

# Nowatorskie produkty inżynierii tkankowej z wykorzystaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, aktualny trend rozwoju stomatologii weterynaryjnej

Anna Tomańska<sup>1</sup>, Maciej Janeczek<sup>1</sup>, Maciej Sroczyński<sup>2</sup>, Tomasz Gębarowski<sup>1</sup>

z Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Kliniki Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej Katedry Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej, Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu<sup>2</sup>

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. extracellular vesicles) są to koliste struktury wywodzące się z błony komórkowej o wielkości od 30 nm do 1 µm (ryc. 1). W ich populacji rozróżnia się mniejsze egzosomy (30–120 nm, sEV, EXOs) i większe ekzosomy, mikropęcherzyki (100–1000 nm, lEV; MVs, ECTOs), pęcherzyki egzosomopodobne (ELVs) i onkosomy (1–10 µm, ONVs) oraz ciała apoptotyczne (50 nm – 2 µm, ACs; 1,2); EVs naturalne, hybrydowe (HE) i modyfikowane (MVs-MEX; 3), wraz z podtypami przyporządkowanymi do profilu białkowych i zależnymi od selektywnej metodyki pozyskania (4). Mikropęcherzyki są wydzielane przez wszystkie

rodzaje komórek organizmu (*donor cells*, DCell), także przez komórki macierzyste, rodzaj DCell definiuje ich właściwości biologiczne i potencjał eksperymentalny (1). Początkowo pęcherzyki zewnątrzkomórkowe były uznawane za artefakty, zanieczyszczenia, nieistotne „worki na śmieci”, „szczątki komórek” (5). Obecność „pyłu płytkowego” obserwowano w płynach ustrojowych już w 1946 r. (Chargaff i West), potwierdzono w 1967 r. (Wolf) i opisano terminologicznie w 1971 r. (Aaronson i in., 6). Pierwotne określenia nadane EVs pokrywały się z dzisiejszą wiedzą jedynie w zakresie udowodnionej roli transportowania metabolitów, ale obecnie wiadomo, że mają też wiele

innych funkcji (7). Same metabolity pełnią już rolę nieinwazyjnych narzędzi diagnostycznych nanomedycyny (8). Poza cytoplazmatycznym cargo przenoszą one elementy struktur błon komórkowych; DNA, miRNAs, lipidy, białka i receptory błonowe (2). Zakres informacji biologicznej płynącej z EVs jest rozległy, gdyż są one wytwarzane przez komórki człowieka, zwierząt, pasożytów, bakterii i roślin (9). Dostarczają też wiedzy o patogenezie chorób wirusowych (10, 11). Same mogą podlegać modyfikacji z udziałem drobnoustrojów (12, 13, 14). Mogą modulować aktywności komórek układu immunologicznego wobec zmian nowotworowych, transplantów czy w przebiegu reakcji alergicznych (15). Od 1984 do 2021 r. zaobserwowano znaczny wzrost zainteresowania wykorzystaniem EVs w terapii zwierząt i ludzi. W szczególności w medycynie człowieka postęp był znaczny, zwłaszcza w ustaleniu metod izolacji EVs. Dużym problemem współczesnych badań weterynaryjnych jest standaryzacja przedanalizy protokołów laboratoryjnych z wykorzystaniem markerów i genów referencyjnych (9). EVs osiągnęły rozpoznawalność poprzez wielokierunkowe mechanizmy regeneracji tkanek, są one potencjalnie terapeutyczne w wielu chorobach człowieka (16, 17) i zwierząt (18). Dają one nadzieję na upowszechnienie dotąd trudno dostępnego lub niemożliwego leczenia; nadając wykorzystaniu mikropęcherzyków nową terminologię „bezkomórkowych terapii komórkowych”. Są one określane też jako „mediatory leków nowej generacji”; ryzyko wykorzystania EVs jest znacząco niższe niż w przypadku komórek macierzystych czy już opracowanych nanoleków. Ze względu na niepełne poznanie funkcji

