

جداسازی و شناسایی هویت مزانشیمی و ستیغ عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان

نازیلا نیاپور^۱ (M.Sc)، زهرا تقی‌پور^۲ (Ph.D)، حسین صالحی^۳ (Ph.D)، ابوالفضل باقری^۴ (DD.S)، آناهیتا روحانی^۵ (DD.S)، مهدیه طالبی^۵ (DD.S)، نوروز نجف‌زاده^۱ (Ph.D)، علی نیاپور^{۱*} (Ph.D)

۱- گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۲- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳- گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۵- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان منبع بی‌نظیر سلول‌های بنیادی بزرگسالان در نظر گرفته می‌شوند که با کم‌ترین مسائل اخلاقی در دسترس می‌باشد. این سلول‌ها جهت بررسی بیولوژی سلول‌های بنیادی، روند تمایز آن‌ها به دیگر سلول‌ها، مهندسی بافت، پزشکی ترمیمی و درمان‌های نوین سرطان مورد استفاده می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر جداسازی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و تایید ویژگی‌های مزانشیمی آن به روش‌های معمول می‌باشد. همچنین بیان پروفایل ژنی مربوط به سلول‌های ستیغ عصبی در آن‌ها بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه دندان‌ها، اتاقت پالپ نمایان و بافت پالپ به‌وسیله آنزیم کلاژناز تیپ چهار، هضم گردید. سپس، سلول‌های جداشده از پالپ دندان در محیط α MEM، حاوی ۱۵٪ سرم جنین گاوی مخلوط شد و در دمای 37°C ، رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. قدرت تمایز سلول‌های بنیادی پالپ در محیط‌های تمایزی استخوانی و چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بیان نشانگرهای CD45 و CD90 به روش فلوسایتومتری بررسی شد. همچنین، بیان ژن‌های slug، p75ngfr و sox10 به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان قابلیت اتصال خوبی داشتند و پتانسیل تکثیری بالای از خود نشان دادند. رنگ‌آمیزی Alizarin Red و Oil red نشان داد که این سلول‌ها در شرایط مساعد، می‌توانند به ترتیب تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک داشته باشند. سلول‌های جداسازی شده از پالپ دندان با درصد بالا نشانگر CD90 را بیان می‌کردند؛ در حالی که درصد بیان CD45، که نشانگر سلول‌های هماتوپویتیک می‌باشد، در این سلول‌ها ناچیز بود. همچنین، نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژن‌هایی هم‌چون slug، p75ngfr و sox10 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان بود.

نتیجه‌گیری: سلول‌های جداسازی شده از پالپ دندان، ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارا هستند و حداقل جمعیتی از سلول‌های حاصل؛ منشا و ماهیت ستیغ عصبی دارند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پالپ دندان، تمایز سلولی، ستیغ عصبی

در بدن فرد بالغ کنام‌هایی (Niche) برای سکونت سلول‌های بنیادی بزرگسال (Adult Stem Cell) وجود

