# ایزولاسیون و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت پالپ و فولیکول دندان مولر سوم انسان

**دکتر فاطمه مشهدی عباس[۱]- دکتر سمانه مجرد[+۲]- زهرا یادگاری[۳]- بهاره شریفی[۴]**

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- دندانپزشک

۳- سرپرست آزمایشگاه سلولی مولکولی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دستیار سرپرست آزمایشگاه سلولی مولکولی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

## Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from the dental pulp and follicle tissue of human third molar tooth

Mashadi Abbas F[1], Mojarrad S[2], Yadegary Z[3], Sharifi B[4]

1- Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

2- Dentist

3- Supervisor of the Cellular and Molecular Laboratory, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

4- Assistant of the Cellular and Molecular Laboratory, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

**Background and Aims:** In the last decade, several studies have reported the isolation of stem cell population from different dental sources, while their mesenchymal nature is still controversial. The aim of this study was to isolate stem cells from mature human dental pulp and follicle and to determine their mesenchymal nature before differentiation based on the ISCT (International Society for Cellular Therapy) criteria.

**Materials and Methods:** In this experimental study, intact human third molars extracted due to prophylactic or orthodontic reasons were collected from patients aged 18-25. After tooth extraction, dental pulp and follicle were stored at 4°C in RPMI 1640 medium containing antibiotics. Dental pulp and follicle were prepared in a sterile condition and digested using an enzyme solution containing 4mg/ml collagenase I and dispase (ratio: 1:1). The cells were then cultivated in α-MEM medium. Passage-3 cells were analyzed by flow cytometry for the expression of CD34, CD45, CD 73, CD90 and CD105 surface markers.

**Results:** Dental pulp and follicle were observed to grow in colony forming units, mainly composed of a fibroblast-like cell population. Flow cytometry results showed that dental pulp and follicle are highly positive for CD73, CD90 and CD105 (mesenchymal stem cell markers) and are negative for hematopoietic markers such as CD34 and CD 45.

**Conclusion:** In this study we were able to successfully confirm that dental pulp and follicle stem cells isolated from permanent third molars have a mesenchymal nature before differentiation. Therefore, these two sources can be considered as an easy accessible source of mesenchymal stem cells for stem cell research and tissue engineering.

**Key Words:** Mesenchymal stem cells; Dental pulp; Dental follicle; Flow cytometry

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2011;24(2):69-76

+ مؤلف مسؤول: نشانی: تهران-اوین- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- دانشکده دندانپزشکی- کد پستی ۱۹۸۳۹۶۹۴۱۱

تلفن: ۲۲۴۰۳۰۱۰ نشانی الکترونیک: samaneh_15@yahoo.com



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

## چکیده

**زمینه و هدف:** در دهه گذشته مطالعات متعددی جداسازی جمعیت سلول بنیادی را از منابع مختلف دندانی گزارش کرده‌اند، در حالیکه هنوز ماهیت مزانشیمی آنها مورد بحث است. هدف از مطالعه حاضر، جداسازی سلول بنیادی از پالپ و فولیکول دندان بالغ انسان و تعیین ماهیت مزانشیمی آنها قبل از تمایز بر اساس معیارهای ISCT (انجمن بین المللی سلول درمانی) بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، از دندان مولر سوم افراد بالغ ۲۵- ۱۸ سال که به دلایل پروفیلاکتیک یا ارتودونسی کشیده شدند، استفاده شد. دندان و فولیکول دندانی پس از کشیده شدن در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محیط RPMI 1640 حاوی آنتی بیوتیک نگهداری می‌شدند. پالپ و فولیکول دندان در شرایط کاملاً استریل تهیه و پس از لیز با mg/ml ۴ محلول کلاژناز تیپ I و دیسپاز با نسبت ۱:۱، سلول‌ها در محیط α-MEM کشت داده شدند. سلول‌ها در پاساژ سوم با روش فلوسایتومتری از نظر بیان آنتی ژن سطحی CD34، CD45، CD73، CD90،CD105 ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر مشاهده شد که بافت پالپ و فولیکول دندان به شکل واحدهای کلونی که غالباً حاوی جمعیتی از سلول‌های شبه فیبروبلاست بود، رشد کردند. نتایج آنالیز فلوسایتومتری به دست آمده از نمونه‌ها با درجه بالایی نسبت به مارکرهای سلول بنیادی مزانشیمی CD73، CD90 و CD105 واکنش مثبت و نسبت به مارکرهای CD34 و CD45 که از مارکرهای هماتوپویتیک هستند، واکنش منفی نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه نشان داده شد که سلول‌های بنیادی تخلیص شده از پالپ و فولیکول دندان مولر سوم قبل از تمایز ماهیت سلول بنیادی مزانشیمی را دارند و لذا به عنوان یک منبع با دسترسی آسان جهت تحقیقات کاربردی مرتبط با سلول بنیادی و مهندسی بافت می‌باشند.