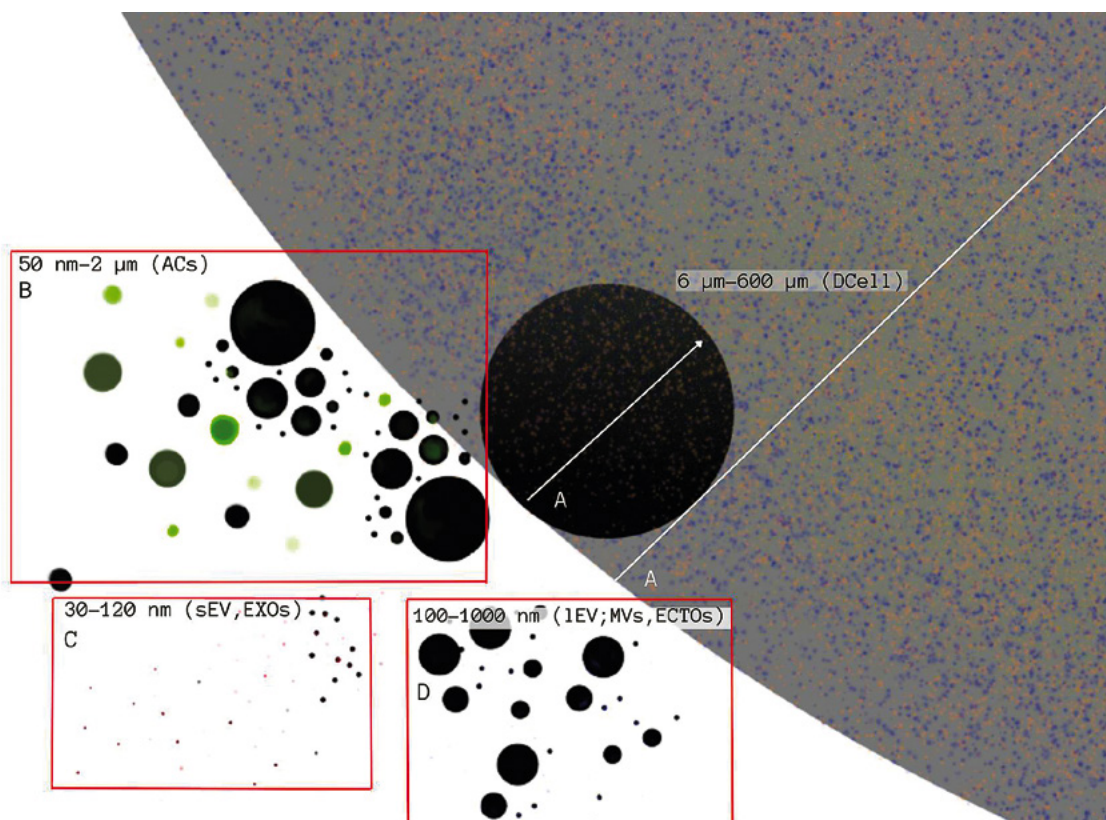
### Innovative tissue engineering products using extracellular vesicles, the current trend in veterinary dentistry development

Tomańska A.<sup>1</sup>, Janeczek M.<sup>1</sup>, Sroczyński S.<sup>2</sup>, Gębarowski T.<sup>1</sup>, Department of Biostructure and Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences<sup>1</sup>, Clinical Department of of General, Minimally Invasive and Endocrine Surgery, Department of General, Minimally Invasive and Endocrine Surgery, Faculty of Medicine, Wrocław Medical University<sup>2</sup>

Extracellular vesicles (EVs) have a variety of functions and properties, which makes them a promising tool in the field of regenerative medicine. In dentistry, their potential use could be a revolution in treatment methods, and result in a transition away from the utilization of synthetic implants and biomaterials. Despite the great caution of the world of science based on experiments related to the use of stem cells, EVs turn out to be relatively safe. However, they require the establishment of appropriate laboratory procedures and experimental models. This is a challenge for veterinary medicine as well as an extraordinary opportunity to develop innovation and improve the quality of animal and human health care.

**Keywords:** veterinary dentistry, novel therapies, extracellular vesicles.

fizjologicznych EVs nowe kierunki badań są niezwykle obiecujące. Stwarzają one nowe wartościowe możliwości diagnostyczne dla terapii ukierunkowanej i tworzenia leków spoza półki farmaceutyków syntetycznych (w tym przekraczających barierę krwi – mózgu). Istotnym atutem mikropęcherzyków jest ich zgodność biologiczna i rzadkie występowanie toksyczności i działań niepożądanych. Eksperymenty takie mają ogromne znaczenie z perspektywy nauk



**Ryc. 1.** Zróżnicowanie populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, A: komórka (DCe11, 6 μm–600 μm), B: ciała apoptotyczne (50 nm – 2 μm), C: egzosomy (30–120 nm), D: ektosomy, mikropęcherzyki (100–1000 nm)

weterynaryjnych i medycyny translacyjnej. Badania na zwierzęcych modelach doświadczalnych są niezbędne do wprowadzenia leków na bazie mikropecherzyków do badań klinicznych w celu opracowania środków leczniczych dla ludzi (3). Współczesne techniki obrazowania (19) i solidne fundamenty metodologii badań komórek macierzystych przyczyniają się do większego powodzenia postępu nauki w tym zakresie.

