NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/50 , 2023

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[1,2], Mazaher Gholipourmalekabadi[3], Hatef Ghasemi Hamidabadi[*1, 2], Hassan Keshavarz[4]

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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره ۵۰ - بهار ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

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 [۱،۲]، مظاهر قلی پور ملک آبادی [۳]،
هاتف قاسمی حمیدآبادی* [۱،۲]، حسن کشاورز [۴]

۱. گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، 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 توجه‌به قرابت جنین شناختی که با سلول‌های اکتومزانشیمی 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 ایمنوسایتوشیمی 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 *Nestin* و *Sox2* با شروع روند تمایز به‌تدریج کاهش یافته‌اند ولی طی افزودن القاگرهای عصبی میزان بروز ژن‌های دخیل در فرآیند نوروژنزیس/ دوپامینرژیک مثل *PITX3, ,DAT ,TH ,Nurr1 ,PITX3* افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت‌به گروه کنترل نشان داد. ارزیابی ایمونوسایتوشیمی نشان داد که سلول‌های بیان کننده تیروزین هیدروکسیلاز (Tirozin hidroksilaz,TH) نیز در گروه تیمار مشاهده گردید. علاوه‌بر این، میزان ترشح دوپامین در گروه تیمار بطور قابل توجهی افزایش یافته است ($P <$ ۰/۰۵).

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

دژنراسیون نورون‌های تولیدکننده دوپامین (Dopamine neuron, DA neurons) در مغز میانی midbrain به‌خصوص 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 درمان های دارویی مرسوم شامل تجویز داروهایی 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 بیمارانی که تحت درمان دارویی مبتنی‌بر L-Dopamine هستند دچار عوارضی مثل Diskinesia می‌شوند. بنابراین، محققان در صدد روش‌های نوین درمانی جایگزین برای درمان بیمارن 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 نورون های 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 سول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی عصبی (Neural stem cells, NSCs) ، سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cells, ESCs)، سلول-های بنیادی القایی پرتوان (Induced pluripotent stem cells, IPSCs) و سلول های 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 به‌هیچ عنوان به لحاظ اخلاقی مشکلی ایجاد نمی‌کند. سلول‌های MSCs قادر به تمایز به‌سلول‌های 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 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 (۱۳-۹). 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 نسبت‌به 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 (۱۹-۸،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 (۲۲-۱۲،۲۰). 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(۱۱،۱۲،۱۴،۲۱،۲۳). 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 (۹،۱۶،۲۴). هم‌چنین نتایج مطالعه‌ای در شرایط In vitro در ارتباط با تمایز سلول‌های hDPSCs به سلول-های شبه نورونی است نشان داده است که در حضور فاکتورهای محرک القایی نورونی، شمار زیادی از سلول‌های hDPSCs تکثیر را متوقف کرده و به‌سمت تمایز متمایل می شوند (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 آنجایی‌که یکی از روش‌های مهم در حیطه تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان

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 وکشت سلول های 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 ۲۵– ۱۸ سال قرار داشتند و با در نظر گرفتن فرم رضایت فرد، جمع آوری شدند. دندان‌های قرار داده شده در محلول بافر فسفات (Phosphate-Buffered Saline, PBS) به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. به‌مدت ۵ دقیقه در محلول ضدعفونی یدین ۱۰ درصد (Povidone Iodine10%,Pejnan,Iran) قرار داده شدند. بعد از جداسازی، بافت پالپ با استفاده از پنس استریل به داخل دیشی که حاوی محیط کشت پایه (Gibco-Life Technologies, Canada) DMEM/F12 ، Fetal bovine serum, FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین (Gibco) ۱۰ Units/ml، استرپتومایسین (Gibco) Units/ml۰ ۱۰) بود انتقال داده شدند. بافت قطعه قطعه شده سپس پالپ در محلول حاوی تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco,USA) به‌مدت 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 به‌صورت 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 ۵-۳ مرتبه پاساژ داده شدند و برای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

تمایز سه مرحله‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان به نوروسفر

بدین صورت که به تعداد $۱۰^{۳} \times ۵$ 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 می گردد.

