

Примљено: 11. 02. 2015.			
Орг.јед.	Б р о ј	Прилог	Вреднос.
06	1751		

**НАУЧНО-НАСТАВНОМ ВЕЋУ
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА У НИШУ
ОДБОРУ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКЕ СТУДИЈЕ**

Предмет: Реферат комисије и оцена израђене докторске дисертације асист. Владимира Петровића

Одлуком Наставно-научног већа Медицинског факултета Универзитета у Нишу бр. 04-ММ-21/06, донетој на седници одржаној дана 12. 1. 2015. год., а по предлогу Одбора за последипломске студије, прихваћен је извештај ментора, доц. др Александра Петровића, о израђеној докторској дисертацији асист. Владимира Петровића из Ниша, студента ДАС-молекуларна медицина, под одобреним насловом: „Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“ и именовани су чланови комисије за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

- 1) Проф. др Иван Николић, председник
- 2) Проф. др Верица Аврамовић, члан
- 3) Проф. др Драган Михаиловић, члан
- 4) Проф. др Златибор Анђелковић, члан са МФ у Приштини са седиштем у Косовској Митровици
- 5) Доц. др Александар Петровић, ментор и члан.

У складу са горе наведеном Одлуком, а након детаљног прегледа споменуте докторске дисертације, Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

I Општи подаци

Докторанд, Владимир Петровић, доктор медицине, асистент у настави на Катедри за хистологију и ембриологију, Медицинског факултета у Нишу, обавио је своје последипломско истраживање посвећено изради докторске дисертације под насловом: „Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“, на Медицинском Факултету у Нишу, при Центру за патологију и патолошку анатомију Клиничког Центра у Нишу, као и у лабораторијама Катедре за хистологију и ембриологију. За примену истраживачке методологије на архивском патохистолошком материјалу, има одобрење Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу (решење број: 01-9337-8/1; од 3.11.2014. год.)

На основу одлука Наставно-научног већа Медицинског факултета у Нишу (од 5 фебруара 2014. год., бр. 04-ММ-21/06; од 4. јула 2014. год., бр. 14-5377-4), Сагласности Научно-стручног већа за медицинске науке Универзитета у Нишу (од 6. маја 2014., бр. 8/19-01-003/14-034) и решења продекана за последипломске студије МФ-Ниш (од 21 маја 2014. год., бр. 04-ММ-21/06; од 24. јула 2014. год., бр. 04-4839-2), у својству именованог ментора студенту докторских академских студија молекуларне медицине, Владимиру Петровићу, при изради докторске дисертације под насловом: „Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“.

II Однос докторске дисертације према пријави и одобрењу теме

Докторска дисертација је урађена у предвиђеном временском року и у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријаве теме, а наслов тезе одговара садржају израђене дисертације. Током израде докторске дисертације није било одступања од постављених циљева, а методологија је изведена према планираном.

Кандидат је објавио један рад из уже научне области доктората, *Petrović V, Stefanović V. Dental Tissue - New Source for Stem Cells. Scientific World Journal 2009; 9: 1167-1177. IF: 1.658 (M21)*, који се тиче „пластицитета“ и индуцибилности мезенхимских ћелијских популација људског организма у циљу њихове изолације, редиференцијације и клоналне експанзије ка биоинжењерски погодним фенотиповима погодним за терапијску употребу у савременој „реконструктивној медицини“.

III Технички опис докторске дисертације

Докторска дисертација асистента Владимира Петровића написана је на 146 страна и према препорукама Наставно-научног већа Медицинског факултета у Нишу број 14-1904/3. Споменута докторска дисертација се састоји из 9 поглавља под насловима: Увод, Преглед литературе, Радна хипотеза, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература. Документација доктората садржи 16 композита оригиналних микрофотографија, 2 шематска приказа, и 265 литературних навода у вези са темом истраживања.

IV Садржајна структура докторске дисертације

У **Уводу** доктората истакнути су концептуални и практични проблеми везани за настанак, раст и организацију различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже, као једне од најчешћих неопластичних алтерација човека, а у светлу нормалних и епително-стромалних односа при неопластичној алтерацији интегументума.

Преглед литературе, даје увид у досадашње научно-стручне налазе везане за организацију коже, њених епителних и стромалних компоненти, које могу бити повезане са етиопатогенетским механизмима настанка, раста и биолошке агресивности базоцелуларних карцинома коже, кроз њихову припадност одређеном патохистолошком типу, и односу туморских епителних ћелија према улози туморске строме у развоју неоплазми. Преглед литературе везан за организацију туморске строме базоцелуларних карцинома коже обављен је свеобухватно, кроз литературне наводе који су споменути феномен приказали кроз различите истраживачке методе и различите аспекте испитиваних типова базоцелуларног карцинома коже човека, али је централно место дато, пореклу ћелија туморске строме, фибробластима туморске строме, као и молекуларним показатељима морфолошке и друге истраживачке детекције мезенхимских мултипотентних ћелија.

Радна хипотеза је изнета кроз очекивање разлика по питању хистохемијских и имунохистохемијских показатеља епително-стромалних односа између различитих хистолошких форми базоцелуларног карцинома коже човека.

Према познатим литературним подацима постављена је следећа хипотеза у истраживању: Код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека (суперфицијални, солидно/цистични, нодуларни, инфилтративни, базосквामозни) постоје разлике у имунохистохемијском маркирању антигена *CD34*, *CD90* и *Erp-CAM* у туморској строми и епителним структурама. Осим овога, претпостављамо да постоје разлике између имунохистохемијског маркирања између наведених типова базоцелуларног карцинома и њима припадајуће перитуморске коже.

Четврто поглавље носи назив, **Циљ истраживања** и децидно истиче своју следећу садржину:

- 1) Евидентирати имунохистохемијско присуство и морфолошку дистрибуцију антигена *CD34* и *CD90*, у везивоткивним, васкуларним, нервним и епидермалним структурама различитих патохистолошких типова базоцелуларних карцинома и припадајуће перитуморске коже човека.
- 2) Имунохистохемијско испитивање топографске дистрибуције антигена *Ep-CAM*, у епителним структурама базоцелуларних карцинома, различитих патохистолошких типова и у структурама припадајуће перитуморске коже.
- 3) Одредити микротопографску колокализованост имунохистохемијске присутности антигена *Ep-CAM*, *CD34* и *CD90* код испитиваних патохистолошких типова базоцелуларних карцинома коже човека, а унутар њихових туморских региона: површинском, средишњем, бочном и дубинском, као и у припадајућој перитуморској кожи биопсијског узорка.

Поглавље **Материјал и методе**, садржи детаљан опис узорковања испитиваних биопсијских узорака коже човека са различитим патохистолошким типовима базоцелуларног карцинома и њихову обраду до парафинских калупа у Центру за патологију Клиничког Центра – Ниш; и извођења хистохемијских, имунохистохемијских, метода истраживања на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу. Групе истраживања су оформљене према следећим патохистолошким типовима базоцелуларног карцинома коже: 1) БцКК **солидног (циркумскриптног) типа** ($n=20$), 2) БцКК **нодуларног типа** ($n=20$), 3) БцКК **инфилтративног типа** ($n=20$), 4) БцКК **суперфицијалног типа** ($n=20$) и 5) БцКК **базосквामозног типа** ($n=20$). На Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу, а на испитиваним узорцима тумора, изведена је *En Vision* имунохистохемијска метода приказивања антигена *CD34*, *CD90* и *Ep-CAM (BerEP4)*, као и хистохемијско бојење модификованом Моватовом пентахромском методом. На Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу употребом микроскопа *Olympus BX50*, опремљеног дигиталном камером *Leica DFC 295*, начињене су колор микрофотографије испитиваних случајева базоцелуларних карцинома коже човека, под различитим повећањима од $\times 40$ до $\times 2000$. У четири основна топографска региона сваког од испитиваних тумора (површинског, средишњег, дубоког и бочног) извршена је светлосномикроскопска и дескриптивна анализа, као и корелација са бројним другим значајним показатељима туморског раста, инвазивности, диференцијације, као и стромално-епителним односима.