Możliwe powikłania zabiegów chirurgii stomatologicznej, szczękowo-twarzowej oraz problemy spotykane w protetyce, ortodoncji i periodontologii są dużą motywacją dla badań mikropecherzykowych terapii regeneracyjnych. Dają one nadzieję na odejście od wykorzystania biomateriałów oraz implantów, które mają ograniczony czas używalności oraz mogą powodować odczyny zapalne, autoimmunologiczne i zaburzenia osteointegracji (20, 21). Działania naprawczego i protekcyjnego EVs wobec tkanek jamy ustnej dowiedziono w doświadczeniach na zwierzętach. U myszy udało się w wyniku transplantacji komórek zawiązać zęba wytworzyć nowy ząb, co jest przełomowym odkryciem. U człowieka istnieje kilka istotnych ograniczeń takich zabiegów, a jednym z nich jest długi fizjologiczny czas regeneracji zębów (22). W rezultacie transfer wiedzy do i ze stomatologii weterynaryjnej może przyspieszyć tempo odkryć naukowych. Analiza bibliometryczna globalnego trendu w terapiach mikropecherzykowych wykazała jego silne powiązanie z onkologią, gerontologią, kardiologią, nefrologią, neurologią, pulmonologią, ortopedią oraz endokrynologią (23); inni autorzy podkreślają też duże znaczenie EVs w ginekologii i położnictwie, parazytologii i analityce medycznej (24). Rozwój wiedzy o pecherzykach zewnątrzkomórkowych w tych dziedzinach wynika ze szczególnego obciążenia gospodarki chorobami przewlekłymi społeczeństw (25) oraz mniejszego dylematu natury etycznej ich wykorzystania. Naturalną kolejną rzeczą jest, że w stomatologii również nastąpi znaczący progres. Stan zdrowia jamy ustnej koreluje z ogólną kondycją organizmu. Zapalenie przyzębia zostało powiązane już z wieloma chorobami ogólnoustrojowymi, w tym cukrzycą, chorobami układu krążenia i nerek (26), przewlekłym bólem odcinka szyjnego kręgosłupa i stawów skroniowo-żuchwowych (27); co dotyczy również w pewnym stopniu zwierząt (28). Warto podkreślić, że zachowania higieniczne jamy ustnej mogą modyfikować ryzyko rozwoju wielu chorób, w tym demencji u człowieka (29). Mogą one mieć też charakter wrodzony lub wiązać się z przyjmowanymi lekami. Kwalifikacja do leczenia chorób zębów i przyzębia jest istotna statystycznie u człowieka (30). Wśród zwierząt problem ten jest jeszcze bardziej znaczący, diagnozuje się u nich częściej zmiany resorpcyjne i ubytki tkanek twardych zębów (todaysveterinarypractice.com; 31, 32). Znaczący wzrost prewalencji chorób jamy ustnej w porównaniu do badań retrospektywnych odnotowano u psów, może być to spowodowane częstszym zgłaszaniem się właścicieli do lecznic weterynaryjnych, co jednak nie umniejsza skali problemu. Do najczęstszych z nich zalicza się choroby

przyzębia, które często prowadzą do zmian degradacyjnych w obrębie przyzębia, czyli do przewlekłego zapalenia przyzębia (*periodontitis*; 33).

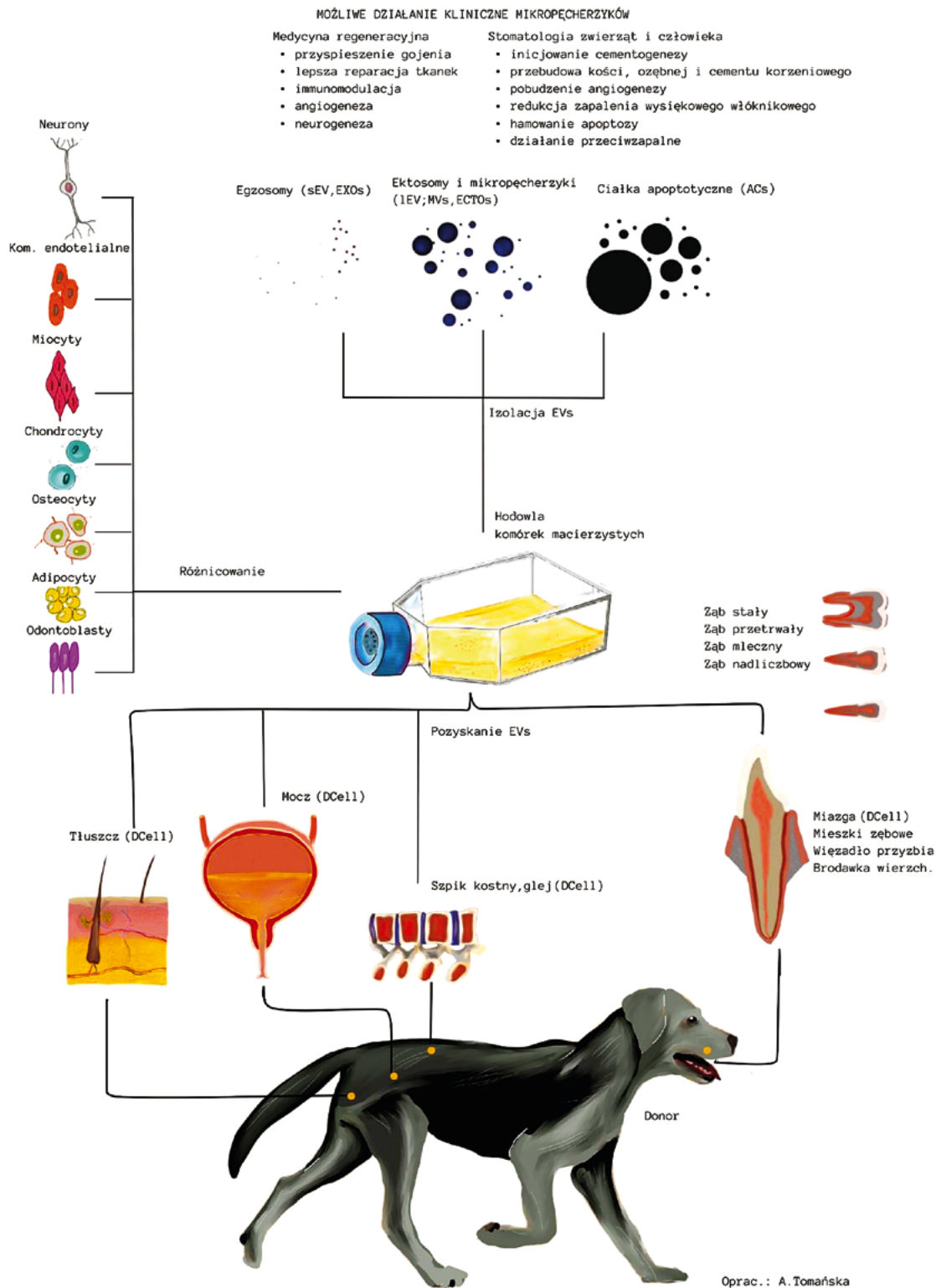
Komórki macierzyste zębów (tooth germ tissue) znajdują się w szczęce, kości siekaczowej i żuchwie, i to z nich w czasie rozwoju osobniczego rozwijają się zęby (34). Zdolności proliferacyjne w kierunku komórek zębotwórczych i regeneracji tkanek jamy ustnej mają komórki różnego pochodzenia – z moczu (35), gleju i komórek nerwowych, embrionalnych komórek macierzystych, szpiku kostnego (36), komórek progenitorowych miazgi zęba (37), więzadeł przyzębia i brodawki wierzchołkowej i mieszków zębowych (34) oraz tkanki tłuszczowej (38). Komórki z powodzeniem pozyskuje się do hodowli z zębów mlecznych i różnicuje się je w linie osteogenne i odontoblastyczne, chondrogenne, adipogenne, miogenne, endotelialne i neuronalne (36, 39). Tkanki o ograniczonej zdolności regeneracji, takie jak szkliwo, zębina i cement (40), są przedmiotem badań o szczególnym znaczeniu. Pojawiające się doniesienia o możliwościach zastosowania EVs w stomatologii regeneracyjnej otwierają drogę do kolejnych innowacji.

