

## *Evaluating and Comparing Genotoxicity Mechanism of Copper Nanoparticles and Copper Sulfate*

Mohammad Shokrzadeh<sup>1</sup>,  
Amirmohammad Tasdighi<sup>2</sup>,  
Mona Modanlo<sup>3</sup>,  
Fatemeh Shaki<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> PhD in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 4, 2018 ; Accepted June 26, 2018)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Copper is a trace element that is used in various industries. Copper nano-particles are being used in different skin care products, lubricants, oils, polymers, metal covers, plastics, inks, etc. Previous studies have shown that both copper sulfate and copper nano-particles can induce cellular genotoxicity and DNA damage. So, this study aimed at evaluating and comparing genotoxicity in copper nanoparticles and copper sulphate. Assessment of oxidative stress as a mechanism of toxicity was also done.

**Materials and methods:** In this experimental study, blood samples were taken from healthy donors and lymphocytes were separated. Then, lymphocytes were divided into ten groups including control, cisplatin (12 $\mu$ M), different concentrations of copper sulphate (10, 25, 50, 100 nM), and copper nano-particles (10, 25, 50, 100 nM). After 24 h incubation, genotoxicity was investigated by micronucleus and also oxidative stress markers including lipid peroxidation and glutathione.

**Results:** Incubation of blood samples with copper sulfate and nano oxide copper increased the number of micronucleus in lymphocyte. In similar concentration, this increase was higher in nanoparticles group compared with that of the copper sulphate. Also, in both groups receiving copper sulfate and nano oxide copper, lipid peroxidation marker (MDA) and glutathione oxidation increased significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The genotoxicity of copper nanoparticles was found to be higher than that of the copper sulphate. Also, oxidative stress plays a role in genotoxicity of copper sulphate and nano-particles.

**Keywords:** Copper, Nano particle, Genotoxicity, Micronucleus, Oxidative stress

**J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163): 1-9 (Persian).**

\* Corresponding Author: Fatemeh Shaki- Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
(E-mail: fshaki.tox@gmail.com)

# بررسی و مقایسه مکانیسم سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و سولفات مس

محمد شکرزاده<sup>۱</sup>

امیرمحمد تصدیقی<sup>۲</sup>

منا مدانلو<sup>۳</sup>

فاطمه شکی<sup>۴</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** مس، یک عنصر ضروری می باشد که در بسیاری از صنایع کاربرد دارد. نانوذرات اکسید مس هم در محصولات مختلف مراقبت از پوست، افزودنی در لوبریکانت ها، روغن ها، پلیمر، پوشاننده های فلزی، پلاستیک، جوهرها و ... مورد استفاده قرار می گیرند. مطالعات قبلی نشان داده اند که هم سولفات مس و هم نانوذرات اکسید مس توانایی القای سمیت ژنتیکی سلول ها و آسیب به DNA سلولی را دارند. لذا در این مطالعه به بررسی و مقایسه سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و سولفات مس و هم چنین بررسی استرس اکسیداتیو به عنوان مکانیسم سمیت می پردازیم.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، نمونه خونی از داوطلبان سالم گرفته شد و بعد از جداسازی لئوسیت ها، به ۱۰ گروه شامل کنترل، سیس پلاتین (۱۲ میکرومولار)، غلظت های مختلف سولفات مس (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) و نانوذرات مس (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) تقسیم شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ژنوتوکسیستی با تست میکرونوکلئوس و هم چنین مارکرهای استرس اکسیداتیو شامل لیپید پراکسیداسیون و گلوتاتیون ارزیابی شدند.

**یافته ها:** انکوبه کردن نمونه های خونی با مس و نانوذرات مس موجب افزایش تعداد ریزهسته در لئوسیت ها شد. تعداد ریزهسته ایجاد شده در غلظت های برابر در فرم نانو مس بیش تر از فرم مس آن می باشد. هم چنین در گروه دریافت کننده مس و نانو مس، مارکر استرس اکسیداتیو (لیپید پراکسیداسیون) به طور معناداری افزایش و میزان گلوتاتیون کاهش یافت.

