Original Article

Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Dental Pulp of Exfoliated Human Deciduous Teeth

N. Nourbakhsh, M.D.[1]*, A. Talebi, M.D.[2], B. Mousavi, M.D.[3], F. Nadali, Ph.D.[2], M. Torabinejad, M.D.[4], Kh. Karbalaie, M.Sc.[5], M.H. Nasr-Esfahani, Ph.D.[5,6]*, H.Baharvand, Ph.D.[6]

1. Pediatric Department, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences
2. Pathology Department, Faculty of Medical Sciences, Isfahan University
3. Endodentic Department, School of Dentistry, Torabinejad Dental Center, Isfahan University of Medical Sciences
4. Endodentic Department, Lumalinda University, U.S.A
5. Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute (Isfahan Campus), ACECR
6. Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR

** Corresponding Addresses:*
P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

P.O.Box: 8174673461, Pediatric Department, Faculty of Medical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Email: nourbakhsh@dnt.mui.ac.ir

Abstract

Received: 4/Aug/2007, Accepted: 17/Feb/2008

Objective: The exfoliated human deciduous tooth (SHED) contain multipotent stem cells that identified to be a population of highly proliferative and clonogenic .These cells are capable of differentiating into a variety of cell types including neural cells, adipocytes, and odontoblasts.

Material and Methods: Normal exfoliated human deciduous incisors collected from six- to nine-years-old children. The pulp was separated from the crown and digested with collagenase .Single cell solutions were cultivated in α-MEM supplemented with ES-FCS. After two to three days, the cells reached confluency and were trypsinized and cultured for further passages. The passage-4 cells were analyzed with CD34, CD45, CD105, CD166, CD31, CD90 and CD146 markers that indicated these cells had a mesenchymal stem cell (MSC) identity. We examined the cells for Alkaline Phosphatase activity to investigate the mesenchymal (stromal) nature.Finally, the cells were differentiated into the osteoblastic and adipocytic lineages in different subcultures and analysed by RT-PCR and different staining protocols.

Results: Viable cells growing out of the explants showed elongated shapes in clusters. These cells showed alkaline phosphatase activity. Flow cytometry results revealed high expression of pluripotent stem cell markers .In some area of the osteoinductive cultures nodule-like structures were observed that showed red mineralizing area upon staining with Alizarin Red.In adipogenic cultures lipid vesicles appeared after five weeks of induction with Oil Red.

Conclusion: This study show that pulp contains cells with high plasticity and proliferation capacity and can be easily isolated without any serious intervention.

Keywords: Stem Cells, Differentiation, Tooth pulp, Flowcytometry

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 101-108

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال از پالپ دندان‌های شیری

نصرت نوربخش .M.D[1]، اردشیر طالبی .M.D[2]، سید بهروز موسوی .M.D[3]، فاطمه نادعلی .Ph.D[2]، محمود ترابی نژاد .M.D[4]، خدیجه کربلایی .M.Sc[5]، محمد حسین نصراصفهانی .Ph.D[5,6]، حسین بهاروند .Ph.D[6]

۱. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده دندان‌پزشکی، گروه دندان‌پزشکی کودکان
۲. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی
۳. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده دندان‌پزشکی، مرکز تحقیقاتی ترابی‌نژاد، گروه درمان ریشه
۴. دانشگاه لومالیندا، دانشکده دندان پزشکی، گروه درمان ریشه
۵. پژوهشکده رویان (پایگاه تحقیقاتی اصفهان)، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی
۶. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی

آدرس نویسندگان مسئول:
تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی
پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

اصفهان، صندوق پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۶۱، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده دندان‌پزشکی، گروه دندان پزشکی کودکان
پست الکترونیک: Email: nourbakhsh@dnt.mui.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۶/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۱/۲۸

* **هدف:** جدا کردن سلول‌های بنیادی از پالپ دندان‌های شیری در حال ریزش

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی از دندان‌های ثنایای شیری کودکان سالم ۹ـ۶ ساله که به صورت طبیعی در حال ریزش بودند استفاده شد. دندان‌های ریخته بلافاصله در محلول نرمال سالین استریل حاوی آنتی‌بیوتیک قرار گرفته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پالپ دندان در شرایط کاملا استریل خارج و پس از لیز بافت با محلول ۴ میلی گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز تایپ I، سلول‌ها در محیط α-ME کشت داده شدند و با روش فلوسایتومتری بیان آنتی‌ژن‌های مختلف سطح سلولی در این سلول‌ها ارزیابی و تست آلکالین فسفاتاز نیز برای سلول‌ها انجام شد. در نهایت سلول‌ها به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز داده شدند و این تمایز به کمک تکنیک RT-PCR ارزیابی و تایید شد.

* **یافته‌ها:** باقی‌مانده پالپ دندان‌های شیری در حال ریزش حاوی جمعیتی ازسلول‌های شبه فیبروبلاست بودند. سلول‌های بنیادی به دست آمده از دندان‌های شیری در حال ریزش (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: SHED) با درجه بالایی نسبت به مارکرهای CD106, CD90, CD166 و CD146 واکنش مثبت نشان دادند و نسبت به مارکرهای CD34, CD31 و CD35 که از مارکرهای سلول‌های هموتوپوئتیک است پاسخ منفی داشتند. سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی به دست آمده بالا بود و این سلول‌ها قادر به تمایز به سلول‌های استئوسیت و ادیپوسیت بودند. علاوه بر این، فعالیت آلکالین فسفاتازی در این سلول‌ها دیده شد.

