بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات طلای تولیدی توسط *Bacillus cereus* بر روی رده های سلولی هپاتوسیت و فیبروبلاست

آزاده رضایی[۱]، پرستو پورعلی[۲]* و بهروز یحیایی[۲]

[۱] نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

[۲] شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، گروه پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۲۹

چکیده

نانوذرات طلا در زمینه پزشکی دارای کاربردهای متفاوتی هستند. سه روش برای تولید نانوذرات وجود دارد. مطالعه اخیر جهت ارزیابی اثرات سمیت سلولی نانوذرات طلای تولید شده به روش زیستی انجام شده است. باکتری *Bacillus cereus* (PTCC 1015) خریداری و سپس در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد. سلولهای باکتریایی به وسیله سانتریفیوژ جداسازی شدند و سوپرناتانت به دست آمده با محلول کلرواوریک اسید در غلظت نهایی ۱ میلی مولار گرمخانه گذاری شد. سپس سوپرناتانت تغییر رنگ یافته برای آنالیزهای اسپکتروفوتومتری، پراش پرتوی اکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. دو رده سلولی ($HepG_2$ و CIRC-HLF) برای آزمون 3-(4,5 dimethyl thiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) استفاده شدند. مطالعات اسپکتروفوتومتری و XRD تشکیل نانوذرات طلا را تأیید نمودند و تصاویر TEM نشان داد که اندازه نانوذرات طلا تولیدی در حدود ۱۰-۷۰ نانومتر بوده است. آزمون MTT نشان داد که نانوذرات طلا دارای اثر سمیت پایینی بوده و این اثر به دز مصرفی آنها وابسته است. در مطالعه حاضر نتایج کشت سلولی نشان داد که نانوذرات در غلظتهای بالا بر روی سلولها اثر سمی اعمال نموده اند و رده سلولی هپاتوسیت نسبت به رده سلولی فیبروبلاست در برابر غلظتهای بالاتر از نانوذرات طلا دارای مقاومت بیشتری بوده اند. نانوذرات طلا تولید شده به روش زیستی می توانند به آسانی تولید، شسته و استریل شود و می توانند در آینده در بدن استفاده شوند.

واژه های کلیدی: اثر سمیت سلولی، نانوذرات طلا، *Bacillus cereus* ، رده سلولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۰۳۶۰ ، پست الکترونیکی: parastoo_pourali@yahoo.com

مقدمه

نانو کلمه ای یونانی و به معنای کوتوله بوده و در سیستم متریک به معنای 10^{-9} می باشد. یک نانو یک میلیاردیم است و کاربرد این واژه امروزه بیشتر در فناوری نانو است. نانوفناوری یک دانش میان رشته‌ای است و به رشته‌هایی چون فیزیک کاربردی، مهندسی مواد، مهندسی مکانیک، مهندسی برق، مهندسی شیمی و رشته های مرتبط با زیست شناسی نیز مربوط می‌شود. روشهای متنوعی جهت تولید نانوذرات وجود دارد که به سه روش کلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی طبقه بندی شده اند. تولید به روش شیمیایی ساده است ولی احتمال اینکه مواد سمی حاصل از واکنش بر روی نانوذرات تولیدی باقی بماند وجود دارد. در روش فیزیکی نانوذرات دارای سمیت کمی می باشند ولی تولید زمانبر است. با توجه به این معایب و مشکلات استفاده از روشهای فیزیکی و شیمیایی امروزه روش تولید زیستی معرفی گردیده است که روشی آسان و ارزان بوده و دارای سمیت کم و سازگاری بالا با بدن انسان است. این

روش از تولید نانوذرات، به نام تکنولوژی سبز خوانده می شود. در طی تولید نانوذرات به وسیله موجودات زنده، اعم از انواع تک یا پر سلولی، واکنشهای آنزیمی و نیز غیر آنزیمی (که عمدتاً پلی ساکاریدها مسئول آن هستند) درگیر می باشند(۵ و ۱۳).

یکی از روشهایی که جهت سمیت زدایی مورد استفاده قرار می گیرد، احیای زیستی فلزات است. در این حالت سلولهای میکروبی یونهای فلزی را به وسیله استفاده از آنزیمهای خاص مانند NADH ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز احیاء می نمایند(۴).

بر اساس آنزیمهای در دسترس، تولید نانوذرات فلزی می تواند به دو صورت درون و برون سلولی رخ دهد. روش درون سلولی مبتنی بر انتقال یونهای سمی به درون سلول میکروبی جهت تولید نانوذرات است که در حضور آنزیمهای درون سلولی واکنشها هدایت می شوند در حالی که روش برون سلولی مبتنی بر به دام اندازی یونهای فلزی در خارج از سلول بوده که احیای یونهای فلزی در حضور آنزیمهای برون سلولی به وقوع می پیوندد(۱۳).