**استنتاج:** در مجموع، مطالعه ما سمیت ژنتیکی بیش تر نانو مس را نسبت به مس نشان داد. هم چنین استرس اکسیداتیو در ژنوتوکسیستی هر دو فرم نانو مس و مس نقش دارند.

**واژه های کلیدی:** مس، نانوذرات، سمیت ژنتیکی، میکرونوکلئوس، استرس اکسیداتیو

## مقدمه

آراییشی مورد استفاده قرار می گیرد. مس هم از طریق منابع طبیعی و هم در اثر فعالیت های بشری، در محیط پراکنده می شود که از منابع طبیعی آن می توان به گرد و غبار حاصل از باد، گیاهان فاسد شده، آتش سوزی

مس به عنوان یک فلز یا آلیاژ، در ماشین آلات، ساخت و ساز، حمل و نقل، سلاح های نظامی، بخش مهمی از طلای سفید و جواهرات دیگر و هم چنین در محصولات دندان پزشکی، دستگاه داخل رحمی و لوازم

E-mail: fshaki.tox@gmail.com

**مؤلف مسئول:** فاطمه شکی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی / داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه سم شناسی / داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۲/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۱۹

رشته‌های DNA برای ذرات نانو با اندازه کوچک (۱-۲ نانو متر) و ۲. به صورت غیر مستقیم به وسیله تحریک عمل استرس اکسیداتیو (۱۱). استرس اکسیداتیو به معنای عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانتهی بدن است (۱۲). از طرفی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مطرح شده جهت سمیت مس، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سلول و بروز استرس اکسیداتیو است (۱۳).

هم‌چنین تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که مصرف نانوذرات موجب القاء فعالیت‌های *in vivo* مس در شرایط سمی مانند تغییر در پروفایل لیپید، استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد کلیه و... می‌گردد (۱۴).

از طرف دیگر با گسترش مصرف مواد نانو، ریسک آلودگی انسانی و محیطی با مواد نانو افزایش پیدا کرده است و پتانسیل سمیت آن‌ها هنوز نیز مورد بحث و تحقیق است و اطلاعات ما در مورد اثرات آلاینده‌هایی با سایز نانو هنوز ناقص است. لذا در این مطالعه به بررسی سمیت ژنتیکی نانوذرات مس و مقایسه آن با فرم سولفات مس با استفاده از تست میکرونوکلئوس در لئوسیت‌های خون محیطی انسان و ارزیابی فاکتورهای استرس اکسیداتیو پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه پس از دریافت مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و با رضایت آگاهانه، پنج داوطلب مرد در محدوده سنی ۲۵-۳۵، سالم (که بیماری خاصی نداشته) و غیر سیگاری که در طی یکماه گذشته تحت رادیوگرافی و درمان با آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته‌اند، انتخاب شدند.

برای انجام شمارش لئوسیت‌ها و میکرونوکلئوس‌های ایجاد شده، نمونه‌های خونی گرفته شده از داوطلبان به ۱۰ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری در پلیت‌های ۶ خانه تقسیم گردیدند که گروه‌ها شامل گروه کنترل، گروه سیس پلاتین با دوز آسیب‌زای ۱۲ میکرومولار، گروه

جنگل‌ها و آب دریا اشاره کرد (۱). مس (Cu) بخش جدایی‌ناپذیر بسیاری از آنزیم‌های مهم درگیر در تعدادی از فرایندهای بیولوژیکی حیاتی است (۲).

سولفات مس به عنوان سم و پایه تولید اکثر ترکیبات مسی مانند قارچ‌کش‌های مسی، کنترل بیماری‌های قارچی و بیماری‌های باکتریایی گیاهان می‌باشد (۳).

مقدار مس بدن شخص بالغ ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم است که در بافت‌های مختلف بدن (کبد، خون و مغز) دیده می‌شود که در کبد به مقدار بیش‌تری مس یافت می‌شود. قسمت اعظم مس جذب شده، از طریق صفرا و مقداری از طریق ادرار دفع می‌شوند. جذب عمده مس از روده باریک صورت می‌پذیرد (۴).

