

سلول‌های بنیادین پالپ دندان‌های شیری انسان، تاریخچه و انواع روش‌های استخراج سلول

فرزانه جباری^۱ - جواد محمد نژاد^{۲+} - کمال یآوری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، گروه آموزشی مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- استادیار گروه آموزشی مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران

Human primary dental pulp mesenchymal stem cells: history and the isolation methods

Farzaneh Jabari¹, Javad Mohammadnejad²⁺, Kamal Yavari³

1- MSc. student in Medical Engineering, Department of Life Science Engineering, School of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

2⁺- Assistant professor, Department of Life Science Engineering, School of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran (Mohamadnejad@ut.ac.ir)

3- Assistant professor, Biotechnology Lab, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Tehran, Iran

Background and Aims: In the last decade, several studies have reported the isolation of stem cell population from different dental sources, while their mesenchymal nature is still controversial. The aim of this study was to introduce the isolating methods for stem cells from human dental pulp and to determine their mesenchymal nature before differentiation.

Material and methods: One of the best sources for stem cell is dental pulps tissue. Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) would be the most convenient source of stem cells because teeth were easy to retrieve and removed throughout life. Pulp is a specialized connective tissue including blood and lymph vessels, nerves, and the interstitial fluid. DPSCs can be found within the "cell rich zone" of pulp. DPSCs have been isolated for the first time in 2000 by Gronthos; these cells exhibited a differentiation potential for odontoblastic, adipogenic and neural cytotypes. Gronthos isolated stem cells in 2 different methods: The enzymatic digestion method and second was out growth, these cells could be cryopreserved in liquid nitrogen. It has also been shown that human DPSCs can be used for complex structures such as pulp or woven bone formation in vivo.

Conclusion: DPSCs originate from the cranial neural crest and have neural characteristics such as the expression of neurotrophins. Therefore, DPSCs may represent a promising source in cell therapy for neurological disorders. Characterization of these cells and determination of their potentialities in terms of specificity of regenerative response will form the foundation for development of new clinical treatment modalities, whether involving directed recruitment of the cells and seeding of stem cells at sites of injury for regeneration or use of the stem cells with appropriate scaffolds for tissue engineering solutions. Such approaches will provide an innovative and novel biologically based on new generation of clinical treatments for dental disease.

Key Words: Stem cell, Dental pulp, Differentiation, Tissue regeneration

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2014;27(3):184-89

چکیده

زمینه و هدف: در دهه گذشته مطالعات فراوانی استخراج جمعیت‌های سلول بنیادین را از منابع گوناگون دندان‌های گزاش کرده‌اند، در حالیکه هنوز ماهیت مزانشیمی آن‌ها مورد بحث است. هدف از این مطالعه معرفی انواع روش‌های جداسازی سلول از پالپ دندان برای تعیین ماهیت مزانشیمی آن‌ها قبل از تمایزشان بود.

روش بررسی: یکی از بهترین منابع برای سلول‌های بنیادین، بافت پالپ دندان است. سلول‌های بنیادین بافت پالپ دندان مناسب‌ترین منبع سلول‌های بنیادین خواهد بود زیرا در طول زندگی، دندان‌ها قابلیت بازیابی و جایگزینی را دارند. پالپ بافت تخصصی همبند شامل خون، رگ‌ها و عروق لنفی و اعصاب و مایع میان بافتی است. سلول‌های بنیادین بافت پالپ در ناحیه غنی از سلول در بافت پالپ یافت می‌شوند. این سلول‌ها برای نخستین بار در سال ۲۰۰۰ توسط شخصی به نام گرانوس استخراج گردید و پتانسیل تمایز به سلول‌های ادونتوبلاست، ادیپوسیت و سلول‌های عصبی را از خود نشان دادند. گرانوس سلول‌ها را به دو روش استخراج نمود: روش هضم آنزیمی و روش دوم روش فرعی بود. این سلول‌ها قابلیت نگهداری و ذخیره‌سازی درون نیتروژن مایع را داشتند. همچنین نشان داده شده است که سلول‌های بنیادین پالپ دندان انسان می‌توانند ساختارهای پیچیده مانند پالپ دندان یا استخوان Woven را در داخل بدن تشکیل دهند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادین پالپ دندان از قسمت Cranial neural crest سرچشمه می‌گیرند و ویژگی‌های عصبی مانند بیان نوتروفین را دارند بنابراین این سلول‌ها می‌توانند منبعی برای درمان اختلالات عصبی باشند. ویژگی این سلول‌ها و تعیین پتانسیل آن‌ها در واکنش‌های احیایی پایه و اساس توسعه روش‌های درمانی جدید را تشکیل می‌دهند اگرچه این روش مستلزم به کارگیری مستقیم سلول‌ها در ناحیه آسیب دیده برای بازسازی و یا بهره‌گیری همراه یک داربست مناسب برای مهندسی بافت است. این روش‌ها خلاقیت و نسل جدید درمان‌های بالینی بر مبنای پدیده‌های بیولوژیکی را برای بیماری‌های دندان فراهم خواهند نمود.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادین، پالپ دندان، تمایز، بازسازی بافت