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 به‌مدت ۷ روز در نوربازال مدیومی که توسط(Shh) sonic hedgehog ،250ng/ml ،50ng/ml (Fibroblast growth factor 8 , وbFGF (FGF8)100ng/ml غنی شده‌اند، تیمار می گردند. سلول های ایجاد شده بعد از القاء به‌صورت روزانه مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

بررسی میزان زنده‌مانی hDPSCs پس از القای نوروژنیک:

بدین منظور $۱۰^{۳} \times ۵$ سلول در هر یک از مراحل القای نوروژنیک، به‌داخل هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. در ادامه به‌منظور سنجش کمیت سلول‌ها ۵ میلی‌گرم از پودر دی‌متیل تیازول‌دی 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 حل‌کردن بلورهای مذکور اضافه شد. سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA

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

تست RT-PCR

در پایان کل RNA سلول‌های تمایز یافته با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation Kit (Roche) مطابق پروتکل شرکت تولید کننده جدا شدند. سپس نسخه‌برداری معکوس بر روی ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد و روی cDNA به‌دست آمده PCR صورت گرفت. برای این منظور µl ۳cDNA (50 ng/µl)، از هر پرایمر Master، µl ۱ (۱۰ µM) ، ۱۲/۵ µl Mix 5x (سیناژن، PR 881606) و در 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 ژن‌های هدف از ژن GAPDH برای کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرها درجدول ۱ شرح داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرها.

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (°C))
Nurr1	F: CAAATAAAAACTGCCCAGTGGACAAG R: TGTCTGTGCGAACCACTTCTTTG	۶۲
PITX3	F: GCTCCCCAGAGGACGGTTC R: TTCTTGAACCACACCCGCAC	۶۰
TH	F: CGGATGAGGAAATTGAGAAGCTG R: AGACAGGCAGTGCAGGAGCTC	۶۱
DAT	F: CCCACTACGGAGCCTACATCTTC R: CGTAGGCCAGTTTCTCTCGAAAG	۶۰
Nestin	F: AAAGTTCCAGCTGGCTGTGG R: TCCAGCTTGGGGTCCTGAAA	۵۵
Sox2	F: AACCAGAAAAACAGCCCGGA R: AACCAGAAAAACAGCCCGGA	۵۷
GAPDH	F: AGCCACATCGCTCAGACACC R: GTACTCAGCGGCCAGCATCG	۶۱

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی نوروژنزیز در سلول‌های تمایز یافته به‌روش ایمونوسیتوشیمی انجام گرفت. سلول‌های ابتدا توسط PBS شستشو داده شده و سپس با پارافرمالدئید ۴ درصد (Sigma-Aldrich) Paraformaldehyde, PFA. به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. در مرحله بعد، سلول‌های تثبیت شده به‌منظور نفوذ پذیرکردن غشای سلول‌ها با استفاده از Triton X-100 (Sigma-Aldrich) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. هم‌چنین جهت مهار آنتی ژن‌های غیر اختصاصی به‌مدت ۴۵ دقیقه با Bovine serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich) انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها به‌مدت یک ساعت در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه Nestin (Rabbit polyclonal to Nestin, ab92391, abcam system, UK), βIII-tubulin (Rabbit polyclonal to βIII-tub,ab52901,UK), MAP2 (Rabbit polyclonal to MAP2, ab32454, abcam system, UK) and Tyrosine Hydroxylase, TH (Rabbit polyclonal to

TH, ab112, abcam primary قرار داده شدند. سپس سلول‌ها شستشو داده شده و به‌مدت 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

به‌منظور فراهم ساختن نمونه‌های برای آنالیز دوپامین به‌وسیله دستگاه HPLC ابتدا ۵۰۰ µl از نمونه سلولی با µl ۱۲۵ محلول perchloric acid نرمال، $Na_2S_2O_5$، Na_2-EDTA در معرض یکدیگر قرار گرفتند. سپس بر روی محلولی که روی یخ قرار گرفته بود، به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول سوپرناتانت در دمای ۸۰- نگه‌داری شدند و در ادامه نمونه‌ها به‌منظور اندازه‌گیری دوپامین به دستگاه HPLC ارزیابی و آنالیز شدند.

