فصلنامه علمی تخصصی طب کار
دوره سوم/ شماره چهارم/ زمستان۹۰/ صفحات۱۹-۱٤

بررسی اثرات سایتوتوکسیک یک نانو ذره اکسید منیزیم بر سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان

ابوالفضل برخورداری[۱]، سجاد برزگر*[۲]، سیدحسین حکمتی‌مقدم[۳]، علی جبالی[٤]، حسین فلاح‌زاده[٥]

۱. عضو هیأت علمی گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۲. کارشناس ارشد بهداشت حرفه‌ای، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۳. عضو هیأت علمی گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
٤. کارشناس ارشد نانوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی تهران
٥. عضو هیأت علمی گروه آمار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت:۹۰/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش:۹۰/۱۱/۲۹

چکیده

مقدمه: با توجه به اثرات سوء نانوذرات بر انسان، این مطالعه به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانو ذره اکسید منیزیم طراحی و اجرا گردید.

روش بررسی: در یک مطالعه آزمایشگاهی، سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای به مدت ٦ و ٢٤ ساعت با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذره مواجهه و سپس درصد مرگ سلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در نمونه‌های مورد مطالعه و کنترل‌های مثبت و منفی تعیین گردید.

یافته‌ها: یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد که حداقل و حداکثر مرگ سلول در مواجهه ٦ ساعته در غلظت ۱ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۳۰/۹٪ و ٤٤/۷٪ و در مواجهه ٢٤ ساعته به ترتیب ۲٦/۵٪ و ٦٤/٤٪ می‌باشد. در مواجهه ٢٤ ساعته، با افزایش غلظت به ویژه در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به مرگ سلولی می‌شود ولی از غلظت ۵۰۰ با افزایش توأم غلظت و زمان مواجهه، سمیت نانوذره به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص گردید که سلول‌های تک هسته‌ای خون به نانو ذره اکسیدمنیزیم نسبتاً حساس می‌باشند به طوری که سمیت تابع غلظت و زمان به طور توأم به‌ویژه از غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد؛ ضمناً در مواجهه ٢٤ ساعته، غلظت ٦۰۰ به عنوان غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود تعیین گردید.

کلید واژه‌ها: نانوذره اکسید منیزیم، سمیت، سلول‌های تک هسته‌ای خون

*نویسنده مسؤول: آدرس پستی: یزد، بلوار دانشجو، مجتمع آموزشی امام رضا، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی
تلفن: ٦٢٤۰٦۹۱، پست الکترونیکی: sajjad.Barzegar@gmail.com

[Downloaded from tkj.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

در سال‌های اخیر کاربرد نانوذرات که ابعاد آنها بین ۱تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد در علوم مختلف از جمله زیست فناوری، پزشکی، داروسازی، صنایع غذایی، انرژی، کشاورزی، و صنایع مختلف به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است(۱). بنابراین تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها به علت اندازه بسیار کوچک و نسبت سطح به حجم آنها از یک طرف و استفاده‌های پزشکی و مواجهه شغلی کارگران و مصرف کنندگان از طرف دیگر ضرورت توجه بیشتر به مخاطرات ناشی از آن را با اهمیت می‌سازد(۲). چون اثرات بیولوژیکی نانوذرات کاملاً متفاوت از ذرات معمولی می‌باشد(۳،٤)، نانو ذرات مختلف از جمله اکسید منیزیم می‌توانند پس از جذب از طریق پوست، ریه و گوارش از غشای سلولی نیز عبور و در بافت‌های هدف مستقر گردند(۵).

علیرغم استفاده از نانو ذره اکسید منیزیم(MgO) در کشور، سمیت آن بر سلول‌ها و بافت‌های بدن کمتر مورد توجه قرار گرفته است گرچه در دنیا مطالعات متعددی در رابطه با اثرات نانو ذرات مختلف بر سلول‌های انسان و حیوان انجام شده و مشخص شده است که جذب و سمیت نانو ذرات از پوست، ریه و گوارش سریع‌تر از ذرات معمولی بوده و مواجهه با آنها می‌تواند منجر به بیماری‌های مختلف کبدی، ریوی، کلیوی و خونی(۱۰-٦) ولی مطالعات انجام شده در کشور محدود می‌باشد(۱۱)؛ لذا به نظر می‌رسد در حال حاضر اطلاعات موجود برای درک کامل سمیت بالقوه‌ی نانو ذرات کافی نمی‌باشد.