از جمله نانوذرات سازگار با بدن انسان که طی فرآیند احیاء توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند می توان به نانوذرات نقره، طلا، تیتانیوم، پلاتین اشاره نمود که از این میان نانوذرات طلا دارای کاربردهای فراوانی در پزشکی می باشند. طلا از زمانهای قدیم مورد استفاده قرار گرفته است زیرا دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی قوی می باشد. نانو ذرات طلا در حوزه های تحقیقاتی متفاوتی مانند پزشکی، تحقیقات مولکولی زیستی و نانوالکترونیک سودمند می باشند(۱۱). به کمک نانوذرات طلا می توان سلولهای سرطانی را نابود کرد. این ذرات می توانند از طریق یک پوشش مولکولی سازگار زیستی خود را به سلولهای سرطانی متصل کنند و به کمک لیزر می توان به این ذرات حرارت داد و سلولهای سرطانی را از بین برد. همچنین این ذرات می توانند پس از اتصال به مولکولهای زیستی و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی به عنوان یک ردیاب عمل نمایند. اخیراً فناوریهای جدیدی برای استفاده از طلا در درمان تومورهای سرطانی ایجاد شده است که این کار از طریق عبور نانوذرات از عروق خونی و انتقال آنها به یاخته های توموری انجام شده است که به این ترتیب می توان داروهای مورد نظر را بدون هیچ مشکلی به مکان مورد نظر انتقال داد. درحالی که دیگر یاخته های سالم از این داروها در امان بوده و صدمه ای به آنها وارد نمی شود. در این روش مزایای دیگری نیز وجود دارد از جمله اینکه عوارض جانبی مانند ضعف سیستم ایمنی و یا ریزش مو که در طی شیمی درمانی به وجود می آیند، وجود نخواهد داشت. با وجود خواص مفید نانوذرات سازگار با بدن انسان، این مواد می توانند دارای سمیت باشند. برخی از عواملی که در ایجاد سمیت توسط نانوذرات دخالت می کنند شامل شیمی سطح، شکل، روش تولید نانوذرات، غلظت و زمان مجاورت نانوذرات با سلولها می باشند(۱۰).

فیبروبلاست از سلولهای همیشگی و اصلی بافتهای همبندی بوده که عملکرد آن در تولید بستر و رشته ها در این بافت می باشد. نقص عملکرد فیبروبلاست باعث بروز ایرادات متعدد در این بافت خواهد شد که به دلیل وجود بافتهای همبندی فراوان در بدن در نهایت باعث نقص بافتهای بدن می گردد. به دلیل ویژگی پروتئین سازی و میزان بالای تولید در این نوع از سلول چنانچه فیبروبلاست تحت تأثیر مواد مختلف قرار بگیرد به دلیل حساسیت بالا ممکن است فعالیت آن کاهش پیدا کند که در نتیجه سبب نقص بافتهای همبندی می گردد. به دلیل این ویژگی بارز سلول، در تحقیق حاضر برای بررسی میزان سمیت نانوذرات طلا از این رده سلولی استفاده گردید(۱۲).

هپاتوسیت سلول پارانشیم کبد بوده که اکثرا دارای یک و یا دو هسته می باشند. این سلولها در ساخت پروتئینهای اصلی خون مانند آلبومین، فیبرینوژن و همچنین متابولیسم

کربوهیدراتها، لیپوپروتئینها، چربیها و همچنین در سمیت زدایی مواد نقش اصلی را دارند. بنابراین این سلولها در تماس با مواد مختلف از قبیل مواد سمی و غیر سمی جلوه های مختلفی از خود نشان می دهند(۲).

با توجه به اینکه تا کنون مطالعه موثقی پیرامون بررسی سمیت نانوذرات طلا تولید شده به روش زیستی در دسترس نبوده است و اکثر مطالعات موجود بر روی نانوذرات طلا تولید شده به روش شیمیایی می باشد، لذا مطالعه حاضر با هدف تولید نانوذرات طلا توسط *Bacillus cereus* و بررسی سمیت آنها بر روی رده کشت سلولهای هپاتوسیت و فیبروبلاست انجام شده است که براساس اطلاعات به دست آمده از این تحقیق می توان امکان استفاده از نانوذرات طلا تولید شده به روش زیستی را در آینده در بدن حیوان آزمایشگاهی بررسی نمود.

مواد و روشها

در مطالعه حاضر باکتری *Bacillus cereus* (PTCC 1015) از کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران خریداری شد و در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. این باکتری گرم مثبت بوده و سمیت حاصل از Lipopolysaccharide (LPS) موجود در باکتریهای گرم منفی را ندارد که بنابراین می توان با اطمینان بالاتری از آن در درون بدن استفاده نمود. علاوه بر این به دلیل فراوانی و پراکندگی آن در محیط و نیز به دلیل اینکه این باکتری بیماریزای فرصت طلب می باشد، جهت تولید نانوذرات طلا مورد استفاده قرار گرفت. پس از رشد، توده سلولی به وسیله سانتریفیوژ (۶۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه) از محیط کشت جدا سازی و سوپرناتانت به دست آمده جهت تولید نانوذرات طلا مورد استفاده قرار گرفت. سوپرناتانت با غلظت نهایی ۱ میلی مولار از محلول $HAuCl_4$ (کلرواوریک اسید) مجاور و در شیکر انکوباتور در دور ۲۰۰ rpm، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. علاوه بر این نمونه حاوی محیط کشت نوترینت براث استریل و دارای غلظت نهایی ۱ میلی مولار از محلول کلرواوریک اسید به عنوان کنترل منفی به همراه نمونه مورد آزمون در شرایط مشابه قرار داده شد. تجمع خارج سلولی نانوذرات طلا با تغییر رنگ محیط کشت از زرد به صورتی- آلبالویی بررسی شد. جهت تأیید تولید نانوذرات طلا، در مرحله اول تولید به وسیله اسپکتروفوتومتری نانودراپ در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تأیید شد. چنانچه نانوذرات طلا در محلول واکنش تولید شده باشند، محلول به دلیل رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) دارای بهینه جذب نوری در محدوده ۵۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر خواهد بود. سپس تأیید نهایی حضور نانوذرات طلا به وسیله روشهای پراش پرتو اکس (XRD) در زوایای $2^{\circ}\theta$ از ۳۰ تا ۸۰ درجه و نیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام گرفت. سپس بهینه سازی نانوذرات طلا بر اساس ۴ عامل اصلی دما (۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد)، زمان (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت)، سوبسترا (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ ، ۵، ۵/۵ و ۶ میلی مولار از محلول کلرواوریک اسید) و pH (۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ ، ۹ و ۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. در هر مرحله از بهینه سازی، نمونه های مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شدند و با توجه به پیکهای به دست آمده بهترین شرایط جهت تولید نانوذرات طلا تعیین گردید. مراحل بهینه سازی ۳ مرتبه تکرار شدند و میانگین هر مورد به دست آمد. علاوه بر این در این فرآیند پس از به دست آمدن بهترین شرایط برای یک عامل، نتیجه آن در بهینه سازی برای عامل دوم اعمال می شد.

