



بررسی سنجش چرخه سلولی آپوپتوز- نکروزه روش فلوسایتومتری در سلول های فیبروبلاست پوست

ملیکا دهقانی سانج^{۱*}

۱- م کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی یادگار امام شهرری، ری، ایران. ایمیل: melika.dehghany7172@gmail.com

* نویسنده مسئول

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی سنجش چرخه سلولی آپوپتوز- نکروزه روش فلوسایتومتری در سلول های فیبروبلاست پوست می باشد. به منظور بررسی میزان مرگ سلولی، سلول های تیمار شده با نانودارو و قیاس آن با جمعیت سلولی گروه کنترل (منفی) شاهد، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ V-Annexin و پروپیدیوم یدید (PI) توسط کیت (Biolegend) صورت گرفت. در طی فرآیند آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین سطح داخلی غشا سیتوپلاسمی، به خارج سطح غشای پلاسمایی انتقال می یابد. به منظور تعیین اثرات نانودارو در جهت القا آپوپتوز و یا نکروز، درصد سلول های مستقر در هر ناحیه توسط نرم افزار دستگاه فلوسایتومتری flowjo در هر بار تکرار محاسبه می شود. نتایج به وضوح نشان می دهند که درصد سلول های آپوپتوز شده در سلول های تیمار شده با نانودارو نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. بررسی مقایسه ای مرگ سلولی (آپوپتوز اولیه- ثانویه- نکروز) در گروه تیمار و کنترل. میزان و نوع مرگ سلولی در گروه تیمار و کنترل نشان داده که نشان دهنده، عدم اختلاف سطح معنادار بین انواع مرگ سلولی است. در ۲۴ ساعت است. بررسی مقایسه ای مرگ سلولی (آپوپتوز اولیه- ثانویه- نکروز) در گروه تیمار و کنترل نشان داده که عدم اختلاف سطح معنادار بین انواع مرگ سلولی است. در ۴۸ ساعت است.

کلمات کلیدی: فیبروبلاست پوست، چرخه سلولی آپوپتوز- نکروز، فلوسایتومتری.

Study of measuring the apoptosis-necrosis cell cycle by flow cytometry in skin fibroblast cells

Melika Dehghani Sanij^{1,*}

1- MSc in Biochemistry, Islamic Azad University of Rayy Yadgar Imam, Rayy, Iran. Email: melika.dehghany@gmail.com

* Corresponding Author

Abstract

The aim of the present study is to study the measurement of the apoptosis-necrosis cell cycle by flow cytometry in skin fibroblast cells. In order to investigate the rate of cell death, cells treated with nanodrug and compare it with the cell population of the control (negative) group, the cells were stained with two dyes: V-Annexin and propidium iodide (PI) by the Biolegend kit. During the apoptosis process, phosphatidylserine on the inner surface of the cytoplasmic membrane is transferred to the outer surface of the plasma membrane. In order to determine the effects of nanomedicines in inducing apoptosis or necrosis, the percentage of cells located in each area is calculated by the flowjo flow cytometry software at each repetition. The results clearly show that the percentage of apoptotic cells in cells treated with nanomedicines has increased compared to the control group. Comparative study of cell death (primary-secondary apoptosis-necrosis) in the treatment and control groups. The rate and type of cell death in the treatment and control groups showed that there is no significant difference between the types of cell death. At ۲۴ hours. Comparative study of cell death (primary-secondary apoptosis-necrosis) in the treatment and control groups showed that there is no significant difference between the types of cell death. At ۴۸ hours.

Keywords: Skin fibroblasts, cell cycle apoptosis-necrosis, flow cytometry.

مقدمه

بلاست ها به میو فیبرو بلاست ها مؤثر باشد. ساختار و عملکرد فیوبلاست ها در حضور فاکتور TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 (TGF-β3 مترشح از ماکروفاژها تغییر یافته و تحت تمایز فنو تیپ قرار می گیرند. در ابتدا TGF-β1 و TGF-β2 فیبرو بلاست ها را از طریق گیرنده های اینتگرینی شان تحریک به اتصال به

از آنجا که فیبرو بلاست ها در بافت سالم توسط ساختار شبکه ای ماتریس خارج سلولی تحت محافظت تنش قرار می گیرند، در هنگام جراحات این حفاظت تنش از دست می رود که ممکن است در فراخوانی و تمایز فیبرو

یوسفی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه ای به بررسی اثر آنتی باکتریال نانوذرات مس بر سوش های باکتریایی شایع در عفونت های بیمارستانی پرداختند. نانوذرات مس با موفقیت با روش قوس الکتریکی سنتز شدند. در جریان ۵۰ آمپر، آنالیزهای TEM (Transmission electron microscope)، XRD (X ray diffraction) و SEM (Scanning electron microscope) نشان دهنده ی شکل گیری ذرات به نسبت خالص، به شدت پراکنده و قهوه ای رنگ نانوذرات مس با متوسط اندازه ی ۲۰ نانومتر بود. این نانوذرات سپس در تست انتشار دیسکی به کار گرفته شدند. نتایج این تست نشان داد که اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین نسبت به نانوذرات مس حساس می باشند. اثر نانوذرات مس بر اشرشیا کلی از سفالکسین بیشتر ولی از سیپروفلوکساسین کمتر است. اثر نانوذرات مس بر استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین از وانکومایسین بیشتر ولی از لینزولید کمتر بود. دیگر سوش های باکتریایی به طور کامل به نانوذرات مس مقاوم بودند به طوریکه هاله ی مهار رشد در اطراف چاهک های حاوی نانوذرات مس در هیچ کدام از پلیت های کشت این باکتری ها مشاهده نشد. بطور کلی نتایج نشان داد، می توان از نانوذرات مس در درمان و یا پیشگیری از عفونت های حاصله از اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین استفاده کرد.

