

مقایسه‌ی اثرات نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش‌های اوره و پلی اتیلن گلیکول بر زیست‌پذیری فیبروبلاست موش

سریه قاسم پور^۱، دکتر محمدعلی شکرگزار^۲، دکتر رقیه قاسم‌پور^۳، دکتر محمدرضا جعفری^۴، دکتر محسن علیپور^۵

نویسنده‌ی مسوول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه فیزیولوژی alipourmohsen@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۳/۱۹ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه نانوساختارهای اکسید آهن به‌عنوان یک ریز مغذی مهم در کنترل و هدافگیری رهایش دارو، گرما درمانی و تشخیص و درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه‌ی سمیت سلولی نانوساختارهای مذکور به‌منظور راهیابی به ایمنی کاربرد آن‌ها، هدف این پژوهش بود.

روش بررسی: نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره در دوزهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با پروتئین‌های سرم گاوی اصلاح گردید.

سمیت این نانو میله‌ها در مقایسه با نوع اصلاح نشده‌ی آن با تست 3-(4,5-D imethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) سنجیده شد. سمیت نانومیله‌ها با پوشش Poly Ethylene Glycol (PEG) نیز در دوزهای مشابه با نانومیله‌های پوشش دار شده با اوره، از طریق تست MTT مقایسه گردید. تمامی تست‌ها بر روی رده‌ی سلولی L۹۲۹ و در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد.

یافته‌ها: سلول‌هایی که در معرض نانومیله‌های اصلاح شده قرار گرفته بودند، در مقایسه با اصلاح نشده‌ی آن زیست‌پذیری بیشتری در تمامی دوزها و زمان‌ها نشان دادند. نانومیله‌های دارای پوشش PEG در تمام دوزها و زمان‌ها، مرگ سلولی بیشتری را نسبت به آن‌هایی که پوشش اوره داشتند، نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نانومیله‌های اصلاح نشده نسبت به نوع اصلاح شده سمیت بیشتری نشان دادند که احتمالاً ناشی از تشکیل یک حلقه‌ی پروتئینی تحت عنوان Hard Corona به دور این نانومیله‌ها در محیط حاوی پروتئین و عدم تشکیل آن در نوع اصلاح شده می‌باشد. علاوه بر این کاهش مرگ سلولی توسط نانومیله‌های دارای پوشش اوره در مقایسه با PEG، بیانگر تاثیر نوع پوشش با توجه به اندازه‌ی ذرات بر سمیت سلولی آن‌ها است.

واژگان کلیدی: نانومیله‌های اکسید آهن، پوشش اوره، پوشش PEG، MTT، زیست‌پذیری، رده‌ی سلولی L۹۲۹

مقدمه

سلول‌ها و پروتئین‌ها، گرما درمانی و تصویربرداری رزنانس مغناطیسی، تشخیص و درمان سرطان (۱ و ۲)، همچنین

امروزه نانو فناوری در حوزه‌ی بیولوژی و پزشکی از جمله در رهایش دارو، حاملین دارو، ترمیم بافت، جداسازی

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

۲- دکترای تخصصی فرآورده‌های بیولوژیک، استاد انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران

۳- دکترای تخصصی نانو فناوری، استادیار دانشگاه تهران

۴- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۵- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

دارند که می‌توان از آن به بروز سمیت، آگلومریزاسیون، انحلال پذیری در غشای سلول و ایجاد سمیت بیشتر نام برد (۲۲ و ۲۱).

در این میان PEG به‌علت آب دوستی، عدم فعال سازی سیستم ایمنی و افزایش زمان حضور ذره در گردش خون و کاهش جذب توسط سیستم بیگانه خوار بدن استفاده می‌شود (۱۰). قابل ذکر است که ناپایداری کلوییدی نانوذرات فرآوری شده در محیط زیستی منجر به آگلومره شدن و تجمع زیاد نانوذرات در عروق و مسدود شدن آن‌ها می‌شود. علاوه بر این بارگذاری دارو بر سطح این ذرات و رهایش انفجاری دارو قبل از رسیدن به هدف از معایب کاربرد این مواد است (۲۰). اوره در بدن بسیاری از موجودات زنده از جمله انسان از طریق اکسیداسیون اسیدهای آمینه یا آمونیاک تولید می‌شود. اسیدهای آمینه پس از متابولیسم شدن، در کبد تبدیل به آمونیاک، آب، دی‌اکسید کربن و انرژی می‌شود. آمونیاک به‌عنوان ماده‌ای سمی برای بدن تلقی شده، باید از بدن خارج شود. در حیوانات خشکی‌زی از طریق خون وارد کلیه شده و از راه ادرار از بدن دفع می‌گردد. بنابراین کبد و کلیه از مهم‌ترین ارگان‌های بدن هستند که در دفع سموم بدن نقش دارند. اوره محلول در آب است و بنابراین می‌تواند ماده‌ی مناسبی به‌عنوان پوشش نانوساختارها باشد ولی تجمع آن در بدن می‌تواند سمی بوده، منجر به آسیب بافت‌های بدن گردد (۲۱). با تمام تلاش‌هایی که در مورد علوم پیشرفته امروزی به‌خصوص در زمینه‌ی نانوفناوری شده و با توجه به اهمیت حفظ سلامت جامعه بشری، به نظر می‌رسد که برای حصول اطمینان و ایمنی بیشتر، باید اثرات منفی و معایب و مضرات نانوذرات نیز مورد مطالعه قرار گیرد. مطالعات زیادی در خصوص اثرات سمی نانوذرات مختلف بر رده‌های سلولی انسانی و حیوانی (Human and Animal Cell Line) مختلف انجام شده است (۲۴ و ۲۳) ولی هنوز مطالعات زیادی بر روی اثرات سمی نانوذرات بر حفظ سلامت انسان در

