



## بررسی اثرات سمیت سلولی کمپوزیت نانوذرات نقره در بستر ژلاتین بر روی رده سلول سرطانی رحم (Hela)

سیده مبینا موسوی سروینه باغی، عباسعلی دهپور جویباری\*، صدف فرخنده

گروه زیست‌شناسی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

\*مسئول مکاتبات: dehpour@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۴

### چکیده

سرطان در حال حاضر دومین عامل مرگ و میر در جهان است و در بین انواع آن سرطان تخمدان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است. سرطان در نتیجه رشد و تکثیر بدون کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود که سلول‌های سرطانی تومور را ایجاد می‌کند. یکی از روش‌های درمان این بیماری شیمی درمانی می‌باشد. برخی از نانوذرات نقره به دلیل بالا بردن سمیت سلولی با ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش رادیکال‌های آزاد در درون سلول‌ها از جمله ROS می‌توانند به عنوان حساس کننده مطرح شوند. در این مطالعه اثر نانوذرات نقره در بستر ژلاتین بر رده سلول‌های سرطانی رحم بررسی گردید. در این بررسی پس از تکثیر و کشت رده سلول‌های Hela نانوذرات نقره در بستر ژلاتین را با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی هلا اثر داده و پس از ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT سمیت مورد نظر ارزیابی قرار گرفته و سپس داده‌های بدست آمده توسط دستگاه الیزا ریدر و با آزمون ANOVA تحلیل گردید. نتایج مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت‌های ۲۰ بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $p \leq 0.05$ ). نانوذرات نقره در اندازه و غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان می‌دهد که نانو ذره نقره در بستر ژلاتین سمیت سلولی موثر بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته و به طور مطلوب آپتوز را تا حد بالایی در این سلول‌ها القا کرده و از این طریق سبب مرگ سلول‌های سرطانی شده و همزمان سمیت کمتری به سلول‌های طبیعی بدن داشته‌اند.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، سمیت سلولی، سرطان رحم، رده سلولی هلا

### مقدمه

علوم پزشکی کاربرد بسیار مهمی دارد. استفاده‌های بسیار زیادی از نانو ذرات در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان امروزه در دنیا رایج می‌باشد [۱۸]. ذرات در مقیاس نانو، مولکول‌هایی با پتانسیل بالا جهت درمان بیماری‌ها می‌باشند، زیرا که این ذرات دارای اثرات بیولوژیکی منحصر به فردی بسته به نوع ساختار سایز و تفاوت‌هایی در ابعاد مولکولی و دارویی و همچنین هم‌بستر شدن با سایر ترکیبات دیگر می‌باشند [۱۶]. نقره به عنوان یکی از ذرات پایه در شاخه نانو بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد که امروزه دیده شده است نقره می‌تواند در مقیاس نانو به صورت ذرات ریز نیز تولید شوند [۱۳]. نانو ذره نقره (AgNPs) سنتزی یک فراورده نانویی می‌باشد که دارای

سرطان اصلی‌ترین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین عامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه بوده است [۵]. سرطان تخمدان کشنده‌ترین سرطان در زنان است [۹]. در بسیاری از روش‌های درمان سرطان می‌توان ردپای نانوفناوری را یافت مهم‌ترین قابلیت نانوفناوری ساخت مواد با ابعاد نانومتری است گروهی از این ساختارها که نانوذرات نامیده می‌شوند حداقل یکی از ابعادشان کمتر از ۱۰۰ نانومتر است و در میان آنها نانوذرات فلزی به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی و خواص منحصر به فردشان مورد توجه واقع شده و در زمینه‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۲]. نانوبیوتکنولوژی به عنوان یکی از شاخه‌های علم نانو در



