

A Study of the Major Components of the PluriNet Network Expression in Dental Pulp Stem Cells Isolated from Human Third Molar Teeth

Behnam Ebrahimi, M.Sc.^{1,2}, Mohammad Mehdi Yaghoobi, Ph.D.^{1*}, Mehdi Abbas Nejad, Ph.D.², Ali Mohammadi Kamal-abadi, D.D.S³, Maryam Raof, D.D.S^{3,4}

1. Department of Biotechnology, Research Institute for Environmental Sciences, International Centre for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3. Department of Endodontics, School of Dentistry, Kerman Medical University, Kerman, Iran
4. Oral and Dental Diseases Research Center, School of Dentistry, Kerman Medical University, Kerman, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 76315-117, Department of Biotechnology, Research institute for Environmental Sciences, International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, Iran
Email: yaghoobim@icst.ac.ir

Received: 15/Sep/2009, Accepted: 5/Jul/2010

Abstract

Objective: The objective of this study was to isolate and culture human dental pulp stem cells to study important stem cell markers in them.

Materials and Methods: Dental stem cells were isolated from human pulp and cultured in alpha-modified eagle's medium (α -MEM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) in a 37°C incubator with 5% CO₂ and photographed under inverted microscope. The expressions of the important stem cell markers were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis in the cells at different passages.

Results: Cells isolated from dental pulp showed a high rate of proliferation and were cultured to more than 15 passages *in vitro*. The study of gene expression by RT-PCR showed that these cells expressed nucleostemin, cyclin D1, Oct-4 and nanog (major components of the PluriNet) in different passages as well as under serum-free conditions.

Conclusion: Cells isolated from dental pulp are genuine pluripotent stem cells with high potential for self-renewal. The expression of the stem cell markers in human dental pulp stem cells indicate that they have a great potential for cell therapy and regenerative medicine, even they were isolated from adult teeth.

Keywords: Pluripotency, Stem Cell Marker, Gene Expression, Dental Pulp

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 349-356

بررسی بیان اجزای اصلی شبکه پرتوانی در سلول‌های بنیادی جدا شده از دندان عقل انسان

بهنام ابراهیمی^{۱*}، M.Sc.، محمد مهدی یعقوبی^{۱*}، Ph.D.، مهدی عباس‌نژاد^۲، Ph.D.، علی محمدی کمال‌آبادی^۳، D.D.S.، مریم رئوف^۴، D.D.S.

۱. مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، پژوهشکده علوم محیطی، بخش بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

۲. دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی، کرمان، ایران

۳. دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده دندانپزشکی، گروه آندودنتیکس، کرمان، ایران

۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان و دندان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده دندانپزشکی، کرمان، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، کرمان، صندوق پستی: ۷۶۳۱۵-۱۱۷، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان،

پژوهشکده علوم محیطی، بخش بیوتکنولوژی

پست الکترونیک: Email: yaghoobim@icst.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۶/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۱۳

چکیده

*** هدف:** جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی از دندان عقل انسان و بررسی بیان مارکرهای مهم ژنی سلول بنیادی در آنها
*** مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی از پالپ دندان عقل انسان بالغ جدا و در محیط (Alpha-Modified Eagle's Medium (α-MEM با ۲۰ درصد سرم جنین گاو در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده و پس از مشاهده زیر میکروسکوپ معکوس عکس‌برداری انجام شد. بیان مارکرهای سلول بنیادی در پاساژهای مختلف به روش RT-PCR و مشاهده محصولات روی الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

*** یافته‌ها:** نتایج کشت نشان داد که سلول‌های جدا شده از پالپ، قدرت تکثیر زیادی داشته و تا بیش از ۱۵ پاساژ کشت داده شدند. بررسی بیان ژن‌ها به روش Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای مهم سلول‌های بنیادی مورد نظر شامل Oct-4، Cyclin D1، Nucleostemin و Nanog (که از اجزای اصلی شبکه پرتوانی هستند) را بیان می‌کنند و در طی پاساژهای متوالی و هم‌چنین کشت بدون سرم (Fetal Bovine Serum (FBS بیان آنها تغییر نمی‌کند.

*** نتیجه‌گیری:** این نتایج بر بنیادی بودن سلول‌های جدا شده از پالپ دندان انسان و پتانسیل بالای خودبازسازی آنها دلالت می‌کند. به علاوه ویژگی‌های ژن‌های بررسی شده که به طور عمده در سلول‌های بنیادی رویانی بیان می‌شوند، پتانسیل بالقوه این سلول‌ها را بر خلاف اینکه از بافت بزرگسال جدا شده‌اند برای سلول درمانی و پزشکی ترمیمی نشان می‌دهد.

*** کلیدواژگان:** پرتوانی، نشانگر سلول بنیادی، بیان ژن، پالپ دندان

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۵۶-۳۴۹

مقدمه

سلول‌های بنیادی رویانی و بزرگسال از نظر منشأ، قدرت تمایز به سلول‌های مختلف و مدت زمان حفظ توانایی خودبازسازی متفاوت هستند و این، خود، ناشی از بیان متفاوت ژن‌های مسئول چنین ویژگی‌هایی در این سلول‌هاست (۳). سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان (Dental Pulp Stem Cell; DPSC) برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط گروتوس و همکاران معرفی شدند (۴). تاکنون گروه‌های مختلفی در سراسر دنیا از جمله در داخل کشور (۵) این سلول‌ها را جداسازی کرده و مطالعات مختلفی روی آنها انجام داده‌اند. این سلول‌ها مارکر سلول بنیادی مزانشیمی Stro-1 (۴)، و نیز مارکر سلول بنیادی رویانی Sox2 را بیان می‌کنند (۶). اما تاکنون گزارشی از بیان ژن‌های مهم شبکه ژنی ویژه سلول‌های بنیادی Oct-4، Nanog، Nucleostemin (NS)، Jmjd1a، Jmjd2c و Slain1 در این سلول‌ها گزارش نشده است. بنابراین هویت این سلول‌ها در سطح ژنتیکی و مولکولی به ویژه از نظر مارکرهای مهمی که در بنیادی بودن سلول نقش کلیدی دارند، شناسایی نشده است.

