Archive of SID

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ۳۵-۲۹

بررسی امکان استحصال سلول‌های بنیادی از بافت نرم دهان و مقایسهٔ آن با سلول‌های بنیادی مغز استخوان (یک مطالعهٔ آزمایشگاهی)

دکتر پرویز ترک‌زبان*، دکتر آنا صفاپور*، دکتر محسن بیدگلی**

چکیده

سابقه و هدف: *در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی جهت بازسازی بافت‌های از دست رفته بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون شایع‌ترین منبع مورد استفاده مغز استخوان بوده است. اما اخیراً سایر بافت‌ها نیز مورد توجه قرارگرفته‌اند و امکان استخراج سلول‌های بنیادی از این بافت‌ها و نیز ویژگی‌های این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هدف از انجام این مطالعه بررسی امکان به دست آوردن سلول‌های بنیادی از بافت نرم دهانی و بررسی ویژگی‌های این سلول‌ها بود.*

مواد و روشها: *در مطالعهٔ تجربی حاضر، نمونه‌گیری از مغز استخوان و بافت همبند دهانی سگ، تحت بیهوشی عمومی انجام شد. در آزمایشگاه، طبق پروتکل پیشنهاد شده در مطالعات پیشین، سلول‌های بنیادی از مغز استخوان سگ جدا شدند و برای به دست آوردن سلول‌های بافت همبند نیز تغییراتی جزئی در همان پروتکل ایجاد شد. سپس سلول‌های به دست آمده از دو بافت، از نظر ویژگی‌های خود با هم مقایسه شدند.*

یافته‌ها: *سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان و بافت همبند، نمای مورفولوژیک مشابهی داشتند. از نظر ویژگی کلونی‌سازی نیز کمابیش مشابه بودند. اگرچه سلول‌های بافت همبند تعداد کلونی بیشتری تشکیل داده بودند. سرعت دو برابر شدن جمعیت سلولی نیز در دو نوع سلول بررسی شده نسبتاً مشابه بود و هر دو نوع سلول در محیط تمایزی به استئوبلاست تمایز یافتند.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های به دست آمده از بافت همبند دهانی در این مطالعه دارای ویژگی‌های خاص سلول‌های بنیادی بودند. از جمله خصوصیات مورفولوژیک، ویژگی خود تجدید شوندگی، سرعت بالای تکثیر، قدرت تمایز.*

کلید واژگان: *بافت همبند دهان، سلول‌های بنیادی، جداسازی*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۴/۲۳ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۹/۱۱/۹ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۲۰

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ۳۵-۲۹

مقدمه

سلول‌های بنیادی (stem cells) که دارای قابلیت رشد بالایی بوده، پتانسیل‌های تمایزی بالقوه و بالفعل فراوانی دارند. یکی از موضوعات به روز علوم زیستی و پزشکی هستند. به لحاظ کاربرد وسیع سلول‌های بنیادی در مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، طب پیوند، تحقیق و توسعه داروسازی، مطالعات ژنتیکی و تولید موجودات با خصوصیات تغییر یافته ژنتیکی، لازم است اطلاعات خود را درباره این سلول‌ها افزایش داده، جداسازی و تخلیص سلول‌ها با دقت بیشتری انجام گیرد.

سلول‌های بنیادی اولین بار با دو ویژگی عمده تعریف شده‌اند: خودتجدیدی (تولید سلول‌های بنیادی دختر با پتانسیل‌های مشخص) و توانائی تمایز به یک و یا چندین رده(۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) که پتانسیل تمایز به کندروسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، استرومای مغز استخوان و بافت‌های دیگر با منشأ مزانشیمی را دارند، در بافت‌های متعددی در سراسر بدن موجود زنده مستقر شده، توانایی تولید انواع سلول خاص برای این بافت‌ها را دارند. مثال‌هایی از این بافت‌ها شامل بافت چربی، پریوستئوم، پرده یا غشای سینوویال، عضله، درم، پری‌سیت‌ها، خون و مغز استخوان می‌باشد (۲،۳).

