

ارزیابی اثر سایتوتوکسیک نانوذرات سیلیکا با اندازه ۲۰-۴۰nm بر سلول‌های سرطانی اپیتلیال ریوی (A549) و فیبروبلاست نرمال ریوی انسان (MRC5)

طناز کریمی^۱، نجمه نجم‌الدین^۲، رابعه منهج‌بناء^۳

چکیده

مقدمه: نانوذرات سیلیکا (SiO₂ NP) به دلیل خواص منحصر به فرد مانند اندازه کوچک، امکان اصلاح سطح و سهولت تولید، در صنعت و پزشکی کاربردهای بسیاری دارند. لذا سمیت ناشی از مواجهات تنفسی آن حین تولید و مصرف بخصوص در ابعاد ۲۰-۴۰nm به دلیل کاربرد گسترده‌تر صنعتی از اهمیت بالایی برخوردار است و می‌بایست مورد توجه و ارزیابی قرار گیرد.

روش بررسی: جهت مطالعه سم‌شناسی در شرایط آزمایشگاهی برون‌تنی (in vitro)، سمیت محلول SiO₂ NP در محدوده غلظت‌های ۰/۶-۳ mg ml⁻¹ روی سلول‌های فیبروبلاست (MRC5) و سلول‌های اپیتلیال (A549) ریه انسان، پس از ۷۲ ساعت توسط آزمون MTT و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

نتایج: آزمون MTT نشان داد، با افزایش غلظت SiO₂ NP از ۰/۶ تا ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در هر دو نوع سلول، میزان بقاء سلول‌ها کاهش می‌یابد. غلظت ۱/۶ mg ml⁻¹ به عنوان حداکثر غلظت بازدارنده نانوذرات سیلیکا (IC₅₀) در سلول‌های A549 محاسبه شده است و شانس بقاء سلول‌ها در این غلظت برای سلول‌های A549 و سلول‌های MRC5 به ترتیب ۴۶ و ۷۰ درصد می‌باشد. تصاویر SEM سلول‌های MRC5 در مواجهه با SiO₂ NP، نشان می‌دهد مورفولوژی سلول‌های MRC5 از شکل دوکی یا کشیده به دایره‌ای تبدیل شده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، سمیت نانوذرات سیلیکا وابسته به غلظت SiO₂ NP و نوع سلول است. با افزایش غلظت SiO₂ NP، میزان بقاء سلول‌ها کاهش می‌یابد. همچنین، میزان سمیت SiO₂ NP در برابر سلول‌های نرمال ریه انسان کمتر از سلول‌های سرطانی بوده است.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات سیلیکا، سلول‌های A549، سلول‌های MRC5

^۱ کارشناس مهندسی پزشکی، گروه تخصصی بیومواد، دانشکده علوم و فناوری پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه تخصصی بیومواد، دانشکده علوم و فناوری پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ دکتری تخصصی سم‌شناسی، گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن تماس: ۰۲۱۴۴۸۶۵۱۷۹، پست الکترونیک: najmoddin@srbiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۱

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده کاربردی از نانوذرات در زمینه‌های مختلف محیط‌زیستی و صنعتی (ساختمانی، الکترونیک، اپتیکی، پلاستیک) و پزشکی (تحویل دارو (۱)، بیوسنسورها (۲)، درمان سرطان (۳)، بیومارکرها (۴)، تحویل DNA (Deoxyribonucleic Acid) (۵)، و تحریک آنزیم‌ها (۶)) بسیار امیدوارکننده و رو به افزایش بوده است. نانوذرات سیلیکا اغلب در محصولات مصرفی و در نانوکامپوزیت‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر این نانو ذرات سیلیکا به‌طور بالقوه یک نانو ماده‌ی ایده‌آل برای کاربردهای زیستی است؛ زیرا سازگار با محیط‌زیست بوده و در برابر تجزیه بیولوژیکی در محیط سلولی مقاوم می‌باشد. همچنین، به دلیل حضور گروه‌های سیانول و بار منفی بر سطح نانوذرات سیلیکا، می‌توانند به‌راحتی توسط گروه‌های عاملی مختلف اصلاح شوند. نانوذرات سیلیکا به‌راحتی در اندازه‌ها و شکل‌های متفاوت سنتز می‌شوند و می‌توانند بارنگ‌های مختلف برای اهداف تصویربرداری یا جهت انتقال آنتی‌بادی‌ها برای اهداف خاص مورد استفاده قرار گیرند (۷). با توجه به کاربردهای فراوان و متفاوت نانوذرات سیلیکا به‌خصوص در زمینه‌های زیستی و پزشکی مانند، زیست سازگاری، سطح آبدوست برای فراهم کردن امکان گردش طولانی‌مدت در بدن و سهولت سنتز و هزینه‌های تولید پایین تحقیقات مختلفی در روش‌های ساخت و سنتز اقتصادی و تکرارپذیر این نانوذرات انجام می‌گیرد که با توجه به آنکه نحوه سنتز، خصوصیات فیزیکی شیمیایی ذره ساخته شده و محیط واکنش در هر روش با هم متفاوت بوده و هر کدام بر میزان سمیت این نانوذرات بسیار مؤثر می‌باشد، لذا ضرورت دارد آزمون‌های توکسیکولوژی بر اساس اهداف کاربردی جهت هر یک از این ذرات ساخته شده حتی با ابعاد یکسان به‌طور مجزا انجام پذیرد.

این نانوذره در کشور ما نیز در مقیاس‌های مختلف تهیه و بر اساس گزارش‌ها در بخش تحقیقات پزشکی و صنایع مختلف من‌جمله صنعت لاستیک، صنایع آرایشی و بهداشتی، رنگ، رزین و پوشش، سیمان و بتن، چسب و غیره مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است.

