

بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسان به سلول استخوانی به کمک ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون

زهرا طیرانی نجاران^۱، حسین کامالی^۲، فرزین هادیزاده^{۳*}، فرناز احمدی^۴، سحر شهیدی^۵، الهام خداوردی^{۶*}

^۱ دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استادیار گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات دارورسانی هدفمند، انستیتو علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۳ استادیار گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۴ دانشجوی تخصصی سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۵ دانشجوی عمومی دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات دارورسانی هدفمند، انستیتو علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مشهد، ایران

^۶ دانشیار گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات دارورسانی هدفمند، انستیتو علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۹/۴/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۴

Osteoblast Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells with Dexamethasone in-situ Forming Implant

Zahra Tayarani-Najaran¹, Hossein Kamali², Farzin Hadizadeh^{3*}, Farahnaz Ahmadi⁴, Sahar Shahidi⁵, Elham Khodaverdi^{6*}

¹ Associate Professor, Department of Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Ph.D candidate in Toxicology, Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Student of PharmD, Faculty of pharmacy, Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 7 July 2020; Accepted: 23 January 2021

Introduction: Dental pulp stem cells (DPSCs) are known as multipotent stem cells which differentiate into three different cell lines, including osteocytes, chondrocytes, and adipocytes. Until now, dental precursor cells have been used in tissue engineering studies for pre-clinical applications. The dexamethasone in-situ forming implant (ISFI) is capable of releasing medicine that is trapped in the aquatic environment slowly and continuously in a few days to weeks. The present research aimed to investigate the ability of human DPSCs to differentiate into bone tissue in the presence of dexamethasone ISFI as a source of dental mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: The DPSCs were extracted from the third molar tooth. To investigate the process of differentiation into osteoblasts, β -glycerophosphate, ascorbic acid, and dexamethasone ISFI in solution were added to the cells. The differentiation process was verified by Alizarin Red S stain, alkaline phosphatase activity (ALP), and western blot technique.

Results: Based on the results of Alizarin Red S staining, extracellular matrix mineralization was increased in dexamethasone ISFI (i.e., implant) and standard (i.e., dexamethasone) groups. In addition, the ALP activity underwent an increase in these groups, compared to the related control group. Furthermore, the protein level of ALP, osteopontin, and runt-related transcription factor two increased in the group treated with dexamethasone ISFI, compared to the control group.

Conclusion: Findings of this study indicated that dexamethasone ISFI could increase the process of differentiation of DPSCs into osteoblasts.

Key words: Dental pulp cells, Dexamethasone in-situ forming implant, Mesenchymal stem cell

Corresponding Author: khodaverdie@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2021; 46(1): 70-82.

چکیده

مقدمه: سلول های بنیادی پالپ دندان، از دسته سلول های چند توان با قدرت تمایز به انواع سلول ها از جمله استئوسیت ها، کندروسیت ها و آدیپوسیت ها می باشند. این سلول ها تا حدی در مطالعات پره کلینیکی مربوط به مهندسی بافت مطالعه شده اند. ایمپلنت در جا تشکیل شونده حاوی دگزامتازون، قابلیت آزادسازی داروی به دام افتاده در بسترش را در محیط آبی، به صورت آهسته و طی مدت زمان طولانی از چند روز تا چند هفته دارد. هدف اصلی این مطالعه بررسی قابلیت و توانایی سلول های پالپ دندان در حضور ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون به بافت استخوانی به عنوان یک منبع سلول های مزانشیمال دندان می بود.

مواد و روش ها: سلول های بنیادی پالپ دندان از دندان مولار سوم استخراج شدند. برای بررسی تمایز به استئوبلاست ها، بتا گلیسرول فسفات، آسکوربیک اسید و ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون به محیط کشت سلول ها اضافه شد و پروسه تمایز توسط رنگ آمیزی Alizarin Red S، اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز و تکنیک وسترن بلات تایید گردید.

یافته ها: نتایج رنگ آمیزی Alizarin Red S، نشان داد که در هر دو گروه، استاندارد حاوی دگزامتازون تنها در محیط کشت و ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون، مینرالیزه شدن در ماتریکس خارج سلولی تحریک شده و فعالیت آلکالین فسفاتاز در این دو گروه نسبت به گروه کنترل که دگزامتازون نداشت افزایش یافته بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون قادر است پروسه تمایز در سلول های پالپ دندان به استئوبلاست ها را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: سلول های پالپ دندان، ایمپلنت در جا تشکیل شونده دگزامتازون، سلول های بنیادی مزانشیمال
مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۰ دوره ۴۵ / شماره ۱: ۸۲-۷۰.

مقدمه

سلولی که مزانشیم و بافت همبند را تشکیل می دهند، از جمله سلول های استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابند.^(۳) سلول های بنیادی پسا جنینی از خون بند ناف، بافت چربی، مغز، پوست، روده و مغز استخوان جدا شده اند. در بافت دندان انسان نیز پس از دوران جنینی، ۵ منبع مختلف از MSCs شناسایی شده است: پالپ دندان، لیگامان پرپودنتال، دندان شیری، فولیکول دندان، Root Apical Papilla و لامینا پروپریای مخاط لثه. سلول های بنیادی توانایی خودبازسازی و تمایز به رده های مختلف سلولی را دارند. سلول های بنیادی استخراج شده از دندان شیری کشیده شده قادر هستند که به سلول هایی شبیه سلول های جزایر پانکراتیک در محیط آزمایشگاه تمایز یابند. از پتانسیل استحاله استئوژنیک این سلول ها جهت بازسازی نقایص جمجمه و فک استفاده می شود. از سلول های بنیادی پرپودنتال لیگامان برای تولید سمان و بافت های شبه پرپودنتال در موش های آزمایشگاهی با سیستم ایمنی نرمال استفاده شده است. همچنین در یک مطالعه جدید

سلول های بنیادی، مخازن طبیعی بدن برای جایگزینی سلول های تخصص یافته ی آسیب دیده هستند. سلول های بنیادی پتانسیل قابل توجهی برای ایجاد انواع مختلفی از سلول ها در طول زندگی و رشد و نمو داشته و به علاوه در بسیاری از بافت ها به عنوان یک سیستم ترمیم داخلی به کار می روند. همچنین می توانند بطور مداوم نسخه ای از خود را تولید کنند که این خصیصه آن ها را منحصر به فرد می کند.

