ORIGINAL ARTICLE

Improvement of Neuroglial Differentiation from Human Dental Pulp Stem Cells Using CSF

Sara Haratizadeh[1],
Maryam Nazm Bojnordi[2,3],
Ali Niapour[4],
Mehrdad Bakhtiari[5],
Hatef Ghasemi Hamidabadi[2,6]

[1] MSc Student in Anatoimical Sciences, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Molecular and Cell biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[4] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[5] Associate Professor, Department of Anatomy & Cell Biology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] Assistant Professor, Immunogenetic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received January 26, 2016 ; Accepted August 8, 2016)

Abstract

Background and purpose: Cerebrospinal fluid (CSF) has a broad set of molecules which is essential for neurogenesis. Human dental pulp stem cells (hDPSCs) are putatively neural crest cell-derived that can differentiate into neurons and glial cells under appropriate neurotrophic factors. The aim of this study was to induce differentiation of hDPSCs into neuroglial phenotypes using Retinoic acid (RA) and CSF.

Materials and methods: The hDPSCs were isolated by mechanical enzymatic digestion from an impacted third molar and cultured. 2×10^5 cells were treated by 10^{-7} µM Retinoic acid (RA group) for 8 days, CSF (CSF group) for 8 days and pre-induced with RA for 4 days followed by inducing with CSF for 4 days (RC group). Nestin, βIII-tubulin and GFAP immunostaining were used for evaluating the differentiated cells. Axonal outgrowth was detected using Bielschowsky's silver impregnation method and Nissl bodies were stained in differentiated cells by Cresyl violet. Data analysis was performed in SPSS V.16 applying One-way ANOVA and Chi-square test.

Results: The morphology of differentiated cells in treated groups significantly changed after 3-5 days. The immunocytochemistry results showed that nestin, the neuroprogenitor marker, was observed in all groups. Whereas, a high percentage of nestin positive cells and BIII-tubulin, as mature neural markers, were seen at the pre-induction and induction stage, respectively. Nissl bodies were detected as dark-blue particles in the cytoplasm of treated cells.

Conclusion: The findings suggest that the RA as pre-inducer and CSF as inducer could be used for in vitro differentiation of neuroglial cells from hDPSCs.

Keywords: hDPSCs, cerebrospinal fluid, retinoic acid, neuroglial, differentiation

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(140): 1-14 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۰ شهریور سال ۱۳۹۵ (۱۴-۱)

بهبود تمایز نوروگلیال از سلول های بنیادی پالپ دندان انسانی توسط مایع مغزی-نخاعی

سارا هراتی زاده[۱]
مریم نظم بجنوردی[۲،۳]
علی نیاپور[۴]
مهرداد بختیاری[۵]
هاتف قاسمی حمیدآبادی[۲،۶]

چکیده

سابقه و هدف: مایع مغزی- نخاعی (CSF) دارای طیف وسیعی از مولکول‌های ضروری در فرآیند نوروژنزیس است. سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی (hDPSCs) که از سلول‌های ستیغ عصبی مشتق شده‌اند، می‌توانند در حضور فاکتورهای نوروتروفیک مناسب به سلول‌های گلیال و نورون تمایز یابند. هدف از این مطالعه القای تمایز hDPSCs به سلول‌های نوروگلیال با استفاده از اسید رتینوئیک و CSF است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، hDPSCs از دندان مولار سوم انسانی به روش مکانیکی- آنزیمی جدا و کشت داده شدند. $۱۰^۵ \times ۲$ سلول به هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای منتقل و با اسیدرتینوئیک (گروه ۱، گروه RA) و CSF (گروه ۲، گروه CSF) به مدت ۸ روز القاء شدند. هم‌چنین به مدت ۴ روز توسط اسید رتینوئیک و ۴ روز توسط CSF (گروه ۳، گروه RC) تیمار شدند. ایمنوسیتوشیمی Nestin، βIII-tubulin و GFAP جهت ارزیابی استفاده شدند. طول آکسون سلول‌ها به روش نیترات نقره بررسی و اجسام نیسل با کریزل ویوله رنگ‌آمیزی شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS 16 و با آزمون‌های آماری One-way ANOVA و Chi Square انجام گرفت.

یافته‌ها: مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته به طور مشخص در گروه‌های تمایزی بعد از روز ۵-۳ تغییر یافت. نتایج ایمنوسیتوشیمی نشان داد که Nestin در همه گروه‌ها بیان شد. هم‌چنین بیش‌ترین درصد سلول‌های بیان‌کننده Nestin و βIII-tubulin به ترتیب در مراحل پیش‌القایی و القایی مشاهده شدند. اجسام نیسل به صورت ذرات توپر بنفش رنگ در سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته شناسایی شدند.

استنتاج: یافته‌ها نشان می‌دهد که می‌توان از اسید رتینوئیک به عنوان پیش القاگر و CSF به عنوان القاگر جهت تمایز در شرایط آزمایشگاهی hDPSCs به سلول‌های نوروگلیال استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سلول بنیادی پالپ دندان انسانی، مایع مغزی-نخاعی، اسید رتینوئیک، نوروگلیال، تمایز

مقدمه

تاکنون مطالعات بسیاری بر روی سلول‌های بنیادی بزرگسال (Adult Stem Cells, ASCs) در سطوح مختلف صورت گرفته است که منجر به پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه سلول درمانی و بهبود بیماری‌های

مولف مسئول: هاتف قاسمی حمیدآبادی- ساری: کیومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:h.ghasemi@mazums.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۵. دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۶. استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۸

