

مطالعه اثرات زیستی و سمیت نانوذرات آلومینای آغشته به جیوه در سول‌های سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی

ناهید سهیلی ارشدی^۱، امیرعباس مختاریه^۲ و مهدی زمانی^{۳*}

- ۱- کارشناسی ارشد شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
- ۲- استادیار زیست‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
- ۳- استادیار شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

دریافت: دی ۱۳۹۷، بازنگری: شهریور ۱۳۹۸، پذیرش: مهر ۱۳۹۸

چکیده: در این مقاله، نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه با روش آغشته‌سازی نانوذرات γ -آلومینا با جیوه استات در محلول آب و ایزوپروپانول و به دنبال آن آبکافت، شستشو، صاف و خشک‌کردن در دمای اتاق، تهیه شدند. ساختار این نانوذرات با الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) تأیید شد. از الگوی XRD برای تأیید پیوند بین نانوذرات آغشته به جیوه و باز آلی تیمین در DNA سلول هدف نیز استفاده شد. اثرات زیستی و سمی نانوذرات γ -آلومینا و γ -آلومینای آغشته به جیوه بر سلول‌های سرطانی هلا (Hella) و سلول‌های بنیادی مغز استخوان با آزمون MTT بررسی شد. برپایه نتایج به دست آمده، سمی بودن نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه بر سلول‌های سرطانی هلا بیشتر از سلول‌های بنیادی بود. به عبارت دیگر، نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه تأثیر قابل توجهی در از بین بردن سلول‌های سرطانی هلا داشتند. همچنین، مشخص شد نانوذرات γ -آلومینای خالص در غلظت‌های پایین نسبت به آلومینای آغشته به جیوه کمتر سمی هستند.

واژه‌های کلیدی: نانوذره، آلومینا، جیوه، سمی بودن، آزمون MTT

مقدمه

به‌طور مستقیم و انتخابی مورد هدف قرار می‌گیرند و دارورسانی می‌شوند [۴]. نانوموادمانند نانوذرات سریم اکسید برای سلول‌های سرطانی سمی هستند [۵ و ۶]. سمی بودن نانوذرات سریم اکسید بر رده سلول‌های ریه مورد بررسی قرار گرفته است [۱]. نتایج نشان می‌دهد که این ترکیب وابسته به غلظت و زمان، باعث افزایش مرگ سلول‌های سرطانی شده است [۱]. این ترکیب همچنین، ویژگی پاداکسیدانی و فعالیت کاتالیز است آزنیم، مهارکننده

در سال‌های اخیر، روش‌های متفاوت شیمی درمانی، جراحی و پرتودرمانی برای درمان سرطان به کاررفته است؛ اما این روش‌ها ممکن است باعث از بین رفتن سلول‌های سالم شده و یا به بافت‌های سالم آسیب رسانند [۱]. بنابراین پژوهشگران برای درمان سرطان به دنبال روش‌های جدید با عوارض جانبی کمتر هستند [۲، ۳]. با به کارگیری فناوری نانو، سلول‌های سرطانی

رادیکال‌های نیتریک اکسید و هیدروکسیل است [۷]. تیتانیم اکسید سمی بسیار ضعیف است و ویژگی فوتوکاتالیستی دارد [۸]. گزارش شده است که این ترکیب برای ریشه‌کن کردن سلول‌های سرطانی نیز کاربرد دارد [۹ و ۱۰]. در سال‌های اخیر تأثیر ضد سرطانی نانوذرات روی اکسید بر سلول‌های سرطانی پروستات مورد بررسی قرار گرفته و از بین رفتن سلول‌های سرطانی با این ترکیب تأیید شده است [۱۱]. گرافن اکسید نیز برای از بین بردن سلول‌های سرطانی به کار گرفته شده است [۱۲]. گرافن و مشتقات آن، مواد به نسبت بی‌اثر و غیرسمی هستند و گرافن اکسید می‌تواند برای مهار انتخابی گسترش تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی در انواع متفاوت تومور استفاده شود [۱۲].

یکی از مهم‌ترین نانومواد، نانوذرات آلومینا است که نه تنها به‌طور گسترده در صنایع متفاوت پتروشیمی، پالایش نفت و در ساخت کاتالیست‌ها استفاده می‌شود، بلکه در همه زمینه‌های مواد غذایی، پزشکی و مراقبت شخصی نیز به کار گرفته می‌شوند [۱۳]. γ -آلومینا به دلیل ویژگی‌های اسیدی و بازی ذاتی که دارد می‌تواند به‌عنوان یک ماده پیشرفته در کاربردهای فراوانی مانند فرایندهای جذبی به کار گرفته شود. برای مثال، می‌توان به جذب یون‌های فلزی و ترکیبات معدنی بر γ -آلومینا اشاره کرد [۱۴ تا ۲۱]. همچنین، نانوذرات γ -آلومینا به‌عنوان پاداکسیدان و رایبند قوی رادیکال‌های آزاد در حلال‌های غیرقطبی معرفی شده‌اند [۲۱]. بر اساس برخی گزارش‌ها، اثر سمی نانوذرات γ -آلومینا بر سلول‌های بنیادی بسیار کم است [۱۳]. در سال‌های اخیر، حامل‌های جدیدی به نام نانولوله‌های آلومینای آندی برای درمان سرطان به کار گرفته شده است [۲۲].

