



مقاله پژوهشی

طراحی، ساخت، مشخصه‌یابی و ارزیابی زیستی نانوذرات مغناطیسی آهن پوشش داده شده با پلیمر کیتوزان/آلژینات

الهام رستمی^{۱*}، الهام هویزی^۲

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: e.rostami@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۴

DOI: 10.22034/ascij.2022.1965581.1415

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات در تشخیص، تحویل دارو و درمان به دلیل کوچک بودن این ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مهم‌ترین مشکل زمان درمان سرطان به‌وسیله‌ی شیمی‌درمانی، عدم دسترسی به قسمت‌های مرکزی توده به علت خون‌رسانی کمتر آن است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان سمیت نانوذره‌ی اکسید آهن با پوشش بیوپلیمر کیتوزان/آلژینات بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما سلول‌های Hep G2 بود. در این پژوهش نانوذرات مغناطیسی آهن با دو بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز و میکروسکوپ الکترونی رویی بررسی شد همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آلژینات به نانوذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز بررسی شد. با استفاده از نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و غلظت IC₅₀ ترکیبات تخمین زده شد. خاصیت توکسیک این نانوذرات با تست MTT و رنگ-آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی رویی و دستگاه اندازه‌گیری سایز، اندازه‌ی ۵۰ نانومتر را برای نانوذرات آهن اصلاح شده نشان داد. شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی مشاهده شد. بررسی‌های زیستی نانوذرات، قطعاً تاییدکننده‌ی پوشش‌دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آلژینات بود. بر اساس یافته‌ها، نانوذرات مغناطیسی آهن به‌طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود در حالیکه نانوذرات پوشش‌دار شده به طور معنی‌داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار/میلی‌لیتر به پایین توکسیسیته معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند.

کلمات کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، اکسید آهن، بیوپلیمر، کیتوسان، آلژینات.

مقدمه

نانوذرات به دلیل ویژگی منحصر به فرد نسبت سطح به حجم، باعث افزایش سطح تماس با بافت سرطانی می‌شوند. استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل می-تواند باعث کاهش سمیت دارو شود. نانوذرات به عنوان ذرات خیلی ریز و اندازه‌ی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف شده است (۱۱، ۲۱). سیستم‌های

پلی وینیل الکل، پلی اتیلن گلیکول و ... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند (۱۲، ۱۷، ۱۹، ۲۴).

پوشش‌دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر کیتوسان و آلژینات نه تنها سبب بهبود سازگاری آنها می‌شود بلکه پلیمر می‌تواند به عنوان محلی جهت بارگذاری دارو عمل کند. گونه ساختار این پلیمر به ایست که دارای گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز بوده و در نتیجه جهت حمل عوامل دارویی آب‌دوست و آب‌گریز می‌تواند مورد استفاده واقع شود. وجود تعداد زیادی گروه عاملی هیدروکسیل در سطح این پلیمر سبب افزایش آب‌دوستی سطح نانوذرات پوشش‌دار شده و به علاوه برای اتصال عوامل ردیاب یا عوامل هدفمندکننده عمل کند (۳، ۵).

در سال ۲۰۱۸ فنگ و همکاران از پلیمر پلی‌اتیلن ایمین برای کاهش سمیت و افزایش زیست در دسترس‌پذیری نانوذرات آهن استفاده کردند (۲).

در سال ۲۰۲۰ حسین بیگی و همکاران بررسی میزان سمیت نانوذره‌ی اکسید آهن با پوشش پلی دوپامین و بدون پوشش پلی دوپامین روی سلول‌های سرطانی ملونما B-16 F-10 بررسی کردند (۲۳).

هدف از این تحقیق ابتدا پوشش‌دهی نانوذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات می‌باشد و سپس بررسی سمیت این نانوذرات بر روی رده سلولی Hep G2 با استفاده از آزمون MTT و با رنگ‌آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و ارزیابی و اصلاح سطحی نانوذرات مغناطیسی آهن: پلیمر کیتوسان و آلژینات از شرکت کم لب خریداری شد. نانو ذرات آهن از شرکت نانوپیشگامان مشهد تهیه شد. کلسیم کلرید از شرکت مرک خریداری شد.

