مقاله پژوهشی

بررسی اثر شیرسویا و شیر گاو بر بقا سلول‌های بنیادی پالپ دندان خرگوش

فاطمه شعله ور[۱]، داود مهربانی[*۲و۳]، پریچهر یغمایی[۱]، اکبر وحدتی[۴]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات فناوری ترانسژنیک و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران.
۳- گروه طب ترمیمی، دانشگاه مانیتوبا، وینیپگ، مانیتوبا، کانادا.
۴- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، فارس، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: پالپ دندان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد که سلول‌های بنیادی پالپ دندانی نامیده می‌شوند (DPSCs). در صورت خروج کامل دندان از حفره آلوئول و شکستگی دندان، DPSCs نقش برجسته‌ای در بازسازی بافت آسیب دیده دارند. این مطالعه به بررسی اثر شیر سویا و شیر گاو بر بقا DPSCs در مقایسه با محیط بافری هنکز (HBSS) پرداخته است.

مواد و روش‌ها: DPSCs از ۱۶دندان‌های پیشین خرگوش جدا گردید. DPSCs پاساژ سوم در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شده و پس از ۳ روز شیرسویا، شیرگاو، HBSS (کنترل مثبت) و آب مقطر (کنترل منفی) جایگزین محیط کشت گردید. قابلیت زنده ماندن سلول‌ها پس از ۴۵ و ۹۰ دقیقه و ۳ و ۶ ساعت بررسی شد. ماهیت مزانشیمی سلول‌ها به وسیله RT-PCR بررسی گردید. زنده ماندن سلول‌ها طی رنگ آمیزی با تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی پایداری سیتوژنیک سلول‌ها، آنالیز کاریوتیپ انجام شد.

نتایج: میزان بقای DPSCs در تمام محیط‌ها در تمام زمان‌ها به طور معنی داری نسبت به محیط کنترل منفی بیشتر بوده است. بعد از گذشت ۶ ساعت، میزان بقای DPSCs در شیرسویا، شیرگاو و HBSS به ترتیب ۱۰۰/۰۰±۰/۰۰، ۱۰۰/۰۰±۰/۰۰ و ۷۴/۷۴±۵/۷۰ بوده است. بعد از گذشت ۶ ساعت، در هر دو محیط شیرسویا و شیر گاو در مقایسه با HBSS، درصد بیشتری از سلول‌ها زنده ماندند.

نتیجه‌گیری: شیرسویا همانند شیر گاو به عنوان یک محیط نگهدارنده برای دندان‌های کشیده یا شکسته شده پیشنهاد می‌گردد و قادر است بقا DPSCs را تا مدت طولانی حفظ کند.

کلمات کلیدی: شیرسویا، شیر گاو، بقا، سلول‌های بنیادی پالپ دندان، خرگوش

مقدمه

سلول‌های بنیادی از بافت‌های مختلفی مثل مغز استخوان (۱)، چربی (۲)، اندومتر (۳)، بندناف (۴) و پالپ دندان (۵) جدا شده‌اند. این سلول‌ها قابلیت تمایز به بافت‌های مختلف مزودرمی مثل استخوان (۶)، عصب (۷) و کاردیومیوسیت (۸) را دارند. سلول‌های پالپ دندان (DPSCs) به دلیل ماهیت مزانشیمی، قدرت تکثیر و تمایز بالا، سهولت دسترسی و جداسازی آسان یکی از منابع پر طرفدار در طب ترمیمی می‌باشند (۹).

یکی از آسیب‌های دندانی، خروج کامل آن از حفره آلوئول پس از زمین خوردن، تصادفات جاده‌ای و حوادثی از این قبیل می‌باشد که با توجه به آسیب ایجاد شده می‌توان این دندان خارج شده را به منظور جاگذاری مجدد و ترمیم ضایعات، مورد استفاده قرار داد (۹). وقوع این امر در صورتی میسر می‌گردد که سلول‌های پالپ

* **نویسنده مسئول: داود مهربانی**، مرکز تحقیقات فناوری ترانسژنیک و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران. Email: mehrabad@sums.ac.ir

دندان زنده مانده و توانایی تکثیر خود را حفظ کرده باشند. هر چه مدت زمان تلف شده برای انتقال دندان افتاده یا شکسته شده به محیط نگهدارنده مناسب کمتر باشد، پس از انتقال دندان به آزمایشگاه درصد بیشتری از سلول‌های پالپ دندان زنده می‌مانند (۹).

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه بررسی محیط‌های نگهدارنده گوناگون از قبیل محلول نمک بافری هنکز (HBSS)، محیط کشت، محلول نمکی (سالین)، محصولات طبیعی از قبیل آب، بزاق، شیرگاو، سفیده تخم مرغ، چای سبز، آب نارگیل، آب انار، آلوئه ورا به منظور زنده نگهداشتن سلول‌های پریودنتال لیگامنت (PDL) انجام شده است (۱۰). شیرگاو به دلیل سهولت دسترسی، قیمت ارزان، pH و اسمولاریته خنثی (۱۱، ۱۲) و دارا بودن مواد مغذی مورد نیاز سلول از قبیل کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها و فاکتورهای رشد (۱۳) در مقایسه با سایر محیط‌های نگهدارنده مطلوب تر بوده است (۱۴).