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

گوناگون ازجمله اختلالات نورولوژیک شده است(۳-۱). مزیت مهم سلول‌های بنیادی بزرگسال، قابلیت استفاده از سلول‌های خود شخص برای درمان نواحی آسیب‌دیده و در نتیجه عدم برانگیختگی سیستم ایمنی است(۴). ASCs در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار می‌گیرند و در بافت‌هایی نظیر مغز استخوان یافت می‌شوند. در همین راستا در سال ۲۰۰۰، گروه جدیدی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بزرگسال به نام سلول بنیادی پالپ دندان (Dental Pulp Stem Cells) کشف شد که از نظر منشا جنینی و ویژگی‌های بیولوژیک با سایر سلول‌های مزانشیمی متفاوت است(۶،۵). این سلول‌ها را می‌توان از پالپ دندان انسان و رباط دور دندانی استخراج کرد. سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی (Human Dental Pulp Stem Cells,hDPSCs) حاصل مهاجرت سلول‌های اکتودرمی با منشا ستیغ عصبی (Neural Crest) کرانیال به ناحیه دهانی هستند که به فنوتیپ مزانشیمی در مراحل ابتدایی تکوین، تمایز می‌یابند(۷). در بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که hDPSCs با بیان نشانگر CD34 جزو سلول‌های بنیادی پیش ساز استرومایی قرار می‌گیرند(۸). این سلول‌های اکتومزانشیمی، ویژگی‌های حائز اهمیتی مثل قدرت تکثیر بالا، دسترسی آسان، قابلیت زنده بودن به مدت طولانی، توانایی خودبازسازی و کلون‌سازی قوی و توانایی گریز از سیستم ایمنی میزبان را دارند. علاوه بر این، hDPSCs توانایی تمایز به چندین رده سلولی از جمله دودمان های سلولی نوروژنیک، استئوژنیک و میوژنیک را دارا می‌باشند. این سلول‌ها پس از القای نورونی، نشانگرهای O1، GFAP، Nestin و βIII-tub که به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های الیگودندروسیت، آستروسیت، پیش‌ساز عصبی و نورون بالغ هستند را بیان می‌کنند(۱۰،۹،۷،۵). هم‌چنین hDPSCs در مقایسه با سایر سلول‌های بنیادی به دلایلی از جمله تکثیر سریع‌تر، امکان استفاده به صورت اتولوگ، نداشتن مشکلات اخلاقی در زمینه استخراج آن، حفظ قابلیت چندتمایزی خود بعد از فریز به مدت طولانی، توانایی بالاتر در سرکوب سیستم ایمنی میزبان و فعالیت بیش‌تر متابولیکی در زمینه تحقیقات کلینیکال، ارجحیت دارد(۱۳-۱۱). از آن جایی‌که یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، تغییر مسیر تمایزی تحت تاثیر شرایط محیطی است و با تغییر شرایط محیطی، رشد و تکثیر آن ها در جهت تمایزی خاصی قرار می‌گیرد، القاگرهای گوناگونی به منظور تمایز سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی به سمت دودمان سلولی مورد نظر به‌طور اختصاصی در محیط آزمایشگاهی به کار رفته است(۱۵،۱۴). موادی مانند رتینوئیک اسید، bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) و EGF (Epidermal Growth Factor) به عنوان القاگر عصبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۱۶-۱۸). با این که مطالعات بسیاری بر روی مایع مغزی- نخاعی (Cerebrospinal fluid, CSF) انجام شده است، اما اطلاعات محدودی در مورد اثرات تمایزی آن مشابه آن چه در زمان جنینی رخ می‌دهد، در دسترس محققین قرار دارد(۲۱-۱۹). CSF مایعی است که از زمان جنینی تا آخر عمر هر شخص درون مجاری و بطن‌های مغزی جریان دارد و نقش مهمی را در تکوین مغزی در دوران جنینی، درناژ مواد متابولیک سیستم عصبی و انتقال فاکتورهای حیاتی به قسمت‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System,CNS) بازی می‌کند. در مراحل ابتدایی تکوین، لوله عصبی مملو از مایعی از جنس مایع آمنیوتیک است. در ادامه در اثر ترشحات ساختاری در مزانسفال به نام شبکه کوروئید، ماهیت آن تغییر می‌کند و به مایعی غنی از فاکتورهای تحریک‌کننده تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل می‌شود(۲۰). از آن‌جایی‌که CSF در تماس مستقیم با شبکه کوروئید و سلول‌های بنیادی عصبی است، می‌تواند مواد بسیاری از جمله فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، مولکول‌های چسبنده و بسیاری مواد دیگر در تکثیر و تمایز سلول‌ها را در خود جای دهد و مبادله کند(۲۱). امروزه با آنالیز دقیق محتویات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

CSF مشخص شده است که حاوی فاکتورهای رشد و نوروترفیک بسیاری است(۲۲-۲۰). هم‌چنین تحقیقات نشان می‌دهد که مواد گوناگون موجود در CSF در سال‌های مختلف عمر، متفاوت است و CSF جنینی دارای بیش‌ترین مقادیر مواد موثر در تکوین CNS به ویژه پلی‌پپتیدها است که ۲۰ درصد را از نورون‌ها، سلول‌های گلیال و سلول‌های لپتومننژ و ۸۵ درصد را از خون یا شبکه کوروئید دریافت می‌کند و در زمان جنینی در حفاظت، حمایت،تغذیه و تکوین CNS نقش به‌سزایی‌دارد(۲۴،۲۳،۲۰). هم‌چنین تحقیقات در in vitro و in vivo نشان می‌دهد که CSF توانایی تمایز و تکثیر سلول‌های جنینی قشر مغز و ترمیم رشته‌های آسیب دیده عصبی را دارد(۲۴).

با توجه به نقش حیاتی CSF در روند تکوین مغزی و داشتن مواد متابولیک ضروری، به نظر می‌رسد می‌تواند در تمایز سلول‌های بنیادی مختلف به سمت سلول گلیال و سلول عصبی بالغ در شرایط آزمایشگاهی مفید واقع شود. از طرفی به علت منشا مشترک hDPSCs با سلول‌های عصبی، این سلول‌ها دارای پتانسیل تمایزی به رده سلول گلیالی و عصبی هستند(۲۳،۸). هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی روند تمایز سلول های hDPSCs در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های نوروگلیال با استفاده از القاگرهای اسیدرتینوئیک و CSF است.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسانی:

در این پژوهش تجربی، از دندان مولار سوم انسانی جهت استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت پالپ دندان استفاده شد. این دندان‌ها به صورت سالم و بدون پوسیدگی از بیماران ۱۸-۲۵ ساله مراجعه‌کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جمع‌آوری و در محلول بافر فسفات (Phosphate-buffered Saline, PBS) به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. سپس به منظور ضدعفونی، دندان به مدت ۵ دقیقه در محلول یدین (Povidone Iodine10%,Pejnan,Iran) قرار گرفت. در ادامه با سپراتور و کاتر جراحی، عاج و ریشه از هم جدا و پالپ با پنس استریل به داخل پتری دیشی که حاوی DMEM/F12 (Gibco-Life Technologies, Canada)، ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum, FBS)، 100 Units/ml پنی‌سیلین (Gibco) و 100Units/ml استرپتومایسین (Gibco) بود (محیط کشت پایه)، منتقل گردید و سپس با استفاده از اسکالپل، قطعه قطعه شد. در مرحله بعد قطعات بافتی در محلول حاوی تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco,USA) به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از این مرحله، قطعات بافتی و تریپسین موجود در لوله فالکون سانتریفیوژ شده، محلول رویی خارج و بافت لیز شده به داخل فلاسک کشت سلول ۲۵ میلی‌لیتری محتوی محیط کشت پایه انتقال یافت و در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و شرایط رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند. هر ۲-۳ روز یک بار، فلاسک در زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده و محیط کشت فلاسک سلولی تعویض شد. پس از پر شدن کف فلاسک (۷۰-۸۰ درصد)، سلول‌ها با استفاده از تریپسین جدا و پاساژ داده شدند. به منظور خالص‌سازی سلول‌های مزانشیمی پالپ دندان از پاساژ ۳- ۵ استفاده شد(۱۱).