### Isolacja i wykorzystaniu mikropecherzyków w stomatologii weterynaryjnej

Pecherzyki zewnątrzkomórkowe najczęściej są pozyskiwane *in vitro* i mogą być stosowane *in vivo*. Komórki macierzyste mają duże zdolności do ich wytwarzania, choć same EVs nie potrafią się dzielić. Jednak nie stanowi to przeszkody, ponieważ EVs są łatwo dostępne (**ryc. 2**). Można je pozyskiwać bez wpływu na dobrostan zwierząt z zębów mądrości, mlecznych, nadliczbowych i zatrzymanych (39), wydzielin, wydaliny i tłuszczu. Z powodzeniem tworzyć z nich preparaty autologiczne jak i allogeniczne. Choć nawet zastosowanie pecherzyków ksenogenicznych może dawać efekt podobny do EVs allogenicznych (41). Wzbogacanie leków na bazie komórek macierzystych w mikropecherzyki może wzmacniać końcowy efekt terapeutyczny, a same EVs uznano za bezpieczne i bogate źródło cytokin i czynników wzrostu odpowiedzialnych za ten proces. Pecherzyki, w tym EVs, wzbogacone w substancje biologicznie czynne, mogą być kierowane bezpośrednio lub same wykazywać predylekcję do uszkodzonych tkanek, gdzie toczy się proces zapalny (42). Mikropecherzyki pochodzące z komórek prozapalnych lub poddanych stresowi wykazują zwykle wyższy potencjał angiogeny, co można wykorzystać w modulacji procesu gojenia. Choć wiadomo, iż sprzyjają one także neurogenezie, mechanizm regeneracji włókien nerwowych nie został w pełni wyjaśniony (43). Nowym etapem poszukiwań w terapii EVs na modelach doświadczalnych jest więc opracowanie metody umożliwiającej jednoczesny prawidłowy przebieg procesu angiogenezy i neurogenezy. A w przypadku utraty zębów także odbudowy zębodołu (44).

Dotychczas najmniej rozwiązań przedstawiono dla regeneracji szkliwa. Wykazano, że białka matrycy szkliwa (EMP) posiadają właściwości naprawcze w obrębie uszkodzeń przyzębia (45). Amelogeniny

## MOŻLIWOŚCI POZYSKANIA, RÓŻNICOWANIA I IZOLACJI PECHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH



**Ryc. 2.** Możliwości pozyskania, różnicowania i izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

są takimi biomimetycznymi związkami symulującym odtwarzanie cementu korzeniowego i wiązań ozębnej; wraz z implantem autogenicznej kości mogą prowadzić do miejscowej regulacji osteogenezy wyrostka zębodołowego (46). Podczas ścierania się zębów lub w próchnicy tkankę reparacyjną jest słabo zorganizowana zębina; komórki macierzyste odontoblastyczne pochodzące z miazgi zęba

inicjują jej rozwój. Komórki szklivopodobne uzyskano w hodowli z komórek brodawki mezenchymalnej i narządu szliwotwórczego (44). Amelogeniny i produkty ich degradacji stwarzają środowisko mineralizacji szkliwa, ale mają również zastosowanie w procesach gojenia ran skóry i błony śluzowej jamy ustnej (47). Wraz z enamelinami są wytwarzane przez ameloblasty (48). Mechanizmy syntetycznego



i regenerowanego rozwoju szkliwa są coraz lepiej poznane (49); komunikacja międzykomórkowa odkrywa w nich szczególną rolę. Mimo dotychczasowych doniesień nie zgromadzono jeszcze rozległej literatury o interakcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórkami zaangażowanymi w organogenezę zębów. Potwierdzono, że egzosomy są zdolne do wielokierunkowego różnicowania komórek zębotwórczych i syntezy macierzy, wraz z amelogeniną (50). Eksperyment Jiang i in. potwierdził zaś, że zakłócenie syntezy egzosomów skutkuje zaburzeniem formacji szkliwa i zębiny (51, 52). Wyzwaniem dla regeneracji szkliwa jest odtwarzanie struktur hydroksyapatytowych (53), udało się to Fang i in., którzy wykorzystali biomimetyczne białka macierzy szkliwa (54). EVs pochodzące z ameloblastów i komórek nabłonkowych mogą przyczynić się choć do częściowego odtworzenia szkliwa; to właśnie mikrośrodowisko zewnątrzkomórkowe decyduje o procesie mineralizacji – białka w macierzy zawiadują inicjacją tworzenia, architekturą i upakowaniem kryształów związków mineralnych tej tkanki (49).

