Nova Biologica Reperta 7(3): 256-266 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.3.256

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۳، صفحات ۲۵۶ الی ۲۶۶ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدآهن بر بیان ژن p53 در سلول‌های بنیادی مشتق شده از غشای آمنیوتیک انسانی

ندا تکیه معروف[۱]، ناهید ابوطالب[۲] و مریم ناصرالاسلامی[۱]

[۱]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: مریم ناصرالاسلامی، m.naseroleslami@iautmu.ac.ir

چکیده. نانوذرات سوپر پارامغناطیس اکسیدآهن (SPIONs)، پیشرفت‌های گسترده‌ای را در نانوتکنولوژی ایجاد کرده است. خصوصیات منحصر به فرد این ذرات موجب گسترش روزافزون کاربرد آن‌ها در زمینه‌های مختلف از جمله حوزه‌های پزشکی شده است. یکی از این کاربردها، امکان تجزیه و تحلیل غیرتهاجمی برای ردیابی سلول‌ها است. با این حال، احتمال ایجاد سمیت در سلول‌ها توسط این نانوذرات گزارش شده است. با توجه به این‌که آسیب سلولی ناشی از نانوذرات اکسیدآهن وابسته به غلظت است، بنابراین پیدا کردن غلظت مناسب نانوذرات اکسید آهن برای جلوگیری از آسیب سلولی یا مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز بسیار مهم است. هدف از این مطالعه یافتن غلظتی از SPIONs است که منجر به ایجاد آپوپتوز در سلول‌ها نشود. این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن بر بقای سلول، تاثیر بر افزایش بیان ژن دخیل در آپوپتوز (p53) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک انسان (hAMSCs) مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌های بنیادی از بافت غشای آمنیوتیک انسانی استخراج و کشت داده شدند و جهت اثبات ویژگی مولتی پوتنت بودن این سلول‌ها به رده‌های سلولی چربی، استخوانی و غضروفی متمایز شدند. سپس درصد زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر غلظت‌های ۰، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره بعد از ۲۴ ساعت در hAMSCs از نظر بیان ژن p53 با روش Real-Time PCR سنجیده شد. سلول‌های hAMSCs استخراج شده در کشت دو بعدی ظاهری دوکی شکل داشتند که در بررسی مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتری، مشخص شد که این سلول‌ها CD29، CD90 و CD105 را بیان کرده و در مقابل CD34 و CD45 را قادر به بیان نبودند. نتایج حاصل از بررسی توانایی چند توانی hAMSCs نشان داد که این سلول‌ها قابلیت تمایز به رده‌های سلول‌های چربی، استخوانی و غضروفی را دارا هستند. نانوذره اکسیدآهن در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت تاثیری معنادار بر بقا سلول‌ها نداشت. در حالی‌که از غلظت ۱۵۰ به بعد بقا سلولی به شکل قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (۴۲/۴±۱، P < ۰/۰۰۱). نتایج حاصل از آنالیز Real-Time PCR نشان داد که بیان ژن p53 ناشی از مواجه سلول با نانوذره با غلظت‌های ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۴/۱±۲/۰، P < ۰/۰۰۱) و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۴/۱±۰/۱۱، P < ۰/۰۰۱) به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج، نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه در غلظت ≤ ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ردیابی سلول‌ها مناسب هستند.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، غشای آمنیوتیک، نانوتکنولوژی، نانوذرات مغناطیسی

The effect of different concentrations of iron oxide nanoparticles on the expression of p53 gene in human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells

Neda Tekiyeh Maroof[1], Nahid Aboutaleb[2] & Maryam Naseroleslami[1]

[1]Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran; [2]Physiology Research Center and Physiology Department, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Correspondent author: Maryam Naseroleslami, m.naseroleslami@iautmu.ac.ir

Abstract. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have made extensive advances in nanotechnology. The unique properties of these particles have expanded their application in various fields, including medicine. One of these applications is non-invasive analysis for cell tracking. However, the possibility of toxicity in cells is reported by these nanoparticles. Due to the fact that cellular damage caused by iron oxide nanoparticles is concentration-dependent, the determination of the appropriate

Received 31.07.2019/ Revised 13.09.2019/ Accepted 16.09.2019/ Published 21.11.2020
دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹/ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۶/۲۲/ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵/ انتشار: ۱۳۹۹/۰۹/۰۱

concentration of iron oxide nanoparticles is very important to prevent cell damage or cell death due to apoptosis. The aim of this study was to find a concentration of SPIONs which does not result in apoptosis. Therefore, the effects of different concentrations of iron oxide nanoparticles on cell survival were investigated, and the their effects on increased gene expression involved in apoptosis (p53) in human amniotic membrane derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) were evaluated. First, stem cells were extracted from human amniotic membrane tissue and cultured. To demonstrate the multipotent characteristic of hAMSCs, these cells were differentiated into adipose, bone, and chondrocyte cell lines. Then, the viability of the cells treated with different concentrations of iron oxide nanoparticles (200, 150, 100, 50, 0 µg / ml) over a period of 24 and 48 hours was evaluated by MTT method. The effect of the concentrations of 0, 100,150 and 200 µg / ml of nanoparticles after 24 hours in hAMSCs was investigated for the expression of p53 gene by Real-Time PCR. hAMSCs were spindle-shaped in a two-dimensional culture. Flow cytometry examination of surface markers revealed that these cells were able to express CD 29, CD90 and CD105 but they were unable to express CD34 and CD45. The results of the multi-potency assay of hAMSCs showed that these cells were capable of being differentiated into adipocyte, bone and chondrocyte cell lines. Iron oxide nanoparticles had no significant effect on cell survival at the concentrations of 50 and 100 µg / ml in 24 hours. However, cell viability decreased significantly after the concentration of 150 µg / ml (42 ± 1.4%, p<0. 001. The results of Real-Time PCR analysis showed that the expression of p53 gene significantly increased at concentrations of 150 (2.4±0.1, P < 0. 001) and 200 µg / ml (4.1 ± 0.11, P < 0. 001). According to the results, the nanoparticles used in this study were appropriate at concentrations ≥ 100 µg / ml for cell tracking.

Keywords: apoptosis, mesenchymal stem cells, amniotic membrane, nanotechnology, magnetic Nanoparticles

مقدمه

با پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی بیولوژی سلولی-مولکولی، سلول درمانی افق جدیدی را در درمان بسیاری از بیماری‌ها گشوده است (Makarevich et al., 2018). بیش از یک دهه است که پژوهشگران با بهره‌گیری از سلول‌های بنیادی بعنوان خاستگاه گونه‌های سلولی تخصص‌یافته مختلف، به درمان بیماری‌های گوناگون پرداخته اند (Das 2009).