مقدمه

دارد [۲،۱]. چنین سلول‌هایی مسئول نوسازی و بازسازی سلول‌های تمایز یافته در بافت‌های مختلف به‌ویژه بافت‌هایی با دوره تخریب و بازسازی بالا هم‌چون مغز استخوان خون‌ساز، پوست و غیره می‌باشند [۳]. امروزه استفاده از چنین سلول‌هایی به‌دلیل جداسازی و کشت آزمایشگاهی نسبتاً راحت و کم‌هزینه آن‌ها و هم‌چنین استفاده از سلول‌های خود فرد در درمان‌های نوین هم‌چون پیوند سلول [۴]، مهندسی بافت [۲] و بحث درمان‌های نوین سرطان مورد توجه قرار گرفته است [۵]. اطلاع جامع از فیزیولوژی سلول‌های بنیادی، مکانیسم‌های کنترل تمایز، و اطمینان از ایمنی درازمدت آن، لازمه کاربرد کلینیکی این نوع سلول‌ها است [۲]. در کنار چنین مسائلی، احراز منبع مناسب و سهل‌الوصول برای استحصال سلول‌های بنیادی مطلب کم‌اهمیتی نخواهد بود [۶]. قسمت عمده‌ای از بافت همبند ناحیه سر و صورت از جمله دندان و بافت‌های دور دندانی از سلول‌های مزانشیمی ایجاد می‌شوند که به لحاظ جنین‌شناسی از سلول‌های ستیغ عصبی منشا می‌گیرند. به همین دلیل اصطلاح اکتومزانشیم در مورد آن‌ها مصداق پیدا می‌کند [۷]. اکتومزانشیم مسئول تولید ساختارهای مختلف سر و صورت مثل عضله، استخوان، اعصاب سر و صورت و اکتومزانشیم پالپ دندان می‌باشد [۸]. با توجه به مسائل و مشکلات مربوط به دندان و استخوان‌های فک و صورت در سنین بزرگسالی به‌دلایلی مثل پوسیدگی دندان، بیماری‌های پریدنتال، تروماها، سرطان و غیره، وجود منبعی مناسب که بتواند برای ترمیم و بازسازی بافتی مورد استفاده قرار گیرد حائز اهمیت است [۹]. بنابراین، سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان گزینه‌ای ایده‌آل برای نیل به این مهم محسوب می‌گردد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان هم‌چون سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی واجد سه ویژگی اساسی هستند که عبارت‌اند از: اول، در شرایط استاندارد آزمایشگاهی به سطح ظروف کشت پلاستیکی می‌چسبند. دوم، این‌که در محیط‌های کشت تمایزی این سلول‌ها قدرت تمایز به سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی را دارند و آخر این‌که نشانگرهای CD73، CD90 و

CD105 در سطح سلول بیان می‌کنند؛ ولی در عین حال نشانگرهای خون‌ساز (هماتوپیتیک) مثل CD14، CD34 و CD45 را نخواهند داشت [۱۱،۱۰]. سلول‌های بنیادی پالپ دندان اولین بار در سال ۲۰۰۰ میلادی توسط Gronthos و همکاران در شرایط آزمایشگاهی جداسازی و معرفی شدند [۸]. استفاده از دو روش معمول استخراج سلول‌های مزانشیمی، هضم آنزیمی و کشت قطعات بافت، نتایج مشابهی را در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان داشته و تغییر قابل توجهی در فنوتیپ، بیان نشانگرهای سطحی و قابلیت تمایز سلول‌های حاصل دیده نشده است [۱۲]. علاوه بر این نشان داده شد که این سلول‌ها تا پنج روز پس از کشیدن دندان، قابل جداسازی از پالپ بوده و انجماد و ذوب در این سلول‌ها تغییر محسوسی در بیان نشانگرهای سطحی مربوطه ایجاد نمی‌کند [۱۳]. هم‌چنین، تصور بر این است که سلول‌های بنیادی موجود در پالپ دندان و رباط دور دندانی با توجه به ماهیت جنینی آن، می‌توانند نقش بالقوه‌ای در ترمیم ضایعات سیستم عصبی داشته باشد [۹،۶]. لذا هدف از تحقیق حاضر جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از پالپ دندان عقل، تایید ویژگی‌های مزانشیمی آن‌ها و هم‌چنین بررسی بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با ستیغ عصبی است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان: تعداد ۲۰ نمونه دندان مولر سوم سالم، بدون پوسیدگی و یا درمان‌های ترمیمی، از افراد بالغ ۱۸-۳۰ سال مراجعه‌کننده به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تهیه شد. این دندان‌ها به علت نهنفتگی یا درمان ارتودنسی با تشخیص متخصص پاتولوژی و ارتودنسی و با کسب رضایت از بیماران جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری، دندان‌ها داخل محلول PBS و دمای چهار درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی گروه علوم تشریحی منتقل و طی دو مرحله ابتدا با بتادین و سپس با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شدند. پس از شستشوی مجدد با PBS، اتاچک پالپ نمایان و