هدف از انجام این مطالعه، به دست آوردن سلول‌های بنیادی

*استادیار گروه پریودانتیکس، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان.

**نویسنده مسئول: دستیار تخصصی گروه پریودانتیکس، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. E-mail: bidgoli@umsha.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

به روشی آسان‌تر بود. روشی که نیاز به از دست رفتن بافت مورد نظر یا وارد آمدن تروما و ایجاد مشکلات خاص نداشته باشد. به همین دلیل، استفاده از بافت نرم دهانی که اولاً در همه افراد امکان دستیابی به آن وجود دارد و ثانیاً ترمیم ناحیهٔ جراحی با مشکلات بسیار کمتری همراه است و ثالثاً حاوی عروق خونی فراوان است (با عنایت به اینکه سلول‌های بنیادی اغلب در اطراف عروق حضور دارند) مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روشها

در مطالعهٔ تجربی حاضر، به منظور استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان و بافت نرم، در این مطالعه از نمونه حیوانی استفاده شد. نمونه مورد نظر سگ بالغ و سالم بود که تحت بیهوشی عمومی، نمونه‌برداری از مغز استخوان و بافت نرم دهانی (به ابعاد ۴×۵ میلی‌متر از بافت همبند subepithelial کام در ناحیه مولرها، دقیقاً شبیه گرفت‌های معمول) انجام شد.

ابتدا نمونه مغز استخوان با حجم ۱۰ میلی‌لیتر از کرست ایلیاک حیوان تهیه شد. این نمونه با همان حجم از محلول PBS رقیق گردید. سپس، نمونه رقیق شده روی فایکل برده شده، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفوژ شد. در مرحله بعد، لایه سلول‌های تک هسته‌ای از روی فایکل جمع‌آوری شده، با محلول PBS شستشو داده شدند. به این سلول‌های تک‌هسته‌ای، محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰٪ اضافه و سوسپانسیون سلولی تولید شده به داخل فلاسک ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های غیرچسبنده حذف شده، به سلول‌های چسبنده، محیط کشت جدید اضافه گردید و پس از آن هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد.

سپس، بافت نرم به قطعات کوچکی تبدیل شد. پس از افزودن آنزیم کلاژناز I، بافت به مدت ۴۵ دقیقه در داخل انکوباتور یا دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس، سلول‌ها با PBS شسته شده، محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰٪ به آن اضافه شد. سوسپانسیون سلولی به داخل فلاسک کشت ریخته شده، پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های غیر چسبنده حذف و به سلول‌های چسبنده، محیط کشت جدید اضافه گردید. سپس، هر سه روز یکبار محیط کشت تعویض شد.

پس از اینکه سلول‌های چسبنده ۸۰–۹۰ درصد سطح دیش را پوشاندند، دو بار با PBS شستشو داده شدند و با استفاده از محلول Trypsin-EDTA ۲۵ درصد از سطح کشت جدا شده، در محیط فلاسک‌های پلی استیرن کشت داده شدند. سلول‌ها تکثیر شدند تا زمانی که محیطی اشباع از سلول که رشد آنها متوقف شده بود، ایجاد گردید.

پس از پاساژ، سرعت تکثیر سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان و بافت نرم دهانی، با محاسبه زمان لازم برای دو برابر شدن جمعیت سلول‌ها (population doubling time) بررسی شد.

به منظور تمایز استئوژنیک، سلول‌ها در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد ، 10^{-7} مول دگزامتازون، ۱۰ میلی‌مول بتاگلیسرو فسفات و ۵۰μg/ml اسکوربیک اسید بی‌فسفات قرار داده شدند و پس از ۲۱ روز رنگ‌آمیزی Alizarin Red انجام شده، تمایز به استئوبلاست مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تمایز به آدیپوسیت، سلول‌ها در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد، ۰/۵ میلی‌مول IBMX ، 10^{-7} مول دگزامتازون، ۶۰ نانومول انسولین و ۰/۲ میلی‌مول ایندومتاسین قرار گرفتند و پس از ۳۱ روز، با استفاده از رنگ‌آمیزی oil red تمایز سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی کلونی‌های سلولی تشکیل شده، ۱۰۰ عدد سلول در پتری دیش ۱۰ سانتی‌متری ریخته شده، محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد به آن افزوده شد. محیط کشت هر سه روز یک بار تعویض شده، پس از ۱۴ روز کلونی‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. سپس تعداد کلونی‌ها شمارش شد (این تست برای هر دو گروه سلول‌ها، ۳ بار تکرار شد.)

