

ارزیابی کارآیی نانوذرات سلنیوم در تولید داربست عصبی سلول‌زدایی شده و قابلیت حفظ سلول‌های بنیادی کشت شده بر روی آن‌ها: یک مطالعه آزمایشگاهی

افسانه غلامی^۱، اسداله اسدی^۲، آرش عبدالملکی^۳، صابر زهری^۴

دریافت مقاله: ۰۰/۱/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۰۰/۲/۲۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۰۰/۴/۱۹ پذیرش مقاله: ۰۰/۴/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: سلنیوم یک عنصر کمیاب است و نانوذره آن دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و به دلیل سمیت کم و عملکرد بیولوژیکی عالی دارای کاربردهای زیادی در مهندسی بافت می‌باشد. هدف از این تحقیق تعیین تأثیر نانوذرات سلنیوم در برهم‌کنش سلول‌های بنیادی بر داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی تأثیر نانوذرات سلنیوم در برهم‌کنش سلول‌های بنیادی بر داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک موش صحرایی با استفاده از تکنیک سلول‌زدایی ساندل داربست‌های سلول‌زدایی شده تهیه و در محلول بافر نمکی فسفات حاوی آنتی بیوتیک نگهداری شد. ارزیابی بیومکانیکی و بافت شناسی داربست‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد کشت سلول‌های بنیادی چربی بر روی داربست انجام گرفت و میزان زنده‌مانی سلول‌ها در حضور نانوذرات سلنیوم از طریق آزمون سمیت شناسی (MTT) [۵-(۴-۳)-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] سنجیده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد.

یافته‌ها: آزمون تست کششی نشان داد که بعد از سلول‌زدایی اجزای ماتریکس خارج سلولی نظیر کلاژن، لامنین و الاستین در داربست حفظ شده است. هم‌چنین محتوی DNA به طور معناداری در گروه داربست کاهش یافت ($P < 0.01$). نتایج آزمون MTT، نشان داد که نانوذرات سلنیوم هیچ‌گونه سمیتی بر سلول‌های بنیادی کشت شده بر روی داربست ندارد.

نتیجه‌گیری: قابلیت زیست‌سازگاری داربست و زنده‌مانی سلول‌های بنیادی تحت تیمار با نانوذرات سلنیوم نسبت به گروه کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. بنابراین می‌تواند به عنوان یک فاکتور تقویت کننده برای افزایش کارآیی داربست‌ها به منظور کاربرد در ترمیم ضایعات عصبی مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات سلنیوم، سلول بنیادی، داربست سلول‌زدایی شده، ترمیم، مهندسی بافت

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- (نویسنده مسئول) دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تلفن: ۰۴۵-۳۱۵۰۵۱۸۷، دورنگار: ۰۴۵-۳۱۵۰۵۱۸۷، پست الکترونیکی: asad.asady@gmail.com

۳- استادیار، گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

۴- استادیار، مرکز پژوهشی علوم زیستی و زیست فن آوری، دانشگاه فن آوری‌های نوین سبلان، نمین، ایران

۵- استادگروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

مقدمه

علی‌رغم وجود شواهدی که نشان می‌دهد پتانسیل رشد آکسون پس از آسیب عصب محیطی وجود دارد، بازگرداندن بافت آسیب دیده در شکاف‌های طولانی هنوز هم یک مشکل بالینی است. امروزه مهندسی بافت عصبی به‌عنوان یکی از روش‌های نوین در درمان آسیب‌های طولانی بین دو انتهای عصب می‌باشد، که توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است [۱-۲]. موفقیت مهندسی بافت عصبی عمدتاً تحت تأثیر ترکیب، ریزساختار و همچنین خصوصیات مکانیکی داربست‌های تهیه شده می‌باشد [۳]. در آسیب‌های اعصاب محیطی که منجر به قطع کامل عصب می‌شود فرآیند ترمیم بسیار ضعیف بوده و نیاز به مداخله پزشکی است. هدف اصلی تکنیک‌های ترمیمی، هدایت مناسب آکسون‌های در حال ترمیم به سمت انتهای دیستال عصب آسیب دیده و اندام‌های هدف است [۴-۵]. امروزه در کلینیک یکی از روش‌های درمانی به منظور ترمیم اعصاب آسیب دیده استفاده از اتوگرافت‌های عصبی می‌باشد که به روش استاندارد طلایی نیز معروف است [۶]. با این حال، نظر به محدودیت‌های فراوان اتوگرافت‌های عصبی، پژوهشگران حوزه ترمیم اعصاب و مهندسی بافت‌های عصبی به دنبال روش‌های جایگزینی هستند که ضمن کارآیی درمانی بالا محدودیت‌های پیوند اتوگرافت را نداشته باشند [۷-۸]. داربست‌های سلول‌زدایی شده به دلیل عدم وجود ایمونوژنیسیته و همچنین حفظ فاکتورهای مهم ماتریکس خارج سلولی و قابلیت رگ‌زایی بالا بستر سه بعدی مناسبی را برای چسبندگی و رشد آکسون‌های در حال ترمیم به‌سوی