دارورسانی با نانوذرات منجر به پایداری دارو، افزایش زمان ماندگاری در جریان خون، ارائه دوز کمتری از عوامل موثر شیمی‌درمانی و کنترل توزیع دارو را در داخل بدن فراهم می‌کند (۲۰، ۲۲). نانوذرات مغناطیسی نتایج موفقیت‌آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده‌اند (۴). مطالعاتی در زمینه استفاده از نانوذرات مغناطیسی و القای حرارت برای از بین بردن سلول‌های سرطان پستان انجام شده است، که نتایج موفقیت‌آمیزی را نشان داده است (۱۸). از نانوذرات مغناطیسی هم چنین برای انتقال داروهای شیمی‌درمانی به سرطان پستان استفاده شده است. امروزه استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه‌های مختلف پزشکی برای تصویربرداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه‌های مختلف نانو تکنولوژی، فراماسیوتیکس و دارورسانی هدفمند، بحث سمیت این نانوذرات مطرح است. به دلیل کاربردهای متنوع و گسترده این نانوذرات، زمینه بررسی مطالعات سمیت آنها از درجه اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان کاربرد نانو اکسیدهای فلزی به عنوان حامل داروهای ضدسرطان به خوبی مشهود است. نانو ذرات اکسید آهن، روی، مس و آلومینا بهترین مثال‌ها در این زمینه می‌باشند (۱۴).

به منظور افزایش زیست‌سازگاری نانوذرات می‌توان از پوشش زیست‌دهی آنها توسط پلیمرهای سازگار استفاده کرد. پوشش‌دهی این نانوذرات، نه تنها سبب افزایش پایداری کلوئیدی آنها خواهد شد بلکه از سمیت آنها نیز کاسته و سبب افزایش زمان حضور این نانوذرات در سیستم گردش خون خواهد شد زیرا مانع از اتصال و جذب سطحی پروتئین‌ها بر سطح این نانوذرات می‌شود (۱۴).

در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به کیتوسان، دکستران، پلی اتیلن اکسید،

آب مقطر انجام می‌شود. pH محلول سدیم آلزینات با استفاده از محلول اسید کلرید ریک در ۵/۱ تثبیت می‌گردد. ۰/۵ گرم کیتوسان در اسید استیک ۱٪ حل شده و با سود pH به ۵/۴ می‌رسانیم. این روش برای پوشش‌دهی نانوذرات مغناطیسی به کار می‌رود. محلول آبی کلسیم کلرید به صورت قطره قطره به محلول سدیم آلزینات و نانو ذرات آهن در حال چرخش با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام می‌شود. سپس ۴ میلی‌لیتر از محلول کیتوسان به محلول کلسیم آلزینات و نانوذرات آهن اضافه می‌گردد و به مدت ۲۴ ساعت همزده می‌شود.

بررسی بقای سلولی با تست MTT: سلول‌های Hep G2 در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهکی با تعداد حدود ده هزار سلول در هر خانه برای ۲۴ ساعت کشت شدند. سپس این سلول‌ها با غلظت ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات آهن (Fe_3O_4) و نانوذرات آهن پوشش‌دار شده با کیتوزان و آلزینات ($Fe_3O_4/Alg/CS$) برای ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلولی با روش MTT بعد از تیمار سلول‌ها از انکوباتور خارج و محیط تیمار و کنترل دور ریخته شد و با استفاده از بافر فسفات (PBS Sigma, USA) شستشو شدند. سپس محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن محتویات رویی سلول‌ها دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (دی‌متیل سولفوکساید، مرک، آلمان) اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد پلیت شیک شده و جذب نوری با طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Fax 2100, USA) خوانش و درصد بقای سلولی اندازه‌گیری شد (۱۸-۲۰).

دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز (FTIR): دستگاه FTIR جزو تجهیزات آزمایشگاهی برای دستیابی به طیف مادون قرمز جذبی یا نشری یک ماده جامد، مایع یا گاز است. از این دستگاه برای بررسی قرار گرفتن کیتوسان بر روی نانو آلومینا استفاده شد. مدل دستگاه MIRACEL 10 ساخت شرکت شیمادزو می‌باشد.

دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): میکروسکوپ الکترونی روبشی، ابزاری ویژه برای تعیین ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می‌شود که مطالعات ریزساختاری مواد با قدرت تفکیک بالا و بزرگنمایی خیلی زیاد را امکان‌پذیر می‌باشد. این دستگاه جهت بررسی مورفولوژی و ساختار نانوذرات آلومینا استفاده گردید. مدل دستگاه Zeiss EM 10C Germany می‌باشد. قبل از انجام آنالیز نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند. همچنین رنگ‌آمیزی توسط یورانیل استات به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. همچنین عکس‌ها از نمونه تازه تهیه شده، گرفته شد (۱۶).

تهیه و کشت سلول‌های HepG2: در این مطالعه از سلول‌های سرطانی کبد تهیه شده از انستیتو پاستور استفاده شد. سلول‌های Hep G2 در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) در شرایط استاندارد دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری و در حضور محیط کشت DMEM (Gibco, USA) و سرم گوساله ۱۰ درصد (FBS, Gibco, USA) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد (Sigma, USA) کشت شدند. محیط کشت هر ۷۲ ساعت یکبار تعویض و سلول‌ها در تراکم ۸۰ درصد با استفاده از ترپسین/EDTA (ایده زیست، ایران) پاساژ داده شدند (۱۷).