* **نتیجه‌گیری:** دندان‌های شیری می‌توانند به عنوان یک منبع قابل دسترسی بی‌نظیر و بدون مشکلات اخلاقی جهت تحقیقات کاربردی مرتبط با سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت باشند.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی، تمایز سلولی، پالپ دندان، فلوسایتومتری

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۰۸-۱۰۱

مقدمه

امروزه تحقیق بر روی سلول‌های بنیادی به دانش پیشرفته‌ای تبدیل شده است که نه تنها در حیات علمی، بلکه در مسائل سیاسی و اقتصادی کشورها نیز موثر قلمداد می‌شود (۱). سال‌هاست که این تفکر در ذهن دانشمندان شکل گرفته که با توجه به امکان تقسیم سلولی آیا می‌توان درمان را براساس این سلول‌ها بنیان نهاد. این تفکر و تحقیق به تدریج به طرف طب جدیدی سوق داده می‌شود که از آن به عنوان reparative (regenerative) medicine نام برده می‌شود (۲). پر واضح است برای رسیدن به این هدف، درک کامل بیولوژی سلولی و ماهیت سلول‌های بنیادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. خصوصا اینکه علی‌رغم تحقیقات وسیع، هنوز ابهامات متعددی پیرامون نحوه عملکرد سلول‌های بنیادی وجود دارد (۳). از طرفی دانشمندان دریافته‌اند که نسبت به آنچه که قبلا تصور می‌شد سلول‌های بنیادی در بافت‌های بیشتری وجود دارند (۳). به طور کلی سلول‌های بنیادی از سه منبع مشتق می‌شوند: ۱. سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells: ESC) ۲. سلول‌های بنیادی بالغ (Adulth stem cells) ۳. سلول‌های بنیادی مشتق از خون بندناف (Cord blood stem cells) (۱، ۳).

به دلیل محدودیت‌های ایجاد شده در مورد تحقیقات پیرامون سلول‌های بنیادی جنینی، پژوهشگران تمایل به ادامه تحقیقات خود

Archive of SID
www.SID.ir

در مورد سلول‌های بنیادی بالغ دارند. آنها سلول‌های بنیادی بالغ را از بافت‌های زیادی از قبیل خون بندناف، پوست، مغز استخوان، فولیکول‌های مو، عضلات مخطط، پالپ دندان، الیاف پریودنتال، شبکیه چشم و... به دست آورده‌اند (۶-۴). جدا کردن سلول‌های بنیادی از پالپ دندان انسان کمک زیادی به درک بیولوژی این بافت منحصر به فرد می‌کند. همان طور که می‌دانیم تاج دندان متشکل از سه قسمت مینا، عاج و پالپ است، در طی رشد و تکامل دندان آملوبلاست‌ها، مینا را تشکیل می‌دهند و ادنتوبلاست ها عاج اولیه را تولید می‌کنند. بعد از رویش دندان، آملوبلاست‌ها از سطح مینا ناپدید شده و تشکیل مینا متوقف می‌شود. برعکس، ادنتوبلاست‌ها که در سطح داخلی عاج داخل اطاقک پالپ قرار دارند به رسوب ماتریکس عاجی ادامه می‌دهند و عاج ثانویه را در سراسر عمر می‌سازند (۷). ادنتوبلاست‌ها همچنین در پاسخ به محرک‌های مختلفی از قبیل محرک‌های مکانیکی، شیمیایی، باکتریایی قادر به تشکیل عاج ترمیمی هستند (۱۱-۸). حتی زمانی که ادنتوبلاست‌ها آسیب دیده‌اند عاج ترمیمی می‌تواند در پالپ دندان تشکیل شود. تصور می‌شود منشاء عاج‌سازی ترمیمی ادنتوبلاست‌های بافت پالپ دندان است (۱۲، ۱۳). این یافته‌ها منجر به این ذهنیت شده است که سلول‌های پیش‌ساز ادنتوژنیک یا سلول‌های بنیادی ممکن است در بافت پالپ وجود داشته باشند (۱۴-۱۲).

محققان زیادی تا کنون گزارش کرده‌اند، بافت پالپ دارای سلول‌های شبه ادنتوبلاستی تکثیر شونده‌ای است که قادر به تشکیل ندول‌های معدنی شده در آزمایشگاه هستند. به نظر می‌رسد سلول‌های جدا شده از پالپ دندان ظرفیت محدودی برای تمایز به سلول‌های شبه ادنتوبلاست‌ها دارند و قادر به تمایز به سایر سلول‌ها از قبیل ادیپوسیت‌ها یا تشکیل ندول به صورت آزمایشگاهی نیستند (۱۸-۱۵). اخیرا تکللس و همکارانش تایید کردند که سلول‌های پیش‌ساز ادنتوژنیک در حال تکثیر، از عروق خونی حرکت کرده و به مناطق آسیب دیده عاجی یا پالپی مهاجرت می‌کنند (۱۹) و در مجموع این مطالعات عنوان می‌کنند که در پالپ دندان سلول‌های پیش ادنتوبلاستی وجود دارد و نهایتا پالپ دندان حاوی سلول‌های بنیادی است.

سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در میان سلول‌های تمایزیافته در یک بافت یا عضو وجود دارند، این سلول‌ها می‌توانند خودشان را تجدید کنند به عبارتی self-renewable هستند. همچنین می‌توانند به نوع خاصی از سلول‌های تخصص یافته، تمایز یابند. نقش اولیه سلول‌های بنیادی بالغ در یک موجود زنده، ترمیم بافت در موارد مورد نیاز است (۳). یکی از نکات مهم در مورد سلول‌های بنیادی بالغ این است که تعداد آنها در هر بافتی محدود است. این سلول‌ها در حالت عادی در ناحیه خاصی از هر بافت به صورت ساکت و آرام به حالت تقسیم نشده وجود دارند، در صورت بروز آسیب یا تخریب، این سلول‌ها تقسیم و تمایز می‌یابند. در واقع نقش اصلی سلول‌های بنیادی شرکت در پدیده ترمیم و بازسازی بافت است (۳). به دلیل محدود بودن سلول‌های بنیادی در هر بافت، کشت دادن این سلول‌ها با استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی و کسب تجربه در کشت سلول، کمک زیادی به موفقیت در دست‌یابی به مهندسی بافت و انواع پیوند می‌کند. یکی از اهداف مهم تحقیق پیرامون سلول‌های بنیادی یافتن منبعی قابل دسترس و راحت است (۴). گزارش‌های متعددی عنوان کرده‌اند که پالپ دندان‌های دائمی حاوی سلول‌های بنیادی هستند (۵) ولیکن تحقیق بر روی پالپ دندان‌های شیری کم بوده است. هدف از مطالعه حاضر، جداسازی سلول بنیادی از باقیمانده پالپ دندان‌های شیری است که به طور طبیعی در حال ریزش هستند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی است که در آن ضمن رعایت مسائل اخلاقی از دندان‌های ثنایای شیری در حال ریزش هشت کودک ۹-۶ ساله استفاده شد .لازم به ذکر است در دندان‌های مورد مطالعه، تحلیل کامل ریشه مشهود بود. دندان‌ها فاقد هرگونه پوسیدگی، درمان پالپ یا سابقهٔ آسیب بودند.

کودکان شرکت کننده در طرح نیز همگی سالم و بدون هیچ گونه بیماری سیستمیک بودند.

پس از شستشوی دندان در محلول PBS (Gibco 21600-051) حاوی ۱درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین (Gibco 15070-063) باقی‌مانده بافت پالپ از دندان خارج و مجددا در محلول مذکور شستشو داده شد.

به منظور کشت سلولی بافت پالپ در محلول ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز تیپ ۱ در دمای ۳۷درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک ساعت، با پیپت کردن، بافت لیز شده به صورت تک سلولی درآمده و به آن محیط کشت α-MEM (Sigma M0644) حاوی ۱۵درصد ES-FSC(Gibco 16141-079) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد. پلیت سلولی حاصله مجددا با محیط کشت مذکور مخلوط و پس از انتقال به دیش مناسب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵درصد کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌های شناور با شستشوی دیش با محلول PBS^{+} (Gibco 14287-072) از محیط حذف و به منظور تکثیر سلولی، ادامه کشت در همان شرایط انجام شد.

پس از پر شدن کف دیش، پاساژ سلولی به کمک Try/EDTA (Gibco 25300-054) انجام و نهایتا بسته به تعداد سلول حاصل از هر نمونه پاساژ سلولی انجام شد. برای انجام آزمایش‌های بعدی سلول‌های پاساژ چهارم در محیط حاوی DMSO 10% (Sigma D2650)، ESFCS 50% (Gibco 16141-07) و ۴۰ درصد محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تانک نیتروژن انتقال داده شد.

فلوسایتومتری

برای بررسی ماهیت سلول‌های استخراج شده، بیان مارکرهای سطحی CD106، CD166، CD146، CD31، CD34, CD45 و CD90 با تکنیک فلوسایتومتری ارزیابی شد. در این روش سلول‌ها در پاساژ چهار تریپسینه و پس از شمارش سلولی با PBS^{-}(Gibco 21600-051) شستشو و سپس با آنتی بادی‌های Mouse Anti Human CD34 FITC MCA 547F Serotec,Mouse Anti Human CD45 FITC MCA87F Serotec ,Mouse Anti Human CD105 RPE MCA 1557 PE Serotec,Mouse Anti Human CD166 FITC MCA 1926F Serotec,Mouse Anti Human CD31 RPE MCA1738PE Serotec,Mouse Anti Human CD90 RPE MCA90A647 Serotec,Mouse Anti Human CD146 FITC MAB 16985 Chemicon در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. نهایتا به منظور حذف آنتی‌بادی‌های اضافه سلول‌ها با محلول PBS^{-} (Gibco 21600-051) شستشو و سپس با محلول پارافرمالدئید ۱درصد فیکس شدند. نتایج با دستگاه فلوسایتومتر Partec III (دانمارک) بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی فعالیت آلکالین فسفاتازی

برای بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ، ابتدا سلول‌های مزانشیمی با تعداد ۱۰۰ سلول بر سانتی‌مترمربع در دیش‌های ۶- خانه با محیط کشت سلول‌های مزانشیمی α-MEM (Sigma M0644) حاوی ۱۵درصد ES-FSC (Gibco 16141-079) به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد و نهایتا فعالیت آلکالین فسفاتازی به کمک کیت آلکالین فسفاتاز (Sigma 85L3R) بررسی شد.