محصول Nanog پروتئینی است که تقسیمات خودبازسازی را در سلول‌های بنیادی رویانی حفظ می‌کند و از دست دادن آن منجر به از دست دادن خصوصیت پرتوانی و تمایز به سلول‌های اندودرم خارج جنینی می‌شود

بر اساس تعاریف سنتی، سلول بنیادی به سلول تمایز نیافته‌ای اطلاق می‌گردد که حداقل دو ویژگی تقسیمات مکرر خودبازسازی (Self-Renewal) و توانایی تمایز به بیش از یک سلول را دارا باشد (۱). به طور معمول برای شناسایی سلول بنیادی از معرفی یک یا چند مارکر مانند Nanog، Oct-4 و ژن‌های مشابه به روش‌هایی مانند Reverse Transcription Polymerase Chain reaction (RT-PCR)، ایمونوسیتوشیمی و یا فلوسایتومتری استفاده می‌شود. در این اواخر برخی محققین این نحوه شناسایی و معرفی سلول بنیادی را به چالش کشیده‌اند. نظر آنان بر این است که با بیان تنها یک مارکر نمی‌توان گفت که سلول بنیادی جداسازی شده است بلکه سلولی، بنیادی است که مجموعه‌ای از ژن‌هایی - که به صورت یک شبکه باهم درگیر هستند - در آن به صورت فعال عمل کنند. این شبکه پروتئینی به نام شبکه پرتوانی (Pluripotency Network) و به اختصار PluriNet نام‌گذاری شده است که ویژگی مشترک تمام سلول‌های پرتوان (Pluripotent) است. به عبارت دیگر اگر سلولی بتواند ژن‌های درون این شبکه را بیان کند، می‌تواند در تعریف سلول بنیادی پرتوان بگنجد (۲).

شورای پژوهشی و کمیته‌های ذیربط در دانشگاه علوم پزشکی کرمان بوده است. دندان‌ها در بافر نمکی فسفات و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از ضدعفونی شدن در محلول یدین، دندان به طور راسی قاعده‌ای شکسته و بافت پالپ استخراج و با تیغ استریل قطعه قطعه شد. قطعات پالپ به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر کلاژناز- دیسپاز (شرکت Roche) قرار گرفته و پس از آن سانتریفیوژ گردید. به منظور مقایسه تاثیر هضم آنزیمی روی جداسازی سلول‌ها از پالپ، روی برخی نمونه‌ها هضم آنزیمی انجام نشده و قطعات پالپ بدون هضم آنزیمی کشت داده شدند. رسوب حاصل، شامل قطعات پالپ و سلول‌های جدا شده در محیط کشت (Alpha-Modified Eagle's Medium (α -MEM) غنی شده با ۲۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum; FBS) (Invitrogen) کشت داده و در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 نگهداری شد (۴). در برخی نمونه‌ها نیز قطعات بزرگ پالپ و قطعات کوچک آزاد شده در زمان تیمار آنزیمی با کمک صافی سلول با اندازه منافذ ۷۰ میکرون از هم جدا شده و در ظروف جداگانه کشت داده شدند. محیط کشت فلاسک هر ۳ روز یک بار تعویض و به طور متوسط هر پنج روز یکبار با محلول تریپسین-EDTA پاساژ ۱:۵ انجام می‌شد. در هر پاساژ حدود ۳۰۰-۲۰۰ هزار سلول زنده برای کشت در فلاسک ریخته می‌شد. شمارش سلول‌های زنده با رنگ آمیزی Trypan Blue ۰/۴ درصد روی لام هماسیتومتر انجام می‌شد. برای انجماد سلول‌ها از همان محیط کشت با ۳۰ درصد FBS و ۵ درصد DMSO استفاده شده و سلول‌ها پس از کاهش تدریجی دما به فریزر -۸۰- و سپس به تانک ازت مایع منتقل شدند. برای کشت سلول‌های منجمد سلول‌ها از نیتروژن مایع خارج شده و پس از ذوب سریع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در همان شرایط کشت داده شدند (۴).

رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ Hoechst

سلول‌های کشت داده شده روی لام پس از شست‌وشو با بافر نمکی فسفات در محلول متانول-استن (۱:۱) به مدت ۲ دقیقه ثابت شدند. پس از دو مرتبه شست‌وشو با بافر نمکی فسفات، در محلول رنگ (Sigma) Hoechst با غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در فضای تاریک نگهداری شدند (۱۳). سپس با آب مقطر استریل دو مرتبه شسته شده و بعد از آب‌گیری در اتانول مطلق با میکروسکوپ فلورسانس Axioplan 2 (Zeiss) با فیلتر شماره ۵ (طول موج ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر) مشاهده شدند و به وسیله دوربین دیجیتال Canon Powershot A260 از آنها عکس برداری شد.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل

RNA کل سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژهای ۲ الی ۱۵ به کمک کیت RNeasy (شرکت Qiagen) بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. ۰/۵ میکروگرم از RNA ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار با آنزیم DNase I عاری از RNase (Fermentas) قرار گرفته و سپس به همراه ۰/۲ میکروگرم از پرایمر شش تایی تصادفی در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد واسرشت شده و سپس با ۱ میلی مولار مخلوط dNTP، بیست واحد مهارکننده ریبونوکلیاز و دو بیست واحد آنزیم M-MuLV RT (همگی بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده Fermentas) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای ساخت DNA مکمل در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه به کار رفت. دو کنترل منفی بدون الگوی RNA و بدون آنزیم M-MuLV RT به همراه هر واکنش گذاشته می‌شد.

