



Scan online to view this article

## Trans Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic neurons via Neurosphere Pulp Stem Cells into Dopaminergic neurons

Maryam Nazm Bojnordi<sup>1,2</sup>, Mazaher Gholipourmalekabadi<sup>3</sup>,  
Hatef Ghasemi Hamidabadi<sup>\*1,2</sup>, Hassan Keshavarz<sup>4</sup>

1. Department of Anatomy & Cell biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Immunogenetic Research Center, Department of Anatomy & Cell biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Emergency medicine department, Rasool-e-akram hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Human dental pulp stem cells (hDPSCs) that closely common origin with ectomesenchymal cells. could be applied as the source of stem cells for treatment of some neurodegenerative diseases. The hDPSCc are capable of differentiating into dopaminergic neurons in presence of appropriate neurotrophic factors and neurosphere technique with regard to fact This study was carried out to assess the differentiation potential of hDPSCc into dopaminergic neurons using neurosphere technique.

**Materials and Methods:** In this study, hDPSCs were isolated from the third molar using mechanical-enzymatic methods. The cells were harvested in a proper condition medium and differentiated into precursor neuronal stem cells and then consequently differentiated into dopaminergic cells in the presence of neuronal induction media including BDNF and GDNF. Cells in each groups were evaluated by immunocytochemistry and RT-PCR assays. In addition, the amount of dopamine released was measured by HPLC.

**Results:** Cells treated with differentiation inducer factors exhibited remarkable changes in phenotypic characteristics and neuron like cells were observed. Molecular results showed that pluripotent genes such as *Nestin*, *Sox2* expression level gradually reduced in the early stages of differentiation process. However, after treatment with neuronal inducers, genes expression level involved in neurogenesis/dopaminergic like *DAT*, *PITX3*, *Nurr1*, *TH* *PITX3* in treated group increased significantly compared to control group. Moreover, immune cytochemistry assay indicated that cells expressing tyrosine hydroxylase (TH) were also detected in treated group. In addition, dopamine release was significantly increased in treated group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** These research findings confirm that the hDPSCs can be differentiated into dopaminergic neurons via neurosphere technique and appropriate inducers.

**Key words:** Human dental pulp stem cells, neurosphere, neuroprogenitors, dopaminergic neurons, differentiation, Iau Science.

### Corresponding author:

Department of Anatomy & Cell biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

**Email:** hatefdr@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی با استفاده از نوروسفر به نورون‌های دوپامینرژیک مریم نظم بجنوردی<sup>۱،۲</sup>، مظاهر قلی پور ملک آبادی<sup>۳</sup>، هاتف قاسمی حمیدآبادی<sup>۱،۲\*</sup>، حسن کشاورز<sup>۴</sup>

۱. گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴. گروه آموزشی طب اورژانس، بیمارستان رسول اکرم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی (hDPSc) با توجه به قرابت جنین شناختی که با سلول‌های اکتومزاننشیمی دارند، می‌توانند در حضور فاکتورهای نوروتروفیک مناسب و با استفاده از تکنیک نوروسفر به نورون‌های دوپامینرژیک تمایز یابند. هدف از این مطالعه القای تمایز hDPSc به نورون‌های دوپامینرژیک با استفاده از تکنیک نوروسفر است.

**مواد و روش‌ها:** hDPScs به روش مکانیکی-آنزیمی جدا و پس از کشت با استفاده از روش تمایزی کشت نوروسفر به سلول‌های بنیادی/پیش سازعصبی و سپس تحت تأثیر (Glial cell-derived Neurotrophic Factor, GDNF) و (Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF) به سلول‌های دوپامینرژیک تمایز داده شدند. سلول‌ها با ایمونوسایتوشیمی و-RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین میزان رهاسازی دوپامین با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه تحت تأثیر القاگرهای تمایزی، سلول‌ها به لحاظ فنوتیپی تغییرهای قابل ملاحظه‌ای داشتند و سلول‌های با ظاهر شبه نورونی مشاهده شدند. یافته‌های مولکولی حاکی از این است که ژن‌های پرتوان نظیر *Sox2* و *Nestin* با شروع روند تمایز به تدریج کاهش یافته‌اند ولی طی افزودن القاگرهای عصبی میزان بروز ژن‌های دخیل در فرآیند نوروزنزیس/دوپامینرژیک مثل *PITX3*، *Nurr1*، *TH*، *DAT*، *PITX3* افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل نشان داد. ارزیابی ایمونوسایتوشیمی نشان داد که سلول‌های بیان کننده تیروزین هیدروکسیلاز (Tirozin hidroksilaz, TH) نیز در گروه تیمار مشاهده گردید. علاوه بر این، میزان ترشح دوپامین در گروه تیمار بطور قابل توجهی افزایش یافته است ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسان با استفاده از تکنیک نوروسفر و افزودن القاگرهای مناسب قابلیت تمایز به نورون‌های دوپامینرژیکی را دارند.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان، نوروسفر، سلول‌های پیش‌ساز عصبی، سلول‌های دوپامینرژیک، تمایز، Iau Science

### مقدمه

بیماری پارکینسون (Parkinson's disease, PD) یکی از رایج‌ترین اختلال‌های نورودژنراتیو مرتبط با سیستم اعصاب مرکزی است (۲،۱). در سال‌های اخیر حدود ۶/۲ میلیون نفر مبتلا به پارکینسون در سرتاسر جهان گزارش شده است.