میلی گرم بر میلی لیتر می باشند.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش **MTT**: برای بررسی درصد سلول های زنده از تست **MTT** استفاده گردید. بدین ترتیب که یک فلاسک سلولی با تراکم ۶۰ درصد را تریپسین و پس از شمارش سلولی به پلیت ۹۶ خانه ای منتقل گردید به طوری که حدود ۵۰۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت قرار گیرد. پس از ۲۴ ساعت در گروه های مختلف نانو ذره و تابش گاما اعمال شد و پلیت های در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز انکوبه شد و در روز از موم ۲۰ میکرولیتر محلول **MTT** به هر چاهک اضافه شده و بعد از ۳ ساعت انکوباسیون محتویات داخل چاهک را دور ریخته و ۱۰۰ میکرو لیتر **DMSO** اضافه کرده تا کریستال فورمازون حل شود برای سنجش سه نمونه یکسان تهیه و جذب حاصل از نمونه توسط نرم افزار ریتو دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید در نهایت نتایج به صورت درصد جذب نوری نسبت به سلول های شاهد سلول هایی که در غیاب نانو ذره رشد کرده بودند ثبت شده درصد سلول های زنده با استفاده از معادله زیر بدست آمد:

$$\text{Percentage Survival} = \frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{cont}}} \times 100$$
 که در آن  $\text{OD}_{\text{test}}$  میزان جذب نوری متوسط از سلول مورد آزمون و  $\text{OD}_{\text{cont}}$  کنترل میزان میانگین جذب متوسط گروه کنترل می باشد. تصاویر نیز توسط فتومیکروسکوپ اینورت نیکون برداشته شده است. این آزمایش در سه تکرار انجام گرفت. میانگین بقاء انحراف معیار آنالیز آماری داده ها از نرم افزار **SPSS** و آزمون آماری **ANOVA** و برای رسم نمودار از نرم افزار اکسل استفاده گردید.

### نتایج

یافته های این تحقیق نشان داد که نانوذره ژلاتین سمیت سلولی را افزایش داده که این سمیت به شدت به نوع ذره وابسته بوده و این نانو دارای اثرات سمیت سلولی در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر میلی -

خواص بسیار جالبی در زمانی که به صورت ذرات نانو می باشد دارد، به طوری که این خواص منجر به استفاده این نانوذره در درمان بیماری ها می باشد [۶]. نانوذره نقره دارای اثرات سمیت سلولی بسیار خوبی می باشد ساختار سلیکونی نانوذره نقره دارای اثرات ضد میکروبی به مراتب زیادتری از خود نشان می دهند [۷]. نانوذره نقره دارای اثرات ضدسرطانی بسیار خوبی در سلول های سرطانی لنفوسیتی از خود نشان داد [۱]. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی سمیت نانوذره نقره در بستر ژلاتین در غلظت های مختلف، بر روی سلول های سرطانی هلا (Hela) می باشد.

### مواد و روش کار

کشت سلول: در این مطالعه برای کشت *in vitro* از سلول های هلا را از انستیتور ایران کد (PTCC 135) تهیه شده استفاده گردید سلول ها در محیط کشت (RPMI-1640) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی محصول شرکت (Gibco) آلمان پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در یک انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد گاز  $\text{CO}_2$  قرار داده شد و ۹۵ درصد رطوبت در فلاسک های استریل مورد کشت و تکثیر قرر گرفت بعد از دو تا سه روز سلول ها به صورت تک لایه فلاسک را پر کرده اند، و بعد از جدا کردن سلول ها از کف فلاسک توسط تریپسین **EDTA** سلول ها شمارش شده و درصد سلول های زنده به روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین و آزمایشات طراحی شده بر روی آنها انجام گرفت.

تهیه رقت های مختلف از نانو ذره نقره در بستر ژلاتین: نانوذره نقره مورد نظر را ابتدا در آونگ پودر کرده و توسط ترازوی حساس دیجیتالی توزین گردید. آنگاه در هر ۱۰۰ میکرولیتر **DMSO** به صورت محلول در آورده شد. سپس در محیط کشت سلولی (RPMI-1640) رقت های مختلف مورد نیاز تهیه شد. رقت های به کار رفته در این تحقیق شامل ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰

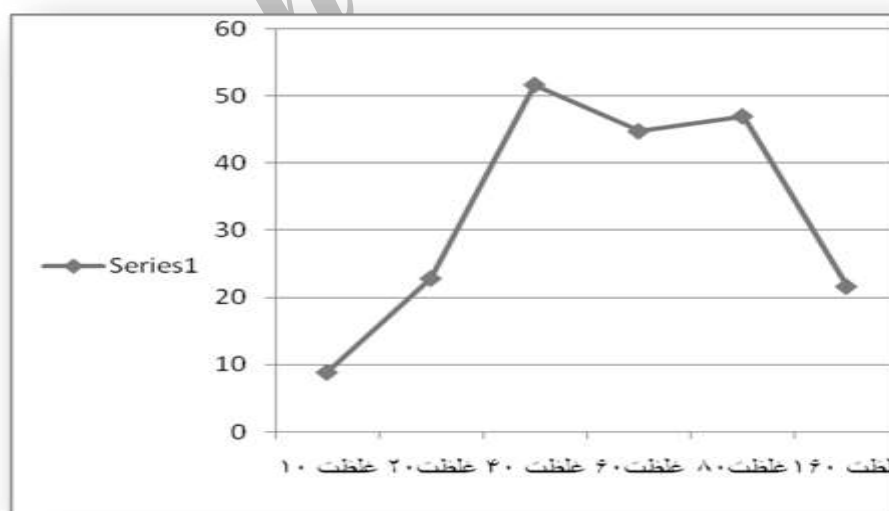


بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شده است (جدول ۱ و نمودار ۱). نتایج نشان می‌دهد که رده سلولی هلا نسبت به نانو ذره نقره در بستر ژلاتین در غلظت‌های ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است ( $p \leq 0.05$ ) (شکل ۱ و ۲).

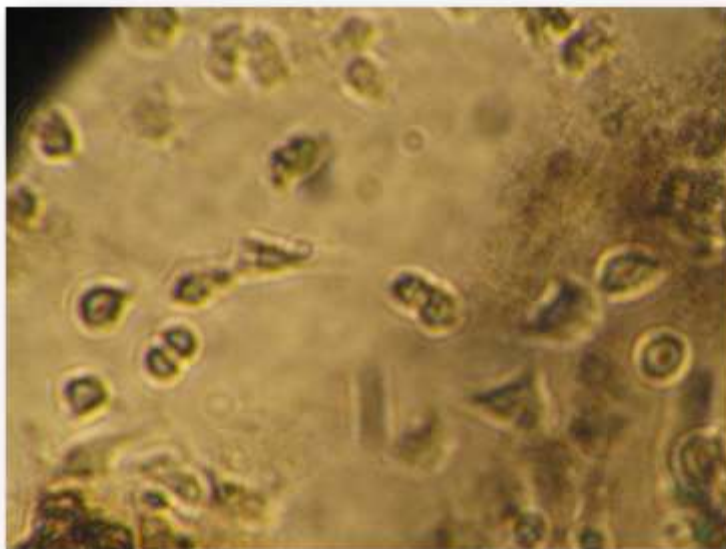
لیتر به ترتیب به میزان ۸/۹۱، ۲۲/۸۵، ۵۱/۶۲، ۴۴/۷۳، ۴۶/۹۶ و ۲۱/۶۶ درصد بوده است. همچنین مشخص شده است که نانو ذره نقره در بستر ژلاتین به طور وابسته به غلظت بوده به طوریکه با افزایش غلظت، درصد مهار رشد سلولی را افزایش داده است (نمودار ۱). بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۵۱٪ بوده است. میزان IC<sub>50</sub> به مقدار ۴۹ میلی‌گرم