(۷). Oct-4 یک فاکتور رونویسی بسیار مهم و کلیدی در شبکه ژنی درگیر در ایجاد و حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی رویانی می‌باشد که با Nanog همکاری دارد (۸). NS نیز ژنی است که در سلول‌های بنیادی و سرطانی با مکانیسم به ظاهر مستقل از Nanog و Oct-4 فعال است (۹)، کاهش بیان هر کدام از این ژن‌ها منجر به کاهش پتانسیل خودبازسازی سلول و ورود به فرایند تمایز می‌گردد، به طوری که با القای تمایز در شرایط طبیعی یا در شرایط آزمایشگاه نیز بیان آنها افت پیدا می‌کند (۸، ۹).

جومانجی هیستون دمتیلازها (Jumonji Histone Demethylases; JHDMS) واکنش‌های اکسیداتیو دمتیلاسیون را با استفاده از یون آهن و آلفاکتوگلو تارات به عنوان کوفاکتور کاتالیز می‌کنند. Jmjd1a و Jmjd2c دو هیستون دمتیلاز هستند که به ترتیب سطوح کلی دی‌متیلاسیون و تری‌متیلاسیون لیزین ۹ هیستون H3 را تنظیم می‌کنند. هر دو این ژن‌ها با کنترل اپی ژنتیکی برای حفظ خودبازسازی سلول‌های بنیادی جنینی ضروری هستند (۱۱).

Oct-4 موجب افزایش بیان هیستون دمتیلازهای فرودست خود می‌شود که با کاهش متیلاسیون لیزین ۹ هیستون H3 در پروموتور ژن‌های لازم برای خودبازسازی سلول‌های بنیادی جنینی، حالت اپی ژنتیکی هیستون را حفظ می‌کند (۱۱).

Slain1 به عنوان یک ژن موثر در بنیادی بودن سلول‌های بنیادی رویانی موش و انسان شناخته شده است که در سلول‌های بنیادی رویانی و در اپی بلاست، سیستم عصبی، جوانه دم و سومیت‌های رویان در حال تکوین موش بیان می‌شود (۱۲).

از آنجا که مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادی مختلف می‌تواند متفاوت باشد، بررسی بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی در سلول‌های مختلف و روابط بین آنها بسیار مهم است. از طرف دیگر عوامل ذکر شده و سایر عوامل احتمالی دیگر به صورت یک شبکه پیچیده با هم همکاری دارند. به عنوان مثل بیش از ۴۰ درصد از ژن‌های موش در پروموتور خود دارای جایگاه اتصال برای هم Oct-4 و هم Nanog هستند (۸). مهار Oct-4 با RNAi باعث کاهش بیان Jmjd1a و Jmjd2c می‌شود و حذف هر کدام از این دو ژن اخیر به کاهش بیان ژن‌های Sox2، Nanog و Oct-4 منجر می‌شود (۱۱). بنابراین سیگنال‌های ترکیبی از همه این ژن‌ها برای حفظ فنوتیپ چندتوانی در سلول‌های بنیادی ضروری است. هرچه قدر شبکه‌های ژنی مسؤول حفظ پرتوانی و خودبازسازی سلول‌های بنیادی رویانی در سلول‌های بنیادی بزرگسال نیز فعال باشند، آن سلول‌ها به اندازه سلول‌های بنیادی رویانی پرتوان بوده و می‌توانند به انواع متعددی از سلول‌های تخصصی تمایز یابند. هم‌چنین با شناخت بهتر اجزای این شبکه و مکانیسم پرتوانی و مسیر تمایزی سلول‌های بنیادی، تمایز آنها به سلول‌های مورد نظر نیز به صورت کاملاً کنترل شده صورت خواهد گرفت. از طرف دیگر، هدف نهایی بهره‌برداری کاربردی از سلول‌های بنیادی در زمینه پزشکی ترمیمی و درمان بیماری‌ها نیز موفق‌تر خواهد بود. هدف این طرح، جداسازی سلول‌های بنیادی از دندان عقل افراد بزرگسال و بررسی بیان ژن‌های اصلی درگیر در شبکه پرتوانی در آنها بوده است.