اگر یون‌های فلزی در حضور ماریچ دو رشته‌ای DNA قرار گیرند، تغییراتی در ساختار DNA ایجاد می‌کنند. در سال‌های اخیر، تحولاتی در ساختار DNA با نانوذرات فلزی صورت گرفته است که منجر به جایگزینی یون‌های فلزی و تشکیل جفت بازهای فلزی می‌شود. این جایگزینی از راه قرار گرفتن یون فلزی به جای پیوند هیدروژنی بین بازهای DNA انجام می‌شود و پیوند هیدروژنی موجود در DNA طبیعی به‌صورت رسمی با پیوندهای

کئوردینانسیونی جایگزین می‌شود. بدین منظور یون‌های فلزی متفاوتی به کار گرفته می‌شوند [۲۳ و ۲۴]. تشکیل جفت بازهای متصل به فلز با نوکلئوزیدهای طبیعی که می‌تواند اثربخشی دارویی، ضد میکروبی و ضد سرطانی داشته باشد طی چند سال اخیر به شدت بررسی شده است [۲۵]. اثرات زیستی و سمی یون‌های فلزی به دلیل برقراری پیوند یا برهم‌کنش آن‌ها با بازهای آلی موجود در ساختار DNA سلول هدف یا سرطانی است. جیوه در بین فلزات سنگین اثر سمی سلولی بسیار زیادی دارد [۲۶]. گزارش شده است که یون فلزی جیوه با قرار گرفتن در حضور DNA دو رشته‌ای و با جایگزین شدن پیوند هیدروژنی بین بازهای آلی تیمین (T) موجود در ساختار DNA، جفت باز $T-Hg^{2+}-T$ را تشکیل می‌دهد [۲۵].

هدف این مطالعه ساخت نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه به منظور جایگزینی آن به جای استفاده مستقیم از یون فلزی جیوه و بررسی اثرات زیستی و سمی آن‌ها در سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی مغز استخوان است. در این مقاله برای نخستین بار از توانایی یک بستر معدنی مانند نانوذرات γ -آلومینا برای حمل یون‌های جیوه به منظور پیوند به باز آلی تیمین در DNA سلول هدف استفاده شد. الگوی XRD برای تأیید پیوند بین نانوذرات آغشته به جیوه و باز آلی تیمین به کار گرفته شد. با توجه به اینکه سطح نانوذرات γ -آلومینا غنی از گروه‌های هیدروکسیل است، یون جیوه به راحتی می‌تواند به گروه‌های هیدروکسیل سطح آلومینا متصل شود. از این رو، نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه به جای یون جیوه آزاد می‌تواند سبب کاهش آلودگی‌های زیستی شود.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و تجهیزات

برای ساخت نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه، پودر نانوذرات γ -آلومینا از شرکت US Research Nanomaterials، استات جیوه (II) و حلال ایزوپروپانول از شرکت مرک خریداری شد. برای شناسایی ساختار نانوذرات از دستگاه پراش پرتو ایکس

بررسی توانایی اتصال نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه به باز آلی تیمین

برای بررسی توانایی پیوند نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه به باز آلی تیمین در DNA، مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول $10^{-5} \times 8$ مولار تیمین در حلال DMSO تهیه و در مجاورت ۰٫۲ گرم نانوذره γ -آلومینای آغشته به جیوه سنتزی به مدت یک ساعت در دمای اتاق با ۳۰۰۰ دور بر دقیقه با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس، نانوذرات موجود در نمونه با دستگاه گریزان^{۱۲} با دور ۱۵۰۰۰ بر دقیقه جداسازی و در دمای اتاق خشک شد.

روش تهیه محیط کشت سلول

۱۰۴ گرم پودر RPMI، ۲ گرم پودر سدیم بی کربنات (NaHCO_3) و نیز ۱۰ میلی لیتر مخلوط $100 \times X$ آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین با آب یون زوده به حجم یک لیتر رسانده شد (غلظت نهایی پنی سیلین $100 \mu\text{g/ml}$ و استرپتومایسین $100 \mu\text{g/ml}$ است) و با همزن مغناطیسی به خوبی مخلوط، سپس pH آن در حد ۷٫۲ تنظیم شد. در مرحله بعدی، محیط کشت بالا برای سترون شدن در زیر هود به کمک سرنگ ۲۰ میلی لیتری از فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ عبور داده شد و در داخل بطری های سترون با در پیچی تقسیم شد.

نوب کردن سلول های منجمد شده ی سلول سرطانی هلا

برای کشت سلول منجمد شده به ترتیب زیر عمل شد:

۱- نیم ساعت پیش از شروع کار، محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰٪ و RPMI بدون سرم بیرون از یخچال گذاشته شد تا به دمای محیط برسد.

۲- حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد آماده شد.

۳- کرایوتیوب حاوی سلول هلا از تانک ازت خارج و پس از انتقال آن به داخل حمام آب گرم ذوب شد.

