بررسی اثرات سمیت سلولی کمپوزیت نانوذرات نقره در بستر ژلاتین بر روی رده سلول سرطانی رحم (Hela)

سیده مبینا موسوی سروینه باغی، عباسعلی دهپور جویباری*، صدف فرخنده

گروه زیست‌شناسی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

*مسئول مکاتبات: dehpour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۶

چکیده

سرطان در حال حاضر دومین عامل مرگ و میر در جهان است و در بین انواع آن سرطان تخمدان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است. سرطان در نتیجه رشد و تکثیر بدون کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود که سلول‌های سرطانی تومور را ایجاد می‌کند. یکی از روش‌های درمان این بیماری شیمی درمانی می‌باشد. برخی از نانوذرات نقره به دلیل بالا بردن سمیت سلولی با ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش رادیکال-های آزاد در درون سلول‌ها از جمله ROS می‌توانند به عنوان حساس کننده مطرح شوند. در این مطالعه اثر نانوذرات نقره در بستر ژلاتین بر رده سلول‌های سرطانی رحم بررسی گردید. در این بررسی پس از تکثیر و کشت رده سلول‌های Hela نانوذرات نقره در بستر ژلاتین را با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی هلا اثر داده و پس از ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT سمیت مورد نظر ارزیابی قرار گرفته و سپس داده‌های بدست آمده توسط دستگاه الیزا ریدر و با آزمون ANOVA تحلیل گردید. نتایج مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره در غلظت‌های ۲۰ بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p\leq0.05$). نانوذرات نقره در اندازه و غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان می‌دهد که نانو ذره نقره در بستر ژلاتین سمیت سلولی موثر بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته و به طور مطلوب آپتوز را تا حد بالایی در این سلول‌ها القا کرده و از این طریق سبب مرگ سلول‌های سرطانی شده و همزمان سمیت کمتری به سلول‌های طبیعی بدن داشته‌اند.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، سمیت سلولی، سرطان رحم، رده سلولی هلا

مقدمه

سرطان اصلی‌ترین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین عامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه بوده است [۵]. سرطان تخمدان کشنده‌ترین سرطان در زنان است [۹]. در بسیاری از روش‌های درمان سرطان می‌توان ردپای نانوفناوری را یافت مهمترین قابلیت نانوفناوری ساخت مواد با ابعاد نانومتری است گروهی از این ساختارها که نانوذرات نامیده می‌شوند حداقل یکی از ابعادشان کمتر از ۱۰۰ نانومتر است و در میان آنها نانوذرات فلزی به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی و خواص منحصر به فردشان مورد توجه واقع شده و در زمینه‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۲]. نانوبیوتکنولوژی به عنوان یکی از شاخه‌های علم نانو در علوم پزشکی کاربرد بسیار مهمی دارد. استفاده‌های بسیار زیادی از نانو ذرات در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان امروزه در دنیا رایج می‌باشد [۱۸]. ذرات در مقیاس نانو، مولکول‌هایی با پتانسیل بالا جهت درمان بیماری‌ها می-باشند، زیرا که این ذرات دارای اثرات بیولوژیکی منحصر به فردی بسته به نوع ساختار سایز و تفاوت‌هایی در ابعاد مولکولی و دارویی و همچنین هم‌بستر شدن با سایر ترکیبات دیگر می‌باشند [۱۶]. نقره به عنوان یکی از ذرات پایه در شاخه نانو بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد که امروزه دیده شده است نقره می‌تواند در مقیاس نانو به صورت ذرات ریز نیز تولید شوند [۱۳]. نانوذره نقره (AgNPs) سنتزی یک فراورده نانویی می‌باشد که دارای

