

Original Article

The effect of titanium carbide used in implants on stemness and senescence of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells

Roya Salehi¹, Roya Valizadeh², Akram Farzandi², Effat Alizadeh²

¹Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: alizadehe@tbzmed.ac.ir

Received: 30 December 2019 Accepted: 15 February 2020 First Published online: 30 Dec 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021;42(5):537-546

Abstract

Background: The aim of the present study was to determine the effect of Titanium carbide nanoparticles on stemness and senescence markers of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells.

Methods: After isolation of mesenchymal stem cells from mouse's bone marrow, their surface markers were studied using flowcytometry. MTT assay, cell cycle analysis; colony forming assay, and senescent beta galactosidase staining were performed for cells treated with titanium carbide nanoparticles. Then, the expression of OCT-4 and Nanog genes were studied by qRT-PCR in titanium carbide treated mouse's bone marrow mesenchymal stem cells (mBMSCs).

Results: All mBMSCs showed spindle shaped morphology. Their identity was confirmed by flow cytometry of stained cells for CD11b, CD90, CD45, and CD44 markers. The MTT assay results showed that titanium carbide effect is time-dependent and no cytotoxic effects were observed in short treatment times. But toxic effects were observed after 72 or 144 hours of post treatment with doses range from 0.1 to 1 mM (P<0.05). Besides, cell cycle study detected more cell populations in G0/G1 and less percentage in S phase. The colony forming assay in treated cells exhibited smaller size of colonies. The beta galactosidase staining of treated cells demonstrated more positive cells (more aged cells). Finally, qRT-PCR showed significant down regulation of OCT-4 and Nanog (p<0.05).

Conclusion: Titanium carbide as an implant material could affect the viability, stemness and senescence of mBMSCs in negative manner.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Titanium Carbide, Implant, Stemness, Senescence

How to cite this article: Salehi R, Valizadeh R, Farzandi A, Alizadeh E. [The effect of titanium carbide used in implants on stemness and senescence of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021;42(5):537-546. Persian.

مقاله پژوهشی

مطالعه اثر تیتانیوم کربید مورد استفاده در ایمپلنت‌ها بر نشانگرهای بیانی بنیادینگی و پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش

رویا صالحی^۱، رویا ولیزاده^۲، اکرم فرزندی^۳، عفت علیزاده^{۴*}

^۱گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
^۲گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
نویسنده مسؤل: alizadehe@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۹ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۵۳۷-۵۴۶

چکیده

زمینه: هدف از این کار پژوهشی تعیین اثر نانوذرات تیتانیوم کربید بر نشانگرهای بیانی بنیادینگی و پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش می‌باشد.

روش کار: پس از استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان، مارکرهای آنها به کمک فلوسایتومتری مطالعه شد. آزمون سمیت MTT برای سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش کشت شده در مجاورت تیتانیوم کربید انجام شد. سپس چرخه سلولی به کمک فلوسایتومتری، تشکیل کلنی به کمک تست بررسی تشکیل کلنی و پیری از طریق رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز پس از مجاورت دادن سلول‌ها با تیتانیوم کربید انجام شد. در نهایت بیان ژن‌های بنیادینگی، Nanog، OCT₄ به کمک QRT-PCR مطالعه شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به خوبی استخراج و به شکل دوکی بودند. مطالعه مارکرهای سطحی با کمک تکنیک فلوسایتومتری، هویت سلول‌های بنیادی این مطالعه را مورد تایید قرارداد (مارکرهای سطح سلول CD_{۳۰}، CD_{۳۳}، CD_{۹۰}، CD_{۱۱۱}). نتایج آزمون MTT نشان داد که تیتانیوم کربید در کوتاه‌مدت سمیت نشان نمی‌دهد اما در مدت زمان ۳ و ۶ روز پس از انکوباسیون سلول‌های مغز استخوان موش با دوزهای ۰/۱ الی ۱ میلی‌مولار، سمیت وابسته به دوز و زمان نشان داد (p < ۰/۰۵). همچنین نتایج چرخه سلولی نشان داد که نسبت به گروه کنترل، سلول‌های بیشتری وارد فاز G0/G1 شده و جمعیت سلول‌ها در فاز S کاهش نشان می‌دهند. نتایج تشکیل کلونی نشان داد که سلول‌های در معرض تیتانیوم کربید نسبت به گروه کنترل کلونی‌های با اندازه کوچک‌تری تشکیل می‌دهند. همچنین رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز نشان داد که در سلول‌های در معرض تیتانیوم کربید تعداد سلول‌های بیشتری رنگ‌آمیزی مثبت نشان می‌دهند. نتایج qPCR همچنین نشان دهنده کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی شامل Nanog، OCT₄ نسبت به کنترل بود.

سلول‌های بنیادی مغز استخوان جزو سلول‌هایی هستند که به احتمال زیاد در معرض مواد ایمپلنت‌ها و مواد آزاد شده از آنها قرار می‌گیرند، بنابراین مطالعه اثر این مواد در طولانی‌مدت بروی بنیادینگی و پیری سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌تواند برای مدیریت خطرات احتمالی این مواد مفید باشد. در این مطالعه اثر تیتانیوم کربید بر سلول‌های بنیادی موش مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی که روی مشتقات دیگر تیتانیوم انجام شده است سازگار و نزدیک بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این تحقیق تیتانیوم کربید به عنوان یک ماده مورد استفاده در ایمپلنت در طولانی مدت می‌تواند اثرات منفی بر زنده ماندن سلول‌های بنیادی مغز استخوان رت و بنیادینگی آنها داشته همچنین پیری در آنها را افزایش دهد.