۴- پس از ذوب شدن، بر میز تمیز و در شرایط سترون محتویات کرایوتیوب سریع به داخل لوله سترون که حاوی محیط کشت

(XRD) مدل D8-Advance ساخت شرکت Bruker و برنامه X-Pert-HighScore-Plus استفاده شد.

برای آزمایش سمیت سلولی، سلول های هلا^۱ خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد C572، سلول های بنیادی مغز استخوان موش سوری نوع NMRI^۲، اهدایی دانشکده زیست دانشگاه دامغان استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه از شرکت SCP^۳ تهیه شد. محیط کشت RPMI^۴ از شرکت Gibco، سرم جنین گاوی (FBS)^۵ از شرکت Biochrom و دی متیل سولفوکسید (DMSO)^۶ از شرکت سیگما-آلدریج خریداری شد. برای سترون^۷ کردن ابزار پزشکی و آزمایشی از اتوکلاو ساخت شرکت Melag-Germany و برای فراهم کردن شرایط مناسب (کنترل رطوبت، دما، اکسیژن و کربن دی اکسید) برای رشد سلول زنده از گرم خانه New Brunswick^۸ استفاده شد. برای شمارش سلول از لام نئوبار^۹ آلمانی، رنگ تریپان به لو سیگما، شمارنده دستی سلول ایرانی و میکروسکوپ نوری معمولی Ziess-Germany استفاده شد.

ساخت نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه

برای تهیه نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه از روش آغشته سازی^{۱۰} استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ۰٫۲ گرم جیوه استات در بشر ریخته، سپس، ۲۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۲۰ میلی لیتر ایزوپروپانول افزوده و تا حل شدن کامل جیوه استات به هم زده شد. سپس، ۴ گرم نانوذره γ -آلومینا به این محلول افزوده (نسبت ۱ به ۲۰ جیوه استات به آلومینا معادل نسبت مولی ۱ به ۱۳۱ جیوه به آلومینیم). برای به هم خوردن محلول ها از دستگاه همزن مغناطیسی استفاده شد. درجه چرخش دستگاه همزن مغناطیسی بر ۳۰۰۰ دور بر دقیقه تنظیم و آزمایش به مدت یک ساعت در دمای اتاق انجام شد. برای جداسازی رسوب نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه موجود در محلول از پمپ خلأ و قیف شیشه ای^{۱۱} متخلخل استفاده شد. رسوب به دست آمده با آب مقطر شسته و در دمای اتاق خشک شد.

1. Hela cells 2. Naval Medical Research Institute (NMRI) 3. Standard containers packaging 4. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 5. Fetal Bovine Serum (FBS) 6. Dimethylsulfoxide (DMSO) 7. Sterile 8. Incubator 9. Neubauer 10. Impregnation 11. Sinter glass filter 12. Centrifuge

روی سلول‌ها و خالی کردن دوباره آن با فشار بر کف فلاسک، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا و در محیط شناور شدند. پس از چند بار تکرار این عمل و معلق شدن سلول‌ها، تعلیق سلول‌ها به درون لوله با در پیچی حاوی ۲ تا ۳ میلی‌لیتر محیط کشت دارای سرم منتقل شد. ۱۰ میکرولیتر آن برای شمارش برداشته و لوله در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه گریزانه شد. ۲- تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده مشخص شد. ۳- مشخصات سلول‌ها شامل نام سلول، درصد سلول‌های زنده، تاریخ فریز و نام فرد فریزکننده با ماژیک بر کرایوتیوب نوشته شد. ۴- محلول رویی سلول‌های گریزانه شده خارج و بر رسوب سلولی آن‌ها محیط ویژه فریز سلول که شامل ۹۰ درصد FBS و ۱۰ درصد DMSO بود، قطره‌قطره افزوده و مخلوط شد به گونه‌ای که در یک میلی‌لیتر از محلول بالا، حداقل $10^6 \times 1-2$ سلول قرار گیرد.

۵- کرایوتیوب‌های حاوی سلول، در داخل ظرف ویژه حاوی ایزوپروپانول قرار گرفت و سریع به درون فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از ۲۴ ساعت به تانک ازت مایع منتقل شدند.

بررسی سمی بودن سلولی ۷- آلومینای خالص و ۷- آلومینای آغشته به جیوه با آزمون MTT

برای بررسی سمی بودن سلولی^۱ نانوذرات ۷- آلومینای خالص و نانوذرات ۷- آلومینای آغشته به جیوه از رده سلولی سرطان هلا و روش MTT^۲ (۳-۵،۴-دی متیل تiazول-۲-ایل)-۵،۲-دی فنیل تترازولیم برمید) استفاده شد. برای این کار، در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حدود ۱۰۰۰۰ سلول کشت شد. پس از ۲۴ ساعت نانوذرات ۷- آلومینا با غلظت‌های نهایی ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و $1000 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ (میکروگرم در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت) به چاهک‌ها با تکرار سه‌تایی افزوده و در فاصله زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بر رده سلول سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با قراردادن سلول‌ها در

فاقد سرم (دو برابر حجم کرایوتیوب) بود، منتقل شد. پس از مخلوط کردن محتویات کرایوتیوب با محیط کشت بدون سرم با پاییت درب لوله را در شرایط سترون بسته و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه گریزانه قرار داده شد.