اندام‌های هدف فراهم می‌آورند [۹، ۱۰]. در این راستا، Gayour و همکاران روشی ارائه کرده‌اند که در آن با استفاده از دترجنت‌های یونی داربست‌های عصبی فاقد سلولی تهیه می‌گردد که در عین فقدان خواص ایمونوژنیسیته، به‌طور قابل قبولی از رشد آکسون‌ها و مهاجرت سلول‌های شوآن در مدل‌های حیوانی پشتیبانی می‌کند [۱۰]. از طرفی یکی از ویژگی‌های ضروری برای داربست‌های زیستی دارا بودن استحکام مکانیکی کافی است تا بتواند در برابر تنش‌های ناشی از حرکت اندام‌ها و فشار وارده بر بافت‌های بدن مقاومت کند [۸].

سلول‌های بنیادی بافت چربی به دلیل فراوان بودن و در دسترس بودن به‌طور گسترده برای تحقیقات بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین، کاربرد درمانی آن‌ها در مطالعات بالینی و تجربی به خوبی نشان داده شده است [۹-۱۱]. این سلول‌ها ظرفیت تمایز به چندین رده سلولی را دارند از این رو دارای پتانسیل لازم برای کاربرد در پزشکی ترمیمی می‌باشند [۱۲].

ظهور فناوری نانو در سه دهه گذشته با گشودن بسیاری از درهای پنهان در پاتوفیزیولوژی بیماری و گزینه‌های درمان، درک کشف و توسعه دارو را تغییر داده است [۱-۲]. انواعی از نانو ساختارها به‌عنوان عوامل درمانی موفق و حامل‌های دارویی خاص استفاده شده است. پزشکی نانو کاربرد تکنیک‌ها و روش‌های مبتنی بر فناوری نانو در تحقیقات پزشکی و اقدامات بالینی برای درمان، تشخیص، نظارت و کنترل سیستم‌های بیولوژیکی است. نانوذرات بسیاری از مشکلات فارماکوکینتیک مرتبط با بسیاری از

داروها را در انواع مختلف بیماری‌ها حل می‌کنند [۱۴-۱۳]. در این میان نانوذرات سلنیوم (Selenium nanoparticles) به دلیل قابلیت دسترسی بالا و کاهش اثرات سمی، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهند که نانوذرات سلنیوم می‌توانند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان با کاهش خطر سمیت سلولی، عمل کنند. تعداد زیادی از گزارش‌ها کاربردهای زیست پزشکی منحصر به فرد نانوذرات سلنیوم را از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضددیابتی نشان می‌دهد [۱۹-۱۵]. از این رو، هدف از پژوهش حاضر تعیین تأثیر نانوذرات سلنیوم در برهمکنش‌های بین سلول‌های بنیادی بافت چربی بر داربست‌های سلول‌زدایی عصب سیاتیک موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه تحقیقاتی نانوزیست فناوری دانشگاه محقق اردبیلی از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۷ تا آذر ماه سال ۱۳۹۸ انجام شد. این مطالعه دارای کد اخلاقی به شماره (IR. UMA.REC.1397.195) می‌باشد. نانوذرات سلنیوم از شرکت نانوپیشگام ایرانیان خریداری شد. به منظور ارزیابی خصوصیات و ویژگی‌های ساختاری نانوذرات از تصاویر میکروسکوپی Scanning electron microscope (SEM) و Transmission electron microscopy (TEM) استفاده گردید.

برای تهیه‌ی داربست عصبی سلول‌زدایی شده نخست عصب سیاتیک پانزده موش صحرایی نر نژاد ویستار برداشته شد، حیوانات توسط مخلوط کتامین و زایلازین با تزریق داخل صفاقی بیهوش شده، موهای پوست ناحیه کمر و پا

(ران) تراشیده شد و به دنبال آن با کنار زدن لایه‌های عضلانی قطعات عصب سیاتیک از محل بالای سه شاخه شدن به طول ۱۵ میلی متر برداشته شد و پاک‌سازی بافت‌های زائد در محلول نمکی بافر فسفات انجام گرفت و بافت به قطعات یک سانتی برش داده شد. در روش سلول‌زدایی ساندل به طور مختصر قطعات عصب سیاتیک ۷ ساعت در آب مقطر دیونیزه و سپس ۱۲ ساعت در محلول تریتون X-۱۰۰ و ۲۴ ساعت در محلول سدیم دزوکسی کولات قرار داده شد و مراحل فوق بار دیگر تکرار شد. در آخر بعد از شستشو قطعات عصب سلول‌زدایی شده در بافر نمکی فسفات ۱۰ میلی مولار محتوی پنی سیلین/ جنتامایسین با $\text{pH} = 7.2$ در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۷].