۵ روز پس از آغاز تمایز استئوژنیک بررسی ژن‌های GAPDH، TBP، ALP، Osteocalcim توسط RT-PCR بر روی سلول‌ها انجام شد. مراحل کار شامل آماده‌سازی RNA، نشر DNA و سپس RT-PCR بود. جزئیات دماها، زمان‌ها و تعداد سیکل‌های واکنش real- time PCR انجام شده در جدول ۱ آمده است.

یافته‌ها

در این مطالعه جمعیتی از سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی از بافت مغز استخوان و بافت نرم دهان سگ به دست آمد. هر دو گروه این سلول‌ها ظاهری مشابه داشتند. بدین صورت که دوکی‌شکل و چسبنده بوده، نمایی شبیه فیبروبلاست داشته، به کف پلیت چسبیده بودند. شکل ۱ این سلول‌ها را پس از پاساژ دوم نشان می‌دهد.

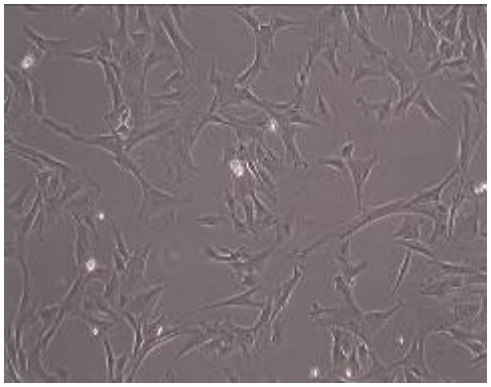
www.SID.ir

Archive of SID

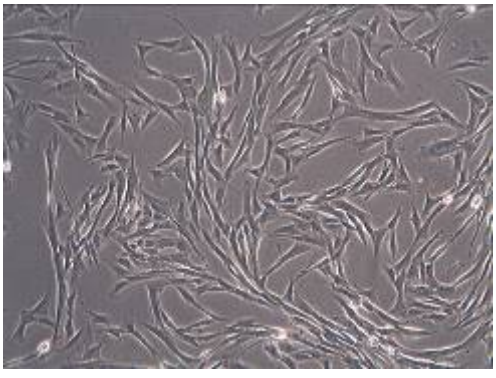
رنگ‌آمیزی Alizarin Red که در روز ۲۱ انجام شد، حضور رسوبات کلسیفیه در محیط‌های کشت هر دو نوع سلول که نشان‌دهنده تمایز سلول‌ها به استئوبلاست می‌باشد را نشان داد. شکل ۲ رسوبات مشاهده شده در ساختارهای ندول‌های استخوانی که با Alizarin Red رنگ‌آمیزی شده‌اند، را نشان می‌دهد.

جدول ۱- دماها، زمان‌ها و تعداد سیکل‌های واکنش real – time PCR

عمل	سیکل	زمان	دما	تعداد
Initial denaturation	۱	۳ دقیقه	۹۴°c	۱
Cycle denaturation		۳۰ ثانیه	۹۴°c	
Primer annealing	۳۵°	۴۵ ثانیه	۶۰°c	۲
Extention		۴۵ ثانیه	۷۲°c	
Substrate clearance	۱	۷ دقیقه	۷۲°c	۳