خواص بسیار جالبی در زمانی که بـه صـورت ذرات نـانو می‌باشد دارد، به طوری‌که این خـواص منجـر بـه اسـتفاده این نانوذره در درمان بیماری‌ها می‌باشد [۶]. نانوذره نقـره دارای اثرات سمیت سلولی بسیار خوبی می‌باشـد سـاختار سلیکونی نانوذره نقره دارای اثرات ضد میکروبی به مراتب زیادتری از خود نشان مـی‌دهنـد [۷]. نـانوذره نقـره دارای اثرات ضدسرطانی بسیار خـوبی در سـلول‌هـای سـرطانی لنفوسیتی از خـود نشـان داد [۱]. بنـابراین هـدف از ایـن مطالعه بررسی سـمیت نـانوذره نقـره در بسـتر ژلاتـین در غلظت‌های مختلـف، بـر روی سـلول‌هـای سـرطانی هـلا (Hela) می‌باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول: در ایـن مطالعـه بـرای کشـت in vitro از سلول‌های هلا را از انسـتیتور ایـران کـد (PTCC 135) تهیـه شـده اسـتفاده گردیـد سـلول‌هـا در محـیط کشـت (RPMI-1640) حاوی ۱۰ درصـد سـرم جنـین گـاوی محصول شرکت (Gibco) آلمان پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در یک انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد گاز CO2 قرار داده شد و۹۵ درصد رطوبت در فلاسک‌های اسـتریل مورد کشت و تکثیـر قـرر گرفـت بعـد از دو تـا سـه روز سلول ها به صورت تک لایه فلاسک را پـر کـرده‌انـد، و بعد از جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک توسط تریپسین EDTA سلول‌ها شمارش شده و درصد سلول‌های زنـده به روش تریپـان بلـو و بـا اسـتفاده از لام نئوبـار تعیـین و آزمایشات طراحی شده بر روی آنها انجام گرفت.

تهیه رقت هـای مختلـف از نـانو ذره نقـره در بسـتر ژلاتین: نانوذره نقره مورد نظر را ابتدا در آونگ پودر کرده وتوسط ترازوی حساس دیجیتالی توزین گردید. آنگـاه در هر ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به صورت محلـول در آورده شـد. سـپس در محـیط کشـت سـلولی (RPMI-1640) رقت‌های مختلف مورد نیاز تهیه شد. رقـت‌هـای بـه کـار رفتـه در ایـن تحقیـق شـامل ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشند.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT: بـرای بررسی درصد سلول‌های زنـده از تسـت MTT اسـتفاده گردید. بدین ترتیب که یک فلاسک سلولی بـا تـراکم ۶۰ درصد را تریپسینه و پس از شمارش سلولی بـه پلیـت ۹۶ خانه ای منتقل گردید به طوری که حـدود ۵۰۰۰۰ سـلول در ۲۰۰ میکرولیتر محـیط کشـت قـرار گیـرد. پـس از ۲۴ ساعت در گروهای مختلف نانو ذره و تـابش گامـا اعمـال شد و پلیت‌های در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز انکوبـه شـد ودر روز ازمـون ۲۰ میکرولیتـر محلـول MTT به هـر چاهـک اضـافه شـده و بعـد از ۳ سـاعت انکوباسیون محتویات داخل چاهک را دور ریختـه و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه کرده تـا کریسـتال فورمـازون حل شود برای سنجش سه نمونـه یکسـان تهیـه و جـذب حاصل از نمونه توسط نرم‌افزاز ریتو دستگاه الیزا ریـدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید در نهایـت نتـایج بـه صورت درصد جذب نوری نسبت بـه سـلول‌هـای شـاهد سلول‌هایی که در غیاب نانو ذره رشـد کـرده بودنـد ثبـت شده درصد سلول‌های زنده با استفاده از معادله زیر بدست آمد:

$$\text{Percentage Survival} = OD_{test}/OD_{cont} \times 100$$

که در آن ODtest میزان جذب نوری متوسـط از سـلول مورد آزمون و OD کنترل میزان میـانگین جـذب متوسـط گروه کنترل می‌باشد. تصاویر نیز توسـط فتومیکروسـکوپ اینورت نیکون برداشته شده اسـت. ایـن آزمـایش در سـه تکرار انجام گرفت. میانگین بقاءانحراف معیار آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و آزمون آمـاری ANOVA و برای رسم نمودار از نرم افزار اکسل استفاده گردید.