استفاده از نانوذرات در سال‌های اخیر به طور قابل توجهی در فرآیندهای خانگی و صنعتی افزایش یافته است. این ذرات، رفتار فیزیکی و شیمیایی خاصی را به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، اندازه کوچک و خصوصیات بصری مرتبط با اندازه شان نشان می‌دهند (۵). نانوذرات فلزی، کاربرد وسیعی در زمینه‌های فناوری زیستی، سنجش زیستی، تشخیص و درمان بالینی، امنیت غذایی و تصفیه آب و فاضلاب دارند (۶).

نانوذرات مس دارای اثرات آنتی‌میکروبیال و آنتی‌اکسیدان می‌باشند و در محصولات مختلف مراقبت از پوست، افزودنی در لوبریکانت‌ها، روغن‌ها، پلیمر، پوشاننده‌های فلزی، پلاستیک، جوهرها و... مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷، ۸).

تحقیقات نشان می‌دهد که نانوذرات مس در بافت‌ها و اندام‌های موجود زنده انتشار یافته و موجب تغییرات ساختمانی ویژه می‌گردند. افزایش نانوذرات مس در موجودات زنده (تا حد آستانه سمیت) موجب دیستروفی یا نکروز بافت‌ها می‌گردد (۹، ۱۰).

یکی از مهم‌ترین اثرات سمی ناشی از تماس با آلاینده‌ها، بحث ژنوتوکسیستی این ترکیبات است. مطالعات نشان داده‌اند که مواد نانو باعث تغییر در DNA به صورت می‌شوند: ۱. از طریق اثر مستقیم بر روی

سولفات مس با دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار و گروه نانو مس با دوزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار بودند. نانوذرات اکسید مس از شرکت نوترینو، تهران با سایز ذره‌ای کم‌تر از ۵۰ نانومتر خریداری گردید.

برای انجام تست‌های اکسیداتیو، نمونه خون‌ها به ۵ گروه تقسیم گردید: گروه کنترل، گروه سولفات مس با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار و گروه نانو مس با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار.

نمونه‌های خونی گرفته شده از داوطلبان به ۱۰ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری در پلیت‌های شش خانه تقسیم گردیدند. در ابتدا سلول‌ها به همراه محیط کشت RPMI 1640 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با 5% CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌های خونی با ذرات مس در انکوباتور مواجه گردید. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۰۰۰ x g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع فوقانی به آرامی خارج شد، به طوری که حدود ۱ میلی‌لیتر ته لوله دست نخورده باقی ماند.

به محتویات ته لوله که شامل مقداری از محیط کشت باقی مانده و پلاک سلول‌های خونی می‌باشد ۶ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید اضافه گشت و با استفاده از پیپت پاستور پلاستیکی ۳-۲ بار جابجایی انجام شد.

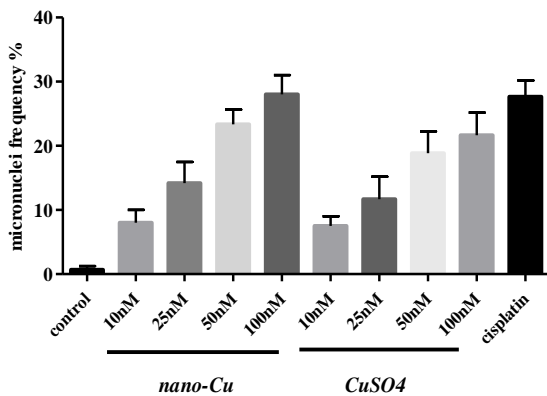
بلافاصله پس از افزودن KCl، نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰ x g به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. بعد توسط پیپت پاستور به آرامی مایع فوقانی برداشته شد، به طوری که در حدود ۱ میلی‌لیتر ته لوله دست نخورده باقی بماند. بعد به آرامی و برای ثابت کردن سلول‌ها، ابتدا با استفاده از پیپت پاستور، ۲ میلی‌لیتر از محلول ثابت کننده، قطره قطره به نمونه افزوده و بعد حجم نهائی نمونه با استفاده از این محلول به ۹ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰ x g به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول بالائی آن خارج گردید. این عمل به صورت پایایی (حداقل ۳ بار) ادامه داده شد.

