

گزارش فنی

بررسی روش‌های مناسب جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی از پالپ دندان آسیاب سوم افراد بالغ و تبدیل آن به بافت استخوان و چربی

فاطمه شریعت‌نیا^۱، سید عادل معلم^۱، مهناز احمدی منش^۱، الهام رضانی^۲، زهرا طیرانی نجاران^{۱*}

۱. مرکز تحقیقات سم‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بخورد، بخورد، ایران

دریافت: ۱۷ آذر ۱۳۹۸

پذیرش: ۲۳ آذر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: هدف از مطالعه حاضر مقایسه روش‌های جداسازی سلول‌های بنیادی از پالپ دندان مولر سوم افراد بالغ و بررسی تمایز آن‌ها به دو بافت استخوان و چربی است.

روش کار: پالپ دندان آسیاب به سه روش (۱) کشت مستقیم قطعات پالپ، (۲) هضم آنزیمی پالپ و کشت سلول‌ها و (۳) کشت مستقیم قطعات پالپ و ثابت کردن آن‌ها با لامل صورت گرفت. شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی با روش فلوسایتومتری و بررسی تمایز به بافت چربی ساز و استخوان ساز به ترتیب با رنگ‌آمیزی روغن قرمز-O و آلیزارین قرمز-S صورت گرفت. اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز، RUNX2 و استئوپونتین با آزمون وسترن بلات صورت گرفت.

نتایج: کشت سلول‌ها با روش هضم آنزیمی سریع‌تر بوده، ولی در روش‌های ۱ و ۳ رشد سلول‌ها کند بوده، خطر آلودگی و آسیب سلول‌ها ناشی از لامل وجود دارد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی پالپ دندان آسیاب جدا شده به روش ۲ سرعت رشد بیشتری دارند و قابلیت تمایز و تبدیل به سلول‌های استخوان و چربی را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، تمایز استخوان‌ساز، تمایز چربی‌ساز

مقدمه

و همچنین قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به بافت استخوان و چربی مورد مطالعه قرار گرفته است [۳، ۴].

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

مطابق ضوابط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد در این مطالعه از پالپ دندان آسیاب سوم تازه کشیده شده افراد بالغ بین ۱۸ تا ۳۵ سال استفاده شد. نمونه‌ها در بافر فسفات

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جمعیت مهمی از سلول‌های بنیادی چندتوان، با کاربرد درمانی گسترده بوده [۱] و قابلیت استفاده در پزشکی ترمیمی را دارا می‌باشند [۲]. از لحاظ بالینی، جراحان در موارد ترمیم بافت، در بیماران مبتلا به تحلیل بافت نرم، با چالش‌های زیادی مواجه هستند، و تحلیل بافت از لحاظ اجتماعی برای بیمار رنج‌آور است [۲]. با توجه به کاربرد گسترده، سهولت دسترسی، قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها و وجود ذخیره مناسب سلول‌های بنیادی از پالپ دندان در همه افراد در این مطالعه روش‌های مختلف جداسازی

تمایز

سلول‌ها پس از پاساژ سوم تحت تاثیر دو محیط القایی بافت استخوان ساز و چربی ساز قرار گرفتند. بعد از رسیدن به ۹۰٪-۸۰ تراکم، تحت تاثیر محیط القای تمایز حاوی ۱ میکرومول در لیتر دگزامتازون (سیگما، آلمان) و ۱۰ میکرومول در لیتر انسولین (اکسیر، ایران) و ۲۰۰ میکرومول در لیتر ایندومتاسین (سیگما، آلمان) در (FBS ۱۰٪) α -MEM قرار گرفتند. به منظور بررسی واکوئل‌های چربی، از رنگ‌آمیزی روغن قرمز-O (سیگما، آلمان) استفاده شد.

به منظور القای تمایز و تبدیل به بافت استخوان ساز تحت تاثیر محیط القای تمایز محتوی ۱۰۰ نانومول در لیتر دگزامتازون (سیگما، آلمان)، ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرو فسفات (سیگما، آلمان) و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آسکوربات ۲-فسفات (سیگما، آلمان) در محیط کشت (FBS ۱۰٪) α -MEM قرار گرفتند. بررسی مینرالیزاسیون، با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز-S صورت گرفت.

