مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۴، مهر و آبان ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۱)

اثرات نقاط کوانتومی‌گرافن بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مشتق شده از اندومتر انسانی

سیاوش صحت کاشانی[۱]، الهام حویزی[۲*]، هادی نداف[۱]

[۱]گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، [۲]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: سلول درمانی به عنوان روشی نوین برای ترمیم نقایص استخوانی با اندازه بحرانی حایز اهمیت است. از سوی دیگر گرافن و مشتقات آن از جمله ذرات کوانتومی‌گرافن(GQDs) به تازگی به عنوان فاکتورهای مؤثر در تمایز سلولی مورد توجه قرار گرفته اند و شواهد نشان می‌دهد که این ذرات می‌توانند در تمایز به سمت سلول‌های استخوانی مؤثر باشند، بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر نقاط کوانتومی گرافن بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مشتق شده از اندومتر انسانی بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده است. بعد از دست یابی به سلول‌های بنیادی اندومتر مشتق شده از نمونه بافت رحم انسانی با استفاده از آنزیم کلاژناز و خالص‌سازی آنها، سلول‌ها در دو گروه کشت داده شدند که شامل دو گروه کنترل در محیط استئوژنیک استاندارد و گروه آزمایش بود که به همین محیط GQDs با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. سپس داده‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی الزارین رد، فعالیت آنزیم الکالین فسفتاز و بیان ژنی با روش qRT-PCR بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس و یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این جا برای اولین بار نتیجه تعامل GQDs با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم در محیط آزمایشگاهی نشان داده شد و تأیید شد که حضور GQDs در محیط کشت استئوژنیک باعث افزایش معنی‌دار کارایی این محیط در القا تمایز سلول‌های اندومتری به سلول‌های استخوانی می‌شود. به علاوه تشکیل مقادیر بیشتر ندول‌های کلسیم که با شدت بالای رنگ‌آمیزی الیزارین رد مشخص شد و هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل و افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بیان ژن‌های بتاکاتین، استئوکلسین و استئوپونتین، نشان از تمایز بهتر و بیشتر سلول‌ها در گروه آزمایش داشت.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به سلول‌های استخوانی در محیط استئوژنیک استاندارد که به آن GQDs اضافه شده باشد می‌تواند به صورت بالقوه روشی کاربردی برای افزایش تمایز استئوبلاستی و سلول‌درمانی باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، اندومتر انسانی، کوانتومی‌گرافن، تمایز استخوانی

***نویسنده مسئول:** **الهام حویزی**، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست شناسی

Email: e.hoveizi@scu.ac.ir

مقدمه

استخوان ارگانی سخت و محکم است که اسکلت داخلی بدن را تشکیل داده و بزرگترین ساختار و بافت همبند حمایتی بدن را تشکیل می‌دهد. استخوان از بافت استخوانی مینراله همراه با مغز استخوان، اندوستیوم، پریوستیوم، عروق خونی، اعصاب و غضروف تشکیل شده است(۱).

نقایص استخوانی با اندازه بحرانی به وسیله عواملی چون، کیست، برداشت تومور، شکستگی‌های پاتولوژیک، و صدمات شدید وارده به استخوان ایجاد می‌شوند(۲). درمان این نقایص نیازمند دخالت در بازسازی به منظور کمک در پروسه ترمیم و پر شدن نقیصه با بافت جایگزین می‌باشد؛ زیرا که بدن قادر به ساخت بافت از دست رفته به صورت خود به خودی نیست(۴ و ۳). تاکنون از روش‌های پیوند بافت از جمله؛ پیوندهای اتوگرافت، آلوگرافت و زنوگرافت به منظور درمان نقایص استخوانی استفاده‌شده است(۵). از میان این پیوندها روش اتوگرافت در مرتبه طلایی استاندارد قرار دارد، هر چند که این روش غالباً با ایجاد عارضه در ناحیه دهنده همراه خواهد بود. به علاوه این که در مواردی که موضع نقیصه استخوانی، سطح و حجم قابل توجهی را در برگرفته باشد، دچار محدودیت جدی خواهد شد. امروزه روش‌های نوین از جمله سلول‌درمانی با هدف توسعه جایگزین‌هایی در ترمیم این نواقص عملیاتی شده است(۶). از آن جایی که در این روش‌ها از منابع متنوع سلولی استفاده می‌شود، اولین قدم در استفاده از سلول‌های مزانشیمی به منظور بازسازی ضایعات استخوانی، تمایز آنها به استئوبلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. سلول‌های بنیادی، که در این مسیر یکی از ارکان اصلی محسوب می‌شود، به سلول‌های اولیه‌ای اطلاق می‌شود که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند و از آن‌ها می‌توان در تولید سلول‌ها و نهایتاً بافت‌های مختلف در بدن استفاده کرد. امروزه استفاده از این سلول‌ها جهت ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده حیوانی و انسانی در حال گسترش است(۸ و ۷).