مطالعه بافت شناسی برای تعیین کیفیت حذف سلول‌ها و لایه میلین و همین‌طور میزان پیوستگی ساختار آندونوریوم پایه، حفظ ترکیب ساختمانی و مولکولی بافت انجام می‌پذیرد. بعد از فیکس کردن اعصاب توسط فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲ تا ۴ ساعت فرآیند آگیری به منظور جلوگیری از چروکیدگی و خراب شدن ساختار قطعات عصب توسط اتانول انجام پذیرفت و بعد از مرحله‌ی قالب‌گیری برای ورود به مرحله‌ی رنگ‌آمیزی برش‌های بافتی نازک توسط دستگاه میکروتوم (مدل ۱۵۱۲ شرکت Leitz ساخت آلمان) به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرومتر تهیه شد. سپس مرحله پارافین زدایی مقاطع بافتی توسط زایلین و آگیری توسط اتانول با درجات نزولی صورت گرفت. در ادامه از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین، رنگ‌آمیزی (DAPI) ۴،۶-

Diamidino-2-phenylindole و رنگ‌آمیزی ماسون‌تری کروم به منظور ارزیابی نمونه‌های بافتی استفاده شد [۸]. در سلول‌زدایی داربست علاوه بر حذف کامل سلولی حذف مواد ژنتیکی نیز مطرح می‌باشد. از این جهت برای اثبات درستی سلول‌زدایی و همینطور بررسی میزان DNA در داربست و نمونه کنترل از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج خریداری شده از شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) استفاده گردید [۵-۲].

برای بررسی استحکام بیومکانیکی و قابلیت کشش داربست، از دستگاه تست کشش (مدل SANTAM ساخت ایران) استفاده شد. به‌طور خلاصه پس از فیکس کردن نمونه‌های داربست و کنترل به طول ۱ سانتی‌متر به گیره‌های دستگاه آزمون کششی با تانسیون ۰/۱ mm/s مورد ارزیابی قرار گرفته و تا حد پاره شدن نمونه ادامه یافت [۲].

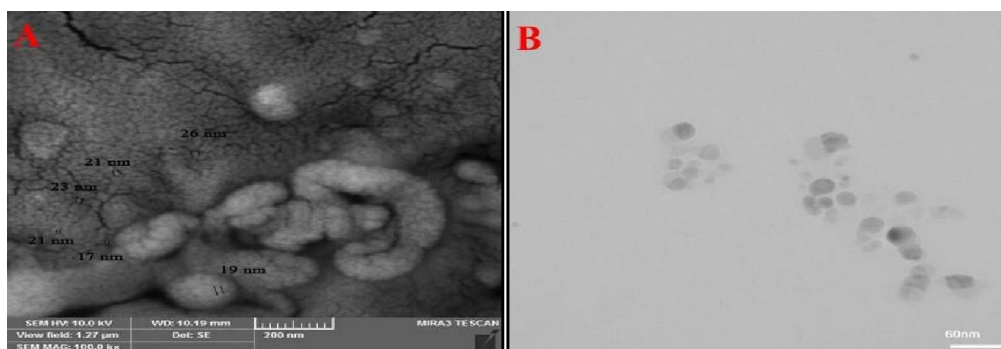
سلول‌های بنیادی بافت چربی از انیستیتو پاستور خریداری شدند، پس از کشت و پاساژ سلولی در پاساژ ۴ سلول‌ها پس از آنکه به تراکم سلولی ۸۰ درصد رسیدند تریپسینه و سپس سانتریفیوژ (مدل Rotina 380 ساخت آلمان) گردید. پس از شمارش سلول‌ها بوسیله لام نتوبار سلول‌ها به روش تزریق با سرنگ همپلتون در سه نقطه در

داربست کشت شد. در نهایت میزان زنده مانی سلول‌ها در گروه‌های آزمایشی پس از کشت سلول‌ها در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت [۵-۲].

تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. نتایج داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شده است. جهت تحلیل واریانس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene و نرمال بودن داده‌ها با آزمون ناپارامتریک Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. سطح معناداری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

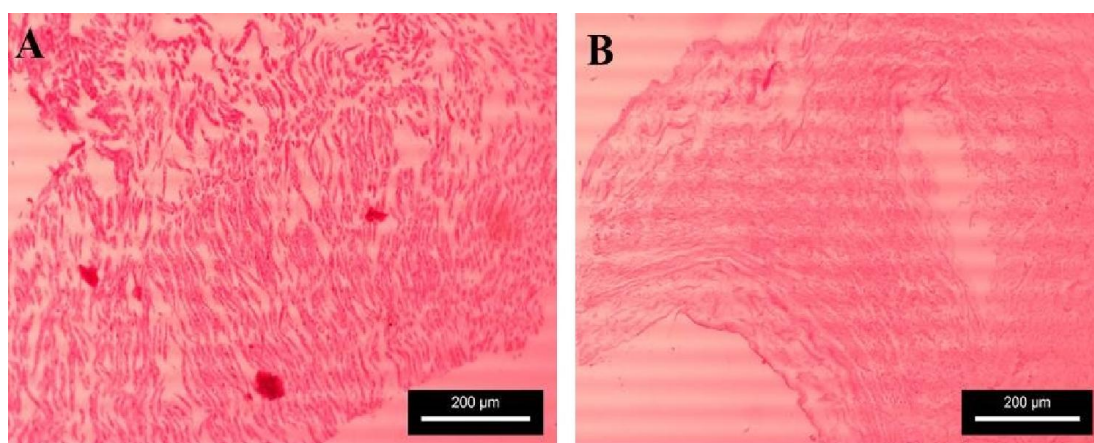
نتایج حاصل از SEM نشان داد که نانوذرات سلنیوم تقریباً هم‌اندازه بوده و قطر تقریبی آن‌ها بین ۱۰ تا ۴۵ نانومتر بود. از نظر مورفولوژی نیز نانوذرات سلنیوم تقریباً کروی بودند (شکل ۱A). همچنین بررسی ریزساختاری نانوذرات حاصل از آنالیز TEM حاکی از آن بود که اندازه نانوذرات سلنیوم کمتر از ۵۰ نانومتر و شکل آن‌ها تقریباً کروی بود (شکل ۱B).



