

افزایش سمیت سلولی نانوذرات نقره با اعمال پالس‌های الکتریکی

ساجده یادگاری دهکردی^۱، دکتر حمیدرضا صادقی^۲، ثمانه سودمند^۳، دکتر فاطمه همایی شانددیز^۴،
دکتر آمنه سازگارنیا^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: الکتروپوریشن یکی از شیوه‌هایی است که بارها برای تحویل دارو به بافت‌های هدف مورد استفاده قرار گرفته است. اعمال پالس‌های الکتریکی قوی با ایجاد منافذ موقتی در غشای سلول، می‌تواند قابلیت نفوذ غشا را نسبت به برخی از مولکول‌ها افزایش دهد. از طرف دیگر، در حالی که خواص ضد میکروبی چشمگیر نانوذرات نقره، بهره‌گیری از سمیت آن‌ها را برای از بین بردن سلول‌های سرطانی کاندید کرده است، اما کاستن از عوارض جانبی ناشی از سمیت آن برای ارگان‌های حساس بدن، مستلزم تجویز دوزهای کم نانوذرات نقره می‌باشد. در این مطالعه، به منظور فراهم آمدن شرایط امن جهت کاربرد بالینی نانوذرات نقره، امکان جبران کاهش دوز کم با تسهیل ورود نانوذرات به داخل سلول‌های سرطانی MCF-7، از طریق فرایند الکتروپوریشن مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا سمیت نانوذرات نقره، در غلظت‌های مختلف ارزیابی شد. سپس پالس‌های الکتریکی مربعی با قدرت‌ها و دیوریشن‌های متفاوت در فرکانس ۱ Hz توسط دستگاه الکتروپوریتور ۸۳۰ ECP، حضور و غیاب نانوذرات نقره ۱۰ nm به سلول‌ها اعمال و کارایی تکنیک با آزمون MTT (Microculture tetrazolium test) مورد سنجش قرار گرفت. همچنین مشخصات پالس‌های الکتریکی جهت ایجاد یک همیاری موفق با دوز کمی از نانوذرات نقره تعیین شد.

یافته‌ها: IC₅₀ نانوذرات نقره، ۴/۵ μg/ml برآورد شد. اعمال همزمان نانوذرات نقره و پالس‌های الکتریکی با قدرت ۷۰۰ V/cm و دیوریشن‌های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ μs مؤثری را فراهم نمود. بیشترین اثر همیاری بین نانوذرات و پالس‌های الکتریکی در دیوریشن ۱۰۰ μs ثبت شد.

نتیجه‌گیری: اعمال پالس‌های الکتریکی در حضور نانوذرات نقره، امکان جبران کاهش اثر ناشی از تجویز دوزهای کمتر آن‌ها را فراهم می‌نماید.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، الکتروپوریشن، رده‌ی سلولی MCF-7

ارجاع: یادگاری دهکردی ساجده، صادقی حمیدرضا، سودمند ثمانه، همایی شانددیز فاطمه، سازگارنیا آمنه. افزایش سمیت سلولی نانوذرات نقره با اعمال پالس‌های الکتریکی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۹): ??

مقدمه

کوشش‌های فراوانی جهت افزایش بازده و کاهش عوارض جانبی درمان‌ها صورت پذیرفته است. در بسیاری از این روش‌ها، می‌توان رده‌ی نانوفنون‌آوری را

در سال‌های اخیر، روش‌های نوینی به منظور پیشگیری، درمان و تشخیص سرطان ابداع شده و

۱- کارشناس ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی و گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- کارشناس، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار، گروه رادیوتراپی، بیمارستان قائم (عج)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- دانشیار، گروه فیزیک پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

(نوعی سرطان مغز) به کار بردند. آن‌ها دریافتند که سلول‌های سالم بعد از دریافت نانوذرات می‌توانند خودشان را بازسازی کنند، در حالی که سلول‌های سرطانی توقف تکثیر سلولی نشان داده‌اند. قطر نانوذرات در مطالعه‌ی ایشان، در حدود ۲۰-۶ nm بود و نشان داده شد که برداشت آن‌ها توسط سلول اغلب از طریق فرایند آندوسیتوز انجام می‌گیرد (۱۰).