Schultz (۲۰۱۱) در مطالعه ای مروری به نقش نانوذرات مس در ترمیم زخم های مزمن پرداختند. نانوذراتی مانند نقره، طلا و مس از طریق مهار سنتز پروتئین، پراکسیداسیون غشای سلولی و از بین بردن اسیدهای نوکلئیک باکتری ها و ویروس ها با فرآیندهای عفونی مبارزه می کنند. در میان نانوذرات زیست فعال، مس نقش پیچیده ای در سلول های مختلف ایفا می کند، چندین سیتوکین و مکانیسم های عمل فاکتور رشد را تعدیل می کند و اساساً در تمام مراحل فرآیند بهبود زخم نقش دارد. مهمتر از آن، مس نقش کلیدی در بازسازی و رگ زایی پوست دارد و از طریق القای فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و رگ زایی توسط عملکرد فاکتور ۱-آلفا (HIF-1 α) ناشی از هیپوکسی که مس HIF- را تقویت می کند، روند بهبود را تسریع می کند Sen و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده اند که مس با اثر بر رگزایی سبب تسریع ترمیم زخم می شود. درمان موضعی با ۲۵ میکرومولار از یون مس هرروز به مدت ۵ روز به طور چشمگیری سبب افزایش بیان VEGF شده و تسریع در فرآیند ترمیم و بهبود کیفیت بافت بازسازی شده را موجب خواهد شد. مطالعات *vivo in* نشان داده اند که مس نه تنها به عنوان فاکتور شرکت کننده در رگزایی بوده بلکه به عنوان یک عنصر رگ زا نیز مطرح می باشد (Bogdanovi et al., 2014). ترمیم زخم به عنوان یکی از چالش های مهم امروزی در دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. از میان شیوه های درمانی متعددی که جهت بهبود زخمها وجود دارند تاکنون روشی پاسخگوی دو چالش اصلی ترمیم زخم یعنی مسئله رگزایی و حضور باکتریهای موجود در سطح زخم نبوده است. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد نانوذره مس یعنی القاء رگزایی، خاصیت ضد میکروبی و مقرون به صرفه بودن آن نسبت به سایر فاکتورهای معدنی و روش های درمانی موجود، نانوذره مس مورد توجه محققان قرار گرفته است

Alizadeh و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه ای اثر درمانی بالقوه غلظت های مختلف CuNPs، ۱۰۰ μ M، ۱۰۰ μ M، ۱۰۰ μ M، ۱۰۰ μ M و ۱۰۰ μ M غلظت های (۲۰، ۴۰، ۸۰ nm) را در بهبود زخم بررسی کردند. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میکرومولار CuNPs ۴۰ نانومتری و غلظت ۱ میکرومولار CuNPs ۸۰ نانومتر برای سلول های فیبروبلاست، اندوتلیال و کراتینوسیت کشت شده سمی نبود و همچنین غلظت ۱ میکرومولار CuNPs

پروتئین های فیبری ماتریس خارج سلولی می کنند و سپس این اتصال سبب می شود که فیبروبلاست ها شروع به ترشح فیلامنت های اکتین در سیتوپلاسم می کنند. این فنوتایپ به نام پروتو میوفیبروبلاست نامیده می شوند و در حالت فوق تکثیری هستند (Hyper-Proliferative) اما مقدار قابل توجهی از پروتئین های ECM را ترشح نمی کنند که نهایتاً تحت تأثیر عوامل یاد شده و یک زیر لایه صلب به میوفیبروبلاست ها تمایز می یابند. یک از عملکردهای کلیدی فیبروبلاست ها و میوفیبروبلاست ها فراهم کردن نیروهای انقباضی برای جمع کردن لبه های زخم به سمت یکدیگر می باشد. در فرایند ترمیم زخم به منظور مهاجرت های سلولی و بازآرایی های بافتی لازم است تا با سنتز و ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها، ماتریکس خارج سلولی نیز ترمیم شده و وارد عمل شوند. در همین ارتباط فیبروبلاست ها در پاسخ به فاکتورهای رشد اقدام به ترشح و سنتز هر چه بیش تر ماتریکس خارج سلولی به ویژه فیبرهای کلاژن می کنند (Babula, 2012; QiushengWang, 2021). در فرایند روند ترمیم زخم مجموعه ای از فاکتور های رشد در محل آسیب بافتی افزایش تولید و ترشح یافته که از آن جمله می توان به فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و رستپور آن (FGF-R) اشاره نمود. بررسی ها نشان داده که ۲۲ عضو خانواده FGF با استفاده از واسطه های پروتئین کینازی موجب القای روند میتوز در سلول هدف خود می شوند. برای مثال FGF1 از پلاکت و ماکروفاژ ترشح شده و موجب فعال سازی لوکوسیت ها و نیز تحریک اپی تلیزاسیون و پیشبرد روند آنژیوژنز و سنتز رشته های کلاژن در موضع زخم شده است FGF7. نیز از فیبروبلاست ها ترشح و موجب تحریک و بازسازی اپی تلیوم در طی روند ترمیم خواهد شد (Zhang et al., 2006). در محل زخم پلاکت ها باعث افزایش بیان فاکتور های رشد مختلف از جمله PDGF و EGF گردیده که این فاکتورها به نوبه خود موجب تحریک میتوز و افزایش بیان ژن FGF7 در فیبروبلاست ها می شوند. رستپورهای FGF از نوع تیروزین کینازی بوده و دارای ۴ رده (FGF-R1-4) هستند. برای مثال رستپور نوع R3 بیش تر در غشای سلول های اپی تلیومی و کراتینوسایت ها مستقر بوده و کشش زیادی نسبت به FGF1&2 دارد (Hajhashemi et al., 2012; Ferguson et al., 2021). این رستپورها موجب فعال سازی چندین مسیر سیگنال رسانی نظیر PKB، PLC و MAPK در درون سلول هدف می شوند. بررسی ها نشان داده که فعال شدن مسیر MAPK موجب پیشبرد روند آنژیوژنز و تکثیر سیستم اندوتلیوم می گردد