۵- پس از جداسازی DMSO با گریزانه، محلول رویی بیرون ریخته و بر رسوب سلول‌ها برپایه مقدار سلول‌های زنده، محیط RPMI حاوی FBS ۱۰٪ افزوده شد.

۶- وضعیت سلول‌ها در روزهای بعدی به‌طور مداوم بررسی و پس از سومین پاساژ سلول‌ها سمیت‌سنجی شدند.

شمارش سلول‌ها و تعیین درصد سلول‌های از بین رفته (الف) شمارش سلول‌ها با لام نفوبار انجام شد (معادله ۱).

تعداد سلول‌های شمارش شده = تعداد کل سلول‌ها

$$\times 10^4 \times \text{عکس ضریب رقت} \times$$

$$\times \text{حجم محیط حاوی سلول (ml)} \times$$

(۱)

(ب) تعیین درصد سلول‌های از بین رفته (معادله ۲).

$$\times 100 \times \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول}} = \text{درصد از بین رفتن سلول‌ها}$$

تعداد کل سلول

(۲)

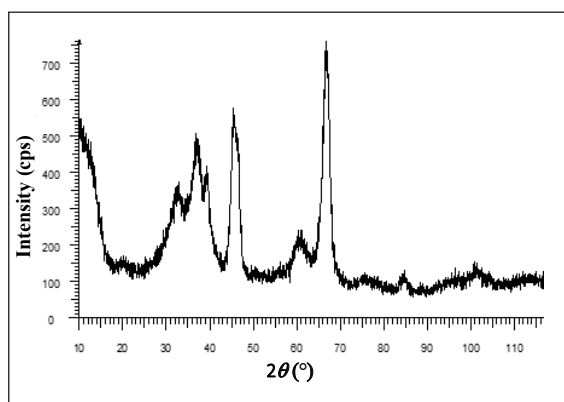
انجماد سلول

در طول فرایند کشت سلول بایستی رده‌های سلولی پی‌درپی منجمد شوند، زیرا ممکن است عواملی از قبیل آلودگی و غیره باعث از بین رفتن رده‌های سلولی شوند. بنابراین، برای این کار بهتر است سلول‌ها به تعداد $10^6 \times 1-2$ در هر ویال کرایوتیوب با درصد زنده‌بودن ۹۰ تا ۹۵٪ فریز شوند. انجماد سلول‌ها با روش زیر انجام شد:

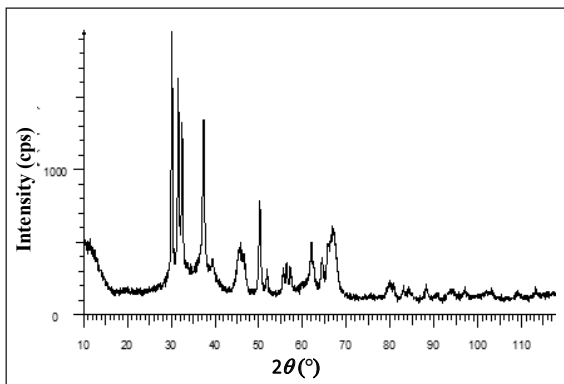
۱- پس از خالی کردن محتویات محیط کشت فلاسک سلولی و افزودن ۲ تا ۳ میلی‌لیتر تریپسین با پرکردن پیپت پاستور از محیط

1. Cytotoxicity 2. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide

نانوذرات γ -آلومینا به صورت برگشت‌ناپذیر از سفید به زرد تغییر کرد. جذب یون فلزی جیوه بر سطح نانوذرات γ -آلومینا با الگوی XRD تأیید شد. الگوی XRD نانوذرات آلومینا پیک‌های شدید مربوط به فاز γ -آلومینا در 32° ، 37° ، 39° ، 46° ، 60° ، 67° و 76° و 84° درجه را نشان می‌دهد (شکل ۱). شکل ۲ الگوی XRD ثبت‌شده برای نانوذرات آلومینای آغشته به جیوه را نشان می‌دهد. ظهور تعدادی پیک جدید در ناحیه 30° تا 35° درجه نشان‌دهنده جذب یون‌های جیوه بر سطح نانوذرات γ -آلومینا است (شکل ۱).



شکل ۱ الگوی XRD نانوذرات γ -آلومینا



شکل ۲ الگوی XRD نانوذرات γ -آلومینا آغشته به جیوه

پیک‌های اصلی نمونه ستر شده نانوذرات γ -آلومینای آغشته

گرم‌خانه 37° درجه سانتی‌گراد تأثیر داده شد. سپس، 10 میکرولیتر از محلول رنگی MTT به داخل هر چاهک افزوده و به مدت 4 ساعت سلول‌ها در گرم‌خانه نگه داشته شدند. سپس، محیط کشت حاوی محلول MTT از داخل چاهک‌ها حذف و 20 میکرولیتر محلول حلال بلور (DMSO) به هر چاهک افزوده شد. جذب نوری (OD) به‌دست آمده از نانوذرات γ -آلومینا خالص و نمونه ستر شده γ -آلومینای آغشته به جیوه در طول موج 570 نانومتر پس از 20 دقیقه اندازه‌گیری شد. در این آزمایش سلول‌های هلا بدون تأثیر نانوذرات و سلول‌های هلا تحت تأثیر γ -آلومینا فاقد جیوه به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی مراحل آزمایش 3 بار تکرار و درصد سمی بودن سلولی با معادله 3 محاسبه شد.