بر اساس نتایج به دست آمده از مراحل بهینه سازی، نانوذرات طلا طبق میانگین بهینه شرایط به دست آمده مجدداً تولید شدند و جذب نوری آنها توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تعیین شد. در این مرحله از نمونه نانوذرات طلای

تولید شده در بهترین شرایط فیزیکی مجدداً عکسبرداری توسط TEM صورت گرفت. جهت شستشوی نمونه، نمونه درون میکروتیوبهای استریل با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت جداسازی و مجدداً در rpm ۱۴۸۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله ۳ نوبت با بافر Phosphate Buffered Saline (PBS) شستشو و در rpm ۱۴۸۰۰ سانتریفیوژ گردید(۸). در طی این فرآیند باقی مانده یونهای طلا از نمونه پاکسازی شد تا در مراحل بررسی سمیت سلولی این یونها دخالتی نداشته باشند.

جهت سترون نمودن نانوذرات از روش تندالیزاسیون استفاده شد. در این روش محلولهای شستشوداده شده از مرحله قبل درون میکروتیوبهای استریل در ۳ روز متوالی به مدت ۳۰ دقیقه با بخار آب استریل و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. نهایتاً نانوذرات به وسیله خشک کن، خشک و برای انجام کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. پیش از انجام کشت سلول، نانوذرات توزین و در بافر PBS وارد شدند(۸).

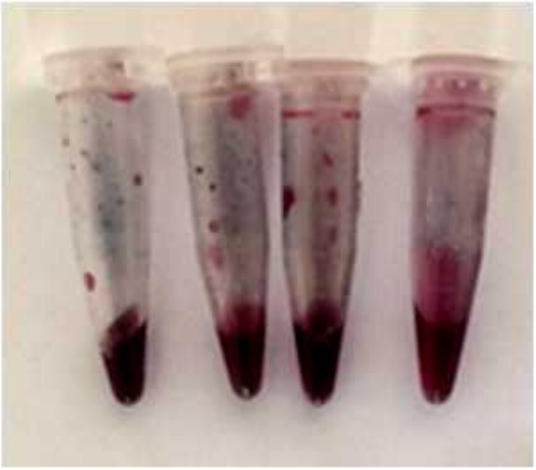
به منظور بررسی اثر نانوذرات طلا در کشت سلول، از سلولهای رده $HepG_2$ و CIRC-HLF که به ترتیب مربوط به هپاتوسیت و فیبروبلاست می باشند، استفاده شد. برای این منظور هر کدام از رده های سلولی به صورت جداگانه در فلاسکهای T25 به همراه محیط کشت کامل (شامل DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)، ۱۰ درصد سرم جنین گاو دکمپلمانه و ۱ درصد محلول پنیسیلین- استرپتومایسین) وارد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور کشت سلولی به همراه ۵ درصد CO_2 انکوبه گردید. پس از به دست آمدن تراکم سلولی ۸۰ درصد نمونه در معرض ۱ درصد از محلول تریپسین- EDTA قرار گرفته و پس از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور کشت سلولی به همراه ۵ درصد CO_2 و مشاهده سلولهای کنده شده از کف پلیت، نمونه در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس رسوب سلولی به وسیله افزودن محیط کشت تریپسین زدایی شد. سپس سوسپانسیون سلولها پس از افزودن رنگ تریپان بلو به وسیله لام نئوبار شمارش شدند و آزمون سمیت سلولی با روش MTT انجام شد(۶). برای این منظور در هر چاهک از پلیت کشت سلول ۹۸ خانه برای سلولهای هپاتوسیت به میزان ۵۰۰۰ سلول $HepG_2$ و برای سلولهای فیبروبلاست به صورت جداگانه ۱۰۰۰۰ سلول CIRC-HLF به همراه µL ۲۰۰ از محیط کشت کامل سلولی وارد شد و جهت رسیدن به تراکم تک لایه سلولها، پلیت مجدداً در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض ۵ درصد CO_2 گرمخانه گذاری گردید(۶). پس از رسیدن به ۸۰ درصد رشد سلولها، محیط کشت خارج شده و ابتدا سطح سلولها به وسیله بافر PBS شستشو داده شد مجدداً در تمام چاهکها محیط کشت کامل دو غلظتی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر وارد و به چاهک شماره۱، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات طلا محلول در PBS وارد شد (۲mg/mL). پس از مخلوط نمودن نانوذرات در محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به چاهک دوم افزوده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم پس از به هم خوردن محیط برداشته شد و به چاهک ۳ اضافه شد. این عمل تا چاهک ۱۱ انجام شد و به این ترتیب میزان نانوذرات در هر چاهک به ترتیب به صورت نصف بود. چاهک شماره ۱۲ تنها حاوی سلول و محیط کشت کامل یک غلظتی بوده و به عنوان شاهد باقی ماند. پلیت مجدداً در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۵ درصد CO_2 گرمخانه گذاری گردید و پس از ۲۴ ساعت سمیت سلولی با استفاده از رنگ تترازولیوم تعیین گردید. به میزان ۱۰ میکرولیتر از رنگ تترازولیوم (۵mg/ml) به تمام چاهکها از جمله شاهد اضافه شد و پلیت در ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض ۵ درصد CO_2 به مدت ۲ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس رنگ از چاهکها خارج شد و به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر از DMSO