علیزاده و همکاران (۱۳۹۷) پژوهشی را با هدف بررسی اثر نانوذره مس بر زندهمانی و مهاجرت سلول کراتینوسیت انجام دادند. در این مطالعه تجربی که در پژوهشگاه رویان (شهر تهران) در مهر و آبان ۱۳۹۶ انجام شد، نانوذره مس با غلظت های (۱، ۱۰، ۱۰۰ μ mol) و اندازه های (۴۰ و ۸۰ nm) را بر روی سلول های کراتینوسیت (که از ناحیه ختنه گاه نوزادان ۱۰ روز تا یک ماهه جمع آوری شد) اثر داده، سپس زندهمانی سلول ها در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTS و مهاجرت سلولی با تست Scratch بررسی شد. نانوذره مس در اندازه های ۴۰ و ۸۰ nm با غلظت های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μ mol پس از ۲۴ ساعت غیرتوکسیک بوده و سبب افزایش مهاجرت سلولی شد. همچنین پس از ۷۲ ساعت در اندازه ۸۰ nm و غلظت ۱ μ mol سبب افزایش تکثیر سلول های کراتینوسیت شد. یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد، نانوذره مس در غلظت ۱ μ mol و اندازه ۸۰ nm سبب افزایش مهاجرت و تکثیر سلول های کراتینوسیت شده است.

از میان نانوذرات، مس نقش متعددی در مراحل ترمیم زخم دارد. به عنوان مثال نانوذره مس در تحریک تکثیر سلولهای اندوتلیال و افزایش رگزایی در شرایط برون تنی نقش دارد. همچنین خاصیت آنتی باکتریال مس نیز در مقالات متعددی گزارش شده است.

علاوه بر این، نانوذرات با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر می توانند به طور قابل توجهی تکثیر سلولی را در مدل های *in vivo* و *in vitro* افزایش دهند. عنصر مس به عنوان یک کاتیون بسیار موثر در فرایند بهبود ترمیم زخم می باشد و عملکرد بسیاری از فاکتورهای شرکت کننده در مسیر پیام رسانی ترمیم زخم نیز وابسته به تعامل با عنصر مس بوده و نقش مهمی در مرحله تکثیر و بازسازی زخم دارد (Xie and Kang, 2009). از دیگر کاربردهای عنصر مس شرکت در واکنشهای انتقال الکترون و اتصال به وکلولهای آلی می باشد که برای تنفس سلولی، تنظیم نوروترانسمیتر، سنتز کلاژن و متابولیسم مواد تغذیه‌ای ضروری است. سنتز کلاژن و الاستین در بافت پیوندی وابسته به آنزیمهای حاوی مس از جمله لیزیل اکسیداز است (Lin et al., 2014). آنچه امروزه به آن توجه بیشتری شده است نقش چشمگیر عنصر مس در اندازه نو (۱-۱۰۰ نانومتر) می باشد، زیرا مواد در اندازه‌های کوچکتر دارای نسبت سطح به حجم بالا، سطح کافی برای جذب و واکنشپذیری بیشتری هستند. Zhao و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعات خود نشان داده اند که پیوند زیرجلدی میکروفیبرهای زیستی بورات حاوی مس در رت به صورت قابل توجهی سبب رشد مویرگها و عروق خونی کوچک در مقایسه با میکروفیبرهای سیلیکات و گروه کنترل شده است. در مطالعه‌ای دیگر (Sen و همکاران ۲۰۰۲) نشان داده‌اند که مس با اثر بر رگزایی سبب تسریع ترمیم زخم میشود. درمان موضعی با ۲۵ میکرومولار از یون مس هر روز به مدت ۵ روز به طور چشمگیری سبب افزایش بیان VEGF شده و تسریع در فرایند ترمیم و بهبود کیفیت بافت بازسازی شده را موجب خواهد شد. مطالعات *in vivo* نشان داده‌اند که مس نه تنها به عنوان فاکتور شرکت کننده در رگزایی بوده بلکه به عنوان یک عنصر رگ زا نیز مطرح میباشد (Bogdanovi et al., 2014). ترمیم زخم به عنوان یکی از چالشهای مهم امروزی در دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. از میان شیوههای درمانی متعددی که جهت بهبود زخمها وجود دارند تاکنون روشی پاسخگوی دو چالش اصلی ترمیم زخم یعنی مسئله رگزایی و حضور باکتریهای موجود در سطح زخم نبوده است. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد نانوذره مس یعنی القاء رگزایی، خاصیت ضد میکروبی و مقرون به صرفه بودن آن نسبت به سایر فاکتورهای معدنی و روشهای درمانی موجود، نانوذره مس مورد توجه محققان قرار گرفته است (Mroczek-Sosnowska et al., 2015).