کلید واژه‌های: سالخوردگی بیولوژیکی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تیتانیوم کربید، ایمپلنت، بنیادینگی

نحوه استناد به این مقاله: صالحی، ر.، ولیزاده، ر.، فرزندی، ا.، علیزاده، ع. مطالعه اثر تیتانیوم کربید مورد استفاده در ایمپلنت‌ها بر نشانگرهای بیانی بنیادینگی و پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۵۳۷-۵۴۶

حق تالیف برای مولفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

اخیرا درمان با سلول‌های بنیادی نویدبخش درمان انواع بیماری‌های رایج و حتی نادر به شمار می‌رود، رایو و همکاران (۱). در درمان دیابت، آرتروز، ضایعات نخاعی، بیماری‌های قلبی و حتی رشد دندان کاربرد دارد ولی به دلیل نبود مارکرهای اختصاصی در سلول‌های بنیادی بالغین، تشخیص و شناسایی این سلول‌ها دشوار است. از طرفی استفاده از این سلول‌ها احتمال ایجاد عفونت، سرطان، مسمومیت، کمبود ایمنی و حتی مرگ را به دنبال دارد، باکش و همکاران (۲). حفظ و نگهداری سلول‌های بنیادی در ارگان‌های بالغ برای هموستاز بافتی و شروع بازسازی بافتی و پاسخ به جراحت ضروری می‌باشد. بنیادینگی به عنوان الگوی بیان ژنی مشترک در همه سلول‌های بنیادی مطرح شده است و هدف پژوهشگران از بیان واژه بنیادینگی (Stemness) بیشتر برای نگهداری سلول‌های بنیادی در شرایط غیرتمایزی و پرتوانی می‌باشد، جکسون و همکاران (۳). سلول‌های بنیادی اغلب به حالت غیرفعال‌اند و فاکتورهای بیرونی و درونی از محیط اطراف سبب شروع تکثیر یا تمایز آنها می‌شوند، الیسون و همکاران (۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بعد از پاساژ از لحاظ تکثیری پتانسیل متغیری دارند که دلیل این تفاوت‌ها احتمالا به روش‌های مختلف جداسازی، شرایط فرد دهنده سلول، تفاوت در سن و پایین بودن تعداد سلول‌های بنیادی در نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط می‌شود. علی‌رغم پتانسیل تکثیری بالا، این سلول‌ها کاربوتیپ نرمال داشته و فعالیت تلومرازی خود را از دست نمی‌دهند. ولی با انجام پاساژهای متعدد دچار پیری می‌شوند. پدیده پیری با اثر بر ریخت‌شناسی، توان تکثیری و تمایز نشان داده می‌شود. پیری سبب کاهش تعداد CFU-U ها و کاهش توان تمایز می‌شود، باکستر و همکاران (۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل منحصربه‌فرد در ترمیم استخوان و تولید غضروف در بدن دارند اما به هنگام کاشت ایمپلنت‌ها در بدن دست‌خوش تغییراتی می‌شوند. بیان ژن‌های بنیادینگی‌شان کاهش می‌یابد و سلول‌ها به مرور دچار پیری می‌شود که این موارد در پزشکی بسیار حایز اهمیت می‌باشد، باکستر و همکاران (۵). اختلالات ارتوپدی یکی از شایع‌ترین ناتوانی‌های جسمی می‌باشند. تروما ارتوپدی به آسیب‌های عضلانی-اسکلتی شامل شکستگی استخوان‌ها، آسیب مفاصل و آسیب بافت نرم گفته می‌شود. اهداف درمان تروما ارتوپدی، ترمیم آناتومی نرمال، ثابت کردن انتهاهای آسیب دیده برای کمک به تسکین درد بدن و اجازه به التیام و احیا آسیب و ترمیم عملکرد می‌باشد. اکثریت شکستگی‌ها می‌تواند با بی‌حرکتی زخم التیام یابند که این امر منجر به تثبیت شکل‌های استخوان در محل شکستگی می‌شود. شکستگی در مکان‌های مختلفی از جمله گردن، تیبیا، اسکاپولا و غیره اتفاق می‌افتد که یکی از شایع‌ترین آنها در گردن اتفاق می‌افتد.

نکات کاربردی

در این مطالعه مشخص می‌گردد که تیتانیوم کربید مورد استفاده در مصارف مختلف می‌تواند بر بنیادینگی سلول‌های بنیادی اثر منفی داشته همچنین آنها را به سمت پیری سوق دهد.

رایج‌ترین ابزار برای مراقبت‌های شکستگی ایمپلنت‌ها هستند و در واقع به عنوان جایگزینی برای ساختار آسیب دیده عمل می‌کنند که به ایجاد یک ساختار پایدار جهت کمک به درمان از آنها استفاده می‌شود. ایمپلنت‌ها در درمان اسکولوز، آرتروز و تنگی کانال نخاعی کاربرد دارد. از مهم‌ترین آنها می‌توان از فلزات با جنس پلاتینیوم (پلاتین) و تیتانیوم نام برد برونیکاردی و همکاران (۶). نانوذرات قادرند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و بنابراین روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین‌ها می‌توانند نقش داشته باشند. گونه‌های فعال اکسیژن از روش‌های مختلف نظیر آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن‌ها و غیره می‌توانند به سلول‌ها آسیب وارد کنند زو سی و همکاران (۷). نانوذرات تیتانیوم اکسید و تیتانیوم کربید اثرات منفی بر روی زنده بودن سلول، تکثیر و سلول‌های MSC را به صورت وابسته به دوز و وابسته به اندازه دارد، هو وای و همکاران (۸). با توجه به کاشت ایمپلنت‌ها در استخوان با اهداف درمانی، در این مطالعه بر آن شدیم که تاثیر تیتانیوم کربید به عنوان ایمپلنت‌های کاشته شده در شکستگی‌های مختلف را در پیری و بنیادینگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطالعه کنیم. با توجه به اینکه تا به اکنون کار تحقیقاتی در این زمینه صورت نگرفته است امید است با انجام این طرح گام کوچکی در رفع مشکلات احتمالی جراحی‌های ارتوپدی صورت گیرد.

