تعیین میزان غلظت غیرسمی نانوذرات Fe_3O_4 مغناطیسی بر سلول های بنیادی غشای آمنیوتیک

ندا موسوی نیری [۱]، مریم ناصرالاسلامی [۲،۳*]

۱ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ،ایران

۲ گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران،دانشگاه آزاد اسلامی ،تهران ،ایران

۳ مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: naseroleslami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۲ تاریخ پذیرش:۹۷/۹/۴

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۳ - شماره ۱- بهار ۱۳۹۷

چکیده

نانوذرات پارا مغناطیس اکسید آهن (SPIONs) یک پیشرفت مهم در زمینه فناوری نانو هستند. آنها امکان تجزیه و تحلیل غیر تهاجمی برای ردیابی سلول ها را فراهم می آورند و دارای خواص مفید بسیاری هستند که آنها را نامزد بالقوه برای کاربرد های متعدد در پزشکی ساخته است با این حال، احتمال ایجاد سمیت در سلول ها توسط این نانو ذرات گزارش شده است .هدف از این مطالعه یافتن غلظتی از SPION است که منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول ها نشود.برای این منظور برای اولین بار سلول های بنیادی غشای آمنیوتیک با غلظت های مختلف SPION ها انکوبه شدند سپس میزان استرس اکسیداتیو سلولی (ROS)با استفاده از پروب Prohod Rhodamine 123 اندازه گیری شد. نتایج ما نشان می دهد که میزان قابل توجهی از گونه های فعال اکسیژن در سلول ها در محدوده غلظت ۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانو ذرات وجود ندارد. با این حال، در غلظت های بالاتر از ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، تولید گونه های فعال اکسیژن افزایش یافت. با توجه به نتایج ،نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه در غلظت ≥ ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای ردیابی این سلول ها مناسب هستند.

واژگان کلیدی: رودامین ۱۲۳، گونه های فعال اکسیژن ، سلول های بنیادی غشای آمنیوتیک

مقدمه

امروز استفاده از نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامغناطیس در پزشکی، تشخیص و نشان دار کردن سلول ها در سلول درمانی رایج شده است (۱). عواملی مانند اندازه، شکل و پوشش سطحی نانوذرات می توانند در میزان جذب سلولی و و کارایی نانوذرات موثر باشند (۲). تاکنون از مواد مختلفی مانند پلیمرها، بیومولکول ها، فلزات و سیلیکا برای پوشش سطح SPION استفاده شده است که این پوشش ها موجب کاهش سمیت ذرات، افزایش زیست سازگاری، تغییر بار سطحی ذرات، افزایش نیمه عمر آنها در سلول و بهبود عملکرد و اختصاصیت ذرات، افزایش امکان عملکردی کردن سطح ذرات در بدن می شوند. یکی از این پوشش ها پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که از تجمع نانوذرات جلوگیری و باعث حل شوندگی آنها می‌شود (۳،۴). مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات روی سلول ها هنوز شناخته نشده است، اما مطالعات مختلف در محیط های آزمایشگاهی و بدن پیشنهاد می کنند که مقادیر زیاد آنها قادرند گونه های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند. گونه های آزاد اکسیژن مانند آنیون های سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت و رادیکال هیدروکسیل است. دو منبع مهم تولید ROS میتوکندری و غشای پلاسمایی می باشد. ROS روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین ها می توانند نقش داشته باشند. ROS از روش های مختلفی نظیر آسیب رساندن به DNA، تداخل با

مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن ها می توانند به سلول ها آسیب وارد کنند. چندین سیستم آنزیمی شامل NAD(P)H اکسیداز، اکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P450 و گزانتین اکسیداز، در تولید درون سلولی ROS دخالت دارند. ROS به صورت غیرآنزیمی عمدتاً در میتوکندری به ویژه در کمپلکس های I و III انتقال الکترون میتوکندریایی به وجود می آید (۵،۶). با توجه به اینکه امروزه استفاده از سلول های بنیادی غشای آمنیوتیک به دلیل خواص ضدالتهابی، فاکتورهای رشد ترشحی، میزان تمایز بالا رو به افزایش است. در این طرح برای اولین بار غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن روی با این سلول ها انکوبه شدند تا دوز مناسب نانوذرات برای نشان دار کردن این سلول ها به دست آید.

مواد و روش ها

تهیه نانو ذرات

ساخت نانوذرات اکسید آهن Fe_3o_4 به روش هم-سوبی شیمیایی نمک‌های کلرید آهن در یک محلول قلیایی در حضور پوشش پلی اتیلن گلیکول (PEG) انجام شد. سپس خصوصیات نانوذرات مغناطیسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (TEM) و طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) مشخص شدند.