شکل ۱- بررسی خصوصیات به دست آمده از نانوذرات سلنیوم تصاویر SEM (A) و TEM (B). همان‌طور که در تصاویر دیده می‌شود، اندازه نانوذرات کمتر از ۵۰ نانومتر بود و شکل آن‌ها تقریباً کروی می‌باشد.

سلول‌ها قابل مشاهده است که نشان دهنده حذف کامل سلول‌ها در فرآیند سلول زدایی بود (شکل ۲).

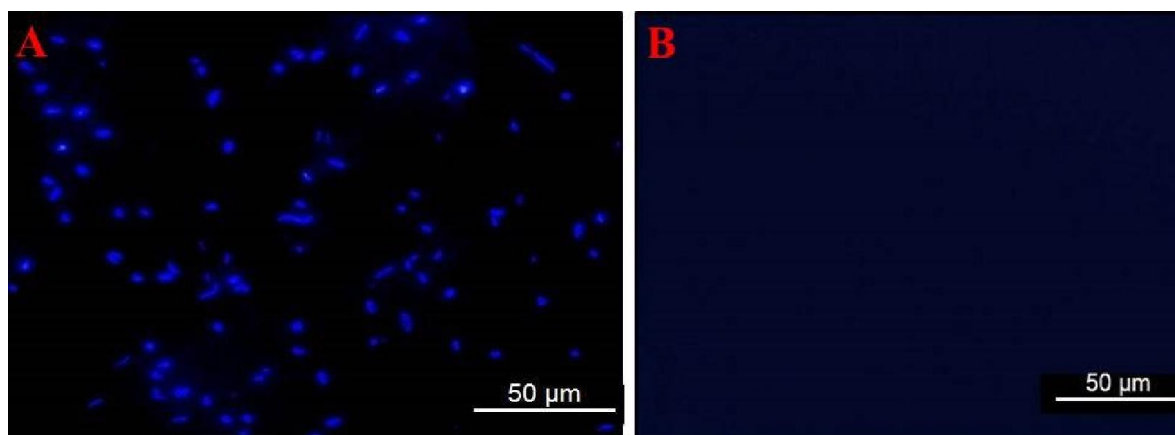
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین (H&E) نشان داد که در داربست‌های سلول زدایی شده هیچ‌گونه هسته سلولی دیده نمی‌شود اما در نمونه کنترل هسته



شکل ۲- بررسی میزان حذف سلولی در عصب سیانیک بعد از سلول زدایی با رنگ‌آمیزی H&E تصاویر، نشان دهنده حذف سلولی کامل از عصب می‌باشد. تصویر A: نمونه کنترل تصویر B: داربست سلول زدایی شده

همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، مقاطع عرضی اعصاب سلول زدایی شده به وسیله DAPI رنگ نگرفته که نشان دهنده حذف کامل سلول‌ها از اعصاب سلول زدایی شده است.

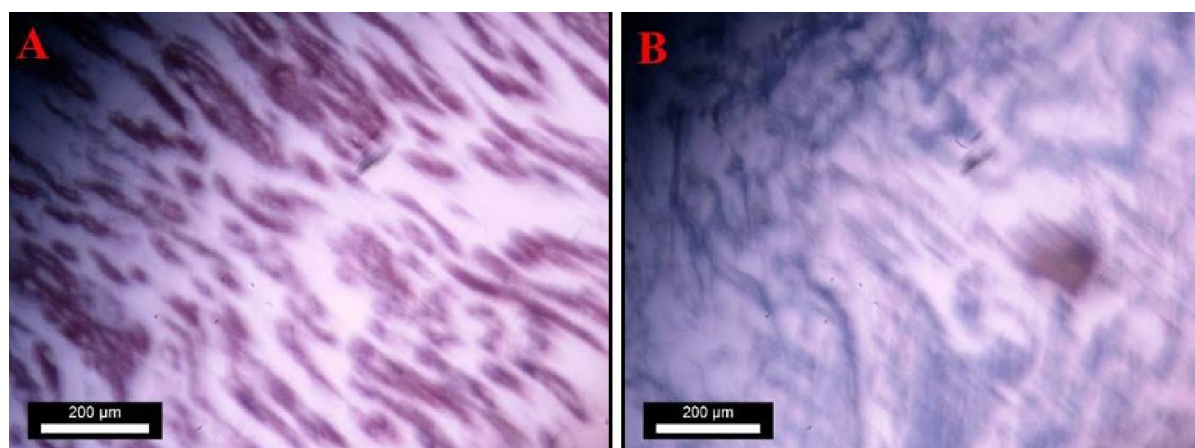
رنگ DAPI نوعی رنگ فلورسنت است که با اتصال به نواحی غنی از بازهای آدنین و تیمین بر روی رشته‌های DNA، هسته سلول‌ها را به رنگ آبی در می‌آورد [۱۰]. به همین دلیل از این رنگ آمیزی جهت بررسی کیفیت حذف سلول‌ها از اعصاب سلول زدایی شده استفاده گردید.