بافت پالپ از داخل حفره پالپ خارج گردید. بافت پالپ به وسیله تیغه جراحی به قطعات کوچک تقسیم و داخل محلول ۳٪ کلارناز تیپ چهار (Gibco) به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در طی این مدت به صورت دوره‌ای پیپتاژ ملایم قطعات بافتی انجام شد تا به هضم آن کمک شود. در ادامه به میزان دو برابر حجم آنزیم، محیط کشت کامل اضافه و به مدت ده دقیقه و با دور ۱۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پلیت سلولی حاصل با محیط کامل مخلوط و داخل فلاسک‌های T ۲۵ منتقل شدند و در دمای ۳۷ °C و با رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ کشت داده شدند. محیط کامل مشتمل بر محیط کشت α MEM (Sigma; M0644)، حاوی ۱۵٪ سرم جنین گاوی (FBS, Gibco)، ۱۰۰ U/ml پنی‌سلین و ۱۰۰ μ g/ml استریتومایسین (Gibco) و آمفوتریسین ۲/۵ μ g/ml (Sigma) بود. محیط کشت سلول‌ها دو بار در هفته تعویض می‌شد و به صورت هفتگی به کمک تریپسین (Biowest) پاساژ داده می‌شدند [۱۵، ۱۴].

تمایز به استخوان: سلول‌ها در مرحله پاساژ سه در ظروف کشت شش خانه پلیت شدند. با ایجاد تراکم حدود نود درصدی در کف چاهک‌ها، محیط کشت معمول این سلول‌ها با محیط کشت استئوبلاستی تعویض شد. محیط پایه تمایزی به استخوان شامل DMEM بود که به آن ۱۰۰ nM دگزامتازون، ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۵٪ اسکوربیک اسید دو فسفات و ۱۰ mM از شش گلیسرول فسفات اضافه می‌شد. سلول‌ها به مدت سه هفته با این محیط در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ به میزان ۵٪ نگهداری شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. قدرت تمایز به استخوان با رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin Red مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از فیکاسیون سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪ و شستشو با آب دیونیزه، محلول Alizarin Red به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق روی سلول‌ها اضافه و در نهایت با آب دیونیزه سه بار شستشو داده شد [۱۶، ۱۴].

تمایز به چربی: سلول‌ها در مرحله پاساژ سه در ظروف کشت شش خانه پلیت شدند. پس از حصول حدود نود

درصدی تراکم سلولی در کف چاهک‌ها، محیط کشت معمول این سلول‌ها به محیط کشت تمایز به چربی جایگزین شد و به مدت سه هفته با این محیط در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ به میزان ۵٪ نگهداری شدند. محیط تمایزی به آدیپوسیت مشتمل بر DMEM به اضافه ۱۰۰ nM دگزامتازون، ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۵۰ μ g/ml ایندومتاسین، ۱۵٪ اسکوربیک اسید دو فسفات می‌شد. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. قدرت تمایز به آدیپوسیت با روش رنگ‌آمیزی اختصاصی چربی (Oil-Red O) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور سلول‌ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند و دو مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شدند. قبل از اضافه کردن رنگ اصلی، سلول‌ها به مدت پنج دقیقه با ایزوپروپانول ۶۰٪ تیمار شدند. در قدم بعدی محلول اصلی Oil red O به چاهک اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و با آب دیونیزه سه بار شستشو داده شد [۱۴].

فلوسایتومتری برای نشان‌گرهای سطح سلولی: نشان‌گرهای سطحی CD45 و CD90 در سلول‌های بنیادی پالپ دندان به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور سلول‌ها در پاساژ سوم تریپسین و از کف ظروف کشت جدا شدند. پس از سانتریفیوژ و شستشوی سلول‌ها با PBS، فیکساسیون سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت نیم ساعت انجام گردید. پس از سانتریفیوژ و شستشوی مجدد با PBS، در مرحله بعدی آنتی‌بادی اولیه کونزوگه FITC که به ترتیب از شرکت Stem Cell Technology (10417) و Life Span Biotechnology (LS-C45136) تهیه شده بودند، داخل محلول بلوک‌کننده رقیق شده و به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت دو ساعت انکوباسیون انجام شد. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, FACS Calibure Germany) آنالیز گردید. اطلاعات اولیه به وسیله برنامه WinMDI2.8 پردازش و درصد سلول‌های مثبت نسبت به کل