**کلید واژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی؛ پالپ دندان؛ فولیکول دندان؛ فلوسایتومتری

وصول: ۸۹/۱۲/۲۵ اصلاح نهایی: ۹۰/۰۲/۱۲ تأیید چاپ: ۹۰/۰۲/۱۰


## مقدمه

از دست دادن دندان، استخوان فک یا هر دو به دنبال بیماری‌های پریودنتال، پوسیدگی دندانی، تروما، سرطان و ضایعات پاتولوژیک، یا انواع اختلالات ژنتیکی موجب از دست دادن هماهنگی و تطابق سیستم جونده می‌شوند که اغلب با عوارض فانکشنال و زیبایی همراه است (۱،۲).

با توجه به اینکه هیچ ماده مصنوعی نمی‌تواند به طور بهینه و کامل جایگزین بافت طبیعی دندان گردد، با پیشرفت دانش بیولوژی در زمینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، این سلول‌ها به عنوان جایگزینی برای بافت‌های از دست رفته دندانی مد نظر می‌باشند (۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دو خاصیت توان خود تجدیدی (Self renewal) و پتانسیل تمایز به چندین دودمان رده مزانشیمی (Multi-lineage differentiation)، شناخته می‌شوند (۴،۵).

MSCs نخستین بار از مغز استخوان جداسازی و به عنوان سلول‌های چسبنده با توانایی تشکیل واحدهای کلونی معرفی شدند (۵،۶). با توجه به معایب مرتبط با جداسازی MSCs از مغز استخوان مانند تعداد ناکافی MSCs در بافت مغز استخوان و مشکل بودن دسترسی، توجه محققین به جدا کردن MSCs از سایر منابع متمرکز شده است (۷). ازجمله بافت‌هایی که MSCs از آن جداسازی شده می‌توان به بافت عصبی، پوست، عضلات مخطط، بافت چربی، قرنیه، مغز، فولیکول مو، کبد اشاره نمود (۱،۵،۸). شناسایی و جداسازی سلول بنیادی از پالپ و فولیکول دندان برای اولین بار به ترتیب در سال ۲۰۰۰ توسط Gronthos و همکاران (۹) و در سال ۲۰۰۵ توسط Morsczeck و همکاران (۱۰) گزارش شد.

در دو دهه اخیر توجه کلینیکی و بیولوژیکی به MSCs افزایش یافته است. لذا انجمن بین المللی سلول درمانی (ISCT) در سال ۲۰۰۶ جهت مقایسه نتایج و بررسی تناقضات مطالعات در این زمینه، ۳ مسئله را برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی معیار ارزیابی قرار داد:

۱- توانایی رشد به شکل سلول‌های چسبنده در محیط کشت.

۲- بیان مثبت آنتی ژن‌های سطحی سلول بنیادی مزانشیمی CD73، CD90، CD105 و عدم بیان آنتی ژن‌های هماتوپویتیک- اندوتلیال CD14، CD34 ، CD45 یا CD11b، CD79α یا CD19

۳- توانایی تمایز به حداقل سه رده سلول مزانشیمی‌استئوژنیک، آدیپوژنیک و کندروژنیک (۱۱).

در انسان، تشکیل ساختارهای دندانی مولر سوم منحصر به فرد است. زیرا پروسه ارگانوژنزیس پس از تولد و در ۶ سالگی شروع می‌شود و تا این زمان بافت‌های جنینی به طور آرام و تمایز نیافته در



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

بافت‌های دندانی باقی می‌مانند (۱۲). از طرفی اغلب مشکلات استخوانی و دندانی در دوران بزرگسالی که دندان‌های شیری حضور ندارند، اتفاق می‌افتد. از آنجا که دندان مولر سوم به طور روتین به دلایل پروفیلاکتیک یا ارتودونسی کشیده و بدون استفاده دور ریخته می‌شود، تخلیص MSCs از بافت‌های دندانی دندان مولر سوم گزینه‌ای مناسب می‌باشد (۱۳،۱۴). لذا هدف از مطالعه حاضر جداسازی سلول بنیادی از پالپ و فولیکول دندان و ارزیابی ماهیت مزانشیمی آنها قبل از تمایز و بر اساس معیارهای ISCT (International Society for Cellular Therapy) بود.