ساخت تجهیزات پزشکی با ساختار نانو جهت درمان بیماری‌ها، کاربردهای فراوانی پیدا کرده است (۵-۳). به‌منظور کاهش عوارض شیمی درمانی از نانوذرات به‌عنوان حامل‌های دارویی برای رساندن دارو به سطح سلول‌های هدف استفاده می‌شود (۶). در مطالعه‌ای که بر روی آنزیم‌های کبدی انجام شده است، اثرات غیر سمی نانوذرات نقره بر روی هموگلوبین و عملکرد کبد مشاهده شده است (۷). یکی از مهم‌ترین مزیت‌های نانوذرات در درمان بیماری‌ها، استفاده از ابزارهای هدف‌گیری (مانند پادتن‌ها) در سطح نانوذرات جهت دارورسانی هدفمند به موقعیت‌های ویژه در بدن (بافت‌ها و سلول‌ها) است که منجر به کاهش قابل توجهی در دوز مورد نیاز برای درمان و مصون ماندن بافت‌ها و سلول‌های سالم در بدن خواهد شد (۸ و ۹). برای این منظور از مواد مختلفی برای ساخت نانوذرات استفاده شده است. در این میان، مطالعات زیادی روی ترکیبات اکسید آهن در سطح سلول (۱۰) و اکسید مس و اکسید روی (۱۱) بر روی باکتری صورت گرفته است. آهن در ترکیبات معدنی و درون ارگانسیم‌های زنده وجود دارد و در بدن انسان نیز توسط فریتین پوشیده شده و به صورت نانوذراتی به ابعاد ۵ تا ۷ نانومتر ذخیره می‌شوند (۱۲). نانوذرات سوپر پارامغناطیس اکسید آهن یکی از موادی است که بیشترین اقبال را در مصارف زیستی به‌خصوص در رهایش دارو دارد (۱۳). با وجود اثرات مثبت استفاده از نانوذرات در کاربردهای پزشکی متاسفانه اثرات مخرب این ساختارها بر بدن انسان کاملاً شناخته شده نیست (۱۴). برای کاهش سمیت، افزایش خواص زیست سازگاری و امکان کاربرد این نانوذرات در درمان هدف‌گیری شده از پوشش‌های مناسب بر سطح آن‌ها استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۶). جهت تامین بخشی از خواص فوق می‌توان از پلی‌اتیلن گلیکول (Poly Ethylene Glycol, PEG) (۱۶)، دکستران (۱۷)، کیتوسان (۱۸)، پلی‌وینیل الکل (۱۹)، طلا (۲۰) و اوره نام برد. مواد ذکر شده به‌عنوان پوشش‌های آلی و غیر آلی معایبی نیز

ساخت نانوميله‌ها از شرکت Merck تهیه شد. اوره و آب دیونیزه در حضور گاز آرگن و با استیرر همزده شد. نمک کلرید آهن (II) و نمک کلرید آهن (III) در محلول اسید کلریدریک ۱ مولار حل شده، سپس به محلول اوره اضافه شد و مجدداً با استیرر در حضور گاز آرگن همزده شدند. گاز آرگن باعث ایجاد محیطی عاری از اکسیژن می‌شود. پس از ۸ ساعت به محلول فوق اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار اضافه گردیده 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 (۲۸).

ساخت نانوميله‌ها با پوشش PEG: تهیه نانوميله‌های پوشش‌دار مطابق با روش سنتز نانوميله‌های بدون پوشش می‌باشد. با این تفاوت که پلی‌اتیلن گلیکول به محلول اولیه اضافه گردید (۲۹).

کشت سلولی: سلول‌های L۹۲۹ در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) که حاوی Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, USA) ۱۰ درصد می‌باشد، نگهداری می‌شوند. سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت اکسیژن ۵ درصد قرار داده شدند.

اصلاح نانوميله‌ها (Modification): نانوميله‌ها پس از اختلاط توسط ورتکس (Vortex) و اطمینان از یکنواخت شدن محلول، به میزان مورد نیاز از محلول برداشته، در فالكون ریخته شد. به میزان ۹ برابر محلول برداشته شده، محیط کشت (DMEM, ۱۰٪ FBS) به آن اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از طی ۲۴ ساعت، محلول با سانتریفیوژ ۱۳۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برداشته شده و

مواجه با این مواد صورت نگرفته است (۵). در این زمینه در مطالعه‌ای، کاهش سلول‌های سرطانی در آدنوکارسینوما توسط نانوذرات، بخصوص مواردی که پوشش سورفکتانتی کاتیونی دارند، گزارش شده است. در این بررسی سمیت غشای سلول و ایجاد اجزای شیمیایی و تغییر pH غیر طبیعی را نیز مطرح کرده‌اند (۲۵). گوپتا و همکاران در جاتی از مرگ سلولی و ایجاد واکیول و انقطاع در سیتواسکلتون سلول‌های فیروبلاست را تحت تاثیر نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن بدون پوشش و پوشش دار شده با دکستران را گزارش کرده‌اند (۲۶).

از آنجایی که در مورد اثرات سلولی نانوميله‌های اکسید آهن با پوشش‌های PEG و اوره مطالعات محدودی انجام شده، لذا مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به بررسی تعیین سطح ایمنی و محدوده‌ی سمیت سلولی نانو ذرات اکسید آهن از طریق ارزیابی زیست‌پذیری سلول‌های چسبنده فیروبلاست موش (رده L۹۲۹) پرداخت.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی (Experimental)، نانوميله‌های اکسید آهن در دوزهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جهت تست بر روی سلول‌های چسبنده فیروبلاست موشی L۹۲۹ انتخاب گردید. در این تحقیق منظور از سلول‌های چسبنده، سلول‌های زنده و چسبیده به کف پلیت می‌باشد و تغییر شکل سلول‌ها در اثر هرگونه آلودگی منجر به حذف آن‌ها در مطالعه گردید. هر دوز به‌طور جداگانه با کنترل خود مقایسه شد. جهت تعیین میزان سمیت نانوميله‌های اکسید آهن از تست 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) استفاده گردید (۲۷). متغیر مورد بررسی، زیست‌پذیری، دوز و جنس نانوميله‌ها می‌باشد. ساخت نانوميله‌ها با پوشش اوره: مواد مورد استفاده در

از رابطه زیر زیست‌پذیری (viability) سلول‌ها را مشخص کرد و با نمونه کنترل مقایسه نمود (۲۹).

