

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

Sara Haratizadeh¹,
Maryam Nazm Bojnordi^{2,3},
Ali Niapour⁴,
Mehrdad Bakhtiari⁵,
Hatef Ghasemi Hamidabadi^{2,6}

¹ MSc Student in Anatomical 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, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, 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} μ M 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, β III-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 β III-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

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 مولکول های ضروری در فرآیند نوروزنیس است. سلول های بنیادی پالپ دندان انسانی (hDPSCs) که از سلول های ستیج عصبی مشتق شده اند، می توانند در حضور فاکتورهای نوروتروفیک مناسب به سلول های گلیال و نوروئید تمایز یابند. هدف از این مطالعه القای تمایز hDPSCs به سلول های نوروگلیال با استفاده از اسید رتینوئیک و CSF است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، hDPSCs از دندان مولار سوم انسانی به روش مکانیکی-آزیمی جدا و کشت داده شدند. 2×10^5 سلول به هر یک از چاهک های پلیت ۶ خانه ای منتقل و با اسیدرتینوئیک (گروه ۱، گروه RA) و CSF (گروه ۲، گروه CSF) به مدت ۸ روز القاء شدند. هم چنین به مدت ۴ روز توسط اسید رتینوئیک و ۴ روز توسط CSF (گروه ۳، گروه RC) تیمار شدند. ایمونوسیتوشیمی Nestin، GFAP و β III-tubulin جهت ارزیابی استفاده شدند. طول آکسون سلول ها به روش نترات نقره بررسی و اجسام نیسل با کریزل و یوله رنگ آمیزی شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS 16 و با آزمون های آماری One-way ANOVA و Chi Square انجام گرفت.

یافته ها: مورفولوژی سلول های تمایز یافته به طور مشخص در گروه های تمایزی بعد از روز ۵-۳ تغییر یافت. نتایج ایمونوسیتوشیمی نشان داد که Nestin در همه گروه ها بیان شد. هم چنین بیش ترین درصد سلول های بیان کننده Nestin و β III-tubulin به ترتیب در مراحل پیش القایی و القایی مشاهده شدند. اجسام نیسل به صورت ذرات توپر بنفش رنگ در سیتوپلاسم سلول های تمایز یافته شناسایی شدند.

استنتاج: یافته ها نشان می دهد که می توان از اسید رتینوئیک به عنوان پیش القاگر و CSF به عنوان القاگر جهت تمایز در شرایط آزمایشگاهی hDPSCs به سلول های نوروگلیال استفاده کرد.

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

مقدمه

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

مؤلف مسئول: هاتف قاسمی حمیدآبادی - ساری: کیومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 - استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
 - استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 - استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
 - دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
 - استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۸

گوناگون از جمله 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 (۵، ۶). 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 پیش‌ساز استرومایی قرار می‌گیرند (۸). این سلول‌های اکتومزانشیمی، ویژگی‌های حائز اهمیت 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 دودمان‌های سلولی نوروژنیک، استئوژنیک و میوژنیک را دارا می‌باشند. این سلول‌ها پس از القای نورونی، نشانگرهای O1, GFAP, Nestin و β III-tub که به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های الیگودندروسیت، آستروسیت، پیش‌ساز عصبی و نرون بالغ هستند را بیان می‌کنند (۵، ۷، ۹، ۱۰). 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 جایی که یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، تغییر مسیر تمایزی تحت تاثیر شرایط محیطی است و با تغییر شرایط محیطی، رشد و تکثیر آن‌ها 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 (۱۴، ۱۵). 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 آمیوتیک 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 آن جایی که 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

دندان به مدت ۵ دقیقه در محلول یدین (Povidone Iodine 10%, 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) 100 Units/ml (Fetal Bovine Serum, FBS) ۱۰ درصد، پنی سیلین (Gibco) و 100 Units/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 فالكون سانتریفیوژ شده، محلول رویی خارج و بافت لیز شده به داخل فلاسک کشت سلول ۲۵ میلی لیتری محتوی محیط کشت پایه انتقال یافت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن 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)، سلول ها با استفاده از تریپسین جدا و پاساژ داده شدند. به منظور خالص سازی سلول های مزانشیمی پالپ دندان از پاساژ ۳-۵ استفاده شد (۱۱).