ارزیابی بیان پروتئین (وسترن بلات)

بررسی میزان بیان پروتئین‌های آلکالین فسفاتاز، فاکتور رونویسی وابسته به رونت (RUNX2)^۷ و استئوپونین با استفاده از روش وسترن بلات انجام گرفت و میزان پروتئین توسط نرم‌افزار (آلیانس ۷/۴، انگلستان) تعیین مقدار گردید. از بتا اکتین به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

یافته‌ها

جداسازی و کشت سلولی

در روش اول (کشت مستقیم قطعات پالپ) پس از گذشت ۱۰ روز، سلول‌های دایره‌ای شکل از حاشیه پالپ جدا شده و رشد کردند که در مقایسه با روش دوم (هضم آنزیمی) تعداد سلول‌های بدست آمده کمتر بود و سلول‌ها دیرتر شروع به رشد کردند (شکل ۱).

در روش دوم سلول‌ها با سرعت بیشتر و بعد از ۴ روز از حاشیه پالپ هضم شده شروع به رشد کردند. جداسازی سریع سلول‌ها، سرعت بالای رشد سلولی، صرفه‌جویی در زمان و کاهش

سالین^۱ به همراه ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین بلافاصله به آزمایشگاه انتقال پیدا کردند.

جداسازی و کشت

پالپ دندان در شرایط کاملاً استریل جدا و ۶ مرتبه شستشو با PBS حاوی پنی‌سیلین/G/استرپتومایسین (گیکو، آمریکا) و آموتریسین B انجام گرفت. پالپ با استفاده از تیغ جراحی قطعات ۳-۴ میلی‌متری قطعه‌قطعه شد. کشت سلولی به سه روش (۱) کشت مستقیم قطعات پالپ، (۲) هضم آنزیمی پالپ (با استفاده از محلول کلاژناز و دیسپاز) و کشت سلول‌ها و (۳) کشت مستقیم قطعات پالپ و ثابت نمودن آن‌ها با لامل صورت گرفت (اکسپلنت)^۲. در روش ۱ پالپ به قطعات کوچک ۱ تا ۲ میلی‌متری تقسیم شد و با حداقل میزان ضروری از محیط کشت α -MEM و ۲۰٪ FBS + ۱٪ P/S + ۰/۰۱٪ آموتریسین) کف فلاسک انتقال پیدا کرد و هر ۲ روز تعویض محیط کشت انجام گرفت. در روش ۲ (هضم آنزیمی)، قطعات بافت، با محلول کلاژناز ۳ میلی گرم در میلی‌لیتر و دیسپاز ۴ میلی گرم در میلی‌لیتر (سیگما، آلمان) به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند. بافت‌های لیز شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times g$ ۵۰۰ سانتریفیوژ شده، با حداقل میزان ضروری از محیط کشت، به فلاسک دارای مساحت ۱۲/۵ سانتی متر منتقل و در انکوباتور ۳۷ °C و اتمسفر ۵٪ دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. در روش ۳ مطابق روش اول سلول‌ها در کف پلیت ۶ خانه کشت شدند و پس از اتصال، یک عدد لامل استریل روی آن‌ها گذاشته و حداقل محیط کشت مورد نیاز به آن افزوده شد.

ارزیابی بیان شاخص‌های سطحی (فلوسایتومتری)

جهت بررسی بیان شاخص‌های سطحی CD45، CD34، CD29 و CD44 سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های انسانی^۳ (ابکم، آمریکا) در دمای ۴ °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. نتایج با دستگاه فلوسایتومتر (بیوساینس، آمریکا) بررسی شد.

¹ Phosphate buffered saline (PBS)

² Explant culture

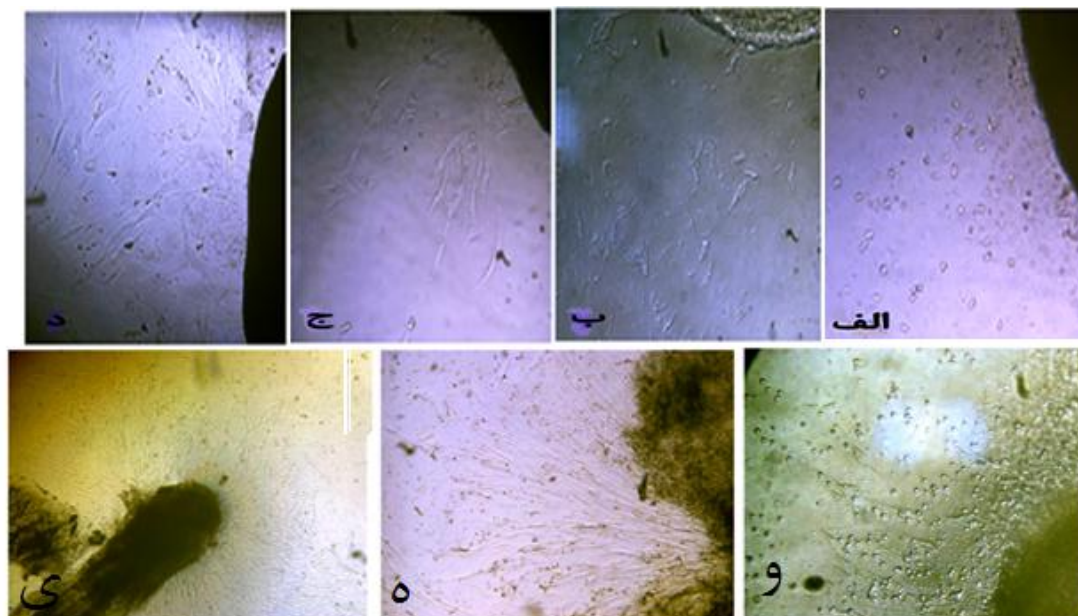
³ Minimum Essential Medium (MEM)