## روش بررسی

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی بود. تعداد ۱۴ نمونه از پالپ و ۶ نمونه از فولیکول دندانی مولر سوم افراد بالغ ۲۵-۱۸ سال جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به علت نهفتگی یا درمان ارتودنسی با تشخیص متخصص جراح فک و صورت و متخصص ارتودونسی و با رضایت قبلی بیماران کشیده می‌شدند. نمونه‌ها در این مطالعه فاقد پوسیدگی یا درمان ترمیم قبلی و بیماران همگی سالم و فاقد هرگونه بیماری سیستمیک بودند. نمونه‌ها پس از کشیده شدن در درون لوله‌های محتوی Gibco، RPMI 1640(Germany) حاوی آنتی بیوتیک دو برابر قدرت (2x) پنی سیلین و استرپتوماسین (Gibco, Germany) قرار گرفته و تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی منتقل شدند. به منظور آشکار شدن اتاقک پالپ، دندان‌ها از ناحیه اتصال مینا- سمان (CEJ) به وسیله دیسک کارباید و هندپیس برش خوردند. سپس بافت پالپ از دندان به وسیله فایل ظریف از اتاقک پالپ جدا گردید.

به منظور کشت سلولی بافت پالپ و فولیکول توسط تیغه جراحی شماره ۱۰ به قسمت‌های کوچک قطعه قطعه شده و سپس در لوله فالکون حاوی ۴ میلی گرم بر میلی لیتر محلول کلاژناز تیپ (Sigma I, Germany) و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر محلول دیسپاز (Gibco, Germany) با نسبت ۱:۱ به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس به بافت لیز شده محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Germany) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰ g سانتریفیوژ شدند. پلیت سلولی حاصله با محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتوماسین (Both antibiotics from Gibco, Germany) مخلوط و پس ازانتقال به zvt مناسب درانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و اتمسفر ۵٪ Co2، کشت داده شدند. محیط کشت هر دو روز یکبار عوض می‌شد تا ۷۰٪ کف پلیت از سلول پر شود. وقتی کف پلیت به ۷۰٪ پرشدگی (Confluency) رسید، نمونه‌ها به کمک Trypsin-EDTA (Gibco, Germany) پاساژ داده شدند.

### فلوسایتومتری:

از آنالیز فلوسایتومتری برای بررسی پروفایل فنوتیپیک مارکرهای سطحی و ماهیت سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت پالپ و فولیکول دندان مولر سوم انسان، استفاده شد. به این منظور سلول‌ها در پاساژ سوم تریپسینه و به شکل سوسپانسیون در ml ۱، PBS (Phosphate Buffer Saline) با غلظت cells/ml ۱,۰۰۰,۰۰۰ قرار گرفتند. سپس سلول‌ها به ۶ تیوب تقسیم شدند. به هر تیوب µl ۵ PE یا FITC کنژوگه با آنتی بادی اضافه شد. سپس این تیوب‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک (Dark room) انکوبه شدند. پس از این مدت سلول‌ها با ml ۱ بافر شستشو دهنده شسته و با سرعت ۱۲۰۰ (RPM) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس هر نمونه سلولی در µl ۵۰۰-۳۰۰ بافر شستشو دهنده سوسپانسیونه شد و به وسیله دستگاه فلوسایتومتری BDFACS Calibur (BD bioscience USA, CA, Sanjose) آنالیز شد. از نرم افزارCell Quest Pro برای آنالیز نتایج استفاده شد. در این مطالعه از ایزوتوپ ایمونوگلوبولین IgG1 موشی برای گروه کنترل استفاده شد. برای پی بردن به پروفایل فنوتیپیک نمونه‌ها از آنتی بادی‌های زیر استفاده شد:

آنتی بادی FITC-کنژوگه:

Mouse Anti Human CD90 (Dako/Denmark), Mouse Anti Human CD45 (BD biosciences/Belgium)

آنتی بادی PE کنژوگه:

Mouse Anti Human CD 105, Mouse Anti Human CD 73, Mouse Anti Human CD 34 (all three from BD biosciences/Belgium)



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

## یافته‌ها

### یافته‌های کشت سلولی:

از ۲۰ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۱۴ نمونه از پالپ و ۶ نمونه از فولیکول دندان مولر سوم به دست آمد. نهایتاً موفق شدیم یک خط سلولی از بافت پالپ و ۲ خط سلولی از بافت فولیکول تخلیص نماییم.

