مقاله پژوهشی

بررسی آزمایشگاهی اثر ملاتونین روی تمایز استئوژنیک سلولهای بنیادی مشتق از پریودنتال لیگامنت دندانهای مبتلا به پریودنتیت مزمن

دکتر محسن بیدگلی*، دکتر ایرج امیری**، دکتر سارا سهیلی فر*، دکتر احسان هوشیار***

دریافت: ۹۴/۷/۲ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰

چکیده:

مقدمه و هدف: در سالهای اخیر استفاده از سلولهای بنیادی برای بازسازی بافتهای از دست رفته بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به همین سبب قابلیت جداسازی، کشت و تمایز سلولهای بنیادی با منشاءهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، تعیین تمایز استئوژنیک سلولهای بنیادی مشتق از پریودنتال لیگامنت دندانهای مبتلا به پریودنتیت در محیط حاوی ملاتونین می باشد.

روش کار : در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی ، شش دندان دارای بیماری پریودنتال کشیده شده و قسمت آپیکالی ریشه‌ی آنها جدا شد. سپس تحت شرایط کاملا استریل، پریودنتال لیگامنت متصل به قسمت جدا شده ی ریشه، توسط تیغ جدا شد. سلولهای این بافت، کشت داده شدند. سپس به منظور بررسی مارکرهای CD 105، CD 146، CD 90، CD 45، CD 31، CD 34، CD 106 و CD 73 تحت آنالیز فلوسیتومتری قرار گرفتند. پس از سومین پاساژ، سلولهای چسبیده به کف، برای تمایز استئوژنیک و افزودن ملاتونین مورد استفاده قرار گرفتند. سپس تمایز استئوژنیک، توسط تستهای آلکالین فسفاتاز، تست محتوای کلسیم و رنگ آمیزی آلیزارین رد بررسی شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SSPP ورژن ۱۷ و توسط آزمون تی انجام شد، $P< 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

نتایج: آنالیز کمی رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۸ نشان داد که تشکیل ندولهای مینرالیزه در گروه حاوی ملاتونین بیشتر از گروه بدون ملاتونین است. فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷،۱۴،۲۱ در گروهی که ملاتونین به آن اضافه شده بود، بیشتر از گروه بدون ملاتونین می باشد. میزان محتوای کلسیم درروزهای ۷و۱۴و۲۱و۲۸ درگروه حاوی ملاتونین بیشترازگروه بدون ملاتونین می باشد.

نتیجه نهایی: ملاتونین با غلظت ۵۰ میکرومول اثر قابل ملا حظه‌ای بر روی تمایز سلولهای بنیادی مشتق ازپریودنتال لیگامنت دندان به استئوبلاست دارد.

کلید واژه ها: استخوان سازی / سلول های بنیادی / ملاتونین

مقدمه:

پریودونشیوم شامل لثه، پریودنتال لیگامنت، سمنتوم ریشه و استخوان آلوئول بوده و عمل اصلی آن اتصال دندان به استخوان فکین و حفظ یکپارچگی سطح مخاط جونده‌ی حفره دهان می‌باشد (۱). در طی بیماریهای پریودنتال، اتصالات بافتهای حمایت کننده‌ی دندان از جمله استخوان آلوئول از دست می‌روند و با توجه به شیوع بالای بیماری پریودنتال در جوامع مختلف، تحلیل استخوان یکی از مشکلات رایج در بین افراد می باشد.

اساس درمان بیماریهای پریودنتال کنترل و حذف عفونت و نیز بازسازی بافتهای از دست رفته با روش های رزکتیو و رژنراتیو می باشد (۲). ایجاد اتصالات پریودنتال یا رژنراسیون پریودنتال، نتیجه ی ایده‌آل این درمان است. چون با این درمان علاوه بر حذف پاکت، پریودنشیم مارژینال نیز بازسازی می‌شود.

