

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی نانو ذره سریم‌اکساید بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

زهرا ولی پور^۱، مرجان نوری^۲، کاظم پریور^۱، احسان احسانی^{۳*}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

*مسئول مکاتبات: ehsan.ehsani@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷

DOI: 10.22034/ascij.2023.1993414.1522

چکیده

امروزه استفاده از نانو ذرات در زمینه‌های مختلف در حال افزایش است. نانو ذره سریم‌اکساید یکی از انواع نانوذرات می‌باشد که به طور گسترده‌ای در بخش نانو پزشکی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود. ویژگی آنتی‌اکسیدانی خاص نانو ذرات سریم‌اکساید سبب شد که به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی آن بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی پردازیم. پس از تهیه و پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، این سلول‌ها برای ایجاد استرس اکسیداتیو با غلظت‌های مختلف از هیدروژن‌پراکسید که با آزمون MTT بررسی شد تیمار شده و اندازه‌گیری میزان رادیکال آزاد ROS صورت گرفت. سپس، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سریم‌اکساید که با آزمون MTT بررسی شده بود تیمار شده و بقای سلولی به کمک آزمون آنکسین-۵ پروبیدیوم بدیاد به روش فلوسایتومتری برای بررسی آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً نتایج از نظر آماری آنالیز شد. بیشترین اثر استرس اکسیداتیو هیدروژن‌پراکسید در ۲۴ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار محاسبه شد و نتایج حاصل از بررسی MTT برای تعیین IC50 نانو ذره سریم‌اکساید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت محاسبه شد. نتایج نشان داد که این نانوذره نه تنها برای این سلول‌ها سمیت ندارد بلکه در غلظت‌های خاصی باعث افزایش تکثیر آن‌ها نیز می‌شود. نتایج حاصل از بررسی‌های آزمون فلوسایتومتری و ارزیابی اثرات نانو ذرات اکسید سریم نیز نشان داد این نانوذرات قابلیت آنتی-اکسیدانی خوبی دارند و زنده‌مانی سلول‌ها تحت تیمار با سریم‌اکساید مشابه گروه تیمار با ویتامین C بوده است. این امر نشان‌دهند اثرات موثر و مفید نانوذرات سریم‌اکساید و پتانسیل این ترکیب در جهت احیا و زنده‌مانی سلول‌ها است. بر اساس این نتایج سریم‌اکساید می‌تواند یک فاکتور بهبوددهنده در میزان تکثیر سلولی باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذره، سریم‌اکساید، رده سلولی بنیادی مزانشیمی، آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های سوماتیکی تمایز نیافته‌ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند (۱۷). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. بر اساس پژوهش‌های انجام‌شده اگر

توسط بدن می‌شوند (۵). در میان بسیاری از نانومواد شناخته شده، نانوذرات سریم‌اکساید به عنوان حامل داروها در داروسازی و همچنین به عنوان آنتی‌اکسیدان به خاطر داشتن ویژگی‌های منحصر بفرد علاوه بر ویژگی‌های معمول در میان نانومواد پررنگ‌تر است (۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات سریم - اکساید از طریق واکنش با ROSها و حذف آنها ایجاد می‌شود (۱۸). رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، هیدروکسیل (OH) و اکسیژن o singlet (O_2) به طور معمول به عنوان ROS تعریف می‌شوند که متابولیت‌های تولیدی در سیستم بیولوژیکی می‌باشند (۸). ROSها نقش‌های متنوعی هم چون سیگنالینگ سلول در مسیرهای فیزیولوژیکی را ایفا می‌کنند و معمولا با متابولیسم اکسیژن بوجود می‌آیند (۱۳). علاوه بر این استرس‌های محیطی، رادیکال‌های یونیزه، آلودگی، داروهای آنتی‌استاتیک منجر به افزایش تولید ROS می‌شوند. مسیرهایی همچون فسفوریلاسیون پروتئین، فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی، اپوپتوز و ایمنی همگی بستگی به میزان تولید و حضور ROS در داخل سلول دارد که نیاز است در میزان کم باقی بماند، زیرا زمانی که میزان ROS افزایش یابد باعث ایجاد تاثیرات منفی در ساختار سلولی می‌شود و آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان ROS scavenging یا مهار تولیدات آنها عمل می‌کنند (۱۵) استرس اکسیداتیو با عدم تعادل بین تولید و تجمع ROS در سلول‌ها و بافت‌ها و همچنین عدم توانایی سیستم زیستی در سم‌زدایی این محصولات واکنشی بوجود می‌آید. شواهد نشان می‌دهد استرس اکسیداتیو با میزان‌های متفاوتی می‌تواند در پیشروی بیماری‌های مختلفی چون سرطان، دیابت، اختلالات متابولیکی، ارترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی نقش داشته باشد (۲۲). در مطالعات گذشته، بررسی اثر نانوذرات سریم‌اکسید وارد شده در فیلم کیتوزان بر