با وجود کاربردهای وسیع نانوذرات نقره، مشاهده شده است که این نانوذرات برای برخی از ارگان‌های بدن مانند کبد، کلیه و طحال سمیت ایجاد می‌کنند (۱۱) و حتی قابلیت عبور از کوچک‌ترین مویرگ‌های بدن و سد مغزی را دارند (۱۲). بنابراین برای فراهم آمدن شرایط امن جهت کاربرد بالینی و کاهش سمیت آن باید چاره‌ای اندیشیده شود. راه حل پیشنهادی در این مطالعه، استفاده از غلظت‌های کم نانوذرات نقره است، به شرط آن که این کاهش دوز با تکنیک دیگری نظیر الکتروپوریشن جبران گردد. طی فرایند الکتروپوریشن، سلول‌ها تحت تأثیر پالس‌های الکتریکی کوتاه مدت و شدید قرار می‌گیرد. سلول‌های زنده شامل پستانداران، ممالکول‌های قطبی و غشاهای باردار هستند. بنابراین به میدان‌های الکتریکی پاسخ می‌دهند (۱۳) و از آن جا که عمای سلول رسانایی کمتری نسبت به محیط داخل و خارج آن دارد، اعمال پالس‌های الکتریکی، با القای یک اختلاف پتانسیل الکتریکی در دو طرف غشا به نوبه‌ی خود تراوایی غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴-۱۵).

در واقع، در این تکنیک منافذ ایجاد شده در غشای سلول منجر به افزایش گذرا و برگشت پذیر تراوایی آن نسبت به موادی می‌شود که در حالت طبیعی به داخل سلول غیر قابل نفوذند (۱۶). به بیان

یافت. استفاده از نانو ساختارها یک ابتکار عمل بی‌مانند در تغییر اساسی خواص مواد از جمله حلالیت، ضریب پخش، نیمه‌ی عمر در گردش خون، خصوصیات رها سازی و تحویل هدفمند دارو به شمار می‌رود. در این میان، نانوذرات نقره با داشتن خواص ضد میکروبی و ضد باکتریایی قوی به یکی از دستاوردهای شگرف علمی از فن‌آوری نانو و یکی از پرکاربردترین ذرات پس از نانو لوله‌های کربنی تبدیل شدند، که در عرصه‌ی پزشکی کاربرد فراوانی دارند (۱). نقره در ابعاد نانو، از خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی برخوردار می‌شود که به افزایش خاصیت ضد میکروبی آن می‌انجامد. یکی از دلایل اثرات مهاری نانوذرات نقره بر رشد و تکثیر سلولی را می‌توان ناشی از قطر کم و افزایش سطح تماس بیشتر یون‌های نقره با غشای سلول‌ها دانست (۲).

نقره می‌تواند با اتصال به پروتئین‌های حاوی گوگرد غشای سلولی، موجب تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا شود و با تأثیر در زنجیره‌ی تنفسی و تقسیم سلولی، در نهایت منجر به مرگ سلولی گردد (۳-۵). همچنین نانوذرات نقره می‌توانند یا با فعال کردن آنزیم‌های کاسپازی به خصوص کاسپاز ۳ سبب ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول شوند و یا با آسیب زدن به گروه فسفات DNA و متراکم کردن میتوکندری به طور غیر مستقیم به سلول صدمه وارد کنند (۶-۸). شاید بتوان گفت مهم‌ترین نقش نانوذرات نقره، تولید ROS (Reactive oxygen species) است و همین عامل باعث مرگ سلول می‌شود (۹).

AshaRani و همکاران اثرات نانوذرات نقره را در شرایط برون‌تنی روی رده‌های سلولی فیروبللاست طبیعی ریه‌ی انسان و سلول سرطانی گلیوبلاستوما

تا غشای سلول را الکتروپوریت کند. افزایش دامنه‌ی پالس گسترش ناحیه‌ی الکتروپوریت شده را به همراه دارد؛ در صورتی که افزایش تعداد یا دیوریشن پالس‌ها بدون تأثیر بر وسعت ناحیه‌ی الکتروپوریت شده، سبب افزایش اندازه و تعداد منافذ در این ناحیه می‌شود (۱۹).

این مطالعه‌ی برون‌تنی با هدف بررسی امکان بهره‌گیری از سمیت نانوذرات نقره، در یک غلظت پایین و استفاده از الکتروپوریشن برای جبران این کاهش دوز، بر روی رده‌ی سلولی MCF-۷ طراحی گردید.

روش‌ها

رده‌ی سلولی و شرایط کشت و تکثیر آن

رده‌ی سلولی انسانی MCF-۷ مشتق شده از تومورهای انسانی آدنوکارسینومای پستان از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهیه گردید. سلول‌ها درون فلاسک‌های استریل با محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute) ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پی سیلین به صورت سوسپانسیون در انکوباتور 37°C با ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. بعد از ۲-۱ روز، سلول‌ها به صورت تک لایه کف فلاسک را می‌پوشاندند. بعد از جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک، تعداد سلول‌ها شمارش و درصد سلول‌های زنده به روش تریپان بلو تعیین و آزمایش‌ها بر روی آن‌ها انجام گرفت.