روشهای درمانی که بمنظور بازسازی استخوان مورد

* استادیار گروه پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (sara_soheilifar@yahoo.com)
** استاد علوم تشریحی مرکز تحقیقات اندومتر و اندومتریوزیس دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** دستیار گروه پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

استفاده قرار گرفته اند عبارتند از: گرفت های استخوانی و بازسازی هدایت شده‌ی نسجی. در سال‌های اخیر با استفاده از سلول‌های بنیادی در بازسازی بافت‌های مختلف، بنظر می‌رسد که شرایط بهینه تری برای بازسازی استخوان ایجاد شده است (۳). اگرچه مغز استخوان منبع رایجی برای جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمال می باشد اما تلاش ها برای دستیابی به روشی ساده تر و با مشکلات کمتر برای جداسازی سلولهای بنیادی محققان را به سمت بررسی سلولهای حیوانی و انسانی به دست آمده از بافتهایی چون پریودنتال لیگامنت، پالپ دندانی و بافتهای چربی هدایت کرده است. نتایج مطالعات ویژگیهایی مانند قابلیت تکثیر و تمایز به رده های سلولی را نشان داده است. در همین راستا در سالهای اخیر بر احتمال تاثیر مدیاتورهای بیولوژیکی، فاکتورهای رشدی، داروها و یا سایر عوامل بر روی سلول های بنیادی و تحریک فرایند استئوژنزیس و سمنتوژنزیس توجه بیشتری شده است (۴).

ملاتونین هورمونی است که بر بسیاری از سیستم های فیزیولوژیک بدن و از جمله متابولیسم استخوانی تاثیرگذار است. نتیجه مطالعات نشان داده است که ملاتونین بیان ژن سیالوپروتیین استخوانی و استیوکلسین و دیگر پروتئینهای استخوانی شامل آلکالین فسفاتاز و... را افزایش می دهد (۵،۶). در این مطالعه در نظر است تاثیر ملاتونین بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی پریودنتال لیگامنت انسان بررسی گردد.

روش کار:

دندان‌های استفاده شده در این مطالعه تجربی ـ آزمایشگاهی از بیمارانی که در سال ۹۲ به بخش پریودانتیکس دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه همدان مراجعه کرده بودند تهیه شد.

نمونه‌ها شامل ۶ دندان (انسیزور) بود که بعلت بیماری پریودنتیت مزمن شدید قابل نگهداری نبودند و در طرح درمان، کشیدن و جایگزینی آنها در نظر گرفته شده بود. معیار انتخاب دندانها از دست رفتن اتصالات به میزان بیش از ۷۰٪ و لقی درجه ۳ بود. یک هفته قبل از کشیدن دندانها جرمگیری برای بیماران انجام شد. بمنظور کاهش بار میکروبی، بیماران دهان خود را با پوویدین آیودان ۵۰ درصد جهت کاهش بیشتر بار میکروبی بدلیل غلظت بالا (۷) شست وشو دادند.

بعد از انجام بی حسی موضعی ابتدا با تیغ بیستوری شماره 15c برش سالکولار اطراف دندان داده شد و سپس دندان با فورسپس و پریوتوم و با حداقل تروما کشیده شد. بعد از کشیدن دندان، قسمت آپیکالی ریشه توسط دیسک ماندرن استریل که به هندپیس میکروموتور متصل بود جدا شد. در حین جداسازی ریشه، دستیار محل برش را برای جلوگیری از افزایش حرارت و آسیب به دندان با مقدار زیادی نرمال سالین شست وشو داد. سپس قسمت جدا شده ی ریشه با دقت زیاد و بدون هیچگونه تماسی به دیواره ی داخلی ظرف بداخل محلول HBSS انداخته شد و در لوله با پوشش مومی بسته شد.

جداسازی سلولهای بنیادی از پریودنتال لیگامنت: بافت‌های لیگامان پریودنتال ریشه با استفاده از تیغ جراحی استریل برداشته شدند. روش کشت سلولهای پریودنتال لیگامنت: طبق روش Gay و همکارانش صورت گرفت (۷).

بافت لیگامان پریودنتال جدا شده از دندان، به محیط کشت حاویα–MEM و ۱۵٪ FBS (fetal bovine serum) انتقال داده شد. سپس سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل از آن بمدت یکساعت در محلول کلاژناز تیپ I با غلظت ۳mg/ml در داخل انکوباتور نگهداری شد. این نمونه ها بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصله با α-MEM حاوی۱۵٪FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک، مخلوط شده و در پلیت‌های ۶ قسمتی ریخته شدند. سپس در ۵٪ CO2 و در دمای ۳۷ ° C کشت داده شدند.