$$\text{میانگین جذب سمی بودن} = \frac{\text{درصد سمی بودن سلولی}}{\text{میانگین جذب کنترل}} \times 100 \quad (3)$$

تحلیل آماری

در این آزمایش، تحلیل آماری داده‌ها با نسخه 24 نرم‌افزار SPSS انجام و اطلاعات به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تفاوت معنی‌دار آماری بین γ -آلومینای خالص و γ -آلومینای آغشته به جیوه در سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی مغز استخوان و تفاوت معنی‌دار در هر غلظت Al+Hg نسبت به Al با آزمون تی مستقل ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

ساخت و شناسایی نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه در ابتدا نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه، با آغشته‌سازی نانوذرات γ -آلومینا با جیوه‌استات و آبکافت در مخلوط آب و ایزوپروپانول (نسبت حجمی ۱:۱) تولید شدند. در این فرایند رنگ

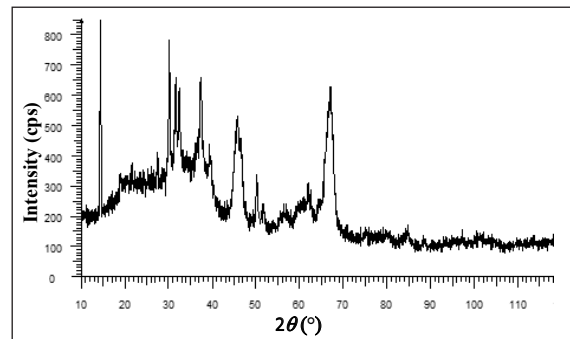
۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و $1000 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ بر مقدار مرگ سلول‌های سرطانی هلا به ترتیب به مقدار ۰، ۴، ۱۶، ۵۴، ۷۸، ۹۲، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب به مقدار ۴، ۱۲، ۲۴، ۶۵، ۸۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد پس از ۴۸ ساعت بوده است و اثرهای سمی بودن سلولی نانوذرات γ -آلومینای خالص که به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفته است، در غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و $1000 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ بر مقدار مرگ سلول‌های سرطانی هلا به ترتیب به مقدار ۰، ۰، ۴، ۱۱، ۲۷، ۵۶، ۷۳ و ۹۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب به مقدار ۰، ۳، ۷، ۱۵، ۳۲، ۶۸، ۸۴ و ۱۰۰ درصد پس از ۴۸ ساعت بوده است. شکل ۴، درصد از بین رفتن سلول‌های سرطانی هلا در نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و نانوذرات γ -آلومینای خالص پس از ۲۴ ساعت و شکل ۵، درصد از بین رفتن سلول‌های سرطانی هلا را در نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و نانوذرات γ -آلومینای خالص پس از ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه سمیت سلولی را افزایش داده و درصد بیشتری سلول سرطانی را از بین می‌برد و این سمیت به شدت به فلز جیوه وابسته بوده است.

سنجش سمی بودن نانوذرات آلومینای آغشته به جیوه با آزمون

MTT بر سلول‌های بنیادی مغز استخوان

آزمون *MTT* بر سلول‌های بنیادی مغز استخوان هم انجام شد. اثرات سمی بودن سلولی نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه در غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و $1000 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ بر مقدار مرگ سلول‌های بنیادی مغز استخوان به ترتیب به مقدار ۰، ۳، ۲۱، ۴۷، ۷۲، ۹۲، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب به مقدار ۰، ۷، ۳۰، ۵۸، ۸۵، ۹۷، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد پس از ۴۸ ساعت بوده است. اثرات سمیت سلولی نانوذرات γ -آلومینای خالص در غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و $1000 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ بر مقدار مرگ سلول‌های بنیادی مغز استخوان به ترتیب به مقدار ۰، ۰، ۰، ۶، ۲۵، ۵۷، ۸۲ و ۹۷ درصد پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب به مقدار ۰، ۰، ۰، ۷،

به جیوه با الگوی پراش پرتو ایکس به دست آمده از کتابخانه نرم‌افزار Expert، برای γ -آلومینا (Al_2O_3) و جیوه‌اکسید (Hg-O) با شماره کارت‌های ICDD '00-004-0858 و 01-072-1141 مطابقت دارد. از الگوی XRD برای تأیید پیوند بین نانوذرات آغشته به جیوه و باز آلی تیمین در DNA سلول هدف استفاده شد. شکل ۳ الگوی XRD نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه پس از پیوند به باز آلی تیمین را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، در گستره 2θ از ۱۰ تا ۳۰ درجه پهن‌شدگی به وجود آمده است و چهار پیک اصلی مولکول تیمین در این ناحیه ظاهر شده‌اند (۱۴، ۱۹، ۲۱ و ۲۷ درجه).