### نویسنده مسئول:

گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

پست الکترونیکی: hatefdr@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹

بافت‌هایی مثل بافت چربی، بند ناف و دندان یافت می‌شوند (۴،۷،۸). سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان (Human dental pulp stem cells, hDPSCs) به‌عنوان یکی از منابع سلولی ارزشمند برای مطالعه‌های سلولی به‌کار می‌روند که دارای خصوصیت‌های بارزی از جمله دسترسی آسان و عاری از هرگونه نگرانی‌های اخلاقی مرتبط هستند (۹-۱۳). در مقایسه با سایر سلول‌های بنیادی، سلول‌های hDPSCs دارای ویژگی‌های متمایزی مانند قابلیت فریزکردن و پتانسیل کشت طولانی مدت است (۸،۱۴). هم‌چنین سایر بررسی‌ها نشان داده است که سلول‌های hDPSCs در مدت زمان کم‌تری نسبت به انواع دیگر سلول‌های مزانشیمی نظیر بند ناف و مغز استخوان، تمایز می‌یابند و دارای قدرت چسبندگی بالا و در نتیجه بقای طولانی‌تر در محیط بدون سرم زنده هستند (۱۹-۱۳،۱۵). پالپ دندان (Dental Pulp) بافت مشتق شده از ستیغ عصبی (Neural Crest) و دارای سلول‌های بنیادی با پتانسیل نوروژنیک است که قادر به بیان نوتروفین و سنتز فاکتورهای نوروتروپیک نظیر (Basic Fibroblast Growth Factor, BFGF) و (Epidermal Growth Factor, EGF) هستند. بنابراین این سلول‌ها می‌توانند یک منبع قابل اطمینان سلولی برای اختلال‌های نورولوژیکال مورد استفاده قرار گیرند (۲۲-۲۰،۱۲). تحقیقات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی hDPSCs در حضور فاکتورهای نوروتروپیک مناسب نه تنها می‌توانند تکثیر یابند، بلکه قادر به تمایز به انواع نورون‌ها و سلول‌های گلیا نیز هستند (۲۱،۲۳،۱۴،۱۲،۱۱). در همین راستا مطالعه‌های حیوانی متعددی نشان داده است که در صورت پیوند بافت‌های پالپ دندانی به طناب نخاعی آسیب دیده میزان بقای نورون‌های حرکتی در محل ضایعه افزایش یافته است (۲۴،۱۶،۹). هم‌چنین نتایج مطالعه‌ای در شرایط *In vitro* در ارتباط با تمایز سلول‌های hDPSCs به سلول‌های شبه نورونی است نشان داده است که در حضور فاکتورهای محرک القایی نورونی، شمار زیادی از سلول‌های hDPSCs تکثیر را متوقف کرده و به سمت تمایز متمایل می‌شوند (۲۵). نتایج مطالعه‌های گذشته به‌همراه ویژگی‌های منحصر بفرد سلول‌های hDPSCs بر اهمیت این موضوع تأکید می‌کند که استفاده از سلول‌های بنیادی hDPSCs می‌تواند به‌عنوان یک کاندید و روش امید بخش برای سلول درمانی در بیمارهای گوناگون از جمله اختلال‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایی که یکی از روش‌های مهم در حیطه تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان

دژنراسیون نورون‌های تولیدکننده دوپامین (Dopamine neuron, DA neurons) در مغز میانی midbrain به-خصوص در بخش جسم سیاه the substantia nigra از مهم‌ترین ویژگی پاتوفیزیولوژیک این بیماری است. راهکارهای بالینی مختلفی در حوزه درمان این بیماری به‌کار گرفته شده است که می‌توان به درمان‌های دارویی مرسوم شامل تجویز داروهای L-DOPA و مهارکننده‌های monoamine oxidase-B و هم‌چنین جراحی اشاره نمود. اما این روش‌های درمانی تنها باعث کاهش علائمی ظاهری مؤثر شده و در جلوگیری از روند پیشرفت بیماری و سرکوب تحلیل نورون‌های دوپامین مؤثر نیستند. هم‌چنین تأثیر داروها وابسته به دسترسی به نورون‌های DA است و با کم شدن تعداد نورون‌های DA در طی زمان و پیشرفت بیماری، اکثر بیماران که تحت درمان دارویی مبتنی بر L-Dopamine هستند دچار عوارضی مثل Diskinesia می‌شوند. بنابراین، محققان در صدد روش‌های نوین درمانی جایگزین برای درمان بیماران مبتلا به پارکینسون برآمدند. از میان روش‌های درمانی ایگزین شامل حفاظت نورونی با فاکتورهای تروفیک، ترانسپلنت سلول‌های جنینی، تحریک Stimulation بخش عمیق مغز deep brain و منابع سلولی تولید نورون‌های DA توسط سلول درمانی، سلول درمانی (Cell Therapy) روش جایگزین مناسب و نیز استراتژی ممکن برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو در نظر گرفته شد (۶-۱).

تاکنون انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی عصبی (Neural stem cells, NSCs)، سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cells, ESCs)، سلول‌های بنیادی القایی پرتوان (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells, MSCs) در جهت تمایز به سلول‌های نورون DA مورد مطالعه قرار گرفته است. در میان سلول‌های بنیادی بزرگسالان، سلول‌های MSCs از امتیاز مصونیت (Immune-privileged) برخوردار هستند و تکثیر آن‌ها به‌هیچ‌عنوان به لحاظ اخلاقی مشکلی ایجاد نمی‌کند. سلول‌های MSCs قادر به تمایز به سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیا هستند و به‌دلایل ذکر شده، گزینه مناسب‌تری به‌عنوان منبع سلول‌های بنیادی در جهت درمان ترمیمی عصبی در هر دو سیستم عصبی محیطی و مرکزی هستند. این سلول‌ها فاکتورهای نوروتروفیک و ضد التهابی مختلفی برای حمایت از تعمیر نورونی بیان می‌کنند و در

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان به نوروسفر**  
بدین صورت که به تعداد  $5 \times 10^3$  سلول به یک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای (Nan adherent, nunk) که حاوی نوروبازال مدیوم است اضافه می‌گردد. پس از گذشت دو روز نوروسفر تشکیل می‌گردد.

