

Cytotoxicity Assessment of Copper Nanoparticles (40nm) on the Human Umbilical Vein Endothelial Cells Viability

Sanaz Alizadeh¹, Naser Aghdami², Bagher Seyed Alipour^{3*}

1. MSc Student, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

2. Associate Professor, Department of Regenerative Biomedicine, Cell Sciences Research Center, Institute of Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Baboldar, Iran

Received: 7 Dec 2016, Accepted: 23 Jan 2017

Abstract

Background: Copper nanoparticles (Cu NPs) induced angiogenesis, has been adapted to respond the most important challenging in wound healing. But due to the toxicity of nanoparticles, the nontoxic concentrations is important. The aim of this study was to determine the concentration and size of copper nanoparticles for investigating the effect of its cytotoxicity on the endothelial cell.

Materials and Methods: In this study, we exposed Cu NPs (40nm) with concentrations of 1, 10, 100 μ M and 1, 10 mM to endothelial cells and evaluate its viability effect after 24, 48 and 72 hours, according to the MTS (Methy Thiazol Tetrazolium) assay. Its optical density was determined using an ELISA reader and then was recorded.

Results: The findings demonstrated that Cu NPs was significantly ($p < 0.05$) cytotoxic in concentration higher than 100 μ M and cell viability was significantly increased following 48 and 72 hours in all concentrations, so that, the most difference was seen in 100 μ M concentration. The IC₅₀ values of Cu NPs at incubation time 24, 48 and 72 hours were 31.44, 36.67 and 29.38 μ M.

Conclusion: The results showed that different concentration of Cu NPs in the 48 and 72 hours didn't cause any cytotoxicity effect, but it stimulated endothelial cell proliferation. Therefore, Cu NPs with dose and time dependent effect has been increased endothelial cell proliferation.

Keywords: Copper nanoparticles, Cytotoxicity, Endothelial cell, MTS assay

*Corresponding Author:

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

Email: b.alipour81@gmail.com

بررسی اثر سمیت سلولی نانوذره مس ۴۰ نانومتری بر زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال مشتق از سیاه‌رگ بندناف

ساناز علیزاده^۱، ناصر اقدمی^۲، باقر سید علیپور^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست پزشکی ترمیمی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فن‌آوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۴

چکیده

زمینه و هدف: نانوذره مس با القاء رگ‌زایی مقبولیت بالایی در پاسخ به مهم‌ترین چالش ترمیم زخم یافته است. اما با توجه به خاصیت سمی نانوذرات، ابتدا باید به غلظت غیر توکسیک از آن‌ها دست یافت. این مطالعه با هدف تعیین غلظت و اندازه مناسب نانوذره مس جهت بررسی اثر سمیت آن بر سلول‌های اندوتلیال انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نانوذره مس ۴۰ نانومتری را با غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار و ۱ و ۱۰ میلی‌مولار بر روی سلول‌های اندوتلیال اثر داده و سپس زنده‌مانی سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت را با روش متیل تیازول تترازولیوم (MTS) ارزیابی نمودیم و میزان جذب نور را با استفاده از دستگاه الیزا ریدر سنجیده و مقدار آن را ثبت کردیم.

یافته‌ها: نتایج بررسی سمیت سلولی نانوذره مس در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت در غلظت بالای ۱۰۰ میکرومولار نشان داد که نانوذره مس در این غلظت توکسیک بوده است ($p < 0.05$). در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان فعالیت زنده‌مانی سلول‌ها در تمام غلظت‌ها افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیش‌ترین تفاوت با کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). هم‌چنین میزان IC_{50} در طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳۱/۴۴، ۳۶/۶۷ و ۲۹/۳۸ میکرومولار به دست آمد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نانوذره مس در غلظت‌های مختلف و در طی بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، نه تنها سبب سمیت سلولی نشده، بلکه باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال نیز شده است. بنابراین، نانوذره مس با اثر وابسته به دوز و زمان باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال می‌شود.

واژگان کلیدی: نانو ذره مس، سمیت سلولی، سلول اندوتلیال، سنجش MTS

*نویسنده مسئول: ایران، مازندران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

