

УДК 611.018.44.085.23:57.086.13

С.П. Мазур\*, О.Ю. Рогульська, О.Б. Ревенко,  
Н.О. Волкова, О.Ю. Петренко

## Виділення стовбурових клітин пульпи зубів мудрості людини та їхні властивості до і після криоконсервування

UDC 611.018.44.085.23:57.086.13

S.P. Mazur\*, O.Y. Rogulska, O.B. Revenko,  
N.O. Volkova, O.Y. Petrenko

### Isolation of Human Third Molar Dental Pulp Stem Cells and Their Characteristics Before and After Cryopreservation

**Реферат:** У роботі проводили виділення стовбурових клітин пульпи (СКП) зародків третіх молярів (зубів мудрості) людини ферментативним методом із використанням колагенази, досліджували їхню морфологію в умовах моношарового культивування, визначали імунофенотип, а також оцінювали проліферативні властивості та диференціювальний потенціал до та після криоконсервування. Показано, що за морфологічними ознаками, профілем поверхневих маркерів і диференціювальним потенціалом отримані СКП відповідають мультипотентним мезенхімальним стромальним клітинам. Криоконсервування СКП шляхом повільного охолодження (1 °C / хв) до –80°C із подальшим зануренням в рідкий азот у середовищі культивування без кріопротектора призводить до загибелі клітин. Криоконсервування за тією самою програмою в присутності 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) і 20% сироватки дозволяє отримувати СКП із життєздатністю (82 ± 6)%, які виявляють метаболічну і проліферативну активність, а також здатність до спрямованого диференціювання в остео- та адипогенному напрямках на рівні, притаманному клітинам до криоконсервування.

**Ключові слова:** пульпа, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, імунофенотип, проліферація, мультилінійне диференціювання, криоконсервування.

**Abstract:** Dental pulp stem cells (DPSCs) from human third molar tooth germ (wisdom tooth) were isolated using a collagenase-based enzymatic method, the obtained cells were analyzed as for morphology in monolayer culture, immunophenotype, proliferation and differentiation potential before and after cryopreservation. In this study we showed that based on morphological features, surface markers profile and differentiation potential, the isolated DPSCs corresponded to multipotent mesenchymal stromal cells. DPSCs cryopreservation by slow cooling (1 °C / min) down to –80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen in cryoprotectant-free culture medium led to a cell death. Cryopreservation using the same protocol in the presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 20% serum ensured (82 ± 6)% cell viability; while metabolic and proliferative activity, as well as the ability to differentiate into the osteo- and adipogenic lineages of cryopreserved DPSCs were similar to their non-cryopreserved counterparts.

**Key words:** dental pulp, multipotent mesenchymal stem cells, immunophenotype, proliferation, multipotent differentiation, cryopreservation.

Застосування клітинних технологій на сьогодні дозволяє вирішувати різноманітні задачі в різних галузях науки – від сучасної супрамолекулярної хімії до прикладних розробок у медико-біологічній сфері, що стимулює подальші дослідження функціонального потенціалу різних клітин і клітинних популяцій, а також пошук нових джерел для їхнього виділення.

Клітинні технології все ширше впроваджуються і в новітні терапевтичні стратегії, які базуються на підходах регенеративної медицини та біоінженерії. Обґрунтований вибір клітинного компонента для цих цілей найчастіше відбувається

Currently, the use of cell technologies enables solving various tasks in different fields of science: from modern supramolecular chemistry to applied developments in biology and medicine, thus promoting the further research of functional potential of different cells and their populations, as well as the finding of new sources of isolation.

Cell technologies are now increasingly being implemented in new therapeutic strategies based on regenerative medicine and bioengineering approaches. Stem cells (SCs) are often reasonably selected as a cell component for these purposes. In addition to a high proliferative potential, they

Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: 23svemazur@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: 23svemazur@gmail.com

Надійшла 21.01.2019

Прийнята до друку 08.02.2021

Received January, 21, 2019

Accepted February, 08, 2021

© 2021 S.P. Mazur, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

на користь стовбурових клітин (СК), відмінною рисою яких, окрім високого проліферативного потенціалу, є здатність до диференціювання в різних напрямках залежно від чинників мікрооточення. Особливу увагу привертають СК, отримані з власних тканин пацієнта, оскільки введення алогенних клітин здатне викликати імунну відповідь і пов'язане з ризиком інфікування. Пріоритетність застосування аутологічних СК на теперішній час актуалізується через розгортання стратегії «персоніфікованої» медицини і зростаючого попиту на створення малоризикових технологій із використанням лише аутологічних матеріалів і клітин.

В останні роки перспективним і доступним джерелом для отримання аутологічних СК вважаються зародки зубів мудрості (третіх молярів) [25]. В ембріогенезі зародки зубів (пульпа та оточуючі тканини) формуються за взаємодії мезенхімальних і ектодермальних клітин шиї та голови, які, в свою чергу, беруть початок із нервового гребеня – провізорного органа, клітинні елементи якого після утворення нервової трубки мігрують у різні ділянки тіла і, зокрема, в первинну ротову порожнину [12, 21]. Треті моляри у людини починають активно розвиватися на шостому році життя і до 18 років часто залишаються не остаточно сформованими. Внаслідок цього в тканинах зародків зубів мудрості і, зокрема, в пульпі зберігаються клітини з високою пластичністю – стовбурові клітини пульпи (СКП) [3, 11, 22]. Перевагами третіх молярів як джерела СК вважаються доступність і низька інвазивність отримання цільового матеріалу [4]. Крім того, видалення зародків зубів мудрості за ортодонтичними показаннями є досить розповсюдженою стоматологічною процедурою, а видалені зуби відносяться до медичних відходів.

Стовбурові клітини пульпи вперше були вилучені з третіх молярів шляхом поєднаної обробки тканини пульпи при 37°C протягом однієї години двома ферментами: колагеназою та диспазою [5]. На даний час також застосовують експлантаційний метод [6, 20] або поєднують ці два підходи [18]. При цьому для ферментативної обробки обов'язково використовують колагеназу, і в більшості досліджень її доповнюють ще однією протеазою: диспазою, трипсином або термолізином [10, 11].

Обов'язковими умовами широкого практичного застосування СКП у медико-біологічній сфері є їх консервування і тривале зберігання, які мають забезпечуватися ефективними і доступними методами кріоконсервування, а також наяв-

exhibit the capacity to differentiate into various lineages depending on microenvironmental factors. Of particular attention are the SCs derived from the patient's own tissues, since the introduction of allogeneic cells can elicit an immune response and may cause an infection. The priority of using autologous SCs is currently actualized through developing the strategy of 'personalized' medicine and a growing demand for designing the low-risk technologies with use of autologous transplants and cells only.