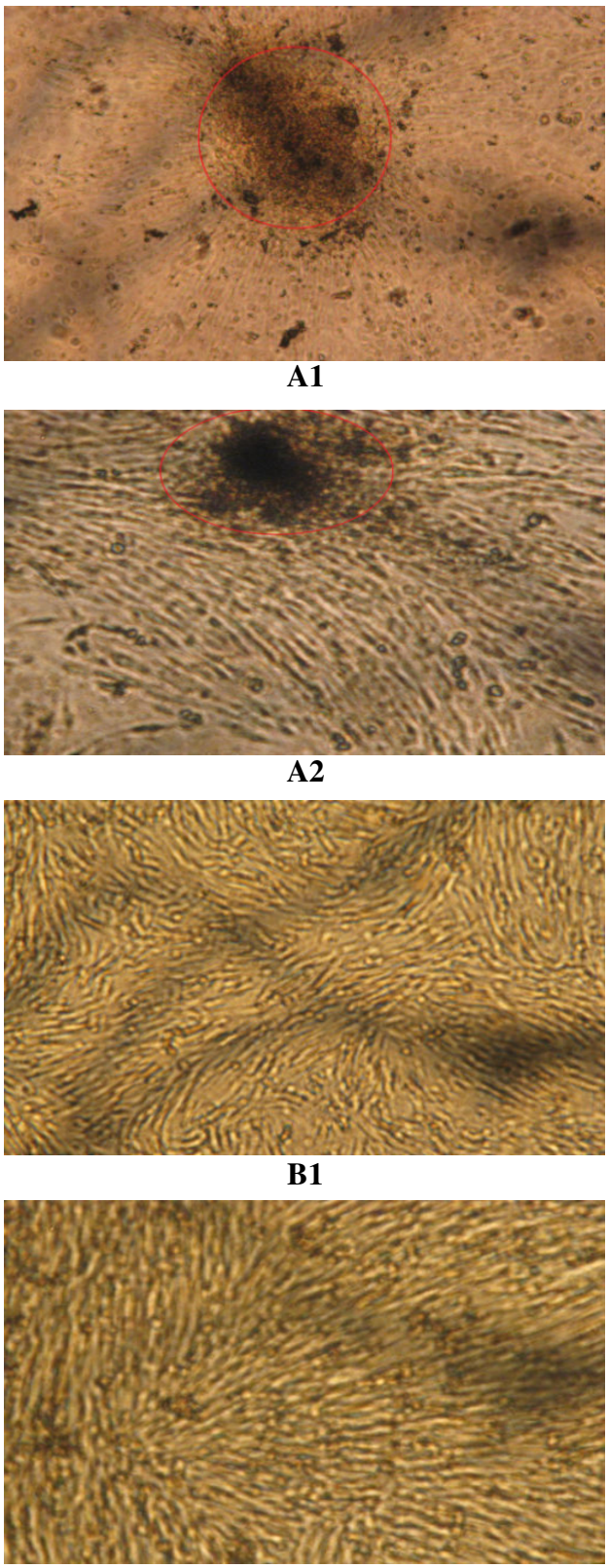
نمونه‌ها در روز ۵، ۱۰ و قبل از پاساژ سلولی زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شدند. سلول‌های جداسازی شده از بافت پالپ و فولیکول، هر دو کلونی‌های مشتق از تک سلول (Single- cell derived colony) تشکیل داده و به شکل واحدهای کلونی رشد می‌کردند. هر کلونی از یک سلول پیش ساز سرچشمه می‌گیرد. تشکیل واحدهای کلونی چسبنده از ویژگی‌های مهم سلول بنیادی مزانشیمی است. این کلونی‌ها اکثراً از سلول‌های شبه فیبروبلاست (CFU-F) تشکیل شده بودند و تعدادی هم سلول شفاف و گرد دیده می‌شد. نمونه‌ها وقتی به پر شدگی ۷۰٪ می‌رسیدند پاساژ داده می‌شدند. در این حالت کشت‌ها پر از باندل‌های متعدد با سلول‌های شبه فیبروبلاست بودند که هر کدام در جهت خاصی حرکت می‌کردند (شکل۱). مورفولوژی سلول‌های بنیادی پالپ و فولیکول دندان انسان در محیط کشت سلولی زیر میکروسکوپ نوری (A1 و A2). رشد DPSCs (شکل A1) و DFPCs (شکل A2) به شکل واحد کلونی (فلش) شامل سلول‌های شبه- فیبروبلاست (CFU-F)، در روز پنجم پس از کشت اولیه (B1 و B2). همان محیط کشت DPSCs (B1) و DFPCs (B2) پس از رسیدن به پرشدگی و قبل از پاساژ سلولی. محیط کشت شامل باندل‌های متعدد از سلول‌های دوکی و شبه- فیبروبلاست است که هر باندل در جهت خاص قرار گرفته است.