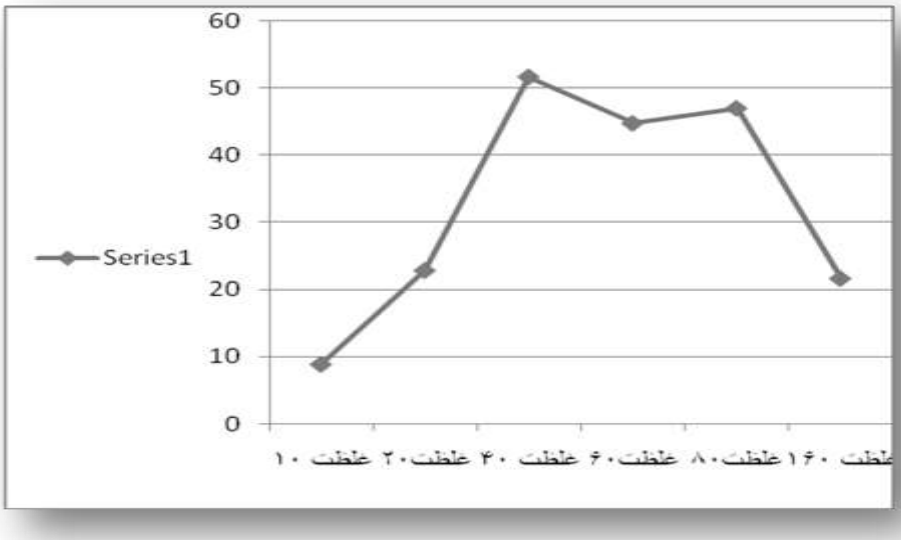
نتایج

یافته‌های این تحقیق نشان داد که نـانوذره ژلاتـین سـمیت سلولی را افزایش داده که این سمیت به شدت به نـوع ذره وابسته بوده و ایـن نـانو دارای اثـرات سـمیت سـلولی در غلظت‌های۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی-

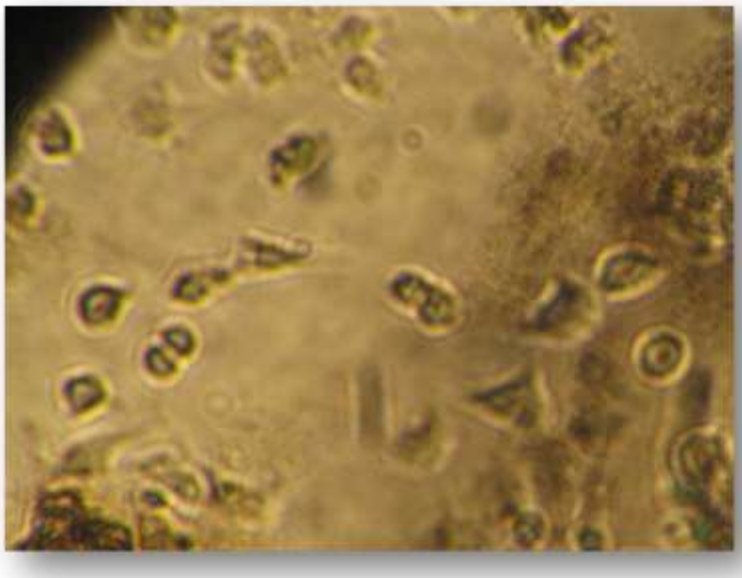
لیتر به ترتیب به میزان ۸/۹۱، ۲۲/۸۵، ۵۱/۶۲، ۴۴/۷۳، ۴۶/۹۶ و ۲۱/۶۶ درصد بوده است. همچنین مشخص شده است که نانوذره نقره در بستر ژلاتین به طور وابسته به غلظت بوده به طوریکه با افزایش غلظت، درصد مهار رشد سلولی را افزایش داده است (نمودار۱). بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۵۱٪ بوده است. میزان IC50 به مقدار ۴۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر اندازه گیری شده است (جدول۱ و نمودار۱). نتایج نشان می‌دهد که رده سلولی هلا نسبت به نانو ذره نقره در بستر ژلاتین در غلظت‌های ۲۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است ($p\leq0.05$) (شکل ۱ و ۲).

جدول ۱ـ نتایج سمیت سلولی غلظت های مختلف نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر رده سلولی هلا)