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

$$\text{Viability}\% = 100 - \text{Toxicity}\%$$

روش آماری: مقایسه‌ی دوزها با یکدیگر و همچنین با گروه کنترل برای یک زمان ثابت به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی (Tukey One-Way ANOVA) انجام شد. جهت مقایسه‌ی دوزهای ثابت در زمان‌های متفاوت و همچنین مقایسه‌ی نتایج نانومیله‌های اصلاح شده و نشده از آزمون آماری اندازه‌های تکراری (LSD Repeated Measure) استفاده شد.

یافته‌های پژوهش: در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscopy (SEM) و عبوری Transmission Electron Microscopy (TEM) که از نانومیله‌ها گرفته شد، نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره، به شکل میله‌ای با اندازه‌ی طولی ۱۵۰ نانومتر و اندازه‌ی قطر ۱۵ نانومتر و اندازه‌ی نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش PEG دارای طول ۱۵۰ نانومتر و قطر ۲۳ نانومتر بودند.

یافته‌ها

نانومیله‌ها با پوشش اوره هم به‌صورت اصلاح شده (Modified) و هم به‌صورت اصلاح نشده (Non-modified) مورد ارزیابی سمیت قرار گرفته، این دو با یکدیگر مقایسه گردید. همان‌گونه که در نمودار ۱ دیده می‌شود، زیست‌پذیری سلول‌هایی که در معرض نانومیله‌های اصلاح شده قرار گرفته بودند، در هر دوز نسبت به دوز مشابه خود در نانومیله‌های اصلاح نشده، به‌طور معنی‌دار بیشتر است ($P < 0/05$). تمامی دوزها در هر دو نوع اصلاح شده و نشده نسبت به کنترل خود کاهش معنی‌داری را در زیست‌پذیری نشان داده‌اند ($P < 0/05$). با توجه به نمودار ۱ با افزایش دوز از ۱۰۰ به

به‌میزان حجم اولیه محلول به آن محیط کشت (DMEM، ۱۰٪ FBS) افزوده شد.

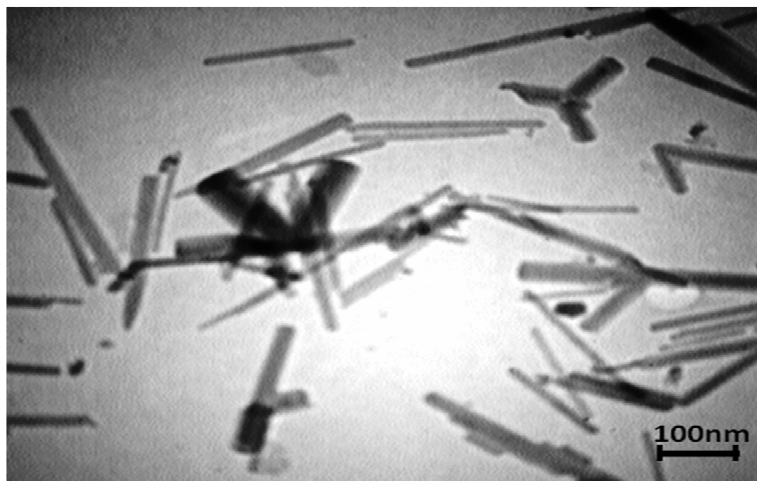
مواجهی سلول‌ها با نانومیله‌ها: سلول‌ها در چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شده، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (DMEM، ۱۰٪ FBS) به روی آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پس از طی این زمان ۴۰ میکرولیتر از نانومیله‌ها روی سلول‌ها ریخته شد سپس تا پایان ساعت‌های مورد مطالعه در انکوباتور قرار داده شدند. هر دوز از نانومیله‌ها در هر بار MTT در ۶ چاهک ریخته شد. تست MTT برای سه بار تکرار گردید. در مجموع زیست‌پذیری سلول‌ها در مواجهه با هر دوز و سلول‌های کنترل ۱۸ بار تست شدند.

بررسی زیست‌پذیری سلول: پس از سپری شدن زمان‌های مورد مطالعه، پلیت از انکوباتور خارج شده، در زیر هود ابتدا محیط رویی سلول‌ها خارج گردید و پس از آن به روی سلول‌ها، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده در Phosphate Buffer Saline (PBS, Sigma, USA) ۰/۱۵M روی سلول‌ها اضافه شد. کاغذ آلومینیومی به دور پلیت پیچیده شده 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 شده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه گردید. مجدداً به مدت زمان ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا بلورهای تشکیل شده در الکل حل گردد. پس از آن به‌منظور به‌دست آمدن محلول یکنواخت، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. مقدار غلظت ماده 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) بالاتری نسبت به چاهک‌های دارای سلول کمتر نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان

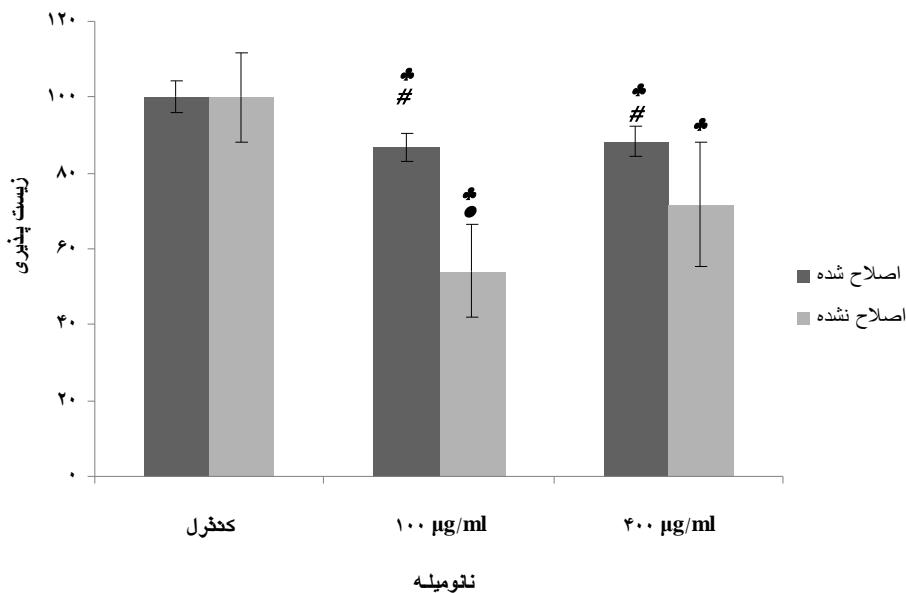
اصلاح نشده معنی‌دار نیست ($P=0/56$). بهتر شدن شرایط زیست سلولی یعنی افزایش زیست‌پذیری در ۴۸ ساعت در هر دو نوع نانومیله‌ی اصلاح شده و نشده نیز در نمودار ۲ نشان داده شده است. ($P<0/05$). در بررسی تاثیر ماده‌ی پوشش دهنده‌ی نانومیله‌ها بر روی زیست‌پذیری سلول‌ها، ۲ نوع نانومیله با پوشش‌های PEG و اوره مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌گونه که در نمودارهای ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، دوز ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانومیله‌های دارای پوشش PEG کاهش قابل توجه و معنی‌داری بر زیست‌پذیری سلول‌ها نسبت به کنترل ایجاد کرده است ($p<0/05$). با افزایش دوز از ۱۰۰ به ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، سرعت کاهش زیست‌پذیری ادامه یافته است که این روند در ۲۴ ساعت معنی‌دار می‌باشد. مشابه چنین تغییراتی در زمان ۴۸ ساعت نیز دیده شد ولی در ۴۸ ساعت با تغییرات دوز کاهش زیست‌پذیری از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار نبوده است. با توجه به نمودار ۳، در مقایسه‌ی دوزهای مشابه در ۲۴ ساعت، نانومیله‌های دارای پوشش PEG منجر به کاهش معنی‌داری در زیست‌پذیری نسبت به نانومیله با پوشش اوره شدند. مشابه این نتیجه در ۴۸ ساعت نیز مشاهده شده است (نمودار ۴).

۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، سرعت روند کاهش زیست‌پذیری معکوس شده است. به طوری که اختلافی بین کاهش زیست‌پذیری در دو دوز اصلاح شده دیده نمی‌شود ($P=0/66$) و حتی در نوع اصلاح نشده میزان زیست‌پذیری با افزایش دوز بیشتر نیز شده است. به عبارت دیگر شرایط رشد سلول بهتر شده است.

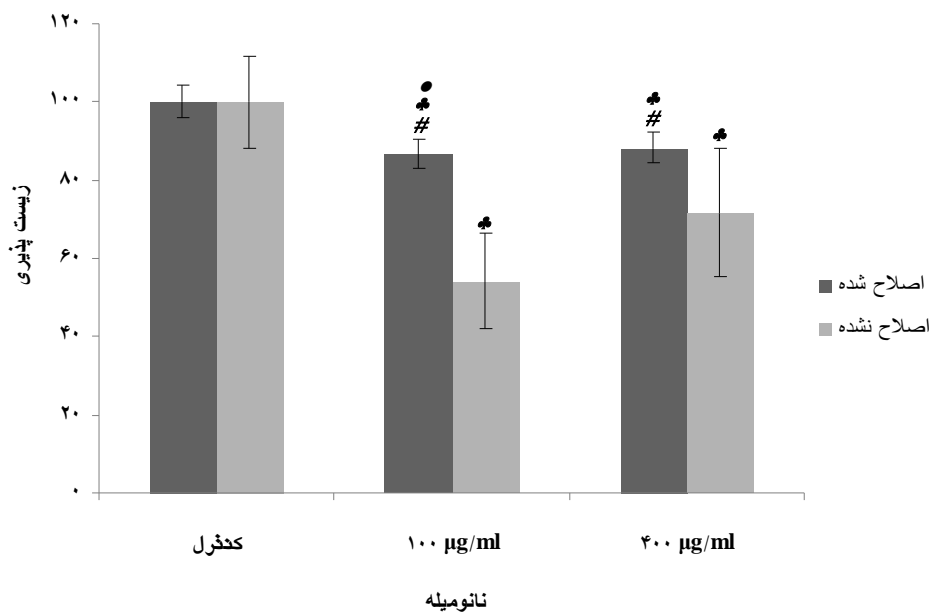
نانومیله‌های اصلاح شده و نشده در دو دوز ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت نیز مقایسه شدند که در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود، دوزهای مشابه در دو نوع نانومیله‌ی اصلاح شده و نشده، اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند ($P<0/05$) که این اختلاف به شکل کاهش زیست‌پذیری در سلول‌هایی که در معرض نانومیله‌های اصلاح نشده قرار گرفته بودند، نمایان شده است. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده در زمان ۲۴ ساعت می‌باشد. در هر دو نوع نانومیله یعنی اصلاح شده و نشده، در ۴۸ ساعت، تمام دوزها کاهش معنی‌داری در زیست‌پذیری نسبت به کنترل خود نشان داده‌اند ($P<0/05$). در مقایسه بین دوزهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در هر دو نوع نانومیله به صورت مجزا، افزایش زیست‌پذیری معنی‌دار در راستای افزایش دوز، در نوع اصلاح شده مشاهده می‌شود ($P<0/05$) که این مورد در نوع



