

Preparation and Biological Investigation of Iron Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan/Alginate Biopolymer ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Alg}/\text{CS}$)

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

ABSTRACT

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

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 $\mu\text{M}/\text{ml}$, while the coated nanoparticles had significantly lower toxic effects and did not have significant toxicity on Hep G2 cells at concentrations below 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$. 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 ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Alg}/\text{CS}$). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(2): 31-41.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

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

الهام رستمی^{۱*}, الهام حویزی^۲

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

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

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۰۳

مقدمه: امروزه سرطان یکی از نگرانی‌های بخش سلامت در جوامع مدرن است. کاربرد نانوذرات 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 وسیله‌ی شیمی‌درمانی، عدم دسترسی به قسمت‌های مرکزی توده به علت خونرسانی کمتر آن است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان سمیت نانوذره‌ی اکسید آهن با پوشش بیو پلیمر کیتوسان/آژینات بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما (سلول‌های Hep G2) بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نانوذرات مغناطیسی آهن با دو بیوپلیمر کیتوسان و آژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازگیری سایز و میکروسکوپ الکترونی رویشی بررسی شد. همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آژینات به نانوذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف‌سنگی مادون قرمز بررسی شد. در این بررسی، با استفاده از نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح شده 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/ایدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

بحث و نتیجه گیری: یافته‌های حاصل از بررسی‌های زیستی نانوذرات قطعاً تأیید کننده پوشش دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC₅₀ آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی لیتر بود، در حالیکه نانوذرات پوشش دار شده به طور معنی داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار بر میلی لیتر به پایین توکسیسیته معنی داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند. پوشش نانوذرات اکسی آهن به طور قابل ملاحظه‌ای، باعث کاهش غلظت سمیت آنها می‌گردد.

نویسنده مسئول:

الهام رستمی

گروه شیمی، دانشکده علوم،

دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز،

ایران.

Email:

e.rostami@scu.ac.ir

واژه‌های کلیدی: انتقال دارو، نانوذرات مغناطیسی، سمیت سلولی، بیو پلیمر، کیتوسان

استناد: رستمی، الهام؛ حویزی، الهام. تهیه و بررسی زیستی نانوذرات مغناطیسی آهن پوشش داده شده با بیوپلیمر کیتوسان/آژینات (Fe₃O₄/Alg/CS). مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خداداد ۱۴۰۲؛ (۲۳۱): ۴۱-۳۱.



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

پوشش دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر کیتوسان و آلتزینات نه تنها سبب بهبود سازگاری آنها می شود بلکه پلیمرها می تواند 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 می تواند مورد استفاده واقع شود. وجود تعداد زیادی گروه عاملی هیدروکسیل در سطح این پلیمر سبب افزایش آب دوستی سطح نانوذرات پوشش دار شده و به علاوه برای اتصال عوامل ردیاب یا عوامل هدفمند کننده عمل می کند(۱۳, ۱۲).

در سال ۲۰۱۸ فنگ و همکاران از پلیمر پلی اتیلن ایمین برای کاهش سمیت و افزایش زیست در دسترس پذیری نانوذرات آهن استفاده کردند(۱۴). در سال ۲۰۲۰ حسینیگی و همکاران میزان سمیت نانوذرات اکسید آهن با پوشش پلی دوپامین و بدون پوشش پلی دوپامین روی سلولهای سرطانی ملاتوما ۱۰-F-16-B-16 را بررسی کردند(۱۵). هدف از این تحقیق، بیان نگرانی هایی است که اخیراً در حوزه سلامت درباره سمیت نانوذراتی که جهت انتقال دارو به کار می روند. بدین منظور کاهش سمیت نانوذرات آهن با استفاده از پوشش دهی آنها با پلیمر زیستی کیتوسان/آلتزینات مورد بررسی قرار گرفت. پوشش دهی سطح نانوذرات مغناطیسی توسط پلیمر کیتوسان و آلتزینات نه تنها سبب بهبود سازگاری آنها می شود، بلکه پلیمرها می توانند به عنوان جایگاهی جهت بارگذاری دارو عمل کنند. هدف از انجام این مطالعه در ابتدا پوشش دهی نانوذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آلتزینات و سپس بررسی سمیت این نانوذرات بر روی رده سلولی Hep G2 با استفاده از آزمون MTT و با رنگ آمیزی های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید می باشد.