(Dimethyl sulfoxide) به چاهکها افزوده شد پلیت در فویل آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر، کاملاً به هم زده شد. نهایتاً میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید(۷).

سپس بر اساس میزان جذب هر چاهک و مقایسه آن با شاهد، میزان Inhibitory concentration %50 (IC_{50}) به دست آمد و پس از آن میزان جذب نانوذرات طلا در دز غیر سمی به وسیله اسپکتروفوتومتر نانودراپ در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تعیین شد.

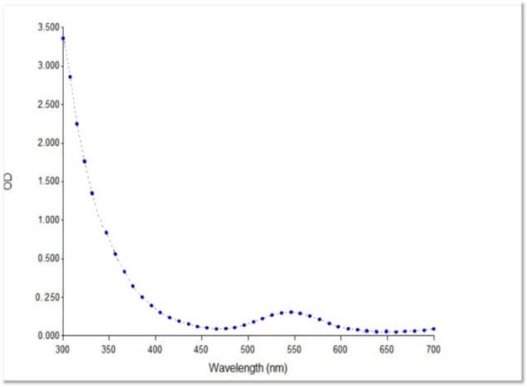
نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنزیمها و سایر مواد ترشحی حاصل از کشت باکتری *Bacillus cereus* باعث کاهش یونهای طلا و تولید نانوذرات طلا برون سلولی می شوند. تغییر رنگ محیط کشت از زرد به صورتی پس از ۲۴ ساعت در محلول سوپرناتانت باکتری که حاوی نمک طلا در غلظت نهایی ۱ میلی مولار بود، مشاهده شد. شکل ۱ این تغییر رنگ را نشان می دهد.



شکل ۱- بیانگر حضور و تولید نانوذرات طلا به دلیل ایجاد رنگ صورتی- قرمز آلبالویی

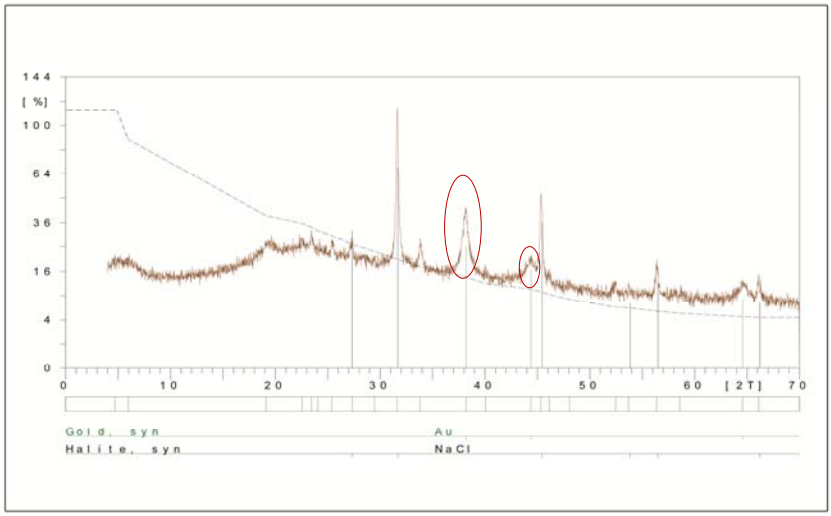
پس از مشاهده تغییر رنگ، نانوذرات دارای پیک جذب نوری در حدود ۵۴۸ نانومتر بودند. شکل ۲ نتایج به دست آمده به وسیله اسپکتروفوتومتری نانودراپ را نشان می دهد.



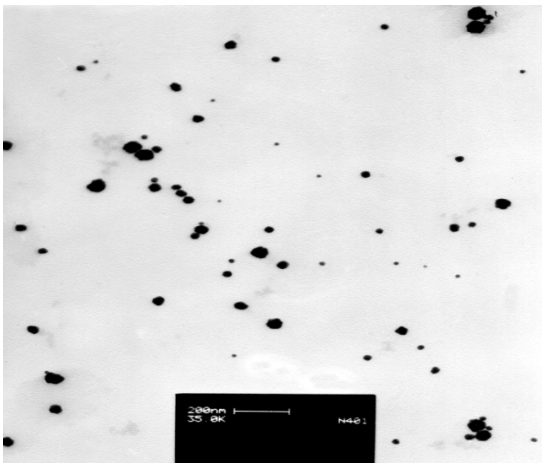
شکل ۲- نتایج بررسی نانوذرات طلا به وسیله اسپکتروفوتومتری نانودراپ. حداکثر جذب نوری در حدود ۵۴۸ نانومتر قابل مشاهده است.