روش کار

۲.۱. نانوذرات تیتانیوم کربید

نانوذرات تیتانیوم کربید از شرکت نانوسانی خریداری شد. سایز نانوذرات بین ۴۰ تا ۶۰ نانومتر و خلوص آن ۹۹٪ بر اساس گزارش شرکت بود.

۲.۲. کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان

موش

سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به کمک پروتکل فلاشینگ استخراج شد (۹). این سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی به کمک محیط کشت DMEM و ده درصد FBS و ۱۰۰ واحد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به همراه ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از bFGF کشت گردید. به محض رسیدن به هشتاد درصد الحاق، به کمک Triple E به فلاسک جدید منتقل شد و تعویض محیط کشت دو بار در هفته انجام گردید.

۲.۳. بررسی سمیت سلولی

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی می‌باشد که برای ارزیابی فعالیت متابولیک سلول به کار می‌رود. برای بررسی میزان تکثیر (proliferation)، بقا (viability) و سیتوتوکسیسیته (cytotoxicity) سلولی انجام می‌شود. MTT پودر زردرنگ (تترازولیوم - تiazolol) محلول در آب است که توسط آنزیم‌های اکسیدوردوکناز میتوکندریایی به کریستال‌های سیاه رنگ و نامحلول فورمازان داخل سلول‌های زنده کاهش می‌یابد. سپس از طریق DMSO کریستال‌های فورمازان نامحلول سیاه به رنگ ارغوانی محلول در می‌آیند.

برای انجام این تکنیک نیاز به شمارش و پاساژ سلولی می‌باشد. بعد از شمارش در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۵۰۰۰ سلول و به تعداد برابر کاشته شدند. به چاهک‌های اطراف فقط محیط خالی به منظور جلوگیری از اثر لبه و تامین رطوبت افزوده شد. سپس پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. روز دوم ۲۰۰ میکرولیتر محیط رویی چاهک‌ها برداشته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تیتانیوم با دوزهای ۰/۱ الی ۱ میلی‌مولار به صورت سه تکرار، اضافه شد. سپس زنده‌مانی سلول‌ها در بازه زمانی ۳ روز و ۶ روز بررسی شد. بعد ۲۰۰ میکرولیتر محیط رویی سلول‌ها را بیرون ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید به هر چاهک افزوده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (که با غلظت ۲ میلی‌گرم محاسبه گردید، وزن شد و با محیط کامل به حجم رساندیم و در نهایت فیلتر کردیم) به هر چاهک اضافه شد (زیر هود و در تاریکی)، سپس پلیت ۹۶ خانه در داخل فویل قرار گرفته و ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از ۴ ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و زیر میکروسکوپ کریستال‌های سیاه رنگ فورمازان مشاهده شد. بدین معنی که MTT به داخل سلول‌های زنده نفوذ کرده و آنها را می‌کشد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده شد و ۲۰ دقیقه انکوبه گردید که سبب حل کردن کریستال‌های نامحلول فورمازان و ایجاد رنگ ارغوانی شد. بعد از این مرحله پلیت داخل فویل به محل خواندن الیزا منتقل شده و OD خوانده شد. جهت محاسبه درصد زنده‌مانی (viability) از فرمول زیر استفاده گردید. (s: sample, b: blank, c: control)

$$\text{Viability: } \text{ODs} - \text{ODb} / \text{ODc} - \text{ODb} \times 100$$

۲.۴. فلوسایتومتری

پس از تیمار کردن سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار تیتانیوم کربید به ترتیب برای رده سلولی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش و گذشت ۴۸ ساعت از مجاورت سلول‌ها با این مواد، محیط روی سلول‌ها (داخل چاهک) آسپیره شده سپس سلول‌ها توسط حجم معینی از PBS شستشو داده شد. سپس محلول تریپسین به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه

در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خروج پلیت‌ها از انکوباتور، آنزیم با محیط کامل خشتی شده و محتویات هر چاهک را به‌طور PBS سوسپانسه شده و بار دیگر سانتیفریوژ گردید (در این مرحله ۲ بار تکرار شد). در نهایت پس از دو بار شستشو، ۳۰۰ میکرولیتر PBS به هر فالكون حاوی سلول اضافه کرده و پیپتاژ شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰٪ سرد به هر فالكون اضافه شده (در اینجا پیپتاژ نباید انجام شود فقط به آرامی اندکی فالكون‌ها را می‌توان تکان داد). بعد از نگهداری سلول‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، فالكون‌های حاوی سلول‌ها را با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ کردیم. سلول‌ها مجدداً توسط PBS سرد شستشو شده (۲ بار) و در ۳۰۰ میکرولیتر پخش شدند. بعد به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱۵ میکرولیتر محلول PI در تاریکی افزوده شد و به دستگاه فلوسایتومتری منتقل شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج فلوسایتومتری با کمک نرم‌افزار Flow Jo آنالیز شد.

