

طراحی، ساخت، مشخصه‌یابی و ارزیابی زیستی نانوذرات اکسید آهن پوشش داده شده با

پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول

عاطفه زارع‌پور^۱، محمد رفیعی نیا^۲، علی ضرابی^۱ و حسین صالحی^{۳*}^۱ اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه بیوتکنولوژی^۲ اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیوسنسور^۳ اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۱

چکیده

ساخت نانوسامانه‌های هدفمند انتقال دارو از یک طرف امکان دسترسی زیستی به دارو را بهبود بخشیده و از طرف دیگر اثرات جانبی زیان‌بار آن را بر سایر نقاط بدن به حداقل ممکن رسانده است. از جمله این 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 ممتاز این نانوذرات همراه با قابلیت هدفمند کردن آنها از طریق میدان مغناطیسی خارجی سبب جلب توجه بسیاری از محققین به آنها شده است. پوشش‌دهی سطح نانوذرات توسط پلیمرهای زیست‌سازگار سبب بهبود خواص زیستی آنها می‌شود. در این زمینه می‌توان به پلیمرهای پرشاخه اشاره کرد که با دارا بودن تعداد زیادی گروه عاملی سطحی می‌توانند به صورت هدفمند داروها را منتقل کنند. هدف از این پژوهش ساخت نانوذرات اکسید آهن، پوشش‌دهی آن توسط پلیمر پرشاخه پلی-گلیسرول و مقایسه زیست‌سازگاری نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش است. در ابتدا نانوذرات با استفاده از روش تجزیه حرارتی ساخته شده و سپس توسط روش حلقه‌گشا پوشش‌دهی شد. در انتها به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری از آزمون سمیت سلولی (MTT assay) استفاده شد. نتایج مربوط به بررسی و مشخصه‌یابی نانوذرات به خوبی نشان‌دهنده‌ی ساخت نانوذرات با قطر متوسط ۱۱ نانومتر و پوشش‌دهی موفق آنها توسط پلیمر پرشاخه بود. به علاوه بررسیهای مربوط به زیست‌سازگاری سلولی نشان داد که نمونه‌های بدون پوشش از غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ به بالا دارای سمیت سلولی بودند در حالی که نمونه‌های پوشش‌دار فاقد این اثر سمیت بود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات اکسید آهن، پلیمرهای زیست‌سازگار، آزمون سمیت سلولی.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۱۳۷۹۲۲۴۴۳، پست الکترونیکی: ho_salehi@med.mui.ac.ir

مقدمه

کاهش اندازه سبب تغییر در خصوصیات ماده شده و خواص جدید و بعضاً بهبود یافته‌ای را به آن می‌بخشد (۷، ۹، ۱۶، ۲۶ و ۲۸).

در چند سال اخیر استفاده از نانوذرات در زمینه پزشکی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. اندازه بسیار کوچک این ذرات به آنها اجازه می‌دهد که

با وجودی که هنوز چند دهه بیشتر از ظهور علم نانو در جهان نمی‌گذرد اما خصوصیات منحصر به فرد آن سبب کاربرد گسترده آن در زمینه‌های مختلف علم، از برق و مکانیک گرفته تا زیست‌شناسی و پزشکی شده است. نانومواد به موادی اطلاق می‌شود که حداقل در یک بعد دارای اندازه نانومتری - بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر- باشند. این

کلوئیدی وابسته به شکل ذرات، اندازه آنها، بار سطحی و ساختار شیمیایی سطح این ذرات است (۳۵).

به منظور افزایش زیست‌سازگاری نانوذرات می‌توان از پوشش‌دهی آنها توسط پلیمرهای زیست‌سازگار استفاده کرد. این پوشش‌دهی 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 (۲۷). در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به چیتوسان، دکستران، پلی اتیلن اکسید، پلی وینیل الکل، پلی اتیلن گلیکول و ... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند (۴، ۲۰، ۲۲، ۳۷ و ۳۹).

پلیمر جدیدی که اخیراً مورد توجه بسیار واقع شده پلی-گلیسرول می‌باشد. این پلیمر زیر مجموعه‌ای از پلیمرهای پلی‌اتر با زیست‌سازگاری بسیار بالا می‌باشد که از پلیمریزاسیون حلقه گشای واحدهای مونومری گلایسیدول ایجاد می‌شود. زیست‌سازگاری بالای آن در مقایسه با پلیمرهای قبلی به همراه خصوصیات دیگری مانند پایداری حرارتی بالا، ویسکوزیته کم و عدم جذب پروتئین بر سطح آن باعث شده تا این پلیمر به عنوان یک کاندید بسیار مناسب جهت کاربردهای درون‌تنی معرفی شود (۱۷، ۳۱ و ۳۸).

پوشش‌دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول نه تنها سبب بهبود زیست‌سازگاری آنها می‌شود بلکه این پلیمر می‌تواند به عنوان محلی جهت بارگذاری دارو عمل کند. ساختار این پلیمر به گونه‌ایست 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 می‌تواند محلی

بتواند به راحتی وارد بافتها، سلولها و حتی اندامکهای داخل سلولی شوند و به این ترتیب می‌توان از آنها برای تصویربرداری داخل سلولی و یا انتقال داروها و عوامل درمانی به داخل سلولها استفاده کرد (۱۳).

نانوذرات مغناطیسی از جمله این نانوذرات است که به علت خصوصیات ویژه خود کاربرد گسترده‌ای را در علم پزشکی پیدا کرده است. از فلزات مختلفی به منظور ساخت این نانوذرات استفاده شده است که به عنوان مثال می‌توان به آهن، کبالت و نیکل اشاره کرد. از میان این فلزات نانوذرات مغناطیسی بر پایه اکسید آهن، شامل مگنتیت (Fe_3O_4) و ماگنیت ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)، بیشترین کاربرد را دارند که از جمله کاربردهای آنها می‌توان به عامل بهبود دهنده تضاد در تصویربرداری مغناطیسی، دارورسانی هدفمند، گرمادرمانی، ترمیم بافت و ... اشاره کرد (۱۰، ۲۳، ۳۰، ۳۴، ۳۶ و ۴۱).