با توجه به توسعه روزافزون صنعتی و افزایش مواجهه افراد و صنعتگران با نانو ذرات سیلیکا، تحقیقات بسیاری در زمینه سمیت نانوذرات سیلیکا صورت گرفته است. نتایج تحقیقات Maqusood Ahamed در خصوص درصد بقاء

سلول‌های اپیتلیال ریه انسان (A549) و سلول‌های اندوتلیال پوست (A431) که در مواجهه با نانوذرات سیلیکا با اندازه ۱۵ نانومتر (دامنه غلظت‌های ۲۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفته بودند نشان می‌دهد که بقاء سلولی در هر دو نوع سلول رو به کاهش بوده است (۸). In Yong Kim و همکارانش، سمیت رده‌های مختلف سلولی در مواجهه با نانوذرات سیلیکا ۲۰۰-۲۰ نانومتر (دامنه غلظت‌های ۵۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به مدت ۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار دادند. نتایج کار این گروه نشان می‌دهد که غلظت بیش از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات سیلیکا سبب امکان انباشتگی در سلول‌ها/اندام‌های خاص نظیر ریه را دارا می‌باشند. سلول‌های HepG2 (سلول سرطانی کبد) کمترین حساسیت به نانوذرات سیلیکا را در میان انواع سلول‌ها اعم از رده‌های سلول سرطانی و نرمال داشته و اثرات سمی آن‌ها نسبتاً مستقل از اندازه و دوز نانوذرات سیلیکا می‌باشد. همچنین در این مطالعه مشاهده شده است که کاهش وابستگی به غلظت و اندازه نانوذرات بر سلول‌های HepG2 نشان از عدم آسیب به این نوع سلول‌ها می‌باشد (۹). Chang و همکاران سمیت نانوذرات سیلیکا را در انواع رده‌های سلولی انسان (ریه، معده و سرطان‌های اپیتلیال روده بزرگ) و فیبروبلاست‌های طبیعی (پوست و ریه) بررسی کرده و به این نتیجه دست یافته‌اند که سمیت نانوذرات سیلیکا تابع نوع سلول و زمان مواجهه با آن می‌باشد (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری، سمیت سلولی نانوذرات سیلیکا با قطر ۱۵ نانومتر و ۴۶ نانومتر بر سلول‌های سرطانی A549 در غلظت‌های ۱۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاکی از آن است که میزان سمیت وابسته به دوز بوده و افزایش غلظت نانوذرات سبب کاهش بقاء سلول‌های A549 می‌گردد (۱۱). مطالعه Rudolf و همکاران در سال ۲۰۱۱ که به‌منظور بررسی سمیت نانوذرات هواپرد انجام شده است، نشان داده شده است که نانوذرات ته‌نشین شده در ریه با غلبه بر سد غشایی بافتی و سلولی به درون سلول وارد می‌شوند و عوارض ناشی از نانوذرات به دلیل ورود و کنش‌های داخل سلولی رخ می‌دهد (۱۲). مطالعه دیگری نشان می‌دهد که بقاء سلولی با افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از این نانوذرات در سلول‌های ریه و سلول‌های اندوتلیال انسان (EAHY926) و سلول‌های (HEK293) و

ریوی (A549) و فیبروبلاست نرمال ریوی انسان (MRC5) جهت انجام آزمایش‌های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

روش تهیه نانوذرات سیلیکا و مشخصه‌یابی آن

نانوذرات سیلیکا ۲۰ تا ۴۰ نانومتر که یکی از ترکیبات پرکاربرد صنعتی و تحقیقاتی کشور می‌باشد، در این مطالعه با استفاده از روش سل - ژل سنتز شد. بر اساس مطالعات انجام شده (۱۶-۱۵)، در این روش اتانول، آب مقطر M ۶ و آمونیاک M ۰/۰۵۶ در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه، TEOS M ۰/۲۸ به محلول اضافه گردید. پس از تهیه کلئید مراحل همگن‌سازی و شستشو به ترتیب با استفاده از اولتراسونیک پروبی و سانتریفیوژ انجام گرفت. در مرحله بعد پودر به‌دست‌آمده وارد مرحله خشک شدن توسط فریزدرایر (دمای ۴۰-۸۰ درجه زیر صفر) گردیده و نهایتاً نانوذرات همگن سیلیس با ابعاد ۲۰-۴۰ نانومتر به‌دست‌آمده است. اندازه ذرات و خلوص آن با استفاده از دستگاه SEM و EDX مورد تأیید و آزمون قرار گرفت.

استریل کردن نانوذرات سیلیکا

جهت استفاده از مواد مختلف به‌منظور اطمینان از عدم حضور مداخله‌گرهای بیولوژیک در مرگ‌ومیر سلولی می‌بایست در ابتدا فرایند استریل کردن انجام شود. در این مطالعه ابتدا مقدار ۲۵ میلی‌گرم از نانوذرات توزین شده و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده می‌شوند. در ادامه روی نانوذرات اتوکلاو شده به میزان ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و سرم FBS ریخته می‌شود و یک محلول همگن آماده می‌شود.

کشت سلولی و قرار گرفتن سلول‌ها در مواجهه با

نانوذرات سیلیکا

سلول‌های A549 و MRC5 در پاساژ دهم مورد مواجهه قرار گرفته‌اند. به دلیل اینکه این سلول‌ها جزء رده‌های سلولی هستند، برخلاف سلول‌های سنتز شده به‌صورت مستقیم (که معمولاً در پاساژ سوم یا چهارم مورد استفاده قرار می‌گیرند) می‌توان آن‌ها را در پاساژهای بالا مورد استفاده قرار داد (۸). محیط کشت استفاده شده به منظور شبیه‌سازی محیط بیولوژیکی بدن انسان، برای سلول‌های A549 محیط RPMI با ۱۰ درصد FBS بوده است. برای سلول‌های MRC5 که سلول‌های نرمال هستند و برای بقاء

همچنین سلول‌های کبد انسان (HepG2) کاهش می‌یابند (۱۳).

نکته مهم آن است که در سمیت نانوذرات نه‌تنها اندازه بلکه روش تهیه و آماده‌سازی حین مصرف نیز بسیار مهم بوده و همین امر سبب می‌شود تا ارزیابی سمیت به‌طور ویژه برای محصولات مختلف انجام شود. نتیجه مطالعه جبالی و همکاران در ارزیابی تأثیر اندازه و شکل نانوذرات سیلیکا بر سلول ریه موش صحرایی در یک مطالعه ۶ و ۲۴ ساعته نشان می‌دهد که ذرات ۲۰ نانومتری سمیت بیشتری نسبت به ۵۰ و ۱۰۰ نانومتر دارد. همچنین ذرات کروی سمیت بیشتری در مقایسه با ذرات میله‌ای و سیمی از خود نشان می‌دهند و لذا سمیت نانوذرات سیلیکا تابع اندازه، شکل و زمان مواجهه در رت می‌باشد (۱۴).

