

استخراج سلولهای بنیادین از بافت پالپ دندانهای شیری انسان و نشاندارسازی آنها با تکنسیم m۹۹

فرزانه جباری^۱ دکتر هنگامه بختیار^{۲*} دکتر جواد محمد نژاد^۳ دکتر کمال یآوری^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی دانشگاه تهران

۲- استادیار گروه اندودانتیکس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندانپزشکی تهران

۳- استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و تکنولوژی‌های جدید، دانشگاه تهران

۴- استادیار پژوهشکده چرخه سوخت هسته ای سازمان انرژی اتمی

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های پالپ دندان شیری انسان توانایی تکثیر و تمایز بالایی از خود نشان می‌دهند و می‌توان با تمایز این سلولها به سلول‌های شبه ادنتوبلاست و استئوبلاست به بازسازی ساختمان از دست رفته دندان کمک کرد. برای ردیابی سلول‌ها نیز میتوان از روش‌های مختلفی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که با رعایت تمامی مسائل اخلاقی انجام یافته است، نمونه‌های دندانی از دندانهای شیری در حال افتادن کودکان ۶ تا ۱۱ ساله ای جمع آوری شد که سابقه هیچ گونه بیماری سیستمیک و خطرناکی نداشتند. برای تسریع در جداسازی سلولها از دو روش آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده شد. جهت ردیابی سلولها، ۱۰۰۰۰ سلول جدا شده از بافت پالپ با ۲۵ میلی کوری تکنسیم مخلوط شد و میزان فعالیت سلولی و محیط، جداگانه اندازه‌گیری شدند.

نتایج: یافته‌های کشت سلولی مطالعه حاضر نشان داد که سلولهای جدا شده از بافت پالپ کلونی‌های مشتق از تک سلول تشکیل داده و به شکل واحدهای کلونی متشکل از سلولهای شبه فیبروبلاست رشد می‌کنند. رنگ آمیزی *آلیزارین رد* در این سلولها نشان دهنده بنیادین بودن این سلولها و تمایز آنها به استخوان بود. تمایز آدیپوسیتی سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ با استفاده از رنگ آمیزی *اوایل رد* او نیز بیانگر تمایز آنها به بافت چربی بود. تماس سلولها با تکنسیم موجب نابودی آنها و در برخی از موارد فعالیت آنها را به شدت کاهش داد. به طوری که در مدت زمانهای تماسی ۱، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت، میزان بقای سلولها به ترتیب ۸۵/۵، ۷۷/۴، ۶۸/۴ و ۵۷/۳ درصد بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد سلول‌های بنیادین پالپ دندان قابلیت قابل توجهی در تبدیل به بافت استخوان و چربی دارند و نشاندار سازی این سلولها با تکنسیم M۹۹ در طی زمان موجب کاهش قابل توجه بقا می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادی، پالپ دندان، تکنسیم تی سی ۹۹ ام

وصول مقاله: ۹۲/۳/۱۸ اصلاح نهایی: ۹۲/۷/۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۷/۱۳

مقدمه:

سلول‌های دیگر را دارند. امروزه سلول‌های بنیادی، امید اول ترمیم بافت‌های آسیب دیده هستند و چه بسا در آینده ساخت اندام‌های انسانی از این طریق صورت گیرد.^(۱) سلول‌های بنیادی با توجه به منشأ آنها به دو دسته تقسیم می‌شوند: سلول‌های بنیادی جنینی که از جنین در مراحل اولیه تشکیل

سلول بنیادی به آن دسته از سلول‌های بدن اطلاق می‌شود که دارای خاصیت خودتکثیری بوده و هنوز تمایز نیافته و برای کار ویژه‌ای تجهیز نشده‌اند، اما قابلیت تمایز و تبدیل شدن به

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر هنگامه بختیار، استادیار گروه اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، نیستان دهم، پلاک ۴ تلفن: ۰۹۱۲۸۱۳۲۲۶۷

مواد و روش‌ها:

این تحقیق با به روش تجربی و آزمایشگاهی انجام شد. جهت انجام این تحقیق، از پالپ وایتال دندانهای شیری کودکان ۶-۱۱ ساله که به دلایل دندانپزشکی از دهان خارج می شدند استفاده گردید. پس از خارج نمودن دندانها و جمع آوری نمونه ها و انتقال به محیط آزمایشگاه، ابتدا دندانها توسط مقادیر کافی آب مقطر و محلول بافر فسفات (PBS) شسته شدند تا زوائد اضافه آنها کاملا برداشته شود. برای از بین بردن هر گونه آلودگی، دندانها به همراه محلول نمکی که در آن قرار داشتند، داخل فالكون شماره ۱۰ که یک محفظه استوانه‌ای شکل و از جنس پلیمر قابل اتوکلاو کردن بود ریخته شد. فالكون حاوی دندانها سانتریفیوژ شده و محیط رویی فالكون دور ریخته شد. دندانها از فالكون خارج شده و با آب مقطر کاملا شسته شدند. در مرحله بعد جداسازی سلولهای بنیادین پالپ دندان شیری انسان انجام گردید. بدین ترتیب که دندانهای تمیز، زیر هود لامینار توسط کاتر جراحی و قیچی کاملا خرد و شکسته شدند به طوری که دسترسی به بافت پالپ راحت باشد. بعد از جدا نمودن بافت پالپ، که به رنگ صورتی و بسیار نازک بود، در داخل محیط کشت (Dulbecco's modified Eagle's medium) DMEM (medium) توسط کاتر جراحی شماره ۱۰ به چندین قطعه بریده شد. ذرات خرد شده به همراه تریپسین وارد فالكون شدند. یکی از فالكونهای حاوی بافت پالپ و تریپسین، به مدت ۸ ساعت داخل یخچال قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ و جدا شدن آنزیم ها و بافت‌های لیز شده، محتوی فالكون در زیر هود وارد فلاسک کوچکی شدند. اما فالكون بعدی، مستقیما و بدون قرار گیری در یخچال مورد آزمایش قرار گرفت و بعد از خالی نمودن محتوی در داخل فلاسک کوچک، وارد انکوباتور گردید. در واقع، با توجه به اینکه جدا شدن سلول بسیار زمان بر بود برای تسریع در روند جداسازی سلولی از دو روش جداگانه استفاده شد. این دو روش شامل روش هضم آنزیمی و یک روش فرعی دیگر جهت تکثیر سلولها بود.^(۲،۵)

آن گرفته می‌شود و سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا بالغ که پس از تولد از افراد به ویژه از مغز استخوان آنها گرفته می‌شود.^(۱،۲)

با توجه به بروز برخی محدودیت‌ها در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی در چند سال اخیر، موج جدیدی از تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شروع شد که کماکان ادامه دارد. در دهه گذشته مطالعات متعددی جداسازی جمعیت سلول بنیادی را از منابع مختلف دندان‌های گزارش کرده‌اند، در حالیکه هنوز ماهیت مزانشیمی آنها مورد بحث است^(۳) زمانی که اولین بار سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان در سال ۲۰۰۰ معرفی شدند، برای شناسایی آنها از آنتی بادی علیه برخی مارکرهای مزانشیمی از جمله Stro 1 استفاده شد و دو ویژگی خودبازسازی و تمایز آنها در شرایط درون بدن به اثبات رسید.^(۳) اما یکی از نکات مهم در استفاده از سلولهای بنیادین در موارد درمانی، این است که مثلا در درمان بیماریهای ریشه دندان، که باید این اجزا به درون کانالهای ریشه تزریق شوند، باید اطمینان حاصل نمود که سلول‌های تزریق شده دقیقا به همان محل مورد نظر وارد شده و مسیر درستی را طی نموده اند. در همین راستا برای مسیر یابی سلولها و تعیین مسیر درست حرکت از انواع ردیابها استفاده می شود^(۴). یکی از انواع این ردیابها رادیو داروی تکنسیم می‌باشد. تکنسیم ۹۹m به عنوان یک ادجوانت برای تصویر برداری رزونانس مغناطیسی و توموگرافی کامپیوتری در ارزیابی و مکان یابی سگته ها و ناهنجاریهای عملکردی مغز از جمله دمانس و ترومای مغزی و صرع معرفی شده است.^(۵)

با توجه به توانایی تمایز سلول های بنیادین به سلول های سازنده بافت دندان‌های این مطالعه با هدف استخراج و نشاندار سازی سلول های بنیادین بافت پالپ دندان‌های توسط تکنسیم ۹۹m در سازمان انرژی اتمی ایران در سال ۱۳۹۱ انجام شد.