در سال‌های اخیر، تحقیقات بالینی زیادی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک (hAMSCs) متمرکز شده است. این سلول‌ها بدلیل مزایای بی‌شماری از جمله ترشح فاکتورهای رشد، قابلیت تمایز بالا، ویژگی‌های ضد التهابی، عدم تحریک سیستم ایمنی میزبان و نداشتن ملاحظات اخلاقی، ارزش درمانی زیادی پیدا کرده اند (Maumus et al., 2013).

در سلول‌درمانی علاوه بر نوع سلول، ردیابی سلول به منظور بررسی مسیر عبوری سلول و میزان نیمه‌عمر سلول در محل مورد نظر بسیار حائز اهمیت است. امروزه از نانوذرات بویژه نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسیدآهن (SPIONs) جهت نشاندار کردن و ردیابی سلولی بسیار استفاده می‌شود (Verma et al., 2015). این نانوذرات، ذراتی به ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر و با دو فرم اصلی مگنتیت و مگهمیت هستند. این ذرات بدلیل ویژگی‌های خاصی از جمله خاصیت پارامغناطیسی، سطح وسیع، نسبت سطح به حجم زیاد و امکان جداسازی آنزیم تحت تاثیر میدان مغناطیسی خارجی و قابلیت عبور از غشای سلولی و سد مغزی-خونی کاربردهای بی‌شماری را در زمینه‌های مختلف و بویژه حوزه‌های پزشکی به خود اختصاص داده است (Sun et al., 2008). از جمله کاربردهای این ذرات می‌توان به کاربرد در زیست حسگرها، انتقال هدفمند دارو، مهندسی بافت، تشخیص و جداسازی مولکول-های زیستی، تصویربرداری تشدید مغناطیسی، درمان سرطان به وسیله گرمادرمانی، آنالیز مواد غذایی و نشاندار کردن سلول‌ها اشاره کرد (Kumar et al., 2013).

با وجود طیف گسترده‌ای از این کاربردها، اطلاعات کمی در مورد تاثیر نانوذرات بر سلامت انسان و محیط زیست وجود دارد. مشاهدات اپیدمیولوژیک نشان داده که نانوذره آهن می‌تواند سمیت سلولی نیز ایجاد کند (Bai et al., 2010). گرچه احتمال دارد که اثرات سمیت سلولی نانوذرات به اندازه‌ای نباشد که موجب مرگ سولی شود، اما می‌تواند محتویات ژنتیکی سلول را دستخوش تغییر کرده و ایجاد بیماری‌هایی از جمله سرطان، ناباروری و به خطر انداختن سلامت نسل آینده را سبب شود (Singh et al., 2009). این سمیت از طریق تولید پراکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد، نشت غشایی لاکتات دهیدروژناز، ایجاد اجسام آپوپتوتیک، از دست رفتن یا تضعیف عملکرد میتوکندری، التهاب، تراکم کروموزوم و آسیب ماده ژنتیکی می‌تواند منجر به ایجاد نکروز یا آپوپتوز سلولی شود. سمیت حاصله از این نانوذرات به خصوصیات فیزیکوشیمیایی این ذرات، اندازه، مورفولوژی، پوشش و غلظت آن-ها بستگی خواهد داشت. ما در این تحقیق از پوشش پلی اتیلن گلیگول (PEG) برای نانوذره استفاده کردیم چراکه این پوشش زیست سازگار است و مانع از تجمع نانوذرات می‌شود و از طرفی نسبت به دیگر پوشش‌ها پایدارتر است (Buzea et al., 2007; Mahmoudi et al., 2011). اندازه ذره را ۲۰ نانومتر انتخاب کردیم که به راحتی این ذره می‌تواند از غشای سلولی از طریق اندوسیتوز عبور کند و لازم به ذکر است که ذره در اندازه کوچک‌تر از بافت خارج می‌شود و در اندازه‌های بزرگتر ایجاد سمیت خواهد کرد. تنها پارامتری که باقی می‌ماند غلظت مورد استفاده است. غلظتی که در سلول ایجاد سمیت نکند و باعث مرگ سلول و در واقع موجب آپوپتوز سلولی نشود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

با توجه به این‌که شناخت کمی در رابطه با اثرات سمی نانوذره اکسیدآهن برسطوح مولکولی سلول وجود دارد و از آن‌جایی‌که یکی از مهمترین ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز ژن p53 است (Sridhar&Shepherd 2003, Tiwari 2012) که یک تومورساپرسورژن است و تریگر در ایجاد مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول است لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدآهن را بر بیان ژن p53 در سلول‌های بنیادی مشتق شده از غشای آمنیوتیک انسانی مورد بررسی قرار دهیم. در این تحقیق سعی شد تا غلظت بهینه از این نانوذره جهت نشاندار کردن سلول‌های مورد مطالعه به دست آورده شود.

مواد و روش‌ها

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک انسانی

پس از کسب رضایت نامه از والدین نوزادان در بخش زایمان، نمونه‌های جفت در شرایط استریل در محلول بافر سالین فسفات (PBS) حاوی آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتومایسین و جنتامایسین) به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس در زیر هود لامینار پرده آمنیون از کوریون جدا گشت و بعد از شستشوی غشا توسط بافر فسفات سالین به منظور خارج‌سازی زوائد خونی، درمرحله بعد غشا به طور مکانیکی به ابعادی در حد میلیمتر برش زده شده و تحت هضم آنزیمی با کلاژناز تیپ ۱ به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس کلاژناز به وسیله سرم غیرفعال شد و بعد از سانتریفیوژ (۲۰۰rpm به مدت ۶ دقیقه) و دور ریختن مایع روی، رسوب سلولی از فیلتر ۷۰ میکرومتری عبور داده شد و در فلاسک کشت سلولی در حضور محیط کشت DMED، سرم (FBS,10%)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱ درصد)، ال گلوتامین (۱ درصد) در انکوباتور با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد رطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

فلوسایتومتری

جهت بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های hAMSC، سلول‌ها توسط فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طور خلاصه، hAMSCs کشت داده شده در پاساژ سه، تریپسین شدند و سوسپانسیون سلولی سانتریفوژ شد (۵۰۰ × g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) و سه بار با PBS شسته شدند. سپس ۵×۱۰^{۵} سلول در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر FACS، (۲,PBS درصد FBS) با آنتی‌بادی اولیه (CD۲۹، CD۹۰، CD۳۴، CD۴۵ و CD۱۰۵)به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی انکوبه شدند. سپس بعد از سانتریفیوژ (۴۰۰ × g به مدت ۵ دقیقه) و سه بار شستشو با بافر FACS توسط دستگاه FACS caliber ساخت شرکت B.D مورد سنجش قرار گرفتند. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Cell Quest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تمایز hAMSCs به سلول‌های چربی، استخوان، غضروف

جهت بررسی ویژگی چند توانی سلول‌های hAMSC، این سلول‌ها به سلول‌های چربی، استخوان و غضروف تمایز داده شدند.