جمع آوری و نگهداری مایع مغزی- نخاعی

مایع مغزی- نخاعی از نوزاد یک روزه موش صحرائی نژاد Sparagu Dawly تهیه شد. بدین صورت که در شرایط استریل، مایع مغزی- نخاعی از ناحیه Cisterna Magna جمع آوری و به میکروتیوب استریل منتقل شد. به منظور جلوگیری از آسپیره نمودن و خونریزی، از پیست پاستور جهت جمع آوری CSF استفاده شد. پس از سانتریفیوژ نمودن با دور ۱۴۰۰ rpm، مایع رویی به منظور ادامه روند پژوهش در دمای ۸۰ C- نگه داری شد (۲۰).

CSF مشخص شده است که حاوی فاکتورهای رشد و نوروتروفیک بسیاری است (۲۲-۲۰). هم چنین تحقیقات نشان می دهد که مواد گوناگون موجود در CSF در سال های مختلف عمر، متفاوت است و CSF جنینی دارای بیش ترین مقادیر مواد موثر در تکوین CNS به ویژه پلی پپتیدها است که ۲۰ درصد را از نورون ها، سلول های گلیال و سلول های لپتومنژ و ۸۵ درصد را از خون یا شبکه کوروئید دریافت می کند و در زمان جنینی در حفاظت، حمایت، تغذیه و تکوین CNS نقش به سزایی دارد (۲۰، ۲۳، ۲۴). هم چنین تحقیقات در *in vivo* و *in vitro* نشان می دهد که CSF توانایی تمایز و تکثیر سلول های جنینی قشر مغز و ترمیم رشته های آسیب دیده عصبی را دارد (۲۴).

با توجه به نقش حیاتی CSF در روند تکوین مغزی و داشتن مواد متابولیک ضروری، به نظر می رسد می تواند در تمایز سلول های بنیادی مختلف به سمت سلول گلیال و سلول عصبی بالغ در شرایط آزمایشگاهی مفید واقع شود. از طرفی به علت منشا مشترک hDPSCs با سلول های عصبی، این سلول ها دارای پتانسیل تمایزی به رده سلول گلیالی و عصبی هستند (۲۳، ۸). هدف از این پژوهش، بهینه سازی روند تمایز سلول های hDPSCs در شرایط آزمایشگاهی به سلول های نوروگلیال با استفاده از القاگرهای اسیدر تینوتیک و CSF است.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسانی:

در این پژوهش تجربی، از دندان مولار سوم انسانی جهت استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی بافت پالپ دندان استفاده شد. این دندان ها به صورت سالم و بدون پوسیدگی از بیماران ۱۸-۲۵ ساله مراجعه کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جمع آوری و در محلول بافر فسفات (Phosphate-buffered Saline, PBS) به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. سپس به منظور ضد عفونی،

بررسی میزان زنده مانده *hDPSCs* در حضور غلظت‌های مختلف CSF

برای به دست آوردن غلظت موثر CSF جهت القای تمایز عصبی و تکثیر سلول‌های مذکور، مقدار 5×10^3 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 فیل 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 حل کردن 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 2×10^5 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 القانات مایع مغزی-نخاعی (برمبنای نتایج حاصل از تست زنده مانده) و اسیدرتینوئیک RA (R2625-100MG, Sigma-Aldrich) به شرح زیر قرار گرفتند:

