تاثیر Chitosan بر ویژگی‌های استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمال پالپ دندان شیری

دکتر طاهره معصوم[۱] - دکتر ایرج امیری[۲] - دکتر رضوان رفعت‌جو[۱+]

۱- استادیار گروه آموزشی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲- دانشیار گروه آموزشی آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

Effect of chitosan on osteogenic properties of mesenchymal stem cell of exfoliated deciduous teeth

Tahereh Masoum[1], Iraj Amiri[2], Rezvan Rafatjou[1†]

1†- Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran (dr.rafatjou@yahoo.com)

2- Associate Professor, Department of Anathomy, School of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Background and Aims: The exfoliated human deciduous tooth contains multipotent stem cells [Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous tooth (SHED)] that identified to be a population of highly proliferative and clonogenic. These cells are capable of differentiating into a variety of cell types including osteoblast/osteocyte, adiopcyte, chondrocyte and neural cell. The aim of this study was to evaluate the differentiation of SHED to osteoblast in standard osteogenic medium and comparing the results with medium which supplemented with glucosamine in form of chitosan.

Materials and Methods: Dental pulp cells were isolated from freshly extracted primary teeth, digested with 4 mg/ml collogenase/dispase, and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10 percent fetal bovine serum. The clonogenic potential of cells was performed after 3 weeks of culture. Flowcytometric analysis, performed at day 21 of culture to identify surface markers of mesenchymal stem cells. The cells from 3rd passage were used for osteogenic differentiation in routine osteoinductive medium. Chitosan (10 µg/ml) was added to the culture medium of case group. Alizarin Red Staining and Alkaline Phosphatase (ALP) activity were done to evaluate osteogenic differentiation in the developing adherent layer on the third passage. The results were analyzed using T-test. For the analysis of normal distribution of data, non-parametric Kolmogrov-Smirnov test was used.

Results: The colonogenic efficiency was more than 80%. Flowcytometric analysis showed that the expression of mesenchymal stem cell marker CD90, CD105 and CD146 were positive in SHED, while hematopoietic cell marker CD34, CD45 and endothelial cell marker CD31 were negative. Quantitative analysis of Alizarin Red Staining demonstrated that: mineralized nodule formation was higher in the group supplemented with glucosamine (chitosan). Results from Alkaline Phosphatase activity test, on day 21, demonstrated a significantly higher ALP activity in the group supplemented chitosan ($P<0.001$).

Conclusion: Stem cells isolated and cultured from exfoliated deciduous teeth pulp can be differentiated to osteoblast. Addition of chitosan can be beneficial to promote osteogenic differentiation of these cells.

Key Words: Stem cell; Deciduous tooth; Glucosamine; Chitosan

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2013;26(1):55-63

+ مولف مسوول: همدان- خیابان شهید فهمیده- دانشگاه علوم پزشکی همدان- گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان

تلفن: ۰۹۱۲۵۴۸۹۹۶۹ نشانی نشانی الکترونیک: dr.rafatjou@yahoo.com

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

چکیده

زمینه و هدف: پالپ دندان‌های شیری اکسفولیه شده، حاوی سلول‌های بنیادی با قابلیت تکثیر و کلونی‌زایی بالا می‌باشد. این سلول‌ها توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی نظیر استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و سلول‌های عصبی را دارند. این مطالعه با هدف ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده از پالپ دندان شیری به استئوبلاست و بررسی تاثیر گلوکزآمین در فرم Chitosan بر این تمایز، انجام شد.

روش بررسی: پالپ دندان‌های شیری لق، که سالم و عاری از پوسیدگی بودند، بلافاصله پس از کشیدن دندان، خارج شده و در محلول هضم آنزیمی حاوی کلاژناز نوع ۱ و دیسپاز غوطه‌ور شد. سپس در محیط کشت α Modified Eagle Medium (α MEM) محتوی ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) کشت داده شدند. پس از سه هفته تشکیل کلونی توسط سلول‌ها ارزیابی شد. بررسی فلوسیتومتریک برای شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی در روز ۲۱ انجام گرفت. سلول‌های سومین پاساژ سلولی، جهت تمایز استئوژنیک در محیط کشت روتین و محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم در لیتر Chitosan، کشت داده شدند. ارزیابی تمایز استئوژنیک در روز ۲۱ با اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز و تعیین میزان تشکیل ندول‌های مینرالیزه با رنگ‌آمیزی Alizarin red انجام شد. نتایج حاصل به روش T-test آنالیز شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون غیر پارامتری Kolmogrov- Smirnov استفاده شد.