تولید نانوذرات نقره

برای سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره با غلظت‌های $0/01-0/001\text{ M}$ استفاده و این محلول داخل ظرفی حاوی دو الکتروود از جنس پلاتین احیا

دیگر، اعمال میدان الکتریکی با شرایط مناسب موجب تسهیل ورود یون‌ها و یا مولکول‌های خارجی مثل داروها، هورمون‌ها، پروتئین‌ها، پلاسמידها و DNA به داخل سلول‌ها می‌شود. در مطالعات زیادی تأثیر پالس‌های الکتروپوریشن در افزایش تراوایی سلول به اثبات رسیده است.

سازگاریا و همکاران یک رابطه‌ی ریاضی بین میزان الکتروتراوایی، بر حسب قدرت و پهنای زمانی پالس به دست آوردند و نشان دادند که بازده الکتروتراوایی با توان دوم پهنای زمانی پالس و توان اول قدرت آن نسبت مستقیم دارد (۱۷). حد آستانه‌ی پتانسیل غشای سلول بین 100 nV تا 1 V است. چنانچه پتانسیل الکتریکی تحریک کننده، خیلی بیشتر از حد آستانه باشد، الکتروپوریشن برگشت ناپذیر اتفاق می‌افتد که در نتیجه‌ی آن غشای سلول تخریب می‌شود و حیات سلول از دست می‌رود (۱۸).

برخی از محققین فرایند الکتروپوریشن را شامل ۳ مرحله دانسته‌اند. مرحله‌ی اول تشکیل منافذ، که در واقع همان پاسخ غشایی سلول به پتانسیل آستانه است و در حد چند میکروثانیه طول می‌کشد. مرحله‌ی دوم افزایش اندازه‌ی منافذ که بسته به دیوریشن پالس، چند صد میکروثانیه تا میلی‌ثانیه تداوم دارد. آخرین مرحله، بازیابی غشای سلول است که شامل بسته شدن منافذ و وابسته به دما می‌باشد. این مرحله، چند دقیقه به طول می‌انجامد. تبادلات مولکولی از طریق غشا از زمان افزایش اندازه‌ی منافذ تا هنگامی که این منافذ بسته می‌شوند، ادامه دارد. برای ورود مولکول‌های کوچک، پالس‌های الکتریکی چندمیکروثانیه‌ای استفاده می‌شود. مهم‌ترین پارامتر، دامنه‌ی پالس است که باید به یک مقدار بحرانی برسد

شد. اندازه‌ی ذرات وابسته به شدت جریان و ولتاژ الکتریکی است که به سیستم داده می‌شود. پس از احیای محلول شفاف نیترات نقره و تبدیل آن به یک سیستم کلوئیدی قهوه‌ای رنگ، اندازه‌ی ذرات تعیین گردید. پیک منحنی توزیع فراوانی نانوذرات بر حسب اندازه‌ی آن‌ها حدود ۱۰ nm به دست آمد (شکل ۱).

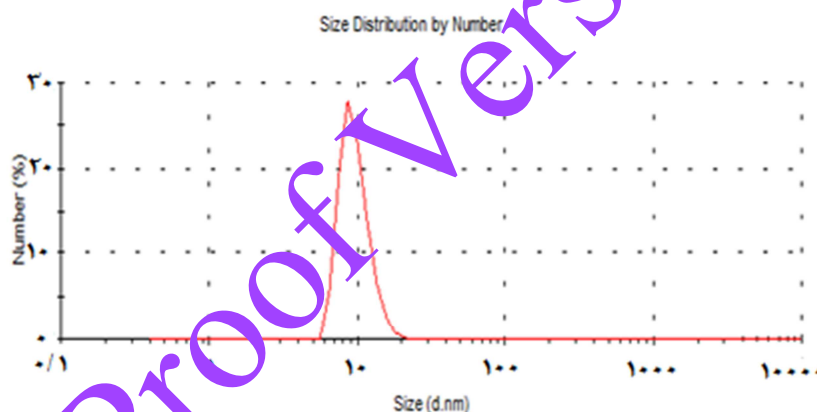
الکتروپوریشن

تولید و اعمال پالس به نمونه‌های سلولی، توسط یک دستگاه مولد پالس مربعی (Electro square porator). Genetronics مدل BTX-۸۳۰ ساخت شرکت Chamber (امریکا) انجام شد. این سیستم مجهز به Voltage stimulator و کووت‌هایی با حفرات ۲ mm و ۴ است (شکل ۲) و قابلیت انتخاب ولتاژ، پهنای زمانی، تعداد و فرکانس پالس بر روی آن وجود دارد.