Uzyskanie większej ilości danych o wpływie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na procesy regeneracji wymaga jeszcze wielu prac eksperymentalnych i testów na zwierzętach. Okazuje się bowiem, że nie tylko proste rozwiązania mogą przynosić znaczne korzyści. Połączono hodowlę komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej miazgi zęba i tkanki tłuszczowej człowieka, co wzmocniło końcowy efekt terapii regeneracyjnej. Pęcherzyki pozyskane z tkanki tłuszczowej wykazały też potencjał odbudowy ubytków żuchwy u myszy (50). U człowieka podaż pęcherzyków apoptotycznych pozyskanych z miazgi zęba doprowadziła ponadto do zwiększenia ekspresji genów angiogenezy. Poprzez taką re-waskularyzację regeneracja miazgi zęba przebiegała znacznie wydajniej (52). Komórki macierzyste pochodzenia mezenchymalnego (MSC) badano też pod kątem wpływu na neurony dopaminergiczne, miały one działanie antyapoptotyczne w indukcji 6-hydroksy-dopaminą. Na modelu mysim wykazano, że indukują one szybkie gojenie się ran poprzez antagonistyczne działanie względem Il-1 (16). Właściwości komórek macierzystych i EVs można modulować z wykorzystaniem różnych technik zabiegowych; u psa fotobiomodulacja laserem diodowym stymuluje komórki macierzyste miazgi zębowej i potęguje aktywność biologiczną pochodzących od nich egzosomów. Te kumulują w leczonej tkance wapń, fosfor i fosfatazę alkaliczną oraz regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za reparację (53).

U kota mikropęcherzyki zostały zobrazowane pomiędzy wierzchnią warstwą cementu a cementoblastami, co może wskazywać na ich udział w inicjowaniu cementogenezy (54, 55). EVs mogą być wykorzystywane do regulacji przebudowy kości, oębnej i cementu korzeniowego (55). U psa EVs w tym celu izolowano ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, pępowiny, łożyska i miazgi zębowej. Korzyści terapeutyczne komórek macierzystych tych tkanek określono jako parakryne. Ich przewagą są zdolności zwiększania angiogenezy, hamowania

apoptozy i redukcji włóknienia (56). Wydzielanie EVs jest zależne od warunków hodowli komórek macierzystych, które w środowisku hipoksji, w warunkach naśladujących niedokrwienie, o znacząco wspomaga gojenie się ran (57), co nie zostało jeszcze wystarczająco przetestowane ze względu na gatunek zwierzęcia.

Nieinwazyjnym narzędziem diagnostycznym w weterynarii mogą być egzosomy pozyskiwane ze śliny (58). Są one wydzielane przez komórki gruczołów ślinowych. W zależności od środowiska przyzębia mogą prowadzić do wzmocnienia stanu zapalnego lub go redukować (59). W ślinie psów dominują białka apoptotyczne i adhezyjne, które odgrywają ważną rolę w procesach przeciwzapalnych i regeneracyjnych. Ślina psa w porównaniu do człowieka posiada o wiele więcej czynników wzrostu fibroblastów i naskórkowego czynnika wzrostu (60). Komórki nabłonka gruczołów ślinowych mają też zwiększony wychwyty mikropęcherzyków, podane *in vivo* myszom przyczyniły się do regeneracji obturacyjnego zapalenia ślinianek (61).

Można zauważyć zainteresowanie wykorzystaniem EVs pochodzących z MSC w wielu dziedzinach, m.in. w anestezjologii, jako środków analgetycznych (62) w bólu pourazowym, przewlekłym, zapalnym czy neuropatycznym, lub ich wzmoczoną sekrecję w wyniku zastosowania różnych zabiegów fizjoterapeutycznych (63). Duże zasoby wiedzy na temat biogenezy oraz sekretomu EVs, a także zaobserwowane korzyści związane z bezpieczeństwem użycia przemawiają na rzecz tych badań. Ponadto, EVs mogą być łatwo pozyskiwane, przechowywane i stosowane w różnych formach podania (64). Warto zaznaczyć, że zachowują one dużą stabilność podczas przechowywania także w stanie zamrożonym (56).

Niedawne badania posunęły się w kierunku bioinżynierii sztucznych egzosomów. Biomimetyczny nanomateriał można poddawać glikolizacji, co pozwala wydłużyć czas krążenia egzosomów w organizmie; zastosowanie transportu przeciwciał i peptydów wpłynęło na celowaną biodystrybucję. Kliniczne zastosowanie sztucznych egzosomów posiada jednak więcej ograniczeń, brak pełnej tolerancji immunologicznej oraz niepełne jest odwzorowanie naturalnych właściwości pęcherzyków, co podkreśla potrzebę poszukiwania naturalnych nośników. Możemy przewidywać, że w przyszłości sztuczne mikropęcherzyki poprawią jakość opieki zdrowotnej. Jednak już teraz wnoszą one istotny wkład w rozwój medycyny translacyjnej (65) i zwiększą zainteresowanie ich wykorzystaniem w stomatologii.