به تعدادی از چاهک‌ها اسید رتینوئیک به غلظت $10^{-6} \mu\text{m}$ اضافه گردید (گروه ۱، گروه RA)، به تعدادی دیگر از چاهک‌ها CSF ۱۰ درصد اضافه شد (گروه ۲، گروه CSF). علاوه بر این، برخی از چاهک‌ها نیز به مدت ۴ روز تحت تیمار اسیدرتینوئیک به غلظت $10^{-6} \mu\text{m}$ قرار گرفتند که به عنوان مرحله پیش‌القائه (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. هم‌چنین 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 (۲۵، ۲۱، ۱۷). 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 پارافمالدئید ۴ درصد (Paraformaldehyde, PFA Sigma-Aldrich) به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. در مرحله بعد، به منظور

ب) رنگ آمیزی بیل شوسکی نقره جهت اندازه گیری طول آکسون سلول های مذکور، رنگ آمیزی بیل شوسکی نقره (Bielschowsky's silver) به کار رفت. بدین منظور ابتدا سلول ها 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 سلول ها ریخته و سپس شسته شد. سرانجام سلول های تمایز یافته با آکسون قهوه ای تیره تا سیاه جهت اندازه گیری طول آکسون در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که بزرگ ترین استتاله عصبی به عنوان آکسون در نظر گرفته شد و طول این زوائد در پایان روز تیمار در گروه های مختلف توسط نرم افزار Image J ۱.۴۱ اندازه گیری و محاسبه شد (۲۱).

آنالیز آماری داده ها

جهت تجزیه و تحلیل داده ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروه ها از آزمون آماری One-way ANOVA و Chi Square استفاده شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS 16 انجام گرفت و علاوه بر این سطح معنی داری $p < 0.01$ و $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

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

نفوذ پذیری سلول ها و مهار آنتی ژن های غیر اختصاصی 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 بادی های اولیه Rabbit to Nestin (ab92391) و β III-tubulin (β III-tub, ab52901), Rabbit to GFAP (ab7260) انکوبه شدند و در نهایت سلول ها 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) ننگه داری شدند. تشخیص افتراقی هسته سلول ها با DAPI (Sigma-Aldrich) انجام شد. سرانجام سلول ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Eclipse-TE600, Japan) بررسی و عکس برداری صورت گرفت (۲۵).

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

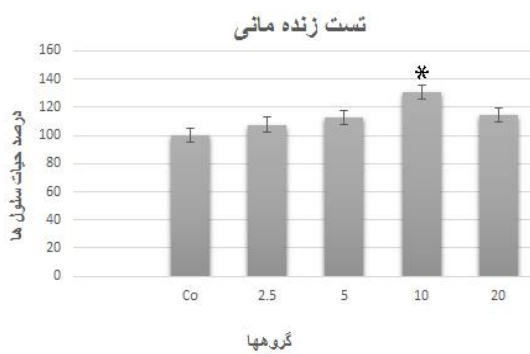
بدین منظور جهت شناسایی سلول های تمایز یافته از دو رنگ آمیزی اختصاصی سایتولوژیک به شرح زیر استفاده شد:

الف) رنگ آمیزی اختصاصی کریزیل فست ویوله:

به منظور شناسایی و رنگ آمیزی اجسام نیسل موجود در سلول های تمایز یافته از رنگ آمیزی اختصاصی کریزیل فست ویوله (Cresyl Echt Violet Stain, Merck Germany) در پایان روز تیمار استفاده شد. به این صورت که ابتدا سلول ها به وسیله PFA به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند و پس از سه بار شستشو با PBS، سلول های گروه های مختلف به وسیله رنگ کریزیل فست ویوله ۱ درصد به مدت ۲-۳ دقیقه رنگ آمیزی و اجسام نیسل بنفش در سلول های واکنش مثبت با میکروسکوپ نوری بررسی و محاسبه شدند.

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).