Поглавље **Резултати**, је организовано дидактички у већи број хијерархијски одређених целина, а са основном поделом на потпоглавља: Суперфицијални базоцелуларни карцином коже, Солидно/цистични базоцелуларни карцином коже, Нодуларни базоцелуларни карцином коже, Инфилтративни базоцелуларни карцином коже, Базосквामозни базоцелуларни карцином коже, Перитуморска кожа биопсијских узорака базоцелуларних карцинома. Унутар морфолошких особина сваког од испитиваних типова базоцелуларних карцинома, као и перитуморске коже дата је општа микроморфолошка анализа имунохистохемијске реактивности на антигене *CD34*, *CD90*, *Ep-CAM*, са посебним увидом у ткивне обрасце раста и диференцијације тумора према нормалним и неопластично алтерисаним епително-стромалним односима. Најзначајнији резултати опште морфолошке анализе документовани су са 16 композита оригиналних микрофотографија у боји и пратећим образложењима.

У поглављу **Дискусија**, сви добијени резултати су на адекватан начин објашњени и поткрепљени научним и стручним чињеницама из старијих и савременијих, као и страних и домаћих истраживања. Дискусија садржи компарацију добијених резултата са резултатима других аутора са истицањем одсуства директне и очигледне везе између морфологије испитиваних тумора и њихове биолошке агресивности, уз разматрање и показатеља организације епително-стромалних односа у перитуморској кожи.

У поглављу, **Закључак**, таксативно су изведене закључне информације које произилазе из добијених резултата, а у складу са постављеним циљевима истраживања:

1. Базалиомске ћелије туморских гнезда испитиваних типова базоцелуларних карцинома коже (солидно/цистични, суперфицијални, нодуларни, инфилтративни и базосквामозни) показују одсуство имунохистохемијског обележавања на антигене *CD34* и *CD90*, док је имунохистохемијска реактивност према антигену *Ep-CAM* присутна на мембранама базалиомских ћелија свих испитиваних типова базоцелуларних карцинома коже са тенденцијом пада интензитета маркираности до потпуног губитка на местима сквामозне цитодиференцијације појединачних туморских гнезда.
2. Туморска строма испитиваних патохистолошких типова базоцелуларних карцинома коже показује значајно већи општи степен имунохистохемијске позитивности према антигену *CD90*, у односу на антиген *CD34*, при чему са порастом биолошке агресивности базоцелуларних карцинома коже долази до пораста величине и броја фибробластодних ћелија туморске строме.
3. Специфични образац дистрибуције имунохистохемијске реактивности базоцелуларних карцинома коже према антигенима *CD34* и *CD90*, у првом реду је одређен постојањем различитих видова организације строме тумора и перитуморског региона, почевши од мономорфне организације туморске строме, као код суперфицијалног типа БцКК, или може показати различитост видова везивноткивних морфологија, насталих туморском литичком ремоделацијом делова дерма, појавом дегенерисаних облика везива, као и новостворених типова стромалне организације: аденоидно/миксоидне, мезенхимоидне, индуковане, реактивне, рефракторне, дезмопластичне, атрофично-компримованог фиброзног везивног ткива ретикуларног дерма и соларне еластозе.
4. На основу имунохистохемијског маркирања на антиген *CD34*, перинодуларна туморска строма испитиваних типова базоцелуларних карцинома коже је регион са умерено васкуларном до хиповаскуларне морфологије и са *CD34* негативним везивноткивним ћелијама, док се у интернодуларној туморској строми, која је добро васкуларизована, имунопозитивност чешће уочава у ендотелу, најчешће мањих мишићних артерија, артериола и пратећих венских судова, али фибробласти туморске строме поглавито показују одсуство *CD34* имунопозитивности.
5. Код нодуларног типа базоцелуларног карцинома коже местимично позитивна реакција на антиген *CD34* у фибробластима интернодуларне и перинодуларне туморске строме јавља се као резултат веће хетерогености у неопластичној диференцијацији овога типа карцинома.
6. Имунохистохемијска реактивност према антигену *CD90* код испитиваних типова базоцелуларног карцинома коже маркира туморску строму у целини, при чему је код диферентованијих типова, као што су солидно/цистични и суперфицијални базоцелуларни карцином коже, јачег степена обележавања и присутном миксоидном до индукованом стромом, док код инфилтративних форми (нодуларни, инфилтративни, базосквामозни) задобија општи пад маркираности, уз задржавање позитивности на густо постављеним, крупним перинодуларним фибробластоидним ћелијама туморске строме.
7. У реонима туморских маса базоцелуларног карцинома коже, субепидермално и између места спојева туморских гнезда са покровним епидермом, *CD34* антиген је одсутан са везивноткивних ћелија, приказујући морфолошку слику сличну папиларном дерму перитуморске коже. Споменуто везивно ткиво, у реону тумора, увек је високо *CD90* позитивно и даје јасан контраст према значајно нижој *CD90* позитивности папиларног дерма околне коже.

8. Узани појас коже јукстатуморског региона показује високи степен обележавања на антигене *CD34* и *CD90*, при чему интензитет ове имунохистохемијске реактивности у кратком одсеку према перифернији пада до нивоа интензитета маркираности који преовладава у остатку коже биопсијског узорка. Код диферентованијих типова БцКК (суперфицијалног и солидно/цистичног) ова зона трансформације сачињена је од компримовано-атрофичног фиброзног везивног ткива околног ретикуларног дерма, а код нодуларних, инфилтративних и базосквामозних базоцелуларних карцинома она показује већу ширину са тенденцијом пада њене ограничености и структурисаности.
9. Нормалне епителне структуре коже, епидерм и епител аднекса показују одсуство *CD34* и *CD90* имунохистохемијске реактивности. Изузетак чине ћелије спољашњег омотача невелозних фоликула длаке, које показују интензивну имунопозитивност према антигену *CD34*.
10. *CD34* позитивне фибробластоидне ћелије запажају се у периаднексалном дерму око мешкова лојних жлезда, секретоних клупка мерокриних знојних жлезда, око истмичног и инфундибуларног дела фоликула длаке, око пилосебацеалног канала, као и у перимизијуму мишића кострешника. *CD34* имунопозитивност је присутна и на појединачним фибробластима ретикуларног дерма морфолошки нормалне коже.
11. Фибробласти периаднексалног дерма су *CD90* имунопозитивни око секретоних клубади знојних жлезда, уз пилосебацеалне канале и истмичне регије фоликула длаке, док је значајно слабија експресија, до потпуног одсуства око мешкова лојних жлезда, папила булбуса фоликула длаке и изводних канала знојних жлезда.
12. Фибробласти интерфасцикуларне зоне ретикуларног дерма показују интензивну имунохистохемијску реактивност према антигену *CD34* и слабију, до потпуног одсуства, према антигену *CD90*.
13. Интерстицијално, између примарних снопова фасцикулуса фиброзног везивног ткива ретикуларног дерма, присутне су *CD34* позитивне влакнасте структуре, које највероватније припадају фибробластима васкуло-еластичне интерфасцикуларне зоне ретикуларног дерма.
14. Епителне ћелије секретоних клубади знојних жлезда показују мембранску имунохистохемијску позитивност на антиген *Ep-CAM*. У ближем реону туморских маса антиген *Ep-CAM* уочава се и на мембранама епителних ћелија спољашњег омотача длаке.
15. Једина микроскопска колокализација у нормалној кожи антигена *CD34* и *CD90* са присуством сулфатисаних гликозаминогликана, обележених алцијан плавом, су периаднексални дерм и део придруженог интермедијарног дерма око и између истмичног региона фоликула длаке и изводних канала себацеалних жлезда.
16. Употреба хистохемијских метода за светлосномикроскопско доказивање сулфатисаних гликозаминогликана у дубљим деловима ретикуларног дерма или хиподерма повећава уочљивост распрострањености туморских гнезда и може имати непосредни дијагностички значај у одређивању степена одстрањености туморских маса инфилтративних и базосквामозних типова базоцелуларног карцинома коже човека, будући да туморска гнезда ране инфилтрације минималног ћелијског броја бивају праћена повећањем споменутих састојака екстрацелуларног матрикса.