شیرسویا عصاره آبی حاصل از دانه‌های سویا (*Glycine Max*) می‌باشد که فاقد برخی از فیبرهای نامحلول بوده ولی حاوی کلیه ترکیبات بیوشیمیایی موجود در دانه‌های سویا می‌باشد (۱۵). شیرسویا دارای حدود ٪۳/۵ پروتئین (مشابه شیر گاو)، ٪۲ چربی و ٪۳ کربوهیدرات می‌باشد (۱۵). مقدار پروتئین شیر سویا تقریبا با شیر گاو برابر بوده ولی از نظر توالی آمینواسیدی متفاوت است. برخلاف شیر گاو، شیر سویا دارای مقدار کمی چربی غیراشباع، تری گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) بوده و فاقد کلسترول می‌باشد (۱۶). تحقیقات نشان داده است که شیر سویا به دلیل ماندگاری طولانی و مواد مغذی فراوان اعم از ویتامین‌ها و مواد معدنی، قادر به تغذیه سلول‌های پریودنتال لیگامنت به منظور حفظ بقای آن‌ها می‌باشد (۱۷).

دانه‌های سویا منابع غذایی غنی از ایزوفلاوون‌ها، توکوفرول‌ها و آسکوربیک اسید هستند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی می‌باشند (۱۸، ۱۹). مهمترین ایزوفلاوون‌های موجود در شیرسویا، جنیستئین و دائیدزئین بوده که غلظت جنیستئین بیشتر می‌باشد (۲۰). فعالیت آنتی اکسیدانتی شیرسویا در مقایسه با شیر گاو تقریبا ۵ برابر گزارش شده است (۲۱). در این تحقیق، شیر سویا و شیر گاو با محیط نگهدارنده محلول نمک بافری هنکز (HBSS) در بقا سلول‌های بنیادی پالپ دندان مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات از خانه حیوانات مرکز پزشکی مقایسه‌ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و تمام مراحل مطالعه مطابق با دستور العمل کار با حیوانات آزمایشگاهی و رعایت قوانین اخلاقی حیوانات انجام گردید و کلیه مراحل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تأیید گردید.

پس از بی هوش کردن ۵ خرگوش نر نیوزیلندی یک ساله به وزن تقریبی ۲/۵ کیلوگرم تعداد ۱۶ دندان پیشین کشیده شده و پالپ دندان تحت شرایط کاملا استریل جداسازی گردید. بافت پالپ پس از شستشو با بافر فسفات سیالین (PBS)، به صورت مکانیکی به وسیله تیغ استریل اسکالپل قطعه قطعه گردید. قطعات بافت پالپ در محلول PBS در دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس به رسوب آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma Aldrich, USA) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور معمولی (37°C/5% CO_2) قرار داده شد. پس از آن به منظور غیرفعال سازی آنزیم، سه برابر حجم آنزیم، DMEM (Biowest, France) حاوی سرم اضافه و به خوبی سلول‌ها منفرد گردیدند. مجددا محتویات لوله‌های فالکون به طریق مشابه سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco, Germany)، ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین و فانگیزون (Biofluids, Rockville, Germany) و ۱ درصد L- گلوتامین (Biowest, France) کشت داده شدند. سوسپانسیون سلولی به انکوباتور منتقل شده و هر ۳ روز یک بار محیط کشت تازه جایگزین محیط قبلی گردید و وضعیت سلول‌ها با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. پس از پر شدن ٪۷۵ کف پلیت با سلول، پاساژ سلولی صورت گرفت.

شیر سویای حاوی g ۶/۳ پروتئین، 4 g چربی، g ۱۷/۵ کربوهیدرات، mg ۲۵ سدیم، mg ۳۱۳ کلسیم در هر لیتر (ACE CANNING CORP, Malaysia)، شیرگاو (پگاه فارس، ایران)، محلول نمکی بافری هنکز (Biowest, France) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر کاملا استریلیزه تزریقی و دارای تاریخ انقضاء به منظور محیط نگهدارنده کنترل منفی از داروخانه تهیه گردید.

اسمولاریته و pH محیط نگهدارنده آزمایشی (شیرسویا)، کنترل مثبت (HBSS) و کنترل منفی (آب مقطر) به وسیله اسمومتر (Osmomat 030) و pH سنج (Metrohm) اندازه گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱ : میزان pH و اسمولالیته محیط‌های نگهدارنده مختلف آزمایشی.

گروه	pH	اسمولالیته(mOsm/kg)
آب مقطر (کنترل منفی)	۵/۱۸	۳
HBSS (کنترل مثبت)	۷/۲۸	۲۹۳
666	۷/۰۱	۳۲۱
شیرگاو	۶/۷۶	۲۹۴

HBSS: محیط بافری شده هنکز

DPSCs در پاساژ ۳ به ۴ گروه (شیر سویا، شیرگاو، HBSS و آب مقطر تزریقی) و هر گروه به ۴ زیر گروه (دوره‌های زمانی ۴۵ دقیقه، ۹۰ دقیقه، ۳ ساعت و ۶ ساعت) تقسیم گردیدند. سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ چاهکی منتقل شده به طوری که تراکم سلولی در هر چاهک برابر با ۳۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر باشد. بعد از اضافه کردن محیط کشت، پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند. پس از گذشت ۳ روز، محیط کشت حذف و ۱ میلی لیتر محیط‌های نگهدارنده (شیر سویا، شیرگاو، HBSS و آب مقطر تزریقی) در چهار دوره زمانی ۴۵ دقیقه، ۹۰ دقیقه، ۳ ساعت و ۶ ساعت جایگزین آن گردید. پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت دوره‌های زمانی مربوطه، طی رنگ‌آمیزی با تریپان بلو در PBS ۰/۴ درصد و شمارش تعداد سلول‌های زنده و مرده با استفاده از لام نئوبار، میزان بقای DPSCs که به طور مستقیم در معرض محیط‌های آزمایشی بودند ارزیابی گردید (جدول ۳). این مرحله از تحقیق، ۴ بار تکرار و داده‌ها از نظر آماری آنالیز گردید.