**تبدیل نوروسفر به سلول‌های بنیادی پیش ساز عصبی**  
با انتقال نوروسفرها و افزودن سرم جنین گاوی به محیط کشت آن‌ها نوروسفرها به کف ظرف چسبیدند و در ادامه بعد از شش روز، سلول‌های بنیادی /پیش ساز عصبی ظاهر گردیدند.

**تبدیل سلول‌های پیش ساز عصبی به نورون‌های دوپامینرژیک**  
در این مرحله سلول‌ها به مدت ۷ روز در نوربازال مدیومی که توسط 50ng/ml, 250ng/ml sonic hedgehog (Shh), FGF8 (Fibroblast growth factor 8), 100ng/ml (FGF8) غنی شده‌اند، تیمار می‌گردند. سلول‌های ایجاد شده بعد از القاء به صورت روزانه مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

**بررسی میزان زنده‌مانی hDPSCs پس از القای نورونرژیک:**

بدین منظور  $5 \times 10^3$  سلول در هر یک از مراحل القای نورونرژیک، به داخل هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. در ادامه به منظور سنجش کمیت سلول‌ها ۵ میلی‌گرم از پودر دی‌متیل تیاژول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT, Sigma-Aldrich) در یک میلی‌لیتر PBS استریل حل کرده و ۲۰ میکرولیتر از محلول زردرنگ حاصل به ازای ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر یک از چاهک‌ها ریخته شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، در اثر واکنش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول با نمک MTT بلورهای ارغوانی رنگ و نامحلول فورمازون در کف پلیت تشکیل شد. با برگرداندن پلیت، محیط روی سلول خالی و در نهایت به هریک از چاهک‌ها حدود ۲۰۰ میکرولیتر-Dimethyl thiazolyl di phenyl-tetrazolium bromide, DMSO (Sigma-Aldrich) جهت حل کردن بلورهای مذکور اضافه شد. سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA

انسان به سلول‌های بنیادی پیش‌ساز عصبی، استفاده از مدل کشت نوروسفر و به‌کارگیری هم‌زمان القاگرهای مناسب است، در این مطالعه به بررسی تمایز سلول‌های hDPSC به سلول‌های عصبی و دوپامینرژکی با استفاده از تکنیک نوروسفر پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان**

در این پژوهش تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت پالپ دندان مولار سوم، سالم و بدون هرگونه پوسیدگی از افراد مراجعه کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که در سن ۱۸-۲۵ سال قرار داشتند و با در نظر گرفتن فرم رضایت فرد، جمع‌آوری شدند. دندان‌های قرار داده شده در محلول بافر فسفات (-Phosphate Buffered Saline, PBS) به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. به مدت ۵ دقیقه در محلول ضد عفونی یدین ۱۰ درصد (Povidone Iodine 10%, Pejman, Iran) قرار داده شدند. بعد از جداسازی، بافت پالپ با استفاده از پنس استریل به داخل دیشی که حاوی محیط کشت پایه ( Gibco-Life Fetal DMEM/F12 (Technologies, Canada), 10% bovine serum, FBS Units/ml (Gibco) استریپتوماپسین ۱۰ درصد، پنی‌سیلین (Gibco) ۱۰ بود انتقال داده شدند. بافت قطعه قطعه شده سپس پالپ در محلول حاوی تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco, USA) به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. محلول رویی لوله فالکون سانتریفیوژ شده و در نهایت به فلاسک کشت سلول ۲۵ میلی‌لیتری که حاوی محیط کشت پایه بود منتقل و کشت داده شدند. سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس به صورت روزانه مشاهده و مورد بررسی قرار گرفتند و تعویض محیط کشت فلاسک سلولی هم به‌طور معمول هر ۲-۳ روز یک‌بار انجام شد. با پر شدن کف فلاسک (۸۰-۷۰ درصد)، سلول‌ها با استفاده از روش هضم آنزیمی تریپسین ۰/۲۵٪ (Gibco, USA) جداسازی و پاساژ داده شدند. به‌منظور خالص‌سازی و ظاهری یکنواخت سلول‌ها ۳-۵ مرتبه پاساژ داده شدند و برای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

**تمایز سه مرحله‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان**

به دست آمده PCR صورت گرفت. برای این منظور  $1 \mu\text{l}$  (۱۰) Master Mix (۵۰ ng/ $\mu\text{l}$ ) cDNA، از هر پرایمر (سیناژن، PR 881606) و در  $12/5 \mu\text{M}$ ، نهایت با آب مقطر دوبار تقطیر شده تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و مطابق برنامه معین توسط دستگاه ترمال سایکلر تکثیر DNA انجام شد. در این مطالعه علاوه- بر ژن های هدف از ژن GAPDH برای کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرها در جدول ۱ شرح داده شده است.

plate reader (Synergy H11, Bio Tek, USA) محاسبه گردید.

### تست RT-PCR

در پایان کل RNA سلول های تمایز یافته با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation Kit (Roche) مطابق پروتکل شرکت تولید کننده جدا شدند. سپس نسخه برداری معکوس بر روی ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد و روی cDNA

جدول ۱. توالی پرایمرها.

