Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Assessment of Gold Nanoparticles Cytotoxicity Produced by the Biological Method by *Fusarium Oxysporum* on Normal and Cancerous Fibroblast Cell Lines

Tahereh Noorani[1], Seyed Hossein Badiee[1], Sahebali Manafi[1], Behrooz Yahyaei[2]

1. Department of Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
2. Department of Basic Science, Faculty of Medical, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/05/03
Accepted: 2018/02/19
Available online: 2018/05/14

Article Subject:
Nanotechnology In Medicine

IJMM 2018; 12(1): 23-32

Corresponding author:

Seyed Hossein Badiee
Department of Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
Tel: 023-32394323

Email: drh_badiee@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Although there are several ways of nanoparticles production, however the biological method of nanoparticles production is under attention of researchers due to its eco friendly and energy saving properties. In the present study biosynthesis of gold nanoparticle was done by Fusarium oxysporum fungus strain and the cytotoxicity of the obtained nanoparticles was evaluated in the cell culture.

Materials and Methods: Fusarium oxysporum was purchased and cultured in Sabouraud dextrose broth medium. The culture supernatant was subjected to chloroauric acid solution at the final concentration of 1 mM. After nanoparticles production, the color changed reaction mixture was used for characterization with spectrophotometry, XRD and TEM microscopy. The obtained nanoparticles were washed and sterilized. Finally two cell lines (CIRC-HLF as normal and SW 872 as cancerous cell lines) were used for 3-(4,5 dimethyl thiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay.

Results: The fungal supernatant color after 24 hours was changed from yellow to red. TEM images have shown the nanoparticles were spherical or hexagonal and their sizes were around 50-70 nanometer. MTT assay and cell culture assay showed that the produced GNPs had toxic effect when they were used at high concentrations and the CIRC-HLF cell line was more resistant than SW 872 one against the higher concentration of GNPs.

Conclusions: It seems that the biological production of gold nanoparticles by Fusarium oxysporum can be done and can be easily produced, washed, sterilized and can be used in vivo.

Keywords: Gold Nanoparticles, Fusarium Oxysporum, Cytotoxic, Fibroblast Cell Lines CIRC-HLF, Fibroblast Cell Lines SW 872

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Noorani T, Badiee S H, Manafi S, Yahyaei B. Assessment of Gold Nanoparticles Cytotoxicity Produced by the Biological Method by *Fusarium Oxysporum* on Normal and Cancerous Fibroblast Cell Lines. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (1) : 23-32

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۱ – فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی سمیت سلولی نانوذرات طلای سنتز شده به روش بیولوژیک به وسیلهٔ قارچ *Fusarium Oxysporum* بر رده‌های سلولی طبیعی و سرطانی فیبروبلاست

طاهره نورانی[۱]، سیدحسین بدیعی[۱]، صاحبعلی منافی[۱]، بهروز یحیایی[۲]

۱. گروه مهندسی مواد سرامیک، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران
۲. گروه علوم پایه، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۳
پذیرش:۱۳۹۶/۱۱/۳۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴
موضوع:
نانوبیوتکنولوژی در پزشکی

IJMM1397;12(1): 23-32

نویسنده مسئول:
سیدحسین بدیعی
گروه مهندسی مواد سرامیک، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۴۳۲۳

پست الکترونیک:
drh_badiee@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: با وجود اینکه روش‌های مختلفی برای تولید نانوذرات وجود دارد، روش تولید بیولوژیکی نانوذرات به دلیل خواص دوستدار طبیعت آن و صرفه‌جویی در انرژی، توجه محققان را به خود جلب کرده است. در مطالعهٔ حاضر تولید بیولوژیکی نانوذرات طلا به وسیلهٔ سویهٔ قارچ *Fusarium oxysporum* انجام و سمیت نانوذرات به‌دست آمده در کشت سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌کار: *Fusarium oxysporum* خریداری و در محیط کشت سابوراد دکستروز براث (SDB) کشت داده شد. سوپرناتانت کشت در معرض محلول کلرواوریک اسید در غلظت نهایی ۱ میلی مولار قرار گرفت. پس از تولید نانوذرات، محلول تغییر رنگ دادهٔ نانوذرات برای بررسی با اسپکتروفوتومتر و TEM استفاده شد و نانوذرات به‌دست آمده شست‌وشو و استریل شدند. در نهایت دو ردهٔ کشت سلولی CIRC-HLF به عنوان ردهٔ طبیعی و SW 872 به عنوان ردهٔ سرطانی برای آزمون MTT استفاده شدند.

یافته‌ها: رنگ سوپرناتانت قارچ پس از ۲۴ ساعت از زرد به قرمز تغییر پیدا کرد. عکس‌های TEM نشان داد که نانوذرات کروی و چند وجهی با ابعاد در حدود ۵۰-۷۰ نانومتر هستند. آزمون MTT و آزمون کشت سلولی نشان داد که نانوذرات طلای تولیدی هنگامی‌که در غلظت‌های بالا استفاده شود اثر سمی دارد و کشت سلولی ردهٔ CIRC-HLF به غلظت‌های بالا از نانوذرات طلا نسبت به ردهٔ سلولی SW 872 مقاوم‌تر بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تولید نانوذرات طلا بیولوژیک با *Fusarium oxysporum* انجام شدنی است و می‌توان آن را به راحتی تولید، شست‌وشو و استریل کرد. این نانوذرات می‌توانند در شرایط درون بدن هم استفاده شوند.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، *Fusarium oxysporum*، سمیت سلولی، ردهٔ سلولی انسانی CIRC-HLF، ردهٔ سلولی انسانی SW 872