۲.۵. بررسی پیری با استفاده از رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز

در این مطالعه غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیتانیوم کربید انتخاب و زمان بیش از ۷۲ ساعت به سلول‌ها اثر داده شد. سپس طبق پروتکل زیر رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز جهت مطالعه میزان پیری در سلول‌ها انجام گرفت. جهت تهیه محلول تثبیت‌کننده باید محلول حاوی ۵۰٪ گلوکارآلدئید و ۳۷٪ فرمالدهید تهیه گردد. جهت تهیه بافر رنگ‌آمیزی برای پیرسازی، در ابتدا محلول سیتریک اسید/سدیم فسفات ۴۰۰ میلی‌مولار تهیه می‌گردد. سپس سدیم کلراید ۱/۵ مولار تهیه شده و منیزیم کلراید ۲۰ میلی‌مولار به آن اضافه می‌شود. محاسبات برای حجم ۱۵ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برای هر خانه از پلیت شش خانه مراحل به صورت زیر انجام شد: ابتدا ۵۰۰ میلی‌مولار از محلول پتاسیم فروسیانید تهیه شد. محلول ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از X-gal در DMSO نیز تهیه گردید (این محلول باید در دما منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد). سپس ۹۳۰ میکرولیتر از بافر سترات/سدیم فسفات، ۱۰ میکرولیتر از پتاسیم فرو سیانید و ۵۰ میکرولیتر از محلول X-gal را ترکیب نموده و pH محلول نهایی بین ۵/۹ الی ۶/۱ تنظیم شد. پس از خروج محیط‌های کشت رویی، شستشو با PBS انجام گرفت. محلول تثبیت‌کننده باید کل سطح خانه‌ها را پوشش دهد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته و با PBS شستشو داده شد. سپس محلول رنگ‌آمیزی که آماده شده بود بر روی سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در تاریکی تحت دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور خشک انکوبه شد. پس از ۲

RNA، تک رشته‌ای و ناپایدار است. کیفیت نمونه حتی در دما منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان کاهش می‌یابد و مقادیر زیادی از RNA تجزیه می‌شود. برای رفع این مشکل نمونه RNA استخراج شده در حداقل زمان ممکن به cDNA که دو رشته‌ای و پایدارتر است تبدیل می‌شود. در فرایند رونویسی معکوس ابتدا آنزیم RT با استفاده از RNA به عنوان الگو، تک رشته مکمل RNA را تولید می‌کند. رشته حاصل DNA بوده و cDNA نام دارد و یک رشته آنتی‌سنس است. مقدار cDNA متناسب با تعداد کپی‌های RNA اولیه در نمونه خواهد بود. برای تولید cDNA حدود یک میکروگرم از RNA هر نمونه را محاسبه کرده و مطابق دستورهای موجود در راهنمای کیت Revert Aid cDNA synthesis (hermoscientific) تولید انجام گردید.

۲.۱.۰ qRT-PCR

جهت انجام آزمون qRT-PCR در میکروتیوب‌های اختصاصی، مقدار دو میکرولیتر از نمونه cDNA رقیق شده به صورت تریپلیکات اضافه شد و مقدار ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر ریورس رقیق شده اضافه گردید و نهایتاً به میزان ۷ میکرولیتر از سایبر گرین مستر میکس اضافه شد و در دستگاه mic PCR واکنش ریل تایم انجام شد، که برنامه آن: ۱۰ دقیقه در دما ۹۵ درجه سانتی‌گراد و چهل چرخه (۱۵ ثانیه ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه ۶۰ درجه و ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود و جهت انجام آنالیزهای ریل تایم از فرمول $\Delta\Delta CT$ استفاده شد.

۲.۱.۱ محاسبات و آنالیز آمار

این مطالعه جزو مطالعات پایه محسوب می‌شود. کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد. اطلاعات به صورت $\pm (SD)$ standard deviation mean گزارش شد. برای محاسبات آماری این مطالعه از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و تفاوت بیان ژن‌های هدف بین نمونه کنترل و تیمار شده با روش آماری تی محاسبه شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مرحله پایانی کار شامل آنالیز آماری داده‌های به دست آمده از روش QRT-PCR می‌باشد. نرم‌افزارهای ABI Applied Biosystem (نسخه ۲/۰)، Software ۷۵۰۰ و LinReg PCR جهت آنالیز آماری داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

۳-۱ مورفولوژی سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از مغز استخوان موش استخراج شده و برای انجام تحقیقات این پایان‌نامه استفاده شدند. مورفولوژی سلول‌های بنیادی استفاده شده به صورت دوکی شکل می‌باشد که در تصویر ۱ دیده می‌شود.

۳-۲ بیان شاخص‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

از مغز استخوان

ساعت، محلول فوق را خارج نموده و پس از چندین مرتبه شستشو، سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲.۶ تست بررسی تشکیل کلونی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از سه بار پاساژ داده شدن، در پتری‌دیش ۱۰۰ میلی‌متری، حاوی چاهک‌های ۲۰۰ سلولی به مدت ۲۴ ساعت کاشته شدند. سپس محیط کشت با محیط تازه حاوی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیتانیم کربید تعویض شد. کلونی‌های سلولی بعد از ۱۴ روز با محلول تثبیت‌کننده گلو تار آلدئید ۲/۵٪ برای ۱۵ دقیقه تثبیت شد. رنگ آمیزی با کریستال ویوله ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت و سپس شستشو با محلول PBS انجام شد. کلونی‌ها از نظر تعداد و اندازه زیر میکروسکوپ شمارش شدند. تعداد کلونی‌ها با روش شمارش و میانگین گرفتن از کلونی‌ها در ده میدان دید متفاوت انجام شد. سایز کلونی‌ها به وسیله مطالعه چشمی و مقایسه با اندازه کلونی‌های پتری کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