V Оцена научног доприноса докторске дисертације

Докторска дисертација, асистента Владимира Петровића под називом: «Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека», представља оригиналан научно-истраживачки рад са значајним научним доприносом у области Хистологија и ембриологија. Дисертација је урађена по свим принципима научно-истраживачког рада, са добро дефинисаним циљевима, адекватном методологијом и закључцима који су у складу са постављеним циљевима. Методологија је дата до практичних детаља и у таквом облику може бити применљива на ткивним узорцима неопластичних алтерација коже или других органа. Докторска дисертација асистента Владимира Петровића написана је јасним и прецизним стилем, и пружа инвентивни и иновативни увид у тему истраживања. Ово истраживање анализира значај епително-стромалних односа испитиваних тумора као и њихове биолошке агресивности. Добијени резултати би могли да нађу примену и у свакодневној дијагностичкој патохистолошкој пракси, при процени биолошког потенцијала базоцелуларних карцинома коже, а методолошки приступ, у другим морфолошким истраживањима неопластичних лезија.

VI Оцена кандидата

Кандидат, асист. Владимир Петровић, показао је познавање правилне употребе стандардних методолошких поступака у извођењу научно-истраживачког рада, правилног разврставања и анализе добијених истраживачких резултата, употребе стручне и научне литературе, адекватног тумачења сопствених и научно-истраживачких резултата других аутора, са коначним извођењем закључака спроведеног истраживања. Својим инвентивним и иновативним радом у оквирима своје докторске дисертације, асист. Владимир Петровић, допринео је новим погледом у анализи питања епително-стромалних односа код различитих патохистолошких типова базоцелуларних карцинома и перитуморске коже човека.

VII Применљивост и корисност резултата

Докторска дисертација асистента Владимира Петровића, садржи истраживачке резултате који би могли да нађу примену у свакодневној дијагностичкој патохистолошкој пракси, при процени биолошког потенцијала базоцелуларних карцинома коже, а дати резултати би могли да буду применљиви при наредним истраживањима различитих неопластичних алтерација коже или других органа. Инвентивним и иновативним радом у оквирима своје докторске дисертације, асистент Владимир Петровић, допринео је новим погледом у анализи питања епително-стромалних односа код различитих патохистолошких типова базоцелуларних карцинома и перитуморске коже човека.

На основу изнетих чињеница, Комисија доноси следећи

ЗАКЉУЧАК

Докторска дисертација асист. др Владимира Петровића, под насловом: „Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“, представља оригинални научно-истраживачки рад са актуелним приступом теоријским и практичним питањима везаним за разумевање ентитета туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома, као и везивоткивних структура нормалне коже, са освртом на морфолошке показатеље неопластичне алтерације стромално-епителних односа. Докторска дисертација, садржи преглед савремене научне литературе, јасно и прецизно дефинисане циљеве, стручно примењену модерну методологију, систематизовани приказ добијених резултата и коначно, закључке, који одговарају постављеним циљевима истраживања.

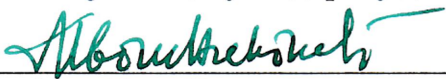
Стручни и научни допринос докторске дисертације асист. др Владимира Петровића огледа се у могућности примене њених резултата у свакодневној пракси патохистолошке дијагностике, даљим истраживањима етиопатогенезе и биолошког потенцијала различитих типова базоцелуларног карцинома коже човека, као и у изградњи нових дидактичких ставова везаних за хистолошку грађу нормалне коже човека.

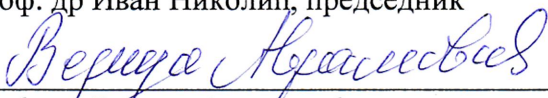
Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује израђену докторску дисертацију кандидата асист. др Владимира Петровића под насловом:

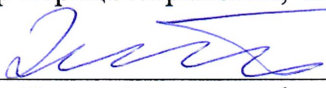
„Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“

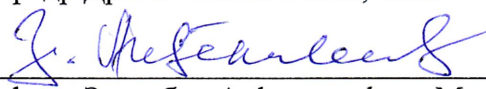
и предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Нишу да усвоји позитивну оцену ове докторске дисертације и одобри докторанту Владимиру Петровићу јавну одбрану дисертације.

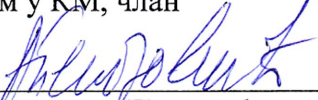
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:


Проф. др Иван Николић, председник


Проф. др Верица Аврамовић, члан


Проф. др Драган Михаиловић, члан


Проф. др Златибор Анђелковић, са Медицинског факултета у Приштини са седиштем у КМ, члан


Доц. др Александар Петровић, ментор и члан

Главни научни допринос докторске дисертације

У докторској дисертацији асист. Владимира Петровића, под насловом: „Светлосномикроскопска и имунохистохемијска студија организације туморске строме код различитих патохистолошких типова базоцелуларног карцинома коже човека“, могуће је издвојити следеће главне научне доприносе:

- 1) Оригинални допринос у светлосномикроскопској детекцији дистрибуције имунохистохемијског присуства антигена *CD90* у епителним и стромалним компонентама различитих типова базоцелуларног карцинома и перитуморске коже.
- 2) Унапређење приступа дидактичком светлосномикроскопском тумачењу морфологије *CD34* имунопозитивности у хистолошким структурама нормалне коже, са посебно оригиналним налазом могућег присуства ћелијских *CD34* позитивних продужетака фибробласта у фасцикулусима фиброеластичне строме ретикуларног дерма.
- 3) Предлог могуће предиктивне улоге хистохемијске детекције сулфатисаних гликозаминогликана у циљу процене степена одстрањености тумора на дубоким маргинама биопсијских узорака коже.

Main scientific contribution of doctor's thesis

Doctoral thesis of teaching assistant Vladimir Petrovic (MD), entitled: "Light microscopic and immunohistochemical study of tumor stroma organization in different histopathological types of basal cell carcinoma in human integument", brings following main scientific contributions:

- 1) Original contribution in light microscopic detection of immunohistochemical distribution of *CD90* antigen in epithelial and stromal components of different types of basal cell carcinoma and peritumoral skin.
- 2) Improvement in the didactical light microscopic approach in interpretation of morphology of *CD34* immunopositivity in histological structures of human skin, with specially original finding of the possible presence of *CD34* positive fibroblast processus in fascicles of fibroelastic stroma in reticular dermis.
- 3) Proposition of possible predictive role of histochemical detection of sulphated glycosaminoglycans in order to evaluate the degree of tumor excision without residues on the deep margins of the skin biopsy specimens.

УКУПАН БРОЈ ПУБЛИКОВАНИХ РАДОВА КАНДИДАТА

Асист. Владимир Петровић је аутор или коаутор 11 научних и стручних радова. Број радова објављених у целини у часописима и зборницима радова са рецензијом је 11, од тога је 8 радова на SCI листи.

Докторант, асист. Владимир Петровић објавио је један рад из уже научне области доктората, *Petrović V, Stefanović V. Dental Tissue - New Source for Stem Cells. Scientific World Journal 2009; 9: 1167-1177. IF: 1.658 (M21)*, који се тиче „пластицитета“ и индуцибилности мезенхимских ћелијских популација људског организма у циљу њихове изолације, редиференцијације и клоналне експанзије ка биоинжењерски погодним фенотиповима погодним за терапијску употребу у савременој „реконструктивној медицини“. Споменути рад је најближе везан за способности мезенхимских/фибробластоидних популација за модулисање свог фенотипског израза и њихово својство да се под „*in vitro*“ условима диферентују и у друге ћелијске фенотипове организма, што улази у оквире „индуцибилности“ коју доноси онкогеназа током алтерације стромално-епителних односа.