منابع مختلفی از سلول‌های بنیادی وجود دارند، اما هر کدام محدودیت‌هایی را به همراه دارند، به عنوان مثال سلول‌های بنیادی جنینی هرچند که پتانسیل بازسازی بالایی دارند، اما دارای مشکلاتی نیز هستند که می‌توان به عدم دسترسی آسان در کلینیک و نیز محدودیت‌های اخلاقی اشاره کرد. آنچه که در حال حاضر ضروری به نظر می‌رسد، لزوم دستیابی به منبعی از سلول‌های بنیادی است که بر این نقایص فائق گردیده و نیز احتمال ناهنجاری‌های کاریوتیپیک در طول پروسه کشت را نداشته باشد. به نظر می‌رسد سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم منبع خوبی برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی باشد(۹). سهولت در جداسازی، دسترسی آسان در حجم بالا و عدم وجود مشکلات اخلاقی از مزایای انتخاب اندومتر به عنوان منبعی برای استخراج سلول‌های بنیادی می‌باشد. این سلول‌ها به دلیل قابلیت تکثیر بالا بدون تغییر در کاریوتیپ سلولی بسیار

مورد توجه قرارگرفته‌اند. پژوهش‌های برون‌تنی نشان داده که این سلول‌ها در صورتی که در محیط‌های کشت حاوی فاکتورهای رشد تمایز دهنده قرار گیرند، می‌توانند به سلول‌های مختلفی تمایز یابند. در سال های اخیر پژوهش‌های چشم‌گیری در زمینه جداسازی، شناسایی، تعیین هویت و تمایز این سلول‌ها شروع و نتایج آنها بیان شده است که در بعضی از این پژوهش‌ها قدرت تمایزی این سلول‌ها به رده‌های با منشا مزودرمی و سلول‌های استخوانی تأیید شده است(۱۱ و ۱۰).

پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد گرافن به‌عنوان ماده‌ای مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استئوبلاست نقش دارد. گرافن، یک‌لایه از اتم‌های کربن، با هیبریداسیون sp2 مرتب شده در یک بافت لانه‌زنبوری دو بعدی و شبکه کریستالی است که مورد توجه بسیاری از پژوهشگران می‌باشد. ذرات کوانتومی‌گرافن، به عنوان جدیدترین عضو این خانواده درزمینه استئوژنز مورد توجه محقیقین می‌باشد(۱۲). ذرات کوانتومی گرافن از چند لایه از گرافن تشکیل شده‌اند که در تمامی جهات ابعادی کوچک تر از ۱۰۰ نانومتر دارند. این ذرات از لحاظ فیزیکی و شیمیایی پایدار بوده که نسبت سطح به حجم بسیار بالایی دارند و به علت وجود گروه‌های عاملی آب دوست در زوایای خود به راحتی در آب پخش می‌شوند. نقاط کوانتومی گرافن می‌تواند به‌عنوان یک گزینه بسیار عالی برای زمینه‌های نانوپزشکی و بیوپزشکی از جمله رهایش داروهای ضد سرطان، حسگر زیستی، تصویربرداری زیستی، کاربردهای ضدباکتریایی، کشت سلول و مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد(۱۳). پیش‌تر تأثیر ترکیبات گرافن بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد توجه قرار گرفته است، به عنوان مثال می‌توان به مطالعه جیکوان و همکاران اشاره کرد که نشان دادند این ذرات می‌توانند موجب ایجاد تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان شوند(۱۲).

با توجه به قابلیت‌های منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر و خلأ تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست با استفاده از نقاط کوانتومیگرافن، در این تحقیق سعی بر این شد، تأثیر ذرات نام برده بر روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر به استئوبلاست مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده است.

کل فرآیند پژوهش پس از اخذ مجوز کمیته اخلاق به شماره EE/99.3.02.5284/scu.ac.ir از دانشگاه شهید چمران اهواز تأیید شد.

جداسازی سلول‌های اندومتر رحم، بعد از گرفتن بیوپسی، نمونه در فالکون حاوی محیط هنکس (گیبکو، آمریکا) و پنی‌سیلین بر استرپتومایسین (گیبکو،آمریکا) ۵ درصد قرار داده شد و سریعاً به

آزمایشگاه برای استخراج سلول منتقل شد. سپس نمونه بافت رحمی چندین بار با بافر سالین شسته و قطعه قطعه شد. قطعات ریز شده به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی آنزیم کلاژناز نوع یک(سیگما، آمریکا) با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منتقل و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور(سینا، ایران) با دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد به هر نمونه مقداری محیط DMEM/F12 (گیبکو، آمریکا) با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی(گیبکو، آمریکا) اضافه و پیپتاژ انجام شد. سپس محلول به دست آمده، یکبار از مش ۷۰ میکرومتری و بار دوم از مش ۴۰ میکرومتری عبور داده شد. به این صورت بافت‌های هضم نشده حذف و محلولی حاوی سلول‌های استرومایی از بافت رحم به دست آمد. هم‌چنین برای حذف سلول‌های خونی و اریتروسیت‌ها از فایکول(سیگما، آمریکا) استفاده شد. ۲ میلی‌لیتر محلول فایکول داخل لوله فلکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته سپس محیط کشت DMEM/F12 همراه با ده درصد سرم محتوی سلول روی فایکول ریخته شد. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ(ارمغان طب ایرانیان ، ایران) شد(۱۴).

ذرات کوانتومی‌گرافن به شکل پودری از شرکت سیگما خریداری شد و در هنگام استفاده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت تهیه شد و قبل از استفاده به مدت ده دقیقه سونیکه گردید.

برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به سلول‌های استئوبلاستی، برای گروه کنترل سلول‌ها در محیط استئوژنیک شامل محیط DMEM/F12 ترکیب با سرم با غلظت ۱۰ درصد، بتا گلیسرول فسفات(سیگما، آمریکا) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، دگزامتازون(سیگما، آمریکا) با غلظت 10^{-8} مولار، اسکوربیک و فسفات(سیگما، آمریکا) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داده شده و به مدت ۲۱ روز نگهداری شد و در مورد گروه آزمایش ذرات کوانتومیگرافن(سیگما، آمریکا) با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط استئوژنیک ذکر شده در بالا اضافه و به مدت ۲۱ روز کشت داده و هر سه روز تعویض محیط انجام شد.

جهت بررسی میزان رسوب کلسیم و تمایز استئوژنیک از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد استفاده شد. به این صورت که بعد از گذشت ۱۴ و ۲۱ روز از زمان تیمار سلول‌ها در دو گروه کنترل و آزمایش با استفاده از پارافرمالدهید(سیگما، آمریکا) ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۲ درصد آلزارین رد(سیگما، آمریکا) رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ معکوس(بیورد، آمریکا) عکس‌برداری انجام گرفت.