شرایط بافت ها مورد بررسی قرار می گرفت و زمانی که اولین رده های سلولی از بافت جدا شدند، با پاساژ دادن، سلولها را به فلاسک ۷۵ میلی لیتری منتقل نمودیم. این سلولها -HDPC O نامیده شدند. بعد از سپری شدن حدوداً ۲ ماه از جدا نمودن بافت پالپ، داخل هر دو فلاسک اولین رده های سلولی مشاهده شدند. این سلولها کاملاً کشیده و ظاهری سوزنی شکل داشتند (شکل ۱) پس از پر شدن کف دیش، پاساژ سلولی به کمک تریپسین انجام و نهایتاً بسته به تعداد سلول حاصل از هر نمونه پاساژ سلولی انجام شد. برای انجام آزمایش های بعدی از سلول های پاساژ چهارم در محیط حاوی DMSO ۱۰ درصد و ۴۰ درصد استفاده شد و محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی به تانک نیتروژن انتقال داده شد.



شکل ۱- اولین رده سلولی جدا شده از بافت پالپ دندان شیری انسان بعد از گذشت ۲ ماه از فرایند جداسازی با تریپسین و کلاژناز

جهت اثبات بنیادین بودن سلولها، آنها را با استفاده از محیطهای کشت تمایزی، به چربی و استخوان تمایز دادیم. برای بررسی تمایز استخوانی در سلولهای مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ ابتدا سلولهای مزانشیمی با تعداد ۱۰۰ سلول بر سانتی متر مربع در دیش های ۶ خانه کشت داده شدند و پس از پر شدن ۷۰-۸۰ درصد از کف دیش، محیط این سلولها با محیط تمایزی تعویض شد. سلولها به مدت ۲۱ روز در این محیط کشت داده شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار

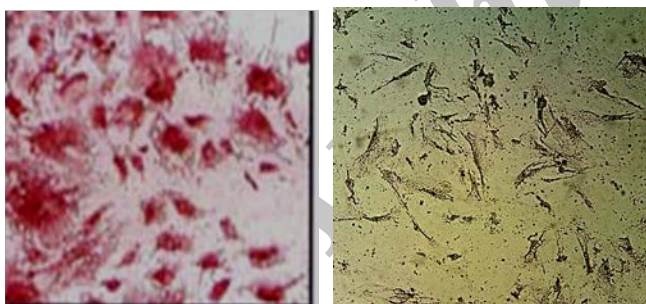
در روش هضم آنزیمی، بافت پالپ بعد از خروج از حفره مرکزی دندان با کاتر جراحی شماره ۱۰ به چندین تکه تقسیم شد و قطعات زیر هود لامینار در مجاورت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر کلاژناز نوع ۱ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر دیسپاز قرار گرفتند، مجموعه درون فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و فالکون برای ۸ ساعت درون یخچال با دمای ۱۸- قرار گرفته و بعد از این مدت فالکون برای ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بود برای تسریع در جداسازی سلولی سانتریفیوژ برای مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از آن سوسپانسیون سلولی حاصل شده از صافی با اندازه ۷۰ میکرومتر عبور داده شده و به عنوان ماده ضمیمه در مجاورت ۲ سی سی FBS20 درصد ۲ میکرومول گلوتامین و ۱۰۰ میکرومول اسکوربیک اسید ۲ فسفات و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین داخل انکوباتور با ۵ درصد گاز Co2 در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۵ روز قرار داده شد. سلولهای حاصل از این روش HDPC-d نام گرفت.^(۵)