نکته قابل توجه، بررسی زیست‌سازگاری این نانوذرات به منظور کاربرد آن در داخل بدن است. پژوهشهای متعددی به منظور بررسی زیست‌سازگاری این نانوذرات انجام شده که نتایج متفاوت و بعضاً متضادی را در برداشته است (۳، ۱۴، ۱۹، ۲۱، ۲۳ و ۴۰).

زمانی که ابعاد این نانوذرات از محدوده خاصی کوچک‌تر شود خاصیت مغناطیسی آنها به خاصیت سوپر پارامغناطیس تغییر می‌کند. مواد سوپر پارامغناطیس موادی هستند که دارای تک حوضه مغناطیسی بوده و تمام اسپینهای اتمی آنها به‌طور یکنواخت در جهت یکسان مغناطیسی می‌شوند. در مورد این نانوذرات به محض تغییر در جهت میدان خارجی تمامی حوضه‌های داخلی نیز تغییر جهت می‌دهند (۴۴).

کاربرد نانوذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن در زمینه زیست‌شناسی و پزشکی، به ویژه در دو حوزه تشخیص و درمان، نیازمند پایداری آنها در محیطهای آبی و همین‌طور pH و شرایط فیزیولوژیک طبیعی بدن می‌باشد. این پایداری

برای اتصال عوامل ردیاب یا عوامل هدفمندکننده عمل کند (۶، ۳۲ و ۳۳).

نانوذرات توسط آهن‌ربا رسوب داده شدند. در نهایت رسوب حاصل توسط آون خلا خشک گردید.

هدف از این پژوهش در ابتدا ساخت نانوذرات اکسید آهن و پوشش‌دهی آن توسط پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول می‌باشد. سپس به منظور بررسی اثر پوشش بر زیست-سازگاری نانوذرات ساخته شده از آزمون MTT استفاده شد. بدین منظور از دو رده سلولی MG-63 و MCF-7 استفاده گردید و اثر نانوذرات در دو حالت پوشش‌دار و بدون پوشش در غلظت‌های مختلف بر روی میزان مرگ سلولی این دو رده مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت پوشش‌دهی نانوذرات ساخته شده از روش پلیمریزاسیون حلقه گشا استفاده شد. برای این منظور مقدار ۳۰ میلی‌گرم از نانوذرات ساخته شده با ۴ میلی‌لیتر مونومر گلیسیدول مخلوط شده و به مدت ۲۰ ساعت تحت دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

مواد و روشها

مواد: جهت ساخت نانوذرات اکسید آهن از آهن (III) استیل استنات (Merck-803912)، تری اتیلن گلیکول (Merck-808245) و اتیل استات (Merck-109623) استفاده شد. جهت پوشش‌دهی نانوذرات از مونومر گلیسیدول (Aldrich-G5809) استفاده شد. جهت انجام آزمون کشت سلولی از رده‌های سلولی MCF-7 و MG-63 (انستیتو پاستور ایران)، بافر نمکی فسفات (CMG)، محیط کشت DMEM (BioIdia)، آنزیم تریپسین (BioIdia-BI1033)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (BioIdia-BI1036)، سرم جنین گاوی (Gibco-106-10270) استفاده شد.

ساخت نانوذرات اکسید آهن و پوشش‌دهی آن توسط پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول: به منظور ساخت نانوذرات اکسید آهن از روش تجزیه حرارتی پیش ماده آهن در حضور حلال تری اتیلن گلیکول استفاده شد (۴۳). بدین منظور ۲ میلی‌مول از آهن (III) استیل استنات با ۳۰ میلی‌لیتر تری اتیلن گلیکول مخلوط شده و در اثر حرارت-دهی تا دمای رفلاکس تری اتیلن گلیکول نانوذرات اکسید آهن ساخته شد. پس از خنک‌سازی محلول حاصل تا دمای اتاق ۲۰ میلی‌لیتر اتیل استات به محلول اضافه شده و

تصویربرداری نیروی اتمی: از میکروسکوپ نیروی اتمی (مدل Dual Scope™ C-26 controller- DME Company، ساخت کشور دانمارک) جهت بررسی مورفولوژی و زبری سطح نانوذرات ساخته شده استفاده شد. بدین منظور محلول رقیقی از نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش در الکل تهیه شده و یک قطره از هر محلول بر روی لام قرار داده شد. پس از تبخیر الکل و تثبیت نانوذرات بر روی لام تصاویر آنها توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از مد تماسی میکروسکوپ و تیپ pyramid با ارتفاع ۱۵-۱۰ میکرون استفاده شده و تصاویر حاصل از آن در ابعاد $1\mu\text{m} * 1\mu\text{m}$ تهیه گردید.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی: از میکروسکوپ الکترونی عبوری (مدل JEM-2100F، ساخت کشور ژاپن و تحت ولتاژ ۲۰۰kV) به منظور تعیین اندازه نانوذرات ساخته شده استفاده شد.

آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز: از دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (مدل JACS0 FT/IR 6300 ساخت کشور ژاپن) به منظور بررسی ساخت نانوذرات و پوشش‌دهی موفق آنها توسط پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول استفاده گردید. بدین منظور مقدار بسیار کم از نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش، به طور جداگانه، با نمک KBr، با نسبت ۵: ۹۵ درصد، مخلوط گردیده و به شکل قرص درآمد. سپس قرص حاصل توسط دستگاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک افزوده شده و مقدار ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول MTT به آن اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محلول روی سلولها خارج شده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به چاهکهای مربوطه اضافه شد، سپس ظرف کشت به مدت یک ساعت دیگر داخل انکوباتور قرار گرفت. در انتها جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰nm خوانده شده و درصد زنده بودن سلولها با استفاده از فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت:

۱۰۰*(میانگین جذب نمونه شاهد/ میانگین جذب خوانده شده برای هر غلظت) = درصد زنده بودن سلولها
 آزمون MTT در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلولها انجام گرفت.