تهیه بافت

در این مطالعه، بعد از اخذ رضایت نامه کتبی از والدین نوزادان در بخش زایمان بیمارستان میلاد، بخشی از پرده آمنیوتیک (به ابعاد تقریبی ۳ در ۴ سانتی متر) به طور مکانیکی از کوریون جفتی نوزادان فول ترم، پس از زایمان جدا گردید و در محلول PBS سرد حاوی آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتومایسین) بر روی یخ، قرار داده شد و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل گردید.

تهیه سلول های مزانشیمال مشتق از غشای آمنیوتیک

ابتدا نمونه چندین نوبت در پتری دیش توسط PBS شستشو شد تا خون و سایر آلودگی سطحی آن کاملا شسته شده و پاک گردد سپس غشای آمنیوتیک با استفاده از یک تیغ بیستوری، پنس و قیچی استریل به صورت مکانیکی کاملا قطعه قطعه شده و لخته های خون جدا گردید. در مرحله بعد نمونه قطعه شده مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. بدین صورت که تیمار با کلاژناز تیپ ۱ به مدت ۴ ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و بعد از غیرفعال سازی توسط سرم جنینی و سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی به دست آمده از صافی عبور داده شده و در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربع در محیط کشت DMEM حاوی FBS(Fetal Bovine Serum) ۱۰% ،ال گلوتامین (۲mM)، پنی سیلین (۱۰۰U/ml)، استروپتومایسین (۱۰۰µg/ml) ، اسیدهای آمینه غیر ضروری ۱٪ کاشته شد. آنگاه در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه گردید بعد از چند روز سلول های شناور با خروج محیط کشت خارج شده و به بقیه سلول های چسبیده به کف فلاسک محیط کشت و FBS اضافه شد. هر ۳ تا ۴ روز محیط کشت فلاسک ها را دور ریخته و محیط جدید اضافه می گردد تا مقدار تراکم سلول ها در کف فلاسک به حدود ۸۰ درصد برسد. سپس پاساژ اول صورت گرفت، به این ترتیب که سلول ها با استفاده از Trypsin/EDTA از کف ظرف کشت کنده شده و به نسبت ۱:۳ کشت داده شد در حدود ۵ تا ۷ روز پس از هر پاساژ، پاساژ بعدی انجام می گرفت.

تیمار سلول های بنیادی با اکسید آهن

برای آماده سازی نانو ذرات ابتدا نانوذرات در آب سونیکیت شدند (با قدرت ۴۰ و زمان ۴ دقیقه،۳۰ ثانیه off و ۳۰ ثانیه on). سپس سلول ها در ظروف کشت کاشته شده و بعد از ۲۴ ساعت غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵۰، ۱۰۰ ،۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) که توسط اشعه UV استریل شده بودند روی سلول ها ریخته شد.

بررسی استرس اکسیداتیو

پس از ۳ بار شستشوی سلول ها با PBS گرم، سلول ها تریپسینه و سانترفیوژ شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر رودامین در فالکون ها ریخته شد و فالکون ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سپس سلول ها سانتریفیوژ شده و پس از شستشو با PBS جذب نوری

توسط دستگاه فلوریمتری در ۴۲۲ و ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

آنالیز داده ها

برای آنالیز داده ها از واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و از تست تکمیلی Games-Howell برای بررسی داده ها استفاده گردید. اختلاف بین گروه‌ها در صورتی معنی دار تلقی شده است که $P<0.05$ باشد.

نتایج

ساخت نانو ذرات

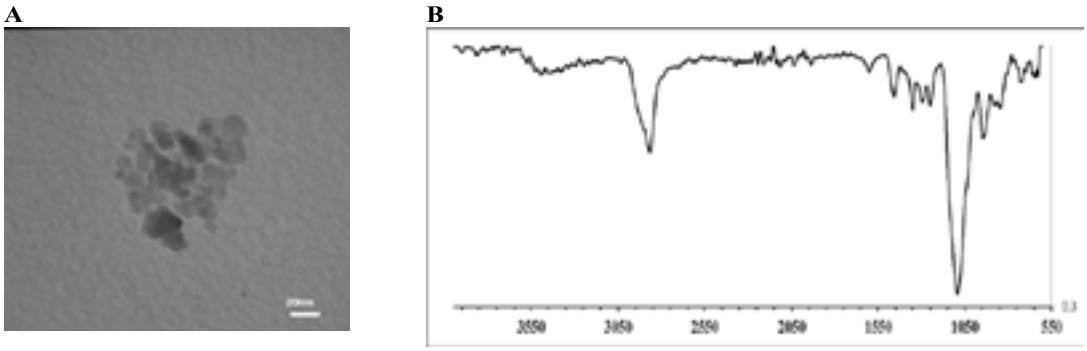
نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد نانوذرات اکسید آهن با اندازه ۲۰ نانومتر و با مورفولوژی کروی سنتز شده اند (شکل ۱، A) و نتایج FT-IR هم حضور پلی اتیلن گلیکول را بر سطح نانوذرات تایید کرد (شکل ۱، B).