در روز هفتم سلولهایی که به کف ظرف چسبیده بودند، پاساژ داده شدند سپس با (PBS phosphate-buffered) شسته شده و بوسیله‌ی محلول ۰/۲۵٪EDTA - trypsin از کف ظرف جدا شدند و در دو ظرف مجددا کشت داده شدند.

فلوسیتومتری: سلول ها پس از پاساژ سوم تریپسینه شده و با PBS شسته شدند. آن گاه سلولها در غلظت در 10^6cells / 50µlPBS شسته شده و به مدت ۴۵ دقیقه و با آنتی بادیهای مورد نظر انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلولها با PBSحاوی BSA ۲ درصد شسته شده و در پارافرمالدئید ۱ درصد فیکس شدند. در نهایت فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه (FACsort, BD) انجام گردید. آنتی بادی های مورد بررسی عبارت بودند از: CD 105،146،CD 90،CD 45،CD 31،CD 34، CD 106 و CD 73.

تمایز استئوژنیک: بعد از سومین پاساژ سلول‌هایی که جدا شده بودند ازنظر ظاهری شبیه سلول‌های بنیادی مزانشیمال بودند که توسط PBS شسته شدند و با استفاده از محلول EDTA- trypsin جمع آوری شدند و طبق گروه‌بندی زیر برای تمایز استئوژنیک مورد استفاده قرار گرفتند:

گروه ۱: محیط استئوژنیک شامل ۵۰ mM بتاگلیسروفسفات و µg/ml1 اسید آسکوروبیک

گروه ۲: محیط استئوژنیک شامل ۵۰ mM بتاگلیسروفسفات، µg/ml 1 اسید آسکوروبیک و ۵۰ µM ملاتونین

در طی دوره ی کشت برای بررسی استئوژنزیس سه آزمایش انجام شد:

۱. تست فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱

۲. تست کلسیم در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱و ۲۸

۳. رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۸

تست فعالیت آلکالین فسفاتاز: این تست با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز انجام شد، سلولهای کشت داده شده در روزهای ۷،۱۴،۲۱ پس از ۲ بار شست وشو با محلول PBS و با کمک محلول ٪۰/۰۱ Tritoonα-100 از محیط کشت جمع آوری شدند و دردمای $-20^{o}C$ نگهداری شده بعد از ۳ بار ذوب و فریز شدن برای آنالیز فعالیت آلکالین فسفاتاز مورد بررسی قرار گرفتند.

فعالیت آلکالین فسفاتاز بصورت رنگ سنجی و با پی نیتروفنیل فسفاتاز بعنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد.

تست محتوای کلسیم: تست کلسیم در روزهای گفته شده انجام گرفت، بدینصورت که سلولها در محلول PBS شسته شدند و دوباره PBS 0.5 ml حاوی ٪۵ Tritoonα-100 به هر کدام از قسمت‌های پلیت اضافه شد. سلولها به کمک یک جدا کننده‌ی سلول از محیط برداشته شده، در دمای C ° ۲۰- نگهداری شدند. سلول‌ها جهت آماده سازی برای اندازه‌گیری میزان کلسیم ۳ بار ذوب و منجمد شدند، سپس با روش Cresolphethalein مورد ارزیابی قرار گرفتند.

رنگ آمیزی آلیزارین رد: برای مشخص شدن میزان مینرالیزاسیون سلولی باید ندول های کلسیفیه مشخص می شدند. برای اینکار از روشی بنام رنگ آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. برای این منظور از کیت In vitro osteogenesis assay kit ساخت شرکت Millipour USA استفاده گردید.

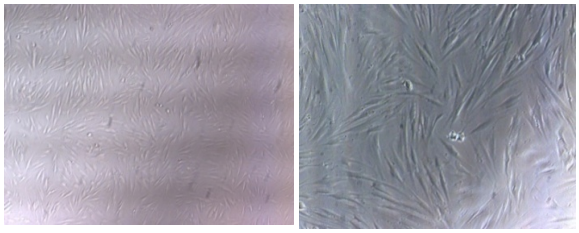
اعمال انجام شده بصورت زیر روی سلولها طبق روش پیشنهادی کارخانه‌ی سازنده انجام شد: سلولها در روز ۲۸ با محلول FBS شسته شدند، سپس بمدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق و در فرمالدهید ٪۱۰ ثابت شدند. در این مرحله پلیتها با رنگ آلیزارین قرمز، رنگ آمیزی شدند. بعداز آن بمدت حداقل ۳۰ دقیقه نگهداشته شده و در آب یونیزه شسته شدند.