یافته‌ها: کلونی‌زایی بیش از ۸۰٪ در سلول‌های مورد بررسی دیده شد. آنالیز نتایج فلوسیتومتری نشان داد که در سلول‌های جدا شده از پالپ دندان شیری مارکرهای مزانشیمال CD90, CD105, CD146 مثبت بودند. درحالیکه مارکرهای هماتوپوئتیک CD45, CD34 و مارکرسلول‌های اندوتلیال CD31 در آن‌ها یافت نشد. تشکیل ندول مینرالیزه و فعالیت آلکالین فسفاتاز در حضور گلوکزآمین به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی از پالپ دندان شیری اکسفولیه شده استخراج و کشت داده شد. این سلول‌ها توانایی تمایز استئوژنیک دارند و افزودن گلوکزآمین (Chitosan) به میزان ۱۰ میکروگرم در لیتر تاثیر مثبتی در این تمایز دارد.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادی؛ دندان شیری؛ گلوکزآمین؛ Chitosan

وصول: ۹۱/۰۶/۱۸ اصلاح نهایی: ۹۲/۰۲/۲۱ تایید چاپ: ۹۲/۰۲/۲۵

مقدمه

ادنتوبلاست‌ها پس از تمایز از سلول‌های اکتومزانشیمال پاپیلای دندانی توانایی تکثیر خود را از دست داده و پس از ترشح سریع عاج اولیه وارد فاز استراحت شده و عاج ثانویه فیزیولوژیک را در طول عمر دندان، با سرعت کمتری ترشح می‌کنند.

ادنتوبلاست‌ها همچنین در پاسخ به محرک‌های مختلفی از قبیل محرک‌های مکانیکی، شیمیایی و باکتریایی قادر به تشکیل عاج ترمیمی هستند، حتی زمانی که ادنتوبلاست‌ها آسیب دیده‌اند عاج ترمیمی می‌تواند در پالپ دندان تشکیل شود. تحقیق پیرامون منشأ پیدایش این‌گونه از عاج ترمیمی منجر به این ذهنیت شده است که سلول‌های پیش‌ساز ادنتوژنیک یا سلولهای بنیادی ممکن است در بافت پالپ وجود داشته باشند. علیرغم انجام مطالعات فراوان هنوز ناشناخته‌های زیادی درمورد منشاء سلول‌های پیش‌ساز/بنیادی طی ساخت عاج ثالثیه ترمیمی و مکانیسم‌های مؤثر در تکثیر، تمایز و فعالیت ترشحی آنها وجود دارد. منشاء احتمالی این سلول‌ها می‌تواند لایه غنی از سلول مجاور ادنتوبلاست‌های اولیه، سلول‌های اطراف عروق، سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته و فیبروبلاست‌ها باشد (۵-۱).

پیدایش و پیشرفت مهندسی بافت، فرصتی جهت بازسازی و جایگزینی بافت‌های بدن به دنبال تروما یا بیماری ایجاد نموده است. اساس مهندسی بافت، توانایی تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف سلولی است، بنابراین به دست آوردن منبعی مناسب برای سلول‌های بنیادی یکی از زمینه‌های اصلی تحقیقات مهندسی بافت است (۶). سلول‌های بنیادی، سلول‌های فوق‌العاده‌ای هستند که به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد نظیر توانایی Self-renewal، تکثیر و تمایز بالا و قابلیت ترمیم بافت‌های بدن در شرایط ضروری از سایر سلول‌های بدن متمایز می‌گردند (۷-۴). سلول‌های بنیادی در دو دسته کلی جنینی و بالغ بررسی می‌شوند.

سلول‌های بنیادی جنینی توانایی تمایز را به طور کامل حفظ کرده (Totipotent) و می‌توانند بیش از دویست نوع سلول مختلف را در بدن ایجاد کنند. اما استخراج و استفاده از این سلول‌ها مشکلات و تناقضات اخلاقی- قانونی و تکنیکی زیادی را در پی داشته است. سلول‌های بنیادی بالغ، که به تعداد محدود در اندام‌های تکامل یافته بدن، نظیر خون بندناف، کبد، مغز استخوان، پوست، عضلات، بافت چربی، قرنیه یافت می‌شوند، توانایی تمایز به چندین رده سلولی را دارند

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

(Pluripotent). این سلول‌ها مشکلات قانونی و اخلاقی سلول‌های بنیادی جنینی را ندارند و با سهولت بیشتری قابل دسترس می‌باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال، یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند که نخستین بار از مغز استخوان جدا شدند. این سلول‌ها هماتوپوئیتیک نیستند و علاوه بر مغز استخوان در کبد و عضلات اسکلتی هم یافت شده‌اند. و قادر به تکثیر طولانی مدت بدون از دست دادن فانکشن هستند. همچنین می‌توانند به غضروف، استخوان، چربی تمایز یابند. (۱۰-۸،۶).

بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمال نسبت به سایر انواع سلول‌های بنیادی بالغ منبع مناسب و امیدوار کننده‌تری در مهندسی بافت برای کاربرد درمانی محسوب می‌شوند (۷).