تمایز چند پتانسیلی (Multilineage Differentiation)

برای بررسی تمایز استخوانی در سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ ابتدا سلول‌های مزانشیمی با تعداد ۱۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع در دیش‌های ۶- خانه کشت داده شدند و پس از پر شدن ۸۰-۷۰ درصد از کف دیش، محیط این سلول‌ها با محیط تمایزی DMEM حاوی ۱۵درصد ES-FCS، اسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، دگزامتازون 10^{-8} مولار و ۱۰ میلی‌مولار ۶-گلیسرول فسفات تعویض شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در این محیط کشت داده شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد و نهایتا تمایز استخوانی با RT-PCR و رنگ‌آمیزی Alizarin Red در این سلول‌ها بررسی شد.

برای بررسی تمایز چربی در سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت پالپ، ابتدا سلول‌های مزانشیمی با تعداد ۱۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع در دیش‌های ۶- خانه کشت داده شدند و پس از پر شدن ۸۰-۷۰ درصد از کف دیش، محیط این سلول‌ها با محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد اسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، دگزامتازون 10^{-7} مولار و ایندومتاسین ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تعویض شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در این محیط کشت داده شدند. طی این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض و نهایتا تمایز آدیپوسیتی با RT-PCR و رنگ‌آمیزی Oil-Red در این سلول‌ها بررسی شد.

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR

از سلول‌های استخراج شده از بافت پالپ و سلول‌های تمایز یافته حاصل از این سلول‌ها استخراج RNA با استفاده ازکیت کیاژن مینی‌پرپ صورت گرفت. برای رفع آلودگی احتمالی DNA نیز، نمونه‌های استخراج شده باآنزیم DNase1 (فرمنتاز) تیمارشدند. پس از تعیین میزان RNA به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، مقدار ۲میکروگرم RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت واکنش PCR با پرایمرهای زیر برای بررسی تمایز استئوبلاستی به کمک آنزیم Smar Tag (سیناژن) انجام شد.

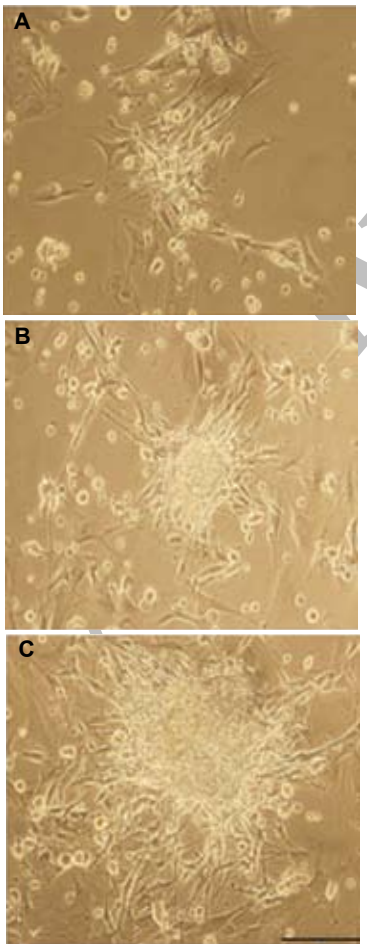
Osteocalcin (OCN;GenBank accession number NM_007541):Tm = 65˚C
Forward:5′-ACCATCTTTCTGCTCACTCTG-3′.
Reverse: 5′-GTGATACCATAGATGCGTTTGTAG-3′.
Osteopontine (OPN; accession number AF515708): Tm = 57˚C
Forward: 5′- CAGTGATTTGCTTTTGCCTGTTTG-3′.
Reverse: 5′-GGTCTCATCAGACTCATCCGAATG-3′.
Parathyroid hormone (PTH) receptor (accession number NM_011199): Tm = 55˚C
Forward: 5′-GACAAGCTGCTCAAGGAAGTTCTG-3′.
Reverse:5′-GGAATATCCCACGGTGTAGATCATG-3′.
and Bone sialoprotein:Tm = 59˚C
Forward:5'-GGC AGT AGT GAC TCA TCC GAA GAA-3´.
Reverse :5'-GGT ACT GGT GCC GTT TAT GCC TTG -3'.

و از پرایمرهای زیر نیز برای بررسی تمایز آدیپوسیتی استفاده شد.

mLPL) murine lipoprotein lipase :(Tm60 = ˚C
Forward:5′-GAGGACACTTGTCATCTCATTC-3′,
Reverse:5′-CCTTCTTATTGGTCAGACTTCC-3′
murine Adipsin : Tm = 63˚C
Forwar:5′-ATGGTATGATGTGCAGAGTGTAG-3′.
Reverse: 5′-CACACATCATGTTAATGGTGAC-3′.

