Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Evaluating and Comparing Genotoxicity Mechanism of Copper Nanoparticles and Copper Sulfate

Mohammad Shokrzadeh[1],
Amirmohammad Tasdighi[2],
Mona Modanlo[3],
Fatemeh Shaki[4]

[1] Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 4, 2018 ; Accepted June 26, 2018)

Abstract

Background and purpose: Copper is a trace element that is used in various industries. Copper nano-particles are being used in different skin care products, lubricants, oils, polymers, metal covers, plastics, inks, etc. Previous studies have shown that both copper sulfate and copper nano-particles can induce cellular genotoxicity and DNA damage. So, this study aimed at evaluating and comparing genotoxicity in copper nanoparticles and copper sulphate. Assessment of oxidative stress as a mechanism of toxicity was also done.

Materials and methods: In this experimental study, blood samples were taken from healthy donors and lymphocytes were separated. Then, lymphocytes were divided into ten groups including control, cisplatin (12µM), different concentrations of copper sulphate (10, 25, 50, 100 nM), and copper nano-particles (10, 25, 50,100 nM). After 24 h incubation, genotoxicity was investigated by micronucleus and also oxidative stress markers including lipid peroxidation and glutathione.

Results: Incubation of blood samples with copper sulfate and nano oxide copper increased the number of micronucleus in lymphocyte. In similar concentration, this increase was higher in nanoparticles group compared with that of the copper sulphate. Also, in both groups receiving copper sulfate and nano oxide copper, lipid peroxidation marker (MDA) and glutathione oxidation increased significantly ($p<0.05$).

Conclusion: The genotoxicity of copper nanoparticles was found to be higher than that of the copper sulphate. Also, oxidative stress plays a role in genotoxicity of copper sulphate and nano-particles.

Keywords: Copper, Nano particle, Genotoxicity, Micronucleus, Oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163): 1-9 (Persian).

* **Corresponding Author: Fatemeh Shaki-** Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: fshaki.tox@gmail.com)

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۳ مرداد سال ۱۳۹۷ (۹-۱)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

بررسی و مقایسه مکانیسم سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و سولفات مس

محمد شکرزاده [۱]
امیرمحمد تصدیقی [۲]
منا مدانلو [۳]
فاطمه شکی [۴]

چکیده

سابقه و هدف: مس، یک عنصر ضروری می باشد که در بسیاری از صنایع کاربرد دارد. نانوذرات اکسید مس هم در محصولات مختلف مراقبت از پوست، افزودنی در لوبریکانت ها، روغن ها، پلیمر، پوشاننده های فلزی، پلاستیک، جوهرها و ... مورد استفاده قرار می گیرند. مطالعات قبلی نشان داده اند که هم سولفات مس و هم نانوذرات اکسید مس توانایی القای سمیت ژنتیکی سلول ها و آسیب به DNA سلولی را دارند. لذا در این مطالعه به بررسی و مقایسه سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و سولفات مس و هم چنین بررسی استرس اکسیداتیو به عنوان مکانیسم سمیت می پردازیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه خونی از داوطلبان سالم گرفته شد و بعد از جداسازی لنفوسیت ها، به ۱۰ گروه شامل کنترل، سیس پلاتین (۱۲ میکرومولار)، غلظت های مختلف سولفات مس (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) و نانوذرات مس (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) تقسیم شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ژنوتوکسیستی با تست میکرونوکلئوس و هم چنین مارکرهای استرس اکسیداتیو شامل لیپید پراکسیداسیون و گلوتاتیون ارزیابی شدند.

یافته‌ها: انکوبه کردن نمونه‌های خونی با مس و نانوذرات مس موجب افزایش تعداد ریزهسته در لنفوسیت‌ها شد. تعداد ریزهسته ایجاد شده در غلظت های برابر در فرم نانو مس بیش تر از فرم مس آن می باشد. هم چنین در گروه دریافت کننده مس و نانو مس، مارکر استرس اکسیداتیو (لیپید پراکسیداسیون) به طور معناداری افزایش و میزان گلوتاتیون کاهش یافت.