بررسی آماری: از نرم افزار SPSS (Version 21) برای تحلیل آماری نتایج استفاده گردید. نتایج به صورت (انحراف معیار \pm مقدار میانگین) برای هر داده بررسی شده و معنی دار بودن نتایج براساس مقدار $p < 0.05$ گزارش شد. برای بررسی آماری از آنالیز پارامتری واریانس [ANOVA (Tukey)] استفاده شد.

نتایج

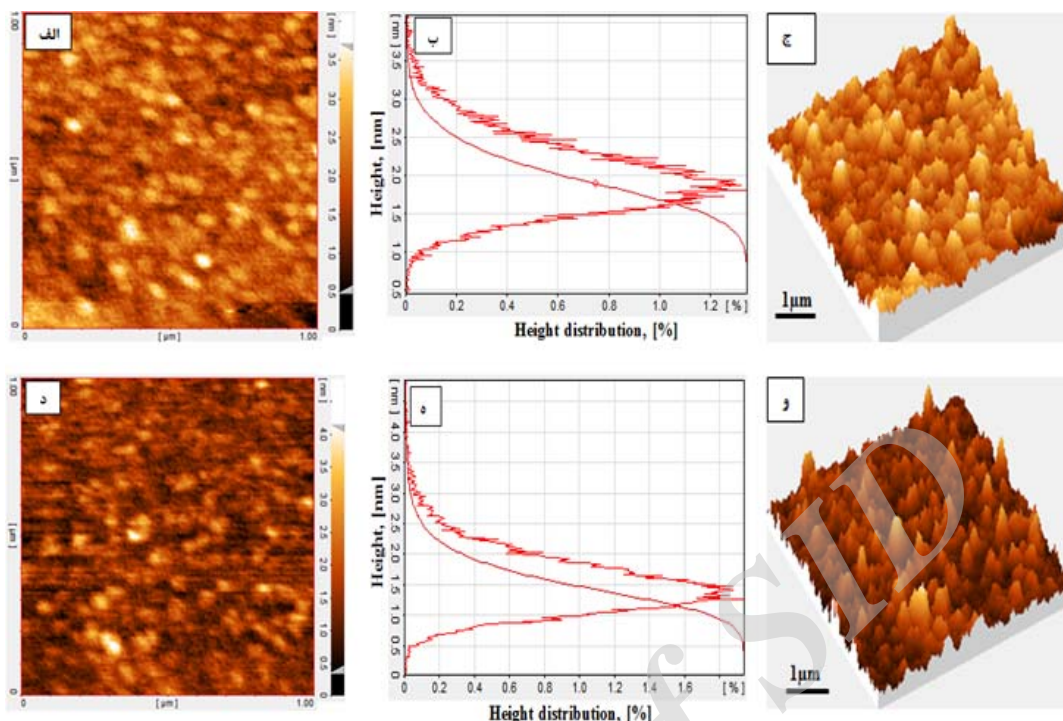
تصویربرداری میکروسکوپ AFM: شکل ۱ نتایج مربوط به تصویربرداری دوبعدی و سه بعدی میکروسکوپ AFM را نشان می‌دهد. تصاویر نشان‌دهنده اثر پوشش‌دهی بر جلوگیری از خاصیت خود تجمعی نانوذرات اکسید آهن می‌باشد. به علاوه زبری سطح در حالت بدون پوشش ۴۹۹pm بود که با انجام پوشش‌دهی مقدار آن به ۵۱۴pm افزایش یافت. افزایش مقدار زبری سطح در نمونه پوشش-دار تأیید کننده پوشش‌دهی موفق آن می‌باشد.

آزمایشهای سلولی: «کشت سلول»: به منظور بررسی و مقایسه زیست‌سازگاری نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش از دو رده سلولی MG-63 و MCF-7 استفاده شد. بدین منظور ابتدا سلولها از فریز خارج شده و سپس درون فلاسک حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد تا سلولها به کف ظرف کشت متصل شوند. سلولها مرتباً واریسی شده و هر چهار روز یک بار پاساژ داده شدند تا برای انجام آزمایش آماده شوند.

پس از چندین مرحله پاساژ سلولی، سلولها به ظروف ۹۶ چاهکی جهت انجام آزمایش سمیت سلولی منتقل شدند. بدین منظور تعداد ۵۰۰۰ سلول در داخل هر چاهک که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت می‌باشد کاشته شده و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد.

بررسی سمیت سلولی: از هر دو نمونه پوشش‌دار و بدون پوشش، غلظتهای مختلفی (۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شده و پس از ۲۴ ساعت بر نمونه‌های سلولی داخل چاهکها اثر داده شد. تعداد سه چاهک به هر نمونه اختصاص داده شد. سلولها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت دیگر داخل انکوباتور قرار داده شدند. گروه شاهد تحت تأثیر هیچ کدام از نمونه‌ها قرار نگرفت.

به منظور بررسی سمیت سلولی از آزمون MTT استفاده شد. این روش بر اساس احیای محلول زرد رنگ MTT به یک ترکیب نامحلول بنفش رنگ به نام فورمازان می‌باشد که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهای زنده انجام می‌گیرد (۱ و ۲). جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر، مقدار ۵ میلی-گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر از PBS، ۰/۱ M حل شد. پس از اتمام اثردهی نانوذرات بر سلولها، محیط کشت داخل چاهکها تخلیه شده و چاهکها دو بار توسط PBS



شکل ۱ - نتایج مربوط به تصویربرداری AFM، نانوذرات اکسید آهن (الف) تصویر دو بعدی، (ب) نمودار Height Histogram، (ج) تصویر سه بعدی، نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دهی شده (د) تصویر دو بعدی، (ه) نمودار Height Histogram، (و) تصویر سه بعدی.