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

نانوذرات فلزی کاربردهای بی‌شماری در صنایع الکترونیک و بیوالکترونیک، حسگری، محیط‌زیست، صنایع شیمیایی (به عنوان کاتالیزور) و در بیوتکنولوژی به عنوان برچسب بیولوژیک برای تثبیت آنزیم و سلول به عنوان ماده ضدمیکروبی و غیره دارند. به طورکلی، دو روش اصلیِ فیزیکی و شیمیایی برای تولید نانوذرات وجود دارد. با این حال امروزه روش سومی که روش بیولوژیک نامیده می‌شود هم پا به عرصهٔ تولید انبوه گذاشته است (۱). روش‌های فیزیکی و شیمیایی نیاز به دما، فشار و زمان زیادی دارند و هزینه‌بر هستند. از طرفی در این روش‌ها، به‌خصوص در نوع فیزیکی، به زمان زیادی نیاز است. میکروارگانیسم‌ها در تولید زیستی می‌توانند بر غلظت‌های بالایی از یون‌های فلزی رشدکرده و زنده بمانند که به دلیل توانایی آنها در برخورد با شرایط استرس است. یکی از روش‌هایی که برای سمیت‌زدایی استفاده می‌شود، احیای زیستی فلزات است.

تولید به روش بیولوژیک نسبت به دو روش فیزیکی و شیمیایی به‌علت قابلیت تجاری و سرعت تولید بیشتر، تولید ذرات با سایز کوچکتر، کم هزینه، تمیز، غیرسمی و دوستدار طبیعت بودن، بسیار بهتر عمل می‌کند (۲). به همین دلیل استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای سنتز نانوذرات، به عنوان روشی ایمن و آسان در حال توسعه است (۳). طلا از جمله عناصر سازگار با بدن است ولی با وجود خواص مفید نانوذرات آن و سازگاریش با بدن انسان، این نانوذرات می‌توانند منجر به بروز واکنش‌های نامطلوبی در سیستم‌های بیولوژیک و محیط شوندکه سبب سمیت می‌شود. از این خاصیت می‌توان برای از بین بردن سلول‌های سرطانی در بدن بهره برد (۴).

دربارهٔ نوع میکروارگانیسم استفاده شده باید گفت انواعی از قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها و جلبک‌ها توانایی تولید نانوذرات فلزی را دارا هستند (۵). تقریباً در تمام روش‌های تولید شیمیایی نانوذرات، به مادهٔ پایدارکننده‌ای نیاز است تا از تجمع و به‌هم پیوستن نانوذرات جلوگیری کند. به عکس، در تصاویر به‌دست‌آمده با میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات تولیدی با روش بیولوژیک، نشان داده شده است که حتی در تجمع‌ها و توده‌هایی از نانوذرات نیز، با هم تماس مستقیم نداشته و نانوذرات تولیدی احتمالا در محلول به وسیلهٔ پروتئین‌هایی، به نام پروتئین‌های پوشش‌دهنده، پایدار می‌شوند که این پروتئین‌ها را میکروارگانیسم‌ها به درون محیط ترشح کرده‌اند (۶).

فیبروبلاست، فراوان‌ترین سلول در بافت همبند است که همهٔ انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی مادهٔ زمینه‌ای را تولید می‌کند (۷). به همین علت این بافت برای بررسی سمیت سلولی استفاده می‌شود. برخی از عواملی که در ایجاد سمیت به‌وسیلهٔ نانوذرات دخالت می‌کنند، شیمی سطح، شکل، روش تولید نانوذرات، غلظت و زمان مجاورت نانوذرات با سلول‌ها، هستند (۸). Connor و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که نانوذرات طلا علی‌رغم جذب به‌وسیلهٔ سلول‌های انسانی، سمیت سلولی حادی نداشته و در عملکرد سلول دخالتی ندارند (۹). با توجه به نبود اطلاعات و یافته‌های کافی در زمینهٔ بررسی نانوذرات بیولوژیک روی رده‌های سلولی سرطانی و مقایسهٔ آثار ناشی از آن بر ردهٔ سلول‌های سالم، هدف از این مطالعه، اولاً تولید بیولوژیک نانوذرات طلا به کمکِ قارچ و ثانیاً بررسی آثار سمیت سلولی آنها بر رده‌های سلولی طبیعی و سرطانی فیبروبلاست است. وجه تمایز کار حاضر با کارهای قبلی، نخست در تولید نانوذرات طلا برای اولین بار به وسیلهٔ قارچ *Fusarium oxysporum* و ثانیاً در بررسی سمیت سلولی نانوذرات تولیدی بر رده‌های سلولی طبیعی و سرطانی انسانی فیبروبلاست با روش MTT است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق روش کار مبتنی بر تولید نانوذرات بیولوژیک از قارچ بوده و قارچ *Fusarium oxysporum* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شد. برای کشت قارچ، نمونهٔ استاندارد *Fusarium oxysporum* (سویه ۵۱۱۵، کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) از محیط سابوراد دکستروز آگار و پوتیتو دکستروز آگار (مرک آلمان) استفاده شد. این محیط‌ها انتخابی برای تکثیر قارچ‌ها هستند. انتخابی بودن این محیط برای قارچ‌ها براساس وجود آنتی بیوتیک در آن و نیز مواد غذایی ناچیز آنها است (۱۰،۱۱).