У Нишу, 11. фебруар. 2015. год.

Асист. др Владимир Петровић

Dental Tissue – New Source for Stem Cells

Vladimir Petrovic and Vladisav Stefanovic*

University of Nis School of Medicine, 18000 Nis, Serbia

E-mail: vlada@medfak.ni.ac.rs; stefan@ni.ac.rs

Received July 28, 2009; Revised September 24, 2009; Accepted September 24, 2009; Published October 14, 2009

Stem cells have been isolated from many tissues and organs, including dental tissue. Five types of dental stem cells have been established: dental pulp stem cells, stem cells from exfoliated deciduous teeth, stem cells from apical papilla, periodontal ligament stem cells, and dental follicle progenitor cells. The main characteristics of dental stem cells are their potential for multilineage differentiation and self-renewal capacity. Dental stem cells can differentiate into odontoblasts, adipocytes, neuronal-like cells, glial cells, osteoblasts, chondrocytes, melanocytes, myotubes, and endothelial cells. Possible application of these cells in various fields of medicine makes them good candidates for future research as a new, powerful tool for therapy. Although the possible use of these cells in therapeutic purposes and tooth tissue engineering is still in the beginning stages, the results are promising. The efforts made in the research of dental stem cells have clarified many mechanisms underlying the biological processes in which these cells are involved. This review will focus on the new findings in the field of dental stem cell research and on their potential use in the therapy of various disorders.

KEYWORDS: dental stem cells, multilineage differentiation, odontogenesis, neural disease, tooth tissue engineering

INTRODUCTION

The discovery of progenitor/stem cells was a giant breakthrough in medicine and opened the door for a whole new era of experimentation, with their potential use in the therapy of various disorders. Stem cells are defined as clonogenic cells capable of both self-renewal and multilineage differentiation[1]. According to the ability and potency to differentiate into different cellular types, three types of stem cells have been established: (1) totipotent stem cells – each cell has the capability of developing into an entire organism, (2) pluripotent stem cells – embryonic stem cells that were grown *in vivo* under induced conditions and are capable of differentiating into all types of tissue, and (3) multipotent stem cells – postnatal stem cells or adult stem cells with the capability of multilineage differentiation[2].

Postnatal stem cells have been isolated from various organs, including dental tissue[3]. So far, five types of dental stem cells have been identified: dental pulp stem cells (DPSC), stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED), stem cells from apical papilla (SCAP), periodontal ligament stem cells (PDLSC), and dental follicle progenitor cells (DFPC)[4,5,6,7,8]. Dental stem cells belong to the multipotent stem cell population[9].

*Corresponding author.

©2009 with author.

Published by TheScientificWorld; www.thescientificworld.com

This paper will focus on the characteristics of dental stem cells, as well as on their potential use for therapeutic purposes.

CHARACTERISTICS OF DENTAL TISSUE STEM CELLS

Dental Pulp Stem Cells

The presence of stem cells in dental pulp was proposed by Fitzgerald et al.[10]. They reported the presence of the fibroblast-like cells capable of differentiation into odontoblasts, after the injury or trauma that led to the death of the mature odontoblasts. However, the identification and isolation of DPSC in the adult dental pulp was first reported by Gronthos and coworkers in 2000[4].

The DPSC represent less than 1% of the total cell population present in dental pulp[11]. It is believed that these cells reside in the various regions inside the dental pulp. In adult dental tissue, the stem cell niches are usually quiescent and become activated only after injury[12]. There is some evidence for a role of notch signaling in DPSC differentiation and proliferation[14,15], and labeling studies have found that the odontoblast-subodontoblast layer expresses higher levels of Notch 1, while the pulp proper predominantly expresses Notch 2, and DPSC in perivascular regions show increases in Notch 1 and 3[11,13,14,15].

Previous attempts to isolate and characterize clonal stem cell lines in dental pulp reported the presence of STRO-1–positive cells, with high colony-forming efficiency. These cells were positive for vascular cell markers CD146 and pericyte antigen 3G5[5,16]. The stem cell clone from dental pulp that expressed CD34 and the putative stem cell proto-oncogene marker c-kit, with the capability of differentiation toward stromal lineages, especially osteoblasts, was recently isolated[17,18]. A side cell population, which fails to incorporate the DNA binding dye Hoechst 33342 with stem cell characteristics, has also been isolated from dental pulp[19].

However, the later studies focusing on DPSC odontogenic and proliferative potential reported different results after the implantation of the single-cell colonies of DPSC isolated from the adult dental pulp[3,20]. These differences could be explained by the findings that there is more than one stem cell population in the dental pulp. So far, at least two different stem cell populations were identified, one originating from the neural crest (the derivative of ectomesenchyme) and the other of mesenchymal origin[12].

Both clonal stem cell populations show expression of STRO-1 and classical adult stem cell markers, as well as of Msx-1 and CD31. Also, all cells were positive for vimentin, which proves their mesenchymal origin. Cells of mesenchymal origin were strongly positive for β 1-integrin, which interacts with fibronectin (FBN) of the extracellular matrix in dental pulp, and these cells are referred as +FBN, while the cells originating from the neural crest showed high expression of neural crest–associated low-affinity nerve growth factor receptor (+LANGFR cells). Compared to +LANGFR cells, +FBN cells did not show the expression of endothelial cell markers CD105 and Notch2, and it is thought that these cells reside in the stem cell niches outside the perivascular regions[9,12]. It is thought that only STRO-1–positive cells have the capability of differentiating into odontoblastic lineage[9].

The results are, however, inconclusive. The work in isolation of different stem cell populations in dental pulp is still in the beginning stages. The difficulty lies in the lack of specific cell surface markers.

DPSC and bone marrow–derived stem cells (BMDSC) show similar gene expression for more than 4000 genes, with only a few differentially expressed genes. A few differentially expressed genes, including collagen type XVIII α 1, insulin-like growth factor-2 (IGF-2), discordin domain tyrosine kinase 2, NAD(P)H menadione oxidoreductase, homolog 2 of *Drosophila* large disk, and cyclin-dependent kinase 6, were highly expressed in DPSC, whereas insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7) and collagen type I α 2 were more highly expressed in BMDSC[21]. DPSC show a 30% higher proliferation rate than BMDSC under the same culture conditions, probably because of strong expression of cyclin-dependent kinase 6, a cell cycle activator[21].

The studies showed that DPSC can be cryopreserved and retain their multipotential differentiation ability[22]. These cells, under the right conditions, have better immunoregulatory capacity that abolishes T-cell alloreactivity than BMDSC. However, DPSC may not elicit humoral immune responses and may thus be immunoprivileged[23,24].

The proliferation and differentiation of DPSC usually occur after infection or injury of the dental pulp during bacterial infection. The studies showed that local dentin pulp inflammation interfered with odontoblast differentiation and dentin repair. It was reported that lipopolysaccharide (LPS), a major component of the outer membrane of bacteria, and tumor necrosis factor (TNF), abundantly present in the inflamed dental pulp tissue, activate NF- κ B signaling pathway in DPSC. NF- κ B regulates the expression of a variety of inflammatory cytokines, including TNF, IL-1, IL-8, and IL-6. These results suggest that DPSC also have a role in inhibiting oral and dental inflammation[25].

Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth

SHED were isolated from dental pulp derived from exfoliated deciduous teeth. Compared to DPSC, SHED show a higher proliferation rate, increased cell-population doublings, sphere-like cell-cluster formation, osteoinductive capacity *in vivo*, and failure to reconstitute a complete dentin pulp-like complex. SHED were found to express the cell surface molecules STRO-1 and CD146, two early mesenchymal stem cell markers previously found to be present in BMDSC and DPSC. STRO-1- and CD146-positive cells were found to be located around blood vessels of the pulp, implying that SHED possibly originate from a perivascular microenvironment. Cultured SHED also express stromal- and vascular-related markers: antialkaline phosphatase (ALP), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), basic fibroblast growth factor (bFGF), and endostatin[7].