به ترتیب مربوط به ارتعاشات C-H و C-O است که تأییدکننده اتصال تعدادی از مولکولهای تری اتیلن گلیکول بر روی سطح نانوذرات Fe_3O_4 است. پیک گسترده در محدوده $2500-3600 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات پیوند هیدروژنی است که بیانکننده حضور گروه O-H در سطح نانوذرات سنتز شده می‌باشد (۵ و ۲۴).

مقایسه نمودار ذرات پوشش‌دار با نمودار مربوط به نانوذرات بدون پوشش بیانکننده افزایش قابل توجهی در پیکهای ارتعاشی در محدوده نواحی $2900, 3400 \text{ cm}^{-1}$ و 1100 cm^{-1} است که به ترتیب مربوط به باندهای O-H، C-H و C-O-C است. این نتیجه به خوبی تأییدکننده پوشش‌دهی موفق نانوذرات توسط پلیمر پرشاخه می‌باشد (۲۴، ۳۸ و ۴۳).

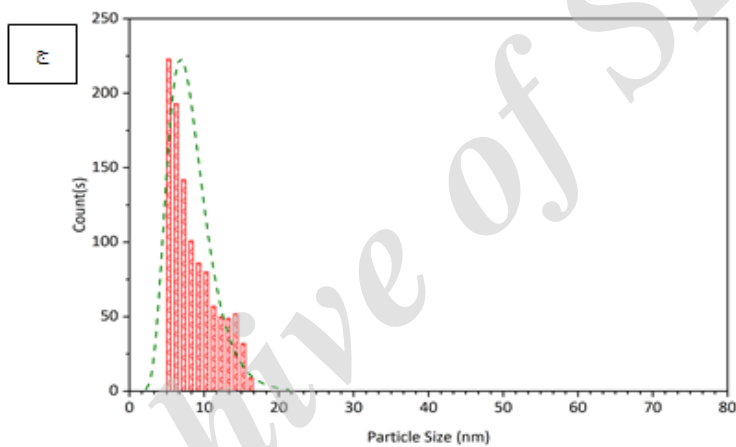
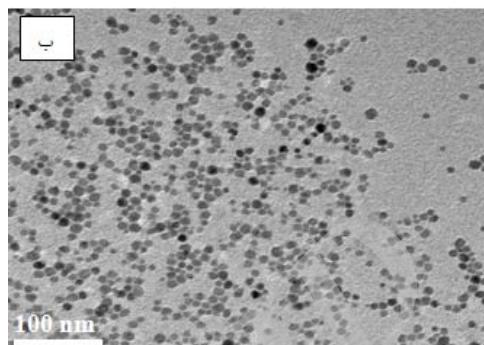
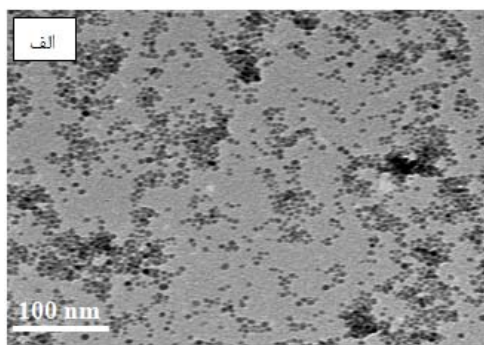
آزمون MTT: بررسی سمیت سلولی اولین گام در بررسی زیست‌سازگاری یک ماده می‌باشد زیرا که روشی آسان و ارزان در جهت فهم سمیت آن ماده است. به علاوه در

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی TEM: شکل ۲ نتایج مربوط به تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش را نشان می‌دهد. تصاویر گرفته شده نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای توزیع همگون اندازه ذرات با قطر متوسط $11/5$ نانومتر بود. همچنین مشخص شد که نانوذرات بدون پوشش خاصیت تجمع‌یافتگی داشته و به صورت خوشه‌ای در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، این در حالی بود که نانوذرات پوشش‌دار به صورت کاملاً مشخصی از یکدیگر مجزا هستند و در نتیجه اندازه یکنواخت‌تری را نسبت به نمونه بدون پوشش داشته باشند.

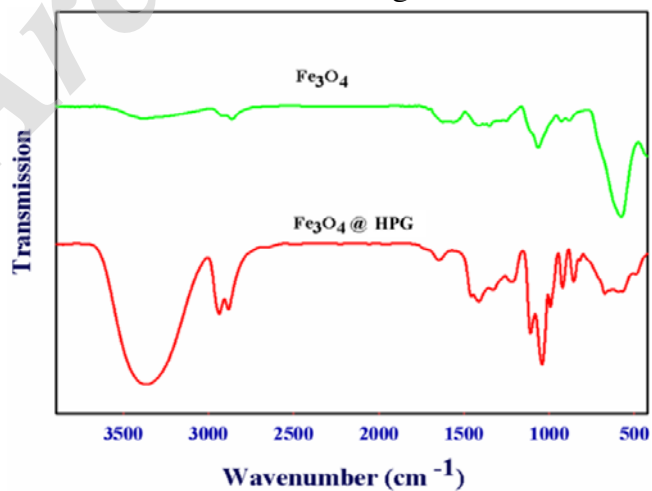
آزمون FTIR: شکل ۳ نتایج مربوط به آنالیز FTIR را برای نانوذرات بدون پوشش و پوشش‌دار نشان می‌دهد. پیک قوی در ناحیه 577 cm^{-1} در نمودار مربوط به نانوذرات Fe_3O_4 نشانگر گروه Fe-O بوده که بیانکننده این است که Fe عنصر اصلی سازنده نانوذرات است. وجود پیکهای مشخص در بازه $2809-2925 \text{ cm}^{-1}$ و $1050-1116 \text{ cm}^{-1}$

تغییر شرایط محیطی حساس بوده و این تغییرات می‌تواند نتایج مثبت کاذب در افزایش سمیت را نشان دهد (۱۲) و (۱۸).

مقایسه با آزمونهای درون‌تنی، این روش بسیار ساده‌تر، قابل کنترل و فاقد موانع اخلاقی است. آنچه در اینجا مهم است کنترل شرایط محیطی است زیرا سلولها به شدت به



شکل ۲- نتایج مربوط به تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی از (الف) نانوذرات بدون پوشش، (ب) نانوذرات پوشش داده شده و (ج) نمودار توزیع اندازه نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش.