مادهٔ اصلی ضروری برای سنتز نانوذرات طلا، $HAuCl_4$ (کلرواوریک) است (شرکت سیگما آدریچ آمریکا). رنگ تریپان بلو (سیگما آلدریچ، آمریکا)، رنگ تترازولیوم (سیگما آلدریچ، آمریکا)، محلول پنیسیلین ـ استرپتومایسین (سیگما آلدریچ، آمریکا)، محلول تریپسین ـ EDTA (سیگما آلدریچ، آمریکا) و سرم جنین گاو (FBS) (سیگما آلدریچ، آمریکا) از دیگر موادی بودند که در این پژوهش استفاده شدند.

شرایط تولید نانوذرات طلا

بدین منظور طبق دستوری که شرکت سازنده ارائه کرده بود، محیط کشت آماده شد و پودر لیوفلیزه نمونهٔ قارچ که درون آمپول ارسال شده بود، در این محیط کشت فعال شد. برای این منظور نوک آمپول با حرارت گرم شد و با ریختن یک قطره سرم فیزیولوژی، شیشه ترک داده شد. سپس سالین استریل به آمپول وارد و سوسپانسیون حاصله با پیپت پاستور برداشته شد. نمونه به صورت کامل در محیط کشت سابورودکستروز براث وارد و به مدت ۷۲ h در شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ °C کشت داده شد (۱۰). در ادامه به منظور نگهداریِ طولانی مدت قارچ و از دست نرفتن سویهٔ مد نظر، از نمونهٔ قارچ استوک استفاده شد. بیوماس سلولی به وسیلهٔ سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ min از محیط کشت جدا شد و سوپرناتانت به‌دست‌آمده برای تولید ذرات طلا بررسی شدند. برای بررسی تولید، سوپرناتانت حاوی میکروب در حالِ آزمایش در ارلن‌های ۱۰۰ mL با غلظت نهایی ۱ mmol از محلول $HAuCl_4$ در حجم نهایی ۱٪ v/v مخلوط شد و در شیکر انکوباتور در دمای ۴ °C به مدت ۲۴ h قرار گرفت. تجمع خارج سلولی ذرات فلز با تغییر رنگ محیطِ کشت به بنفش، بررسی شد.

شاهدهای استفاده شده شامل انکوباسیون محیط کشت استریل به همراه یون فلزی بود (۱۳).

اسپکتروفتومتر نور مرئی

برای تایید حضور ذرات طلا، جذب نوری محلول با اسپکتروفوتومتر مدل VT 05404-0998 ساخت شرکت Biotek آمریکا از ۳۰۰ تا ۷۰۰ nm بررسی شد (۱۴).

میکروسکوپ الکترونی عبوری

برای تایید تولید نانوذرات طلا و اندازه‌گیری سایز ذرات تولیدی، نمونه‌های به‌دست‌آمده با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (مدل CM120، شرکت Philips)، بررسی شد. به این ترتیب طبق دستورالعمل، نمونه‌ها روی گریدهای مسی مخصوص پوشش داده شده با کربن فیکس شده، سپس با میکروسکوپ در ولتاژ kV ۱۲۰، از آنها عکس‌برداری شد (۴).

ایجاد شرایط برای بررسی سمیت سلولی

با استفاده از روش MTT و روش شمارش سلول‌های زنده، می‌توان ظرفیت سمیت داروی خاص سلولی را ارزیابی کرد و سلول‌های سرطانی مختلفی را از نظر خاصیت سمیت سلولی و مقاومت به دارو شناسایی کرد (۱۲). بدین منظور، آماده سازی و بررسی سمیت نانوذرات طلای به‌دست‌آمده طبق مراحل زیر انجام گرفت:

شست‌وشوی نانوذرات به وسیلهٔ آب مقطر

نانوذرات برون سلولی به‌دست‌آمده، در مرحلهٔ بهینه‌سازی درون میکروتیوب استریل ریخته شد و با دور پایین (۲۰۰۰ rpm) به‌مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد تا ذرات بزرگ رسوب کنند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله ۳ مرتبه با محلول بافر PBS (Phosphate Buffered saline) شست‌وشو و با دور ۱۴۸۰۰ g به مدت ۳۰ min سانتریفیوژ شد. در نهایت، رسوب به‌دست‌آمده در (میکرولیتر) ۵۰ µL آب مقطر استریل حل شده و از آن برای مطالعه های بعدی استفاده شد (۱۵).

انجام تیندالیزاسیون

محلول‌های شست‌وشو شده از مرحلهٔ قبل ۳ روز متوالی به مدت ۳۰ min، درون میکروتیوب‌های استریل با بخار آب استریل و سپس در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h درون انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت نانوذرات به وسیلهٔ خشک‌کن، خشک شده و برای انجام کشت سلولی از آنها استفاده شد. پیش از انجام کشت سلول، نانوذرات، توزین و در بافر PBS وارد شدند (۱۶).