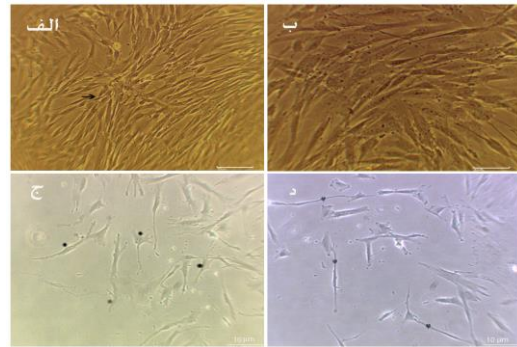
نتایج حاصل از تست زنده‌مانی (MTT) غلظت‌های مختلف مایع مغزی-نخاعی بر میزان بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان حاکی از این است که درصد بقاء سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی بیش‌تر از گروه کنترل است، به طوری که حداکثر میزان زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت ۱۰ درصد مایع مغزی-نخاعی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



نمودار شماره ۱: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف مایع مغزی-نخاعی 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 به ترتیب از نشانگرهای Nestin و β III-tub استفاده شد. هم‌چنین جهت شناسایی آستروسیت‌ها از نشانگر خاص آستروسیتی GFAP استفاده شد. علاوه بر این، تعداد سلول‌های بیان‌کننده نشانگرهای اختصاصی سلول‌های عصبی و گلیالی در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که شمارش سلولی توسط نرم‌افزار Image J صورت گرفته است و نتیجه حاصل به صورت درصد در تصویر شماره ۲ ارائه شده است. حداکثر درصد سلول‌های

ایجاد کلون‌زایی در محیط کشت بودند. هم‌چنین فوتیپ شبه‌فیروبلاستی و دوکی شکل در پاساژهای متوالی و موقعیت‌های غیرالقایی حفظ گردید و برای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۱-ب).



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپ فاز کتراست. (الف) سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان طی هفته اول کشت به صورت شبه‌فیروبلاستی و دوکی شکل مشاهده شدند (علامت پیکان نشان‌دهنده ویژگی کلون‌زایی)، (ب) پس از پاساژ سوم، فوتیپ شبه فیروبلاستی 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 مغزی-نخاعی (علامت ستاره بیانگر مورفولوژی الیگودندروسیت)، (د) ترکیب توامان اسیدرتینوتیک و مایع مغزی-نخاعی (علامت سرپیکان نشان‌دهنده 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

و نتایج حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (تصویر شماره ۳ و نمودار شماره ۲). میانگین درصد سلول های با فنوتیپ عصبی در گروه های تیمار به طور قابل توجهی بیش تر از گروه کنترل بود. علاوه بر این حداکثر سلول های با فنوتیپ عصبی در گروه RC مشاهده شد که نسبت به سایر گروه ها دارای اختلاف معنی داری است. (تصویر شماره ۳ و نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۱: نتایج درصد بیان Nestin، β III-tub و GFAP در گروه های تحت تیمار

گروه ها	Co	RA	CSF	RC
D4	0.1 ± 2	0.13 ± 28	0.11 ± 19	0.07 ± 27
D8	0.8 ± 0.4	0.12 ± 67	0.12 ± 31	0.15 ± 37
D4
D8	.	0.01 ± 2	0.03 ± 8	0.04 ± 17
D4	0.11 ± 4	0.11 ± 38	0.09 ± 45	0.13 ± 34
D8	0.05 ± 11	0.09 ± 27	0.12 ± 67	0.09 ± 45

(RA): گروه تحت القاء اسیدرتینوئیک.

(CSF): گروه تحت القاء مایع مغزی- نخاعی.

(RC): گروه توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی.

(Co): گروه کنترل.

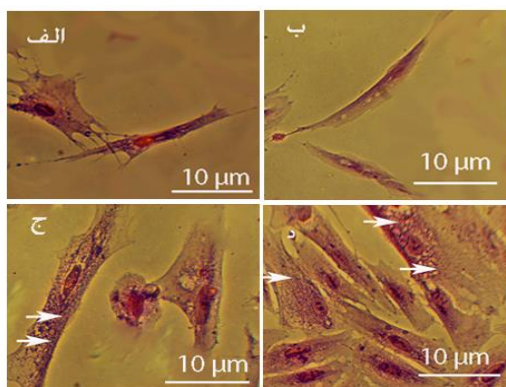
a. اختلاف معنی دار با گروه های CSF و کنترل.

b. اختلاف معنی دار با سایر گروه ها.

c. اختلاف معنی دار با سایر گروه ها.