رایج‌ترین منبع جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان است؛ اما محدودیت‌هایی نظیر فرآیند دردناک نمونه‌گیری و تعداد کم سلول‌های به دست آمده، تحقیقات جدید را به سمت یافتن منبع جایگزین سوق داده است. حضور سلول‌های بنیادی در پالپ دندان نخستین بار توسط Gronthos و همکاران (۱۱) به اثبات رسید و تاکنون مطالعات زیادی در زمینه استخراج، تکثیر و تمایز این سلول‌ها صورت گرفته است. دندان عقل نهفته رایج‌ترین منبع دندانی برای استخراج سلول‌های بنیادی است. اما منبع جدیدتری که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، دندان‌های شیری درحال افتادن هستند که مزایای خاص خود را دارند (۱۲)، از آن جمله: سهولت دسترسی، عدم تخریب بافت در محل دهنده، کاهش یا حذف درد و ناراحتی بیمار و امکان دسترسی در بازه زمانی طولانی‌تر (در کل دوره Mixed dentition). همچنین تعداد بیشتر منابع سلول و نیز امکان تهیه سلول از بیماران جوان‌تر در دسترس بوده و از سرعت و سهولت بیشتر تکثیر برخوردارند (۱۵-۱۳). مطالعات صورت گرفته روی سلول‌های بنیادی پالپ دندان نشان‌دهنده توانایی تمایز این سلول‌ها به چندین رده مختلف سلولی ازجمله: استئوژنیک، کندروژنیک، آدیپوژنیک، میوژنیک، نوروژنیک و البته ادنتوژنیک می‌باشد (۲۰-۱۵،۸). پس از جداسازی سلول‌های بنیادی از منبع موردنظر، یکی دیگر از زمینه‌های مطالعاتی، یافتن مواد مناسب جهت اضافه کردن به محیط کشت سلولی است تا بتوان بهترین و کارآمدترین ماده را برای تکثیر و تمایز رده‌های مختلف سلولی معرفی کند.

یکی از موادی که به نظر می‌رسد اثر مثبت در تمایز استئوژنیک داشته باشد گلوکزآمین است.

ترکیبات مختلف گلوکزآمین استفاده‌های بیولوژیک متعددی دارند. از آن جمله می‌توان به کاربرد گسترده گلوکزآمین سولفات در درمان استئوآرتریت اشاره کرد (۲۱،۲۲).

Chitosan یک پلی‌ساکارید خطی است که از β-(1-4)-D-glucosamin، (Deacetylated) و N-acetyle-D- (Acetylated) glucosamine تشکیل شده است. فرم تجاری آن از دِ استیله شدن Chitin ساخته می‌شود. وزن مولکولی این ماده ۳۸۰۰ تا ۲۰/۰۰۰ دالتون است. Chitosan به دلیل داشتن گروه آمین با pKa≈۶/۵ محلول در آب بوده بیوادهزیو می‌باشد و توانایی چسبیدن به غشاهای مخاطی با شارژ منفی را دارد.

از خواص Chitosan می‌توان به سازگاری بیولوژیک بالا، توانایی تشکیل لخته و برقراری هموستاز، آلرژی‌زایی کم و خواص آنتی‌باکتریال اشاره کرد (۲۳،۲۴). اثربخشی گلوکزآمین در تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان دایم به اثبات رسیده است اما با توجه به تفاوت‌های موجود بین این سلول‌ها با آنچه در پالپ دندان شیری یافت می‌شود و فقدان مطالعات در این زمینه، مطالعه حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای اثر گلوکزآمین در فرم Chitosan بر روی تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی جدا شده از پالپ دندان شیری با گروه کنترل در دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی همدان انجام گرفت.

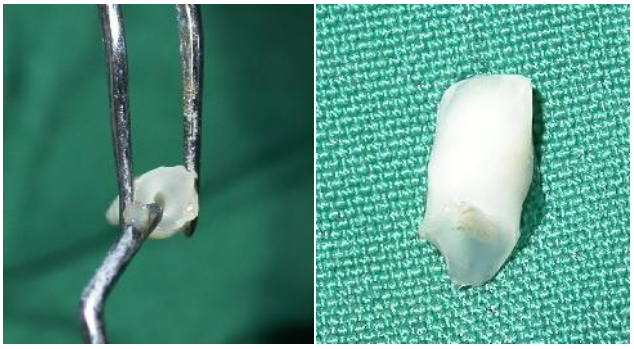
روش بررسی

تعداد ۱۵ دندان شیری (۲ دندان مولر اول شیری بالا، ۴ دندان کانین شیری بالا، ۳ دندان انسیزور میانی شیری بالا، ۳ دندان کانین شیری پایین، ۲ دندان انسیزور میانی شیری پایین و ۱ دندان انسیزور کناری شیری پایین) سالم و بدون پوسیدگی لق، که به طور طبیعی درحال افتادن بودند، از ۱۰ کودک سالم ۶ تا ۱۰ ساله (۳ دختر و ۷ پسر) جهت استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمال کشیده و جمع‌آوری شد. دو تا پنج روز قبل از کشیدن دندان‌ها، بیماران تحت آموزش بهداشت و پروفیلاکسی حرفه‌ای کامل دندان‌ها توسط برس و خمیر پامیس قرار گرفتند تا میزان پلاک و دبری حتی‌الامکان کاهش یابد و

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

به این ترتیب آلودگی میکروبی در محیط کشت به حداقل برسد. در روز کشیدن، مجدداً پروفیلاکسی حرفه‌ای برای بیماران انجام شد. پس از تزریق بی‌حسی موضعی مناسب، بیماران دهان خود را با دهان‌شویه کلرهگزیدین ۰/۱۲٪ دوبار- هر بار به مدت یک دقیقه شستشو دادند تا احتمال آلوده شدن محیط کشت را باز هم کاهش داده باشیم.

کشیدن دندان‌ها تحت شرایط استریل جراحی با استفاده از روپوش و دستکش استریل و پس از ضدعفونی کردن اطراف دهان با محلول بتادین انجام شد و بلافاصله پس از کشیدن، پالپ باقی‌مانده دندان‌ها توسط اسکاویتور قاشقی یا فایل اندو از انتهای اپیکال ریشه‌های تحلیل یافته با حداقل ترومای ممکن، با وسایل استریل خارج و در محلول Digestive غوطه‌ور گردید (شکل ۱).