mix, ۰/۷۵ μL از MgCl₂, ۲/۵ μL از ۱۰X PCR buffer و در حجم ۲۴ μL انجام گرفت [۱۸]. همه مواد مربوط به واکنش PCR از شرکت سینازن خریداری شدند. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر BioRAD مدل ۱۰۰T انجام شد. بعد از دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۶°C، تکثیر برای ۳۰-۳۵ سیکل انجام گرفت که هر سیکل مشتمل بر ۴۵ ثانیه در دمای ۹۶°C برای دناتوراسیون، ۴۵ ثانیه در دمای مربوط به فاز اتصال و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲°C جهت گسترش بود و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه در آخر انجام می‌شد. محصول واکنش روی ژل آگار ۱/۲٪ محتوی ۱۰ ng/ml اتیدیوم بروماید، الکتروفورز و با استفاده از دستگاه Gel Doc تصاویر تهیه گردید. جدول ۱ لیست پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

سلول‌های شمارش شده مشخص گردید. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در هیستوگرام فراهم گردید [۱۷،۴].

RT-PCR برای ژن‌های مرتبط با سلول‌های ستیغ عصبی: استخراج RNA از سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ سوم به کمک TRIZOL و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ تعیین شد. مقدار ۲ μg از RNA برای سنتز cDNA وارد واکنش ۴۰ تایی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز (ReverseAidTM First Strand cDNA Synthesis) و طبق دستورالعمل مربوطه انجام گرفت. در ادامه ۵۰ ng از DNA حاصل برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاوی یک واحد DNA پلیمرز، ۱ μL از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پسرو اختصاصی، ۰/۵ μL از dNTP

جدول ۱. لیست پرایمرها و شرایط دمایی مورد استفاده

Gene	Primer Sequence (5'→3')	AT (°C)	Length (bp)	Cycle	Accession No.
p75ngf	F:CCCCCTTCTCCACACTGCTA R:CGAACCCCAAACCTGACTCC	60	590	32	NM_002507.3
slug(snail2)	F:AGCGAACTGGACACACATAC R:TCTAGACTGGGCATCGCAG	58	410	32	NM_003068.3
sox10	F:CGATGACAAGTTCCTCCGTG R:CGCTTGTCATTTTCGTTTCA	54	260	32	NM_006941.3
GAPDH	F:CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG R:GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	50	496	30	NM_002046.5

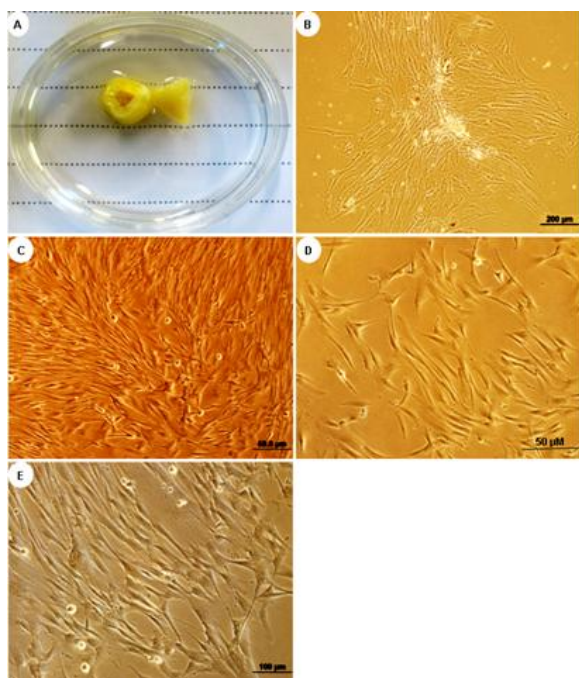
AT: Annealing temperature

اتصال نداشتند. در حالی که قطعات نسبتاً هضم شده اتصال بهتری پیدا کرده بودند (تصویر ۱B). با گذشت زمان نمادهای سلولی دوکی شکل براق و شبه فیبروبلاستی که به کف ظروف کشت متصل شده‌اند و یا از قطعات نیمه هضم شده مهاجرت کرده‌اند، زیر میکروسکوپ اینورت دیده شدند که در حال تکثیر بودند (تصویر ۱C, D). سلول‌ها به تدریج و تا آخر هفته دوم، کف فلاسک‌های T25 را پر کردند. پاساژ سلول‌های بنیادی پالپ به‌طور معمول به‌صورت ۳:۱ انجام و با تعداد اولیه ۱×۱۰^۵ در فلاسک‌های T25 پلیت می‌شدند. میزان تکثیر سلول‌های مزانشیمی پالپ دندان قابل توجه بود، به طوری که