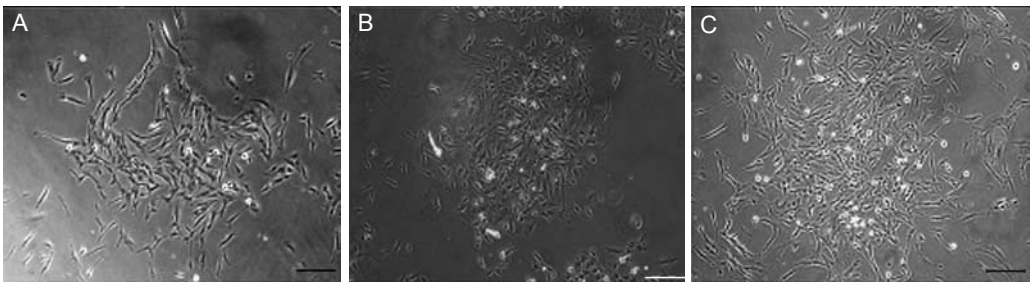
یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان دادکه اولا SHED را می‌توان به راحتی از دندان‌های شیری، بدون جراحی و آسیب به فرد به دست آورد. ثانیا تعداد سلول کم (۱۲-۲۰ سلول) استخراج شده از هر دندان ثنایای شیری توانایی تشکیل کلونی و نهایتا تکثیر سلولی به میزان بالایی را دارد. سلول‌های زنده استخراج شده از بافت پالپ یک روز پس از شروع کشت به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست، کف دیش با ظاهر فیبروبلاست مانند قابل مشاهده بودند شکل (۱). به تدریج با افزایش زمان کشت تراکم این سلول‌ها افزایش یافت شکل (۲).

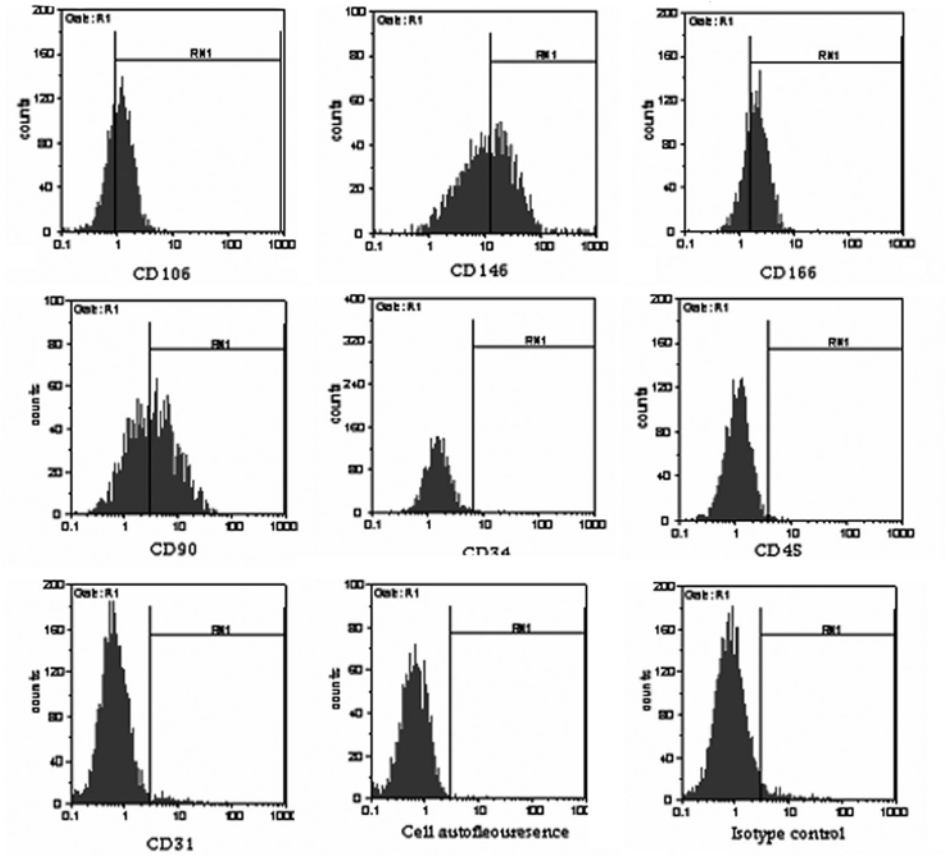


شکل ۱: سلول‌های استخراج شده از بافت پالپ یک روز پس از کشت (A)، دو روز پس از کشت (B) و سه روز پس از کشت (C).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: تراکم سلول‌های SHED در اولین روز پاساژ اول (A)، در دومین روز پاساژ اول (B) و در چهارمین روز پاساژ اول (C).