Email: b.alipour81@gmail.com

مقدمه

عنصر مس به عنوان یک کاتیون بسیار موثر در فرآیند بهبود ترمیم زخم می‌باشد و عملکرد بسیاری از فاکتورهای شرکت کننده در مسیر پیام رسانی ترمیم زخم نیز وابسته به تعامل با عنصر مس بوده و نقش مهمی در مرحله تکثیر و بازسازی زخم دارد (۱). از دیگر کاربردهای عنصر مس شرکت در واکنش‌های انتقال الکترون و اتصال به مولکول‌های آلی می‌باشد که برای تنفس سلولی، تنظیم نوروترانسمیتر، سنتز کلاژن و متابولیسم مواد تغذیه‌ای ضروری است. سنتز کلاژن و الاستین در بافت پیوندی وابسته به آنزیم‌های حاوی مس از جمله لیزیل اکسیداز است (۲). آنچه امروزه به آن توجه بیش‌تری شده است نقش چشم‌گیر عنصر مس در اندازه نانو (۱-۱۰۰ نانومتر) می‌باشد، زیرا مواد در اندازه‌های کوچک‌تر دارای نسبت سطح به حجم بالا، سطح کافی برای جذب و واکنش‌پذیری بیش‌تری هستند (۳). Zhao و همکاران در مطالعات خود نشان داده‌اند که پیوند زیر جلدی میکرو فیبرهای زیستی بورات حاوی مس در رت به صورت قابل توجهی سبب رشد مویرگ‌ها و عروق خونی کوچک در مقایسه با میکرو فیبرهای سیلیکات و گروه کنترل شده است (۴). در مطالعه‌ای دیگر، sen و همکاران نشان داده‌اند که مس با اثر بر رگ‌زایی سبب تسریع ترمیم زخم می‌شود. درمان موضعی با ۲۵ میکرومولار از یون مس هر روز به مدت ۵ روز به طور چشم‌گیری سبب افزایش بیان VEGF شده و تسریع در فرآیند ترمیم و بهبود کیفیت بافت بازسازی شده را موجب خواهد شد (۵). مطالعات *in vivo* نشان داده‌اند که مس نه تنها به عنوان فاکتور شرکت کننده در رگ‌زایی بوده بلکه به عنوان یک عنصر رگ‌زا نیز مطرح می‌باشد (۶). ترمیم زخم به عنوان یکی از چالش‌های مهم امروزی در دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. از میان شیوه‌های درمانی متعددی که جهت بهبود زخم‌ها وجود دارند تاکنون روشی پاسخ‌گوی دو چالش اصلی ترمیم زخم یعنی مسئله رگ‌زایی و حضور باکتری‌های موجود در سطح زخم نبوده است. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد نانوذره مس یعنی القاء رگ‌زایی، خاصیت ضد میکروبی و مقرون به صرفه بودن آن نسبت به سایر فاکتورهای معدنی و

روش‌های درمانی موجود، نانوذره مس مورد توجه محققان قرار گرفته است (۷، ۸). اما از آنجایی که هیچ یک از این موارد بدون نقص نبوده و هر یک محدودیت‌هایی نیز دارند، یکی از مشکلات استفاده از آن‌ها پیدایش خاصیت سمی با کاهش اندازه می‌باشد. هم‌چنین مطالعات قبلی همگی نشان داده‌اند که سمیت نانوذرات وابسته به غلظت و اندازه نانوذره می‌باشد (۹، ۱۰). اما از آنجایی که تاکنون سمیت نانوذره مس بررسی نشده است لذا هدف از این مطالعه تعیین غلظت و اندازه مناسب نانوذره مس بوده که کم‌ترین اثر سمیت را بر سلول زنده داشته باشد. از آنجایی که یکی از مراحل اصلی در ترمیم زخم، رگ‌زایی بوده و سلول فعال در این مرحله سلول‌های اندوتلیال می‌باشند، در این مطالعه تجربی اثر نانوذره مس بر زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال مورد بررسی قرار گرفته است، تا با تعیین دوز مناسب از نانوذره مس بتوان از آن به عنوان یک روش درمانی برای بهبود زخم استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نانوذره مس

در این مطالعه تجربی، محلول نانوذره مس در اندازه ۴۰ نانومتر با خلوص ۹۹.۹۹ درصد و با غلظت ۲۰۰۰ ppm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان-مشهد خریداری شده است. در این مطالعه تجربی از نانوذره مس ۴۰ نانومتری با غلظت ۲۰۰۰ ppm، غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میکرومولار و ۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌مولار با آب دی‌یونیزه تهیه شده است.

جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال

بند ناف نوزاد انسان از اطاق عمل بیمارستان بهمن تهران در بافر فسفات نمکی (PBS) که حاوی ۱۰۰ واحد بین المللی (international unit [IU]) در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین بود، در شرایط استریل جداسازی شد. بعد از انتقال به آزمایشگاه، بندناف را در داخل پتری دیش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول PBS (Gibco) قرار داده و با قیچی به قطعات کوتاه‌تری تبدیل گردید. بعد از شستشوی بند ناف با محلول PBS-، قسمت انتهایی آن کلامپ زده شده و ضمن تشخیص سیاهرگ از