شکل ۳ الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه پس از پیوند به باز آلی تیمین

بر اساس مطالعات پیشین در مورد پیوند یون‌های فلزی به سطح آلومینا [۱۴ تا ۲۰] و همچنین، پیوند یون فلزی جیوه به بازهای تیمین [۲۵]، پیش‌بینی می‌شود که یون فلزی جیوه از یک طرف به سطح نانوذرات آلومینا و از طرف دیگر، به باز آلی تیمین موجود در ساختار DNA کتوردینه شود و به صورت آزاد در محیط وجود نداشته باشد.

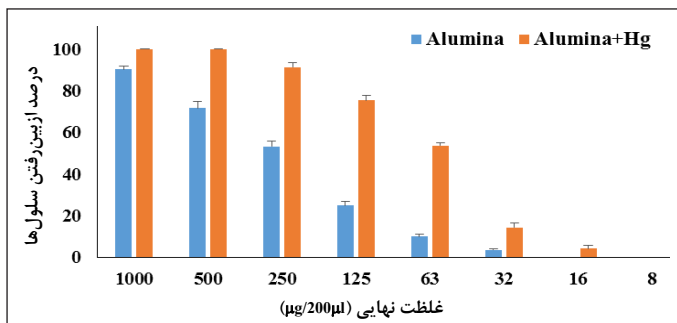
سنجش سمی بودن نانوذرات آلومینای آغشته به جیوه با آزمون

MTT بر سلول‌های سرطانی هلا

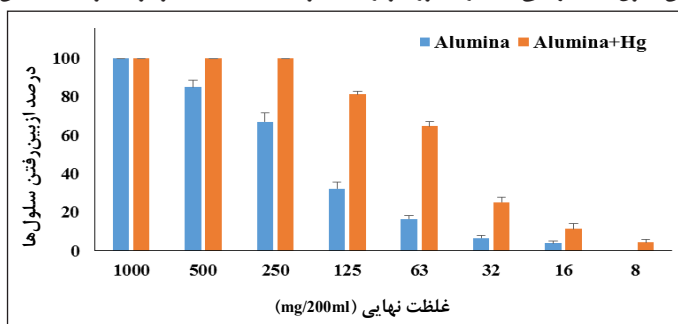
نتایج آزمون *MTT* نشان داد، اثرهای سمی سلولی نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه در غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۳،

1. International center for diffraction data

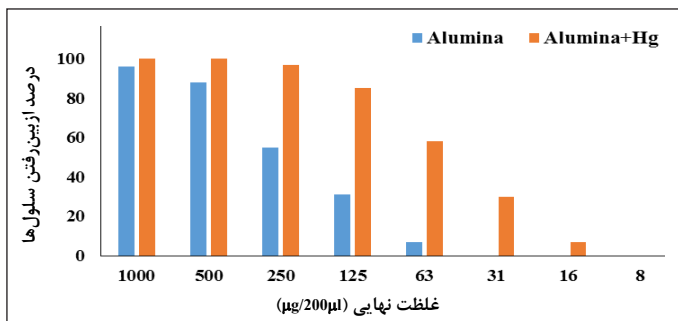
۳۱، ۵۵، ۸۸ و ۹۶ درصد پس از ۴۸ ساعت بوده است. شکل‌های ۶ و ۷-آلومینای آغشته به جیوه و نانوذرات γ -آلومینای خالص پس از ۲۴ ساعت، ۷ درصد از بین رفتن سلول‌های بنیادی مغز استخوان را در نانوذرات و ۴۸ ساعت نشان می‌دهند.



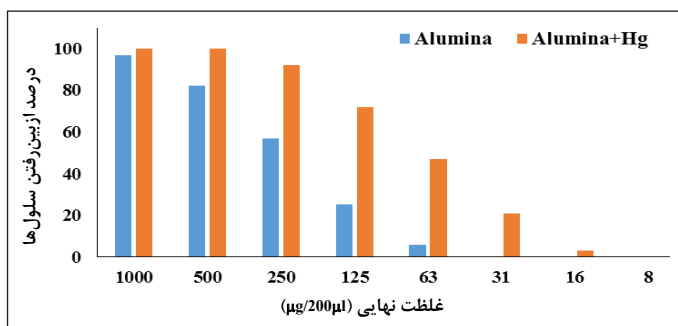
شکل ۴ درصد از بین رفتن سلول‌های سرطانی هلا در حضور نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و γ -آلومینای خالص پس از ۲۴ ساعت



شکل ۵ درصد از بین رفتن سلول‌های سرطانی هلا در حضور نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و γ -آلومینای خالص پس از ۴۸ ساعت



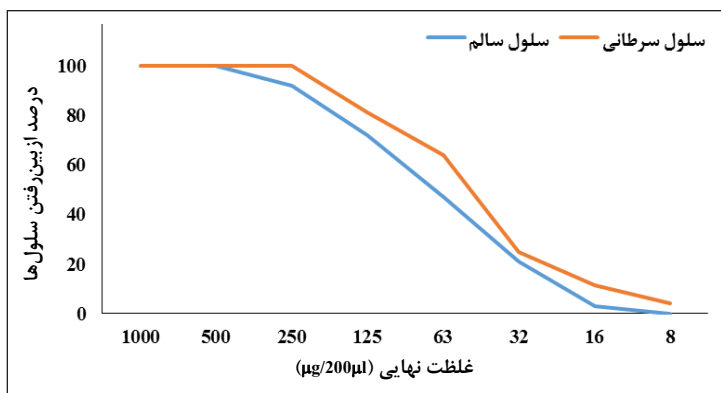
شکل ۶ درصد از بین رفتن سلول‌های بنیادی مغز استخوان در مجاورت نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و γ -آلومینای خالص پس از ۲۴ ساعت