سلولی واجد ظاهر دوکی شکل، توانایی چسبندگی به کف ظرف کشت و قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مزودرمی باشد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار می‌گیرند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خود بیمار به دست می‌آیند و مغز استخوان افراد بالغ مهمترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت کاربردهای درمانی می‌باشد اما این سلول‌ها را می‌توان از بافته‌های مختلف بدن مانند چربی، دندان، بندناف و ژله‌ی وارتون نیز بدست آورد (۱۵، ۲۱). سلول‌های بنیادی بالغین مشتق از بافت چربی از بافت چربی جدا می‌گردند و در آزمایشگاه قابل تمایز به استخوان، مفاصل، چربی، عضله و حتی عصب می‌باشند. بافت چربی به دلیل داشتن مقادیر زیاد سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان، قابلیت پیوند به میزبان خودی و غیرخودی، دسترس بودن، قدرت تکثیر بالا، ایمن بودن برای پیوندهای خودی، میزان تکثیر فراوان، قدرت تهاجم کم، منبع نامحدود و مطمئن و بدون درد بودن نمونه‌برداری از بافت چربی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۸). فناوری نانو، در سال‌های اخیر بدلیل خواص منحصر به فردی مانند افزایش فعالیت‌های زیستی، شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی که به واسطه‌ی اندازه ذرات خود دارند در علوم طبیعی، پزشکی، مهندسی و تکنولوژی پرکاربرد هستند. سیستم‌های داروسازی بر پایه فناوری نانو به سبب تغییر فارموکتیک دارو از طریق افزایش مدت زمان حضور دارو در جریان خون، کاهش سمیت و افزایش نیمه عمر موجب بهبود چشمگیر در درمان دارویی شده‌اند (۹، ۱۱). اصطلاح نانو ذره یک نام عمومی برای نانوکره و نانو پوشینه می‌باشد. نانوکره ساختاری شبکه‌ای است که ماده زیست فعال بر سطح کره جذب یا درون ذرات درون پوشانی می‌گردد (۲۵). نانوذرات می‌توانند به عنوان حامل آنتی‌اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار گیرند که موجب افزایش جذب آنتی‌اکسیدان‌ها

با CO₂ به میزان ۵ درصد نگهداری شدند. تعداد ۱۰^۴ × ۵-۴ سلول در یک میلی لیتر محیط کشت را در ظرف کشت آزمون ریخته و بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف نانوذرات سریم‌اکساید اضافه شده و در زمان‌های متفاوت تیمار شدند. به منظور تهیه استوک از نانوذرات سریم‌اکساید از بافر فسفات استفاده شد. بدین صورت که ۱۰ ماکرولیتر بافر فسفات در ۹۹۰ میلی لیتر محیط کشت حل شد و به نانوذرات سریم اکساید اضافه گردید. سلول‌ها بعد از دوبار کشت به درون فلاسک‌ها منتقل شده و آماده تیمار شدند.

بررسی سمیت یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون

MTT (Dimethyl thiazolyl-diphenyl)

tetrazolium bromide): در این روش سلول‌های

رده سلول‌های دودمان سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بدون حضور و با حضور نانوذرات سریم-اکساید تحت تنش اکسیداتیو قرار گرفته و سپس آزمون MTT بر روی آن‌ها انجام شد. در روش *in vitro* از مقدار مشخص هیدروژن پراکسید (H₂O₂) برای ایجاد استرس اکسیداتیو استفاده شد. در نمونه تیمار شده با نانوذرات سریم‌اکساید ابتدا سلول‌ها با دوزهای مناسبی از نانوذره سریم‌اکساید به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و پس از این مدت سلول‌ها توسط هیدروژن پراکسید دچار استرس اکسیداتیو شدند و پس از ۲۴ ساعت آزمایشات مربوطه انجام شد. سلول‌های که نانوذره و تنش اکسیداتیو دریافت نکرده بودند، به عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که ویتامین C با مقدار ۰/۳ گرم (غلظت ۱۰۰ میکرولیتر) دریافت کرده بودند، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

آزمون MTT بدین صورت انجام شد که ابتدا برای تهیه محلول استوک MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب نمک زرد رنگ تیل تیازولیل تترازولیوم بروماید

تکتیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی چند توان (۱۴)، اثر دوزهای مختلف سریم‌اکساید بر آسیب ذوب انجماد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی از طریق مطالعه زنده‌مانی سلولی و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز (۱۰)، اثر نانوذرات سریم‌اکساید بر مقابله با تغییرات عروقی شبکه ناشی از آسیب اکسیداتیو در شرایط *in vitro* و *in vivo* (۲۳)، نانو داروی پلیمری هوشمند با نانوذرات سریم اکساید و نانو داروی پلیمری هوشمند در ترکیب با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روند بهبود زخم‌های پوستی (۲۰) و دو نوع پوشش سیلیکات کلسیم حاوی سریم‌اکساید تهیه شده و اثرات افزودن اکساید سریم بر پاسخ سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخوان (۷) انجام شده است.

این پژوهش با هدف بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سریم اکسید در شرایط *in vitro* ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سریم‌اکساید بر روی دودمان سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و روشن نمودن اثر آنتی‌اکسیدانی و مکانیسم اثر نانوذره سریم اکساید صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی اثرات برهم کنش سلولی نانوذرات سریم اکساید: به منظور بررسی اثرات نانوذرات سریم-اکساید بر رده سلول‌های دودمان سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، غلظت‌های متفاوتی از ترکیب نانوذرات سریم‌اکساید تهیه و سلول‌ها توسط آن‌ها تیمار شدند. رده سلول دودمان سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شدند. سلول‌های تهیه شده در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به همراه ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) و ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (سیگما، کانادا) کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد

آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یداید (Flow cytometry) برای بررسی آپوپتوز: جهت سنجش آپوپتوز یکی از بیومارکرهای فرآیند آپوپتوز، نفوذ فسفاتیدیل سرین از غشای داخلی به غشای خارجی پلاسما بررسی می‌شود. زمانی که فسفاتیدیل سرین در سطح سلول قرار گیرد، می‌توان به وسیله رنگ‌آمیزی فلورسنت که به انکسین ۵ متصل می‌شود ردیابی شود. جهت انجام این آزمون از کیت انکسین ۵-پروپیدیوم یداید (Annexin V-FITC، سیگما، کانادا) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا رده سلولی در پلیت ۶ خانه کشت داده شد، بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها و چسبیدن آن‌ها به کف پلیت سلول‌ها با غلظت IC50 نانوذرات سریم‌اکساید (در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت) تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و به درون اپندروف منتقل شدند و سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. با حذف کردن محیط رویی، به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال انکسین (Annexin V binding buffer) اضافه شده و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به هر نمونه اضافه گردید. سپس، نمون‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و با دستگاه فلوسایتومتری (BD، آمریکا) بررسی شدند. سپس نتایج و داده‌های حاصل با نرم افزار FlowJo 7.6 آنالیز شدند.