نانوذرات به دلیل ویژگی منحصر به فرد نسبت سطح به حجم، باعث افزایش سطح تماس با بافت سلطانی می شوند. استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل می تواند باعث کاهش سمیت دارو شود. نانو ذرات به عنوان ذرات خیلی ریز با سایز بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف شده است(۱, ۲). سیستم های دارورسانی با نانو ذرات منجر به پایداری دارو ، افزایش زمان ماندگاری در جریان خون، ارائه دوز کمتری از عوامل موثر شیمی درمانی و کنترل توزیع دارو را در داخل بدن فراهم می کند(۳, ۴) .. نانو ذرات مغناطیسی نتایج موفقیت آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده اند(۵). مطالعه هایی در زمینه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی و القای حرارت برای از بین بردن سلولهای سرطان پستان انجام شده است، که نتایج موفقیت آمیزی را نشان داده است(۶, ۷). از نانو ذرات مغناطیسی همچنین برای انتقال دارو_های شیمی_درمانی به سرطان پستان استفاده شده است. امروزه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه های مختلف پزشکی برای تصویربرداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه های مختلف نانوتکنولوژی، فارماسیوتیکس 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 آلومینیا بهترین مثال ها در این زمینه می باشند(۸-۱۰).

به منظور افزایش زیست سازگاری نانوذرات می توان از پوشش زیست دهی آنها توسط پلیمرهای سازگار استفاده کرد. پوشش دهی این نانوذرات، نه تنها سبب افزایش پایداری کلولئیدی 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 پروتئین ها بر سطح این نانوذرات می شود(۱۱, ۱۲). در این زمینه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می توان به

مواد و روش‌ها

تهیه، ارزیابی و اصلاح سطحی نانوذرات مغناطیسی آهن: پلیمر کیتوسان و آلثینات از شرکت (Chem Lab) خریداری شد. نانوذرات آهن از شرکت (نانوپیشگامان مشهد) تهیه شد. کلسیم کلرید، اسید استیک، دی متیل سولفوکسید و اسید کلریدیریک از شرکت (Merck) خریداری شد. آب دیونیزه از شرکت (قطران اصفهان) تهیه گردید.

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

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

دستگاه میکروسکوپ الکترونی رویشی (Scanning electron microscope - SEM) میکروسکوپ الکترونی رویشی، 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 رفیق شدند. همچنین رنگ‌آمیزی توسط یورانیل استات به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. همچنین عکس‌ها از نمونه تازه تهیه

شده، گرفته شد (۱۷).

مشخصه‌یابی نانوذرات: جهت تهیه نانوذرات آهن پوشش داده شده توسط محلول ۱۰ درصد کیتوسان / آلثینات، ابتدا محلول سدیم آلثینات و کلسیم کلرید با حل شدن در آب مقطر آماده می‌شود. pH محلول سدیم آلثینات با استفاده از محلول اسید کلریدیریک در ۵/۱ تثیت می‌گردد. ۵/۰ گرم کیتوسان در اسید استیک ۱٪ حل شده و با سود، pH به ۵/۴ رسانده می‌شود. این روش برای پوشش دهی نانوذرات مغناطیسی به کار می‌رود (۹). محلول آبی کلسیم کلرید به صورت قطره قطره به محلول سدیم آلثینات و نانوذرات 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 آلثینات و نانوذرات 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 پوشش دار شده با کیتوسان و آلثینات ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Alg/CS}$) 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) 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 سولفوکساید، 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 الایزاریدر (Fax 2100, USA) خوانش و درصد بقای سلولی اندازه‌گیری شد (۱۸، ۱۹).

