بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران و
دوازدهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۶-۱۵ بهمن ۱۳۹۸

تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان با استفاده از تحریک نوری نانوذرات طلا

میرحسین سید نظری[۱]، سارا چاوشی نژاد[۲]، محمد حسینی[۱]، هدیه کریمی تار[۱]، لیلا درگاهی[۲]، حمید لطیفی[۱] و محمد اسماعیل زیبائی [۱*]

[۱]پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

*m_zibaye@sbu.ac.ir

چکیده - در این مقاله از تحریک نور ـگرمایی برای تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی به سلول‌های عصبی استفاده شده است. بصورت تجربی سلول‌های پالپ دندان با چگالی cell/ml ۱۵۰۰۰۰ در فلاسک‌های T25 کشت داده شده در ادامه با نانوذرات طلا با غلظت‌های ppm 10^{-1} و 10^{-5} تیمار شده و در نهایت تحت تحریکات نوری قرار می‌گیرند. یک روز پس از اتمام تحریکات نوری میزان زنده ماندن سلول‌ها توسط آزمون MTT مورد بررسی قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از آزمون MTT بهبود میزان زنده‌ماندن سلول‌های تحت تحریکات نوری نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد. علاوه بر این، نتایج حاصل از تحریکات نوری نانوذرات طلا با نتایج بدست آمده از تکنیک اپتوژنتیک، شامل بیان آپسینی، برای سلول‌های پالپ دندانی مقایسه می‌شود. به منظور ارزیابی تمایز، بیان ژن Tubulin که مارکر سلول‌های نورونی است، مورد بررسی قرار می‌گیرد. تجزیه و تحلیل داده‌های کمی PCR (qPCR) نشان می‌دهد که هر دو تکنیک توانایی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی را دارا می‌باشند.

کلید واژه- اپتوژنتیک، تحریک نوری، سلول‌های بنیادی ، گرمایش پلاسمونیکی، نانوذرات طلا

Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cell using Optical Stimulation of Gold Nanoparticle

Mir Hossein seyed Nazari[1], Sara Chavoshi Nezhad[2], Mohammad Hosseini[1], Hedieh Karimi Tar[1], Leila Dargahi[3], and Hamid Latifi[1], Mohammad Ismail Zibaii[1,*]

Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
Neuroscience Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract- In this article, the photothermal stimulation technique was used for cell differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) into nerve cells. Experimentally the hDPSCs were plated at the density of 150000 cells/ml in T25 flask and treatment with AuNPs in 10^{-5} ppm and 10^{-1} ppm. Then optical stimulation was conducted. A day after the last light stimulation, the viability of cells was analyzed with the MTT assay. The result of the MTT assay revealed significant more viability in photothermal stimulation as compared with the control group. In addition, we compared this method with the optogenetic technique using opsin-expressing hDPSCs. For the assessment of differentiation, the expression of gene Tubulin was studied. Analysis of quantitative PCR (qPCR) data shows that both technics can differentiate the stem cells from neuron cells.

Keywords: Optogenetic, Optical stimulation, Stem cells, Plasmonic heating, gold nanoparticle