Recently, the wisdom tooth (third molar) germs are considered to be promising and affordable source for procuring autologous SCs [25]. In embryogenesis, the tooth germs (pulp and surrounding tissues) are formed by interaction of mesenchymal and ectodermal cells of neck and head, which, in turn, originate from the neural crest: a transient organ, the cell elements of which migrate after neural tube formation into different body's parts, and primary oral cavity, in particular [12, 21]. The human third molars begin to actively develop in age of 6 years and often remain incompletely formed until the age of 18. As a result, the cells with a high plasticity, *i. e.* the dental pulp stem cells (DPSCs) are preserved in wisdom tooth germ tissues and, particularly, in dental pulp [3, 11, 22]. The advantages of third molars as a SCs source are the availability and minimally invasive procedure of target material procurement [4]. Furthermore, the extraction of wisdom tooth germs by orthodontic indications is quite a common dental procedure, and the extracted teeth are considered as medical waste.

Dental pulp stem cells were first obtained from third molars using combined treatment of pulp tissue with two enzymes: collagenase and dispase at 37°C for an hour [5]. The explant technique is currently used as well [6, 20] or these both approaches are applied jointly [18]. Herewith, a mandatory step in enzymatic treatment is the use of collagenase, supplemented in most studies with one more protease: dispase, trypsin or thermolysin [10, 11].

The prerequisites for the DPSCs widespread practical application in medicine and biology include their preservation and long-term storage. They should be ensured by efficient and affordable cryopreservation techniques, and available DPSCs banking as well. The prospects of DPSCs banking development are also supported by the opportunity to procure them from deciduous and permanent teeth, periodontal ligaments, periapical follicles of adult teeth [11, 22]. Since the DPSCs are relatively new object for cryobiological research, in most



ністю банків цих клітин. Перспективність розвитку банків дентальних СК підкріплюється також можливістю їх отримання з молочних і постійних зубів, періодонтальних зв'язок, періапикальних фолікулів дорослих зубів [11, 22]. Оскільки СКП є відносно новим об'єктом для кріобіологічних досліджень, у більшості робіт для них обирається стандартний метод заморожування суспензій клітин із повільним охолодженням до  $-80^{\circ}\text{C}$  під захистом кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) [2, 11, 24].

Мета даної роботи – виділення стовбурових клітин пульпи зародків третіх молярів (зубів мудрості) людини ферментативним методом із використанням одного ферменту колагенази, дослідження їхньої морфології за умов моношарового культивування, визначення імунофенотипу, а також оцінка проліферативних властивостей і диференціального потенціалу до та після кріоконсервування.

### Матеріали та методи

Матеріалом дослідження була пульпа зародків третіх молярів, видалених у здорових пацієнтів за ортодонтичними показаннями ( $n = 4$ ). Процедури, які пов'язані з отриманням тканин людини і маніпуляціями з ними, проводили відповідно до рекомендацій Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи проведення медичних досліджень за участю людини у якості суб'єкта дослідження».

Видалені зуби вміщували в розчин Хенкса з сумішшю антибіотиків (100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину). Клітини виділяли ферментативним методом за S. Gronthos та співавт. [5] без використання диспази. Для цього до фрагментів пульпи додавали розчин колагенази («Sigma», США) до кінцевої концентрації 3 мг/мл та інкубували протягом 30 хв при  $37^{\circ}\text{C}$  і постійному струшуванні.

Отримані суспензії центрифугували при 150g протягом 7 хв, осаді ресуспендували в культуральному середовищі (КС)  $\alpha$ -MEM («РАА», Австрія), доповненому 10% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби, 50 од/мл пеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину, і переводили в умови моношарового культивування при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  і 95% вологості з заміною середовища кожні 3–4 доби. Після досягнення культурами субконфлюентного моношару клітини відкріплювали від культурального пластику за стандартною методикою з використанням суміші трипсин/версен у співвідношенні 1:4. Кожну первинну клітинну культуру пасивували як три паралельні субкультури ( $n = 12$ ).

studies they are frozen with the standard method for cell suspensions by slow cooling down to  $-80^{\circ}\text{C}$  and dimethyl sulfoxide (DMSO) protection [2, 11, 24].

The objective herein was to isolate the dental pulp stem cells from human third molar tooth (wisdom tooth) germs using the collagenase-based enzymatic method, to study their morphology in monolayer culture, to determine immunophenotype, as well as to evaluate proliferation and differentiation potential prior to and after cryopreservation.

### Materials and methods

The third molar tooth germ pulp extracted from healthy patients by orthodontic indications ( $n = 4$ ) was used in the reserach. All the procedures for human tissue procurement and manipulation were performed in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association 'Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects'.

Extracted teeth were placed in Hanks' solution with antibiotics mixture (100 IU / ml penicillin and 100  $\mu\text{g}$  / ml streptomycin). Cells were isolated using the dyspase-free enzymatic method according to S. Gronthos *et al.* [5]. For this purpose, the pulp fragments were supplemented with collagenase solution (Sigma, USA) up to a final concentration of 3 mg / ml and incubated for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with constant shaking.

The resulting suspensions were centrifuged at 150g for 7 min, the pellets were re-suspended in  $\alpha$ -MEM culture medium (CM) (RAA, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 IU / ml penicillin and 50  $\mu\text{g}$  / ml of streptomycin, and transferred into monolayer culture at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  and 95% humidity. The medium was changed every 3–4 days. When the cells reached the subconfluent monolayer, they were then detached from a culture plastic according to the standard technique using the trypsin / versen mixture in 1: 4 ratio. Each primary cell culture was passaged as three parallel cell subcultures ( $n = 12$ ).

Cell cultures were daily monitored with the inverted microscope Ceti Inverso (CETI, German).

To assess the dynamics of cell proliferation within passaging, we determined the population doubling time and population doubling [15].

Population doubling time (PDT) was calculated by the following formula:

$$PDT = \frac{1}{3,32 \times (\lg N_t - \lg N_0) / T} ,$$



Щоденний контроль стану клітинних культур проводили за допомогою інвертованого мікроскопа «СЕТІ Inverso» («СЕТІ», Німеччина).

Для оцінки динаміки проліферації клітин у процесі пасивування визначали час подвоєння популяції та число клітинних поділів [15].

Час подвоєння популяції розраховували за формулою:

$$PDT = \frac{1}{3,32 \times (\lg N_t - \lg N_0) / T},$$

де  $N_t$  – кількість відкріплених клітин;  $N_0$  – кількість посіяних клітин;  $T$  – термін культивування, години.