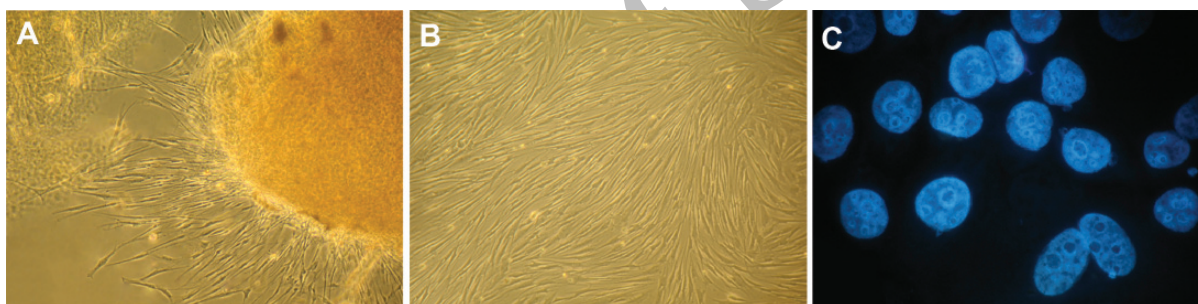
مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول

دندان عقل بدون پوسیدگی از افراد ۱۸ تا ۲۵ ساله که به مطب دندانپزشک جراح مراجعه نموده بودند با جراحی خارج شده و با اطلاع و رضایت بیمار برای پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. این طرح مصوب

جدول: نام ژن‌های بررسی شده به همراه شماره دست‌یابی، توالی پرایمرها، محل پرایمر روی هر ژن و طول قطعات حاصل از تکثیر برای هر ژن

نام ژن و شماره RefSeq	توالی پرایمر و شماره اگزون هدف	طول قطعه تکثیر شده
<i>βactin</i> NM_001101	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG (exon 3) R: GACAGGACTGTGTGGCGTA(exon 4)	237 bps
<i>Nanog</i> NM_024865	F: TGATTTGTGGCCTGAAGAA(exon 1) R: AGTGGGTTGTTTGCCTTTGG(exon 2)	155 bps
<i>Nucleostemin</i> NM_014366	F: GTGATTGAAGCCTCCGATGT(exon 6) R: AGCCAGCTCTCCAAAGGCTC(exon 7)	167 bps
<i>Oct-4</i> NM_002701	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA(exon 4) R: TTACAGAACCACACTCGGACC(exon 5)	120 bps
<i>Slain1</i> NM_001040153	F: CGTTCAAGGCAGCAGTAACA(exon 5) R: GTGAAGACAGAGGCTTTGGAG(exon 6)	215 bps
<i>Jmjd1a</i> NM_018433	F: CAGGGTTGCTCTCAZAAGT(exon 10) R: TAGGAAGGCCAGTCAATG(exon 10)	146 bps
<i>Jmjd2c</i> NM_015061	F: GGTCCCAGAAGTTCGATT(exon 17) R: ATCCAGTGTTCCTACGGT(exon 18)	148 bps
<i>Cyclin D1</i> NM_053056.2	F: CGCTTTGTCTGTCTGAT(exon 5) R: TACATGTTGGTGTGGAA(exon 5)	195 bps



شکل ۱: سلول‌های در حال رشد به بیرون از بافت پالپ دندان بعد از گذشت ۵ روز از آغاز کشت. B: سلول‌های پالپ دندان انسان با ظاهر دوکی شکل در پاساژ پنجم (بزرگ‌نمایی هر دو $\times 200$). C: رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان با رنگ Hoechst. همان‌گونه که مشخص است هسته‌ها به طور واضح رنگ گرفته‌اند (هستک‌ها به شکل نقاطی تیره‌تر در هسته دیده می‌شوند) ولی سیتوپلاسم سلول رنگ نگرفته است که حکایت از نبود آلودگی داخل سلولی است (بزرگ‌نمایی $\times 1000$).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز ژل آگارز (Fermentas)، روی الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه G BOX HR عکس برداری انجام شده و در برنامه Gene Tools (شرکت Syngene) بررسی شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی تاثیر هضم آنزیمی روی بازدهی جداسازی سلول‌ها، در برخی نمونه‌ها هضم آنزیمی انجام نشد. نتایج نشان داد در روش هضم قطعات بافت پالپ و کشت آنها بعد از گذشت ۲-۳ روز اولین سلول‌های خارج شده از بافت با ظاهر دوکی شکل قابل مشاهده بودند (شکل ۱A). در سمت راست شکل قطعه پالپ مشاهده می‌شود که سلول‌ها از زیر آن بیرون زده‌اند. اما زمانی که قطعات پالپ از همان دندان تحت تیمار آنزیمی قرار نمی‌گرفتند سلول‌های پالپ پس از گذشت حدود ۱۶-۱۲ روز ظاهر می‌شدند. به عبارت دیگر هضم آنزیمی سبب تسریع در آزاد شدن سلول‌ها از پالپ می‌شود اما برای جداسازی سلول‌ها ضروری نمی‌باشد. شکل ۱B سلول‌های جدا شده از پالپ دندان انسان در پاساژ پنجم را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است سلول‌ها با آرایش منظم و ظاهر دوکی شکل سطح

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز ژل آگارز یک میکرولیتر از DNA مکمل ساخته شده در مرحله قبل به عنوان الگو برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۱/۵ میلی‌مولار منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر تخصصی و ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (سیناژن) در حجم ۲۵ میکرولیتر به کار رفت. تکثیر در دستگاه Mastercycler® (شرکت Eppendorf) و با شرایط ذیل انجام شد:

واکنش سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه)، واسرشت سازی هر چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمر به توالی هدف در هر چرخه ۵۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، تطویل محصول در هر چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه). تعداد چرخه‌ها ۳۵ بار بود و تطویل نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. هر آزمایش حداقل سه مرتبه تکرار شد تا از تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل شود. پرایمرهای تخصصی برای هر ژن توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی و توسط شرکت Isogen ساخته شد. از ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱). محصول PCR به همراه نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت باز

بحث

به طور عمده محققین مختلف از دو روش برای استخراج سلول از بافت پالپ دندان استفاده کرده‌اند: گروهی بافت را قطعه قطعه کرده و بدون هضم با آنزیم‌های کلاژناز- دیسپاز آن را در محیط کشت کامل کشت داده‌اند (۱۶-۱۳). گروهی نیز ابتدا بافت را قطعه قطعه کرده و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های کلاژناز، رسوب سانتریفیوژ شده حاصل از هضم را کشت داده و بدین صورت سلول‌ها را استخراج کرده‌اند (۴، ۱۹-۱۷).