وصول: ۹۲/۱۱/۲۰۳ اصلاح نهایی: ۹۳/۰۴/۳۱ تأیید چاپ: ۹۳/۰۵/۰۳

مقدمه

فولیکول‌های مو، عضلات مخطط، پالپ دندان، ایاف پریدونتال، شبکیه چشم به دست آورده‌اند (۱،۲). یکی از بهترین منابع برای استخراج سلول بنیادین بافت پالپ دندان‌های شیری است سلول‌ها، در سرتاسر ناحیه پرسلول و ناحیه مرکزی پالپ توزیع شده‌اند و اغلب ناحیه دور عروقی را اشغال می‌کنند این سلول‌ها قابلیت تولید دامنه وسیعی از سلول‌های مزانشیمی یا انواع سلول در کشت سلولی یا در بررسی‌های حیوانی را دارند و شامل تولید ادونتوبلاست‌های مولد عاج، ادیپوسیت، استئوبلاست، استخوان، غضروف، عضلات صاف و مخطط است. این سلول‌ها قابلیت تبدیل یا ایجاد نسوج اکتودرمی مانند اعصاب یا بن‌یاخته اپی‌تلیوم مانند را دارند (۳،۴). از زمان کشف سلول‌های بنیادین در پالپ، یعنی سال ۲۰۰۰ تا امروز محققان تکنیک‌ها و روش‌های بسیاری به کار بستند تا روند استخراج و جداسازی سلول از بافت پالپ را تسریع نموده و میزان آسیبی که حین جداسازی به سلول وارد می‌شود را به حداقل برسانند. جداسازی سلول از بافت یک فرایند زمان‌بر و طولانی مدت است اما به کمک برخی ترکیبات مانند لیزکننده‌های بافتی و آنزیم‌ها می‌توان طول این دوره را به شدت کوتاه نمود در مقابل، لیزکننده‌ها و آنزیم‌ها در برخی مواقع موجب مرگ

در این مقاله هدف ما بررسی تاریخچه کشف و استخراج سلول‌های بنیادین از بافت پالپ دندان انسان است، در این مطالعه سعی شده که تمامی روش‌هایی که محققان برای استخراج سلول‌های بنیادین مزانشیمال به کار بسته‌اند را توضیح دهیم و همچنین موارد کاربردی این سلول‌ها و مزایایی که در مقایسه با سایر سلول‌های بنیادین مانند مغز استخوان و یا سلول‌های خون بند ناف دارند را شرح دهیم.

روش بررسی

امروزه تحقیق بر روی سلول‌های بنیادی به دانش پیشرفته‌ای تبدیل شده است که نه تنها در حیات علمی، بلکه در مسایل سیاسی و اقتصادی کشورها نیز موثر قلمداد می‌شود، علیرغم تحقیقات وسیع، هنوز ابهامات متعددی پیرامون نحوه عملکرد سلول‌های بنیادی وجود دارد. به دلیل محدودیت‌های ایجاد شده در مورد تحقیقات پیرامون سلول‌های بنیادی جنینی، پژوهشگران تمایل به ادامه تحقیقات خود در مورد سلول‌های بنیادی بالغ دارند. آن‌ها سلول‌های بنیادی بالغ را از بافت‌های زیادی از قبیل خون بندناف، پوست، مغز استخوان،

