

مطالعه میزان سمیت نانونقره بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست طبیعی (HF2)، و استئوبلاست (G292)

دلور شهباززاده^{۱*}، حامد اهری^۲، مهدی سلطانی^۳، حمید راشدی^۴، محمدرضا شکرگزار^۵، سمیه مودب^۶، مژگان حیدرپور^۷، جعفر رحمان نیا^۸

(۱) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران - ایران.

(۳) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۴) گروه شیمی، دانشکده فنی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۵) مرکز تحقیقات بانک سلولی، انستیتو پاستور تهران، تهران - ایران.

(۶) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، تهران - ایران.

(۷) موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، کرج - ایران.

(۸) بخش تحقیقات شرکت نانو نصب پارس، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۸ دی ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۴ مرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

نانوتکنولوژی فرصت‌های بی‌شماری را برای ابداع محصولات کاربردی اصلاح‌شده جدید برای انتفاع جامعه ارائه می‌نماید. با وجود کاربرد بسیار وسیع نانومواد، اطلاعات کمی در خصوص اثر آنها بر سلامت انسان وجود دارد. در این مطالعه اثر بیولوژیک نانونقره بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست طبیعی HF2، و استئوبلاست G292 مورد بررسی قرار گرفته است. اثر نانونقره بر روی این سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و تکثیر سلولی با انجام آنالیزهای سمیت سلولی استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌داد که اثر کشندگی سلول‌ها وابسته به غلظت نانونقره می‌باشد و مقدار IC50 آن بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست طبیعی HF2 و استئوبلاست G292 به ترتیب به مقدار $6/68$ ، $6/33$ $\mu\text{g/L}$ و $3/42$ بدست آمد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که نانونقره بر روی سلول‌های سرطانی در حدود دو برابر بیشتر از سلول‌های طبیعی و نرمال اثر مه‌ار رشد را دارد. این پدیده به دلیل اثر مستقیم نانونقره بر روی سامانه تنفسی سلول می‌باشد. در سلول‌های سرطانی میزان فعالیت میتوکندری در تنفس سلول بسیار بیشتر از سلول‌های طبیعی می‌باشد که می‌تواند بستر مناسبی برای عنصر نانونقره جهت تخریب سلول‌های سرطانی باشد.

واژه‌های کلیدی: نانونقره، سمیت، فیبروبلاست، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، استئوبلاست.

دستیابی به این نوع نانومواد به نظر می‌رسد با اهمیت باشد زیرا بسیاری از داروهای ضدسرطان اثرات نامطلوب زیادی را دارند. نانوذرات در درمان بیماری‌هایی که نیازمند به حضور دارو در چند جایگاه آناتومیکی هستند مورد استفاده قرار گیرند (۹،۱۵). علاوه بر این، نانومواد در برنامه‌های مهندسی شده و تدافعی کاربرد دارند زیرا استفاده بالقوه آنها در الکترونیک، حس‌گرها، جنگ افزارها و واکنش‌های انرژی زایی مد نظر قرار گرفته است.

نقره یکی از موادی است که برای سالیان زیادی مورد استفاده قرار گرفته است و می‌تواند اثرات مهمی را در حد نانوتکنولوژی ایفاء نماید. در مطالعه حاضر اثر سمیت نانونقره بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست طبیعی HF2 و استئوبلاست G292 مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تهیه نانوذره: نحوه تهیه نانونقره در مقاله‌ی دیگری توضیح داده شده است (۱۱). به طور خلاصه (مقدار تقریبی ۱۰ میلی لیتر از محلول ۱۰ مول نیترات نقره به صورت قطره قطره به ۳۰ میلی لیتر از محلول NaBH4 برای