زمانی که یک سلول بنیادی تقسیم می شود، هر سلول جدید این توانایی را دارد که یا به صورت سلول بنیادی باقی بماند و یا نوع دیگری از سلول ها با عملکردهای تخصصی تر مثل سلول های ماهیچه ای، گلبول های قرمز و یا سلول های مغزی ایجاد کند.^(۱و۲)

سلول های بنیادی مزانشیمی Mesenchymal Stem Cell (MSCs) جمعیت مهمی از سلول های بنیادی چندتوان و با قابلیت رشد و بازیابی بوده و می توانند به تمام رده های

توسط نوع دیگری بافت همبند متراکم (لیگامان پرپودنتال) به استخوان آلوئول اطراف متصل شده است.^(۷۸)

پس از اینکه در سال ۲۰۰۰، Gronthos و همکارانش اولین سلول های شبه بنیادی مزانشیمال را از پالپ دندان جدا کردند، بیش از ۴ نوع از سلول های شبه بنیادی مزانشیمال (MSC-like) از بافت دندان جدا شدند: پالپ دندان شیری، لیگامان پرپودنتال، Root Apical Papilla و فولیکول دندان.^(۹-۱۵)

این جمعیت از سلول های بنیادی، کیفیتی مشابه سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs)، از جمله ظرفیت خودنوسازی و پتانسیل تمایز به رده های مختلف سلولی را دارا می باشند. سلول های بنیادی مشتق از دندان، از بافت های خاصی جدا شده و توانایی زیادی جهت تمایز به سلول های ادونتوژنیک دارند.^(۱۶)

سلول های شبه بنیادی مزانشیمال پالپ دندان (DPSCs) اولین سلول های بنیادی مشتق شده از دندان بودند که در سال ۲۰۰۰ جداسازی و تعیین هویت شدند. این سلول ها از هضم آنزیمی بافت پالپ دندان انسان از دندان های دائمی مولر سوم (دندان عقل) به دست آمده و ظاهر معمولی شبه فیبروبلاست دارند. مشخص شده است که این سلول ها توانایی تکثیر بالاتری نسبت به سلول های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) داشته و ظرفیت ایجاد رسوب معدنی را (اگرچه به میزان کمتر از BMSCs) در خارج از بدن دارا می باشند. این سلول ها دارای خاصیت کلونی زایی بوده و می توانند سرعت بالای تکثیر خود را حتی پس از پاساژهای طولانی، حفظ کنند. هیچ نشانگر خاصی برای شناسایی DPSCs وجود ندارد.^(۱۷)

کشت DPSCs با محیط القای تمایزهای مختلف، نشان دهنده توانایی تمایز آنها به بافتهای دندانی، استخوان، چربی، غضروف، عصب و عضله می باشد. این سلول ها،

نشان داده شده که سلول های بنیادی بافت پرپودنتال قادر به بازسازی بافت پرپودنتال در مدل های پرپودنتیت پیشرفته می باشند. سلول های بنیادی پالپ دندان می توانند نقایص استخوانی در انسان را بازسازی نمایند. همچنین بافت های پرسلول پری واسکولار در پالپ در بازسازی و ترمیم زخم ها می توانند موثر باشند.^(۶-۴)

پیشرفت در علم بیوتکنولوژی موجب مطرح نمودن فرضیه هایی در زمینه ایجاد تغییرات ژنتیکی هدفدار در سلول های بنیادی به منظور اقدامات ژن تراپی و درمان بیماری ها و ناهنجاری های کرانیوفاسیال و طراحی پروژه هایی با استفاده از مهندسی بافت جهت ترمیم و بازسازی بافت های دندانی آسیب دیده و چشم اندازهای امیدوارکننده جهت مقاصد ادونتوژنیزس شده است.

با توجه به اینکه هیچ ماده مصنوعی نمی تواند بطور بهینه و کامل جایگزین بافت طبیعی دندان گردد، با پیشرفت دانش بیولوژی در زمینه MSCs، این سلول ها به عنوان جایگزینی برای بافت های از دست رفته دندانی مد نظر می باشند.

اغلب مشکلات استخوانی و دندانی در دوران بزرگسالی که دندان های شیری حضور ندارند، اتفاق می افتد و از آنجا که دندان مولر سوم (دندان عقل) به طور عادی به دلایل پیشگیری و یا ارتودنسی، کشیده و دور انداخته می شود، تخلیص MSCs از بافت های دندانی مولر سوم، گزینه ای مناسب می باشد.

سلول های بنیادی دندان از بافت های نرم مختلف دندان جدا می شوند. ساختار دندان متشکل از بافت سخت متصل به بافت نرم است. بافت سخت شامل عاج دندان بوده که در تاج توسط مینا و در ریشه توسط سمتموم پوشیده شده است. پالپ دندان غنی از عصب و بافت نرم (همبند سست) پر از عروق بوده و توسط عاج در بر گرفته شده است. دندان

آهسته آزاد شود. به این سیستم ها، کاشتنی های تزریقی گفته می شود، که در واقع با یک تزریق در محل کاشته می شوند، بعد از تزریق سفت شده و تبدیل به ایمپلنت می شوند و از طرفی به مرور تجزیه شده و نیازی به خروج ایمپلنت بعد از تخلیه دارو نمی باشد.^(۲۱)