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

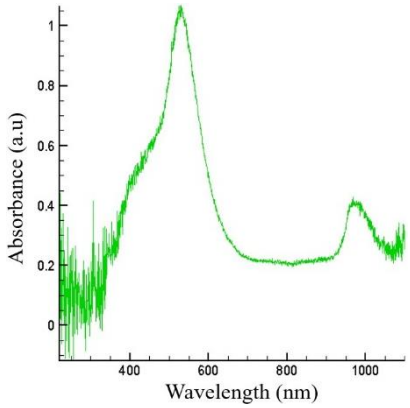
۱- مقدمه

در چندین دهه اخیر نانوفناوری به عنوان یک حوزه تحقیقاتی میان رشته‌ای شناخته شده که از پتانسیل بالای برای تشخیص و درمان بیماری‌ها برخوردار است. ابعاد بسیار کوچک این نانوذرات امکان تعاملشان با مولکول‌های زیستی در سطح و درون سلول را فراهم ساخته است[۱]. گسترش فناوری نانو و کاربرد انواع نانوذرات در حوزه پزشکی، سبب معرفی و پیدایش تکنیک‌های کارآمد همراه با تاثیرگذاری بیشتر نسبت به روش‌های متداول الکتریکی و دارویی شده است. در این میان نانوذرات طلا به دلیل سهولت سنتز، پایداری عالی و قابلیت عاملدار کردن توجهات فراوانی را به خود جلب کرده‌اند[۲]. در این مقاله از دو رویه تحریک نوری برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی استفاده شده است.۱- استفاده از نانوذرات طلا با ابعاد ۵۰ نانومتر و گرمایش پلاسمونیکی حاصل از تحریک نوری این نانوذرات برای تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی به سلول‌های عصبی و ۲- استفاده از روش تیمار اپتوژنتیکی و بیان آپسین چانلرودوپسین بر روی سلول‌های بنیادی. با اینکه بسیاری از مکانیسم‌های بیوشیمیایی، سلولی و ژنتیکی تعاملات نانومواد با سلول‌ها ناشناخته است اما وجود گونه‌های اکسیژن فعال ناشی از تابش نور لیزر بر روی نانوساختارهای طلا می‌تواند منجربه تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی شود.

۲- آزمایشات سلولی

سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی با دارا بودن ویژگی‌های از قبیل قدرت تکثیر بالا، دسترسی آسان و توانایی خودبازسازی به عنوان یک منبع پرتوان درکاربردهای بالینی مطرح بوده و می‌توانند ترمیم کننده عالی در بازسازی بخش‌های آسیب دیده بدن در هر اندام باشند.

پس از آماده‌سازی و کشت سلول‌ها، نیاز بود تا غلظت بهینه نانوذرات طلا با ابعاد ۵۰ نانومتر مشخص شود. برای این منظور از آزمون سنجش بقای سلولی به روش MTT استفاده شد. این یک روش رنگ‌سنجی برای بررسی تکثیر و بقای سلول‌ها است که میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه‌ی مستقیمی دارد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می‌دهد که غلظت‌های 10^{-1} ppm و 10^{-5} ppmغلظت‌های ایمن می‌باشند. در شکل ۱ طیف جذب پلاسمونی برای نانوذرات ۵۰ نانومتری نشان داده شده است.

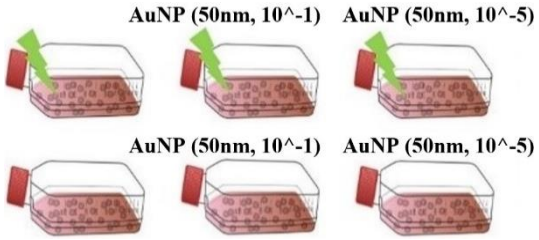


شکل۱: طیف جذب پلاسمونی نانوذرات طلا ۵۰ نانومتری

در ادامه غلظت‌های انتخابی از نانوذرات طلا را به هر یک از فلاسک‌هایT25 که حاوی cell/ml ۱۵۰۰۰۰ اضافه کرده و به مدت یک شبانه‌روز داخل انکوباتور در شرایط ۵٪ CO_2 ، ۹۵٪ O_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند تا احتمال جفت‌شدگی نانوذرات طلا با سلول‌ها افزایش یابد. در شکل ۲ طرحواره‌ای از گروه‌های کنترل و تیمار نمایش داده شده است.

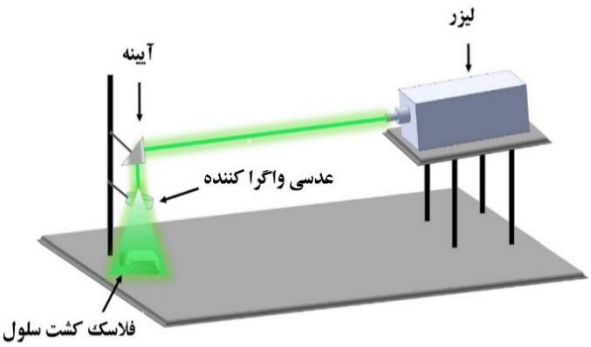
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]



شکل۱: طرحواره‌ای از گروه‌های کنترل و تیمار مورد مطالعه

در ادامه سلول‌ها تحت تحریکات نوری با فرکانس ۱۰Hz، سیکل تابش‌دهی ٪۵۰ در بازه زمانی ۵ روز قرار می‌گیرند. پس از اتمام تحریکات نوری مجددا با استفاده از آزمون MTT میزان زنده ماندن سلول‌ها تحت تحریکات نوری بررسی می شود. در شکل ۳ طرحواره‌ای از سیستم تحریک نوری سلول‌های جفت شده با نانوذرات طلا نشان داده شده است.



