

ارزیابی سمیت نانو میله‌های اکسید آهن بر رده‌ی سلولی L۹۲۹

سریه قاسم‌پور^۱، دکتر محمدعلی شکرگزار^۲، دکتر رقیه قاسم‌پور^۳، دکتر محسن علیپور^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاربردهای عمده‌ی نانو فن‌آوری در صنعت، کشاورزی، بیولوژی و پزشکی رو به افزایش است. با توجه به گستره‌ی وسیع نانو ساختارها در علوم پزشکی، این پژوهش با هدف ارزیابی سمیت سلولی نانو ذرات اکسید آهن از طریق مقایسه‌ی میزان زیست‌پذیری و آپتوتوز سلولی، انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، نانو میله‌ها به روش هم‌رسوبی ساخته شدند. برای تعیین اندازه و شکل نانو ساختارها، از میکروسکوپ الکترونی عبوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ نانو میله‌ها با پوشش اوره و پلی اتیلن گلیکول و به شکل اصلاح شده و نشده، در ۴۸ و ۷۲ ساعت از طریق آزمایش MTT مورد ارزیابی سمیت قرار گرفتند.

یافته‌ها: نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش اوره، به شکل میله‌ای با اندازه‌ی طولی ۱۵۰ nm و اندازه‌ی قطر ۱۵ nm و نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش PEG (Polyethylene glycol) دارای طول ۱۵۰ nm و قطر ۲۳ nm بودند. زیست‌پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های اکسید آهن اصلاح نشده، نسبت به نوع اصلاح شده‌ی آن کمتر بود. این سمیت، با افزایش دوز روند صعودی نشان داد. زیست‌پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش PEG کمتر از نانو میله‌های دارای پوشش اوره بودند.

نتیجه‌گیری: افزایش مرگ سلولی توسط نانو میله‌های اصلاح نشده، می‌تواند ناشی از تشکیل حلقه‌ی پروتئینی به دور این نانو میله‌ها در محیط حاوی پروتئین باشد. علاوه بر این، افزایش مرگ سلولی توسط نانو میله‌های دارای پوشش PEG در مقایسه با اوره، بیانگر تأثیر نوع پوشش و نوع سلول مورد مطالعه بر سمیت سلولی آن‌ها است.

واژگان کلیدی: نانو میله‌های اکسید آهن، زیست‌پذیری، مرگ سلولی، MTT

ارجاع: قاسم‌پور سریه، شکرگزار محمدعلی، قاسم‌پور رقیه، علیپور محسن. ارزیابی سمیت نانو میله‌های اکسید آهن بر رده‌ی سلولی

L۹۲۹. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۳): ۱۹۸۴-۱۹۷۳

موارد استفاده‌ی نانو ذرات در زمینه‌های مرتبط با سلامتی انسان‌ها و همچنین ساخت نانو ساختارهای پزشکی و نانو درمانی می‌باشد (۴-۲). فن‌آوری نانو در جاسازی سلول‌ها (۵)، افزایش کیفیت MRI (Magnetic resonance imaging) (۶) و درمان

مقدمه

نانو تکنولوژی شامل ساخت مواد در اندازه‌ی نانومتری جهت تولید و نشان دادن خواص جدید مواد است. مواد در اندازه‌ی نانو، خواص متفاوتی نسبت به اندازه‌ی بزرگ‌تر خود دارند (۱).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲- استاد، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه انرژی‌های نو و محیط زیست، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

می‌توانند با اثرات سوء بر میتوکندری، به دنبال استرس اکسیداتیو، بر روی چرخه‌ی سلولی تغییر ایجاد کنند و باعث مرگ سلولی شوند (۱۴).

علاوه بر این، تأثیر نانو لوله‌های کربنی در مطالعات حیوانی، حاکی از گرانولومای اپیتلیوئیدی و التهاب بین بافتی می‌باشد (۱۵). برای کاهش سمیت، افزایش خواص زیست سازگاری و امکان کاربرد این نانو ذرات در درمان هدف‌گیری شده از پوشش‌های مناسب عامل‌دار شده (آلی و غیر آلی) بر سطح آن‌ها استفاده می‌شود (۱۸-۱۶). جهت تأمین بخشی از خواص فوق می‌توان از پلی اتیلن گلیکول (PEG) یا Polyethylene glycol (۱۸)، دکستران (۲۰-۱۹)، کیتوسان (۲۱، ۱۶)، پلی وینیل الکل (۲۳-۲۲)، طلا و اوره (۲۴) نام برد.