کشت سلول ردهٔ فیبروبلاست CIRC-HLF و SW 872

به‌منظور بررسی اثر نانوذرات طلا در کشت سلول، از سلول‌های فیبروبلاست ردهٔ انسانی CIRC-HLF به‌عنوان ردهٔ غیرسرطانی و سلول‌های ردهٔ انسانی SW 872 به‌عنوان سلول‌های فیبروبلاست رده سرطانی (خریداری شده از بانک سلول انستیتو پاستور تهران) و برای کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM (Dulbecos Modified Eegle Medium) حاوی ۱۰٪ FBS استفاده شد. ابتدا محیط کشت با فیلتر سر سرنگی استریل شد، سپس نمونهٔ سلولی به همراه این محیط کشت در فلاسک T25 و در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 انکوبه شد. پس از به دست آمدن تراکم سلولی ۸۰٪ نمونه در معرض تریپسین ـ EDTA قرار گرفت و پس از ۳ min انکوباسیون در دمای ۳۷ °C سلول‌های کنده شده از کف پلیت در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ min سانتریفیوژ و سپس رسوب سلولی با افزودن محیط کشت حاوی FBS حل و تریپسین‌زدایی شد (۱۷).

بررسی سمیت سلولی با روش MTT

ابتدا برای انجام آزمون سمیت سلولی، شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار و رنگ آمیزی متیلن بلو انجام شد (۱۸). سپس در هر چاهک از پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای جداگانه حدود ۱۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست سرطانی و غیرسرطانی اضافه‌سازی شد. در ادامه ۲۰۰ µL از محیط کشت DMEM به هر چاهک اضافه شد و برای رسیدن به تراکم تک لایه سلول‌ها، پلیت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از پوشش ۸۰٪ از کف چاهک‌ها با سلول، محیط کشت خارج شده و سطح سلول‌ها با بافر PBS شست‌وشو داده شد. دوباره در تمام چاهک‌ها محیط کشت با دو برابر غلظت استاندارد و به میزان ۱۰۰µL وارد اضافه شد، سپس به چاهک شمارهٔ۱، µL ۱۰۰ از محلول نانوذرات طلا محلول در PBS اضافه شد. پس از مخلوط کردن نانوذرات در محیط کشت، µL ۱۰۰ از آن برداشته و به چاهک دوم افزوده شد. این عمل تا چاهک ۱۱ انجام شد و به این ترتیب میزان غلظت نانوذرات در هر چاهک به نصف کاهش داده شد. چاهک شمارهٔ ۱۲ فقط حاوی سلول بوده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پلیت دوباره در ۳۷ °C به‌مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد و پس از ۲۴ h سمیت سلولی با استفاده از محلول MTT حاوی تترازولیوم تعیین شد. بدین منظور ۱۰۰ µL از محیط کشت حاوی محلول MTT (با غلظت mg/ml5) به تمام چاهک‌ها از جمله شاهد اضافه و در ۳۷ °C به مدت ۲ h ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲ h گرمخانه‌گذاری، محلول از چاهک‌ها خارج شده و به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید شده، مقدار ۱۰۰ µL DMSO به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و پلیت به مدت ۲۰ min کاملاً در

شیکر، مخلوط شد. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست‌آمده در طول موجود ۵۴۰ نانومتر خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد. این کار برای اطمینان از نتایج آزمایش، سه بار تکرار شد. همچنین به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیک، سلول‌ها با میکروسکوپ فاز کنتراست هم بررسی شدند.

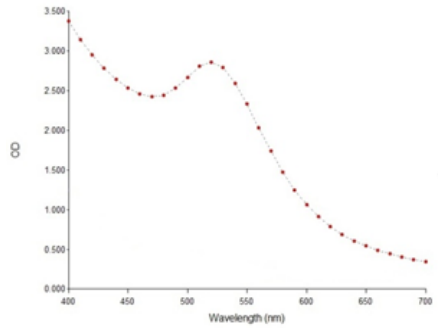
یافته‌ها

نتایج بررسی چشمی تولید نانوذرات طلا

پس از اضافه کردن کلرواوریک اسید در محلول رویی و با گذشت ۲۴ h از انکوباسیون، رنگ محلول از زرد به صورتی تا بنفش تغییر کرد. نتایج حاصل از این تغییر نشان دهندهٔ تولید ذرات طلا به دلیل تغییر در پلاسمون سطحی ذرات بوده است.

تایید تولید نانوذرات طلا با اسپکتروفتومتری

نتایج اسپکتروفوتومتر نشان داد که نانوذرات طلای تولید شده، حداکثر پیک جذب در محدودهٔ طول موج ۵۳۰ nm داشته است. باقی ماندن میزان جذب نور در طول موج مذکور با گذشت زمان، نشان دهندهٔ پخش بودن نانوذرات در محیط و پایداری آنها و ایجاد نشدن تجمع در محلول است (شکل ۱).

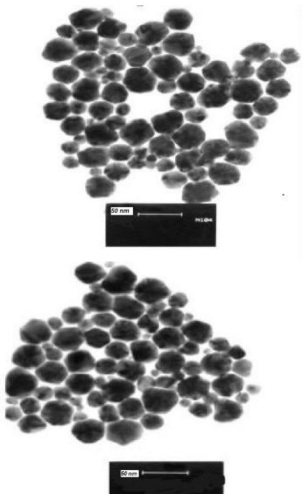


شکل ۱. اسپکتروفوتومتری حاصل از نانوذرات طلای به دست آمده از قارچ *Fusarium oxysporum*.

نتایج میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

در این تحقیق برای بررسی شکل و اندازهٔ نانوذرات طلای تولیدی از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، که نانوذرات به شکل کروی و شش وجهی بوده و اندازهٔ آنها به‌طور متوسط بین ۵۰-۷۰ nm است (شکل ۲).