$100 * [(T - T_0) / (C - T_0)]$ = فرمول رشد
 T: جذب نوری نمونه ، C: جذب نوری کنترل T_0 : جذب در
 زمان صفر
 زنده مانی سلول‌ها از مقایسه نسبت درصد جذب سلول‌های
 تیمار شده به سلول‌های غیر تیماری به دست آمد.
آنالیز آماری: پس از جمع‌آوری داده‌ها تجزیه و تحلیل با از
 نرم افزار آماری prism 6 Demo انجام شد. جهت آنالیز
 داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و جهت مقایسه
 میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. مقادیر به صورت
 میانگین \pm انحراف از معیار محاسبه گردید و اختلاف در
 سطح احتمال کمتر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.
 مقادیر IC_{50} (غلظتی از نانوذره که باعث ۵۰ درصد مهار
 می‌شود) نیز از روی رگرسیون خطی بین درصد سمیت سلولی
 و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

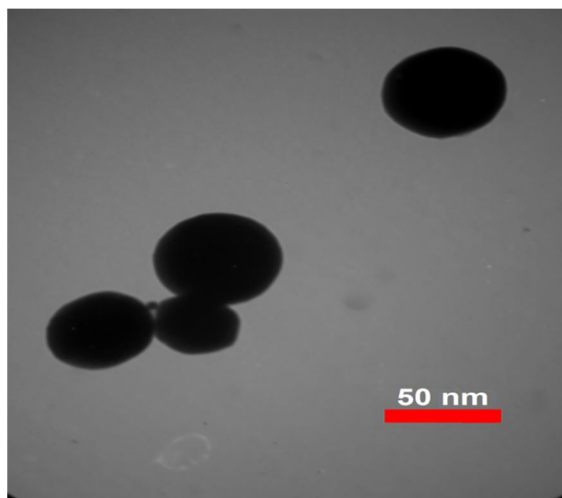
یافته‌ها

در این مطالعه تجربی از نانوذره مس ۴۰
 نانومتری (شکل ۱، ۲) غلظت‌های ۱، ۱۰۰، ۱۰ میکرومولار ۱، ۱۰،
 میلی‌مولار با آب دیونیزه تهیه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و
 ۷۲ ساعت در مجاورت سلول‌های اندوتلیال قرار گرفتند. همان
 طوری که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تصویری از سلول‌های
 اندوتلیال پاساژ ۱ جدا شده از سیاهرگ خون بند ناف در
 محیط کشت سلولی با بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری
 نشان داده شده است. در این تست از آب دیونیزه به عنوان
 کنترل استفاده شده است.
 مقدار (The half maximal inhibitory concentration) IC_{50}
 سلول‌های اندوتلیال در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به
 ترتیب ۳۱/۴۴، ۳۶/۶۷ و ۲۹/۳۸ میکرومولار به دست آمد.
 مقایسه IC_{50} نانوذره مس ۴۰ نانومتری در طی زمان‌های
 انکوباسیون نشان داد در ۷۲ ساعت کم‌ترین مقدار IC_{50} دارا
 می‌باشد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها و درصد سمیت نسبت به گروه
 کنترل بر حسب زمان‌های مورد نظر به تفکیک غلظت‌های
 مختلف از نانوذره در جدول ۱ نشان داده شد.

سرخ‌رگ مقدار ۵ میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز IV با غلظت
 1mg/ml به سیاهرگ اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷
 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از مدت انکوباسیون کلامپ
 انتهایی باز گردید و محلول حاوی کلاژناز و سلول‌ها
 جمع‌آوری شد. ۵ میلی‌لیتر از محیط DMEM/F12
 (Gibco) (Dulbecco's modified medium) Eagle's
 (Fetal bovine serum) FBS ۱۰ درصد به آن اضافه شد.
 مخلوط فوق ۱۰ دقیقه با دور ۱۷۰۰ rpm
 سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و
 رسوب سلول به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت 199 medium
 (Gibco) انتقال داده شد. و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و
 دی اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید.
 بعد از مدت انکوباسیون سلول‌ها تعویض محیط شده و مجدداً
 به مدت ۴ الی ۶ روز انکوبه گردید تا کف فلاسک پر شود.