آنالیز کمی آلیزارین رد: پس از انجام رنگ‌آمیزی، بررسی آنالیز کمی با روش شرکت سازنده‌ی کیت انجام شد. طبق این روش، 400 µl اسید استیک به هرکدام از قسمت‌های پلیت اضافه شدو برای ۳۰ دقیقه در حال shaking در انکوباتور قرار گرفت. سپس بوسیله‌ی یک اسکراپر، سلولها به آرامی از پلیت جدا شدند و بهمراه اسید استیک به لوله ی میکرو سانتریفوژ انتقال داده شدند و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای $85^{o}C$ نگهداشته شده و پس از آن سریعا منجمد شدند و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰۰×g بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ ۴۰۰µl از محلول حاصل برداشته شده و به یک لوله‌ی جدید انتقال یافت و پس از خنثی شدن PH با استفاده از هیدروکسیدآمونیوم، 150 µL از آن به یک پلیت ۹۶ قسمتی انتقال یافت و غلظت رنگ در OD 405 خوانده شد. برای مقایسه ی مقادیر بدست آمده با منحنی استاندارد، محلولهای استاندارد طبق دستورالعمل کیت در دو دسته ی با محدوده بالا و پایین مرتب شدند و با کشت مقادیر جذب، منحنی استاندارد آماده شد سپس با کمک این منحنی مقادیر کمی مینرالیزاسیون بدست آمد.

آنالیزآماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SSPP ورژن ۱۷ انجام شد. با توجه به اینکه کلیه آزمایشات در دو گروه و ۳ بار تکرار شده بود، میانگین داده ها پس از ۳ بار تکرار بدست آمد و به روش t-test (آزمون تی) مورد ارزیابی قرار گرفت و اختلاف $P<0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

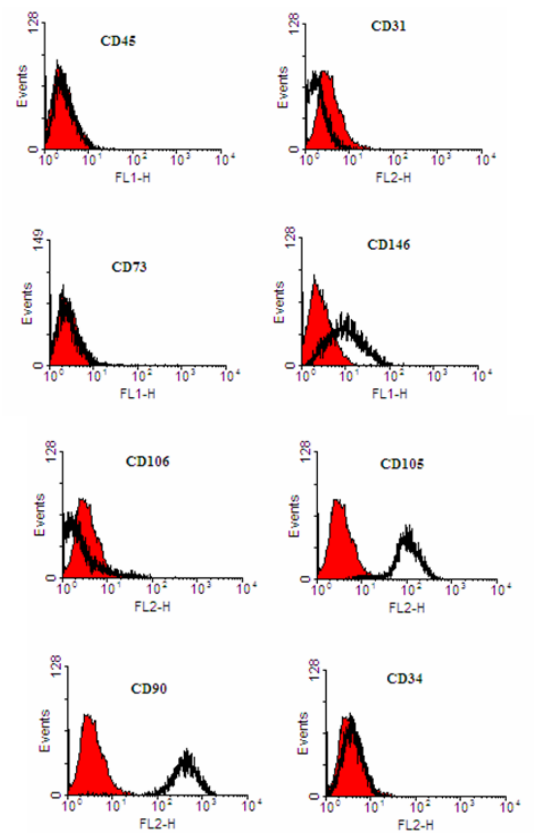
نتایج:

نمای سلولهای کشت داده شده با بزرگنمایی های مختلف در شکل ۱نشان داده شده است.



