

Preparation and Biological Investigation of Iron Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan/Alginate Biopolymer (Fe₃O₄/Alg/CS)

Elham Rostami ^{1*} , Elham Howezi ² 

¹ Dept of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Dept of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 22 August 2022

Revised: 29 November 2022

Accepted: 17 January 2023

Published Online: 24 May 2023

* Correspondence to:

Elham Rostami

Dept of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email:

e.rostami@scu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Today, cancer is one of the health concerns in modern societies. The use of nanoparticles in diagnosis, drug delivery, imaging, and cancer treatment has received much attention in medical sciences. The most important problem when treating cancer with chemotherapy is the lack of access to the central parts of the mass due to its less blood supply. This study aimed to investigate the toxicity of iron oxide nanoparticles coated with biopolymer chitosan/alginate on melanoma cancer cells (Hep G2 cells).

Material & Methods: In this research, magnetic iron nanoparticles were coated with two biopolymers, namely chitosan and alginate. The size and surface morphology of these nanoparticles were checked by size measuring device and scanning electron microscope. Moreover, the binding of functional groups of chitosan and alginate to iron magnetic nanoparticles was checked by an infrared spectrometer. In this study, magnetic iron nanoparticles and modified nanoparticles were treated for 24 hours and the IC₅₀ concentration of the compounds was estimated. The toxic properties of these nanoparticles were evaluated by MTT test and acridine orange/ethidium bromide staining.

Findings: After examining the photos of the scanning electron microscope and the size measuring device, the size of 50 nanometers was shown for the modified iron nanoparticles, and the shape of these nanoparticles was observed to be completely round and spherical.

Discussion & Conclusion: The findings from the investigations of binanoparticles definitely confirmed the effective coating of nanoparticles by chitosan and alginate biopolymers. Furthermore, the findings showed that magnetic iron nanoparticles had higher toxic effects depending on the concentration and their IC₅₀ concentration was about 134 μM/ml, while the coated nanoparticles had significantly lower toxic effects and did not have significant toxicity on Hep G2 cells at concentrations below 25 μM/ml. The coating of iron oxy nanoparticles significantly reduces their toxicity concentration.

Keywords: Biopolymer, Cell toxicity, Chitosan, Drug Delivery, Magnetic nanoparticles

➤ How to cite this paper

Rostami E, Howezi E. Preparation and Biological Investigation of Iron Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan/Alginate Biopolymer (Fe₃O₄/Alg/CS). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(2): 31-41.



تهیه و بررسی زیستی نانوذرات مغناطیسی آهن پوشش داده شده با بیوپلیمر کیتوسان / آلژینات (Fe₃O₄/Alg/CS)

الهام رستمی^{۱*} ID، الهام حویزی^۲ ID

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۰۳

نویسنده مسئول:

الهام رستمی

گروه شیمی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز،
ایران.

Email:

e.rostami@scu.ac.ir

مقدمه: امروزه سرطان یکی از نگرانی‌های بخش سلامت در جوامع مدرن است. کاربرد نانو ذرات در علم پزشکی امکانات جدیدی را برای تشخیص، انتقال دارو، تصویربرداری تومور و درمان سرطان در انسان ایجاد نموده است. مهم‌ترین مشکل در درمان سرطان به وسیله شیمی‌درمانی، عدم دسترسی به قسمت‌های مرکزی توده به علت خون‌رسانی کمتر آن است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان سمیت نانوذره اکسید آهن با پوشش بیوپلیمر کیتوسان/آلژینات بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما (سلول‌های Hep G2) بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نانوذرات مغناطیسی آهن با دو بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آلژینات به نانو ذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز بررسی شد. در این بررسی، با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح‌شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و غلظت IC₅₀ ترکیبات تخمین زده شد. خاصیت توکسیک این نانوذرات با تست MTT و رنگ آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم پروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه اندازه‌گیری سایز، به خوبی سایز ۵۰ نانو متر برای نانوذرات آهن اصلاح‌شده را نشان داد و همچنین شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از بررسی‌های زیستی نانوذرات قطعاً تأیید کننده‌ی پوشش‌دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آلژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به‌طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود، در حالیکه نانوذرات پوشش‌دار شده به‌طور معنی‌داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار بر میلی‌لیتر به پایین توکسیسیته معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند. پوشش نانوذرات اکسی آهن به‌طور قابل ملاحظه‌ای، باعث کاهش غلظت سمیت آنها می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انتقال دارو، نانو ذرات مغناطیسی، سمیت سلولی، بیوپلیمر، کیتوسان

استناد: رستمی، الهام؛ حویزی، الهام. تهیه و بررسی زیستی نانوذرات مغناطیسی آهن پوشش داده شده با بیوپلیمر کیتوسان/آلژینات (Fe₃O₄/Alg/CS).

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۲؛ ۳۱(۲): ۳۱-۴۱.