شکل ۳- بررسی نمونه‌های عصب و داربست سلول‌زدایی شده توسط رنگ آمیزی DAPI. تصویر A نمونه کنترل. تصویر B داربست سلول‌زدایی شده. تصویر نشان دهنده حذف کامل هسته سلول‌ها از داربست می‌باشد.

رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم نشان داد که در طی سلول‌زدایی رشته‌های کلاژن در ماتریکس خارج سلولی بطور نسبی حفظ شده‌اند (شکل ۴).

حفظ ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد زیرا بستر مناسبی را برای کشت و بررسی رفتار سلولی فراهم می‌کند [۷]. نتایج حاصل از

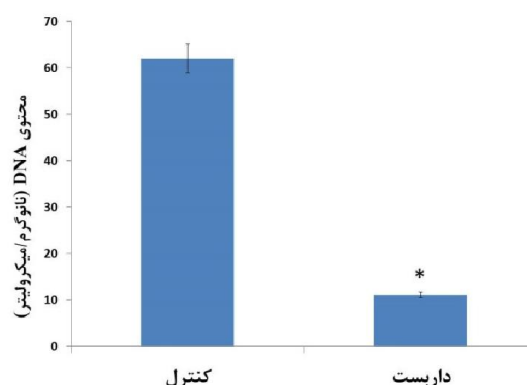


شکل ۴- بررسی حفظ رشته‌های کلاژن در داربست با رنگ آمیزی ماسون تری کروم. بخش‌های آبی رنگ نشان دهنده حضور رشته‌های کلاژن می‌باشد. تصویر کنترل (A) و تصویر داربست سلول‌زدایی شده (B)

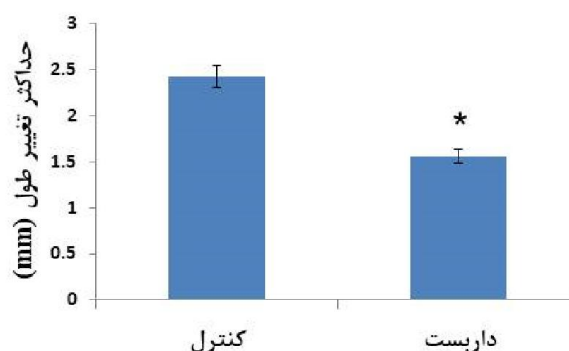
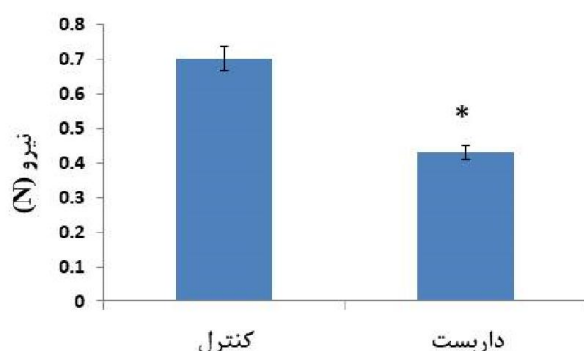
به منظور نشان دادن درستی سلول‌زدایی انجام شده و بررسی میزان DNA در نمونه داربست و کنترل از استخراج DNA استفاده گردید. غلظت DNA در عصب طبیعی و داربست، تفاوت معناداری در داربست سلول‌زدایی شده نشان داد که بیانگر افت غلظت DNA داربست نسبت

به غلظت عصب کنترل می‌باشد ($P < 0.01$) که نشان دهنده حذف حداکثری محتوی DNA در داربست تهیه شده می‌باشد (نمودار ۱).

نمودار ۱- محتوای DNA در نمونه عصب کنترل و داربست سلول‌زدایی شده، داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش داده شده است. برای مقایسه دو گروه از آزمون t استیودنت استفاده گردید. علامت * اختلاف معنادار ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نتایج به دست آمده از آزمون کشش و اندازه‌گیری تغییر طول ناشی از اعمال نیروی کششی نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($P < 0.05$) در میانگین حداکثر نیروی مورد نیاز همچنین میزان افزایش طول تا نقطه شکست در نمونه عصب سالم و داربست سلول‌زدایی شده می‌باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲- نمودارها مقایسه بین حداکثر نیروی کشش تا نقطه شکست بین نمونه کنترل و داربست همچنین مقایسه میانگین حداکثر تغییر طول بین نمونه‌های کنترل و داربست را نشان می‌دهد، داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش داده شده است. برای مقایسه دو گروه از آزمون t استیودنت استفاده گردید. علامت * اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p < 0.05$).