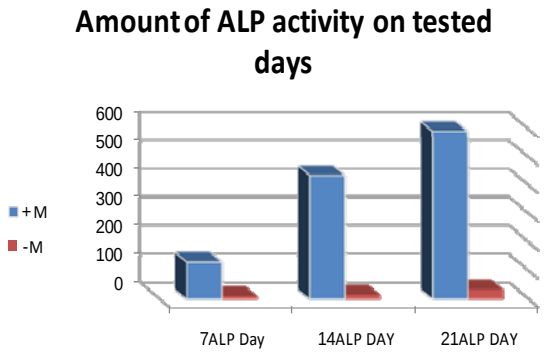
شکل ۱: نمای سلولهای بنیادی با بزرگنمایی های ۴۰ و ۱۰۰

نتایج فلوسیتومتری: همانطور که در شکل ۲ آمده است سلولهای مورد بررسی دارای مارکرهای CD 105، CD 146 و CD 90 و فاقد مارکرهای CD 45، CD 31، CD 34، CD 106و CD 73 بودند. این خصوصیات اثبات می کند که سلولهای مورد نظر مارکرهایی مشابه سلولهای بنیادی مزانشیمال دارند.



شکل ۲: نتایج آنالیز فلوسیتومتری

نتایج تست فعالیت آلکالین فسفاتاز: فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷و ۱۴و ۲۱ بعد از کشت اندازه گیری شد. میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در نمودار ۲ وجدول ۱ نشان داده شده است.



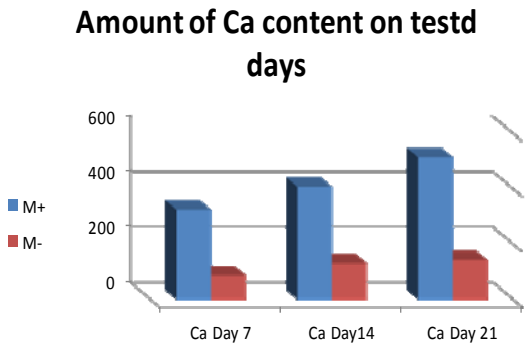
شکل ۳: نتایج میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز

جدول ۱: مقادیر آلکالین فسفاتاز در روزهای آزمایش در هر دو گروه

روز	Melatonin +group (U/L)	Melatonin -group(U/L)
۷	۱۳۲	۱۲
۱۴	۴۳۷	۱۷
۲۱	۵۹۳	۳۶

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است مقدار آلکالین فسفاتاز تولید شده در گروهی که به آن ملاتونین به عنوان فاکتور استئوژنیک اضافه شده است در مقایسه با گروهی که ملاتونین ندارد (روز هفتم ۱۳۲U/L در برابر۱۲U/L)، (روز چهاردهم ۴۳۷U/L در برابر۱۷ U/L)، (روز بیست و یکم ۵۹۳ U/L در برابر۳۶ U/L) به طور قابل توجهی بیشتر است که کاملاً این تفاوت معنی دار است (P=0.0142). همچنین جدول ۱ نشان می‌دهد که میزان آلکالین فسفاتاز به مرور طی ۳ هفته نخست رو به افزایش است اما این افزایش با حضور ملاتونین به صورت معنی داری بیشتر خواهد بود. به طوری که بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز را در گروه حاوی ملاتونین و در روز ۲۱ام از کشت خواهیم داشت.

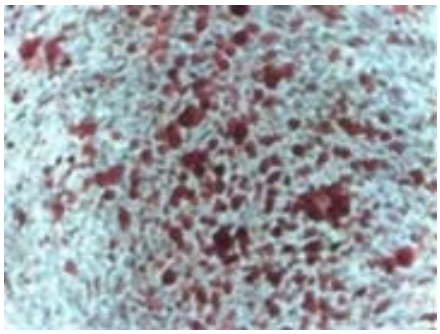
نتایج تست محتوای کلسیم: میزان کلسیم تولید شده در روزهای ۷،۱۴،۲۱،۲۸ از آزمایش اندازه گیری شد، میزان کلسیم در این روزها در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴: میزان کلسیم در روزهای مختلف در هر دو گروه