رنگ‌آمیزی گیمسا: به این منظور سلول‌های Hep G2

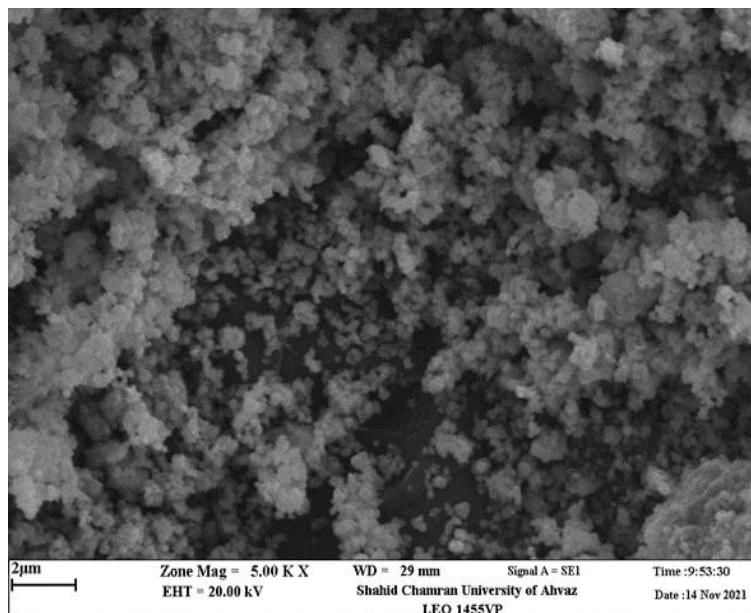
انجام گرفت.

یافته های پژوهش

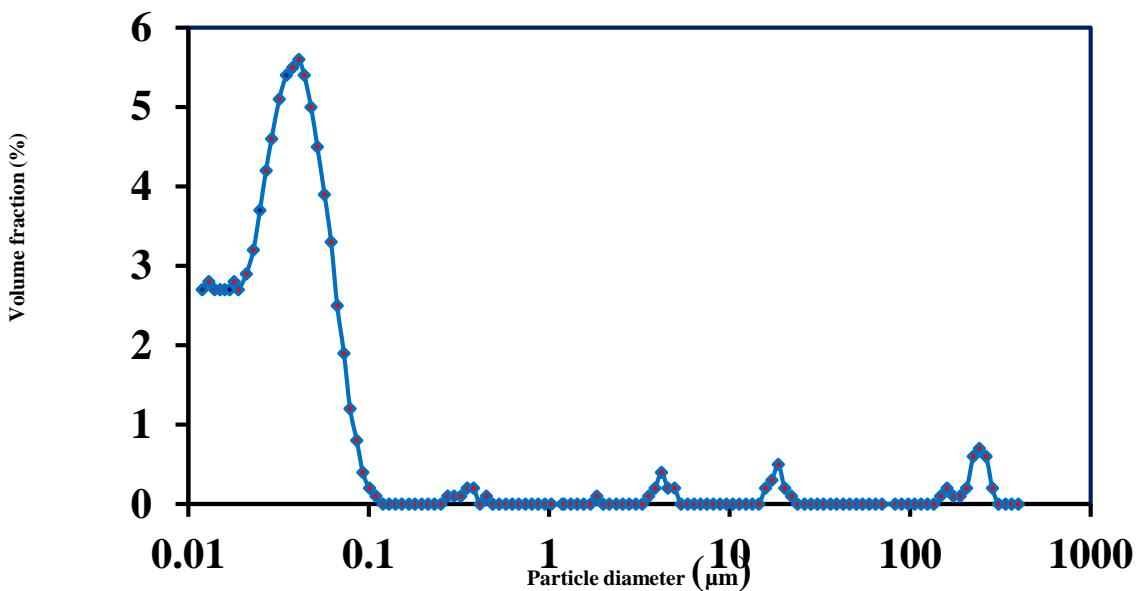
اندازه قطر نانو ذرات و مورفولوژی ذرات با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. بار سطحی نیز به صورت پتانسیل زتا بر حسب میلی ولت اندازه گیری شد. طیف سنجی مادون قرمز بر روی نانوذرات مغناطیسی صورت گرفت. نتایج دستگاه انداز گیری سایز نانو ذرات و میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل شماره ۱)، اندازه ۵۰ نانومتر برای نانوذرات اصلاح شده را نشان داد. همان‌گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، کاملاً گرد و کروی هستند که منجر به افزایش کاربرد گسترده‌ی آنها در مطالعات انتقال دارو می‌گردد. در شکل شماره ۲ به خوبی توزیع یکنواخت نانوذرات 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 ثبیت و سپس با استفاده از رنگ گیمسای ۴٪ برای ۲۰ دقیقه رنگ شده و زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند (۲۰).