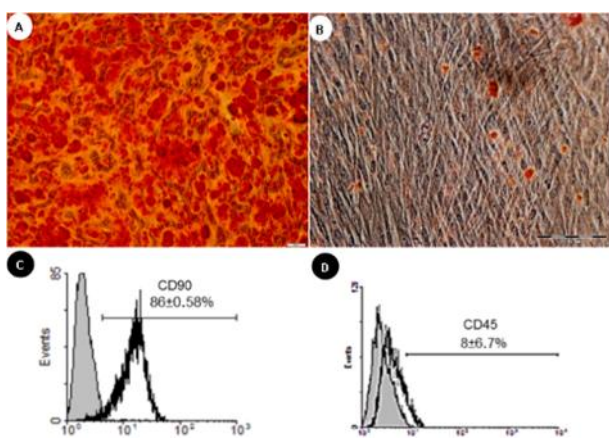
نتایج

دندان‌های جمع‌آوری شده پس از طی مراحل شستشو و ضد عفونی‌سازی، از محل کمر دندان و به‌صورت مکانیکی شکسته شدند. تصویر A۱ محل برش و نحوه نمایان شدن حفره پالپ را نشان می‌دهد. میانگین وزنی پالپ‌های جمع‌آوری شده پس از خروج از اتافک پالپ mg ۸/۶±۰/۵۵ بود. پس از هضم آنزیمی، پلیت اولیه سلول‌های حاصل در ظروف کشت اضافه و به مدت ۴-۶ روز بدون دستکاری انکوبه شدند. طی ۴۸ ساعت اول اغلب سلول‌های منفرد به‌صورت گرد و روشن دیده می‌شدند و به ظروف کشت

(DPSC) و فیبروبلاست (FBs) به روش RT-PCR نشان داده شده است. سمت راست تصویر، طول محصول بر حسب (bp) و سمت چپ اسامی ژن مورد مطالعه آورده شده است.



شکل ۱. جداسازی و کشت سلول های بنیادی پالپ دندان. نحوه شکستن دندان و نمایان شدن اتاقک پالپ در قسمت A آورده شده است. اتصال اولیه و شروع رشد سلول ها (B) پس از هضم آنزیمی بافت پالپ، تکثیر سلول ها در مراحل بعدی (C)، پاساژ سلول ها (D) و با بزرگ نمایی بیشتر در قسمت (F) نشان داده شده است.



شکل ۲. سلول های بنیادی پالپ دندان ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی را دارند. قسمت A و B به ترتیب مربوط به رنگ آمیزی Oil Red و Alizarin Red می باشد. ایجاد نودول های آهکی که با رنگ آمیزی مربوطه به رنگ قرمز دیده می شود حاکی از توان تمایز استئوژنیک می باشد. همچنین، در قسمت B ایجاد و تجمع قطرات چربی در داخل سلول ها که به رنگ قرمز دیده می شود، نشان دهنده تمایز آدیپوژنیک این سلول ها می باشد. قسمت C و D به ترتیب درصد بیان نشانگر سطح

معمولاً پس از چهار تا پنج روز تراکم سلولی به نزدیک ۱۰۰٪ می رسد. از پاساژ نهم به بعد میزان تکثیر سلولی افت قابل توجهی را نشان داد.

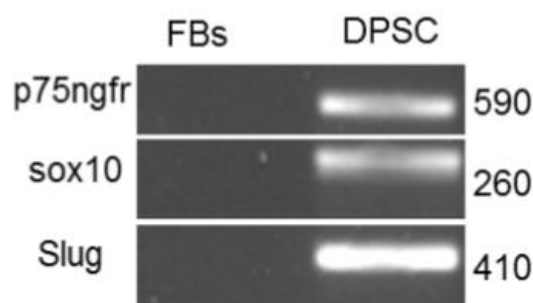
در پی کشت سلول های بنیادی پالپ در محیط تمایزی، وجود نودول های آهکی و ذرات چربی با استفاده از رنگ آمیزی های اختصاصی تایید شد (تصویر ۲ A, B). همچنین، نتایج فلوسایتومتری حاکی از وجود درصد بالایی (۸۶±۰/۵۸٪) از سلول ها با نشانگر سطحی CD90 بود، در حالی که نشانگر CD45، مربوط به سلول های هماتوپیتیک، به میزان جزئی (۸±۶/۷٪) در سلول های کشت داده شده از پالپ گزارش گردید (تصویر ۲ C, D). بررسی پروفایل بیان ژن نشان داد که این سلول ها ژن های مربوط به سلول های سستیغ عصبی را بیان می کنند (تصویر ۳ A).