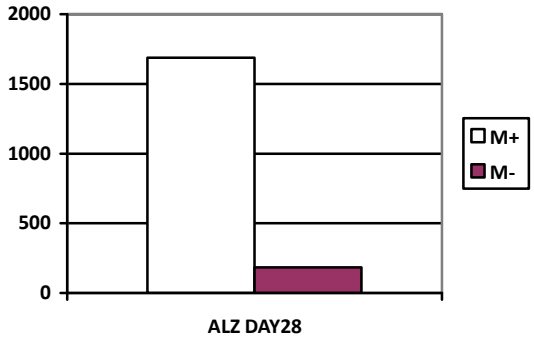
همانگونه که در شکل دیده میشود میزان کلسیم تولید شده در روزهای ۷،۱۴،۲۱،۲۸ در گروهی که ملاتونین به آن اضافه شده بود به ترتیب (۳۲۴µg/ml، ۴۰۷ µg/ ml، ۵۱۳ µg/ ml، ۵۹۳µg/ ml در مقایسه با گروه کنترل که فاقد ملاتونین بود به ترتیب ۸۷µg/ ml، ۱۵۲ µg/ ml ، ۱۳۱ µg/ ml، ۱۴۲µg/ml بسیار بیشتر بود که این تفاوت معنی دار است (P=0.0016).

نتایج کمی آنالیز آلیزارین رد: شکل ۵ نمای میکروسکوپی رنگ آمیزی آلیزارین رد را در روز ۲۸ از کشت با بزرگنمائی۱۰۰ نشان می‌دهد. در این نما رنگ قرمز روشن نشان دهنده ندولهای مینرالیزه است.



شکل ۵: رنگ آمیزی آلیزارین با بزرگنمایی۱۰۰

آنالیز کمی رنگ آمیزی در روز ۲۸ ام از کشت با کیت کمی این رنگ آمیزی انجام شد، نتایج این تست در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶: میزان آلیزارین در روز ۲۸ در هر دو گروه

همانطور که مشاهده می‌شود شکل‌گیری ندولهای مینرالیزه در گروهی از سلول‌های بنیادی که به آنها ملاتونین اضافه شده بود (۱۶۸۷μM) بصورت قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل (۱۸۳μM) بود که به آنها ملاتونین اضافه نشده بود.

بحث:

در این مطالعه، اثر ملاتونین با دوز ۵۰ μM بر روی تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی پریودنتال لیگامنت که از دندان های مبتلا به پریودنتیت تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت.

سلولهای بنیادی مزانشیمی از بافت های مختلفی قابل جداسازی می باشند. تا مدتها در اغلب مطالعات سلولهای مغز استخوان مورد استفاده قرار می گرفتند. اما دستیابی به این سلولها برای بیمار راحت نبوده ومستلزم تحمل درد و ناراحتی بسیاری می شد. به همین سبب دستیابی به سلولهایی که چنین مشکلاتی را برای بیمار در بر نداشته باشد هدف برخی از مطالعات بوده است. نتایج مطالعات نشان داده که سلول‌های بنیادی مزانشیمال به دست آمده از پریودنتال لیگامنت دندان، سلول‌های مولتی پوتنت می باشند که با سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی پالپ دندان ویژگی‌های مشابهی دارند و می‌توانند بافت‌های مختلف نظیر استخوان و بافت‌های مرتبط را بسازند (۸). این سلولها از بافت اطراف ریشه دندانهای کشیده شده قابل جداسازی می باشند و درنتیجه بیمار تحت جراحی اضافی قرار نمی گیرد. درمطالعه حاضر این سلولها از دندانهایی که به علت ابتلا به پریودنتیت شدید غیر قابل نگهداری بودند جدا شدند. پس از طی مراحل کشت، برای اثبات بنیادی بودن سلولها فلوسیتومتری بر روی آنها انجام شد که نتایج آن اثبات کننده این بود که سلولهای جداسازی و کشت داده شده از نوع سلولهای بنیادی مزانشیمی می باشند. در سال ۲۰۰۶ چن و همکارانش مطالعه ای بر روی سلولهای بنیادی بدست امده از دندانهای سالم و مبتلا به پریودنتیت توسط انجام دادند. آنها از آنتی بادی علیه STRO-1، CD146، و CD44 استفاده نمودند تا بنیادی بودن سلولهای به دست آمده را مشخص کنند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که سلول های بنیادی در هر دو پریودنتال لیگامنت دندانهای سالم و دچار پریودنتیت حضور داشتند و این تعداد در بافت پریودنتال دندانهای دچار پریودنتیت بیشتر بود. آنها این فرضیه را مطرح نمودند که احتمالا وجود یک واکنش التهابی ناشی از پریودنتیت مزمن، تعداد این سلول ها را در پریودنتال لیگامنت دندانهای مبتلا به پریودنتیت افزایش میدهد(۹).