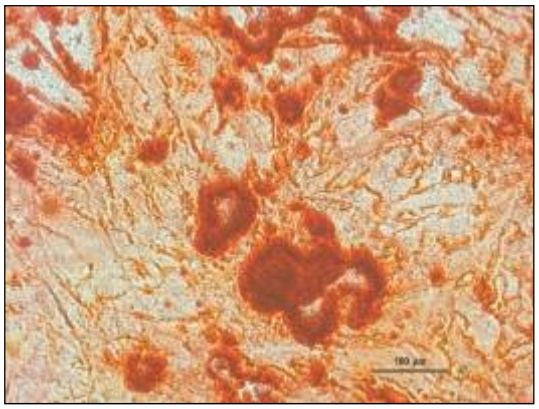
a



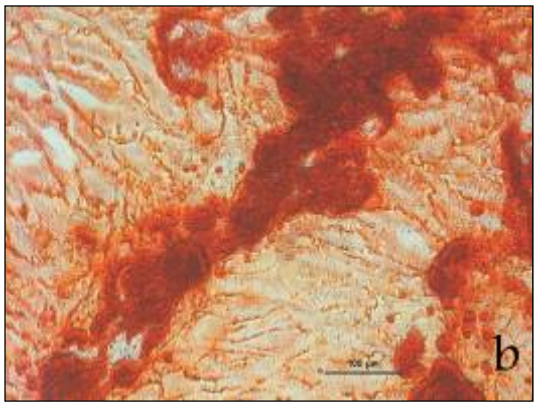
b

شکل ۱- سلول‌ها پس از پاساژ دوم a: سلول‌های مغز استخوان b: سلول‌های بافت همبند

به منظور بررسی تمایز سلول‌ها به آدیپوسیت، در روز ۳۱ رنگ‌آمیزی با Oil Red انجام شد. نتایج به دست آمده از این رنگ‌آمیزی در هر دو گروه سلول‌ها، منفی بوده، هیچگونه سلول تمایز یافته‌ای مشاهده نشد.



a



b

شکل ۲- رسوبات مشاهده شده در ساختارهای ندول‌های استخوانی که با Alizarin Red رنگ‌آمیزی شده‌اند a: محیط کشت سلول‌های مغز استخوان b: محیط کشت سلول‌های بافت نرم

نتایج رنگ‌آمیزی کلونی‌ها با هماتوکسیلین و سپس شمارش آنها نشان داد که متوسط تعداد کلونی‌ها، نسبت به سطح پلیت در گروه سلول‌های بافت نرم ۳۶٪ و در گروه سلول‌های مغز استخوان ۲۹٪ بود. بدین معنا که کلونی‌های سلول‌های بافت نرم در حد کلونی‌های مغز استخوان و حتی بیشتر ار آن، سطح پلیت را پوشانده بودند.

نتایج تست زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) که با محاسبهٔ زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی، به بررسی میزان تکثیر سلول‌ها می‌پردازد نشان می‌داد که سرعت تکثیر سلول‌های مغز استخوان بیشتر از سلول‌های بافت است. زمان محاسبه شده برای دو برابر شدن سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

بافت نرم ۳۰ ساعت و سلول‌های مغز استخوان ۲۴ ساعت بود.

نتایج بررسی ژن‌های GAPDH، TBP، osteocolcin و ALP در سلول‌های مغز استخوان و بافت نرم تمایز داده شده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. TBP, GAPDH ژن‌هایی هستند که در همه سلول‌ها حضور دارند و نتایج مثبت حضور آنها، تأییدی بر صحت نتایج به دست آمده است.