نانوذرات به دلیل ویژگی منحصر به فرد نسبت سطح به حجم، باعث افزایش سطح تماس با بافت سرطانی می‌شوند. استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل می‌تواند باعث کاهش سمیت دارو شود. نانو ذرات به عنوان ذرات خیلی ریز با سایز بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف شده است (۱، ۲). سیستم‌های دارورسانی با نانو ذرات منجر به پایداری دارو، افزایش زمان ماندگاری در جریان خون، ارائه دوز کمتری از عوامل موثر شیمی‌درمانی و کنترل توزیع دارو را در داخل بدن فراهم می‌کند (۳، ۴). نانو ذرات مغناطیسی نتایج موفقیت‌آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده‌اند (۵). مطالعه‌هایی در زمینه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی و القای حرارت برای از بین بردن سلول‌های سرطان پستان انجام شده است، که نتایج موفقیت‌آمیزی را نشان داده است (۶، ۷). از نانو ذرات مغناطیسی همچنین برای انتقال داروهای شیمی‌درمانی به سرطان پستان استفاده شده است. امروزه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه‌های مختلف پزشکی برای تصویربرداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه‌های مختلف نانو تکنولوژی، فراماسیوتیکس و دارورسانی هدفمند، بحث سمیت این نانوذرات مطرح است. به دلیل کاربردهای متنوع و گسترده این نانوذرات، زمینه بررسی مطالعات سمیت آنها از درجه اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان کاربرد نانو اکسیدهای فلزی به عنوان حامل داروهای ضدسرطان به خوبی مشهود است. نانو ذرات اکسید آهن، روی، مس و آلومینا بهترین مثال‌ها در این زمینه می‌باشند (۸-۱۰).

به منظور افزایش زیست‌سازگاری نانوذرات می‌توان از پوشش زیست‌دهی آنها توسط پلیمرهای سازگار استفاده کرد. پوشش‌دهی این نانوذرات، 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 (۱۱، ۱۲). در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به

کیتوسان، دکستران، پلی اتیلن اکسید، پلی وینیل الکل، پلی اتیلن گلیکول و ... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند (۱۳، ۱۴).

پوشش‌دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر کیتوسان و آلژینات نه تنها سبب بهبود سازگاری آنها می‌شود بلکه پلیمرها می‌تواند به عنوان محلی جهت بارگذاری دارو عمل کند. ساختار این پلیمر دارای گروه‌های آب دوست و آب گریز بوده و در نتیجه جهت حمل عوامل دارویی آب دوست و آب گریز 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 برای اتصال عوامل ردیاب یا عوامل هدفمندکننده عمل می‌کند (۱۲، ۱۳).

در سال ۲۰۱۸ فنگ و همکاران از پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین برای کاهش سمیت و افزایش زیست در دسترس‌پذیری نانوذرات آهن استفاده کردند (۱۴). در سال ۲۰۲۰ حسین‌بیگی و همکاران میزان سمیت نانوذرات اکسید آهن با پوشش پلی‌دوپامین و بدون پوشش پلی‌دوپامین روی سلول‌های سرطانی ملانوما B-16F-10 را بررسی کردند (۱۵). هدف از این تحقیق، بیان نگرانی‌هایی است که اخیراً در حوزه سلامت درباره سمیت نانو ذراتی که جهت انتقال دارو به کار می‌روند. بدین منظور کاهش سمیت نانوذرات آهن با استفاده از پوشش‌دهی آنها با پلیمر زیستی کیتوسان/آلژینات مورد بررسی قرار گرفت. پوشش‌دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر کیتوسان و آلژینات نه تنها سبب بهبود سازگاری آنها می‌شود، بلکه پلیمرها می‌توانند به عنوان جایگاهی جهت بارگذاری دارو عمل کنند. هدف از انجام این مطالعه در ابتدا پوشش‌دهی نانو ذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات و سپس بررسی سمیت این نانوذرات بر روی رده سلولی Hep G2 با استفاده از آزمون MTT و با رنگ آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه، ارزیابی و اصلاح سطحی نانوذرات مغناطیسی آهن: پلیمر کیتوسان و آلژینات از شرکت (Chem Lab) خریداری شد. نانو ذرات آهن از شرکت (نانوپیشگامان مشهد) تهیه شد. کلسیم کلرید، اسید استیک، دی متیل سولفو کسید و اسید کلریدریک از شرکت (Merck) خریداری شد. آب دیونیزه از شرکت (قطران اصفهان) تهیه گردید.

تهیه و کشت سلول‌های HepG2: در این مطالعه از سلول‌های سرطانی کبد تهیه شده از انستیتو پاستور استفاده شد. سلول‌های Hep G2 در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) در شرایط استاندارد دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ نگهداری و در حضور محیط کشت DMEM (GBCO, USA) و سرم گوساله ۱۰٪ (FBS, GIBCO, USA) و پنی سیلین-استرپتومایسین ۱٪ (Sigma, USA) کشت شدند. محیط کشت هر ۷۲ ساعت یکبار تعویض و سلول‌ها در تراکم ۸۰٪ با استفاده از تریپسین/EDTA (ایده زیست، ایران) پاساژ داده شدند (۱۶).

دستگاه طیف سنج مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR): دستگاه FTIR یا طیف سنج مادون قرمز از تجهیزات آزمایشگاهی برای دستیابی به طیف مادون قرمز جذبی یا نشری یک ماده جامد، مایع یا گاز است. از این دستگاه برای بررسی قرار گرفتن کیتوسان بر روی نانو آلومینا استفاده شد. مدل دستگاه MIRACEL 10 ساخت شرکت شیمادزو می‌باشد.

دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope - SEM): میکروسکوپ الکترونی روبشی، ابزاری ویژه برای تعیین ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می‌شود که مطالعات ریزساختاری مواد با قدرت تفکیک بالا و بزرگنمایی خیلی زیاد را امکان‌پذیر می‌نماید. این دستگاه جهت بررسی مورفولوژی و ساختار نانوذرات آلومینا استفاده گردید. مدل دستگاه Zeiss EM 10C-Germany می‌باشد. قبل از انجام آنالیز نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند. همچنین رنگ آمیزی توسط یورانیل استات به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. همچنین عکس‌ها از نمونه تازه تهیه

شده، گرفته شد (۱۷).

مشخصه‌یابی نانوذرات: جهت تهیه نانو ذرات آهن پوشش داده شده توسط محلول ۱۰ درصد کیتوسان / آلژینات، ابتدا محلول سدیم آلژینات و کلسیم کلرید با حل شدن در آب مقطر آماده می‌شود. pH محلول سدیم آلژینات با استفاده از محلول اسید کلریدریک در ۵/۱ تثبیت می‌گردد. ۰/۵ گرم کیتوسان در اسید استیک ۱٪ حل شده و با سود، pH به ۵/۴ رسانده می‌شود. این روش برای پوشش‌دهی نانوذرات مغناطیسی به کار می‌رود (۹). محلول آبی کلسیم کلرید به صورت قطره قطره به محلول سدیم آلژینات و نانو ذرات آهن در حال چرخش با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام می‌شود. سپس ۴ میلی‌لیتر از محلول کیتوسان به محلول کلسیم آلژینات و نانو ذرات آهن اضافه می‌گردد و به مدت ۲۴ ساعت همزده می‌شود.

بررسی بقای سلولی با تست MTT: سلول‌های Hep G2 در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهکی با تعداد حدود ده هزار سلول در هر خانه برای ۲۴ ساعت کشت شدند. سپس این سلول‌ها با غلظت ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات آهن (Fe_3O_4) و نانوذرات آهن پوشش‌دار شده با کیتوسان و آلژینات ($Fe_3O_4/Alg/CS$) برای ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلولی با روش MTT بعد از تیمار سلول‌ها از انکوباتور خارج و محیط تیمار و کنترل دور ریخته شد و با استفاده از بافر فسفات (PBS, Sigma, USA) شستشو شدند. سپس محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن محتویات رویی سلول‌ها دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (دی‌متیل سولفو کساید، مرک، آلمان) اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد پلیت تکان داده شده و جذب نوری با طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزابدر (Fax 2100, USA) خوانش و درصد بقای سلولی اندازه‌گیری شد (۱۸، ۱۹).

رنگ آمیزی گیمسا: به این منظور سلول‌های Hep G2

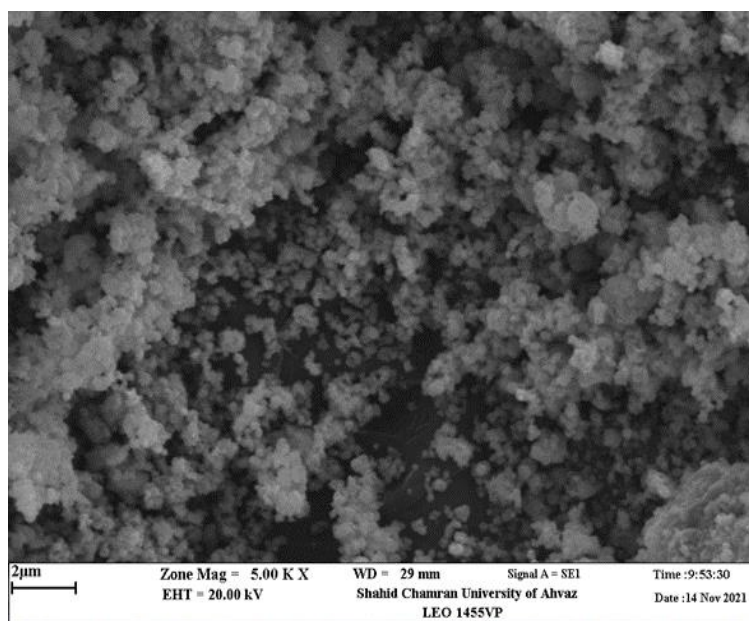
انجام گرفت.