با توجه به نتایج آزمایش‌های انجام شده روی ذرات تولیدی، نانو بودن آنها تایید شد.

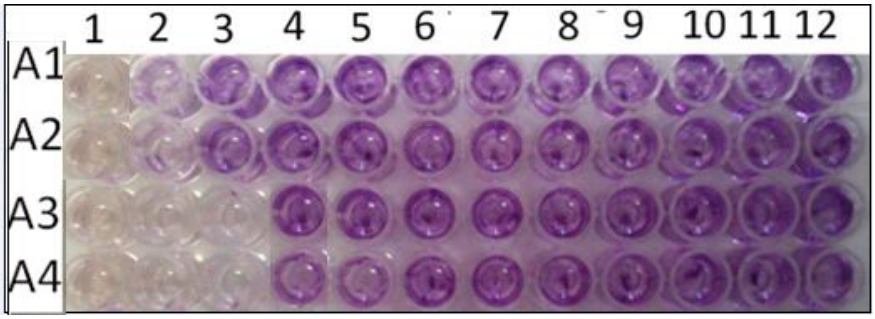


شکل ۲. تصاویر نانوذرات طلا با TEM

نتایج بررسی سمیت سلولی

ابتدا هر یک از رده‌های سلولی در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. شکل ۳ نتایج چشمی آزمون MTT و تغییر رنگ چاهک‌ها را نشان می‌دهند. همچنین جدول ۳، نتایج تفاوت در میزان جذب را در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی روی رده‌های فیبروبلاست سرطانی و غیرسرطانی نشان داد، مقدار بیشتری از ۰/۰۰۲۵ mg/mL از نانوذرات طلا می‌تواند جلوی رشد سلول‌های سرطانی و میزان بیشتر از mg/mL ۰/۰۵ از نانوذرات طلا می‌تواند جلوی رشد سلول‌های غیرسرطانی را بگیرد.

در کل نتایج کشت سلولی نشان داد که سمیت سلولی وابسته به دوز نانوذرات بوده و نانوذرات طلا در غلظت‌های بالا بر سلول‌ها آثار سمی اعمال می‌کنند. همچنین سلول‌های فیبروبلاست غیرسرطانی نسبت به سلول‌های فیبروبلاست سرطانی، توانایی مقابله با نانوذرات طلا در غلظت‌های بالاتر را دارند که این امر نشان دهندهٔ توان استفاده از نانوذرات طلا برای مقابله با سرطان در آینده است.



شکل ۳. نتایج چشمی آزمون MTT و تشکیل کریستال‌های فورمازان در هر یک از چاهک‌ها براساس دوز نانو ذرات طلا و میزان حساسیت سلولی، ردیف‌های A۱ و A۲ ردهٔ سلولی فیبروبلاست غیرسرطانی و ردیف‌های A ۳ و A۴ ردهٔسلولی فیبروبلاست سرطانی را نشان می‌دهند.

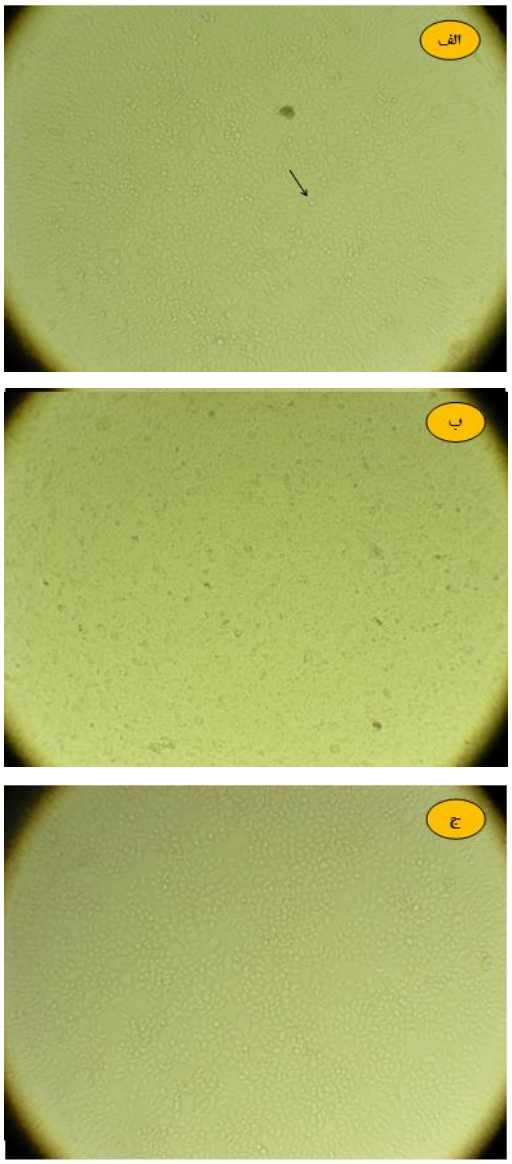
جدول ۳. میزان جذب سلول‌های ردهٔ فیبروبلاست سرطانی و فیبروبلاست غیرسرطانی در طول موج nm ۵۴۰ پس از رنگ آمیزی با رنگ تترازولیوم.