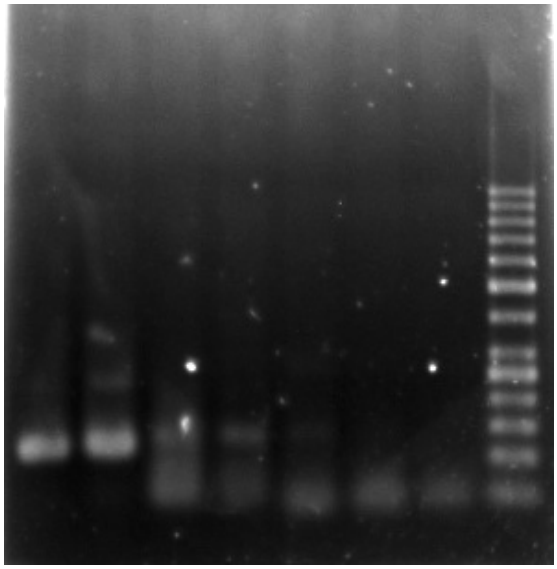
شکل ۳ تصاویر PCR انجام شده می‌باشند که نشان می‌دهند ژن استئوکلسین در سلول‌های مشتق از مغز استخوان موجود بوده ولی سلول‌های به دست آمده از بافت نرم فاقد آن می‌باشند. در ضمن، ژن آلکالین فسفاتاز در هر دو نوع از سلول‌ها موجود بود، اگرچه در سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان به میزان بیشتری حضور داشت.

جدول ۲- نتایج بررسی ژن‌هایALP, osteocalcin, TBP و GAPDH در سلول‌های مغز استخوان و بافت همبند دهان

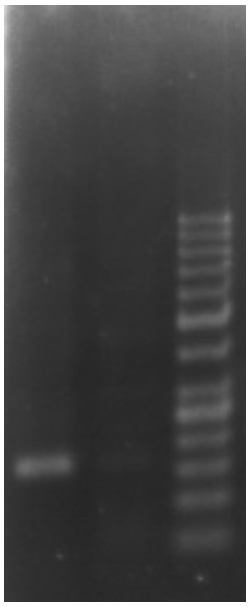
	PRIMER	B.M	S.T	SIZE
OD	Total RNA	۶۵/۱	۶۹/۲	µg/µl
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۸۱	۱/۸۲	
	۲۶۰	۱/۶۲۸	۱/۷۳۰	
۱	D.GAPDH	++	++	۱۱۳
۲	D.TBP	+	+	۱۰۹
۳	D.Osteocalcin	+	-	۱۳۵
۴	D.ALP	++	+	۱۶۲

بحث

امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی جهت بازسازی بافت‌های از دست رفته بسیار مورد توجه می‌باشد. به همین دلیل، اخیراً مطالعات متعددی انجام شده‌اند که هدف آنها استخراج سلول‌های بنیادی از بافت‌های دهانی و استفاده از این سلول‌ها در بازسازی بافت‌های دهانی از دست رفته بوده است. نتایج به دست آمده از این مطالعات نشان داد که امکان استخراج سلول‌های بنیادی از بافت‌های دهانی مانند پالپ دندان شیری و دائمی، پریودنتال لیگامنت دندان‌ها و فولیکول دندان‌های نهفته وجود دارد(۸-۴). در ضمن، سلول‌های به دست آمده از این بافت‌ها و نیز سایر بافت‌ها (که معمول‌ترین آنها مغز استخوان می‌باشد) در بازسازی دیفکت‌های استخوانی مختلف، و در جراحی‌هایی مانند سینوس (به کمک تشکیل استخوان با این سلول‌ها) مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۹).



a



b

شکل ۳- a: نتایج Real Time-PCR برای ژن‌های GAPDH، TBP و Osteocalcin. b: نتایج Real Time-PCR برای ژن ALP

هدف از انجام این مطالعه، به دست آوردن سلول‌های بنیادی به روشی آسان بود. روشی که در آن نیازی به از دست رفتن بافت مورد نظر یا وارد آمدن تروما و ایجاد مشکلات خاص نباشد. از آنجا که استخراج سلول‌های بنیادی از منابع دندانی ذکر شده، مستلزم کشیدن دندان‌هاست و با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

اینکه امکان کشیدن دندان‌های سالم در افراد وجود ندارد و دندان‌های نهفته نیز ممکن است در همه وجود نداشته باشند، همچنین، به علت اینکه مراحل استخراج سلول‌ها از بافت مغز استخوان همواره با مشکلات بسیاری از جمله درد و ناراحتی شدید بیمار همراه می‌باشد، استفاده از بافت نرم دهانی مورد توجه قرار گرفت. امکان دستیابی به آن در همهٔ افراد، همچنین، مشکلات کمتر هنگام ترمیم ناحیهٔ جراحی و وجود عروق خونی فراوان و حضور سلول‌های بنیادی در اطراف این عروق از مزایای بافت نرم دهانی می‌باشند.