مقدمه

فلز نقره با استفاده از مهندسی تکنولوژی جدید به خصوصیات و اشکال خارق‌العاده‌ای نوینی تبدیل می‌شود. انجام این مهندسی به نحوی است که مولکول نقره را از حالت "ملکولی درشت" به شکل ذرات بسیار ریز تبدیل می‌نماید که در مقیاس نانومتر (nm) قابل اندازه‌گیری است. وقتی که این ذرات در ابعاد کمتر از ۱۰۰ nm تبدیل شوند به نانوذرات یا نانوپارتیکل نامگذاری می‌شوند (۱۴،۱۸). نانوذرات اثرات آنتی‌باکتریایی مؤثری را از خود نشان می‌دهند (۲). هم‌اکنون این نانوذرات در ساخت پیتیدها، پروتئین‌ها، اولیگونوکلوئیدها و پلاسמידها در یک نوع سلول خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند که سبب حفاظت این سلول‌ها از اثرات تخریبی آنزیم‌ها می‌شوند (۶). علاوه بر این نانوذرات جهت درمان بسیاری از بیماری‌هایی که نیازمند به غلظت ثابتی از دارو در خون و یا مورد هدف دارو قرار دادن سلول‌ها و یا ارگان‌های خاصی، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲،۱۵). در این خصوص عوامل نانوکپسول شده درمانی مانند داروهای ضدسرطانی به منظور هدف قرار دادن انتخابی عوامل ضد توموری و افزایش غلظت دارو در محل سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵،۱۶).



آنکوبه شدند. رنگ ارغوانی فرمازان در داخل سلول کریستال های MTT را تثبیت کرده و توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شده و سپس سوپرناتانت برداشته می شوند. برای حل کردن کریستال های MTT مقدار $100 \mu\text{l}$ از محلول ایزوپروپانول و یا DMSO به هر گودی افزوده گردید. پلیت ها به مدت ۱۵ دقیقه برای کامل شدن واکنش بر روی شیکر قرار داده شد و پس از کامل شدن عمل حل شدن کریستال غلظت رنگ هر گودی تعیین گردید. مقدار محصول فرمازان با جذب نوری 545nm نسبت مستقیم با تعداد سلول زنده در هر گودی پلیت دارد. درصد سلول های زنده با استفاده از فرمول زیر بدست آمد: مقدار جذب نوری سلول های مورد آزمایش / جذب نوری نمونه کنترل $\times 100$.

آنالیز آماری: کلیه آزمایش ها به صورت دوتایی انجام شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد. داده های آزمایش به روش آنالیز واریانس ANOVA با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقدار IC50 با استفاده از آنالیز غیر خطی بر اساس متد Alexander و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱) و نرم افزار instat Graphpad اندازه گیری شد.

نتایج

اثر نانوقره بر روی سلول های فیبروبلاست طبیعی با اندازه گیری حداقل و حداکثر غلظت از صفر تا ۱۰۰ درصد کشندگی انجام شد. محاسبات، با آزمایش نسبت صورت پذیرفت و در آزمایش اولیه محدوده غلظت اولیه بدست آمد. هر کدام از آزمایش ها به صورت دوتایی انجام شد. اثر سمیت بر روی سلول ها با مقدار $100-1 \mu\text{g/ml}$ (ppm) از نانوقره انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول ها پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت اندازه گیری شد (تصاویر ۱ تا ۳). حداقل غلظت کشندگی در سلول های بین 10 تا 100ppm تعیین گردید. مقدار IC50 در سلول های بنیادی مزانشیمال برابر $6/33 \mu\text{g/ml}$ (تصویر ۴)، فیبروبلاست طبیعی HF2 معادل $6/68 \mu\text{g/ml}$ و در سلول های استئوبلاست G292 به مقدار $3/42 \mu\text{g/ml}$ تعیین گردید.