تمایز hAMSCs به سلول‌های چربی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (۵×۱۰^{۴}) در پلیت‌های ۶ خانه با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Pen/Strep و L- Glutamine 2mM کشت داده شدند تا این‌که حدوداً ۷۰ درصد سطح پلیت را پوشاندند. سپس جهت تمایز به سلول‌های چربی، ابتدا محیط کشت اولیه دور ریخته شده سپس سلول‌ها با محیط تمایزی شامل α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد Pen/Strep، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر انسولین، ۱۰۰ میکرومولار ایندومتاسین، ۱ میکرومولار دگزامتازون و ۵۰۰ میکرومولار IBMX به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. محیط تمایزی هر سه روز یک بار تعویض گردید. برای ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی با Oil-Red O به منظور تشخیص واکوئل‌های چربی صورت گرفت.

تمایز hAMSCs به سلول‌های استخوانی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (۵×۱۰^{۴}) در پلیت‌های ۶ خانه با محیط کشت DMEM حاوی۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Pen/Strep و L- Glutamine ۲ میلی‌مولار کشت داده شدند تا این‌که حدودا ۷۰ درصد سطح پلیت را پوشاندند. سپس جهت تمایز به سلول‌های استخوان ابتدا محیط کشت اولیه دور ریخته شده و سلول‌ها با محیط تمایزی شامل α-MEM حاوی ۱۰درصد FBS، Pen/Strep1٪، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. محیط تمایزی هر سه روز یک بار تعویض گردید. برای ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی آلیزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت.

تمایز hAMSCs به سلول‌های غضروفی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (۳×۱۰^{۵}) با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۶ دقیقه داخل فالکون‌های پلی پروپیلن کونیکال ۱۵ میلی‌لیتری سانترفیوژ شدند. به منظور تمایز سلول‌ها به غضروف، پلت سلولی به دست آمده با کیت تمایزی حاوی محیط غضروف ساز (DMEM-High glucose) و مکمل غضروفی شامل ۱۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

نانوگرم TGFβ، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ITS، ۱ میکرومولار دگزامتازون، ۵۰ میکرومولار ۲-فسفو آسکوربات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ آمیزی اختصاصی آلسین بلو استفاده شد.

ساخت نانوذره

نانوذره سوپرپارامغناطیس اکسیدآهن (SPIONs) به روش هم‌رسوبی تهیه شده که در این روش ابتدا مقدارهای تعیین شده از نمک‌های کلریدآهن را داخل آب دیونایز حل کرده و با محلول آمونیاک pH محیط را به ۱۲ رسانده و دمای محیط واکنش را تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد بالا برده و به مدت ۱ ساعت اجازه داده شد تا واکنش انجام بپذیرد. در ادامه محلول سیاه رنگ که نشانه سنتز نانو ذرات است را با آب و اتانول شستشو داده شد. سپس برای عامل‌دار کردن سطح نانوذرات مقدار تعیین شده از نانوذرات را داخل DMF خشک به مدت ۵ دقیقه سونیکیت کرده و مقدار تعیین شده از ترکیب سیلان دار را به محیط اضافه کرده و واکنش به مدت ۱۸-۶ ساعت انجام شده و در نهایت با آب و اتانول شستشو داده شد. برای اتصال PEG روی نانوذرات‌آهن اصلاح شده، ابتدا باید با اکریل کلراید اصلاح شوند که این کار در ۳۰ میلی لیتر حلال دی کلرو متان و در حضور تری‌اتیل‌آمین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در ادامه برای نشاندن پلی اتیلن‌گلیکول اصلاح شده، مقدار تعیین شده از نانو ذرات‌آهن اصلاح شده را در داخل آب ریخته و سپس با سونیکیت کردن، یک محلول همگن تهیه کرده و پلیمر اصلاح شده را نیز در آب حل کرده و به روی محلول حاوی نانو ذرات اضافه می‌کنیم. این واکنش به مدت یک هفته در دور تند همزن قرار گرفته و در ادامه با آب و اتانول شستشو داده می‌شوند. برای بررسی خصوصیات نانو ذرات از قبیل شکل و اندازه و وجود پلی‌اتیلن‌گلیکول بر سطح نانوذره در مطالعات پیشین از تست‌های مختلفی از قبیل میکروسکوپ الکترونی و طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد (Naseroleslami et al., 2018).

آماده سازی نانوذره جهت تیمار سلول‌های hAMSC

برای آماده‌سازی نانوذرات ابتدا نانوذرات در آب سونیکیت شدند (با قدرت ۴۰ و زمان ۴ دقیقه، ۳۰ ثانیه خاموش و ۳۰ ثانیه روشن). سپس سلول‌ها در ظروف کشت کاشته شده و بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدآهن (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که توسط اشعه UV استریل شده بودند روی سلول‌ها ریخته شد.

آزمایش MTT

جهت ارزیابی درصد زنده‌مانی سلول‌ها و برای به دست آوردن بهترین غلظت جهت تیمار توسط نانوذره، hAMSCs با تعداد 10^3 × ۵ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از طی ۲۴ ساعت، غلظت‌های مختلفی از نانوذره (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میگروگرم در میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه گردید و بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت تست MTT انجام شد. به این صورت که ۱۰ ماکرولیتر از محلول MTT (۰.۰۵ گرم در ۱۰میلی‌لیتر PBS) در ابتدا به هر چاهک اضافه گردید و سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. بعد از طی مدت زمان انکوباسیون، محیط داخل چاهک‌ها به آرامی خالی گردید و ۱۰۰ ماکرولیتر از DMSO به رسوب اضافه شد و پلیت‌ها ۱۰ دقیقه به آرامی تکان داده شدند. در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. دو عدد به دست آمده از هم کسر گردید و عدد مربوطه بعنوان عدد اصلی در نظر گرفته شد و جهت کار آماری ارائه شد.