در بررسی نتایج مربوط به XRD، وجود نانوذرات طلا در محلول تأیید شد. شکل ۳ نتیجه به دست آمده از این آزمون را نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می شود، حضور پیک مربوط به عنصر طلا در بین سایر ترکیبات موجود در محیط کشت نشان دهنده تولید نانوذرات طلا و احیای یونهای طلا است. در این فرآیند می توان حضور عنصر از یون آن فلز را جداگانه تأیید کرد. علاوه بر این مشاهده سایر پیکها دال بر وجود ناخالصیهای همراه نانوذرات طلا بوده و نشان دهنده نیاز به پاکسازی نانوذرات پیش از استفاده در آزمون سمیت سلولی می باشد.

تصاویر TEM از نانوذرات تولید شده نشان دادند که شکل نانوذرات به صورت چند ضلعی و گرد بوده و اندازه نانوذرات به طور متوسط بین ۱۰-۷۰ نانومتر بوده است. شکل ۴ نشانگر تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی است.

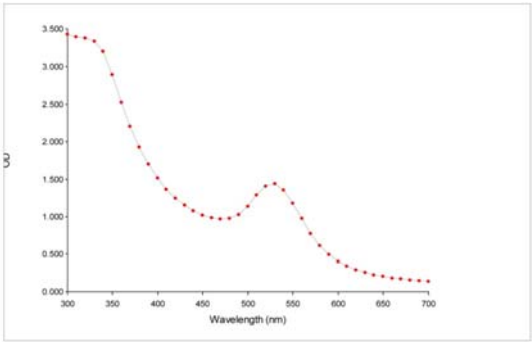


شکل ۳- نتایج به دست آمده از آزمون XRD. پیکهای مربوط به فلز طلا در تصویر مشخص شده اند.

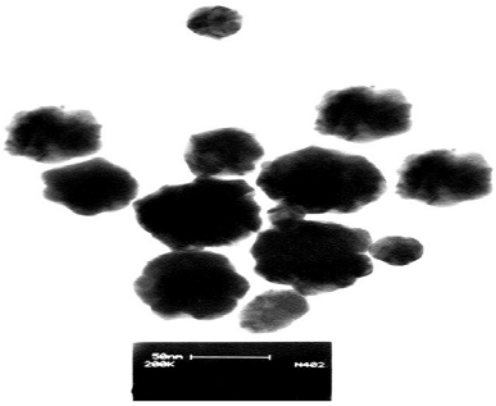


شکل ۴- تصویر TEM از نانوذرات طلا (بزرگنمایی ۲۰۰ نانومتر)

در طی بهینه سازی نشان داده شد که بهترین تولید نانوذرات بعد از اعمال شرایط، در غلظت ۵ میلی مولار، مدت زمان ۷۲ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۹ بوده است. شکل ۵ الگوی چگالی نوری بهینه سازی نانوذرات طلا بعد از اعمال شرایط بهینه را نشان می دهد. همان گونه که پیش از این گفته شد، از نمونه نانوذرات طلا تولید شده در بهترین شرایط فیزیکی مجدداً عکسبرداری توسط TEM انجام و نتایج آن در شکل ۶ آورده شده است. نتایج نشان داد که پس از انجام بهینه سازی، نانوذرات به شکل چند ضلعی و منظم و یک اندازه مشاهده شدند که دارای اندازه حدود ۷۰-۵۰ نانومتر بودند. از این نمونه جهت انجام کشت سلولی استفاده شد.

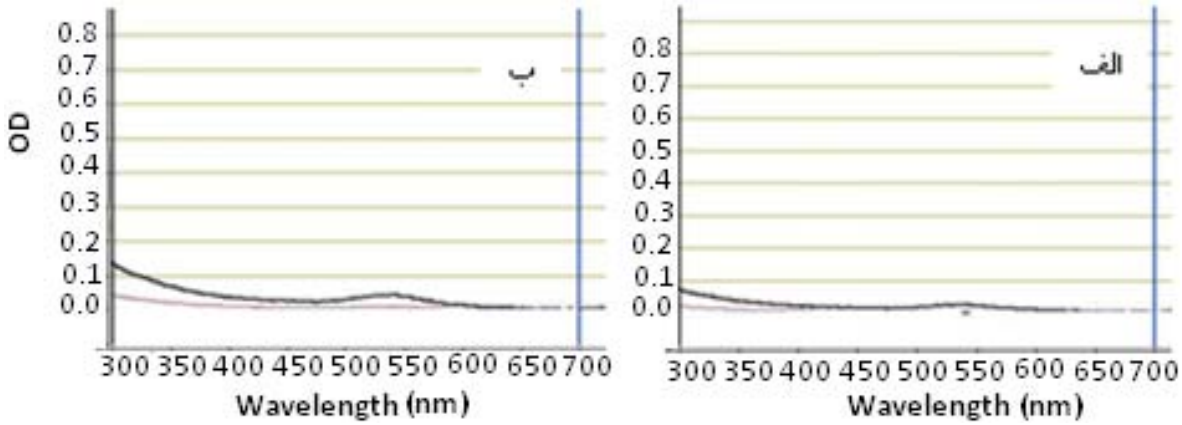


شکل ۵- الگوی چگالی نوری بهینه سازی نانوذرات طلا بعد از اعمال شرایط. حداکثر جذب نوری در حدود ۵۴۰ نانومتر قابل مشاهده است.