جداسازی سلول از بافت و تکثیر سلول ها

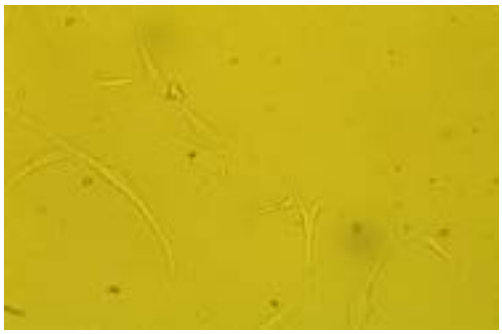
سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده از غشای آمنیوتیک از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول های فیبروبلاستی و دوکی شکل بودند (شکل ۲).

استرس اکسیداتیو

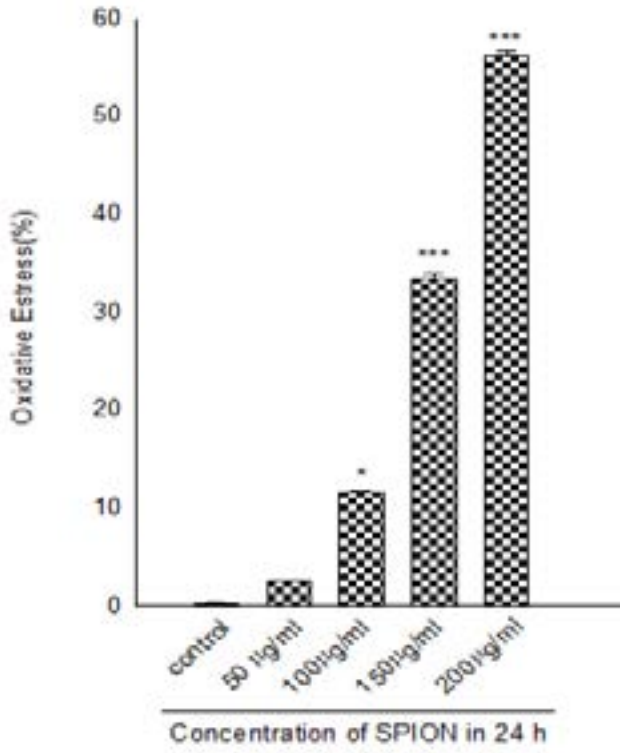
همانطور که در نمودار ۱ دیده می شود با افزایش غلظت آهن ریخته شده روی سلول میزان استرس اکسیداتیو ایجاد شده در سلول افزایش یافت و با توجه به نتایج بهترین غلظت انکوباسیون نانوذرات برای سلول ها ۱۰۰ ماکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد.



شکل ۱- خصوصیات نانو ذرات اکسید آهن.



شکل ۲- سلول های بنیادی جدا شده از غشای آمنیوتیک در پاساژ، با بزرگنمایی ۲۰۰.



نمودار ۱- بررسی تولید استرس اکسیداتیو در سلول ها پس از مجاورت با نانوذرات در غلظت های متفاوت
سطح معنادار بودن $0.05> P$ *و$0.005> P$ ** در نظر گرفته شد

بحث

امروزه استفاده از نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامغناطیسی برای کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گرفته اند، اما مطالعات نشان داده است که در معرض قرار گرفتن سلول ها با این نانوذرات برای سلول ها سمیت ایجاد می کند و سبب آزاد شدن ROS در سلولها می گردد (۷،۸) که این ایجاد سمیت به شدت وابسته به دوز SPION می باشد (۹). ایجاد گونه های فعال اکسیژن با آسیب به ماده ژنتیکی ، لیپید و پروتیین های درون سلول می تواند سبب القای آپوپتوز و نکروز در سلول ها گردند (۸،۷).