استنتاج: در مجموع، مطالعه ما سمیت ژنتیکی بیش تر نانو مس را نسبت به مس نشان داد. هم چنین استرس اکسداتیو در ژنوتوکسیستی هر دو فرم نانو مس و مس نقش دارند.

واژه های کلیدی: مس، نانوذرات، سمیت ژنتیکی، میکرونوکلئوس، استرس اکسیداتیو

مقدمه

مس به عنوان یک فلز یا آلیاژ، در ماشین آلات، ساخت و ساز، حمل و نقل، سلاح‌های نظامی، بخش مهمی از طلای سفید و جواهرات دیگر و هم‌چنین در محصولات دندان پزشکی، دستگاه داخل رحمی و لوازم آرایشی مورد استفاده قرار می گیرد. مس هم از طریق منابع طبیعی و هم در اثر فعالیت‌های بشری، در محیط پراکنده می شود که از منابع طبیعی آن می توان به گرد و غبار حاصل از باد، گیاهان فاسد شده، آتش‌سوزی

مولف مسئول: فاطمه شکی– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: fshaki.tox@gmail.com
۱. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی/ داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه سم شناسی/ داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۷/۲/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۴/۱۹

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

جنگل ها و آب دریا اشاره کرد(۱). مس (Cu) بخش جدایی‌ناپذیر بسیاری از آنزیم‌های مهم درگیر در تعدادی از فرایندهای بیولوژیکی حیاتی است(۲).

سولفات مس به عنوان سم و پایه تولید اکثر ترکیبات مسی مانند قارچ‌کش‌های مسی، کنترل بیماری‌های قارچی و بیماری‌های باکتریایی گیاهان می‌باشد(۳).

مقدار مس بدن شخص بالغ ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم است که در بافت‌های مختلف بدن (کبد، خون و مغز) دیده می‌شود که در کبد به مقدار بیش‌تری مس یافت می‌شود. قسمت اعظم مس جذب شده، از طریق صفرا و مقداری از طریق ادرار دفع می‌شوند. جذب عمده مس از روده باریک صورت می‌پذیرد(۴).

استفاده از نانوذرات در سال های اخیر به طور قابل توجهی در فرآیندهای خانگی و صنعتی افزایش یافته است. این ذرات، رفتار فیزیکی و شیمیایی خاصی را به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، اندازه کوچک و خصوصیات بصری مرتبط با اندازه شان نشان می‌دهند(۵). نانوذرات فلزی، کاربرد وسیعی در زمینه‌های فناوری زیستی، سنجش زیستی، تشخیص و درمان بالینی، امنیت غذایی و تصفیه آب و فاضلاب دارند(۶).

نانوذرات مس دارای اثرات آنتی‌میکروبیال و آنتی‌اکسیدان می‌باشند و در محصولات مختلف مراقبت از پوست، افزودنی در لوبریکانت‌ها، روغن ها، پلیمر، پوشاننده‌های فلزی، پلاستیک، جوهرها و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند(۸،۷).

تحقیقات نشان می‌دهدکه نانوذرات مس در بافت‌ها و اندام‌های موجود زنده انتشار یافته و موجب تغییرات ساختمانی ویژه می‌گردند. افزایش نانوذرات مس در موجودات زنده (تا حد آستانه سمیت) موجب دیستروفی یا نکروز بافت‌ها می‌گردد(۹،۱۰).

یکی از مهم‌ترین اثرات سمی ناشی از تماس با آلاینده‌ها، بحث ژنوتوکسیستی این ترکیبات است. مطالعات نشان داده‌اند که مواد نانو باعث تغییر در DNA به ۲ صورت می‌شوند: ۱. از طریق اثر مستقیم بر روی رشته‌های DNA برای ذرات نانو با اندازه کوچک (۱-۲ نانو متر) و ۲. به صورت غیر مستقیم به وسیله تحریک عمل استرس اکسیداتیو(۱۱). استرس اکسیداتیو به معنای عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن است(۱۲). از طرفی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مطرح شده جهت سمیت مس، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سلول و بروز استرس اکسیداتیو است(۱۳).