جمع‌آوری و نگهداری مایع مغزی- نخاعی

مایع مغزی- نخاعی از نوزاد یک روزه موش صحرایی نژاد Sparagu Dawly تهیه شد. بدین‌صورت که در شرایط استریل، مایع مغزی- نخاعی از ناحیه Cisterna Magna جمع‌آوری و به میکروتیوب استریل منتقل شد. به منظور جلوگیری از آسپیره‌نمودن و خونریزی، از پیپت پاستور جهت جمع‌آوری CSF استفاده شد. پس از سانتریفوژ نمودن با دور rpm ۱۴۰۰، مایع رویی به منظور ادامه روند پژوهش در دمای C° ۸۰- نگه‌داری شد(۲۰).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

بررسی میزان زنده مانی hDPSCs در حضور غلظت‌های مختلف CSF

برای به دست‌آوردن غلظت موثر CSF جهت القای تمایز عصبی و تکثیر سلول‌های مذکور، مقدار ۵×۱۰۳ سلول به داخل هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. پس از اطمینان از چسبندگی سلول‌ها به کف پلیت، درصدهای مختلف CSF (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰) رقیق شده در محیط کشت پایه به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و سلول‌ها به صورت روزانه به مدت ۷ روز با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. سپس به منظور سنجش کمیت سلول‌ها، ۵ میلی‌گرم از پودر دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید (Dimethylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, 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 هر یک از چاهک‌ها حدود ۲۰۰ میکرولیتر (Dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich) جهت حل‌کردن بلورهای مذکور اضافه شد. سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza plate reader (Synergy H11, Bio Tek, USA) محاسبه گردید(۲۰).

القائ تمایز عصبی و گلیالی:

نحوه القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان بدین صورت بود که ابتدا ۲×۱۰۵ سلول به هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای اضافه و به مدت یک شبانه‌روز در محیط کشت حاوی ۱ درصد سرم جنین گاوی قرار داده شد. پس از حصول از چسبندگی سلول‌ها به کف فلاسک، سلول‌ها به مدت ۸ روز تحت القائات مایع مغزی- نخاعی (برمبنای نتایج حاصل از تست زنده مانی) و اسیدرتینوئیک RA (R2625-100MG, Sigma-Aldrich) به شرح زیر قرار گرفتند:

به تعدادی از چاهک‌ها اسید رتینوئیک به غلظت 10^{-7}µm اضافه گردید (گروه ۱، گروه RA)، به تعدادی دیگر از چاهک‌ها CSF۱۰ درصد اضافه شد (گروه ۲، گروه CSF). علاوه بر این، برخی از چاهک‌ها نیز به مدت ۴ روز تحت تیمار اسیدرتینوئیک به غلظت 10^{-7}µm قرار گرفتند که به عنوان مرحله پیش‌القاء (Pre-induction stage) و در ادامه نیز به مدت ۴ روز تحت القای CSF تیمار شدند (گروه ۳، گروه RC) که تحت عنوان مرحله القاء (Induction stage) در نظر گرفته شدند. هم چنین تعدادی از چاهک‌ها نیز در محیط کشت پایه قرار داده شدند و به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند (گروه ۴، گروه Co). لازم به ذکر است محیط کشت پایه استفاده شده جهت القای تمایز دارای یک درصد سرم بود. تعویض محیط هر دو روز یک بار در طول زمان تمایز صورت گرفت. بدین ترتیب که در هر بار تعویض، حدود ۵۰ درصد از محیط رویی هر چاهک دور ریخته شده و محیط کشت تازه و مشابه (Refresh) جایگزین گردید(۱۷،۲۱،۲۵). ارزیابی‌های مورفولوژیک: مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته در گروه‌های مختلف، توسط میکروسکوپ معکوس (Nikon,Eclipse-TS100) به صورت روزانه مشاهده و بررسی گردید.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

بررسی بیان مارکرهای نورگلیال در سلول‌های حاصل از تمایز به روش ایمونوسیتوشیمی انجام گرفت. سلول‌ها پس از سه بار شستشو با PBS توسط پارافرمالدئید ۴ درصد (*Paraformaldehyde*, PFA Sigma-Aldrich) به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. در مرحله بعد، به منظور

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

نفوذ پذیری سلول‌ها و مهار آنتی ژن‌های غیراختصاصی به ترتیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با Triton X-100 (Sigma-Aldrich) و به مدت ۴۵ دقیقه با BSA (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) انکوبه شدند. پس از آن به مدت یک ساعت با آنتی بادی‌های اولیه Rabbit to Nestin (ab92391) βIII-tubulin (βIII-tub, ab52901), Rabbit to و Rabbit to GFAP (ab7260) انکوبه شدند و در نهایت سلول‌ها پس از سه مرتبه شستشو با PBS به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با آنتی بادی های ثانویه Donkey anti-Rabbit Phycoerythrin (ab7007) و Goat anti-Rabbit (ab7086) نگه‌داری شدند. تشخیص افتراقی هسته سلول‌ها با DAPI (Sigma-Aldrich) انجام شد. سرانجام سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Eclipse-TE600, Japan) بررسی و عکس‌برداری صورت گرفت(۲۵).