شکل ۳: ارزیابی بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی استخراج شده از پالپ دندان‌های شیری به کمک فلوسایتومتری

فلوسایتومتری

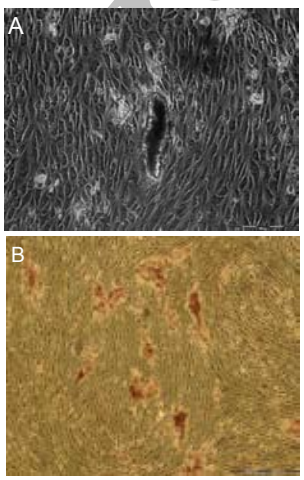
نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد میزان بیان مارکرهای هماتوپئتیک CD45, CD34 به ترتیب ۰/۶درصد و۰/۴درصد، میزان بیان مارکرهای اندوتلیالی CD106،CD166، CD146 و CD31 به ترتیب ۶۷، ۷۱، ۴۸ و ۲ درصد و میزان بیان مارکر سلول‌های بنیادی پرتوان CD90 ۵۴ درصد است (شکل ۳).

ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتازی

در اثر فعالیت فسفاتازی، نفتول AS-MX آزاد شده از سلول‌ها با نمک دیازونیم ترکیب و بلورهای رنگی قابل مشاهده نامحلول در جایگاه‌هایی که فعالیت فسفاتازی وجودداشته، تشکیل داده است.

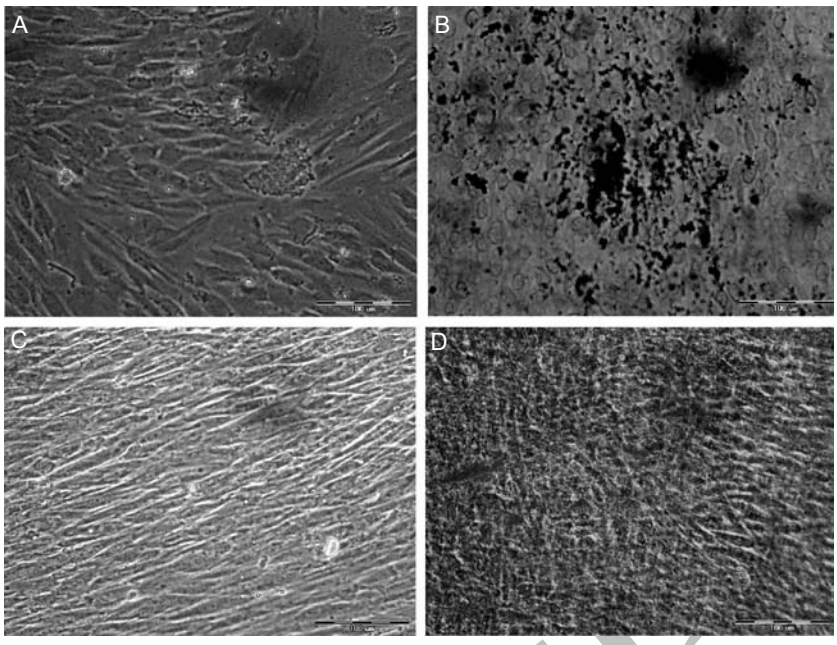
تمایز چند پتانسیلی (Multilineage Differentiation)

ندول‌های آهکی و قطرات حاوی ذرات چربی به ترتیب پس از سه هفته کشت SHED در محیط القا کننده تمایز استئوبلاستی و آدیپوسیتی تشکیل می‌شوند.



شکل ۴: تجمعات یا ندول‌های بیانگر فعالیت آلکالین فسفاتازی در سلول‌های SHED قبل ازرنگ‌آمیزی (A) و بعد از رنگ‌آمیزی (B).

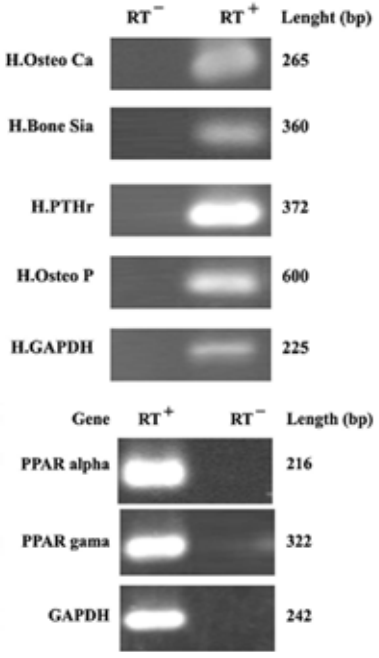
www.SID.ir



شکل ۵: تمایز استخوانی SHED، سلول های معدنی شده قبل از رنگ آمیزی (A) و پس از رنگ آمیزی با Alizarin red (B). تمایز چربی SHED، قبل از رنگ آمیزی (C) و پس از رنگ آمیزی Oil Red (D).
(مشاهده نمونه رنگی تصاویر B و D در انتهای مقالات)

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR

همان‌طور که نتایج RT-PCR نشان می‌دهد بیان مارکرهای آدیپوسیتی و استئوسیتی پس از ۳ هفته کشت سلول‌های استخراج شده از پالپ در محیط‌های القاکننده مناسب دیده شده است شکل (۶).