اطلاعات آماری: اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS در قالب آنالیز واریانس یکطرفه تحلیل و نتایج شدند. داده‌ها به عنوان مقادیر میانگین با انحرافات استاندارد ارائه گردید. همچنین، اختلافات آماری معنی داری در سطوح $p < 0.05$ ، در نظر گرفته و گزارش شد.

(MTT) در ۱ میلی لیتر بافر نمکی فسفات حل گردید. سپس سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شدند و ۱۰ میکرولیتر از استوک MTT به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش با اضافه کردن محلول ۰/۰۴ درصد هیدروکلریک‌اسید نرمال در دی‌متیل‌سولفوکساید متوقف گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیق همزده شدند و سپس میزان جذب آن‌ها توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر (ELISA plate reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. اندازه گیری میزان رادیکال آزاد (ROS): برای مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی نانوذره از روش DCF استفاده شد. پروب رنگی DCFH2-DA (-2,7-dichlor-odihydrofluorescein diacetate) (تهیه شده از Molecular Probes، آمریکا) مورد استفاده در این روش که یک ماده هیدروفیلیک است به طور معمول برای بررسی توانایی مولکول آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از انتشار نور فلورسانس به کار گرفته می‌شود. DCFH2-DA در حضور رادیکال‌های آزاد و مخصوصاً ROS به راحتی اکسیده شده و تبدیل به DCF می‌شود که شدیداً فلورسانس می‌باشد. در این بررسی ابتدا سلول‌های کشت داده شده به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض DCFH2-DA با غلظت ۱۰ میکرومول قرار گرفتند. بعد از تیمار، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو و با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و مجدداً در معرض ۵ میکرومول از نانوذره ساخته شده قرار گرفتند. ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورسانس (Hitachi F-2700، ژاپن) در طول موج تحریک ۴۹۸ نانومتر و نشر ۵۳۰ نانومتر صورت گرفت.

نتایج

۳۰، ۲۰ و ۱۵ درصد مشاهده شد. میزان IC_{50} (بیایانگر زنده‌مانی نصف سلول‌ها) در ۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرومولار در میلی‌لیتر محاسبه شده است که در این غلظت بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی نانو ذره سریم‌اکساید مشاهده شد. در سلول‌هایی که با ویتامین C تیمار شدند در مقایسه با بقیه سلول‌ها بیشترین میزان زنده‌مانی مشاهده شده است. در بین سلول‌هایی که با سریم‌اکساید تیمار شدند، میزان زنده‌مانی در سلول‌هایی که با ۱۰۰ میکرومولار سریم‌اکساید تیمار شدند بیشتر می‌باشد و در این بین سلول‌هایی که با ۲۰ میکرومولار از سریم‌اکساید تیمار شدند کمترین درصد زنده‌مانی را دارند. به عبارت دیگر با افزایش میزان سریم‌اکساید میزان زنده‌مانی افزایش می‌یابد.

آزمون اندازه‌گیری ROS: مقایسه نتایج حاصل از آزمون ROS در چهار گروه کنترل، تیمار شده با هیدروژن پراکسید، تیمار شده با ویتامین C و تیمار شده با سریم‌اکساید انجام شد (شکل ۳). کاهش میزان پروتئین (افزایش Relative DCF Fluorescence) که بعد از گرمخانه‌گذاری با هیدروژن پراکسید روی داده، ناشی از افزایش ROS می‌باشد. ترکیبات نظیر سریم-اکساید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند، ممکن است اثرات سودمند خود را به واسطه متعادل ساختن سطوح ROS اعمال نمایند. افزایش استرس اکسیداتیو، از طریق هیدروژن پراکسید اثر سمیت سلولی بر روی رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اعمال می‌نماید و سریم‌اکساید این اثر را با مهار کردن رادیکال‌های آزاد به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود اعمال می‌کند. نتایج حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف در گروه کنترل با گروه گرمخانه‌گذاری شده با هیدروژن پراکسید است و عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های کنترل، ویتامین C و سریم-اکساید می‌باشد (شکل ۳).

نتایج آزمون MTT در حضور استرس اکسیداتیو (هیدروژن پراکسید): آزمون بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی تحت غلظت‌های گوناگون ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرومول از هیدروژن پراکسید به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان استرس با استفاده از هیدروژن پراکسید میزان مرگ سلولی افزایش می‌یابد و بیشترین مرگ سلولی و کمترین زنده‌مانی (۳۵/۶۴ درصد) در غلظت ۲۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بدست آمده است. در نتیجه در این غلظت اثر استرس اکسیداتیو ایجاد شده با هیدروژن پراکسید موثر بوده است (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی تست MTT در حضور نانو ذره سریم‌اکساید: نتایج حاصل از بررسی تست MTT در حضور نانو ذره سریم‌اکساید در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در (شکل ۲) نشان داده شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی با غلظت ۲۰۰ میکرومولار از هیدروژن پراکسید به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و بعد از گذشت این بازه زمانی تحت تیمار با غلظت‌های گوناگون ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرومولار از نانو ذره سریم‌اکساید به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سلول‌های که نانوذره و هیدروژن پراکسید دریافت نکرده بودند، به عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که مقدار ۰/۳ گرم ویتامین C دریافت کردند به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. در سلول‌های کنترل منفی که نانوذره و هیدروژن پراکسید دریافت نکرده بودند، زنده‌مانی ۱۰۰ درصد مشاهده شده است و در سلول‌های کنترل مثبت، میزان زنده‌مانی ۶۰ درصد مشاهده شده است. همچنین در غلظت ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار سریم‌اکساید به ترتیب زنده‌مانی ۵۰، ۵۵،