### یافته‌های آنالیز فلوسایتومتری:

بررسی عدم بیان و درجه بیان مثبت مارکرها در جمعیت سلولی تخلیص شده، بر اساس این طبقه بندی صورت گرفت (۸،۱۳):

بیان کمتر از ۱۰٪ عدم بیان، ۴۰٪-۱۱ بیان ضعیف، ۷۰٪-۴۱ بیان متوسط، بیش از ۷۰٪ بیان قوی می باشد.

نتایج فلوسایتومتری برای سلول‌های بنیادی پالپ دندان (Dental Pulp Stem Cells: DPSCs) و سلول‌های بنیادی فولیکول دندان (Dental Follicle Stem Cells: DFSCs) نشان داد که در هر دو بافت بیان مارکر CD34 (مارکر سلول پیش ساز هماتوپویتیک



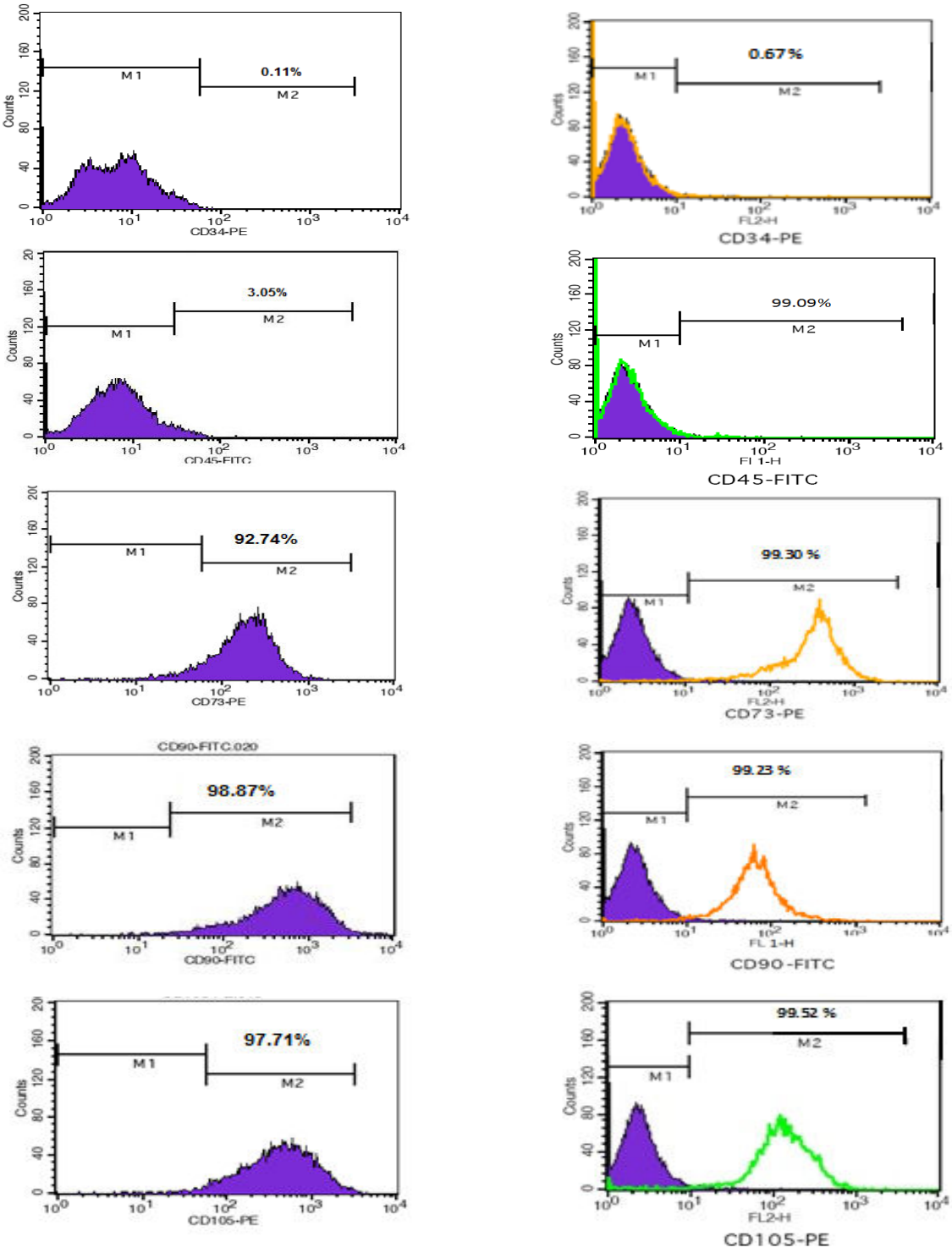

**شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی پالپ و فولیکول دندان‌انسان در محیط کشت سلولی زیر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی عکس A1 و A2، x100 و بزرگنمایی عکس B1و B2، x200می باشد).**



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

**جدول ۱- درصد بیان مارکرهای ارزیابی شده در جمعیت سلولی تخلیص شده از DPSCs و DFSCs**

| منبع MSCs | ٪ بیان مارکر CD34 | ٪ بیان مارکر CD45 | ٪ بیان مارکر CD73 | ٪ بیان مارکر CD90 | ٪ بیان مارکر CD105 |
|---|---|---|---|---|---|
| DPSCs | ٪۰/۱۱ | ٪۳/۰۵ | ٪۹۲/۷۴ | ٪۹۷/۷۱ | ٪۹۸/۸۷ |
| $DFSC_S$ | ٪۰/۳۴ | ٪۱/۲۶ | ٪۹۸/۴۲ | ٪۹۹/۱۹ | ٪۹۸/۳۴ |




**نمودار ۱- نتایج فلوسایتومتری بیان مارکرهای سطحی در جمعیت سلولی تخلیص شده از DPSCs و DFSCs در پاساژ سوم**



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