تصویر ۱- جداسازی و کشت سلول های بنیادی پالپ دندان. نحوه شکستن دندان و نمایان شدن اتاقک پالپ در قسمت A آورده شده است. اتصال اولیه و شروع رشد سلول ها (B) پس از هضم آنزیمی بافت پالپ، تکثیر سلول ها در مراحل بعدی (C)، پاساژ سلول ها (D) و با بزرگ نمایی بیشتر در قسمت (F) نشان داده شده است.

تصویر ۲- سلول های بنیادی پالپ دندان ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی را دارند. قسمت A و B به ترتیب مربوط به رنگ آمیزی Oil Red و Alizarin Red می باشد. ایجاد نودول های آهکی که با رنگ آمیزی مربوطه به رنگ قرمز دیده می شود حاکی از توان تمایز استئوژنیک می باشد. همچنین، در قسمت B ایجاد و تجمع قطرات چربی در داخل سلول ها که به رنگ قرمز دیده می شود، نشان دهنده تمایز آدیپوژنیک این سلول ها می باشد. قسمت C و D به ترتیب درصد بیان نشانگر سطح سلولی CD45 و CD90 را در سلول های بنیادی پالپ دندان نشان می دهد.

تصویر ۳- سلول های بنیادی پالپ دندان ژن های مرتبط با هویت سستیغ عصبی را بیان می کنند. پروفایل بیان ژن های *sox10* و *slug*، *p75ngfr* در سلول های بنیادی پالپ دندان

سلولی CD90 و CD45 را در سلول های بنیادی پالپ دندان نشان می دهد



شکل ۳. سلول های بنیادی پالپ دندان ژن های مرتبط با هویت ستیغ عصبی را بیان می کنند. پروفایل بیان ژن های p75ngfr, slug و sox10 در سلول های بنیادی پالپ دندان (DPSC) و فیبروبلاست (FBs) به روش RT-PCR نشان داده شده است. سمت راست تصویر، طول محصول بر حسب (bp) و سمت چپ اسامی ژن مورد مطالعه آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

طبق تعریف، هدف پزشکی ترمیمی عبارت است از جایگزینی یا بازگرداندن عملکرد سلول و بافت و یا اندام های آسیب دیده به کمک سلول، مواد بیولوژیک و یا ترکیبی از این دو می باشد [۱۹]. امروزه سلول های بنیادی مزانشیمی کاربرد گسترده ای در مطالعات مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی به خود اختصاص می دهند. به ویژه آن دسته از سلول هایی که سهل الوصول بوده و با کمترین مداخله در دسترس قرار گیرد؛ حائز اهمیت بالینی بیش تری خواهند بود. در این میان بافت های دندانی مورد توجه خاص قرار گرفته است، به طوری که تا کنون شش نوع مختلف سلول بنیادی مزانشیمی از پالپ دندان و بافت های اطراف دندان گزارش شده است [۲۰-۲۲].

هر چند روش های بدون سرم برای کشت سلول های بنیادی پالپ دندان پیشنهاد شده است [۲۳]؛ لیکن دو روش معمول جهت استخراج سلول های بنیادی از پالپ دندان مورد استفاده قرار می گیرد: در روش اول پالپ به اندازه های کوچک تر برش داده و به صورت قطعات کوچک بافتی (explant) نگهداری می شود تا سلول ها به تدریج به بیرون مهاجرت کنند. در روش دوم؛ پس از هضم آنزیمی (معمولاً به کمک آنزیم های کلاژناز و دیسپاز)، سلول های حاصل کشت