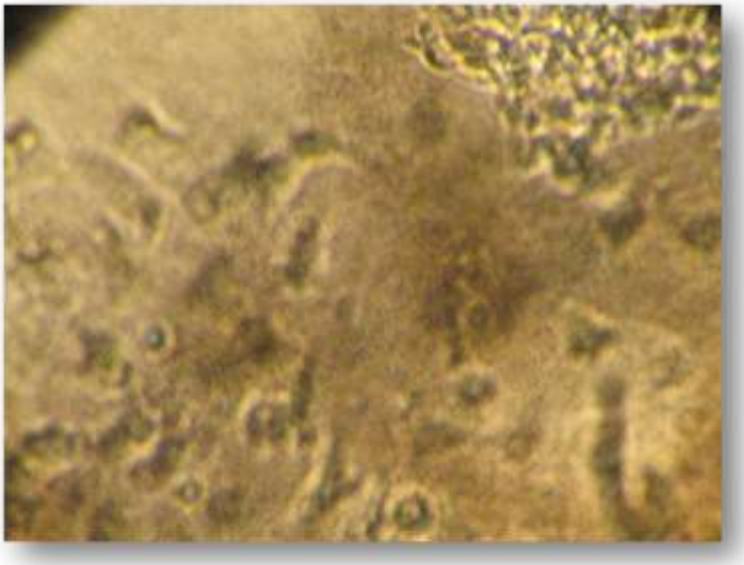
Concentration of Alliumparadoxum (mg/ml)	Absorption	Cell Growth Inhibition	IC_{50}(mg/ml)
0	0.49±0/026517		
10	0.455567±0.024997	8.91	
20	0.385067±0.020262*	22.85	
40	0.243567±0.028989	51.62	49
60	0.2802±0.078249	44.73	
80	0.254067±0.105091	46.96	
160	0.3941±0.042118	21.66	



نمودار۱ـ غلظت های مختلف نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر درصد زنده مانی رده سلولی هلا با استفاده از تست MTT



شکل ۱ـ گروه کنترل (رده سلول‌های هلا در محیط کشت RPMI) 400×



شکل ۲ـ غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذره نقره در بستر ژلاتین بر روی رده سلول‌های سرطانی هلا که بیشترین اثرات مهاری رشد را نشان می‌دهد. ×۴۰۰

بحث

با گسترش فن‌آوری نانو و استفاده از ویژگی‌های متفاوت نانومواد افق جدیدی در کلیه حوزه علمی گشوده شده است این فن‌آوری توانسته است در زمینه‌های مختلف پزشکی کاربردهای فراوانی پیدا کند [۱۵]. از ویژگی نانومواد هم در تشخیص بیماری‌ها هم در درمان آنها مورد مطالعه قرار گرفته و بسیاری نیز به استفاده انبوه رسیده است [۲]. نانوفناوری آغاز تغییرات در مقیاس و روش‌های رهاسازی دارو در بدن می‌باشد. ذرات و ابزارهای نانو از نظر ابعاد کاملاً به مولکول‌های زیستی نزدیک بوده و به سادگی می‌توانند در اغلب سلول‌ها نفوذ کنند. قابلیت ادغام فیزیکی و شیمیایی و خواص بیولوژیک این نانوذرات، پژوهشگران را قادر ساخت تا نانو ذرات را در

جهت ساخت دارو به کار گیرند. داروهایی که در حوزه تشخیص و درمان بیماری ها از جمله سرطان می‌تواند مفید واقع شود [۴]. نانو ذره نقره همچنین به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی بسیار خوب مد نظر می‌باشد، به طوری که در گزارشات مختلف اثرات ضدویروسی بر علیه هیپاتیت B ویروس‌های آسیب‌رسان به دستگاه تنفسی ویروس هرپِس (Herpes) نوع ۱ ویروس POX میمون را دارد [۸]. ساختار سلیکونی نانوذره نقره دارای اثرات ضد میکروبی به مراتب زیادتری از خود نشان می‌دهند [۱۷]. برای تشخیص بهتر و موفقیت‌آمیز سرطان در مراحل اولیه آن، دانشمندان باید قادر به طراحی ابزارآلاتی برای تعیین تغییرات مولکولی باشند. این بدان معنی است که ابزارات بسیار دقیق نیاز است. پتانسیل نانوساختارها برای بررسی‌های سلولی می‌تواند نیازهای پزشکان و متخصصان و در نهایت بیماران را برطرف کند. به علت ابعاد کوچک نانوساختارها بیشترین کاربرد نانوبیوتکنولوژی در تشخیص مولکولی به سیستم‌های میکروآرایه‌ها و تراشه‌های زیستی متمرکز شده است (۱۶). مارتینز و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه اثرات AgNPS (نانو ذره نقره سنتزی) را بر روی سلول‌های سرطانی لنفوسیتی OIA بررسی نمودند و دریافتند که AgNPS دارای اثرات سایتو توکسیته بسیار خوبی بر روی سلول‌های فوق نشان دادند (۱۱) و همچنین در مطالعه‌ی دیگری استول و همکاران دریافتند که تری اکسید مولبیدن دارای اثرات سمیت سلولی به مراتب کمتری نسبت به نانو ذره نقره می باشد با توجه به نتایج ما که IC50 ۴۹ با این نتایج همسو می‌باشد (۱۵). همچنین در مطالعه مؤدب اهری و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات نانو ذره نقره را بر رده سلول‌های سرطانی استخوان (G292) مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که نانو ذره نقره در ۳/۴۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات سمیت سلولی می‌باشند که همسو با این گزارشات می‌باشد [۱۰]. همچنین در مطالعه‌ای Dechsakuthom و همکاران، اثرات سمیت سلولی نانوذره اکسید روی و دی اکسید تیتانیوم را بر روی رده سلولی پوشش پوست مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که غلظت‌های ۱۰ ppm اکسید روی به صورت نانوذره به اندازه ۵۰ تا ۷۰ ohm نسبت به دی اکسید تیتانیوم در همان غلظت دارای بالاترین اثرات مهار رشد بر رده سلول‌های سرطانی پوست داشتند که با نتایج حاصل از تحقیقات ما همسو می‌باشد [۳].