مشخصه یابی نانوذرات: جهت تهیه نانوذرات آهن پوشش داده شده توسط کیتوسان/آلزینات، ابتدا محلول سدیم آلزینات و کلسیم کلرید با حل شدن در

توزیع یکنواخت نانوذرات و میزان فراوانی در اندازه ۵۰ نانومتر قابل مشاهده است.

طیف FT-IR نانوکامپوزیت Fe_3O_4 (a) Chitosan Sodium alginate- (b) و Sodium alginate (c) در $\text{Chitosan@Fe}_3\text{O}_4$ (شکل ۳) نشان داده شده است. طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی یک پیک جذب را در 579.66 cm^{-1} نشان می‌دهد که می‌تواند به پیک اکسید فلزی نسبت داده شود، این پیک بیان‌کننده آن است که آهن عنصر اصلی سازنده نانوذرات است. همچنین پیک گسترده در محدوده 3600 cm^{-1} - 2500 نشان دهنده ارتعاشات پیوند هیدروژنی می‌باشد که متعلق به نانوذره سنتز شده است (۷).

همانطور که مشاهده می‌شود در طیف (b)، ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H و همچنین پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی پلی‌ساکارید کیتوسان دارای نوار قوی و گسترده‌ای در محدوده 3000 cm^{-1} تا 3500 (3430 cm^{-1}) هستند. علاوه بر این، وجود یک حلقه مونوساکاریدی با خم شدن باند C-H به خارج از صفحه در حدود 890 cm^{-1} شناسایی شد که به دو پیک جذب در حدود 2926 cm^{-1} و 2876 برای ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن نسبت داده شد. پیوند C-H به ترتیب گروه کربونیل آمید I پیک بالایی در حدود 1649 cm^{-1} نشان داد، در حالی که ارتعاش کششی آمید III C-N پیک کوچکتری را در 1324 cm^{-1} نشان داد. علاوه بر این، ارتعاش خمشی گروه CH_2 و ارتعاش کششی نامتقارن پیوند C-O-C به ترتیب در 1423 و 1153 cm^{-1} یافت شد. ارتعاش کششی پیوند C-O پلیمر توسط دو قله برجسته در 1066 و 1029 cm^{-1} شناسایی شد (۲۲-۲۴).

در طیف سدیم آلزینات پیک در 3347 cm^{-1} به ارتعاش کششی OH نسبت داده می‌شود، نوارها در 1600 cm^{-1} و 1414 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن COO گروه نمک کربوکسیلات و

رنگ‌آمیزی گیمسا: به این منظور سلول‌های Hep G2 در پلیت ۲۴ چاهکی کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت IC_{50} نانوذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. به این منظور که ابتدا سلول‌ها در گروه‌های تیمار و کنترل با استفاده از متانول به مدت ۵ دقیقه تثبیت و سپس با استفاده از رنگ گیمسای ۴ درصد برای ۲۰ دقیقه نگ شده و زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند (۱).

رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید: به این منظور سلول‌های Hep G2 در پلیت ۲۴ چاهکی کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت IC_{50} نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند (۶). سپس با استفاده از محلول آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus, Japan) بررسی و تصویر برداری انجام گرفت.

نتایج

اندازه قطر نانوذرات و مورفولوژی ذرات با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. بار سطحی نیز به صورت پتانسیل زتا بر حسب میلی‌ولت اندازه‌گیری شد. طیف سنجی مادون قرمز بر روی نانوذرات مغناطیسی صورت گرفت. نتایج دستگاه اندازه‌گیری سائز نانوذرات و میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۱)، اندازه ۵۰ نانومتر برای نانوذرات اصلاح شده را نشان داد. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، کاملاً گرد و کروی هستند که منجر به افزایش کاربرد گسترده‌ی آنها در مطالعات انتقال دارو می‌گردد. در (شکل ۲) به خوبی

مشاهده تغییرات مورفولوژی سلول‌ها: برای مشاهده تغییرات مورفولوژی سلول‌ها از رنگ‌آمیزی گیمسا و میکروسکوپ معکوس استفاده شد. ارزیابی تغییرات ظاهری سلول‌های Hep G2 نشان داد که سلول‌های Hep G2 تیمار شده با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی-لیتر نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده از نظر مورفولوژی با هم و با سلول‌های نمونه کنترل تفاوت چشم‌گیری نشان دادند. به‌طوریکه در گروه‌های آزمایش انقباض و کاهش حجم سلولی، کاهش حجم سیتوپلاسم، چروکیدگی شدن هسته‌ها، از بین رفتن اتصالات و چسبندگی سلول‌ها و ایجاد سلول‌های منفرد و کروی‌تر مشاهده شد. که نشان دهنده سمیت نانوذرات استفاده شده و پیشبرد مرگ سلول بود که البته این تغییرات در گروه نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده نسبت به گروه نانوذرات مغناطیسی آهن کمتر بود (شکل ۶ الف-ج).