اولیه و سلول‌اندوتلیال) و CD45 (مارکر سلول بنیادی پیش ساز لکوسیت) منفی و بیان مارکرهای سلول بنیادی مزانشیمی CD90، CD105 و CD73 مثبت و قوی بود. نتایج فلوسایتومتری مارکرهای ارزیابی شده و بیان مارکرها در جمعیت سلولی تخلیص شده از بافت پالپ و فولیکول به ترتیب در جدول ۱ و نمودار ۱ آمده است. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که DPSCs و DFSCs هر دوآنتی ژن سطحی CD73، CD90 و CD105 (آنتی ژن‌های سطحی معمول برای MSCs) را بیان نمودند و برای آنتی ژن سطحی CD34 و CD45 (آنتی ژن‌های سطحی هماتوپویتیک) منفی بودند. (M1: محدوده عدم بیان مارکر.M2: محدوده بیان مارکر).

## بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر دندانپزشکی اساساً بر پایه درمان‌های غیر سلولی استوار است، که در آنها عمدتاً از مواد با دوامی خارج از سیستم بدن استفاده می‌شود. آمالگام، انواع کامپوزیت‌ها، ایملپنت‌های فلزی، مواد سنتتیک و پیوندهای بافتی از انتخاب‌های اصلی برای ترمیم دندان و ساختمان‌های کرانیوفاشیال هستند. علی رغم کسب نتایج نسبتاً موفق بالینی در مصرف مواد رایج، این مواد دارای محدودیت‌های ذاتی می‌باشند. در این راستا، به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های بنیادی اتولوگ تولید کننده دنتین، سمان، استخوان و لیگامان پریودنتال در آینده احتمالاً یک انتخاب جایگزین برای درمان‌های رایج و استفاده درRegenerative medicine خواهد بود (۱۴،۱۵).

یافته‌های کشت سلولی مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های جداسازی شده از بافت پالپ و فولیکول، هر دو کلونی‌های مشتق از تک سلول (Single- cell derived colony) تشکیل داده و به شکل واحدهای کلونی متشکل از سلول‌های شبه فیبروبلاست (CFU-F) رشد می کردند. این یافته‌ها، نتایج سایر مطالعاتی را که دراین زمینه صورت گرفته است را تأیید می‌کند (۱۷-۱،۷،۱۵).