البته مواد گفته شده معایبی نیز دارند که می‌توان از آن جمله به بروز سمیت، آگلومریزاسیون، انحلال پذیری در غشای سلول و ایجاد سمیت بیشتر نام برد (۲۷-۲۵، ۲۰). نظر به این که در خصوص تأثیر نانو میله‌های اکسید آهن بر عملکرد سلول که ممکن است به بهبود زیست پذیری و یا بروز سمیت و نابودی آن منجر شود، اطلاعات کافی موجود نیست؛ بنابراین مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار، اثرات سمی احتمالی نانو ذرات اکسید آهن با پوشش اوره و PEG را در سلول‌های رده‌ی L۹۲۹ مورد بررسی قرار داد.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه‌ی تجربی (Experimental) بود که در آن به بررسی تأثیر نانو میله‌های اکسید آهن در دوزهای پایین (۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$) و بالا (۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$) و با دو نوع پوشش اوره و پلی اتیلن گلیکول و در دو

سرطان و هایپرترمی (۷-۸) مورد استفاده قرار می‌گیرد. مولکول‌ها و ذرات در مقیاس نانو، قابلیت متفاوتی در درمان بیماری‌ها دارند که این تفاوت به اثرات بیولوژیکی آن‌ها که ناشی از اندازه و ساختار ذرات نسبت به مولکول‌های بزرگ‌تر است، برمی‌گردد. افزایش نیاز هر چه بیشتر به این مواد و ساختارها در مطالعات *In vitro* و *In vivo* منجر به ایجاد شرکت‌ها و مؤسسات سازنده‌ی این مواد شده است. اگر چه این نانو ساختارها، به طور وسیعی در تکنولوژی جدید استفاده می‌شوند؛ اما اطلاعات کافی از محدوده‌ی ایمنی و سمیت این مواد برای انسان در دسترس نمی‌باشد (۹). به همین دلیل، این افزایش مصرف، ضرورت حصول اطمینان از ایمنی این مواد را ایجاد می‌کند. بدون داشتن اطلاعات کافی از اثرات سمی نانو میله‌ها، خطرات زیادی منتظر بشریت خواهد بود. برخی از این نانو ساختارها از عرض غشای سلولی عبور نموده و به میتوکندری می‌رسند و آثار خود را اعمال می‌کنند (۱۰).

مواد سمی می‌توانند منجر به پاسخ‌های گوناگونی در سلول‌ها شوند (۲). دانشمندان به طور عمده بر روی مکانیسم‌هایی که باعث مرگ سلولی می‌شوند، متمرکز شده‌اند. بنابراین، عواملی که در آپوپتوز و یا نکروز سلولی دخیل هستند، مورد مطالعه قرار می‌گیرند (۱۱). علاوه بر این، دانشمندان در جستجوی مکانیسم‌ها و راه‌هایی هستند که از آن طریق، با افزایش و یا کاهش نانو میله‌ها مرگ سلولی رخ می‌دهد؛ یکی از این مکانیسم‌ها، القای استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۳-۱۲). القای استرس اکسیداتیو نیز منجر به تخریب عملکرد میتوکندری می‌شود و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. بنابراین، نانو میله‌ها

گردید و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از طی ۲۴ ساعت، محلول با سانتریفیوژ rpm ۱۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برداشته شد و به میزان حجم اولیه‌ی محلول، به آن محیط کشت (DMEM، ۱۰ درصد) FBS افزوده شد.

کشت سلولی

سلول‌های L۹۲۹ در محیط کشت DMEM که حاوی FBS ۱۰ درصد می‌باشد، نگهداری شدند. سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت اکسیژن ۵ درصد قرار گرفتند.

مواجهه‌ی سلول‌ها با نانو میله‌ها

سلول‌ها در چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند و FBS به روی آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پس از طی این زمان، ۴۰ میکرولیتر از نانو میله‌ها روی سلول‌ها ریخته شدند. سپس تا پایان ساعت‌های مورد مطالعه (۴۸ و ۷۲ ساعت)، در انکوباتور قرار داده شدند. هر دوز از نانو میله‌ها در ۶ چاهک ریخته شد. این مراحل جهت آزمایش MTT برای سه بار تکرار گردید.

بررسی زیست پذیری سلول

پس از سپری شدن زمان‌های مورد مطالعه، پلیت از انکوباتور خارج شد و در زیر هود ابتدا محیط رویی سلول‌ها خارج گردید و پس از آن به روی سلول‌ها، به میزان ۱۰۰ μ l از محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده در PBS

زمان مختلف (۷۲ و ۴۸ ساعت) بر روی سلول‌های رده‌ی L۹۲۹ جهت تعیین سمیت یا سلامت نانو ذرات ذکر شده با استفاده از روش MTT پرداخته شد. در آزمایشات انجام شده هر کدام از دوزها علاوه بر کنترل با یکدیگر، بر حسب زمان نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

چگونگی ساخت نانو میله‌های اکسید آهن

اوره و آب دیونیزه در حضور گاز آرگون و با استیرر هم زده شد. نمک کلرید آهن (II) و نمک کلرید آهن (III) در محلول اسید کلریدریک ۱ مولار حل شد و سپس به محلول اوره اضافه شد و بار دیگر با استیرر در حضور گاز آرگون هم زده شدند. گاز آرگون باعث ایجاد محیطی عاری از اکسیژن می‌شود. پس از ۸ ساعت به محلول فوق، اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار اضافه گردید و به مدت یک روز روی مگنت قرار داده شد. پس از جدا نمودن محلول رویی، ۲ مرتبه و هر بار با ۵۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار، رسوب شسته شد. محلول نهایی در یخچال، در دمای ۶ درجه، جهت کارهای بعدی نگهداری شد. تهیه‌ی نانو میله‌های دارای پلی اتیلن گلیکول، مطابق با روش سنتز نانو میله‌های بدون پوشش می‌باشد. با این تفاوت که پلی اتیلن گلیکول به محلول اولیه اضافه می‌شود (۲۸).