رایج ترین چالش قابل پیشگیری برای ترمیم زخم، عفونت است، که در آن از داروهای ضد میکروبی به صورت موضعی برای جلوگیری از عفونت زخم استفاده شده است. درمان های موضعی روش کلاسیک برای مدیریت زخم هستند. در این تکنیک از ضد عفونی کننده ها، عوامل ضد باکتری و/یا کلونیدی برای جلوگیری از عفونت استفاده می شود. با این حال، برای رویارویی با چالشهای عفونت، دانشمندان به دنبال استراتژیهای جدید مراقبت از زخم هستند. نانوتکنولوژی از طریق کاربرد نانومواد، فصل جدیدی را در درمان زخم گشوده و راه حل هایی را برای تسریع بهبودی و همچنین ارائه خواص متمایز به عنوان عوامل باکتری کش ارائه کرده است (Kalashnikova et al., 2015). در میان نانومواد، نانوذرات زیست فعال به

۸۰ نانومتری باعث افزایش مهاجرت و تکثیر سلولهای اندوتلیال شد. ارزیابی گسترده ترمیم زخم در داخل بدن نشان داد که غلظت ۱ میکرومولار CuNPs ۸۰ نانومتری از طریق تشکیل بافت دانه‌بندی و رگ‌های خونی جدید بالاتر، بهبود زخم را در مدت زمان کوتاه‌تری تسریع می‌کند. نکته مهم، تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی سرم تایید کرد که ۴۰ CuNP نانومتری (۱۰ μM و CuNP ۸۰ نانومتری (۱ μM) هیچ تجمعی در کبد در طول بهبود زخم نشان ندادند. به طور کلی، نتایج نشان داد که غلظت ۱ میکرومولار CuNPs ۸۰ نانومتری یک NP امیدوارکننده برای کاربردهای بهبود زخم بدون عوارض جانبی است. Cardona و همکاران در سال (۲۰۱۵) نیز ترکیب و خاصیت ضدباکتری

اسانس کاکوتی را بر روی چندین گونه از باکتری ها مورد بررسی قرار دادند. اسانس از رشد همه ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمایش جلوگیری کرد که بیشترین اثر را بر روی باکتری سالمونلاتیفی موریوم ۱ میکروگرم در میلی لیتر با MIC 255 داشت. Schlieff در سال ۲۰۰۶ اثر عصاره متانولی پوست تازه پسته (*Pistacia atlantica*) بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پایوژن و باسیلوس سرئوس را در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این گروه نشان داد این عصاره با اثرگذاری بر روی استرپتوکوک پایوژن نسبت به باکتری‌های دیگر و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین؛ کلیندامایسین؛ سفیکسیم بیشترین تأثیر را دارد. با توجه به اندازه قطر هاله عدم رشد، به ترتیب حساسیت: استرپتوکوک پایوژن، استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سرئوس بیشترین تأثیر را دارد. نتایج MIC عصاره بر روی باکتری‌های مورد نظر در روش ماکرودایلوشن معادل ۱/۱۶ $\mu\text{l/ml}$ و میزان MBC آن $\mu\text{l/ml}$ ۲/۳۲ گزارش شد.

در یک مطالعه Zarrintaj و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر اسانس وعصاره کاکوتی کوهی را بر فعالیت باکتریهای آغازگرماست بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد باکتری های آغازگر در همه نمونه های ماست در طول نگهداری کاهش معناداری داشت.

لیو و همکارانش (۲۰۲۰) متوجه شدند، تشکیل اسکار یک مشکل پزشکی غیرقابل حل است که پس از بهبود زخم های پوستی ظاهر می شود. تحقیقات اخیر نشان داده است که اگزوزوم های ترشح شده توسط سلول ۳۱ های بنیادی مزانشیمی چربی انسان (Exos-ASC) می تواند به بهبود زخم کمک کند. برای بررسی بیشتر پتانسیل درمانی Exos-ASC، اثرات آنها بر کاهش تشکیل اسکار، و مکانیسم های اساسی این اثرات را بررسی کردند. آنها کشف کردند که تزریق داخل وریدی Exos-ASC اندازه اسکارها را کاهش داد و نسبت کالژن III به کالژن I در زخم های برش موش را افزایش داد. درمان اگزوزوم نیز از تمایز فیبروبلاست ها به میوفیبروبلاست ها و افزایش نسبت تبدیل فاکتور رشد ۳ (TGF- β ۱-TGF- β) در داخل بدن جلوگیری کرد. علاوه بر این، ما دریافتیم که Exos-ASC ماتریکس متالوپروتئیناز-۳ (3 MMP) بیان فیبروبلاست های پوستی با فعال کردن مسیر MAPK/ERK را افزایش داد. منجر به نسبت با ال 3 MMP به مهارکننده بافتی (متالوپروتئینازهای ماتریکس-1 TIMP)، که برای آن بازسازی ماتریکس خارج سلولی (ECM). نیز مفید است. در نتیجه، نتایج آنها نشان داد که Exos-ASC با تنظیم نسبت های کالژن نوع III، بازسازی ECM را در ترمیم زخم پوستی تقویت می کند نوع I، TGF- β 3-TGF- β 1 و TIMP3 و با تنظیم تمایز فیبروبلاست برای کاهش اسکار تشکیل شد. بنابراین، استفاده از Exos-ASC ممکن است یک رویکرد درمانی جدید برای ترمیم زخم بدون اسکار باشد.

شد. فاز رویی تخلیه شد؛ رسوب DEPC را رقیق شد. نمونه RNA سنتز شده در فریزر ۸۰- درجه برای مراحل بعد نگهداری شد. مقدار RNA با روش تعیین دانسیته نوری OD توسط دستگاه Nano drop و میزان جذب در طول موج ۲۶۰- ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. محلول نهایی تخلیص شده باید دارای جذب ۱،۸ باشد نسبت های کمتر بیانگر آلودگی با پروتئین است.