با توجه به این نکات تصمیم بر آن شد تا بافت همبند کام حیوان (همان ناحیه که در جراحی‌های گرفت لثه نیز به عنوان ناحیه donor استفاده می‌شود) جهت استخراج سلول بنیادی مورد بررسی قرار گیرد.

مراحل مختلف کشت سلولی عبارتند از: شستشو، قطعه قطعه کردن بافت و جداسازی سلول‌های آن و یا همان dissection و digestion که با استفاده از آنزیم‌ها و یا به صورت مکانیکی صورت می‌گیرد)، جداسازی سلول‌های مورد نظر بر اساس گرادیان تراکمی، شستشو و کشت در پلیت‌های پلاستیکی و در محیط و دمای مناسب. جهت دستیابی به سلول‌های بافت‌های مختلف تغییر جزئی در این مراحل لازم است.

در حال حاضر با ایجاد تغییرات ذکر شده، پروتکل‌های متفاوتی برای استخراج سلول‌های بنیادی از مناطق مختلف بدن انسان و حیوان مطرح شده‌اند. اما تاکنون مطالعه‌ای بر روی جداسازی سلول‌ها از بافت همبند دهانی انجام نشده است. به همین علت، مطالعهٔ حاضر روی حیوان صورت پذیرفته و با روش آزمون و خطا و با ایجاد تغییراتی در پروتکل‌های موجود، روش صحیح جداسازی سلول از این بافت بدست آمد.

در مطالعه Lindolfo و همکاران (۲۰۰۶)، اثر پروتکل مورد استفاده در کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش در توانایی کشت سلول‌های بنیادی از سایر بافت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. آنها نتیجه‌گیری نمودند که با ایجاد تغییرات بسیار جزئی در روش مورد استفاده جهت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان، می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمال را از سایر بافت‌ها نیز به دست آورد. در واقع مسئله‌ای که در حین انجام این مطالعه روشن شد این بود که سلول‌های بنیادی مزانشیمال در تمامی بافت‌ها و ارگان‌ها (بدون توجه به منشا جنینی آنها) حضور داشتند. سلول‌های به دست آمده خصوصیات مورفولوژیک مشابهی داشتند، از نظر مارکرهای سطحی نیز تا حد زیادی مشابه بودند اما توانایی متفاوتی در تمایز به انواع مختلف بافت‌ها داشتند(۱۰).

سلول‌های بدست آمده در اثر پروتکل اجرایی، نمایی فیبروبلاست مانند داشتند، که مشابه سلول‌های بنیادی استخراج شده، از مغز استخوان بوده و همانند آنها به کف پلیت چسبیده بودند. به منظور اطمینان از بنیادی بودن این سلول‌ها، نسبت به مقایسه برخی از ویژگی‌هایی آنها با سلول‌های بنیادی مغز استخوان اقدام شد.

همانطور که قبلاً هم در قسمت مقدمه ذکر گردید، یکی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های بنیادی خاصیت خود تجدید شوندگی این سلول‌ها است. بدین معنا که این سلول‌ها مدام تکثیر شده و کلونی‌هایی تشکیل می‌دهند. در این مطالعه با استفاده از colony forming assay به بررسی توانایی تشکیل کلونی پرداخته شد. سپس، کلونی‌های تشکیل شده نسبت به مساحت پلیت محاسبه شدند. در هر دو گروه سلول (سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های به دست آمده از بافت همبند دهانی) کلونی‌ها تشکیل شدند و نسبت کلونی‌ها تشکیل شده در پلیت حاوی سلول‌های بافت همبند کمی بیشتر از کلونی‌های سلول‌های مغز استخوان بود.