یافته های پژوهش

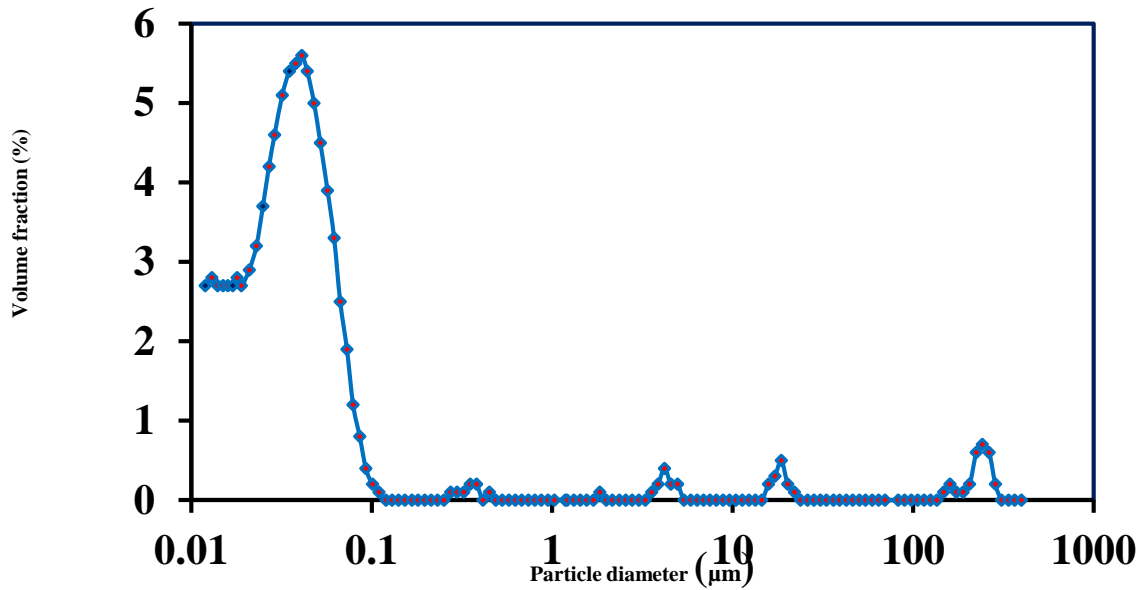
اندازه قطر نانو ذرات و مورفولوژی ذرات با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. بار سطحی نیز به صورت پتانسیل زتا بر حسب میلی ولت اندازه گیری شد. طیف سنجی مادون قرمز بر روی نانو ذرات مغناطیسی صورت گرفت. نتایج دستگاه اندازه گیری سایز نانو ذرات و میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل شماره ۱)، اندازه ۵۰ نانومتر برای نانو ذرات اصلاح شده را نشان داد. همان گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می شود نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، کاملاً گرد و کروی هستند که منجر به افزایش کاربرد گسترده ی آنها در مطالعات انتقال دارو می گردد. در شکل شماره ۲ به خوبی توزیع یکنواخت نانو ذرات و میزان فراوانی در اندازه ۵۰ نانومتر قابل مشاهده است.

در پلیت ۲۴ چاهکی کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت IC50 نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. به این منظور که ابتدا سلول‌ها در گروه‌های تیمار و کنترل با استفاده از متانول به مدت ۵ دقیقه تثبیت و سپس با استفاده از رنگ گیمسای ۴٪ برای ۲۰ دقیقه رنگ شده و زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند (۲۰).

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید: به این منظور سلول‌های Hep G2 در پلیت ۲۴ چاهکی کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت IC50 نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند (۲۰). سپس با استفاده از محلول آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus, Japan) بررسی و تصویربرداری



شکل شماره ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده



شکل شماره ۲. توزیع یکنواخت نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده

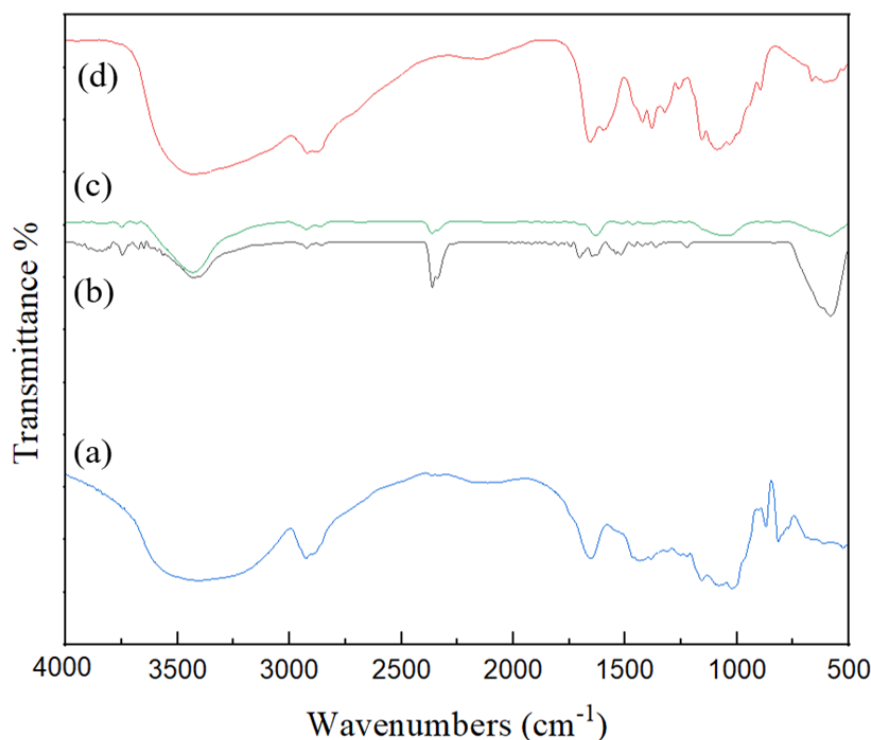
آمید I پیک بالای در حدود 1649 cm^{-1} نشان داد، در حالی که ارتعاش کششی آمید III C-N پیک کوچکتری را در 1324 cm^{-1} نشان داد. علاوه بر این، ارتعاش خمشی گروه CH_2 و ارتعاش کششی نامتقارن پیوند C-O-C به ترتیب در 1423 cm^{-1} و 1153 cm^{-1} یافت شد. ارتعاش کششی پیوند C-O پلیمر توسط دو قله برجسته در 1066 cm^{-1} و 1029 cm^{-1} شناسایی شد (۲۲-۲۴).

در طیف سدیم آلزینات، پیک در 3347 cm^{-1} به ارتعاش کششی OH نسبت داده می‌شود، نوارها در 1600 cm^{-1} و 1414 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن COO گروه نمک کربوکسیلات و پیک در 1103 cm^{-1} است. به ترتیب به ارتعاش کششی گروه‌های C-O-C اختصاص داده می‌شود.