پس از سانتریفیوژ، محلول بالائی برداشته شد تا مواد باقیمانده در لوله سانتریفیوژ فقط ۰/۵ میلی‌لیتر باشد. بدین ترتیب یک محلول سوسپانسیون یکنواخت به دست آمد. سپس از فاصله ۱۰ سانتی‌متری، ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی بر روی هر لام ریخته و لام‌ها کمی سر و ته شد تا حداکثر سلول‌ها بر روی لام‌ها باقی بماند. سپس در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. ۷-۳ روز پس از تهیه لام‌ها، رنگ آمیزی گیمسا صورت گرفت.

لام‌ها به صورت منظم ابتدا با بزرگنمایی ۴۰ x با میکروسکوپ نوری مورد جستجو قرار گرفت و در مواردی که نیاز به دقت بیش‌تر بود، با بزرگنمایی ۱۰۰ x بررسی شدند. به ازای هر نمونه، حداقل ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای و تعداد ریزهسته‌های موجود در آن بررسی شدند. با استفاده از پیپت پاستور پلاستیکی، به مدت ۱ دقیقه نمونه را جابجا نموده تا تمامی لنفوست‌ها از یکدیگر جدا شوند (۱۵).

برای بررسی لیپید پراکسیداسیون جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، از سنجش میزان مالون دی‌آلدید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپید پراکسیداسیون استفاده گردید. در این روش از معرف تیوباریتوریک اسید (TBA) استفاده شد. به این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از پنج گروه سوسپانسیون سلولی برداشته و جداگانه ۲۰۰ میکرولیتر از اسید فسفریک ۰/۲ مولار در یک میکروتیوب قرار گرفت. سپس ۲۵ میکرولیتر معرف TBA به میکروتیوب اضافه گردید و سپس در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. بعد از آن میکروتیوب‌ها در یخ قرار داده شدند تا سرد شوند. در مرحله بعد، ۰/۵ میکرولیتر از n-butanol اضافه گردید. در نهایت بعد از پایان سانتریفیوژ، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با دقت برداشته و در پلیت ریخته شد و جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد (۱۶).

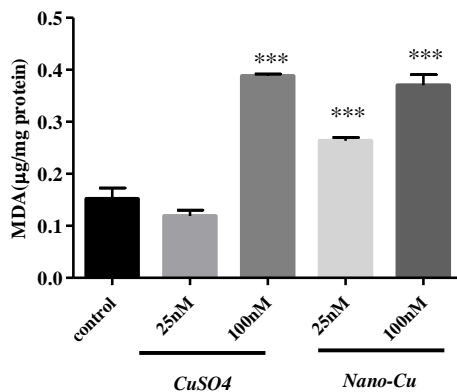
در ابتدا ۱ سی‌سی از محلول EDTA به تعداد ۱۰<sup>۴</sup> سلول لنفوسیت اضافه گردید و در داخل لوله‌های هموژنایزر قرار گرفت. چندین بار عمل هموژن کردن با پیستون



نمودار شماره ۱: مقایسه درصد میکرونوکلیوس ایجاد شده در لنفوسیت های خونی تماس یافته با ذرات مس و نانو مس در نمونه خونی انسانی