بحث

نانوتکنولوژی که با ابزاری با مقیاس کمتر از 100 نانومتر سروکار دارد می تواند به طور قابل توجهی در زمینه های ذخیره سازی رایانه ای، نیمه هادی ها، بیوتکنولوژی، تولید و انرژی کاربرد داشته باشد. نانومتر یال ها میتوانند از راه تنفس از طرق مختلف به داخل ریه (۱۴) سیستم گوارشی و احتمالاً پوست (۷، ۸) وارد می شود. انتشار سیستماتیک نانوذرات پس از تنفس و خوراکی نشان داده شده است (۴، ۱۴). همچنین نانوذرات می توانند به سد خونی نفوذ کند (۹). اگر چه دارورسانی اختصاصی به سلول و عضو از طریق نانوذرات زمینه بسیار ارزشمند در علوم پزشکی به حساب می آید و نانوذرات ممکن است به عنوان سنسورهایی برای مکانیسم های سلولی بکار رود ولی مطالعات کمی از اثر سمیتی آن ها انجام

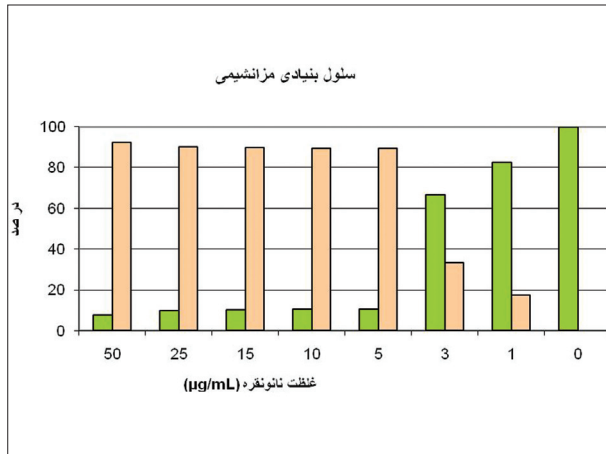
تولید نانوذرات نقره زمانی که حرارت به نقطه جوش رسید، مورد استفاده قرار گرفت. نانوذرات تبدیل شده و توسط سیترات تثبیت شده به صورت پایدار و ذرات نانو قابل حل در آب در آمدند. کلیه مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا انتخاب شدند و آب خالص برای ساختن محلول های آبی مورد استفاده قرار گرفت. ذرات نانو نقره از لحاظ مورفولوژی (ریخت شناسی) با استفاده از دستگاه هیتاچی ۴۰۰۰ اسکن کننده الکترون میکروسکوپ و دستگاه های دیجیتالی DI5000 مجهز به میکروسکوپ اتمیک فورس مورد بررسی قرار گرفت. اندازه ذرات توسط گذراندن میکروگراف های الکترونی حاصل از JEM-2010F(TEM) و نرم افزارهای مناسب مورد اندازه گیری قرار گرفت. تجزیه پراکندگی محلول نانوقره با قرار دادن آن در توری کربن پوشش داده شده با مس و سپس خشک کردن آن در هوا با دمای اطاق و میکروسکوپ اندازه گیری شد.

کشت سلول: سلول های طبیعی فیبروبلاست (PI 14, C190) HF2 (HF2FF)، استئوبلاست G292 (A 141B1 Clone) و سلول بنیادی مزانشیمال از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول ها در فلاسک با استفاده از محیط کشت RPMI (Biosera) کشت داده شدند. در خصوص سلول های بنیادی از محیط کشت DMEM با گلوکز کم (Low Glucose) (Gibco, Paisly) انگلستان) استفاده شد. به محیط کشت سرم گوساله FBS به مقدار ۱۰-۵ درصد اضافه گردید. سلول ها در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار اتمسفر CO_2 به مقدار ۵ درصد آنکوبه شدند. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت کشت سلول ها به کف فلاسک چسبیدند و سپس برای جداسازی سلول ها از کف فلاسک از تریپسین به غلظت $0/05$ درصد به مدت ۵-۳ دقیقه استفاده شد. سلول های سانتریفیوژ شده ($1400 \times g$ ، ۵ دقیقه) و سپس شمارش گردید و در داخل پلیت کشت ۹۶ گودی تقسیم گردید (هر گودی در حدود ۱۰۰۰۰ سلول). پلیت به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد فشار CO_2 قرار داده شد تا سلول ها به ته پلیت بچسبند (۳).