سامانه های ایمپلنت در جا تشکیل شونده In situ forming implant (ISFI) در محیط بیرون دارای ویسکوزیته کمی هستند که به محض ورود به بدن، تبدیل به ایمپلنت (جامد) می شوند. مکانیسم های مختلفی مانند سیستم های جدایی فاز (پاسخ به دما، تغییر حلال و pH)، سیستم های کراس لینک شده (به طور شیمیایی، فیزیکی) و ارگانوژل ها (تغییر حلالیت) برای ایجاد ایمپلنت بیان شده است. در بین مکانیسم های مختلف ایمپلنت در جا تشکیل شونده، مکانیسم تغییر فاز حلال (SPI) به دلیل سادگی در تهیه فرمولاسیون از اهمیت ویژه ای برخوردار است. SPI از یک پلیمر زیست تخریب پذیر غیر قابل حل در آب و از یک حلال آلی زیست سازگار از نظر فیزیولوژیکی و قابل حل در آب تشکیل شده است. با تزریق این سامانه به یک محیط آبی، حلال آلی به محیط آبی نفوذ کرده و آب به زمینه پلیمر نفوذ می کند. پلیمر به دلیل نامحلول بودن در آب، در تماس با آب رسوب و ایمپلنت جامد را تشکیل می دهد. فرم های تجاری آهسته رهش مورد تایید FDA با این مکانیسم شامل Atridox® (داروی داکسی سیکلین)، Eligard® (داروی لوپرولید استات) و Sandostatin® (اوکتروتاید) می باشد. یکی از جالب ترین این سیستم ها، Atridox® حاوی داروی داکسی سیکلین برای درمان عفونت لثه می باشد. فرمولاسیون های تجاری از دو سرنگ تشکیل شده است. سرنگ اول حاوی محلول پلیمری متشکل از پلیمر و حلال N متیل پیرولیدون (NMP) و سرنگ دوم حاوی پودر دارویی است. سرنگ ها قبل از تجویز با یکدیگر جفت شده

قادر به حفظ خودنوسازی و تمایز به بافت شبه پالپ، سلول های شبه ادونتوبلاستی و نهایتاً تشکیل بافت های سخت دندانی شامل بافت های شبه عاج، سمان و تشکیل بافت استئوئید به دنبال پیوند در مدل حیوانی می باشند.^(۱۸) مطالعه ای که بر روی سلول های بنیادی مغز استخوان انجام شد، نشان داد که مواجهه مزمن سلول ها با دگزامتازون، موجب تمایز آنها به سلول های استئوژنیک می شود. Ogata و همکاران^(۱۹) نشان دادند که بیان یک ژن خاص در پاسخ به دگزامتازون، مسئول تمایز سلول های بنیادی به استئوبلاست ها است.

Martins و همکاران^(۲۰) یک داربست پلیمری بارگیری شده با دگزامتازون ساختند که به عنوان عامل تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به استئوبلاست ها محسوب می شد.

استئوبلاست ها از سلول های بنیادی چند ظرفیتی منشا گرفته از بافت اسکلتال و بافت اکتومزانشیمال مهاجرت یافته از نورال کرست در ناحیه سر و گردن تشکیل می شوند. فاکتورهای Transcription نظیر Runx2 و Osterix برای تمایز سلول های بنیادی به استئوبلاست ضروری می باشند. این سلول های بنیادی چند ظرفیتی در بافت مغز استخوان پس از تولد نیز یافت می شوند.

با توجه به این اثر دگزامتازون در تمایز سلول های بنیادی، تهیه یک فرم دارویی آهسته رهش از دگزامتازون که بتواند دارو را آهسته اما طولانی مدت در معرض سلول ها برای تمایز قرار دهد، ایده کاملاً جدید، بسیار جالب و کاربردی به نظر می رسد. بهترین سیستم های دارورسانی آهسته رهش انواعی هستند که قادرند با یک تزریق در محل رهش دارو ایجاد ایمپلنت یا ژل کرده و در نتیجه مخزنی از دارو در محل تزریق ایجاد کنند که با تخریب و تجزیه سامانه، به مرور زمان دارو در محل به صورت پیوسته و

سپس ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۱۴، ۱۰، ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۸، و ۳۵ (روز) ۰/۵ میلی لیتر از محیط آزادسازی برداشت شده و با بافر فسفات تازه جایگزین شد تا شرایط سینک حفظ شود. مقدار دگزامتازون آزاد شده در λ_{max} ۲۴۱ دگزامتازون تعیین مقدار شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های دگزامتازون ۰/۰۰۱ تا ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در محیط آزادسازی استفاده شد. آنالیز توسط تکنیک HPLC انجام شده و سطوح زیر پیک ها محاسبه گردید.

جداسازی و کشت سلولی - دندان مولار سوم استخراج

شده بدون پوسیدگی و کیست و التهاب بافت پریو و کاملاً سالم ($n=3$) از بیماران ۱۸ تا ۳۰ ساله با رضایت آگاهانه آنها و در نظر گرفتن تمامی موارد قانونی مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه پالپ دندان با گیره به آرامی جدا شد و در محلول بافر سالین محتوی پنی سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریپسین قرار گرفت و در کوتاهترین زمان ممکن (حداکثر دو ساعت) به محیط کشت انتقال یافت. قبل انتقال توسط پوویدون آیودین و محلول استریل بافر سالین شستشو داده شد. سپس بافت پالپ به قطعات ۱ تا ۲ میلی لیتری تقسیم شد و در معرض هضم آنزیمی توسط محلول کلاژناز نوع ۱ با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر و محلول دیسپاز (Gibco, USA) با غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر برای ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۳ میلی لیتر محیط کشت α -MEM، ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, USA) و ۱ درصد پنی سیلین / استرپتومایسین (Gibco, USA) اضافه شد تا بافت پالپ هضم شود و در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوسپانسیون سلول های منفرد به فلاسک های کشت سلولی T25 انتقال یافته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط ۵ درصد CO2 انکوبه

و با مخلوط شدن با یکدیگر با ۶۰ سیکل رفت و برگشتی کاملاً در یکدیگر حل می شوند و آماده تزریق می گردند.^(۲۲) دگزامتازون سدیم فسفات، دارویی انتخابی برای ترمیم پالپ دندان بوده و با بارگذاری در ایمپلنت در جا تشکیل شونده PLGA (Poly lactic-co-glycolic acid) در حلال NMP، سیستم مناسبی جهت تحویل مداوم و پیوسته دارو ایجاد می کند و می تواند یک داربست برای مهندسی بافت و القاء استئوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی بسازد.^(۲۳)

مواد و روش ها

تهیه محلول پلیمری - ابتدا ۳۳۰ میلی گرم از پودر پلیمری PLGA (504H) تهیه شده از (سیگما، آمریکا) با ۶۲۰ میلی گرم حلال NMP (۶۲ درصد وزنی) و ۵۰ میلی گرم اتیل هپتانوات (۵ درصد وزنی) مخلوط شده و توسط اولتراسوند در دمای اتاق هموزن گردید تا یک محلول یکنواخت حاصل شد. میزان پلیمر در محلول ۳۳ درصد وزنی بود. سپس برای استریل کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۳ بار، اتوکلاو شد. سپس میزانی دگزامتازون سدیم فسفات (ایران هورمون، ایران) به محلول اضافه شد که غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر دارو حاصل شود و سونیکاسیون انجام شد تا سوسپانسیون یکنواخت شود.^(۲۴)