شکل ۱- استخراج پالپ از دندان شیری

این محلول شامل پنی‌سیلین ۱۰ u/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ mg/ml، کلاریترومایسین ۵۰۰mg/ml در ۴ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate-buffered saline) ۰/۱ مولار به اضافه ۳ mg/ml کلاژناز نوع یک و ۴ mg/ml دیسپاز می‌باشد. پس از یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محلول فوق روی Falcon strainer ۷۰ µm فیلتر شد. پس از فیلتراسیون سلول‌ها در محیط کشت α MEM (Modified Eagle Medium) مادی ۲۰٪ (Gibco،FBS (Fetal Bovine Serum) Germany)، اسید اسکوربیک ۲ فسفات ۱۰۰µm (sigma، Germany) ۲۰۰ µm گلوتامین ۱۰u/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰mg/ml استرپتوماسین قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شده و در فلاسک‌های ۲۵ cm^2 قرار داده شدند. فلاسک‌ها در دمای ۳۷ سانتی‌گراد CO_2 ۵٪ انکوبه شدند (۴،۵،۹،۱۱،۱۲،۱۴،۱۶،۱۸).

در اولین کشت‌های سلولی علیرغم سرعت بالای تکثیر و ایجاد کلونی‌های سلولی درحد مطلوب پس از ۴۸ ساعت، آلودگی با نوعی میکروارگانیسم دیده شد که پس از بررسی‌های لابراتوری آلودگی مخمر تشخیص داده شد. بنابراین برای جلوگیری از تکثیر آلودگی، به محلول Digestive اولیه Fungisom به میزان ۲ میکروگرم در لیتر اضافه شد و مراحل فوق مجدداً تکرار گردید. فلاسک‌های محتوی سوسپانسیون سلولی در دمای ۳۷ سانتی‌گراد در CO_2 ۵٪ و رطوبت نسبی ۱۰۰٪ انکوبه شده و محیط کشت دوبار در هفته تعویض گردید.

ارزیابی تشکیل کلونی

برای ارزیابی تشکیل کلونی از سوسپانسون سلولی کم چگال استفاده شد. به این منظور سوسپانسیون سلولی بعد از هضم آنزیمی در محلول کلاژناز /دیسپاز، در Mesh strainer بسیار ظریف فیلتر شد. سوسپانسیون سلولی که به میزان ۱۰۰ سلول در میلی‌لیتر رقیق شده است در پلیت ۹۶ چاهکی به میزان ۰/۰۱ میلی‌لیتر در هر چاهک قرار داده شد. به این ترتیب در هر چاهک فقط یک یا دو سلول قرار می‌گیرد. در پلیت، محیط کشت αMEM ,۱۰٪ FBS هر هفته دوبار تعویض گردید. پس از سه هفته انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵٪ CO_2 سلول‌ها باتولوئیدن بلو ۱٪ در پارافرمالدئید ۱٪ رنگ‌آمیزی شدند و تعداد کلونی‌ها (که بیشتر از ۵۰ سلول داشتند) شمارش شد (۹،۱۵،۱۸،۲۵،۲۶).

فلوسیتومتری

به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده در این مطالعه از روش فلوسیتومتری نیز استفاده شد. مراحل فلوسیتومتری به شرح زیر بود:

سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشوی مخصوص- که حاوی EDTAO/O٪۵۸ , PBS ۱٪ می‌باشد- به مدت ۳۰ دقیقه با فرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. در مرحله بعدی با آنتی‌بادی‌های موردنظر که شامل CD31, CD34, CD45, CD90, CD105, CD146 بوده و به صورت مستقیم به یک آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند انکوبه شدند. بعد از فیکس مجدد سلول‌ها در پارافرمالدئید یک درصد، توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin and Dekenson و نرم‌افزار ۲/۸ Win MD مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵،۲۷،۲۸). پس از اینکه تراکم سلول‌ها در کلونی‌ها به حدود ۹۰-۸۰٪ رسید - حدود ۶ تا ۸ روز پس از کشت اولیه- به منظور مضاعف‌سازی کشت، خالص‌سازی سلول‌های

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

مزانشیمال و نیز امکان تمایز سلول‌ها، پاساژ سلولی به کمک محلول Trypsin-EDTA ۲۵٪ انجام گرفت از سلول‌های سومین پاساژ برای تمایز استئوژنیک استفاده شد. برای انجام آزمایش‌های بعدی سلول‌های پاساژ چهارم در محیط حاوی ۵۰٪ ESFCS (Gibco 16141-07)، ۱۰٪ DMSO (Sigma D2650) و ۴۰٪ محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به تانک نیتروژن ۲۸۶- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

تمایز استئوژنیک

پس از سومین پاساژ سلولی، سلول‌های جدا شده از کف پلیت‌ها (با استفاده از محلول Trypsin-EDTA ۲۵٪) در پلیت کشت تقسیم و برای ۲۴ ساعت کشت داده شدند. وقتی تراکم سلولی به ۸۰٪ رسید، جهت تمایز به صورت زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

گروه یک: محیط کشت استئوژنیک شامل α-MEM (Gibco, Germany) حاوی FBS ۱۰٪، ۵۰ میلی‌مول بتا گلیسروفسفات mg/ml ۵۰ L- اسید آسکوربیک ۲- فسفات ۰/۱ میکرومول دگزامتازون (Sigma, Germany) (۳۱-۲۹، ۲۷-۲۵، ۱۸، ۱۳-۱۱).