Для визначення числа клітинних поділів (подвоєнь) у популяції ( $PD$ ) використовували формулу:

$$PD = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{\lg 2},$$

де  $N_t$  – кількість відкріплених клітин;  $N_0$  – кількість посіяних клітин.

Ефективність проліферації клітин оцінювали за сукупним індексом клітинних поділів у популяції (CPD), який визначали як суму  $PD$  поточного і  $PD$  попереднього пасажів.

З метою кріоконсервування клітини 5-го пасажу ресуспендували в кріозахисному середовищі на базі  $\alpha$ -MEM з 50 од/мл пеніциліну і 50 мкг/мл стрептоміцину, що містило 10% ДМСО і 20% FCS ( $0,5 \times 10^6$  клітин у 0,5 мл середовища). Після 5-хвилинної експозиції суспензії клітин поміщали в кріопробірки («Nunc», США) об'ємом 1 мл і заморожували зі швидкістю охолодження  $1^\circ\text{C} / \text{хв}$  до  $-80^\circ\text{C}$  та подальшим зануренням у рідкий азот. Кріоконсервовані зразки зберігали в рідкому азоті за температури  $-196^\circ\text{C}$  впродовж 3-х тижнів, відігрівали на водяній бані при  $37^\circ\text{C}$ . Негативним контролем були клітини, кріоконсервовані за таким самим режимом охолодження в середовищі без кріопротектора.

Безпосередньо після відігріву та відмивання клітин від кріопротектора оцінювали їхню життєздатність за тестом трипанового синього, який визначає цілісність плазматичної мембрани клітин. Клітинну суспензію розводили в співвідношенні 1:1 з 0,4%-м розчином трипанового синього в фосфатно-сольовому буфері («Sigma-Aldrich», США), кількість забарвлених і незабарвлених клітин підраховували за стандартним протоколом. Життєздатність визначали як частку незабарвлених клітин у загальній кількості клітин суспензії, виражену у відсотках.

where  $N_t$  is a number of detached cells;  $N_0$  is a number of seeded cells;  $T$  is culture period, hrs.

To determine the population doubling we used the following formula:

$$PD = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{\lg 2},$$

where  $N_t$  is a number of detached cells;  $N_0$  is a number of seeded cells.

Cell proliferation efficiency was assessed by cumulative population doubling (CPD), determined as the sum of  $PD$  of current and previous passages.

For further cryopreservation, the cells which underwent 5 passages were re-suspended in the  $\alpha$ -MEM-based cryoprotective medium with 50 IU / ml penicillin and 50  $\mu\text{g}$  / ml streptomycin, contained 10% DMSO and 20% FBS ( $0,5 \times 10^6$  cells in 0.5 ml of medium). After 5-min exposure, cell suspensions were placed into 1 ml cryotubes (Nunc, USA) and frozen with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  down to  $-80^\circ\text{C}$  and then immersed into liquid nitrogen. Cryopreserved samples were stored in liquid nitrogen at  $-196^\circ\text{C}$  for 3 weeks, warmed in a water bath at  $37^\circ\text{C}$ . The cells cryopreserved with the same cooling regimen in cryoprotectant-free medium were negative controls.

Right after the cells were warmed and washed out of cryoprotectant, their viability was evaluated by trypan blue test, measuring the plasma membrane integrity of cells. The cell suspension was diluted in 1:1 ratio with 0.4% trypan blue solution in phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, USA), a number of stained and unstained cells was counted according to the standard protocol. The viability was determined as a share of unstained cells in the total suspension cell number, expressed as a percentage.

Metabolic activity of cells was evaluated using the redox indicator Alamar Blue (AB, Serotec Ltd, USA). For this purpose, the cell suspensions were placed into culture plate wells and cultured for 24 hrs in CM. Afterwards, the medium was changed for fresh one, containing 10% AB. The fluorescence level of AB reduced form was assessed after 3-hour incubation at  $37^\circ\text{C}$  with spectrofluorimeter (TECAN Genios, Austria) at 550 nm excitation and 590 nm emission wavelengths. The ratio of fluorescence levels of experimental and blank (cell-free) specimens was the index of AB reduction.

Cell immunophenotype was analyzed using monoclonal antibodies CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec Ltd), CD34 Class II-FITC, CD44-FITC, CD73-PE, CD90-FITC (BD Biosciences,



Метаболічну активність клітин визначали за допомогою редокс-індикатора Alamar Blue (AB, «Serotec Ltd», США). Для цього суспензії клітин поміщали в лунки культурального планшета і культивували протягом доби в КС, після чого проводили заміну середовища на свіже, що містило 10% AB. Після 3-годинної інкубації при 37°C рівень флуоресценції відновленої форми AB оцінювали за допомогою спектрофлуориметра «TECAN Genios» («Tecan», Австрія) при довжині хвилі збудження 550 нм і довжині хвилі емісії 590 нм. Співвідношення рівнів флуоресценції експериментальних і холостих (без клітин) проб було показником відновлення AB.

Аналіз імунофенотипу клітин здійснювали з використанням моноклональних антитіл CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC («Serotec Ltd»), CD34 Class II-FITC, CD44-FITC, CD73-PE, CD90-FITC («BD Biosciences», США). Суспензії клітин 5-го паसाжу, відкріплених від пластику шляхом стандартної трипсинізації, центрифугували при 150g протягом 5 хв, отримані осадки з'єднували з FITC- або PE-кон'югованими моноклональними антитілами та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі в темряві. Після інкубації клітини тричі відмивали від моноклональних антитіл розчином Хенкса з центрифугуванням при 150g протягом 5 хв, отримані зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD Biosciences»). Результати проточної цитометрії оцінювали за допомогою програми FCSalyzer 0.9.13 (Австрія).

Для індукції остеогенного диференціювання досліджувані клітини культивували протягом 21 доби в КС, що містило відповідні індуктори: 0,2 мМ аскорбінову кислоту («Sigma-Aldrich»), 10 мМ β-гліцерофосфат («Sigma-Aldrich») і 1 мкМ дексаметазон («Sigma-Aldrich»). Після закінчення експерименту культури фіксували 4%-м забуференим формаліном. Для індикації диференціювання виявляли накопичення позаклітинного кальцію на фіксованих препаратах після 2-хвилинної інкубації в 1%-му розчині барвника Alizarin Red S («Sigma-Aldrich») за кімнатної температури.