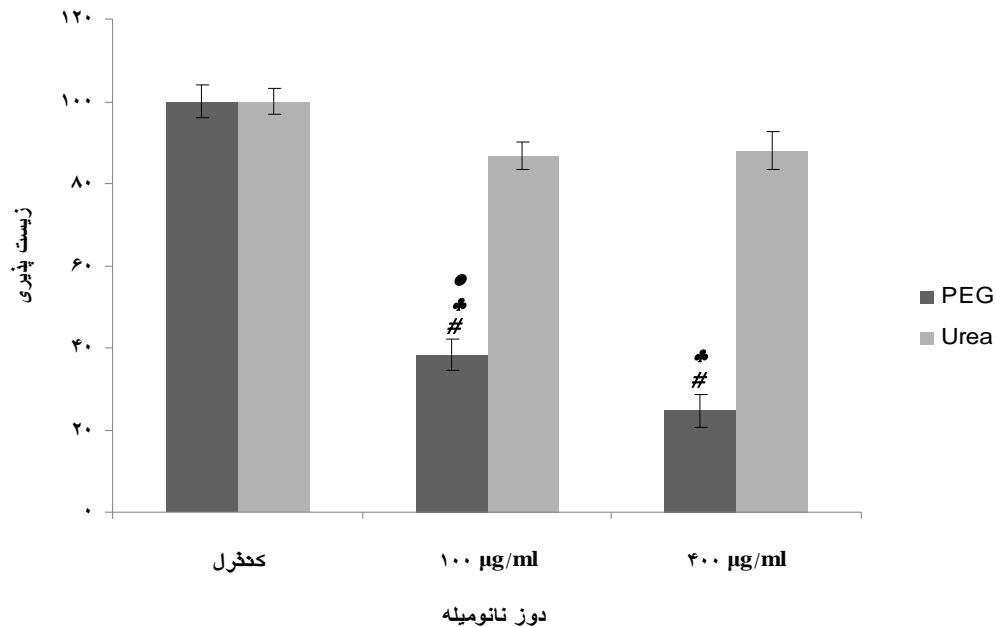
شکل ۱: تصویر TEM از نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره



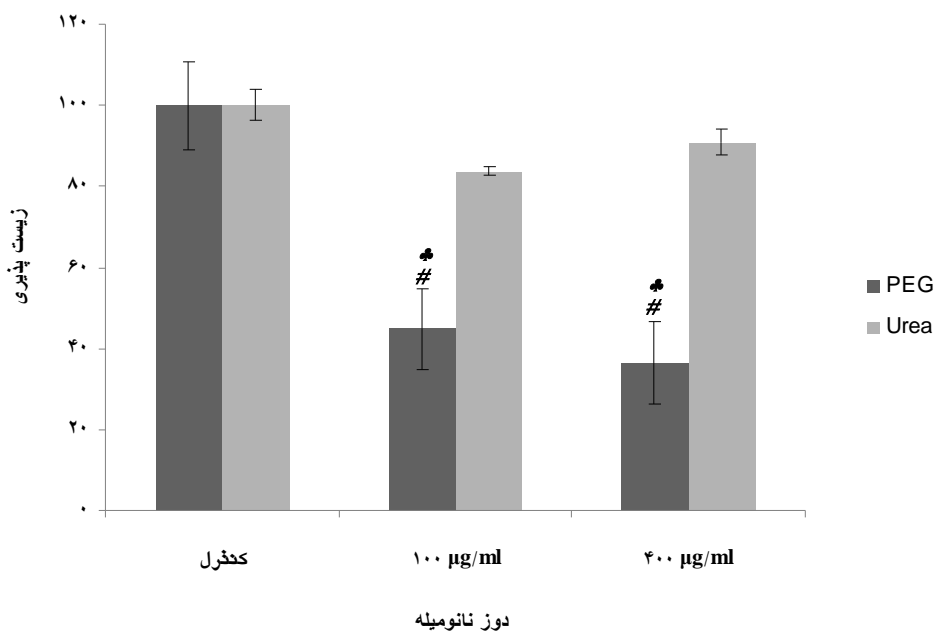
نمودار ۱: مقایسه‌ی نانومیله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده با پوشش اوره با یکدیگر و کنترل در ۲۴ ساعت. ♣: ($P < 0.05$) مقایسه هر دوز با کنترل؛ #: ($P < 0.05$) مقایسه هر دوز نانومیله‌ی اصلاح شده با دوز مشابه خود در نوع اصلاح نشده، •: ($P < 0.05$) مقایسه‌ی دوز ۱۰۰ با ۴۰۰ µg/ml، ستون‌ها نمایانگر میانگین ± دامنه تغییرات می‌باشند.



نمودار ۲: مقایسه‌ی نانومیله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده با پوشش اوره با یکدیگر و کنترل در ۴۸ ساعت. ♣: ($P < 0.05$) مقایسه هر دوز با کنترل؛ #: ($P < 0.05$) مقایسه هر دوز نانومیله‌ی اصلاح شده با دوز مشابه خود در نوع اصلاح نشده، •: ($P < 0.05$) مقایسه‌ی دوز ۱۰۰ با ۴۰۰ µg/ml، ستون‌ها نمایانگر میانگین ± دامنه تغییرات می‌باشند.



نمودار ۳: مقایسه‌ی نانومیله‌ها با پوشش اوره و PEG در ۲۴ ساعت، * $P < 0/05$) مقایسه‌ی هر دوز با کنترل، # $P < 0/05$) مقایسه‌ی دوزهای مشابه نانومیله با پوشش اوره با همان دوز در پوشش PEG: * $P < 0/05$) مقایسه‌ی دوز ۱۰۰ با ۴۰۰ µg/ml، ستون‌ها نمایانگر میانگین ± دامنه تغییرات می‌باشد.



نمودار ۴: مقایسه‌ی نانومیله‌ها با پوشش اوره و PEG در ۴۸ ساعت، * $P < 0/05$) مقایسه‌ی هر دوز با کنترل، # $P < 0/05$) مقایسه‌ی دوزهای مشابه نانومیله با پوشش اوره با همان دوز در پوشش PEG: * $P < 0/05$) مقایسه‌ی دوز ۱۰۰ با ۴۰۰ µg/ml، ستون‌ها نمایانگر میانگین ± دامنه تغییرات می‌باشد.