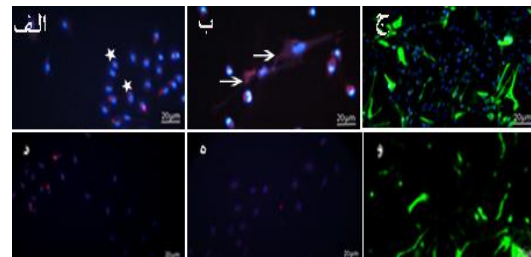
d. اختلاف معنی دار با سایر گروه ها.

e. اختلاف معنی دار با سایر گروه ها ($p < 0.05$)



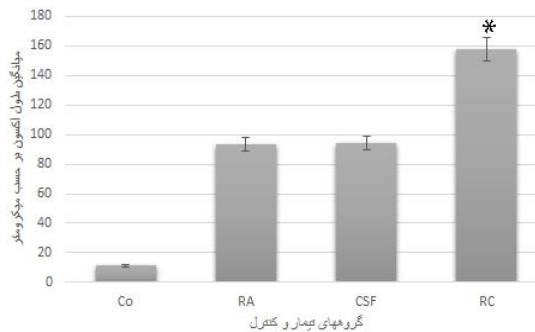
تصویر شماره ۳: رنگ آمیزی کریزل و یوله. سلول های شبه نورونی تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان در روز هشتم. (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی- نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی (RC) (مقیاس ۱۰ میکرومتر).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

بیان کننده 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 گروه ها بیش تر بود، هر چند که سلول های پیش ساز عصبی در گروه تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی نیز مشاهده شدند. در حالی که سلول های بیان کننده نشانگر β III-tub در گروه تحت القاء مایع مغزی- نخاعی دیده شدند. به طوری که بیش ترین درصد سلول های بیان کننده β III-tub در گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی بود (جدول شماره ۱). بررسی های به عمل آمده نشان داد که بیش ترین درصد سلول های بروز دهنده نشانگر آستروسیتی در گروه های تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی مشاهده شدند (جدول شماره ۱).

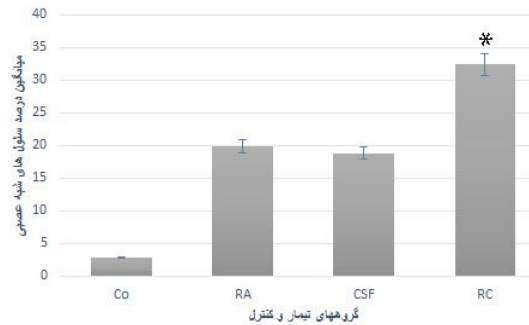


تصویر شماره ۴: ایمونوسیتوشیمی سلول های شبه نورونی و شبه آستروسیتی تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان. (الف) بیان نشانگر Nestin در روز چهارم گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- نخاعی. (ب) بیان نشانگر β III-tub در روز هشتم گروه تحت القاء توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی- 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 β III-tub در گروه کنترل. (و) بیان نشانگر خاص آستروسیتی در گروه کنترل. مقیاس 20 μ m.

یافته های حاصل از رنگ آمیزی کریزل و یولت نشان داد که در تمامی گروه های تیمار، سلول های شبه عصبی، واکنش مثبت نشان داده اند و اجسام کرووی شکل به مشاباه اجسام نیسل در درون سیتوپلاسم سلول های مذکور دیده شدند (تصویر شماره ۳). نکته قابل توجه این که در گروه کنترل نیز سلول های واکنش مثبت رویت شدند. در ادامه سلول های واکنش مثبت شمارش



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 (* $P < 0.05$).