نتایج آنالیز فلوسایتومتری DPSCs مطالعه حاضر نشان داد که بیان مارکرهای هماتوپویتیک و اندوتلیال CD34 و CD45 منفی و بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD105 مثبت بودند، که با نتایج مطالعه باغبان اسلامی‌نژاد و همکاران (۷) که در همین راستا برای تعیین ماهیت سلول‌های جدا شده از پالپ دندان مولر سوم انسان بر اساس معیار ISCT صورت گرفته بود، مشابه می‌باشد. نتایج مطالعه آنها نشان داد که بیان مارکرهای CD34 و CD45 منفی (به ترتیب ۱/۰۴٪ و ۰/۷۴٪) و بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD105 مثبت (به ترتیب ۹۷/۶۸٪، ۹۵/۶۴٪ و ۹۸/۶۲٪) می‌باشد.

نتایج مطالعه آقاحسینی و همکاران (۱۳) با نتایج مطالعه حاضر و مطالعه باغبان اسلامی‌نژاد و همکاران (۷) متفاوت بود. در مطالعه آنها نتایج آنالیز فلوسایتومتری DPSCs جدا شده از مولر سوم انسان نشان داد که مارکر CD34 و CD45 بیان مثبت و ضعیف (به ترتیب ۲۰/۴۹٪ و ۱۲/۷۹٪)، مارکر CD105 بیان مثبت و متوسط (۶۸/۸۶٪) و مارکر CD90 بیان مثبت و قوی (۸۵/۳۷٪) داشتند. این تناقض می‌تواند ناشی از آلوده بودن محیط کشت سلولی این مطالعه با سایر سلول‌های چسبنده از جمله سلول‌های هماتوپویتیک باشد.

سایر مطالعاتی که در زمینه جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از پالپ دندان مولر سوم انسان صورت گرفته نیز نشان از عدم بیان مارکرهای هماتوپویتیک CD34 و CD45 و بیان مثبت مارکرهای CD73، CD90 و CD105 دارد که با مطالعه حاضر مشابه است (۸،۱۸،۱۹).

همچنین نتایج آنالیز فلوسایتومتری DFSCs مطالعه حاضر نشان داد که بیان مارکرهای هماتوپویتیک و اندوتلیال CD34 و CD45 منفی و بیان مارکرهای مارکرهای CD73، CD90 و CD105 مثبت است، که با نتایج مطالعه Yalvac و همکاران (۲۰) که در همین راستا برای تعیین ماهیت سلول‌های جدا شده از فولیکول دندان مولر سوم انسان انجام شد، مشابه بود. نتایج مطالعه آنها نشان داد که بیان مارکر CD34 و CD45 منفی و بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD105 مثبت است.

در مطالعه Lindroos و همکاران (۱۸) که بر روی DFSCs صورت گرفت، نتایج نشان داد که بیان مارکر CD45 منفی (۰/۳٪) و بیان مارکرهای CD90 و CD105 مثبت (به ترتیب ۹۵/۹٪ و ۹۹/۸٪) است. نتایج مطالعه Kemoun و همکاران (۲۱) نیز تأییدی بر نتایج مطالعات قبلی است که نشان داد بیان مارکر CD45 منفی (۰/۱۱٪) و بیان مارکر CD73 مثبت (۹۵/۲۷٪) می‌باشد، که نتایج هر دو تحقیق مشابه مطالعه حاضر است (۱۸،۲۱).

بر اساس یافته‌های تجربی به دست آمده از مطالعه حاضر به نظر



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

می‌رسد که تخلیص سلول از بافت فولیکول دندان از سهولت بیشتری برخوردار باشد. حجم بیشتر بافتی و در نتیجه محتوی سلولی بیشتر بافت فولیکول و کاهش احتمال آلودگی بافت فولیکول حین کار (نداشتن مرحله خارج کردن بافت از دندان) از جمله مزیت‌های تخلیص MSCs از این بافت است.

تا به امروز، MSCs از ۶ بافت دندانی مختلف شامل: پالپ دندان بالغ، پالپ دندان شیری در حال ریزش، لیگامان پریودونتال، پاپیلای اپیکال، فولیکول دندانی و جوانه دندان‌انسان جداسازی شده است (۹،۱۰،۲۲-۲۶). اما در ایران، تنها جداسازی موفقیت‌آمیز MSCs از پالپ دندان شیری در حال ریزش توسط نوربخش و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۸ و پالپ دندان بالغ مولر سوم انسان، توسط آقاحسینی وهمکاران (۱۳) در سال ۲۰۰۹ و باغبان اسلامی نژاد و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۰ گزارش شده است، لذا وجه تمایز مطالعه حاضر، تخلیص موفقیت‌آمیز MSCs از فولیکول مولر سوم‌انسان برای نخستین بار در کشور می‌باشد.