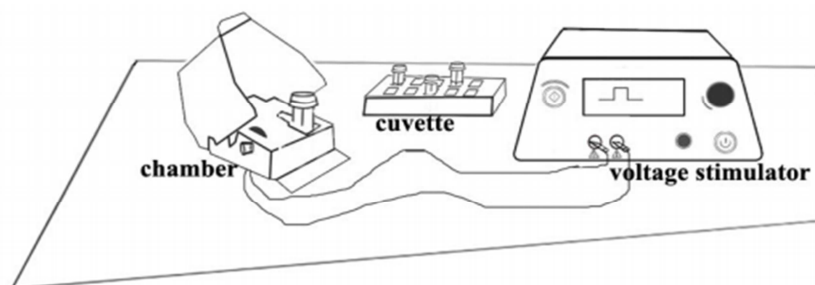
پس از تریپسینه و شمارش سلول‌ها، یک سوسپانسیون سلولی با تراکم 7×10^4 cell/m در محیط کشت تهیه و با ۷ غلظت از نانوذرات نقره به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۳۷^oC، انکوبه گردید. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS

تعیین سمیت سلولی نانوذرات نقره

شکل ۱. منحنی توزیع اندازه‌ی نانوذرات نقره



شکل ۱. منحنی توزیع اندازه‌ی نانوذرات نقره



شکل ۲. مجموعه‌ی دستگاه مولد پالس مربعی. این مجموعه شامل کووت‌هایی است که با سوسپانسیون نانوذرات نقره و سلول پر می‌شود و Chamber و Voltage stimulator به همراه سیم‌های رابط در عملکرد آن دخالت دارند

بقای سلولی هر نمونه نسبت به گروه شاهد محاسبه گردید. آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

تحلیل داده‌ها

با توجه به طبیعی بودن توزیع داده‌ها، مقایسه‌ی آماری داده‌ها به روش One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و آزمون Tokey در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت. معیار مقایسه‌ی نتایج، درصد بقای سلولی و همیاری نسبی در درمان‌های ترکیبی بود که به صورت زیر محاسبه گردید: «درصد مرگ سلولی ناشی از درمان ترکیبی تقسیم بر مجموع درصد مرگ سلولی ناشی از تأثیر انفرادی هر یک از عوامل درمانی» (۲۰). همیاری نسبی بیشتر از ۱ به منزله‌ی بروز آثار اضافی در مقایسه با مجموع آثار انفرادی عوامل درمانی است. بدین ترتیب، بالاتر بودن این نسبت به معنای همیاری بیشتر عوامل درمانی در ایجاد مرگ یا جلوگیری از تکثیر سلولی است.

یافته‌ها

سمیت نانوذرات نقره در غلظت تعیین شد. در شکل ۳ مشاهده می‌شود که افزایش غلظت نانوذرات نقره کاهش بقای سلولی یا مهار تکثیر سلولی را به دنبال دارد و افت بقای سلولی در همه‌ی غلظت‌ها در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بوده است ($P < 0/031$). همچنین بین تمام غلظت‌ها به جز غلظت‌های $1 \mu\text{g/ml}$ با $1/5$ ، اختلاف معنی‌داری ثبت شد ($P < 0/001$). بر اساس داده‌های مندرج در شکل ۳، IC_{50} نانوذرات نقره (غلظتی از نانوذرات نقره که رشد و تکثیر سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد

در این مرحله سلول‌ها در چهار گروه مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه اول، شاهد بدون درمان، گروه دوم دریافت کننده‌ی همزمان نانوذرات نقره و پالس‌های الکتریکی در ۸ زیر گروه، گروه سوم دریافت کننده‌ی پالس‌های الکتریکی در ۸ زیر گروه و گروه چهارم دریافت کننده‌ی نانوذرات نقره بودند. غلظت نانوذرات نقره $1/5 \mu\text{g/ml}$ و در زیر گروه‌های مختلف تعداد پالس‌ها ۴ عدد در فرکانس 1 Hz با قدرت پالس 500 و 700 V/cm در دیوریشن‌های $100 \mu\text{s}$ ، 300 و 500 و قدرت پالس 1000 و 1500 V/cm در دیوریشن $100 \mu\text{s}$ در نظر گرفته شد.