اما روش دوم که روش فرعی است، بافت پالپ جدا شده از حفره مرکزی دندان، با کاتر جراحی به چندین تکه تقسیم شد و قطعات زیر هود لامینار با ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM و ۲ میکرومول گلوتامین و ۱۰۰ میکرومول اسکوربیک اسید ۲ فسفات و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین مخلوط شد و در اینجا کلاژناز و تریپسین افزوده نشد. هر دو اینها جز لیز کننده های بافت بدن هستند که ساختار پودری شکل داشته و برای افزودن به ترکیبی باید به صورت محلول درآیند.^(۶) این دو ماده باید در یخچال قرار گیرند تا همواره فعال بوده و در صورتی که برای بیش از نیم ساعت بیرون از یخچال باشند خاصیت لیز کنندگی خود را از دست داده و برای بافتها و سلولها توکسیک خواهند بود.^(۷-۹) تمامی بافت های پالپ تکه تکه شده به همراه مواد ضمیمه ای درون فلاسک ۲۵ میلی لیتری قرار گرفته و داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و گاز دی اکسید کربن ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد برای مدت معینی تا جدا شدن سلولها قرار گرفتند هر ۳ روز یکبار فلاسک زیر میکروسکوپ اینورت قرار گرفته و

فاز ثابت کاغذ واتمن انتخاب شد به فاصله ۲ سانتیمتر از ابتدای کاغذ نمونه گذاری انجام شد و بعد از خشک شدن نمونه، کاغذ درون نرمالین سالین قرار گرفت بعد از اینکه حدود ۵ سانتیمتر توسط فاز متحرک طی شد کاغذ خشک شد و نهایتاً ورقه به چندین تکه تقسیم شد و میزان فعالیت توسط دستگاه شمارنده گاما، شمارش شد و بازده ۹۷/۳ به دست آمد.

یافته ها:

در روش هضم آنزیمی که برای تسریع در روند جداسازی سلولی به کار گرفته شد، میزان آسیب دیدگی بافت پالپ به دلیل استفاده از کلاژناز و تریپسین زیاد بود. سلولهای جدا شده مورفولوژی سوزنی شکل و کشیده ای داشتند و این موجب می شد تا بتوانند در محیط بدون سرم به راحتی زنده بمانند و در برابر تنشهای مکانیکی یا بیولوژیکی به راحتی مقاومت کنند.^(۱۱) یافته های کشت سلولی مطالعه حاضر نشان داد که سلولهای جدا شده از بافت پالپ کلونی های مشتق از تک سلول تشکیل داده و به شکل واحدهای کلونی متشکل از سلولهای شبه فیبروبلاست رشد می کنند. رنگ آمیزی آلینزآرین رد در این سلولها نشان دهنده بنیادین بودن این سلولها و تمایز



آنها به استخوان بود^(۲۰-۲۳) (شکل ۲).

ب

الف

شکل ۲- سلولهای بافت پالپ دندان شیری انسان (الف) که با محیط کشت استئوژنیک به استخوان تمایز یافته اند (ب)

محیط سلولها تعویض شد و نهایتاً تمایز استخوانی با رنگ آمیزی آلینزآرین رد^(۱۰-۱۲) در این سلولها بررسی شد.

برای بررسی تمایز چربی در سلولهای مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ، ابتدا سلولهای مزانشیمی با تعداد ۱۰۰ سلول بر سانتی متر مربع در دیش های ۶ خانه کشت داده شدند و پس از پر شدن ۷۰-۸۰ درصد از کف دیش، محیط این سلولها با محیط تمایزی حاوی ۱۵ درصد اسکوربیک اسید ۲- فسفات، ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر دگزامتازون تعویض شد. سلولها به مدت ۲۱ روز در این محیط کشت داده شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلولها تعویض و نهایتاً تمایز آدیپوسیتی با رنگ آمیزی اوایل رد^(۱۳-۱۶) در این سلولها بررسی شد.

