

ORIGINAL ARTICLE

Exploring the Role of Graphene Oxide in Enhancing Neuronal Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Navid Dehnavi¹, Zohreh Moeini², Tahereh Foroutan³

¹Department of Biology Education, Farhangian University, P.O. Box 14665-889, Tehran, Iran.

²Department of Pediatrics, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Kharazmi, Tehran, Iran.

Correspondence

Navid Dehnavi

Email: n.dehnavi@cfu.ac.ir

ABSTRACT

Objective: Nanoparticles, owing to their unique physicochemical properties, have emerged as promising agents for biomedical applications, particularly in tissue engineering and regenerative medicine. Among the various types of nanoparticles, graphene oxide (GO) has garnered significant attention because of its biocompatibility and ability to facilitate cellular processes. This study investigated the role of graphene oxide nanoparticles in promoting neural differentiation of mouse mesenchymal stem cells (MSCs), focusing on the underlying mechanisms and outcomes of such interactions.

Materials and Methods: In this study, bone marrow-derived stem cells were isolated from the femurs of mice using a flushing method. The cells were cultured in three distinct groups for 14 days. Control Group: Cells were cultured in a neural differentiation medium without additives. Group 1: Cells were cultured in a general culture medium supplemented with 1.5 µg/ml of graphene oxide. Group 2: Cells were cultured in neural differentiation medium with 1.5 µg/ml of graphene oxide. To assess the effects of graphene oxide on cell viability and differentiation, MTT assays were employed to evaluate cytotoxicity, while immunocytochemistry (ICC) techniques were used to detect the expression of neural differentiation markers, including Sox2, β-tubulin III, and MAP2.

Results: The results demonstrated that both Group 1 and Group 2 exhibited expression of all three neural differentiation markers, Sox2, β-tubulin III, and MAP2, comparable to that of the control group. This indicates that the presence of graphene oxide, even in general culture medium, can promote neural differentiation. However, it is noteworthy that the dose of graphene oxide used in this study also exhibited no cytotoxic effects on the cells, suggesting a delicate balance between promoting differentiation and maintaining cell viability. The findings of this study underscore the potential of graphene oxide nanoparticles as a tool for enhancing neural differentiation of mesenchymal stem cells. The ability of GO to induce the expression of key proteins associated with neural differentiation without the need for additional nerve growth factors highlights its efficacy as a biocompatible scaffold.

Conclusion: This study provides evidence that graphene oxide nanoparticles can effectively promote the neural differentiation of mouse mesenchymal stem cells. The ability to induce the expression of critical neural markers through both direct cellular interactions and scaffold formation makes graphene oxide a valuable component in neuroregenerative strategies. Future research should focus on elucidating the precise mechanisms by which graphene oxide influences cellular pathways and optimizing its application in stem cell therapy for neurological disorders.

KEYWORDS

Differentiation, Graphene oxide, Mesenchymal Stem Cell, Neuron.

How to cite

Dehnavi, N., Moeini, Z., & Foroutan, T. (2025). Exploring the Role of Graphene Oxide in Enhancing Neuronal Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Animal Biology*, 13(51), 1-11.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تأثیر گرافن اکساید بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به نورون در محیط کشت تمایزی

نوید دهنوی^۱ , زهره معینی^۲، طاهره فروتن^۳

چکیده

هدف: نانوذرات می‌توانند به آسانی از غشای پلاسمایی عبور کنند و از طریق وارد شدن به سلول و اثر بر مسیر سیگنالینگ داخل سلولی و یا از طریق مجتمع‌شدن در محیط کشت و تشکیل داربست به‌عنوان سیستم‌های سازگار و مکانیکی ایده‌آل برای حمایت از تکثیر و تمایز سلولی در نظر گرفته شوند. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر نانوذره گرافن اکساید بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی با روش فلاشینگ از مغز استخوان موش استخراج شد. در سه گروه مختلف به مدت ۱۴ روز کشت یافتند. گروه کنترل (سلول‌های کشت‌یافته در محیط کشت تمایزی عصبی)، گروه ۱ (سلول‌های کشت‌یافته در محیط کشت عمومی و حاوی دوز ۱/۵ µg/ml گرافن اکساید) و گروه ۲ (سلول‌های کشت‌یافته در محیط کشت تمایزی عصبی و حاوی دوز ۱/۵ µg/ml گرافن اکساید). پس از گذشت ۱۴ روز به‌منظور بررسی سمیت سلولی و میزان تمایز عصبی به‌ترتیب از تکنیک MTT و ICC استفاده شد.

نتایج: براساس یافته‌های تکنیک ایمونوسیتوشیمی و سمیت‌سنجی سلولی مشخص شد که هر سه مارکر تمایزی عصبی (Sox2، Btubulin III و MAP2) در گروه ۱ و ۲ همانند گروه کنترل بیان شده و همچنین گرافن اکساید در دوز مورد استفاده اثرات سمی بر روی سلول‌ها نداشته است.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیبی از گرافن اکساید با محیط کشت عمومی و بدون اضافه کردن هیچ فاکتور رشد عصبی دیگر می‌تواند همانند گروه کنترل سبب القای بیان پروتئین‌های مهم دخیل در تمایز نورونی شود.

واژه‌های کلیدی

تمایز عصبی، گرافن اکساید، سلول بنیادی، مغز استخوان.

^۱ گروه آموزش زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵ تهران، ایران.

^۲ گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۳ گروه آموزشی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

نوید دهنوی

رایانامه: n.dehnavi@cfu.ac.ir

استناد به این مقاله:

دهنوی، نوید؛ معینی، زهره و فروتن، طاهره (۱۴۰۳). بررسی تأثیر گرافن اکساید بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به نورون در محیط کشت تمایزی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۳(۵۱)، ۱۱-۱.

مقدمه و پیشینه پژوهش

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی با وظیفه نامشخص در بدن می‌باشند و مانند بازیگرانی عمل می‌کنند که منتظر تعیین نقش خود هستند. در واقع می‌توان گفت در انتظار سیگنال‌هایی می‌باشند که به آن‌ها بگوید باید در بدن چه کار کنند (Chapman, 2017). این سلول‌ها تحت شرایط فیزیولوژیکی یا آزمایشگاهی خاص، القا شده و می‌توانند سلول‌هایی با اعمال تخصصی ایجاد نمایند. تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های تخصص یافته را «تمایز»^۱ می‌گویند (Yang et al., 2022). نشانه‌های درونی مانند ژن‌های سلولی، نشانه‌های بیرونی مانند ترشحات شیمیایی سلول‌های دیگر، تماس فیزیکی توسط سلول‌های مجاور و حضور مولکول‌های معین در محیط، در تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های تخصص یافته نقش دارد (Yu et al., 2021).