در این تحقیق بر اساس مطالعات ذکر شده و کاربرد بالای تحقیقاتی و صنعتی نانوذرات سیلیکا (۲۰-۴۰ نانومتر) کروی شکل که در مطالعات جبالی و همکاران در موش صحرایی سمیت بالاتری دارد و با توجه به نیاز به بررسی‌های تحقیقاتی در غلظت‌های مختلف آن، نانوذرات سیلیکا سنتز شده ۲۰ تا ۴۰ در سلول‌های سرطانی اپیتلیال ریه انسان و سلول‌های نرمال فیبروبلاست ریه انسان به‌عنوان دو سلول شاخص ریه انسانی و سمیت تنفسی از طریق آزمون MTT و SEM مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

مواد مورد استفاده

اتانول ($\geq 99/99$ درصد)، آمونیاک (۲۵ درصد) و تترااتیل‌اورتوسیلیکات (TEOS, ≥ 99 درصد)، گلوکار آلدهید با فرمول شیمیایی $C_5H_8O_2$ ، اتانول و ایزوپروپانول از شرکت مرک (Merck, USA) خریداری گردید. تریپسین، پنی‌سیلین / استرپتومایسین، محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) و DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و سرم جنین گاوی (با اختصار FBS (Fetal Bovine Serum)) از شرکت گیبکو (Gibco, USA) تهیه گردید. ۳-۴ و ۵-دی‌متیل تiazول (۲-۲-یل) MTT: 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetra zolium bromide (نیز از شرکت سیگما-آلدریج (Sigma-Aldrich USA) تهیه شد. سلول‌های سرطانی اپیتلیال

بنفش تیره‌تر باشد به این معناست که درصد بقاء سلول‌ها بیشتر می‌باشد. بعد از ۴ ساعت محصولات فورمازون در ایزوپروپانول به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده می‌شود. با توجه به اینکه فورمازون یک ماده غیرقطبی است، از ایزوپروپانول یا DMSO به عنوان حلال غیرقطبی استفاده می‌شود. در آزمون MTT، استفاده از ایزوپروپانول به دلیل میزان حلالیت بیشتر، مرسوم‌تر است. در پایان با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر (Microplate reader) در طول موج ۶۳۰ نانومتر، درصد بقاء سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بررسی ساختار و توزیع اندازه ذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM)

به منظور بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات سیلیکا از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی عموماً در خلا کار می‌کنند. پس از ایجاد خلا با انجام عملیات روبش توسط پرتو الکترونی بر روی سطح نمونه، از سطح نمونه تصویری بر روی صفحه نمایشگر مشاهده می‌گردد. در این تحقیق از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGA/TESCAN ساخت جمهوری چک با بزرگنمایی بالا تا ۱۰۰۰۰۰ برابر و قدرت تفکیک ۱۰ نانومتر استفاده گردید. همچنین میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی با مدل MIRA3/TESCAN ساخت جمهوری چک جهت بررسی مورفولوژی نانوذرات سیلیکا در سلول مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت این میکروسکوپ با میکروسکوپ الکترونی روبشی در بزرگنمایی بالای آن (۱۰۰۰۰۰۰) و قدرت تفکیک یک نانومتری آن می‌باشد (۱۷).

جهت آماده‌سازی نمونه‌ها در این آزمون ۵۰۰۰ سلول (۱۸) روی لام‌های مربعی (۱×۱) شیشه‌ای توزیع گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در مواجهه با نانوذرات سیلیکا با غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$ قرار داده شد. بعد از ۳ ساعت سلول‌ها به وسیله گلوآرآلدهید تثبیت گردید و سپس تصاویر سلول‌های قرارگرفته در مواجهه با نانوذرات سیلیکا به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه گردید.

و تکثیر به محیط کشت مغذی تری نیاز دارند، محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS مورد استفاده قرارگرفت. سلول‌های A549 در محیط کشت RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) - L گلوتامین ۱ درصد - ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین - ۱ درصد هپس و ۱ درصد سدیم و سلول‌های MRC5 در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS - ۱ درصد L گلوتامین - ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین قرارگرفتند.

هر دو نوع سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شدند. نانوذرات سیلیکا با غلظت‌های ۰/۶-۰/۷-۰/۹-۱/۲-۱/۶-۲/۱-۲/۴ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. بر اساس یک سری آزمون‌های اولیه، غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان پایه انتخاب گردید و غلظت‌های بعدی با فرمول (غلظت قبل $\times 10^{-1}$) مشخص شده‌اند. به منظور جلوگیری از به هم چسبیدگی نانوذرات سیلیکا از حمام سونیکاتور به مدت ۱۰ دقیقه و همچنین دستگاه ورتکس (Vortex) استفاده گردید.

ارزیابی میزان سایتوتوکسیسیته نانوذرات با روش MTT

جهت بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات سیلیکا بر رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده گردید. این روش یکی از بهترین روش‌های غیرمستقیم موجود بوده که بر پایه تغییر رنگ پودر تترازولیوم زرد به کریستال‌های نامحلول بنفش مایل به سیاه فورمازون است. این پدیده تنها در سلول‌های زنده و با استفاده از آنزیم موجود در میتوکندری آن‌ها به نام سوکسینات دهیدروژناز اتفاق می‌افتد. ابتدا سلول‌های A549 و MRC5 در پلیت ۹۶ تایی (۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) و به مدت یک روز در انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH حدود ۷/۲ و تامین CO_2 به میزان ۵ درصد) قرار داده می‌شوند. سپس سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف (۳-۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات سیلیکا به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از ۷۲ ساعت محیط روی سلول حذف می‌گردد و رنگ MTT به میزان ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ روی سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شده تا رنگ زرد MTT به رنگ بنفش فورمازون تبدیل شود. هر چه رنگ

روش آماری

در این مطالعه مهارکنندگی رشد ۵۰ درصد IC50 (Half maxima inhibitory concentration) (غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود) مستقیماً بر اساس آزمایش غلظت‌های مختلف نانوذره روی سلول‌ها به دست آمدند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار v7.05 Graphpad.prism استفاده گردید.