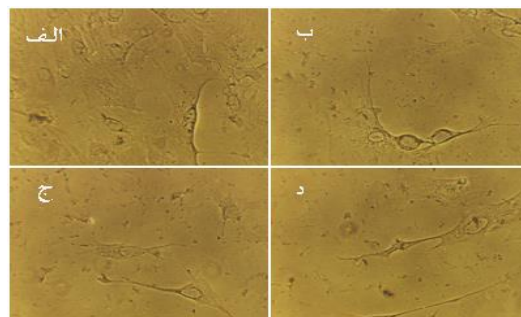
نمودار شماره ۲: میانگین درصد سلول‌های با فنوتیپ شبه عصبی در (الف) گروه کنترل (Co)، (ب) گروه رتینوئیک اسید (RA)، (ج) گروه مایع مغزی-نخاعی (CSF) و (د) گروه تحت تیمار توامان اسیدرتینوئیک و مایع مغزی-نخاعی ($p < 0.05$).

بحث

در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان مولار سوم استفاده شده است. 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 شبه فیروبلاستی 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 هموزن 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).

نتایج رنگ آمیزی نیترات نقره دال بر حضور زوائد شبه آکسونی 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 شبه آکسونی از روز سوم در گروه‌های تحت تیمار قابل مشاهده و اندازه‌گیری بودند. حداکثر طول آکسون در گروه تحت القای 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)

مایع مغزی- نخاعی در تماس مستقیم با کنام سلول های بنیادی سیستم اعصاب مرکزی است، به طوری که این مایع با داشتن ترکیباتی نظیر فاکتورهای رشد و نوروتروفیک، سایتوکاین ها، مولکول های اتصال و پروتئین های ماتریکس خارج سلولی می تواند نقش قابل توجهی در روند تکوین سیستم عصبی داشته باشد. لذا فرض ما بر این بود که افزودن مایع مغزی- نخاعی به محیط کشت القایی، ریز محیط (Micro-environment) مغذی مناسبی برای حفظ بقاء، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان فراهم آورد. در مجموع نتایج ارزیابی سمیت سلولی در مطالعه کنونی حاکی از این است که مایع مغزی نخاعی در یک الگوی وابسته به دوز بر میزان بقاء سلول ها تاثیر می گذارد.

یافته های تحقیق حاضر با مطالعات قبلی صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد. در همین ارتباط تحقیقات Lehtinen و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که مایع مغزی- نخاعی دارای فاکتورهای القاگر تکثیری (Proliferation-inducing factors) است که می تواند در تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز عصبی نقش داشته باشد (۱۹). علاوه بر این گزارشات متعددی وجود دارند مبنی بر این که ماکرومولکول ها موجود در مایع مغزی نخاعی منجر به شکل گیری آبخاری از سیگنال هایی می گردد که با تغییر بیان فاکتورهای نسخه برداری و ژن ها می توانند بر روی برخی از عملکردهای حیاتی سلول تاثیر به سزایی بگذارند (۲۰، ۲۶، ۲۷). از سویی hDPSCs در محیط کشت، فاکتورهای رشد نوروتروفیک مانند Brain Drived Neurotrophic Factor (BDNF)، Ciliary Neurotrophic Factor (CNDF) و Nerve Growth Factor (NGF) را ترشح می کند که باعث بقای عصبی و رشد نوریت ها در محیط کشت آزمایشگاهی می شود (۲۸) که این امر به نوبه ی خود اثرات زنده مانگی، تکثیر و تمایزی CSF را در محیط کشت دو چندان می کند.

علاوه بر این، یافته های حاصل از نتایج ایمونوسیتوشیمی

حاکی از این است که با به کار بردن عوامل القاگر نوروژنیک، سلول های شبه عصبی تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ، قادر به بیان نشانگرهای ویژه نورون ها مثل نستین و بتاتوبولین هستند و آن ها را به میزان مناسبی بروز می دهند که صحت این پدیده با رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت و شمارش سلولی به اثبات رسید. سلول های بیان کننده مارکر نستین نه تنها در تمام گروه های تیمار بلکه در گروه کنترل نیز مشاهده شده اند. این بدان معنی است عوامل القاگر به کار رفته شده در این پژوهش ظرفیت تحریک نوروژنریس را دارند. اما حضور سلول های پیش ساز عصبی در گروه کنترل دور از انتظار نبود. شاید بتوان این پدیده را به ماهیت مشاء نورال کرسی سلول های بنیادی مشتق از پالپ دندان نسبت داد که به صورت خود به خودی (Spontaneous) یا بدون هر گونه القاگر در محیط کشت ظاهر می گردند.