به منظور ارزیابی مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی به دست آمده، بیان سه مارکر سطحی CD73 (مارکر اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، CD34 و CD45 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک) طی RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج RNA از DPSCs پاساژ سوم با استفاده از کیت (DENAZist column RNA isolation kit-III, Iran) و مطابق با دستوالعمل کیت انجام شد. پس از تعیین غلظت و درصد خلوص RNA به دست آمده به وسیله اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific Nanodrop 1000 spectrophotometer, Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, USA)، مقدار ۱ میکروگرم RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت AccuePower CycleScript PreMix (dN6) (Bioneer, South Korea) مورد استفاده قرار گرفت و مطابق با دستورالعمل کیت، cDNA سنتز گردید. در ادامه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول ۲) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی و در ۳۵ سیکل انجام شد. پس از تکثیر، هر یک از محصولات PCR به وسیله ژل ۱/۵ درصد

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی به دست آمده بر اساس مارکر سطحی

نام جفت پرایمر	ژن هدف	طول توالی
Forward: 5´-TAC ACC GGC AAT CCA CCT TC-3´ Reverse: 5´-CTT GGG TCT TCG GGA ATG CT-3´	CD73	bp 212
Forward: 5´-ACC ATC TCA GAG ACT AGA CTG-3´ Reverse: 5´-GAA AGT TCT GTT CTG TTG GC-3	CD34	512bp
Forward: 5´-CAG TAC TCT GCC TCC CGT TG-3´ Reverse: 5´-TAC TGC TGA GTG TCT GCG TG-3´	CD45	269bp

جدول ۳ : میانگین درصد قابلیت زنده ماندن سلول‌های بنیادی پالپ دندان (انحراف معیار±میانگین) در شیرسویا، شیرگاو، کنترل مثبت و کنترل منفی در دوره‌های زمانی گوناگون

گروه‌های آزمایشی	سلول زنده(٪) ۴۵ دقیقه	سلول زنده(٪) ۱/۵ ساعت	سلول زنده(٪) ۳ ساعت	سلول زنده(٪) ۶ ساعت
آب مقطر (کنترل منفی)	۶۵/۷±۹۱/۲۳[c]	۴۷/۹±۴۲/۳۶[c]	۱۸/۴±۳۸/۱۲[c]	۰/۰±۰۰/۰۰[d]
HBSS (کنترل مثبت)	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۹۷/۴±۶۲/۱۲[a]	۸۴/۱±۱۳/۳۷[a]	۷۴/۵±۷۴/۷۰[b]
شیرسویا	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۹۷/۴±۴۴/۴۴[a]	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]
شیرگاو	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]	۱۰۰/۰±۰۰/۰۰[a]

حروف a، b، c و d تفاوت‌های معنی دار را در هر ستون نشان می‌دهد. حروف b-d اختلاف معنی دار را در مقایسه با a نشان می‌دهند. به طوری که بعد از گذشت ۴۵ دقیقه، ۱/۵ ساعت و همچنین بعد از ۳ ساعت، به طور معنی داری درصد قابلیت زنده ماندن سلول‌های بنیادی پالپ دندان در آب مقطر کمتر از سایر گروه‌ها بود. بعد از ۶ ساعت درصد قابلیت زنده ماندن سلول‌های مذکور در HBSS به طور معنی داری نسبت به شیرسویا و شیر گاو کمتر بود و نسبت به آب مقطر به طور معنی داری بیشتر بود. بعد از گذشت ۶ ساعت درصد قابلیت زنده ماندن سلول‌ها در آب مقطر به طور معنی داری نسبت به دوره‌های زمانی ۴۵ دقیقه، ۱/۵ و ۳ ساعت کمتر شد.

آگاروز جداسازی و طی رنگ آمیزی با DNA safe stain قابل مشاهده و ارزیابی گردید.