۲.۷ استخراج RNA

سلول‌های بنیادی در معرض غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تیتانیوم کربید قرار گرفتند. سلول‌ها بدون هیچ تیماری به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. نمونه‌ها در زمان‌های مختلفی (بعد ۱۳،۵ و ۹ روز) استخراج شدند. برای استخراج کامل از سلول‌ها، سلول‌های بنیادی تریپسین شده و رسوب سلولی با بافر سه بار شستشو داده شدند. استخراج مطابق پروتکل کارخانه‌ای کیت انجام شد، EZ-10 Total RNA Mini-Preps kit, Bio Basic, (Toronto, Canada). به‌طور خلاصه سوسپانسیون سلول‌های استخراج شده در بافر RLT لیز شد. سپس نصف حجم آن اتانول ۹۸٪ اضافه شد. این مخلوط به ستون‌ها منتقل شده و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از شستشو با محلول‌های RW و RPE، RNA با آب بدون RNA شسته شده و به مدت ۲ دقیقه و با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. RNA استخراج شده در ۷۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شد.

۲.۸ کنترل کیفی RNA استخراج شده

جهت کنترل کیفی و پی‌بردن به درجه خلوص و غلظت نمونه‌های RNA، جذب نوری (OD) آن‌ها در طول موج‌های ۲۸۰/۲۶۰ و ۲۳۰/۲۶۰A به کمک دستگاه نانودراپ بررسی شد. غلظت نمونه‌ها نیز به کمک همین دستگاه قابل خواندن می‌باشد. اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئین‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب نوری دارند. جذب نوری بالا در طول موج ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده آلودگی با بافرهای استخراج RNA می‌باشد. OD بین ۱/۷ تا ۲ در ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر، نشانه درجه خلوص بالای نمونه‌هاست. پایین بودن این نسبت نشان‌دهنده آلودگی به پروتئین است.

۲.۹ تهیه سنتز cDNA از RNA استخراج شده

و (۳D) که به نوبه خود نشان دهنده کاهش قدرت بنیادینگی می‌باشد. ($P < 0.05$)

۳.۶. نتایج پیری سنجی

بررسی میزان پیری براساس سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز است. سنجش میزان فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبسترای آن به نام برومو-۴-کلرو-ایندوئیل بتا-گالاکتوزیداز (x-gel) صورت می‌گیرد. هرچه میزان لیوزومی انباشته شده افزایش یابد، سطح بتا-گالاکتوزیداز نیز افزایش می‌یابد. میزان و شدت رنگ سبز - آبی سلول‌ها نشانگر میزان فعالیت این آنزیم می‌باشد. با توجه به تصاویر بدست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان که بوسیله میکروسکوپ معکوس گرفته شده است، سلول‌های تیمار شده با تیتانیوم کربید در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل رنگ‌پذیری بیشتری داشتند (تصویر ۴A و ۴B)، که این رنگ‌پذیری زیاد سبز - آبی، نشان از تاثیر این نانوذرات بر روی سلول‌ها و متعاقب آن نشانگر میزان فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز و در نتیجه بیان کننده تاثیر این نانوذرات بر القا پیری در سلول‌ها می‌باشد.

۳.۷. نتایج Real time-PCR

بررسی بیان ژن Nanog به عنوان ژن دخیل در روند بنیادینگی و پیری در گروه‌های سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیتانیوم کربید طی ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل، نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه تیمار شده با تیتانیوم کربید نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. این حالت نشان دهنده افزایش روند پیری در این سلول‌هاست (تصویر ۴C). بررسی بیان ژن Oct4 به عنوان ژن دخیل در روند پیری در گروه‌های سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیتانیوم کربید طی ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه سلول کنترل نشان داد میزان بیان این ژن در گروه تیمار شده با تیتانیوم کربید نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. این حالت نیز نشان دهنده افزایش روند پیری در این سلول‌هاست (تصویر ۴D).

نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهد که درصد بیان مارکرهای CD۴۴ و CD۹۰ به ترتیب ۹۹/۷٪ و ۹۹/۵٪ می‌باشد. این در حالی است که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپویتیک از جمله CD۴۵ و CD۱۱ در این سلول‌ها بیان قابل توجهی نشان ندادند. این نتایج از یک سو نشان دهنده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی و از سوی دیگر موید کیفیت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و حذف سلول‌های هماتوپویتیک در طی جداسازی سلول‌های استرومال از بافت چربی و مغز استخوان می‌باشد (تصویر ۲A).

۳. نتایج تست سمیت سلولی

با توجه به نمودار اثر سمیت سلولی تیتانیوم کربید روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان، مشخص می‌شود که اثر این ماده بر سلول‌ها وابسته به دوز و زمان می‌باشد. سلول‌های تیمار شده با تیتانیوم کربید در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۷۲ ساعت رشد و تکثیر، نزدیک به ۹۰٪ و در ۱۴۴ ساعت نزدیک به ۳۰٪ کاهش یافته است (تصویر ۲C و ۲B).