آزمایش Real time PCR

بعد از کشت سلول‌های hAMSC در فلاسک سلولی و مواجه آن‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذره SPION (۰، ۱۵۰،۱۰۰ و ۲۰۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت، RNA سلول‌ها توسط RNX (به ازای هر 10^6 × ۱ سلول ۱ میلی‌لیتر از RNX) طبق پروتوکل مربوطه استخراج شد، بعد از اندازه گیری غلظت RNA با نانودراپ، با استفاده از کیت qPCRBIO cDNA synthesis و ۰/۱ میکروگرم از RNA، توسط دستگاه ترموسایکلر (انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه) cDNA ساخته شد و در نهایت با استفاده از مسترمیکس سایبرگرین و پرایمرهای طراحی شده ژن p53 (p53F: TTCCGTCTGGGCTTCTTG و p53R: TGCTGTGACTGCTTGTAGAT)، در دستگاه Rotor-Gene شرکت کیاژن تست QRT PCR (انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۵۰ سیکل با انکوباسیون در دمای ۹۵ به مدت ۵ ثانیه سپس ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و نهایتا۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه) انجام گرفت. در زمان انجام Real Time PCR نمودار سیکل‌های انجام شده توسط نرم افزار Rotor-Gene ترسیم شد. جهت مقایسه و بررسی کمی نتایج در تکنیک Real Time PCR نیاز به ژنی داریم که در تمام سلول‌ها بیان شود. ژنی که بعنوان مرجع در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت GAPDH (GAPDH F: GCA GGG ATG ATG TTC TGG و GAPDH R: CTT TGG TAT CGT GGA AGG AC) بود. برای هر نمونه دو نمودار توسط

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

دستگاه رسم شد که یکی به ژن اصلی و دیگری به GAPDH مربوط بود. دربرنامه Rotor-gene برای نمودارهای سیکل‌های PCRخط آستانه ترسیم شد و نرم افزار مزبور داده‌ها را بر مبنای خط آستانه به صورت اعداد Ct مشخص نمود. بیان نسبی ژن به صورت چندین برابر اختلاف کاهش یا افزایش گزارش داده شد و $P < ۰/۰۵$ معنی دار در نظرگرفته شد.

آنالیز داده‌ها

اطلاعات با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism for Windows مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای کمی به صورت میانگین ± انحراف میانگین (mean ± SEM) بیان شده‌اند. تفاوت بین گروه‌های مختلف توسط One-Way ANOVA و با در نظر گرفتن $P < ۰/۰۵$ بعنوان حد معنی دار بودن مورد مقایسه قرار گرفتند. نرمال بودن داده‌ها توسط تست Shapiro-wilk مورد تایید قرار گرفت.

نتایج

کشت سلول‌های hAMSC

در بررسی مورفولوژی سلول‌ها در زیر میکروسکوب نوری معکوس، hAMSCs دارای ظاهری تقریباً دوکی شکل و فیبروبلاستی بودند (شکل۱).

مارکرهای سطحی hAMSCs

مارکرهای سطحیhAMSCs به وسیله فلوسایتومتری بررسی گردید. نتایج نشان داد که CD۲۹، CD۹۰ و CD۱۰۵ بر سطح hAMSCs بیش از ۹۵ درصد بیان شدند ولی این سلول‌ها قادر به بیان CD۳۴، CD۴۵ نبودند (شکل۲).

تمایز سلول‌های hAMSC به سلول‌های چربی، استخوان و غضروف

در سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های چربی، حدودا ۱۴روز بعد از تمایز، واکوئل‌های چربی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که با رنگ آمیزی Oil Red O به رنگ قرمز درآمدند. در سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوانی بعد از ۲۱ روز که سلول‌ها با آلیزارین رد رنگ‌آمیزی شدند، رسوبات کلسیم داخل سلولی به رنگ قرمز قابل مشاهده بودند و در نهایت در سلول‌های غضروفی گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته ماتریکس تحت رنگ-آمیزی آلسین بلو به رنگ آبی درآمده بودند (شکل۳).

ساخت نانو ذرات

نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد نانوذرات اکسیدآهن با اندازه ۲۰ نانومتر و با مورفولوژی کروی سنتز شده‌اند. (شکل ۴ A، B) و به منظور شناسایی و ارزیابی ساختار و نیز ماهیت نانوذرات مگنتیت سنتز شده از طیف سنجی مادون قرمز استفاده شد. پیک شاخص مگنتیت در $۵۹۰\ cm^{-1}$ و ۴۴۵ ظاهر می‌شود که مطابق با ارتعاش کششی پیوند Fe-O در اکسیدآهن است و حضور پیک‌های پهن در محدوده $۳۵۰۰\ cm^{-1}$ که مربوط به گروه-های هیدروکسی سطح نانوذارت هستند دلیل بر تشکیل ماده است. نتایج FT-IR حضور پلی‌اتیلن‌گلیکول را بر سطح نانوذرات تایید کرد (شکل۴ C).

بررسی زنده‌مانی hAMSCs توسط تست MTT

با استفاده از آزمایش MTT، اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بر میزان زنده ماندن سلول‌های hAMSCs بررسی گردید. در طی هر دو زمان با غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد زنده‌مانی سلول‌ها تغییر چشمگیری نداشت (۲۴ h، ٪۰/۰۱ ± ۴). در صورتیکه در غلظت‌های ۱۵۰ (۲۴h، ٪۱/۴ ± ۴۲) و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۲۴h، ٪۱/۳ ± ۶۶) زنده‌مانی سلول‌ها به طور معنادار (***$p < ۰/۰۰۱$) کاهش یافت. از اینرو غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره جهت بررسی اثرات آن در کل مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۵).

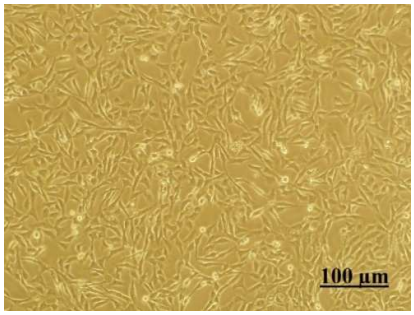
تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن بر بیان ژن p53

آزمون qRT-PCR جهت بررسی تغییرات بیان ژن p53 مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی این ژن نسبت به بیان نسبی ژن مربوط به GAPDH سنجیده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن p53 بعد از مواجه با نانوذره اکسیدآهن با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نتوانست تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کند. درحالی‌که در مواجه با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره میزان بیان mRNA ژن p53 به طور چشمگیری (***$p < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (شکل ۶).