شکل۶- تصویر TEM از نانوذرات طلا (بزرگنمایی ۵۰ نانومتر)

نتایج کشت سلولی برای سلولهای رده $HepG_2$ و CIRC-HLF نشان داد که نانوذرات طلا به ترتیب در غلظتهای ۰/۱۲۵ mg/mL و ۰/۲۵ mg/mL به کار برده شده برای هر دو رده کشت سلولی دارای سمیت بوده اند که این سمیت وابسته به دز بوده است. همان گونه که جدول ۱ نشان می دهد، میزان جذب نوری در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه در طول موج ۵۴۰ نانومتر برای سلولهای هپاتوسیت ($HepG_2$) نسبت به سلولهای فیبروبلاست (CIRC-HLF) بیشتر بوده است که حاکی از توانایی مقابله بیشتر این سلولها در برخورد با نانوذرات طلا در غلظتهای بالاتر می باشد. این حالت به دلیل توانایی بالای پاکسازی مواد سمی توسط این رده از سلولها می باشد. نهایتاً همان گونه که اشاره شد، میزان جذب نوری نانوذرات طلا برای هر دو رده سلولی در غلظت IC_{50} به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۷ آورده شده اند.



شکل ۷- الف) IC_{50} مربوط به رده سلولی فیبروبلاست (CIRC-HLF) و ب) هپاتوسیت ($HepG_2$)

جدول ۱ میزان جذب سلولهای رده $HepG_2$ و CIRC-HLF در طول موج ۵۴۰ نانومتر پس از رنگ آمیزی با رنگ تترازولیوم می باشد. اعداد میانگین ۳ بار تکرار می باشند. چاهک شماره ۱۲ شاهد و فاقد نانوذرات است. چاهک شماره ۱ دارای بیشترین و چاهک شماره ۱۱ دارای کمترین میزان از نانوذرات طلا است.

جدول ۱- میزان جذب سلولهای رده $HepG_2$ و CIRC-HLF در طول موج ۵۴۰ نانومتر پس از رنگ آمیزی با رنگ تترازولیوم

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

* نشانگر IC_{50} می باشد

بحث

تا به امروز نانوذرات به صورت قابل ملاحظه ای در بسیاری از زمینه ها در زندگی انسان وارد شده اند. نفوذ بالای این ذرات در زندگی انسان منجر به این شد که دانشمندان پیوسته به دنبال راههای کم هزینه تر و کم خطرتر برای تولید آنها باشند(۱).

تنها مطالعه در دسترس از نانوذرات طلا تولید شده به صورت سبز، نتایج به دست آمده از تحقیقات Satish و همکارانش بر روی نانوذرات طلای تولیدی توسط برگ گیاه چای بود. نتایج آنها نشان دهنده تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد بود که این تغییر رنگ بیانگر تولید نانوذرات طلا توسط این گیاه می باشد در حالی که تغییر رنگ نانوذرات طلا تولید شده در این تحقیق از زرد به صورتی گزارش شد. به علاوه این گروه به بررسی سمیت سلولی نانوذرات طلا بر روی سلولهای سرطانی سینه و پروستات پرداختند. نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی توسط اسپکتروفوتومتر نوری بیانگر آن بود که فعالیت این سلولها با ورود نانوذرات طلای تولیدی به درون سلولهای سرطانی کاهش بسیار زیادی پیدا می کند. این تنها مطالعه بر روی اثرات نانوذرات طلا تولید شده به روش زیستی در کشت سلول می باشد(۹).

با توجه به اینکه نانوذرات طلا پس از ورود به بدن در داخل کبد که یکی از بافتهای اصلی بدن در سمیت زدایی و خنثی سازی می باشد، تجمع خواهند یافت لذا در مطالعه حاضر سلولهای رده هپاتوسیت به عنوان سلولهای اصلی و نیز سلولهای فیبروبلاست به عنوان سلولهایی که در ساختار کبد و دیگر بافتها و اندامها حضور دارند، استفاده شدند تا دزهای غیر سمی نانوذرات طلا جهت مصارف درمانی تعیین گردند. با اطلاعات به دست آمده از تحقیق حاضر می توان پایه ای را برای بررسیهای بیشتر ایجاد کرد زیرا تا کنون مطالعه ای مبنی بر رفتار نانوذرات طلا تولیدی به روش زیستی وجود نداشته است. با توجه به اینکه نانوذرات طلا دارای سطوح در معرض می باشند که قادر به جذب ترکیبات سرم بر روی سطح خود هستند لذا احتمال دارد با جذب این ترکیبات اثرات این نانوذرات خنثی شود. با این حال چنانچه از مطالعات سمیت سلولی بر می آید، نانوذرات طلا سمیت کمتری در کشت سلولی رده هپاتوسیت نسبت به رده فیبروبلاست داشتند که خود می تواند دلیلی بر فعالیت و پایداری این نانوذرات در محیط کشت سلولی و نیز پایداری و مقاومت بیشتر سلولهای هپاتوسیت به مواد سمی باشد.