مطالعات سایتولوژیک سلول‌های تمایز یافته (Cytological Studies of the Differentiated Cells)

بدین‌منظور جهت شناسایی سلول‌های تمایز یافته از دو رنگ‌آمیزی اختصاصی سایتولوژیک به شرح زیر استفاده شد:

الف) رنگ‌آمیزی اختصاصی کریزل‌فست‌ویوله:

به منظور شناسایی و رنگ‌آمیزی اجسام نیسل موجود در سلول‌های تمایز یافته از رنگ‌آمیزی اختصاصی کریزیل‌فست‌ویوله (Cresyl Echt Violet Stain, Merck Germany) در پایان روز تیمار استفاده شد. به این‌صورت که ابتدا سلول‌ها به وسیله PFA به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند و پس از سه بار شستشو با PBS، سلول‌های گروه‌های مختلف به وسیله رنگ کریزیل‌فست‌ویوله ۱ درصد به مدت ۲ - ۳ دقیقه رنگ‌آمیزی و اجسام نیسل بنفش در سلول‌های واکنش مثبت با میکروسکوپ نوری بررسی و محاسبه شدند.

ب) رنگ آمیزی بیل‌شوسکی‌نقره

جهت اندازه‌گیری طول آکسون سلول‌های مذکور، رنگ‌آمیزی بیل‌شوسکی‌نقره (Bielschowsky´s silver) به کار رفت. بدین منظور ابتدا سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول نیترات نقره و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در محلول نیترات نقره آمونیاکی قرار گرفتند. در ادامه پلیت سلولی به ترتیب در محلول کاری Developer (مخلوطی از فرمالین، اسیدسیتریک، اسیدنیتریک، آمونیاک و آب مقطر) و هیدروکسید آمونیوم به مدت ۱ دقیقه قرار گرفته و مجدداً در آب مقطر شسته شد. پس از آن به منظور توقف واکنش، ۵ دقیقه محلول تیوسولفات سدیم روی سلول‌ها ریخته و سپس شسته شد. سرانجام سلول‌های تمایز یافته با آکسون قهوه‌ای تیره تا سیاه جهت اندازه‌گیری طول آکسون در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که بزرگ‌ترین استطاله عصبی به عنوان آکسون در نظر گرفته شد و طول این زوائد در پایان روز تیمار در گروه‌های مختلف توسط نرم‌افزار Image J ۱.۴۱ اندازه‌گیری و محاسبه شد(۲۱).

آنالیز آماری داده‌ها

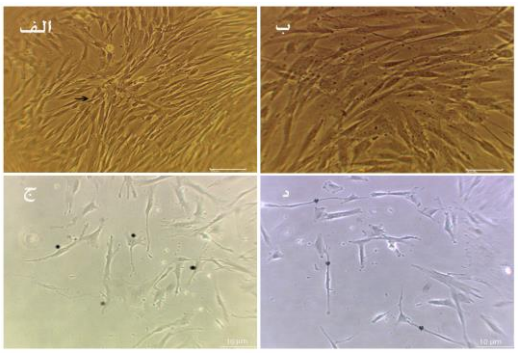
جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروه‌ها از آزمون آماری One-way ANOVA و Chi Square استفاده شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت و علاوه بر این سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

ارزیابی‌های مورفولوژیک به عمل آمده نشان داد که اکثر سلول‌های پالپ دندان به صورت شبه‌فیبروبلاستی دراز (elongated) طی هفته اول کشت سلولی مشاهده شدند (تصویر شماره ۱- الف). به طور طبیعی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان پس از ۳ الی ۴ روز به ۷۰-۸۰ درصد تراکم رسیدند و قادر به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

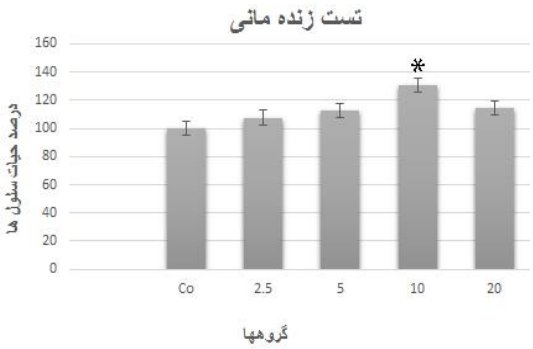
ایجاد کلون‌زایی در محیط کشت بودند. هم‌چنین فنوتیپ شبه‌فیبروبلاستی و دوکی‌شکل در پاساژهای متوالی و موقعیت‌های غیرالقایی حفظ گردید وبرای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۱- ب).



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست. (الف) سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان طی هفته اول کشت به صورت شبه‌فیبروبلاستی و دوکی‌شکل مشاهده شدند (علامت پیکان نشان‌دهنده ویژگی کلون‌زایی)، (ب) پس از پاساژ سوم، فنوتیپ شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل سلول‌ها حفظ شدند، (ج) سلول‌های شبهنورونی و شبه‌گلیالی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان در گروه‌های تحت تیمار با مایع مغزی‌نخاعی (علامت ستاره بیانگر مورفولوژی الیگودندروسیت)، (د) ترکیب توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- خاعی (علامت سرپیکان نشان دهنده آکسون). (مقیاس ۱۰ میکرومتر).

تغییرات مورفولوژیکی در تمامی گروه‌های تیمار قابل مشاهده بودند. این تغییرات شامل پدیدار شدن سلول‌هایی با اجسام سلولی دوقطبی (Bipolar) و چندقطبی (Multipolar)، هسته نسبتاً بزرگ یوکروماتین با هستک واضح و سیتوپلاسم غنی از گرانول بودند (تصویر شماره ۱-ج و د). علاوه بر این، جمعیت کمی از سلول‌ها با ظاهر شبه الیگودندروسیتی گرد و کوچک نیز مشاهده گردیدند که این پدیده بیش‌تر در گروه‌های تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی (گروه‌های CSF و RC) دیده شد (تصویر شماره ۱-ج و د). نکته قابل توجه این که در برخی از موارد، سلول‌ها تا حدی زوائد سیتوپلاسمی خود را گسترش دادند و با سلول‌های مجاور خود، سیناپس برقرار کردند. علاوه بر این در انتهای زوائد سلولی نواحی دگمه مانند (Button like) برجسته‌ای یافت شد که احتمالاً دلیلی بر ارتباط عملکردی، بین نورون‌های مذکور می‌باشد. ساختارهای مذکور تنها در گروه RC و در مرحله القاء (Induction stage) مشاهده شدند (تصویر شماره ۱- د).

نتایج حاصل از تست زنده‌مانی (MTT) غلظت‌های مختلف مایع مغزی- نخاعی بر میزان بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان حاکی از این است که درصد بقاء سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی- خاعی بیش‌تر از گروه کنترل است، به طوری که حداکثر میزان زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت ۱۰ درصد مایع مغزی- نخاعی مشاهده شد (نمودار شماره ۱).