بحث

به دنبال قرار گرفتن نانومیلها در محیط پروتئین دار مانند محیطهای بیولوژیکی و یا محیط کشت سلولی حاوی FBS، پروتئینها به دور نانومیلها جذب می شوند و تشکیل Hard Corona می دهند. با تشکیل این پوشش پروتئینی، pH محیط کشت دچار تغییر می شود که این تغییر pH موجب دناتور شدن پروتئینها و حتی مرگ سلولی می گردد. با خارج کردن محیط کشت پس از ۲۴ ساعت و اضافه کردن محیط کشت تازه، دیگر تغییری در شرایط محیط ایجاد نمی شود (۳۲-۳۰). بنابراین با قرار دادن نانومیلها در محیط حاوی FBS، نانومیلها اصلاح شده و می توان میزان دقیق تری از مرگ سلولی به دنبال اثرات مستقیم نانومیلها بر سلول را به دست آورد. با توجه به نمودار ۱ میزان زیست پذیری نانومیلهای اصلاح شده نسبت به اصلاح نشده در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، از حدود ۸۶ درصد به ۵۴ درصد رسیده است و در دوز ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، از ۸۸ درصد به ۷۱ درصد رسیده است. بنابراین در هر دو دوز میزان زیست پذیری نانومیلهای اصلاح نشده کمتر از اصلاح شده آن می باشد. این نتایج در ۴۸ ساعت نیز دیده شده است (نمودار ۲). به طوری که در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، درصد از ۸۸ درصد به ۸۱ درصد رسید و در دوز ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، این میزان از ۹۰ درصد به ۸۷ درصد رسید. این نتایج که به لحاظ آماری معنی دار می باشد، نشان دهنده افزایش زیست پذیری و به عبارتی افزایش میزان ایمنی به دنبال اصلاح این مواد می باشد. همان گونه که در پسین اشاره شد موارد استفاده این مواد در دارورسانی به ویژه در درمان سرطان، تصویربرداری، ترمیم زخمها و موارد دیگری که با محیطهای بیولوژیک ارتباط دارند، می باشد و مستلزم ایمنی هر چه بیشتر است. بنابراین با روش اصلاح نانومیلها می توان ایمنی آنها را افزایش داد. کمتر شدن اختلاف زیست

پذیری دوزهای مشابه در ۴۸ ساعت نیز بیانگر شدت بیشتر مرگ سلولی در ۲۴ ساعت اول است که ممکن است با فرایند تشکیل Hard Corona و دناتور شدن پروتئینها مرتبط باشد. همان گونه که در این تحقیق دیده می شود در نمودارهای ۱ و ۲ به نظر می رسد که با گذشت زمان، سرعت کاهش زیست پذیری، کاهش می یابد. این کاهش سرعت می تواند به علت ماده MTT باشد. نانومیلها در تمامی لحظات در حال ورود به سلولها می باشند و از آنجایی که MTT میزان فعالیت متابولیکی میتوکندری را ارزیابی می کند (۳۳)، به نظر می رسد که این امکان وجود دارد که در لحظه آغازین واکنش MTT، سلول در حال جذب نانومیلها بوده و به صورت کاذب میزان فعالیت میتوکندری را بالاتر نشان دهد. و این امر منجر به کاهش کاذب مرگ سلولی شده باشد. برای اثبات این فرضیه بنظر می رسد که بهتر است ۴ ساعت قبل از ریختن MTT نانومیلها را از محیط خارج کرده، اجازه دهیم تا در این فاصله سلول استراحت کرده، فعالیت متابولیکی واقعی سلول در معرض نانومیلها را نشان دهد و نتیجهی درستی از میزان فعالیت متابولیکی سلول توسط MTT سنجیده شود. با توجه به نمودار ۱، زیست پذیری سلولی در سلولهایی که در معرض نانومیلهای اصلاح شده قرار دارند، با افزایش دوز تغییری به جهت آماری نداشته است. این یافته در نمودار ۲ به گونه ای است که افزایش معنی داری در زیست پذیری دیده می شود. این یافتهها بیانگر بهتر شدن شرایط زیستی سلول می باشد.

وجود آهن باعث بهتر شدن شرایط زیستی سلولها گردیده و سرعت مرگ سلولی را کاهش می دهد. از آنجایی که نانومیلهای مورد مطالعه اکسید آهن می باشند، به نظر می رسد که آهن آن به مرور در محیط آزاد گردیده است و شرایط را برای رشد سلولها بهتر کرده است. این نتایج در راستای نتایج به دست آمده توسط هوانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹

می‌باشد (۳۴). مطالعات انجام شده توسط این دانشمندان حاکی از آن است که کمبود آهن باعث کاهش رشد و اختلال در چرخه‌ی سلولی و پروتئین‌های مرتبط با آن مانند CDKs و سایکلین‌ها می‌گردد. CDKs و سایکلین‌ها پروتئین‌هایی هستند که در تکامل چرخه‌ی سلولی نقش کلیدی و اساسی دارند و خود به آهن نیاز دارند بنابراین با حضور آهن چرخه‌ی سلولی تکامل بهتری خواهد داشت (۳۴). به‌طور کلی بیشترین سمیت در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد که هنوز آهن نانوميله‌ها در محیط آزاد نشده است و آثار تخریبی نانوميله‌ها به آثار بهینه‌سازی شرایط توسط آهن غلبه دارد و با افزایش دوز این روند به صورت معکوس ادامه می‌یابد.