ناحیه Q4 برابر ۱۷/۹ درصد، سلول‌های آپوپتوز اولیه در ناحیه Q3 برابر ۲۳/۸ درصد، سلول‌های آپوپتوزی تاخیری در ناحیه Q2 برابر ۵۴/۳ درصد و نهایتاً سلول‌های نکروزی در ناحیه Q1 برابر ۳/۳۹ درصد می‌باشد. در گروه تحت تیمار با سریم‌اکساید-هیدروژن پراکسید میزان سلول‌های سالم در ناحیه Q4 برابر ۳۷ درصد، سلول‌های آپوپتوز اولیه در ناحیه Q3 برابر ۲۵/۴ درصد و سلول‌های آپوپتوزی تاخیری در ناحیه Q2 برابر ۲۹/۵ درصد می‌باشد و نهایتاً سلول‌های نکروزی که در ناحیه Q1 قرار دارند ۸/۱۳ درصد می‌باشد (جدول ۱). سلول‌های اپاپتوز ثانویه تیمار شده با ویتامین C نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است که به ۱۷/۹۹ درصد کاهش یافته است. سلول‌های آپوپتوز ثانویه در گروه تیمار شده با هیدروژن پراکسید نسبت به گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است که به ۵۴/۳ درصد افزایش یافته است. سلول‌های آپوپتوز ثانویه در گروه تیمار شده با سریم‌اکساید-هیدروژن پراکسید نسبت به گروه تیمار شده با هیدروژن پراکسید کاهش معناداری داشته که به ۲۹/۵ درصد کاهش یافته است. سلول‌های نکروز در گروه تیمار شده با سریم‌اکساید-هیدروژن پراکسید افزایش یافته و از ۳/۹۳ درصد به ۸/۱۳ درصد رسیده است (شکل ۲، جدول ۱).

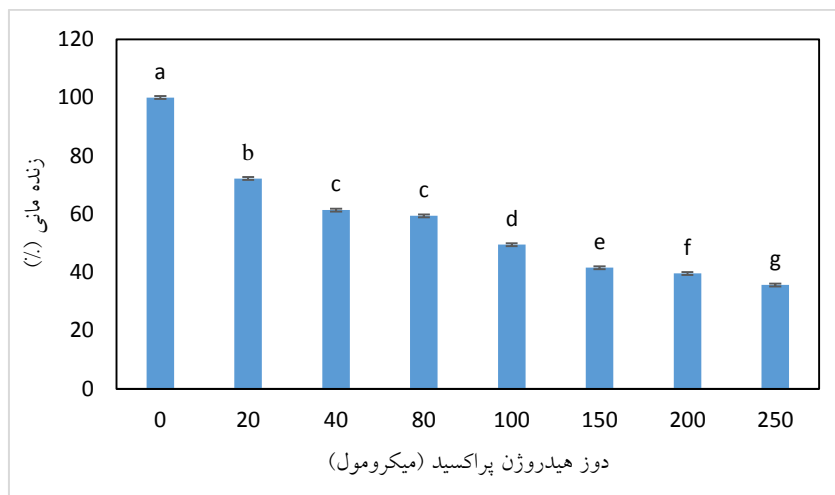
بررسی میزان سلول‌های دچار آپوپتوز و نکروز با استفاده از تست فلوسایتومتری: نتایج بدست آمده از تست فلوسایتومتری مربوط به گروه‌های کنترل، تیمار شده با ویتامین C، تیمار شده با هیدروژن پراکسید و تیمار شده با سریم‌اکساید-هیدروژن پراکسید در شکل ۴ ارائه شده است.

تست فلوسایتومتری به این صورت است که تحلیل و تجزیه داده نشان‌دهنده چهار ناحیه Q1، Q2، Q3 و Q4 می‌باشد. ناحیه Q1 بیان‌کننده سلول‌های نکروزی، ناحیه Q2 بیان‌کننده سلول‌های آپوپتوزی تاخیری، ناحیه Q3 بیان‌کننده سلول‌های آپوپتوزی اولیه و ناحیه Q4 بیان‌کننده سلول‌های سالم می‌باشند (شکل ۴). براساس نتایج بدست آمده، در گروه کنترل میزان سلول‌های سالم در ناحیه Q4 برابر ۶۰/۶ درصد، سلول‌های آپوپتوز اولیه در ناحیه Q3 برابر ۱۴/۵ درصد، سلول‌های آپوپتوزی تاخیری در ناحیه Q2 برابر ۸/۰۳ درصد و نهایتاً سلول‌های نکروزی در ناحیه Q1 برابر ۱۶/۹ درصد می‌باشد. در گروه تحت تیمار با ویتامین C میزان سلول‌های سالم در ناحیه Q4 برابر ۸۹/۹ درصد، سلول‌های آپوپتوز اولیه در ناحیه Q3 برابر ۵/۳۹ درصد، سلول‌های آپوپتوزی تاخیری در ناحیه Q2 برابر ۴/۱۷ درصد و نهایتاً سلول‌های نکروزی در ناحیه Q1 برابر ۰/۵۷۴ درصد می‌باشند. تحت تیمار با هیدروژن پراکسید میزان سلول‌های سالم در