## Podsumowanie

Na podstawie zebranych danych można stwierdzić, że technologia mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w terapii regeneracyjnej ma znaczący potencjał innowacyjny. Ten postęp może wywierać istotny wpływ na rozwój stomatologii człowieka, co czyni to zagadnienie równie interesującym w kontekście medycyny weterynaryjnej. Anatomia jamy ustnej jest znacząco zróżnicowana wśród zwierząt.

Występują u nich liczne przystosowania gatunkowe; takie jak zmienne pH śliny, adaptacje do pobierania i rozdrabniania pokarmu oraz zróżnicowana dieta. U niektórych zwierząt zęby mają zdolność do wzrostu przez całe życie i są regularnie ścierane; rozwijają się w różnym tempie. Te zróżnicowania są inspiracją dla prowadzenia interesujących projektów badawczych i poszukiwania nowych możliwości izolacji wykorzystania EVs, które wciąż nie zostały dostatecznie poznane. Wzbudza to nadzieję na odkrycie innowacyjnych metod leczenia i poprawę dobrostanu zarówno zwierząt, jak i człowieka.

## Piśmiennictwo

- Bieleńska-Osuchowska Z.: Pozakomórkowe mikropecherzki jako system komunikacji między komórkami. *Post. Biol. Kom.* 2017, **44**(1), 3–32.
- Zaborowski M.P., Balaj L., Breakfield X.O., Lai C.P.: Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioSci.* 2015, **65**(8), 783–797.
- Herrmann I.K., Wood, M.J.A., Fuhrmann G.: Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat. Nanotechnol.* 2021, **16**, 748–759.
- Lim H.J., Yoon H., Kim H., Kang Y.W., Kim J.E., Kim O.Y., Lee E.Y., Twizere J.C., Rak J., Kim D.K.: Extracellular Vesicle Proteomes Shed Light on the Evolutionary, Interactive, and Functional Divergence of Their Biogenesis Mechanisms. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, **9**, 734950, 1–11.
- Wójtowicz A., Baj-Krzyworzeka M., Baran J.: Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropecherzyków błonowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2014, **68**, 1421–1432.
- Bazzan E., Tin M., Casara A., Biondini D., Semenzato U., Cocconcelli E., Balestro E., Damin M., Radu C.M., Turato G., Baraldo S., Simioni P., Spagnolo P., Saetta M., Cosio M.G.: Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**(12), 6417.
- Durak-Kozica M.: Izolacja subpopulacji mikropecherzyków o różnych właściwościach biologicznych. Praca doktorska. Uniwersytet Jagielloński 2020, 5.
- Priyanka Kodam S., Ullah M.: Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2021, **20**, 1–10.
- Moccia V., Sammarco A., Cavicchioli L., Castagnaro M., Bongiovanni L., Zapulli V.: Extracellular Vesicles in Veterinary Medicine. *Animals* 2022, **12**(19), 2716.
- Masciopinto F., Giovanni C., Campagnoli S., Galli-Stampino L., Colombatto P., Brunetto M., Benedict Yen T.S., Houghton M., Pileri P., Abrignani S.: Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur. J. Immunol.* 2004, **34**(10), 2834–2842.
- Badierah R.A., Uversky V.N., Redwan E.M.: Dancing with Trojan horses: an interplay between the extracellular vesicles and viruses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021, **39**(8), 3034–3060.
- Koopers-Lalic D., Hogenboom M.M., Middeldorp M.J., Michiel Pegtel D.: Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; A new approach in nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, **65**(3), 348–356.
- Nurul Huda M., Nurunnabi M.: Potential Application of Exosomes in Vaccine Development and Delivery, Emerging Leaders in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. *Pharm. Res.* 2022, **39**, 2635–2671.
- Anderson M.R., Kaschanchi F., Jacobson S.: Exosomes in Viral Disease. *Neurother.* 2016, **13**, 535–546.
- Nazimek K., Filipczak-Bryniarska I., Bryniarski K.: Rola leków, egzozomów i cząsteczek miRNA w modulacji aktywności immunologicznej makrofagów. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2015, **69**, 1114–1129.
- Keshitkar S., Azapira N., Hossein Ghahremani M.: Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* 2018, **9**(63), 1–9.
- Gézi A., Kovács Á., Visnovitz T., Buzás E.I.: Systems biology approaches to investigating the roles of extracellular vesicles in human diseases. *Exp. Mol. Med.* 2019, **51**, 1–11.
- Otero-Ortego L., Laso-García F., Gómez-de Frutos M.C., Diekhorst L., Martínez-Arroyo A., Alonso-López E., García-Bermejo M.L., Rodríguez-Serrano M., Arrúe-Gonzalo M., Díez-Tejedor E., Fuentes B., Gutiérrez-Fernández M.: Low dose of extracellular vesicles identified that promote recovery after ischemic stroke. *Stem Cell Res. Ther.* 2020, **11**(70), 1–15.
- Verweij F.J., Balaj L., Boulanger C.M., Carter D.R.F., Compeer E.B., D'Angelo G., El Andaloussi S., Goetz J.G., Gross J.C., Hyenne V., Krämer-Albers E.M., Lai C.P., Loyer X., Marki A., Momma S., Nolte-‘t Hoen E.N.M., Michiel Pegtel D., Peinado H., Raposo G., Rilla K., Tahara H., Théry C., van Royen M.E., Vandenbroucke R.E., van Niel G.: The power of imaging to understand extracellular vesicle biology *in vivo*. *Nat. Methods* 2021, **18**, 1013–1026.