نتایج

آنالیز نانوذرات سیلیکا

تصاویر تهیه‌شده از نانوذرات سیلیکا (شکل ۱) نشان می‌دهد، مورفولوژی این ذرات به صورت کروی بوده و در اندازه‌های ۲۰-۴۰ نانومتر می‌باشد. شکل ۱ نشان می‌دهد که نانوذرات سیلیکا به فرم آگلومره (کلوخه) می‌باشند. علت این امر آن است که با کاهش اندازه‌ی ذرات پودری، نسبت سطح به حجم آن‌ها افزایش یافته و در نتیجه نیروی جاذبه بین ذرات افزایش می‌یابد که نتیجه آن آگلومره‌های شدیدی است که این آگلومره‌ها می‌تواند دلیلی بر کوچکی زیاد ذرات سنتز شده باشد (۱۹) و نیاز است تا تلاش گردد پیش از مواجهه محلول یکنواخت و همگن از ذرات پخش شده نانوذرات سیلیکا مطابق با روش ذکر شده در غلظت‌های مورد نظر به دست آید.

طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوایکس (EDX) یا (EDS) یک روش تحلیلی است که برای تجزیه و تحلیل ساختاری یا خصوصیات شیمیایی یک نمونه به کار می‌رود (شکل ۲). پیک‌های به‌دست‌آمده از آنالیز EDX مؤید حضور اکسیژن (O)، سیلیسیم (Si) و خلوص بسیار بالای ترکیب سنتز شده می‌باشد.

مورفولوژی سلول‌ها

تصاویر سلول‌های A549 و MRC5 در شکل ۳ (الف) و (ب) مشاهده می‌شود، این سلول‌ها در پاساژ پنجم و قبل از مواجهه می‌باشند و تست MTT بعد از پاساژ آخر صورت گرفت.

آزمون MTT

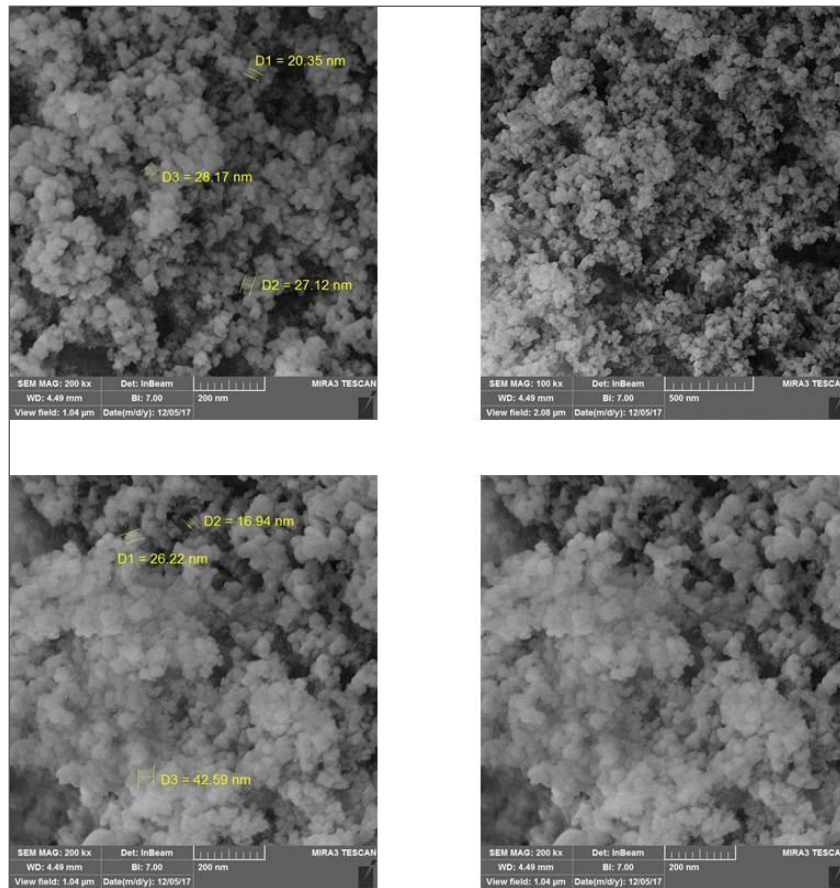
این آزمون روی سلول‌های A549 و MRC5 بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با نانوذرات سیلیکا (۳-۰/۶ میلی‌گرم بر

میلی‌لیتر) انجام شده است. همچنین کنترل مثبت در این آزمون DMSO و کنترل منفی محیط کشت سلولی RPMI می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد هم‌زمان با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکا رنگ بنفش فورمازون کمتر شده است، این بدان معناست که درصد بقاء سلول‌های A549 با افزایش غلظت سیلیکا کاهش می‌یابد. این امر بخصوص از غلظت ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به بالا شدت بیشتری را نشان داده و نرخ کاهش بقاء افزایش می‌یابد (شکل ۴). به‌منظور اطمینان از نتایج این آزمون سه مرتبه برای انواع سلول‌ها تکرار شده است. درصد بقاء، سلول‌ها طبق فرمول زیر به‌دست می‌آید:

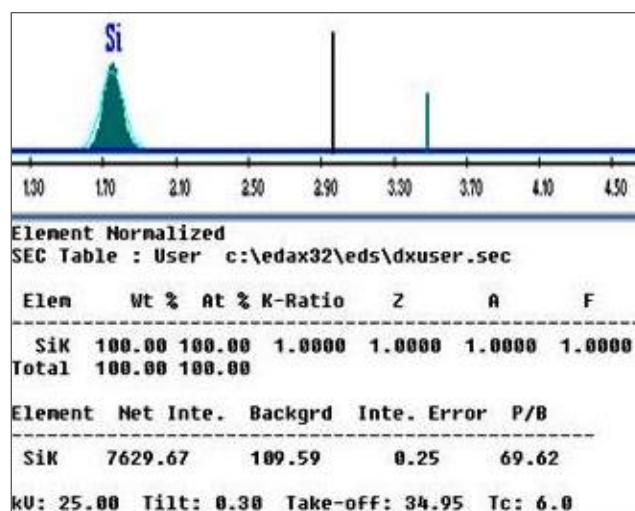
$$\text{درصد بقاء سلول} = (\text{بقاء سلول در غلظت خاص} \div \text{بقاء سلول در کنترل}) \times 100$$

با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکا از ۰/۶ الی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درصد بقاء سلول‌های MRC5 از ۸۵ درصد به ۶۳ درصد کاهش یافته‌است (شکل ۵). نانوذرات سیلیکا در این مطالعه در غلظت‌های بالاتر از ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر سلول‌های A549 و MRC5 در مواجهه با نانوذرات سیلیکا اثر می‌گذارد و سبب مرگ سلولی می‌گردند.