شکل ۳- نتایج مربوط به آنالیز FTIR از نانوذرات Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{HPG}$

رده سلولی MCF-7: نتایج حاصل از تست MTT بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۵ آمده است.

همان‌طور که در تصویر مشخص است در اینجا نیز نانوذرات بدون پوشش در غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ سبب کاهش در میزان زنده بودن سلولها شده‌اند اگرچه مقدار کاهش مشاهده شده نسبت به رده قبلی کمتر است. نتایج مربوط به نمونه پوشش‌دار نشان‌دهنده اثر پوشش پلیمری بر کاهش مرگ سلولی و در نتیجه کاهش سمیت ناشی از نانوذرات اکسید آهن به ویژه در غلظتهای بالا می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که گفته شد در این پژوهش از روش تجزیه حرارتی به منظور ساخت نانوذرات آهن استفاده شد. از جمله مزایای این روش نسبت به سایر روشهای مرسوم می‌توان به این موارد اشاره کرد: استفاده از یک پیش‌ماده آهن و عدم نیاز به عوامل احیاء کننده و سورفاکتانت، بهبود خواص مغناطیسی و کریستالی نانوذرات ساخته شده به علت دمای بالا در حین فرآیند ساخت و در نهایت توزیع اندازه یکنواخت نانوذرات ساخته شده، که مجموعه این عوامل سبب انتخاب این روش جهت ساخت نانوذرات به منظور کاربردهای درون‌تنی است (۵ و ۲۵). نانوذرات ساخته شده با استفاده از روش پلیمریزاسیون حلقه گشای مونومر گلیسیدول پوشش‌دهی شد. اندازه نانوذرات ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نیروی اتمی تعیین شده و پوشش‌دهی آن توسط پلیمر پلی-گلیسرول تأیید شد. سپس به منظور بررسی اثر پوشش‌دهی بر زیست‌سازگاری نانوذرات اکسید آهن از آزمون سمیت سلولی استفاده شد. بدین منظور دو رده سلولی MG-63 و MCF-7 مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بیان‌کننده تأثیر مثبت پوشش‌دهی بر افزایش میزان زنده بودن سلولها به ویژه در غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد.

در میان روشهای مختلفی که به منظور بررسی سمیت سلولی به کار می‌روند آزمون MTT به علت سادگی و در دسترس بودن از جمله فراوان‌ترین روشهای مورد استفاده می‌باشد که براساس احیای محلول MTT به ترکیبی نامحلول به نام فورمازان توسط میتوکندری سلولهای زنده عمل می‌کند (۲۹ و ۴۲).

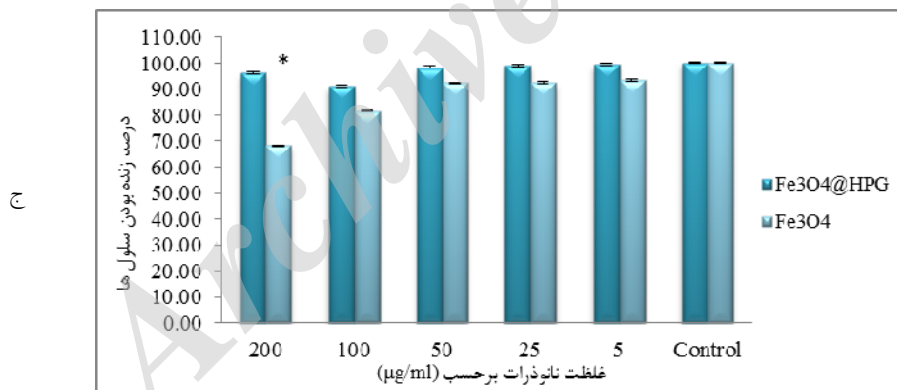
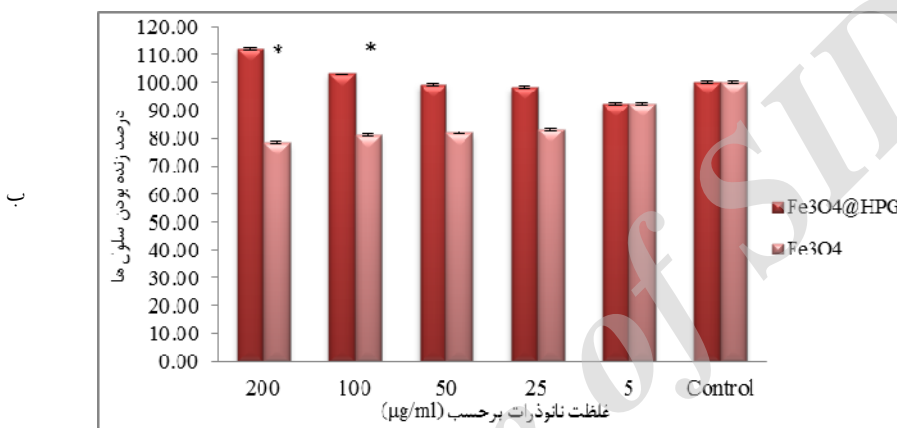
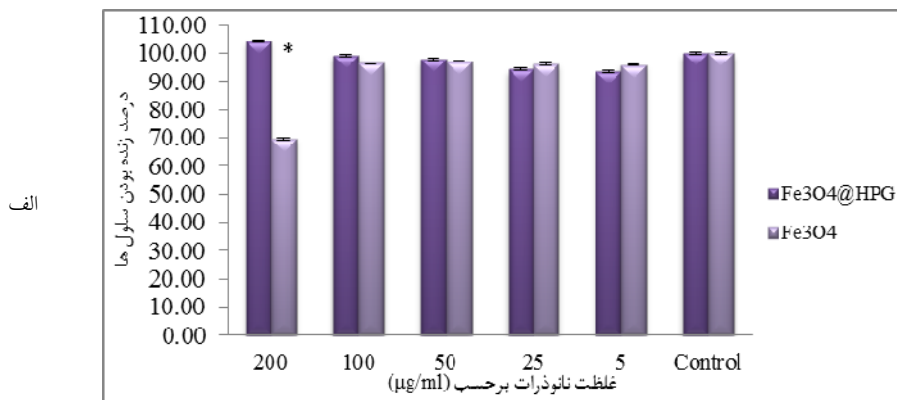
در این قسمت نتایج مربوط به آزمون MTT نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش بر روی دو رده سلولی MG-63 و MCF-7 بیان می‌شود. با توجه به کاربرد این نانوذرات در درمان بیماری سرطان از دو رده سلولی گفته شده استفاده شد.