اصلاح نانو میله‌ها (Modification)

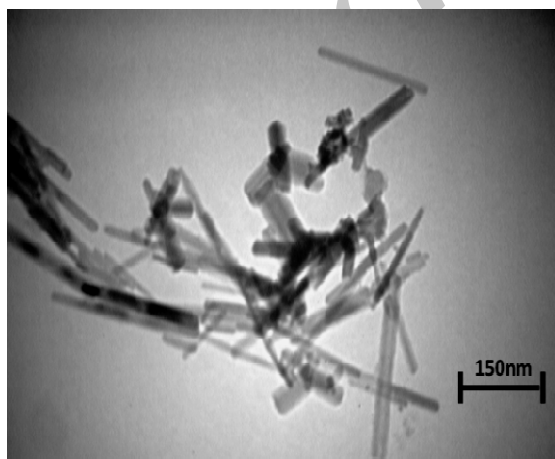
نانو میله‌ها پس از اختلاط توسط ورتکس (Vortex) و اطمینان از یکنواخت شدن محلول، به میزان مورد نیاز از محلول برداشته و در فالکون ریخته شد. به میزان ۹ برابر محلول برداشته شده، محیط کشت (DMEM یا Dulbecco's modified eagle medium) ۱۰ درصد) FBS (Fetal bovine serum) به آن اضافه

نشده از آزمون آماری اندازه‌های تکراری Repeated measures ANOVA و Fisher's least significant difference استفاده شد.

یافته‌ها

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) یا (Transmission electron microscope) و روبشی (SEM یا Scanning electron microscope) که از نانو میله‌ها گرفته شد، با توجه به شکل ۱ و ۲ نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش اوره، به شکل میله‌ای با اندازه‌ی طولی ۱۵۰ nm و اندازه‌ی قطر ۱۵ nm و اندازه‌ی نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش PEG دارای طول ۱۵۰ nm و قطر ۲۳ nm بودند.

با توجه به شکل ۳، میزان زیست‌پذیری سلول‌های L۹۲۹ در مواجهه با دوزهای مختلف نانو میله‌های اکسید آهن اصلاح شده نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P = ۰/۰۳۲$) و ($P = ۰/۰۲۰$). این نتیجه در مورد نانو میله‌های اصلاح شده نیز دیده می‌شود.



شکل ۱. تصویر گرفته شده از نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش اوره توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، نشان دهنده‌ی شکل و اندازه‌ی آنها

(Phosphate buffer saline) ۰/۱۵ M روی سلول‌ها اضافه شد. کاغذ آلومینیومی به دور پلیت پیچیده شد و در انکوباتور به مدت ۴ ساعت قرار داده شد. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج گردید. محلول MTT از روی سلول‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه گردید. بار دیگر، به مدت زمان ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا بلورهای تشکیل شده در الکل حل گردد. پس از آن به منظور به دست آمدن محلول یکنواخت، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. مقدار غلظت ماده‌ی حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه الیزاریدر (STAT FAX ۲۱۰۰ USA)، در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد.

چاهک‌هایی که دارای سلول‌های بیشتری باشند، چگالی نوری (OD یا Optical density) بالاتری نسبت به چاهک‌های دارای سلول کمتر نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان از رابطه‌ی زیر زیست‌پذیری (Viability) سلول‌ها را مشخص کرد و با نمونه‌ی شاهد مقایسه نمود.

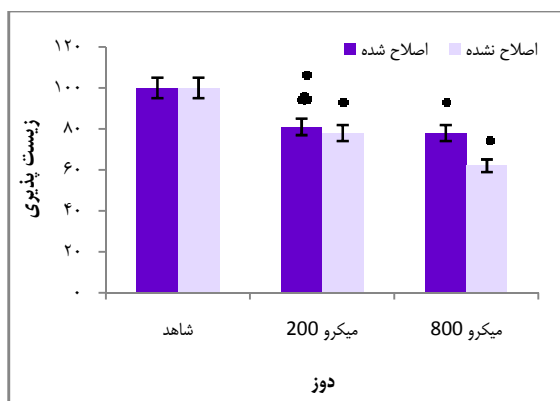
$$\text{Toxicity}\% = \left(1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}\right) \times 100$$

$$\text{Viability}\% = 100 - \text{Toxicity}\% \quad (29)$$

روش آماری

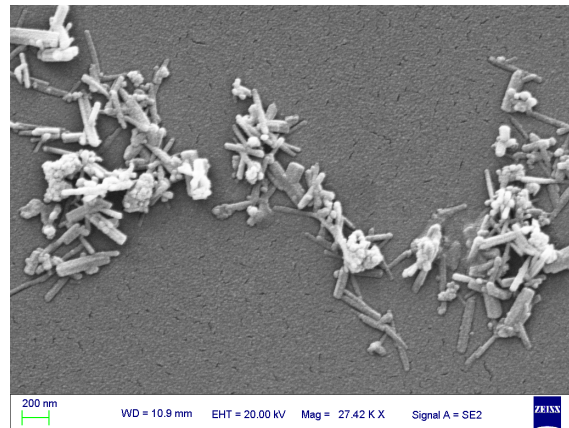
جهت انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. مقایسه‌ی دوزها با یکدیگر و همچنین با گروه شاهد برای یک زمان ثابت به کمک آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون Tukey انجام شد. جهت مقایسه‌ی دوزهای ثابت در زمان‌های متفاوت و همچنین مقایسه‌ی نتایج نانو میله‌های اصلاح شده و