آنالیز آماری داده‌ها

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

یافته‌ها

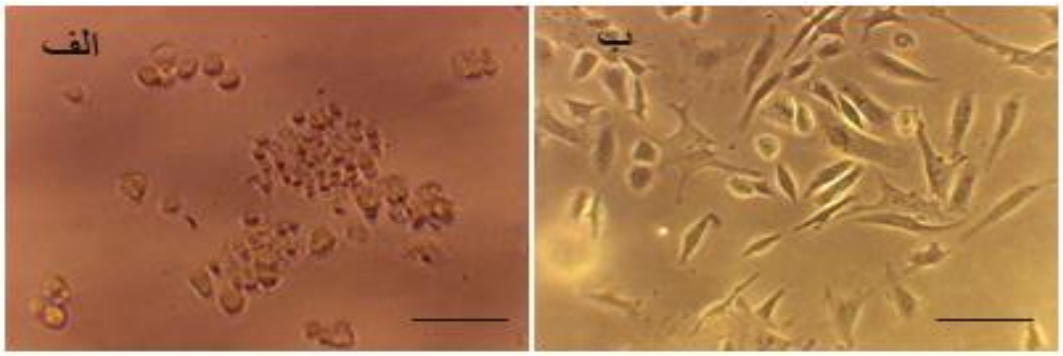
سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی پیش از القاء نوروژنیک، فنوتیپ دوکی شکل و ظاهر شبه فیبروبلاستی را از خود بروز دادند و نکته جالب این‌که فنوتیپ مذکور طی پاساژهای متوالی و در موقعیت‌های غیرالقایی حفظ گردید (شکل ۱ الف و ب).

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

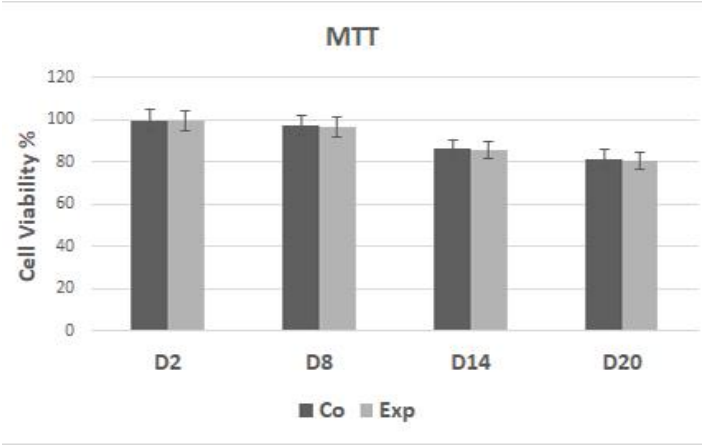
سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neuroprogenitor cells) و سلول عصبی بالغ به‌ترتیب با به‌کارگیری مارکرهای Nestin, MAP-2, βIII Tubulin و TH در مراحل مختلف تمایز مورد ارزیابی قرار گرفتند. (شکل۳).

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 به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۴).