با توجه به اندازه بسیار کوچک ذرات و امکان دسترسی و مواجهه به سلول‌های تک هسته‌ای خون بر آن شدیم تا اثرات سایتوتوکسیک نانو ذره اکسید منیزیم بر سلول‌های تک هسته‌ای خون مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

تهیه سلول‌های تک هسته‌ای در یک مطالعه آزمایشگاهی، اثرات سمی نانو ذره اکسید منیزیم بر سلول‌های تک هسته‌ای خون ۱۰ مرد بالغ و سالم با میانگین سنی ۲۵ سال با روش استاندارد MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-y1)-2,5diphenyltetrazolium bromide) مورد بررسی قرار گرفتند(۱۲). برای این منظور، ۵ میلی لیتر خون هپارینه به مدت ۵ دقیقه روی میکسر هماتولوژی (لابترون، ایران) مخلوط و پس از اضافه نمودن ۵ میلی لیتر فایکول (مرک، آلمان)، به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (سهند، ایران) شد و سپس سلول‌های تک هسته‌ای با پیپت جدا گردیدند وپس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژی تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول در محیط کشت مایع RPMI ١٦٤٠ با حجم نهایی یک میکرولیتر تهیه گردید. به منظور اطمینان، تعداد سلول‌ها با استفاده از دستگاه سل کانتر (ABX France-Japan،Micros60) شمارش شدند.

پس از خریداری نانو ذره MgO با ابعاد ٤٠ نانومتر و نسبت سطح به وزن ۵۰۰ مترمربع به گرم از شرکت لولیتک آلمان (Lolitech, Germany) و انتقال به آزمایشگاه، با استفاده از آب دیونیزه غلظت‌های مختلف ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون در میکروپلیت ۹ خانه‌ای ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانو ذره به هر چاهک حاوی سلول افزوده و سپس غلظت نهایی نانو ذره در هر چاهک به ترتیب ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسانده و به مدت ٦ و ٢٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (Fater electronic، ایران) انکوبه شدند. به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانو ذره اکسید منیزیم بر سلول‌های تک هسته‌ای از روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-y1)-2,5diphenyltetrazolium bromide) استفاده گردید. برای این منظور ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT (مرک، آلمان) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه

[Downloaded from tkj.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

شدند، سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول ایزوپروپانول ۷۰٪ (مرک، آلمان) به هر چاهک اضافه و پس از آن جذب نوری (Optical Density) هر چاهک در طول موج ٤۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (ELICO spectrophotometers, India) قرائت و در پایان میزان مرگ سلولی محاسبه گردید.

در نهایت میزان مهارکنندگی رشد ۵۰ درصد یعنی غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود (LC50) و غلظت بدون اثر مشاهده شده یعنی غلظتی که در آن غلظت هیچ اثر سمی بر سلول مشاهده نمی‌شود (NOAEC: No observed adverse effect concentration) نیز مشخص و تفسیر گردیدند.

در این مطالعه از کنترل های مثبت، منفی و بلانک نیز استفاده شد به طوری که در چاهک کنترل مثبت آب مقطر و در چاهک مربوط به کنترل منفی فقط سالین نرمال اضافه گردیدند ضمناً به منظور اطمینان کلیه آزمایشات دوبار تکرار گردیدند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ انجام و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار، گزارش گردیدند. ولی با توجه به نرمال نبودن داده‌ها از میانه و دامنه میان چارکی جهت تجزیه و تحلیل استفاده گردید همچنین P<۰/۰۵ به عنوان مرز معنی‌دار شدن نتایج در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه پس از مواجهه سلول‌های تک هسته‌ای خون با غلظت‌های مختلف نانو ذره MgO به مدت ٦ و ۲٤ ساعت، نتایج مربوط به درصد مرگ سلول با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از مواجهه سلول‌های تک هسته‌ای خون با غلظت‌های مختلف نانو ذره در مواجهه ٦ و ۲٤ ساعت و میزان مرگ سلولی (درصد) بر اساس میانگین نتایج دو بار آزمایش درشکل ۱ آمده است.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود حداقل و حداکثر مرگ سلول در مواجهه‌ی ٦ ساعته به ترتیب مربوط به غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۰/۹٪) و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (٤٤/۷٪) است ولی این میزان در مواجهه ۲٤ ساعته به ترتیب ۲٦/۵ و ٦٤/٤ درصد می‌باشد؛ همچنین درصد مرگ سلولی در مواجهه ٦ ساعته با افزایش غلظت از ۱ تا ۵۰۰ میکروگرم نیز تا حدی افزایش می‌یابد ولی از این غلظت به بعد یعنی ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰، با افزایش غلظت، مرگ سلولی افزایش نمی‌یابد. در حالی که در مواجهه ۲٤ ساعته با افزایش غلظت، درصد مرگ سلولی بویژه در غلظت ۱۰۰۰ افزایش می‌یابد، ولی از غلظت ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با افزایش زمان مواجهه از ٦ به ۲٤ ساعت، میزان سمیت کاهش می‌یابد.