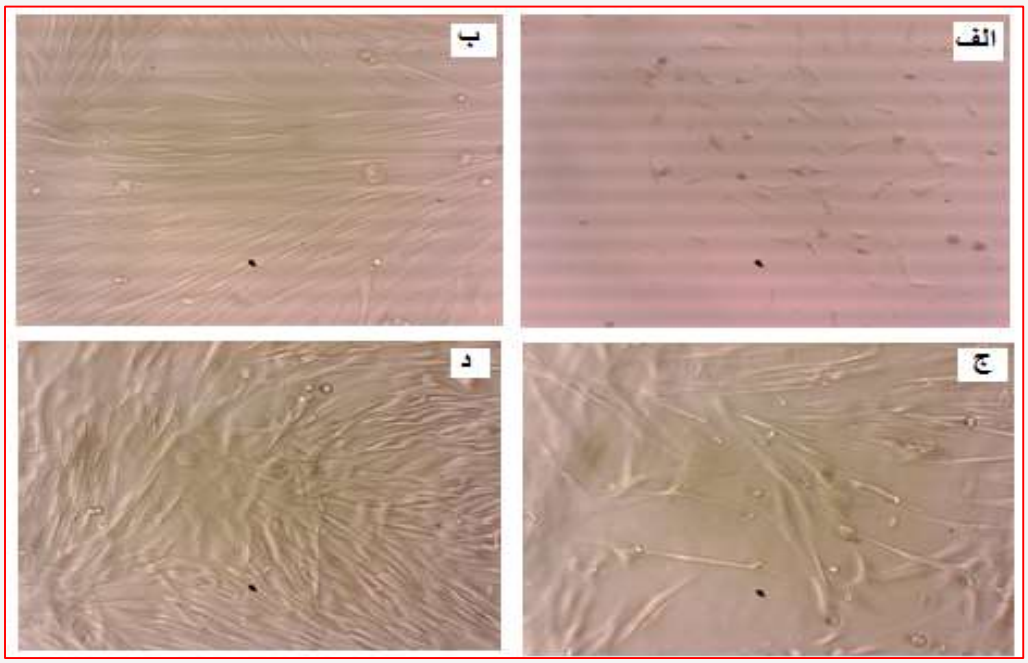
آنالیز کاریوتیپ: سلول‌های پاساژ ۶ را برای مدت ۲/۵ ساعت (۱۵۰ دقیقه) با ۱۰µg/ml کولسماید درون انکوباتور قرار داده، سپس سلول‌ها را تریپسینه کرده و محلول ۰/۵۶ درصد KCl (Sigma-Aldrich, USA) به سلول‌ها اضافه نموده و به حجم ۶ml رسانیده شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوبه کردن در ۳۷ °C، سلول‌ها به ترتیب ۳ بار در ۱ ml (۱:۳)، ۳ ml (۱:۳) و ۲/۵ ml (۱:۲) محلول فیکساتیو سرد متانول: اسیداستیک (MERC, Germany) قرار داده شد. سپس سلول‌ها از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده شدند؛ ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی در هر اسلاید تثبیت گردید. برای شمارش کروموزوم‌ها از رنگ آمیزی گیمسا: گرلیشمان با نسبت ۳:۱ به مدت ۲ دقیقه استفاده شد و با میکروسکوپ (ECLIPSE E600, Nikon, Japan) رؤیت و با نرم افزار Cytovision (CytoVision 7.0 software, USA) آنالیز گردید. در هر رده سلولی بیش از ۷۵۰ سلول آنالیز شد.

کلیه مراحل آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد. برای تائید توزیع نرمال متغیر تعداد سلول، از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید. پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه قابلیت زنده ماندن سلول‌ها بین گروه‌های مختلف (گروه‌های شامل محیط‌های نگهدارنده مختلف و کنترل) از آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه Two way ANOVA استفاده شد و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ بود. آزمون تکمیلی Tukey نیز به کار برده شد. نرم افزار SPSS $v_{11.5}$ مورد استفاده قرار گرفت.

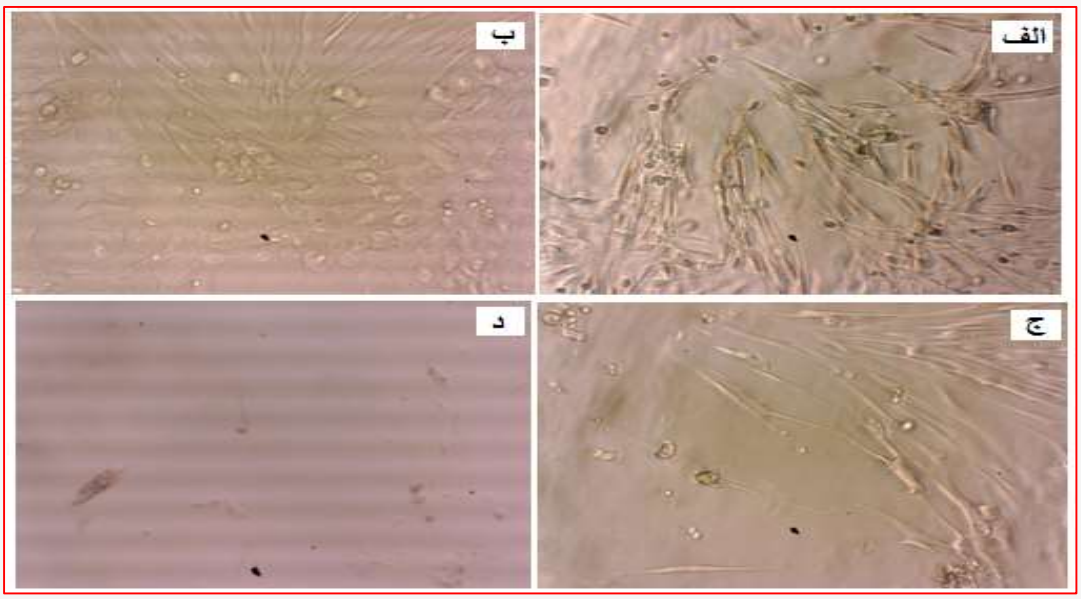
نتایج

سلول‌های جدا شده همگی در پاساژهای مختلف دوکی شکل و چسبیده به کف ظرف کشت سلولی بودند (شکل ۱). سلول‌های مواجه با محیط‌های نگهدارنده شیرسویا، شیرگاو و HBSS همگی ظاهر دوکی شکل خود را حفظ نمودند درحالی که سلول‌های گروه کنترل منفی دچار مرگ سلولی شدند و ظاهر دوکی شکل خود را از دست دادند (شکل ۲).