بررسی آزادسازی دارو از ایمپلنت به روش برون تن -

۱ میلی لیتر از فرمولاسیون فوق به ویال های ۵ میلی لیتری حاوی بافر فسفات (pH=7.4) در ۳۷ درجه سانتیگراد با سرنگ 20-gauge تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق، فرمولاسیون تبدیل به جامد و ایمپلنت گردید. ویال ها در حمام آب شیکردار (N-BIOTEK NB-304, South Korea) با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۳۵ pm قرار گرفتند. در زمان های مشخص (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۸، و ۲۴ ساعت،

فسفات شسته شدند و در ۷۰ درصد اتانول تثبیت گردیدند و سپس با Alizarin Red S برای ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و pH=۴/۲ رنگ شدند. سلول ها با فسفات بافر سالین شسته شدند تا رنگ غیر اختصاصی شسته شود و توسط میکروسکوپ معکوس به لحاظ مورفولوژیکی ارزیابی گردیدند.^(۳۶)

فعالیت آلکالن فسفاتاز - فعالیت آلکالن فسفاتاز (ALP) جهت تایید تمایز سلول بنیادی به سلول استخوان ساز (استئوژنز) در محیط کشت با رنگ آمیزی آلکالن فسفاتاز ارزیابی شد.

آنالیز وسترن بلات - سلول ها در پلیت های ۶ خانه با دانسیته ۱۰^۶ سلول در پلیت کشت شدند و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. سپس سلول ها در بافر لیز سلولی لیز شدند. ۱۵ میکرولیتر نمونه روی ۱۵-۱۰ درصد ژل پلی آکریلامید SDS بارگیری شد و متعاقب آن به غشاهای پلی وینیلیدن دی فلوراید (Bio-Rad, USA) انتقال پیدا کرد. پس از بلاک کردن کاغذ در شیر بدون چربی ۵ درصد حل شده در TBST (Tris Buffered Saline+0.1% tween20) در دمای اتاق برای ۲ ساعت، غشاها با آنتی بادی های اولیه (Cell Signaling, USA) بر علیه آنتی آلکالن فسفاتاز (1:1000)، آنتی استئوپونین (1:1000) و آنتی RUNX2 (1:1000) به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. غشاها سه بار با TBST شسته شدند و با آنتی بادی های ثانویه (1:2000) انکوبه شدند. باندها توسط سیستم Chemiluminescent مشاهده شدند. بیان پروتئین بر اساس سطح بتا اکتین (Cell signaling, USA) نرمالیزه گردید.^(۳۷)

در این مطالعه داده ها بر اساس انحراف ± معیار میانگین برای سه بار تکرار، گزارش شدند و با نرم افزار GraphPad Prism version 8 و توسط آنالیز واریانس یک طرفه

شد. محیط کشت جایگزین شد تا وقتی که ۸۰ درصد کف ظرف با کشت سلولی پوشیده شود.^(۳۵)

تعیین خصوصیت با فلوسایتومتری - سلول های پالپ دندان، پاساژ چهارم به لحاظ فنوتیپ آنتی ژنیک سطح سلول بررسی شد. حدود ۱۰^۶ سلول بر میلی لیتر با مونوکلونال آنتی بادی ها بر علیه آنتی ژن های Mouse Anti Human CD34 FITC, Mouse Anti Human CD45FITC, Mouse Anti Human CD44 FITC and Mouse Anti Human CD29 FITC antibodies (Cell signaling, USA) رنگ شدند. سپس برای ۳۰ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. فلوسایتومتری با (BD Biosciences, CA, USA) انجام شد و نتایج توسط نرم افزار FlowJo 7.6 آنالیز شد.

تمایز استئوژنیک - در پاساژ چهارم، سلول ها در پلیت ۶ خانه در محیط استئوژنیک حاوی α -MEM همراه با ۱۰ درصد فسفات بافر سالین و ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین، ۵۰ میکرومول بر لیتر آسکوربیک اسید فسفات (Sigma, Germany)، ۱۰ میلی مول بر لیتر بتا گلیسرول فسفات (Sigma, Germany) و ۱۰۰ نانومول بر لیتر دگزاتازون یا سوپرنا تانت (مایع رویی رسوب بعد سانتریفیوژ) سامانه ISFI حاوی دگزاتازون که معادل همان مقدار دگزاتازون آزاد شده می باشد کشت شدند. گروه کنترل شامل α -MEM حاوی ۱۰ درصد فسفات سالین بافر بدون مکمل استئوژنیک بود. سلول ها در ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط ۵ درصد CO2 انکوبه شدند و محیط هر دو روز یکبار تجدید می شد.

رنگ کردن با Alizarin Red S و کلسیفیکاسیون - پروسه کلسیفیکاسیون توسط رنگ کردن با Alizarin Red S (Merck, Germany) تایید شد. بعد از انکوباسیون سلول ها با محیط استئوژنیک برای ۲۱ روز، سلول ها دو بار با بافر

دندان هیچ تغییر مورفولوژیکی واضحی در طی ۷۲ ساعت نشان نداد، سلول‌ها به مرور تا ۴۰ روز شروع به رشد کردند و شکل دوکی شبیه فیبروبلاست در زیر میکروسکوپ معکوس داشتند. مارکرهای اختصاصی سطح سلول‌های بنیادی در پاساژ چهارم ملکول‌های چسبندگی CD44 و CD29 مثبت بوده در صورتیکه از نظر مارکرهای هماتوپوئیتیک CD45 و CD34 منفی بودند.

تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی پالپ دندان در محیط خارج بدنی - مینرالیزه شدن ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک مارکر برای استئوژنز با رنگ آمیزی Alizarin Red S در روز بیست و یکم بررسی شد. رسوب معنی دار کریستال‌های کلسیم اگزالات در گروه استاندارد و گروه‌های با ایمپلنت دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد (تصویر ۲). به علاوه حضور کریستالهای قرمز کلسیم اگزالات در ماتریکس سلولی تحت میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰، تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به استئوبلاست‌ها را نشان داد (تصویر ۳).