هم‌چنین اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت تجاری ساخت شرکت پارس آزمون که حاوی سوبسترای این آنزیم با نام پارا نیتروفنل بود انجام گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵

نانومتر به وسیله الایزا ریدر(Fax 2000, USA) اندازه‌گیری شد.

به علاوه بررسی کمی بیان ژن‌های بتاکتین، استئوکلسین و استئوپونتین با تکنیک RT-PCR انجام گرفت. برای استخراج RNA از کیت(Plus)RNX™ ساخت شرکت سیناژن طبق پروتکل این شرکت استفاده شد؛ سپس سنجش کمی RNA با دستگاه نانودراپ (Ependorf، آلمان) انجام شد. تعیین توالی ژن‌ها لازم برای طراحی پرایمر از سایت www . ncbi. nlm. nih. gov استخراج شد(جدول ۱). برای ساخت CDNA در این تحقیق از کیت تاکارا (ژاپن) استفاده شد که شامل آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس، بافر، نوکلئوتید، پرایمر و ثابت کننده دما برای رونویسی معکوس بود. از مزایای این کیت سرعت، پایداری، قابلیت تکثیر و سادگی می‌باشد. سیکل هر نمونه با استفاده از نرم‌افزارStepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن GAPDH انجام گرفت، همهٔ آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار و به طور مجزا انجام شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی به کف فلاسک چسبیده و قابل استحصال بودند، این سلول‌ها بعد از حدود ۲٤ ساعت کف فلاسک‌های کشت متصل و بعد از چند روز که حدود ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند به واسطه ترپسین پاساژ شده و تا پاساژ سوم پیش برده و بعد از آن برای تیمار استفاده شدند. همان‌گونه که در تصویر ۱ نشان داده شده در مشاهدات میکرسکوپ معکوس، سلول‌ها به‌صورت کشیده، دوکی شکل و با ظاهر نرمال به خوبی سطح فلاسک را پوشانده بودند(شکل۱).

میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در طول دوره ۲۱ روزه و با گذشت زمان، اختلاف معنی‌داری بین گروه آزمایش که تحت تأثیر نقاط کوانتومیگرافن بوده و گروه کنترل(محیط استئوژنیک به تنهایی) نشان داد($p<۰/۰۰۱$) به طوری که در روز هفتم بعد از تیمار اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبوده، اما با گذشت زمان و در روزهای ١٤ و ٢١ بعد از تیمار، میزان فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز به طور معنی‌داری در گروه نقاط کوانتومیگرافن افزایش یافت، که نشان دهنده تمایل بیشتر سلول‌های گروه آزمایش نسبت به سلول‌های گروه کنترل برای تمایز به استئوبلاست‌ها بود(شکل ۲).

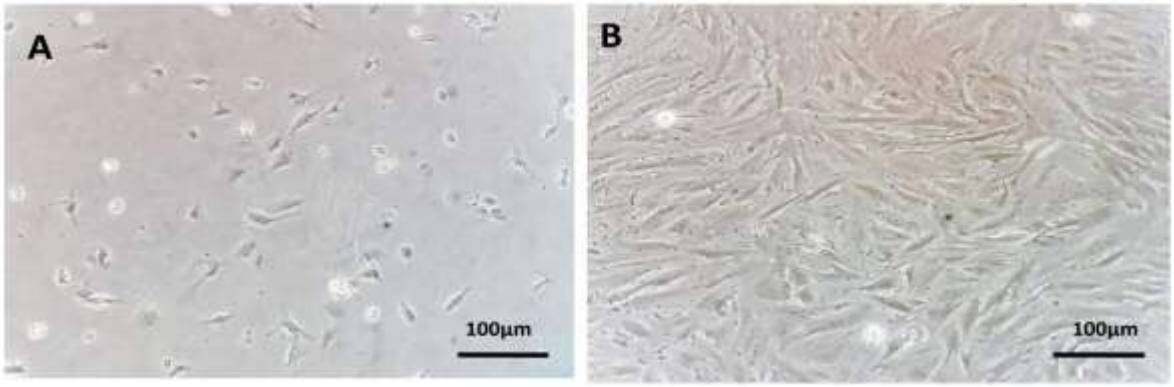
رنگ آمیزی آلزارین رد برای شناسایی و مقایسه رسوبات کلسیمی‌تولید شده در سلول‌های گروه کنترل و تیمار در روزهای ١٤ و ٢١ انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، رسوبات معدنی در هر دو گروه در روزهای ١٤ و ٢١تشکیل و تحت تأثیر الزارین رد به رنگ قرمز آجری دیده شد. شدت این رنگ در هر دو گروه در روز ۲۱ بیشتر از روز ١٤ بود و همچنین رسوبات کلسیمی بیشتر و با شدت رنگ بیشتر در گروه تحت تأثیر نقاط

کوانتـومیگرافن نسـبت بـه گـروه کنتـرل مشـاهده شد(تصویر ۳).