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (°C)
<i>Nurr1</i>	F: CAAATAAAAACTGCCAGTGGACAAG R: TGTCTGTGCGAACCCTTCTTTG	۶۲
<i>PITX3</i>	F: GCTCCCCAGAGGACGGTTC R: TTCTGAACCACACCCGCAC	۶۰
<i>TH</i>	F: CGGATGAGGAAATTGAGAAGCTG R: AGACAGGCAGTGCAGGAGCTC	۶۱
<i>DAT</i>	F: CCCACTACGGAGCCTACATCTTC R: CGTAGGCCAGTTTCTCTCGAAAG	۶۰
<i>Nestin</i>	F: AAAGTTCCAGCTGGCTGTGG R: TCCAGCTTGGGGTCTGAAA	۵۵
<i>Sox2</i>	F: AACCAGAAAAACAGCCCGGA R: AACCAGAAAAACAGCCCGGA	۵۷
<i>GAPDH</i>	F: AGCCACATCGCTCAGACACC R: GTACTCAGCGCCAGCATCG	۶۱

### ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. همچنین جهت مهار آنتی ژن های غیر اختصاصی به مدت ۴۵ دقیقه Bovine serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich) با انکوبه شدند. در ادامه سلول ها به مدت یک ساعت در معرض آنتی بادی های اولیه (Nestin (Rabbit polyclonal to Nestin, ab92391, abcam system, UK),  $\beta$ III-tubulin (Rabbit polyclonal to  $\beta$ III-tub, ab52901, UK), MAP2 (Rabbit polyclonal to MAP2, ab32454, abcam system, UK) and Tyrosine Hydroxylase, TH (Rabbit polyclonal to

بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی نورونیز در سلول های تمایز یافته به روش ایمونوسیتوشیمی انجام گرفت. سلول های ابتدا توسط PBS شستشو داده شده و سپس با پارافرمالدهید ۴ درصد (Sigma-Aldrich), Paraformaldehyde, PFA) در مرحله بعد، سلول های تثبیت شده به منظور نفوذ پذیر کردن غشای سلول ها با استفاده از Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

سلول‌ها شستشو داده شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض آنتی‌بادی‌های ثانویه (Donkey anti-Rabbit Phycoerythrin, ab7007, abcam system, UK) قرار داده شدند. تشخیص افتراقی هسته سلول‌ها با DAPI صورت گرفت و سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت عکس‌برداری و ثبت شدند.

## HPLC

به منظور فراهم ساختن نمونه‌های برای آنالیز دوپامین به وسیله دستگاه HPLC ابتدا ۵۰۰  $\mu$ l از نمونه سلولی با ۱۲۵  $\mu$ l محلول perchloric acid، نرمال  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ، EDTA در معرض یکدیگر قرار گرفتند. سپس بر روی محلولی که روی یخ قرار گرفته بود، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول سوپرناتانت در دمای ۸۰- نگهداری شدند و در ادامه نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری دوپامین به دستگاه HPLC ارزیابی و آنالیز شدند.

## آنالیز آماری داده‌ها

روش محاسبه، تجزیه و تحلیل داده‌ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروه‌ها از آزمون ANOVA و کی سکوار استفاده شد.

## یافته‌ها

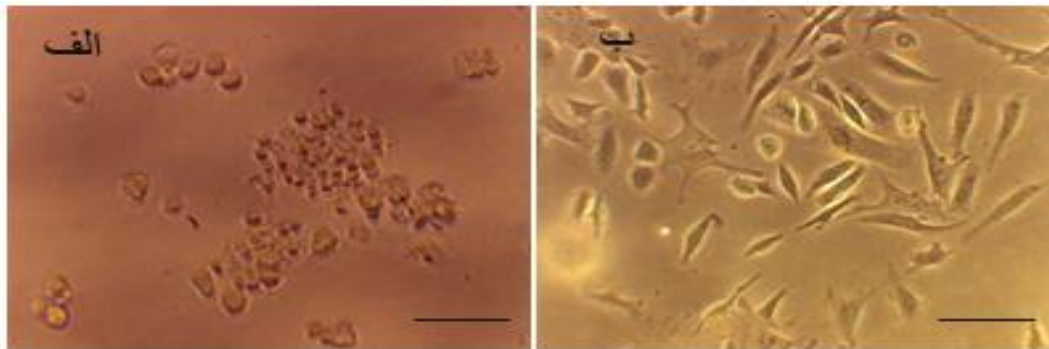
سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی پیش از القاء نوروژنیک، فنوتیپ دوکی شکل و ظاهر شبه فیبروبلاستی را از خود بروز دادند و نکته جالب این‌که فنوتیپ مذکور طی پاساژهای متوالی و در موقعیت‌های غیرالقایی حفظ گردید (شکل ۱ الف و ب).

یافته‌های تست زنده مانی حاکی از این است که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی طی تمایز (گروه تیمار) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۲).