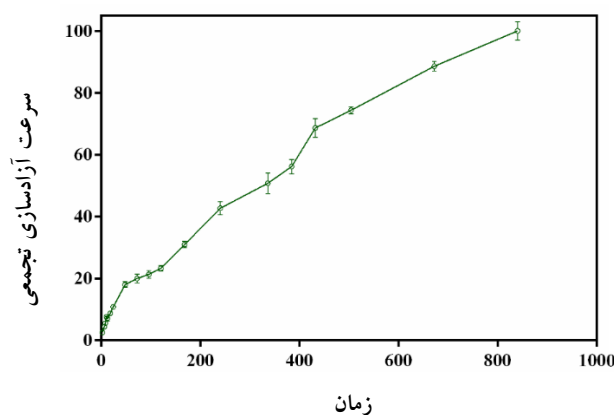
گرچه همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، مینرالیزه شدن بیشتر در گروه استاندارد در مقایسه با ایمپلنت حاوی دگزامتازون مشاهده شد.

(ANOVA) پردازش گردیدند. میزان $P < 0/05$ به عنوان نتایج معنی دار در نظر گرفته شد.

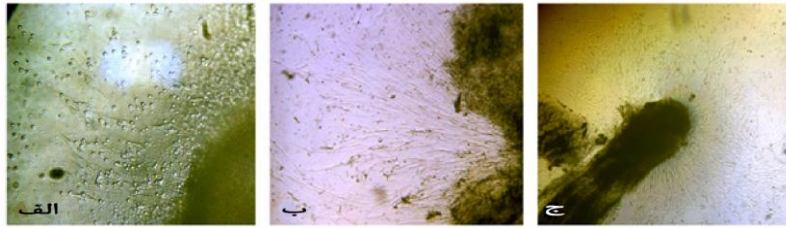
یافته‌ها

نتایج آزادسازی مدت دارو از ایمپلنت در جا تشکیل شونده - همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود دگزامتازون از ایمپلنت در جا تشکیل شونده به صورت آهسته و طولانی مدت در عرض ۳۵ روز آزاد شد. آزادسازی ناگهانی اولیه که یک پدیده نامطلوب در سیستم‌های آهسته رهش دارویی می‌باشد در اینجا کم بوده و آزادسازی از یک سرعت نسبتاً ثابت تبعیت می‌کرد که باعث شد غلظت نسبتاً ثابت و مشخصی از دگزامتازون همیشه در محیط کشت آزاد شود که قابل پیش بینی و مطلوب است.

مورفولوژی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و پروفایل فلوسایتومتری - سه گروه در مطالعه وجود داشت: گروه کنترل شامل محیط کشت بدون فاکتورهای القایی مانند دگزامتازون، گروه استاندارد حاوی محیط کشت و تمام فاکتورهای القایی از جمله دگزامتازون و گروه ایمپلنت محتوی محیط رویی (سوپرناتانت) ایمپلنت حاوی دگزامتازون و تمامی فاکتورهای القایی رشد در محیط کشت به غیر از دگزامتازون. کشت سلول‌های بنیادی پالپ

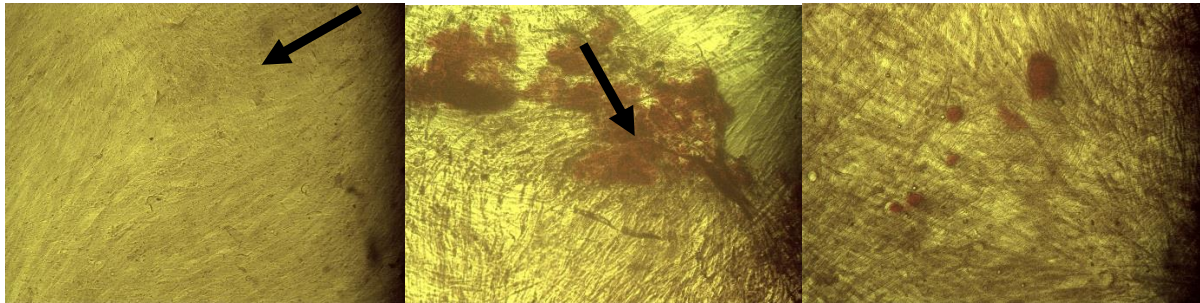


نمودار ۱: آزادسازی تجمعی مدت دارو و یکنواخت دگزامتازون از ایمپلنت در جا تشکیل شونده



تصویر ۱ : مراحل جداسازی DPSCs به روش هضم آنزیمی (کلاژناز/ دیسپاز) در روز های مختلف
 الف) جداسازی و تغییر مورفولوژی DPSCs در روز هفتم (بزرگ نمایی 100x)
 ب) دوکی شکل شدن کامل DPSCs در روز چهاردهم (بزرگ نمایی 100x)
 ج) رشد سریع و پر شدن کف فلاسک در روز بیست و یکم (بزرگ نمایی 100x)

کریستالهای اگزالات کلسیم



کنترل

استاندارد

ایمپلنت

تصویر ۲ : میترالیزه شدن ماتریکس خارج سلولی در گروه کنترل، گروه ایمپلنت دگزامتازون و گروه استاندارد حاوی دگزامتازون معمولی تحت میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۱۰).