با توجه به اینکه استفاده از نانوذرات اکسید آهن به عنوان عاملی برای نشان دار کردن سلول ها در سلول درمانی رو به گسترش است. پیدا کردن دوز مناسب این نانوذرات امری ضروری به شمار می رود. در این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن روی سلول های بنیادی غشای آمنیوتیک انجام گرفت، زیرا تهیه این سلول ها آسان و ارزان است و نسبت به سلول های مغز استخوان که در درمان استفاده می شود، مزایای بی شماری دارد از جمله اینکه به سلول های ناخواسته تمایز پیدا نمی کنند و فاکتورهای رشد و رگ زایی بیشتری ترشح می کند. ازآنجایی که مطالعات نشان داده اند که پوشش دهی در کاهش سمیت موثر هستند نانوذرات مورد استفاده در این طرح توسط پلی اتیلن گلایکول که ترکیبی زیست سازگار است پوشش دهی شدند (۸).

مطالعاتی هم راستا با این مطالعه صورت گرفته است به عنوان مثال Naqvi و همکاران، در سال ۲۰۱۰ سمیت

نانوذرات اکسید آهن بر اساس غلظت آنها را از طریق ارزیابی افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج پژوهش آنها نشان داد که غلظت های بالای نانوذرات اکسید آهن با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب مرگ ماکروفاژهای انکوبه شده با این نانو ذرات می گردد (۱۰). مطالعه Hoskins و همکاران نیز نشان داد که نانوذرات آهن باعث افزایش تولید ROS در سلول ها می گردد و تولید استرس اکسیداتیو نیز باعث مرگ سلول می شود (۱۱). همچنین مطالعاتی نشان داده است که انکوباسیون سلول ها با دوز بالای این نانوذرات سبب آسیب DNA، نکروز سلولی و آپوپتوز را از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می شود (۱۲،۵).

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که دوز خاصی از نانوذرات برای سلول بی ضرر است، اما در غلظت های بیشتر از ۱۰۰ µg /mL از نانوذرات اکسید آهن روند افزایش استرس اکسیداتیو در سلول در گروه های تیمار شده نسبت به گروه کنترل معنا دار می شود. با توجه به این که آسیب سلولی ناشی از نانوذرات اکسید آهن وابسته به دوز است. بنابراین پیدا کردن دوز مناسب نانوذرات اکسید آهن برای جلوگیری از آسیب سلولی یا مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو بسیار مهم می باشد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه ایران تأمین شده است که بدینوسیله از زحمات و مساعدت های انجام شده سپاسگزاری می شود.

منابع مورد استفاده

1. Verma, VK, Kamaraju, SR, Kancherla, R, Kona, LK, Beevi, SS, Debnath, T, Usha, SP, Vadapalli, R, Syed Arbab, A, Kiran Chelluri, L, 2015. Fluorescent magnetic iron oxide nanoparticles for cardiac precursor cell selection from stromal vascular fraction and optimization for magnetic resonance imaging. IJN 10: 711-726.
2. 2. Lindemann ,A , Lüdtke-Buzug ,K , Fräderich , B .M , Gräfe, K , Pries ,R, Wollenberg ,B , 2014,.Biological impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging of head and neck cancer cells. IJN,9,5025–5040.
3. Buzea, C, Blandino ,P, Robbie, K, 2007, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases ,4, 17 - 1721.
4. 4. Mahmoudi ,M., Hofmann ,H , Rothen-Rutishauser ,B , Petri-Fink ,A , 2011, Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, ACS.
5. 5.Chen ,H, Feng ,Y, Zhang, M, Chao ,W, Josephson ,L,Shaw ,S, Sosnovik, D, 2011, Protective Effect of the ApoptosisSensing Nanoparticle AnxCLIO-Cy5.5,Nanomedicine.
6. Cristina ,B ,Ivan. I,Pache ,Co,Robbie, K, 2007,Nanomaterials and nanoparticles :sources and toxicity.Biointer phases;.2,No 4.
7. Jennifer, M, Maciej ,W, 2013, Nanoparticle Technology as a Double-Edged Sword: Cytotoxic, Genotoxic and Epigenetic Effects on Living Cells, JBNB, , 4, 53-63.
8. Shuklaa, S , Jadaunb ,A, Arorac V, Sinhad, R K., Biyanie, N, Jainaa, V,K, 2015, In vitro toxicity assessment of chitosan oligosaccharidecoated iron oxide nanoparticles, Toxicology Reports, 2 ,27–39.
9. Huang, G, Chen, H, Dong, Y,X, Luo, H. , 2013 , Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Amplifying ROS Stress to Improve Anticancer Drug Efficacy , Theranostics, 3 , 2 .
10. Naqvi, S, Samim, M, Abdin ,M .Z, Ahmed , J, Maitra ,F, Prashant ,C.K, Dinda AK, 2010,Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress, IJN,5,983–9.
11. Hoskins ,C, Cuschieri ,A, Wang, L, 2012, The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. JN,10- 15.
12. Cortajarena ,A. L, Ortega , D, 2014, Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings, Nanobiomedicine,10 , 5772/58841.