داده می شود [۱۲]. در تحقیق حاضر سعی بر آن بوده تا ترکیبی از دو روش مورد استفاده قرار گیرد. یافته های تجربی ما نشان داد که عدم هضم کامل آنزیمی پالپ دندان اجازه مهاجرت سلول ها از تکه های کوچک و سست شده بافت را فراهم می سازد و در حین حال این تکه ها به اندازه کافی سنگین بودند که بتوانند اتصال سریع تر و قوی تری را در مقایسه با سلول های منفرد ایجاد کنند. بدین ترتیب از مزیت هر دو تکنیک بهره برده ایم. سلول های بنیادی حاصل نشانگر سطح سلولی CD90 را به میزان قابل توجهی بیان می کردند، در حالیکه میزان آنتی ژن CD45 محدود بود. این یافته در امتداد مقالات پیشین می باشد که تاکید بر بیان نشانگرهای سطح سلولی مثل CD90، CD73 و CD105 و عدم بیان نشانگرهای هماتوپویتیک روی سلول های بنیادی مزانشیمی دارند [۱۲، ۲۴]. هم چنین سلول های کشت داده شده توان تمایز به سلول های استخوانی و چربی را از خود نشان دادند. این یافته نیز در راستای مقالاتی است که نشان داده اند سلول های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان می توانند به انواع رده های مزانشیمی تمایز پیدا کنند. Janebodine و همکارانشان از طریق دستکاری های ژنتیکی و پیگیری سلول های ستیغ عصبی در پالپ دندان های موش سوری، وجود سلول های مزانشیمی را با منشأ سلول های ستیغ عصبی تایید کردند [۲۵]. بیان ژن های slug, p75ngfr و sox10 نشان از وجود سلول هایی با هویت ستیغ عصبی در سلول های بنیادی پالپ دندانی انسانی می باشد و با یافته های قبلی مطابقت دارد. Stevens و همکاران توانستند سلول هایی با توان ایجاد کره های چرخان را از سلول های پالپ دندان جدا کنند که علاوه بر چربی، استخوان، غضروف و عضله، می توانستند به سلول های ملانوسیتی نیز تمایز پیدا کنند. بدین ترتیب شواهدی دال بر وجود سلول های چند توانی نورال کرسی ارائه دادند [۲۶]. هم چنین، سلول های بنیادی پالپ دندان با کمک فاکتورهای نوروتروفیک مثل bFGF و EGF به سمت عصب تمایز داده شدند و با روش های معمول هم چون RT-PCR و Immunostaining؛ بیان نشانگرهای مختلف نورونی در سطح ژن و پروتئین نشان

- [10] Bitsika V, Vlahou A, Roubelakis MG. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; 8: 133-143.
- [11] Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Wislet-Gendebien S. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem Cells Translat Med* 2013; 2: 284-296.
- [12] Hilken P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, 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: 65-78.
- [13] Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, 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: 149-156.
- [14] Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi SB, Talebi A, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Intern J Dev Biol* 2011; 55: 189-195.
- [15] Murakami T, Saitoh I, Inada E, Kurosawa M, Iwase Y, Noguchi H, et al. STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells by eliminating contaminating bacteria and promoting cellular outgrowth. *Cell Med* 2013; 6: 75-81.
- [16] Kiraly M, Porcsalmy B, Pataki A, Kadar K, Jelitai M, Molnar B, et al. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neur Intern* 2009; 55: 323-332.
- [17] Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, et al. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS One* 2012; 7: e49146.
- [18] Niapour A, Karamali F, Nemati S, Taghipour Z, Mardani M, Nasr-Esfahani MH, et al. Cotransplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors and schwann cells in a rat spinal cord contusion injury model elicits a distinct neurogenesis and functional recovery. *Cell Trans* 2012; 21: 827-843.
- [19] Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 3-11.
- [20] Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazil Dent J* 2011; 22: 91-98.
- [21] Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88: 792-806.
- [22] Kim BC, Bae H, Kwon IK, Lee EJ, Park JH, Khademhosseini A, et al. Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18: 235-244.
- [23] Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PLoS One* 2012; 7: e48945.
- [24] Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaei-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Trans* 2010; 24: E23-28.
- [25] Janebodin K, Horst OV, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumar K, Pratumvinit B, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One* 2011; 6: e27526.
- [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] 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: 1787-1795.
- [28] Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 167-175.
- [29] Osathanon T, Sawangmake C, Nowwarote N, Pavasant P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis* 2014; 20: 352-328.