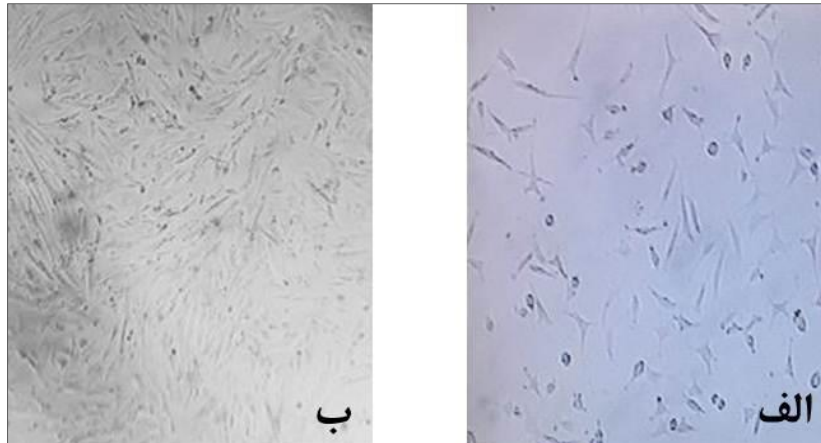
نتایج آزمون MTT نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکا از ۰/۶ الی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درصد بقاء سلول‌های A549 از ۹۲ درصد به ۳۳ درصد کاهش یافته است (شکل ۴). همچنین این سلول‌ها در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۴۳ درصد بقاء دارند که این غلظت معرف غلظت حداکثر غلظت بازدارنده نانوذرات سیلیکا (IC50) می‌باشد که در این غلظت نیمی از سلول‌ها زنده باقی می‌مانند. نتایج تست MTT نشان می‌دهند که درصد بقاء سلول‌های A549 در مواجهه با نانوذرات، با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکا کاهش می‌یابد. سلول‌های نرمال ریه انسان (MRC5) در مقایسه با سلول‌های سرطانی (A549) در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۷۰ درصد بقاء دارند.



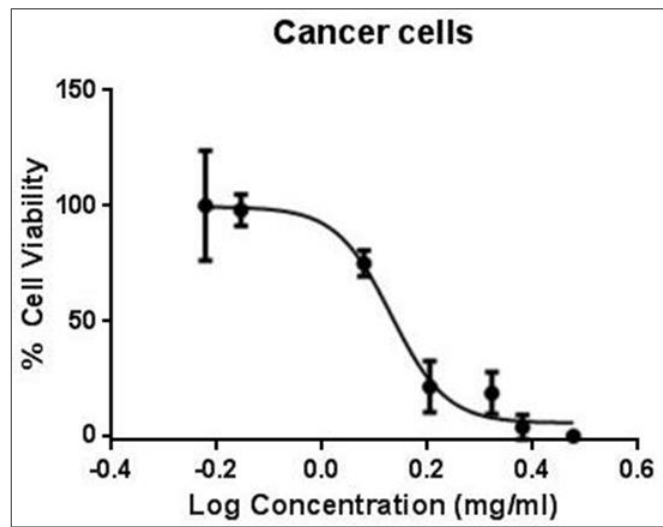
شکل ۱. تصاویر FESEM مربوط به نانوذرات سیلیکا (VEGA/TESCAN با بزرگنمایی بالا تا 100 K)



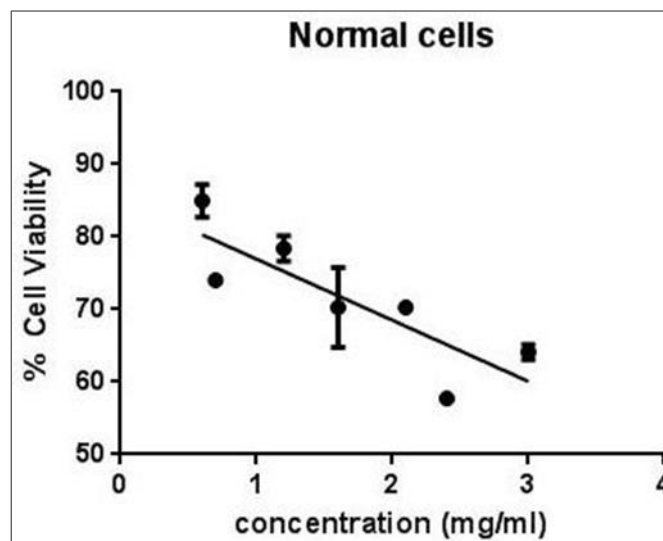
شکل ۲. عناصر سازنده نانوذرات سیلیکا (EDX)



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 100X (الف) سلول‌های A549 ، (ب) سلول‌های MRC5