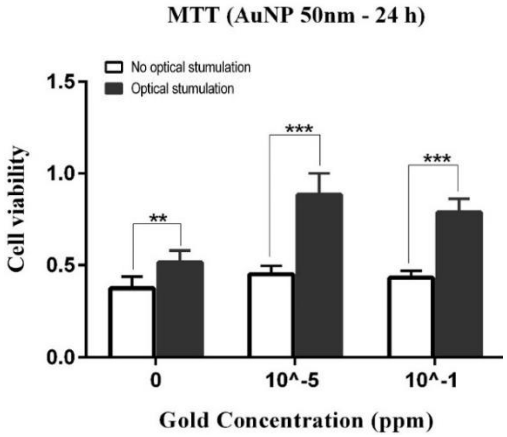
شکل۳: طرحواره‌ای از چیدمان تحریک نوری سلول‌های بنیادی جفت شده با نانوذرات طلا

در روش اپتوژنتیکی سلول‌های پالپ دندانی با آپسین چنلرودپسین تیمار شده و مطابق سیستم و مشخصات تحریک نوری نانوذرات، تحت تابش‌دهی با طول موج ۴۷۳ نانومتر قرار می‌گیرند. پس از اتمام فرآیندهای قبلی، به ارزیابی سلولی_مولکولی پرداخته می‌شود. آغاز این فرآیند با استخراج RNA می‌باشد. از آنجایی که بررسی دقیق ژن‌های مورد مطالعه به تعیین مقدار mRNA نیاز دارد برای همین منظور از روی RNA به روش نسخه‌بردای معکوس(cDNA)، DNA سنتز می‌شود. اساس سنتزcDNA بر مبنای آنزیم نسخه‌برداری معکوس است که قابلیت سنتز DNA تک‌رشته‌ای از روی توالی RNA تک‌رشته‌ای را دارد. پس از سنتز cDNA نیاز است تا فرآیند PCR انجام گردد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک تکنیک برگرفته از همانند سازی DNA در درون سلول است که شامل سه مرحله واسرشت DNA دورشته‌ای، اتصال پرایمر و تکثیر DNA هدف توسط آنزیم پلیمراز است. مرحله آخر واکنش Real-Time PCR است. این مرحله شباهت بسیاری به تکنیک PCR دارد با این تفاوت که Real-Time PCR برای سنجش کمی توالی تکثیر استفاده می‌شود. برای این منظور نیز از یک نشانگر فلورسنتی برای ردیابی میزان تکثیر محصول استفاده می‌شود.

۳- نتایج تجربی

۳-۱ نتایج آزمون MTT

نتایج حاصل از آزمون MTT برای تحریک نوری سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی حاوی نانوذرات با ابعاد ۵۰ نانومتر در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل۴: نتایج حاصل از آزمون MTT برای تحریک نوری سلول‌های بنیادی حاوی نانوذرات طلا با ابعاد ۵۰ نانومتر

نتایج حاصل بیانگر بهبود در فرآیند زنده‌ماندن سلول‌ها تحت تحریکات نوری نانوذرات طلا می‌باشد. اگرچه مکانیسم دقیق تابش‌های لیزری و اثرات آن بر روی روند تکثیر سلولی بصورت واضح مشخص نیست ولی داده‌های تجربی بیانگر

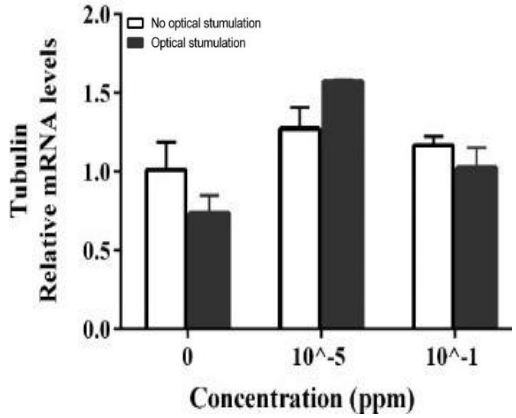
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]