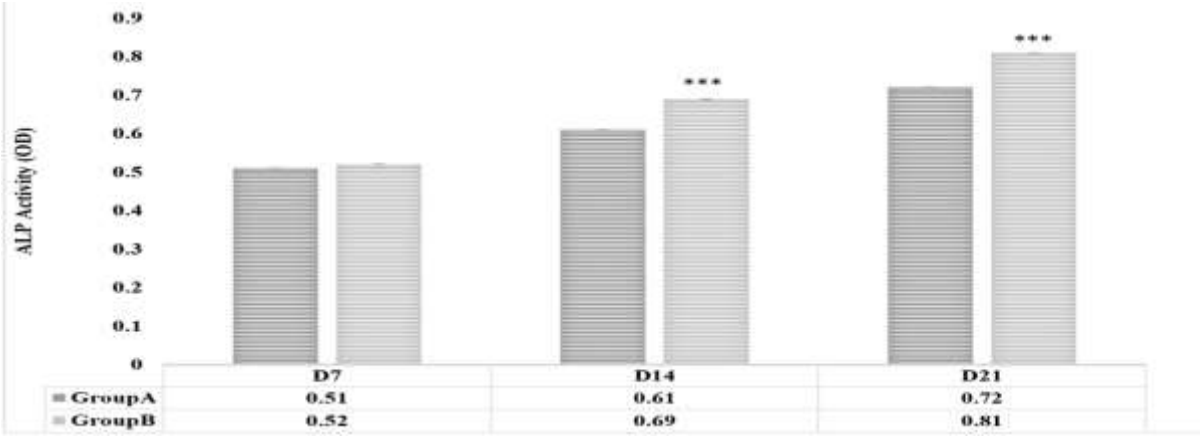
هم‌چنین بررسـی بیـان ژن‌هـای استئوکلسـین، استئوپونتین و بتا اکتـین در دو گـروه تیمـار بـا نقـاط گرافن و کنتـرل ۲۱ روز بعـد از تیمـار انـدازه‌گیـری و مقایسه شـد. نتـایج کمـی نشـان دهنـده افـزایش بیـان معنی‌دار این ژن‌ها در گروه تیمار در مقایسه با گـروه کنترل بود به طـوری کـه بیـان ژن‌هـای استئوکلسـین، استئوپونتین و بتا اکتین در گروه تیمار بـه‌ترتیـب ٤/٥، ٥/٣ و ٥/٢ بوده در حـالی کـه در گـروه کنتـرل بـدون حضور نقاط کوانتـومیگرافن ٣/٨، ٤/٧ و ٤/٥ ارزیـابی شدند (شکل ۴).

جدول۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای qRT-PCR

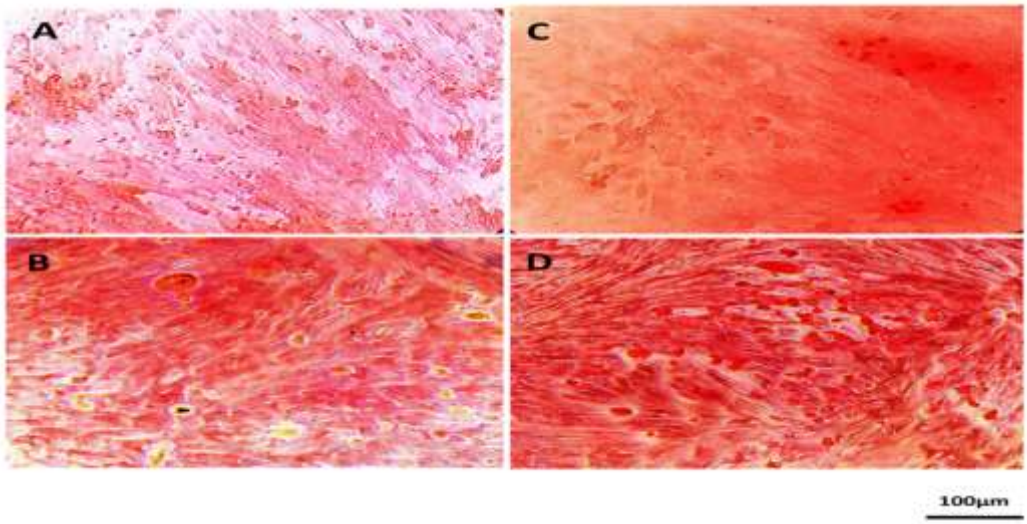
Gene	Sequence
Osteopontin	F 5´-GACCAAGGAACAATCACCAC-3´ R 5´-TCATCGTCCTCATCCTCATC-3´
Osteocalcin	F 5´-ACAAGAGATTCAGCGACT-3´ R 5´-GGTTCTTGGCTTCCTGTTTC-3´
RUNX2	F5´-ACTCTTCTGGAGCCGTTTATG-3´ R5´-GTGAATCTGGCCATGTTTGTG-3´
GAPDH	F 5' -GCAAGAGCACAAGAGGAAGA- 3' R 5' -ACTGTGAGGAGGGGAGATTC - 3'



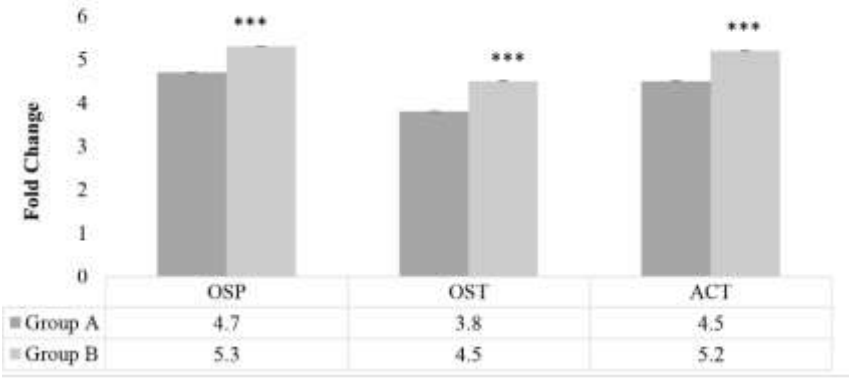
تصویر ۱: مشاهده مورفولوژی سلول های اندومتر با استفاده از می‌کرسوپ معکوس A: نمای مورفولوژی سلول‌های بنیادی اندومتر در پاساژ اول B : سلول‌های بنیادی اندومتر در در پاساژ سوم