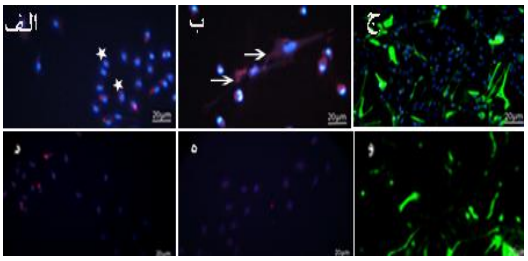


نمودار شماره ۱: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف مایع مغزی- خاعی بر درصد بقاء سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان پس از یک هفته بر مبنای سنجش MTT (*P<0.05).

در مطالعات ایمونوسیتوشیمی به منظور شناسایی سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neuroprogenitor cells) و سلول‌های عصبی بالغ به‌ترتیب از نشانگرهای Nestin و βIII-tub استفاده شد. هم‌چنین جهت شناسایی آستروسیت‌ها از نشانگر خاص آستروسیتی GFAP استفاده شد. علاوه بر این، تعداد سلول‌های بیان کننده نشانگرهای اختصاصی سلول‌های عصبی و گلیالی در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که شمارش سلولی توسط نرم‌افزار Image J صورت گرفته ست و نتیجه حاصل به صورت درصد در تصویر شماره ۲ ارائه شده ست. حداکثر درصد سلول‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

بیان‌کننده نشانگر Nestin در گروه تحت تیمار اسیدرتینوئیک و گروه RC به ترتیب در روزهای هشتم و چهارم مشاهده شد که به طور قابل توجهی از سایر گروه‌ها بیش‌تر بود، هر چند که سلول‌های پیش ساز عصبی در گروه تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی نیز مشاهده شدند. در حالی که سلول‌های بیان‌کننده نشانگر βIII-tub در گروه تحت القاء مایع مغزی-نخاعی دیده شدند. به‌طوری که بیش‌ترین درصد سلول‌های بیان‌کننده βIII-tub در گروه تحت‌القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی بود (جدول شماره ۱). بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که بیش‌ترین درصد سلول‌های بروزدهنده نشانگر آستروسیتی در گروه‌های تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی مشاهده شدند (جدول شماره ۱).



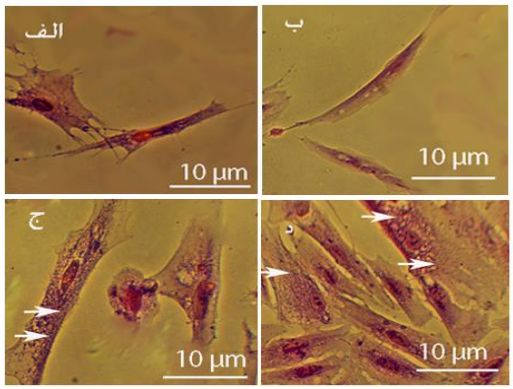
تصویر شماره۲: ایمونوسیتوشیمی سلول‌های شبه‌نورونی و شبه‌آستروسیتی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان. (الف) بیان نشانگر Nestin در روز چهارم گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی. (ب) بیان نشانگر βIII-tub در روز هشتم گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی. (ج) بیان نشانگر خاص آستروسیتی در روز هشتم گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی. (د) بیان نشانگر Nestin در گروه کنترل. (ه) بیان نشانگر βIII-tub در گروه کنترل. (و) بیان نشانگر خاص آستروسیتی در گروه کنترل. مقیاس 20µm.

یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی کریزل‌ویولت نشان داد که در تمامی گروه‌های تیمار، سلول‌های شبه‌عصبی، واکنش مثبت نشان داده‌اند و اجسام کروی‌شکل به مشابه اجسام نیسل در درون سیتوپلاسم سلول‌های مذکور دیده شدند (تصویر شماره ۳). نکته قابل توجه این که در گروه کنترل نیز سلول‌های واکنش مثبت رویت شدند. در ادامه سلول‌های واکنش مثبت شمارش و نتایج حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (تصویر شماره ۳ و نمودار شماره ۲). میانگین درصد سلول‌های با فنوتیپ عصبی در گروه‌های تیمار به طور قابل توجهی بیش تر از گروه کنترل بود. علاوه بر این حداکثر سلول‌های با فنوتیپ عصبی در گروه RC مشاهده شد که نسبت به سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است.(تصویر شماره ۳ و نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۱: نتایج درصد بیان Nestin، βIII-tub و GFAP در گروه‌های تحت تیمار

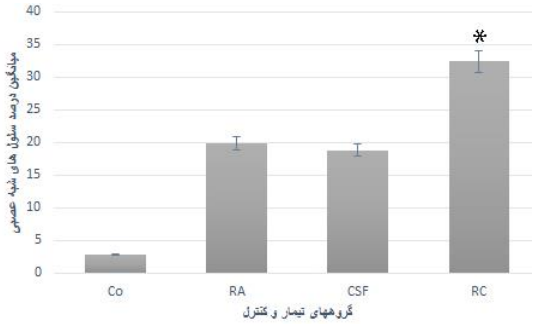
گروه ها	Co انحراف معیار ± میانگین	RA انحراف معیار ± میانگین	CSF انحراف معیار ± میانگین	RC انحراف معیار ± میانگین
D4	۰/۱ ± ۲	۰/۱۳ ± ۲۸	۰/۱۱ ± ۱۹	۰/۰۷ ± ۲۷
D8	[b]۸±۰/۰۴	۰/۱۲ ± ۶۷	[b]۰/۱۲ ± ۳۱	[b]۰/۱۵ ± ۳۷
D4	۰	۰	۰	۰
D8	۰	[c]۰/۰۱ ± ۲	[c]۰/۰۳ ± ۸	۰/۰۴ ± ۱۷
D4	[d]۰/۱۱ ± ۴	[d]۰/۱۱ ± ۳۸	۰/۰۹ ± ۴۵	[d]۰/۱۳ ± ۳۴
D8	[e]۰/۰۵ ± ۱۱	[e]۰/۰۹ ± ۲۷	۰/۱۲ ± ۶۷	[e]۰/۰۹ ± ۴۵

(RA): گروه تحت القاء اسیدرتینوئیک.
(CSF): گروه تحت القاء مایع مغزی- نخاعی.
(RC): گروه توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی.
(Co): گروه کنترل.
a. اختلاف معنی‌دار با گروه‌های CSF و کنترل.
b. اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها.
c. اختلاف معنی دار با سایر گروه‌ها.
d. اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها.
e. اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها ($p < ۰/۰۵$)