گروه دو: محیط کشت استئوژنیک پایه همراه با مکمل گلوکزآمین (Chitosan) به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

مراحل تمایز در هر دو گروه فوق ۷ بار تکرار شد و طی انجام مطالعه محیط‌های کشت در گروه هر سه روز یکبار تعویض شدند. طی دوره کشت بررسی‌های بیوشیمیایی جهت ارزیابی روند استئوژنز انجام پذیرفت به این منظور فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) و رنگ‌آمیزی Alizarin-red در روز بیست و یکم انجام شد.

به منظور ارزیابی تمایز استئوبلاست‌ها، فعالیت ALP در محیط کشت با استفاده از کیت ALP (پارس آزمون- ایران) اندازه‌گیری شد. پس از کشت به روش گفته شده، در روز ۲۱ سلول‌ها پس از دوبار شستشو با PBS به کمک محلول ۱٪ Tritoon، جمع‌آوری شده و در دمای ۲۰ سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رقیق‌سازی با محلولی شامل ۴ قسمت محلول بافر (mol/lit ۱ دی‌اتانول‌آمین و mgl_2 mmol/lit ۰/۵) و یک قسمت محلول سوبسترا (mmol/lit ۱۰ پارا نیتروفنیل فسفات)، فعالیت ALP براساس رنگ سنجی تعیین شد. Alizarin red (Alz-r) از مشتقات آنتوآکوئینون است که برای تشخیص کلسیم در بافت‌ها استفاده می‌شود. برای ارزیابی مینرالیزاسیون در کشت سلولی، از کیت (Millipour, USA) in vitro osteogenesis assay kit استفاده شد. طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده، در روز ۲۱ سلول‌ها دوبار با FBS شسته، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با فرمالدئید ۱۰٪ فیکس شدند. سپس پلیت‌ها با استفاده از رنگ Alz-r به میزان ml/well ۱ رنگ‌آمیزی شدند. پس از گذشت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، پلیت‌ها با آب یونیزه شسته شدند، سپس ندول‌های استخوانی و ماتریکس مینرالیزه که به رنگ قرمز شفاف درآمده بودند، زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده، به صورت کمی و براساس مقایسه غلظت رنگ در OD405 (Optic Density) با منحنی استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت.

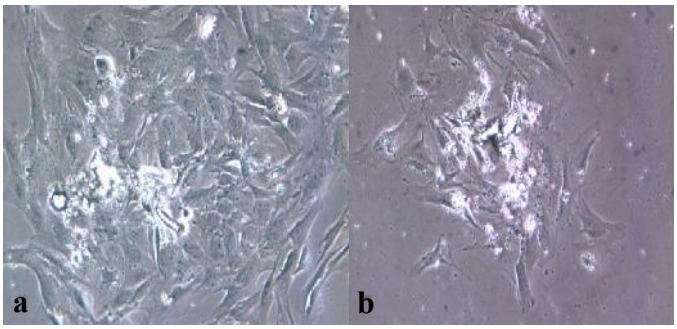
آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایشات در نرم افزار SPSS 17 و به روش T-test آنالیز شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون غیر پارامتری Kolmogrov- Smirnov استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از مشاهدات مرفولوژیک

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده از پالپ دندان شیری شبیه فیبروبلاست بودند که پس از چسبیدن به کف ظرف کشت به صورت دوکی شکل تا گرد قابل مشاهده بودند. ویژگیهای مرفولوژیک این سلول‌ها طی پاساژ سلولی ثابت باقی ماند (شکل ۲).

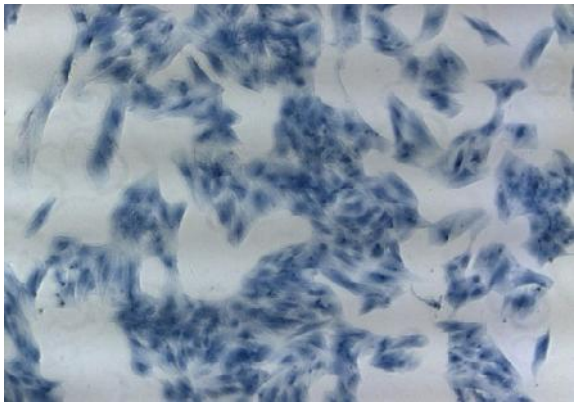


شکل ۲- محیط کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری پس از ۷ روز (شکل a بزرگنمایی ۲۰x شکل b بزرگنمایی ۴۰x)