شکل ۶: بیان مارکرهای استئوبلاستی و آدیپوسیتی در سلول‌ها قبل و بعد از تمایز

بحث

در حال حاضر دندانپزشکی اساسا بر پایه درمان‌های غیرسلولی استوار است که در آنها عمدتا از مواد بادوامی خارج از سیستم بدن استفاده می‌شود. آمالگام، انواع کامپوزیت‌ها، ایمپلنت‌های فلزی، مواد سنتتیک و پیوندهای بافتی از انتخاب‌های اصلی برای ترمیم دندان و ساختمان‌های کرانیوفاشیال و دهان است. علی‌رغم کسب نتایج نسبتا موفق بالینی در مصرف مواد رایج، محدودیت‌های ذاتی از قبیل رد پیوند، انتقال پاتوژن‌ها از دهنده و ناتوانی مواد در دوباره‌سازی بافت‌ها و ارگان‌ها وجود دارد و برای حل این مشکلات جراحان عمومی ترجیح می‌دهند که از پیوندهای اتولوگ از قبیل پیوندهای استخوانی استفاده کنند. در این راستا به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های بنیادی اتولوگ احتمالا یک آلترناتیو برای درمان‌های رایج باشد (۲۰).

در مهندسی بافت با تکیه بر این موضوع که سلول‌های بنیادی مزانشیمال توانایی ایجاد کلیه ساختمان‌های کرانیو فاشیال را دارند از داربست‌های بیومتریک موقت برای تجمع رشد سلولی و ایجاد بافت استفاده می‌شود. داربست‌ها، پایه اصلی ساختمان را به طور موقت برای سلول‌ها فراهم می‌کنند تا ماتریکس‌های خارج سلولی و سایر اجزای فانکشنال در ابعاد و اشکال مورد نظر ساخته شوند (۲۱). مطالعات قبلی نشان داده که دندان‌های شیری می‌توانند به عنوان یک منبع قابل دسترسی برای مهندسی بافت‌های سخت در نظر گرفته شوند (۲۲).

در مطالعه حاضر شواهدی ارائه شده که نشان می‌دهد سلول‌های پالپ دندان‌های شیری ریخته، قادر به تکثیر تا حداقل ۲۶ پاساژ در محیط آزمایشگاهی هستند. در بررسی مارکرهای سطحی این سلول‌ها با تکنیک فلوسایتومتری مشخص شد این سلول‌ها فاقد آنتی‌ژن‌های مربوط به سلول‌های هموتوپوئتیک (CD31 و CD34) هستند و از طرفی بیان آنتی‌ژن CD90 در این سلول‌ها به میزان بالایی دیده شده است (۲۳، ۲۴). لذا سلول‌های استخراج شده سلول‌هایی پرتوانند.

مطالعات قبلی ارائه شده توسط میورا و همکاران مشخص کرده است که سلول‌های استخراج شده از پالپ دندان‌های شیری مارکر اولیه سلول‌های مزانشیمی CD146 و STRO را بیان می‌کنند و با توجه به اینکه در نتایج ایمنوهیستوشیمی، سلول‌های CD146 و STRO مثبت در حاشیه رگ‌های خونی دیده شدند احتمالا سلول‌های استخراج شده از ریزمحیط دور عروقی منشا گرفته‌اند (۴). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد این

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌ها علاوه بر مارکرهای اندوتلیالی مذکور مارکرهای اندوتلیالی دیگر نظیرCD106 و CD166 را هم بیان می‌کنند که این شواهد نیز موید نظرات قبلی در زمینه منشاء این سلول‌ها است.

بنابراین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دندان‌های شیری یک منبع قابل دسترسی و بی‌نظیر برای جداسازی سلول‌های بنیادی به شمار می‌آیند. آزمایش‌های قبلی نیز نشان داده است که بافت پالپ دندان‌ها حاوی جمعیتی از سلول‌هایی هستند که توانایی تمایز به سلول‌های ادونتوبلاستی و چربی را دارند (۴).

دندان‌های شیری اختلاف بارزی با دندان‌های دائمی از حیث روند تکاملی، ساختار بافتی و عملکرد دارند. لذا یافتن این موضوع که SHED متفاوت از DPSCs است چندان دور از ذهن نیست. SHED قدرت تکثیر بالاتری نسبت به DPSCS دارد (۴). در این مطالعه همچنین نشان داده شد که در سلول‌های استخراج شده فعالیت آلکالین فسفاتازی وجود دارد چرا که تحت تاثیر اسید آسکوربیک، دگزامتازون و گلیسرول فسفات ندول های آهکی تشکیل شده که با رنگ‌آمیزی Alizarin red قابل مشاهده بود. همچنین در محیط حاوی اسکوربیک‌اسید ۲- فسفات، دگزامتازون و ایندومتاسین، ذرات چربی در آنها نمایان شد که با رنگ‌آمیزی Oil-red-O مشخص گردید. با آنالیز RT-PCR نیز بیان مارکرهای استئوسیتی و آدیپوسیتی تائید شد. در نتیجه این سلول‌ها دارای Plasticity و به عبارتی پتانسیل تمایز به بافت‌های مختلف نظیر استخوان و چربی را دارند. با توجه به این نکته که اگرچه در پالپ دندان سلول‌های مختلفی وجود دارد ولی در حالت نرمال، فاقد سلول‌های چربی است (۲۵).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد SHED مارکرهای سلولی عصبی و گلیال را بیان می‌کند که احتمالا مرتبط با منشاء تیغه عصبی است (۴). سلول‌های تیغه عصبی نقش حیاتی در تکامل دندان دارد و منجر به تکامل انواع مختلفی از سلول‌ها از قبیل سلول‌های عصبی، سلول‌های ایجاد کننده رنگ‌دانه، عضلات صاف، غضروف کرانیوفاشیال و استخوان می‌شود (۲۶، ۲۷). بنابراین دندان‌های شیری می‌توانند یک منبع ایده‌آل سلول بنیادی جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده دندانی باشند. همچنین می‌توانند در بازسازی استخوان و درمان آسیب‌های عصبی یا بیماری‌های دژنراتیو موثر باشند (۴، ۲۸). به هرحال اهمیت بیولوژیک وجود SHED باید با انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه تعیین شود.