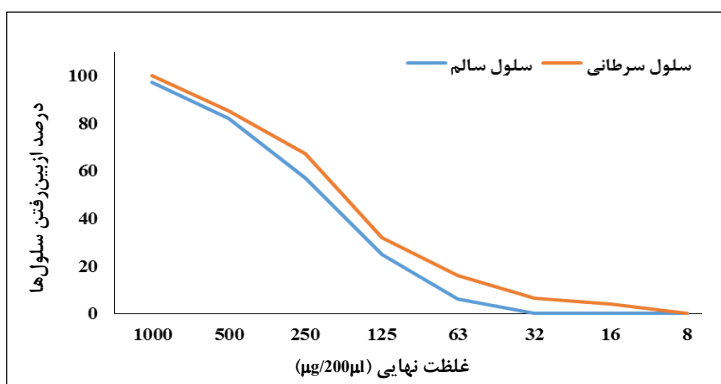
شکل ۷ درصد از بین رفتن سلول‌های بنیادی مغز استخوان در حضور نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و γ -آلومینای خالص پس از ۴۸ ساعت

به دست آمد و در مجاورت این نانوذرات سلول‌های سرطانی بیشتری از بین رفت. همچنین، با آزمون تی مستقل نشان داده شد که تفاوت معناداری بین γ -آلومینای خالص و γ -آلومینای آغشته به جیوه در سلول‌های سرطانی هلا و بنیادی مغز استخوان در ۲۴ ساعت وجود دارد (جدول ۱).

شکل‌های ۸ و ۹ سمی بودن نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه و γ -آلومینای خالص در سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی مغز استخوان را در ۴۸ ساعت نشان می‌دهند. براساس این نتایج سمیت نانوذرات γ -آلومینای خالص و γ -آلومینای آغشته به جیوه بر سلول‌های سرطانی هلا بیشتر از سلول‌های بنیادی



شکل ۸ سمی بودن نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه در سلول‌های بنیادی و سرطانی



شکل ۹ سمی بودن نانوذرات γ -آلومینای خالص در سلول‌های بنیادی و سرطانی

جدول ۱ تفاوت معنادار آماری بین γ -آلومینای خالص و γ -آلومینای آغشته به جیوه از راه آزمون تی مستقل ($P < 0.05$)

P	انحراف معیار	میانگین	تعداد	نوع ماده		
				آلومینا	درصد از بین رفتن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت	سلول سرطانی
۰,۰۴	۳۳,۹۴	۳۱,۷۵	۲۴	آلومینا	درصد از بین رفتن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت	سلول سرطانی
	۴۱,۲۵	۵۴,۸۸	۲۴	آلومینا+جیوه		
۰,۰۳	۳۸,۵۷	۳۴,۶۳	۲۴	آلومینا	درصد از بین رفتن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت	سلول سالم
	۴۰,۳۹	۵۹,۶۳	۲۴	آلومینا+جیوه		

به جیوه سمیت سلولی را افزایش داده و درصد بیشتری سلول سرطانی را از بین برد. سمیت نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه بر سلول‌های سرطانی هلا در ۴۸ ساعت بیشتر از سلول‌های بنیادی به دست آمد. همچنین، مشخص شد نانوذرات γ -آلومینای خالص در غلظت‌های پایین نسبت به آلومینای آغشته به جیوه، کمتر سمی هستند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه دامغان کمال سپاس و قدردانی را دارند.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه در این پژوهش، نانوذرات γ -آلومینای آغشته به جیوه با استفاده از روش آغشته‌سازی نانوذرات γ -آلومینا با جیوه‌استات در محلول آب و ایزوپروپانول تهیه و ساختار آن با استفاده از الگوی XRD بررسی شد. از الگوی XRD برای تأیید اتصال بین نانوذرات آغشته به جیوه و باز آلی تیمین در DNA سلول هدف استفاده شد. اثرات سمیت نانوذرات γ -آلومینا و γ -آلومینای آغشته به جیوه بر سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های بنیادی مگر استخوان با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده، نانوذرات γ -آلومینای آغشته