هم‌چنین تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که مصرف نانوذرات موجب القاء فعالیت‌های in vivo مس در شرایط سمی مانند تغییر در پروفایل لیپید، استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد کلیه و... می‌گردد(۱۴).

از طرف دیگر با گسترش مصرف مواد نانو، ریسک آلودگی انسانی و محیطی با مواد نانو افزایش پیدا کرده است و پتانسیل سمیت آن‌ها هنوز نیز مورد بحث و تحقیق است و اطلاعات ما در مورد اثرات آلاینده‌هایی با سایز نانو هنوز ناقص است. لذا در این مطالعه به بررسی سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و مقایسه آن با فرم سولفات مس با استفاده از تست میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان و ارزیابی فاکتورهای استرس اکسیداتیو پرداختیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه پس از دریافت مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و با رضایت آگاهانه، پنج داوطلب مرد در محدوده سنی ۲۵-۳۵، سالم (که بیماری خاصی نداشته) و غیر سیگاری که در طی یکماه گذشته تحت رادیوگرافی و درمان با آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته‌اند، انتخاب شدند.

برای انجام شمارش لنفوسیت‌ها و میکرونوکلئوس‌های ایجاد شده، نمونه‌های خونی گرفته شده از داوطلبان به ۱۰ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری در پلیت‌های ۶ خانه تقسیم گردیدند که گروه‌ها شامل گروه کنترل، گروه سیس پلاتین با دوز آسیب‌زای ۱۲ میکرومولار، گروه

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

سولفات مس با دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار و گروه نانو مس با دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار بودند. نانوذرات اکسید مس از شرکت نوترینو، تهران با سایز ذره‌ای کم‌تر از ۵۰ نانومتر خریداری گردید.

برای انجام تست‌های اکسیداتیو، نمونه خون‌ها به ۵ گروه تقسیم گردید: گروه کنترل، گروه سولفات مس با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار و گروه نانو مس با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار.

نمونه‌های خونی گرفته شده از داوطلبان به ۱۰ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری در پلیت‌های شش خانه تقسیم گردیدند. در ابتدا سلول‌ها به همراه محیط کشت RPMI 1640 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، با Co_2=%5 به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌های خونی با ذرات مس در انکوباتور مواجه گردید. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه با دور g x ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس مایع فوقانی به آرامی خارج شد، به طوری که حدود ۱ میلی‌لیتر ته لوله دست نخورده باقی ماند.

به محتویات ته لوله که شامل مقداری از محیط کشت باقی مانده و پلاک سلول‌های خونی می‌باشد ۶ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید اضافه گشت و با استفاده از پیپت پاستور پلاستیکی ۳-۲ بار جابجایی انجام شد.

بلافاصله پس از افزودن KCl، نمونه‌ها با دور x g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. بعد توسط پیپت پاستور به آرامی مایع فوقانی برداشته شد، به طوری که در حدود ۱ میلی‌لیتر ته لوله دست نخورده باقی بماند. بعد به آرامی و برای ثابت کردن سلول‌ها، ابتدا با استفاده از پیپت پاستور، ۲ میلی‌لیتر از محلول ثابت کننده، قطره قطره به نمونه افزوده و بعد حجم نهائی نمونه با استفاده از این محلول به ۹ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها با دور g x ۱۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و محلول بالائی آن خارج گردید. این عمل به صورت پیاپی (حداقل ۳ بار) ادامه داده شد.

پس از سانتریفیوژ، محلول بالائی برداشته شد تا مواد باقیمانده در لوله سانتریفیوژ فقط ۰/۵ میلی‌لیتر باشد. بدین‌ترتیب یک محلول سوسپانسیون یکنواخت به‌دست آمد. سپس از فاصله ۱۰ سانتی‌متری، ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی بر روی هر لام ریخته و لام‌ها کمی سر و ته شد تا حداکثر سلول‌ها بر روی لام‌ها باقی بماند. سپس در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. ۷-۳ روز پس از تهیه لام‌ها، رنگ آمیزی گیمسا صورت گرفت.