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

ارزیابی تشکیل کلونی

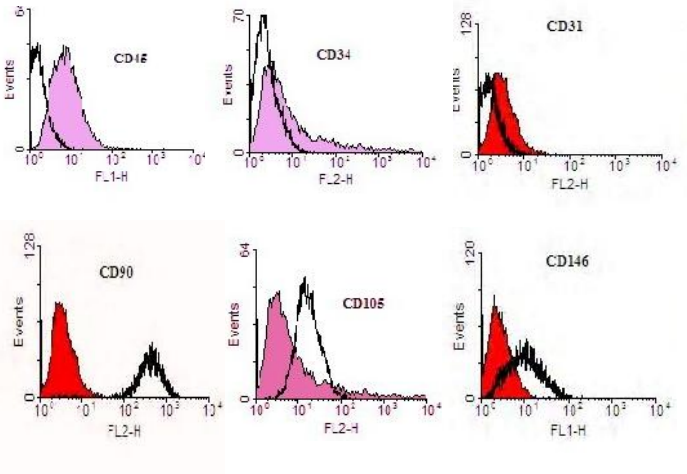
نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپیک پس از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو نشان داد که ۸۴٪ از سلول‌ها در محیط کشت اولیه قابلیت تشکیل کلونی‌هایی با بیش از پنجاه سلول را داشتند (۸۱ چاهک از ۹۶ چاهک) (شکل ۳).



شکل ۳- رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو برای شمارش کلونی‌ها (بزرگنمایی ۲۰x)

نتایج حاصل از فلوسیتومتری

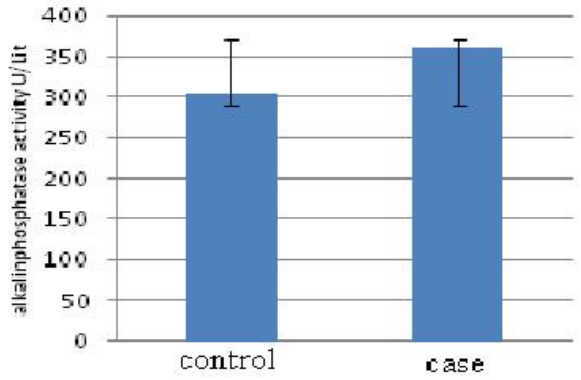
آنالیز نتایج فلوسیتومتری نشان داد که در سلول‌های جدا شده از پالپ دندان شیری مارکرهای مزانشیمال CD90, CD105, CD146 مثبت بودند. درحالیکه مارکرهای هماتوپوئتیک CD45, CD34 و مارکرسلول‌های اندوتلیال CD31 در آنها یافت نشد. نتایج در گراف‌های زیر نشان داده شده است (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج حاصل از فلوئوسیتومتری

فعالیت آلکالین فسفاتاز

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتاز پس از بیست و یک روز در گروه‌های مورد مطالعه در نمودار ۱ نشان داده شده است. فعالیت آلکالین فسفاتاز در حضور گلوکزآمین به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). (میانگین فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه کنترل ۳۰۳/۷۲ واحد در لیتر با انحراف معیار ۲۳/۵۶ و در گروه گلوکزآمین ۳۵۹/۵۳ واحد در لیتر با انحراف معیار ۱۰/۱۳).

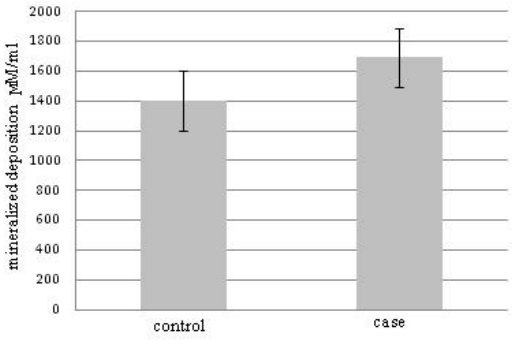


نمودار ۱- تست فعالیت آلکالین فسفاتاز

رنگ آمیزی Alizarin red

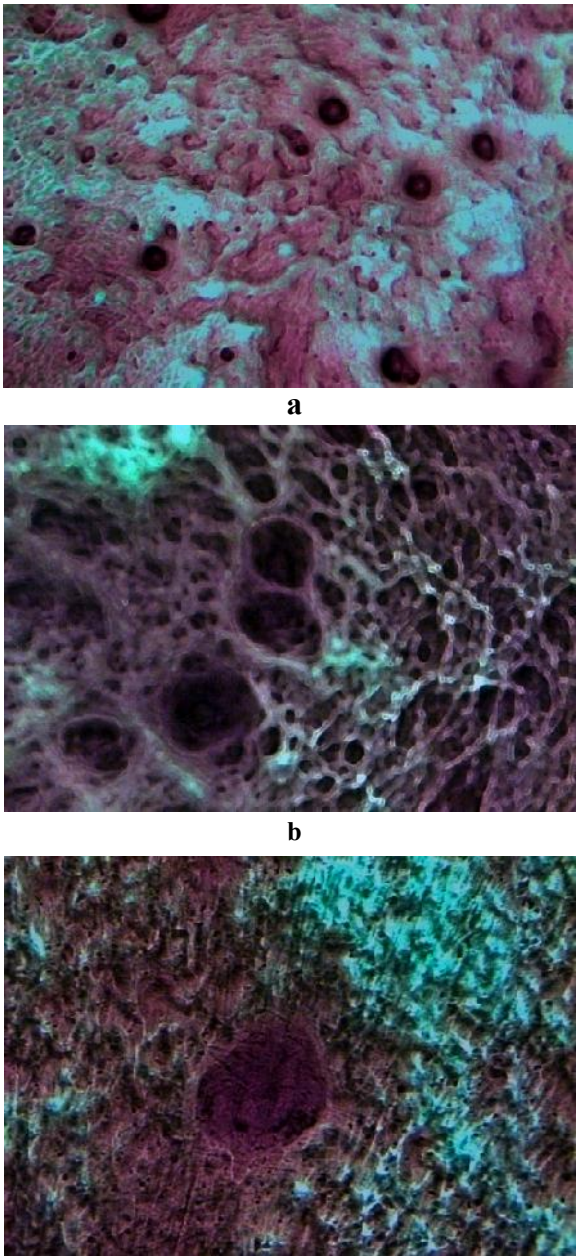
نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی Alizarin red در روز بیست و یکم نشان‌دهنده تولید تجمعات کلسیفیه به رنگ قرمز روشن در هر دو گروه بود. شدت رنگ در گروه گلوکزآمین بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۵).