جدول ۱- نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر رده سلولی هلا

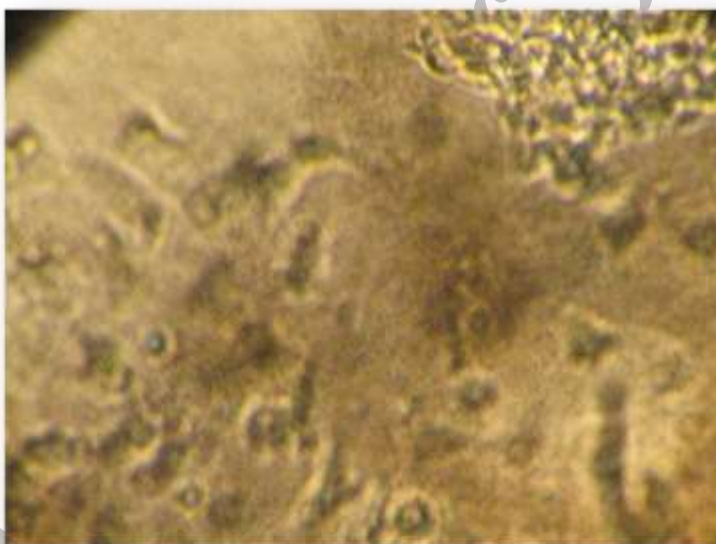
Concentration of Alliumparadoxum (mg/ml)	Absorption	Cell Growth Inhibition	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
0	0.49±0/026517		
10	0.455567±0.024997	8.91	
20	0.385067±0.020262*	22.85	
40	0.243567±0.028989	51.62	49
60	0.2802±0.078249	44.73	
80	0.254067±0.105091	46.96	
160	0.3941±0.042118	21.66	



نمودار ۱- غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر درصد زنده مانی رده سلولی هلا با استفاده از تست MTT



شکل ۱- گروه کنترل (رده سلول‌های هلا در محیط کشت RPMI)  $\times 400$



شکل ۲- غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر روی رده سلول‌های سرطانی هلا که بیشترین اثرات مهاری رشد را نشان می‌دهد.  $\times 400$

#### بحث

است [۲]. نانوفناوری آغاز تغییرات در مقیاس و روش- های رهاسازی دارو در بدن می‌باشد. ذرات و ابزارهای نانو از نظر ابعاد کاملاً به مولکول‌های زیستی نزدیک بوده و به سادگی می‌توانند در اغلب سلول‌ها نفوذ کنند. قابلیت ادغام فیزیکی و شیمیایی و خواص بیولوژیک این نانوذرات، پژوهشگران را قادر ساخت تا نانو ذرات را در

با گسترش فن‌آوری نانو و استفاده از ویژگی‌های متفاوت نانومواد افق جدیدی در کلیه حوزه علمی گشوده شده است این فن‌آوری توانسته است در زمینه‌های مختلف پزشکی کاربردهای فراوانی پیدا کند [۱۵]. از ویژگی نانومواد هم در تشخیص بیماری‌ها هم در درمان آنها مورد مطالعه قرار گرفته و بسیاری نیز به استفاده انبوه رسیده



اکسید تیتانیوم را بر روی رده سلولی پوششی پوست مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که غلظت‌های ۱۰ ppm اکسید روی به صورت نانوذره به اندازه ۵۰ تا ۷۰ ohm نسبت به دی اکسید تیتانیوم در همان غلظت دارای بالاترین اثرات مهار رشد بر رده سلول‌های سرطانی پوست داشتند که با نتایج حاصل از تحقیقات ما همسو می‌باشد [۳].

#### نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد. که نانو ذره نقره در بستر ژلاتین (بستر ژلاتین موجب آزاد سازی نانو ذره نقره به طور مداوم می‌شود) سمیت سلولی موثر بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته و به طور مطلوب اپوپتوز را تا حد بالایی در این سلول‌ها القا کرده و از این طریق سبب مرگ سلول‌های سرطانی شده‌اند و همزمان سمیت کمتری بر سلول‌های طبیعی بدن داشته‌اند. با توجه به بررسی اثرات دوزهای مختلف از نانو بهترین تاثیر غلظت این نانوذره در غلظت ۴۰ که بیشترین تأثیر را بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته است.

#### منابع

- 1- Baker C., Pradhan A., Pakstis L. (2005), Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 244-249
- 2- Banerjee D., Sengupta S. (2011), Nano particles in cancer chemotherapy. *Progress in Molecular Biology and Translationa Science*, 104: 489-507.
- 3- Dechsakulthom F., Hayes A., Bakand S., Joen L., Winder C. (2007), In vitro cytotoxicity of selected nano particle using human skin fibroblasts. 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use the Life Sciences, 21-25, Tokyo, Japan
- 4- Felix K. (2008), Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug

جهت ساخت دارو به کار گیرند. داروهایی که در حوزه تشخیص و درمان بیماری‌ها از جمله سرطان می‌تواند مفید واقع شود [۴]. نانو ذره نقره همچنین به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی بسیار خوب مد نظر می‌باشد، به طوری که در گزارشات مختلف اثرات ضد ویروسی بر علیه هیپاتیت B و ویروس‌های آسیب‌رسان به دستگاه تنفسی ویروس هرپس (Herpes) نوع ۱ ویروس POX میمون را دارد [۸]. ساختار سلیکونی نانوذره نقره دارای اثرات ضد میکروبی به مراتب زیادتری از خود نشان می‌دهند [۱۷]. برای تشخیص بهتر و موفقیت‌آمیز سرطان در مراحل اولیه آن، دانشمندان باید قادر به طراحی ابزارآلاتی برای تعیین تغییرات مولکولی باشند. این بدان معنی است که ابزارات بسیار دقیق نیاز است. پتانسیل نانو ساختارها برای بررسی‌های سلولی می‌تواند نیازهای پزشکان و متخصصان و در نهایت بیماران را برطرف کند. به علت ابعاد کوچک نانو ساختارها بیشترین کاربرد نانوبیوتکنولوژی در تشخیص مولکولی به سیستم‌های میکروآرایه‌ها و تراشه‌های زیستی متمرکز شده است (۱۶). مارتینز و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه اثرات AgNPS (نانو ذره نقره سنتزی) را بر روی سلول‌های سرطانی لئوسیتی OIA بررسی نمودند و دریافتند که AgNPS دارای اثرات سایتو توکسیته بسیار خوبی بر روی سلول‌های فوق نشان دادند (۱۱) و همچنین در مطالعه دیگری استول و همکاران دریافتند که تری اکسید مولیبدن دارای اثرات سمیت سلولی به مراتب کمتری نسبت به نانو ذره نقره می‌باشد با توجه به نتایج ما که IC<sub>50</sub> ۴۹ با این نتایج همسو می‌باشد (۱۵). همچنین در مطالعه مؤدب اهری و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات نانو ذره نقره را بر رده سلول‌های سرطانی استخوان (G292) مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که نانو ذره نقره در ۳/۴۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات سمیت سلولی می‌باشند که همسو با این گزارشات می‌باشد [۱۰]. همچنین در مطالعه‌ای Dechsakuthom و همکاران، اثرات سمیت سلولی نانوذره اکسید روی و دی



- 12- Shuford K., Schatz G. (2005), Optical Properties of Gold Nanospheres. *Nanoscope*, 2(1): 2733.
- 13- Silver S., Phung L.T., Silver G. (2006), Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 33: 627-634
- 14- Singh N., Manshian B., Jenkins G.J., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G. (2009), Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nano materials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914.
- 15- Stoll L., Hussain S., Schlager J., Hafman C. (2005), invitrocyto toxicity of nano particeles in Mammalian Germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2). 412-419
- 16- Wagner V., Dullaart A., Bock A.K., Zweck A. (2006), The emerging nano medicine landscape. *Natural Biotechnology*, 24: 1211-1217
- 17- Wang X., Yang L., Chen Z., Shin D.M. (2008), Application of nanotechnology in cancer therapy and Imaging. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 58(2): 97-110.
- 18- Yezhelyev M.V., Gao X., Xing Y., Hajj A.A., Nie S., Regan R.M.O. (2006), Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7: 657-667.
- conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3): 171-183.
- 5- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011), Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90.
- 6- Kalishwaralal K., Barathmanikanth S., Pandian S.R.K., Deepak V., Gurunathan S. (2010), Silver nano – a trove for retinal therapies. *Journal of Control Release*, 145(2):76-90.
- 7- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N. (2007), Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3: 95-101.
- 8- Lu L., Sun R.W., Chen R. (2008), Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivirus Therapy*, 13: 253-262.
- 9- Lukanov A., Kaaks R. (2005), Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypothesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14: 98-107.
- 10- Moaddab Ahari H., Shahbazzadeh D., Motallebi A.A., Anvar A.A., Rahman G., Shorgozarm R. (2011), Toxicity study of nano silver on osteoblast cancer cell line. *International Nano Letters*, 1: 11-16.
- 11- Martins D., Frungillo L., Anazzetti M.C., Melo P.S., Durán N. (2010), Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D, L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 77-85.