۳.۴. بررسی اثر نانوذرات روی چرخه سلولی

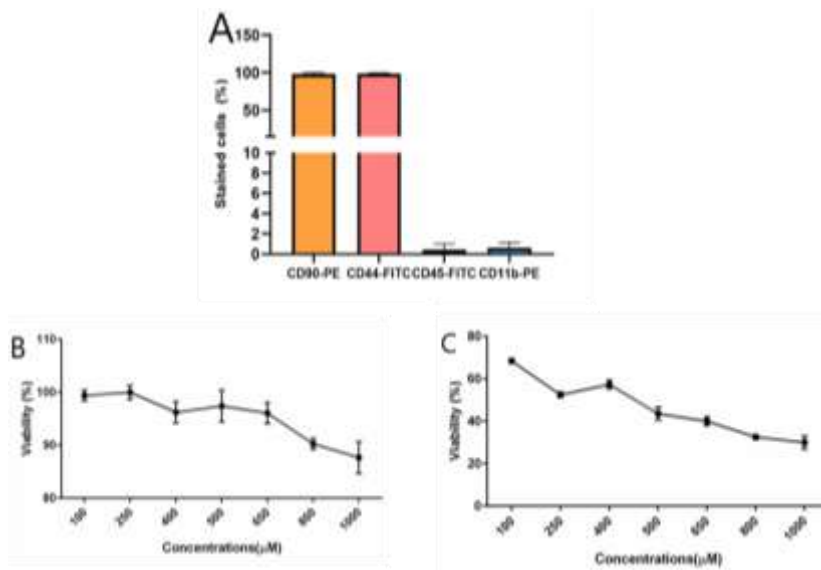
در سلول‌های بنیادی بیشتر سلول‌ها در فاز استراحت G_0 اند و درصد کمی از آنها وارد چرخه تقسیم (G_1-S-G_2) می‌شوند. عواملی مثل فاکتورهای رشد، ورود این سلول‌ها به چرخه رشد و تکثیر را تسهیل کرده و افزایش می‌دهند. مقایسه سلول کنترل (۵۴٪/۷۵) با سلول‌هایی که با تیتانیوم کربید تیمار شدند، نشان می‌دهد سلول‌های تیمار شده با تیتانیوم کربید وارد فاز S نشدند (۱۹٪/۳۴). در نتیجه تیتانیوم کربید موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌ها شده و سلول‌ها بیشتر در حالت سکون و غیرفعال (G_0) و (G_1) مانده‌اند. بنابراین تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با تیتانیوم کربید، موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌ها، کاهش سنتز DNA، همانند سازی و تقسیم سلولی می‌گردد (نمودار ۳A و ۳B).

۳.۵. بررسی اثر نانوذرات روی تشکیل کلونی

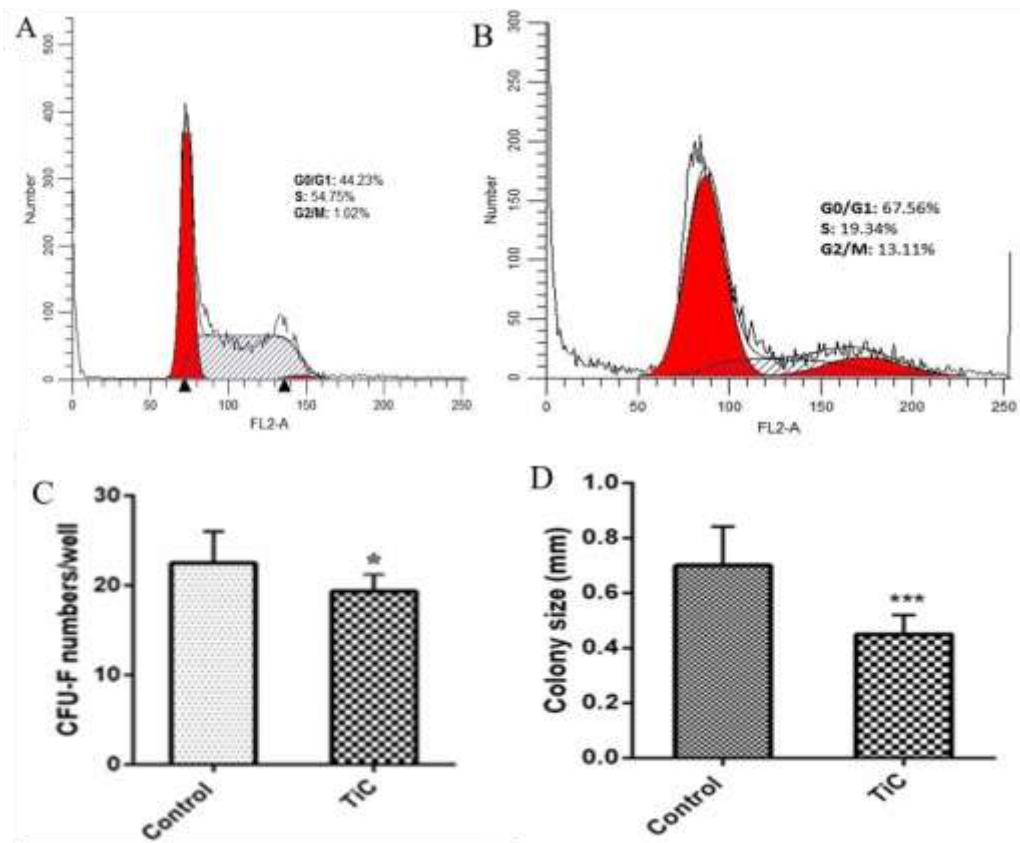
طبق نتایج به دست آمده، تعداد کلنی‌ها ثابت و فقط ساینز آنها به صورت معنی‌داری تغییر کرده و کوچک‌تر شده است (نمودار ۳C)