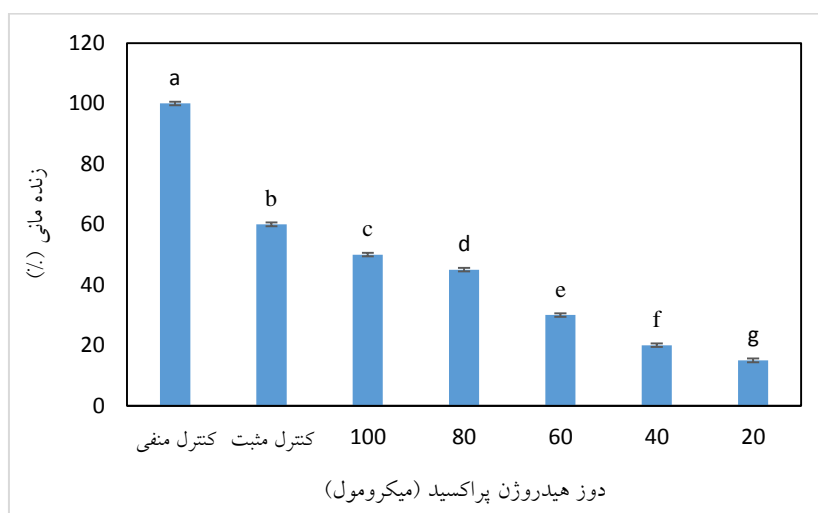
جدول ۱: نتایج آزمون فلوسایتومتری

گروه‌ها	نکروز Q1	اپاپتوز ثانویه Q2	اپاپتوز اولیه Q3	سالم Q4
کنترل	۱۶/۲±۹a	۸/۲±۰۳c	۱۴/۱±۵c	۶۰/۲±۶۰b
ویتامین C	۰/۰±۵۷/۱d	۴/۲±۱۷d	۵/۱±۳۹d	۸۹/۴±۹a
هیدروژن پراکسید	۳/۱±۹۳c	۵۴/۱±۳a	۲۳/۱±۸b	۱۷/۱±۹d
سریم‌اکساید-هیدروژن پراکسید	۸/۱±۱۳b	۲۹/۴±۵b	۲۵/۱±۴a	۱±۳۷c

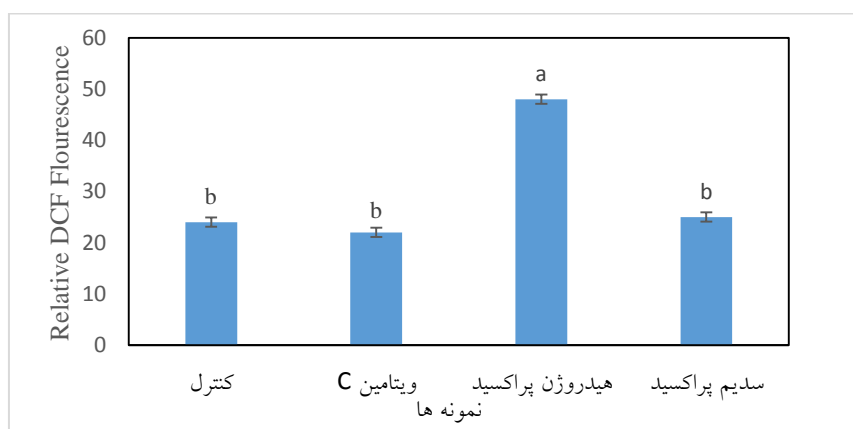
a-d نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف ($p < 0/05$).



شکل ۱. نمودار مربوط به نتایج درصد زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از چربی تحت استرس با هیدروژن پراکسید (^{a-g} نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف ($p < 0/05$)).



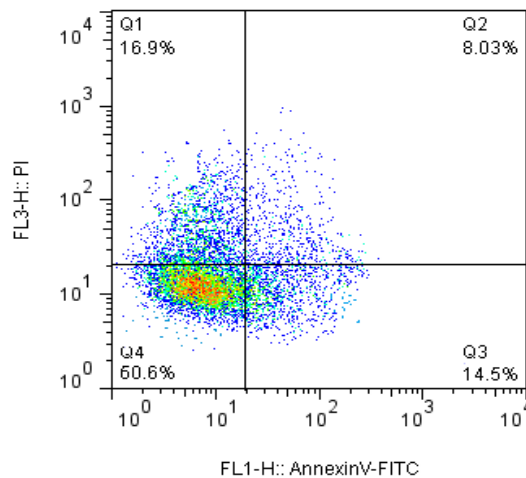
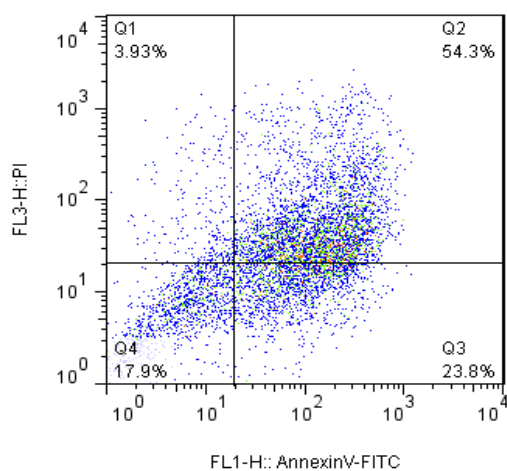
شکل ۲. نمودار نتایج آزمون MTT تحت اثر محافظتی سریم اکساید و ویتامین C بر سلول‌های رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از چربی (^{a-g} نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف ($p < 0/05$)).