چنان که در شکل ۴ دیده می‌شود، در ۷۲ ساعت میزان زیست پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های اصلاح شده و نشده در دوزهای مختلف، نسبت به نمونه‌ی شاهد، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P = 0/011$ و $P = 0/010$). در این شکل با افزایش دوز، زیست پذیری در نانو میله‌های اصلاح شده، کاهش یافته است. همچنین مشاهده می‌گردد که در مقایسه‌ی دوزهای مشابه، تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود. همچنان که با افزایش دوز در نوع اصلاح نشده، تفاوت معنی‌داری در زیست پذیری سلول‌ها دیده نمی‌شود.

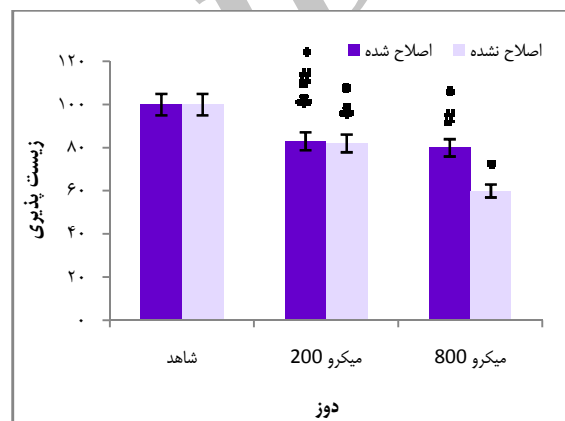


شکل ۴. مقایسه‌ی نانو میله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده با یکدیگر و کنترل در ۷۲ ساعت
 • مقایسه‌ی هر دوز با کنترل ($P < 0/05$), ♣: مقایسه‌ی دوز ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ با ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0/05$), ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm دامنه‌ی تغییرات می‌باشد.

به دنبال اثرات متفاوت نانو ساختارها به سبب پوشش‌های مختلف آن‌ها، نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش‌های اوره و PEG مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است. در این بخش، دو نوع نانو میله با پوشش‌های اوره و PEG، پس از قرار گرفتن در محیط کشت حاوی FBS (Modification)، آزمایش



شکل ۲. تصویر گرفته شده از نانو میله‌های اکسید آهن با پوشش اوره توسط میکروسکوپ روبشی، نشان دهنده‌ی شکل و اندازه‌ی آن‌ها

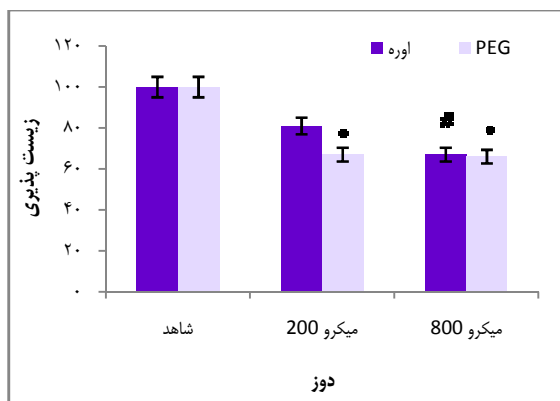


شکل ۳. مقایسه‌ی نانو میله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده در ۴۸ ساعت

• مقایسه‌ی هر دوز با کنترل ($P < 0/05$), #: مقایسه‌ی هر دوز با دوز مشابه خود ($P < 0/05$), ♣: مقایسه‌ی دوز ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ با ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0/05$), ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm دامنه‌ی تغییرات می‌باشد.

علاوه بر این، با افزایش دوز نیز میزان زیست پذیری کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P = 0/023$). این مورد در نانو میله‌های اصلاح نشده نیز صادق است. در مقایسه‌ی نانو میله‌های اصلاح شده و نشده، نانو میله‌های اصلاح نشده زیست پذیری کمتری را نسبت به نانو میله‌های اصلاح شده نشان می‌دهد ($P = 0/001$).