توانایی شیرسویا در زنده نگه داشتن سلول‌های بنیادی پالپ دندان (DPSCs) طی شمارش سلولی به روش رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی گردید. همان طور که از جدول ۳ بر می‌آید، میزان بقای DPSCs در تمام محیط ها در تمام زمان ها بطور معنی داری نسبت به محیط کنترل منفی بیشتر می‌باشد ($P<0/05$). سلول‌هایی که در مجاورت شیرگاو قرار داشتند در تمام زمان‌ها (از زمان ۴۵ دقیقه تا زمان ۶ ساعت)، ۱۰۰ درصد زنده ماندند. پس از گذشت ۴۵ دقیقه، همه DPSCs موجود در محیط



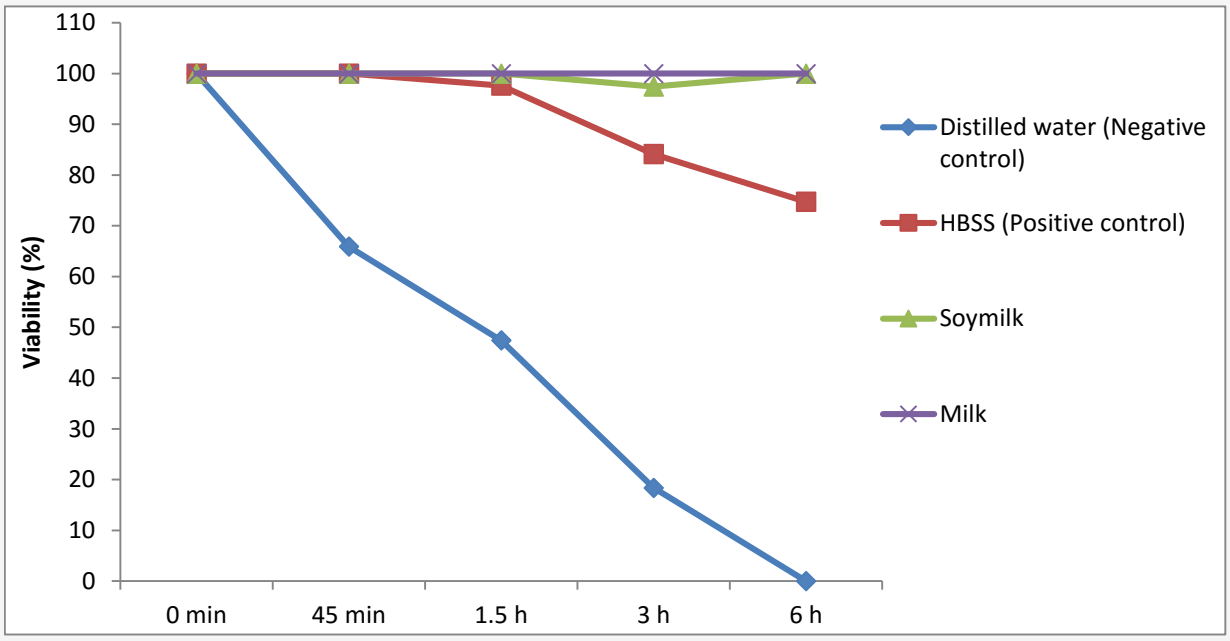
شکل ۱: مورفولوژی DPSCs. سلول‌های بنیادی جداسازی شده از بافت پالپ دندان در تمامی پاساژهای سلولی ظاهری دوکی شکل داشتند. الف: روز دوم پاساژ صفر (day2/p0)، ب: روز سوم پاساژ دوم (day3/p2)، ج: روز دوم پاساژ سوم (day2/p3)، د: روز پنجم پاساژ ششم (day5/p6).



شکل ۲: مورفولوژی سلول‌های بنیادی پالپ دندان خرگوش پس از ۴۵ دقیقه مواجهه با الف: شیرسویا ب: شیرگاو، ج: HBSS (کنترل مثبت)، و د: آب مقطر (کنترل منفی). سلول‌ها در همه محیط‌های نگهدارنده به جز کنترل منفی، ساختمان دوکی شکل خود را به خوبی حفظ نموده‌اند. تقریبا نیمی از سلول‌های واقع در آب مقطر، دچار مرگ سلولی گردیدند و تنها تعداد اندکی از آن‌ها دوکی شکل و زنده باقی ماندند.

بعد از گذشت ۱/۵ ساعت به تدریج از درصد سلول‌های زنده واقع در HBSS کاسته شد اما تقریبا همه سلول‌هایی که تحت تیمار با شیرسویا بودند زنده باقی ماندند. به طوری که بعد از گذشت ۶ ساعت، میزان بقای DPSCs در شیرسویا به طور معنی داری نسبت به، HBSS (کنترل مثبت) و آب مقطر (کنترل منفی) بیشتر می‌باشد (جدول ۳).