تمایز MSC به نرونها در محیط برون‌تنی با گزارش‌هایی که Woodbury (۲۰۰۲) و Ramos (1998) ارائه دادند بسیار مورد توجه قرار گرفت. آنان MSC موشی و انسانی را با استفاده از محیط القایی حاوی DMEM و ترکیبات متفاوتی چون بتامرکاپتوتانول^۲، دی متیل سولفواکساید^۳ (DMSO) و بوتیرات هیدروکسی آنیزول^۴ (BHA) تیمار کردند. طی چند ساعت پس از القا تقریباً ۸۰ درصد MSC تیمار شده به سلول‌هایی با ظاهر شبه عصبی تمایز یافتند. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای Nestin (پروتئین‌های رشته‌ای حدواسط که در سلول‌های نوروایی تلایال بیان می‌شود) و نشانگرهای بلوغ عصبی نشان داد که سلول‌های تیمار شده پنج ساعت بعد از تیمار Nestin را بیان می‌کنند. طبق مشاهدات Sanchez-Ramos معلوم شد که وقتی MSC موشی و انسانی در حضور EGF^۵، رتینوئیک اسید به همراه BDNF القا شوند، می‌توانند نشانگرهای عصبی را نظیر Nestin، NeuN و GFAP را بیان دارند. Jiménez-Acosta et al. (۲۰۲۲) گزارش کردند که هم‌کشتی MSC با برش‌های هیپوکامپ مغز تمایز MSC را به سلول‌های شبه عصبی القا می‌کند، آن‌ها پیشنهاد کردند که تماس سلول-سلول علاوه بر فاکتورهای تروفیک و سایتوکین‌ها، نقش مهمی در تمایز به عصب سلول‌های MSC بازی می‌کند. گرافن ورقه‌ای دو بعدی (۲D) از اتم‌های کربن در یک پیکربندی شش ضلعی (لانه زنبوری) می‌باشد که اتم‌ها با هیبرید SP² به هم متصل شده‌اند (Kim, 2023; Katsnelson,)

(2007; Rao et al., 2009). ویژگی‌های قابل توجه گرافن مانند رسانندگی الکتریکی، کشسانی و جذب پروتئین و مواد با وزن مولکولی کم ممکن است مسیر تمایز سلول‌های بنیادی و تکثیر سلول‌های عصبی را تغییر دهد. ویژگی مهم گرافن که می‌تواند در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گیرد توانایی آن در جذب پروتئین و مواد شیمیایی با وزن مولکولی کم است. به منظور هر دو عمل رشد سلولی و ارتباط با سلول‌های اطراف، سلول‌ها مواد مختلفی را ترشح می‌کنند. این مواد جذب سطح گرافن شده و در تکثیر سلولی و تمایز سلولی اثر می‌گذارند (Rawat et al., 2021). ساختمان شیمیایی محکم گرافن برای اتصال سلول عصبی مناسب است و از آنجایی که سلول‌های عصبی دارای فعالیت الکتریکی هستند و عملکرد آن‌ها براساس فعالیت‌های الکتریکی است، بنابراین هدایت الکتریکی خوب گرافن برای مدل عصبی مناسب است. هدایت دوبعدی بالای گرافن منجر به تحریک در محیط *in vitro* می‌شود. به علاوه شفافیت گرافن اجازه بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های عصبی توسط میکروسکوپ را مهیا می‌سازد. تحریک الکتریکی بدون تماس گرافن باعث تغییر شکل افزایش میانکنش‌های سلول به سلول در محیط *in vitro* می‌شود که این افزایش در تماس سلول به سلول منجر به افزایش در روند سرعت تمایز سلولی می‌شود (Rawat et al., 2021).

گزارش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند نانوذره گرافن سبب افزایش تمایز در سلول‌های بنیادی می‌شود. به عنوان مثال، تأثیر مضاعف گرافن در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول استخوانی در مقایسه با گروه فاقد گرافن مشاهده شده است. از طرفی تأثیر مضاعف گرافن اکساید در تمایز سلول‌های بنیادی القایی (IPSCs)^۶ به سلول‌های عصبی در حضور فاکتورهای تمایزی عصبی به اثبات رسیده است. با توجه به شواهد به دست آمده از آزمایش‌های پیشین، در این پژوهش تصمیم گرفتیم تا تأثیر گرافن اکساید با دوز مشخص (۱/۵ μg/ml) را بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش به سلول‌های عصبی بررسی کنیم. این بررسی در دو حالت مختلف انجام خواهد شد؛ یکی در محیط کشت فاقد فاکتورهای تمایزی عصبی و دیگری در محیط کشت دارای فاکتورهای عصبی. هم‌چنین، نتایج این دو گروه را با گروه کنترل (سلول‌های کشت داده شده در محیط کشت تمایزی عصبی و بدون گرافن اکساید) مقایسه خواهیم کرد.

1. Differentiation
2. Bmercaptoethanol
3. Dimethylsulfoxide
4. Butylated hydroxyanisole
5. Epidermal Growth Factor

روش‌شناسی پژوهش

جهت بررسی اثر تمایزی نانوذرات گرافن اکساید بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش، مغز استخوان موش‌ها در شرایط کاملاً استریل آزمایشگاهی تخلیه شده و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌مترمربع حاوی محیط کشت متناسب با گروه‌های مورد مطالعه کشت داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم استفاده شد. سلول‌ها پس از ۱۴ روز قرارگیری در معرض محیط کشت حاوی گرافن اکساید با دوز $1/5 \mu\text{g/ml}$ ، برای بررسی میزان بیان پروتئین‌های عصبی و میزان اثرات سمی گرافن اکساید بر سلول‌ها، از طریق تکنیک‌های ICC و MTT مورد مطالعه قرار گرفتند.

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان

در پژوهش حاضر، سلول‌های بنیادی مغز استخوان با روش فلاشینگ از مغز استخوان فمور پنج راس موش بالغ نژاد NMRI با سن تقریبی شش تا هشت هفته و وزن ۲۲ تا ۲۵ گرم استخراج شد. این سلول‌ها پس از جداسازی در محیط کشت حاوی DMEM و FBS، ۱۰ درصد، اسیدهای آمینه غیر ضروری ۱ درصد و پنسیلین استیپتومایسین ۱ درصد کشت اولیه داده شدند. پس از چند روز زمانی که سلول‌های مذکور کف پلیت را پر نمودند پلیت‌ها با PBS شست‌وشو داده شده و با استفاده از Trypsin-EDTA سلول‌ها از فلاسک سلولی جدا گشته و در نهایت با سانتریفیوژ و دور ریختن سوسپانسیون رویی سلول‌های حاصله به فلاسک‌های کشت منتقل شدند. کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان در محیط کشت DMEM با روش ذکر شده انجام گردید که پس از بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ در صورت نیاز و تغییر رنگ، تعویض محیط کشت انجام شد.