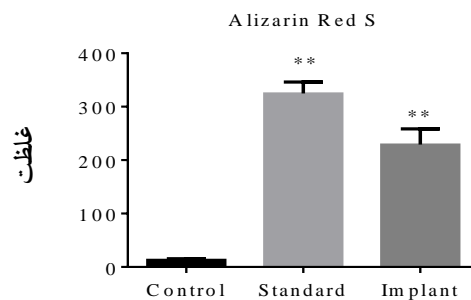


control

standard

implant

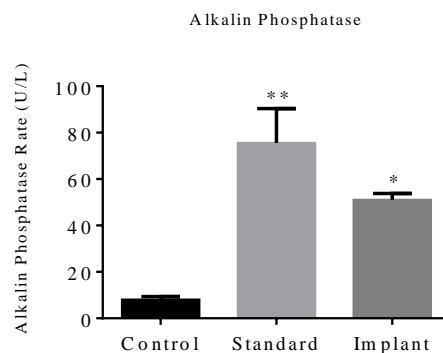
تصویر ۳ : رسوبهای اگزالات کلسیم در گروههای استاندارد و ایمپلنت



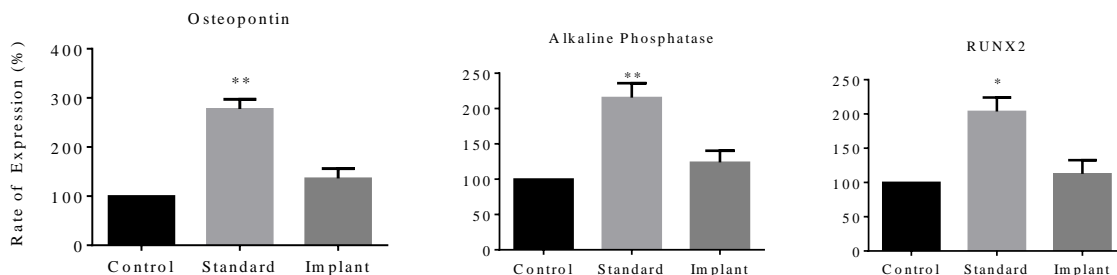
نمودار ۲ : کریستالهای کلسیم اگزالات در گروههای استاندارد و ایمپلنت دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل ($n=3$ و $P<0.01$ (**))

آنالیز وسترن بلات- اثر دگزامتازون بر روی سطوح بیان مارکرهای استئوژنیک، شامل استئوپونتین، آلکالین فسفاتاز و RUNX2 با تکنیک وسترن بلات آزمایش شد. نتایج نشان داد که دگزامتازون در گروه استاندارد به طور معنی داری سطح $P < 0.05$ RUNX2، آلکالین فسفاتاز و استئوپونتین $P < 0.10$ را افزایش داده است (نمودار ۴).

به علاوه فعالیت آلکالین فسفاتاز به عنوان مارکر اولیه تمایز استئوژنیک اندازه گیری شد. تفاوت معنی دار در فعالیت آلکالین فسفاتاز بین گروه ها مشاهده شد. نتایج به لحاظ آماری تفاوت معنی داری در گروه استاندارد با گروه ایمپلنت حاوی دگزامتازون نشان داد $P < 0.01$ (نمودار ۳).



نمودار ۳: فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول های پالپ دندان انکوبه شده با دگزامتازون در روز ۲۱م ($n=3$ و $P < 0.01$)



نمودار ۴: بیان مارکرهای استئوژنیک توسط تکنیک وسترن بلات شامل سطوح استئوپونتین، آلکالین فسفاتاز و RUNX2

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مارکرهای استئوژنیک برحسب گروه

ایمپلنت	استاندارد	کنترل	
۵۱±۲/۸۲*	۷۵/۵±۱۴/۸۵**	۸±۱/۴۱۴	آلکالین فسفاتاز (رنگ سنجی)
۲۲۹±۲۹/۳**	۳۲۵±۲۱/۴**	۱۳/۶±۲/۰۴	آلیزارین رد (رنگ سنجی)
۱۳۶±۲۰	۲۲۷±۱۹/۷**	۱۰۰±۱۰	استئوپونتین (وسترن بلات)
۱۲۴±۱۶/۶	۲۱۵±۲۰/۵**	۱۰۰±۱۰	آلکالین فسفاتاز (وسترن بلات)
۱۱۳±۲۰/۱	۲۰۴±۲۰/۳*	۱۰۰±۱۰	RUNX2 (وسترن بلات)

* $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$

بحث

در حال حاضر دندانپزشکی به میزان بالایی بر درمانهای غیر سلولی متکی است که اساساً کاربرد مواد دندانی با دوام بالا را شامل می شود. آمالگام، کامپوزیت ها، ایمپلنت های فلزی، مواد سنتتیک و پیوندهای بافتی انتخابهای مهم برای بازسازی و تعمیر دندانی و ساختارهای فکی صورتی می باشند. علیرغم کاربرد بالینی نسبتاً موفقیت آمیز داروها و مواد سنتی، این مواد محدودیت هایی هم دارند. از این رو به نظر می رسد کاربرد سلول های بنیادی اتولوگ سازنده عاج دندان، استخوان و لیگامان پریدنتال در آینده یک انتخاب برای درمان های رایج دندانی و پزشکی ترمیمی در ناحیه فک و صورت باشد.^(۲۸)

D 'Alimonte و همکارانش^(۲۹) نشان دادند که سلول های بنیادی پالپ دندان پس از تمایز به سلول استخوان ساز، تمامی چهار زیرگروه گیرنده های آدنوزین (AR) و گیرنده CD73 را بیان می کند و همچنین دیده شد که این سلول ها بیان دو مارکر استئوژنیک شناخته شده، آلکالن فسفاتاز و RUNX2 را بعد از ۳ و ۷ روز و همچنین فعالیت آنزیمی آلکالن فسفاتاز را در ۷ روز و نیز مینرالیزه شدن ماتریکس خارج سلولی را بعد ۲۱ روز افزایش می دهد.

هدف این مطالعه جداکردن سلول های بنیادی از دندان مولر سوم، کشت سلول ها و سپس القای تمایز در سلول های کشت شده به سمت سلول های استئوژنیک (استخوان ساز) در حضور دگزامتازون به صورت آزاد و دگزامتازون بارگیری شده بر روی ایمپلنت با رهایش آهسته و مقایسه اثر این دو با یکدیگر بود. ایمپلنت به کار رفته در این مطالعه داروی دگزامتازون را برای مدت یک ماه به صورت پیوسته و با غلظت ثابت آزاد می نماید. پلیمرهای PLA و PLGA بیشترین حاملهای پلیمری به کار رفته در