Середовище для індукції адипогенного диференціювання на основі КС містило індуктори: 0,5 мМ 3-ізобутил-1-метил-ксантин («Sigma-Aldrich»), 1 мкМ дексаметазон («Sigma-Aldrich»), 10 мкг/мл інсуліну («Sigma-Aldrich») і 100 мкМ індометацин («Sigma-Aldrich»). Після 21-ї доби культивування в адипогенному середовищі клітини фіксували як описано вище. Реалізацію адипогенного диференціювання оцінювали за наявністю в цитоплазмі вакуолей, заповнених нейт-

USA). Cell suspensions, which underwent 5 passages, were detached from plastic by standard trypsinization, and then centrifuged at 150 g for 5 min. The obtained pellets were combined with FITC- or PE-conjugated monoclonal antibodies and incubated for 30 min at room temperature in the dark. After incubation, the cells were thrice washed out of monoclonal antibodies with Hanks' solution by centrifugation at 150g for 5 min. The resulted specimens were analyzed with FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences). The flow cytometry data were evaluated with FCSalyzer 0.9.13 software (Austria).

To induce an osteogenic differentiation, the studied cells were cultured for 21 days in CM, including the following inducers such as: 0.2 mM ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 10 mM β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich) and 1 μm dexamethasone (Sigma-Aldrich). After completing the experiment, the cultures were fixed with 4% buffered formalin. To indicate differentiation, the accumulation of extracellular calcium on fixed samples was detected after 2-min incubation in 1% Alizarin Red S dye solution (Sigma-Aldrich) at room temperature.

The CM-based medium for adipogenic differentiation induction included the following inducers: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Sigma-Aldrich), 1 μm dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 μg / ml insulin (Sigma-Aldrich) and 100 μm indomethacin (Sigma-Aldrich). After 21 days of culture in adipogenic medium, the cells were fixed as described above. The implementation of adipogenic differentiation was evaluated by the presence in cytoplasm of neutral lipid-filled vacuoles, positively stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich).

The findings were statistically processed with Past software version 3.0 (Sweden). Data were presented as mean ± standard deviation. The significance in differences between the indices was determined using the Student's t-test. Differences between samples were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

The dental pulp is a loose fibrous connective tissue, through which a network of numerous nerve fibers, blood and lymphatic vessels runs. The cell range within the dental pulp is highly varied and includes odontoblasts, histiocytes, macrophages, fibroblasts and undifferentiated SCs.

Mechanical disaggregation of human dental pulp and subsequent enzymatic treatment resulted in a release of cell elements from a tissue. Post-isolation suspension was of a heterogeneous cell composition. During following monolayer culture,



ральними ліпідами, які позитивно забарвлювалися Oil Red O («Sigma-Aldrich»).

Отримані результати обробляли статистично за допомогою програмного забезпечення «Past» (Швеція). Дані представляли у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартне відхилення. Значущість відмінностей між показниками визначали, використовуючи параметричний t-критерій Стюдента. Відмінності між вибірками вважали значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Пульпа зуба є пухкою волокнистою сполучною тканиною, яка пронизана мережею численних нервових волокон, кровоносних і лімфатичних судин. Спектр клітин у складі пульпи надзвичайно різноманітний і містить одонтобласти, гістіоцити, макрофаги, фібробласти і недиференційовані СК.

Механічна дезагрегація пульпи зуба людини та подальша ферментативна обробка приводили до вивільнення клітинних елементів із тканини. Отримана після виділення суспензія мала гетерогенний клітинний склад. Протягом подальшого моношарового культивування клітини з низькою здатністю до адгезії поступово елімінувалися. Прижиттєве мікроскопічне спостереження на 3-ю добу культивування дозволило виявити великі розпластані полігональні клітини з округлим ядром і цитоплазмою, що містила значну кількість гранул і вакуолей (рис. 1, А). Крім них виявлялися дрібні компактні веретеноподібні клітини з невеликим овальним ядром і гомогенною цитоплазмою. Веретеноподібні клітини активно проліферували, утворювали колонії і через 7 днів культивування формували конфлуентний моношар (рис. 1, В). Культури СКП характеризувалися високою проліферативною активністю зі стабільною позитивною динамікою росту (рис. 2, А). Середній час подвоєння клітинної популяції зберігався приблизно на одному рівні протягом усього періоду спостереження (5 пасажів) і склав  $(40 \pm 2)$  годин (рис. 2, В).

Дослідження імунофенотипового профілю показало, що не менше 90% СКП експресують поверхневі маркери мезенхімальних стромальних клітин (МСК): CD29 (91,5%), CD44 (93,3%), CD73 (98,9%), CD90 (90,0%), CD105 (90,7%). При цьому експресія гемопоетичних маркерів властива менш ніж 1% клітин: CD34 – 0,52%, CD45 – 0,08%.

Життєздатність СКП до кріоконсервування (контроль) становила  $(96,1 \pm 3,5)\%$ . Кріоконсервування шляхом повільного заморожування в середовищі без кріопротектора призводило до за-

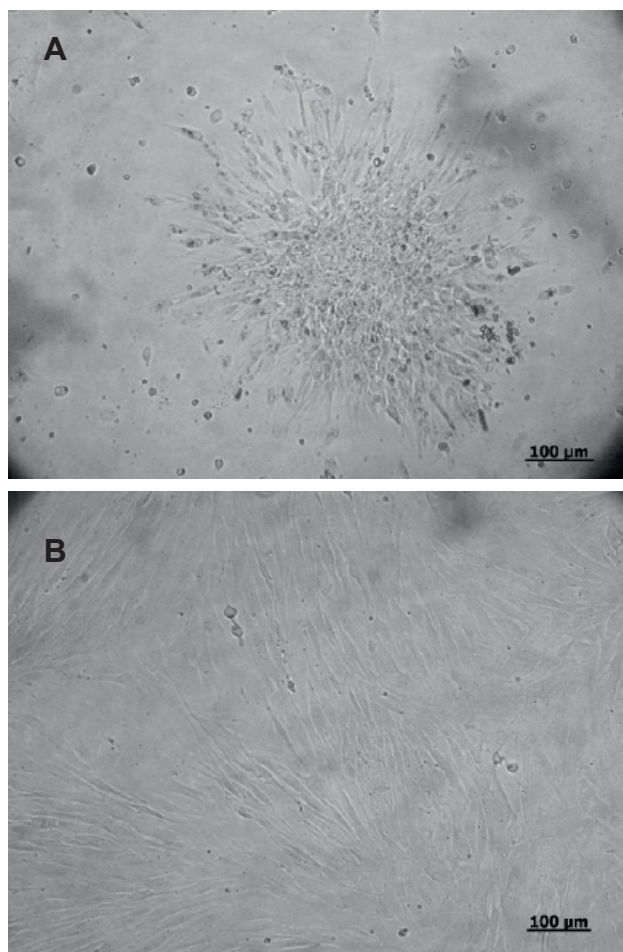


Рис. 1. Культура клітин, отриманих із пульпи зачатків третіх молярів людини: А – 3 доби культивування, В – 7 днів культивування.