بررسی زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال

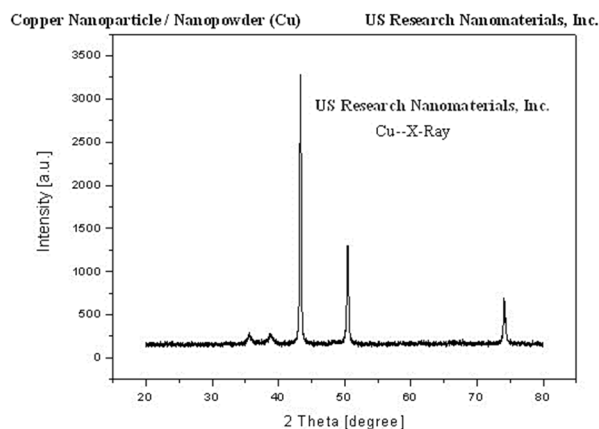
بعد از پر شدن ظرف کشت حاوی سلول‌های
 اندوتلیال سلول‌ها را ترپسینه کرده و پس از خنثی‌سازی محیط
 به تعداد ۵۰۰۰ سلول (۱۰۰ میکرولیتر/چاهک) در هر چاهک
 ظرف کشت ۹۶ خانه کشت داده به مدت ۲۴ ساعت در
 انکوباتور (فشار دی اکسید کربن ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه و
 رطوبت ۹۸ درصد) قرار داده شد. پس از یک بار تعویض
 محیط رویی، سلول‌ها را با ۵۰ میکرولیتر از نانوذره با
 غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱ میکرومولار، ۱ و ۱۰ میلی‌مولار
 (هر کدام از غلظت‌ها با ۴ تکرار) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه
 کرده و قبل از پایان مدت انکوباسیون محیط رویی سلول‌ها
 حاوی نانوذرات را حذف کردیم. سپس ۲۰ میکرولیتر از
 محلول MTS (ab197010) دقیق شده در ۱۰۰ میکرولیتر
 محیط کشت 199 Medium به چاهک‌ها اضافه شده (این
 عمل بدور از نور انجام شده است) و پس از سه ساعت انکوبه
 شدن در تاریکی جذب فورمازان‌های تولید شده در ۴۹۰ نانومتر
 با میکروپلیت ریدر خوانده شد (۱۱). هر کدام از این آزمایش‌ها
 جهت نتیجه بهتر سه مرتبه تکرار شد و میزان زنده‌مانی طبق
 فرمول زیر محاسبه گردید:
 درصد رشد نیز طبق فرمول زیر محاسبه شده است.



شکل ۱. تصویر نانوذره مس با اندازه ۴۰ نانومتر توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

با نسبت ابعادی نزدیک به یک مشاهده می‌شوند و اثری از چند دانه‌ای بودن نانوذرات نیز مشاهده نمی‌شود. متوسط اندازه ذرات با توجه به اندازه‌گیری قطر تعداد ۴۷ نانوذره در ۳ عکس متفاوت برابر ۴۰ نانومتر بوده است.

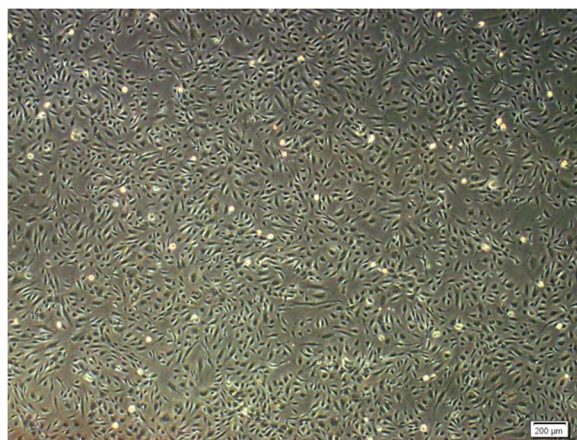
به منظور مشاهده اندازه و شکل نانوذرات از آنالیز TEM استفاده شد. نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات مس مورد استفاده در این کار تحقیقاتی در شکل ۱ نشان داده شده است. نانوذرات به شکل شبه کروی و



شکل ۲. نمودار پراش اشعه ایکس (XRD) از نانوذره مس با اندازه ۴۰ نانومتر

۰۴ تطابق دارد. در واقع قله‌های ظاهر شده در زوایای ۳۶/۶، ۳۸/۷، ۴۳/۶، ۵۰/۸ و ۷۴/۴ مربوط به پراش از صفحات بلوری نانوذرات مس می باشد که تیز بودن قله‌ها بیان گر بلوری بودن نانوذرات مورد استفاده است.

جهت بررسی میزان بلوری بودن نانوذرات مس، نوع و فاز بلور از آنالیز XRD استفاده شده است. طیف XRD نانوذرات به دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده است. نتیجه به دست آمده نشان دهنده تشکیل فاز فلزی نانوذرات مس بوده که با دقت بسیار زیادی با کارت استاندارد آن به شماره ۰۸۳۶-



شکل ۳. سلول‌های اندوتلیال پاساژ ۱ جدا شده از سیاهرگ خون بند ناف در محیط کشت سلولی (بزرگ نمایی ۴۰ میکروسکپ نوری)