تقدیر و تشکر

به موجب طرح تصویبی شماره۱۸۵۶، این تحقیق در پژوهشکده رویان پایگاه تحقیقاتی اصفهان انجام شد. هزینه‌های مربوط به این تحقیق نیز توسط دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات دکتر پرفسور ترابی نژاد پرداخت شد. لذا از کلیه مسئولین دو مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Audrey R, Mark S, Michele S. Stem cell reserch and applications. American Association for the Advancement of science and instituite for civil socity, November 1999
2. Herriek SE, Mutsaers SE. The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine applications. Int J Artiforgans, Jun 2007; 30(6): 527-40
3. Turksen K. Embryonic stem cells. Published by Human Press, Totowa, New Jersey. 2002
4. Masako Miuram, Gronthos S, Mingrui Z, Bai Lu, Harry W, Pamela Gehron R, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, PNAS, 2003 May, 100(10); 5807-5812
5. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stemcells. J Dent Res, Aug 2002; 81 (8): 531-535
6. Gay I, Chen S, Macdougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal Ligament stem cells. Orthod Craniofac Res . Aug 2007; 10(3):149-160
7. Baume LJ. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey, Monogr Oral Sci, 1980; 8: 1-220
8. Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: Factors affecting its deposition Quintessence Int, 1992; 23: 257-270
9. Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Terashita M. Temporal and spatial expression of C-jun and Jun-B protooncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. J Dent Res, 1999; 78: 673-680
10. Smith AJ, Toblas RS, Cassidy N, Plant CG, Brown RM, Begue-Kirn C, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. Arch Oral Biol, 1994; 39: 13-22
11. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Brown RM, Lesot H, Ruch JV. In vivo morphogentic activity of dentine matrix proteins. J Biol Buccale, 1990; 18: 123-129
12. Sveen OB, Hawes RR. Differentiation new odantoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. Arch Oral Biol, 1968; 13: 1399-1409
13. Ruch JV. Odontoblanst commitment and differentiation Biochem cell Bial. 1998; 76: 923-938
14. Butter WT, Ritchie HH, Bronkers AL. Extracellular matrix proteins of dentine. Ciba Found Symp, 1997; 205: 107-115
15. Buurma B, Gu K, Rutherford RB. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffols Eur J Oral Sci, 1999; 107: 282-289
16. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat Mabillan B, Boudeulle M, Mayloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. Calcif Tissue Int 2000; 66: 129-138
17. KUO MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Haha LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. Arch Oral Biol, 1992; 37: 945-952
18. Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphates, and calcification in cultures of human pulp cells. Deu Biol, 1990; 170: 457-466

Archive of SID

www.SID.ir

19. Tecles O, Laurent P, Zygovritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor stem cells in response to odontoblast injury. Arch Oral Biol, 2005; 50: 103-108
20. Murry PE, Garcia FG, Harqeavey KM. Regenarative Endodontic: A review of currfent status and a call for action. JOE, 2007; 33(4): 377-391
21. Mao JJ, Glannobil WV, Helms JA, Hollister SJ, Kerbsbach PH, Lonqaker MT, et al. Craniofacial Tissue engineering by stem cells. J Dent Res, Nov 2006; 85(11): 960-979
22. Lainv G, GraZiano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiantes S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard tissue engineering, J cell physical, 2006; 206(3): 693-701
23. Ribatti D, Nico B, Mazia C, Lonqo V, Murtas D, Manqieri D, et al. Neo vascularization and mast cells with tryptase activity increase simnotaneously in human Pterygium. J cell Mol Med, May-Jun, 2007; 11(3): 585-589
24. Dominici M, Le Blank K, Mueller I, Slaper Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mescenchymal stromal cells . the international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-317
25. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells . Methods Enzymol , 2004; 419: 99-113
26. Teng L, Labasky PA. Neural Crest Stem Cells. Adv Exp Med Biol. 2006; 589: 206-212
27. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi PereiralV, Caplan AI, et al. Isolation and characterizations of a population of immature dental pulp stem cells expressing Oct-4 and other embryonic stem cells markers.cells tissues organs,2006; 184(3-4): 105-116
28. Guizzardi S, Galli C, Govonil P, Boratto R, Cttarini G, Martini D, Belletti S, Scandroglio R. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) Promotes human osteoblast proliferation: A new proposal for bone tissue repair. Life Sci, 2003; 73(5): 1973-1983

Archive of SID

www.SID.ir