Fig. 1. Culture of cells isolated from human third molar tooth germ pulp: А – 3-day culture, В – 7-day culture.

the cells with low adhesion ability were gradually eliminated. Vital microscopic observation to day 3 of culture revealed large spread polygonal cells with a rounded nucleus and cytoplasm, containing a significant number of granules and vacuoles (Fig. 1A). In addition, the compact spindle-shaped cells with a small oval nucleus and a homogeneous cytoplasm were detected. Spindle-shaped cells actively proliferated, formed colonies and after 7 days of culture made a confluent monolayer (Fig. 1B). The DPSCs cultures were characterized by a high proliferative activity with stable positive growth dynamics (Fig. 2A). The average population doubling time remained at nearly the same level throughout the observation period (5 passages) and made  $(40 \pm 2)$  hrs (Fig. 2B).

The study of immunophenotypic profile showed at least 90% of DPSCs to express the surface markers of mesenchymal stromal cells (MSCs): CD29 (91.5%), CD44 (93.3%), CD73 (98.9%), CD90 (90.0%), CD105 (90.7%). Herewith, the expression of hema-

гибелі переважної більшості клітин. Введення 10% ДМСО та 20% ЕС до складу криозахисного середовища дозволяло після відігрівання зберегти  $(82,3 \pm 6,1)\%$  СКП.

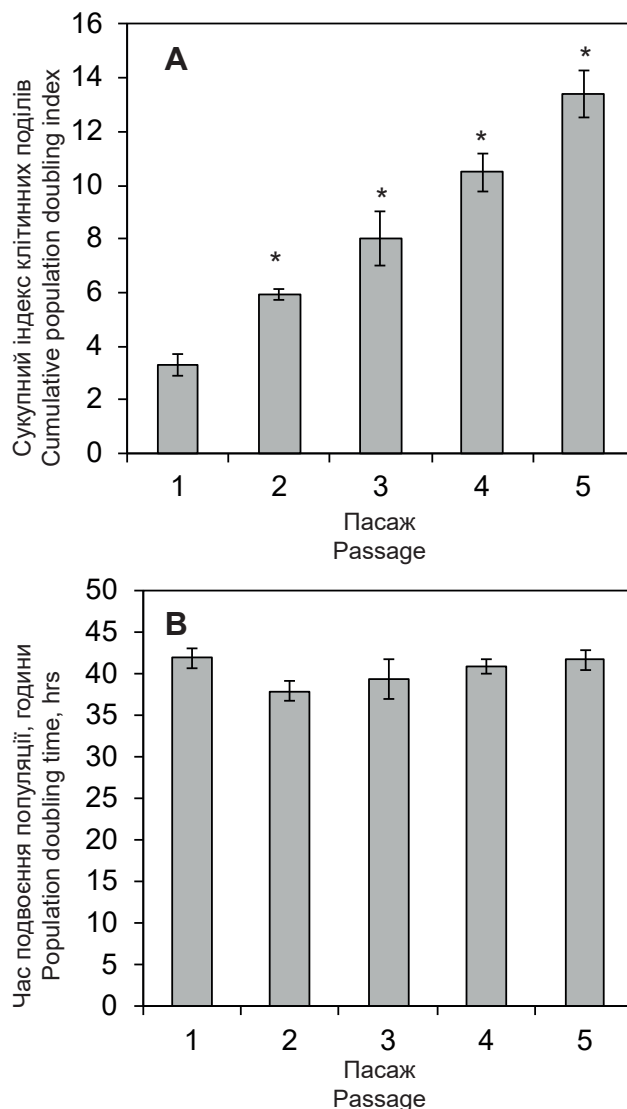
За умов культивування клітини, кріоконсервовані в середовищі з 10% ДМСО та 20% ЕС, прикріплювалися до пластику і проліферували. Відзначалось, що СКП після кріоконсервування формували субконфлуентний моношар веретеноподібних клітин у середньому на 3 доби пізніше в порівнянні з контролем, що, вочевидь, пов'язано з періодом адаптації та реалізації репаративних процесів у клітинах. Протягом подальшого субкультивування в стандартних умовах кріоконсервовані клітини активно ділилися і практично не відрізнялися від некріоконсервованих за морфологічними характеристиками і здатністю до проліферації.

Клітини, кріоконсервовані в середовищі без кріопротектора, після перенесення в умови культивування не були здатні прикріплюватися до культурального пластику та відновлювати АВ і в подальших дослідженнях не використовувалися.

На ранніх термінах культивування кріоконсервовані з кріопротектором СКП відрізнялися від контролю за рівнем метаболічної активності: показник відновлення АВ для них через добу після відігрівання був нижчим за значення контролю на 22% (рис. 3). Через 7 діб культивування рівень відновлення АВ в обох випадках значно перевищував такий у першу добу: для контрольних культур – у 5,7 раза, для кріоконсервованих клітин – у 6,6 раза. Значущої різниці в показниках метаболічної активності між контрольними і кріоконсервованими клітинами на 7-му добу культивування виявлено не було.

Основною властивістю СК, яка визначає перспективність їх застосування в клінічній практиці, є здатність до спрямованого мультилінійного диференціювання. Культивування як контрольних, так і кріоконсервованих СКП у середовищі, що індукє остеогенне диференціювання, приводило до мінералізації позаклітинного матриксу (рис. 4, А, С). Після 3-х тижнів культивування в середовищі з індукторами адипогенезу СКП накопичували внутрішньоклітинні ліпіди в формі характерних вакуолей, які позитивно забарвлювалися Oil Red O (рис. 4, В, D). Слід зазначити, що за умов культивування СКП у ростовому середовищі без додавання індукторів не було виявлено спонтанних процесів остео- або адипогенного диференціювання.

Результати проведеної роботи показують, що застосування для ферментативного розщеплен-



**Рис. 2.** Динаміка росту культур СКП, отриманих із пульпи зачатків третіх молярів людини, на 1–5-му пасажах: **А** – сумарний індекс клітинних поділів CPD; **В** – час подвоєння популяції PDT. \* – відмінності значущі порівняно з попереднім пасажем ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Dynamics of growth of DPSCs cultures, isolated from human third molar tooth germ pulp, on passages 1–5: **A** is the cumulative population doubling index; **B** is the population doubling time. \* – differences are significant as compared with previous passage ( $p < 0.05$ ).