آماده‌سازی بستر سلولی جهت کشت سلول‌ها در حضور نانوذرات گرافن اکساید

پس از پاساژ سوم، سلول‌ها از فلاسک‌ها جدا و به پلیت‌های شش‌خانه منتقل شدند. قبل از ریختن سلول‌ها، کف هر خانه با لامل استریل پوشانده شد و در هر خانه ۱۰۰ هزار سلول قرار گرفت. پس از سه روز و زمانی که سلول‌ها کف خانه‌ها را پر کردند، محیط کشت عمومی خارج و سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند. گروه کنترل در معرض محیط کشت تمایزی عصبی، گروه ۱ در معرض محیط کشت عمومی حاوی گرافن اکساید با دوز $1/5 \mu\text{g/ml}$ و گروه ۲ در معرض محیط کشت تمایزی عصبی

حاوی گرافن اکساید با دوز مشابه قرار گرفتند. سلول‌ها به مدت ۱۴ روز در محیط کشت مخصوص هر گروه نگهداری شدند و هر دو روز محیط کشت قبلی تعویض شد. قبل از افزودن محیط کشت دارای گرافن اکساید، محلول چندین بار پیپتاژ شد تا ذرات گرافن به طور یکنواخت پخش شوند.

بررسی سمیت سلولی به روش MTT

اندازه‌گیری سمیت سلولی به روش MTT^۱ یک روش رنگ‌سنجی است که برای بررسی سمیت سلولی و فعالیت سیتوتوکسیسیته عوامل دارویی و مواد سمی به کار می‌رود. MTT یک نمک تترازول زرد رنگ است که پس از احیا توسط آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز (به‌ویژه سوکسینات دهیدروژناز) در سلول‌ها به فورامازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود. این روند احیا و تبدیل MTT به فورامازان ارغوانی تنها در حضور آنزیم‌های ردوکتاز فعال موجود در میتوکندری سلول‌های زنده انجام می‌شود، بنابراین این روش مناسب برای تعیین میزان سلول‌های زنده است. برای ارزیابی سمیت سلولی گرافن اکساید بر روی گروه کنترل (سلول‌های قرار گرفته در معرض محیط کشت تمایزی عصبی و مواجهه نشده با گرافن اکساید)، گروه ۱ (سلول‌های قرار گرفته در محیط کشت عمومی حاوی گرافن اکساید با دوز $1/5 \mu\text{g/ml}$) و گروه ۲ (سلول‌های قرار گرفته در محیط کشت تمایزی حاوی گرافن اکساید با دوز $1/5 \mu\text{g/ml}$)، پس از ۱۴ روز تست MTT به روش زیر انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) انجام گرفت. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف در میزان جذب رنگ فورامازان تولیدشده توسط سلول‌ها در سه گروه مورد آزمایش، با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

روش انجام کار

سلول‌های پاساژ ۳ پس از تریپسینه شدن به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه قرار داده شدند. برای هر یک از سه گروه مورد مطالعه (گروه کنترل، گروه ۱ و گروه ۲) سه چاهک از پلیت انتخاب گردید و سلول‌ها به مدت ۱۴ روز در معرض محیط کشت مخصوص هر گروه قرار گرفتند تا اثرات گرافن اکساید القا شود (تعویض محیط هر دو روز یک‌بار انجام شد).

ایمونوسیتوشیمی براساس واکنش بین یک محصول ژن (پروتئین یا هدف مورد نظر) و یک آنتی‌بادی انجام می‌شود. پس از قرار گرفتن سه گروه در معرض محیط کشت مخصوص خود به مدت ۱۴ روز، تست ایمونوسیتوشیمی برای بررسی تأثیر گرافن اکساید بر روند تمایز عصبی سلول‌ها (با تمرکز بر بیان پروتئین‌های Sox2، β -tubulin III و MAP2) بر روی لام‌های کف پلیت‌ها انجام شد.

روش انجام تست ایمونوسیتوشیمی

در جدول (۱) مراحل انجام کار به صورت خلاصه و به ترتیب آورده شده است.

یافته‌های پژوهش

نانوذره گرافن اکساید از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری گردید که همراه با آن تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره^۱ و گذاره^۲ و همچنین آنالیز تفرق اشعه ایکس موجود بود.

آنالیز تفرق اشعه ایکس^۳

اندازه نانوذرات گرافن اکساید مورد استفاده در این پژوهش با کمک آنالیز تفرق اشعه ایکس حدوداً بین ۲ تا ۱۸ نانومتر محاسبه شده است (نمودار ۱). بیش تر ذرات گرافن اکساید قطر ۱۲ نانومتر را نشان دادند.

سپس، محیط کشت رویی از چاهک‌ها تخلیه و پس از شست‌وشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۱۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ mg/ml و ۹۰ میکرولیتر DMEM) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂، محیط کشت حاوی MTT از چاهک‌ها تخلیه و با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد. پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، رنگ تولیدشده در چاهک‌های پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانش شد.

بررسی مورفولوژیکی القای فنوتیپ عصبی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پائو سوم در سه گروه کنترل، گروه ۱ و گروه ۲ با تراکم صد هزار سلول در هر خانه از پلیت شش خانه کشت داده شدند. طول دوره تمایز چهارده روز بود که در طول این مدت هر دو روز یک‌بار محیط کشت هر گروه تخلیه و با محیط کشت ویژه همان گروه جایگزین شد. پس از پایان دوره تمایز به منظور بررسی فنوتیپ‌های عصبی عکس برداری از سلول‌ها با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس انجام شد.