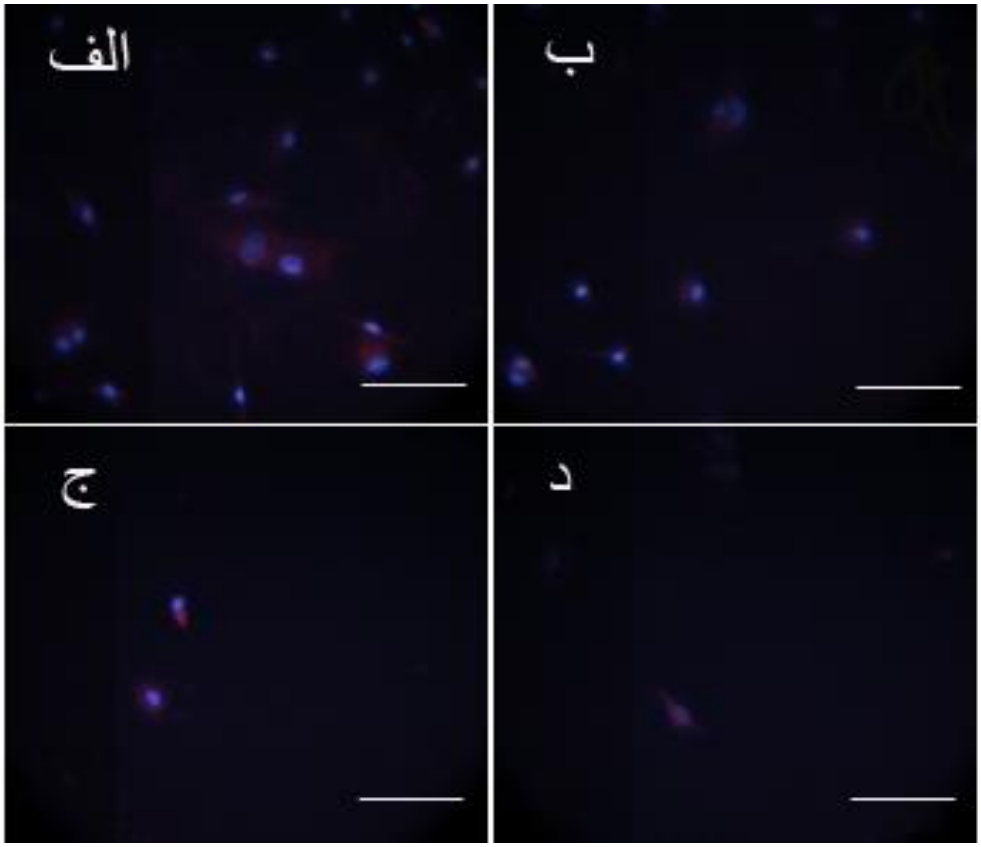
نتایج HPLC نشان داد که میزان دوپامین در گروه تیمار به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است، هر چند که در گروه کنترل نیز رها سازی دوپامین از سلول-های مزانشیمی حاصل گردیده است (شکل ۵).



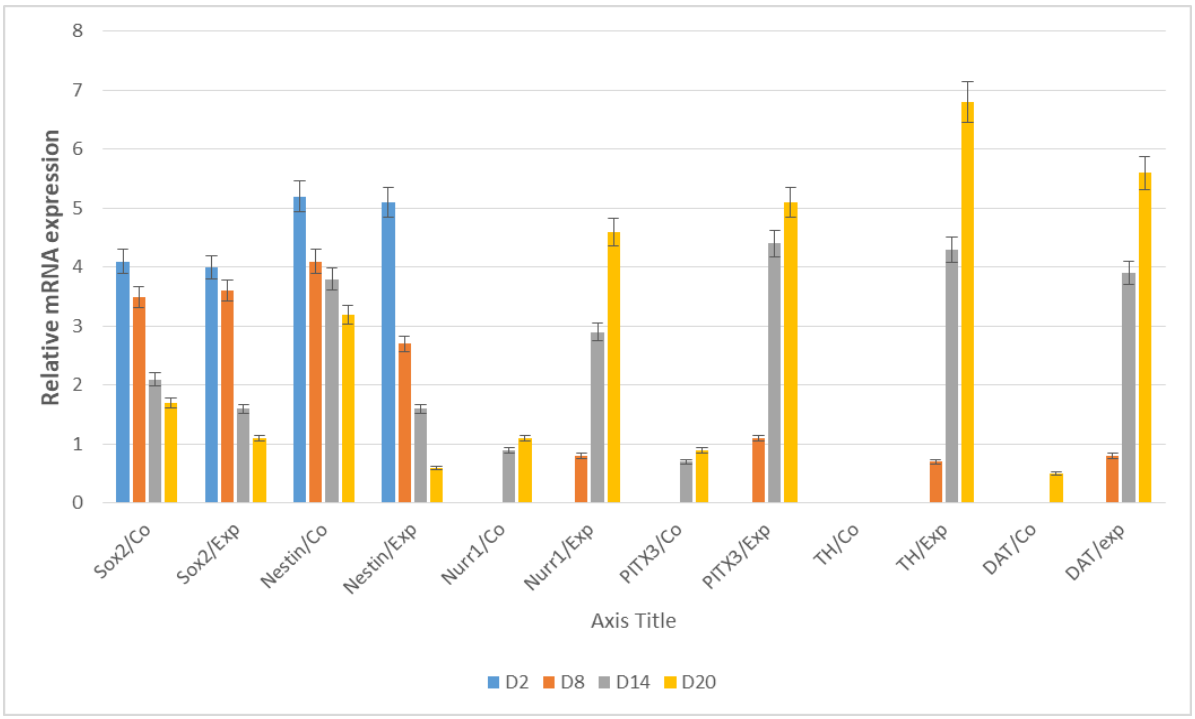
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست. (الف) کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی در روز سوم. (ب) پاساژ سوم (مقیاس µm ۱۰).