Real Time PCR3-10-5

تکثیر DNA در ۳ مرحله صورت می گیرد که شامل دناتوراسیون، جفت شدن پرایمر (annealing) و طویل شدن (Elongation) است. هر یک از مراحل در شرایط دمایی خاص خود رخ داده و در نهایت به سنتز DNA منجر می شود. مرحله اول دناتوراسیون: در این مرحله دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه از هم و اسرشت می گردد. مرحله دوم: Annealing به طور معمول دما را در این مرحله برای اتصال پرایمر به DNA تک رشته کاهش می دهند. دمای Annelin ما در این مرحله ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود. مرحله سوم افزایش Extention: در این مرحله برای اتصال آنزیم DNA pol دوباره افزایش دما داریم. (جدول ۱)

جدول ۱: مخلوط واکنش های زیر به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر با افزودن

مواد به ازای هر نمونه

مواد تشکیل دهنده	حجم
Sybir Green	۶ میکرولیتر
پرایمر	۱ میکرولیتر
cDNA	۲ نانوگرم
آب دیونیزه	۳ میکرولیتر

مخلوط واکنشی به حجم نهایی ۱۲ به درون هریک از چاهک های ۸ تایی استریپ ریخته شد و درب آن ها بادرپوش مخصوص پوشانده شد. سپس استریپ ها در دستگاه قرار گرفت و برنامه داده ایی و زمانی مطابق جدول اجرا گردید (جدول ۲).

جدول ۲: شرایط دمایی Real Time PCR برای ژن های (COL1A1 و MMP3)

دما	مدت زمان	مراحل تکثیر
95°	5S	دناتوراسیون
60°	60S	Annealing
95°	120S	Elongation

یافته ها

بررسی سنجش چرخه سلولی آپوپتوز - نکروزه روش فلوسایتومتری

۱. آنالیز نتایج میزان آپوپتوز / نکروز سلول های HFF تیمار شده با نانودارو در ۲۴ و ۴۸ ساعت

در هیستوگرام شکل (۱) نمودارهای a، تحلیل راندمان و مرگ سلولی سلول های مورد بررسی توسط نرم افزار Flowjo دستگاه فلوسایتومتری می باشد. در نمودارهای a، نقاط رنگی موجود در ناحیه (Q1) مربع بالاسمت چپ نشان دهنده سلول های نکروز شده است. ناحیه ی (Q2) بالا سمت راست نقاط رنگی موجود نشان دهنده آپوپتوز Apoptosis Late است و ناحیه (Q3) مربع پایین سمت راست نشان دهنده آپوپتوز زودرس یا Apoptosis Early است. بدین معنا که، سلول زنده است و هنوز غشاء سلولی گسسته نشده است. نقاط رنگی موجود در ناحیه ی (Q4) نشان دهنده سلول

دلیل هزینه کم، نسبت سطح به حجم بالا، پایداری و ایمنی بالا برای کلینیک در نظر گرفته شده اند. در واقع، دانشمندان اخیراً چندین نوع روش را برای تولید NP های آلی یا سنتز NP های معدنی بررسی کرده اند (Barroso et al., 2020; Wang et al., 2018). به دلیل خواص ضد باکتریایی و مشخصات سمیت کم، نانوذرات فلزی مانند مس، نقره، طلا و روی کاندیدای ایده آلی برای ادغام در پانسمان زخم هستند (Negut et al., 2018). در میان NP های زیست فعال، مس (Cu) نقش پیچیده ای در سلول های مختلف ایفا می کند، چندین سیتوکین و مکانیسم های عمل فاکتور رشد را تعدیل می کند و اساساً در تمام مراحل فرآیند بهبود زخم نقش دارد. به دلیل خواص ضد باکتریایی و مشخصات سمیت کم، نانوذرات فلزی مانند مس، نقره، طلا و روی کاندیدای ایده آلی برای ادغام در پانسمان زخم هستند (Negut et al., 2018). در میان NP های زیست فعال، مس (Cu) نقش پیچیده ای در سلول های مختلف ایفا می کند، چندین سیتوکین و مکانیسم های عمل فاکتور رشد را تعدیل می کند و اساساً در تمام مراحل فرآیند بهبود زخم نقش دارد. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از پژوهش حاضر بررسی سنجش چرخه سلولی آپوپتوز - نکروزه روش فلوسایتومتری در سلول های فیبروبلاست پوست می باشد.