بررسی بیان پروتئین‌های عصبی به روش ایمونوسیتوشیمی

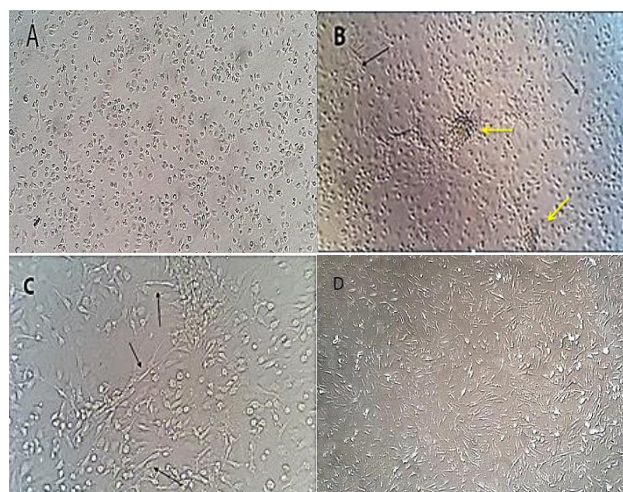
علاوه بر ارزیابی مورفولوژیکی، تمایز عصبی سلول‌ها از نظر بیان نشانگرهای عصبی نیز مورد بررسی قرار گرفت. تست

جدول ۱. خلاصه مراحل انجام تست ایمونوسیتوشیمی

مرحله	توضیحات
۱	شست‌وشوی سلول‌ها با PBS به مدت ۵ دقیقه (سه بار)
۲	فیکس کردن سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد (PFA) در دمای اتاق
۳	شست‌وشوی سلول‌ها با محلول PBS/Tween
۴	قراردادن سلول‌ها در محلول مهارکننده سرم ۱۰ درصد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق
۵	انکوباسیون سلول‌ها به مدت یک شب با آنتی بادی‌های اولیه (پلی کلونال ضد MAP2، B tubulin III و Sox2) با رقت ۱/۱۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
۶	شست‌وشوی سلول‌ها بعد از انکوباسیون با آنتی بادی‌های اولیه
۷	انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Goat anti Rabbit IgG (رقت ۲۰۰/۱ برای MAP2 و B tubulin III) و آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Goat anti Rabbit IgG (FICT) (رقت ۲۰۰/۱ برای Sox2)
۸	رنگ‌آمیزی هسته‌ها با رنگ DAPI
۹	مشاهده سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon/Japan) و تهیه تصاویر و آنالیز آن‌ها

- SEM
- TEM
- XRD

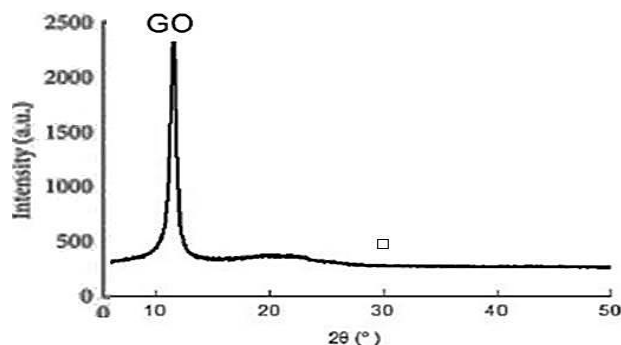
گرد تغییر شکل داده و به وضعیت دوکی درآمده‌اند. پیکان‌های زردرنگ کلنی سلول‌های استرومایی را نشان می‌دهد (شکل ۲-B). با تعویض محیط کشت، سلول‌های خونی و خون ساز از محیط خارج شده و جمعیت سلولی چسبیده روبه تزايد گذاشته و پس از حدود یک هفته تعداد سلول‌های دوکی شکل افزایش یافت (شکل ۲-C). با افزایش مدت زمان کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت خالص درآمده و از لحاظ مورفولوژی بیش تر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) بودند (شکل ۲-D).



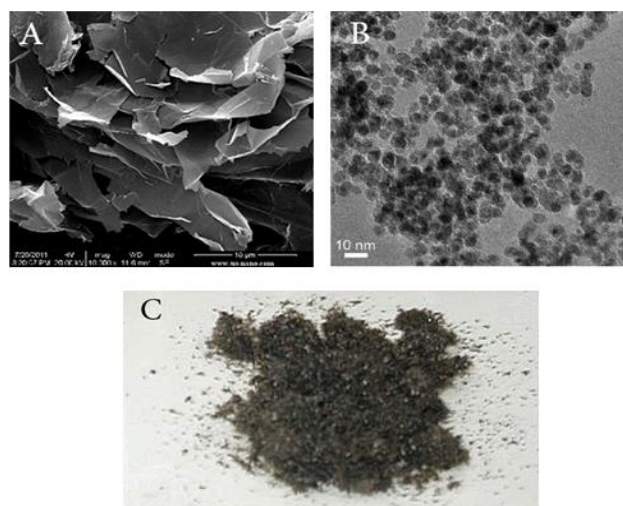
شکل ۲. سلول‌های جدا شده از مغز استخوان موش NMRI در کشت اولیه. روز اول (A)، روز سوم (B)، هفته اول (C)، پاساژ سوم (D).

نتایج بررسی میزان سمیت گرافن اکساید

بر اساس نمودار زیر درمی‌یابیم که بیش‌ترین شدت جذب در گروه ۱ (سلول‌های قرار گرفته در معرض محیط کشت عمومی و حاوی گرافن اکساید) و پس از آن گروه کنترل و در نهایت گروه ۲ بوده است. با توجه به این که در روش MTT روند احیا و تبدیل شدن MTT به فورامازان ارغوانی رنگ فقط در حضور آنزیم‌های ردوکتاز فعال موجود در میتوکندری سلول‌های زنده اتفاق می‌افتد بنابراین هرچه شدت جذب بیش‌تر باشد می‌تواند گویای این حقیقت باشد که میزان بیش‌تری از سلول‌ها زنده هستند. از طرفی چون سطح معنی‌دار (sig.) بین گروه‌ها به صورت دو به دو (Post hoc) بیش‌تر از ۰/۰۵ است (طبق نتایج حاصل از آنالیز آماری one way ANOVA) پس بین گروه‌های ۱ و ۲ و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و نشان می‌دهد که گرافن اکساید در دوز مورد استفاده (۱/۵ μg/ml) اثرات سمی بر روی سلول‌ها نداشته است.



نمودار ۱. آنالیز تفرق اشعه ایکس



شکل ۳. (A) مربوط به تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی (نگاره؛ B)

مربوط به تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره می‌باشد. همانطور که در این تصویر قابل ملاحظه است نانوذرات گرافن اکساید دارای شکل کروی و گرد می‌باشند. (C) تصویری از پودر گرافن اکساید با چشم غیر مسلح می‌باشد.