لام‌ها به صورت منظم ابتدا با بزرگنمایی x ۴۰ با میکروسکوپ نوری مورد جستجو قرارگرفت و در مواردی که نیاز به دقت بیش‌تر بود، با بزرگنمایی x ۱۰۰ بررسی شدند. به ازای هرنمونه، حداقل ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای و تعداد ریزهسته‌های موجود در آن بررسی شدند. با استفاده از پیپت پاستور پلاستیکی، به مدت ۱ دقیقه نمونه را جابجا نموده تا تمامی لنفوست‌ها از یکدیگر جدا شوند(۱۵).

برای بررسی لیپید پراکسیداسیون جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، از سنجش میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپید پراکسیداسیون استفاده گردید. در این روش از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) استفاده شد. به این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از پنج گروه سوسپانسیون سلولی برداشته و جداگانه ۲۰۰ میکرولیتر از اسید فسفریک ۰/۲ مولار در یک میکروتیوب قرار گرفت. سپس ۲۵ میکرولیتر از معرف TBA به میکروتیوب اضافه گردید و سپس در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. بعد از آن میکروتیوب ها در یخ قرار داده شدند تا سرد شوند. در مرحله بعد، ۰/۵ میکرولیتر از n-butanol اضافه گردید. در نهایت بعد از پایان سانتریفیوژ، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با دقت برداشته و در پلیت ریخته شد و جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد(۱۶).

در ابتدا ۱ سی‌سی ازمحلول EDTA به‌تعداد 10^4 سلول لنفوسیت اضافه گردید و در داخل لوله‌های هموژنایزر قرار گرفت. چندین بار عمل هموژن کردن با پیستون

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

انجام‌گرفت. سپس ۰/۵ سی‌سی از محلول EDTA به لوله هموژنایزر اضافه گردید و پس از تکان دادن، به لوله سانتریفیوژ منتقل شد. لوله‌های سانتریفیوژ در یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد، به لوله‌های سانترفیوژ، ۱/۵ سی‌سی از TCA ۱۰٪ اضافه گردید که به این ترتیب موجب رسوب پروتئین‌ها شد. لوله‌های سانتریفیوژ در تمامی این مراحل در روی یخ نگهداری می شدند. لوله‌های سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شدند. سپس ۱ سی سی از محلول رویی به داخل لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل گردید و به آن ۲/۵ سی‌سی بافر تریس ۰/۴ مولار با PH=۸/۹ و ۰/۵ سی‌سی DTNB اضافه گردید. سپس لوله به خوبی هم‌زده شد تا رنگ زرد یکنواختی در لوله پدید آید. در مرحله آخر، جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. میزان گلوتاتیون از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید(۱۷).

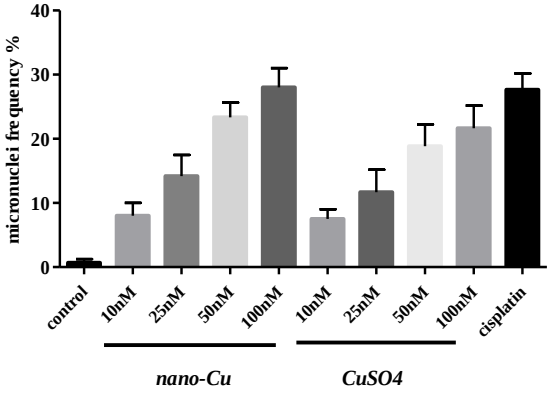
یافته ها

درصد میانگین تعداد میکرونوکلئوس های لنفوسیت‌ها در گروه های مورد مطالعه

داده های حاکی از مقایسه سمیت ژنتیکی ایجاد شده در ذرات مس و نانو مس نشان می‌دهد که هر دو در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار با p<۰/۰۰۱ دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می‌باشند. هم‌چنین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول توسط ذرات نانو مس بیش‌تر از ذرات مس می باشد(نمودار شماره۱).