شکل ۳. نمودار نتایج حاصل از آزمون ROS (^{a-b} نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف ($p < 0/05$)).

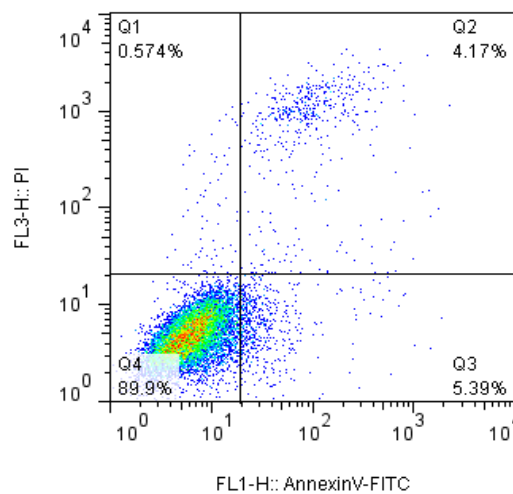
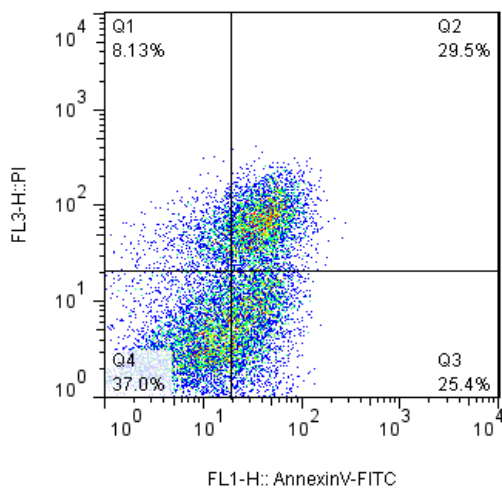
الف

ب



د

ج



شکل ۴. اثر سریم اکساید بر اپوپتوز ناشی از هیدروژن پراکسید بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی کشت داده شده، با استفاده از رنگ آمیزی توسط PI و Annexin V-FITC و آنالیز آن با استفاده از تست فلوسایتومتری (هیستوگرام گروه کنترل (الف)، سلول‌هایی که در معرض ۲۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید (ب)، سلول‌هایی که در معرض ۰/۳ گرم ویتامین C (ج)، سلول‌هایی که در معرض ۱۰۰ میکرومولار سریم‌اکساید (د) قرار گرفتند.

بحث

داد ۰/۳۷ درصد سلول‌ها در ناحیه Q4 قرار دارند که نشان دهند تاثیر سریم‌اکساید در خنثی کردن اثرات آپوپتوزی هیدروژن پراکسید است. تعدادی تحقیقات مرتبط با موضوع این مطالعه در زمینه اثرات آنتی-اکسیدانی نانوذرات سریم‌اکساید با نتایج زیر گزارش شده‌اند. در یک پژوهش به بررسی فعالیت‌های آنتی-اکسیدانی نانوذرات سریم‌اکساید در رده سلول‌های سرطان روده بزرگ انسان پرداختند. تیمار رده با نانوذرات سریم‌اکساید از طریق تولید ROS منجر به آپوپتوز سلولی از طریق مسیر سیگنالینگ میتوکندری وابسته به p53 شده‌است (۳)، همچنین گزارش شده- است که نانو ذرات سریم‌اکساید، نه تنها برای این سلول‌ها سمیت ندارد بلکه در غلظت‌های خاصی باعث افزایش تکثیر آن‌ها نیز می‌شوند. براساس این نتایج نانو ذرات سریم‌اکساید می‌توانند یک فاکتور بهبوددهنده در میزان تکثیر سلولی و سلول درمانی باشند (۲). در مطالعه دیگری گزارش شده‌است که نانو ذرات سریم‌اکساید قادر به القای اثر آنتی‌اکسیدانی و محافظتی در سلول‌های سالم پستان در برابر رادیوتراپی هستند (۱۱). گزارش شده که نانوسریا در pHهای مختلف باعث سیتوتوکسی در سلول‌های سرطانی شده و اثری روی سلول‌های اوستئوبلاست ندارد (۱). بررسی شده که در در سرطان تخمدان در ابتدا پاسخ‌های ROS به طور چشمگیری در سلول‌های تیمار شده کاهش می‌یابد و میزان تهاجم سلولی بدون اثر روی تکثیر سلولی کاهش می‌یابد. همچنین نانوسریاها باعث کاهش سایز تومور شده و تکثیر سلولی در بافت می‌شود (۶). استفاده از نانو ذرات سریم‌اکساید با افزایش pH و حساسیت سلول‌های توموری به رادیوتراپی منجر به افزایش القای آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول‌های توموری با مسیر JNK می‌شود و تاثیر مثبتی در روند مرگ سلولی سلول‌های