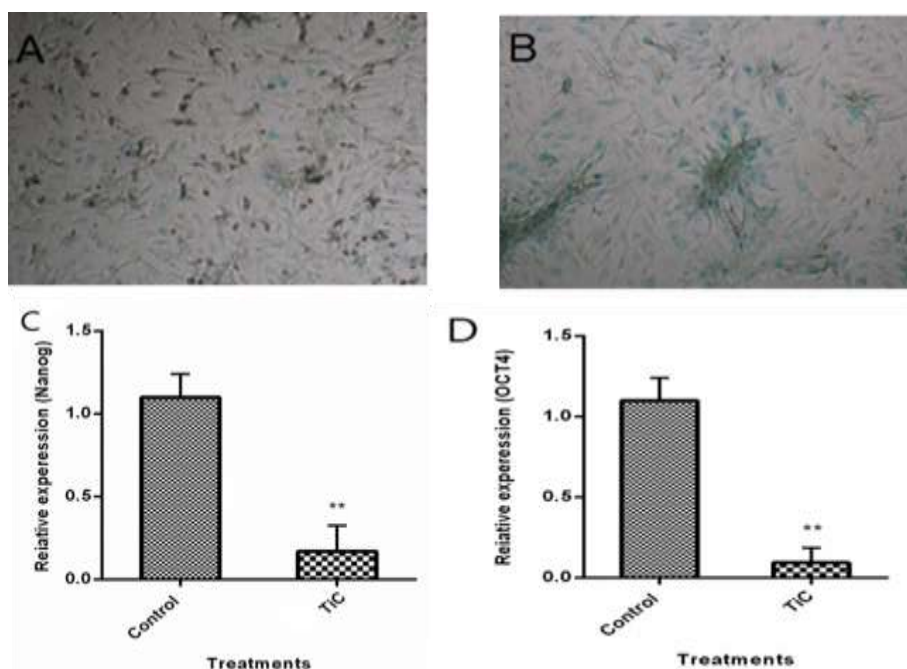
تصویر ۱: سلول‌های BM-MSC، پاساژ سوم. سلول‌های دوکی شکل قابل مشاهده می‌باشد.



تصویر ۲: تصاویر فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی و نمودارهای حاصل از تیمار سلول‌های بنیادی مغز استخوان. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی ۲A. (۱) مارکرهای هماتوپویتیک و (۲) مارکرهای غیر هماتوپویتیک نمودارهای بررسی زنده‌مانی حاصل از تیمار سلول‌های بنیادی مغز استخوان با غلظت‌های مختلف تیتانیوم کربید در روز ۳ (B) و ۶ (C) بعد از تیمار به روش بررسی MTT



تصویر ۳: نتایج فلوسایتومتری تأثیر تیتانیوم کربید و نمودارهای تأثیر تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تیتانیوم کربید (A) و سلول‌های تیمار شده با تیتانیوم کربید (B) نمودارهای تأثیر تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تیتانیوم کربید بر تشکیل کلونی‌ها (C) و سایز کلونی‌ها (D). $P < 0.05$ ؛ $P < 0.001$ ؛ $P < 0.0001$



تصویر ۴: تصاویر رنگ آمیزی بتاگالاکتوزیداز سلول‌های بنیادی مغز استخوان و نمودارهای بیان Nanog در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان: (A) کنترل سلول‌های بنیادی مغز استخوان. (B) سلول‌های تیمار شده با تیتانیوم کریبد- تصویر ۴C. نمودار بیان Nanog در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیتانیوم کریبد در طی روز ۲ (P value < ۰/۰۱): تصویر ۴D- نمودار بیان Oct4 در سلول‌های بنیادی مغز استخوان در گروه کنترل و گروه تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیتانیوم کریبد در طی ۲ روز (P value < ۰/۰۱): (**)

بحث

کریبد یکی از مشتقات تیتانیوم است و به عنوان پوشاننده سطح سایر آلیاژها در ایمپلنت‌های کاشته شده در شکستگی‌های مختلف کاربرد دارد و می‌تواند خصوصیات سطح ایمپلنت‌ها را بهبود بخشد. با توجه به کاشت ایمپلنت‌ها در استخوان با اهداف درمانی، در این مطالعه بر آن شدیم که تاثیر تیتانیوم کریبد را در پیری و بنیادینگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطالعه کنیم. مطالعه حاضر نشان که سلول‌های بنیادی مزانشیمی وقتی که در معرض تیتانیوم کریبد مورد استفاده در ایمپلنت‌ها قرار می‌گیرند می‌توانند در طولانی‌مدت باعث ایجاد سمیت سلولی گردند که در مطالعه بررسی MTT مشخص گردید. همچنین این ترکیبات می‌توانند چرخه سلولی سلول‌های بنیادی را تغییر داده و آن‌ها را به سمت فازهای G_0/G_1 سوق دهند. به علاوه سلول‌های بنیادی تیمار شده با تیتانیوم کریبد دچار کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی شدند. همچنین فاکتورهای پیری مانند بتاگالاکتوزیداز که معمولاً در سلول‌های سالخورده افزایش می‌یابد، در آنها شناسایی شدند. به این ترتیب می‌توان گفت که تیتانیوم کریبد کاملاً ایمن نیست و احتمالاً می‌تواند باعث ایجاد یک سری مشکلات مربوط به بنیادینگی و تسریع بخشیدن به روند پیری شود. هر چند در مورد اثرات منفی تیتانیوم کریبد مطالعات زیاد نیست اما کارهای قبلی انجام شده در سایر مشتقات تیتانیوم منطبق بر نتایج این مطالعه است (۱۵ و ۱۶). با توجه به اینکه تاکنون کار تحقیقاتی در این زمینه صورت نگرفته