بنابراین، سلول‌های بدست آمده از بافت همبند، توانایی خود تجدید شوندگی داشته، این ویژگی آنها کمی بارزتر از سلول‌های بنیادی مغز استخوان بود.

Digirolamo در سال ۱۹۹۹ نشان داد که توانایی تکثیر سلول‌ها در محیط کشت با استفاده از colony- Forming assay و وقتی سلول‌ها با تعداد کم وارد پلیت شوند، به خوبی قابل بررسی است(۱۱). در مطالعه Seo (۲۰۰۴) و Nagatomo (۲۰۰۶) به بررسی ویژگی تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی به دست آمده از PDL پرداخته شده است و هر دوی آنها این ویژگی سلول‌های PDL را با سلول‌های بنیادی مغز استخوان مقایسه نموده‌اند(۱۲،۱۳). Gronthos و همکاران (۲۰۰۲) نیز، به بررسی کلونی‌سازی سلول‌های بنیادی پالپ انسان پرداختند و نتیجه‌گیری نمودند که این ویژگی در این سلول‌ها چندان قوی نیست(۱۴).

از جمله خواص دیگر سلول‌های بنیادی، سرعت بالای تکثیر آنهاست. بدین معنا که تکثیر این سلول‌ها در زمان کمی رخ می‌دهد. با مقایسه زمان لازم برای دو برابر شدن جمعیت

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی به بررسی این ویژگی اقدام شدت و نتایج حاصل نشان دادند که سلول‌های به دست آمده از بافت همبند نیز سرعت تکثیر بالایی داشته، در مدت ۳۰ ساعت جمعیت سلولی آنها دو برابر شد. اگرچه سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان کمی بیشتر (زمان دو برابر شدن ۲۴ ساعت) بود. مطالعات مختلف زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی با منشأ متفاوت را بررسی کرده و اعداد مختلفی تاکنون گزارش شده‌اند. به عنوان مثال، در سلول‌های بنیادی جنین انسان این زمان ۳۶ ساعت است، یعنی کمی بیشتر از آنچه که در مطالعه حاضر برای سلول‌های بافت نرم دهانی سگ محاسبه گردیده است(۱۵). در مطالعه Miura و همکاران (۲۰۰۳)، سلول‌های به دست آمده از پالپ دندان شیری، نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان و پالپ دندان دائمی سرعت تکثیر بالاتری داشتند(۱۶).

از آنجا که از دیگر ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، چند ظرفیتی بودن آنها (یعنی قابلیت تمایز به رده‌های مختلف سلولی) است، تصمیم بر آن شد تا توانایی تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست و آدیپوسیت با سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان مقایسه گردد.

بررسی تمایز به استئوبلاست، ابتدا با رنگ‌آمیزی Alizarin Red انجام شد. این رنگ‌آمیزی که در روز ۲۱ تمایز انجام شد، نشان داد که رسوبات کلسیفیه در محیط‌های کشت سلول‌های بافت همبند و مغز استخوان حضور داشتند. سپس، به منظور اطمینان از تبدیل شدن سلول‌ها به استئوبلاست، بروز برخی از ژنها با استفاده از Real Time PCR روی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های مورد بررسی عبارت بودند از: GAPDH، TBP، Osteocalcin و ALP. دو ژن اول بر روی همه سلول‌ها بروز می‌یابند و علت استفاده از آنها اطمینان از صحت مراحل PCR بود.

ژن GAPDH، ژنی است که تولید آنزیم گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز را تنظیم می‌نماید. این آنزیم کاتالیزور گلیکولیز است و در تولید انرژی و مهار آپوپتوزیز نقش مهمی دارد. ژن GAPDH به میزان زیادی در اغلب بافت‌ها و سلول‌ها بارز می‌شود و اغلب به عنوان loading control در RT-PCR استفاده می‌گردد.