در مطالعه حاضر سلولهاپس از پاساژ سوم در محیط کشت استئوژنیک قرار گرفتند و اثر هورمون ملاتونین نیز بر روی تمایز استئوژنیک از طریق تست آلکالین فسفاتاز و محتوای کلسیم و رنگ آمیزی آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نتایج ذکر شده است افزایش تمایز استئوژنیک در گروهی که ملاتونین در آن استفاده شده بود نسبت به گروه کنترل مشهود بود.

مطالعه رادیو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نتایج

مشابهی داشت. آنها توانایی ملاتونین برای تحریک تمایز سلولهای بنیادی انسانی (سلولهای بنیادی مزانشیمال) به استئوبلاست را مورد ارزیابی قرار دادند. اما سلولهای هدف آنها از مغز استخوان انسانی تهیه شده بودند. برای این منظور سلولها پس از کشت در محیط استئوژنیک وارد شدند. به تعدادی از محیطهای کشت، ملاتونین اضافه شد. نتایج مطالعه نشان داد که فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه دارای ملاتونین بسیار بیشتر از گروه کنترل بود (۱۰).

در سال ۲۰۰۸ مطالعه ای توسط زمینی و همکاران درمورد تاثیر ملاتونین بر روی پرولیفراسیون و تمایز سلولهای بنیادی مشتق از بافت آدیپوز و مغز استخوان رت صورت گرفت. برای این کار، سلولهای بنیادی مزانشیمال، از مغز استخوان و بافت چربی موشهای بالغ استخراج شدند و در محیط استئوژنیک در غیاب و حضور ملاتونین کشت داده شدند. بررسی مینرالیزاسیون بوسیله رنگ آمیزی الیزارین رد و رنگ آمیزی وون کسا و بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز انجام گردید. نتایج تحقیقات آنها اثر تحریکی ملاتونین را برروی تمایز استئوژنیک سلولهای ناشی از مغز استخوان نشان داد، اما چنین اثری برروی سلولهای مشتق از بافت چربی تایید نشد. در واقع این آزمایش نشان می دهد که داروی ملاتونین الزاماً اثر یکسانی برروی انواع مختلف سلول های بنیادی ندارد (۱۱).

مطالعه مشابه دیگری که در این زمینه انجام شده است در سال ۲۰۱۰ توسط ژانگ و همکارانش صورت گرفت، و در آن تاثیر ملاتونین برروی آدیپوژنزیس و استئوژنزیس در سلولهای بنیادی مزانشیمال انسانی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ملاتونین تاثیر آشکاری روی پرولیفراسیون سلولهای مورد بررسی دارد. ملاتونین بطور خاص بیان رسپتورهای peroxisome proliferation activated receptor gamma (PPARgamma) را مهار میکند، هم چنین ملاتونین بیان چندین مارکر تمایز نهایی آدیپوسیت شامل: لپتین ، لیپوپروتئین لیپاز، آدیپونکتین را دچار اختلال می کند و این در حالیست که این ماده بیان چندین مارکر تمایز استئوبلاست شامل آلکالین فسفاتاز، استئوپروتگرین و استئوکلسین را افزایش می دهد. این یافته ها ملاتونین را برای انتخاب بعنوان یک داروی ضد استئوپروز سوق می دهد (۱۲).

در مطالعه ای لوزانو و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر محافظتی ملاتونین بر روی سلولهای بنیادی لیگامان پریودنتال انسانی که در معرض زولدرونیک اسید قرار گرفته بودند پرداختند. آنها دریافتند که ملاتونین اثر محافظتی بر روی این سلول ها داشته و میتواند برای ممانعت از استیونکروز در بیماران مصرف کننده بیس فسفونات ها بکار رود (۱۳).

غلظت مورد استفاده ملاتونین در مطالعه حاضر ۵۰ μM بود. این غلظت بر اساس نتایج مطالعات پیشین انتخاب شده است (۱۱)، بنابراین اثر غلظت های مختلف این ماده ممکن است بر سلولهای مورد مطالعه ما نتایج متفاوتی را در بر داشته باشد. لذا پیشنهاد می گردد مطالعات تکمیلی جهت بررسی اثرات غلظت‌های مختلف روی سلول‌های بنیادی با منشاء پریودنتال لیگامنت مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه نهایی :

به عنوان نتیجه نهایی می‌توان گفت که ملاتونین باعث افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از PDL دندانهای مبتلا به پریودنتیت مزمن به استئوبلاست شده است.