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم 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/اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ فلورئنسن (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

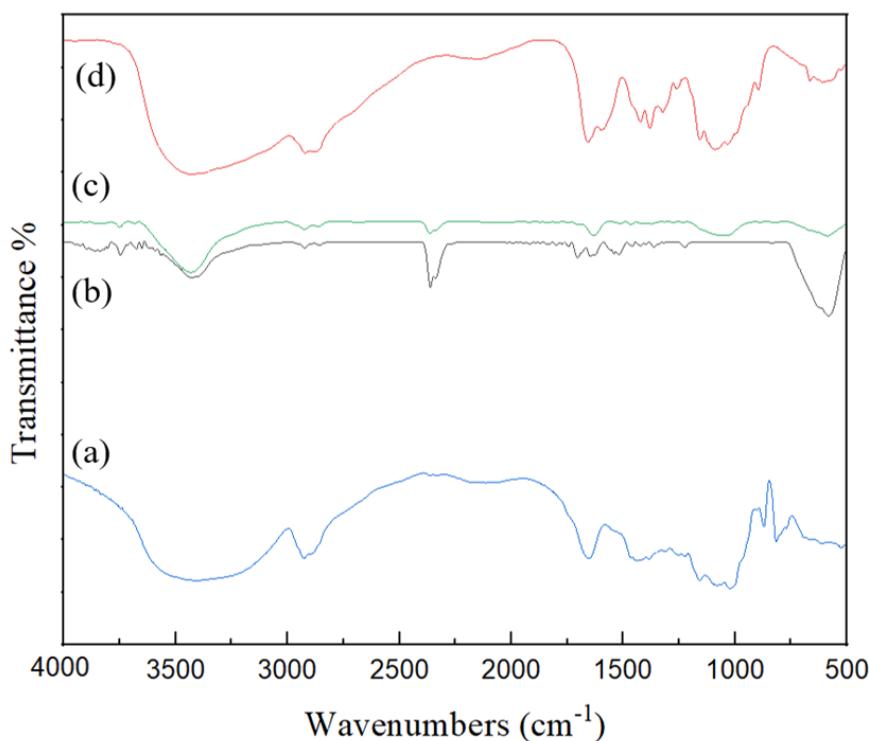
آمید I پیک بالایی در حدود 1649 cm^{-1} نشان داد، در حالی که ارتعاش کششی آمید III C-N پیک کوچکتری را در 1324 cm^{-1} نشان داد. علاوه بر این، ارتعاش خمشی گروه CH₂ و ارتعاش کششی نامتقارن پیوند C-O-C به ترتیب در 1423 cm^{-1} و 1153 cm^{-1} یافت شد. ارتعاش کششی پیوند C-O پلیمر توسط دو قله برجسته در 1066 cm^{-1} و 1029 cm^{-1} شناسایی شد (۲۴-۲۲).

در طیف سدیم آلتینات، پیک در 3337 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 1030 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 باشد کمتری در محدوده‌های مورد نظر نسبت به پیک‌های مربوط به هر یک از این مواد وجود دارد.

طیف FT-IR نانوکامپوزیت $\text{Fe}_3\text{O}_4(a)$ (d) Sodium alginate(c) Chitosan(b) alginat-Chitosan@ Fe_3O_4 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 بیان کننده آن است که آهن عنصر اصلی سازنده نانوذرات است. همچنین پیک گستردگی در محدوده $2500-3600\text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده ارتعاشات پیوند هیدروژنی می‌باشد که متعلق به نانوذره سنتز شده است (۲۱).