These cells have the ability to differentiate into odontoblast-like cells and the regenerated dentin shows immunoreactivity to dentin-specific dentin sialophosphoprotein (DSPP) antibody. Also, SHED are capable of inducing recipient murine cells to differentiate into bone-forming cells. SHED expressed a variety of neural cell markers, including nestin, β III-tubulin, glutamic acid decarboxylase (GAD), neuronal nuclei (NeuN), 2,3-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase (CNPase), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and neurofilament M (NFM). They have the ability to transform into neuronal-like cells, glial cells, but also into adipocytes and chondrocytes[7,26].

SHED probably represent a population of more immature multipotent stem cells than DPSC.

Stem Cells from Apical Papilla

SCAP appear to be a different population of stem cells from DPSC. In developing teeth, root formation starts as the epithelial cells from the cervical loop proliferate apically, and influence the differentiation of odontoblasts from undifferentiated mesenchymal cells and cementoblasts from follicle mesenchyme. It has been known that the dental papilla contributes to tooth formation and eventually converts to pulp tissue[27,28,29]. As the root continues to develop after the bell stage, the location of the dental papilla becomes apical to the pulp tissue.

SCAP show a two- to threefold higher proliferation rate than do DPSC after the BrdU incorporation. SCAP, similar to DPSC, are more committed to osteo/dentinogenicity. Despite that SCAP express many osteo/dentinogenic markers following *ex vivo* expansion, they express lower levels of DSPP, MEPE, transforming growth factor (TGF) β R11, fibroblast growth factor (FGF)R3, and CD146 than do DPSC. The *in situ* immunohistochemical staining of various osteo/dentinogenic markers revealed that only odontoblasts in the pulp express these genes, not in the apical papilla. Their adipogenic aspect of the multipotentiality was also confirmed[30].

SCAP exhibit a heterogeneous nature by showing (1) coexpression of STRO-1 with a variety of osteo/dentinogenic markers and (2) a low percentage of STRO-1-positive cells, while a high percentage

of cells positive with osteo/dentinogenic markers in cultures. In addition, SCAP show a positive staining for several neural markers, including β III-tubulin, GAD, NeuN, nestin, GFAP, NFM, neuron-specific enolase (NSE), and CNPase. It is possible that SCAP are derived from neural crest cells or at least associated with neural crest cells, analogous to dental stem cells such as DPSC and SHED[30,31].

The discovery of SCAP may also explain a clinical phenomenon, apexogenesis, that can occur in infected immature permanent teeth with periradicular periodontitis or abscess[32]. It is likely that stem cells residing in the apical papilla survived the infection due to their proximity to the periapical tissues. Therefore, after endodontic disinfection, under the influence of the survived Hertwig's epithelial root sheath (HERS), these cells give rise to primary odontoblasts to complete the root formation[30,31].

Periodontal Ligament Stem Cells

The periodontal ligament (PDL) is a specialized connective tissue derived from the dental follicle and originates from neural crest cells. The PDL connects the cementum to the alveolar bone, and functions primarily to support the tooth in the alveolar socket[33,34].

A recent report identified stem cells in human PDL and found that PDLSC implanted into nude mice generated cementum/PDL-like structures that resemble the native PDL as a thin layer of cementum that interfaced with dense collagen fibers, similar to Sharpey's fibers[3]. These cells can also differentiate into adipocytes, odontoblasts, myotubes, NFM-positive neuron-like cells, GFAP-positive astrocyte-like cells, and CNPase-positive oligodendrocyte-like cells[7,35,36].

PDLSC and DPSC both showed similar characteristics as compared to BMDSC. All cell types were strongly positive for CD44, CD90 (cell surface markers associated with stromal cells), CD105, and CD166 (cell surface markers associated with stromal cells and endothelial cells), but negative for CD40, CD80, and CD86 (cell surface markers of hematopoietic cells)[37].

PDLSC and DPSC expressed HLA-ABC (MHC class I antigen) similar to BMDSC, while HLA-DR (MHC class II antigen) expression was not detected in these cell populations[37].

Ex vivo expanded PDLSC and DPSC possess immunosuppressive properties and mediate suppression mainly by soluble factors, partly induced by IFN- γ produced by activated peripheral blood mononuclear cells (PBMNC). Inhibitory factors include indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) that is dependent on IFN- γ produced by PBMNC, TGF- β 1 and hepatocyte growth factor (HGF) that are independent on IFN- γ [37].

The possibility of obtaining stem cells from cryopreserved adult human PDL[38] indicates that samples from tissue banks could be viable for future applications.

Dental Follicle Progenitor Cells

DFPC are localized in the dental follicle, a mesenchymal tissue that surrounds the tooth germ and can be easily isolated after wisdom tooth extraction[8,39]. However, these cells are available only from patients during wisdom tooth eruption, usually between 15 and 28 years of age[40].

Human DFPC have the ability to differentiate toward alveolar osteoblasts, PDL fibroblasts, cementoblasts, adipocytes, and neuron-like cells[8,39,40,41]. Long-term cultures of DFPC with dexamethasone produced compact calcified nodules or appeared as plain membrane structures of different dimensions consisting of a connective tissue-like matrix encapsulated by a mesothelium-like cellular structure[8]. DFPC differentially express osteocalcin and bone sialoprotein after transplantation in immunocompromised mice, but without any sign of cementum or bone formation. DFPC are fibroblast-like, colony-forming, and plastic-adherent cells[8]. These cells show the expression of putative stem cell markers Notch-1, nestin, and STRO-1[8,39,42]. Compared to BMDSC, DFPC express higher amounts of IGF-2 transcripts[8]. Also, these cells are positive for vimentin, which is a typical marker for mesenchymal cells[39].

DENTINOGENESIS

Odontoblasts are postmitotic, terminally differentiated cells whose main role is the production of primary dentin. Following the primary dentinogenesis, these cells remain functional and are able to produce the physiologically secondary dentin and the tertiary atubular reparative dentin as a response to mild environmental stimuli. However, any greater injury or trauma leads to their death and, consequently, to the loss of the reparative potential of the dental pulp[43]. Therefore, one of the biggest problems in dentistry today is how to restore diseased dental tissue and to save the vitality of the tooth.

It has been reported that bone sialoprotein and dentin matrix components are able to stimulate reparative dentin formation, and that growth factors such as TGF- β and bone morphogenetic proteins (BMP) are capable of stimulating secretion of extracellular matrix by odontoblasts[44,45,46,47]. Also, *in vivo* gene therapy with Bmp11/Gdf11 by ultrasound-mediated gene delivery stimulated reparative dentin formation on the amputated dental pulp[48]. Recently, it was shown that TNF- α stimulates differentiation of dentin pulp cells toward an odontoblastic phenotype via regulation of mitogen activated protein kinase p38[49]. However, the restoration of damaged dentin is still limited to conventional treatments, such as fillings of dental pulp with calcium hydroxide and crown restorations[50,51]. The dental stem cells and their ability to differentiate into functional odontoblasts could be the answer to the problem.

The possible role for DPSC in regeneration is demonstrated by their *in vitro* differentiation into odontoblast-like cells and deposition of mineralized deposits after treatment with dentin matrix extracts in association with a mineralization supplement of β -glycerophosphate and ascorbic acid[52]. DPSC/HE/TCP implants (hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramic powder) were able to induce the production of dentin with organized dentin tubules, unlike DPSC/dentin implants. It has been shown that DPSC and SHED express DSPP in xenogenic transplants, and this expression is not present in bone formed by bone marrow stromal cells in similar transplants, suggesting that the clonogenic dental pulp-derived cells represent an undifferentiated preodontogenic phenotype *in vitro*[53].