در این پژوهش از هر دو روش استفاده شد. در روش کشت پالپ هضم نشده حداقل ۲ هفته پس از کشت، بافت سلول‌ها از پالپ خارج می‌شد. از طرف دیگر هضم آنزیمی سبب تخریب ساختار پالپ و تسریع در روند آزاد شدن سلول‌ها می‌شود. به نظر می‌رسد روش هضم بیشتر سلول‌ها را از پالپ خارج کند. در این تحقیق از ترکیب هر دو روش استفاده شد، بدین صورت که قطعات پالپ پس از هضم آنزیمی کشت می‌شدند و شاهد میزان موفقیت بالایی بودیم به گونه‌ای که در بیشتر موارد بعد از ۴۸ ساعت سلول جدا شده قابل مشاهده بود.

به منظور شناسایی آلودگی احتمالی سلول‌های جدا شده از پالپ دندان از رنگ Hoechst استفاده شد تا اگر سلول‌ها به انگل داخل سلولی آلوده باشند ژنوم این میکرواورگانیزم‌ها در سیتوپلاسم رنگ بگیرد. نتایج رنگ‌آمیزی با این رنگ نیز نشان داد که سلول‌ها به انگل داخل سلولی مبتلا نمی‌باشند. علائم آلودگی برون سلولی که همراه نمونه‌ها وارد شده باشد نیز مشاهده نگردید.

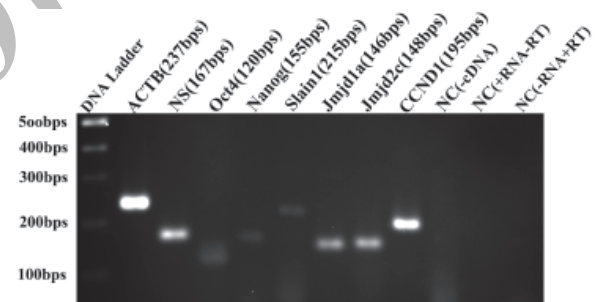
در بخش دیگر این تحقیق، به منظور تعیین هویت و مقایسه سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان با دیگر سلول‌های بنیادی از جمله سلول بنیادی رویانی به عنوان یک مرجع سلول بنیادی پروتوان، تعدادی از ژن‌هایی که در این سلول‌ها به میزان بالایی بیان می‌شوند و به عنوان مارکر این سلول‌ها شناخته می‌شوند، انتخاب شدند و بیان آنها در سلول‌های جداسازی شده از پالپ دندان انسان مورد بررسی قرار گرفتند تا بتوان جایگاه این سلول‌ها را در تعاریف توان مشخص کرد.

زمانی که اولین بار سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان در سال ۲۰۰۰ معرفی شد، برای شناسایی آنها از آنتی‌بادی علیه برخی مارکرهای مزانشیمی از جمله Stro1 استفاده شد و دو ویژگی خودبازسازی و ترامیز آنها در شرایط درون بدن (*in vivo*) به اثبات رسید (۴، ۲۰). این سلول‌ها به سلول‌های استخوانی (۱۴)، سلول ماهیچه (۲۱، ۲۲)، غضروف (۲۱)، ادونتوبلاست و چربی (۲۲، ۲۰) و سلول عصبی (۲۳، ۲۴) نیز تمایز داده شده‌اند. هم‌چنین در این اواخر مشخص شده است که این سلول‌ها آنتی‌ژن‌های CD133 (مارکر خون‌ساز)، CD31 (مارکر اندوتلیال)، CD117، CD71، CD34، CD45 و HLA II را بیان نمی‌کنند. در حالی که مارکرهای CD40، CD90، CD73، CD44، CD146، CD166، CD105، CD29 را بیان می‌کنند (۲۸-۲۵). با وجود همه تحقیقات پیشین، بیان مارکرهای مهمی که در این پژوهش بررسی شدند تاکنون در این سلول‌ها گزارش نشده است. بنابراین به مقایسه بیان و یا تشریح عملکردشان در سایر سلول‌های بنیادی می‌پردازیم.

Nanog (۷)، Jmjd1a (۱۱)، Nucleostemin (۱۰)، Pou5f1 (۸)، Ccnd1 (۲۹) و Slain1 (۱۲) از جمله ژن‌هایی هستند که به میزان بالایی در توده سلولی داخلی رویان در مرحله بلاستوسیست و سلول‌های بنیادی رویانی بیان می‌شوند. در این تحقیق نیز بیان این ژن‌ها در DPSC‌ها بررسی شد. همان‌طور که در مقدمه گفته شد روش مرسوم

طرف کشت را پر کرده‌اند. هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان داد که اگر قطعات پالپ با صافی سلولی از قطعات کوچک باقی‌مانده جدا شوند، میزان موفقیت در گرفتن سلول از قطعات کوچک‌تر از ۷۰ میکرون کمتر از ۱۰ درصد بوده است (از ۲۰ نمونه دندان فقط در یک نمونه سلول جدا شد).