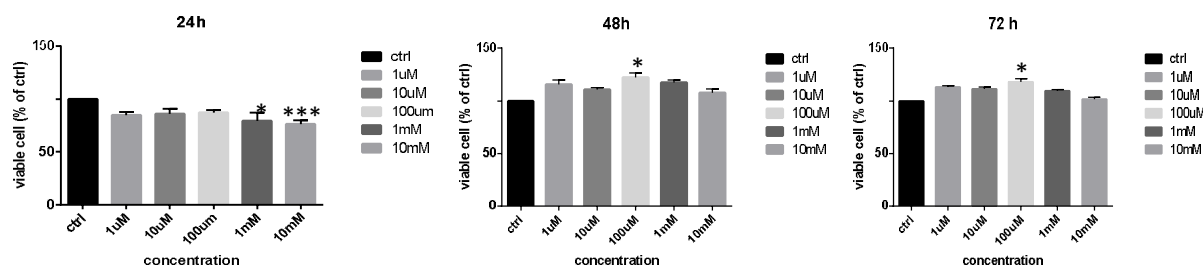
جدول ۱. میانگین زنده مانی سلول‌های اندوتلیال در بازه زمانی ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره مس ۴۰ نانومتری به روش MTS

غلظت						زمان
10mM	1mM	100μM	10μM	1μM	کنترل	
76.34±5.9	79.35±10.9	87.105±3.01	85.95±10.2	84.94±4.8	100	24 h
107.56±8.00	117.19±5.2	122.01±9.1	110.77±3.1	115.36±8.9	100	48 h
101.86±2.8	109.45±1.8	118.09±5.6	111.56±2.7	113.17±2.4	100	72 h

مقادیر به دست آمده بر اساس میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (تست توکی، آنالیز واریانس یک طرفه)

میزان زندهمانی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار به میزان (122.01 ± 9.1) و پس از ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۱ و ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار از نانوذره مس به ترتیب 113.17 ± 2.4 ، 111.56 ± 2.7 و 118.09 ± 5.6 می‌باشد که از لحاظ آماری افزایش معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0.05$) و این بدان معنی است که با گذشت زمان نانوذره مس باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال شده است و تنها در زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار توکسیک بوده است. نتایج آنالیز داده‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱ نمایان‌گر میزان زندهمانی سلول‌های اندوتلیال در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره مس ۴۰ نانومتری در طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد که طبق فرمول ذکر شده در قسمت روش‌ها محاسبه شده است. از داده‌های مربوطه می‌توان نتیجه گرفت: میزان زندهمانی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌مولار از نانوذره مس به ترتیب 79.35 ± 10.9 و 76.34 ± 5.9 می‌باشد که از لحاظ آماری نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0.05$) و این نتیجه نشان دهنده‌ی توکسیک بودن آن در غلظت‌های مورد نظر می‌باشد.



شکل ۴. میزان زندهمانی سلول‌های اندوتلیال در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره مس ۴۰ نانومتری در طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ($P < 0.05^*$) ($P < 0.001^{***}$)

(factor)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) Fibroblast (growth factor) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت شناسایی شده‌اند که نقش بسیار مهمی در رگ‌زایی دارند. یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی عملکرد خود را بر روی سلول‌های هدف از طریق میان‌کنش با گیرنده‌های تیروزین کینازی موجود در غشای پلاسمایی سلول به انجام می‌رساند (۱۳). روش‌های مختلفی جهت تسهیل و القاء رگ‌زایی وجود دارد که از میان آن‌ها انتقال فاکتور رشد عروقی مانند VEGF اغلب از طریق پلیمر استفاده شده است (۱۴)،

بحث

در مطالعه حاضر به بررسی اثر نانوذره مس با اندازه ۴۰ نانومتر بر زندهمانی سلول‌های اندوتلیال پرداخته شده است. شکل‌گیری جریان خون نشان دهنده مرحله مهم از ترمیم زخم می‌باشد (۱۲). رگ‌زایی طی یک تا دو روز بعد از تخریب رگ آغاز شده و تا ۴ روز بعد از جراحی قابل رویت می‌باشد. سلول‌های اندوتلیال از اطراف به حاشیه زخم مهاجرت می‌کنند و به دنبال مهاجرت، تکثیر و تشکیل مویرگ‌های لوله‌ای شکل صورت می‌گیرد. محرک‌های رگ‌زایی متعددی مانند: فاکتور رشد عروقی (VEGF) (Vascular endothelial groth)