۷۲ ساعت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

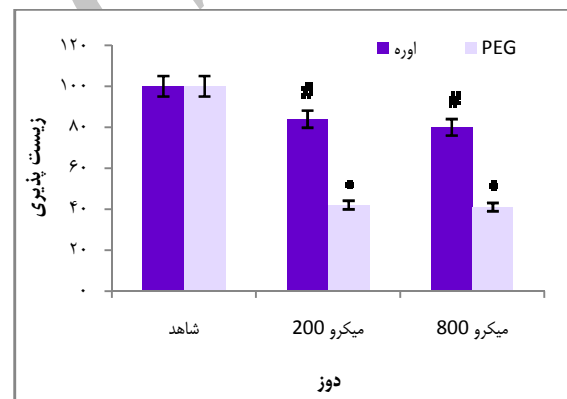


شکل ۶. مقایسه‌ی نانو میله‌ها با پوشش اوره و PEG (Polyethylene glycol) با یکدیگر و کنترل در ۷۲ ساعت. * مقایسه‌ی هر دوز با کنترل ($P < 0/05$), #: مقایسه‌ی دوزهای مشابه با یکدیگر ($P < 0/05$), ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm دامنه‌ی تغییرات می‌باشد.

بحث

نانو ساختارها در ابتدای مواجهه با سلول از عرض غشای سلولی عبور می‌کنند و با ورود به سلول باعث آسیب به ارگان‌های داخلی از جمله میتوکندری می‌شوند. آسیب مکانیکی میتوکندری به دنبال قرار گرفتن نانو میله‌ها بر روی آن می‌باشد. نانو میله‌ها با اندازه‌ها و ترکیبات متفاوت اغلب بر روی میتوکندری قرار می‌گیرند (۳۰) و باعث تخریب جدی ساختاری می‌شوند که علت به وجود آمدن استرس اکسیداتیو می‌شوند (۳۱). همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، در مواجهه‌ی سلول‌ها با دوزهای متفاوت نانو میله‌های اکسید آهن، کاهش میزان زیست‌پذیری نسبت به گروه شاهد دیده شد. از آن جایی که نانو ساختارهای مورد بررسی در این تحقیق، میله‌ای شکل بودند، پس می‌توانند به راحتی از غشای سلولی عبور کنند و اثرات خود را اعمال کنند.

MTT بر روی آن‌ها انجام شد و با هم مقایسه گردید. با توجه به شکل ۵ زیست‌پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های پوشش داده شده با PEG در دوزهای متفاوت، نسبت به نمونه‌ی شاهد کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0/001$). این کاهش با افزایش دوز، افزایش معنی‌داری نداشت. در مقایسه، نانو میله‌های پوشش‌دار شده با اوره و PEG، میزان سمیت پوشش اوره در هر دو زمان (۴۸ و ۷۲) ساعت کمتر از PEG مشاهده شد. این اختلاف به جهت آماری معنی‌دار است ($P = 0/04$) و ($P < 0/001$).



شکل ۵. مقایسه‌ی نانو میله‌ها با پوشش اوره و PEG (Polyethylene glycol) با یکدیگر و کنترل در ۴۸ ساعت. * مقایسه‌ی هر دوز با کنترل ($P < 0/05$), #: مقایسه‌ی دوزهای مشابه با یکدیگر ($P < 0/05$), ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm دامنه‌ی تغییرات می‌باشد.

با مشاهده‌ی شکل ۶، دوز $200 \mu\text{g/ml}$ در ۷۲ ساعت در هر دو پوشش، معنی‌دار نمی‌باشد که به نظر می‌رسد که خطای آزمایشی باشد. با توجه به شکل‌های ۵ و ۶، اختلاف بین دوز $200 \mu\text{g/ml}$ و $800 \mu\text{g/ml}$ در نانو میله‌های دارای پوشش PEG در ۴۸ و

قرار گرفته در معرض نانو ذرات اصلاح شده، بیشتر از نوع اصلاح نشده‌ی آن گزارش شد (۳۲).

همچنان که از شکل‌های ۳ و ۴ در مقایسه‌ی اختلاف بین زیست‌پذیری در دو نوع نانو میله در دوزهای ثابت بر می‌آید، میزان این تفاوت در دوزهای ثابت از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت کمتر شده است و در ۷۲ ساعت این اختلاف از بین رفته است. به عبارت دیگر، اختلاف زیست‌پذیری بین نانو میله‌های اصلاح شده و نشده با گذشت زمان از بین می‌رود و شرایط زیستی به سمت یکسان شدن پیش می‌رود. به نظر می‌رسد علت این پدیده با سلول‌های مرده مرتبط باشد. با مواجهه‌ی اولیه‌ی نانو میله‌ها با سلول، درصدی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی می‌شوند. این سلول‌ها تا پایان آزمایش (۷۲ ساعت) در محیط باقی می‌مانند و احتمال می‌رود پروتئین‌های حاصل از لیز این سلول‌ها، شرایط جدیدی را برای سلول‌های باقی‌مانده ایجاد کند. این شرایط ممکن است به دنبال خالی شدن نقاط قابل اتصال پروتئین‌ها به نانو میله‌ها باشد و یا این که با شرایط تغییر پروتئین موجود در محیط، به دنبال لیز سلول‌های مرده، pH تغییرات جدیدی داشته است. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای بررسی شرایط جدید، آزمایش‌های تکمیلی انجام گردد.