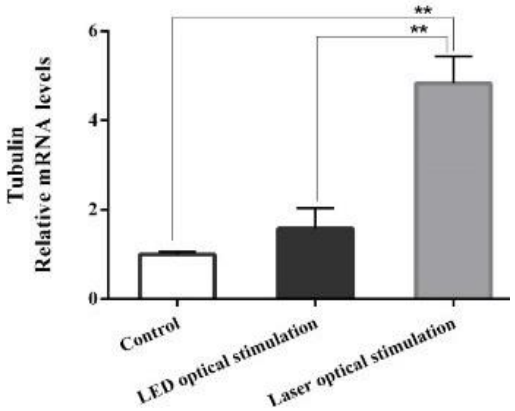
این موضوع می‌باشد که تابش نور لیزر منجربه افزایش گونه‌های اکسیژن فعال وابسته به شدت تابش فرودی می‌شود و افزایش میزان تکثیر سلولی و فرآیندهای میتوکندری می‌تواند نتیجه جزئی از گونه‌های اکسیژن تولید شده تحت تابش‌های لیزری باشد[۳].

۳-۲ نتایج حاصل از واکنش Real-Time PCR

نتایج حاصل از واکنش Real-Time PC ژن Tubulin که که مارکر سلول‌های عصبی، نورون‌ها، می‌باشد برای گرمایش پلاسمونیکی و تیمار اپتوژنتیکی در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل۵: نتایج حاصل از واکنش Real-Time PCR برای ژن Tubulin در سلول‌های که حاوی نانوذرات ۵۰ نانومتری می‌باشند.



شکل۶: نتایج حاصل از واکنش Real-Time PCR ژن Tubulin برای تیمار اپتوژنتیکی

یکی از بارزترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، تغییر مسیر تمایزی تحت تاثیر شرایط محیطی بوده و با تغییر شرایط محیطی، رشد و تکثیر آنها در جهت تمایز خاصی قرار می‌گیرد. گرمایش پلاسمونیکی حاصل از تحت تابش قرار گرفتن نانوذرات طلا با تغییر شرایط محیطی سلول‌های بنیادی می‌تواند شرایط را برای تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عصبی فراهم سازد. از سوی دیگر وجود گونه‌های اکسیژن فعال ناشی از تابش نور لیزر می‌توانند با فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی و بهبود فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها، شرایط را برای تمایز به سلول‌های عصبی فراهم سازند[۴].

۴- نتیجه گیری

بطور کلی، نتایج حاصل بیانگر این موضوع می‌باشد که بیان ژن Tubulin در هر دو رویه تحریکی افزایش یافته است. بااینحال میزان تمایز به سلول‌های عصبی در سلول‌های که بصورت اپتوژنتیکی تیمار شده‌اند نسبت به روش گرمایش پلاسمونیکی به میزان قابل توجه‌ی بالا است.

۵- سپاسگزاری

این مقاله با حمایت ستاد علوم و فناوری‌های شناختی انجام شده است.

۶- منابع

[1] Polak P., Shefi O.," Nanometric agents in the service of neuroscience: manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles." Nanomedicine, 2015. 11(6): p. 1467-1479.

[2] Long N.N., Vu L.V., Kiem Ch.D., Doanh C.S., Nguyet C.Th., Hang Ph.Ti., Quynh L.M.,"Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles." in Journal of Physics: Conference Series. 2009. IOP Publishing.

[3] Anwer A.G., Gosnel M.E., Perinchery S.M., Inglis D.W., Goldys E.M.,"Visible 532 nm laser irradiation of human adipose tissue-derived stem cells: effect on proliferation rates, mitochondria membrane potential and autofluorescence." Lasers in surgery and medicine, 2012. 44(9): p. 769-778.

[4] Paviolo C., Haycock J.W., Stoddart P.R., McArthur S.L.,"Effects of laser-exposed gold nanorods on biochemical pathways of neuronal cells. in Micro/Nano Materials, Devices, and Systems." 2013. International Society for Optics and Photonics.

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]