نشاندن سازی سلولها با رادیو ایزوتوپ تکنسیم m۹۹

برای نشان دار سازی سلولها ابتدا فلاسک حاوی سلول زیر میکروسکوپ مشاهده شد و زمانی که کف فلاسک پر شده و به تراکم ۷۵ درصد رسید، برای نشان دار سازی سلولها اقدام شد. در حدود ۲۰ میلی کوری رادیو ایزوتوپ تکنسیم در یک ظرف مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد. از سلولهای بافت پالپ دندان رقتی در حدود ۵۰۰۰۰۰ سلول تهیه گردید. به آرامی تکنسیم به سلولها اضافه شد و مجموعه برای مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در پایان اکتیویته رسوب سلولی و محلول روئی با استفاده از گاما کانتر، شمارش شد و برای بررسی پایداری ترکیب نشاندن سازی شده از دستگاه کروماتوگرافی استفاده شد. به این ترتیب که از ستون کروماتوگرافی غربالی به عنوان فاز ساکن و از نرمالین سالین به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط نشاندن سازی شده روی ستون ریخته شد و با جریان ۱ میکرولیتر در دقیقه توسط آشکار ساز ماورابنفش آنالیز و با دستگاه گاما کانتر مورد شمارش قرار گرفت.^(۱۶)

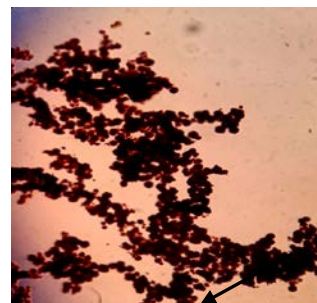
تعیین بازده نشان دار سازی: این کار در زمانهای مختلف انجام شد. برای این منظور از روش رنگ نگاری با لایه نازک تی ال سی استفاده شد^(۱۷-۱۹) که فاز متحرک نرمال سالین و

اند، می شوند. در پالپ های مسن تر تعداد سلولهای تمایزنیافته کمتر بود که این توانایی بازسازی پالپ را کاهش می دهد.^(۳۵) سلولهای جدا شده از سایر منابع مانند بند ناف و یا مغز استخوان در مقایسه با سلولهای بافت پالپ ماندگاری کمتری از خود نشان داده اند. ضمن اینکه سلولهای پالپ قابلیت زنده مانی در محیط بدون سرم را از خود نشان دادند.^(۳۶) یکی از روش های ، regenerative endodontic وارد کردن post natal stem cell اتولوگ یا الوژنیک از طریق یک ماتریکس قابل تزریق به درون کانال های ریشه با اپکس باز ضد عفونی شده است.^(۳۷) با ایزوله کردن سلول های بنیادی یا سلول های پروژنیاتور از بافت پالپ و مواجهه آنها با BMP-7, bone sialo proteins می توان انتظار تمایز این سلو لها به سلو لهای شبه ادنتوبلاست و استئوبلاست را داشت.

استفاده از این روش مزایایی چون سرعت انجام کار، در دسترس بودن سلول های بنیادی اتوزن، حداقل درد حین انجام این شیوه و سادگی تکنیک حمل سلو لها به دندان را در بردارد اما از طرف دیگر احتمال دارد که این سلول ها به نقاط دیگری از بدن مهاجرت کرده، باعث ایجاد mineralization نابجا در بدن شوند. راه حل این موضوع، استفاده از لخته فیبرینی یا مواد دیگر برای نگه داشتن این سلول ها در مکان خود است.^(۳۶) بنابراین به طور کلی احتمال ایجاد بافت دارای عملکرد پالپی از طریق تزریق سلولها به تنهایی در پالپ شامپر بدون استفاده از داربست یا مولکولهای سیگنال دهنده بسیار پایین است. برای رشد سه بعدی سلولها در فضای داخل کانال می توان از داربست سلولز باکتریایی متیله شده استفاده نمود.^(۳۷)