شکل ۲: میزان فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز در دو گروه آزمایش(گروه A) و کنترل(گروه B) در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ که افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم را در گروه آزمایش در روزهای ۱۴ و ۲۱ نشان می‌دهد.D7: روز هفتم، D14: روز چهاردهم،D21: روز بیست ویکم، ALP: الکالین فسفتاز و ××× نشان دهنده سطح معنی‌داری با p≤۰/۰۰۱



تصویر۳: بررسی رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در روز ۱۴ و ۲۱ در دو گروه آزمایش و تیمار . A: رنگ پذیری سلول‌های کنترل در روز ۱٤ B: رنگ پذیری سلول های کنترل در روز ۲۱ C: رنگ پذیری گروه آزمایش در روز ۱٤ D: رنگ پذیری گروه آزمایش در روز ۲۱



شکل ۴: بررسی بیان ژن‌های استئوژنیک در سلول های تمایز یافته و کنترل ۲۱ روز بعد از تیمار با استفاده از روش RT-PCR. بیان ژن‌های بتاکتین(ACT)، استئوپونین(OSP) و استئوکلسین(OST) در گروه B (تحت تأثیر ذرات کوانتومیگرافن) به نسبت گروه A(گروه کنترل) افزایش قابل توجه‌ای نشان می‌دهد.

بحث

در مطالعه حاضر با استناد به نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی الیزارین رد، بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز و آزمون qRT-PCR ،می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نقاط کوانتومی گرافن در محیط کشت استئوژنیک استاندارد باعث افزایش بازده این محیط در القا تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به سمت سلول‌های استخوانی می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر نقاط کوانتومی گرافن بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مشتق شده از اندومتر انسانی بود.

امروزه با به کارگیری روش‌های نوین می‌توان اقدام به ترمیم نقایص استخوانی با اندازه بحرانی کرد. آنچه که در این روش‌ها حایز اهمیت است، انتخاب منبع سلول بنیادی مناسب با کیفیت بالا می‌باشد که به راحتی و با حداقل عوارض در دسترس باشد. وجود سلول‌های بنیادی در اندومتر از گذشته دور مورد توجه بوده است. اولین سند علمی مربوط به این موضوع در سال ۲۰۰٤ به چاپ رسیده است که از آن زمان(تشخیص سلول‌های اپیتلیال و استرومال که قابلیت تشکیل کلنی دارند)، باب جدیدی از پژوهش‌ها در علم سلول‌های بنیادی باز کرده است(۱۵). سلول‌های بنیادی با منشاء اندومتریوم و یا به دست آمده از خون قاعدگی به علت سهولت در استخراج و عوارض حداقل، می‌توانند منبع مناسبی از سلول‌های مزانشیمی بنیادی باشند که در روش‌های نوین درمانی کاربرد زیادی دارند. سلول‌های بنیادی در بافت اندومتریوم انسانی وجود دارند که پس از تکثیر سریع به لایه فانکشنال اندومتریوم مهاجرت کرده و در ترمیم و نوسازی اندومتریوم سهیم می‌شوند(۱۶). تحقیقات نشان داده است که این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع مختلفی از بافت‌های مزانشیمی مانند؛ سلول‌های چربی، غضروفی و حتی عصبی تمایز یابند. توانایی تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به سلول‌های استئوبلاست در پژوهش‌هایی نظیر مطالعات اسمنی و همکاران اثبات شده است. همچنین این سلول‌ها غیر سرطان‌زا هستند و خاصیت رگزایی دارند(۱۸ و ۱۷، ۱۵).

یکی دیگر از جنبه‌های مهم سلول درمانی در عوارض استخوانی هدایت تکثیر سلول‌های بنیادی و هدایت کنترل شده تمایز آنها به سمت سلول استئوبلاست به وسیله فاکتورهای رشد و القا کننده‌های تمایز است. برودر و همکاران برای اولین بار نشان دادند که در درجه نخست، تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان‌های استخوان، غضروف و چربی تحت تأثیر محرک‌های شیمیایی است. آنان گزارش دادند وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید- ۱ فسفات، بتاگلیسروفسفات و دگزامتازون کشت می‌شوند، فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از خود ترشح می‌کنند که نتایج این پژوهش‌ها در مطالعه حاضر نیز تأیید شد(۱۹).

محرک دیگری که در سلول‌های گروه آزمایش در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، ذرات

کوانتومیگرافن بود. به تازگی کشف شده است که ذرات نانو می‌توانند بر روی رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی(خودبازسازی، تمایز و عملکرد) تأثیرگذار باشند. در واقع ایجاد کوچکترین تأثیر در همئوستازی سلول به وسیله مواد نانو بر عملکرد و رفتار آن سلول مؤثر است. به عنوان مثال لوله‌های نانوکربن می‌توانند بر تکثیر سلول‌های بنیادی اثر منفی داشته باشند، در حالی که صفحات سیلیکات اثر مثبت بر تکثیر و تزاید آنها دارند. نقاط کوانتومیگرافن به خاطر ثبات شیمیایی، خواص الکتریکی و فتولومینانس خود به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. در واقع بیشتر پژوهش‌ها در رابطه با این ذرات در زمینه زیست پزشکی و عمدتاً در مورد تصویربرداری زیستی و انتقال ژن بوده است(۲۰). با این حال تعداد بسیار اندکی از پژوهش‌ها تأثیر این ذرات بر سلول‌های بنیادی را بررسی کرده‌اند. مطالعه بر روی این ذره نه تنها به شناخت بیشتر در نحوه تعامل آن با سلول‌های بنیادی می‌انجامد، بلکه به شناخت محاسن و مضرات احتمالی آن در مواردی که این ذرات به صورت تصادفی در مجاورت سلول‌های بنیادی قرار می‌گیرند(تصویربرداری یا انتقال دارو) کمک می‌کند. توانایی گرافن و مشتقات آن به خصوص اکسیدگرافن در بهبود خصوصیات داربست‌های زیست سازگار، بهبود چسبندگی، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست در محیط کشت سه بعدی و همچنین به صورت محلول در محیط کشت دو بعدی در چندین مطالعه بررسی شده است، به عنوان نمونه سانچز و همکاران با بررسی اثر گرافن اکسید و ترکیب سیلک فیبروین- گرافن اکسید بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت پریودنتال نشان دادند که تمایز خود به خودی به سلول‌های استئوبلاست بر سمنتوبلاست، در سلول‌هایی روی این داربست‌ها، اتفاق می‌افتد(۲۰).