۱۵). اگرچه اثربخشی و قابلیت دسترسی فاکتورهای رشد نو ترکیب به خوبی شناخته شده است، اما استفاده بالینی از آن‌ها با مقدار زیاد مورد نیاز به همراه هزینه‌های پزشکی طولانی مدت و افزایش برخی اثرات نامطلوب در دوزهای مکرر، محدود شده است. در بدن، عناصر کمیاب از یون‌های معدنی پایدار به خصوص یون‌های فلزی مانند مس وجود دارد که مانند کوفاکتور آنزیم‌ها عمل کرده (مانند متالوپروتئیناز) و سبب تحریک مسیر پیام رسانی به سمت بازسازی بافت آسیب دیده می‌شوند. اثر یون مس به ویژه در فعالیت چندین فاکتور رونویسی {HIF-1 (Hypoxia inducible factor)} و پرولین هیدورکسیلاز} و اتصال به غشای سلولی، تسهیل و آزادسازی فاکتور رشد و سیتوکین از سلول‌های تولید کننده به اثبات رسیده است (۱۶، ۱۸). علاوه بر این نشان داده شده است عنصر مس در تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال و افزایش رگ‌زایی در شرایط *in vitro* نقش دارد (۱۹). علی‌رغم مزایای ذکر شده اثر مہاری استفاده از یون‌ها به دلیل چند وقایع بیولوژیکی مانند جذب آن‌ها به دیواره سلولی باکتری‌ها، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) (Reactive oxygen species) و غیر فعال‌سازی آنزیم‌های سلولی نیز به خوبی شناخته شده است (۲۰). در مقابل استفاده از مواد در اندازه‌های نانو (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد مانند: نسبت سطح به حجم بالا، سطح کافی برای جذب و واکنش‌پذیری بالاتر نسبت به مواد بزرگ‌تر پاسخ‌گوی محدودیت‌های استفاده از یون‌ها بوده است (۲۱). ذرات با اندازه کوچک‌تر و شکل کروی، به خاطر انتشار بیشتر موجب افزایش غلظت نانوذره در مرکز رگ خونی می‌شوند و با کاهش برهم‌کنش‌ها با سلول‌های اندوتلیال باعث افزایش طول عمر نانوذره در خون می‌شود. هم‌چنین اندازه نانو ذره توانایی خروج از عروق و انتشار در بافت هدف را نیز متاثر می‌کند. به طوری که سلول‌های اندوتلیال اجازه عبور به ذرات کوچک‌تر از ۱۵۰ نانومتر را می‌دهد که البته عبور از موانع محکم از جمله سد خونی مغز محدود تر و دشوارتر

می‌شود (۲۱). با توجه به نقش نانوذره مس بر ترمیم زخم یکی از محدودیت‌های استفاده از آن مانند سایر نانوذرات سمیت آن‌ها می‌باشد. لذا قدم اول در به کارگیری نانوذره مس جهت القاء رگ‌زایی یافتن غلظت غیر توکسیک از آن می‌باشد. آنچه در مطالعات گذشته نشان داده شده است نانوذرات با اندازه کوچک‌تر و غلظت بیشتر دارای اثر سمیت بیشتری می‌باشند. هم‌چنین در مطالعه‌ای که به اثر نانوذره مس بر بافت کبد رت توسط Doudi و همکاران صورت گرفته، نشان داده شده است که نانوذره مس در اندازه‌های ۱۰-۱۵ نانومتر اثر سایتوتوکسیسته داشته است (۲۲) در مطالعه Prabhu و همکاران به بررسی اثر سمیت نانوذره مس بر نورون‌های حسی پیکری گانگلیون‌های ریشه پشتی رت پرداخته شد، از نانوذره مس با سه اندازه ۴۰ و ۶۰ و ۸۰ نانومتر و در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار استفاده شد، نشان داده شده است که نانوذره مس با اندازه کوچک‌تر و غلظت بالاتر بیشترین اثر سمیت را داشته است (۲۳). در مطالعه اخیر نیز که به بررسی اثر نانوذره مس با اندازه‌ی ۴۰ نانومتر و در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میکرومولار، ۱ و ۱۰ میلی‌مولار بر سلول‌های اندوتلیال پرداخته شده است مشاهده شده که در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌مولار در ۲۴ ساعت مقدار سمیت بر سلول معنی‌دار بوده و میزان مرگ و میر ۲۴ درصد بوده است و از آنجایی که نانوذره مس بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال نیز اثر مثبت دارد در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش تکثیر سلول‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار معنی‌دار بوده است. مطالعات Hector و همکارانش نشان داد نانوذره نقره ۴۵ نانومتری اثر دو گانه‌ای بر روی تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر دارد به طوری که در غلظت پائین 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ باعث مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال شد در حالی که در غلظت بالاتر 50-100 $\mu\text{g/ml}$ باعث تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق شد که با مطالعات ما هم‌خوانی ندارد (۲۴). اثر مہاری در غلظت پائین نانوذره نقره احتمالاً می‌تواند به دلیل اینترکشن مستقیم با سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر باشد که مجوز اینترنالیزه