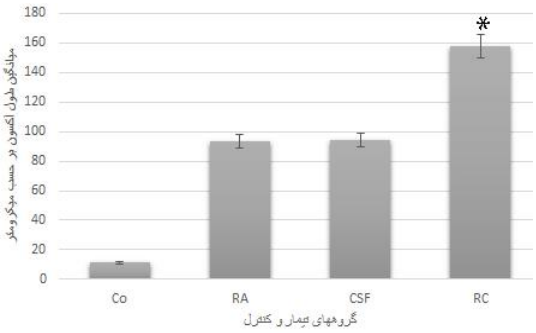


تصویر شماره ۳: رنگ‌آمیزی کریزل‌ویوله. سلول‌های شبه‌نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان در روز هشتم. (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی_نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی (RC) (مقیاس ۱۰ میکرومتر). علامت فلش بیانگر محل های واکنش است

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

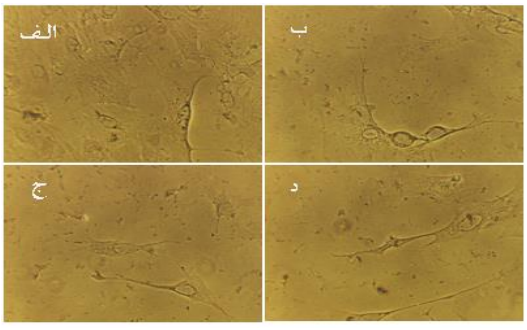


نمودار شماره ۲: میانگین درصد سلول‌های با فنوتیپ شبه‌عصبی در (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی-نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی (p <۰/۰۵)



نمودار شماره ۳: میانگین طول آکسون در (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی_نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی (*P<0.05).

نتایج رنگ‌آمیزی نیترات نقره دال بر حضور زوائد شبه‌آکسونی و دندریتی (نوریت‌ها) در سلول‌های تمایز یافته است. در پژوهش حاضر زوائد هم اندازه یا بزرگ‌تر از قطر جسم سلولی به عنوان آکسون در نظر گرفته شده و بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شدند. زوائد شبه‌آکسونی از روز سوم در گروه‌های تحت تیمار قابل مشاهده و اندازه‌گیری بودند. حداکثر طول آکسون در گروه تحت القائ مایع مغزی- نخاعی در روز هشتم مشاهده شد که نسبت به گروه تحت تیمار اسیدرتینوئیک تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. اما حداکثر طول آکسون در گروه RC دیده شد که نسبت به سایر گروه‌های تیمار افزایش معنی‌داری داشت (تصویر شماره ۴ و نمودار شماره ۳).



تصویر شماره ۴: میزان رشد آکسون در (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی_نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی (RC) (مقیاس ۲۰ میکرومتر)

بحث

در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان مولار سوم استفاده شده‌است. جهت حصول اطمینان از بنیادی بودن (Stemness) سلول‌های مزانشیمی مشتق از پالپ دندان، ابتدا خصوصیت غیرتمایزی این سلول‌ها به لحاظ مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارزیابی‌ها نشان داد که فنوتیپ شبه‌فیبروبلاستی دراز و دوکی شکل سلول‌ها طی پاساژهای متوالی حفظ گردید. علاوه بر این، قابلیت چسبندگی زیاد، توان تکثیر بالا و خصوصیت کلون‌زایی سلول‌های مذکور، گواه این مطلب است که سلول‌های به کار رفته در این تحقیق جمعیت هموژن و همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان محسوب می‌شوند که صحت این ادعا را به اثبات می‌رساند و با یافته‌های سایر محققین مطابقت دارد(۱۳،۹).

در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای با هدف بررسی پتانسیل تکثیر و تمایز hDPSCs انجام شد. نتایج نشان داد این سلول‌ها در پاساژهای متوالی بدون از دست دادن توانایی تکثیر خود در محیط کشت به بقای خود ادامه می‌دهند. به علاوه سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته با اشکال مختلفی به فاصله زمانی کمی پس از افزودن عوامل القایی در محیط کشت ظاهر می‌گردند(۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

مـایع مغـزی- نخـاعی در تمـاس مسـتقیم بـا کنـام سلول‌های بنیادی سیستم اعصاب مرکزی است، به‌طوری که این مایع با داشتن ترکیباتی نظیر فاکتورهـای رشـد و نوروترو‌فیـک، سـایتوکاین‌هـا، مولکـول‌هـای اتصـالی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌تواند نقش قابـل توجهی در روند تکوین سیستم عصبی داشـته باشـد. لـذا فرض ما بر این بود که افزودن مـایع مغـزی- نخـاعی بـه محیط کشت القایی، ریز محـیط (Micro-environment) مغذی مناسبی برای حفظ بقاء، تکثیر و تمایز سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی مشتق از پالـپ دنـدان فـراهم آورد. در مجموع نتایج ارزیابی سـمیت سـلولی در مطالعـه کنـونی حاکی از این است که مایع مغزی نخاعی در یک الگـوی وابسته به دوز بر میزان بقاء سلول‌ها تاثیر می‌گذارد.

یافته‌های تحقیق حاضـر بـا مطالعـات قبلـی صـورت گرفتـه در ایـن زمینـه مطابقـت دارد. در همـین ارتبـاط تحقیقات Lehtinen و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشـان داد که مایع مغزی-نخاعی دارای فاکتورهای القاگر تکثیری (Proliferation-inducing factors) است که مـی‌توانـد در تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی نقش داشـته باشد(۱۹). علاوه بر این گزارشات متعددی وجـود دارنـد مبنی بر این که ماکرومولکول‌ها موجـود در مـایع مغـزی نخاعی منجر بـه شـکل‌گیـری آبشـاری از سـیگنال‌هـایی می‌گردد که بـا تغییـر بیـان فاکتورهـای نسـخه‌بـرداری و ژن‌ها می‌تواننـد بـر روی برخـی از عملکردهـای حیـاتی سـلول تـاثیر بـه سـزایی بگذارنـد(۲۰،۲۶،۲۷). از سـویی hDPSCs در محیط کشت، فاکتورهای رشد نوروتروفیـک مانند Brain Drived Neurotrophic Factor (BDNF)، Ciliary Neurotrophic Factor (CNDF) و Nerve Growth Factor (NGF) را ترشح مـی‌کنـد کـه باعث بقای عصبی و رشـد نوریـت‌هـا در محـیط کشـت آزمایشگاهی می‌شود(۲۸) کـه ایـن امـر بـه نوبـه ی خـود اثـرات زنـده‌مـانی، تکثیـر و تمـایزی CSF را در محـیط کشت دو چندان می‌کند.