بررسی اثرات سریم‌اکساید نشان داد که هیدروژن پراکسید نوعی ROS می‌باشد، که تجمع آن در سلول موجب صدمه به پروتئین می‌شود. تولید ROS منجر به استرس اکسیداتیو، آسیب به DNA و مولکول‌های داخل سلولی و نهایتاً نکروز می‌شود. زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی در برابر ROS در گروه کنترل، تحت تیمار با ویتامین C، تحت تیمار با هیدروژن پراکسید و تحت تیمار با سریم-اکساید ۷۷، ۷۹/۴، ۹۷ و ۷۸/۲ درصد به ترتیب بود. لذا کاهش میزان پروتئین که بعد از تیمار با هیدروژن پراکسید روی داده، ناشی از افزایش ROS می‌باشد که باعث صدمه اکسیداتیو پروتئین و نهایتاً کاهش میزان آن شده است. ترکیبات نظیر سریم‌اکساید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند، ممکن است اثرات سودمند خود را به واسطه متعادل ساختن سطوح ROS اعمال نمایند. افزایش استرس اکسیداتیو، از طریق هیدروژن پراکسید اثر سمیت سلولی بر روی رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اعمال می‌نماید و سریم‌اکساید با مهار کردن رادیکال‌های آزاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند. در تجزیه تحلیل داده‌های تست فلوسایتومتری در گروه کنترل بیشترین سلول‌ها در ناحیه Q4 با ۶۰/۶ درصد سلول‌های زنده هستند. در مقابل در گروه تحت تیمار با ویتامین C، بیشترین سلول‌ها در ناحیه Q4 با میزان ۸۹/۹ درصد بود که میزان سلول‌های سالم نسبت به گروه کنترل افزایش یافته‌است. در گروه تحت تیمار با هیدروژن پراکسید، بیشترین سلول‌ها در در ناحیه Q2 قرار داشت که برابر ۵۴/۳ درصد بوده است. در این ناحیه سلول‌ها در وضعیت آپوپتوزی تاخیری قرار دارند که نشان می‌دهد تحت تیمار با هیدروژن پراکسید سلول‌ها به سمت آپوپتوز هدایت می‌شوند. نتایج در گروه تحت تیمار با هیدروژن پراکسید-سریم‌اکساید نشان

اعمال شده توسط هیدروژن‌پراکسید، با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود دارد. همچنین نتایج حاصل از بررسی‌ها بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، افزایش بیان آنتی‌اکسیدان نشان‌دهنده‌ی اثرات محافظتی سریم اکساید را تایید کرد. نتایج حاصل از بررسی‌های تست فلوسایتومتری و ارزیابی اثرات نانو ذرات سریم‌اکساید نیز نشان داد این نانوذرات قابلیت آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند و زدن ماندن سلول‌ها تحت تیمار با سریم‌اکساید مشابه گروه تیمار با ویتامین C بوده است. این امر نشان دهند اثرات موثر و مفید نانوذرات سریم اکساید و پتانسیل این ترکیب در جهت احیا و زنده مانی سلول‌هاست.

منابع

1. Alpaslan, E., Yazici, H., Golshan, N. H., Ziemer, K. S., and Webster, T. J. (2015). pH-dependent activity of dextran-coated cerium oxide nanoparticles on prohibiting osteosarcoma cell proliferation. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 1(11), 1096-11.
2. Atefeh Pesaraklou, M. M. M., Naser Mahdavi-Shahri, Halimeh Hassanzadeh. (2017). Studying the effects of cerium oxide nanoparticles on proliferation of adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro. 29-31.
3. Datta, A., Mishra, S., Manna, K., Saha, K. D., Mukherjee, S., and Roy, S. (2020). Pro-oxidant therapeutic activities of cerium oxide nanoparticles in colorectal carcinoma cells. *ACS omega*, 5(17), 9714-9723.
4. Deshpande, S., Patil, S., Kuchibhatla, S. V., and Seal, S. (2005). Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide. *Applied Physics Letters*, 87(13), 133113.
5. Fatemi, B., Vaezi, G., Sharafi, S., and Rahbarian, R. (2021). Antioxidant Effects of 6-gingerol on Serum Levels of Liver Enzymes and Oxidative Stress-induced Markers with Gold Nanoparticles in Rat

سرطانی پانکراس در موش‌ها داشته‌است (۲۴). بررسی نتایج پژوهش‌های پیشین و مقایسه آن با نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که هیدروژن‌پراکسید نوعی ROS می‌باشد، تجمع آن در سلول موجب صدمه به پروتئین می‌شود. تولید ROS منجر به استرس اکسیداتیو، آسیب به DNA و مولکول‌های داخل سلولی و نهایتاً نکروز در رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می‌شود. بررسی اثر سریم‌اکساید بر این رده نشان داد که سریم‌اکساید اثر استرس اکسیداتیو را با مهارکردن رادیکال‌های آزاد به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود اعمال می‌کند. همچنین، استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA ناشی از هیدروژن‌پراکسید در رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی توسط سریم کساید با مهارکردن رادیکال‌های آزاد به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی تا حدودی رفع می‌شود. این امر موید اثر آنتی‌اکسیدانی سریم‌اکساید است. از طرفی این مطالعه به ما نشان داد که اثر آنتی‌اکسیدانی سریم اکساید وابسته به دوز استفاده از آن می‌باشد و افزایش ROS باعث صدمه اکسیداتیو می‌شود. ترکیبات نظیر سریم‌اکساید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند، ممکن است اثرات سودمند خود را به واسطه متعادل ساختن سطوح ROS اعمال نمایند. افزایش استرس اکسیداتیو، از طریق هیدروژن‌پراکسید اثر سمیت سلولی بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اعمال می‌نماید و سریم‌اکساید این اثر را با مهار کردن رادیکال‌های آزاد به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی‌های ما نشان داد که سریم‌اکساید بر رده سلولی بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اثر محافظتی در برابر عوامل اکسیداتیو ROS

13. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1), 315-424.
14. Petrova, V. A., Dubashynskaya, N. V., Gofman, I. V., Golovkin, A. S., Mishanin, A. I., Aquino, A. D., . . . Baranchikov, A. E. (2023). Biocomposite films based on chitosan and cerium oxide nanoparticles with promising regenerative potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 229, 32. ۳۴۳-۹
15. Poursafavi, Z., Abroun, S., Kaviani Jebeli, S., and Hayati Roudbari, N. (2023). The Study of the Viability of Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells in Alginate Capsules. *Journal of Animal Biology*, 15(2), 195-204.
16. Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., . . . Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica chimica acta*, 436, 332-347.
17. Rostam Pur, S., Edalat Panah, Y., Enayati Parvar, F., and Haghghi, R. (2019). The Therapeutic Effect of Amniotic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Type-1 Diabetes. *Journal of Animal Biology*, 11(3), 21-31.
18. Seki, T., Yokoyama, Y., Nagasaki, H., and Kokuryo, T. (2012). Adipose tissue derived mesenchymal stem cell transplantation. *J Ser Res*, 1-8.
19. Sharpe, E., Andreescu, D., and Andreescu, S. (2011). Artificial nanoparticle antioxidants *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy* (pp. 235-253): ACS Publications.
20. Silina, E. V., Stupin, V. A., Suzdaltseva, Y. G., Aliev, S. R., Abramov, I. S., and Khokhlov, N. V. (2021). Application of polymer drugs with cerium dioxide nanomolecules and mesenchymal stem cells for the treatment of skin wounds in aged rats. *Polymers*, 13(9), 1467.
- Liver Tissue. *Journal of Animal Biology*, 14(2), 199-210.
6. Giri, S., Karakoti, A., Graham, R. P., Maguire, J. L., Reilly, C. M., Seal, S., . . . Shridhar, V. (2013). Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. *PLoS one*, 8(1), e54578.
7. Li, K., Yu, J., Xie, Y., You, M., Huang, L., and Zheng, X. (2017). The effects of cerium oxide incorporation in calcium silicate coating on bone mesenchymal stem cell and macrophage responses. *Biological trace element research*, 177, 148-158.
8. Navarro-Yepes, J., Zavala-Flores, L., Anandhan, A., Wang, F., Skotak, M., Chandra, N., . . . Del Razo, L. M. (2014). Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology and therapeutics*, 142(2), 206-230.
9. Nemmar, A., Yuvaraju, P., Beegam, S., Fahim, M. A., and Ali, B. H. (2017). Cerium oxide nanoparticles in lung acutely induce oxidative stress, inflammation, and DNA damage in various organs of mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 20-29.
10. Nesari, F., Boroujeni, M. B., Pirnia, A., Rezaian, J., and Gholami, M. (2022). Cerium protects adipose tissue derived mesenchymal stem cell from slow freezing thawing damage via affecting apoptosis genes. *Gene Reports*, 26, 101529.
11. Nouri, M. (2022). Oxidation behavior of magnetic hybrid nanoalloys. In: *Handbook of magnetic hybrid nanoalloys and their nanocomposites*. Springer, Cham. 1-43
12. Ouyang, Z., Mainali, M. K., Sinha, N., Strack, G., Altundal, Y., Hao, Y., . . . Ngwa, W. (2016). Potential of using cerium oxide nanoparticles for protecting healthy tissue during accelerated partial breast irradiation (APBI). *Physica Medica*, 32(4), 631-635.

Vitro and In Vivo. *Antioxidants*, 11(6), 1133.

24. Wason, M. S., Colon, J., Zhao, J., and Baker, C. H. (2012). Cerium oxide nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to radiation by modulating the JNK pathway. *Cancer Research*, 72(8_Supplement), 1468-1468.

25. Yadav, A., Prasad, V., Kathe, A., Raj, S., Yadav, D., Sundaramoorthy, C., and Vigneshwaran, N. (2006). Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles. *Bulletin of materials Science*, 29(6), 641-645.

21. Song, N., Scholtemeijer, M., Khalid, S. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci*. 41(9): 653-664.

22. Taniyama, Y., and Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42(6), 1075-1081.

23. Tisi, A., Pulcini, F., Carozza, G., Mattei, V., Flati, V., Passacantando, M., . . . Delle Monache, S. (2022). Antioxidant Properties of Cerium Oxide Nanoparticles Prevent Retinal Neovascular Alterations In

Evaluation of Antioxidant Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cell Line

Zahra Valipour¹, Marjan Nouri², Kazem Parivar¹, Ehsan Ehsani^{3*}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
3. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract

Today, the use of nanoparticles in various fields is increasing. Cerium oxide nanoparticles are one of the types of nanoparticles that are widely used in the nanomedicine as an antioxidant. The specific antioxidant property of cerium oxide nanoparticles made us investigate its antioxidant effect on mesenchymal stem cell line derived from adipose tissue. After preparation and passage of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, these cells were tested for oxidative stress with different concentrations of hydrogen peroxide, which was checked by MTT test, treated and the amount of free radical ROS was measured. Then, the cells were treated with different concentrations of cerium oxide which checked by MTT test and the cell survival investigated by Annexin 5-propidium iodide test by flow cytometry to check apoptosis and finally the results were statistically analyzed. became. The greatest effect of hydrogen peroxide oxidative stress was calculated in 24 h at a concentration of 200 μM and the results of MTT were calculated to determine the IC₅₀ of cerium oxide nanoparticles at a concentration of 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ in 24 h. The results showed that this nanoparticle is not only non-toxic for these cells, but also increases their proliferation in certain concentrations. The results of the flow cytometry tests and the evaluation of the effects of cerium oxide nanoparticles also showed that these nanoparticles have a good antioxidant capacity and the survival of cells treated with cerium oxide was similar to the group treated with vitamin C. This shows the effective and beneficial effects of cerium oxide nanoparticles and the potential of this compound in cell regeneration and survival. Based on these results, cerium oxide can be an improving factor in cell proliferation and cell therapy.

Keywords: Nanoparticle, Cerium oxide, Mesenchymal stem cell line, Antioxidant.