داده‌های حاصل از بررسی شیرسویا بر DPSCs در مطالعه حاضر نشان داد که شیرسویا می‌تواند سلول‌های بنیادی پالپ



نمودار ۱: مقایسه درصد زنده ماندن DPSCs در محیط‌های آزمایشی در مقایسه با کنترل مثبت و منفی

شکل ۳: نتایج حاصل از RT-PCR مارکرهای سطحی. ژن مربوط به CD45 و CD34 (مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک) در DPSCs بیان نشده در حالی که CD73 (ماکر سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی) به خوبی بیان گردیده است. سلول‌های بنیادی حاصل از پالپ دندان خرگوش، $CD73^{+}$ / $CD34^{-}$ / $CD45^{-}$ بودند.

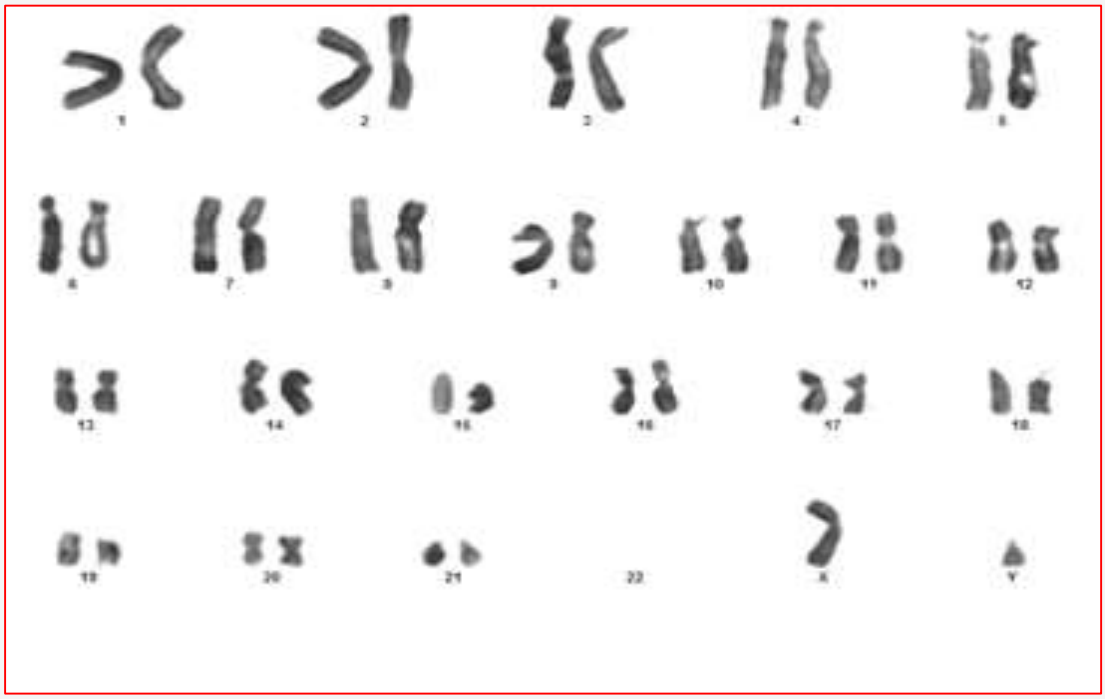
دندان را زنده نگه دارد. به طوری که سلول‌هایی که به مدت ۴۵ دقیقه، ۱/۵ ساعت، ۳ ساعت و ۶ ساعت مستقیما در معرض شیر سویا قرار داشتند تقریبا همگی زنده ماندند (نمودار ۱).

بر اساس یافته‌های حاصل از RT-PCR، سلول‌های بنیادی پالپ دندان، ژن CD73 (مارکر اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی) را بیان می‌کنند و ژن‌های CD34 و CD45 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک) را بیان نمی‌کنند؛ به عبارتی $CD73^{+}, CD34^{-}, CD45^{-}$ می‌باشند (شکل ۳).

کاریوتیپ سلول‌های پاساژ ۶ تحت تیمار با شیرسویا، مانند سلول‌های گروه شیرگاو و کنترل مثبت (HBSS) ظاهری طبیعی داشتند و هیچ گونه نقص کروموزومی مشاهده نشد (شکل ۴).

از سلول‌های بنیادی پرتوان از دست می‌رود؛ زیرا که سلول‌های بنیادی پالپ دندان، به دلیل منشأ جنینی خود (تیغه عصبی)، ظرفیت تمایز به انواع بسیار گوناگونی از سلول‌های تخصصی را دارا می‌باشند و می‌توانند در پزشکی و دندانپزشکی جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده و درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۲۲). لیکن این امر مهم زمانی امکان پذیر می‌باشد که سلول‌های بنیادی مورد نظر، زنده باشند. ما در این مطالعه، اثر شیر سویا و شیر گاو را در بقا سلول‌های بنیادی پالپ دندان ارزیابی نموده تا در مواقع ضروری قابلت استفاده آن‌ها بررسی گردد.