مراجع

- [1]* نصیری، رها؛ زارع کاریزی، شهره؛ حیاتی‌رودباری، نسیم؛ فرهادیار، نازین؛ مجله سلول و بافت، شماره ۳، ۲۰۲-۲۹۴، ۱۳۹۶.
- [2] Hembruff, S.L.; Cheng, N.; *Cancer Therapy* 7, 254-267, 2009.
- [3] Golfinopoulos, V.; Pentheroudakis, G.; Pavlidis, N.; *Cancer Treatment Reviews* 1, 1-8, 2006.
- [4] Ediriwickrema, A.; Saltzman, W.M.; *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2, 64-78, 2015.
- [5] Ghaz-Jahanian, M. A.; Abbaspour-Aghdam, F.; Anarjan, N.; Berenjjan, A.; Jafarizadeh-Malmiri, H.; *Molecular Biotechnology* 3, 201-218, 2015.
- [6] Das, S.; Dowding, J. M.; Klump, K.E.; McGinnis, J.F.; Self, W.; Seal, S.; *Nanomedicine* 9, 1483-1508, 2013.
- [7] Celardo, I.; Pedersen, J. Z.; Traversa, E.; Ghibelli, L.; *Nanoscale* 4, 1411-1420, 2011.
- [8] Fujishima, F.; *A Revolution in Cleaning Technology* 12, 14-21, 1999.
- [9] Huang, N.P.; Min-hua, X.; Yuan, C.W.; Ruirong, Y.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2-3, 229-233, 1997.
- [10] Zhang, A. P.; Sun, Y.P.; *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 21, 3191, 2004.
- [11]* سلیمانی درچه، صفورا؛ جلال، راضیه؛ کفشداری‌گوهرشادی، الهه؛ چهارمین کنگره آزمایشگاه و بالین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳۰ آذر لغایت ۲ دی ۱۳۹۰.
- [12] Fiorillo, M.; Verre, A.F.; Iliut, M.; Peiris-Pagés, M.; Ozsvari, B.; Gandara, R.; Cappello, A.R.; Sotgia, F.; Vijayaraghavan, A.; Lisanti, M.P.; *Oncotarget* 6, 3553-3562, 2015.
- [13] Dong, E.; Wang, Y.; Yang, S.T.; Yuan, Y.; Nie, H.; Chang, Y.; Wang, H.; *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9, 7848-7856, 2011.
- [14] Tabesh, S.; Davar, F.; Loghman-Estarki, M.R.; *Journal of Alloys and Compounds* 730, 441-449, 2018.
- [15] Liu, Y.; Cen, W.; Feng, G.; Chu, Y.; Kong, D.; Yin, H.; *Applied Surface Science* 313,

- 424-431, 2014.
- [16] Louwse, M. J.; Rothenberg, G.; ACS Catalysis 7, 1545-1554, 2013.
- [17] Mager-Maury, C.; Chizallet, C.; Sautet, P.; Raybaud, P.; ACS Catalysis 7, 1346-1357, 2012.
- [18] Geng, L.; Han, L.; Cen, W.; Wang, J.; Chang, L.; Kong, D.; Feng, G.; Applied Surface Science 30-37, 2014.
- [19] Deng, H.; Yu, Y.; Liu, F.; Ma, J.; Zhang, Y.; He, H.; ACS Catalysis 8, 2776-2784, 2014.
- [20] Zamani, M.; Dabbagh, H. A.; Iranian Journal of Catalysis 4, 345-353, 2016.
- [21] Zamani, M.; Delfani, A.M; Jabbari, M.; Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 201, 288-299, 2018.
- [22] Wang, Y.; Santos, A.; Kaur, G.; Evdokiou, A.; Losic, D.; Biomaterials 21, 5517-5526, 2014.
- [23] Wagenknecht, H.A.; Angewandte Chemie International Edition 28, 3204-3206, 2007.
- [24] Scharf, P.; Müller, J.; Chem. Plus. Chem. 1, 20-34, 2013.
- [25] Morris, D.L.; Biomolecular Concepts 5, 397-407, 2014.
- [26] Steffensen, I.L.; Mesna, O.J.; Andruchow, E.; Namork, E.; Hylland, K.; Andersen, R.A.; General Pharmacology: The Vascular System. 8, 1621-1633, 1994.

Study of biological effects and toxicity of mercury impregnated γ -alumina nanoparticles in Hella cancer cells and stem cells

N. Soheyli Arshadi¹, A.A. Mokhtarieh², M. Zamani^{3,*}

1. M.Sc. of organic chemistry, School of Chemistry, Damghan University, Damghan, Iran
2. Assistant professor in Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
3. Assistant prof. in organic chemistry, School of Chemistry, Damghan University, Damghan, Iran

Received: December 2018, Revised: October 2019, Accepted: September 2019

Abstract: In this article, the mercury-impregnated γ -alumina nanoparticles were prepared using impregnation of γ -alumina nanoparticles with mercury acetate into the solution of water/isopropanol, followed by hydrolysis, washing, filtration, and drying at the room temperature. The structure of these nanoparticles were studied using X-ray diffraction (XRD) pattern. The XRD pattern was used to confirm the binding between mercury impregnated nanoparticles and thymine organic base in the DNA of target cell. The biological effects and toxicity of γ -alumina and mercury impregnated γ -alumina nanoparticles on the cancer cells (Hella) and bone marrow stem cells were examined using the MTT test. Based on the results, the toxicity of the mercury impregnated γ -alumina nanoparticles on Hella cancer cells was found to be higher than that of stem cells. In other words, the mercury impregnated γ -alumina nanoparticles had a significant effect on removing the Hella cancer cells. It was also found that in the lower concentrations, pure γ -alumina nanoparticles had lower toxicity than mercury impregnated alumina.

Keywords: Nanoparticle, Alumina, Mercury, Toxicity, MTT test