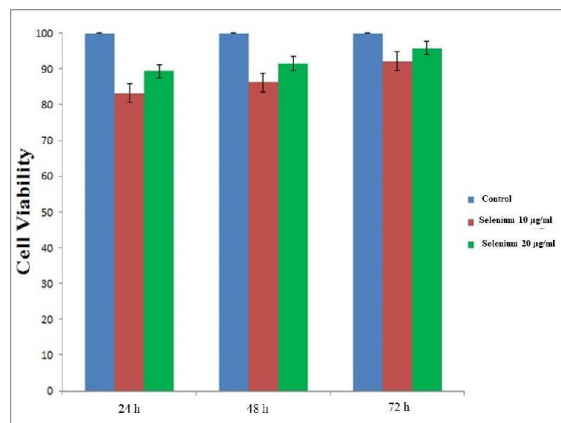
غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نانوذرات سلنیوم انجام پذیرفت. نتایج به دست آمده حاکی از قابلیت چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست‌ها بود، همچنین نمایانگر این بود که این نانوذرات هیچ گونه سمیتی بر سلول‌های بنیادی چربی نداشته‌اند (نمودار ۳).

به منظور ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی کاشته شده بر روی داربست‌های سلول‌زدایی شده از آزمون MTT استفاده شد. در این آزمون میزان جذب نوری هر نمونه ارتباط مستقیمی با تعداد سلول‌های زنده موجود در نمونه دارد. آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تیمار سلول‌های بنیادی چربی با

عصبی است [۱۸، ۵]. نانوذرات سلنیوم به دلیل خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی و الکتریکی خود در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این نانوذره شبه فلزی هم‌چنین به واسطه خواص بیولوژیک مختلف خود هم‌چون خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی و تقویت کنندگی سیستم ایمنی امروزه به-عنوان یکی از نانوذرات مهم در علوم پزشکی مورد توجه محققان این رشته نیز قرار گرفته است [۲۰-۱۹].

در این پژوهش نتایج آنالیزهای بافتی نشان داد که سلول زدایی به درستی انجام شده است و در داربست‌های سلول زدایی شده عصب ساختار داربست‌ها شامل اجزای ماتریکس خارج سلولی به طور قابل قبولی حفظ شده‌اند. با توجه به این که کشش یکی از مهم‌ترین انواع تنش است که به خصوص به هنگام حرکت مفاصل بر اعصاب محیطی وارد می‌گردد، داربست‌های مورد استفاده در ترمیم جراحات عصبی باید از استحکام کششی قابل قبولی برخوردار باشند از این رو نتایج تست‌های بیومکانیکی در این پژوهش نیز نشان داد که ساختار و مقاومت مکانیکی داربست‌ها نسبت به نمونه کنترل بطور مطلوبی حفظ شده است. هم‌راستا با این پژوهش نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داد که تهیه داربست‌های سلول زدایی شده توسط تکنیک Sondell اثرات مخربی را بر ماتریکس خارج سلولی داربست نمی‌گذارد و استحکام کششی آن به طور قابل قبولی حفظ می‌شود [۷-۸].

هم‌چنین نتایج بدست آمده از تست MTT بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تیمار سلول‌های بنیادی چربی با غلظت‌های



نمودار ۳- نمودار ارزیابی قابلیت زنده ماندن سلول‌های بنیادی چربی بر داربست در حضور نانوذره سلنیوم. نمودار نشان دهنده میزان زنده ماندن گروه‌های آزمایش در طول موج ۵۷۰ نانومتر می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش داده شده است. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید.

بحث

عصب محیطی یک بافت شکننده و محافظت نشده است که به راحتی در اثر صدمات جسمی مختلف، از جمله حوادث رانندگی جاده‌ای، سوانح ساختمانی، آسیب‌های ورزشی و صدمات الکتریکی آسیب می‌بیند [۱۶، ۱۰]. پس از آسیب، عصب محیطی توانایی ذاتی خاصی را برای ترمیم خود بدست می‌آورد با این حال، بهبود عملکرد عصب محیطی آسیب دیده همیشه راضی کننده نیست [۱۷]. برای آسیب عصب محیطی با فواصل طولانی، بخیه زدن مستقیم عصب باعث ایجاد تنش بیش از حد و منجر به عدم ترمیم صحیح عصب می‌شود. بنابراین، برای پیوند در ناحیه شکاف ایجاد شده، به داربست‌های عصبی نیاز است تا به استقرار تونل احیاء کننده کمک کند. از این رو، طراحی داربستی ایده‌آل که محیطی مناسب برای چسبندگی و رشد آکسون‌های در حال ترمیم فراهم آورد هدفی کلیدی در علم مهندسی بافت

۱۰، ۲۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نشان داد که این نانوذرات هیچ‌گونه سمیت معناداری بر سلول‌های بنیادی چربی نداشته‌اند و باعث افزایش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست‌های تهیه شده می‌گردند. در این راستا پژوهش‌های پیشین نشان دادند که سلنیوم دارای ویژگی‌هایی از جمله خاصیت دارویی، آنتی اکسیدانی، پرواکسیدانی، متعادل کردن تکثیر سلولی، افزایش خنثی سازی عوامل سرطان‌زا، مهار تهاجم سلولی و رگ‌زایی تومورها می‌باشد که نقش حفاظتی در برابر مراحل گوناگون سرطان دارد [۲۱-۲۲، ۱۵].