میاجی و همکاران سطح داربست‌های اسفنجی کلاژن را با استفاده از اکسید گرافن پوشش دادند و نشان دادند که اکسید گرافن در بهبود آسیب‌های دندانی نقش مثبت داشت(۲۱). هم‌چنین ولف و همکاران اعلام کردند که استفاده از گرافن به همراه نانوتیوپ‌های کربن می‌توانند سبب بهبود و ترمیم استخوانی شوند(۲۲). به علاوه حسین و همکاران اعلام کردند که اکسید گرافن در شرایط درون تنی می‌تواند سبب بهبود آسیب‌های پوستی و استخوانی شود(۲۲). در همین راستا ریو و همکاران نشان دادند که استفاده از داربست ساخته شده از پلی‌آکریلونیتریل به همراه نانو لوله‌های کربنی و سلول‌های مزانشیمی متمایز شده به استئوبلاست‌ها در شرایط درون‌تنی می‌تواند سبب بهبود چشمگیری در ضایعات استخوانی شود(۲۳). ذرات کوانتومی‌گرافن می‌توانند در محلولی مانند فسفات بافرسالین یک کلوئید پایدار تشکیل دهند. پژوهش‌ها مشخص کرده است که غلظت بالای ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نقاط کوانتومیگرافن در محیط کشت سلول‌های بنیادی سمی هستند، اما غلظت‌های پایین‌تر اثر مخربی بر روی این سلول‌ها نشان نمی‌دهد(۲۴).

در این مطالعه تأثیر نقاط کوانتومیگرافن بر القای تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر رحم انسان به سلول‌های استئوبلاست مورد بررسی قرار گرفت و در همین راستا بیان ژن‌های بتاکاتین، استئوپونتین و استئوکلسین در سلول‌های تمایز یافته بعد از ۲۱ روز بررسی شده است. استئوپونین و استئوکلسین پروتین‌های ماتریکس خارج سلولی مهمی هستند که در زمان استخوان‌سازی جنین و همچنین در زمان ترمیم استخوان نقش به سزایی دارند. این پروتئین‌ها به طور معمول به عنوان نشانگرهای قابل اطمینان برای بررسی ساخت بافت استخوان در محیط آزمایشگاهی کاربرد دارند. استئوپونتین به وسیله استئوبلاست در مراحل اولیه تشکیل استخوان ساخته می‌شود و موجب بهبود چسبندگی بهتر سلول‌های استئوبلاست به ماتریکس خارج سلولی می‌شود(۲۵). سودوک و همکاران گزارش کردند که استئوپونین در استئوبلاست‌های تمایز یافته موش صحرایی بیان بالایی دارد(۲۶).

استئوپونین همچنین در تنظیم اندازه و رشد بلورهای آپاتیت نقش دارد. در واقع استئوپونین و الکالین فسفتاز نشانگرهای زود هنگام تمایز استئوژنیک هستند و بیان آنها در فاز بلوغ ماتریکس افزایش پیدا می‌کند، اما نشان اختصاصی تمایز استخوانی نیستند. استئوکلسین، اما تنها از سلول‌های استئوبلاست ترشح می‌شود و نشانگر اختصاصی تمایز استخوانی است. وین و همکاران نشان دادند که موشی که ژن استئوکلسین آن سرکوب گردیده، از ٦ ماهگی به بعد ناهنجاری استخوانی را نشان می‌دهد(۲۵). همچنین کیو جیچان و همکاران اثر غلظت‌های متفاوت نقاط کوانتومیگرافن بر روی تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از مغز استخوان را بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها در رابطه با بیان ژن استئوپونتین و استئوکلسین نشان داد که بیان این دو ژن در گروهی که تحت تأثیر غلظت نقاط کوانتومیگرافن بودند، به نسبت گروه کنترل در روز دهم افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در مطالعه حاضر نیز بررسی این مقادیر در روز ۲۱ افزایش معنی‌داری را در گروه آزمایش به نسبت گروه کنترل نشان داد(۲۷).

به علاوه زین یانگ و همکاران نیز اثر اکسید گرافن و نقاط کوانتومی اکسید گرافن را بر تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از دندان‌های شیری بررسی کردند. آنها اعلام کردند که حضور اکسیدگرافن با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا روز هفتم باعث تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی دندانی شده، اما گروهی که تحت تأثیر اکسید گرافن قرار گرفتند، نسبت به گروه تحت تأثیر اکسید گرافن در تمایز استئوژنیک بهتر عمل کردند(۲۲). در واقع رسوب مواد معدنی و الکالین فسفاتاز در گروه تحت تأثیر اکسید گرافن و محیط استئوژنیک افزایش قابل ملاحضه‌ای نشان داد در حالی که این مقادیر در سلول‌های تحت تأثیر اکسید گرافن به نسبت گروه کنترل کاهش داشته‌اند. همچنین یانگ و همکاران عنوان کردند بیان پروتیین و RNAهای OCN ، Runx2،