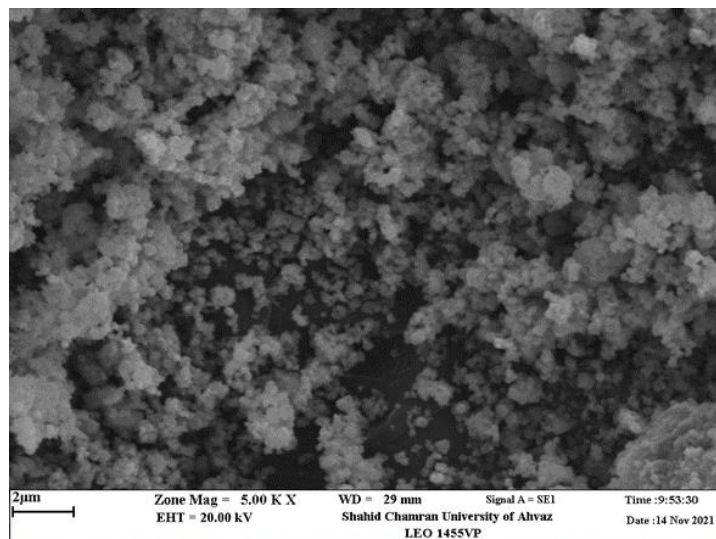
مشاهدات حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید: آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید رنگی آمیزی دوگانه است که سبب رنگ سبز در سلول‌های زنده و رنگ نارنجی در سلول‌های آپوپتوزی در زیرمیکروسکوپ می‌شود. در این پژوهش سلول‌های Hep G2 بعد از تیمار و انکوبه شدن به مدت ۲۴ ساعت با آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید رنگ شدند تا وضعیت آپوپتوز و زنده‌مانی آنها مشخص شود. در سلول‌های Hep G2 تیمار شده با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به صورت پراکنده و با تراکم کمتر مشاهده شدند (۲۰-۱۸).

سلول‌های نمونه کنترل شفاف و سبز رنگ که نشان-دهنده بقای آنها بود و سلول‌های تیمار یافته، به رنگ نارنجی بوده که نشان‌دهنده القای مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های تیمار بود. این مشاهدات در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات مغناطیسی آهن در

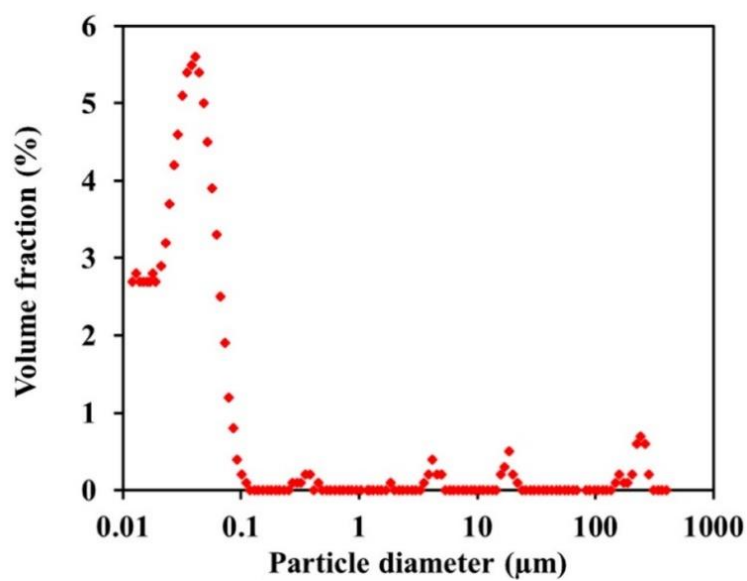
پیک در 1030 cm^{-1} است. به ترتیب به ارتعاش کششی گروه‌های C-O-C اختصاص داده می‌شود. در طیف (d) دیاگرام نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده آورده شده است. در این طیف همان گونه که مشاهده می‌شود تمامی پیک‌های مربوط به ۳ ماده قبل حضور دارند اما به علت اصلاح چند مرحله‌ای این پیک با شدت کمتری در محدوده‌های مورد نظر نسبت به پیک‌های مربوط به هر یک از این مواد وجود دارد. نتایج بررسی پتانسیل سطحی نانوذرات نشان می‌دهد که بار سطحی ۲۳- میلی‌ولت می‌باشد (شکل ۴) که این خود دلیلی بر قرار گرفتن گروه‌های عاملی بیوپلیمر آلیژنات در سطح نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده می‌باشد.