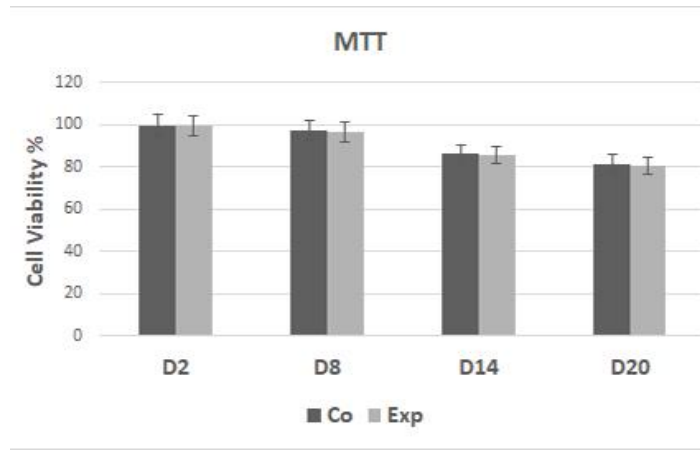
سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neuroprogenitor cells) و سلول عصبی بالغ به ترتیب با به کارگیری مارکرهای Nestin, MAP-2,  $\beta$ III Tubulin و TH در مراحل مختلف تمایز مورد ارزیابی قرار گرفتند. (شکل ۳).

یافته‌های مولکولی نشان داد که بیان ژن‌های Sox2 و Nestin از روز دوم تا روز بیستم کاهش تدریجی نشان داده است. اما میزان بروز ژن‌های DAT و TH در گروه‌های تیمار به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۴).

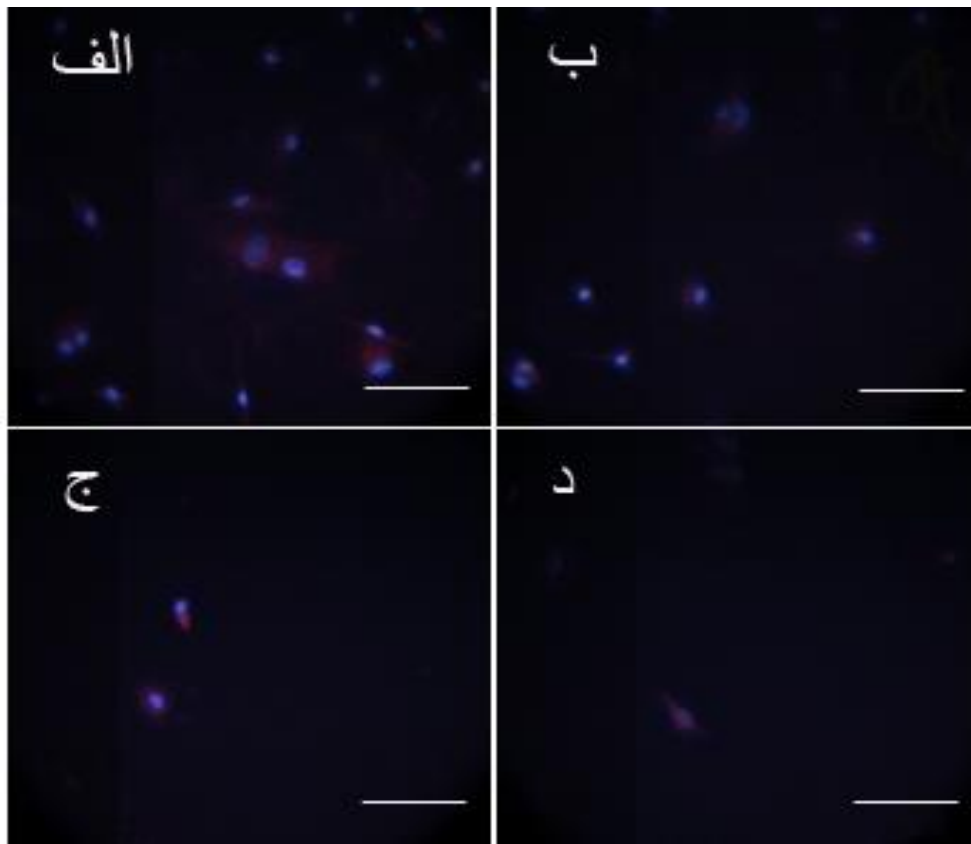
نتایج HPLC نشان داد که میزان دوپامین در گروه تیمار به طور قابل توجهی افزایش یافته است، هر چند که در گروه کنترل نیز رها سازی دوپامین از سلول‌های مزانشیمی حاصل گردیده است (شکل ۵).



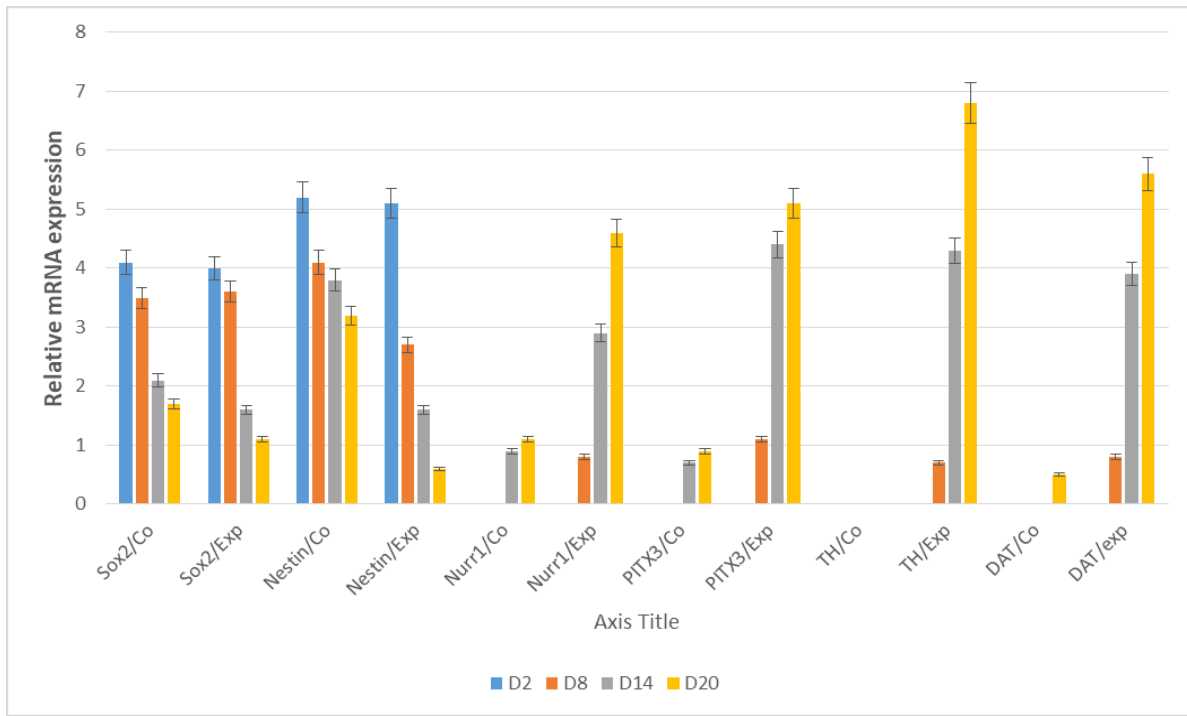
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست. (الف) کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی در روز سوم. (ب) پاساژ سوم (مقیاس ۱۰  $\mu$ m).