بتاکاتنین و کلاژن نوع ۱، در گروه گرافن افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است(۱۲). در مطالعه حاضر نتایج مشابهی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نقاط کوانتومی گرافن در محیط کشت استئوژنیک به دست آمده است؛ اگرچه نانو ذرات گرافن و مشتقات آن می‌توانند اثر سیتوتوکسیک داشته باشند. کیو جیچان و همکاران با استفاده از روش MTT نشان دادند غلظت‌های کمتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیری بر بقای سلول‌ها نداشته و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۹۳ درصد سلول‌ها(مقایسه با سلول‌هایی که در معرض نقاط کوانتومی‌اکسید گرافن نیستند) زنده می‌مانند، اما درغلظت بالای ۱۰۰ باعث مرگ حدود ۴۰ درصد سلول‌ها شده و بنابراین غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حد سمیت اکسید گرافن در نظر گرفته شد. نتایج مشابهی در رابطه با غلظت سمی اکسید گرافن موجود است(۲۷). در این پژوهش از غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نقاط کوانتومی گرافن برای افزایش تمایز استفاده کردیم که مبنی این انتخاب بر اساس پژوهش‌های پیشین(۲۷ و ۲۴) بود.

آلکالاین فسفاتاز یکی دیگر از نشانگر فنوتیپیک زود هنگام برای تشخیص تمایز سلول‌های بنیادی به استخوان است و در واقع میزان آن ارتباط مستقیم با تمایز استخوانی این سلول‌ها دارد. کیو جیچان و همکاران همچنین تالوکدار و همکاران افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم را در روزهای ۱۰ و ۱۴ در سلول‌های گروه تحت تأثیر نقاط کوانتومی‌گرافن نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر همسو می‌باشد. همچنین به طور مشابه در مطالعه حاضر رسوب بیشتر املاح غنی از کلسیم به وسیله رنگ‌آمیزی الیزارین رد در گروه آزمایش(گروه نقاط کوانتومی گرافن) تأیید شد که نتایج بررسی آنزیم الکالین فسفاتاز را نیز تأیید کرد(۲۷ و ۱۴). در این پژوهش به علت محدودیت‌های موجود امکان بررسی ژن‌های بیشتر و مکانیسم‌های مولکولی درگیر در القاء سلول‌های استئوبلاستی به واسطه اثرات نقاط کوانتومی گرافن میسر نشد، لذا پیشنهاد می‌شود مسیرهای سیگنالینگ درگیر در افزایش تمایز با بررسی‌های مولکولی بیشتر و استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی انجام گیرد. همچنین می‌توان تأثیر نقاط کوانتومی گرافن در بهبود عوارض استخوانی را در شرایط درون تنی در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار داد. به علاوه در جهت بهبود مهندسی بافت استخوان می‌توان گرافن را در داربستی مناسب ادغام و در مدل حیوانی پیوند داد. به علت وجود محدودیت‌ها در این پژوهش فقط تأثیر گرافن در القاء استخوانی در یک رده سلولی بررسی شد، لذا استفاده از سایر رده‌های سلولی و مقایسه آنها پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

اگر چه بیشتر پژوهش‌ها مربوط به استفاده از گرافن و ذرات نانو گرافن و مشتقات آن برای ایجاد تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تلفیق این ذرات با داربست زیست سازگار و در محیط سه بعدی

انجام گرفته است، ولی نتایج این تحقیق برای اولین بار نتیجه تعامل این ذرات را با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم در محیط دو بعدی نشان داد. در مطالعه حاضر با استناد به نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی الیزارین رد، بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز و آزمون qRT-PCR ، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نقاط کوانتومی گرافن در محیط کشت استئوژنیک استاندارد باعث افزایش بازده این محیط در القا تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به سمت سلول‌های استخوانی می‌شود. بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند با توجه به مزایای ذاتی استفاده از سلول بنیادی مشتق از بافت اندومتریوم که پیشتر ذکر شدند و استفاده از نقاط کوانتومی گرافن به عنوان روشی مناسب برای استفاده در علم مهندسی بافت استخوان و روش‌های نوین درمانی مطرح شوند، اگرچه مطالعات تکمیلی بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه دانشجوی دکتری تخصصی بوده و هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تأمین شده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1.Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER, Leavitt T, Flacco JS, Hu MS, et al. Stem cells in bone regeneration. Stem Cell Rev Rep 2016; 12(5): 524-9.
2.Hao L, Hao J, Fang W, Han C, Zhang K, Wang X. Dual isotope simultaneous imaging to evaluate the effects of intracoronary bone marrow-derived mesenchymal stem cells on perfusion and metabolism in canines with acute myocardial infarction. Biomed Rep 2015; 3(4): 447-52.
3.Kavya KC, Jayakumar R, Nair S, Chennazhi KP. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO2 composite scaffold for bone tissue engineering. Int J Biol Macromol 2013; 59: 255-63.
4.Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. Expert Opin Biol Ther 2016; 16(2): 213-32.
5.Oryan A, Meimandi Parizi A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham AS. Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, hidtopathological and biomechanical evaluation. Cell Tissue Bank 2012; 13(4): 639-51.
6.Oryan A, Moshiri A, Meimandi-Parizi A. In vitro characterization of a novel tissue engineered based hybridized nano and micro structured collagen implant and its in vivo role on tenoinduction, tenoconduction, tenogenesis and tenointegration. J Mater Sci Mater Med 2014; 25(3): 873-97.
7.Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O,Nasiri-Khalili MA. Small molecules differentiate definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells on PCL scaffold. Appl Biochem Biotechnol 2014; 173(7): 1727-36.
8.Quail DF, Siegers GM, Jewer M, Postovit LM. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. Int J Biochem Cell Biol 2013; 45(4): 885-898.
9.Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, Aghdami N, Baharvand H. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. Stem Cell Rev Rep 2010; 6(4): 601-10.
10.Revel A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells. Obstet Gynecol Surv 2009; 64(4): 249-257.
11.Tavakol S, Aligholi H, Gorji A, Eshaghabadi A, Hoveizi E, Tavakol B, et al. Thermogel nanofiber induces human endometrial-derived stromal cells to neural differentiation: In vitro and in vivo studies in rat. J Biomed Mater Res A 2014; 102(12):4590-7.
12.Yang X, Zhao Q, Chen Y, Fu Y, Lu S, Yu X, et al. Effects of graphene oxide and graphene oxide quantum dots on the osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2019; 47(1): 822-32.
13.Zhang Q, Deng H, Li H, Song K, Zeng C, Rong L. Preparation of graphene oxide-based supramolecular hybrid nanohydrogel through host-guest interaction and its application in drug delivery. J Biomed Nanotechnol 2018; 14(12): 2056-65.
14.Talukdar Y, Rashkow J, Lalwani G, Kanakia S, Sitharaman B. The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells. Biomaterials 2014; 35(18): 4863-77.
15.Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. Mol Hum Reprod 2010; 16(11): 818-34.
16.Mobarakeh ZT, Ai J, Yazdani F, Sorkhabadi SM, Ghanbari Z, Javidan AN, et al. Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. Cell Biol Int Rep 2012; 19(1): e00015.
17.Gargett CE, Chan RW,Schwab KE. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. Mol Cell Endocrinol 2008; 288(1-2): 22-9.
18.Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, et al. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. J Cell Mol Med 2011; 15(4): 747-55.
19.Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 1997; 64(2): 278-94.
20.Vera-Sanchez M, Aznar-Cervantes S, Jover E, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Hernandez-Romero D, et al. Silk-fibroin and graphene oxide composites promote human periodontal ligament stem cell spontaneous differentiation into osteo/cementoblast-like cells. Stem Cells Dev 2016; 25(22): 1742-54.