سلول‌های بنیادین پالپ دندان‌های شیری انسان، تاریخچه و انواع روش‌های استخراج سلول فرزانه جباری و همکاران

کاتر جراحی شماره ۱۰ به چندین قطعه بریده شده، اندازه تکه‌های بافت در این روش نسبت به روش هضم آنزیمی بسیار کوچک‌تر بود. قطعات بافت همراه محیط کشت DMEM درون فالكون قرار گرفته و سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت، سپس محیط رویی درون فالكون دور ریخته شده و بافت‌ها به همراه ذرات ته نشین شده درون یک فلاسک کشت سلولی قرار گرفتند و در حدود ۵ سی‌سی محیط DMEM و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین افزوده گردید، سپس مجموعه درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ گاز دی اکسید کربن قرار گرفت. بعد از گذشت ۵ هفته سلول‌ها در کف ظرف کشت سلولی دیده شدند. هر دو نوع سلول‌ها قابلیت فریز کردن و نگهداری در نیتروژن مایع را داشته و سرعت تکثیر سلول‌های هر دو روش با بروموداکسی یوریدین مورد بررسی قرار گرفتند و بعد سلول‌ها تثبیت و رنگ‌آمیزی شده و به صورت رندوم شمارش سلولی با Light microscop انجام گرفت بررسی سرعت تکثیر نشان داد که HDPC-d نسبت به روش دوم سرعت رشد بالاتری داشته ولی در بیان برخی ژن‌ها مانند کلاژن نوع ۱ و ۲ و نیز cbfa1 هیچ تفاوتی دیده نمی‌شود. اما اگر دو روش جداسازی را با هم مقایسه کنیم، می‌بینیم که روش فرعی بسیار راحت بوده اما به مدت زمان زیادی نیاز دارد تا اجازه دهد تعداد کافی از سلول‌ها از بافت مهاجرت کنند، اما در روش آنزیمی احتمالاً تمام سلول‌ها از بافت جدا شده ولی میزان آسیب دیدگی نیز زیاد است ولی با این وجود در اینجا امکان تشکیل کلونی‌های گوناگون و تک کلونی هست. بر اساس آمار تنها چند نوع از سلول‌های چسبنده در بافت پالپ شناخته شده‌اند که قادر به تقسیم شدند و این‌ها عبارتند از سلول‌های مزانشیمی و فیبروبلاست‌ها و اندوتلیال‌ها (۱۰-۸). تلاش‌های زیاد دانشمندان در جداسازی سلول بنیادین از بافت پالپ دندان نشان داد که یکی از مارکرهای بارز در این بافت STRO-1 می‌باشد و این به وسیله Immunomagnetic activated cell selection آشکار گردید، البته بیان مارکرهایی چون CD146 و انتی‌ژن 3G5 نیز در این سلول‌ها دیده شده است (۱۴-۱۱).

برای ذخیره نمودن سلول‌های جدا شده در هر دو روش بدین ترتیب عمل شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، شمارش سلولی انجام شده و Viability سلول‌ها تعیین گردید. براساس تعداد سلول‌ها تصمیم‌گیری می‌شود که نیاز به چند کرایو ویال است. سپس در یک

گسترده سلولی می‌شوند (۵۶). روش هضم آنزیمی یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای استخراج سلول از پالپ دندان می‌باشد که امروزه نیز در بسیاری از مراکز تحقیقاتی دنیا به کار گرفته می‌شود. سلول‌های جدا شده بدین صورت را می‌توان به انواع دیگر سلول‌ها تمایز داده و در موارد بالینی برای درمان بیماری‌ها به کار بست. بررسی‌ها نشان داده که طول دوره تمایز سلول‌های پالپ در مقایسه با سلول‌های بند ناف و مغز استخوان کوتاه‌تر بوده و توانایی زنده ماندن در محیط بدون سرم را دارند. طی سال‌های اخیر در کشور ما نیز تحقیقات گسترده‌ای پیرامون استخراج و تمایز سلول‌های پالپ صورت گرفته که در تازه‌ترین یافته‌ها، آشکار گردید که پاسخگویی این‌ها به انواع تحریکات مکانیکی بسیار سریع‌تر از سایر سلول‌ها بوده و مقاومت بالایی در برابر تنش و فشار مکانیکی دارند و این ویژگی موجب می‌شود تا سلول‌های پالپ را برای کاربردهایی چون بازسازی رگ‌ها و عروق و یا بافت آسیب دیده قلب و نیز در جراحی‌های دهان برای بازسازی بافت‌های نرم که مدام تحت فشار مکانیکی هستند به کار بست. با در نظر گرفتن تمامی قابلیت‌های سلول‌های پالپ، می‌توان امید داشت که در آینده نه چندان دور بسیاری از بیماری‌های صعب‌العلاج به کمک این سلول‌ها قابل درمان باشند (۷).