شماره چاهک	میانگین جذب نوری ردهٔ سلولی فیبروبلاست سرطانی ± انحراف معیار	میانگین جذب نوری ردهٔ سلولی فیبروبلاست غیرسرطانی ± انحراف معیار
۱	۰/۱ ± ۰/۰۴۹	۰/۱ ±۰/۰۰۸۳
۲	۰/۰۱ ± ۰/۰۷۵	۰/۰۵۵ ±۰/۰۱
۳	۰/۲۴۰ ± ۰/۰۲۰	۰/۶۷ ±۰/۰۲*
۴	۰/۴۲۰ ±۰/۰۰۱*	۰/۸۰۰ ±۰/۰۰۱
۵	۰/۸۷۰ ±۰/۰۳	۰/۹۸۳ ±۰/۰۳
۶	۰/۹۴۰ ±۰/۰۲	۰/۹۰۰ ±۰/۰۲
۷	۰/۹۸۰ ±۰/۴	۱/۱۱۰ ±۰/۴
۸	۱/۰۱۰ ±۰/۰۲	۱/۲۲۲ ±۰/۰۲
۹	۱/۱۰۰ ±۰/۰۵	۱/۱۵۰ ±۰/۰۵
۱۰	۱/۰۲۲ ±۰/۰۶	۱/۳۰۰ ±۰/۰۶
۱۱	۱/۱۶۱ ±۰/۰۷	۱/۱۱۰ ±۰/۰۷
۱۲	۱/۰۲۷ ±۰/۰۸	۱/۲۳۰ ±۰/۰۸

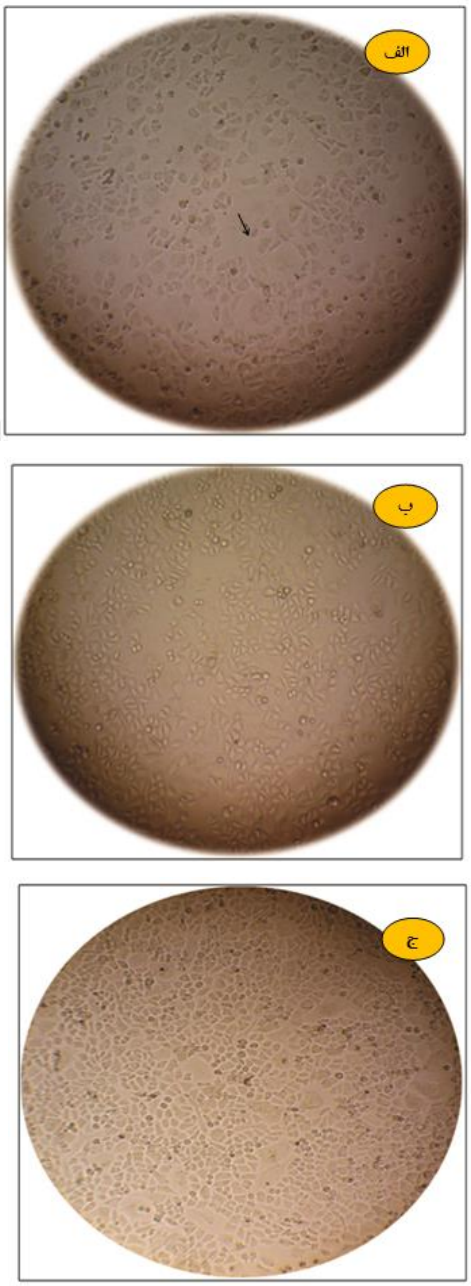
اعداد میانگین سه بار تکرارند؛ شمارهٔ ۱۲ چاهک شاهد و فاقد نانوذرات است (* نشانگر IC50 (50 Inhibitory concentration ٪) است)

نتایج مشاهدهٔ تغییرات سلولی

برای مشاهدهٔ تغییرات در مرفولوژی سلول‌ها از میکروسکوپ فاز کنتراست و بدون هیچ نوع رنگ‌آمیزی، استفاده شد. شکل ۴ نتایج کشت سلول‌های فیبروبلاست سرطانی را پس از آن نشان می‌دهد که در معرض دوزهای متفاوتی از نانوذرات طلا قرار گرفته اند. شکل ۵ نیز به صورت مشابه نتایج کشت سلول‌های فیبروبلاست غیرسرطانی را نشان می‌دهد.



شکل ۴. تغییرات مرفولوژی سلول‌های فیبروبلاست سرطانی مواجه شده با غلظت الف) ۰/۰۵ mg/mL (چاهک ۳)، ب) ۰/۰۲۵ mg/mL (چاهک ۴) از نانوذرات طلا، ج) چاهک ۱۲ نمونهٔ شاهد (فاقد نانوذره). نوک فلش، نمونه‌ای از سلول مرده بر اثر سمیت نانوذرهٔ طلا را نشان می‌دهد.



شکل ۵. تغییرات مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست غیرسرطانی مواجه شده با غلظت الف) ۰/۰۵ mg/mL (چاهک ۳) ، ب) ۰/۰۲۵ mg/mL (چاهک ۴) از نانوذرهٔ طلا. ج) چاهک ۱۲، نمونهٔ شاهد و فاقد نانوذرهٔ طلا. نوک فلش سلول‌های زنده را نشان می‌دهد.