- Abdullah Albugami R., Smith S., Al. Sheikh Hassan M., Almas A.K.: Trends in implant systems, complications and barriers in Riyadh, Saudi Arabia. *Dent. Med. Probl.* 2019, **56**(3), 223–230.
- Ziętek M., Markowska J., Konopka T., Radwan-Oczko M., Kozłowski Z.: Czteroletnia ocena stosowania biomateriałów w chirurgicznym leczeniu zapaleń przyzębia. *Dent. Med. Probl.* 2002, **39**, 109–115.
- Miran S., Mitsiadis T.A., Pagella P.: Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry. *Stem Cells Int. Hindawi* 2016, 1–8.
- Lin J., Yang Z., Wang L., Xing L., Lin J.: Global research trends in extracellular vesicles based on stem cells from 1991 to 2021: A bibliometric and visualized study. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, **10**, 1–16.
- Diomaiuto E., Principe V., De Luca A., Laperuta F., Alterisio C., Di Loria A.: Exosomes in Dogs and Cats: An Innovative Approach to Neoplastic and Non-Neoplastic Diseases. *Pharmaceuticals* 2021, **14**(8), 766.
- Rudawska I.: Obciążenie gospodarki chorobami przewlekłymi – problem nie tylko ochrony zdrowia. *Ekonomia* 2013, **32**, 29–41.
- Kaur S.: Correlation between oral health and systemic diseases, International Journal of Life Sciences. *Biotechnol. Pharma Res.* 2023, **12**(2), 2413–2416.
- Naito M., Yuasa H., Nomura Y., Nakayama T., Hamajima N., Hanada N.: Oral health status and health-related quality of life: a systematic review. *J. Oral Sci.* 2006, **48**, 1–7.
- Głowacka M.: Znaczenie właściwej higieny jamy ustnej u psów. *Animal Expert* 2018, **4**, 22–26.
- Noble J.M., Scarmeas N., Papanou P.N.: Poor Oral Health as a Chronic, Potentially Modifiable Dementia Risk Factor: Review of the Literature. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013, **13**, 384.
- Strużycka I., Wierzbicka M., Jodkowska E., Rusyan E., Ganowicz M., Ziemińska K.: Wyniki monitoringu stanu zdrowia jamy ustnej w populacji młodych dorosłych w Polsce. *Nowa Stomatologia* 2013, **4**, 195–199.
- Pistor P., Janus I., Janeczek M., Dobrzyński M.: Feline Tooth Resorption: A Description of the Severity of Disease in Regard to Animal's Age, Sex, Breed and Clinical Presentation. *Animals* 2023, **13**(15), 2500.
- <https://todaysveterinarypractice.com/dentistry/pet-health-by-the-numbersprevalence-of-oral-disease/>
- McFadden T., Manfra Marretta S.: Consequences of Untreated Periodontal Disease in Dogs and Cats. *J. Vet. Dent.* 2013, **30**(4), 266.
- Zhai Q., Dong Z., Wang W., Li B., Jin Y.: Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front. Med.* 2018, **13**, 152–159.
- Bansal R., Jain A.: Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry, Journal of Natural Science. *Biol. Med.* 2015, **6**(1), 29–34.
- Rodriguez y Baena A., Casasco A., Monti M.: Hypes and Hopes of Stem Cell Therapies in Dentistry: a Review. *Stem Cell Rev. Rep.* 2022, **18**, 1294–1308.
- Pistor P., Gębarowski T., Janus I., Janeczek M.: Development of a tissue engineering product for use in periodontal mucosal regeneration. *AMBRA, Book of abstracts 2022*, 80.
- Ferro F., Spelat R., Falini G., Gallelli A., D'Aurizio F., Puppato E., Pandolfi M., Beltrami A.P., Cesselli D., Beltrami C.A., Ambesi-Impioabato F.S., Curcio F.: Adipose Tissue-Derived Stem Cell in Vitro Differentiation in a Three-Dimensional Dental Bud Structure. *Am. J. Pathol.* 2011, **178**(5), 2299–2310.
- Kong F., Wu C.T., Geng P., Liu C., Xiao F., Wang L.S., Wang H.: Dental Pulp Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Mitigate Haematopoietic Damage after Radiation. *Stem Cell Rev.* 2021, **17**, 318–331.
- Red. Pelegrine A.A.: Stem Cell Approaches to Dental Tissue Engineering and Regenerative Dentistry. *Stem Cells Int. Hindawi* 2019.
- Yu W., Li S., Zhang G., Xu H.H.K., Zhang K., Bai Y.: New frontiers of oral sciences: Focus on the source and biomedical application of extracellular vesicles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, **10**, 1–19.
- Williams K.B., Enhart N.P.: Regenerative medicine 2.0: extracellular vesicle-based therapeutics for musculoskeletal tissue regeneration. *JAVMA* 2022, **260**(7), 683–689.
- Lai H., Li J., Kou X., Mao X., Zhao W., Ma L.: Extracellular Vesicles for Dental Pulp and Periodontal Regeneration. *Pharmaceutics* 2023, **15**(1), 282.
- Tutak M., Drukała J., Sporniak-Tutak K.: Tkanki zęba – potencjalne źródło komórek macierzystych. *J. Stomatol.* 2006, **6**, 451–457.
- Bosshardt D.D.: Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J. Clin. Periodontol.* 2008, **35**(8), 87–105.
- Kurhańska-Flisykowska A., Łojewski W., Soboczyńska K., Stopa J., Wiesiołowska A.: Kliniczne zastosowanie białek substancji podstawnej szklawi w leczeniu przyzębia. *Dent. Med. Probl.* 2022, **39**, 241–244.
- Klewin-Steinböck S., Wyganowska-Świątkowska M.: Amelogenins and their effects on the wound healing of skin and oral mucous membrane. *JoFA* 2018, **1**(1), 31–36.