پوشش‌دار کردن نانو ساختارها به منظور بهینه کردن موارد مصرف آن‌ها، نشان‌دار کردن سلول‌ها، اتصال آنتی‌بادی‌ها و هدفمند کردن محل اعمال اثر داروهای متصل شده به نانو ساختارها، اعمال می‌گردد (۳۲). پلی‌اتیلن گلیکول، پلیمری است که در فن‌آوری نانو از آن به عنوان پوشش نانو ذرات استفاده می‌شود. این ماده خاصیت ایمونوژنیک و آنتی

محیط‌های بیولوژیک مانند محیط بدن موجودات زنده و همچنین محیط‌های کشت سلولی در مطالعات آزمایشگاهی حاوی مواد معدنی و پروتئین‌های متعددی می‌باشد. با قرار گرفتن نانو ساختارها در این محیط‌ها، پروتئین‌ها به سطح این مواد جذب می‌شوند و تشکیل یک حلقه‌ی پروتئینی تحت عنوان Hard corona می‌دهند. با تشکیل این پوشش پروتئینی، pH محیط کشت دچار تغییر می‌گردد که این تغییر pH، موجب مرگ سلولی می‌گردد. با خارج کردن محیط کشت حاوی پروتئین سرم گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) پس از ۲۴ ساعت و اضافه کردن محیط کشت تازه، دیگر تغییری در pH محیط جدید ایجاد نمی‌شود. با قرار گرفتن نانو ذرات در محیط تازه، با وجود مواد بیولوژیک تازه و فراوان، جایی برای اتصال آن‌ها با نانو ذرات باقی نمی‌ماند. این موضوع منجر به ثبات pH محیط جدید می‌گردد (۳۲-۳۵). بنابراین، با این روش که همان اصلاح کردن ذرات نام دارد، می‌توان به طور دقیق‌تری میزان مرگ سلولی به دنبال اثرات مستقیم نانو ذرات را به دست آورد.

همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، با اصلاح نانو میله‌ها میزان سمیت آن‌ها کاهش یافته است که نشان از ایمن‌تر شدن این مواد دارد. در راستای نتایج به دست آمده، در مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکاران انجام شد، نانو ذرات اکسید آهن کروی شکل بدون پوشش و پوشش داده شده با PVA (Polyvinyl acetate)، مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی هر دو نوع نانو ذرات (با و بدون پوشش) به صورت اصلاح شده و نشده، با آزمایش MTT ارزیابی شده‌اند. در این پژوهش، میزان زیست‌پذیری سلول‌های

ژنیک ندارد و به خوبی در آب قابل حل است (۳۶). علاوه بر این، مدت زمان ماندگاری طولانی در خون دارد و با بدن سازگار است (۳۷). بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان سمیت نانو میله‌های اکسید آهن با روکش اوره و پوشش PEG انجام شد.

همان‌گونه که در شکل ۵ دیده می‌شود، زیست‌پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های با پوشش اوره بیشتر از پوشش PEG بود. این نتیجه در شکل ۶ که مقایسه‌ی این دو در ۷۲ ساعت است، نیز دیده می‌شود. به طور خلاصه، به نظر می‌رسد که در ساعت‌ها و دوزهای متفاوت مورد مطالعه، PEG آثار سمی بیشتری نسبت به اوره دارد. با توجه به روش ساخت ماده، این احتمال می‌رود که این ذرات آگلومره شده باشند. پروتئین‌های اطراف نانو میله‌ها به دنبال آگلومریزاسیون، شرایط زیستی سلول‌ها را به مخاطره می‌اندازند و باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند. در مواردی که آگلومریزاسیون (تجمع) نانو میله‌ها ایجاد می‌شود و سپس رسوب می‌کنند، ممکن است منجر به کاهش ATP (Adenosine triphosphate) و سمیت سلول و یا مرگ سلول شود (۳۱). به نظر می‌رسد نتایج زیست‌پذیری سلول‌های قرار گرفته در معرض نانو میله‌های پوشش داده شده با PEG در تحقیق حاضر نیز تأییدی بر کاهش ATP و مرگ سلولی به دنبال آگلومریزاسیون باشد.

این نکته قابل توجه است که اثرات معکوس نانو میله‌ها به غلظت آن‌ها نیز بستگی دارد. علاوه بر این، ممکن است که افزایش مرگ سلول‌ها به نوع سلول نیز مرتبط باشد. در مطالعه‌ای که توسط Seo و همکاران بر روی اسید لینولئیک با پوشش PEG انجام شد، میزان آپوپتوز تا ۵ برابر افزایش یافته است. این

نتایج از طریق فلوسیتومتری و MTT بر روی سلول‌های سرطانی سینه به دست آمده است. در حالی که عکس این نتایج، در مورد اثر ماده‌ی فوق بر روی سلول‌های NIH ۳T۳ دیده شده است (۳۷). بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای علت‌یابی این موضوع، مطالعات و آزمایش‌های تکمیلی انجام گردد. در راستای نتایج به دست آمده، در مطالعه‌ی Vangara و همکاران، نانو ذرات هیالورونیک اسید با پوشش PLGA-PEG (Poly lactic-co-glycolic acid- polyethylene glycol) بر روی رده‌ی سلولی CHO (Chines hamster ovarian) بررسی قرار گرفت و کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها گزارش گردید (۳۸).