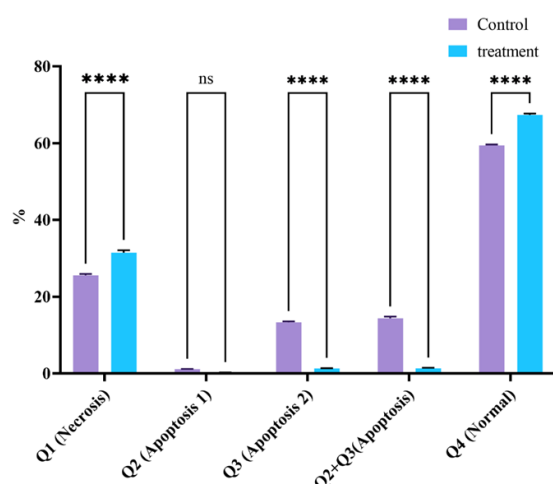
مواد و روش ها

به منظور بررسی میزان مرگ سلولی، سلول های تیمار شده با نانودارو و قیاس آن با جمعیت سلولی گروه کنترل (منفی) شاهد، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ V-Annexin و پروپیدیوم دیدید (PI) توسط کیت (Biolegend) صورت گرفت. در طی فرآیند آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین سطح داخلی غشا سیتوپلاسمی، به خارج سطح غشای پلاسمایی انتقال می یابد. رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشای سیتوپلاسمی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری قرائت می شود. رنگ PI هم به توالی DNA قطعه قطعه شده موجود در هسته سلول های مرده و سلول های نکروز شده، متصل و طول موج آن توسط دستگاه فلوسایتومتری خوانده می شود. در این روش سلول های زنده با PI رنگ نمی شوند. تجزیه و تحلیل نرم افزار دستگاه فلوسایتومتری به صورت منحنی دو بعدی به چهار ناحیه Q1 تا Q4 صورت می گیرد به نحوی که ناحیه Q1 نمایانگر سلول های نکروزی با ویژگی - Annexin و V-PI، ناحیه Q2 نمایانگر سلول های آپوپتوز شده دیررس یا نکروزی با ویژگی + Annexin و V-PI، ناحیه Q3 نمایانگر سلول های آپوپتوز شده جوان یا زودرس با ویژگی + Annexin و V-PI و ناحیه ی Q4 نمایانگر سلول های سالم با ویژگی - Annexin و V-PI می باشد. به منظور تعیین اثرات نانودارو در جهت القا آپوپتوز و یا نکروز، درصد سلول های مستقر در هر ناحیه توسط نرم افزار دستگاه فلوسایتومتری flowjo در هر بار تکرار محاسبه می شود.

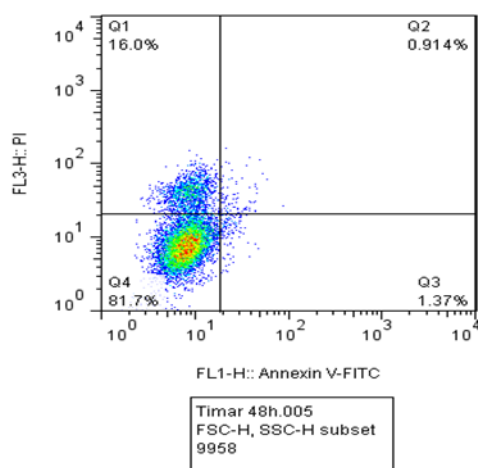
Real Time PCR 3-10 و بررسی بیان کلاژن

به منظور جداسازی RNA از سلول ابتدا آن هادریک لوله فالکن سانتریفیوژ شدند؛ سپس به پالت حاصله میزان ۵۰ میکرولیتر از واکنشگر ترایزول اضافه گردید و بعد آن کو باسیون انجام شد. سلول های لیز شده به فالکن انتقال یافتند؛ سپس کلروفرم به مخلوط اضافه و همگن سازی انجام شد. در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ سانتریفیوژ انجام شد. در فاز بالایی RNA فاز میانی و پایینی DNA و پروتئین حضور دارد. به منظور جلوگیری از پروتئین، حدود ۹۰٪ فاز بالایی به میکروتیوب دیگر منقل و به اندازه حجم مایع ایزوپروپانول افزوده و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام

ناحیه Q2 ۵۲۶٪، آپوپتوز تاخیری، ناحیه Q3 ۱،۴۸٪، آپوپتوز اولیه،
 و ناحیه Q4 ۹۷،۴٪ سلول های زنده می باشد.

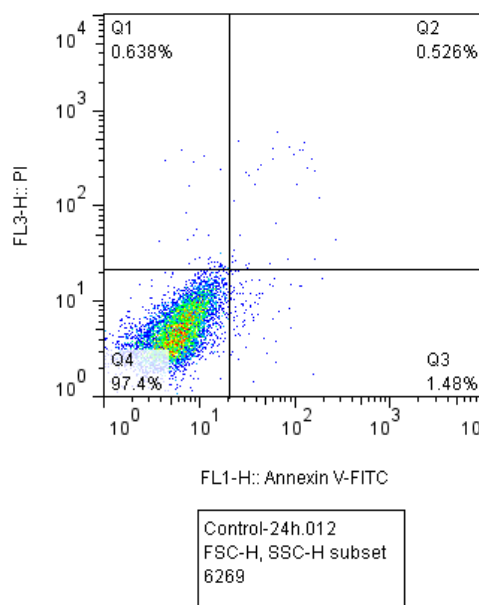
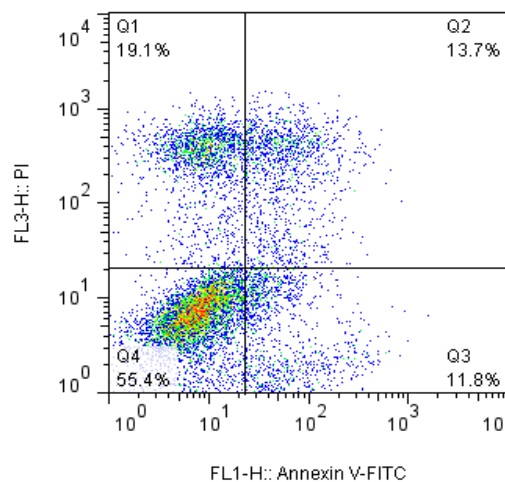


شکل ۲: مقایسه ای مرگ سلولی (آپوپتوز اولیه-ثانویه-نکروز) در گروه تیمار و کنترل. در این نمودار میزان و نوع مرگ سلولی در گروه تیمار و کنترل نشان داده شده است. وجود حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف سطح معنادار بین انواع مرگ سلولی است. در ۲۴ ساعت



شکل ۳: هیستوگرامی گروه تیمار در ۴۸ ساعت. ناحیه Q1 معرف میزان ۱۶.۰٪ نکروز، ناحیه Q2 ۰.۹۱۴٪ آپوپتوز تاخیری، ناحیه Q3 ۱.۳۷٪ آپوپتوز اولیه، و ناحیه Q4 ۸۱.۷٪ سلول های زنده می باشد.