مطالعات نشان داده اند که نانوذرات فلزات مختلف می توانند به صورت درون و یا برون سلولی تولید شوند(۳). با توجه به اینکه باکتری *Bacillus cereus* توانایی تولید هر دو نوع نانوذرات را دارا می باشد، در تحقیق حاضر تنها نانوذرات تولید شده به صورت برون سلولی مورد بررسی قرار گرفت زیرا تولید برون سلولی نسبت به درون سلولی بهتر و ساده تر است. علاوه بر این در تولید برون سلولی، نیازی به عملیات پایین دستی جهت تخلیص نانوذرات تولیدی از درون سلول باکتریها نمی باشد.

جهت تأیید تولید نانوذرات توسط باکتری *Bacillus cereus* چندین روش مورد استفاده قرار گرفت که یکی از آنها استفاده از روش اسپکتروفوتومتری نانودراپ بود. از دیگر آزمونهایی که جهت تأیید تولید نانوذرات طلا استفاده شد XRD بود. به علاوه جهت بررسی شکل و اندازه نانوذرات طلای تولیدی از TEM استفاده شد. در شکلهای به دست آمده از TEM نانوذرات به صورت چند ضلعی مشاهده شدند و بررسی تصاویر مشخص کرد که اندازه نانوذرات تولیدی متغییر بوده است.

در ادامه تحقیق بهینه سازی تولید نانوذرات طلا بر اساس فاکتورهای دما، زمان، سوبسترا و pH انجام گرفت. به دلیل اینکه گروه وسیعی از پلیمرها، شاتلهای الکترونی و آنزیمها در روند تولید نانوذرات دخیل می باشند، لذا بهینه سازی می تواند بر روی دسته ای از این عوامل تأثیر مثبت داشته

باشد در حالی که بر روی سایر عوامل تأثیر خنثی و یا منفی بگذارد بنابراین بهینه سازی همیشه مناسب نخواهد بود. نتایج نشان داد که بهترین شرایط تولید نانوذرات برای سوپرناتانت کشت حاصل از باکتری مورد آزمون در غلظت سوبسترای ۵ میلی مولار، pH=۹ ، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۷۲ ساعت بوده است. سپس به منظور بررسی اثر نانوذرات طلا در کشت سلول، ابتدا باید نانوذرات شستشو داده می شدند زیرا حضور ترکیبات اضافه از جمله یونهای طلای باقی مانده در محلول نانوذرات در نتایج آزمایشات سمیت سلولی می توانست تداخل ایجاد نماید. بدین منظور با استفاده از سانتریفیوژ با دور کم ابتدا ذارت بزرگ محلول گرفته شدند و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور بالا نانوذرات رسوب داده شدند و به وسیله بافر PBS تحت سه مرحله شستشو قرار گرفتند. جهت انجام سترون سازی از روش تندالیزاسیون استفاده شد. این روش، روشی راحت و آسان و بدون هزینه است که بدون ایجاد تغییر در ساختار مواد حساس به حرارت قادر به استریل نمودن مناسب محلولها و سرمهاست. با توجه به اینکه استفاده از فیلتراسیون سبب به دام اندازی نانوذرات در منافذ فیلتر و عدم کارآیی مناسب می شد و نیز استفاده از اتوکلاو و یا سایر روشهای استریل نمودن سبب تخریب پروتئینهای پوشش دهنده سطحی نانوذرات می گردید، از روش تندالیزاسیون استفاده شد. با این حال استفاده از اشعه هایی نظیر اشعه اکس نیز جهت استریلیزاسیون توصیه می شود ولی با توجه به گران بودن این روش، در تحقیق حاضر روش تندالیزاسیون برگزیده شد. نتایج کشت سلولی نمونه ها نیز حاکی از استریل بودن مناسب نانوذرات طلا بود زیرا آلودگی خاصی در کشت سلولی مشاهده نشد.

تا کنون مطالعه موثقی دال بر بررسی سمیت سلولی نانوذرات طلای تولیدی به روش زیستی بر روی کشت سلولهای انسانی وجود نداشته است. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه کنونی می توان نانوذرات طلا تولید شده به روش زیستی را در دزهای پایین تر از IC_{50} آنها برای سلولها در جهت مصارف پزشکی نظیر شناسایی تومورها استفاده نمود. با این حال همان طور که از نتایج سمیت سلولی بر می آید، تأثیر نانوذرات طلا در کشت سلولی بر اساس رده سلولی مورد استفاده متفاوت است.