بحث

همان گونه که پیش از این نیز اشاره شده است، نانوذرات فلزات مختلف می‌توانند به صورت درون یا برون سلولی تولید شوند (۱۸). با توجه به اینکه قارچ *Fusarium oxysporum* توانایی تولید هر دو نوع نانوذره را دارد، لذا در تحقیق حاضر فقط نانوذرات نوع برون سلولی بررسی شده‌اند زیرا تولید برون سلولی نسبت به درون سلولی بهتر و ساده‌تر است و نیازی به عملیات پایین‌دستی برای تخلیص نانوذرات تولیدی از درون سلول‌ها نیست (۱۸). با این حال مطالعات فراوانی از هر دو دستهٔ تولید وجود دارد. برای مثال Shahverdi و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به بررسی تولید نانوذرات خارج سلولی پرداخته و آن را روشی راحت و سریع عنوان کردند (۱۹). Birla و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ عنوان کردند که استفاده از مایع رویی حاصل از کشت میکروارگانیسم‌ها یا عصارهٔ آبی حاصل از قرار گرفتن چندین ساعتهٔ میکروارگانیسم‌ها می‌تواند سبب تولید نانوذرات شود که این روش کارآیی زیادی در آزمایشگاه‌های تولید زیستی نانوذرات داشته است (۲۰). در کل به دلیل مشکل‌بودن استخراج نانوذرات درون سلولی این روش در فرآیندهای صنعتی توصیه نمی‌شود. همچنین نتایجی که Taheri و همکاران به‌دست‌آورده‌اند، نشان می‌دهد علاوه بر مشکل‌بودن تولید به روش درون سلولی و مشکلات استخراج نانوذرات، نانوذرات درون سلولی تولیدی نسبت به انواع تولید شده به روش برون سلولی خواص ضدمیکروبی ضعیف‌تری دارند (۲۱).

همان گونه که نتایج نشان می‌دهند، نانوذرات طلا، برای ردهٔ سلولی فیبروبلاست سرطانی، خواص سمیت بیشتری دارند.

یکی از مطالعات انجام شده روی نانوذرات طلای تولید شده به صورت بیولوژیک، نتایج به‌دست آمده از تحقیقات Satish و همکارانش بر روی نانوذرات طلای تولیدی از برگ گیاه چای بود. نتایج آنها نشان دهندهٔ تغییر رنگ محلول از زرد به بنفش بود که این تغییر رنگ بیانگر تولید نانوذرات طلا از این گیاه است. در حالی که تغییر رنگ نانوذرات طلا تولید شده در این تحقیق از زرد به صورتی گزارش شد. به‌علاوه آنها به بررسی سمیت سلولی نانوذرات طلا بر سلول‌های سرطانی سینه و پروستات نیز پرداختند که نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی ایجاد شده در مطالعهٔ آنها، با اسپکتروفوتومتر نوری، بیانگر آن بود که فعالیت این سلول‌ها با ورود نانوذرات طلای تولیدی به درون سلول‌های سرطانی کاهش بسیار زیادی پیدا می‌کند (۲۲). همچنین Muniyappan و همکارانش در سال ۲۰۱۴ سمیت سلولی نانوذرات طلا سنتز شده به روش بیولوژیک را روی سلول‌های T47D که دچار سرطان پستان شده بودند، بررسی کردند (۲۳). Klekotko و همکارانش نیز نانوذرات طلا را به روش بیولوژیک سنتز و اثرات سمیت آن را به روش MTT بررسی کردند و نتایج حاصل از مطالعهٔ آنها مانند تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات تولیدی به روش بیولوژیک، سمیت سلولی کمتری نسبت به نانوذرات سنتز شده با سایر روش‌ها دارد (۲۴). براساس نتایج حاصل از مطالعهٔ کنونی می‌توان نانوذرات طلای تولید شده به روش زیستی را در دوزهای پایین‌تر از میزان MIC50 که دارند(یعنی دوزی که ۵۰٪ سلول‌ها زنده هستند و عدد آن حدوداً نصف عدد جذب شاهد است)، برای سلول‌های غیر سرطانی برای مصارف پزشکی نظیر شناسایی و درمان تومورها استفاده کرد. با این حال همان گونه که از نتایج سمیت سلولی برداشت می‌شود، تاثیر نانوذرات طلا در کشت سلولی می‌تواند براساس ردهٔ سلولی استفاده شده، متفاوت باشد. بدین معنی که چنانچه ردهٔ سلولی از نوع سرطانی به غیرسرطانی تغییر کند یا ردهٔ سلولی دیگری از قبیل ردهٔ هپاتوسیتی استفاده شود، ممکن است نتایج حاصل از تاثیر نانوذرات به دلیل ویژگی‌های سلولی متفاوت شود.

براساس نتایج حاصل از رویت تغییر رنگ محلول محیط کشت از زرد به صورتی تا بنفش و انجام آزمایش‌های تاییدکننده می‌توان بیان کرد که نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که حضور قارچ *Fusarium oxysporum* باعث کاهش یون‌های طلا و تولید نانوذرات طلا شده و از آنجایی که تولید برون سلولی نانوذرات در مقایسه با تولید درون سلولی مناسب‌تر و بهتر است، در مطالعهٔ حاضر نانوذرات طلا با اندازهٔ دانهٔ حدود ۵۰ تا ۷۰ nm با شکل‌های کروی یا شش گوشه و به‌صورت برون سلولی با قارچ مذکور تولید شدند.