های زنده است. درصد سلول های آپوپتوز و نکروز شده HFF تحت تاثیر غلظت ۱۰ IC50 نانو دارو در شکل (۱) و سلول های گروه کنترل (بدون تیمار دارویی) در نمودار نشان داده شده است. نتایج به وضوح نشان می دهند که درصد سلول های آپوپتوز شده در سلول های تیمار شده با نانودارو نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است.



شکل ۱: نتایج آزمون فلو سایتومتری آپوپتوز Annexin-V

شکل (۲) هیستوگرامی گروه تیمار HFF در ۲۴ ساعت. ناحیه Q1 معرف میزان ۱۹.۱٪ نکروز، ناحیه Q2 ۱۳.۷٪ آپوپتوز تاخیری، ناحیه Q3 ۱۱.۸٪ آپوپتوز اولیه و ناحیه Q4 ۵۵.۴٪ سلول های زنده می باشد. شکل (۳) هیستوگرامی گروه کنترل HFF در ۲۴ ساعت. ناحیه Q1 معرف میزان ۱۶.۰٪ نکروز،

می دهد نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت، درصد زنده مانی را در سلول های نرمال پوست MHFB-1 کاهش می دهند.

Buzea و همکاران (۲۰۰۷) بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه (Artemisia ebra) بر سلول های سرطانی پستان رده سلولی SKBR3 مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه استخراج شد و سلول های SKBR3 با غلظت های مختلف عصاره (۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس توسط روش MTT و فلوسایتومتری، به ترتیب اثر ضد سرطانی و تاثیر عصاره بر چرخه سلولی مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس داده های به دست آمده از تست MTT بیشترین سمیت عصاره برای سلول ها تعیین شد. میزان IC50 مربوط به عصاره هیدروالکلی در ۲۴، ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. از طرف دیگر، نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد این عصاره قابلیت توقف چرخه سلولی در گروه های تیمار ۲۴، ۴۸ ساعت را نیز دارد.

Mihai و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه ای به بررسی کلژن پرداختند. کلژن نوع ۱ فراوان ترین شکل کلژن در بافت ها می باشد و از دو زنجیره یکسان α -1 نوع ۱ و یک زنجیره α -2 نوع ۱ که در یک ساختار مارپیچ سه گانه سازمان یافته است. مطالعات قبلی نشان داده است که کلژن انسانی α -2 نوع (1A 2COL1) سنتز کلژن را در التیام زخم و تولید الاستین در فیبروبلاست های پوستی انسان تقویت می کند. با این حال، اثرات بیولوژیکی کلژن انسانی α -1 نوع (1A 1COL) بر روی خواص مختلف پوست مورد بررسی قرار گرفته است. شناسایی کارایی دامنه های ۱A 1COL در سنتز کلژن نوع ۱ مطالعات قبلی نشان داده اند که کلژن نوع ۱ با سنتز و تکثیر سلول های فیبروبلاست برای حفظ استحکام و خاصیت ارتجاعی پوست مورد نیاز است. گزارش های پیشین حاکی از آن است که پروتئین های مشتق شده از ۱A 2COL باعث تقویت سنتز نوع ۱، تولید الاستین و تکثیر سلول های فیبروبلاست در HDF های معمولی کلژن می شود. در مجموع با توجه به مقالات مستخرج و داده های حاصله تست real time PCR ژن COL1A1 باعث افزایش بیان می شود. با توجه به عملکردهای بیولوژیکی گسترده MMP3 و دخالت آن در انواع بیماری ها این مولکول می تواند به عنوان شاخص و هدف درمانی بیماری ها استفاده گردد. این محققان همچنین دریافتند که اکثر سلول های بنیادی به طور مداوم MMP3 را بیان می کند. MMP3 دارای سوبستراهای زیادی است، همچنین در بروز و توسعه بیماری های مختلف نقش دارند MMP3 یک عامل التهابی شایع می باشد.

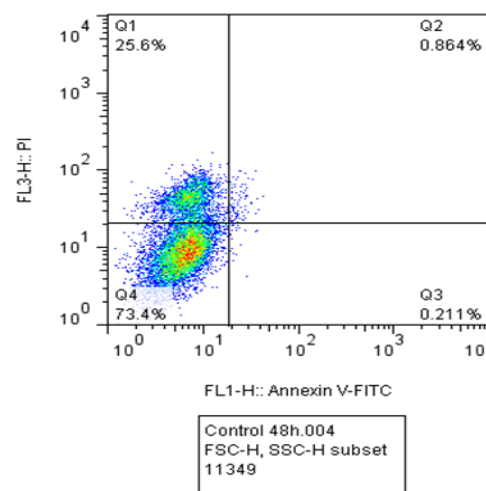
مراجع

علیزاده ساناز، اقدمی ناصر، سیدعلیپور باقر، محمدی پروانه. بررسی اثر نانوذره مس بر زنده مانی و مهاجرت سلول های کراتینوسیت. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۹۷؛ ۷۶ (۸): ۵۴۹-۵۴۳.