جدا کردن سلول‌ها توسط گراتوس در سال ۲۰۰۰ با دو روش عمده انجام گرفت (۸). روش هضم آنزیمی، که در این روش از دندان‌های سالم و بدون پوسیدگی کودکان ۶ تا ۱۲ سال، بافت پالپ خارج شده و سپس با کاتر جراحی کاملاً تکه تکه گردید، در حدود ۳mg/ml کلاژناز نوع ۱ و ۴mg/ml دیسپاز و ۵ سی‌سی محیط کشت DMEM به تکه‌های بافت پالپ افزوده گردید. مجموعه حاصل درون یخچال به مدت ۸ ساعت قرار گرفت سپس سانتیفریوژ، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. سوسپانسیون سلولی از صافی با اندازه ۷۰ میکرومتر عبور داده شده، ترکیباتی مانند ۲ Mm گلوتامین اسید و ۱۰۰ میکرومول اسکوربیک اسید ۲ فسفات و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین افزوده شده و سپس فلاسک حاوی پالپ و ترکیبات افزوده شده داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵٪ گاز CO₂ شد، بعد از گذشت سه هفته اولین رده‌های سلول در کف فلاسک دیده شد، گراتوس این سلول‌ها را HDPC-d نامید. اما روش دوم Out growth است، بافت پالپ بعد از خروج از حفره مرکزی دندان، با

پژوهش‌های گذشته از شیوه‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی جهت بررسی توانایی تکثیر سلول‌ها استفاده شده است. از این روش‌ها برای ردیابی آنتی‌ژن تکثیر هسته سلول در سلول‌های پالپ دندان نابالغ استفاده شده و نشان داده شده که محیط کشت اختصاصی سلولی (SCCM) بهتر از محلول نمکی متعادل شده هانک (HBSS) یا Hank's balanced salt (solution) قادر به حفظ قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان می‌باشد (۲۱-۱۸). ردیابی سلول‌های پالپ یکی دیگر از موضوعات مهم و اساسی در کاربردهای بالینی و *in vivo* می‌باشد. یکی از مهم‌ترین ردیاب‌ها برای سلول‌های پالپ رادیو ایزوتوپ تکنسیم 99m می‌باشد. سودمندترین رادیو ایزوتوپ‌ها در پزشکی رادیو ایزوتوپ‌های تابش کننده گاما می‌باشند، زیرا پرتوهای تابش شده از این مواد در درون بدن را می‌توان از بیرون بدن به سادگی تشخیص داد اندازه‌های کاربردی مواد رادیواکتیو در روش‌های تشخیص از دید جرم بسیار اندک است - نزدیک به میکروگرم- به گونه‌ای که این مواد بر روند کارهای فیزیولوژیک بدن اثری ندارند. رادیو ایزوتوپ‌ها بیشتر به گونه ترکیبی، وارد بدن می‌شوند. ترکیب‌های یاد شده مولکول‌های نشان‌دار هستند. یک مولکول نشان‌دار مولکولی است که یک یا چند اتم آن رادیواکتیو باشد، از با ارزش ترین رادیو ایزوتوپ‌ها در کار تشخیص، Tc (Technetium) است که شمار فراوانی از ترکیب‌های شیمیایی کاربردی را با آن نشاندار می‌کنند (۲۴-۲۲). علاوه بر ردیابی سلول‌ها، رشد و گسترش سه بعدی سلول‌ها روی داربست از اهمیت بالایی برخوردار است. در یک آزمایشی محققان از داربست‌های کامپوزیتی سلولز- ژلاتین برای رشد و تکثیر سه بعدی سلول‌ها استفاده کردند، تصویربرداری مستقیم از سلول‌ها نشان داد که استفاده از میکرو داربست‌های ساخته شده با ژلاتین و میکرو فایبرهای سلولزی چسبندگی سلولی و رشد سلول‌ها را در شرایط *in vitro* افزایش می‌دهد (۲۶، ۲۵). در سال ۲۰۰۸ محققان، سلول‌های بنیادی موجود در پالپ دندان شیری کشیده شده انسان را بر روی دو نوع Scaffold cell poly lactic acid- Open، (Collagen) حاوی و یا فاقد BMP2 و TGF β 1 قرار داده، این ساختار را در ۱۰۵ دندان پرمولر کشیده شده تک کاناله آماده سازی شده انسان قرار دادند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که در همه موارد، اتصال سلول‌ها به دیواره‌های کانال حاصل شد (۲۸، ۲۷). در سال ۲۰۱۰ سلول‌های بنیادی