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد. که نانو ذره نقره در بستر ژلاتین (بستر ژلاتین موجب آزاد سازی نانو ذره نقره به طور مداوم می‌شود) سمیت سلولی موثر بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته و به طور مطلوب اپوپتوز را تا حد بالایی در این سلول‌ها القا کرده و از این طریق سبب مرگ سلول‌های سرطانی شده‌اند وهمزمان سمیت کمتری بر سلول‌های طبیعی بدن داشته اند. با توجه به بررسی اثرات دوزهای مختلف از نانو بهترین تاثیر غلظت این نانوذره در غلظت ۴۰ که بیشترین تأثیر را بر روی سلول‌های سرطانی هلا داشته است.

منابع

1- Baker C., Pradhan A., Pakstis L. (2005), Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 244-249

2- Banerjee D., Sengupta S. (2011), Nano particlesin cancer chemotherapy. *Progress in Molecular Biology and Translationa Science*, 104: 489-507.

3- Dechsakulthom F., Hayes A., Bakand S., Joen L., Winder C. (2007), In vitro cytotoxicity of selected nano particle using human skin fibroblasts. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use the Life Sciences, 21-25, Tokyo, Japan

4- Felix K. (2008), Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs,drug

conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3): 171-183.

5- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011), Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90.

6- Kalishwaralal K., Barathmanikanth S., Pandian S.R.K., Deepak V., Gurunathan S. (2010), Silver nano – a trove for retinal therapies. *Journal of Control Release*, 145(2):76-90.

7- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N. (2007), Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3: 95–101.

8- Lu L., Sun R.W., Chen R. (2008), Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivirus Therapy*, 13: 253-262.

9- Lukanov A., Kaaks R. (2005), Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hyopothesis Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 14: 98-107.

10- Moaddab Ahari H., Shahbazzadeh D., Motallebi A.A., Anvar A.A., Rahman G., Shorgozarmr R. (2011), Toxicity study of nano silver on osteoblast cancer cell line. *International Nano Letters*, 1: 11-16.

11- Martins D., Frungillo L., Anazzetti M.C., Melo P.S., Durán N. (2010), Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D, L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 77-85.

12- Shuford K., Schatz G. (2005), Optical Properties of Gold Nanospheres. *Nanoscape*, 2(1): 2733.

13- Silver S., Phung L.T., Silver G. (2006), Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 33: 627–634

14- Singh N., Manshian B., Jenkins G.J., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffeis T.G. (2009), Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nano materials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914.

15- Stoll L., Hussain S., Schlager J., Hafman C. (2005), invitorcyto toxicity of nano particeles in Mammalian Germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2). 412-419

16- Wagner V., Dullaart A., Bock A.K., Zweck A. (2006), The emerging nano medicine landscape. *Natural Biotechnology*, 24: 1211–1217

17- Wang X., Yang L., Chen Z., Shin D.M. (2008), Application of nanotechnology in cancer therapy and Imaging. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 58(2): 97-110.

18- Yezhelyev M.V., Gao X., Xing Y., Hajj A.A., Nie S., Regan R.M.O. (2006), Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7: 657-667.