علاوه بر این، یافته‌های حاصل از نتایج ایمونوسیتوشـیمی حاکی از این است کـه بـا بـه کـار بـردن عوامـل القـاگر نوروژنیـک، سـلول‌هـای شـبه‌عصـبی تمـایز یافتـه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ، قـادر بـه بیـان نشانگرهای ویژه نورون‌ها مثل نستین و بتاتوبولین هسـتند و آن ها را به میزان مناسبی بروز می‌دهند که صحت این پدیده با رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت و شمارش سلولی به اثبات رسید. سلول‌های بیان‌کننده مارکر نستین نه تنهـا در تمام گروه‌های تیمار بلکه در گروه کنترل نیز مشاهده شده‌اند. این بدان معنی است عوامل القاگر بـه کـار رفتـه شده در ایـن پـژوهش ظرفیـت تحریـک نـوروژنزیس را دارند. اما حضور سلول‌های پـیش‌سـاز عصـبی در گـروه کنترل دور از انتظار نبود. شـاید بتـوان ایـن پدیـده را بـه ماهیت منشاء نورال کرستی سلول‌هـای بنیـادی مشـتق از پالپ دندان نسبت داد کـه بـه صـورت خـود بـه خـودی (Spontaneous) یـا بـدون هرگونـه القـاگر در محـیط کشت ظاهر می‌گردند.

حداکثر سلول‌های پیش‌ساز عصبی در گروه تحـت تیمار اسیدرتینوئیک در روز هشتم القاء مشاهده شد. هـر چند که سلول‌های پیش‌ساز عصبی به میزان قابل‌تـوجهی در مرحله پیش‌القاء (Pre-induction stage) گـروه RC نیـز دیده شدند. نتایج تحقیق حاضر در این زمینه در توافق با نتایج به دست آمده توسط دکتر دارابـی و همکـاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد(۲۵).

در رونـد القـاء نوروژنیـک تحقیـق حاضـر، شـاید مهم‌ترین نکته قابل توجه، حضور سلول‌هـای بیـان‌کننـده βIII-tub به عنوان سلول عصبی بالغ در گروه‌های تیمـار است. به‌طوری‌که بیش‌ترین درصد سلول‌های بیان‌کننـده βIII-tub در گروه تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی و بـه ویژه در مرحلـه القـاء (Induction stage) گـروه توامـان RC مشاهده شد. اما فاکتور اصلی مسئول رفتـار تمـایزی CSF خـانواده Bone Morphogenic Proteins (BMPs) هستند. آن‌ها با فعال یا مهـار کـردن مسـیرهای مولکـولی ویژه درون سلولی می‌توانند عملکرد خود را ایفـا کننـد. از آن جمله می‌توان به BMP4 اشاره کرد که باعث فعال

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

شـدن زنجیـره‌ای از پـروتئین‌هـا بـا نـام عمـومی Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) می‌شود. این پروتئین‌ها (ERK) وظیفه انتقال سیگنال از گیرنده سطح سلول به اسیدنوکلئیک درون هسته سلول را بر عهده دارند و منجر به بیان آنزیم‌ها و پروتئین‌های گوناگون می‌شوند. بدین ترتیب امکان تمایز عصبی را از سلول‌های پیش‌ساز عصبی فراهم می‌آورد(۲۹). در سال ۲۰۱۱ نیز پژوهشی با عنوان اثر فاکتور رشد bFGF بر روی تمایز عصبی hDPSCs صورت گرفت و نشان داد که این عامل تمایزی با انتقال سیگنال‌های ویژه باعث افزایش اندازه نوروسفر hDPSCs و بیان مارکرهای نوروژنیک در in vitro می‌شود(۱۲). از طرفی یکی از مهم‌ترین مواردی که بایستی در شرایط آزمایشگاهی در القای تمایز عصبی مد نظر گرفته شود، شبیه‌سازی شرایط تمایز نورواکتودرم در دوره جنینی است. به عبارتی ریزمحیط اطراف سلول‌ها نقش مهمی در تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی دارد. اما درصد کم تر سلول‌های پیش‌ساز عصبی در گروه‌های تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی و حضور سلول‌های عصبی بالغ در مرحله القاء گروه RC را می‌توان به نقش حائز اهمیت RA نظیر آن چه در دوران جنینی ایفا می‌کند و هم‌چنین فاکتورهای نوروتروفیک و سایر ترکیبات موجود در مایع مغزی- نخاعی نسبت داد که سبب شروع آبشاری از مسیرهای مولکولی متعدد درون‌سلولی، کاهش بیان فاکتورهای رونویسی و در نتیجه گذر از مرحله پیش‌نورونی می‌شود و امکان تمایز نورون بالغ را در محیط کشت القایی فراهم می‌آورد.

نتایج ارزیابی‌های سایتولوژیک به کار رفته در این پژوهش ماهیت این سلول‌ها را به عنوان سلول‌های عصبی تایید می‌کند. در مطالعه حاضر رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی به منظور بررسی اشکال سلول‌های تمایز یافته، مشخص نمودن ماهیت عصبی و تغییرات استطاله‌های سلولی در طول دوره تمایز استفاده شد. یافته‌ها نشان داد اثر توامان CSF و RA بر روی سلول‌های اکتومزانشیمی انسانی باعث تجمعات واضح اجسام نیسل و ایجاد استطاله‌های طویل سلولی می‌شود که بیانگر ویژگی‌های عصبی سلول‌های متمایز شده است. در مطالعه حاضر علت احتمالی افزایش سلول‌های بیان‌کننده نستین در گروه تحت تیمار با اسیدرتینوئیک نسبت به سایر گروه‌ها بر اساس گزارشات موجود بیان دسته‌ای از ژن‌ها نظیر (Sonic hedgehog, shh) و فاکتورهای نسخه‌برداری نظیر Pax6 و Pax7 مرتبط با نورون زایی تحت تاثیر اسیدرتینوئیک است که سبب تکثیر و تمایز اولیه سلول‌های پیش‌ساز عصبی از سلول‌های مزانشیمی مشتق از پالپ می‌گردد(۲۷،۲۲). لذا اسیدرتینوئیک به عنوان یک فاکتور تمایزی چند منظوره و تمایزدهنده انواع سلول‌ها به ویژه مشتقات مزودرمی(۳۰،۲۲) و نیز توانایی حذف سلول‌های ناخواسته حاصل از تمایز و خالص‌سازی سلول‌های عصبی، استفاده از آن در مرحله پیش‌القاء مطلوب به نظر می‌رسد.