بحث

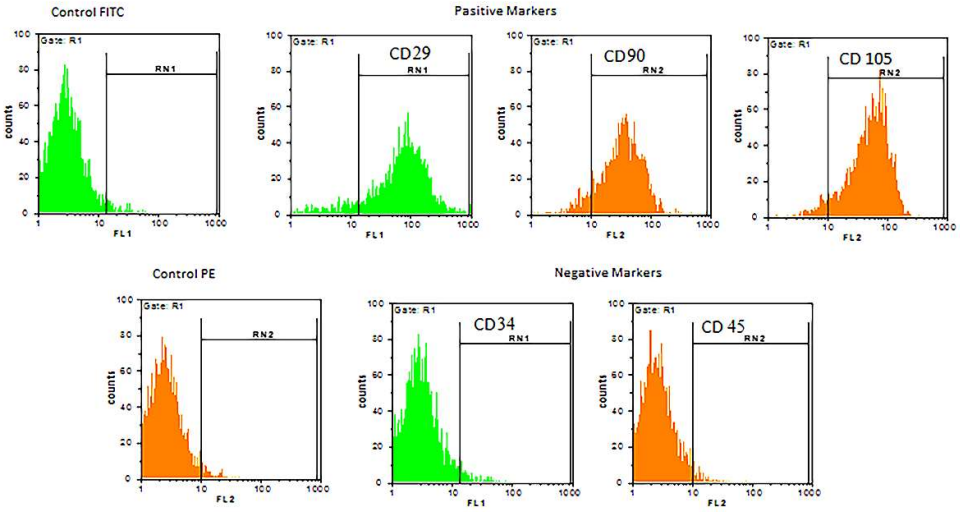
در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت ویژگی‌های منحصر به فرد خود، به عنوان یکی از ابزارهای مهم در تحقیقات سلول درمانی محسوب شده‌اند (Jiang et al., 2002). روی آوردن بسیاری از محققان در استفاده از این سلول‌ها در دهه اخیر قابل توجه است. این مطلب در تعداد مطالعات بسیاری که در مخذ معتبر تحقیقات پزشکی به ثبت رسیده، هویدا است. در بین انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک انسانی بدلیل ویژگی‌های منحصر بفرد خود مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله این‌که این سلول‌ها فاکتورهایی را بیان می کنند (Maumus et al., 2013) که در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]



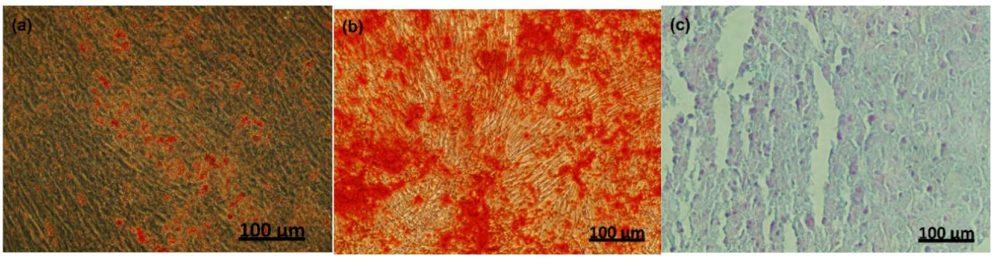
شکل ۱- بررسی مورفولوژی hAMSCs توسط میکروسکوپ نوری معکوس. تصاویر نشان داد که سلول‌ها دارای شکل یکنواخت در کشت تک لایه بودند.

Fig. 1. Assessment of morphology of hAMSCs by a Reverse Optical Microscope. The images showed that the cells had a uniform shape in monolayer culture.



شکل ۲- تعیین مارکرهای سطحی hAMSCs با استفاده فلوسایتومتری.hAMSCs برای مارکرهای CD45 و CD34 منفی، اما برای CD29، CD90 و CD105 مثبت بودند.

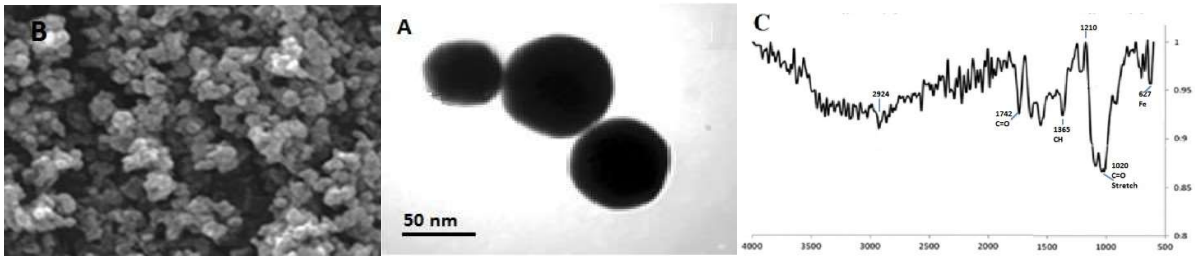
Fig. 2. Determination of surface markers of hAMSCs by flow cytometry. hAMSCs were negative for CD45 and CD34 but positive for CD29, CD90 and CD105.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ نوری از تمایز hAMSCs **a**. به سلولهای چربی (رنگ آمیزی Oil Red O)، **b**. سلول‌های استخوانی (رنگ آمیزی آلیزارین رد)، **c**. سلول‌های غضروفی (رنگ آمیزی آلسین بلو).

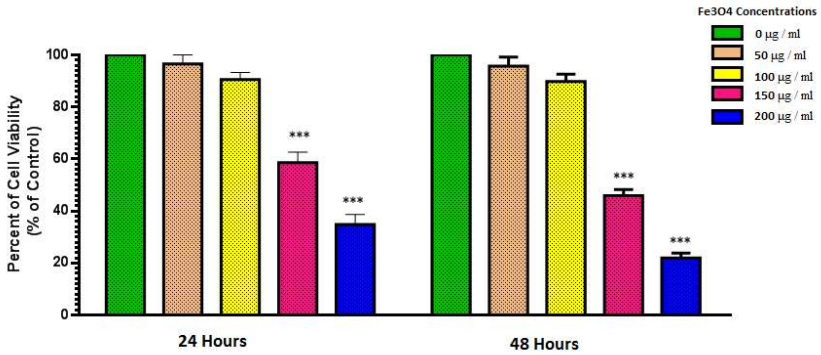
Fig. 3. Optical microscopy images of differentiation of **a.** hAMSCs into adipocytes (Oil red staining), **b.** osteoblasts (Alizarin red staining), **c.** chondrocytes (Alcian blue staining/nuclear fast red counterstain).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]



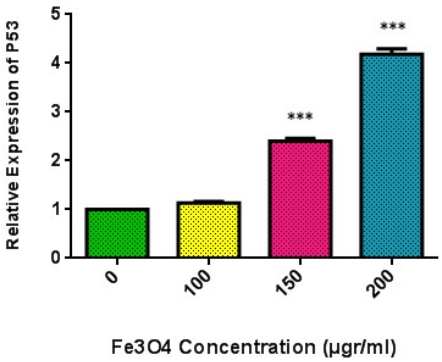
شکل ۴- خصوصیات نانو ذرات اکسیدآهن. **A**. تصویر TEM از SPIONs. **B**. تصویر SEM از SPIONs. **C**. نتایج FTIR از حضور پلی‌اتیلن‌گلیکول بر سطح SPIONs.

Fig. 4. Characterization of iron oxide nanoparticles. **A.** TEM image of SPIONs. **B.** SEM image of SPIONs. **C.** FTIR results of the presence of polyethylene glycol on the surface of SPIONs.