دربارهٔ هر دو ردهٔ سلولی به‌کاربرده شده در این پژوهش، همان گونه که مشاهده می‌شود، نانوذرات طلا در غلظت‌های بالا روی سلول‌ها آثار سمی اعمال کرده‌اند. همان گونه که در قسمت الف از شکل ۴ نشان می‌دهد، سلول‌های چسبیده در کف پلیت پس از مواجهه با دوزهای بالای نانوذرات (دوز سمی ـ چاهک‌های ۱ و ۲) به‌دلیل آسیب وارده و مرگ، از کف پلیت جدا شده و به صورت کروی مشاهده کردنی‌اند. در صورتی که سلول‌های فیبروبلاست غیرسرطانی توانایی مقابله با نانوذرات طلا در غلظت‌های بالاتر را داشتند اما دربارهٔ سلول‌های فیبروبلاست سرطانی همان گونه که مشاهده می‌شود، نانوذرات طلا با همان غلظت (چاهک شمارهٔ ۳، قسمت الف از شکل ۵) سبب مرگ و آسیب سلولی شده‌اند. در صورتی‌که در چاهک شمارهٔ ۴ (قسمت ب از شکل ۵) همان گونه که می‌توان رویت کرد، توانایی نجات و رشد را از خود بروز داده‌اند.

در این تحقیق هر چاهک علاوه بر این نتایج مطالعات میکروسکوپی، تاییدی بر بررسی سمیت سلولی با روش MTT بود که نتایج به صورت کامل با یکدیگر همخوانی داشت.

بنابر مطالعات فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نانوذرات طلا از یک نوع، یک شکل و یک اندازه روی هر ردهٔ سلولی اثرگذاری متفاوتی دارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از مسئولین دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود برای همکاری در انجام تست‌های مطالعه و همچنین سرکار خانم دکتر پرستو پورعلی به دلیل مشارکت در تفسیر نتایج، تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine. 2010;6(2):257-62. https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002
2. Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel M, Dhivya B. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, Penicillium fellutanum isolated from coastal mangrove sediment. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009;71(1):133-7. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.016 PMid:19269142
3. Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. Hydrometallurgy. 2006;83(1-4):132-40. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.019
4. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf. Nanotechnology. 2007;18(10):105104. https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104
5. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Synthesis of palladium nanoparticles by reaction of filamentous cyanobacterial biomass with a palladium (II) chloride complex. Langmuir. 2007;23(17):8982-7. https://doi.org/10.1021/la7012446 PMid:17658865
6. Moghaddam KM. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. J Young Investig. 2010;19(19):1-7.
7. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano Letters. 2001;1(10):515-9. https://doi.org/10.1021/nl0155274
8. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. Langmuir. 2005;21(23):10644-54. https://doi.org/10.1021/la0513712 PMid:16262332
9. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. Small. 2005;1(3):325-7. https://doi.org/10.1002/smll.200400093 PMid:17193451
10. Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. Biomaterials. 2012;33(7):2327-33. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057 PMid:22182745
11. Schaffie M, Hosseini M. Biological process for synthesis of semiconductor copper sulfide nanoparticle from mine wastewaters. J Environ Chem Eng. 2014;2(1):386-91. https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.01.006
12. Weissman-Shomer P, Fry M. Chick embryo fibroblasts senescence in vitro: Pattern of cell division and life span as a function of cell density. Mech Ageing Dev. 1975;4:159-66. https://doi.org/10.1016/0047-6374(75)90017-2
13. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Advances in colloid and interface science. 2010;156(1-2):1-13. https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001 PMid:20181326
14. Binupriya A, Sathishkumar M, Yun S-I. Biocrystallization of silver and gold ions by inactive cell filtrate of Rhizopus stolonifer. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;79(2):531-4. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.021 PMid:20627484
15. Rautaray D, Sanyal A, Adyanthaya SD, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of strontium carbonate crystals using the fungus Fusarium oxysporum. Langmuir. 2004;20(16):6827-33. https://doi.org/10.1021/la049244d PMid:15274591
16. Xiong B, Cheng J, Qiao Y, Zhou R, He Y, Yeung ES. Separation of nanorods by density gradient

centrifugation. J Chromatogr A. 2011;1218(25):3823-9. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.038 PMid:21571285

17. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1989:17-9.
18. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi A-A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. Process Biochem. 2007;42(5):919-23. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.005
19. Kalishwaralal K, Deepak V, Ramkumarpandian S, Nellaiah H, Sangiliyandi G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of Bacillus licheniformis. Mater lett. 2008;62(29):4411-3. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.06.051
20. Birla S, Tiwari V, Gade A, Ingle A, Yadav A, Rai M. Fabrication of silver nanoparticles by Phoma glomerata and its combined effect against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Lett Appl Microbiol. 2009;48(2):173-9. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02510.x PMid:19141039
21. Yazdansetad S, Taheri R, Ajoudanifar H. Production of microbial cellulose by native species of Pseudomonas luteola. NCMBJ. 2015;5(19):53-60
22. Nune SK, Chanda N, Shukla R, Katti K, Kulkarni RR, Thilakavathy S, et al. Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. J Mater Chem. 2009;19(19):2912-20. https://doi.org/10.1039/b822015h PMid:20161162 PMCid:PMC2737515
23. Muniyappan N, Nagarajan N. Green synthesis of gold nanoparticles using Curcuma pseudomontana essential oil, its biological activity and cytotoxicity against human ductal breast carcinoma cells T47D. J Environ Chem Eng. 2014;2(4):2037-44. https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.03.004
24. Klekotko M, Matczyszyn K, Siednienko J, Olesiak-Banska J, Pawlik K, Samoc M. Bio-mediated synthesis, characterization and cytotoxicity of gold nanoparticles. Phys Chem Chem Phys. 2015;17(43):29014-9. https://doi.org/10.1039/C5CP01619C