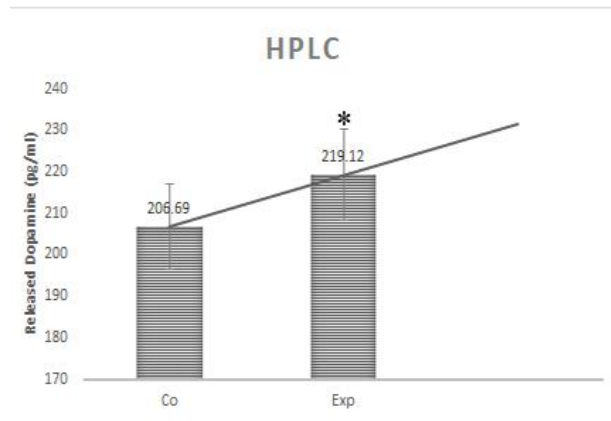
شکل ۲. تست زنده مانی. درصد سلول‌های زنده در گروه تیمار (Experimental group, Exp) نسبت به گروه (Control group, Co) در روزهای مختلف تمایز (روزهای ۲، ۸، ۱۴ و ۲۰ تمایز به ترتیب D2، D8، D14 و D21)



شکل ۳. ایمونوسیتوشیمی سلول‌های نوروینی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندانی. (الف) بیان نشانگر Nestin در روز دوم القاء، (ب) بیان نشانگر MAP-2 در روز هشتم، (ج) بیان نشانگر  $\beta$ III Tubulin در روز هشتم، (د) بیان نشانگر TH در روز چهاردهم (مقیاس ۱۰  $\mu$ m).



شکل ۴. ارزیابی RT-PCR. بررسی کمی بیان ژن‌های Sox2, Nestin, Nurr1, PITX3, TH و DAT در گروه‌های تیمار (Experimental group, Exp) نسبت به گروه کنترل (Control group, Co) در روزهای D2, D8, D14 و D20.



شکل ۵. رها سازی دوپامین در گروه‌های کنترل (Control group, Co) و تیمار (Experimental group, Exp) در روز ۱۴. اختلاف معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## بحث

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان مولار سوم تحت شرایط مناسب تکثیر یافته‌اند و تجمعات سلولی تمایز نیافته چند ظرفیتی به نام نوروسفر را ایجاد کرده که قادر به تمایز به سمت سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی و در نهایت به نورون‌های دوپامینرژیک هستند.

بیماری پارکینسون یکی از رایج‌ترین اختلال‌های مزمن پیش‌رونده مربوط به تخریب سیستم اعصاب مرکزی است که بعد از آلزایمر به‌عنوان دومین بیماری تخریب‌کننده عصبی شناخته می‌شود و کمابیش یک درصد افراد بالای ۵۰ سال را در هر دو جنس در سرتاسر جهان مبتلا کرده است. پارکینسون یک بیماری تحلیل‌رونده عصبی است که حاصل از دست رفتن تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک در جسم

کلون‌زایی همگی بنیادی بودن این سلول‌های مزانشیمی را به اثبات رسانده‌اند که با یافته‌های سایر محققین نیز مطابقت دارد (۲۳، ۲۵، ۱۲، ۱۱، ۴). در مطالعه Nemati S که بر روی ساختارهای نوروسفری سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام دادند، بعد از اتمام دوره القایی هفت روزه با BFGF و EGF و رتینوییک اسید، افزایش قابل توجهی در بیان نشانگرهای ویژه سلول‌های نورونی (نستین و توبولین) مشاهده شد و همچنین بعد از Coat نمودن این ساختارها در ظروف کشت پوشانده شده با لامینین و پلی-L-اورنیتین، تغییرهای مورفولوژیکی آشکاری که در سلول‌های نورونی رخ می‌دهد همانند کشیده شدن سیتوپلاسم سلولی و کوچک شدن جسم سلول‌ها، در سلول‌های مورد مطالعه مشاهده شدند (۱۴).