⁴ Mouse Antihuman CD34, CD44, CD45, CD29 FITC

⁵ Oil Red O (-O)

⁶ Alizarin Red S (-S)

⁷ Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)



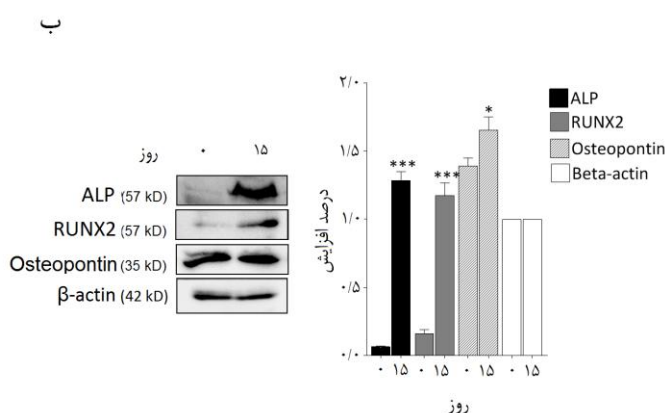
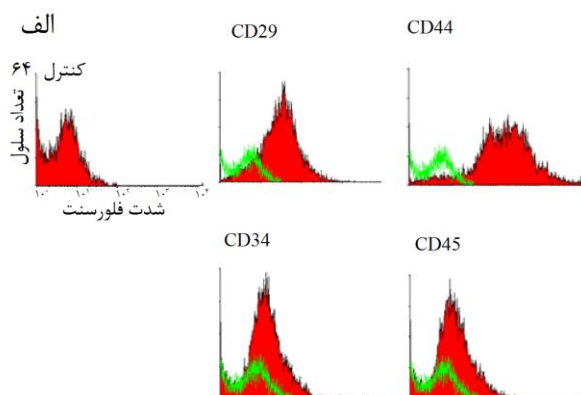
شکل ۱- مراحل جداسازی DPSCs به روش کشت مستقیم و هضم آنزیمی (کلاژناز/ دیسپاز) قطعات پالپ در روزهای مختلف. جداسازی DPSCs به روش کشت مستقیم: (الف و ب) جداسازی و تغییر ریخت شناسی DPSCs با ریخت شناسی دایره‌ای در روز دهم و در روز چهاردهم، (ج) دوکی شکل شدن کامل در روز بیستم و (د) افزایش تدریجی تعداد DPSCs در روز بیست و یکم به بعد. جداسازی و تغییر ریخت شناسی DPSCs به روش هضم آنزیمی: (و) جداسازی و تغییر ریخت شناسی DPSCs در روز هفتم، (ه) دوکی شکل شدن کامل در روز چهاردهم و (ی) رشد سریع و پر شدن کف فلاسک در روز بیست و یکم، (بزرگ نمایی 100×). DPSCs: سلولهای بنیادی پالپ دندانی (Dental pulp stem cells).

مناسب سلولی صورت نگرفت و نسبت به روش ۱ و ۲ روش مناسبی ارزیابی نشد.

ارزیابی بیان شاخص های سطحی (فلوسایتومتری)
بررسی ماهیت سلولهای استخراج شده، بیان شاخص های سطحی CD34، CD45، CD29 و CD44 با روش فلوسایتومتری انجام گرفت (شکل ۲).

آلودگی‌ها به دلیل نبود قطعات پالپ و جسم خارجی (لامل) در محیط باعث شد این روش کارایی بهتری به منظور جداسازی سلول‌ها داشته باشد (شکل ۱).