در تحقیقات انجام شده توسط Yazdi و همکاران نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات سلنیوم در موش‌های مبتلا به سرطان پستان در کل روزهای هفته به مدت دو هفته قبل از القاء تومور و سه هفته بعد از آن قادر است طول عمر موش‌ها را افزایش داده و عملکرد سیستم ایمنی را در مقابل رشد تومور از طریق اثرات آنتی اکسیدانی نانوذره تقویت نمایند [۲۳]. همچنین در پژوهش دیگری نشان داده شد که نانوذرات سلنیوم اثر بخشی بالاتر و سمیت کم‌تری در مقایسه با اشکال دیگر سلنیوم مانند سلنیت، سلنومیتوینین و سلنوسیتستین دارند [۲۴]. نتایج این پژوهش نیز اثر بخش بالا و سمیت پایین نانوذرات را تأیید کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات سلنیوم باعث افزایش رشد و همچنین زنده مانگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها گردید که می‌تواند به عنوان یک محرک رشد سلولی باشد، در ارتباط

با این نتایج یک پژوهش حیوانی مطالعات نشان داد که داربست کیتوزان حاوی سلنیوم سبب بهبود عملکرد حرکتی عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی دچار آسیب عصب سیاتیک در مقایسه با گروه کنترل فاقد سلنیوم گردید [۲۵]. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم بررسی اثرات نانوذره در مدل‌های جانوری آسیب سیستم عصبی اشاره کرد از این رو می‌توان برای مطالعات آتی از این داربست‌های تهیه شده همراه با نانوذره سلنیوم در مدل آسیب عصب استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

در داربست‌های تحت تیمار با نانوذرات سلنیوم قابلیت زیست پذیری داربست و زنده‌مانی سلول‌های بنیادی چربی نسبت به گروه کنترل حفظ شده است و همچنین نانوذرات سلنیوم هیچ‌گونه سمیت معناداری بر سلول‌های بنیادی چربی نداشته‌اند. از این رو، برای تأیید این یافته‌ها به تحقیقات بیش‌تری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد که مورد حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی قرار گرفته است و نویسندگان لازم می‌دانند که از این معاونت کمال قدردانی و تشکر را به عمل بیاورند.

References

- [1] Abdolmaleki A, Zahri S, Bayrami A. Rosuvastatin enhanced functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Eur J Pharmacol* 2020; 882 (3): 173–6.
- [2] Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Biosynthesis, characterization and evaluation of the supportive properties and biocompatibility of DBM nanoparticles on a tissue-engineered nerve conduit from decellularized sciatic nerve. *Regen Ther* 2020; 14(2): 315–21.
- [3] Entekhabi E, Haghbin Nazarpak M, Shafieian M, Mohammadi H, Firouzi M, Hassannejad Z. Fabrication and in vitro evaluation of 3D composite scaffold based on collagen/hyaluronic acid sponge and electrospun polycaprolactone nanofibers for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2021; 109(3): 300–12.
- [4] Soluki M, Mahmoudi F, Abdolmaleki A, Asadi A, Sabahi Namini A. Cerium oxide nanoparticles as a new neuroprotective agent to promote functional recovery in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Br J Neurosurg* 2020; 16(1): 1–6.
- [5] Abbaszadeh S, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A, Mahmoudi F. Does Phenytoin Have Neuroprotective Role and Affect Biocompatibility of Decellularized Sciatic Nerve Scaffold?. *GCT* 2021; 31(4): 8–12.
- [6] Abdolmaleki A, Asadi A, Taghizadeh Momen L, Parsi Pilerood S. The Role of Neural Tissue Engineering in the Repair of Nerve Lesions. *Neurosci. J. Shefaye Khatam* 2020; 10 (3): 80–96. [Farsi].
- [7] Ghayour M, Abdolmaleki A, Fereidoni M. Role of extracellular matrix in peripheral

- nerve regeneration process. *JIMS* 2015; 22 (3): 75–8. [Farsi].
- [8] Abdolmaleki A, Ghayour M, Zahri S, Asadi A, Behnam-Rassouli M. Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and its mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration. *TUMSJ* 2019; 77(2): 115–22. [Farsi].
- [9] Ghayour M, Abdolmaleki A, Fereidoni M. Use of stem cells in the regeneration of peripheral nerve injuries: an overview. *Neurosci J Shefaye Khatam*. 2015; 10 (1): 84–98. [Farsi].
- [10] Gayour M, Abdolmaleki A, Behnam-Rassouli M, Mahdavi-Shahri N, Moghimi A. Synergistic effects of acetyl-l-carnitine and adipose-derived stromal cells on improving regenerative capacity of acellular nerve allograft in sciatic nerve defect. *J Pharmacol Exp Ther* 2019; 368(3): 490-502.
- [11] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63(11): 86–92.
- [12] Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr surg* 2012; 129(6): 77–90.
- [13] Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS nano* 2008; 27 (5): 889–96.
- [14] Abdolmaleki A, Asadi A. Importance of Nano Medicine and New Drug Therapies for Cancer. *Adv Pharm Bull* 2020; 19(2): 42–8.
- [15] Khurana A, Tekula S, Saifi MA, Venkatesh P, Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed Pharma* 2019; 111(1): 802–12.