ژن TBP، TATA binding protein (TBP) را کدگذاری می‌کند و یکی از پلی‌پپتیدهایی است که به عملیات transcription توسط RNA پلیمراز II کمک می‌نماید. استئوکلسین جزء پروتئین و غیرکلاژنی ماتریکس خارج سلولی استخوان است که انحصاراً توسط استئوبلاست‌ها تولید و ترشح می‌شود و نشانه‌ای از تمایز استئوبلاست‌هاست. این پروتئین نقش مثبتی در کنترل nucleation کریستال‌های HA دارد.

ALP آنزیمی است که محصول فعالیت استئوبلاست بوده و افزایش آن نشان‌دهندهٔ تشکیل فعال استخوان می‌باشد. ژن ALP تولید این آنزیم را تنظیم می‌نماید.

ژن استئوکلسین در سلول‌های مشتق از مغز استخوان موجود بوده ولی سلول‌های به دست آمده از بافت نرم فاقد آن بودند. اما ژن آلکالین فسفاتاز در هر دو نوع از سلول‌ها موجود بود، اگرچه در سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان به میزان بیشتری حضور داشت.

به منظور بررسی تمایز سلول‌ها به آدیپوسیت در روز ۳۱ تمایز، از رنگ‌آمیزی Oil Rod استفاده شد. اما نتیجه این رنگ‌آمیزی در هر دو گروه سلول‌ها منفی بود. بدین معنا که سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان نیز که با پروتکل اثبات شده جهت استخراج سلول‌های بنیادی به دست آمده بودند و سایر ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را دارا بودند، نتوانستند به آدیپوسیت تمایز یابند. ازآنجا که محیط‌هایی که در مطالعات مختلف جهت تمایز استفاده می‌شوند، در دوز مواد و مدت مصرف آنها دارای تفاوت‌های جزئی هستند، به نظر می‌رسد پروتکل استفاده شده در این مطالعه بر روی سلول‌های سگ مؤثر نیست. به همین جهت پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اثر سایر پروتکل‌ها بر روی این سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

Lindolfo و همکاران (۲۰۰۶)، حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمامی بافت‌ها را به حضور این سلول‌ها در اطراف عروق خونی نسبت دادند. آنها مطرح کردند که این سلول‌ها در basement membrane عروق حضور داشته، طی فرآیند تمایز به سلول‌های پروژنیتور و بالغ تبدیل می‌شوند. در صورتی که آسیبی به بافت وارد شود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون اینکه به پروژنیتورها تبدیل شوند، به داخل بافت وارد می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سلول‌های بافت همبند دهان سگ کشت داده شدند. با توجه به مورفولوژی، ویژگی‌های خود تجدید شوندگی، سرعت بالای تکثیر و توانایی تمایز به استئوبلاست که با سلول‌های بنیادی مغز استخوان سگ

www.SID.ir

Archive of SID

قابل مقایسه بود، این سلول‌ها بنیادی می‌باشند. البته در انتها پیشنهاد می‌شود در ادامه این تحقیق، تست‌های فلوسیتومتری جهت بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بافت همبند انجام گردد.

References

1. Lakshmipathy U, Verfaillie C: Stem cell plasticity. Blood Reviews 2005;19:29-38.
2. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF: Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. J Orthop Res 1997;15:546-557.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. PNAS 2000;97:13625–13630.
5. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. Connect Tissue Res 2002;43:406-408.
6. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM: Location of putative stem cells in human periodontal ligament. J Periodont Res 2006;547–553.
7. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al: Characterization of the apical papilla and its residingf stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod 2008;34(2):166-171.
8. Gay IC, Chen S, MacDo ugall M: Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofacial Res 2007;10:149–160.
9. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N: Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106:203-209.
10. Lindolfo SM, Chagastelles PC, Nardi NB: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Science 2006;119:2204-2213.
11. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999;107:275-281.
12. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I: Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodont Res 2006;41:303–310.
13. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S: Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. J Dent Res 2005;84:907-912.
14. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. Dent Res 2002;81:531–535.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell. 4th Ed. Garland Science 2002;Chap22:1308-1312.
16. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100: 5807-5812.

www.SID.ir