شیر گاو می‌تواند در مواقع ضروری به عنوان یک محیط انتقال دهنده مناسب برای دندان‌های کشیده یا شکسته شده به خوبی



شکل ۴: کاریوتیپ سلول‌های بنیادی پالپ دندان خرگوش نر بالغ نژاد نیوزیلندی در پاساژ ششم. ساختار و تعداد کروموزوم‌ها پس از مواجهه با شیرسویا، شیر و محیط بافری هنکز کاملا طبیعی می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

پالپ دندان، بافتی منحصر به فرد می‌باشد که توسط دیواره‌های سخت عاج محافظت می‌شود. چنانچه این بافت، بر اثر شکستگی و افتادن دندان در معرض هوا قرار گیرد، منبعی عظیم

توانایی حفظ DPSCs را حفظ کند و می‌تواند یک محیط نگهدارنده موقتی برای دندان‌های کشیده شده معرفی شود که سلول‌های پریودنتال لیگامنت را زنده نگه دارد (۲۳) اما پتانسیل شیر گاو برای زنده نگهداشتن سلول‌های بنیادی، پس از ۳-۲

ساعت کاهش می‌یابد (۲۴، ۲۵). در این مطالعه، سلول‌های بنیادی پالپ دندان تا ۶ ساعت ارزیابی و شیر گاو به خوبی باعث بقای سلول‌ها گردید اگر چه نوع شیر مصرفی و همچنین نوع سلول می‌تواند در نتایج حاصله مؤثر باشد.

بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعه ما، شیرسویا یک محیط نگهدارنده مطلوب و قابل مقایسه با HBSS و شیر گاو بوده است. این محیط نگهدارنده علاوه بر این که نسبت به HBSS در دسترس تر و ارزان قیمت تر می‌باشند، قادر است درصد بیشتری از DPSCs را زنده نگه دارد.

Moura و همکاران تأثیر شیر سویا را بر قابلیت زنده ماندن سلول‌های فیبروبلاست انسان بررسی نمودند و بدین نتیجه رسیدند که شیر سویا قادر به حفظ سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد (۱۴). با توجه به نتایج حاصل از آن مطالعه، آن‌ها شیر سویا را به عنوان یک محیط مناسب جهت انتقال سلولی پیشنهاد نمودند. البته این گروه، تأثیر کوتاه مدت (حداکثر ۴۵ دقیقه) شیر سویا را بر سلول‌های فیبروبلاست مورد مطالعه و بررسی قرار داده که با نتایج حاصل از مطالعه ما صرف نظر از گذشت زمان، شباهت دارد. این قابلیت شیر سویا می‌تواند به علت pH و اسمولاریته مناسب (جدول ۱) و همچنین خصلت آنتی اکسیدانتی و مواد مغذی موجود در آن می‌باشد.

بنابراین شیر گاو و شیر سویا هر دو محیط‌های نگهدارنده مناسبی برای انتقال دندان‌های کشیده شده و شکسته شده می‌توانند قلمداد شوند و حتی بهتر از محیط رایج HBSS، قابلیت نگهداری DPSCs را دارند. در شرایطی که HBSS در دسترس نمی‌باشد؛ شیر سویا مانند شیر گاو به عنوان یک محیط نگهدارنده مناسب سلول‌های بنیادی پالپ دندان بوده و در صورت لزوم در تسهیل ترمیم بافت آسیب دیده می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

سپاسگزاری می‌نمایم از جناب آقای دکتر مهدی دیانت پور و جناب آقای دکتر نادر تنیده از دانشگاه علوم پزشکی شیراز که با اطلاعات گرانبهای خود اینجانب را یاری نمودند. جناب آقای دکتر محمدمهدی نقی زاده مشاور محترم واحد توسعه تحقیقات بالینی دانشگاه علوم پزشکی فسا که در آنالیز آماری این مطالعه همکاری نمودند. جناب آقای مهندس شاهرخ زارع، تکنسین آزمایشگاه سلول‌های بنیادی که با تجربیات گهربار خود، مرا از ابتدا تا انتهای طرح یاری نمودند. کلیه کارمندان محترم مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه علوم پزشکی شیراز که در هماهنگی برنامه‌های اجرایی طرح با اینجانب همکاری نمودند. این طرح برگرفته از رساله مصوب دانشجویی جهت اخذ مدرک دکتری بیوشیمی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات بوده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Ai J, Ebrahimi S, Khoshzaban A, Jafarzadeh Kashi TS, Mehrabani D. Tissue engineering using human mineralized bone xenograft and bone marrow mesenchymal stem cells allograft in healing of tibial fracture of experimental rabbit model. Iran Red Crescent Med J. 2012;14(2):96-103.
2. Mehrabani D, Mehrabani G, Zare S, Manafi A. Adipose-derived stem cells (ADSC) and aesthetic surgery: a mini review. World J Plast Surg. 2013;2(2):65-70.
3. Ghobadi F, Mehrabani D, Mehrabani G. Regenerative potential of endometrial stem cells: a mini review. World J Plast Surg. 2015;4(1):1-6.
4. Razmkhah F, Soleimani M, Mehrabani D, Karimi MH, Kafi-Abad SA. Leukemia cell microvesicles promote survival in umbilical cord blood hematopoietic stem cells. EXCLI J. 2015;14:423-9.
5. Mahdiyar P, Zare S, Robati R, Dianatpour M, Torabi K, Tamadon AD, Razeghian Jahromi I, Tamadon A,