اثر نانوقره بر روس سلول ها: غلظت های متفاوتی از نانوقره به هر گودی پلیت الا با به صورت دوتایی اضافه گردید. غلظت های ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۵۰ و 100 میکروگرم در هر میلی لیتر از نانوقره به سلول های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست طبیعی HF2 و استئوبلاست G292 (هر گودی با ۱۰۰۰۰ سلول) اضافه گردید و جمعیت سلولی بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

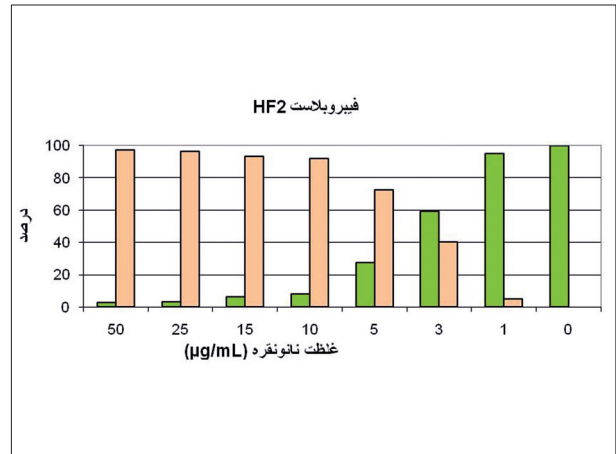
آزمایش MTT: سلول های زنده با استفاده از روش رنگ سنجی MTT مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۳). به طور خلاصه مقدار 100 میکروگرم از محلول تترازولیم زرد رنگ MTT (۳-۴، ۵-دیمیتیل تیزاولیل-۲-۲، ۵-دیفنیل تترازولیم بروماید) (سیگما) 5mg/ml در داخل (PBS) به هر گودی اضافه شد. برای احیاء MTT بوسیله فعالیت متابولیکی سلول ها، با فعالیت آنزیم های دهیدورژناز، برای تولید معادل احیاء کننده ها مانند NADH و NADPH پلیت ها به مدت ۴-۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد





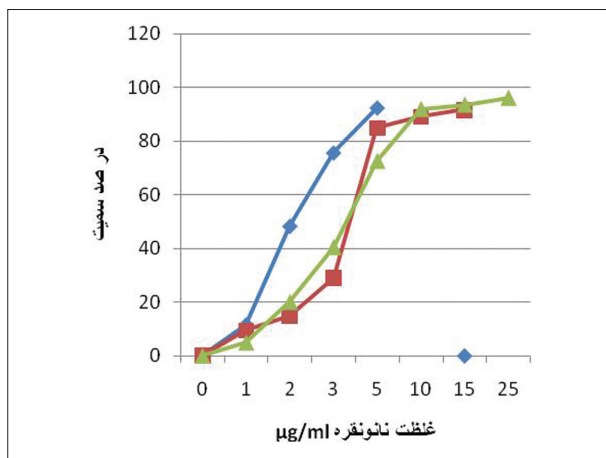
تصویر ۲- مقایسه اثر سمیت نانو نقره در سلول های بنیادی مزانشیمی در غلظت های متفاوتی از نانو نقره HF2 (۱-۵۰ µg/ml) پس از ۲۴ ساعت توسط آزمون MTT.