دادند؛ هم‌چنین به روش الکتروفیزبولوژی توانایی انتقال پتانسیل عمل در نورون‌های حاصله تأیید گردیده است [۲۷-۲۹].

در مجموع نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی پالپ دندان یک منبع قابل دسترس و بدون مسائل اخلاقی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد که قادر به تمایز به رده‌های مزودرمی می‌باشند. هر چند نیاز به مطالعه بیش‌تر ضروری به نظر می‌رسد، لیکن می‌توان قابلیت تمایز اکتودرمی سلول‌های بنیادی پالپ دندان را به زیرگروهی از سلول‌ها با ماهیت ستیغ عصبی نسبت داد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های مربوط به این مطالعه از محل اعتبار طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره ۹۲۲۳ و حمایت‌های مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تأمین گردیده است.

منابع

- [1] Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level. *J Clin Invest* 2012; 122: 3029-3034.
- [2] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213: 341-347.
- [3] Greenowand K, Clarke AR. Controlling the stemcell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. *Physiol Rev* 2012; 92: 75-99.
- [4] Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, Niapour A, Bahramian H, Nasr-Esfahani MH, et al. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1794-1802.
- [5] Galderisi U, Giordano A, Paggi MG. The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World J Stem Cells* 2010; 2: 5-12.
- [6] Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garc'ia-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Intern* 2012; 2012: 103503.
- [7] Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 2000; 127: 1671-1679.
- [8] 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 USA* 2000; 97: 13625-13630.
- [9] Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Catón J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res* 2011; 23: 275-279.

Isolation and identification of mesenchymal and neural crest characteristics of dental pulp derived stem cells

Nazila Niapour (M.Sc)¹, Zahra Taghipour (Ph.D)², Hossein Salehi (Ph.D)³, Abolfazl Bagheri (DDS)⁴, Anahita Rouhani (DDS)⁵, Mahddie Talebi (DDS)⁵, Nowrouz Najafzadeh (Ph.D)¹, Ali Niapour (Ph.D)^{*1}

1 – Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2 - Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

3 - Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4 - Dept. of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

5 - Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received: 6 Aug 2014; Accepted: 20 Dec 2014)

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSC) are considered as a unique source of adult stem cells which are usually accessible with minimum ethical concerns. MSCs can be used in stem cell biology, different to other cells, tissue engineering, regenerative medicine and future of cancer treatment researches. The aim of the present study was to isolate dental pulp derived stem cells (DPSCs), characterizing them with common techniques and determining neural crest genes expression profile.

Materials and Methods: After collecting the teeth, the pulp chamber exposed and the pulp tissue digested with collagenase IV. Dental pulp derived cells were resuspended and incubated in alpha modified minimum essential medium eagle (αMEM) supplemented with 15% fetal bovine serum at 37°C temperature, 95% humidity and 5% CO₂. The osteogenic and adipogenic differentiation potentials for dental pulp derived cells were assessed in appropriate conditions. Flow-cytometry analyses were utilized to evaluate the percentage of CD90 and CD45 positive markers within isolated cells. The expression of *p75ngfr*, *slug* and *sox10* genes was measured via RT-PCR.

Results: Dental pulp derived cells were appropriately attached to the culture vessels and showed high proliferation rate on culture medium. Cells could also differentiate to osteogenic and adipose cells; displayed by Alizarin red and Oil red staining. Higher percentage of pulp derived cells were CD90 positive, while the percentage of CD45 expression, as a marker of hematopoietic cells, was negligible. Furthermore, the RT-PCR also revealed the expression of *p75ngfr*, *slug* and *sox10* in the MSCs isolated from the dental pulps.

Conclusion: Dental pulp derived cell have the mesenchymal stem cells characteristics and at least a portion of them have neural crest origin and identity.

Keywords: Mesenchymal Stromal cells, Dental pulp, Cell differentiation, Neural Crest

* Corresponding author. Tel: +98 45 33510052(287)

a.niapour@arums.ac.ir