شکل ۵- بررسی زنده‌مانی hAMSCs تحت تاثیر نانوذره اکسیدآهن توسط تست MTT. غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجه هیچ تاثیری بر بقا سلول‌ها نداشت. در مقابل غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شدند (n=3,$^{***}p$ < ۰/۰۰۱).

Fig. 5. Evaluation of hAMSCs viability under the influence of iron oxide nanoparticles by MTT assay. Concentrations of 50 and 100 µg / ml nanoparticles at 24 and 48 hrs exposure had no effect on cell survival. In contrast, concentrations of 150 and 200 µg / ml significantly reduced cell viability (***P<0.001, n = 8).



شکل ۶- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن بر بیان ژن p53: در بیان ژن p53 در سلول‌های مواجه شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. در حالی‌که بیان ژن p53 در سلول‌های مواجه شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود (n=3,24hrs,$^{***}p$ < ۰/۰۰۱).

Fig. 6. Evaluation of the effect of different concentrations of iron oxide nanoparticles on p53 gene expression: No significant changes were observed in p53 gene expression in cells exposed to 100 µg / ml. However, p53 gene expression was significantly higher in cells exposed to 100 and 200 µg / ml than control group (n=3,24hrs, p <0.001).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

بنیادی ژرمینال اولیه هم بیان می‌شوند و همچنین می‌توانند به سلول‌های حاصل از سه لایه زایای جنینی تمایز یابند. همچنین این سلول‌ها تلومراز را بیان نمی‌کنند و در صورت پیوند باعث ایجاد تومور نمی شوند، خواص ضد التهابی و ایمونومدولاتوری دارند، MHC1 در سطح این سلول‌ها بیان نخواهد شد و بنابراین سیستم ایمنی میزبان را تحریک نکرده و می‌توان از فردی به فرد دیگر تزریق کرد، ملاحظات اخلاقی ندارند و منبع تهیه آن آسان است و به بافت-های ناخواسته تبدیل نمی‌گردند و بدون مداخله هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در بدن قادرند به سلول‌های مختلف تبدیل شوند (Zhao et al., 2005; Hida et al., 2008; Miki 2011).

محققین در مطالعه‌ای به جداسازی سلول‌های بنیادی آمنیوتیک با پتانسیل درمانی پرداختند که در آن تحقیق نشان داده شد که سلول‌های بنیادی آمنیوتیکی می‌توانند به رده‌های مختلف سلولی از جمله رده سلول‌های عصبی با توان ترشح نوروترانسمیتر L-گلوتامات و G پروتئین، سلول‌های کبدی تولید کننده اوره و سلول‌های استخوانی که در مهندسی بافت نقش مهمی دارند، تمایز یابند (De Coppi et al., 2007).

از طرفی ردیابی موثر و غیر تهاجمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بکارگیری پتانسیل درمانی آن‌ها ضروری و لازم است.کاربردهای فناوری نانو در ردیابی، انتقال، بیوسنسورها و کنترل سلول‌های بنیادی، امکان شگفت انگیز و غیرقابل باوری برای دسترسی به مکانیزم‌های پیشرفته روش‌های تشخیصی و درمانی نوین جهت بیماری‌های انسان فراهم می‌کند (Lin et al., 2015). نانومهندسی و فناوری‌نانو ساخت آرایه‌های کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی کنترل‌شده و با بازدهی بالا را برای کشت سلول‌های بنیادی و نمونه‌هایی که رشدشان دشوار است را ممکن ساخته است.

امروزه، نانو ساختارها بعلت داشتن فرایندهای خاص در واکنش-های بیولوژیکی و دارویی باعث جلب توجه پژوهشگران شده‌اند. فناوری‌نانو برای ردیابی اولیه، تشخیص و درمان بیماری‌ها در حوزه‌های پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. مگنتیت بعلت خواص مغناطیسی بالای آن ابتدا در زیست‌شناسی و سپس در پزشکی برای جداسازی مغناطیسی محصولات زیستی و سلول‌ها و همچنین هدایت مغناطیسی ذرات از جمله انتقال دارو استفاده می‌شود (Gupta & Gupta, 2005).

پژوهشگران در مطالعه‌ای به بررسی ذرات اکسیدآهن با سایزهای مختلف در ابعاد میکرون و نانو در تکنیک MRI پرداختند و ثابت کردند که این ذرات در ابعاد بزرگتر برای ردیابی سلول‌ها از طریق Spin echo(SE) مناسب هستند و از طرفی ذرات اکسیدآهن در ابعاد میکرون (MPIOs) برای بررسی سلول‌ها به وسیله MRI بهینه هستند (Shapiro et al., 2005). نانوذره‌های اکسیدآهن (SPIONs) به طور گسترده‌ای بعنوان ابزاری موثر برای نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی یا تصویربرداری هدفمند مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ذرات با استفاده از تصویربرداری تشدید مغناطیسی قابل مشاهده هستند (Mohanty et al., 2018).

لازم به ذکر است که پایدار نگه داشتن این ذرات به مدت زمان طولانی بدون توده‌ای شدن یا رسوب کردن یک موضوع بسیار مهم است. یکی از روش‌ها برای ایجاد این پایداری حفاظت نانوذره با پوششی از پلیمرهای زیست‌سازگار غیرقابل نفوذ است (Thünemann et al., 2006).

در مطالعه‌ای برای ردیابی سلول‌های بنیادی توسط MRI، از نانوذره سوپر پارامغناطیس اکسیدآهن پوشش‌دار شده توسط سیترات استفاده کردند. در این مطالعه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌ای که با SPION نشاندار شده بودند، در داخل بدن بعد از تزریق عضلانی به وسیله 7T-MRI مورد بررسی قرار گرفتند (Andreas et al., 2012). با توجه به این‌که پوشش استفاده شده باید زیست سازگار بوده و اثرات سمی بر سلول نداشته باشد و با در نظر گرفتن بسیاری از مطالعات در این زمینه (Schweiger et al., 2011; Nance et al., 2012) در این تحقیق ما از پلی اتیلن گلیکول (PEG) برای پوشش‌دار کردن نانوذره اکسیدآهن استفاده کردیم.