در مواجهه‌ی سلول‌ها با نانوذرات، این مواد به راحتی وارد سلول شده و باعث ایجا واکوئل‌هایی می‌شوند که منجر به آسیب ارگانل‌های داخل سلولی و نهایت مرگ سلولی می‌گردند (۵). بر اساس اطلاعات موجود، نوع پوشش نانوذرات بر میزان سمیت آن‌ها تاثیر متفاوت دارد (۳۵). پوشش‌ها و نانو مواد به صورت Core-Shell ساخته می‌شود. مطالعات زیادی بر روی این نوع ساختارها انجام شده است (۳۶). اثرات نانو ساختارها بستگی به خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها شامل اندازه و توزیع اندازه‌ی ذره، بار سطحی، میزان آب دوستی، زیست سازگاری و مدت زمان حضور آن در خون دارد (۳۷-۳۹، ۵). در مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی سلول‌های L۹۲۹ انجام شد، دوز بالای نانوذرات اکسید آهن را با پوشش PVA، ایمن اعلام کردند در حالی که بدون پوشش آن کاملاً سمی گزارش شده است (۲۷). همچنین گوپتا و همکارانش نانوذرات اکسید آهن با پوشش Pullulan را ایمن با زیست پذیری ۹۲ درصد گزارش کرده‌اند (۴۰). در راستای نتایج به‌دست آمده، در مطالعه‌ای که توسط وانگازا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام شد، نانوذرات هیالورونیک

اسید با پوشش PLGA-PEG بر روی رده‌ی سلولی Chines Hamster Ovarian (CHO) مورد بررسی قرار گرفت و کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها گزارش گردید (۴۱). همان‌گونه که در نمودارهای ۳ و ۴ نشان داده شده است، میزان سمیت نانوميله‌ها با پوشش اوره در تمام دوزها و زمان‌های مورد مطالعه کمتر از نانوميله‌هایی است که پوشش PEG دارند. این یافته بیانگر ایمن بودن اوره در مقایسه با PEG می‌باشد. به نظر می‌رسد که علت این ایمن بودن با نوع پوشش و با میزان پایداری نانوميله‌ها پس از ساخت آن مرتبط باشد. نتایج این تست با توجه به نمودارهای ۳ و ۴ نشان می‌دهد که میزان زیست‌پذیری سلول‌های L۹۲۹ در مواجهه‌ی با نانوميله‌ها با پوشش PEG کم شده است. در حالی که انتظار افزایش آن می‌رفت. به عبارت دیگر در ۲۴ ساعت در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، زیست‌پذیری در سلول‌های در معرض نانوميله‌های پوشش دار شده با PEG، به کمتر از ۵۰ درصد زیست‌پذیری سلول‌های در معرض نانوميله‌ها با پوشش اوره رسیده است. این کاهش در دوز ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به کمتر از ۳۰ درصد کاهش یافته است. این نتایج در ۴۸ ساعت نیز دیده شده است. با توجه به نتایج فوق و همچنین روش ساخت نانوميله‌ها، به نظر می‌رسد که در این ذرات، آگلومریزاسیون (تجمع) رخ داده باشد و این باعث اثرات سمی بر روی سلول‌ها شده است. پروتئین‌های اطراف نانوميله‌ها به‌دنبال پدیده آگلومریزاسیون، شرایط زیستی سلول‌ها را به مخاطره انداخته و باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند. در مواردی که آگلومریزاسیون نانوميله‌ها ایجاد می‌شود و سپس رسوب می‌کنند، ممکن است منجر به کاهش ATP و سمیت سلول و یا مرگ سلول گردد (۴۲). این نکته قابل توجه است که اثرات معکوس نانوميله‌ها به غلظت آن‌ها نیز بستگی دارد. علاوه بر این ممکن است که مرگ و یا کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها به نوع سلول‌ها مرتبط باشد در راستای این نتایج، در مطالعه‌ای که توسط سئو و همکارانش در سال

اتفاق می‌افتد. لذا پیشنهاد می‌شود نانوذرات آهن جهت اثربخشی بهتر و افزایش زیست‌پذیری سلول‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در محیط حاوی پروتئین قرار داده شده، به شکل اصلاح شده تبدیل گردند. همچنین نانومیله‌های دارای پوشش اوره سمیت کمتری نسبت به PEG نشان دادند که بایستی علاوه بر نوع پوشش، اندازه‌ی ذرات، دوز و طول زمان مواجهه‌ی سلول‌ها با آن‌ها مورد توجه قرار گیرد. جهت راهیابی به محدوده‌ی ایمنی دقیق این ذرات و مکانیزم اثر آن‌ها مطالعات بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

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

References

- 1- Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 969-76.
- 2- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials.* 2007; 28: 869-76.
- 3- Mao HY, Laurent S, Chen W, et al. Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chem Rev.* 2013; 113: 3407-24.

۲۰۰۸ بر روی اسید لینولئیک با پوشش PEG انجام شده است، در تست MTT کاهش زیست‌پذیری در سلول‌های سرطانی سینه به دنبال مصرف اسید لینولئیک با پوشش PEG گزارش شده است. در حالی که عکس این نتایج در مورد اثر ماده‌ی فوق بر روی سلول‌های NIH ۳T۳ دیده شده است (۴۳). در مطالعه‌ای که توسط گوپتا و همکارانش بر روی نانوذرات کروی اکسید آهن با پوشش PEG انجام شد در تمام دوزهای مورد بررسی سلول‌ها زیست‌پذیری بالا در حدود ۱۰۰ درصد نشان دادند (۱۰). بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای علت‌یابی نتایج این تحقیق مطالعات و آزمایشات تکمیلی بیشتری انجام گردد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، نانومیله‌های اکسید آهن اصلاح شده باعث کاهش میزان سمیت و بهبود زیست‌پذیری سلول‌ها نسبت به نوع اصلاح نشده‌ی آن می‌شوند که ممکن است ناشی از تغییرات بیوشیمیایی مانند pH محیط و دنا توره شدن پروتئین‌های آن باشد که به دنبال تشکیل Hard Corona

- 4- Helmus MN. How to commercialize nanotechnology. *Nat Nanotechnol.* 2006; 1: 157-8.
- 5- Mahmoudi M, Simchi A, Vali H, et al. Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and poly(vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts. *Adv Eng Mater.* 2009; 11: B243-B50.
- 6- Kommareddy S, Tiwari SB, Amiji MM. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol Cancer Res Treat.* 2005; 4: 615-25.
- 7- Heydarnejad MS Y-SP, Mobini- Dehkordi M,