یافته های مربوط به میزان لیپید پراکسیداسیون موجود در لنفوسیت های نمونه های خونی

نتایج حاصل از بررسی تست لیپید پراکسیداسیون در سلول های آلوده نشان می دهد که ذرات با غلظت ۱۰۰ نانومولار از مس و نانو مس، هم چنین ذرات غلظت ۲۵ نانومولار نانو مس با  $p < 0.001$  دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشند، اما در غلظت ۲۵ نانومولار ذرات مس، اختلاف قابل توجهی با گروه کنترل نشان نمی دهد. هم چنین میزان لیپید پراکسیداسیون ایجاد شده در غلظت ۱۰۰ نانومولار در ذرات مس و نانو مس بیش تر از غلظت ۲۵ نانومولار می باشد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: نتایج بررسی تست لیپید پراکسیداسیون بر روی نمونه های خونی مواجه شده با ذرات مس و نانو مس. \*\*\*:  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل

انجام گرفت. سپس ۰/۵ سی سی از محلول EDTA به لوله هموژنایزر اضافه گردید و پس از تکان دادن، به لوله سانتریفیوژ منتقل شد. لوله های سانتریفیوژ در یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد، به لوله های سانتریفیوژ، ۱/۵ سی سی از ۱۰٪ TCA اضافه گردید که به این ترتیب موجب رسوب پروتئین ها شد. لوله های سانتریفیوژ در تمامی این مراحل در روی یخ نگهداری می شدند. لوله های سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۱ سی سی از محلول رویی به داخل لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل گردید و به آن ۲/۵ سی سی بافر تریس ۰/۴ مولار با  $\text{PH}=8.9$  و ۰/۵ سی سی DTNB اضافه گردید. سپس لوله به خوبی هم زده شد تا رنگ زرد یکنواختی در لوله پدید آید. در مرحله آخر، جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. میزان گلو تاتیون از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید (۱۷).

## یافته ها

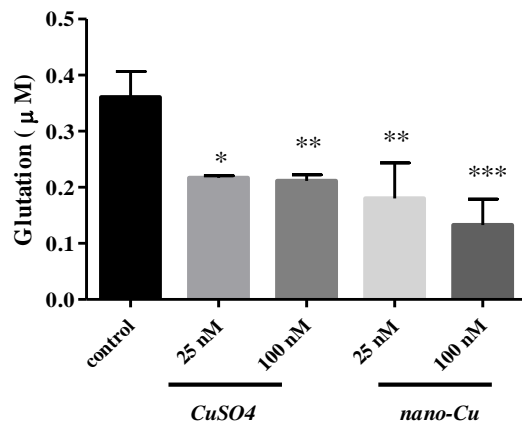
درصد میانگین تعداد میکرونوکلیوس های لنفوسیت ها در گروه های مورد مطالعه

داده های حاکی از مقایسه سمیت ژنتیکی ایجاد شده در ذرات مس و نانو مس نشان می دهد که هر دو در غلظت های ۲۵ و ۱۰۰ نانومولار با  $p < 0.001$  دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشند. هم چنین تعداد میکرونوکلیوس ایجاد شده در سلول توسط ذرات نانو مس بیش تر از ذرات مس می باشد (نمودار شماره ۱). هم چنین در غلظت ۲۵ نانومولار، ذرات نانو مس با  $p < 0.001$  دارای اختلاف بیش تری نسبت به ذرات مس با  $p < 0.01$  نسبت به گروه کنترل می باشند، هم چنین تعداد میکرونوکلیوس ایجاد شده در سلول در اثر سمیت نانو ذرات مس بیش تر از ذرات مس می باشد.

در غلظت ۱۰ نانومولار، نانو ذرات مس با  $p < 0.1$  در مقایسه با ذرات مس، اختلاف بیش تری با گروه کنترل دارند و تعداد میکرونوکلیوس ایجاد شده در سلول در اثر ذرات نانو مس بیش تر از مس می باشد.