در روش سوم به دلیل استفاده از لامل، کشت سلول‌های بنیادی در پلیت ۶ خانه انجام شد. در این روش به دلایل مختلف از جمله حفظ شرایط استریل لامل، وجود شیء خارجی، حرکت لامل در محیط کشت و امکان آسیب سلول‌ها رشد



شکل ۲- (الف) تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری برای تایید بیان شاخص های سطحی سلول های بنیادی. (ب) بیان آلكالين فسفاتاز، RUNX2 و استئوپونتين پس از تمایز به استخوان.

تمایز

تمایز و تبدیل به سلول استخوان ساز و چربی ساز

رنگ آمیزی هیستوشیمی برای بررسی شروع اثر آلكالین فسفاتاز و ایجاد تمایز استخوان ساز و رنگ آمیزی روغن قرمز-O برای بررسی شروع اثر تمایز و تبدیل به بافت چربی ساز انجام شد. به تدریج در روزهای ۵ و ۱۰ میزان مینرالیزاسیون به واسطه ایجاد رنگ قرمز افزایش داشته است (شکل ۳). با ایجاد واکوئل‌های چربی، کروی شکل شده و در روزهای ۸ و ۲۱ میزان قطرات چربی افزایش داشته است (شکل ۳).

ارزیابی بیان پروتئین (وسترن بلات)

در بررسی پروتئینی به روش وسترن بلات، افزایش میزان باند آلكالین فسفاتاز و RUNX2 و استئوپونتین مشاهده گردید. از بتا اکتین به عنوان گروه کنترل استفاده شد (شکل ۲).

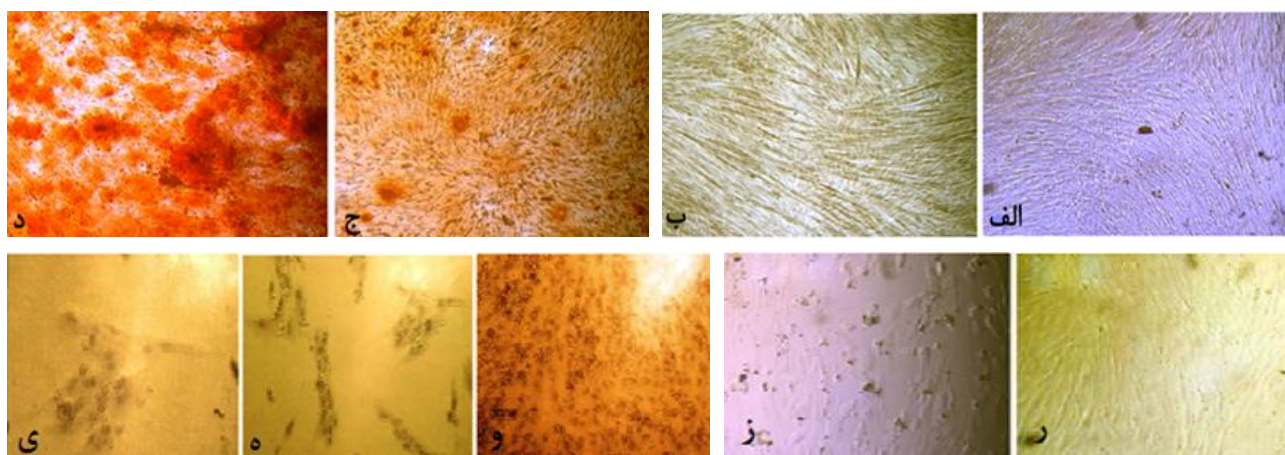
بحث

هانگ و همکاران نشان دادند که سلول‌های جدا شده با روش هضم آنزیمی نسبت به روش کشت مستقیم، سرعت رشد بیشتری دارند [۵، ۶]. یافته‌های کشت سلولی مطالعه حاضر نیز نتایج مشابهی را نشان داد.

مزیت اصلی روش کشت مستقیم قطعات پالپ، سهولت روش و صرف هزینه کم است [۶]. در مطالعه رئوف و همکاران استفاده از لامل با روش کشت آنزیمی همراه بود و منجر به رشد بهتر سلول‌ها گردیده، در مطالعه حاضر استفاده از لامل با روش اکسپلنت (قطعات بافتی چسبنده به کف ظرف کشت) همراه بوده و سرعت رشد کم سلول‌ها در این روش و از طرفی شناور شدن لامل سبب آسیب بیشتر به سلول‌ها شد [۳، ۴]. علاوه بر مقایسه فوق کشت سلول‌ها در پلیت ۶ خانه و فلاسک نیز مقایسه گردید، که مشخص شد، رشد سلول در فلاسک کشت بهتر از پلیت است.