رده سلولی MG-63: نتایج حاصل از بررسی زیست-سازگاری نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش در شکل ۴ آورده شده است.

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که نانوذرات بدون پوشش در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ دارای اثر سمیت بر این رده سلولی بوده و سبب کاهش حدود ۳۰ درصدی در میزان زنده بودن این سلولها شده است. به علاوه همان‌طور که در تصاویر مشخص شده با کاهش غلظت نانوذرات اثر سمیت نیز کاهش یافته است.

این امر در حالی بوده که نمونه پوشش داده شده توسط پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول فاقد این اثر سمیت بوده و حتی در روز اول و دوم به عنوان یک عامل تقویتی در رشد سلولها عمل کرده است.

نتایج حاصل از این داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ANOVA Ver.22) مورد تجزیه و تحلیل واقع شده و مشاهده شد که نتایج مربوط به غلظت مزبور ($200 \mu\text{g/ml}$) نسبت به نمونه کنترل (که فقط شامل نمونه سلولی به تنهایی بوده) معنی‌دار بوده که این خود تأیید کننده نتیجه گرفته شده از نمودارها است.

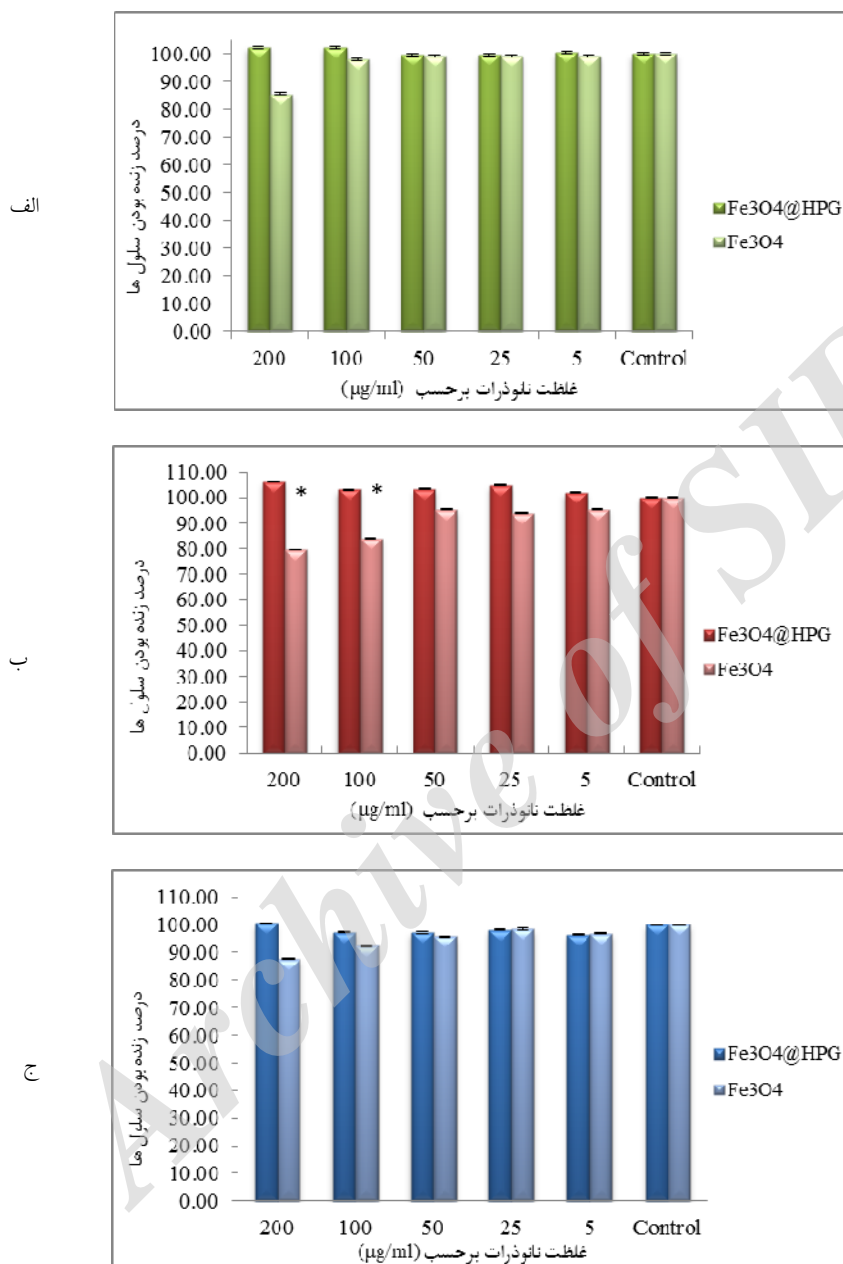


شکل ۴- نتایج مربوط به آزمون سمیت سلولی نانوذرات پوشش‌دار و بدون پوشش بر روی رده سلولی MG-63 در سه بازه زمانی الف (۲۴، ب) ۴۸ و ج) ۷۲ ساعت ($p < 0.05$ → *).