نتایج تست بقای سلولی: تست MTT برای ارزیابی اثرات نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بر سلول‌های Hep G2 در غلظت-های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت، نتایج این آزمون نشان داد که بقای سلول‌های Hep G2 بعد از تیمار با این برخی از غلظت‌ها به صورت وابسته به غلظت و به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد. همانگونه که در (شکل ۵) ارائه شده، یافته‌ها نشان داد که میزان سمیت نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نانو ذرات مغناطیسی آهن به-صورت معنی‌داری کاهش نشان داد اما در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به هم و همچنین نمونه کنترل تفاوتی مشاهده نشد. همچنین غلظت IC_{50} محاسبه شده نانوذرات مغناطیسی آهن بر سلول‌های Hep G2 در غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید که میزان بقای سلول‌های Hep G2 در این غلظت برای نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده حدود ۷۰ درصد تخمین زده شد (شکل ۵).

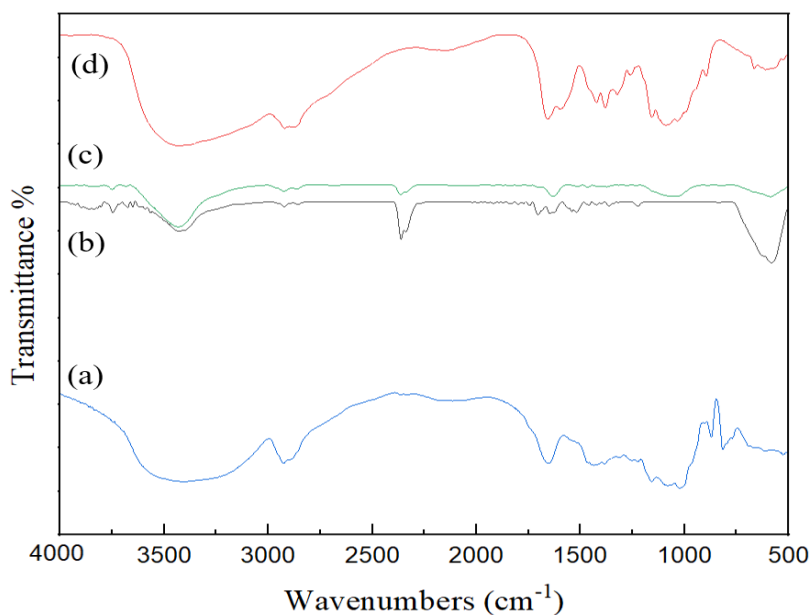
مقایسه با گروه تیمار با نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بارزتر و چشم‌گیرتر بود (شکل ۶ د-و).



شکل ۱- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده



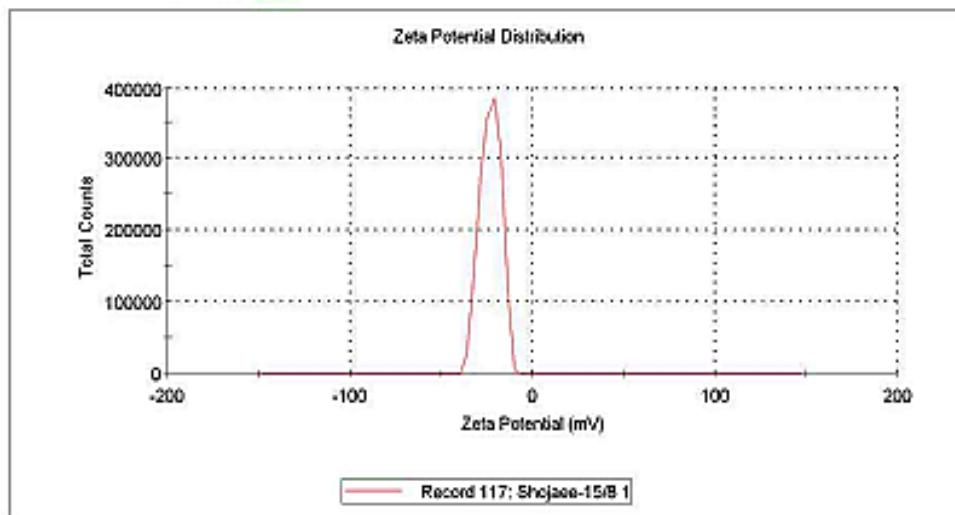
شکل ۲- توزیع یکنواخت نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده



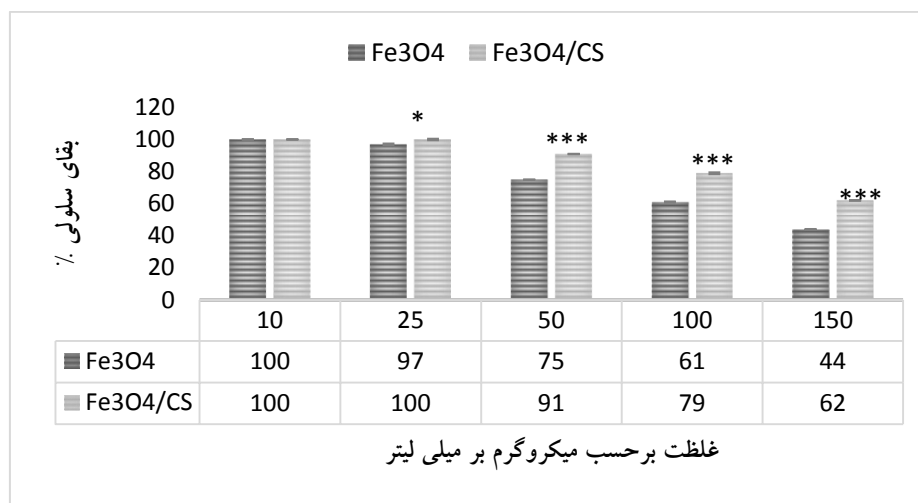
شکل ۳- طیف FT-IR نانوکامپوزیت (a) Fe_3O_4 ، (b) Chitosan، (c) Sodium alginate و (d) Sodium alginate-Chitosan- Fe_3O_4

Results

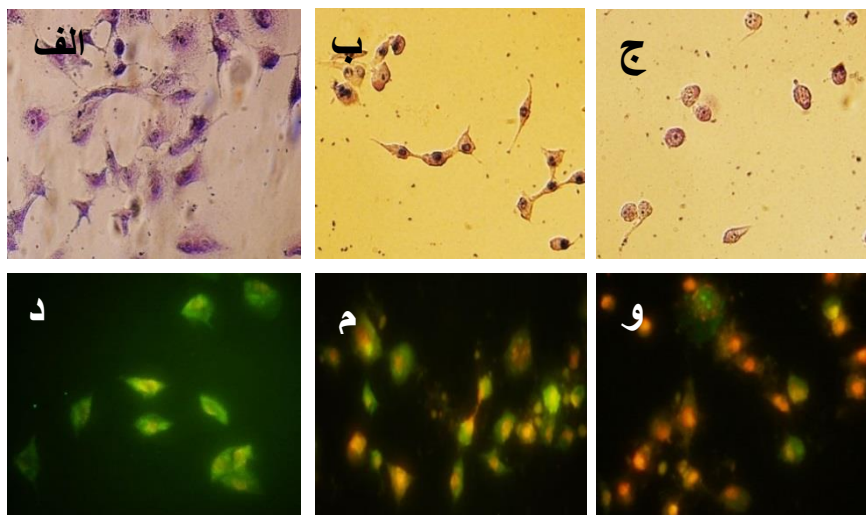
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -23.0	Peak 1: -23.0	100.0	5.49
Zeta Deviation (mV): 5.49	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.98	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			



شکل ۴- پتانسیل سطحی نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده



شکل ۵- ارزیابی بقای سلول‌های Hep G2 با استفاده از تست MTT در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی-لیتر تیمار شده با نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بعد از ۲۴ ساعت، غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان IC₅₀ در تیمار ۲۴ ساعته رده سلولی Hep G2 تعیین شد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.



شکل ۶- تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی گیمسا و اکریدین اورنج / اتیدیوم بر مایند و بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های Hep G2 با میکروسکوپ اینورت و فلورسنت الف: مورفولوژی سلول‌های Hep G2 در گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی گیمسا ب: مورفولوژی سلول‌های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی گیمسا، ج: مورفولوژی سلول Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی-لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن به مدت ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی گیمسا. د: مورفولوژی سلول‌های Hep G2 در گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم، م: مورفولوژی سلول‌های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم، و: مورفولوژی سلول Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات مغناطیسی آهن به مدت ۲۴ ساعت رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم. ۲۰ X

بحث

ساخت نانوسامانه‌های هدفمند انتقال دارو از یک طرف امکان بخشید دسترسی زیستی به دارو را بهبود و از طرف دیگر اثرات جانبی زیان بار آن را بر سایر نقاط بدن به حداقل ممکن رسانده است. از جمله این

استفاده از آزمون MTT و با رنگ‌آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید می‌باشد.

یافته‌های حاصل از بررسی‌های زیستی نانوذرات قطعا تاییدکننده‌ی پوشش‌دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آلژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به‌طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود در حالیکه نانوذرات پوشش‌دار شده به‌طور معنی‌داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار بر میلی‌لیتر به پایین توکسیسیته معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند (۱، ۶، ۱۵).