Mehrabani D. Isolation, Culture, and Characterization of Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells. Int J Pediatr 2nd Mashad Annual Stem Cell Research and Application Congress. 2014;2(6):2-3.
6. Ai J, Mehrabani D. The potential of human endometrial stem cells for osteoblast differentiation. Iran Red Crescent Med J. 2010;12(5):585-7.
7. Ai J, Noroozi Javidan A, Mehrabani D. The possibility of differentiation of human endometrial stem cells into neural cells. Iran Red Crescent Med J. 2010;12(3):328-31.
8. Ai J, Mehrabani D. Are endometrial stem cells novel tools against ischemic heart failure in women? a hypothesis. Iran Red Crescent Med J. 2010;12(1):73-5.
9. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 2014; Published online in Wiley Online Library.
10. Layug ML, Barrett EJ, Kenny DJ. Interim storage of avulsed permanent teeth. J Can Dent Assoc. 1998;64(5):357-63.
11. Blomlof L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. Swed Dent J Suppl. 1981; 8:1-26.
12. Lindskog S, Blomlof L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. Acta Odontol Scand. 1982;40(6):435-41.
13. Belford DA, Rogers ML, Regester GO, Francis GL, Smithers GW, Liepe IJ, Priebe IK, Ballard FJ. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995;31(10):752-60.
14. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVP, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Soy Milk as a Storage Medium to Preserve Human Fibroblast Cell Viability: An In Vitro Study. Braz Dent J. 2012;23(5):559-63.
15. Ringgenberg E. The Physico-Chemical Characterization of Soymilk Particles and Gelation Properties of Acid-Induced Soymilk Gels, as a Function of Soymilk Protein Concentration. A thesis Presented to The University of Guelph; In partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science in Food Science Guelph, Ontario, Canada. 2011; pp. 1-12.
16. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med. 1995;3(5):276-82.
17. Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of Soymilk, Powdered milk, HBSS and tap water on periodontal ligament cell survival. Dent Traumatol. 2012;28(2):132-5.
18. Hailong Yang, Liang Zhang.Changes in some components of soymilk during fermentation with the basidiomycete Ganoderma lucidum. Food Chem. 2009;112(1):1-5.
19. Barnes S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. Lymphat Res Biol. 2010;8(1):89-98.
20. GolKhoo S, Ahmadi AR, Hanachi P, Barantalab F, Vaziri M. Determination of Daidzein and Genistein in soymilk in Iran by using HPLC analysis method. Pak J Biol Sci. 2008;11(18):2254-8.
21. Borodin EA, Menshikova IG, Dorovskikh VA, Feoktistova NA, Shtarberg MA, Aksenova TV, et al. Antioxidant and Hypocholesterolemic Effects of Soy Foods and Cardiovascular Disease. Soybean and Health. Prof. Hany El-Shemy (Ed.). 2011; 18:407-25. ISBN: 978-953-307-535-8, InTech, DOI: 10.5772/17929. Available from: http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/antioxidant-and-hypocholesterolemic-effects-of-soy-foods-and-cardiovascular-disease
22. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, and White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 2014 May 21. [Epub ahead of print]
23. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. Pediatr Dent. 1983;5(3):183-6.
24. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. Scand J Dent Res 1980; 88:436-40.
25. Nozari A, Esmaeilpour T, Fijan S and Salmannejad M. Evaluation of the long-shelf life honey milk as a storage media for preservation of avulsed teeth. Caspian J Dent Res. 2013;2(2):42-7.

Original Article

Survival of Dental Pulp Stem Cells: The effect of Soymilk and Milk

Sholehvar F[1], Mehrabani D[2,3*], Yaghmaei P[1], Vahdati A[4]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran.
3- Department of Regenerative Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.
4- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

Received: 22 Jul 2015 Accepted: 15 Nov 2015

Abstract

Background & Objectives: Dental pulp stem cells (DPSCs) are alternate source of mesenchymal stem cells. Subsequent to tooth avulsion and fracture, DPSCs can play a prominent role in tissue regeneration. This study was conducted to evaluate the effect of soymilk and milk on survival of dental pulp stem cells.

Materials & Methods: DPSCs were isolated from 16 freshly extracted incisors of 5 rabbits. The 3rd passage was seeded in 24 well plates, and after 3 days, soymilk, cow milk, HBSS, and distilled water were replaced with culture media. After 45 minutes, 1.5, 3, and 6 hours, the viability of DPSCs were investigated. Mesenchymal nature of stem cells was investigated by RT-PCR. The cell viability was determined by Trypan blue exclusion. Karyotyping was done to evaluate the cytogenetic stability of cells.

Results: The viability of DPSCs in all media were significantly more than distilled water at all intervals. After 6 h, the viability of DPSCs in soymilk, cow milk, and HBSS were 100,000±0.00, 100,000±0.00, and 74.74±5.70, respectively. After 6 h, both soymilk and cow milk maintained cells significantly better than HBSS.

Conclusion: Like cow milk, soymilk is a suitable alternative transfer media for avulsed and broken teeth that can increase the survival of DPSCs.

Keywords: **Soymilk, Milk, Survival, Dental pulp stem cells, Rabbit**

***Corresponding author: Davood Mehrabani,** Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran.
Email: mehrabad@sums.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences/ Autumn 2015/ Vol.5/ No.3/ P. 425-434