در بررسی فلوسایتومتری فاکتورهای CD34 و CD45 منفی بوده و از طرفی بیان آنتی ژن CD44 و CD29 به میزان بالایی دیده شده است.

در این مطالعه همچنین نشان داده شد که در سلول‌های استخراج شده فعالیت آلكالین فسفاتازی وجود دارد. همچنین در محیط مناسب تمایز به بافت چربی ذرات چربی در سلول‌ها نمایان شد. با تست وسترن بلاتینگ نیز بیان شاخص‌های استخوان ساز از جمله آلكالین فسفاتاز، RUNX2 و استئوپونتین تایید شد. در نتیجه این سلول‌ها پتانسیل تمایز به بافت‌های استخوان و چربی را دارا می‌باشند.



شکل ۳- تمایز DPSCs به استخوان و رنگ آمیزی با رنگ آمیزی آلیزارین قرمز-S و تمایز DPSCs به چربی و رنگ آمیزی با روغن قرمز-O (بررسی میکروسکوپی). تمایز DPSCs به استخوان. (الف) سلول‌های کنترل، (ب) سلول‌های تمایز یافته به استخوان با رنگ آمیزی آلیزارین قرمز-S در روز هفتم، (ج) در روز چهاردهم و (د) در روز بیست و یکم. تمایز DPSCs به چربی: (ر) سلول‌های کنترل، (ز) سلول‌های تمایز یافته به چربی فاقد رنگ آمیزی در روز سوم، (و) در روز هشتم، (ه) در روز بیست و یکم و (ی) در روز بیست و یکم، (بزرگ نمای ۱۰۰×). DPSCs: سلول‌های بنیادی پالپ دندانی (Dental pulp stem cells).

نتیجه‌گیری

جداسازی پالپ دندان انسان به روش هضم آنزیمی نسبت به روش‌های دیگر ارجحیت دارد.

ملاحظات مالی

این طرح (شماره: ۹۱۰۹۶۶) پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه علم پزشکی مشهد انجام گردیده است.

سپاسگزاری

از پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی مشهد قدردانی می‌گردد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

- [1] Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ, Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Intern Med* 49 (2017) 644-651.
- [2] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ, Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 300-311.
- [3] Raoof M, Yaghoobi MM, Derakhshani A, Kamal-abadi AM, Ebrahimi B, Abbasnejad M, Shokouhinejad N, A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dent Res J* 11 (2014) 244-250.
- [4] Souza LM, Bittar JD, Silva IC, Toledo OA, Bírígido MD, Poças-Fonseca MJ, Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Braz J Oral Sci* 9 (2010) 427-433.
- [5] Pirjali T, Azarpira N, Pirjali S, Ayatollahi M, Hossein Aghdaei M, Ahmadi Shamsabadi T, Isolation of mesenchymal stem cells from fetal tissues. *J Fasa Univ Med Sci* 3 (2013) 248-259.
- [6] Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH, In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 324 (2006) 225-236.

Technical report

Investigation of the appropriate isolation methods of human dental pulp stem cells from third molars for osteogenic and adipogenic differentiation

Fatemeh Shariatnia¹, Seyed Adel Moallem¹, Mahnaz Ahmadimanesh¹,
Elham Ramazani², Zahra Tayarani-Najaran^{1*}

¹Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Science, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran

Received: 8 December 2019

Accepted: 14 December 2019

Abstract

Background and aims: The aim of this study was to compare different isolation methods to obtain stem cells from adult human third molars pulp and investigation on their potential of osteogenic and adipogenic differentiation.

Methods: Dental pulp was isolated by three ways: 1) direct culture of pulp pieces, 2) enzymatic digestion of pulp using collagenase and dispase, and 3) direct culture of pulp pieces and fixing it with lamella. Stem cell surface markers were analyzed by flow cytometry method. Adypogenic and osteogenic differentiation were verified by Oil Red O staining and Alizarin Red S staining, respectively.

Results: The growth of cells cultured after enzymatic digestion was faster than those isolated by other methods and the use of lamella increased the risk of infection and cell damage.

Conclusion: Dental pulp stem cells isolated with enzymatic digestion has faster growth and might be as an available resource both for research and tissue engineering.

Keywords: Isolation, osteogenic, adipogenic

Please cite this article as follows:

Shariatnia Fm Moallem SA, Ahmadimanesh M, Ramazani E, Tayarani-Najaran Z, Investigation of the appropriate isolation methods of human dental pulp stem cells from third molars for osteogenic and adipogenic differentiation. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 142-147.

*Corresponding author: tayaraninz@mums.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-8899-0886)