به عبارت دیگر وجود قطعات پالپ در محیط کشت باعث افزایش احتمال جداسازی سلول می‌شود. به طور میانگین میزان موفقیت در جداسازی سلول‌ها از پالپ دندان‌های افراد مختلف که تحت اثر هضم آنزیمی قرار می‌گرفتند حدود ۶۰ درصد بود. سلول‌های جدا شده از نمونه‌های دندان افراد مختلف تا بیش از ۱۵ پاساژ ۱:۵ (معادل تقریبی ۷۵ دو برابر شدن جمعیت) در شرایط آزمایشگاه رشد کردند. این امر در حالی بود که تغییر مشهودی در سرعت تقسیم آنها دیده نشده است. هم‌چنین انجماد و ذوب سلول‌ها اثر قابل ملاحظه‌ای بر رشد آنها نمی‌گذاشت و سلول‌های منجمد پس از ذوب و کشت مجدد رشد و تکثیر خود را آغاز می‌کردند. ژن‌های NS (Gnl3)، Slain1، Nanog، Oct-4 (Pou5f1)، Cyclin D1 (CCND1) و Jmjd2c و Jmjd1a از جمله ژن‌های درگیر در خودبازسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی رویانی هستند که بیان همه آنها در سلول‌های جدا شده از پالپ دندان انسان مشاهده شد. این ژن‌ها در طی پاساژهای مختلف همچنان بیان می‌شدند و هیچ گونه تغییر محسوسی در بیان آنها که با روش RT-PCR قابل شناسایی باشد، دیده نشد (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ژن‌های NS، β-actin، Ccnd1، Jmjd2c، Jmjd1a، Slain1، Nanog، Oct-4 بنیادی پالپ دندان انسان کشت شده در محیط حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو در پاساژ پنجم. همان‌گونه که مشخص است این سلول‌ها همه مارکرهای سلول بنیادی را که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته‌اند بیان می‌کنند. در کنترل منفی اول از چپ به راست همه اجزای PCR به غیر از الگوی cDNA حضور دارند. در کنترل منفی دوم از RNA بدون اثر دادن آنزیم RT به عنوان الگو در PCR استفاده شده است تا آلودگی ژنومی در RNA استخراج شده خود را نشان دهد. در کنترل منفی سوم در مرحله ساخت cDNA به جای RNA از آب استفاده شده است. در تمام موارد کنترل از پرایمرهای β-actin استفاده شده است. نبود محصول PCR در هر کدام از کنترل‌ها نشان دهنده عدم وجود آلودگی در مراحل RT-PCR است.

هم‌چنین به منظور بررسی تاثیر FBS روی رشد سلول‌ها و بیان مارکرهای فوق، به موازات کشت سلول‌های جدا شده از پالپ، بخشی از همان سلول‌ها در شرایط یکسان و در محیط بدون FBS کشت داده شدند. نتایج نشان داد که حذف FBS سبب کاهش در رشد سلول‌ها نشده و همه این ژن‌ها در سلول‌هایی که برای مدت یک هفته در محیط کشت بدون سرم رشد خود را سپری کرده بودند، بیان می‌شدند. رنگ‌آمیزی Hoechst نیز نشان دهنده عدم آلودگی به میکرواورگانیزم داخل سلولی در سلول‌های جدا شده از پالپ بود (شکل ۱C).

توده سلولی داخلی معرفی شده است *Slain1* می‌باشد؛ در این پژوهش نیز بر آن شدیم تا از این ژن برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های استخراج شده از پالپ دندان انسان استفاده کنیم و نتایج RT-PCR گویای آن است که *Slain1* در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان فعال می‌باشد. مطالب زیادی تاکنون در مورد نحوه عملکرد *Slain1* گزارش نشده است. نتایج پیشین نشان می‌دهد که رونوشت ژن *Slain1* در مرحله تمایز نیافتگی سلول‌های بنیادی رویانی انسانی بیان بالایی داشته و در طول تمایز بیان آن کاهش می‌یابد (۱۲).

بیان NS که در هستک سلول‌های بنیادی رویانی، سلول‌های بنیادی عصبی و تعدادی از سلول‌های سرطانی دیده می‌شود، انعکاس دهنده حالت تکثیری سلول و وضعیت چندتوانی آن می‌باشد (۱۰). رومانوف و همکاران به تازگی نشان دادند که NS با سه پروتیین هستکی *Pes1*، *DDX21* و *EBP2* که در پردازش *pre-rRNA* نقش دارند برهم کنش داشته و در بیوژنز پیش‌ساز زیر واحد ریبوزومی *S60* شرکت دارد (۳۱). توانایی اتصال *GTP* به NS انتقال آن را به داخل و بیرون هستک تنظیم می‌کند و موجب عملکرد آن در تکثیر سلول‌های بنیادی و سرطانی می‌شود، که می‌تواند به منظور تبدیل پیام‌های خارج سلولی به حالت میتوزی این سلول‌ها به طور سریع و قابل برگشت استفاده شود. نتایج حاصل از RT-PCR در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان نشان داد که NS هم در این سلول‌ها بیان می‌شود. البته همان طور که قبل گفته شد تاکنون هیچ رابطه‌ای میان عملکرد NS با مسیری که در آن *Nanog* و *Oct-4* فعال هستند، شناسایی نشده است و به ظاهر این دو مسیر مستقل از هم کار می‌کنند. البته پیدا کردن هر نوع رابطه و یا برهم کنش میان این ژن‌ها نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

Cyclin D1 (Ccd1) ژن دیگری است که در بسیاری از سلول‌های بنیادی و سرطانی فعال است (۲۹). سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان در مرحله S از چرخه سلولی به میزان زیادی کیناز ۶ وابسته به سیکلین (*cdk6*)، فعال کننده چرخه سلولی را بیان می‌کنند (۳۲). *cdk6* به وسیله *Cyclin D1* فعال می‌شود تا سلول را از مرحله G1 از چرخه سلولی عبور دهد و سنتز DNA آغاز گردد (۳۳). از قبل بیان این ژن در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان به روش ریزآرایه نشان داده شده بود (۳۲). در تایید این گزارش نتایج این پژوهش نیز فعالیت آن را در این سلول‌ها نشان می‌دهد.