در این پژوهش نانوذرات مغناطیسی آهن با دو بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شده است. بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه اندازه‌گیری سایز، به خوبی سایز ۵۰ نانومتر برای نانوذرات آهن اصلاح شده را نشان داد و همچنین شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی مشاهده شد. همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آلژینات به نانوذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز بررسی شد (۷، ۸، ۹، ۱۰). در این بررسی، با استفاده از نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و غلظت IC₅₀ ترکیبات تخمین زده شد. خاصیت توکسیک این نانوذرات با تست MTT و رنگ‌آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه‌های مختلف پزشکی برای تصویربرداری و

نانوسامانه‌ها می‌توان به نانوذرات اکسید آهن اشاره کرد که امروزه به صورت گسترده در تصویربرداری تشدید مغناطیسی به عنوان عامل بهبود کیفیت تصویر استفاده می‌شود. این خاصیت منحصر به فرد این نانوذرات همراه با قابلیت هدفمند کردن آنها از طریق میدان مغناطیسی خارجی سبب جلب توجه بسیاری از محققین به آنها است و می‌توان در زمینه تحقیقات دارورسانی و همچنین تشخیص بیماری از آنها استفاده نمود. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه‌های مختلف نانوتکنولوژی، فراماسیوتیکس و دارورسانی هدفمند، بحث سمیت این نانوذرات مطرح است. به دلیل کاربردهای متنوع و گسترده این نانوذرات، زمینه بررسی مطالعات سمیت آنها از درجه اهمیت بالایی برخوردار است (۲، ۳، ۱۷، ۲۴).

به منظور افزایش زیست در دسترس پذیری و زیست‌سازگاری این نانوذرات می‌توان از پوشش زیست‌دهی آنها توسط پلیمرهای زیستی استفاده کرد. پوشش‌دهی این نانوذرات، نه تنها سبب افزایش پایداری کلئیدی آنها خواهد شد بلکه از سمیت آنها نیز کاسته و سبب افزایش زمان حضور این نانوذرات در سیستم گردش خون خواهد شد زیرا مانع از اتصال و جذب سطحی پروتئین‌ها بر سطح این نانوذرات می‌شود (۱۴). در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به کیتوسان، دکستران، پلی اتیلن اکسید، پلی وینیل الکل، پلی اتیلن گلیکول و ... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند (۱۴، ۲۱). همچنین از دیگر مزیت این پلیمرها می‌توان به وجود گروه‌های عاملی فراوان اشاره کرد که برای انتقال هدفمند داروها کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۳).

هدف از این تحقیق ابتدا پوشش‌دهی نانوذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات می‌باشد و سپس بررسی سمیت این نانوذرات بر روی رده سلولی Hep G2 با

2. Azar N.T., Mutlu P., Khodadust R., Gunduz U. 2013. Poly (amidoamine) (PAMAM) nanoparticles: Synthesis and biomedical applications. *Journal of Biology and Chemistry*, 41(3):289-299.

3. Babaei E., Sadeghizadeh M., Hassan Z.M., Feizi M.A., Najafi F., Hashemi S.M. 2012. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology*, 12(1):226-234.

4. Bakhtiary Z., Saei A.A., Hajipour M.J., Raoufi M., Vermesh O., Mahmoudi M. 2016. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine*, 12(2):287-307.

5. Beigi F., Fatahian S., Shahbazi Gahrouei D. 2019. In-Vitro Toxicity Assessment of polydopamine-coated and uncoated Fe₃O₄ nanoparticles in cell line B16-F10 (melanoma cell). *Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 37(533):762-767.

6. Berry C.C., Wells S., Charles S., Curtis AS. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25):4551-4557.

7. Cai W., Wan J. 2007. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *Journal of Colloid and Interface Science*, 305(2):366-370.

8. Calderón M., Quadir M.A., Sharma S.K., Haag R. 2010. Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Advanced Materials*, 22(2):190218.

9. Calderón M., Quadir M.A., Strumia M., Haag R. 2010. Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers. *Biochimie*, 92(9):1242-1251.

10. Chobot V., Hadacek F., Kubicova L. 2014. Effects of selected dietary secondary metabolites on reactive oxygen species production caused by iron (II) autoxidation. *Molecules*, 19(12):20023-20033.

انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات مغناطیسی نتایج موفقیت آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده‌اند اما استفاده از آنها به دلیل سمیت نسبتاً محدود بوده است. در این پژوهش نانو ذرات مغناطیسی آهن توسط بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات پوشش داده شده‌اند. بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه اندازه‌گیری سایز، به خوبی سایز ۵۰ نانومتر برای نانوذرات آهن اصلاح شده را نشان داد و همچنین شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی تشخیص داده شد. بررسی بار طحی نانوذرات آهن اصلاح شده نشان‌دهنده قرار گرفتن گروه‌های عاملی آلژینات در سطح این نانو ذرات است که ۲۳- میلی‌ولت می‌باشد. یافته‌های حاصل از بررسی‌های زیستی نانوذرات قطعاً تاییدکننده‌ی پوشش‌دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آلژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به‌طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود در حالیکه نانوذرات پوشش‌دار شده به‌طور معنی-داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت-های ۲۵ میکرومولار بر میلی‌لیتر به پایین سمیت معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه شهید چمران به جهت تامین هزینه با گرنت به شماره SCU.SC1400.31316 قدردانی و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Ankamwar B., Lai T., Huang J., Liu R., Hsiao M., Chen C., Hwu Y. 2010. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology*, 21(7):075102.