شکل ۴. نمودار آزمون MTT سلول‌های A549

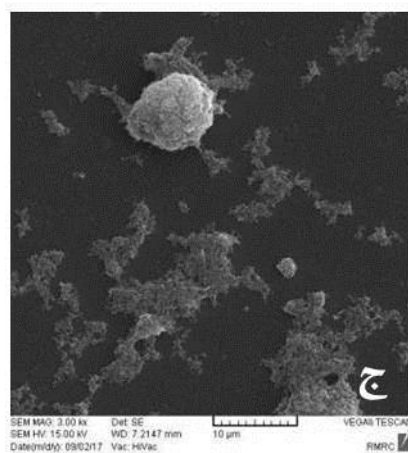
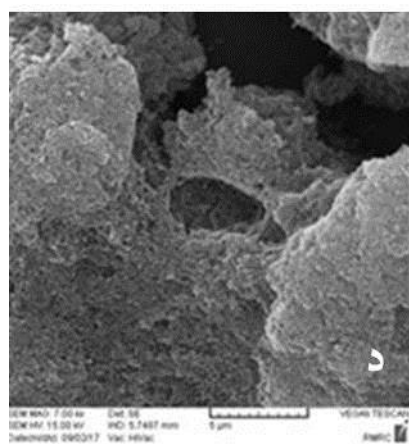
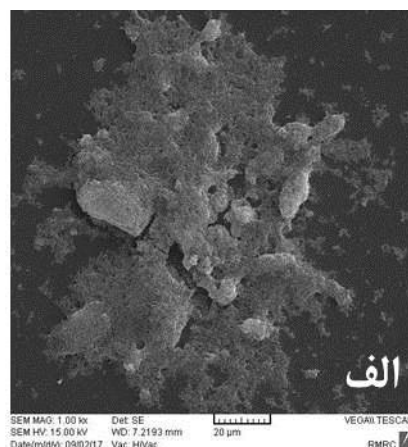
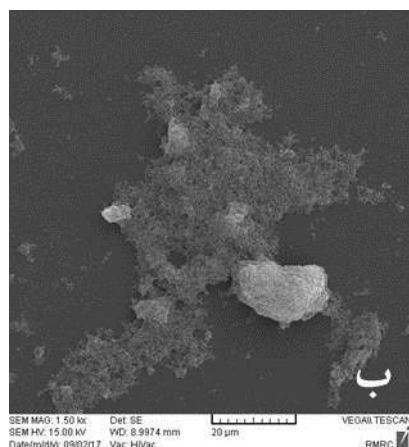


شکل ۵. نمودار آزمون MTT سلول‌های MRC5

نتایج آزمون FESEM

با توجه به نتایج آزمون MTT، درصد بقاء سلول‌های MRC5 در مقابل نانوذرات سیلیکا در مقایسه با سلول‌های A549 بیشتر است و در نتیجه نانوذرات به زمان بیشتری برای نفوذ در سلول نیاز دارند. با توجه به درصد زنده‌مانی بالاتر سلول‌های MRC5 در مقایسه با سلول‌های A549، رفتار این رده سلولی در مواجهه با نانوذرات سیلیکا توسط

آزمون FESEM مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر FESEM نشان می‌دهد مورفولوژی سلول‌های MRC5 در مواجهه با نانوذرات سیلیکا با غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییر کرده و از شکل دوکی به شکل دایره‌ای تبدیل شده است. نانوذرات بعد از ۳ ساعت در سلول‌ها نفوذ کرده و سبب مرگ ۳۰ درصد (طبق آزمون MTT) از سلول‌ها شده‌اند (شکل ۶).



شکل ۶. تصاویر SEM سلول‌های MRC5 در مواجهه با نانوذرات سیلیکا (الف) بزرگنمایی ۱kx (ب) ۱/۵kx (ج) ۳kx (د) ۷kx

بحث

سلول‌های سرطانی (A549) و سلول‌های نرمال (MRC5) به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. با توجه به لزوم بررسی سمیت نانوذرات سیلیکا بر سلول‌های ریوی انسان، سلول‌های مورد آزمایش در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، سلول‌های سرطانی (A549) و سلول‌های نرمال (MRC5) می‌باشند. شکل ۳ نشان می‌دهد که سلول‌های A549 در تراکم ۸۰ درصد،

نانوذرات سیلیکا به دلیل کاربردهای بسیار در صنعت و زیست پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. از این رو بررسی سمیت نانوذرات سیلیکا و اثرات آن‌ها روی سلول‌ها به خصوص سلول‌های ریوی که اولین راه ورودی نانوذرات به بدن انسان است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. مطالعه سمیت نانوذرات سیلیکا (۲۰-۴۰ نانومتر) در محدوده غلظت‌های ۰/۶-۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی

یافته ولی سمیت نانوذرات ۱۵ و ۴۶ نانومتری تفاوت معناداری نداشته‌اند (۱۱). مطالعه روی سمیت نانوذرات سیلیکا با اندازه ۲۰ نانومتر در محدوده غلظت ۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های اندوتلیال انسان توسط آزمون MTT نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکا زنده مانی سلول‌های اندوتلیال کاهش می‌یابد (۲۶). Duan و همکارانش گزارش کرده‌اند که در مواجهه با نانوذرات سیلیکا (۶۲ نانومتر)، افزایش غلظت نانوذرات از ۲۵ به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های ریه (A549) و سلول‌های اپیتلیال پوست (A431) می‌گردند (۲۷). مطالعه دیگری روی سلول‌های فیروبلاست ریه نیز نشان داد که نانوذرات سیلیکا (۲۰ نانومتر) می‌توانند سبب ایجاد مرگ سلول به روش آپوپتوز وابسته به غلظت (۲۵۰-۱۰۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت) شوند (۲۸). بنا بر مطالعات انجام شده در خصوص نانوذرات سیلیکا نشان داده شده است که نانوذرات سیلیکا کروی (قطر ۱۵۰-۸۰ نانومتر) توسط سلول‌ها جذب شده و تفاوت‌ها مرتبط با سازگاری زیستی، مقاومت زیستی و نوع سلول‌های مورد مواجهه با این ذرات می‌باشد (۳۲-۲۹).

با توجه به شکل ۶ مربوط به سلول‌های MRC5 در تماس با نانوذرات سیلیکا، شکل سلول‌ها از حالت دوکی (کشیده) به کروی تغییر یافته است. همچنین، توزیع نانوذرات سیلیکا ناهمگن بوده است. به‌خصوص در قسمت‌های مرکزی به هم چسبیده‌اند و نفوذ بیشتری در سلول‌ها داشته‌اند. علت این امر ممکن است به دلیل آگلومره شدن نانوذرات باشد. در کناره‌های لام (سلول‌های در مواجهه با نانوذرات سیلیکا بر روی آن ثابت شده‌اند) سلول‌ها تغییرات اندکی داشته‌اند و یا نانوذرات در سلول‌ها نفوذ نکرده و سلول‌ها بدون تغییر در شکل و ساختار قرار دارند.