یافته جالب دیگری که در این تحقیق مشاهده شد توانایی زنده ماندن، رشد و تکثیر سلول‌های پالپ دندان انسان در محیط کشت بدون سرم می‌باشد. نکته جالب‌تر اینکه پس از یک هفته نگهداری سلول‌ها در محیط بدون FBS هیچ کدام از ژن‌های *Na*، *Pou5f1*، *Gnl3*، *Slain1*، *Jmjd2c*، *Jmjd1a* و *nog* و *Ccd1* خاموش نشدند و سلول‌ها در سطح بیان ژن، حالت تمایز نیافتگی و خودبازسازی را ترک نکردند. این در حالی است که سلول‌های مشابه مانند سلول مزانشیمی مغز استخوان قادر به تحمل شرایط محیط بدون سرم نبوده و دچار مرگ وسیع سلولی می‌شوند (۳۴). البته یک گزارش حاکی از آن است که اگر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به مدت طولانی حدود یک ماه در شرایط رشد بدون سرم نگهداری شوند، بسیاری از آنها می‌میرند. اما تعداد اندکی سلول باقی می‌ماند که پس از گذراندن این شرایط سخت ژن *Oct-4* را بیان می‌کنند (۳۵). شناسایی رفتار سلول‌های بنیادی مختلف در شرایط سخت مانند رشد در محیط بدون سرم نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

معرفی چند مارکر برای شناسایی و طبقه‌بندی سلول بنیادی پرتوانی یا چندتوان می‌تواند به اشتباه منجر شود. در حال حاضر تعاریفی که در گذشته برای معرفی رده سلول بنیادی جدید به کار می‌رفت به چالش کشیده شد و یک قالب و چهارچوب برای شناسایی نمونه‌های جدید سلول بنیادی با تکیه بر فنوتیپ‌های بیان mRNA از کل ژنوم یا مجموعه مرکزی اطلاعات مرجع که آن را شبکه سلول بنیادی نامیده‌اند معرفی شده است (۲).

این شبکه آن دسته از سلول‌های انسانی که کیفیت سلول بنیادی یا پیش‌ساز دارند مثل سلول بنیادی رویانی، سلول بنیادی مزانشیمی و سلول بنیادی عصبی را در بر می‌گیرد. در این شبکه برهم کنش‌های پروتیین پروتیین یا همان شبکه پرتوانی معرفی شده است که در سلول‌های پرتوان بنیادی رویانی، سرطان‌های رویانی و سلول‌های پرتوان القایی مشترک می‌باشد. پرتوانی و خودبازسازی به وسیله شبکه‌های مولکولی ویژه تحت کنترل شدید هستند و اگر سلولی بتواند ژن‌های درون این شبکه را بیان کند، می‌تواند در تعریف سلول بنیادی پرتوان بگنجد (۲). *Nanog* جزئی کوچک از یک شبکه بزرگ برهم کنش‌های پروتیین می‌باشد که بیان آنها در سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی زیاد است. این شبکه ویژه سلول‌های بنیادی حاوی تنظیم کننده‌های کلیدی می‌باشد که در کنترل چرخه سلول، همانندسازی و تعمیر DNA، متیلاسیون DNA، پردازش RNA، تنظیم هستون‌ها و موقعیت‌یابی نوکلئوزوم‌ها درگیر می‌باشد (۲). آنچه از یافته‌های این محققین در مورد تعریف سلول بنیادی و تعاریف توان بر می‌آید به طور قاطع تکیه بر نقش فاکتورهای رونویسی *Nanog*، *Oct-4* و *Sox2* در شبکه پرتوانی دارد. ترکیب دوتایی *Oct4/Nanog* در فعال نمودن رونویسی *Pou5f1*، *Sox2* و *Nanog* نقش دارد (۸، ۳۰).

در عوض دو فاکتور رونویسی *Pou5f1* و *Sox2* ژن‌های فرودستی را فعال می‌کنند که برای حفظ پرتوانی یا مهار تمایز مهم می‌باشند (۸). *Oct-4* موجب افزایش بیان هستون دمتیلازهای فرودست خود همچون *Jmjd1a* و *Jmjd2c* می‌شود (۱۱).

در این اواخر ویدرا و همکاران گزارش کردند که DPSCها فاکتور رونویسی *Sox2* را بیان کرده ولی *Oct-4* را بیان نمی‌کنند (۶). اما بیان *Oct-4* و *Nanog* در این سلول‌ها در این طرح نشان داده شد. بنابراین با توجه به وابستگی عملکرد این ژن‌ها و نتایج ما، بیان *Sox2* در این سلول‌ها توسط این محققین قابل تایید است. به این ترتیب اجزای اصلی شبکه پرتوانی در این سلول‌ها کامل می‌شوند. این یافته خود به وضوح به این نکته اشاره دارد که نمایه بیان ژن‌های مسؤول پرتوانی در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان با سلول‌های بنیادی رویانی شباهت دارد و می‌توان سلول‌های جدا شده از پالپ را در شبکه فوق گنجانده.