The use of DPSC in everyday clinical work is still not possible because some aspects of such a therapeutic approach need to be explored further. The isolation and characterization of stem cells from the vital pulp is neither feasible, nor practical, in clinical work. Tissue engineering with the triad comprising dental pulp progenitor/stem cells, morphogens, and scaffolds may provide a useful alternative method for pulp-capping and root canal treatment[48]. Such approaches to clinical therapies, however, require close control or regulation of the regenerative events. Uncontrolled regeneration would consequently lead to the pulp obliteration and loss of tooth vitality[54].

The studies of the effect of pulp-capping procedures reported the migration of dental pulp cells in the place of the formation of the reparative dentin and dentin bridge[48,54,55,56]. Naturally derived collagen or synthetic materials, such as polyglycolic acid (PGA), are used as a scaffold for attachment and guidance of cells[57]. The pulp-derived fibroblasts adhering to the PGA fibers can proliferate and form a new tissue similar to that of native pulp[58]. The synthetic matrices, however, must undergo degradation simultaneously with the new tissue formation by the cultured cells. The further investigation of DPSC should be focused on finding the appropriate biomaterials that would maximize the migration of these cells into the place of injury. Besides that, the key to successful tissue repair is also angiogenesis. DPSC express CD146 on their surface, the perivascular marker. It was shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) and FGF promote neovascularization of severed human dental pulps[59]. These results could imply the possible application of angiogenic growth factors in dentin matrix[60] and their release after injury, which might be crucial for the local up-regulation of angiogenesis at injury sites.

DENTAL STEM CELLS AND ADIPOGENESIS, CHONDROGENESIS, AND OSTEOGENESIS

Although the interest for DPSC arises mostly for their ability to differentiate into odontoblast-like cells, these cells are multipotent and have the possibility to differentiate into other cell types.

The cultivation of DPSC in potent adipogenic-inductive medium that contained isobutylmethylxanthine, hydrocortisone, and indomethacin induced DPSC to form characteristic oil red O-positive lipid-containing adipocytes[3,61]. This phenotypic conversion also correlated with the expression of the early adipogenic master gene PPAR γ 2 and the late marker lipoprotein lipase. Unlike BMDSC, DPSC failed to differentiate into adipocytes after treatment with glucocorticoids[4]. It is reported that only the CD34⁻ subpopulation of dental pulp cells had the capacity to differentiate into adipocytes, odontoblast-like cells, and to form spheres comprised of cells expressing neural crest stem cell markers and of differentiating into Mart-1-positive melanocytes when grown in melanocyte-inducing medium[62].

DPSC also have the ability to differentiate into chondrocytes. The experiments with side population cells isolated from porcine dental pulp reported the expression of aggrecan and type II collagen mRNA in the culture of these cells, and that almost 30% of cultured dental pulp cells were converted into chondrocytes[21]. Stevens and coworkers showed that human DPSC after cultivation in chondrogenic medium express aggrecan and dental matrix protein-1 (DMP-1), which are both crucial for postnatal chondrogenesis[62,63]. The subcutaneous transplantation of DPSC to 1-day-old Swiss mice is followed by the generation of aggrecan- and Alcian blue-positive cartilage tissue in two out of three mice [62].

The ability of DPSC to produce chips of bone tissue as well as their high proliferative potential makes them good candidates for the study of bone formation[17,64]. DPSC have the ability to differentiate into osteoblasts and endothelial cells, and are capable of forming the woven bone[64]. The osteoblastic potential of these cells was proven by expression of RUNX-2, a transcription factor essential for inducing osteoblast differentiation[18,65] and the endothelial cells were confirmed by the expression of CD54_b, an antigen specifically expressed by endotheliocytes[64,66]. This synergy is most probably mediated by flk-1, which is shown to couple osteogenesis and vasculogenesis after transplantation of bone chips in immunosuppressed rats[18,67].

DENTAL STEM CELLS AND NERVE CELLS

Neuronal stem cells have been isolated from various tissues, including brain, bone marrow, and retina[68,69,70]. The cultivation of these cells in the serum-free culture medium supplemented with epidermal growth factor (EGF) and bFGF leads to the formation of the cellular suspensions called neurospheres[68,71]. Neuronal stem cells have the ability to transform into neurons and glial cells, which is preceded by migration of the cells out of the spheres. Even more, the implantation of grafts of neural stem cells showed promising results as the potential therapy for various disorders of nervous system[72,73]. However, their accessibility and the potential risks for the patients that might occur during their extraction remain a problem.

The fact that dental pulp is derived from the neural crest and that it is shown that dental pulp cells show a high expression of nestin (marker for neural progenitors), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA transcripts opened the possibility of using dental pulp as the possible source for neural progenitors[74,75].

Dental pulp-derived cells promote the survival of sensory neurons of the trigeminal ganglion and of motoneurons of the spinal cord by providing neurotrophic support. Also, the increased survival of the motoneurons in the injured spinal cord after the implantation of the dental pulp cells grafts was reported[76]. NGF, BDNF, and GDNF produced by dental pulp cells promote the survival and neuroprotection of dopaminergic neurons against 6-hydroxy-dopamine *in vitro*[75]. Dental pulp grafted intraocularly led to the increase of density of catecholaminergic nerve fibers in the iris that is, probably, due to the presence of the neurotrophic factors in the anterior chamber of the eye[76,77].

Dental pulp cells from the adult rat incisor in culture have the ability to form neurospheres. The formation and growth of neurospheres is dependent on bFGF, but not on EGF, and is negatively regulated by TGF- β in a dose-dependent manner. Dental pulp-derived neurospheres show limited self-renewal ability[71]. DPSC induced by activators of the protein kinase C (PKC) and the cyclic adenosine

monophosphate (cAMP) give rise to neuronal cells and, in smaller number, to glial cells, which are believed to be substantial for normal development and function of the neurons. These cells express neuronal and glial markers, and display voltage-dependent sodium and potassium currents[78].

Previous studies revealed that DPSC, when transplanted into adult rat/mouse brain, infiltrated into the host nerve tissue and expressed neurospecific markers[5,76]. Also, the transplantation of DPSC into the mesencephalon of a 2-day-old chicken embryo resulted in their differentiation into neuronal-like cells, with expression of neurospecific markers and the ability to produce the sodium currents[79]. It was shown that implantation of DPSC into the hippocampus of mice stimulates proliferation of endogenous neural cells and results in the recruitment of pre-existing nestin(+) neural progenitor cells (NPC) and β III-tubulin(+) mature neurons to the site of the graft[80]. The injection of human neuronal stem cells isolated from the third molars into the dorsolateral striatum of rats inflicted with middle cerebral artery occlusion shows a significant recovery from neurologic dysfunction, which implies a possible therapeutic role of these cells in stroke-inflicted rats[81].

DENTAL STEM CELLS AND TOOTH TISSUE ENGINEERING

Tissue engineering is a potential resolution for tissue/organ replacements and has been made possible by the cooperation of biological and material sciences. The concept involves the use of *ex vivo* expanded cells grown on a support of biocompatible material under appropriate environmental conditions in order to create tissue replacement and living prostheses[9].

Currently, there are two main branches of research of tooth tissue regeneration. The first deals with the restoration of partial tooth damages. This line of research focuses on using existing reparative capacities of the tooth and/or use of tooth-related stem cells for repair of damaged tooth parts. The second line of research focuses on whole tooth regeneration by using stem cells and conventional tissue engineering techniques[82]. The researches concerning the whole tooth regeneration developed into two main directions: (1) *in vitro* cell culture and polymers for *in vivo* implantation and (2) *in vivo* implantation of engineered cells[9]. However, the immune response of the human organism to the implants of dental stem cells is still unknown, and that question should be resolved before any clinical trials.