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر حجم کم نسج پالپ موجود در اتاقک پالپ و آلودگی نمونه‌ها حین کار بود که به این علت تعدادی از تلاش‌ها برای تخلیص خط سلولی از بافت پالپ و فولیکول دندان بی‌نتیجه ماند. همچنین به علت نبود مارکرهای مورد نیاز در داخل کشور و محدودیت‌های ناشی از تحریم، امکان بررسی تعداد مارکر بیشتر، مقدور نبود.

از آنجا که MSCs کاربردی وسیع درمطالعات مهندسی بافت و Regenerative medicine دارد، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی توانایی سلول‌های بنیادی تخلیص شده در تولید بافت شبه پالپ/دنتین، بافت پریودنتال، ترمیم نقایص استخوانی و تولید ریشه بیولوژیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتایج مطالعه حاضر تأیید کننده ماهیت مزانشیمی‌سلول‌های بنیادی جدا شده از دو منبع دندانی پالپ و فولیکول قبل از تمایز می‌باشد و لذا می توان از آنها به عنوان یک منبع با دسترسی آسان و بدون مشکلات اخلاقی جهت تحقیقات کاربردی مرتبط با سلول بنیادی و مهندسی بافت استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

مراحل جداسازی و کشت سلولی تحقیق حاضر با یاری خانم یادگاری و خانم شریفی در آزمایشگاه سلولی مولکولی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و آنالیز فلوسایتومتری این تحقیق توسط آقای جان زمین در لابراتور فلوسایتومتری بخش سلول بنیادی، مرکز تحقیقات رویان تهران صورت گرفت. لذا از کلیه مسئولین و همکارانی که درانجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع:

**1-** Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Eng. 2007;13(4):767-73.

**2-** Young SC, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. J Dent Res. 2002;81(10):695-700.

**3-** Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell. 2000;100(1):143-55.

**4-** Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. Cell Tissue Res. 2008;331(1):359-72.

**5-** Baghban Eslaminejad MR. Mesenchymal stem cells: history, isolation and biology. J Iran Anatomic sci. 2007;5(18):49-59.

**6-** Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970;3(4):393-403.

**7-** Baghaban Eslaminejad MR, Nazarian H, Shariati M, Vahabi S, Falahi F. Isolation and in vitro characterization of mesenchymal stem cells derived from the pulp tissue of human third molar tooth. Iran J Med Sci. 2010;35(3):216-25.

**8-** Suchanek J, Soukup T, Visek B, Ivancakova R, Kucerova L, Mokry J. Dental pulp stem cells and their characterization. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2009;153(1):31-6.

**9-** 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 U S A. 2000;97(25):13625-30.

**10-** Morsczeck, C, Gotz W, Schierholz J , Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol. 2005;24(2):155-65.

**11-** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et all. Minimal ctiteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

**12-** Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Lida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. J Dent Res. 2008;87(7):676-81.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]

**13-** Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. Clin Transplant. 2010;24(2):E23-8.

**14-** Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. J Dent Res. 2006;85(11):966-79.

۱۵- نوربخش نصرت، طالبی اردشیر، موسوی سید بهروز، نادعلی فاطمه، ترابی نژاد محمود، کربلایی خدیجه و همکاران. جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال از پالپ دندان‌های شیری. فصلنامه پزشکی یاخته. سال ۱۳۸۷; دوره ۱۰(شماره ۲): ۸-۱۰۱.

**16-** Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

**17-** Suchanek J, Soukup T, Ivančakova R, Karbanova J, Hubkova V, Pytlik R, et al. Human dental pulp stem cells-isolation and long time cultivation. Acta Medica. 2007;50(3):195-201.

**18-** Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. Biochem and Biophys Res Commun. 2008;368(2):329-35.

**19-** Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res. 2005;8(3):191-9.

**20-** Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implication in neo-vascularization, osteo-,adipo-and neurogenesis. Pharmacogenomics J. 2010;10(2):105-13.

**21-** Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. Cell Tissue Res. 2007;329(2):283-94.

**22-** Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem Cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(10):5807-12.

**23-** Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. J Oral Pathol Med. 2008;37(9):571-4.

**24-** Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2006;41(4):303-10.

**25-** Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. Oral Dis. 2006;12(4):358-63.

**26-** Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res. 2007;10(3):149-60.

[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08 ]