مطالعات ثابت کرده‌اند که نانوذرات اکسید آهن از غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ به بالا دارای اثر سمیت بر رده‌های سلولی مختلف می‌باشند (۳، ۱۴ و ۱۹). مهم‌ترین مکانیسمی که می‌توان برای وجود اثر سمیت برای این نانوذرات در نظر گرفت تولید رادیکال آزاد اکسیژن است که زمانی که غلظت آن از مقدار مشخص و کنترل شده داخل سلول

مطالعات مختلفی به منظور بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن بر روی سلولهای مختلف انجام شده و نتایج بیان‌کننده تأثیر غلظت نانوذرات و همین‌طور رده سلولی به‌کار برده شده بر مرگ سلولی است به گونه‌ای که با افزایش غلظت نانوذرات سمیت سلولی آنها نیز افزایش می‌یابد البته این اثر سمیت در همه سلولها مشاهده نمی‌شود (۲۸). بیشتر

بیشتر شود سبب بروز تأثیرات منفی بر عملکرد اندامکهای داخل سلول، مانند میتوکندری، پروتئینها و حتی DNA خواهد شد که در نهایت به مرگ سلولی منجر می شود (۸ و ۱۵).



شکل ۵- نتایج مربوط به آزمون سمیت سلولی نانوذرات پوشش دار و بدون پوشش بر روی رده سلولی MCF-7 در سه بازه زمانی (آ) ۲۴، (ب) ۴۸ و (ج) ۷۲ ساعت ($p < 0.05$ → *).

ویژه مانند آبدوستی بالا، زیست سازگاری مناسب، مقاومت حرارتی و ... می تواند جایگزین مناسبی برای انواع مشابه خود مانند PEG باشد (۱۱).

مطالعات مختلفی بر روی پوشش دهی نانوذرات انجام گرفته و از پلیمرهای مختلفی بدین منظور استفاده شده است. یکی از پلیمرهایی که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته پلی گلیسرول می باشد که به علت دارا بودن خواص

در این پژوهش از پلیمر پرشاخه پلی‌گلیسرول به منظور پوشش‌دهی نانوذرات آهن استفاده شد. نتایج حاصل اثبات کرد که پوشش‌دهی این نانوذرات توسط این پلیمر نه تنها مانع از تأثیرات منفی نانوذرات بر سلولها شده بلکه سبب بهبود میزان زنده بودن آنها نیز خواهد شد، که با نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی تطابق دارد.

در پژوهشی که توسط ضرابی و همکاران به منظور بررسی زیست‌سازگاری این پلیمر انجام شد نشان داده شد که این پلیمر در غلظت‌های بالا نیز زیست‌سازگار بوده و حتی اثرات مثبتی در افزایش میزان زنده بودن سلولها داشته است. هرچند هنوز مکانیسم اصلی مؤثر در این افزایش مشخص نشده اما این گروه معتقد بودند که علت می‌تواند ناشی از مصرف الیگوساکاریدهای ناشی از ساختار پلیمر توسط سلولها به عنوان یک منبع غذایی باشد (۴۲).

منابع

- محمدپور ر، صفریان ش، نوروزی س، رزاقان ع، ۱۳۹۲، بررسی اثرات سلولی آنتی‌باکتریهای سولفات‌تازول و سولفاستامید بر روی سلولهای سرطان سینه (رده سلولی T-47D)، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۲۶، شماره ۴، ۵۴۹-۵۳۲.
- محمدپور ر، صفریان ش، نوروزی س، رزاقان ع، ۱۳۹۲، بررسی اثرات سلولی آنتی‌باکتریهای سولفات‌تازول و سولفاستامید بر روی سلولهای سرطان سینه (رده سلولی T-47D)، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۲۶، شماره ۴، ۵۴۹-۵۳۲.
- 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):075102-075111.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS, 2003, Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro*, *Biomaterials*, 24(25):4551-4557.
- Cai W, Wan J, 2007, Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols *Journal of colloid and interface, science*, 305(2):366-370.
- Calderón M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R, 2010, Dendritic polyglycerols for biomedical applications, *Advanced Materials*, 22(2):190-218.
- Calderón M, Quadir MA, Strumia M, Haag R, 2010, Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers, *Biochimie*, 92(9):1242-1251.
- 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.
- Choi JY, Lee SH, Na HB, An K, Hyeon T, Seo TS, 2010, *In vitro* cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines, *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(1):21-30.
- Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J, 2010, Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering, *Pharmacological Research*, 62(2):144-149.
- Deng Y, Saucier-Sawyer JK, Hoimes CJ, Zhang J, Seo Y-E, Andrejcsk JW, Saltzman WM, 2014, The effect of hyperbranched polyglycerol coatings on drug delivery using degradable polymer nanoparticles, *Biomaterials*, 35(24):6595-6602.
- Edwards V, Markovic E, Matison J, Young F, 2008, Development of an *in vitro* reproductive screening assay for novel pharmaceutical compounds, *Biotechnology and applied biochemistry*, 51(2):63-71.
- Fadeel B, Garcia-Bennett AE, 2010, Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 62(3):362-374.
- Gupta AK, Gupta M, 2005, Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles, *Biomaterials*, 26(13):1565-1573.
- Huang G, Chen H, Dong Y, Luo X, Yu H, Moore Z, et al., 2013, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy, *Theranostics*, 3(2):116-126.