بنابراین از نتایج مطالعه استنباط می‌شود که از غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با افزایش غلظت و زمان مواجهه به صورت توأم و هم‌زمان، سمیت نانوذره نیز بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

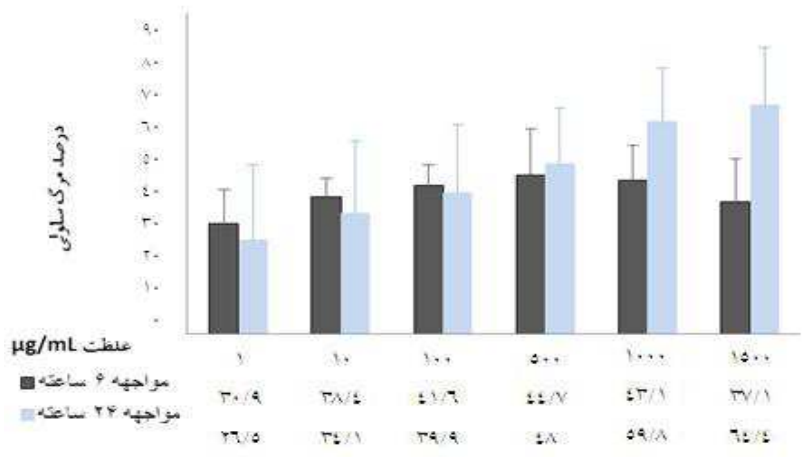
نتایج تست Mann-Whitney نشان داد که در مواجهه ۲٤ ساعته از غلظت ۱۰۰، رابطه معنی‌داری بین دوز و مرگ سلولی وجود دارد ولی در مواجهه ٦ ساعته فقط با افزایش غلظت از ۱ به ۱۰ این ارتباط معنی‌داری است (P<۰/۰۱). همچنین تحلیل Kruskal-Wallis بیانگر اختلاف معنی‌دار مرگ سلولی در غلظت های مختلف نانوذره با نمونه‌های کنترل می‌باشد (P<۰/۰۱).

نتایج مربوط به میزان مهارکنندگی رشد ۵۰ درصد (LC50) و غلظت بدون اثر مشاهده شده (NOAEC) در جدول شماره ۱ آمده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود غلظت LC50 پس از ۲٤ ساعت مواجهه برابر ٦۰۰µg/ml تعیین گردید در حالی که در مواجهه‌ی ٦ ساعته این غلظت قابل تعیین نبود.

جدول۱: میزان LC50 و NOAEC نانوذره MgO در مدت زمان مواجهه ٦ و ۲٤ ساعته

سمیت (µg/ml)	مواجهه ٦ ساعته	مواجهه ۲٤ ساعته
LC50	نامشخص	٦۰۰
NOAEC	نامشخص	نامشخص

[Downloaded from tkj.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۱: میانگین درصد مرگ سلولی بر حسب غلظت نانو ذره MgO (میکروگرم بر میلی لیتر) و زمان مواجهه

بحث

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در خصوص اثرات سایتوتوکسیک نانوذره اکسید منیزیم بر سلول های تک هسته‌ای خون انجام نشده و یا نتایج آن تاکنون چاپ نشده است لذا مقایسه نتایج این مطالعه صرفا با اثرات این نانوذره بر سلول های آندوتلیال و همچنین نانو ذره اکسید نقره بر سلول های تک هسته‌ای خون میسر می‌باشد. از طرفی سریع، با صرفه و قابل اعتماد بودن تست MTT به عنوان یک ابزار حساس و موثر برای تعیین میزان سمیت نانوذرات در تحقیقات بعدی امکان‌پذیر است (۱۴-۸،۱۰).

افزایش اثرات سایتوتوکسیک به مرور زمان نیز ممکن است به علت اتصال بیشتر نانو ذرات به پروتئین‌های سطح سلولی یا داخل سلولی باشد، چون این خاصیت وابسته به زمان است.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش زمان مواجهه، میزان سمیت فقط از غلظت ۵۰۰ و بالاتر تا حدی افزایش می‌یابد؛ لذا نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Jing Sun و همکاران و Ge S و همکاران که نشان دادند نانو ذره اکسید منیزیم بر سلول‌های آندوتلیال اثر سمی دارد نسبتاً همخوانی دارد(۵،۱۵). مرگ سلول‌ها احتمالابه علت تداخل عملکرد میتوکندری در سلول‌ها و همچنین نفوذپذیری زیاد نانوذره و تاثیر آن بر دیواره سلول وغشاء سیتوپلاسم و همچنین مهار آنزیم‌ها وتخریب آنها به علت اتصال نانوذره به لیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد.