همان گونه که نتایج کشت سلولی بر روی دو رده سلولی فیبروبلاست و هپاتوسیت نشان می دهد، نانوذرات طلا در کل دارای خواص سمیت سلولی اندک می باشند که سمیت مذکور وابسته به دز نانوذرات بوده و می توان با به کار بردن دزهای غیر سمی از نانوذرات از آنها در بدن استفاده نمود. با این حال باید این نکته را نیز توجه داشت که چنانچه هدف از استفاده از نانوذرات تولیدی جهت مصارف دارورسانی و درمان باشد، باید نانوذرات در حجم خاص حداقلی جهت تأثیر استفاده شوند لذا مطالعات بیشتری در بدن لازم است تا دز مورد استفاده در پزشکی را تعیین و سپس نتایج آن را به نتایج تحقیقات سمیت سلولی تعمیم داد تا به این ترتیب بتوان با اطمینان نانوذرات را با تأثیر مناسب در بدن وارد نمود. لذا مطالعات بیشتری راجع به بررسیهای درون بدن مورد نیاز است و پیشنهاد می شود نانوذرات طلا تولیدی در مرحله بعدی در بدن حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده شود. علاوه بر این با تزریق نانوذرات به دلیل پاکسازی و تجمع نانوذرات در برخی از بافتها نظیر بافت کبد، در آینده باید سمیت نانوذرات را حتی اگر در دزهای غیر سمی تجویز شوند، در روی سلولهای کبد در شرایط داخل بدن نیز بررسی نمود.

به طور کلی در تحقیق حاضر نتایج کشت سلولی بر روی دو رده سلولی فیبروبلاست و هپاتوسیت نشان می دهد که نانوذرات طلا در غلظتهای بالا بر روی سلولها اثرات سمی اعمال نموده اند و سلولهای هپاتوسیت توانایی مقابله با نانوذرات طلا در غلظتهای بالاتر را دارا می باشند که این امر نشان دهنده مقاومت بیشتر این سلولهاست. در حالی که در مورد سلولهای فیبروبلاست نانوذرات طلا با همان

غلظت، سبب مرگ و آسیب سلولی شده بودند. بنابر مطالعات فوق می توان نتیجه گیری نمود که نانوذرات طلا از یک نوع، یک شکل و یک اندازه بر روی هر رده سلولی دارای رفتارهای متفاوت می باشند.

منابع

1. Collins, P., Bradley, K., & Ishigami, M. (2000). Extreme oxygen sensitivity of electronic properties of carbone nanotubes. Sciencemag , 1801-1804.
2. Gebhardt, R. (1996). Special issue on: international congress on hepatocytes: applications in cell biology, toxicology and medicine. Cell Bio Toxicol; 22: 1-65.
3. Husseiny, M., El-Aziz, M., Badr, Y., & Mahmoud, M. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Biomol Spectrosc; 67: 1003-1006.
4. Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M., & Dhivya, B. (2009). Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus,*Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. Colloids Surf; 71: 133,137.
5. Kumar, S., Abyaneh, M., Gosavi, S., Kulkarni, S., Ahmad, A., & Khan, M. (2007). Sulfite reductase-mediated synthesis of gold nanoparticles capped with phytochelatin. Biotechnol Appl Biochem; 47: 191-195.
6. Loosdrecht, van de (1994). A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. J Immunol Methods; 14;174
7. Pagliacci, M., Spinozzi, F., & Migliorati, G. (1993). Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. Eur J Cancer; 29: 1573- 1577.
8. Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). A laboratory manual. Cold Springs Harbor; 15: 50-62.
9. Satish, K., Chanda, N., Shukla, R., Katti, K., Kulkarni, R. R., Mekapothula, S., et al. (2009). Green Nanotechnology from Tea: Phytochemicals in Tea as Building Blocks for Production of Biocompatible Gold Nanoparticles. J Mater Chem; 19(19): 2912-2920.
10. Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment, a microscopic overview. Langmuir; 21: 10644-10654.
11. Wang, Y., He, X., Wang, K., Zhang, X., & Tan, W. (2009). Barbated *Skullcup* herb extract-mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. Biointerf; 73: 75-79.
12. WEISSMANSHOMER, P.(1975). Chick Embryo Fibroblasts Senescence In Vitro: Pattern Of Cell Division And Life Span As A Function Of Cell Density. Science Direct 4: 159-166.
13. Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2011). Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. Chemosphere; 82: 489-494.

Assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles produced by *Bacillus cereus* on hepatocyte and fibroblast cell lines

Rezaei A.[1], Pourali P.[2] and Yahyaei B.[2]

[1] Microbiology Dept., Faculty of Basic Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

[2] Medical Sciences Dept., Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, I.R. of Iran

Abstract

Gold nanoparticles (GNPs) have different applications in the medicinal field. There are three methods for producing nanoaprticles. Recent study was conducted on the assessment the toxic effects of the biologically produced GNPs. *Bacillus cereus* (PTCC 1015) was purchased and cultured in Nutrient broth medium. The bacterial cells were harvested by centrifugation and the obtained supernatant was incubated with Chloroauric acid solution at the final concentration of 1mM. Then the color changed supernatant was used for spectrophotometery, X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) analyses. Two cell lines ($HepG_2$ and CIRC-HLF) were used for 3-(4,5 dimethyl thiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Spectrophotometery and XRD analyses proved the formation of GNPs and TEM images showed that the sizes of the produced GNPs were around 10-70nm. MTT assay has showed that GNPs had low cytotoxic effect and this effect was dose dependent. In the recent study the cell culture assay showed that the produced GNPs had toxic effect when they were used at high concentrations and the Hepatocyte ($HepG_2$) cell line was more resistant than the Fibroblast (CIRC-HLF) one against the higher concentration of GNPs. The biologically produced GNPs can be easily produced, washed, sterilized and can be used *in vivo* in future studies.

Key words: Cytotoxic effect, Gold nanoaprticles, *Bacillus cereus*, cell line