16. Huang Q, Yu H, Ru Q, 2010, Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology, *Journal of Food Science*, 75(1):R50-R57.
17. Kainthan RK, Brooks DE, 2007, *In vivo* biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols, *Biomaterials*, 28(32):4779-4787.
18. Lewinski N, Colvin V, Drezek R, 2008, Cytotoxicity of nanoparticles, *Small*, 4(1):26-49.
19. Liu S-Y, Long L, Yuan Z, Yin L-P, Liu R, 2009, Effect and intracellular uptake of pure magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in the cells and organs of lung and liver, *Chinese Med J*, 122(15):1821-1825.
20. Liu Y, Kong M, Feng C, Yang KK, Li Y, Su J, et al., 2013, Biocompatibility, cellular uptake and biodistribution of the polymeric amphiphilic nanoparticles as oral drug carriers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:345-353.
21. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A, 2011, Assessing the *in vitro* and *in vivo* toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Chemical reviews*, 112(4):2323-2338.
22. Mahmoudi M, Shokrgozar MA, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P, et al., 2009, Multiphysics flow modeling and *in vitro* toxicity of iron oxide nanoparticles coated with poly (vinyl alcohol), *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(6):2322-2331.
23. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P, 2009, An *in vitro* study of bare and poly (ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure, *Nanotechnology*, 20(22): 225104-225112.
24. Maity D, Chandrasekharan P, Si-Shen F, Xue J-M, Ding J, 2010, Polyol-based synthesis of hydrophilic magnetite nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, 107(9):09B310-09B310-3.
25. Maity D, Kale S, Kaul-Ghanekar R, Xue J-M, Ding J, 2009, Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri (ethylene glycol), *Journal of Magnetism and magnetic Materials*, 321(19):3093-3098.
26. Markides H, Rotherham M, El Haj A, 2012, Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine, *Journal of Nanomaterials*, 2012(13):1-11.
27. Mukhopadhyay A, Joshi N, Chattopadhyay K, De G, 2011, A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome C, *ACS applied materials & interfaces*, 4(1):142-149.
28. Neethirajan S, Jayas DS, 2011, Nanotechnology for the food and bioprocessing industries, *Food and bioprocess technology*, 4(1):39-47.
29. Nikzad S, Hashemi B, Hassan Z-M, Mozdarani H, 2013, The cell survival of F10B16 melanoma and 4T1 breast adenocarcinoma irradiated to gamma radiation using the MTT assay based on two different calculation methods, *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 3(2):29-36.
30. Polyak B, Fishbein I, Chorny M, Alferiev I, Williams D, Yellen B, et al., 2008, High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2):698-703.
31. Saatchi K, Gelder N, Gershkovich P, Sivak O, Wasan KM, Kainthan RK, et al., 2012, Long-circulating non-toxic blood pool imaging agent based on hyperbranched polyglycerols, *International journal of pharmaceutics*, 422(1):418-427.
32. Steinhilber D, Seiffert S, Heyman JA, Paulus F, Weitz DA, Haag R, 2011, Hyperbranched polyglycerols on the nanometer and micrometer scale, *Biomaterials*, 32(5):1311-1316.
33. Steinhilber D, Sisson AL, Mangoldt D, Welker P, Licha K, Haag R, 2010, Synthesis, reductive cleavage, and cellular interaction studies of biodegradable, polyglycerol nanogels, *Advanced Functional Materials*, 20(23):4133-4138.
34. Sun C, Lee JS, Zhang M, 2008, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 60(11):1252-1265.
35. Tartaj P, Serna CJ, 2003, Synthesis of monodisperse superparamagnetic Fe/silica nanospherical composites, *Journal of the American Chemical Society*, 125(51):15754-15755.
36. Turaga KK, Kvols LK, 2011, Recent progress in the understanding, diagnosis, and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2):113-132.
37. Veisheh O, Gunn JW, Zhang M, 2010, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Advanced drug delivery reviews*, 62(3):284-304.

38. Wang L, Neoh K, Kang E, Shuter B, Wang SC, 2009, Superparamagnetic hyperbranched polyglycerol-grafted Fe₃O₄ nanoparticles as a novel magnetic resonance imaging contrast agent: an *in vitro* assessment, *Advanced Functional Materials*, 19(16):2615-2622.
39. Weinhart M, Becherer T, Schnurbusch N, Schwibbert K, Kunte HJ, Haag R, 2011, Linear and hyperbranched polyglycerol derivatives as excellent bioinert glass coating materials, *Advanced Engineering Materials*, 13(12):B501-B510.
40. Wu J, Ding T, Sun J, 2013, Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus, *Neurotoxicology*, 34(1):243-253.
41. Yuanbi Z, Zumin Q, Huang J, 2008, Preparation and analysis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(3):451-455.
42. Zarrabi A, Shokrgozar MA, Vossoughi M, Farokhi M, 2014, *In vitro* biocompatibility evaluations of hyperbranched polyglycerol hybrid nanostructure as a candidate for nanomedicine applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2):499-506.
43. Zhao L, Chano T, Morikawa S, Saito Y, Shiino A, Shimizu S, et al., 2012, Hyperbranched polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization, functionalization, size separation, magnetic properties, and biological applications, *Advanced Functional Materials*, 22(24):5107-5117.
44. 2012, *Magnetic Force Microscopy (MFM) Characterization of Superparamagnetic Nanoparticles (SPIONs)*, Waterloo, Ontario, Canada.

Design, synthesis, characterization and bioactivity evaluation of polyglycerol-grafted Fe₃O₄ nanoparticles

Zarepourer A.¹, Rafienia M.², Zarrabi A.¹ and Salehi H.³

¹Biotechnology Dept., Faculty of advanced sciences and technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

²Biosensor Research Center, Isfahan University of medical science, Isfahan, I.R. of Iran

³Anatomy Dept., Isfahan University of medical science, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The development of drug delivery nano-systems has improved the drug bioavailability while reducing their adverse side effects. Among them, iron oxide nanoparticles have gained lots of attention due to their applications as contrast agent in MRI technique as well as being targeted through an external magnetic field. The biological properties of these nanoparticles have been improved through surface modifications by different kinds of polymers. Hyperbranched polymers are of great interest due to existence of plenty of surface functional groups which could be utilized in conjugation of targeting and/or tracing agents. In this study, we have synthesized iron oxide nanoparticles using thermal decomposition method, modified its surface with hyperbranched polyglycerol through ring opening polymerization and compared its biocompatibility with naked iron oxide nanoparticles. The results confirmed the synthesis of iron oxide nanoparticles with average diameter of 11 nm coated with hyperbranched polyglycerol. The comparative biocompatibility tests revealed that naked nanoparticles show cytotoxicity when the concentration reaches above 200 µg/ml, whereas they are safe when coated with hyperbranched polyglycerol.

Key words: Iron Oxide nanoparticles, Biocompatible polymers, Cytotoxicity test.