در میان فلزات و آلیاژهای آن‌ها، تیتانیوم جزو پراستفاده‌ترین فلزات و آلیاژها در ایمپلنت‌های ارتوپدی و دندانپزشکی می‌باشد که این موضوع به علت ویژگی‌های فیزیکی آن مثل وزن مخصوص کم، مدول الاستیک کم آن و بویژه زیست‌سازگاری بالای آن نسبت به سایر فلزات می‌باشد (۱۰) با این حال رهش بعضی عناصر از این فلز و مشتقات آن در اطراف ایمپلنت می‌تواند باعث ایجاد پاسخ‌های سلولی، التهاب و رهایش آنزیم‌های مضر گردد. همچنین می‌تواند باعث آسیب و تخریب در سلول‌های استخوانی و شل شدن ایمپلنت شود (۱۱ و ۱۲). مطالعه‌ای نشان داد که نانوذرات در بدن قادرند برخی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در طی فعل و انفعالات شیمیایی تولید کنند و بنابراین باعث تغییر غلظت کلسیم درون سلولی می‌شوند. همچنین در فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و به دنبال آن ایجاد تغییر در هورمون‌ها و فاکتورهای علامت‌دهی سلول‌ها می‌توانند نقش داشته باشند. ROS از روش‌های مختلف نظیر آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای علامت‌دهی سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن‌ها و غیره می‌تواند به سلول‌ها آسیب وارد کند (۱۳). همکاران گزارش دادند که نانوذرات تیتانیوم اکسید و تیتانیوم کریبد اثرات منفی روی زنده بودن سلول، تکثیر و سلولی MSC را به صورت وابسته به دوز و وابسته به اندازه دارد (۱۴ و ۱۵) تیتانیوم

بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. کد اخلاق مربوط به پایان نامه (IR.TBZMED.REC.1395.967) می باشد.

است امید است با انجام این طرح گام کوچکی در رفع مشکلات احتمالی جراحی‌های ارتوپدی صورت گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به داده‌ها و نتایج به دست آمده در این طرح می‌توان ادعا کرد که به کاربرد نانوذرات تیتانیوم کربید می‌تواند منجر به کاهش سلول‌های بنیادی و کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی می‌شود و هم‌چنین منجر به پیری سلول‌های مزانشیمی می‌شود. نتایج ما می‌تواند گام کوچکی جهت بهبود ایمپلنت‌های به کار برده در جراحی‌های ارتوپدی و کاهش عوارض احتمالی در بیماران شود.

قدردانی

با تشکر از گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم نوین پزشکی که با نویسندگان همکاری نزدیک داشتند.

ملاحظات اخلاقی

با توجه به اینکه کار استخراج سلول از موش انجام گردیده، کلیه اصول اخلاقی در مورد حیوان رعایت شده است. با تقدیر و تشکر از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشکده و دپارتمان

منابع مالی

ندارد

منافع متقابل

هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ر ص مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است. ر و اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. اف اجرا و ترسیم نمودارهای نتایج مطالعه را بر عهده داشت. ع طراحی، اجرا، تحلیل نتایج مطالعه، تدوین و ویرایش نسخه نهایی را انجام داده است.

References

- Ryu S, Yoo J, Jang Y, Han J, Yu SJ, Park J, Jet al. Nanothin Coculture Membranes with Tunable Pore Architecture and Thermoresponsive Functionality for Transfer-Printable Stem Cell-Derived Cardiac Sheets. *ACS Nano*. 2015 Oct 27;9(10):10186-202. doi: 10.1021/acs.nano.5b03823
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14482-6. doi: 10.1073/pnas.96.25.14482
- Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):144-60. doi: 10.1002/path.2498
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22(5):675-82. doi: 10.1634/stemcells.22-5-675
- Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2013 Jul-Aug;13(4 Suppl 2):e1-15. doi: 10.1016/j.pan.2013.07.063
- Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, et al. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010 Dec;10(12):8500-7. doi: 10.1166/jnn.2010.2682
- Hou Y, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hu Y, et al. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3619-30. doi: 10.2147/IJN.S38992
- Li J, Huang Y, Song J, Li X, Zhang X, Zhou Z, et al. Cartilage regeneration using arthroscopic flushing fluid-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel. *Acta Biomater*. 2018 Oct 1;79:202-215. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.029
- Brama M, Rhodes N, Hunt J, Ricci A, Teghil R, Migliaccio S, et al. Effect of titanium carbide coating on the osseointegration response in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(4):595-608. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.018
- Kurella A, Dahotre NB. Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. *J Biomater Appl*. 2005 Jul;20(1):5-50. doi: 10.1177/0885328205052974
- Pourbaix M. Theoretical and experimental considerations in corrosion testing. *Corrosion Science*. 1972 Jan 1;12(2):161-90.

13. Brunicardi F, Andersen D, Billiar T, Dunn D, Hunter J, Matthews J, et al. Schwartz's principles of surgery, 10e. McGraw-hill; 2014.
14. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2015 Jan 22;26(6):062002. doi: 10.1088/0957-4484/26/6/062002
15. Hou Y, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hu Y, et al. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:3619-3630. doi: 10.2147/ijn.s38992
16. Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, et al. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2010 Dec 1;10(12):8500-7. doi: 10.1166/jnn.2010.2682