سلول مرده سلول زنده

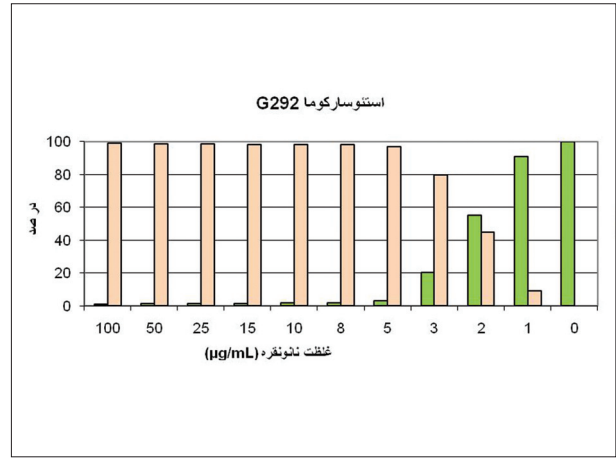


تصویر ۱- اثر غلظت های متفاوت نانو نقره (۱-۵۰ µg/ml) بر سلول های فیبروبلاست طبیعی HF2 پس از ۲۴ ساعت توسط آزمون MTT.

سلول مرده سلول زنده



تصویر ۴- اندازه گیری مقدار IC50 در رده های سلولی مورد آزمایش با استفاده از نرم افزار Graph-pad instat. G292 (سلول استئوسارکوما)، M Stem Cell (سلول بنیادی مزانشیمی)، HF2 (سلول فیبروبلاست طبیعی)، واحد IC50 به صورت µg/ml بیان شده است. G292, IC50:3.4 M Stem Cell, IC50:6.33 HF2, IC50:6.68



تصویر ۳- تأثیر نانو نقره در زنده بودن و سمیت سلول های استئوسارکوما G292 در غلظت های متفاوتی از نانو نقره HF2 (۱-۵۰ µg/ml) پس از ۲۴ ساعت توسط آزمون MTT.

سلول مرده سلول زنده

۶/۳۳ و در خصوص فیبروبلاست طبیعی HF2 مقدار ۶/۴۸ بدست آمد. جالب توجه آن که مقدار دوز مؤثر در سلول های سرطان استخوان سارکوما استئوبلاست G292 معادل ۳/۴۲ µg/mL یعنی تقریباً نصف سلول های طبیعی بدست آمد. بنابراین فرضیه مبنی بر اثر سرطان زایی نانو نقره در دراز مدت را می تواند منتفی نماید و نشان می دهد که نانو نقره نه تنها سبب سرطان زایی در طولانی مدت نمی شود بلکه میتواند در درمان سرطان نقش مؤثری را ایفاء نماید.

شده است. بسیاری از نانوذرات صنعتی تولید شده از آلوده کننده های غیر تجزیه شونده بیولوژیکی مانند زغال سیاه و فلزات ساخته می شوند و اثر طولانی مدت این مواد هنوز شناخته نشده است.

نانو نقره اثرات آنتی باکتریایی بالقوه ای دارد. ولی اطلاعات کمی در خصوص اثر سمیت آن بر روی رده های مختلف سلولی وجود دارد. یک بررسی نشان داد که نانو نقره به اندازه ۵-۲ نانومتر قادر به ایجاد مرگ (آپتوزیس) در سلول های Hella با غلظت IC50 معادل ۹۲ µg/ml می شود در حالی که نیترات نقره با مقدار ۱۷ میکروگرم در میلی لیتر قادر به انجام آن است (۱۰). همچنین در مطالعه دیگری اثر سمیت نانو نقره بر روی سلول های ماکروفاژهای جدا شده از محوطه بطنی موشی مورد تأیید قرار گرفت (۱۷). در تحقیق حاضر، که با ذرات نانو نقره به اندازه ۱۵nm مورد آزمایش قرار گرفت، نشان داده شد که مقدار IC50 و یا همان میزان اثر سمیت نانو نقره بر روی سلول های بنیادی مزانشیمی معادل µg/mL