هم چنین در غلظت ۲۵ نانومولار، ذرات نانو مس با p< ۰/۰۰۱ دارای اختلاف بیش‌تری نسبت به ذرات مس با p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل می‌باشند، هم‌چنین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول در اثر سمیت نانوذرات مس بیش تر از ذرات مس می‌باشد.

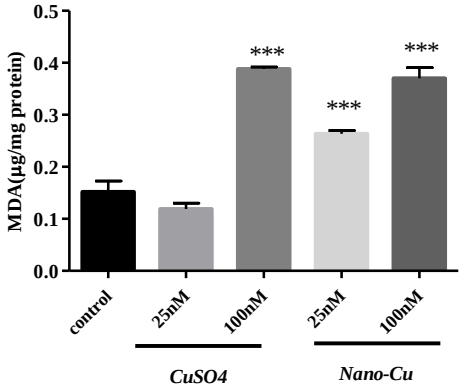
در غلظت ۱۰ نانومولار، نانوذرات مس با p<۰/۱ در مقایسه با ذرات مس، اختلاف بیش تری با گروه کنترل دارند و تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول در اثر ذرات نانو مس بیش تر از مس می‌باشد.



نمودار شماره ۱: مقایسه درصد میکرونوکلئوس ایجاد شده در لنفوسیت های خونی تماس یافته با ذرات مس و نانو مس در نمونه خونی انسانی

یافته های مربوط به میزان لیپید پراکسیداسیون موجود در لنفوسیت های نمونه های خونی

نتایج حاصل از بررسی تست لیپید پراکسیداسیون در سلول‌های آلوده نشان می‌دهد که ذرات با غلظت ۱۰۰ نانومولار از مس و نانو مس، هم‌چنین ذرات غلظت ۲۵ نانومولار نانو مس با p<۰/۰۰۱ دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می‌باشند، اما در غلظت ۲۵ نانومولار ذرات مس، اختلاف قابل توجهی با گروه کنترل نشان نمی‌دهد. هم‌چنین میزان لیپید پراکسیداسیون ایجادشده در غلظت ۱۰۰ نانومولار در ذرات مس و نانو مس بیش‌تر از غلظت ۲۵ نانومولار می باشد (نمودار شماره۲).



نمودار شماره ۲: نتایج بررسی تست لیپید پراکسیداسیون بر روی نمونه های خونی مواجه شده با ذرات مس و نانو مس.
***: p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل

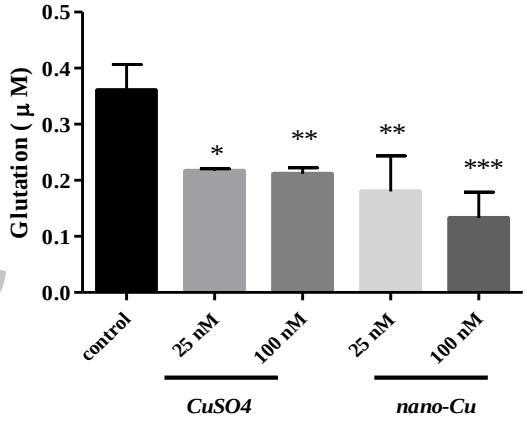
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

یافته های مربوط به میزان گلوتاتیون موجود در لنفوسیت نمونه‌های خونی

نتایج آزمایش گلوتاتیون بر روی سلول های آلوده شده نشان می‌دهد که نانوذرات مس با غلظت ۱۰۰ نانومولار با $p<۰/۰۰۱$ دارای بیش‌ترین اختلاف با گروه کنترل و بیش‌ترین آسیب سلولی می باشند.