با تمام این توضیحات، مطالعات اندکی در رابطه با رفتار سلولی و تغییر عملکرد بعد از نشاندار کردن و امکان ایجاد سمیت سلولی صورت گرفته است (Mohanty et al., 2018). ویژگی‌هایی از نانوذرات که در ایجاد سمیت سلولی نقش دارند، شامل سطح، اندازه، مورفولوژی ذرات و انحلال یون‌ها هستند. بدنبال افزایش استرس اکسیداتیو و هوموستاز کلسیم داخل سلولی در نتیجه القا سمیت نانوذره، چرخه سلولی با اختلال مواجه شده و سلول به سمت مرگ سوق می‌یابد

مطالعات قبلی سمیت برخی از انواع نانوذرات را در چندین سلول در شرایط آزمایشگاهی گزارش کرده‌اند (Nowrouzi et al., 2010; Shavandi et al., 2011). همچنین در مطالعه‌ای مروری که در سال ۲۰۱۸ انجام شده عنوان شده که نانوذرات نقره با افزایش پراکسیدان‌ها و به دنبال آن آسیب ماده ژنتیکی، با فعال کردن مسیرهای آپوپتوزی منجر به سمیت سلولی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Akter et al., 2018). با این حال، اطلاعات مشخص کمی در رابطه با پتانسیل ژنوتوسیتی نانوذرات مغناطیسی وجود دارد.

همان‌طور که گفته شد سمیت نانوذرات به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این ذرات از جمله اندازه، مورفولوژی، پوشش و غلظت آن‌ها بستگی خواهد داشت (Buzea et al., 2007; Mahmoudi et al., 2011). خواص فیزیکی شیمیایی نانوذرات بر نحوه تعامل با سلول‌ها و به همین ترتیب سمیت بالقوه تاثیر می‌گذارند. در مورد اندازه و نوع

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

پوشش پیشتر به تفصیل توضیح داده شد. در مورد غلظت نانوذرات در ایجاد سمیت تحقیقاتی نه چندان زیاد صورت گرفته است. در مطالعه‌ای سمیت نانوذرات اکسید فلزات (TiO2، ZnO، Fe3O4، Al2O3 و CrO3) را در سلول‌های پستانداران در غلظت‌های متفاوت این نانوذرات مورد بررسی قرار داده‌اند (Jeng & Swanson, 2006). در پی تحقیقاتشان مطالعات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های Neuro-2A که در معرض نانوذرات (به ویژه ZnO) قرار داشتند، در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، اندازه غیرطبیعی، ظاهر شدن انقباض سلولی و جدا شدن از سطح را نشان داد. عملکرد سلول‌های خونی در سلول‌های مواجه شده با ZnO در ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (Jeng & Swanson 2006). در مطالعه حاضر غلظت‌های مختلف نانوذره پارامغناطیس اکسیدآهن مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد نانوذره اکسیدآهن در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تاثیر معناداری بر زنده‌مانی سلول‌ها ندارد، درحالی‌که این نانوذره در غلظت‌های بالای ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان قابل توجهی زنده‌مانی سلولی را کاهش داده و موجب وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول می‌شود. بنابراین نتایج به دست آمده در مطالعه پیشرو، حاکی از هم جهت بودن با مطالعات قبلی در این زمینه است. در راستای این تحقیق در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط انصاری صورت گرفت، برهمکنش SPIONs با DNA در کنار دیگر اثرات سمی این ذرات در شرایط برون تنی و درون تنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشاهدات وی نشان داد که نانوذرات اکسیدآهن با بازهای اسیدنوکلوئیک پیوند می‌خورد و در نتیجه کمپلکسی با DNA تشکیل می‌شود و از طرفی این ذرات با افزایش دادن تولید پراکسیدان و رادیکال آزاد، درصد زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهند (Ansari et al., 2019).

در میان مطالعات صورت گرفته توسط سایر پژوهشگران یک گزارش حاکی از این است که نانوذره اکسیدآهن تنها باعث ایجاد سمیت سلولی و کاهش زنده‌مانی سلول نمی‌شود بلکه سبب پیشرفت چرخه سلولی و در نتیجه افزایش رشد و تکثیر سلول می‌شود (Huang et al., 2009) که در این مطالعه آن‌ها بیان کردند که نشاندار کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نانوذره اکسیدآهن سبب افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود و نشان دادن این امر بسبب حذف پراکسیدان‌ها توسط SPIONs درون سلولی و اثر نانوذره بر تنظیم کننده‌های پروتئینی چرخه سلولی است. البته لازم به ذکر است که در این مطالعه از نانوذره فروکربوتران استفاده شده است که همان نانوذره اکسیدآهن با پوشش کربوکسی دکستران است. از مقایسه این مطالعه با مطالعه حاضر به این نتیجه خواهیم رسید که نوع پوشش نانوذره در ایجاد یا عدم ایجاد سمیت سلولی نانوذره بسیار حائز اهمیت است.

در این مطالعه، سلول‌های hAMSC در مواجه با غلظت‌های مختلف SPIONs قرار گرفتند. در آزمایش ما، پس از انکوباسیون سلول‌ها با SPIONs در غلظت‌های بالا (۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) زنده‌مانی سلولی و نرخ تکثیر سلولی تا حدود زیادی تحت تأثیر قرار گرفت و کاهش پیدا کرد و همچنین بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز سلولی (p53) را تحت تاثیر قرار داد. سعی شد در این تحقیق غلظت مناسب از نانوذره که موجب سمیت سلولی نمی‌شود را پیدا کنیم.

نتیجه‌گیری

SPIONها با اندازه متوسط ۲۰ نانومتر پوشش داده شده با پلی اتیلن گلیکول سمیت قابل توجهی را در غلظت‌های تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک انسانی (hAMSCs) در ۲۴ ساعت مواجه نشان نداده و در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق القای آپوپتوز منجر به سمیت و مرگ سولی خواهند شد. آزمایش Real Time PCR برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن p53 نشان داد که قرار گرفتن سلول‌ها در معرض غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از نانوذرات منجر به افزایش بیان این ژن می‌شود که در نهایت منجر به آسیب سلول و مرگ می‌شود. از آنجا که پروتئین کد شده توسط ژن p53، تریگر مهمی در مسیر القای آپوپتوز است، بواسطه بیان بیش از حد آن آبشار عناصر دخیل در آپوپتوز به راه افتاده و در نهایت منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلول خواهد شد. در نهایت این تحقیق نشان داد که قرار گرفتن در معرض غلظت‌های بالای SPION باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان می‌شود. بنابراین طی این بررسی مشخص شد که نانوذرات با غلظت ≤۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جهت ردیابی سلول‌های بنیادی مناسب هستند. بنابراین، hAMSCهای نشان‌دار شده با غلظت بهینه از نانوذره می‌توانند در درمان‌های بالینی و طب بازساختی مورد استفاده قرار گیرند. در ادامه این مطالعه، بررسی دیگر ژن‌های دخیل در القای آپوپتوز از جمله ژن‌های خانواده کاسپازها، همچنین بررسی اثرات این نانوذرات بر ژن‌های اتوفازی، نکروزی و فاکتورهای التهابی در سلول‌های بنیادی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

در نهایت از داوران این مقاله و همچنین از مساعدت‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران در جهت اجرای این پروژه سپاسگزاری می‌شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]
[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]

[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]

REFRENCES

Akter, M., Sikder, M.T., Rahman, M.M., Ullah, A.A., Hossain, K.F.B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T. & Kurasaki, M. 2018. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. Journal of Advanced Research 9: 1-16.