از نظر تمایز گلیال هم می‌توان خاطر نشان کرد که سلول‌هایی با اشکال متفاوت، بیان‌کننده نشانگر GFAP و در عین حال با پاسخ منفی به رنگ‌آمیزی کریزل‌فست‌ویوله و نیترات نقره در گروه RC بیش‌تر حاضر بودند. در همین راستا آزمایشی توسط Buddensiek و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی اثرات تمایزی CSF به عمل آمد. نتیجه این شد که CSF یک تحریک‌کننده قوی تمایز آستروگلیال در محیط کشت سلول بنیادی عصبی (Neural Stem Cells,NSCs) است. آن‌ها با استفاده از مایع مغزی-نخاعی انسان بزرگسال توانستند میزان زنده مانی NSCs را هم افزایش دهند که با نتایج زنده‌مانی در پژوهش حاضر همخوانی دارد. از سویی یکی از فاکتورهای موجود در مایع- مغزی نخاعی، BMP7 است که در طویل‌شدن نوریت‌ها نقش به سزایی دارد(۳۰). بنابراین القاء تمایز نوروژنزیس در شرایط آزمایشگاهی مشابه شرایط بدن، نیاز به دخالت مولکول‌ها و فاکتورهای متعدد نوروترفیک و مسیرهای سیگنالینگ ویژه و متوالی دارد. با توجه به یافته‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

مورفولوژیک، ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و سایتولوژیک می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان با دارا بودن خصوصیات منحصر به فرد، گزینه مناسبی برای ترمیم بیماری‌های نورودژنراتیو محسوب می‌شوند. از سویی استفاده از پروتوکل دو مرحله‌ای که اسیدرتینوئیک به عنوان پیش‌القاء و مایع مغزی- نخاعی به عنوان القاگر نورونی در نظر گرفته شد، می‌تواند با حذف سایر سلول‌های ناخواسته حاصل از تمایز به همگن‌سازی سلول‌های عصبی و گلیالی، کمک قابل‌توجهی کند و سبب بهینه‌سازی روند القای نوروژنزیس و گلیوژنزیس در شرایط آزمایشگاهی شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد آناتومی، مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی است که نویسندگان بدین‌وسیله از مسئولین محترم تشکر می نمایند.

References

1. Nakashima, Misako, Koichiro Iohara, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. Cytokine Growth Factor Rev 2009; 20(5-6): 435-440.
2. Nazm Bojnordi M, Ghasemi HH, Akbari E. Remyelination after Lysophosphatidyl Choline-Induced Demyelination Is Stimulated by Bone Marrow Stromal Cell-Derived Oligoprogenitor Cell Transplantation. Cells Tissues Organs 2015; 200(5): 300-306.
3. Hatef GH, Rezaei N, Mahmoudi R, Bojnordi MN. Expression of Spermatogonial and Pluripotency Markers in Spermatogonial Stem Cells after Treatment with Different Culture Factors. Res Mol Med 2014, 2(2): 16-21.
4. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nat Neurosci 2002; 5(5): 438-445.
5. Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulpderived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. Stem Cells 2008; 26(10): 2654-2663.
6. KaraozE, Demircan PC, Sağlam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Histochem Cell Biol 2011; 136(4): 455-473.
7. Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y.Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. Biomaterials 2014;35(24): 6332-6343.
8. 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): 1394-1402.
9. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. J Formos Med Assoc 2014; 113(12): 956-965.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

10. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. BMC Cell Biol 2010; 11: 32.
11. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S .Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(25): 13625-13630.
12. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, etal .Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. Histochem Cell Biol 2010; 133(1): 95-112.
13. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S .Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. Stem Cells 2008; 26(7): 1787-1795.
14. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells. Cytotechnology 2013;65(1): 97-104.
15. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T.Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2013; 49(8): 638-652.
16. Salehi Z, Mashayekhi F, Naji M, Pandamooz S.Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos. J Clin Neurosci 2009; 16(7): 950-953.
17. Engberg N, Kahn M, Petersen DR, Hansson M, Serup P. Retinoic Acid Synthesis Promotes Development of Neural Progenitors from Mouse Embryonic Stem Cells by Suppressing Endogenous, WntDependent Nodal Signaling. Stem Cells 2010; 28(9): 1498-1509.
18. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCγ signaling pathway. J Cell Biochem 2011; 112(7): 1807-1816.
19. Lehtinen K M, Walsh CA.Neurogenesis at the brain–cerebrospinal fluid interface. Annu Rev Cell Dev Biol 2011; 27: 653-679
20. Nabiuni M, Rasouli J, Parivar K, Kochesfehani HM, Irian S, Miyan JA.In vitro effects of fetal rat cerebrospinal fluid on viability and neuronal differentiation of PC12 cells. Fluids Barriers CNS 2012; 9(1): 8.
21. Otify DY, Youssef E, Nagy NB, Marei MK, Youssif MI.Transdifferentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neural Cells via Cerebrospinal Fluid. J Biomed Biotechnol 2014; 2(4): 66-679.
22. Mashayekhi F, Azari M, Moghadam LM, Yazdankhah M, Naji M, Salehi Z.Changes in cerebrospinal fluid nerve growth factor levels during chick embryonic development. J Clin Neurosci 2009; 16(10): 1334-1337.
23. Lehtinen K M, Zappaterra W M, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. Neuron 2011; 69(5): 893-905.
24. Tehranipour M, Baharara J, Mostafaee M. The neuroprotective effect of CSF intraperitoneal injection on alpha motor degeneration after sciatic nerve compression in rat. Arak Medical University Journal 2009; 12(3): 101-108.
25. Darabi S, Tiraihi T, Delshad A, Sadeghizadeh M. A new multistep induction protocol for the transdifferentiation of bone

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

marrow stromal stem cells into GABAergic neuron-like cells. Iran Biomed J 2013; 17(1): 8-14

26. Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005; 284(1): 475-484.
27. Zappaterra MW, Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. Cell Mol Life Sci 2012; 69(17): 2863-2878.
28. Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. Clin Oral Investig 2013; 17(9): 1969-1983.
29. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCγ signaling pathway. J Cell Biochem 2011; 112(7): 1807-1816.
30. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, Schroeder H, Hermann A, et al. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. BMC Neuroscience 2010; 11: 48.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]