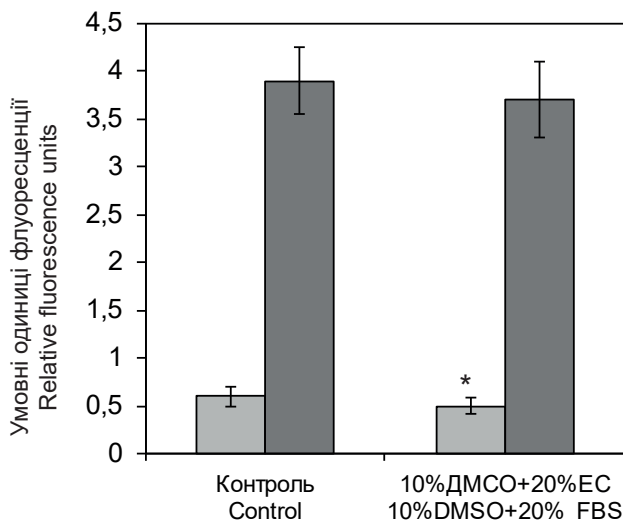
topoietic markers was inherent in less than 1% of cells, *i. e.* 0.52 and 0.08% for CD34 and CD45, respectively.

The viability of DPSCs prior to cryopreservation (control) was  $(96.1 \pm 3.5)\%$ . Cryopreservation by slow freezing in cryoprotectant-free medium led to most cells death. The supplement of cryoprotective medium with 10% DMSO and 20% FBS allowed to preserve  $(82.3 \pm 6.1)\%$  DPSCs after warming.

When culturing the cells cryopreserved in the medium supplemented with 10% DMSO and 20% FBS were attached to the plastic and proliferated.







**Рис. 3.** Метаболічна активність СКП до (контроль) і після кріоконсервування під захистом 10% ДМСО і 20% ЕС на 1-у (■) і 7-му (■) доби культивування; \* – відмінності значущі порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3.** Metabolic activity of DPSCs before (control) and after cryopreservation with 10% DMSO and 20% FBS to days 1 (■) and 7 (■) of culture; \* – differences are significant as compared with control ( $p < 0.05$ ).

ня пульпи зубів мудрості колагенази без інших протеолітичних ферментів забезпечує отримання суспензії клітин, які після експансії виявляють властивості, описані раніше для стовбурових клітин пульпи. Клітини характеризуються специфічним імунофенотипом, високою проліферативною активністю і здатністю до мультилінійного диференціювання.

Аналіз імунофенотипу СКП, проведений після 5-го пасажу, показав експресію поверхневих маркерів, подібну до такої для МСК кісткового мозку (КМ), жирової тканини і дерми людини [13, 19, 23]. Ми не виявили значної популяції CD34-позитивних клітин, описаної G. Laino та співавт. [7], що може бути пов'язане з різними умовами експансії. Непрямим підтвердженням відсутності цієї популяції клітин може слугувати той факт, що отримані нами СКП не вступали в спонтанне диференціювання, у той самий час як за даними G. Laino та співавт. CD34-позитивні клітини здатні диференціюватися в остеогенному напрямку за відсутності індукуючих агентів.

Представлені нами результати узгоджуються з даними інших робіт з вивчення СКП: частка клітин, що експресують мезенхімальні маркери (CD73, CD90, CD105) становила понад 90%, а гемопоетичні (CD34, CD45) – менше 5% [11, 16, 25]. Таким чином, отримані СКП за морфологічними ознаками, профілем поверхневих маркерів і диференціальним потенціалом відповідали ідентифікаційним характеристикам МСК, але при цьому демонстрували суттєві відмінності

The DPSCs after cryopreservation was noted to form a subconfluent monolayer of spindle-shaped cells 3 days later on average if compared with the control, likely due to the period of adaptation required for reparative processes in cells. During following subculture under the standard conditions, the cryopreserved cells were actively divided and virtually did not differ from non-cryopreserved ones by morphological features and ability to proliferate.

Cells cryopreserved in cryoprotectant-free medium after transferring into culture conditions were not able to attach to the culture plastic and reduce AB, and were not used in further studies.

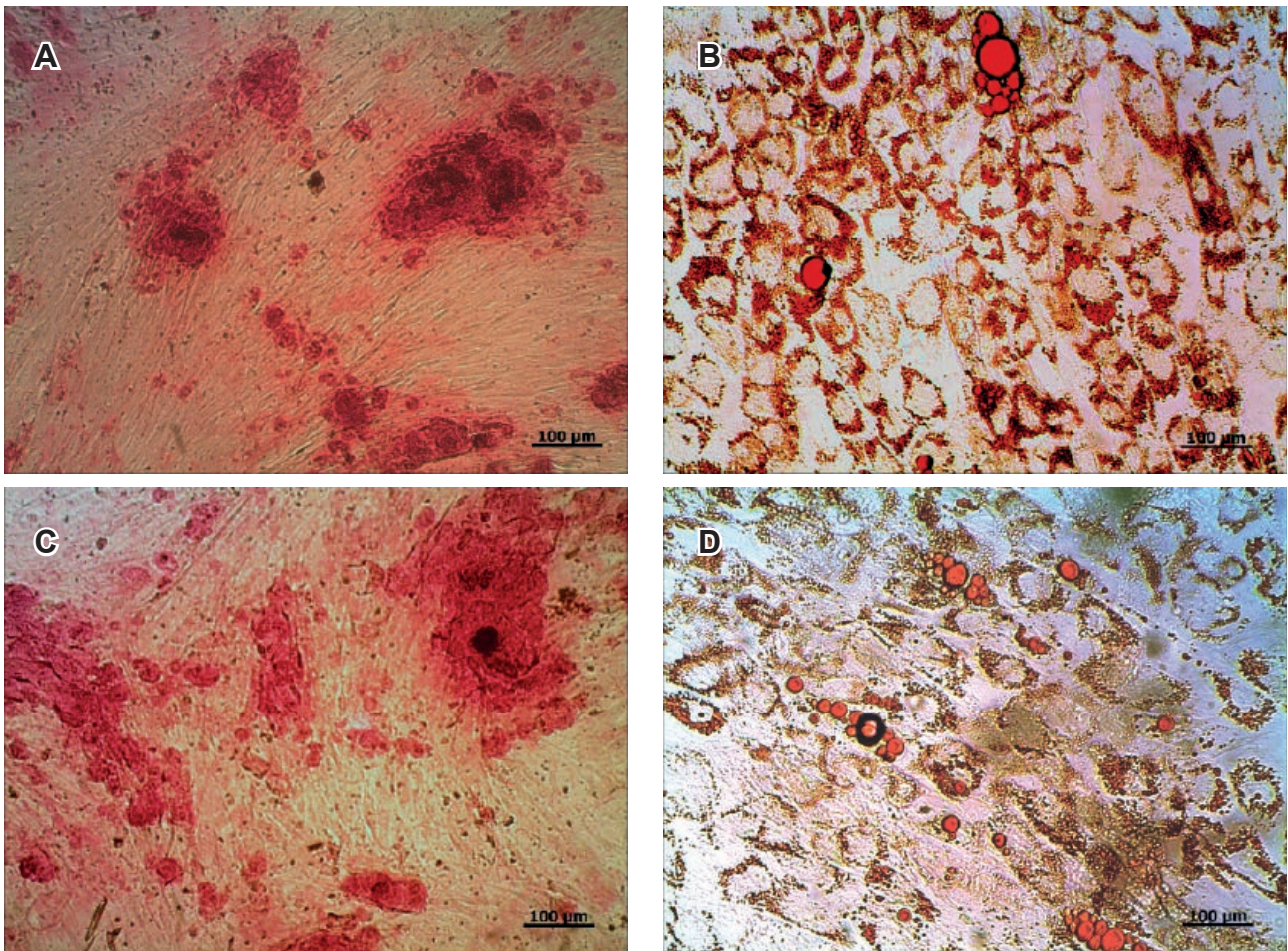
At the early stages of culture, the DPSCs cryopreserved with cryoprotectant differed from the control by the level of metabolic activity, *i. e.* the rate of AB reduction for them a day after warming was by 22% lower than the control value (Fig. 3). After 7-day culture, the level of AB reduction in both cases significantly exceeded this index of day 1, *i. e.* by 5.7 and 6.6 times for control cultures and cryopreserved cells, respectively. No significant difference in metabolic activity between control and cryopreserved cells to day 7 of culture was revealed.