نتایج به‌دست آمده از ایمونوسیتوشیمی گواه بر این است که با استفاده از عوامل القاگر نورونژنیک، سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ، پتانسیل بیان نستین و بتا توبولین که نشانگرهای نورونی هستند را بروز دادند و درستی این پدیده با رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت و شمارش سلولی نیز به اثبات رسید.

سلول‌هایی که نشانگر نستین را بیان می‌کنند در تمامی گروه‌های تیمار و نیز گروه کنترل مشاهده شدند که نشان دهنده این است که عوامل القاگر استفاده شده در این مطالعه توانایی ایجاد تحریک نورون‌زایی را دارا هستند. اما مشاهده سلول‌های پیش‌ساز عصبی در گروه کنترل قابل پیش‌بینی بود که می‌توان این پدیده را با منشأ نورال کرسی سلول‌های بنیادی پالپ دندان نسبت داد. در مطالعه پیش رو برای بررسی سلول‌های تمایز یافته و ماهیت عصبی آن‌ها در طی دوره تمایز از روش ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR استفاده شد. در این مطالعه ژن *TH* به‌عنوان یک نشانگر دوپامینرژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج RT-PCR نشان داد که میزان بیان ژن *TH* در گروه تیمار به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از گروه کنترل بود.

در این راستا، در بررسی‌های دیگر که بر روی سایر سلول‌های بنیادی انجام شده است، به‌تازگی نتایج آنالیز HPLC حاصل از مطالعه Alizadeh R نشان داد که مقادیر دوپامین آزاد شده از نورون‌های دوپامینرژیک تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در ژله وار تون و موکوس بویایی انسان کمابیش یکسان است. علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر

سیاه مغز میانی است. این بیماری نه تنها نورون‌های دوپامینرژیک بلکه سایر قسمت‌ها از جمله کورتکس سینگولیت، لوکوس سرلئوس و هسته‌های مینرت و گانگلیون‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۶، ۲۱، ۲۱، ۱۲، ۳، ۱). علائم بالینی قابل تشخیص در بیماران مبتلا به پارکینسون شامل علائم حرکتی نظیر سفتی عضلانی، لرزش در هنگام استراحت و کندی حرکت و علائم دیگر شامل اختلال در هوشیاری، حافظه و ادراک است (۲۹، ۲۸، ۲). راهکارهای درمانی دارویی مانند تجویز L-DOPA و سایر درمان‌های مرسوم هر کدام شامل محدودیت و یا عوارض جانبی هستند و این موجب شده که محققین همواره در جستجوی راهکاری نوین و مناسب‌تر برای درمان بهینه پارکینسون باشند. یکی از شیوه‌های درمانی پیشنهاد شده در بهبود بخشیدن به بیماری پارکینسون، سلول درمانی است (۳۰، ۴-۲). در طی روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های دوپامینرژیک، فاکتورهای رشد نورونی نقش مهمی را ایفا می‌نمایند (۲۴). در مطالعه‌ای که توسط Ghorbanian MT در سال ۲۰۱۳ انجام شد، نتایج آن‌ها نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به بیان فاکتورهای رشد نورونی و بروز ژن‌های دوپامینرژیک هستند. این سلول‌ها با ترشح فاکتورهای رشد نورونی و فعال کردن مکانیسم‌های ترمیمی آندوژنوس (Endogenesis) باعث افزایش کارایی سریع و موثرتر عصبی شدند و بنابراین این سلول‌ها را می‌توان برای درمان بیماری پارکینسون به‌کار برد (۴). به‌تازگی سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان به‌عنوان یکی از منابع سلولی برای درمان سلولی بیماری‌های نورودژنراتیو معرفی شده‌اند. با توجه به قرابت جنین شناختی سلول‌های اکتو مزانشیمی پالپ دندان، این سلول‌ها دارای پتانسیل بالاتری نسبت به سایر سلول‌های مزانشیمی برای تمایز به نورون‌ها هستند. همچنین اثرهای پاراکرین این سلول‌ها نیز در ترمیم آسیب‌های عصبی مورد توجه قرار گرفته است (۲۳، ۱۲، ۱۱). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان که از دندان‌های اولیه استخراج شدند، دارای ویژگی پتانسیل کشت بلند مدت، تحقیقات و بانک بافتی ممکن در آینده و قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله نورون‌ها هستند (۳۳، ۳۲، ۳۱، ۲۲، ۱۶، ۱۵، ۱۰). در بررسی نتایج ما، خصوصیت مورفولوژیکی سلول‌های جدا شده از پالپ دندان شامل، فوتوتیپ شبه فیبروبلاستی و دوکی سلول‌ها و چسبندگی زیاد، توانایی تکثیر فراوان و

اثبات شد که فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ (FGF2)، می‌تواند به تنهایی به‌عنوان یک محرک برای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به نوروهای عملکردی دوپامینرژیک مؤثر واقع شود.

### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسان در شرایط آزمایشگاهی از طریق تکنیک نوروسفر به سلول‌های پیش‌ساز عصبی متمایز می‌گردند و در صورت افزودن القاگرهای مناسب قابلیت تمایز به نوروهای دوپامینرژیکی را دارند.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد ۷۰۱۱ است که نویسندگان بدین‌وسیله از مسئولین محترم تشکر می‌نمایند.