21.Nishida E, Miyaji H, Kato A, Takita H, Iwanaga T, Momose T, et al. Graphene oxide scaffold accelerates cellular proliferative response and alveolar bone healing of tooth extraction socket. Int J Nanomedicine 2016; 11: 2265-77.
22.Hussein KH, Abdelhamid HN, Zou X, Woo HM. Ultrasonicated graphene oxide enhances bone and skin wound regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2019; 94: 484-92.
23.Ryu S, Lee C, Park J, Lee JS, Kang S, Seo YD, et al. Three-dimensional scaffolds of carbonized polyacrylonitrile for bone tissue regeneration. Angew Chem Int Ed Engl 2014; 53(35): 9213-7.
24.Haghshenas M, Hoveizi E, Mohammadi T, Kazemi Nezhad SR. Use of embryonic fibroblasts associated with graphene quantum dots for burn wound healing in Wistar rats. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2019; 55(4): 312-22.
25.Wein M, Huelter-Hassler D, Nelson K, Fretwurst T, Nahles S, Finkenzeller G, et al. Differential osteopontin expression in human osteoblasts derived from iliac crest and alveolar bone and its role in early stages of angiogenesis. J Bone Miner Metab 2019; 37(1): 105-17.
26.Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R, JR, Li I W, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. Ann N Y Acad Sci 1995; 760: 223-41.
27.Qiu J, Li D, Mou X, Li J, Guo W, Wang S. Effects of graphene quantum dots on the self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. Adv Healthc Mater 2016; 5(6): 702-10.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Effects of Graphene Quantum Dots on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Human Endometrial

Sehat kashani S[1], Hoveizi E[2*], Naddaf H[1]

[1]Department of Clinical Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, [2]Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 03 Jun 2020 Accepted: 04 Aug 2020

Abstract

Background and aim: Cell therapy is important by means of a new method for repairing critical bone defects. On the other hand, graphene and its derivatives, including quantum-graphene particles (GQDs), have recently been considered as effective factors in cell differentiation, and evidence suggests that these particles may be effective in differentiating into bone cells. Therefore, the aim of the preswnt study was to determine the effect of graphene quantum dots on osteoblastic differentiation of human endometrial-derived stem cells.

Methods: This is an experimental study that was conducted in 2019, in the cell culture research laboratory of Shahid Chamran University of Ahvaz. After extraction of endometrial stem cells derived from human uterine tissue samples using collagenase enzyme and their purification, the cells were cultured in two groups, including the control group in standard osteogenic medium and the experimental group in the same medium of GQDs with a concentration of 50 Micrograms per milliliter was added. Data were then analyzed using rejection staining, alkaline phosphatase activity and gene expression by qRT-PCR. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: In the present study, for the first time, the results of the interaction between GQDs and endometrial derived stem cells were shown in in-vitro condition and and it was confirmed that the presence of GQDs in the osteogenic medium could lead to significant incrassation in osteogenic differentiation efficiency of endometrial cells. Actually, alkaline phosphatase activity and formation of calcium nodules (that are given more intensity by alizarin red) were significantly increased in the experimental group compared with the control group, which indicated previous and better activation of osteogenesis in the experimental group. These results were confirmed with the significant up-regulation of phenotypically related osteogenic genes (Runx2, osteopontin, and osteocalcin) which were measured using a qRT-PCR technique.

Conclusion: The results of the present study suggested that differentiation of uterine endometrial stem cells into bone cells in a standard osteogenic medium to which GQDs have been added could potentially be a practical method of increasing osteoblastic differentiation and cell therapy.

Keywords: Human Endometrial-Derived Stem Cells, Graphene Quantum Dots, Osteogenic Differentiation.

[*]**Corresponding author: Hoveizi E,** Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Email: e.hoveizi@scu.ac.ir

Please cite this article as follows:
Sehat kashani S, Hoveizi E, Naddaf H. Effects of Graphene Quantum Dots on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Human Endometrial. Armaghane-danesh 2020; 25(4): 423-437.