سامانه های آهسته رهش دارو هستند. که برای استفاده در بدن کاملاً سالم و ایمن می باشند. این پلیمرها تاییدیه FDA را دارند و اولین کاربرد پزشکی این پلیمرها به عنوان نخ های بخیه قابل جذب در بدن بوده است. محصولات حاصل از تجزیه آنها لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید می باشند که در چرخه طبیعی بدن حضور دارند.^(۳۰) سلول های بنیادی در دیگر قسمتهای دندان مانند لیگامان پریدنتال و ریشه های دندانی در حال رشد، نقش فعالی در عملکرد و رشد دندانی دارند. سلول های بنیادی پالپ دندان قادر هستند بافت از دست رفته دندان به دنبال عفونت را ترمیم کنند و یا لیگامان پریدنتال از دست رفته به دنبال بیماریهای پریدنتال را بازسازی نمایند. همچنین می توانند به عنوان ایمپلنت های بیولوژیک در ترمیم های کامل و یا جزئی دندان نقش داشته باشند. از آنجایی که سلول های بنیادی پالپ دندان خواصی مشابه سلول های بنیادی مزانشیمال دارند، تلاشهایی در مورد درمان اختلالات مرتبط با سلول های مزانشیمال مانند پارکینسون با این روش انجام شده است.^(۳۱)

در این مطالعه نشان داده شد که فعالیت آلکالن فسفاتازی در طی پروسه تمایز سلول های استخراج شده افزایش یافته است. همچنین تحت تاثیر آسکوربیک اسید، بتا گلیسروفسفات و دگزامتازون در نمونه های در معرض قرار گرفته، کریستال های کلسیم اگزالات تشکیل شد که با رنگ آمیزی Alizarin Red S قابل مشاهده بودند. همچنین غلظت پروتئین های مهم درگیر در مسیر تمایز سلولی به سلول های استئوژنیک مانند آلکالن فسفاتاز، استئوپونین و RUNX2 هم اندازه گیری شد. تشکیل کریستال های کلسیم اگزالات در هر دو گروه استاندارد و ایمپلنت که یکی دارای دگزامتازون به صورت آزاد و دیگری دگزامتازون بارگیری شده بر روی ایمپلنت بود، نسبت به گروه کنترل که

فایده و نوآوری مطالعه حال حاضر این است که در محیط کشت از یک سیستم کاشتنی تزریقی پیوسته رهش برای در دسترس قرار دادن فاکتور القای رشد دگزامتازون استفاده شد، در حالی که مطالعات انجام شده تاکنون بر استفاده از پلیمر به عنوان بستری جهت کشت سلولی بسنده کرده اند. این مطالعه از این نقطه نظر که یک سیستم موثر رهش آهسته دارو را در محیط کشت استفاده می کند و بر پایه متداولترین پلیمر رهش دارو یعنی PLGA بنا نهاده شده و سیستم جدید و منحصر به فرد رهش آهسته دارو یعنی سیستم ایمپلنت تزریقی کاشتنی را استفاده می کند کاملاً جدید و در خور توجه می باشد. به طور خلاصه همان طور که در تصویر و نمودارها مشاهده شد، میزان بیان پروتئین های استئوپونین و آلکالن فسفاتاز در گروه های استاندارد و ایمپلنت نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود که این افزایش در گروه ایمپلنت نسبت به استاندارد کمتر بود. در مورد پروتئین Runx2 نیز مقداری افزایش داشت، اما کاملاً بارز نبود. از آنتی بادی پروتئین بتا اکتین به عنوان کنترل استفاده شد.

به این ترتیب سلول های بنیادی پالپ دندان در محیط حاوی دگزامتازون اعم از اینکه به صورت بارگیری شده در ایمپلنت و یا آزاد باشد، به طور موفقیت آمیزی به سلول های شبه استئوبلاست تمایز پیدا کرده، ندول های مینرالیزه را در ماتریکس تشکیل داده و مارکرهای معمول استئوبلاستیک از جمله استئوپونین و آلکالن فسفاتاز و تا حدی RNUX2 را بیان کرده اند. دلیل اینکه در گروه ایمپلنت تمایز کمتر از گروه استاندارد بود، می تواند حضور متابولیت های حاصل از تخریب پلیمر باشد که با وجود کاملاً سیف و سالم بودن آنها، بر روی رشد و تمایز سلول های پالپ به استئوبلاستها تأثیرات اندکی در مقایسه با گروه کنترل که متابولیت های حاصل از تخریب پلیمر را دارا نمی باشد داشته است. به

دگزامتازونی نداشت افزایش پیدا کرد. به طور کلی این سلول ها در حضور ایمپلنت حاوی دگزامتازون با توجه به نتایج مربوط به فعالیت آلکالن فسفاتازی و رنگ آمیزی Alizarin Red S توانایی تمایز به استئوبلاست ها را دارا می باشند و بنابراین ایمپلنت به صورت موفقیت آمیز داروی دگزامتازون را با تخریب تدریجی حامل پلیمری خود آزاد می کند. نتایج مشابهی توسط Noh و همکارانش^(۳۲) نشان داد که Scaffold های حاوی ماتریکس خارج سلولی می توانند شرایط مساعدی برای تمایز استئوژنیک سلول ها ایجاد کنند.

دگزامتازون یک القا کننده مکانیکی و شیمیایی قدرتمند در تمایز و مینرالیزه شدن سلول های پالپ دندان می باشد. در مطالعه ای که توسط Bhatnagar و همکارانش^(۳۳) انجام شد نشان داده شد که هیدروژل های ژلاتینی کراس لینک شده حاوی دگزامتازون که برای رهش آهسته دارو استفاده شده بودند، سوبسترای بسیار موثری در تمایز سلول های بنیادی پالپ دندان به ادونتوبلاست ها بودند.

پیشرفت ها در معالجه جراحات دندانی نشان داده است که مدلینگ دوباره پالپ دندان جایگزین مناسبی برای درمان کانال ریشه می باشد. Zhang و همکارانش^(۳۴) نشان دادند که کشت سلول های پالپ دندان بر روی نانوکامپوزیت های حاوی دگزامتازون باعث ایجاد بافت یکنواختی پس از ۲۱ روز گردید. مطالعه همچنین نشان داد که نانوکامپوزیت ها کاندیداهای خوبی برای ریمادلینگ دوباره سلول های پالپ دندان می باشند.

Apel و همکارانش^(۳۵) نشان دادند که کشت سلول های پالپ دندان بر روی پلیمرهای مختلف در حضور دگزامتازون باعث تمایز آنها به سلول های مغز استخوان شد.