- [16] Gu X, Ding F, Yang Y, Liu J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog neurobio* 2011; 93(2): 204-30.
- [17] Lee JY, Giusti G, Friedrich PF, Archibald SJ, Kemnitzer JE, Patel J, Desai N, Bishop AT, Shin AY. The effect of collagen nerve conduits filled with collagen-glycosaminoglycan matrix on peripheral motor nerve regeneration in a rat model. *JBJS* 2012; 94(22): 2084-91.
- [18] Ghayour MB, Abdolmaleki A, Rassouli MB. Neuroprotective effect of Lovastatin on motor deficit induced by sciatic nerve crush in the rat. *Eur J Pharmacol* 2017; 812 (4): 121-7.
- [19] Shakibaie M, Mohazab NS, Mousavi SAA. Antifungal activity of selenium nanoparticles synthesized by *Bacillus* species MSH-1 against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(9): 26-34.
- [20] Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. In vitro antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *Leishmania infantum*. *J Parasitol Res* 2012; 20(12): 7-13.
- [21] Zeng H, Combs Jr GF. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem* 2008; 19(1): 1-7.
- [22] Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K, Horky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* 2017; 33(2): 83-90.
- [23] Yazdi MH, Mahdavi M, Varastehmoradi B, Faramarzi MA, Shahverdi AR. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biol Tra Elem Res* 2012; 149(1): 22-8.
- [24] Kojouri GA, Sadeghian S, Mohebbi A, Dezfouli MR. The effects of oral consumption

of selenium nanoparticles on chemotactic and respiratory burst activities of neutrophils in comparison with sodium selenite in sheep. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(2): 160–6.

[25] Seil JT, Webster TJ. Electrically active nanomaterials as improved neural tissue regeneration scaffolds. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed* 2010; 2(6): 635–47.

Evaluating the Efficiency of Selenium Nanoparticles in the Production of Decellularized Neural Scaffold and the Ability to Preserve Stem Cells Cultured on Them: A Laboratory Study

A. Gholami¹, A. Asadi², A. Abdolmaleki^{3,4}, S. Zahri⁵

Received: 19/04/2021 Sent for Revision: 16/05/2021 Received Revised Manuscript: 10/07/2021 Accepted: 14/07/2021

Background and Objectives: Selenium is a trace element and its nanoparticle has antimicrobial activity and due to their low toxicity and excellent biological performance, it has many biological applications in tissue engineering. The aim of this study was to investigate the effect of selenium nanoparticles on stem cell interaction on rat decellularized sciatic nerve scaffolds.

Materials and Methods: In this laboratory study, the effect of selenium nanoparticles on stem cell interaction on rat decellularized sciatic nerve scaffold, scaffolds were prepared using Sondell decellularization method and stored in PBS solution containing antibiotics. Biomechanical and histological evaluations of scaffolds were examined using the light microscope. In the next step, adipose stem cells were seeded on the scaffold and the viability of the cells on the scaffold in the presence of selenium nanoparticles were measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Data were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results: The tensile test showed that after decellularization, extracellular matrix components such as collagen, laminin, and elastin were retained in the scaffold. Also, DNA content was significantly reduced in the scaffold group ($p < 0.01$). The results of MTT test showed that selenium nanoparticles had no toxicity on stem cells cultured on the scaffold.

Conclusion: The biocompatibility of scaffolds and the viability of stem cells treated with selenium nanoparticles were not significantly different from the control group. Therefore, it can be evaluated as a reinforcing factor to increase the efficiency of scaffolds for the use in regeneration of the nerve lesions.

Key words: Selenium nanoparticles, Stem cell, Decellularized scaffold, Regeneration, Tissue engineering

Funding: This study was funded by University of Mohaghegh Ardabili.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of University of Mohaghegh Ardabili approved the study (IR.UMA.REC.1397.195).

How to cite this article: Gholami A, Asadi A, Abdolmaleki A, Zahri S. Evaluating the Efficiency of Selenium Nanoparticles in the Production of Decellularized Neural Scaffold and the Ability to Preserve Stem Cells Cultured on Them: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2021; 20 (7): 733-46. [Farsi]

1- MSc, Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0003-3315-2944

2- Associated Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0003-3314-2948 (Corresponding Author) Tel: (045) 31505187, Fax: (045) 31505187, E-mail: asad.asady@gmail.com

3- Assistant Prof., Dept. of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran, ORCID: 0000-0002-7454-8728

4- Assistant Prof., Bioscience and Biotechnology Research Center (BBRC), Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Iran, ORCID: 0000-0002-7454-8728

5- Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0002-1470-7694