افزایش نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال عروق پس از مواجهه با نو ذره مس مرتبط است (۲۷). مطالعات با فلورسین نشان داد نانوذره مس بر روی نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال عروق مغز تاثیر می‌گذارد. مطالعات نشان داد که مس متابولیزه شده در سلول‌های کشت بافت کبدی، از طریق گلوکوتایون به متالوتیونین (جایی که مس ذخیره شده) منتقل می‌شود. زمانی که مس overload می‌شود باعث تخلیه گلوکوتایون شده و بلافاصله باعث افزایش سمیت سلولی می‌شود (۲۸، ۲۹). در مطالعه Fahmy و همکاران نشان داد شده است نانوذره مس با اختلال در فاکتورهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و گلوکوتایون ردوکتاز باعث افزایش گلوکوتایون دی سولفید نسبت به گلوکوتایون احیاء شده در سلول‌های HEP-2 می‌شود (۳۰). بنابراین با توجه به پاسخ‌های متفاوت وابسته به غلظت سلول‌های اندوتلیال بعد از مواجهه با نانوذره مس و القاء تکثیر سلولی می‌تواند منجر به افزایش نسبت گلوکوتایون بعد از افزایش جزئی ذخیره مس شود که به طور بالقوه باعث القاء رگ زایی می‌شود. این مطالعه بدین منظور صورت گرفته است تا با تعیین غلظت و اندازه مناسب نانوذره مس و استفاده از آن غلظت در القاء رگ زایی بتوان گامی جهت ترمیم زخم‌های پوستی برداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت بر سلول‌های اندوتلیال سمی بوده و بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثر افزایشی بر تکثیر سلول‌ها داشته است. با توجه به یافتن غلظت مناسب غیر توکسیک از نانوذره مس و نقش آن در ترمیم زخم می‌توان از غلظت ۱۰۰ میکرومولار در سایر مراحل ترمیم زخم استفاده کرد. با توجه به اهمیت این موضوع پیشنهاد می‌شود تا بررسی اثر نانوذره در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و اندازه ۴۰ نانومتر در مدل‌های *In vivo* نیز انجام شود.

شدن و واکنش شدن نانوذرات یا عبور نانوذرات از غشاء سلول را می‌دهد. پیتز و همکارانش نشان دادند سلول‌های اندوتلیال ظرفیت بزرگی برای اینترنالیزه شدن مواد، به خصوص در مقیاس نانومتر مانند SiO_2 ، TiO_2 و Co را دارند (۲۵). مطالعات نشان داد تنظیم مسیر ویژه‌ای که فعالیت NOS را مهار می‌کند باعث مهار تکثیر سلولی و انقباض عروق می‌شود. از آنجایی که سنتز NO فاکتور اصلی در مسیر واسطه‌ای تکثیر سلول می‌باشد، غلظت بالای نانوذره نقره ۴۵ نانومتری تولید نیتریک اکسید و اتساع عروق را از طریق روش مشابه با مواد وازواکتیو مانند VEGF تحریک می‌کند و نقش نانوذره را در این روند نشان می‌دهد (۲۶). نتایج به وضوح خاصیت انتخابی، اختصاصی و اثرات وابسته به غلظت نانوذرات را در سلول‌های اندوتلیوم عروق نشان می‌دهد. اثرات متضاد در غلظت بالا و پائین نانوذرات می‌تواند به ناهمگونی نانوذرات مرتبط باشد. به طوری که مطالعات تعامل مستقیم نانوذرات با سلول‌های اندوتلیال عروق و نقش این نانوذرات در تنظیم تکثیر سلول را نشان می‌دهد که یک جزء حیاتی در رگ زایی را فراهم می‌کند. بنابراین در حالی که در غلظت‌های پایین، نانوذرات به عنوان فاکتور تنگ کننده عروق / ضد تکثیری از طریق مختل کردن نیتریک اکسید عمل می‌کند در غلظت بالا با تحریک نیتریک اکسید و گشاد کردن عروق نقش خود را انجام می‌دهد.

مطالعات Trickler نشان داد نانوذره مس با اندازه ۴۰ و ۶۰ نانومتری در غلظت پائین باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک در مغز موش شد در حالی که در غلظت بالا باعث القاء سمیت در سلول‌های اندوتلیال عروق شد که با نتایج ما هم راستا می‌باشد (۲۷). مطالعات نشان داد پس از مواجهه سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک مغز موش با نانوذره مس باعث القاء افزایش تولید واسطه‌های پیش التهابی مختلفی مانند PGE_2 ، $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{IL-1}\beta$ در غلظت بالا می‌شود. به طوری که پروفایل وابسته به زمان و افزایش آزاد سازی این واسطه‌های پیش التهابی به طور معنی‌داری با

9. seyed Alipour B BN, Dehpour Jooybari A, Hoseini S M. Assessment of Histopathological Changes on Brain, Spleen and Embryo NMRI Pregnant Mice Exposed to Copper Oxide Nanoparticles. Arak Medical University Journal. 2015; 17 (11) :17-28.