نتیجه‌گیری

سمیت نانوذرات سیلیکا وابسته به غلظت و نوع سلول است. سلول‌های نرمال MRC5، در برابر نانوذرات سیلیکا نسبت به سلول‌های سرطانی A549، مقاومت بیشتری از خود نشان داده و درصد بقاء سلول‌های MRC5 بیشتر از سلول‌های A549 می‌باشد. احتمالاً متابولیسم و فعالیت سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های نرمال می‌باشد، به

به‌صورت چندضلعی و تقریباً ستاره‌ای مانند (سلول سنگ‌فرشی و باریک) می‌باشند و سلول‌های MRC5 در تراکم ۷۰ درصدی بسیار کشیده بوده و زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند. بر اساس نتایج سلول‌های نرمال ریه انسان (MRC5) در مقایسه با سلول‌های سرطانی (A549) در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۷۰ درصد بقاء دارند. مقایسه شکل‌های ۴ و ۵ گویای تفاوت درصد بقاء سلول‌های A549 و MRC5 می‌باشد که در غلظت‌های بالا سلول‌های MRC5 نسبت به سلول‌های A549 مقاوم‌تر می‌باشند. سلول‌های نرمال به دلیل چسبندگی و پیوستگی زیاد، متابولیسم و فعالیت کنترل شده و پایین‌تر، جذب پایین‌تری از نانوذرات سیلیکا را نشان می‌دهند. در مقابل سلول‌های سرطانی به علت چسبندگی و پیوستگی کم، متابولیسم و فعالیت بالا و نیز کاهش عملکرد سیستم‌های کنترلی درون سلولی در جذب مواد و تولید گونه‌های فعال آسیب‌زا، قابلیت جذب میزان بالاتری از نانوذرات سیلیکا را دارا می‌باشند و در نتیجه بیشتر دچار مرگ سلولی می‌شوند (۲۲-۲۰). درصد زنده‌مانی سلول‌های MRC5 از غلظت ۰/۶ الی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش می‌یابد اما این میزان کاهش در مقابل سلول‌های A549 میزان کمتری می‌باشد. در این مطالعه درصد زنده‌مانی سلول‌های اپیتلیال ریه انسان (A549) و سلول‌های نرمال ریه انسان (MRC5) در مواجهه با نانوذرات سیلیکا با اندازه ۴۰-۲۰ نانومتر و غلظت ۰/۶-۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش غلظت، درصد بقاء هر دو نوع سلول کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه در تست MTT واکنش توسط میتوکندری صورت می‌پذیرد لذا از نتایج این مطالعه می‌توان حدس زد که مکانیسم سمیت سلول احتمالاً از طریق تداخل عملکرد میتوکندری در سلول‌ها انجام شود (۲۳).

گزارش‌های سایر محققین روی سمیت نانوذرات سیلیکا بر انواع دیگر رده‌های سلولی موید وابستگی سمیت به دوز می‌باشد (۲۵-۲۴). این نتایج در مطالعات Lin و همکاران که به بررسی سمیت سلولی نانوذرات سیلیکا ۱۵ نانومتر و ۴۶ نانومتر در سلول‌های سرطانی مشتق شده از برونش کشت شده انسانی در غلظت‌های ۱۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت نیز نشان داده شده است. لین نشان داده است که با افزایش غلظت نانوذرات درصد بقاء در سلول‌های ریه انسان کاهش

در این خصوص و درک موارد ایمنی مرتبط لازم و ضروری است.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر از پایان نامه دانشجویی استخراج گردیده است. پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از کلیه عزیزانی که در انجام این پژوهش همکاری را داشته‌اند، مراتب سپاس و قدردانی را به‌جا آورند.

همین علت سلول‌های سرطانی میزان بیشتری از نانوذرات را جذب می‌کنند. اما با این وجود طبق نتایج به‌دست‌آمده در تست MTT و همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی باید توجه شود که نانوذرات سیلیکا با ایجاد سمیت در سلول‌های نرمال ریه انسان می‌تواند سبب تغییر در شکل و ساختار سلولی انسان شده و این تغییرات نسبی روی سلول‌های ریه انسان از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد زیرا روزانه افراد زیادی در زمینه‌های مختلف صنعتی با نانوذرات سیلیکا روبه‌رو می‌باشند و حتماً مطالعات بیشتر

References:

- Manzano M, Vallet-Regí M. *Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery*. Advanced functional materials. 2020; 30(2): 637-642.
- Jimenez-Falcao S, Para-Nieto J, Perez-Cuadrado H, Martínez-Máñez R, Martínez-Ruiz P, Villalonga R. *Avidin-gated mesoporous silica nanoparticles for signal amplification in electrochemical biosensor*. Electrochemistry Communications. 2019;108: 4988-4993.
- AbouAitah KH, Hasan HA, Swidereska-Sroda A, Gohar L, Shaker OG, Wojnarowicz, J, Opalinska A, Smalc-Koziorowska J, Gierlotka S, Lojkowski W. *Targeted nano-drug delivery of colchicine against colon cancer cells by means of mesoporous silica nanoparticles*. Cancers. 2020; 12(1): 144.
- Geng J, Song H, Gao F, Kong Y, Fu J, Luo J, Yang Y, Yu C. *Lyophilization enabled disentanglement of polyethylenimine on rambutan-like silica nanoparticles for enhanced plasmid DNA delivery*. Journal of Materials chemistry B. 2020; 21: 11539-11544.
- Mutti AMG, Santos JAO, Cavalcante DJS, Gomes, AS, Job AE, Pires AM, Lima SAM. *Decorated silica particles with terbium complexes as luminescent biomarker for cell imaging*. Optical Materials. 2019; 90:56-63.
- Mishra A, Melo J.S, Agrawal A, Kashyap Y, Sen D. *Preparation and application of silica nanoparticles-Ocimum basilicum seeds bio-hybrid for the efficient immobilization of invertase enzyme*. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces. 2020; 188: 110796.
- Vandghanooni S, Barar J, Eskandari M, Omid Y. *Aptamer-conjugated mesoporous silica nanoparticles for simultaneous imaging and therapy of cancer*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020; 123: 115759.
- Ahamed M. *Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells*. Human & Experimental Toxicology. 2013; 32(2): 186-95.
- Kim I, Joachim E, Choi H, Kim K.K. *Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2015; 11 (6): 1549-9634.
- Chang J, Chang K.L.B., Hwang D-F, Kong Z-L. *In vitro cytotoxicity of Silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the Cell Line*. Environmental Science & Technology. 2007; 41 (6): 2064-2068.
- Lin W, Huang Y-W, Zhou X-D, Ma Y. *In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*. Toxicity and applied pharmacology. 2007; 217 (3): 252-259.
- Hanns-Rudolf P, Flemming R, Justin T, Heinz F, Silvia D, Michaela A, et al. *In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung – A dialog between aerosol science and biology*. Journal of aerosol science. 2011; 118: 407-413.
- Yang H, Lui C, Yang D, Zhang H, Xi Z. *Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterial: the role of partial size, shape and composition*. Journal of applied toxicology. 2009; 29: 69-78.
- Jebali A, Hekmatimoghaddam SH, Halvani GH, Abdolmaleki A, *Comparison of cytotoxic effects of different sizes and shapes of SiO₂ nanoparticles on rat lung cells*. Occupational Medicine Quarterly Journal. 2013; 5(4): 24-32.
- Ragheb G, Najmoddin N, Alimardani M, Jomeh-Farsangi Z. *The effect of synthesis parameters on the particle size, particle size distribution and hydrodynamic diameter of silica nanoparticles via modified Stöber method*. Journal of nanomaterials. 1397: 10: 117-128.[Persian].