هم‌چنین ذرات نانو مس با غلظت ۲۵ نانومولار و ذرات سولفات مس با غلظت ۱۰۰ نانومولار با $p<۰/۰۱$ دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می‌باشند. در غلظت ۲۵ نانومولار مس با $p<۰/۱$ دارای کم‌ترین آسیب سلولی می باشد(نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: نتایج بررسی تست گلوتاتیون بر روی نمونه های خونی مواجه شده با ذرات مس و نانو مس.
*: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل **: $p<۰/۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل ***: $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل

بحث

مس اگرچه در بدن به پروتئین‌هایی همچون متالوتیونین‌ها و سرولوپلاسمین متصل است، ولی ممکن است از آن‌ها رها شده و به صورت آزاد، تشکیل رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل بسیار واکنش‌پذیر را کاتالیز کند(۱۸). در حالی که قرار گرفتن در معرض مقادیر اندک مس مضر نیست، اما قرار گرفتن در معرض غلظت‌های بالای آن خطرناک است و منجر به بروز اثرات مضر بر سلامت از جمله آسیب به کبد و کلیه، آنمی، سمیت سیستم ایمنی و سمیت تکاملی می‌گردد. بسیاری از این اثرات به دلیل آسیب اکسیداتیو به غشاها و ماکرومولکول‌ها است. استرس اکسیداتیو، عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن است. از طرفی مس می‌تواند به گروه های سولفیدریل آنزیم هایی همچون گلوکز ۶-فسفاتاز و گلوتاتیون ردوکتاز متصل شود و در نتیجه موجب اختلال در عملکرد محافظتی این آنزیم‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد می‌شود(۱۹). هم‌چنین گلوتاتیون مهم‌ترین دفاع آنتی اکسیدانتی داخل سلولی است که نقش مهمی در حفاظت سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سموم محیطی دارد(۲۰). در این مطالعه نشان داده شد که ذرات سولفات مس می‌توانند باعث کاهش میزان گلوتاتیون سلولی و افزایش رادیکال‌های آزاد شوند.

از طرف دیگر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند به اهداف مختلفی از سلول از جمله لیپیدهای غشایی حمله کنند و باعث لیپید پراکسیداسیون و تولید مقادیر زیادی رادیکال‌های فعال جدید شوند که می‌توانند باعث آسیب به DNA شوند(۲۱).

هم‌چنین رادیکال‌های آزاد در سلول می‌توانند مستقیما با ماکرومولکول‌های حیاتی مانند DNA برخورد کنند و موجب شکست رشته‌های DNA، اتصال متقابل DNA-پروتئین و DNA-DNA، تولید اداکت روی رشته‌DNA، تغییر در اتصالات بازهای آلی و هم‌چنین شکست‌های کروموزومی گردند و منجر به آسیب ژنتیکی شوند(۲۲). آسیب ژنتیکی و میزان میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول در مطالعه حاضر خود دلیلی بر سمیت ژنتیکی این ذرات می‌باشد.

ویژگی‌های خاص فیزیکی- شیمیایی و الکتریکی ذرات نانو باعث پیشرفت سریع علم نانوتکنولوژی و کاربرد گسترده آن در صنایع پزشکی و دیگر بخش‌ها شد و باعث شد برای بسیاری از کاربردها و اهداف گزینه مطلوبی باشد. با این حال این خصوصیات جدید

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

ذرات نانو، نگرانی‌هایی را درمورد تماس شغلی و محیطی ایجاد کرده است. تغییرات در ساختمان و خصوصیات فیزیکی- شیمیایی ذرات نانو می‌تواند منجر به تغییرات درفعالیت بیولوژیک آن‌ها شود، ازجمله تولید رادیکال‌های آزاد که یکی از شایع‌ترین سمیت‌های ناشی از تماس با ذرات نانو است. استرس اکسیداتیو ناشی از تماس با مواد نانو ناشی از فاکتورهای سلولی مثل سطح ذرات، اندازه، ترکیب و حضور فلزات است؛ در حالی که پاسخ‌های سلولی مثل تنفس میتوکندری، تداخل سلول و نانوذره، فعال‌سازی سلول‌های ایمنی مسئول آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. پاسخ‌های استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات می‌تواند شروع‌کننده اثرات پاتوفیزیولوژیک بیش‌تری مانند ژنوتوکسیستی باشد(۲۳).