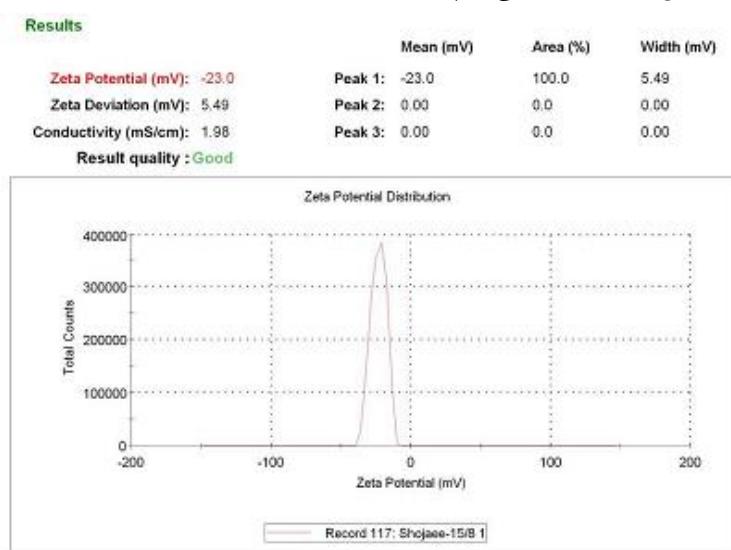
همانطور که مشاهده می‌شود در طیف (b)، ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H و همچنین پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی پلی‌ساقارید کیتوسان دارای نوار قوی و گستردگی در محدوده $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ تا 3430 cm^{-1} هستند. علاوه بر این، وجود یک حلقه مونوساکاریدی با خم شدن باند C-H به خارج از صفحه در حدود 890 cm^{-1} 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 ۵. طیف FT-IR نانو کامپوزیت (d) Sodium alginate-Chitosan@Fe₃O₄, Sodium alginate(c), Chitosan(b), Fe₃O₄(a)

آژینات در سطح نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده می باشد.

نتایج بررسی پتانسیل سطحی نانوذرات نشان می دهد که بار سطحی -۲۳- میلی ولت می باشد (شکل شماره ۴) که این خود دلیلی بر قرار گرفتن گروههای عاملی بیopolymer



شکل شماره ۴. پتانسیل سطحی نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده

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

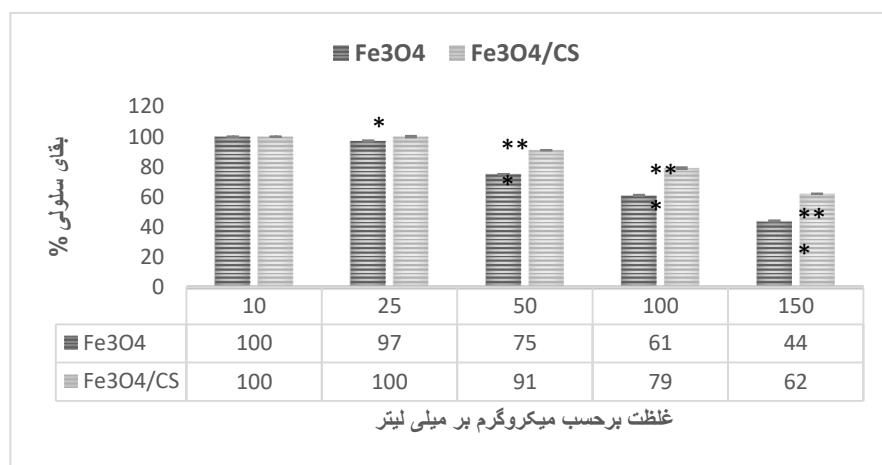
نتایج تست بقای سلولی: تست MTT برای ارزیابی اثرات نانوذرات نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بر سلول های Hep G2 در غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر

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

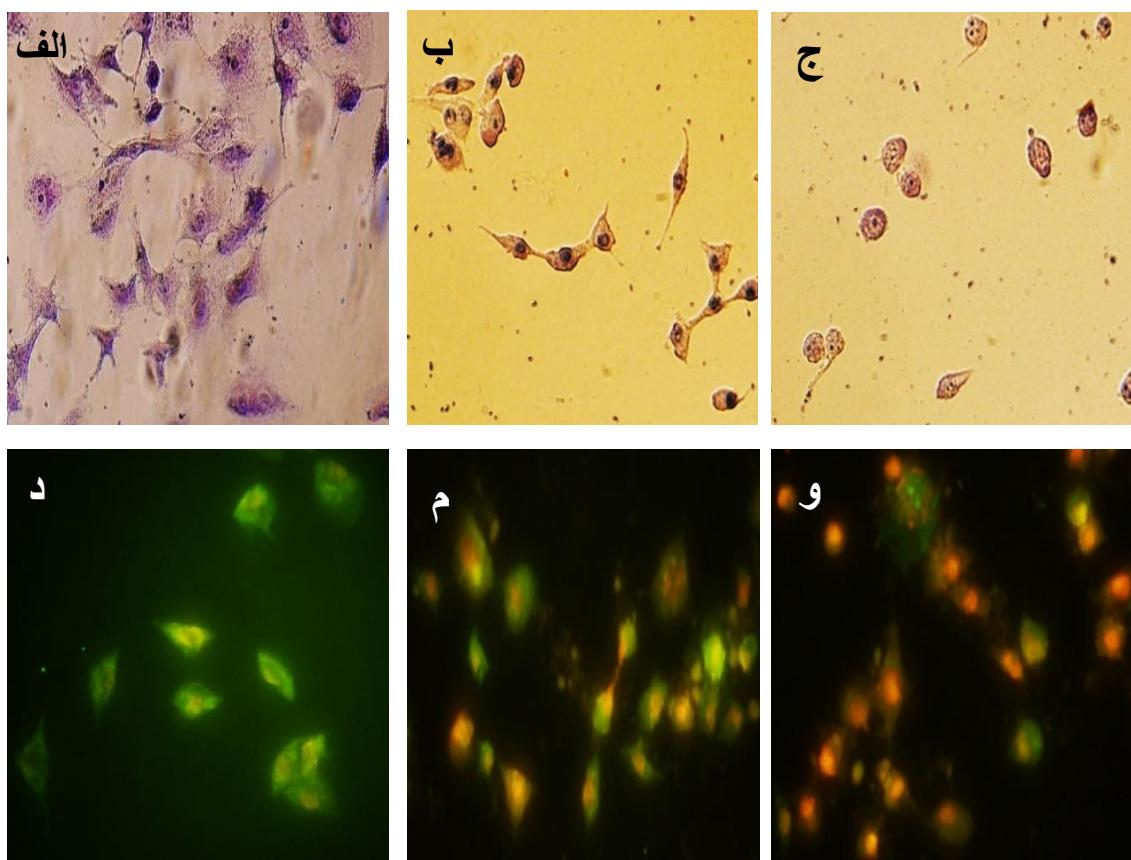
مشاهدات حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید: آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی دو گانه است که سبب رنگ سبز در سلول‌های زنده و رنگ نارنجی در سلول‌های آپوپتوزی در زیرمیکروسکوپ می‌شود. در این پژوهش سلول‌های Hep G2 بعد از تیمار و انکوبه شدن به مدت ۲۴ ساعت با آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید رنگ شدند تا وضعیت آپوپتوز و زنده‌مانی آنها مشخص شود. در سلول‌های Hep G2 تیمار شده با غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر، سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به صورت پراکنده و با تراکم کمتر مشاهده شدند (۱۸-۲۰). 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 تیمارشده بود. این مشاهدات در سلول‌های تیمارشده با نانو ذرات مغناطیسی آهن در مقایسه با گروه تیمار با نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بارزتر و چشم‌گیرتر بود (شکل شماره ۶ تصاویر د-و).