1. Vazifehkhah S, Karimzadeh F. Parkinson Disease: from Pathophysiology to the Animal Models. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2016;4(3):91-102.
2. Davie CA. A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*. 2008;86(1):109-27.
3. Feigin V. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 acute and chronic diseases and injuries, 1990-2015: A systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1545-602.
4. Ghorbanian MT, Lashkarbolouki T, Haji Ghasem Kashani M. Effects of dimethyl sulfoxide on expression of neurotrophic factors and dopaminergic genes by mesenchymal stem cells. *Koomesh*. 2013;14(2):130-7.
5. Alizadeh R, Hassanzadeh G, Soleimani M, taghi Joghataei M, Siavashi V, Khorgami Z, et al. Gender and age related changes in number of dopaminergic neurons in adult human olfactory bulb. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2015;69:1-6.
6. Moayeri A, Bojnordi MN, Haratizadeh S, Esmaeilnejad-Moghadam A, Alizadeh R, Hamidabadi HG. Transdifferentiation of human dental pulp stem cells into oligoprogenitor cells. *Basic and clinical neuroscience*. 2017;8(5):387.
7. Kuan W-L, Barker R. New therapeutic approaches to Parkinson's disease including neural transplants. *Neurorehabilitation and neural repair*. 2005;19(3):155-81.
8. Miller RH. The promise of stem cells for neural repair. *Brain research*. 2006;1091(1):258-64.
9. Alizadeh R, Hassanzadeh G, Joghataei MT, Soleimani M, Moradi F, Mohammadpour S, et al. In vitro differentiation of neural stem cells derived from human olfactory bulb into dopaminergic-like neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2017;45(6):773-84.
10. Alizadeh R, Kamrava SK, Bagher Z, Farhadi M, Falah M, Moradi F, et al. Human olfactory stem cells: As a promising source of dopaminergic neuron-like cells for treatment of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2019;696:52-9.
11. Jabari F, Mohammadnejad J, Yavari K. Human primary dental pulp mesenchymal stem cells: History and isolation methods. *Journal of Dental Medicine*. 2014;27(3):184-9.
12. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem cells and development*. 2008;17(6):1175-84.
13. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
14. Nemati S, Mehrjerdi NZ, Baharvand H. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neural-like cells in vitro. *Tehran University Medical Journal*. 2009;67(8).
15. Shen WB, McDowell KA, Siebert AA, Clark SM, Dugger NV, Valentino KM, et al. Environmental neurotoxin-induced progressive model of parkinsonism in rats. *Annals of neurology*. 2010;68(1):70-80.
16. Urraca N, Memon R, El-Iyachi I, Goorha S, Valdez C, Tran QT, et al. Characterization of neurons from immortalized dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Stem cell research*. 2015;15(3):722-30.
17. Bagher Z, Kamrava SK, Alizadeh R, Farhadi M, Absalan M, Falah M, et al. Differentiation of neural crest stem cells from nasal mucosa into motor neuron-like cells. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2018;92:35-40.

18. Salehi M, Bagher Z, Kamrava SK, Ehterami A, Alizadeh R, Farhadi M, et al. Alginate/chitosan hydrogel containing olfactory ectomesenchymal stem cells for sciatic nerve tissue engineering. *Journal of cellular physiology*. 2019.
19. Bagher Z, Atoufi Z, Alizadeh R, Farhadi M, Zarrintaj P, Moroni L, et al. Conductive hydrogel based on chitosan-aniline pentamer/gelatin/agarose significantly promoted motor neuron-like cells differentiation of human olfactory ecto-mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C* 2019.
20. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. A simple co-culture system for generation of embryonic stem-like cells from testis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2012;14(12):811.
21. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Niapour A, Bakhtiari M, Ghasemi Hamidabadi H. Improvement of neuroglial differentiation from human dental pulp stem cells using CSF. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016;26(140):1-14.
22. Suwijn SR, van Boheemen CJ, de Haan RJ, Tissingh G, Booij J, de Bie RM. The diagnostic accuracy of dopamine transporter SPECT imaging to detect nigrostriatal cell loss in patients with Parkinson's disease or clinically uncertain parkinsonism: a systematic review. *EJNMMI research*. 2015;5(1):12.
23. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(25):13625-30.
24. Alizadeh R, Bagher Z, Kamrava SK, Falah M, Hamidabadi HG, Boroujeni ME, et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells (MSC) to dopaminergic neurons: A comparison between Wharton's Jelly and olfactory mucosa as sources of MSCs. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2019;96:126-33.
25. Chang C-C, Chang K-C, Tsai S-J, Chang H-H, Lin C-P. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014;113(12):956-65.
26. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(12):1701-10.
27. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, García-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem cells international*. 2012;2012.
28. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005;2(3):484-94.
29. Darabi S, Noori-Zadeh A, Rajaei F, Abbaszadeh HA, Bakhtiyari S, Roozbahany NA. SMER28 Attenuates Dopaminergic Toxicity Mediated by 6-Hydroxydopamine in the Rats via Modulating Oxidative Burdens and Autophagy-Related Parameters. *Neurochemical research*. 2018;43(12):2313-23.
30. Choi W-S, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *The Journal of cell biology*. 2011;192(5):873-82.
31. Bojnordi MN, Azizi H, Skutella T, Movahedin M, Pourabdolhossein F, Shojaei A, et al. Differentiation of spermatogonia stem cells into functional mature neurons characterized with differential gene expression. *Molecular neurobiology*. 2017;54(7):5676-82.
32. Niapour N, Taghipour Z, Salehi H, Bagheri A, Rouhani A, Talebi M, et al. Isolation and identification of mesenchymal and neural crest characteristics of dental pulp derived stem cells. *Koomesh*. 2015;16(4).
33. Preynat-Seauve O, Burkhard PR, Villard J, Zingg W, Ginovart N, Feki A, et al. Pluripotent stem cells as new drugs? The example of Parkinson's disease. *International journal of pharmaceutics* 2009;381(2):113-21.