نمونه‌های حاوی سوسپانسیون سلول با یا بدون نانوذرات نقره در هر کووت ریخته و با استفاده از دستگاه الکتروپوریتور به آن‌ها پالس‌های الکتریکی اعمال می‌شد. سپس سوسپانسیون سلولی از کووت به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل گردید. پس از ۶ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با نانوذرات نقره در انکوباتور 37°C ، محیط رویی تخلیه و با PBS شستشو داده شد. در نهایت، توسط آزمایش MTT درصد بقای سلولی تعیین گردید.

سنجش بقای سلولی

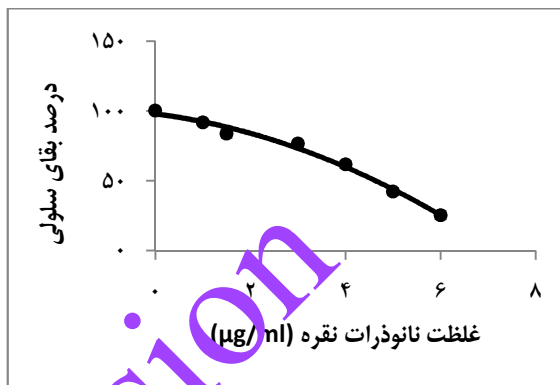
بقای سلولی بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل MTT به کریستال‌های فورمازان ارزیابی گردید. بدین منظور، MTT با غلظت $0/5 \text{ mg/ml}$ به هر چاهک حاوی سلول اضافه شد و پس از ۴ ساعت رسوب سلولی حاصل در DMSO (Dimethyl sulfoxide) و بافر گلایسین حل و جذب نوری فورمازون توسط دستگاه الایزا ریدر (مدل ۳۲۰۰، ساخت شرکت آویرنس) در طول موج 545 nm اندازه‌گیری و درصد

پالس الکتریکی دریافت کرده‌اند با گروه شاهد درمی‌یابیم که پالس‌های الکتریکی با قدرت V/cm ۵۰۰ در دیوریشن‌های ۳۰۰ و ۵۰۰، قدرت‌های ۷۰۰ در دیوریشن‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ و قدرت‌های ۱۰۰۰ V/cm و ۱۵۰۰ در دیوریشن ۱۰۰ μ s توانسته‌اند مرگ معنی‌دار سلولی را ایجاد کنند ($P < ۰/۰۰۱$).

مقایسه‌ی گروه‌های دریافت کننده‌ی هر دو عامل درمانی یعنی نانوذرات نقره و الکتروپوریشن با گروهی که فقط نانوذرات نقره را دریافت کرده‌اند، برای شرایط ۵۰۰ V/cm در دیوریشن ۵۰۰ μ s، ۷۰۰ V/cm در هر دو دیوریشن و قدرت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ در دیوریشن ۱۰۰ μ s میکروثانیه مرگ سلولی معنی‌داری رخ داده است ($P < ۰/۰۰۱$).

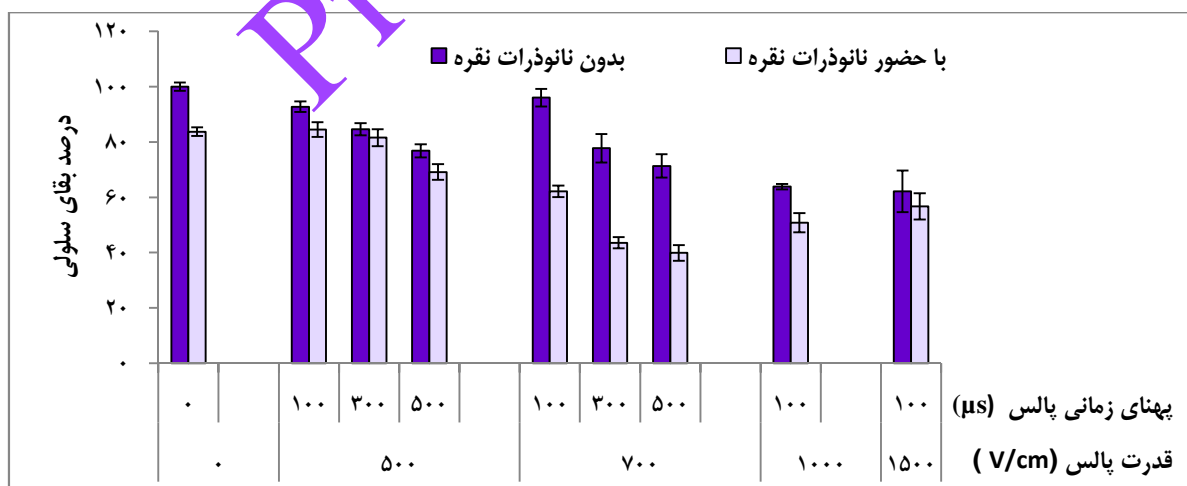
در دیوریشن ۱۰۰ μ s، قدرت‌های ۱۰۰۰ V/cm و ۱۵۰۰ در مقایسه با قدرت ۵۰۰ V/cm تفاوت معنی‌داری دارد ($P < ۰/۰۰۱$). اما اختلاف درصد بقای سلولی بین دو قدرت ۷۰۰ و ۵۰۰ V/cm معنی‌دار نبود است.