اما *Oct-4* به واسطه *Jmjd2c* بر ساختمان کروماتین جایگاه ژنی *Nanog* اثر می‌گذارد تا ساختار کروماتین این ناحیه را باز کند و کروماتین را در حالتی آماده برای تجمع عوامل رونویسی قرار دهد. برای اینکه بیان *Nanog* به طور قاطع اثبات شود در این پژوهش بیان *Jmjd2c* و *Jmjd1a* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج RT-PCR نشان داد که این دو ژن نیز در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان بیان می‌شوند، همان‌گونه که در سلول‌های بنیادی رویانی بیان آنها گزارش شده است.

یکی دیگر از ژن‌هایی که اواخر محصول آن به عنوان یک فاکتور مهم در حفظ حالت بنیادی و تمایز نیافتگی سلول‌های بنیادی رویانی و

مانند سلول‌های بنیادی رویانی از توانایی‌های بالای تکوینی به منظور کاربردهای پزشکی ترمیمی و درمان بیماری‌ها و ضایعات مختلف برخوردار هستند. هم‌چنین بررسی نقش microRNA در این سلول‌ها و فرایند تمایز و مهار بیان برخی ژن‌ها با روش siRNA از جمله مطالعات آینده بر این سلول‌ها می‌باشد.

تقدیر و تشکر

مجریان این طرح مراتب قدردانی خود را از همکاران جراح به خاطر همکاری در تهیه نمونه دندان اعلام می‌کنند. این تحقیق از محل اعتبار طرح مصوب دانشکده دندانپزشکی کرمان و مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته تامین شده است.

References

1. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002; 12(11): 502-508.
2. Müller FJ, Laurent LC, Kostka D, Ulitsky I, Williams R, Lu C, et al. Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature.* 2008; 455(7211): 401-405.
3. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell.* 2004; 116: 639-648.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-13630.
5. Navab Azam A, Sadeghian Nodushan F, Fesahat F, Soleimani M. Isolation and characterization of postnatal stem cells from dental pulp and priapical follicle. *Yakhteh.* 2008; 10 Suppl 1; 89.
6. Widera D, Grimm W, 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; 16: 447-460.
7. Mitsui K, Tokuzawa, Y Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003; 113: 631-642.
8. Loh Y, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006; 38(4): 431-440.
9. Ma H, Pederson T. Nucleostemin: a multiplex regulator of cell-cycle progression. *Trends Cell Biol.* 2008; 18(12): 575-579.
10. Tsai RYL, McKay RDG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002; 16: 2991-3003.
11. Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 2007; 21(20): 2545-2557.
12. Hirst CE, Ng ES, Azzola L, Voss AK, Thomas T, Stanley EG, et al. Transcriptional profiling of mouse and human ES cells identifies SLAIN1, a novel stem cell gene. *Developmental Biology.* 2006; 293: 90-103.
13. 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.

نتیجه‌گیری

توجه به یافته‌های اخیر مشخص می‌سازد که علاوه بر توانایی خودبازسازی و ترانزایز شبکه‌ای از ژن‌های خاص به نام شبکه پرتوانی می‌بایست در یک سلول بیان شود تا بتوان آن را سلول بنیادی پرتوان نامید. در این طرح سلول‌های بنیادی از پالپ دندان انسان جداسازی و کشت داده شدند. هم‌چنین مهم‌ترین ژن‌هایی که نقش کلیدی در این شبکه دارند، در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان ثابت می‌کند که این سلول‌ها جزو سلول‌های بنیادی پرتوان می‌باشند. از آنجا که این سلول‌ها با روش غیرتهاجمی به دست می‌آیند، به عنوان یکی از منابع آسان سلول بنیادی بزرگسال مطرح می‌شوند. از این رو می‌توان گفت که این سلول‌ها نیز

14. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyumata K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor Cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 1191-1197.
15. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 2005; 80(6): 836-842.
16. 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; 39(5): 415-422.
17. 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; 32: 1066-1073.
18. 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; 324: 225-236.
19. 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: 1394-1402.
20. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81(8): 531-535.
21. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006; 12: 2813-2823.
22. Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008; 2(2-3): 117-125.
23. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008; 26(7): 1787-1795.
24. 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; 27: 2229-2237.
25. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G,

- De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med*. 2010 ;14(6B):1635-1644.
26. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev*. 2008; 17: 1175-1184.
27. Suchanek J, Soukup T, Visek B, Ivancakova R, Kucerova L, Mokry J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009; 153(1): 31-35.
28. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J*. 2010; 10(2): 105-113.
29. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G (1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; 12: 676-684.
30. Matoba R, Niwa H, Masui S, Ohtsuka S, Carter MG, Sharov AA, et al. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS ONE*. 2006; 1(1): e26.
31. Romanova L, Grand A, Zhang L, Rayner S, Katoku-Kikyo N, Kellner S, et al. Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem*. 2009; 284: 4968-4977.
32. 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: 532-539.
33. Gossel M, Baker GL, Hinds PW. cdk6 can shorten G(1) phase dependent upon the N-terminal INK4 interaction domain. *J Biol Chem*. 1999; 274(42): 29960-29967.
34. Yaghoobi MM, Mowla SJ. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Neurosci Lett*. 2006; 397: 149-154.
35. Pochampally R, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*. 2004; 103(5): 1647-1652.