مطالعات قبلی در رابطه با ارزیابی میکرونوکلئوس‌ها و آزمون کامت در رده سلولی CHS-20 نشان داد که نانوذرات مس باعث افزایش تعداد میکرونوکلئوس و شکست رشته‌های DNA می‌شوند(۲۴).

هم‌چنین مطالعات in vitro و in vivo ثابت کرده اند که سمیت نانوذرات مس با تولید ROS، که ممکن است در نتیجه مهار دهیدروژنازهای میتوکندریایی باشد، همراه است(۲۶،۲۵).

مطالعات ارزیابی سمیت اکسید نانوذرات فلزی در مقایسه با نانوتیوب‌های کربن، ثابت کردند که نانوذرات CuO به شدت برای سلول و DNA سمی هستند(۲۷). در این مطالعه نیز نانو ذرات مس موجب شکست رشته‌های DNA و افزایش تعداد میکرونوکلئوس در سلول شدند. هم‌چنین باعث کاهش عوامل کاهنده سلولی مس گلوتاتیون و هم‌چنین تخریب غشای سلولی شد که از طریق اندازه‌گیری MDA و افزایش آن ثابت گردید که این نتایج با مطالعات قبلی هم‌خوانی داشت.

در این مطالعه، میزان سمیت ژنتیکی سولفات مس و ذرات نانو اکسید مس از طریق میزان میکرونوکلئوس ایجاد شده در لنفوسیت‌های خونی بررسی شد و با یکدیگر مقایسه گردید. هم‌چنین فاکتورهای استرس اکسیداتیو شامل گلوتاتیون و مالون دی‌آلدهید بررسی گردید. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که ذرات مس و نانو مس هر دو در سمیت سلولی ایجاد شده نقش دارد و با افزایش غلظت آن‌ها، تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول افزایش می‌یابد، به این صورت که بیش‌ترین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سولفات مس و نانوذرات اکسید مس مربوط به غلظت ۱۰۰ نانومولار و کم‌ترین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده مربوط غلظت ۱۰ نانومولار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که با مطالعات و تحقیقات قبلی هم‌خوانی داشت. هم‌چنین مواجهه لنفوسیت‌های خونی با فرم نانوذرات اکسید مس باعث ایجاد تعداد میکرونوکلئوس بیش‌تری در لنفوسیت‌های خونی نسبت به ذرات سولفات مس و در نتیجه سمیت سلولی بیش‌تری شد.

در ارتباط با میزان MDA ایجاد شده در سلول با افزایش غلظت ذرات، میزان MDA ایجاد شده نیز افزایش می‌یابد و فرم نانوی ذرات MDA بیش تری نسبت به فرم معمولی آن ایجاد می‌کند.

در ارتباط با گلوتاتیون ایجاد شده در سلول نیز با افزایش غلظت ذرات سولفات مس و نانو اکسید مس، میزان گلوتاتیون سلولی کاهش یافت که این امر منجر به تولید رادیکال آزاد بیش‌تر و در نتیجه آسیب بیش‌تر سلولی می‌شود. فرم نانوذرات مس، سهم بیش‌تری در کاهش گلوتاتیون سلولی داشته و در نتیجه موجب سمیت بیش تر سلولی می شود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه دکترای داروسازی آقای امیرمحمد تصدیقی ثانی، مصوب دانشکده داروسازی ساری، با کد طرح ۲۴۳۸ است. هم‌چنین نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت و تامین هزینه این طرح کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