مهار کند) در حدود ۴/۵ μ g/ml به دست می‌آید. البته برای درمان‌های ترکیبی نانوذرات نقره با الکتروپوریشن، غلظتی کمتر از IC_{50} یعنی ۱/۵ μ g/ml که بقای سلولی حدود ۸۳ درصد را به دنبال داشت، انتخاب شد.



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر درصد بقای سلول‌های MCF-7. داده‌ها بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد روی میانگین می‌باشد.

نتایج حاصل از تأثیر پالس‌های الکتروپوریشن در حضور و غیاب نانوذرات نقره بر سلول‌های MCF-7 در شکل ۴ آمده است. از مقایسه‌ی گروه‌هایی که فقط



شکل ۴. درصد بقای سلولی پس از اعمال ۴ پالس الکتریکی با فرکانس ۱ Hz طی فرایند الکتروپوریشن در حضور و غیاب نانوذرات نقره. داده‌ها بیانگر میانگین نتایج ۳ بار آزمایش \pm خطای استاندارد روی میانگین می‌باشد.

جدول ۱. همیاری نسبی بین پالس‌های الکتروپوریشن و نانوذرات نقره در شرایط مختلف

۱۵۰۰		۱۰۰۰		۷۰۰		۵۰۰		قدرت پالس‌های الکتریکی (V/cm)
۱۰۰	۱۰۰	۵۰۰	۳۰۰	۱۰۰	۵۰۰	۳۰۰	۱۰۰	دیوریشن پالس‌ها (μs)
۰/۷۹	۰/۹۳	۱/۳۴	۱/۴۶	۱/۹۲	۰/۷۸	۰/۵۰	۰/۹۳	همیاری نسبی

نقره در درمان تومورهای سرطانی به منظور کاهش عوارض جانبی آن اهمیت بیشتری ببخشد. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که نانوذرات نقره اثرات ضد سرطانی دارند و عملکرد این ذرات در حضور پالس‌های الکتریکی با شرایط خاص بهبود می‌یابد. استفاده از نانوذرات نقره به همراه پالس‌های الکتریکی نه تنها منجر به کاهش غلظت نانوذرات نقره می‌شود، بلکه تحویل سریع‌تر این نانوذرات به داخل سلول را نیز نتیجه می‌دهد.

همان‌طور که مشاهده شد، اعمال همزمان پالس‌های الکتریکی و نانوذرات نقره سبب بهبود کارایی درمان می‌شود. به عبارت دیگر، چنانچه درمان فقط با یکی از این عوامل انجام می‌شد، برای دستیابی به بازدهی مشابه با درمان ترکیبی اخیر، نیاز به غلظت بیشتری از نانوذرات نقره یا پالس‌های الکتریکی با قدرت چندین برابر بود. دیده شد که پالس‌های الکتریکی با قدرت ۷۰۰ V/cm و دیوریشن ۳۰۰ μs در حضور نانوذرات نقره بقای سلولی را به کمتر از ۵۰ درصد می‌رساند و این در شرایطی است که برای رسیدن به چنین نتیجه‌ای با تجویز نانوذرات نقره به تنهایی، باید غلظت بیش از ۳ برابر غلظت مورد استفاده در حضور پالس فراهم شود.