تعدادی از دانشمندان آثار میزان ثابتی از (Aminosilane-coated iron oxide nanoparticles) AmS-IONPs را بر روی سه رده‌ی سلولی آستروسیت، نورون و bEnd.۳ بررسی کرده‌اند. در این بررسی میزان زیست‌پذیری سلول‌ها در مواجهه با دوز ثابتی از AmS-IONPs متفاوت گزارش شده است. میزان زیست‌پذیری سلول‌های نورونی در معرض دوز ثابتی از AmS-IONPs در حدود ۵۰ درصد بوده است، در حالی که در شرایط یکسان، زیست‌پذیری سلول‌های bEnd.۳ در حدود ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۳۹).

با مقایسه‌ی دو شکل ۵ و ۶ و مشاهده‌ی عدم اختلاف بین دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در پوشش PEG، این احتمال وجود دارد که پوشش PEG زودتر از اوره از بین برود و آهن موجود در زیر پوشش آن آزاد شود و این امر، منجر به بهبود شرایط زیستی سلول و کاهش روند مرگ سلولی می‌گردد. آهن از

حلقه، شرایط زیستی محیط مانند pH تغییر می‌کند و منجر به مرگ سلولی می‌شود. در بررسی نوع پوشش نانو میله‌ها، نانو میله‌های پوشش‌دار شده با PEG سمی‌تر از نانو میله‌های با پوشش اوره شدند. این نتیجه ممکن است متأثر از نوع سلول، اندازه و یا آگومریزاسیون این نانو میله‌ها باشد. به منظور دستیابی به یک حاشیه‌ی امن جهت کاربرد نانو میله‌های ذکر شده، مطالعات بیشتری در رده‌های سلولی مختلف و ارگان‌های مختلف در مدل‌های حیوانی بر حسب دوز و زمان، مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از نتایج پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی فیزیولوژی می‌باشد. از معاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی زنجان جهت تأمین هزینه‌های این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از همکاری مسئولین محترم انستیتو پاستور ایران به جهت فراهم آوردن امکانات لازم تشکر می‌شود. راهنمایی و نظرات ارزنده‌ی جناب آقای دکتر مرتضی محمودی شایسته‌ی قدردانی است.

جمله مواد معدنی مورد نیاز رشد سلول است و کمبود آن منجر به کاهش رشد و اختلال در چرخه‌ی سلولی و پروتئین‌های مرتبط با چرخه از جمله سایکلین‌ها و CDKها (Cyclin-dependent kinases) می‌شود (۴۳-۴۰).

در مطالعه‌ی Huang و همکاران بر روی فروکربوتران (اکسید آهن یونیزه)، مشاهده شد که این ماده نه تنها باعث آپوپتوز نشده است؛ بلکه باعث پیشرفت چرخه‌ی سلولی نیز گردیده است. علت این امر، کاهش H_2O_2 داخل سلولی به واسطه‌ی حضور فروکربوتران گزارش شده است (۴۴). از آن جایی که نانو میله‌های مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر حاوی اکسید آهن بود، بنابراین به نظر می‌رسد که با گذشت زمان، آهن در محیط آزاد شده و منجر به بهبود نسبی شرایط زیستی سلول شده باشد. نتیجه‌ای که به دنبال از بین رفتن اختلاف زیست پذیری با افزایش دوز، در نانو میله‌های پوشش‌دار شده با PEG، دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که سمیت بیشتر نانو میله‌های اکسید آهن اصلاح نشده در مقایسه با نوع اصلاح شده‌ی آن، به دلیل تشکیل حلقه‌ی پروتئین به دور نانو میله‌های اصلاح شده باشد. با تشکیل این

References

- Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev* 2012; 112(4): 2323-38.
- Rouch DA, Lee BT, Morby AP. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* 1995; 14(2): 132-41.
- Mahmoudi M, Simchi A, Vali H, Imani M, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, et al. Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and poly(vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts. *Advanced Engineering Materials* 2009; 11(12): B243-B50.
- Helmus MN. How to commercialize nanotechnology. *Nat Nanotechnol* 2006; 1(3): 157-8.
- Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, et al. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology* 2009; 20(37): 375101.
- Liu G, Lin Y. A renewable electrochemical magnetic immunosensor based on gold nanoparticle labels. *J Nanosci Nanotechnol* 2005; 5(7): 1060-5.