آنالیز کمی نیز نشان داد که رسوب مینرالیزه به طور معنی‌داری در حضور گلوکزآمین افزایش می‌یابد (نمودار ۲) (میانگین گروه کنترل ۱۴۰۱/۸۶ میکرومول در میلی‌لیتر با انحراف معیار ۷۳/۰۱ و گروه گلوکزآمین ۱۶۹۱/۴۳ میکرومول در میلی‌لیتر با انحراف معیار ۱۰۱/۸۱).



نمودار ۲- آنالیز کمی رنگ آمیزی Alizarin red

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]



شکل ۵- رنگ‌آمیزی Alizarin red در گروه گلوکزآمین در بزرگنمایی‌های مختلف نشان دهنده تولید ماتریکس مینرالیزه و ندول‌های استخوانی است
(شکل a بزرگنمایی 10x، شکل b بزرگنمایی 20x، شکل c بزرگنمایی 40x)

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از پالپ دندان شیری اکسفولیه شده و بررسی اثر گلوکزآمین در تمایز استئوژنیک این سلول‌ها انجام شد.

SHED یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغ است که اخیراً شناسایی و مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات این سلول‌ها را به دلیل توانایی تکثیر و تمایز بالا به عنوان منبع مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت، جهت ساخت و جایگزینی بافت‌های دندانی و غیردندانی آسیب دیده و از دست رفته معرفی کرده‌اند (۱۲).

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمال از پالپ دندان شیری اکسفولیه شده جداسازی و کشت داده شد. نتایج شمارش کلونی پس از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو نشان داده که پس از سه هفته در ۸۴٪ از چاهک‌ها کلونی‌های بیشتر از ۵۰ سلول تشکیل شدند.

در مطالعه Shi و همکاران (۱۶) در روزهای ۱۰ تا ۱۲ پس از شروع کشت ۱۴ سلول بنیادی مغز استخوان BMSC و۲۰۰ SHED از هر 10^5 سلول کشت داده شده، کلونی تشکیل داده بود. این قضیه نشان‌دهنده ظرفیت تکثیر بالاتر SHED نسبت به BMSC می‌باشد.

در مطالعه Laino و همکاران (۱۸) پس از سه هفته ۹۲٪ از چاهک‌هایی که ابتدا یک یا دو سلول SHED داشتند، حاوی کلونی‌های بیش از ۵۰ سلول بودند.

در مطالعه Laino و همکاران (۲۰۰۵) (۲۵) سلول‌های بنیادی مزانشیمال پالپ دندان عقل (DPSC) در ۸۸٪ از چاهک‌ها کلونی تشکیل داده بودند.

مطالعه Huang و همکاران (۲۶) نشان داده که ظرفیت تشکیل کلونی در سلول‌های بنیادی پالپ دندان مولر ۱۵ برابر بیشتر از کل سلول‌های پالپ است و حدود ۷۸٪ از DPSCهای $stro1^+/cd_{146}^+$ توانایی تشکیل کلونی در محیط کشت را داشتند.

نتایج مطالعه حاضر ازنظر کفایت تشکیل کلونی در SHED هم راستا با سایر مطالعات انجام شده می‌باشد.

برای اطمینان از اینکه سلول‌های جدا شده بنیادی و از نوع مزانشیمال است، با استفاده از روش فلوسیتومتری مارکرهای سطحی سلول‌ها شناسایی شد. این سلول‌ها فاقد آنتی ژن‌های مربوط به سلول‌های هماتوپوئتیک CD34, CD45 بودند و مارکر سلول‌های اندوتلیال CD31 در آنها یافت نشد. درحالیکه مارکرهای مزانشیمال CD90, CD105, CD146 مثبت بودند. در مطالعه Alipour و همکاران (۲۸) و نیز مطالعه Suchanek و همکاران (۱۵) نتایج مشابهی گزارش شده است.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

برای ارزیابی پتانسیل تمایز استئوژنیک در SHED و نیز ارزیابی تاثیر گلوکزآمین براین تمایز، پس از سومین پاساژ سلولی گروهی از سلول‌ها در محیط روتین القاء استئوژنز کشت داده شدند، درحالیکه به محیط کشت استئوژنیک گروه دوم گلوکزآمین در فرم Chitosan به میزان ۱۰ µg/ml اضافه شد (Chitosan یک پلی‌ساکارید خطی متشکل از گلوکزآمین و N استیل گلوکزآمین است). پس از سه هفته، برای ارزیابی تمایز استئوژنیک در محیط کشت از رنگ‌آمیزی Alizarin red و اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز استفاده شد.