Now we know that it is possible to regenerate tooth crowns if the appropriate environment is provided, such as *in vitro* organ culture, grafts on chick chorioallantoic membrane, ocular grafts, subcutaneous transplants, or kidney capsules. The other important conditions are to create a three-dimensional (3D) organization of cells, to support the differentiation of these cells, and to avoid the xenograft rejection[9].

The attempts to make a bioroot also showed some promising results. The insertion of hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) blocks containing SCAP and PDLSC into the socket of swine led to the regeneration of the root/PDL complex, over which an artificial dental crown could have been affixed. In this way, engineered bioroots showed lower compressive strength than that of natural swine root dentin, but they were capable of supporting a porcelain crown and resulted in normal functions[83].

The implantation of PDLSC seeded on HA/TCP in surgically created periodontal defects in miniature swine showed their excellent capacity to form bone, cementum, and PDL[84]. These results are promising, bearing in mind that periodontitis is one of the leading causes of tooth loss, especially in the elderly population[85].

A dentin pulp-like structure was obtained after the subcutaneous transplantation of DPSC/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. Transplanted samples revealed the formation of osteodentin-like structures, as well as tubular bilayered structures of vertically aligned parallel tubules resembling tubular-like dentin[86].

Toothlike structures can be created from biodegradable polymer scaffolds (collagen-coated polyglycolic acid, calcium phosphate material, collagen sponges) seeded with dissociated single-cell suspension obtained from pig, rat, or mice tooth germs and grown in the omentum of

immunocompromised mice. The obtained structures contain enamel, dentin, and pulp, but are still missing some essential elements, such as the complete root and periodontal tissues that allow correct anchoring into the alveolar bone, and do not reach the expected size or shape of the scaffold[87,88,89].

Recently, a new approach was proposed for growing teeth in the mouse mandible[90]. In this study, epithelial and mesenchymal cells were sequentially seeded into a collagen gel drop and then implanted into the tooth cavity of adult mice. With this technique, the presence of all dental structures, such as odontoblasts, ameloblasts, dental pulp, blood vessels, crown, PDL, root, and alveolar bone, could be observed[90]. Cell-scaffold constructs in a coculture system appeared to improve the tooth shape control. PGA mesh and latter collagen sponge, together with the sequential seeding of dental mesenchyme in direct contact with dental epithelium, demonstrated organized tooth structures derived from dissociated postnatal canine and porcine molar tooth germs[91,92].

DPSC have been used for partial tooth structures, but not a whole biological tooth germ. Because of the limited *in vitro* expansion ability of DPSC, SHED, and other dental stem cells, efforts have been directed toward establishing cell lines: several lines have been created by the insertion of transgenes, including human telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen, and human papillomavirus genes, or by the spontaneously immortalization of dental follicle cells, cementoblasts, dental papilla, PDL, cervical loop epithelium, ameloblast, and odontoblast lineage cells[9]. One of the major technical advantages is that cells can be produced, characterized, and controlled relatively easily without the need to derive material repeatedly from primary tissue[9]. These lines could therefore be used for generating dental structures *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant, No 145004, from the Ministry of Science and Technological Development of Serbia. The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

- Weissman, I.L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157–168.
- Wagers, A.J. and Weissman, I.L. (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639–648.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Gehron Robey, P., and Shi, S. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **81**, 531–535.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13625–13630.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5807–5812.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., and Huang, G.T. (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.* **34**, 166–171.
- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Roby, P.G., Wang, C.Y., and Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149–155.
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., and Hoffmann, K.H. (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* **24**, 155–165.
- Yen, A.H.H. and Sharpe, P.T. (2008) Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* **331**, 359–372.
- Fitzgerald, M., Chiego, J.D., and Heys, D.R. (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch. Oral Biol.* **35**, 707–715.
- Sloan, A.J. and Waddington, R.J. (2009) Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int. J. Paediatr. Dent.* **19**, 61–70.
- Waddington, R.J., Youde, S.J., Chi, P.L., and Sloan, A.J. (2009) Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs* **189**, 268–274.
- Lovschall, H., Tummers, M., Thesleff, L., Fuchtbauer, E.M., and Poulsen, K. (2005) Activation of the Notch signalling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur. J. Oral Sci.* **113**, 312–317.
- He, F., Yang, Z., Tan, Y., Yu, N., Wang, X., Yao, N., and Zhao, J. (2009) Effects of Notch ligand Delta1 on the proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* **54**, 216–222.

15. Zhang, C., Chang, J., Sonoyama, W., Shi, S., and Wang, C.Y. (2008) Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling. *J. Dent. Res.* **87**, 250–255.
16. Shi, S. and Gronthos, S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 696–704.
17. Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., d'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., Gombos, F., Caruso, F., Guida, L., Rullo, R., Menditti, D., and Papaccio, G. (2006) In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J. Craniofac. Surg.* **17**, 511–515.
18. Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. (2005) A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1394–1402.
19. Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Tomokiyo, A., Matsushita, K., and Nakashima, M. (2006) Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* **24**, 2493–2503.
20. Toclès, O., Laurent, P., Zygouritsas, S., Burger, A.S., Camps, J., Dejou, J., and About, I. (2005) Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch. Oral Biol.* **50**, 103–108.
21. Shi, S. (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* **29**, 532–539.
22. Papaccio G., Graziano, A., d'Aquino, R., Graziano, M.F., Pirozzi, G., Menditti, D., De Rosa, A., Carinci, F., and Alviano, F. (2006) Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSC) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J. Cell. Physiol.* **208**, 319–325.
23. Caplan, A.I. and Bruder, S.P. (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259–264.
24. Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., and Bagnara, G.P. (2005) Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **80**, 836–842.
25. Chang, J., Zhang, C., Tani-Ishii, N., Shi, S., and Wang, C.Y. (2005) NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J. Dent. Res.* **84**, 994–998.
26. Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., and Bessho, K. (2009) Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **67**, 501–506.
27. D'Souza, R. (2002) Development of the pulpodentin complex. In *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Hargreaves, K.M. et al., Eds. Quintessence Publishing, Carol Stream, IL.
28. Linde, A. and Goldberg, M. (1993) Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 679–728.
29. Ruch, J.V., Lesot, H., and Begue-Kirn, C. (1995) Odontoblast differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 51–68.
30. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., and Huang, G.J.T. (2008) Characterization of apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth – a pilot study. *J. Endod.* **34**, 166–171.
31. Huang, G.T.J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., and Shi, S. (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J. Endod.* **34**, 645–651.
32. Chueh, L.H. and Huang, G.T. (2006) Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J. Endod.* **32**, 1205–1213.
33. Coura, G.S., Garcez, R.C., Mendes de Aguiar, C.B.N., Alvarez-Silva, M., Magini, R.S., and Trentin, A.G. (2008) Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J. Periodont. Res.* **43**, 531–536.
34. Mao, J.J., Giannobile, W.V., Helms, J.A., Hollister, S.J., Krebsbach, P.H., Longaker, M.T., and Shi, S. (2006) Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J. Dent. Res.* **85**, 966–979.
35. Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C., and Robey, P.G. (2002) Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat. Biotechnol.* **20**, 587–591.
36. Techawattanawisal, W., Nakahama, K., Komaki, M., Abe, M., Takagi, Y., and Morita, I. (2007) Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 917–923.
37. Wada, N., Menicanin, D., Shi, S., Bartold, P.M., and Gronthos, S. (2009) Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell. Physiol.* **219**, 667–676.
38. Seo, B., Miura, M., and Sonoyama, W. (2005) Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J. Dent. Res.* **84**, 907–912.
39. Morsezeck, C., Völlner, F., Saugspier, M., Brandl, C., Reichert, T.E., Driemel, O., and Schmalz, G. (2009) Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin. Oral Invest.* [Epub ahead of print]
40. Morsezeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E., Völlner, F., Gallier, K., and Driemel, O. (2008) Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin. Oral Invest.* **12**, 113–118.
41. Yao, S., Pan, F., Prpic, V., and Wise, G.F. (2008) Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J. Dent. Res.* **87**, 761–771.