Andreas, K., Georgieva, R., Ladwig, M., Mueller, S., Notter, M., Sittinger, M. & Ringe, J. 2012. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. Biomaterials 33: 4515-4525.

Ansari, M.O., Parveen, N., Ahmad, M.F., Afrin, S., Rahman, Y., Jameel, S., Khan, Y. A., Siddique, H.R., Tabish, M. and Shadab, G. 2019. Evaluation of DNA interaction, genotoxicity and oxidative stress induced by iron oxide nanoparticles both in vitro and in vivo: attenuation by thymoquinone. Scientific Reports 9: 1-14.

Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y. & Chai, Z. 2010. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. Journal of Nanoparticle Research 12: 1645-1654.

Buzea, C., Pacheco, I.I. & Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases 2: MR17-MR71.

Das, A.K. 2009. Stem cell therapy for critical limb ischaemia—a review. Indian Journal of Surgery 71: 177-181.

De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y. and Yoo, J. J. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nature Biotechnology 25: 100-106.

Gupta, A.K. & Gupta, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 26: 3995-4021.

Hida, N., Nishiyama, N., Miyoshi, S ,.Kira, S., Segawa, K., Uyama, T., Mori, T., Miyado, K., Ikegami, Y. & Cui, C. 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem Cells 26: 1695-1704.

Huang, D.M., Hsiao, J.K., Chen, Y.C., Chien ,L.Y., Yao, M., Chen, Y.K., Ko, B.S., Hsu, S.C., Tai, L.A. & Cheng, H.Y. 2009. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamag-netic iron oxide nanoparticles. Biomaterials 30: 3645-3651.

Jeng, H.A. & Swanson, J. 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. Journal of Environmental Science and Health Part A 41: 2699-2711.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T. & Blackstad, M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418 (6893): 41.

Kumar, S., Jana, A. K., Dhamija, I., Singla, Y. & Maiti, M. 2013. Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 85: 413-426.

Lin, Y.X., Ding, Z.Y., Zhou, X.B., LI, S.T., Xie, D.M., LI, Z.Z. & Sun, G.D. 2015. In vitro and in vivo evaluation of the developed PLGA/HAp/Zein scaffolds for bone-cartilage interface regeneration. Biomedical and Environmental Sciences 28: 1-12.

Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. 2011. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Chemical Reviews 112: 2323-2338.

Makarevich, P.I., Dergilev, K.V., Tsokolaeva, Z.I., Boldyreva, M.A., Shevchenko, E.K., Gluhanyuk, E.V., Gallinger, J.O., Menshikov, M.Y. & Parfyonova, Y.V. 2018. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. PLOS One 13: e0197566.

Maumus, M., Jorgensen, C. & Noël, D. 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. Biochimie 95: 2229-2234.

Miki, T. 2011. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. Stem Cell Research & Therapy 2: 25.

Mohanty, S., Jain, K.G., Nandy, S.B., Kakkar, A., Kumar, M., Dinda, A.K., Singh, H. & Ray, A. 2018. Iron oxide labeling does not affect differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells exhibited by their differentiation into cardiac and neuronal cells. Molecular and Cellular Biochemistry 448: 17-26.

Nance, E.A., Woodworth, G.F., Sailor, K.A., Shih, T.-Y ,.Xu, Q., Swaminathan, G., Xiang, D., Eberhart, C. & Hanes, J. 2012. A dense poly (ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. Science Translational Medicine 4: 149ra119.

Naseroleslami, M., Aboutaleb, N. & Parivar, K. 2018. The effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeled mesenchymal stem cells in the presence of a magnetic field on attenuation of injury after heart failure. Drug Delivery and Translational Research 8: 1214-1225.

Nowrouzi, A., Meghrazi ,K., Golmohammadi, T., Golestani, A., Ahmadian, S., Shafiezadeh, M., Shajary, Z., Khaghani, S. & Amiri, A. 2010. Cytotoxicity of subtoxic AgNP in human hepatoma cell line (HepG2) after long-term exposure. Iranian Biomedical Journal 14: 23.

Schweiger, C., Pietzonka, C., Heverhagen, J. & Kissel, T. 2011. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (ethylene imine)-g-poly (ethylene glycol) for potential biomedical application: synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. International Journal of Pharmaceutics 408: 130-137.

Shapiro, E. M., Skrtic, S. & Koretsky, A. P. 2005. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. Magnetic Resonance in Medicine 53: 329-338.

Shavandi, Z., Ghazanfari, T. & Moghaddam, K.N. 2011. In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine

peritoneal macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology 33: 135-140.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G., Wright, C. J. and Doak, S. H. 2009. "NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials." Biomaterials 30: 3891-3914.

Sridhar, S.S. & Shepherd, F.A. 2003. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. Lung Cancer 42: 81-91.

Sun ,C., Lee, J. S. & Zhang, M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 60: 1252-1265.

Thünemann, A.F., Schütt, D., Kaufner, L., Pison, U. & Möhwald, H. 2006. Maghemite nanoparticles protectively coated with poly (ethylene imine) and poly (ethylene oxide)-b lock-poly (glutamic acid). Langmuir 22: 2351-2357.

Tiwari, M. 2012. Apoptosis, angiogenesis and cancer therapies. Journal of Cancer Terapeutics and Research 1: 3.

Verma, V.K., Kamaraju, S.R., Kancherla, R., Kona, L.K., Beevi, S.S., Debnath, T., Usha, S.P., Vadapalli, R., Arbab, A.S. & Chelluri, L.K. (2015). Fluorescent magnetic iron oxide nanoparticles for cardiac precursor cell selection from stromal vascular fraction and optimization for magnetic resonance imaging. International Journal of Nanomedicine 10: 711.

Zhao, P., Ise, H., Hongo, M., Ota, M., Konishi, I. & Nikaido, T. 2005. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. Transplantation 79: 528-535.

*****

How to cite this article:

Tekiyeh Maroof, N., Aboutaleb, N. and Naseroleslami, M. 2020. The effect of different concentrations of iron oxide nanoparticles on the expression of p53 gen in human derived amniotic membrane mesenchymal stem cell. Nova Biologica Reperta 7: 256-266. (In Persian).

تکیه معروف، ن.، ابوطالب، ن. و ناصرالاسلامی، م. ۱۳۹۹. بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدآهن بر بیان ژن p53 در سلول‌های بنیادی مشتق شده از غشای آمنیوتیک انسانی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۲۶۶-۲۵۶.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.3.3.9]

[DOI: 10.52547/nbr.7.3.256]