18. Moradi K.P., Shahbazi-Gahrouei D., Malik Shah Abdul Majid A., Suhaimi J.M., Moradi K.B., Shahbazi-Gahrouei S. 2017. In vitro study of SPIONs-C595 as molecular imaging probe for specific breast cancer (MCF-7) cells detection. *Iranian Biomedical Journal*, 21(6):360-368.
19. Munnier E., Cohen-Jonathan S., Hervé K., Linassier C., Soucé M., Dubois P. 2011. Doxorubicin delivered to MCF-7 cancer cells by superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Effects on subcellular distribution and cytotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(3):959-971.
20. Pankhurst Q.A., Thanh N.T.K., Jones S.K., Dobson J. 2009. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(22):224001.
21. Shahbazi-Gahrouei D., Moradi K.P., Moradi K.B., Shahbazi-Gahrouei S. 2019. Medical imaging modalities using nanoprobes for cancer diagnosis: A literature review on recent findings. *Journal of Research in Medical Sciences*, 24: 38.
22. Shahbazi-Gahrouei D., Moradi Khaniabadi P., Shahbazi-Gahrouei S., Khorasani A., Mahmoudi F. 2019. A literature review on multimodality molecular imaging nanoprobes for cancer detection. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering*, 25(2):57-68.
23. Unsoy G., Gunduz U. 2017. Targeted drug delivery via chitosan-coated magnetic nanoparticles. In: Andronescu E, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures drug delivery*. Amsterdam: Elsevier, Pp:835-864.
24. Veisheh O., Gunn J.W., Zhang M. 2010. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3):284-304.
11. Fatahian S., Shahbazi-Gahrouei D., Pouladian M., Yousefi M.H., Amiri G.R., Noori A. 2012. Biodistribution and toxicity assessment of radiolabeled and DMSA coated ferrite nanoparticles in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 293(3): 915-921.
12. Gautier J., Allard-Vannier E., Munnier E., Soucé M., Chourpa I. 2013. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 169(1-2):48-61.
13. Gu X. Zhang Y., Sun H. Song X., Fu C., Dong P. 2015. Mussel-inspired polydopamine coated iron oxide nanoparticles for biomedical application. *Journal of Nanomaterials*, 2015:154592.
14. Javid A., Ahmadian S., Saboury A.A., Kalantar S.M., Rezaei-Zarchi S. 2013. Chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for doxorubicin delivery: synthesis and anticancer effect against human ovarian cancer cells. *Chemical Biology and Drug Design*, 82(3):296-306.
15. Liao N., Wu M., Pan F., Lin J., Li Z., Zhang D. 2016. Poly (dopamine) coated superparamagnetic iron oxide nanocluster for noninvasive labeling, tracking, and targeted delivery of adipose tissue-derived stem cells. *Scientific Reports*, 6:18746.
16. Majewski A.P., Schallon A., Jerome V., Freitag R., Muller A.H., Schmalz H. 2012. Dual-responsive magnetic core-shell nanoparticles for nonviral gene delivery and cell separation. *Biomacromolecules*, 13(3): 857-866.
17. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53(2):283-318.

Design, Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan/Alginate Polymer

Elham Rostami^{1*}, Elham Hoveizi²

1- Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

In recent years, the use of nanoparticles in diagnosis, drug delivery and treatment has received much attention due to the small size of these particles and the increase in the surface-to-volume ratio. The most important problem when treating cancer with chemotherapy is the lack of access to the central parts of the mass due to its less blood supply. The purpose of this research was to investigate the toxicity of iron oxide nanoparticles coated with chitosan/alginate biopolymer on melanoma cancer cells of Hep G2 cells. In this research, magnetic iron nanoparticles were coated with two biopolymers, chitosan and alginate. The size and morphology of the surface of these nanoparticles were checked by size measuring device and scanning electron microscope, also the binding of functional groups of chitosan and alginate to magnetic iron nanoparticles was checked by infrared spectrometer. It was treated using magnetic iron nanoparticles and modified nanoparticles for 24 hours and the IC50 concentration of the compounds was estimated. The toxic properties of these nanoparticles were evaluated by MTT test and acridine orange/ethidium bromide staining. Examining the photos of the scanning electron microscope and the size measuring device showed a size of 50 nm for the modified iron nanoparticles. The shape of these nanoparticles was observed to be completely round and spherical. Biological investigations of nanoparticles definitely confirmed the effective coating of nanoparticles by chitosan and alginate biopolymers. According to the findings, magnetic iron nanoparticles had higher toxic effects depending on the concentration and their IC50 concentration was about 134 $\mu\text{M}/\text{ml}$, while the coated nanoparticles had significantly lower toxic effects and at concentrations below 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$, they had no significant toxicity on Hep G2 cells.

Keywords: Magnetic Nanoparticles, Iron Oxide, Biopolymer, Chitosan, Alginate.