42. Kemoun, P., Laurencin-Dalicioux, S., Rue, J., Farges, J.C., Gennero, I., Conte-Auriol, F., Briand-Mesange, F., Gadelorge, M., Arzate, H., Narayanan, A.S., Brunel, G., and Salles, J.P. (2007) Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* **329**, 283–294.
43. Smith, A.J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J.V., and Lesot, H. (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 273–280.
44. Decup, F., Six, N., Palmier, B., Buch, D., Lasfargues, J.J., and Salih, E. (2000) Bone sialoprotein induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin. Oral Invest.* **4**, 110–119.
45. Smith, A.J. and Lesot, H. (2001) Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **12**, 425–437.
46. Sloan, A.J. and Smith, A.J. (1999) Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch. Oral Biol.* **44**, 149–156.
47. Sloan, A.J., Rutherford, R.B., and Smith, A.J. (2000) Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Arch. Oral Biol.* **45**, 173–177.
48. Nakashima, M., Tachibana, K., Iohara, K., Ito, M., Ishikawa, M., and Akamine, A. (2003) Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum. Gene Ther.* **14**, 591–597.
49. Paula-Silva, F.W.G., Ghosh, A., Silva, L.A.B., and Kapila, Y.L. (2009) TNF- α promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J. Dent. Res.* **88**, 339–344.
50. Baum, B.J. and Mooney, D.J. (2000) The impact of tissue engineering on dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* **131**, 309–318.
51. Kaigler, D. and Mooney, D. (2001) Tissue engineering's impact on dentistry. *J. Dent. Educ.* **65**, 456–462.
52. Liu, J., Jin, T., Ritchie, H.H., Smith, A.J., and Clarkson, B.H. (2005) In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **41**, 232–238.
53. Shi, S., Bartold, P.M., Miura, M., Seo, B.M., Robey, P.G., and Gronthos, S. (2005) The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod. Craniofacial. Res.* **8**, 191–199.
54. Sloan, A.J. and Smith, A.J. (2007) Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* **13**, 151–157.
55. Putnam, A.J. and Mooney, D.J. (1996) Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat. Med.* **2**, 824–826.
56. Mooney, D.J., Powell, C., Piana, J., and Rutherford, B. (1996) Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol. Prog.* **12**, 865–868.
57. Murray, P.E., Stanley, H.R., Matthews, J.B., Sloan, A.J., and Smith, A.J. (2002) Ageing human odontometric analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**, 474–482.
58. Murray, P.E., Matthews, J.B., Sloan, A.J., and Smith, A.J. (2002) Analysis of incisor cell populations in Wistar rats of different ages. *Arch. Oral Biol.* **47**, 709–715.
59. Mullane, E.M., Dong, Z., Sedgley, S.M., Hu, J.C.C., Botero, T.M., Holland, G.R., and Nör, J.E. (2008) Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J. Dent. Res.* **87**, 1144–1148.
60. Roberts-Clark, D. and Smith, A.J. (2000) Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch. Oral Biol.* **45**, 1013–1016.
61. Gimble, J.M., Morgan, C., Kelly, K., Wu, X., Dandapani, V., and Wang, C.S. (1995) Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* **58**, 393–402.
62. Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., Formstecher, P., Bailliez, Y., and Polakowska, R. (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* **17**, 1175–1184.
63. Ye, L., Mishina, Y., Chen, D., Huang, D., Dallas, S.L., Dallas, M.R., Sivakumar, P., Kunieda, T., Tsutsui, T.W., Boskey, A., Bonewald, L.F., and Feng, J.Q. (2005) Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J. Biol. Chem.* **280**, 6197–6203.
64. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2007) Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* **14**, 1162–1171.
65. Harada, S. and Rodan, G.A. (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349–355.
66. Thompson, P.W., Randi, A.M., and Ridley, A.J. (2002) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J. Immunol.* **169**, 1007–1013.
67. Kaigler, D., Krebsbach, P.H., Polverini, P.J., and Mooney, D.J. (2003) Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng.* **9**, 95–103.
68. Reynolds, B.A. and Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707–1710.
69. Kopen, G.C., Prockop, D.J., and Phinney, D.G. (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10711–10726.
70. Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R., and van der Kooy, D. (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032–2036.
71. Sasaki, R., Aoki, S., Yamato, M., Uchiyama, H., Keiji, W., Okano, T., and Ogiuchi, H. (2008) Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 538–548.

72. Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F.H., and Anderson, A.J. (2005) Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14069–14074.
73. Shear, D.A., Tate, M.C., Archer, D.R., Hoffman, S.W., Hulce, V.D., Laplaca, M.C., and Stein, D.G. (2004) Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury. *Brain Res.* **1026**, 11–22.
74. About, I., Laurent-Maquin, D., Lendahl, U., and Mitsiadis, T.A. (2000) Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am. J. Pathol.* **157**, 287–295.
75. Nosrat, I.V., Widenfalk, J., Olson, L., and Nosrat, C.A. (2001) Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol.* **238**, 120–132.
76. Nosrat, I.V., Smith, C.A., Mullally, P., Olson, L., and Nosrat, C.A. (2004) Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2388–2398.
77. Giacobini, M., Stromberg, I., Almstrom, S., Cao, Y., and Olson, L. (1993) Fibroblast growth factors enhance dopamine fiber formation from nigral grafts. *Dev. Brain Res.* **75**, 65–73.
78. Kiraly, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kadar, K., Jelitai, M., Molnar, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.D., Ganss, B., Zsembery, A., and Varga, G. (2009) Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem. Int.* **55**, 323–332.
79. Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A., and Gronthos, S. (2008) Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* **26**, 1787–1795.
80. Huang, A.H., Snyder, B.R., Cheng, P.H., and Chan, A.W. (2008) Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* **26**, 2654–2663.
81. Yang, K.Y., Chen, M.F., Liao, C.H., Pang, C.Y., and Lin, P.Y. (2009) A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. *Cytotherapy* **11**(5), 606–617.
82. Koussoulakou, D.S., Margaritis, L.H., and Koussoulakos, S.L. (2009) A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 226–243.
83. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.Y., Wang, S., and Shi, S. (2006) Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* **1**(1), e79.
84. Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P.M., Gronthos, S., Shi, S., and Wang, S. (2008) Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* **26**, 1065–1073.
85. Honda, M.J., Tsuchiya, S., Sumita, Y., Sagara, H., and Ueda, M. (2008) Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. *Med. Mol. Morphol.* **41**, 183–192.
86. El-Backly, R.M., Massoud, A.G., El-Badry, A.M., Sherif, R.A., and Marei, M.K. (2008) Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust. Endod. J.* **34**, 52–67.
87. Bluteau, G., Luder, H.U., De Bari, C., and Mitsiadis, T.A. (2008) Stem cells for tooth engineering. *Eur. Cell. Mater.* **16**, 1–9.
88. Duailibi, M.T., Duailibi, S.E., Young, C.S., Bartlett, J.D., Vacanti, J.P., and Yelick, P.C. (2004) Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J. Dent. Res.* **83**, 523–528.
89. Honda, M.J., Sumita, Y., Kagami, H., and Ueda, M. (2005) Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch. Histol. Cytol.* **68**, 89–101.
90. Ohazama, A., Modino, S.A.C., Miletich, I., and Sharpe, P.T. (2004) Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res.* **83**, 518–522.
91. Honda, M.J., Ohara, T., Sumita, Y., Ogaeri, T., Kagami, H., and Ueda, M. (2006) Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* **64**, 283–289.
92. Honda, M.J., Tsuchiya, S., Sumita, Y., Sagara, H., and Ueda, M. (2007) The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue engineered tooth regeneration. *Biomaterials* **28**, 680–689.

This article should be cited as follows:

Petrovic, V. and Stefanovic, V. (2009) Dental tissue – new source for stem cells. *TheScientificWorldJOURNAL* **9**, 1167–1177. DOI 10.1100/tsw.2009.125.