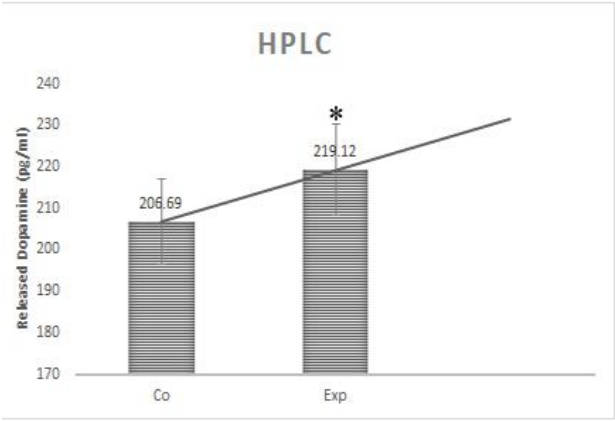
شکل ۲. تست زنده مانی. درصد سلول‌های زنده در گروه تیمار (Experimental group, Exp) نسبت‌به گروه (Control group, Co) در روزهای مختلف تمایز (روزهای ۲، ۸، ۱۴ و ۲۰ تمایز به‌ترتیب D14, D8, D2 و D21)



شکل ۳. ایمونوسیتوشیمی سلول‌های نورونی 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 βIII Tubulin در روز هشتم. (د) بیان نشانگر TH در روز چهاردهم (مقیاس ۱۰ mμ).



شکل ۴. ارزیابی RT-PCR. بررسی کمی بیان ژن‌های Sox2، Nestin، Nurr1، PITX3، TH و DAT در گروه‌های تیمار (Experimental group, Exp) نسبت‌به گروه کنترل (Control group, Co) در روزهای Day 2 (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 < ۰/۰۵ 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 دوپامینرژیکی هستند.

بیماری پارکینسون یکی از رایج‌ترین اختلال‌های مزمن پیش‌رونده مربوط به تخریب سیستم اعصاب مرکزی است که بعد از آلزایمر به‌عنوان دومین بیماری تخریب کننده 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 تحلیل رونده عصبی است که حاصل از دست رفتن تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک در جسم

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(۱،۲،۳،۱۲،۲۱،۲۶،۲۷). 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 (۲،۲۸،۲۹). 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 (۴،۳۰-۲). 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 سلول-های 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 سلول ها 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 توجه‌به قرابت جنین شناختی سلول‌های اکتو مزانشیمی پالپ دندان، این سلول ها دارای پتانسیل بالاتری نسبت‌به سایر سلول‌های مزانشیمی برای تمایز به نورون‌ها هستند. هم‌چنین اثرهای پاراکرین این سلول‌ها نیز در ترمیم آسیب-های عصبی مورد توجه قرار گرفته است (۱۱،۱۲،۲۳). 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 (۱۰،۱۵،۱۶،۲۲،۳۱،۳۲،۳۳). در بررسی نتایج ما، خصوصیت مورفولوژیکی سلول‌های جدا شده از پالپ دندان شامل، فنوتیپ شبه فیبروبلاستی و دوکی سلول‌ها و چسبندگی زیاد، توانایی تکثیر فراوان و کلون‌زایی همگی بنیادی بودن این سلول‌های مزانشیمی را به اثبات رسانده‌اند که با یافته‌های سایر محققین نیز مطابقت دارد (۴،۱۱،۱۲،۲۵،۲۳). 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 توجه‌ای 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 نوروژنیک، 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 کرستی 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 توجه‌ای بیش‌تر از گروه کنترل بود.

در این راستا، در بررسی‌های دیگر که بر روی سایر سلول-های 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 وارتون و موکوس بویایی انسان کمابیش یکسان است. علاوه‌بر این در مطالعه‌ای دیگر

اثبات شد که فاکتور رشد فیبروبلاستی۲ (FGF2)، می‌تواند به تنهایی به‌عنوان یک محرک برای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به نورون‌های 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 نورون‌های دوپامینرژیکی را دارند.

سپاسگزاری

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

منابع

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/chitosar 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, Brahim 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.