لوله جداگانه مقدار لازم از FBS حاوی DMSO ۱۰٪ تهیه گردید. حدوداً به ازای هر ۱۰۶ سلول از سوسپانسیون سلولی FBS ۰/۵ ml حاوی ۵ تا ۱۰٪ DMSO به رسوب سلول‌ها افزوده گردید و پس از پی‌پتاژ، تقسیم و به سرعت به فریزر انتقال یافت کرایو حاوی سوسپانسیون سلولی به مدت ۲ ساعت به فریزر ۲۰- درجه و سپس به تانک ۸۰- انتقال می‌یابد. بعد از ۶ ساعت سلول‌های پالپ به تانک نیتروژن منتقل شدند (۱۵).

بحث و نتیجه گیری

در تحقیقات انجام شده بر روی پالپ دندان دانشمندان احتمال داده‌اند که سلول‌های پالپ دندان منشأ دور عروقی دارند زیرا این سلول‌ها مارکرهای CD90، CD146 را به روز می‌دهند که از مارکرهای خاص سلول‌های اندوتلیال هستند. در پالپ دندان تنها یک نوع سلول متمایز نشده وجود دارد که می‌تواند به دیگر سلول‌ها تمایز یابد. با توجه به فضای بسته اتاقک و مجرای بسیار باریک ریشه دندان نتیجه می‌گیریم که سلول‌های پالپ دندان همگی بنیادین هستند (۱۷-۱۵). پروفایل بیان ژن سلول‌های دندانی با استرومای مغز استخوان مقایسه شدند و دیده شد که تنها در بیان چند ژن با هم تفاوت هست که این‌ها شامل COLLAGEN XVIII- IGF-2-CYCLIN بوده و البته به طور گسترده در سلول‌های دندان بیان می‌شوند، همان طور که قبلاً گفته شد فاکتورهای رشد و نیز بسیاری از مولکول‌های بیواکتیو که در داخل ماتریکس دندانی غیرفعال هستند می‌توانند جایگزین Enamel organ برای ریشه دندان باشند، البته این زمانی صورت می‌گیرد که در زمان آسیب دیدن بافت این مولکول‌ها رها شوند و این رهایش روی سیگنالینگ سلولی تأثیرگذار است و عدم کنترل این مولکول‌ها ممکن است باعث مرگ و آپوپتوز سلول‌ها گردد و موجب نبود پاسخ‌های احیا کننده در زمان پوسیدگی دندان باشد مولکول ایجادکننده سیگنالینگ سلولی می‌تواند یکی از عواملی باشد که موجب تنوع در ویژگی Dentinogenic شده و یا یک جمعیت سلولی گوناگون که در پالپ هست. علی‌رغم تحقیقات گسترده در این حوزه در طول چند دهه اخیر هیچ جمعیت تک سلولی از بافت پالپ یافت نشده که به عنوان Sole progenitor برای تمایز سلول‌ها در طول بازسازی باشد. در

جوش می‌خورد، از سلول‌های بنیادی پالپ دندان برای جوش خوردگی سریع و جلوگیری از عفونت‌های بعدی استفاده شده است (۳۳-۳۵).