همچنین مشاهده شد که پالس‌های الکتریکی با قدرت ۷۰۰ V/cm و دیوریشن ۱۰۰ μs که سمیتی برای سلول ندارد، وقتی با نانوذرات نقره همراه می‌شود، سمیتی ایجاد می‌کند که اگر قرار باشد

آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که حضور نانوذرات نقره در اکثر گروه‌های دریافت‌کننده‌ی پالس الکتریکی، توانسته در مقایسه با گروه مشابه بدون نانوذرات تفاوت معنی‌داری ایجاد کند ($P \leq 0/040$). در جدول ۱، اثر هم‌افزایی مورد انتظار برای نانوذرات نقره و الکتروپوریشن و اثر واقعی به دست آمده ناشی از ترکیب آن‌ها درج شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در قدرت ۵۰۰ V/cm، اثرات همیاری ظاهر نشده است، اما در قدرت ۷۰۰ V/cm در هر سه دیوریشن (۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ μs) اثرات همیاری دیده می‌شود. بیشترین اثر همیاری، در درمان ترکیبی نانوذرات نقره و پالس‌های الکتریکی با دریافت پالس‌های با قدرت ۷۰۰ V/cm و دیوریشن ۱۰۰ μs رخ داده است.

بحث

در این تحقیق به منظور القای مرگ سلولی در سلول‌های MCF-7 در غلظت پایینی از نانوذرات نقره، از فرایند الکتروپوریشن بهره‌گیری شد. ابتدا سمیت غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 بررسی شد و IC_{50} برابر با $4/5 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد که کمتر از سطوح تعیین شده برای سلول‌های طبیعی در مطالعات قبلی می‌باشد (۲۱). اما غلظت مورد استفاده در ترکیب با الکتروپوریشن، یک سوم مقدار IC_{50} بوده است؛ این موضوع می‌تواند به پیشنهاد تجویز دوز کم نانوذرات

بدین ترتیب، در ارتباط با مکانیسم وقوع همیاری الکتروپوریشن و نانوذرات نقره، به نظر می‌رسد که پالس‌های الکتریکی با تأثیری که روی غشای سلول می‌گذارند، سبب افزایش اندازه و یا تعداد منافذ می‌شوند و منجر به افزایش ورود تعداد بیشتری از نانوذرات به داخل سلول می‌گردند و در نتیجه مرگ سلولی بیشتری فراهم می‌نمایند. همچنین می‌توان پیش‌بینی کرد که پالس‌های الکتریکی روی خواص نانوذرات تأثیر می‌گذارند و با ایجاد تغییراتی در نانوذرات و یا تشدید آزادسازی یون‌های نقره، موجب افزایش سمیت نانوذرات شده‌اند. در ضمن نباید فراموش کرد که هدایت الکتریکی بالای نانوذرات نقره، می‌تواند باعث کاهش امپدانس سوسپانسیون سلولی و در نتیجه، افزایش قدرت میدان الکتریکی شود. در هر صورت، شناخت مکانیسم دقیق نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لایم می‌دانند از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تأمین اعتبار طرح شماره ۹۱۰۳۰۵ تشکر و سپاسگزاری نمایند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است.

نانوذرات نقره به تنهایی این سمیت را به وجود آورد، به غلظت ۲/۶ برابری احتیاج خواهد داشت. همچنین ترکیب پالس‌های الکتریکی با قدرت ۷۰۰ V/cm و دیوریشن ۵۰۰ μ s با نانوذرات نقره، مرگ سلولی ایجاد می‌کند که معادل استفاده از نانوذرات به تنهایی با غلظت حدود ۳/۶ برابر است.

بنابراین می‌توان گفت که ترکیب دو عامل درمانی در مقایسه با یکی از عوامل، سبب ایجاد مرگ سلولی بیشتری شده است. در واقع، مرگ سلولی مورد انتظار در درمان ترکیبی برابر مجموع مرگ سلولی ناشی از الکتروپوریشن و نانوذرات نقره هر یک به تنهایی است، اما مرگ سلولی واقعی در درمان ترکیبی در بعضی موارد کمتر و در برخی دیگر بیش از انتظار، اتفاق افتاد که در این صورت گفته می‌شود اثر همیاری وجود دارد.

شاید بتوان همیاری نسبی غیر مؤثر را در گروه‌هایی که پالس‌های با قدرت بالا گرفته‌اند، ناشی از تخریب نانوذرات و در گروه‌هایی که پالس‌های با قدرت کم اما دیوریشن طولانی دریافت کرده‌اند، مربوط به عدم تراوایی در غشای سلولی و تخریب نانوذرات دانست. در قدرت متوسط، افزایش الکتروتراوایی که در القای مرگ سلولی کمک کننده است، بر تخریب احتمالی نانوذرات که به نوبه‌ی خود می‌توانسته‌اند کاهنده‌ی اثر درمان ترکیبی باشند، غالب بوده است.