حداکثر سلول های پیش ساز عصبی در گروه تحت تیمار اسیدرتینوئیک در روز هشتم القاء مشاهده شد. هر چند که سلول های پیش ساز عصبی به میزان قابل توجهی در مرحله پیش القاء (Pre-induction stage) گروه RC نیز دیده شدند. نتایج تحقیق حاضر در این زمینه در توافق با نتایج به دست آمده توسط دکتر دارابی و همکاران در سال ۲۰۱۳ می باشد (۲۵).

در روند القاء نوروژنیک تحقیق حاضر، شاید مهم ترین نکته قابل توجه، حضور سلول های بیان کننده β III-tub به عنوان سلول عصبی بالغ در گروه های تیمار است. به طوری که بیش ترین درصد سلول های بیان کننده β III-tub در گروه تحت تیمار مایع مغزی- نخاعی و به ویژه در مرحله القاء (Induction stage) گروه توامان RC مشاهده شد. اما فاکتور اصلی مسئول رفتار تمایزی CSF خانواده Bone Morphogenic Proteins (BMPs) هستند. آن ها با فعال یا مهار کردن مسیرهای مولکولی ویژه درون سلولی می توانند عملکرد خود را ایفا کنند. از آن جمله می توان به BMP4 اشاره کرد که باعث فعال

شدن زنجیره‌ای از پروتئین‌ها با نام عمومی 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 آبخاری از مسیرهای مولکولی متعدد درون سلولی، 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 استتاله‌های 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 استتاله‌های 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 (۲۲، ۲۷). لذا اسیدرتینوئیک به عنوان یک فاکتور تمایزی چند منظوره و تمایزدهنده انواع سلول‌ها به ویژه مشتقات مزودرمی (۲۲، ۳۰) 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 کریزلفست و یوله و نیترا 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 زنده‌مانی 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 به‌سزایی دارد (۳۰). بنابراین القاء تمایز نوروتروفیک در شرایط آزمایشگاهی مشابه شرایط بدن، نیاز به دخالت مولکول‌ها و فاکتورهای متعدد نوروتروفیک و مسیرهای سیگنالینگ ویژه و متوالی دارد. با توجه به یافته‌های

گلیالی، کمک قابل توجهی کند و سبب بهینه سازی روند القای نوروزنزیس و گلیوزنزیس در شرایط آزمایشگاهی شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد آناتومی، مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ستاد توسعه علوم و فناوری های سلول های بنیادی است که نویسندگان بدین وسیله از مسئولین محترم تشکر می نمایند.

مورفولوژیک، ارزیابی های ایمنوسیتوشیمی و سایتولوژیک می توان چنین نتیجه گیری کرد که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان انسان با دارا بودن خصوصیات منحصر به فرد، گزینه مناسبی برای ترمیم بیماری های نورودژنراتیو محسوب می شوند. از سویی استفاده از پروتوکل دو مرحله ای که اسیدرتینوئیک به عنوان پیش القاء و مایع مغزی- نخاعی به عنوان القاگر نورونی در نظر گرفته شد، می تواند با حذف سایر سلول های ناخواسته حاصل از تمایز به همگن سازی سلول های عصبی و

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 pulpperived 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.

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, Brahimi 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, et al. 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, Najji 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, Wnt-Dependent 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 PLC γ 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, Kochesfehni 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. Otiy 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, Najji 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, Mostafae 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

- 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, Lambrechts 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 PLC γ 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.