سلول های بنیادی پالپ دندان انسان در مرحله S از چرخه سلولی به میزان زیادی کیناز ۶ وابسته به سیکلین فعال کننده چرخه سلولی را بیان می کنند. cdk6 به و سیله Cyclin D1 فعال می شود تا سلول را از مرحله G1 از چرخه سلولی عبور دهد.^(۳۸) تماس سلولها با تکنسیم موجب نابودی آنها شده و در برخی از موارد فعالیت آنها را به شدت کاهش داد، به طوری که در مدت زمانهای تماسی ۱، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت ، میزان زنده مانی سلولها به ترتیب ۵/۹۵٪، ۵/۸۵٪، ۴/۷۷٪،

تمایز آدیپوسیتی سلول های مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ با استفاده از رنگ آمیزی اوایل رد او نیز بیانگر بنیادین بودن این سلولها بود. (شکل ۳)



شکل ۳- سلولهای بنیادین جدا شده از بافت پالپ دندان شیری انسان که تحت تاثیر محیط آدیپوژنیک به چربی تمایز داده شده اند

تماس سلولها با تکنسیم موجب نابودی آنها و در برخی از موارد فعالیت آنها را به شدت کاهش داد. به طوری که در مدت زمانهای تماسی ۱، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت، میزان زنده مانی سلولها به ترتیب ۵/۹۵، ۵/۸۵، ۴/۷۷، ۴/۶۸ و ۳/۵۷ درصد بود.

بحث:

لازم به ذکر است که ۷ روش مورد استفاده در درمان اندودانتیکس رژنراتیو هنوز در مرحله آزمایشگاهی می باشند.^(۲۷-۲۱)

مهمترین این روشها عبارتند از: از لخته خونی و سلولهای بنیادی جهت خونرسانی مجدد بافت نکروزه پالپ دندانهای نابالغ نکروزه انسانی و همچنین استفاده از سلولهای بنیادی بالغ در داربست های مناسب جهت ترمیم پالپ اکسپوز شده و یا ضایعات وارد شده به دندان اعم از پوسیدگی و یا آسیب های ایاتروژنیک ناشی از اعمال دندانپزشکی است.^(۲۷-۳۳)

پالپ دندان، حاوی جمعیتی از سلول های بنیادی است که اغلب، سلول های ادنتوبلاستوئید نامیده می شوند.^(۳۴) زیرا به نظر می آید که این سلول ها باعث سنتز و ترشح ماتریکس عاجی مشابه سلو لهای ادنتوبلاستی که جایگزین شان شده

مورد خاص داربست ژلاتینی ترجیح داده می شود زیرا تخریب پذیری راحت تر و چسبندگی سلولهای روی آن بیشتر است با این کار مدت زمان بازسازی کوتاه تر شده و تعداد سلولهای زنده نیز بیشتر است.

نتیجه گیری:

به نظر می رسد سلول های بنیادین پالپ دندان قابلیت قابل توجهی در تبدیل به بافت استخوان و چربی دارند و نشاندار سازی این سلولها با تکنسیم M۹۹ در طی زمان موجب کاهش قابل توجه بقا می شود.

regenerative در تکنیک و ۵۷/۳٪ و ۶۸/۴٪ بود. در تکنیک endodontic ژنهای مینرالیزه کننده به داخل سلولهای پالپی زنده در دندانهای نکروتیک و دارای علائم منتقل می شوند، تا فرایند مینرالیزاسیون را تسریع بخشند مثلا سلولهای بافت پالپ تحت تیمار با BMP توانایی تمایز به ادونتوبلاست را دارند.^(۳۸،۳۶) در نتیجه یک راه برای احیای عاج این است که ژن BMPII به سلولهای پالپ تزریق گردد. برای رشد سه بعدی سلولها باید از یک سری داربستهای زیست سازگار و البته تخریب پذیر مانند ژلاتین و کلاژن استفاده نمود که البته در این

References:

1. Wang J, Wei X, Ling J, Huang Y, Huo Y, Zhou Y. The presence of a side population and its marker ABCG2 in human deciduous dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 24;400(3):334-9.
- 2- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12
3. Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1823-33
- 4- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Whartons Jelly From Neurons and Glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
- 5- Huang AH, 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 Oct;37(9):571-4
- 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 May;324(2):225-36
- 7- 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 Feb 17;11:35-42
- 8- Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006 May; 39(5): 415-422.
- 9- Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006 May;324(2):225-36
- 10- Huang GT-J, Shagranova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*. 2006 Nov;32(11):1066-73
- 11- 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 Aug;20(8):1394-402
- 12- Mashhadi Abbas F, Mojarrad S, Yadegary Z, Sharifi B. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from the dental pulp and follicle tissue of human third molar tooth. *J Dent (Tehran)* 2011;24(2):69-76.
- 13- Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002 Nov;23(22):4307-14.
- 14- Teng L, Labasky PA. Neural Crest Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 589: 206-12
- 15- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterizations of a population of immature dental pulp stem cells expressing Oct-4 and other embryonic stem cells markers. *cells tissues organs*, 2006; 184(3-4): 105-16

- 16- Widera D, Grimm WD, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, et al. Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev.* 2007 Jun;16(3):447-60
- 17- Richards P, Tucker WD, Srivastava SC. Technetium-99m: an historical perspective. *Int J Appl Radiat Isot.* 1982 Oct;33(10):793-9.
- 18- Granowska M, Britton KE, Mather SJ, Morris G, Ellison D, Soobramoney S, et al. Radioimmiscintigraphy with ^{99m}Tc labeled monoclonal antibody, 1A3, in colorectal cancer. *Eur J Nucl Med.* 1993 Aug;20(8):690-8
- 19- Cherry SR. In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics. *Phys Med Biol.* 2004;49(3):13-48.
- 20- 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 Mar;206(3):693-701
- 21- Ribatti D, Nico B, Mazia C, Longo V, Murtas D, Manqieri D, et al. Neo vascularization and mast cells with tryptase activity increase simnotaneously in human Pterygium. *J Cell Mol Med.* 2007 May-Jun;11(3):585-9.
- 22- Dominici M, Le Blank K, Mueller I, Slaper Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7
- 23- Ebrahim B, Yghoubi M.M, Abas Nejad SM, Mhammadi kamal Abadi A. Expression of core network elements pluripotent cells isolated from human molar dental. *Med J of cells.*1389;12(3): 356-349..
- 24- Hofstetter C, Holmstrom N, Lilja J, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci.* 2005 Mar;8(3):346-53
- 25- Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009 Sep;27(9):2229-37
- 26- Kouhkan A, Pourpak Z, Moin M, Dorosty AR, Safaralizadeh R, Teimorian S, et al. A study of malnutrition in Iranian patients with primary antibody deficiency. *Iran. J Allergy Asthma Immunol.* 2004 Dec;3(4):189-96.
- 27- Ashraf H, kozekonani M, Mohammadian F. Stem cell and Regenerative role of new therapies in endodontics. *jds.sbmu.ac.ir* 1390. 29(2)
- 28- Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:99-113
- 29- Demir H, Ciftçi M, Küfrevioğlu OI. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves and investigation of some kinetic properties. *Prep Biochem Biotechnol.* 2003 Feb;33(1):39-52
- 30- 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 Aug;34(8):962-9
- 31- Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Nov;108(5):e94-100
- 32- Nesti C, Pardini C, Barachini S, D'Alessandro D, Siciliano G, Murri L, et al. Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. *Brain Res.* 2011 (7);1367:94-102.
- 33- Cappelletti G, Pedrotti B, Maggioni MG, Maci R. Microtubule assembly is directly affected by MPP(+)*in vitro*. *Cell Biol Int.* 2001;25(10):981-4.
- 34- Cappelletti G, Surrey T, Maci R. The parkinsonism producing neurotoxin MPP+ affects microtubule dynamics by acting as a destabilising factor. *FEBS Lett.* 2005 Aug 29;579(21):4781-6.
- 35- Maier IC, Schwab ME. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Sep 29;361(1473):1611-34
- 36- Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):469-74
- 37- Cochran DL, Wozney JM .Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1999 Feb;19:40-58.
- 38- Nourbakhsh A. Talebi B. Mousavi . Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Dental Pulp of Exfoliated Human Deciduous Teeth. *Yakhteh Med J* 2008 10(2):101-108.