سپاسگزاری :

این مقاله منتج از تحقیقی است که در آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شده است. از همکاری خانم دکتر فریبا نصرالهی در انجام مراحل کلینیکی و از دانشگاه علوم پزشکی بابت حمایت مالی این مطالعه سپاسگزاری می شود. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Lindhe J, Lang N, Karring T. Clinical periodontology and Implant Dentistry. 5th ed. V1 1. New York: Blackwell, 2008.
2. Hattar S, Asselin A, Greenspan D, Oboeuf M, Berdal A, Sautier JM. Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. Biomaterials 2005;26(8):839-848.
3. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells 2008; 26 (4): 1065-73.
4. Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D. Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. J Clin Periodontol 2002;29(4):317-325.
5. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasa-

ki Y, Kudoh K, Maeda E, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. J Pineal Res 2007; 42(3): 231-239.

6. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biomech Chem 1999; 274(31): 22041–7.
7. Gay IC, Chen S, MacDougall M: Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofacial Res 2007; 10(3):149-160.
8. Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E. Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. Acta Histochem 2009; 111(1): 15-24.
9. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM, Location of putative stem cells in human perio dontal ligament. J Periodont Res 2006;41(6): 547-553
10. Radio NM, Doctor JS, Witt-Endorby, PA. Melatonin enhances alkalin phosphatase activity in differentiation human adult mesenchymal stem cells growth in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the the Mek/Erk 1/21 signaling cascade. J Pineal Res 2006;40(4): 332-342.
11. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Farzaneh Nejad A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. Iranian Biomed J 2008; 12 (3): 133-141.
12. Zhang L, sup/ Xuc, Chen C, Liang A, Duk/ Pegy, Hung D. The effect of Melatonin on the adipogenesis and osteogenesis in human mesenchymal stem cells. J Pineal Res 2010;49(4):364-72.
13. Lozano R, Javier F. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. J Cranio Maxillofac Surg 2015;43(6):855-862

Original Article

In vitro Evaluation of the Effect of Melatonin on Osteogenic Differentiation of PDL Mesenchymal Stem Cells Isolated from Chronic Periodontitis Affected Teeth

M. Bidgoli, D.D.S., M.Sc.[*] ; I. Amiri, Ph.D.[**] ; S. Soheilifar, D.D.S., M.Sc.[*]
E. Hoshyar, D.D.S., M.Sc.[***]

Received: 24.9.2015 Accepted: 29.2.2016

Abstract

Introduction & Objective: In recent years stem cells have been evaluated for regenerating lost tissues. Therefore, many studies aimed to assess isolation of these cells from different origins, and culture them. The purpose of this study is to evaluate the osteogenic differentiation of stem cells derived from periodontal ligament of periodontitis affected teeth in melatonin contained media.

Materials & Methods: In this experimental-laboratory study after tooth extraction and isolating the apical segment of the roots, the periodontal ligament tissue was removed. Cells were expanded and after the third passage; flow cytometery analysis was performed to evaluate the surface markers (CD 105, CD146, CD90, CD 45, CD31, CD34, CD106 and CD 73). Adherent cell layer was used for osteogenic differentiation in melatonin contained osteogenic media. Then, osteogenic differentiation was evaluated using alizarin red staining, alkaline phosphatase and calcium content tests were performed.

Results: Quantitative analysis of alizarin red staining on the 28th day demonstrated that mineralized nodule formation in the group supplemented with melatonin was higher than the control group. Results from alkaline phosphatase activity test on the 7th, 14th and 21st days demonstrated that, this activity was higher in the group supplemented with melatonin. Also, the amount of calcium on the 7th, 14th, 21st and 28th days, in melatonin group, was higher than the control group.

Conclusion: Melatonin (50 μM) may be beneficial for differentiation of PDL stem cells into osteoblast.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (1):49-56)

Keywords: Melatonin / Stem Cells / Osteogenesis

---

* Assistant Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (sara_soheilifar@yahoo.com)
** Professor of Anatomy, Endometr & Endomeriosis Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
*** Resident, Department of Periodontics, School of Dentistry
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.