یافته‌ها نشان داد که میزان سمیت نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده، در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به نانو ذرات مغناطیسی آهن به صورت معنی‌داری کاهش یافته است، اما در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به هم و همچنین نمونه کنترل تفاوتی مشاهده نشد. همچنین غلظت IC50 محاسبه شده نانو ذرات مغناطیسی آهن بر سلول‌های Hep G2 در غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر Hep G2 میلی لیتر مشخص گردید که میزان بقای سلول‌های Hep G2 در این غلظت برای نانو ذرات 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 میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده از نظر مورفولوژی باهم و با سلول‌های نمونه کنترل تفاوت چشم‌گیری نشان دادند. به طوریکه در گروه‌های آزمایش انقباض و کاهش حجم سلولی، کاهش حجم سیتوپلاسم، چروکیله 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 میلی لیتر تیمار شده با نانو ذرات مغناطیسی آهن و نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده بعد از ۲۴ ساعت، غلظت ۱۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر 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 / ایدیوم بر ماید 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 آمیزی گیمسا، ب: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکرو گرم 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 میکرو گرم 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 / ایدیوم، م: مورفولوژی سلول های Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکرو گرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی اکریدین اورنج / ایدیوم، و: مورفولوژی سلول Hep G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۳۴ میکرو گرم بر میلی لیتر نانو ذرات مغناطیسی آهن به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی اکریدین اورنج / ایدیوم. X 20

همچنین تشخیص بیماری از آنها استفاده نمود. در کنار کاربردهای گسترده این نانوذرات در زمینه های مختلف نانوتکنولوژی، فارماسیوتیکس و دارورسانی هدفمند، بحث سمیت این نانوذرات مطرح است. به دلیل کاربردهای متعدد 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 بیopolymerها استفاده کرد. پوشش دهی 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

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 تشخیص 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

ساعت تیمارشده و غلظت IC_{50} 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 پوشش دهی موثر نانوذرات بوسیله بیوپلیمرهای کیتوسان و آژینات بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات مغناطیسی آهن به طور وابسته به غلظت اثرات توکسیک بالاتری داشته و غلظت IC_{50} آنها حدود ۱۳۴ میکرومولار بر میلی لیتر بود، در حالیکه نانوذرات پوشش دار شده به طور معنی‌داری اثرات توکسیک پایین‌تری داشته و در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار بر میلی لیتر به پایین توکسیسیته معنی‌داری بر سلول‌های Hep G2 نداشتند(۱۸، ۲۰).

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

بدین وسیله نویسنده‌گان اعلام می‌نمایند که نویسنده‌گان هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

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

References

- 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.
- Shahbazi-Gahrouei D, Khaniabadi PM, Khaniabadi BM, Shahbazi-Gahrouei S. Medical imaging modalities using nanoprobes for cancer diagnosis: A literature review on recent findings. *J Res Med Sci* 2019; 24 :38. doi: 10.4103/jrms.JRMS_437_18.
- Shahbazi-Gahrouei D, Khaniabadi PM, Shahbazi-Gahrouei S, Khorasani A, Mahmoudi F. A literature review on multimodality molecular imaging nanoprobes for cancer detection. *Pol J Med Phys* 2017;21:360-8. doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.6.360.
- 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.
- Bakhtiari 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.
- 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.ibj.21.6.360.

سیستم گردش خون خواهد شد زیرا مانع از اتصال و جذب سطحی پروتئینها بر سطح این نانوذرات می‌شوند (۷). در این زمانه از پلیمرهای مختلفی استفاده شده که از جمله می‌توان به کیتوسان، دکستران، پلی‌اتیلن اکسید، پلی وینیل الکل، پلی‌اتیلن گلیکول و... اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشد (۷-۱۲). همچنین از دیگر مزیت این پلیمرها می‌توان به وجود گروه‌های عاملی فراوان اشاره کرد که برای انتقال هدفمند داروها کاربرد گسترشده‌ای دارد (۱۶). اهداف این تحقیق پوشش دهی نانوذرات آهن با بیوپلیمر کیتوسان و آژینات 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 آژینات پوشش داده شد. اندازه و مورفولوژی سطح این نانوذرات توسط دستگاه اندازگیری سایز و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شده است. بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه اندازگیری سایز، به خوبی سایز ۵۰ نانومتر برای نانوذرات آهن اصلاح شده را نشان داد و شکل این نانوذرات کاملاً گرد و کروی مشاهده شد. همچنین اتصال گروه‌های عاملی کیتوسان و آژینات به نانوذرات مغناطیسی آهن توسط دستگاه طیف سنجی مادون نانو ذرات مغناطیسی شد (۲۱-۲۴). در این بررسی، با استفاده از نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات اصلاح شده به مدت ۲۴

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

5. Bakhtiari 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.ibj.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. Veiseh 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. Hosseini-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.