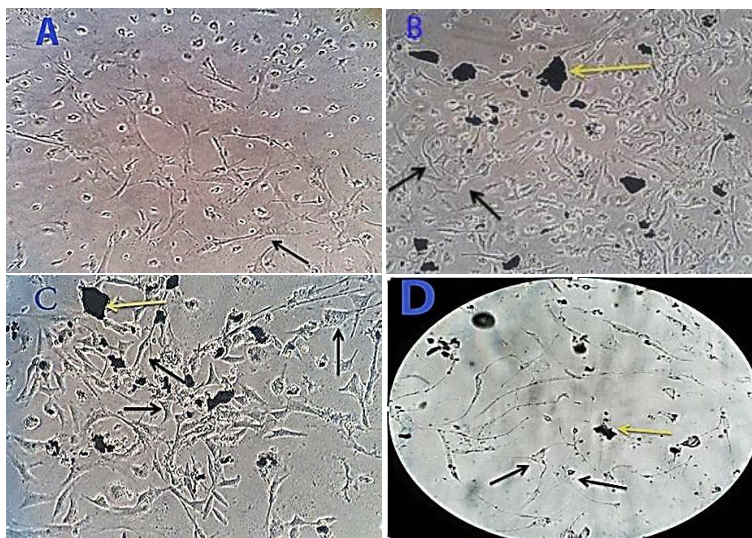
نتایج حاصل از تهیه و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان

سلول‌های استرومایی مغز استخوان از استخوان فمور جداسازی و کشت داده شدند. پس از تکثیر، جمعیت یکنواختی از آن‌ها در پاساژ ۳ به دست آمد. شکل زیر کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان در مراحل مختلف خالص سازی را نشان می‌دهد. طی این مراحل ابتدا به هنگام استخراج، جمعیتی غیرهموژن از این سلول‌ها در محیط کشت به دست آمد که شامل گلبول قرمز، گلبول سفید، سلول بنیادی خون ساز و سلول بنیادی غیرخون ساز بود (شکل ۲-A). پس از حدود سه روز تعدادی از سلول‌های استرومایی به کف ظرف کشت چسبیده و از بقیه سلول‌ها جدا شدند. پیکان‌های مشکی رنگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان را نشان می‌دهد که با تعویض محیط کشت به صورت چسبیده به کف فلاسک باقی مانده، از حالت

القای فنوتیپ عصبی

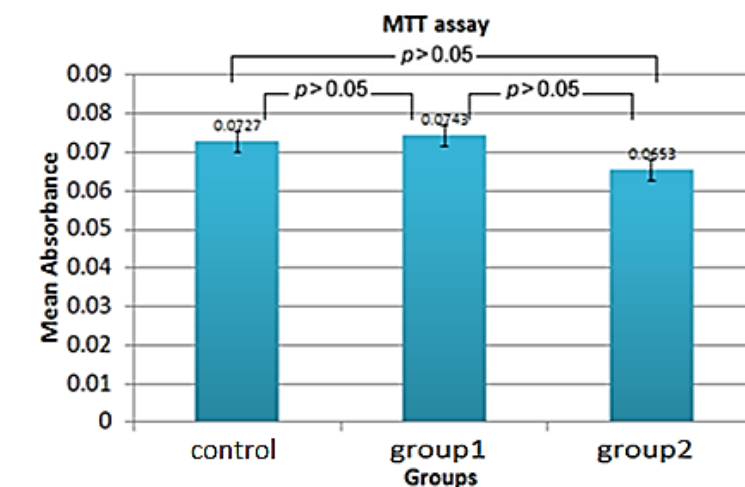
حالت دوکی شکل به سلول‌هایی با استپاله‌های بلند و کشیده (سلول عصبی) کردند (شکل ۳). با افزایش مدت زمان قرارگیری سلول‌ها در معرض گرافن اکساید تعداد سلول‌هایی که این ظاهر عصبی را پیدا کردند بیش‌تر شد به گونه‌ای که در پایان روز تمایز (روز چهاردهم) بیش‌تر سلول‌ها ظاهر عصبی به خود گرفتند (شکل ۴).

در پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر گرافن اکساید بر روی روند نوروگنی شدن سلول‌ها، پس از تیمار سلول‌ها با گرافن اکساید، فنوتیپ آن‌ها هر روز توسط میکروسکوپ نوری فاز کنتراست بررسی شد و مشخص شد که پس از سه روز سلول‌ها شروع به تغییر شکل از



شکل ۳. شدت جذب رنگ فورامازان تولیدشده در آزمون MTT در گروه‌های مختلف مورد آزمایش.

تفاوت بین گروه‌ها بیش از ۰/۰۵ می‌باشد، یعنی نرخ بقا در گروه‌های دارای نانوذرات گرافن اکساید (گروه ۱ و ۲) با گروه فاقد نانوذرات (کنترل) اختلاف معنی‌داری ندارد.



		absorbance Tukey HSD				
(i) groups	(j) groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control(Diff)	GO	-.00167	.00609	.960	-.0204	.0170
	GO+Diff	.00733	.00609	.493	-.0114	.0260
GO	control(Diff)	.00167	.00609	.960	-.0170	.0204
	GO+Diff	.00900	.00609	.365	-.0097	.0277
GO+Diff	control(Diff)	-.00733	.00609	.493	-.0260	.0114
	GO	-.00900	.00609	.365	-.0277	.0097

شکل ۴. سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌یافته در غلظت $1/5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ گرافن اکساید. (A) گروه کنترل، (B) گروه C و D و (D) گروه ۱. پیکان‌های مشکی رنگ فنوتیپ عصبی و پیکان‌های زرد رنگ توده‌های گرافن اکساید را نشان می‌دهند (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس x100).

بررسی بیان پروتئین‌های عصبی به‌روش ایمونوسیتوشیمی

بررسی تأثیر گرافن اکساید بر بیان پروتئین MAP2

نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی فلورسنت بر روی گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیان پروتئین MAP2 در گروه‌های ۱ و ۲ همانند گروه کنترل، مثبت بوده و این پروتئین در آن‌ها بیان شده است (شکل ۵).

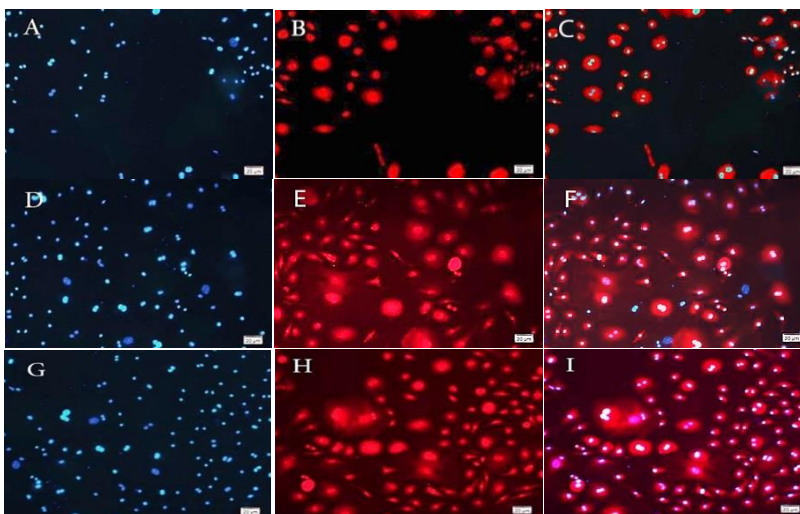
بررسی تأثیر گرافن اکساید بر بیان پروتئین β tubulinIII

نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی فلورسنت بر روی گروه‌های

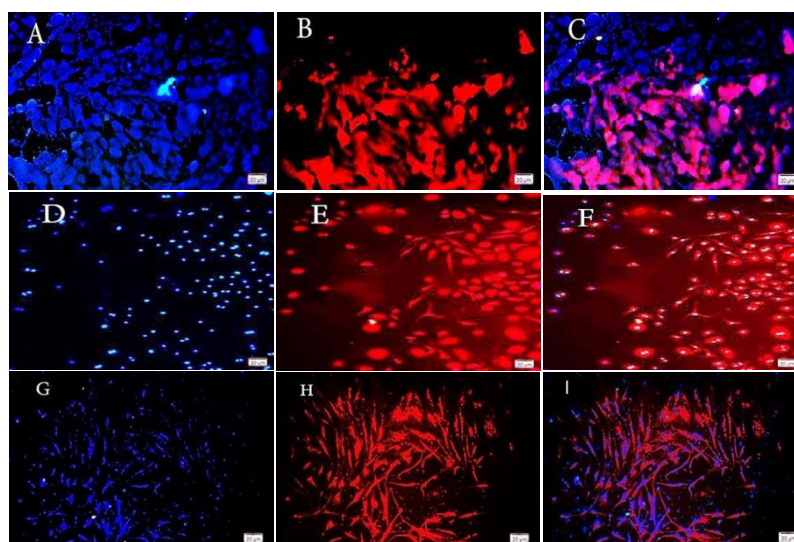
مورد مطالعه نشان داد که بیان پروتئین β tubulinIII نیز همانند MAP2 در گروه‌های ۱ و ۲ همانند گروه کنترل، مثبت بوده و این پروتئین در آن‌ها بیان شده است (شکل ۶).

بررسی تأثیر گرافن اکساید بر بیان پروتئین Sox2

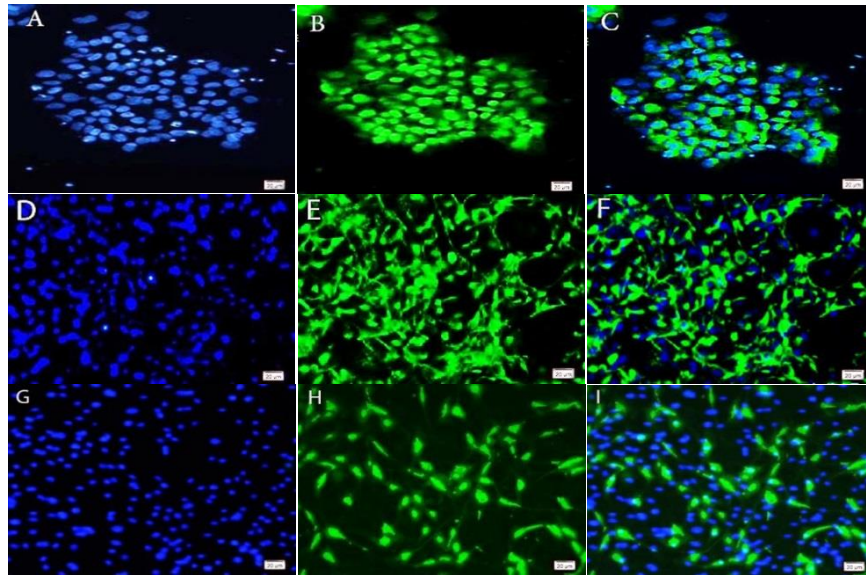
نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی فلورسنت بر روی گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیان پروتئین Sox2 نیز همانند MAP2 و β tubulinIII در گروه‌های ۱ و ۲ همانند گروه کنترل، مثبت بوده و این پروتئین در آن‌ها بیان شده است (شکل ۷).



شکل ۵. تصاویر A، B و C مربوط به بیان پروتئین MAP2 در گروه کنترل، D، E و F بیان پروتئین MAP2 در گروه ۲ و G، H و I بیان پروتئین MAP2 در گروه ۱ می‌باشد. تصاویر A، D و G مربوط به رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با رنگ هسته‌ای DAPI، تصاویر B، E و H مربوط به واکنش سلول‌های تمایز پیدا کرده با آنتی‌بادی MAP2، تصاویر C (تصویر merge شده دو تصویر A و B)، تصویر F (تصویر merge شده دو تصویر D و E) و تصویر I (تصویر merge شده دو تصویر G و H) می‌باشد.



شکل ۶. تصاویر A، B و C مربوط به بیان پروتئین β tubulinIII در گروه کنترل، D، E و F بیان پروتئین β tubulinIII در گروه ۲ و G، H و I بیان پروتئین β tubulinIII در گروه ۱ می‌باشد. تصاویر A، D و G مربوط به رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با رنگ هسته‌ای DAPI، تصاویر B، E و H مربوط به واکنش سلول‌های تمایز پیدا کرده با آنتی‌بادی β tubulinIII، تصاویر C (تصویر merge شده دو تصویر A و B)، تصویر F (تصویر merge شده دو تصویر D و E) و تصویر I (تصویر merge شده دو تصویر G و H) می‌باشد.



شکل ۷. تصاویر A، B و C مربوط به بیان پروتئین Sox2 در گروه کنترل، D، E و F: بیان پروتئین Sox2 در گروه ۲ و G، H و I: بیان پروتئین Sox2 در گروه ۱ می‌باشد. تصاویر A، D و G مربوط به رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با رنگ هسته‌ای DAPI، تصاویر B، E و H مربوط به واکنش سلول‌های تمایز پیدا کرده با آنتی‌بادی Sox2، تصویر C (تصویر merge شده دو تصویر A و B)، تصویر F (تصویر merge شده دو تصویر D و E) و تصویر I (تصویر merge شده دو تصویر G و H) می‌باشد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

سوم به سه گروه کنترل، گروه ۱ و گروه ۲، کشت سلولی به مدت چهارده روز ادامه یافت تا گرافن اکساید اثرات خود را القا کند. با توجه به اهمیت FBS در کشت سلولی و اثرات مشاهده‌شده از آن در کاهش سمیت گرافن اکساید در مطالعات پیشین (Guo et al., 2014)، در تمامی گروه‌های مورد مطالعه از FBS ۱۰ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از تکنیک MTT نشان داد که میزان تفاوت در جذب فورامازان ارغوانی که تولید آن در سلول زنده اتفاق می‌افتد در بین گروه‌های ۱ و ۲ با گروه کنترل، معنادار نبود ($P > 0.05$) که نشان‌دهنده عدم مشاهده اثرات سمی از گرافن اکساید در دوز مورد استفاده بر روی سلول‌ها است که در تایید با مطالعات پیشین نیز می‌باشد.

تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه نورونی در سال ۲۰۰۰ توسط پژوهش‌گرانی همچون Woodbury et al. (۲۰۰۲) و Sanchez-Ramos et al. (۱۹۹۸) ارائه شد. این دانشمندان نشان دادند افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) در این سلول‌ها، سلول را به سمت بیان برخی از ژن‌های عصبی و ایجاد یک فنوتیپ نورونی هدایت می‌کند، اما نکته مهم در این میان آن است که فنوتیپ عصبی ایجادشده در اثر القا در این سلول‌ها یک فنوتیپ پایدار باشد، چراکه ممکن است این سلول‌ها در اثر تغییر محیط اطراف خود و یا افزودن برخی مواد محرک مثل اسیدها یا محلول نمک هیپرتونیک نیز، ظاهری نورونی پیدا کرده که درواقع این یک

Ikram و همکارانش (۲۰۲۲) با آزمایش بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی، مشخص کردند که سمیت نانوذرات گرافن اکساید یک سمیت وابسته به زمان نیست، چراکه با افزایش مدت زمان قرارگیری سلول‌ها در معرض نانوذره گرافن اکساید کاهش قابل توجهی در میزان زنده ماندن سلول‌ها مشاهده نشد بلکه سمیت گرافن اکساید یک سمیت وابسته به دوز است به این دلیل که رابطه معکوسی بین مقدار دوز مصرفی گرافن اکساید و زنده ماندن سلول‌ها مشاهده شد. دوز کم‌تر از $50 \mu\text{g/ml}$ اثرات سمی قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل (گروه فاقد گرافن اکساید) نشان نداد، درحالی‌که میزان مرگومیر سلولی در دوز بالاتر از $50 \mu\text{g/ml}$ بالا بود (Ikram et al., 2022). Xiaoqing در پژوهش خود به این موضوع اشاره کرد که سمیت گرافن اکساید می‌تواند به طور گسترده‌ای از طریق انکوبه‌شدن با FBS ۱۰ درصد، کاهش یابد (Guo et al., 2014). گزارش‌های مبنی بر توانایی گرافن اکساید در جذب ۲۵ درصد پروتئین‌های سرم موجود است. بار الکتریکی اطراف نانوذرات گرافن اکساید منفی است که می‌توان آن را به حضور گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل در روی سطح ذرات گرافن اکساید نسبت داد. در پژوهش حاضر از نانوذرات گرافن اکساید با اندازه تقریبی بین ۲ تا ۱۸ نانومتر (بیش‌ترین تعداد ۱۲ نانومتر) و دوز $1/5 \mu\text{g/ml}$ استفاده شد. پس از تقسیم‌شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ

می‌یابد) (MAP2 (Dehmelt & Halpain, 2005) به‌عنوان یک مارکر نورونی بالغ شناخته می‌شود (Huber *et al.*, 1984). مکانیسم مولکولی دقیق در مورد نحوه تأثیر گرافن اکساید در القا و افزایش تمایز عصبی هنوز ناشناخته است، اما با توجه به مطالعات صورت گرفته نحوه تأثیر آن را به دو صورت می‌توان توجیه کرد. گروهی از نانوذرات که در محیط کشت سلولی با یکدیگر مجتمع شده و تشکیل یک توده گرافن اکسایدی را دادند احتمالاً به‌عنوان یک داربست عمل کرده و از طریق افزایش توان اتصال سلول‌ها به ظرف کشت و همچنین با توجه به ویژگی‌هایی که از گرافن اکساید مانند توان بالای هدایت الکتریکی، خاصیت کشسانی و جذب پروتئین‌های سرم در سطح خود بیان شد سبب القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده است (Guo, 2021) و از طرفی نانوذرات گرافن اکساید که در محیط کشت به‌صورت محلول درآمده‌اند از طریق ورود به سلول (Ikram, 2022) احتمالاً سبب فعال کردن مسیرهای تمایز عصبی داخل سلولی مانند مسیر سیگنالینگ wnt و Notch شده‌اند و به این ترتیب اثر خود را القا کرده‌اند. با توجه به بیان شدن هر سه مارکر عصبی *sox2*, *B tubulin III* و MAP2 در سلول‌ها، می‌توان به این نتیجه رسید که گرافن اکساید در ابتدا سبب تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های پیش‌ساز عصبی (سلول‌های *sox2* مثبت) شده است. با افزایش مدت زمان قرارگیری سلول‌ها در معرض گرافن اکساید، سلول‌های پیش‌ساز عصبی به نورون‌های نابالغ (*B tubulin III* مثبت) تمایز پیدا کرده‌اند. هر چه سلول‌ها بیش‌تر در معرض گرافن اکساید قرار گرفتند تا روز چهاردهم تمایز عصبی کامل‌تر شد به گونه‌ای که سلول‌های نورونی بالغ (MAP2 مثبت) نیز در بین سلول‌ها مشاهده گردید. با توجه به نتایج حاصل از دو تکنیک MTT و ICC در نهایت می‌توانیم به این نتیجه برسیم که استفاده از گرافن اکساید با دوز مورد استفاده ($1/5 \mu\text{g/ml}$)، تأثیری بر میزان تکثیر سلولی نگذاشته و سمی نبوده است و از طرفی محیط کشت عمومی حاوی گرافن اکساید می‌تواند همانند محیط کشت تمایزی (گروه کنترل) سبب تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی شود و پیشنهاد می‌شود که از آن می‌توان به‌عنوان یک جایگزین برای محیط کشت تمایزی عصبی در *in vitro* استفاده کرد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