- Rahnama S. The influence of topical treatment of dermalwounds with silver nanoparticles on alt and ast enzymes and hemoglobin in mice. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2013; 21: 35-44.
- 8- Fahmy TM, Demento SL, Caplan MJ, Mellman I, Saltzman WM. Design opportunities for actively targeted nanoparticle vaccines. *Nanomedicine (Lond).* 2008; 3: 343-55.
- 9- Phan JH, Moffitt RA, Stokes TH, et al. Convergence of biomarkers, bioinformatics and nanotechnology for individualized cancer treatment. *Trends Biotechnol.* 2009; 27: 350-8.
- 10- Gupta AK, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Ieee Trans Nanobio Science.* 2004; 3: 66-73.
- 11- Hoseinzadeh E AM, Samarghandy MR. Evaluation of synergistic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria by fraction inhibitory concentration index. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2012; 20: 31-43.
- 12- Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage. *J Struct Biol.* 1999; 126: 182-94.
- 13- Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P. Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging. *J Phys Chem B.* 2008; 112: 14470-81.
- 14- 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: 2323-38.
- 15- Bautista MC, Bomati-Miguel O, Morales MD, Serna CJ, Veintemillas-Verdaguer S. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *J Magn Magn Mater.* 2005; 293: 20-7.
- 16- Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug Chem.* 2002; 13: 122-7.
- 17- Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials.* 2000; 21: 2253-61.
- 18- Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003; 24: 2339-49.
- 19- Albornoz C, Jacobo SE. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *J Magn Magn Mater.* 2006; 305: 12-5.
- 20- Latham VH, Ducut JL, Rostamiani K, et al. A Rapid lectin receptor-binding assay- comparative-evaluation of sea-urchin embryo cell-surface lectin receptors. *Acta Histochem.* 1995; 97: 89-97.
- 21- Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis ASG. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2003; 24: 4551-7.
- 22- Hilger I, Kiessling A, Romanus E, et al.

- Magnetic nanoparticles for selective heating of magnetically labelled cells in culture: preliminary investigation. *Nanotechnology*. 2004; 15: 1027-32.
- 23- Ge G, Wu H, Xiong F, et al. The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8: 215.
- 24- Mahmoudi M, Simchi A, Milani AS, Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2009; 336: 510-8.
- 25- Hilger I, Fruhauf S, Linss W, et al. Cytotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells. *J Magn Magn Mater*. 2003; 261: 7-12.
- 26- Gupta AK, Curtis ASG. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci-Mater Med*. 2004; 15: 493-6.
- 27- Mahmoudi M, Simchi A, Imani M. Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2009; 113: 9573-80.
- 28- Ghasemi F. Determination of protein absorption profile at the surface of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles using gel electrophoresis. Sharif University; 2012.
- 29- Freshney RI. Culture of animal cell a manual of basic technique. UK, John Wiley and Sons; 2005.
- 30- Mahmoudi M, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Häfeli UO, Stroeve P. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 75: 300-309.
- 31- Mahmoudi M, Imani M, Milani AS, Stroeve F. An in vitro study of bare and poly (ethyleneglycol) -co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*. 2009; 20.
- 32- Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, et al. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev*. 2011; 111: 5610-37.
- 33- Kaliyamurthi S, Thiruganasambandam R, Thangavel B. Toxicity study of silver nanoparticles synthesized from suaeda monoica on Hep-2 Cell Line. *Avicenna J Med biotech*. 2012; 4: 35-9.
- 34- Huang DM, Hsiao JK, Chen YC, et al. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2009; 30: 3645-51.
- 35- 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*. 2011.
- 36- Ghosh Chaudhuri R, Paria S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem Rev*. 2012; 112: 2373-433.
- 37- Andre Nel TX, Lutz Mädler, Ning Li. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006; 311: 622-7.
- 38- Colvin VL. The potential environmental

- impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 1166-70.
- 39- Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev.* 2013; 113: 1904-2074.
- 40- Gupta AK, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2005; 26: 1565-73.
- 41- Vangara K K L, Palakurthi S. Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of SN-38 to ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33: 2425-34.
- 42- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009; 3: 279-90.
- 43- Seo JH, Moon HS, Kim IY, 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: 621-6.

The Effect of Urea and Polyethylene Glycol Coated Iron Oxide Nanorods on Viability of Mouse Fibroblasts

Ghasempour S¹, Shokrgozar MA², Ghasempour R³, Jafari MR¹, Alipour M¹

¹Dept. of Physiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

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

³Dept. of Renewable Energy of Environment Engineering, Faculty of New Sciences of Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Alipour M, Dept. of Physiology & Pharmacology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: alipourmohsen@yahoo.com

Received: 9 Jun 2013 **Accepted:** 21 Aug 2013

Background and Objective: Currently, as an important trace element, is increasingly used in drug delivery, hyperthermia and diagnosis and treatment of cancer. The main objective of this study was to determine the cytotoxicity effects of nanostructure iron oxide and to implement the findings for its safe applications.

Materials and Methods: Urea coated iron oxide nanorods were modified with fetal bovine serum. Toxicity at doses of 100 and 400µg/ml in modified nanorods vs. non-modified nanorods was tested via (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Toxicity of Polyethylene glycol (PEG) coated iron oxide nanorods with identical doses were compared with Urea coated iron oxide nanorods by MTT assay. All the procedures were carried out on L929 cell lines for periods of 24 and 48 h.

Results: Cells on exposure to modified nanorods had more viability than non-modified ones at all doses and all the time points. PEG coated in comparison to urea coated nanorods exhibited a higher cell death at all doses and all time points.

Conclusion: Based on the obtained results, unmodified nanorods in comparison to modified ones demonstrated more toxicity which appears to stem from formation of a protein ring called Hard Corona around these nanorods in a protein contained media. Protein rings are not formed in the modified nanorods. Meanwhile, the reduction of apoptosis in urea coated nanorods as compared with PEG, verifies that the type of coating depending on size is effective on cellular toxicity.

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