References

1. Okereke T, Sternlieb I, Morell AG, Scheinberg IH. Systemic absorption of intrauterine copper. Science 1972; 177(4046): 358-360.
2. . Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M. Elements and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004.
3. Resistance Welder Manufacturers' Association (RWMA). Resistance Welding Manual. 4th ed. Philadelphia: Resistance Welder Manufactures assn. 2003.
4. Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. The Am J Clin Nutr 1998; 67(5): 960S-964S.
5. Xiao X, Fan FR, Zhou J, Bard AJ. Current transients in single nanoparticle collision events. J Am Chem Soc 2008; 130(49): 16669-16677.
6. Patil MA, Parikh PA. Investigation on likely effects of Ag, TiO 2, and ZnO nanoparticles on sewage treatment. Bullet Environ Contamin Toxic 2014; 92(1): 109-114.
7. Liu G, Li X, Qin B, Xing D, Guo Y, Fan R. Investigation of the mending effect and mechanism of copper nano-particles on a tribologically stressed surface. Tribol Lett 2004; 17(4): 961-966.
8. Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Möller L, Leygraf C, et al. Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano-and Micrometer-Sized Copper and Copper (II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. Small 2009; 5(3): 389-399.
9. Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO2 to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata. Sci Total Environt 2009; 407(4): 1461-1468.
10. Wang H, Huang Y, Tan Z, Hu X. Fabrication and characterization of copper nanoparticle thin-films and the electrocatalytic behavior. Anal Chim Acta 2004; 526(1): 13-17.
11. Hashimoto K, Nakajima Y, Matsumura S, Chatani F. An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. Toxicol Vitro 2010; 24(1): 208-216.
12. Shokrzadeh M, Shaki F, Mohammadi E, Rezagholizadeh N, Ebrahimi F. Edaravone decreases paraquat toxicity in a549 cells and lung isolated mitochondria. Iran J Pharm Res(IJPR) 2014;13(2): 675-681 (Persian).
13. Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production. Cell Biochem Biophys 2014; 70(1): 367-381.
14. Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RC, Ribas BO, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. Food Chem Toxicol 2004; 42(12): 2053-2060.
15. Shokrzadeh M, Habibi E, Modanloo M. Cytotoxic and genotoxic studies of essential oil from Rosa damascene Mill, Kashan, Iran. Med Glas (Zenica) 2017; 14(2): 152-157.
16. Shaki F, Hosseini MJ, Shahraki J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated liver mitochondria: a revised mechanistic vision for justification of clinical complication of depleted uranium (DU) on liver. Toxicol Environ Chem 2013; 95(7):1221-1234.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:49 +0330 on Monday November 19th 2018

17. Pourahmad J, Eskandari MR, Alavian G, Shaki F. Lysosomal membrane leakiness and metabolic biomethylation play key roles in methyl tertiary butyl ether-induced toxicity and detoxification. Toxicol Environ Chem 2012; 94(2): 281-293.
18. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189(1-2): 147-163.
19. Georgieva S, Popov B, Petrov V. Genotoxic effects of copper sulfate in rabbits. Arch Biol Sci 2013; 65(3): 963-937.
20. Shahani S, Behzadfar F, Jahani D, Ghasemi M, Shaki F. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Nasturtium officinale involved in attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity. Toxicol Mech Methods 2017; 27(2): 107-114.
21. Mojtahedzadeh M, Ahmadi A, Mahmoodpoor A, Beigmohammadi MT, Abdollahi M, Khazaeipour Z, et al. Hypertonic saline solution reduces the oxidative stress responses in traumatic brain injury patients. J Res Med Sci 2014; 19(9): 867-874 (Persian).
22. Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D, et al. Role of radicals and singlet oxygen in photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug camptothecin: an electron paramagnetic resonance study. J Phys Chem B 2003; 107(10): 2415-2425.
23. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. BioMed Resarch International 2013; 2013.
24. Sadiq R, Khan QM, Mobeen A, Hashmat AJ. In vitro toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. Drug Chem Toxicol 2015; 38(2): 152-161.
25. Sheline CT, Choi DW. Cu2+ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. Ann Neurol 2004; 55(5): 645-653.
26. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem 2005; 12(10): 1161-1208.
27. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano-and micrometer size. Toxicol Lett 2009; 188(2): 112-118.

Archive of SID

www.SID.ir