48. Mortezaoghli B., Dadgar E., Saeidi S., Rajaei Behbahani L., Firouzi A., Rezayee Mehr O., Movahed E.: Mesenchymal stem cell derived exosome promotes the viability of ameloblast-like cells. *Nanomed. Res. J.* 2023, **8(2)**, 186–192.
49. Moradian-Oldak J.: The Regeneration of Tooth Enamel. *Dimens. Dent. Hyg.* 2009, **7(8)**, 12–15.
50. Jin Q., Li P., Yuan K., Zhao F., Zhu X., Zhang P., Huang Z.: Extracellular vesicles derived from human dental pulp stem cells promote osteogenesis of adipose-derived stem cells via the MAPK pathway. *J. Tissue Eng.* 2020, **11**, 1–14.
51. Jiang N., Xiang L., He L., Yang G., Zheng J., Wang C., Zhang Y., Wang S., Zhou Y., Sheu T.J., Wu J., Chen K., Coelho P.G., Tovar N.M., Kim S.H., Chen M., Zhou Y.H., Mao J.J.: Exosomes Mediate Epithelium–Mesenchyme Crosstalk in Organ Development. *ACS Nano* 2017, **11(8)**, 7736–7746.
52. Li Z., Wu M., Liu S., Liu X., Huan Y., Ye Q., Yang X., Guo H., Liu A., Huang X., Yang X., Ding F., Xu H., Zhou J., Liu P., Liu S., Jin Y., Xuan K.: Apoptotic vesicles activate autophagy in recipient cells to induce angiogenesis and dental pulp regeneration. *Mol. Ther.* 2022, **30(10)**, 3193–3208.
53. Mohamed Abdelgawad L., Hasan Nghnugh M., Abdelgwad M.: Influence of photo biomodulation using 980 nm diode laser and exosomes derived from dental pulp stem cells on pulp regeneration of dogs' teeth. *J. Med. Pharm. Allied Sci.* 2022, **11(3)**, 4980–4985.
54. Fang Z., Guo M., Zhou Q., Li Q., Ming Wong H., Ying Cao C.: Enamel-like tissue regeneration by using biomimetic enamel matrix proteins. *Macromolecules* 2021, **183**, 2131–2141.
55. Hayashi Y.: Ultrastructural characterization of extracellular matrix vesicles in the mineralizing fronts of apical cementum in cats. *Archives of Oral Biol.* 1985, **30(5)**, 445–449.
56. Holliday L.S., Truzman E., Zuo J., Han G., Torres–Medina R., Rody Jr W.J.: Extracellular vesicle identification in tooth movement models. *Orthod. Craniofac. Res.* 2019, **22**, S1,101–106.
57. Brennan M.A., Layrolle P., Mooney D.J.: Biomaterials Functionalized with MSC Secreted Extracellular Vesicles and Soluble Factors for Tissue Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* 2020, **30(37)**, 1–21.
58. Han P., Li X., Ivanovski S.: Saliva Diagnosis Using Small Extracellular Vesicles and Salivaomics. *Oral Biol.* 2022, 25–39.
59. Nik Mohamed Kamal N.N.S., Wan Shima Shahidan N.: Salivary Exosomes: From Waste to Promising Periodontitis Treatment. *Front. Physiol.* 2022, **12**, 1–6.
60. Sanguansermsri P., Jenkinson H.F., Thanasak J., Chairatvit K., Roytrakul S., Kittisenachai S., Puengsurin D., Surarit R.: Comparative proteomic study of dog and human saliva. *PLoS ONE* 2018, **13(12)**, 1–16.
61. Kim D., Min Lim K., Min Cho J., Hyo Jin P., Hwang S., Abdal Dayem A., Jin Jeong Y., Shin Y., Hong Y., Song K., Cho S.G., Lim J.Y.: Ductal delivery of extracellular vesicles promote the recovery from salivary gland inflammation. *J. Control. Release* 2023, **357**, 235–248.
62. Bryk M., Karmas E., Mlost J., Zuba-Surma E., Starowicz K.: Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles for the treatment of pain: Current status and perspectives. *Brit. J. Pharmacol.* 2021, **179(17)**, 4281–4299.
63. Vyklický L., Syková E.: May increased extracellular potassium be responsible for analgetic effects of electroacupuncture? *PAIN* 1981, **11(S1)**, 282.
64. Birjandi A.A., Sharpe P.: Potential of extracellular space for tissue regeneration in dentistry. *Front. Physiol.* 2022, **13**, 1–6.
65. Li Y.J., Wu J.Y., Liu J., Xu W., Qiu X., Huang S., Hu X.B., Xiang D.X.: Artificial exosomes for translational nanomedicine. *J. Nanobiotech.* 2021, **19(242)**, 1–7.