16. Greasley SL, Page SJ, Sirovica S, Chen S, Martin RA, Riveiro A, Hanna JV, et al. *Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium*. Journal of Colloid and Interface Science. 2016; 469: 213-223.
17. Sriamornsak P, Thirawong N. *Use of back-scattered electron image as a tool for examining matrix structure of calcium pectinate*. International journal of Pharmaceutics. 2003; 267: 151-156.
18. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J, *The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function*. Biomaterials. 2010; 31: 438-448.
19. Napierska D, Thomassen L.C.J, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al. *Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells*. Small. 2009; 5(7): 846-853.
20. Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing II, Lin, VS-Y. *Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects*. ACS Nano. 2011; 5(2): 1366-1375.
21. Trewyn BG, Nieweg JA, Zhao Y, Lin VS-Y, *Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration*. Chemical Engineering Journal. 2008; 137(1): 23-29.
22. Zhang Y, Hu L, Yu D, Gao Ch. *Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts*. Biomaterials. 2010; 31(32): 8465-8474.
23. Kearns ChR. *In vitro toxicity of silver nanoparticles human lung epithelial cells*. MSc [Thesis]. Air Force Institute of Technology, USA; 2009.
24. Shen Y, Nakajima M, Kojima S, Homma M, Kojima M, Fukuda T. *Single cell adhesion force measurement for cell viability identification using an AFM cantilever-based micro putter*. Measurement Science and Technology. 2011; 22(11): 115802.
25. Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J. *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*. Toxicology in Vitro. 2009; 23(5): 808-815.
26. Lee K, Lee J, Kwak M, Cho Y-L, Hwang B, Cho MJ, et al. *Two distinct cellular pathways leading to endothelial cell cytotoxicity by silica nanoparticle size*. Journal of Nanobiotechnology. 2019; 17(1): 24.
27. Duan J, Yu Y, Li Y, Yu Y, Li Y, Zhou Z, Huang P, Sun Z. *Toxic effect of silica nanoparticles on endothelial cells through DNA damage response via Chk1-dependent G2/M checkpoint*. PLOS One. 2014;8(4): 11: 50.
28. Ryu HJ, Seong NW, So BJ, Seo HS, Kim JH, Hong JS, Park M, Kim M, Kim Y, Cho K, Seo MY, Kim M, Meang E, Son SW. *Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days*. International Journal of Nanomedicine. 2014; 9: 127-136.
29. Ahmad J, Ahamed M, Akhtar MJ, Alrokayan SA, Siddiqui MA, Musarrat J, Al-Khedhairi. *Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2012; 259 (2):160-168.
30. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Letter. 2006; 6(4): 662-668.
31. Vallhov H, Gabrielsson S, Strømme M, Scheynius A, Garcia-Bennett A. E, *Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells*. Nano Letter. 2007; 7 (12): 3576-3582.
32. Lu F, Wu S-H, Hung Y, Mou C-Y. *Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles*. Small. 2009; 5: 1408-1413.

Evaluation of silica nanoparticles cytotoxicity (20-40 nm) on cancerous epithelial cell (A549) and fibroblasts cells of human normal lung fibroblast (MRC5)

Karimi T¹, Najmoddin N^{1*}, Menhaje-Bena R²

¹ Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Silica nanoparticles have received more attraction in medical and industrial applications due to their unique properties such as small size, the possibility of surface functionalization, ease of production, and low cost. So, it is necessary to study the respiratory toxicity of occupational exposure due to the production and increasing use of silica nanoparticles, especially in the size of 20-40 nm.

Materials and Methods: In vitro, cytotoxicity of silica nanoparticles (SiO₂ NPs) in 0.6 -3 mg/ml concentrations were evaluated on human lung epithelial (A549) and human fetal lung fibroblast (MRC5) cells by MTT assay and scanning electron microscopy (SEM) images AFTER 72 hours.

Results: The MTT assay showed that the cell viability was reduced by increasing the concentration of SiO₂ NPs from 0.6 to 3 mg/ml in both types of cells. In 1.6 mg/ml concentration, the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of SiO₂ NPs on A549 cancer cells, the chance of survival is as such: %46 for A549 cancer and %70 for MRC5 normal cells. The SEM images of normal lung cells (MRC5), which have been exposed to SiO₂-NP, showed that the morphology of MRC5 cells has transformed from a long shape to a circular one.

Conclusion: The cytotoxicity of SiO₂ NP depends on the concentration of SiO₂ NP and the type of cells. By increasing SiO₂ NP concentration, the cell viability decreases for both types of cells. Moreover, the cytotoxicity of SiO₂ NP against cancer cells (A549) is higher than normal lung cells (MRC5).

Keywords: SiO₂ NP, A549 Cells, MRC5 Cells

This paper should be cited as:

Karimi T, Najmoddin N, Menhaje-Bena R. *Cytotoxicity of silica nanoparticles (20-40 nm) in fibroblasts cells of human normal lung (MRC5) versus cancerous one (A549)*. Occupational Medicine Quarterly Journal. 2021;12(4): 1-12.

***Corresponding Author**

Email: najmoddin@srbiau.ac.ir

Tel: +982144568179

Received: 01.06.2019

Accepted: 12.08.2020