References

- Alexander, B., Browse, D. J., Reading, S. J., Benjamin, I. S. (1999). A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 41: 55-58.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrucke, P., Wagener, M., Deidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., Schenettler, R. (2004) An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 25: 4383-91.
- Azari, O., Ghamsari, S. M., Aghchelo, M. R., Dehghan, M. M. (2007) In vitro culture of equine fibroblasts isolated from distal aspects of the limb of Thoroughbred and Caspian miniature horses. *J. Vet. Res.* 62: 126-130.
- Borm, P. J., Kreyling, W. (2004) Toxicological hazards of inhaled nanoparticles- potential implications for drug delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4: 521-531.
- Chawla, J. S., Amiji, M. M. (2002) Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm.* 249: 127-138.
- Janes, K.A., Calvo, P., Alonso, M. J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 83-97.
- Kreilgaard, M. (2002) Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: S77-S98.
- Lademann, J., Weigmann, H., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G., Sterry, W. (1999) Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12: 247-256.
- Li, Z. Z., Wen, L. X., Shao, L., Chen, J. F. (2004) Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control. *J. Control Release* 98: 245-254.
- Miura, N., Shinohara, Y. (2009) Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 390: 733-737.
- Moaddab, S., Ahari, H., Shahbazzadeh, D., Motallebid, A., Anvar, A. A., Rahman-Nya, J., Shokrgozar, M. A. (2011). Toxicity study of Nanosilver (Nanocid®) on Osteoblast Cancer Cell Line. *Iran. Nano Lett.* 1:11-16.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles, Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53: 283-318.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113: 823-839.
- Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 329-347.
- Sahoo, S. K., Ma, W., Labhasetwar, V. (2004) Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 112: 335-340.
- Shavandi, Z., Ghazanfari, T., Moghaddam, K. N. (2011) In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33: 135-40.
- Warheit, D. B., Borm, P. J., Hennes, C., Lademann, J., (2007) Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. *Inhal. Toxicol.* 19: 631-643.

STUDY ON THE CYTOTOXICITY LEVEL OF NANOSILVER ON NATURAL FIBROBLAST (HF2), OSTEOSARCOMA (G292) AND MESENCHYMAL STEM CELLS

Shahbazzadeh, D.^{1*}, Ahari, H.², Soltani, M.³, Rashedi, H.⁴, Shokrgozar, M. R.⁵, Moaddab, S.⁶, Heidarpour, M.⁷, Rahman-Nia, J.⁸

¹*Biotechnology Research Center, Medical Biotechnology Group, Venom and Toxin Lab, Pasteur Institute, Tehran- Iran.*

²*Food Hygiene sciences, Azad Islamic University, Science and Research Compus of Tehran, Tehran- Iran.*

³*Department of Aquatic Animal's Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

⁴*Department of Chemistry, College of Engineering, University of Tehran, Tehran-Iran.*

⁵*Cell bank Department, Pasteur Institute, Tehran-Iran.*

⁶*Biotechnology Research Center Medical Biotechnology Group, Venom and Toxin Lab, Pasteur Institute, Tehran- Iran.*

⁷*Institute of Standards and Industrial Researches of Iran, Karaj- Iran.*

⁸*Research Unit, Pars Nano Nasb Co, Tehran- Iran.*

(Received 8 January 2011 , Accepted 26 July 2011)

Abstract:

Nanotechnology offers numerous opportunities for invention of new and reformed applicable products for the benefit of human society. In spite of a vast application of nanomaterials there is little information about their impact on human health. This study examines the biological activity of nanosilver on mesenchymal, natural fibroblast (HF2), and osteoblast (G292) cells. The effects of nanosilver on the cells were observed by a light microscope and the amplification of the cells was assayed by using a standard cell toxicity test. The results show that the cytotoxicity depends on nanosilver concentration. The amount of IC50 on mesenchymal stem was 6.33; and on HF2 was 6.68; and on G292 cells was 3.42 µg/L. The results show that nanosilver has two times more of an inhibition effect on cancerous cells' growth as compared to the normal cells. This phenomenon is due to the direct effect of nanosilver on the cell oxidation system. Due to the extraordinary activation of the mitochondrial respiration system in cancer cells, when compared to the normal cells, it can provide suitable opportunity for nanosilver to cause cell disruption.

Key words: nanosilver, cytotoxicity, fibroblast, mesenchymal stem cells, osteoblast.

*Corresponding author's email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir, Tel: 021-66480780, Fax: 021-66480780