عدم امکان تعیین مقدار NOAEC و LC50 در مواجهه ٦ ساعته در مطالعه حاضر و عدم وجود ارتباط و روند مشخص بین غلظت و میزان سمیت بیانگر بالا نبودن سمیت این نانوذره می‌باشد و این در حالی است که در مواجهه ٢٤ ساعته، غلظت ٦٠٠ به عنوان غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود تعیین گردید. نکته قابل توجه این مطالعه این است که میزان سمیت سلول‌های تک هسته‌ای خون نیز تابع دو عامل غلظت و زمان مواجهه به طور همزمان و توام می‌باشد بنابراین با افزایش همزمان غلظت نانوذره و مدت زمان مواجهه به ٢٤ ساعت، رفتار دوز پاسخ بهتر می‌شود. نتیجه کلی این که نانو ذره توسط پوست، گوارش و به ویژه ریه جذب و به راحتی وارد جریان خون شده و با سلول‌های خون از جمله سلول‌های تک هسته‌ای تماس یافته و منجر به بروز عوارض مختلف از جمله مرگ سلول‌های خونی گردد(۱۱،۱٦).

نتیجه‌گیری

گرچه نتایج حاصله از این مطالعه می‌تواند در ارزیابی خطرات ناشی از مواجهه با نانو ذرات مورد استفاده قرار

[Downloaded from tkj.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

گیرد ولی کاربرد وسیع نانو ذرات لزوم بررسی اثرات سمی آنها بر روی سلول‌های مختلف به ویژه در سطح سلولی- میکروسکوپی را می‌طلبد. با توجه به نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات بعدی مکانیسم سمیت‌زایی نانوذره‌ی MgO باید بر مبنای ارزیابی میکروسکوپی سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته مانند میکروسکوپ الکترونی طراحی گردد. مطالعه روی حیوان هم در آینده بایستی لحاظ گردد. همچنین بررسی دقیق‌تر ابعاد و سایرغلظت‌های نانوذره در مطالعات بعدی ضروری به نظر می‌رسد.

لازم به ذکر است این مقاله حاصل پایان نامه تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

منابع

1. Nam JY, Lead RJ. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ. 2008; 400: 396-414.
2. YeF. Synthesis of Nanostructured and Hierarchical Materials for Bio-Applications. Licentiate Thesis Stockholm 2011.
3. Lin W, Huang Y, Zhou XD, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 217: 252-9.
4. Dechsakulthorn Fb, Hayes A, Bakand S, Joeng L, Winder C. In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. AATEX. 2006; 14: 397-400.
5. Ge S, Wang G, Shen Y, Zhang Q, Jia D, Wang H, Dong Q, Yin T. Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells in vitro. IET Nanobiotechnol. 2011; 5(2) : 36.
6. Won Kim H, hn E-K, eun Jee B, oon H-K, aeng Lee K LY. Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. J Nanopart Res. 2008; 11: 55-65.
7. Aillon KL, XieY, Gendy NEl, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61: 457-66.
8. Brunner TJ, wick P, Manser P, Grass RN, Limbach LK. In vitro cytotoxicity of oxid nanoparticles: comparison to Asbestos silica, and the effect of particle solubility. Environ sci technol. 2006; 40:437-481.
9. Kroll A, Pillukat M H, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. Eur J Pharm Biopharm. 2008; 72(2):370-7.
10. Kim SC, Chen DR, Qi C, Gelein RM, Finkelstein JN, Elder A, et al. A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. Nanotoxicology 2010; 4(1) :42-51.
11. Barkhordari A, Barzegar S, Hekmati SH, Jebalai A and Falahzada H. The cytotoxic effects of SiO2 nanoparticles on human blood mononuclear cells. J of SSMU, vol, No , 2012
12. Kalmodia S, Molla AR, Basu B. In vitro cellular adhesion and antimicrobial property of SiO2-MgO-Al2O3-K2O-B2O3-F glass ceramic. J Mater Sci 2010; 21: 1297-309.
13. Shi Y, Yadav S, Wang F, Wang H. Endotoxin promotes adverse effects of amorphous silica nanoparticles on lung epithelial cells in vitro. J Toxicol Environ Health 2010; 73:748-56.
14. Shin SH, e MK, im HS, angb HS. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. I Int Immunopharmacol. 2007; 7(13): 1813-8.
15. Sun J, Wang S, Zhao D, Han Hun F, Weng L, Liu H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: Cell Biol Toxicol. 2011, 27; 333–342.
16. Aillon KL, XieY, Gendy NEl, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61: 457-66.

[Downloaded from tkj.ssu.ac.ir on 2024-04-25]