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد اینجانب به شماره ۳۹۵۰۱ به راهنمایی دکتر جواد محمدنژاد در دانشگاه تهران می‌باشد که با کمک‌های مالی و علمی پژوهشگرده چرخه سوخت هسته‌ای سازمان انرژی اتمی واحد تهران انجام یافته است، لذا بر خود لازم میدانم از زحمات فراوان جناب آقای دکتر یآوری و ریاست پژوهشگرده چرخه سوخت قدردانی نمایم.

پالپ دندان با استفاده از Salt crystal و Gelatin spheres بر روی Poly-l-lactic scaffold قرار داده شدند. سپس این داربست در اتاقک پالپی مولرهای سوم کشیده شده انسان ایمپلنت گردید. نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که Dentin related morphogens تأثیر بسیار مهمی بر تمایز سلول‌های پالپ به ادنتوبلاست و در نتیجه ایجاد ساختارهای شبه پالپ در فضای پالپی دندان دارد (۲۹-۳۱). سلول‌های پالپ دندان را می‌توان برای بازسازی بافت‌های سخت از جمله استخوان به کار بست در افرادی که شکستگی وسیع استخوان دارند و یا کسانی که مورد عمل جراحی مغزی قرار گرفته و کاسه سر آنها برداشته شده و همچنین اشخاصی که استخوان‌های آنها به‌کندی

منابع:

- 1- Herriek SE, Mutsaers SE. The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Int J Artif Organs*. 2007;30(6):527-40.
- 2- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Nat Acad Sci*. 2003;100(10):5807-12.
- 3- Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Meth Enzymol*. 2004;419:99-113.
- 4- Kerkis II, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing Oct-4 and other embryonic stem cells markers. *Cell Tissue Orgs* 2006;184(3-4):105-16.
- 5- Lopez-Cazuax S, Bluteau G, Magne D, Lieubeau B, Guicheux J, Alliot-Licht B. Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical notes. *Eur Cell Mater*. 2006;11:35-42.
- 6- Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(4):225-36.
- 7- Laino G, d'Aquino R, Graziano R, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005;20(8):1394-402.
- 8- Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Meth Enzymol*. 2006;419:99-113.
- 9- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res*. 2006;41(4):303-10.
- 10- Cordeiro MM1, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
- 11- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of gene expression profiles for human, dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29(6):532-9.
- 12- Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Pediatr Dent*. 2009;319(7):467-71.
- 13- Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006;206(3):693-701.
- 14- Sakai KI, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*. 2012;122(1):80-90.
- 15- Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005;24(2):155-65.
- 16- Peng I, Ye I, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci*. 2009;1(1):6-12.
- 17- Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cell for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008 Jul 31;16:1-9.
- 18- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(3):301-16.
- 19- Rutherford B, Fitzgerald M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(3):218-29.
- 20- Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod*. 2010;36(12):1963-6.
- 21- Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*. 2005;31(10):711-8.
- 22- Herbert R, Kulke W, Shepherd RT. The use of technetium 99m as a clinical tracer element. *Postgrad Med J*. 1965;41(481):656-62.
- 23- Richards P, Tucker WD, Srivastava S.C. Technetium-99m: an historical perspective. *Int J Appl Radiat Isot*. 1982;33(10):793-9.
- 24- International Atomic Energy Agency. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits. Vienna; 2008.

- 25- Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Colla1-GFP transgenes. *Cell Tissue Org.* 2004;176(1-3):120-33.
- 26- Kurioka K, Umeda M, Teranobu O, Komori T. Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Sci.* 1999;45(3-4):149-63.
- 27- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008;34(8):962-9.
- 28- Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells.* 2008;26(4):1065-73.
- 29- Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *Dent Res.* 2002;81(10):695-700.
- 30- Huang AHC, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):571-4.
- 31- Nadri S, Soleimani M, Kiani J, Atashi A, Izadpanah R. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human eye conjunctiva stromal cells. *Differentiation.* 2008;76(3):223-31.
- 32- Cordeiro MM1, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J Endod.* 2008;34(8):962-9.
- 33- Graziano A1, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-6.
- 34- Pittenger MF1, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Sci.* 1999;284(5411):143-7.
- 35- Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(8):881-7.