در طیف (d) دیاگرام نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده آورده شده است. در این طیف همان‌گونه که مشاهده می‌شود تمامی پیک‌های مربوط به ۳ ماده قبل حضور دارند اما به علت اصلاح چند مرحله‌ای این پیک با شدت کمتری در محدوده‌های مورد نظر نسبت به پیک‌های مربوط به هر یک از این مواد وجود دارد.

طیف FT-IR نانوکامپوزیت $\text{Fe}_3\text{O}_4(a)$ ، Sodium alginate(c) و Chitosan(b) در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی یک پیک جذب را در $579,66\text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهد که می‌تواند به پیک اکسید فلزی نسبت داده شود، این پیک بیان‌کننده آن است که آهن عنصر اصلی سازنده نانوذرات است. همچنین پیک گسترده در محدوده $2500-3600\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده ارتعاشات پیوند هیدروژنی می‌باشد که متعلق به نانوذره سنتز شده است (۲۱).

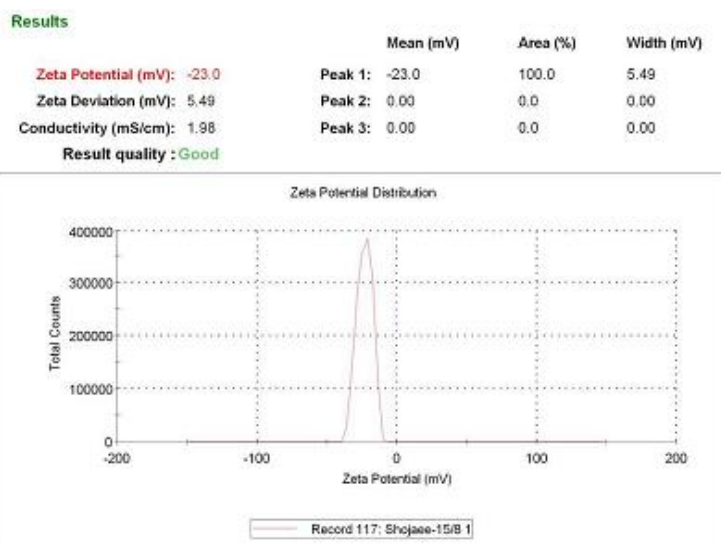
همانطور که مشاهده می‌شود در طیف (b)، ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H و همچنین پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی پلی‌ساکارید کیتوسان دارای نوار قوی و گسترده‌ای در محدوده 3000 cm^{-1} تا 3500 cm^{-1} هستند. علاوه بر این، وجود یک حلقه مونوساکاریدی با خم شدن باند C-H به خارج از صفحه در حدود 890 cm^{-1} شناسایی شد که به دو پیک جذب در حدود 2926 cm^{-1} و 2876 cm^{-1} برای ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن نسبت داده شد. پیوند C-H به ترتیب گروه کربونیل



شکل شماره ۳. طیف FT-IR نانو کامپوزیت (a) Fe_3O_4 ، (b) Chitosan، (c) Sodium alginate و (d) Sodium alginate-Chitosan@ Fe_3O_4

آلژینات در سطح نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده می‌باشد.

نتایج بررسی پتانسیل سطحی نانو ذرات نشان می‌دهد که بار سطحی -23 میلی ولت می‌باشد (شکل شماره ۴) که این خود دلیلی بر قرار گرفتن گروه‌های عاملی بیوپلیمر



شکل شماره ۴. پتانسیل سطحی نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده

انجام گرفت، نتایج این آزمون نشان داد که بقای سلول‌های Hep G2 بعد از تیمار با برخی از غلظت‌ها به صورت وابسته به غلظت و به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد. همانگونه که در شکل شماره ۵ ارائه شده،

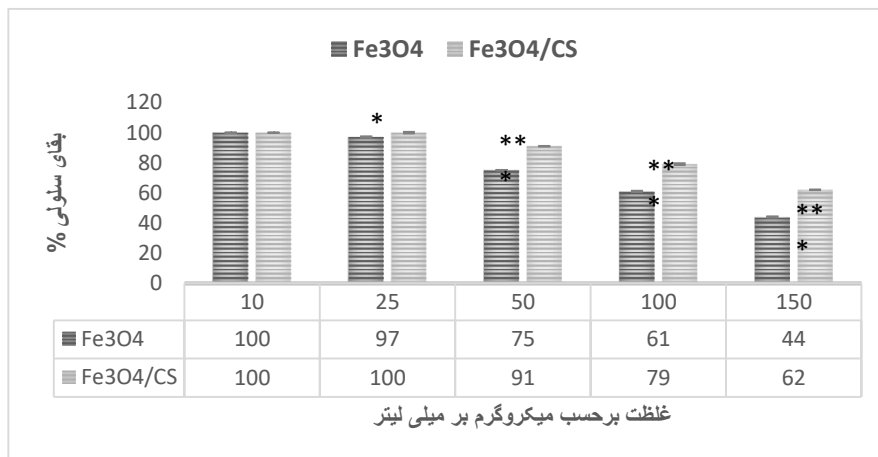
نتایج تست بقای سلولی: تست MTT برای ارزیابی اثرات نانو ذرات نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بر سلول‌های Hep G2 در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

نشان دهنده سمیت نانوذرات استفاده شده و پیشبرد مرگ سلول بود که البته این تغییرات در گروه نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده نسبت به گروه نانوذرات مغناطیسی آهن کمتر بود (شکل شماره ۶ تصاویر الف-ج).