The main feature of SCs, determining the prospects for their use in clinical practice, is the ability to a directed multilineage differentiation. The culture of both control and cryopreserved DPSCs in the medium, inducing an osteogenic differentiation resulted in extracellular matrix mineralization (Fig. 4A, C). After 3-week culturing in the medium with adipogenesis inducers, the DPSCs accumulated the intracellular lipids in the form of specific positively Oil Red O-stained vacuoles (Fig. 4B, D). Notably, that under DPSCs culturing in the inducer-free growth medium, no spontaneous osteo- or adipogenic differentiations were detected.

Our findings showed the use of collagenase for wisdom tooth pulp enzymatic digestion without any other proteolytic enzymes to ensure the procurement of cell suspension, exhibiting after expansion the properties, previously described for pulp stem cells. The cells showed a specific immunophenotype, high proliferative activity and ability to multilineage differentiation.

The DPSCs immunophenotype analysis, performed after passage 5 showed the surface marker expression to be similar to that for MSCs of bone marrow (BM), adipose tissue and human dermis [13, 19, 23]. We have found no significant population of CD34-positive cells, described by G. Laino *et al.* [7], likely due to different expansion conditions. The fact that the DPSCs we procured did not spon-





**Рис. 4.** Індуковане остео- та адипогенне диференціювання СКП до (A, B) і після криоконсервування (C, D) *in vitro*: A, C – накопичення позаклітинного кальцію (забарвлення Alizarin Red); B, D – клітини з вакуолями, які містять нейтральні ліпіди (забарвлення Oil Red O).

**Fig. 4.** Induced osteo- and adipogenic differentiation of DPSCs before (A, B) and after cryopreservation (C, D) *in vitro*: A, C – accumulation of extracellular calcium (Alizarin Red staining); B, D – cells with neutral lipid-containing vacuoles (Oil Red O staining).

показників динаміки росту від класичного стандарту МСК із КМ, а саме: PDT для СКП в середньому становив 40 годин, тоді як для МСК КМ в аналогічних умовах культивування – близько 70 годин [8]. Більш високі проліферативну активність та клоногенний потенціал для культур із клітин пульпи зуба порівняно з МСК КМ відзначали й інші дослідники [1, 17], що робить СКП привабливим об'єктом для використання в високотехнологічних медико-біологічних галузях.

Суттєвою характеристикою клітин з точки зору перспектив клінічного застосування є криочутливість, яка залежить від їхнього розміру, кількості вільної та зв'язаної води, складу плазматичних і внутрішньоклітинних мембран. Отримані нами результати свідчать про те, що зміни функціональних властивостей СКП під дією чинників низькотемпературного консервування як за відсутності криопротектора, так і в присут-

тaneously differentiate, while according to G. Laino *et al.* the CD34-positive cells were able to differentiate towards osteogenic lineage if no inducing agents were present, might indirectly confirm this cell population absence.

Our findings were consistent with the reported data of other scientists on DPSCs studying, *i. e.* the share of cells, expressing mesenchymal markers (CD73, CD90, CD105) was more than 90%, and that for hematopoietic ones (CD34, CD45) was less than 5% [11, 16, 25]. Thus, the isolated DPSCs by morphological characteristics, surface marker profile and differentiation potential corresponded to those of MSCs, but showed significant differences in growth dynamics compared to the 'gold standard' from BM, namely PDT for DPSCs averaged 40 hrs, while for BM MSCs, under the similar culture conditions it was about 70 hrs [8]. Other researchers [1, 17] have also mentioned higher proliferative activity and clonogenic potential for

ності 10% ДМСО були подібні до встановлених під час кріоконсервування МСК, отриманих із жирової тканини [19], дерми [14] і кісткового мозку дорослої людини [9]. Кріоконсервування СКП за відсутності кріопротектора призводить до загибелі практично всіх клітин, а введення в середовище кріоконсервування 10% ДМСО дозволяє зберегти більше 80% клітин із неушкодженою плазматичною мембраною, здатних до адгезії, проліферації та індукованого мультилінійного диференціювання в умовах моношарового культивування.

Відносна простота процедури отримання СКП, можливість швидкої експансії *in vitro* і висока пластичність цих клітин зумовлюють перспективність їхнього застосування в регенеративній медицині та біоінженерії. Однак для трансляції цих даних у клінічну практику необхідно продовжити вивчення властивостей СКП і розробити ефективні та безпечні протоколи кріоконсервування, що виключають застосування токсичних і ксеногенних матеріалів.

### Висновки

1. Адгезивні клітини, виділені в результаті ферментативної обробки пульпи зачатків третіх молярів за допомогою колагенази, за умов експансії *in vitro* демонструють високу проліферативну активність і здатність до індукованого диференціювання в остео- та адипогенному напрямках.