آلکالین فسفاتاز به عنوان مارکر تشکیل استخوان در مطالعات invitro و invivo به طور گسترده مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت آلکالین فسفاتاز در حضور گلوکزآمین (Chitosan) در محیط استئوژنیک، پس از ۲۱ روز نسبت به گروه کنترل بیشتر بود. هرچند مطالعه‌ای مشابه در دندان شیری صورت نگرفته است، در تنها مطالعه مشابه Huang و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۶) اثر گلوکزآمین را در تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان مولر دایم بررسی کردند و نتیجه گرفتند که گلوکزآمین اگزوژن به میزان ۰/۰۰۵ ml/l در افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیمال پالپ دندان مولر دائم مؤثر می‌باشد و همچنین تظاهر mRNA پروتئین‌های Runx 2/cbfa1 استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز که مارکرهای استخوان هستند در حضور گلوکزآمین افزایش یافت.

بنابراین نتایج مطالعه حاضر که نشان‌دهنده افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در حضور گلوکزآمین (Chitosan) است با مطالعه Huang و همکاران (۲۶) همخوانی داد. Alizarin red برای ارزیابی ذخایر کلسیمی در سلول‌های کشت داده شده به کار می‌رود، در این مطالعه برای ارزیابی تمایز استئوژنیک و تولید ماتریکس مینرالیزه مورد استفاده قرار گرفت و به صورت کمی نیز بررسی شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید ماتریکس مینرالیزه توسط SHED در حضور گلوکزآمین (Chitosan) نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. این قضیه با مطالعه Huang و همکاران (۲۶) همخوانی داد. آنها در مطالعه خود، نشان دادند که اضافه کردن گلوکزآمین به محیط کشت استئوژنیک موجب تولید مقادیر بیشتری از ماتریکس مینرالیزه توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال پالپ دندان مولر دایم می‌شود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال در پالپ دندان شیری اکسفولیه شده حضور دارند و توانایی تمایز استئوژنیک در آنها دیده شد. افزودن گلوکزآمین در فرم Chitosan به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت استئوژنیک این سلول‌ها، می‌تواند تمایز استئوژنیک و بروز مارکرهای استخوانی را افزایش دهد.

پیشنهادات

۱- بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمال پالپ دندان شیری اکسفولیه شده به سایر رده‌های سلولی

۲- استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکزآمین جهت تعیین غلظت اپتیمم

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از همکاری مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان که تجهیزات و امکانات خود را در اختیار این پژوهش قرار دادند. این مقاله حاصل پایان‌نامه تخصصی شماره ۳۶ دانشکده دندانپزشکی همدان گروه کودکان می‌باشد.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]

منابع:

1- Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. 5th ed. 1998; St. Louis: Mosby. 1998:81-102.

2- Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. Curr Opin Cell Biol. 1996:8(6): 844-50.

3- Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. Connect Tissue Res. 1995;32(1-4):9-15.

4- Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. Int J Oral Sci. 2009;1(1): 6-12.

5- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

6- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. J R Soc Interface. 2006;3(10):589-601.

7- Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy and ethics. J Clin Invest. 2004;114(10):1364-70.

8- Karien GA. Dental pulp stem cells, a new era in tissue engineering. Smile Dent J. 2009;4(2):6-9

9- Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth stem cell. Retrieved from "stemcellgateway.net";27 May 2010.

10- Bluteau G, Luder HU, Bari CD, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. Eur Cell Mater. 2008;16:1-9.

11- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(25):13625-30.

12- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Gehron Robey P, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(10): 5807-12.

13- 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(9):792-806.

14- d'Aquino R, de Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells:from biology to clinical applications. J Exp Zool (Mol Dev Evol). 2009; 312B (5): 408-15.

15- Suchánek J, Víšek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokrỳ J, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth- isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. Acta Medica (Hradec Králové). 2010;53(2):93-9.

16- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S: The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res. 2005;8(3): 191-9.

17- Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Braz Dent J. 2011;22(2):91-8.

18- Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. J Cell Physiol. 2006;206(3): 693-701.

19- Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Braz Dent J. 2011;22(1):3-13.

20- Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. Pediatr Dent. 2009;31(7):467-71.

21- Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. Cochrane Database Syst Rev (2). 2005;CD002946.

22- Kirkham SG, Samarasinghe RK. Review article: Glucosamine. J Orthop Surg (Hong Kong). 2009;17(1):72-6.

23- Rao S, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. J Biomed Mater Res. 1997;34(1):21-8.

24- Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. Glycoconj J. 1997;14(4):535-42

25- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, 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.

26- Huang CH, Tseng WY, Yao CC, Jeng JH, Young TH, Chen YJ. Glucosamine promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells through modulating the level of the transforming growth factor-beta type I receptor. J Cell Physiol. 2010;225(1):140-51.

27- Baghaban Eslaminejad MR, Nazarian H, Shariati M, Vahabi S. Human dental pulp stem cells: the culture optimization for increased growth. IJHOSCR. 2009;3(4):5-13.

28- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. Int J Prev Med. 2010;1(3):164-71.

29- Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng. 2006;12(10):2813-23.

30- Zhang W, Walboomers XF, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(2-3):117-25.

31- Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from non extracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. J Endod. 2008;35(5): 673-81.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-07-23]