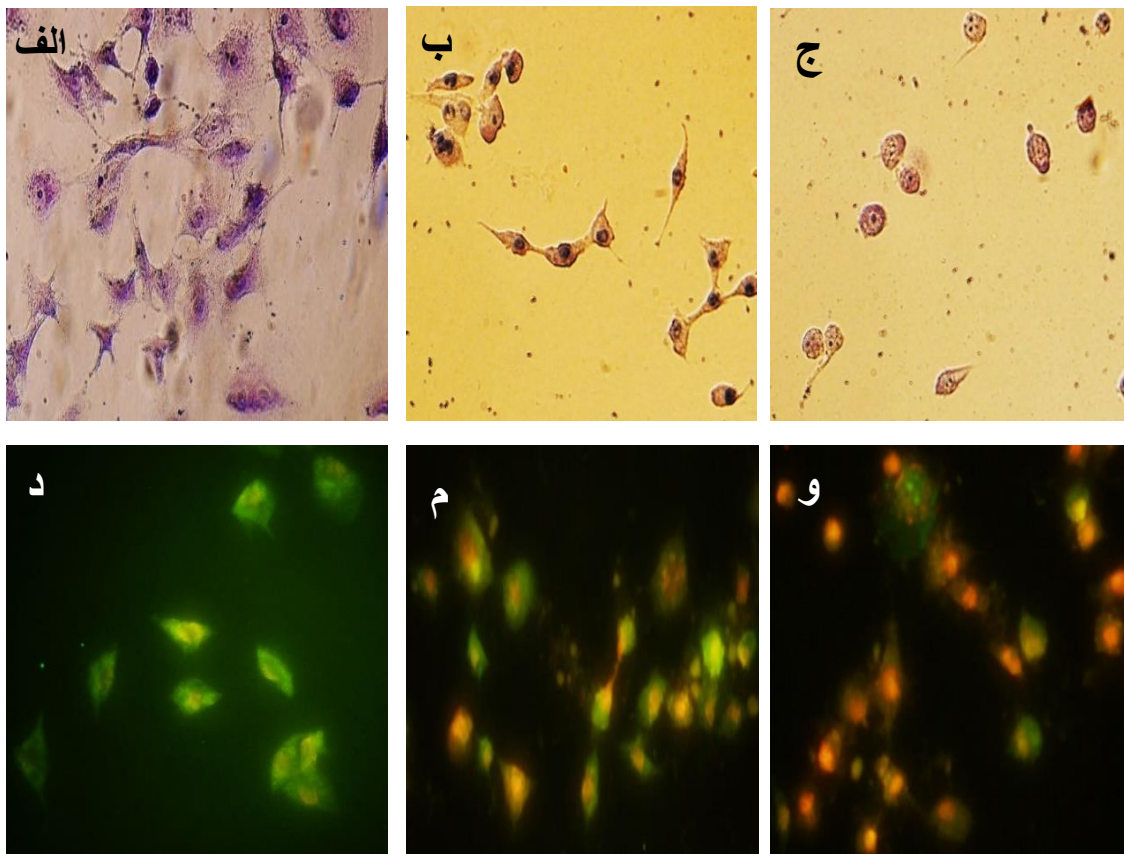
مشاهدات حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید: آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی دوگانه است که سبب رنگ سبز در سلول‌های زنده و رنگ نارنجی در سلول‌های آپوپتوزی در زیر میکروسکوپ می‌شود. در این پژوهش سلول‌های Hep G2 بعد از تیمار و انکوبه شدن به مدت ۲۴ ساعت با آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید رنگ شدند تا وضعیت آپوپتوز و زنده‌مانی آنها مشخص شود. در سلول‌های Hep G2 تیمار شده با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به صورت پراکنده و با تراکم کمتر مشاهده شدند (۲۰-۱۸). سلول‌های نمونه کنترل شفاف و سبز رنگ که نشان دهنده بقای آنها بود و سلول‌های تیمار یافته، به رنگ نارنجی بوده که نشان دهنده القای مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های تیمار شده بود. این مشاهدات در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات مغناطیسی آهن در مقایسه با گروه تیمار با نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بارزتر و چشم‌گیرتر بود (شکل شماره ۶ تصاویر د-و).

یافته‌ها نشان داد که میزان سمیت نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نانوذرات مغناطیسی آهن به صورت معنی‌داری کاهش یافته است، اما در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به هم و همچنین نمونه کنترل تفاوتی مشاهده نشد. همچنین غلظت IC₅₀ محاسبه شده نانوذرات مغناطیسی آهن بر سلول‌های Hep G2 در غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید که میزان بقای سلول‌های Hep G2 در این غلظت برای نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده حدود ۷۰ درصد تخمین زده شد (شکل شماره ۵).