2. За морфологічними ознаками, профілем поверхневих маркерів і диференціальним потенціалом отримані СКП відповідають критеріям мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, але при цьому демонструють вищу швидкість проліферації порівняно з МСК КМ.

3. Кріоконсервування СКП людини шляхом повільного двоступеневого заморожування в середовищі, що містить 10% ДМСО та 20% ЕС, дозволяє значною мірою зберегти життєздатність, метаболічну активність, а також остео- і адипогенний диференціальний потенціал клітин.

### Література

1. Alge DL, Zhou D, Adams LL, et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4(1): 73–81.
2. Chen YK, Huang AH, Chan AW, et al. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(10): 793–800.
3. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66(2): 129–38.

dental pulp cell cultures versus BM MSCs, making DPSCs an attractive target for high-tech biomedical applications.

Cryosensitivity is an important feature of cells in terms of their prospects for clinical use, depending on their size, free and bound water amount, plasma and intracellular membrane composition. Our findings suggested the changes in functional properties of DPSCs, affected by low temperature preservation both with (10% DMSO use) and without cryoprotectant to be similar to those, established when cryopreserving the MSCs, derived from adipose tissue [19], dermis [14] and adult bone marrow [9]. Cryoprotectant-free cryopreservation of DPSCs resulted in death of virtually all the cells, while 10% DMSO supplement to cryopreservation medium enabled preserving more than 80% of cells with intact plasma membrane, capable of adhesion, proliferation and induced multilineage differentiation in monolayer culture.

Relatively easy procedure of DPSCs isolation, possibility of rapid expansion *in vitro* and a high plasticity, make them very promising for application in regenerative medicine and bioengineering. However, for translating these findings into clinical practice, the studying of DPSCs features should be continued with designing the efficient and safe cryopreservation protocols, excluding toxic and xenogenic compounds use.

### Conclusions

1. Adherent cells, isolated as a result of enzymatic treatment of the third molar germ tooth pulp with collagenase, under *in vitro* expansion showed a high proliferative activity and ability to induce differentiation towards osteo- and adipogenic lineages.

2. The obtained DPSCs met the criteria for multipotent mesenchymal stromal cells by morphological features, surface marker profile and differentiation potential, but showed a higher proliferation rate as compared with BM MSCs.

3. Cryopreservation of human DPSCs by slow two-step freezing in the medium, composing of 10% DMSO and 20% FBS, enabled to significantly preserve the viability, metabolic activity, as well as osteo- and adipogenic differentiation potential of cells.

### References

1. Alge DL, Zhou D, Adams LL, et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4(1): 73–81.



4. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008; 4(1): 21–6.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(25): 13625–30.
6. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013; 353(1): 65–78.
7. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005; 20(8): 1394–402.
8. Li X, Bai J, Ji X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* 2014; 34(3): 695–704.
9. Liu Y, Xu X, Ma X, et al. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnol Prog.* 2010; 26(6): 1635–43.
10. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, et al. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res.* 2005; 84(6): 515–20.
11. Perry BC, Zhou D, Wu X, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14(2): 149–56.
12. Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15(2): 59–65.
13. Petrenko YuA, Ivanov RV, Petrenko AY, et al. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22(6): 1529–40.
14. Petrenko YA, Rogulska OY, Mutsenko VV, et al. A sugar pretreatment as a new approach to the Me2SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. *CryoLetters.* 2014; 35 (3): 239–46.
15. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, et al. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol [Internet].* 2015 Mar 14; [Cited 06.07.2018] 15:14 Available from: <https://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12861-015-0065-x>.
16. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7(5): 839–51.
17. Rajendran R, Gopal S, Masood H, et al. Regenerative potential of dental pulp mesenchymal stem cells harvested from high caries patient's teeth. *J Stem Cells.* 2013; 8(1): 25–41.
18. Raouf M, Yaghoobi MM, Derakhshani A, et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dent Res J (Isfahan).* 2014; 11(2): 244–50.
19. Rogulska O, Petrenko Y, Petrenko A. DMSO-free cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stromal cells: expansion medium affects post-thaw survival. *Cytotechnology.* 2017; 69(2): 265–76.
20. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6b):1635–44.
21. Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone.* 1999; 25(1): 123–25.
22. Tirino V, Paino F, De Rosa A, et al. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol.* 2012; 879: 443–63.
23. Trufanova NA, Zaikov VS, Zinchenko AV, et al. Closed vitrification system as a platform for cryopreservation of tissue engineered constructs. *CryoLetters.* 2016; 37(6): 440–7.
2. Chen YK, Huang AH, Chan AW, et al. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(10): 793–800.
3. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66(2): 129–38.
4. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008; 4(1): 21–6.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(25): 13625–30.
6. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013; 353(1): 65–78.
7. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005; 20(8): 1394–402.
8. Li X, Bai J, Ji X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* 2014; 34(3): 695–704.
9. Liu Y, Xu X, Ma X, et al. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnol Prog.* 2010; 26(6): 1635–43.
10. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, et al. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res.* 2005; 84(6): 515–20.
11. Perry BC, Zhou D, Wu X, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14(2): 149–56.
12. Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15(2): 59–65.
13. Petrenko YuA, Ivanov RV, Petrenko AY, et al. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22(6): 1529–40.
14. Petrenko YA, Rogulska OY, Mutsenko VV, et al. A sugar pretreatment as a new approach to the Me2SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. *CryoLetters.* 2014; 35 (3): 239–46.
15. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, et al. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol [Internet].* 2015 Mar 14; [Cited 06.07.2018] 15:14 Available from: <https://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12861-015-0065-x>.
16. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7(5): 839–51.
17. Rajendran R, Gopal S, Masood H, et al. Regenerative potential of dental pulp mesenchymal stem cells harvested from high caries patient's teeth. *J Stem Cells.* 2013; 8(1): 25–41.
18. Raouf M, Yaghoobi MM, Derakhshani A, et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dent Res J (Isfahan).* 2014; 11(2): 244–50.
19. Rogulska O, Petrenko Y, Petrenko A. DMSO-free cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stromal cells: expansion medium affects post-thaw survival. *Cytotechnology.* 2017; 69(2): 265–76.
20. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6b):1635–44.





24. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009; 59(2): 150–7.
25. Yalvac M, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, 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): 105–13.
21. Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone*. 1999; 25(1): 123–25.
22. Tirino V, Paino F, De Rosa A, et al. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012; 879: 443–63.
23. Trufanova NA, Zaikov VS, Zinchenko AV, et al. Closed vitrification system as a platform for cryopreservation of tissue engineered constructs. *CryoLetters*. 2016; 37(6): 440–7.
24. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009; 59(2): 150–7.
25. Yalvac M, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, 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): 105–13.