References

1. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 2001; 109(Suppl 4): 547-51.
2. Geho DH, Jones CD, Petricoin EF, Liotta LA. Nanoparticles: potential biomarker harvesters. *Curr Opin Chem Biol* 2006; 10(1): 56-61.
3. Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7(6): 1893-7.
4. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM,

- Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008; 112(43): 13608-19.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.
 6. Xia T, Kovochich 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.
 7. AshaRani PV, Low Kah MG, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009; 3(2): 279-90.
 8. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol* 2011; 85(7): 743-50.
 9. Sambhy V, MacBride MM, Peterson BR, Sen A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *J Am Chem Soc* 2006; 128(30): 9798-808.
 10. AshaRani PV, Hande MP, Valiyaveettil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* 2009; 10: 65.
 11. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(7): 2171-8.
 12. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009; 145(1-2): 83-96.
 13. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res* 2004; 64(9): 3288-95.
 14. Neumann E, Kakorin S, Toensing K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem Bioenerg* 1999; 48(1): 3-16.
 15. Kotnik T, Miklavcic D, Slivnik T. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields: a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998; 45(1): 3-16.
 16. Weaver JC. Electroporation theory: concepts and mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. *Animal cell electroporation and electrofusion protocols*. New York, NY: Springer; 1995. p. 28-30.
 17. Sazgarnia A, Bahreyni Toossi MH, Valizadeh M, Homaei Shandiz F, Esmaily H, Abbasi A. A quantitative study of the effect of electroporation on the electroporability and cell survival. *Iran J Med Phys* 2007; 4(2): 33-41. [In Persian].
 18. Teissie J, Rols MF. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporabilization. *Biophys J* 1993; 65(1): 409-13.
 19. Kancuser M, Miklavcic D. *Electroporation in biological cell and tissue: an overview*. New York, NY: Springer; 2009.
 20. Ghahremani FH, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Rajabi O, Aledavood A. Efficacy of microwave hyperthermia and chemotherapy in the presence of gold nanoparticles: an in vitro study on osteosarcoma. *Int J Hyperthermia* 2011; 27(6): 625-36.
 21. Shahbazzadeh D, Ahari H, Soltani M, Rashedi H, Shokrgozar M, Moaddab S, et al. STUDY on the cytotoxicity level of nanosilver on natural fibroblast (HF2), osteosarcoma (G292) and mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Research* 2011; 66(4): 305-8.

Enhanced Cytotoxicity of Silver Nanoparticles by the Use of Electrical Pulses

Sajedeh Yadegari-Dehkordi MSc¹, Hamid-Reza Sadeghi PhD², Samaneh Soudmand³,
Fatemeh Homae Shandiz MD⁴, Ameneh Sazgarnia PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Electroporation is an electrical technique to deliver different molecules to target tissues. Application of potent electric pulses can increase permeability of the membrane for a number of molecules by creating transient pores in cell membrane. On the other hand, while significant antimicrobial properties of silver nanoparticles (SNP) has made them candidates for destroying cancer cells because of their toxicity, reducing the side effects of toxicity for vital organs of the body requires administration of low doses of these nanoparticles. In this study, a low dose of SNP was applied to MCF-7 cancer cells and reduced treatment efficacy was compensated by electroporation.

Methods: We first evaluated the toxicity of SNPs in different concentrations. Four square electric pulses with different strengths and durations were applied to cells in 1 Hz frequency by ECM-830 electroporator instrument in presence and absence of 10nm SNPs, and performance of the technique was evaluated by MTT assay. The characteristics of electric pulses to generate effective synergism with a small dose of nanoparticle were determined.

Findings: IC₅₀ of SNPs was estimated to be 4.5 µg/ml. Application of SNPs and electric pulses with 700 V/cm strength and 100-500 -300µs duration simultaneously provided an effective cell death. Maximum synergism between nanoparticles and electric pulses was recorded in 100µs duration.

Conclusion: The application of electric pulses in presence of SNPs enables compensation of the effect of administering lower doses of nanoparticles.

Keywords: Silver nanoparticles, Electroporation, MCF-7 cell line

Citation: Yadegari-Dehkordi S, Sadeghi HR, Soudmand S, Homae Shandiz F, Sazgarnia A. **Enhanced Cytotoxicity of Silver Nanoparticles by the Use of Electrical Pulses.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(289): ??.

1- Student Research Committee, Department of Medical Physics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- Department of Medical Physics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Medical Physics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Associate Professor, Department of Radiotherapy, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine AND Medical Physics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Ameneh Sazgarnia PhD, Email: sazgarniaa@mums.ac.ir