10. Bavand Z GS, Honari S, Rahimi Esboei B, Torabi N, Borabadi H. Effect of Gold Nanoparticles on Giardia Lamblia Cyst Stage in In vitro. Arak Medical University Journal. 2014; 16 (10) :27-37.

11. Fede C, Selvestrel F, Compagnin C, Mognato M, Mancin F, Reddi E, et al. The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;404(6-7):1789-802.

12. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. Journal of dermatological science. 2013;72(3):206-17.

13. Chen RR, Silva EA, Yuen WW, Brock AA, Fischbach C, Lin AS, et al. Integrated approach to designing growth factor delivery systems. The FASEB Journal. 2007;21(14):3896-903.

14. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. Journal of Orthopaedic Research. 2009;27(1):8-14.

15. Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, et al. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. Blood. 2005;105(12):4613-9.

16. Rajalingam D, Kumar TKS, Yu C. The C2A domain of synaptotagmin exhibits a high binding affinity for copper: implications in the formation of the multiprotein FGF release complex. Biochemistry. 2005;44(44):14431-42.

17. Bar-Or D, Thomas GW, Yukl RL, Rael LT, Shimonkevitz RP, Curtis CG, et al. Copper stimulates the synthesis and release of interleukin-8 in human endothelial cells: a possible early role in systemic inflammatory responses. Shock. 2003;20(2):154-8.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم ساناز علیزاده با عنوان اثر نانوذره مس بر عملکرد سلول‌های فیبروبلاست و اندوتلیال در ترمیم زخم‌های عمیق پوستی می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر محمدی به خاطر همکاری نهایت تشکر را دارند.

منابع

- Xie H, Kang YJ. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. Current medicinal chemistry. 2009;16(10):1304-14.
- Lin Y, Brown RF, Jung SB, Day DE. Angiogenic effects of borate glass microfibers in a rodent model. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2014;102(12):4491-9.
- Tocco I, Zavan B, Bassetto F, Vindigni V. Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration. Journal of Nanomaterials. 2012;2012:4.
- Zhao S, Li L, Wang H, Zhang Y, Cheng X, Zhou N, et al. Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model. Biomaterials. 2015;53:379-91.
- Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, et al. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2002;282(5):H1821-H7.
- Bogdanović U, Lazić V, Vodnik V, Budimir M, Marković Z, Dimitrijević S. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. Materials Letters. 2014;128:75-8.
- Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty KP, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. International journal of molecular sciences. 2015;16(3):4838-49.
- Li Q-f, Ding X-q, Kang YJ. Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor. The Journal of nutritional biochemistry. 2014;25(1):44-9.

isolated rat aortic rings. *Toxicology Letters*. 2009; 191: 305–313.

25. Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Gatti AM, Monari E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; 15: 321–325.

26. Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales- Tlalpan V, et al. K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endotheliumdependent vasorelaxation. *Endocrinology*. 2004; 145: 5714– 722.

27. Trickler WJ(1), Lantz SM, Schrand AM, Robinson BL, Newport GD, Schlager JJ, et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine (Lond)*. 2012; 7(6):835-46.

28. Steinebach OM, Wolterbeek HT. Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*. 1994; 92: 75–90.

29. Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 5598–5605.

30. Fahmy B, Cormier SA. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2009; 23: 1365–1371.

18. Hu Gf. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of cellular biochemistry*. 1998;69(3):326-35.

19. Khandia R, Vishwakarma P, Dwivedi A, Mehra R, Kujur A, Dhama K, et al. Evaluation of the modulatory effects of copper salts on the process of Angiogenesis (Neovascularization) with therapeutic perspectives. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4(8):405-10.

20. Studer AM, Limbach LK, Van Duc L, Krumeich F, Athanassiou EK, Gerber LC, et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology letters*. 2010;197(3):169-74.

21. Wang X, Cheng F, Liu J, Smått J-H, Gepperth D, Lastusaari M, et al. Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: Biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application. *Acta Biomaterialia*. 2016;46:286-98.

22. Doudi M, Setorki M. Acute effect of nano-copper on liver tissue and function in rat. *Nanomedicine Journal*. 1999;1(5).

23. Prabhu BM, Ali SF, Murdock RC, Hussain SM, Srivatsan M. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology*. 2010;4(2):150-60.

24. Rosas-Hernández H, Jiménez-Badillo S, Martínez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, et al. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and