این مطالعه نشان داد که دگزامتازون آزاد شده از ایمپلنت حاوی دگزامتازون در محیط کشت و نیز دگزامتازون قرار داده شده در محیط کشت سلول های پالپ دندان در گروه استاندارد، هر دو قادر هستند تمایز استئوژنیک به سمت سلول های استخوان ساز را ایجاد کنند. ایمپلنت مذکور با رهایش مدت دار و آهسته دگزامتازون غلظت ثابتی از این سوبسترا را برای مدت زمان مشخصی در اختیار سلول های پالپ دندان جهت تمایز قرار می دهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت تامین اعتبار پژوهشی طرح مذکور تشکر و قدردانی می نماید.

امید خدا در مطالعات آتی سعی بر این خواهد بود تا تاثیر متابولیت های ایمن حاصل از تخریب پلیمر به صورت کامل بر روی رشد سلول های پالپ بررسی و مطالعه شود. رهایش آهسته و پیوسته و با غلظت یکنواخت دگزامتازون در محیط کشت از خلال ایمپلنت مزیتی است که حضور ایمپلنت در این مطالعه به دنبال داشت که این رهایش آهسته و پیوسته در نمودار آزادسازی داروی دگزامتازون در ایمپلنت کاملاً قابل مشاهده است. غلظت دگزامتازون در محیط کشت در گروه ایمپلنت و گروه استاندارد در تمام مدت آزمایش یکسان بوده است.

نتیجه گیری

منابع

- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1):68.
- Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran* 2012; 50(2):79-96.
- Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, et al. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem* 2007; 102(1):224-39.
- Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011; 99(1):1-7.
- Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J* 2011; 22(2):91-8.
- Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 2011; 23(3):325-32.
- Galler KM, Brandl FP, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, et al. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2018; 24(3-4):234-44.
- Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 2010; 89(8):791-6.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13625-30.
- Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J* 2015; 36(12):1391-9.
- Rosa V, Dubey N, Islam I, Min KS, Nör JE. Pluripotency of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for tissue engineering. *Stem Cells Int* 2016; 2016:5957806.
- Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium. *Stem Cells Dev* 2019; 28(15):974-85.
- Nada OA, El Backly RM. Stem cells from the apical papilla (SCAP) as a tool for endogenous tissue regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2018; 6:103.
- Zhou T, Pan J, Wu P, Huang R, Du W, Zhou Y, et al. Dental follicle cells: roles in development and Beyond. *Stem Cells Int* 2019; 2019:9159605.
- Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int* 2015; 2015:972313.

16. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. *Stem Cells Int* 2016; 2016:4709572.
17. Song M, Lee JH, Bae J, Bu Y, Kim EC. Human dental pulp stem cells are more effective than human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in cerebral ischemic injury. *Cell Transplant* 2017; 26(6):1001-16.
18. Balic A. Biology explaining tooth repair and regeneration: a mini-review. *Gerontology* 2018; 64(4):382-8.
19. Ogata Y, Mabuchi Y, Yoshida M, Suto EG, Suzuki N, Muneta T, et al. Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration. *PLoS One* 2015; 10(6):e0129096.
20. Falci SGM, Lima TC, Martins CC, Santos CRRD, Pinheiro MLP. Preemptive effect of dexamethasone in third-molar surgery: a meta-analysis. *Anesth Prog* 2017; 64(3):136-43.
21. Musmade N, Jadhav A, Moin P, Patil S, Gupta A. An overview of in situ gel forming implants: current approach towards alternative drug delivery system. *J Biol Chem Chron* 2019; 5:14-21.
22. Javali MA, Vandana KL. A comparative evaluation of atrigel delivery system (10% doxycycline hyclate) Atridox with scaling and root planing and combination therapy in treatment of periodontitis: a clinical study. *J Indian Soc Periodontol* 2012; 16(1):43-8.
23. Khodaverdi E, Gharechahi M, Alibolandi M, Tekie FS, Khashyarmansh BZ, Hadizadeh F. Self-assembled supramolecular hydrogel based on PCL-PEG-PCL triblock copolymer and γ -cyclodextrin inclusion complex for sustained delivery of dexamethasone. *Int J Pharm Investig* 2016; 6(2):78-85.
24. Kamali H, Khodaverdi E, Hadizadeh F, Mohajeri SA, Nazari A, Jafarian AH. Comparison of in-situ forming composite using PLGA-PEG-PLGA with in-situ forming implant using PLGA: In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of naltrexone release. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019; 50:188-200.
25. Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. *J Dent (Tehran)* 2010; 7(4):185-95.
26. Houshmand B, Amjadi O, Rafiei A, Rouzegar M, Abrishami M, Talebi Ardakani M. The potential of human-derived periodontal ligament stem cells to osteogenic differentiation: an In vitro investigation. *Res Mol Med* 2014; 2(4):18-23.
27. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4(9):429-34.
28. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006; 85(11):966-79.
29. D'Alimonte I, Nargi E, Lannutti A, Marchisio M, Pierdomenico L, Costanzo G, et al. Adenosine A1 receptor stimulation enhances osteogenic differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells via WNT signaling. *Stem Cell Res* 2013; 11(1):611-24.
30. Khodaverdi E, Tekie FS, Mohajeri SA, Ganji F, Zohuri G, Hadizadeh F. Preparation and investigation of sustained drug delivery systems using an injectable, thermosensitive, in situ forming hydrogel composed of PLGA-PEG-PLGA. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13(2):590-600.
31. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* 2010; 20(12):715-22.
32. Noh YK, Du P, Kim IG, Ko J, Kim SW, Park K. Polymer mesh scaffold combined with cell-derived ECM for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomater Res* 2016; 20:6.
33. Bhatnagar D, Bherwani AK, Simon M, Rafailovich MH. Biomineralization on enzymatically cross-linked gelatin hydrogels in the absence of dexamethasone. *J Mater Chem B* 2015; 3(26):5210-9.
34. Zhang L, Yu Y, Joubert C, Bruder G, Liu Y, Chang CC, et al. Differentiation of dental pulp stem cells on gutta-percha scaffolds. *Polymers (Basel)* 2016; 8(5):193.
35. Apel C, Buttler P, Salber J, Dhanasingh A, Neuss S. Differential mineralization of human dental pulp stem cells on diverse polymers. *Biomed Tech (Berl)* 2018; 63(3):261-9.