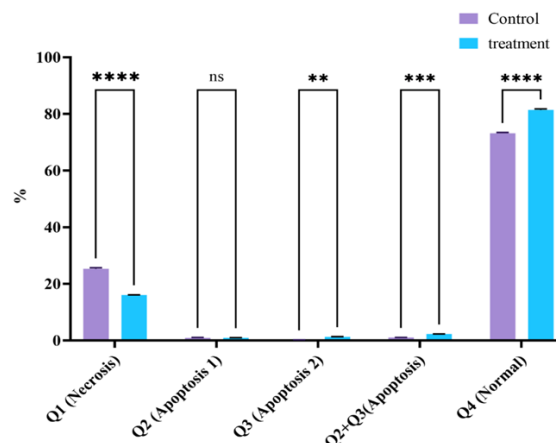
یوسفی، ا.، رفیعی نیا، م.، فاضلی، ج. و کسائی، م. ۱۳۹۲. بررسی اثر آنتی باکتریال نانوذرات مس بر سوش های باکتریایی شایع در عفونت های بیمارستانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان

Alizadeh, S., Seyedalipour, B., Shafieyan, S., Kheime, A., Mohammadi, P., & Aghdami, N. (2019). Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. Dev Cell. 2011;21:193-215. [PubMed] [Google Scholar]



شکل ۴: هیستوگرامی گروه کنترل HFF در ۴۸ ساعت. ناحیه Q1 معرف میزان 25.6% نکروز، ناحیه Q2 ۰.۸۶۴% آپوپتوز تاخیری، ناحیه Q3 ۰.۲۱۱% آپوپتوز اولیه، و ناحیه Q4 ۷۳.۴% سلول های زنده می باشد.



شکل ۵: مقایسه ای مرگ سلولی (آپوپتوز اولیه-ثانویه-نکروز) در گروه تیمار و کنترل. در این نمودار میزان و نوع مرگ سلولی در گروه تیمار و کنترل نشان داده شده است. وجود حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف سطح معنادار بین انواع مرگ سلولی است. در ۴۸ ساعت

نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی سنجش چرخه سلولی آپوپتوز- نکروز به روش فلوسایتومتری در سلول های فیبروبلاست پوست می باشد. **Armulik** و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر نانوذرات نقره بر زنده مانی سلول های نرمال پوست (MHFB-1) بررسی کردند. تیمار شده سلولی نرمال MHFB-1 با غلظت های مختلف (۱۰، ۱۰۰، ۲۵، ۵۰، ۱۲، ۶، ۳، ۱، ۵۵ میکروگرم بر میلی لیتر) نانوذرات نقره با استفاده از تست MTT طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انجام شد. در غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش معنی دار زنده مانی سلول های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد. نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین تاثیر را بر درصد بقا سلول ها داشته و نسبت به گروه کنترل نتایج معناداری مشاهده شد ($p < 0.001$). کمترین میزان کشندگی معنادار سلول های تیمار شده با نانوذرات نقره در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان

- Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*. 2018;23:2392. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- QiushengWang,ShuiqingZhou,LuWang,RenchuanYou,ShuqinYan,Qi angZhang,MingzhongLicBioactive silk fibroin scaffold with nanoarchitecture for wound healing- 1 November 2021, 109165
- Schlieff ML, Gitlin JD. Copper homeostasis in the CNS: a novel link between the NMDA receptor and copper homeostasis in the hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2006;33:81-90. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, Diegelmann RF. Principles of Wound Healing. In: Fitridge R, Thompson M (eds). *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. Australia: University of Adelaide Press, 2011. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, et al. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;282(5):H1821-H7.
- Wang X, Chang J, Wu C. Bioactive inorganic/organic nanocomposites for wound healing. *Appl Mater Today*. 2018;11:308-19. [[Google Scholar](#)]
- Xie H, Kang YJ. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(10):1304- 14.
- Zarrintaj P, Moghaddam AS, Manouchehri S, Atoufi Z, Amiri A, Amirkhani MA, et al. Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12:2403-22. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Zhou N, et al. Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model. *Biomaterials*. 2015;53:379-91.
- Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D.M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 281(23); 15694-15700.
- Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*. 2012;4:739-50. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Barroso A, Mestre H, Ascenso A, Simões S, Reis C. Nanomaterials in wound healing: from material sciences to wound healing applications. *Nano Select*. 2020;1:443-60. [[Google Scholar](#)]
- Bogdanović U, Lazić V, Vodnik V, Budimir M, Marković Z, Dimitrijević S. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters*. 2014;128:75-8.
- Buzea C, Blandino I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases vol 2*. 2007.MR17 - MR172 17(4), 684-690.
- Cardona AF, Wilson SE. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin Infect Dis*. 2015;61:S69-78. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Ferguson, H.R., Smith, M.P., Francavilla, C. (2021). Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and noncanonical partners in cancer signaling. *Cells*, 10; 1201.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Heidari, A.H. (2012). Anti-inflammatory and wound healing activities of Aloe littoralis in rats. *Res Pharm Sci*, 7(2); 73-78.
- Kalashnikova I, Das S, Seal S. Nanomaterials for wound healing: scope and advancement. *Nanomedicine*. 2015;10:2593-612. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Lin Y, Brown RF, Jung SB, Day DE. Angiogenic effects of borate glass microfibers in a rodent model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(12):4491-9.
- Liu T, Xiao B, Xiang F, Tan J, Chen Z, Zhang X, et al. Ultrasmall copper-based nanoparticles for reactive oxygen species scavenging and alleviation of inflammation related diseases. *Nat Commun*. 2020;11:2788. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., & Holban, A. M. (2019). Nanomaterials for wound healing and infection control. *Materials*, 12(13), 2176.
- Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty KP, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):4838-49.