مشاهده تغییرات مورفولوژی سلول‌ها: برای مشاهده تغییرات مورفولوژی سلول‌ها از رنگ آمیزی گیمسا و میکروسکوپ معکوس استفاده شد. ارزیابی تغییرات ظاهری سلول‌های Hep G2 نشان داد که سلول‌های Hep G2 تیمار شده با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده از نظر مورفولوژی با هم و با سلول‌های نمونه کنترل تفاوت چشم‌گیری نشان دادند. به طوری که در گروه‌های آزمایش انقباض و کاهش حجم سلولی، کاهش حجم سیتوپلاسم، چروکیدگی شدن هسته‌ها، از بین رفتن اتصالات و چسبندگی سلول‌ها و ایجاد سلول‌های منفرد و کروی‌تر مشاهده شد که



شکل شماره ۵. ارزیابی بقای سلول‌های Hep G2 با استفاده از تست MTT در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شده با نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بعد از ۲۴ ساعت، غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان IC₅₀ در تیمار ۲۴ ساعته رده سلولی Hep G2 تعیین شد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.



شکل شماره ۶. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی گیمسا و اکریدین اورنج / اتیدیوم بر مایند و بررسی تغییرات مورفولوژی سلول های Hep G2 با میکروسکوپ اینورت و فلورسنت: الف: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت با رنگ-آزمی گیمسا، ب: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت با رنگ آمیزی گیمسا، ج: مورفولوژی سلول Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن به مدت ۲۴ ساعت با رنگ آمیزی گیمسا، د: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت با رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم، م: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم، و: مورفولوژی سلول Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم. X 20

بحث و نتیجه گیری

ساخت نانوسامانه های 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 نانوسامانه ها می توان به نانوذرات اکسید آهن اشاره کرد که امروزه به صورت گسترده در تصویربرداری تشدید مغناطیسی به عنوان عامل بهبود کیفیت تصویر استفاده می شود. این خاصیت منحصر به فرد این نانوذرات همراه با قابلیت هدفمند کردن آنها از طریق میدان مغناطیسی خارجی سبب جلب توجه بسیاری از محققین به آنها شده است و می توان در زمینه تحقیقات دارورسانی و

همچنین تشخیص بیماری از آنها استفاده نمود. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه های مختلف نانو تکنولوژی، فرماسیوتیکس و دارورسانی هدفمند، بحث سمیت این نانوذرات مطرح است. به دلیل کاربردهای متنوع و گسترده این نانوذرات، زمینه بررسی مطالعات سمیت آنها از درجه اهمیت بالایی برخوردار است (۸، ۹، ۲۵).
به منظور افزایش زیست در دسترس پذیری و زیست سازگاری این نانوذرات می توان از پوشش دهی زیستی این بیوپلیمرها استفاده کرد. پوشش دهی این نانوذرات، نه تنها سبب افزایش پایداری کلئیدی آنها خواهد شد بلکه از سمیت آنها نیز کاسته و سبب افزایش زمان حضور این نانوذرات در

ساعت تیمار شده و غلظت IC₅₀ ترکیبات تخمین زده شد. خاصیت توکسیک این نانوذرات با تست MTT و رنگ آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌های حاصل از بررسی‌های زیستی نانوذرات قطعاً تأیید کننده‌ی پوشش‌دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آلژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به‌طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود، در حالیکه نانوذرات پوشش‌دار شده به‌طور معنی‌داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار بر میلی‌لیتر به پایین توکسیسته معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند (۱۸، ۲۰).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه شهید چمران به جهت تامین هزینه با گرنت به شماره SCU.SC1400.31316 قدرانی و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

کد اخلاق: EE/1400.3.02.38292/scu.ac.ir

References

1. Fatahian S, Shahbazi-Gahrouei D, Pouladian M, Yousefi M, Amiri G, Noori A. Biodistribution and toxicity assessment of radiolabeled and DMSA coated ferrite nanoparticles in mice. *J Radioanal Nucl Chem* 2012;293:915-21. doi: /10.1007/s10967-012-1822-y.
2. Shahbazi-Gahrouei D, Khaniabadi PM, Khaniabadi BM, Shahbazi-Gahrouei S. Medical imaging modalities using nanoprobe for cancer diagnosis: A literature review on recent findings. *J Res Med Sci* 2019; 24 :38. doi: 10.4103/jrms.JRMS_437_18.
3. Shahbazi-Gahrouei D, Khaniabadi PM, Shahbazi-Gahrouei S, Khorasani A, Mahmoudi F. A literature review on multimodality molecular imaging nanoprobe for cancer detection. *Pol J Med Phys*

سیستم گردش خون خواهد شد زیرا مانع از اتصال و جذب سطحی پروتئینها بر سطح این نانوذرات می‌شوند (۷). در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به کیتوسان، دکستران، پلی اتیلن اکساید، پلی وینیل الکل، پلی اتیلن گلیکول و... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند (۷، ۱۲). همچنین از دیگر مزیت این پلیمرها می‌توان به وجود گروه‌های عاملی فراوان اشاره کرد که برای انتقال هدفمند داروها کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۶).

اهداف این تحقیق پوشش‌دهی نانو ذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات و بررسی سمیت این نانوذرات بر روی رده سلولی Hep G2 با استفاده از آزمون MTT و با رنگ آمیزی‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید است. در این پژوهش نانوذرات مغناطیسی آهن با دو بیوپلیمر کیتوسان و آلژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شده است. بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه اندازه‌گیری سایز، به خوبی سایز ۵۰ نانو متر برای نانوذرات آهن اصلاح شده را نشان داد و شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی مشاهده شد. همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آلژینات به نانو ذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز بررسی شد (۲۴-۲۱). در این بررسی، با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح شده به مدت ۲۴

2019;25:57-68. doi:10.2478/pjmpe-2019-0009.