فوتوپ نورونی حقیقی نیست و فقط چروک خوردگی و تغییرات گذرای است که سلول‌ها در پاسخ به این محیط جدید پیدا می‌کند و در نتیجه پس از برداشتن عامل القاکننده، بلافاصله این سلول‌ها به فوتوپ قبلی خودشان یا همان سلول‌های استرومایی مغز استخوان برگشت می‌کنند (Xie *et al.*, 2022). در پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر گرافن اکساید بر روی روند نورونی شدن سلول‌ها، پس از تیمار سلول‌ها با گرافن اکساید، فوتوپ آن‌ها هر روز توسط میکروسکوپ نوری فاز کنتراست بررسی شد و مشخص شد که پس از سه روز سلول‌ها شروع به تغییر شکل از حالت دوکی شکل به سلول‌هایی با استتاله‌های بلند و کشیده (سلول عصبی) کردند. با افزایش مدت زمان قرار گیری سلول‌ها در معرض گرافن اکساید تعداد سلول‌هایی که این ظاهر عصبی را پیدا کردند بیش‌تر شد به گونه‌ای که در پایان روز تمایز (روز چهاردهم) بیش‌تر سلول‌ها ظاهر عصبی به خود گرفتند. با توجه به این که فوتوپ عصبی سلول‌ها تا روز پایان تمایز حفظ گردید، بنابراین می‌توان گفت که فوتوپ ایجاد شده یک فوتوپ حقیقی از سلول‌های عصبی است و تغییرات گذرای که سلول‌ها در پاسخ به یک محیط جدید داده باشد، نبوده است.

یافته‌های حاصل از تکنیک ICC مشخص کرد که بیان هر سه مارکر *sox2*, *BtubulinIII* و MAP2 در گروه ۱ همانند گروه کنترل اتفاق افتاده است. در طی نوروزن، *sox2* هنگام توسعه سلول‌ها در لوله عصبی و همچنین هنگام تکثیر سلول‌های پیش‌ساز سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شود (htt). بیان این پروتئین در هنگام تمایز سلول‌های بنیادی چند توان به سلول‌های پیش‌ساز عصبی و اهمیت آن در تمایز عصبی مشاهده شده است (Stevanovic *et al.*, 2021). بنابراین، مشاهده شدن بیان پروتئین *sox2* در گروه ۱ نشان‌دهنده تأثیر گرافن اکساید در تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پیش‌ساز عصبی می‌باشد. بتاتوبولین III یک مارکر نورونی است که در نورون‌های نابالغ (تازه تمایز یافته) و بعضی از پیش‌سازهای عصبی که به لحاظ میتوزی فعال هستند مشاهده می‌شود. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی حضور این پروتئین را در جسم سلولی، دندريت، آکسون و پایانه آکسونی نورون‌های نابالغ اثبات کرده است (Geisert *et al.*, 1989). MAP2 یک پروتئین سیتواسکلتال مخصوص نورونی است که به‌عنوان یک مارکر برای فوتوپ عصبی استفاده می‌شود. میزان بیان آن در سلول‌های پیش‌ساز عصبی پایین است، اما با افزایش مدت زمان تکوین عصبی، میزان بیان آن افزایش می‌یابد (تقریباً یک روز بعد از بیان *Btubulin III* بیان آن افزایش

References

- Chapman, A. R., Frankel, M. S., & Garfinkel, M. S. (1999). *Stem cell research and applications: monitoring the frontiers of biomedical research*. American Association for the Advancement of Science. Washington, DC, USA.
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology*, 6, 1-10.
- Geisert Jr, E. E., & Frankfurter, A. (1989). The neuronal response to injury as visualized by immunostaining of class III β -tubulin in the rat. *Neuroscience letters*, 102(2-3), 137-141.
- Guo, R., Li, J., Chen, C., Xiao, M., Liao, M., Hu, Y., Liu, Y., Li, D., Zou, J., Sun, D., & Torre, V. (2021). Biomimetic 3D bacterial cellulose-graphene foam hybrid scaffold regulates neural stem cell proliferation and differentiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 200, 111590.
- Guo, X., & Mei, N. (2014). Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 105-115.
- Huber, G. E. R. D. A., & Matus, A. N. D. R. E. W. (1984). Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 4(1), 151-160.
- Ikram, R., Shamsuddin, S. A. A., Mohamed Jan, B., Abdul Qadir, M., Kenanakis, G., Stylianakis, M. M., & Anastasiadis, S. H. (2022). Impact of graphene derivatives as artificial extracellular matrices on mesenchymal stem cells. *Molecules*, 27(2), 379.
- Jiménez-Acosta, M. A., Hernández, L. J. R., Cristerna, M. L. P., Tapia-Ramírez, J., & Meraz-Ríos, M. A. (2022). Neuronal differentiation protocols of mesenchymal stem cells. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 13(1), 15-71.
- Katsnelson, M. (2007). Graphene: Carbon in Two Dimensions. *Materialstoday*, 10(1-2), 20-27.
- Kim, M., Ma, K. Y., Kim, H., Lee, Y., Park, J. H., & Shin, H. S. (2023). 2D materials in the display industry: status and prospects. *Advanced Materials*, 35(43), 2205520.
- Kim, S. R.-S. (2013). Culture of Neural Cells and Stem Cells on Graphene. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(2), 39-46.
- Rao, C. N. R., Biswas, K., Subrahmanyam, K. S., & Govindaraj, A. (2009). Graphene, the new nanocarbon. *Journal of Materials Chemistry*, 19(17), 2457-2469.
- Rawat, S., Jain, K.G., Gupta, D., Raghav, P.K., Chaudhuri, R., Pinky, Shakeel, A., Arora, V., Sharma, H., Debnath, D., & Kalluri, A. (2021). Graphene nanofiber composites for enhanced neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanomedicine*, 16(22), 1963-1982.
- Ramos, J. S. (1998). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*, 149, 411-423.
- Stevanovic, M., Drakulic, D., Lazic, A., Ninkovic, D. S., Schwirtlich, M., & Mojsin, M. (2021). SOX transcription factors as important regulators of neuronal and glial differentiation during nervous system development and adult neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14, 654031.
- Woodbury, D., Reynolds, K., & Black, I. B. (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of neuroscience research*, 69(6), 908-917.
- Xie, J. L., Wang, X. R., Li, M. M., Tao, Z. H., Teng, W. W., & Saijilafu. (2022). Mesenchymal stromal cell therapy in spinal cord injury: mechanisms and prospects. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 862673.
- Yang, K., Lu, R., Lu, J., Fan, S., Zhang, Q., Lou, Z., Ma, Y., Lu, G., Pan, R., & Zhang, J. (2022). Phenotypic and functional characterizations of mesenchymal stem/stromal cells isolated from human cranial bone marrow. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 909256.
- Yu, L., Wei, Y., Sun, H.X., Mahdi, A.K., Arteaga, C.A.P., Sakurai, M., Schmitz, D.A., Zheng, C., Ballard, E.D., Li, J., & Tanaka, N. (2021). Derivation of intermediate pluripotent stem cells amenable to primordial germ cell specification. *Cell stem cell*, 28(3), 550-567.