7. Johannsen M, Thiesen B, Jordan A, Taymoorian K, Gneveckow U, Waldofner N, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate* 2005; 64(3): 283-92.
8. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett* 2004; 209(2): 171-6.
9. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(7): 975-83.
10. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(1): 116-9.
11. Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journey WS, Laurent S. Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem Rev* 2011; 111(5): 3407-32.
12. Xia T, Kovoichich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 2006; 6(8): 1794-807.
13. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761): 622-7.
14. Van HB, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5(2): 145-52.
15. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 2004; 77(1): 126-34.
16. An X, Su Z. Characterization and application of high magnetic property chitosan particles. *Journal of Applied Polymer Science* 2001; 81(5): 1175-81.
17. Carmen Bautista M, Bomati-Miguel O, Morales MDP, Serna CJ, Veintemillas-Verdaguer S. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005; 293(1): 20-7.
18. Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A, Jr. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug Chem* 2002; 13(1): 122-7.
19. Lee J, Senna M, Isobe T. Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996; 177(2): 490-4.
20. Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials* 2000; 21(22): 2253-61.
21. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-49.
22. Albornoz C, Jacobo SE. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2006; 305(1): 12-5.
23. Osada Y, Gong JP. Soft and wet materials: polymer gels. *Advanced Materials* 1998; 10(11): 827-37.
24. Latham VH, Ducut JL, Rostamiani K, Chun HH, Lopez ME, Herrera S, et al. A rapid lectin receptor binding assay: comparative evaluation of sea urchin embryo cell surface lectin receptors. *Acta Histochem* 1995; 97(1): 89-97.
25. Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2003; 24(25): 4551-7.
26. Gupta AK, Curtis AS. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15(4): 493-6.
27. Hilger I, Kiessling A, Romanus E, Hiergeist R, Hergt R, Andra W, et al. Magnetic nanoparticles for selective heating of magnetically labelled cells in culture: preliminary investigation. *Nanotechnology* 2004; 15(8): 1027-32.
28. Ghasemi F. Determination of protein absorption profile at the surface of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles using gel electrophoresis [PhD Thesis]. Tehran, Iran: Sharif University of Technology; 2012.
29. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2005.
30. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Advanced Materials* 2004; 16(12): 961-6.
31. AshaRani PV, Low Kah MG, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009; 3(2): 279-90.
32. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Hafeli UO, et al. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 75(1): 300-9.

33. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P. An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology* 2009; 20(22): 225104.
34. Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 2011; 111(9): 5610-37.
35. Seo JH, Moon HS, Guo DD, Lee HG, Choi YJ, Cho CS. PEGylation of conjugated linoleic acid and its application as an anti-cancer prodrug. *Key Engineering Materials* 2007; 342(343): 441-4.
36. Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 2005; 10(21): 1451-8.
37. Seo JH, Moon HS, Kim IY, Guo DD, Lee HG, Choi YJ, et al. PEGylated conjugated linoleic acid stimulation of apoptosis via a p53-mediated signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70(2): 621-6.
38. Vangara KK, Liu JL, Palakurthi S. Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of SN-38 to ovarian cancer. *Anticancer Res* 2013; 33(6): 2425-34.
39. Sun Z, Yathindranath V, Worden M, Thliveris JA, Chu S, Parkinson FE, et al. Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system-relevant cell culture models. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 961-70.
40. Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 402-14.
41. Gao J, Richardson DR. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: The mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood* 2001; 98(3): 842-50.
42. Kulp KS, Green SL, Vulliet PR. Iron deprivation inhibits cyclin-dependent kinase activity and decreases cyclin D/CDK4 protein levels in asynchronous MDA-MB-453 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 1996; 229(1): 60-8.
43. Simonart T, Degraef C, Andrei G, Mosselmans R, Hermans P, Van Vooren JP, et al. Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of Kaposi's sarcoma cells and of their putative endothelial precursors. *J Invest Dermatol* 2000; 115(5): 893-900.
44. Huang DM, Hsiao JK, Chen YC, Chien LY, Yao M, Chen YK, et al. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2009; 30(22): 3645-51.

The Iron Oxide Nanorods Toxicity on L929 Cell Line

Sarieh Ghasempour¹, Mohammad-Ali Shokrgozar PhD², Roghayeh Ghasempour PhD³,
Mohsen Alipour PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Major applications of nanotechnology in industry, agriculture, biology and medicine are growing. Given the broad range of nanoscience in medical sciences, evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanorods through comparing viability and apoptosis formed the objectives of this study.

Methods: In this study, the nanorods were synthesized by coprecipitation method and transmission electron microscopy and scanning electron microscopy was used for determination of the size and shape of nanoparticles. 200 and 800 µg/ml urea and polyethylene glycol (PEG) coated nanorods, in forms of modified and non-modified, were assessed for toxicity using MTT assay 48 and 72 hours later.

Findings: The length and diameter of the urea- and PEG-coated nanorods were 150 and 15 nm and 150 and 23 nm, respectively. Viability of cells exposed to non-modified iron oxide nanorods was less than modified form. This toxicity showed uptrend with increasing dose. Viability of the cells exposed to PEG-coated iron oxide nanorods was lower than urea-coated once.

Conclusion: It appears that the increase in apoptosis affected by non-modified iron oxide nanorods might be resulted from formation of protein rings called Hard Corona around the nanorods. In addition, more increase of cell death by PEG-coated nanorods compared to urea-coated nanorods is indicator of the effect of type of coverage and type of cells on their cytotoxicity.

Keywords: Iron oxide nanorods, MTT, Viability, Urea coated iron oxide, L929 cell line

Citation: Ghasempour S, Shokrgozar MA, Ghasempour R, Alipour M. **The Iron Oxide Nanorods Toxicity on L929 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(263): 1973-84

1- MSc Student, Department of Physiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2- Professor, Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Renewable Energy of Environment Engineering, School of New Science of Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Mohsen Alipour PhD, Email: alipourmohsen@yahoo.com