4. Pankhurst Q, Thanh N, Jones S, Dobson J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys* 2009;42. doi: 10.1088/00223727/42/22/224001.
5. Bakhtiary Z, Saei AA, Hajipour MJ, Raoufi M, Vermesh O, Mahmoudi M. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine: NBM* 2016;12:287-307. doi:10.1016/j.nano.2015.10.019.
6. Khaniabadi PM, Shahbazi-Gahrouei D, Majid AMSA, Jaafar MS, Khaniabadi BM, Shahbazi-Gahrouei S. In vitro study of SPIONs-C595 as molecular imaging probe for specific breast cancer (MCF-7) cells detection. *Iran Biomed J* 2017;21:360-8. doi: 10.18869/acadpub.ijb.21.6.360.

7. Haghshenas M, Hoveizi E, Mohammadi T, Kazemi Nezhad SR. Use of embryonic fibroblasts associated with graphene quantum dots for burn wound healing in Wistar rats. *In Vitro Cell Dev Biol* 2019;55:312-22. doi: 10.1007/s11626-019-00331-w.
8. Alavi M, Rai M. Antisense RNA, the modified CRISPR-Cas9, and metal/metal oxide nanoparticles to inactivate pathogenic bacteria. *Cell Mol Biomed Rep* 2021;1:52-9. doi:10.55705/cmbr.2021.142436.1014.
9. Alavi M, Rai M, Martinez F, Kahrizi D, Khan H, Rose Alencar De Menezes I, et al. The efficiency of metal, metal oxide, and metalloid nanoparticles against cancer cells and bacterial pathogens: different mechanisms of action. *Cell Mol Biomed Rep* 2022;2:10-21. doi:10.55705/cmbr.2022.147090.1023.
10. Hovazi E, Rostami E. Fabrication, characterization, and biological applications of TiO₂ nanoparticles coated by chitosan. *J Nanomed Res* 2023;8:50-60. doi: 10.22034/nmrj.2023.01.005.
11. Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:284-304. doi:10.1016/j.addr.2009.11.002.
12. Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Soucé M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J Control Release* 2013;169:48-61. doi:10.1016/j.jconrel.2013.03.018.
13. Munnier E, Cohen-Jonathan S, Hervé K, Linassier C, Soucé M, Dubois P, et al. Doxorubicin delivered to MCF-7 cancer cells by superparamagnetic iron oxide nanoparticles: effects on subcellular distribution and cytotoxicity. *J Nanopart Res* 2011;13:959-71. doi: 10.1007/s11051-010-0093-1.
14. Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MAH, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2012;12:226-34. doi:10.1016/j.intimp.2011.11.015.
15. Hossein-Beigi F, Fatahian S, Shahbazi-Gahrouei D. In-vitro toxicity assessment of polydopamine-coated and uncoated Fe₃O₄ nanoparticles in cell line B16-F10 (Melanoma Cell). *J Isfahan Med Sch* 1. Fatahian S, Shahbazi-Gahrouei D, Pouladian M, Yousefi M, Amiri G, Noori A. Biodistribution and toxicity assessment of radiolabeled and DMSA coated ferrite nanoparticles in mice. *J Radioanal Nucl Chem* 2012;293:915-21. doi: /10.1007/s10967-012-1822-y.
16. Unsoy G, Gunduz U. Targeted drug delivery via chitosan-coated magnetic nanoparticles. *Nanostructures Drug Deliv* 2017. 835-64. doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00026-9.
17. Ramezani MR, Ansari-Asl Z, Hoveizi E, Kiasat AR. Polyacrylonitrile/Fe (III) metal-organic framework fibrous nanocomposites designed for tissue engineering applications. *Mater Chem Phys* 2019;229:242-50. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.03.031.
18. Liao N, Wu M, Pan F, Lin J, Li Z, Zhang D, et al. Poly (dopamine) coated superparamagnetic iron oxide nanocluster for noninvasive labeling, tracking and targeted delivery of adipose tissue-derived stem cells. *Sci Rep* 2016;6:1-13. doi:10.1038/srep18746.
19. Saedi Z, Hoveizi E, Roushani M, Massahi S, Hadian M, Salehi K. Synthesis, characterization, anticancer properties and theoretical study of asymmetrical Cd (II) N₂-Schiff base complexes. *J Mol Struct* 2019;1176:207-216. doi:10.1016/j.molstruc.2018.08.072.
20. Gu X, Zhang Y, Sun H, Song X, Fu C, Dong P. Mussel-inspired polydopamine coated iron oxide nanoparticles for biomedical application. *J Nanomater* 2015;2015:3. doi:10.1155/2015/154592.
21. Ankamwar B, Lai T, Huang J, Liu R, Hsiao M, Chen C, et al. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology* 2010;21:075102. doi: 10.1088/0957-4484/21/7/075102.
22. Berry H, Wang B, Zhang Q. The Behavior of Magnetic Properties in the Clusters of 4d Transition Metals. *Molecules* 2018;23: 1896. doi:10.3390/molecules23081896.
23. Cai W, Wan J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J Colloid Interface Sci* 2007;305:366-70. doi:10.1016/j.jcis.2006.10.023.
24. Calderón M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R. Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Adv Mater* 2010;22:190-218. doi:10.1002/adma.200902144.
25. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001;53:283-31. doi: 10.1038/s41598-023-32409-7.