یافته های مربوط به میزان گلوتاتیون موجود در لنفوسیت نمونه های خونی

نتایج آزمایش گلوتاتیون بر روی سلول های آلوده شده نشان می دهد که نانوذرات مس با غلظت ۱۰۰ نانومولار با  $p < 0.001$  دارای بیش ترین اختلاف با گروه کنترل و بیش ترین آسیب سلولی می باشند. هم چنین ذرات نانو مس با غلظت ۲۵ نانومولار و ذرات سولفات مس با غلظت ۱۰۰ نانومولار با  $p < 0.01$  دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشند. در غلظت ۲۵ نانومولار مس با  $p < 0.1$  دارای کم ترین آسیب سلولی می باشد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: نتایج بررسی تست گلوتاتیون بر روی نمونه های خونی مواجه شده با ذرات مس و نانو مس.  
\*  $p < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل \*\*  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل \*\*\*  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل

## بحث

مس اگرچه در بدن به پروتئین هایی همچون متالوتئین ها و سرولوپلاسمین متصل است، ولی ممکن است از آن ها رها شده و به صورت آزاد، تشکیل رادیکال های آزاد هیدروکسیل بسیار واکنش پذیر را کاتالیز کند (۱۸). در حالی که قرار گرفتن در معرض مقادیر اندک مس مضر نیست، اما قرار گرفتن در معرض غلظت های بالای آن خطرناک است و منجر به بروز اثرات مضر بر سلامت از جمله آسیب به کبد و کلیه،

آئمی، سمیت سیستم ایمنی و سمیت تکاملی می گردد. بسیاری از این اثرات به دلیل آسیب اکسیداتیو به غشاهای و ماکرومولکول ها است. استرس اکسیداتیو، عدم تعادل بین تولید رادیکال های فعال اکسیژن و دفاع آنتی اکسیدانسی بدن است. از طرفی مس می تواند به گروه های سولفیدریل آنزیم هایی همچون گلوکز ۶- فسفاتاز و گلوتاتیون ردوکتاز متصل شود و در نتیجه موجب اختلال در عملکرد محافظتی این آنزیم ها در برابر آسیب رادیکال های آزاد می شود (۱۹). هم چنین گلوتاتیون مهم ترین دفاع آنتی اکسیدانسی داخل سلولی است که نقش مهمی در حفاظت سلول در برابر آسیب های اکسیداتیو ناشی از سموم محیطی دارد (۲۰). در این مطالعه نشان داده شد که ذرات سولفات مس می توانند باعث کاهش میزان گلوتاتیون سلولی و افزایش رادیکال های آزاد شوند.

از طرف دیگر رادیکال های آزاد اکسیژن می توانند به اهداف مختلفی از سلول از جمله لیپیدهای غشایی حمله کنند و باعث لیپید پراکسیداسیون و تولید مقادیر زیادی رادیکال های فعال جدید شوند که می توانند باعث آسیب به DNA شوند (۲۱).

هم چنین رادیکال های آزاد در سلول می توانند مستقیماً با ماکرومولکول های حیاتی مانند DNA برخورد کنند و موجب شکست رشته های DNA، اتصال متقابل DNA-پروتئین و DNA-DNA، تولید اداکت روی رشته DNA، تغییر در اتصالات بازهای آلی و هم چنین شکست های کروموزومی گردند و منجر به آسیب ژنتیکی شوند (۲۲). آسیب ژنتیکی و میزان میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول در مطالعه حاضر خود دلیلی بر سمیت ژنتیکی این ذرات می باشد.

ویژگی های خاص فیزیکی- شیمیایی و الکتریکی ذرات نانو باعث پیشرفت سریع علم نانو تکنولوژی و کاربرد گسترده آن در صنایع پزشکی و دیگر بخش ها شد و باعث شد برای بسیاری از کاربردها و اهداف گزینه مطلوبی باشد. با این حال این خصوصیات جدید

ذرات نانو، نگرانی‌هایی را در مورد تماس شغلی و محیطی ایجاد کرده است. تغییرات در ساختمان و خصوصیات فیزیکی- شیمیایی ذرات نانو می‌تواند منجر به تغییرات در فعالیت بیولوژیک آن‌ها شود، از جمله تولید رادیکال‌های آزاد که یکی از شایع‌ترین سمیت‌های ناشی از تماس با ذرات نانو است. استرس اکسیداتیو ناشی از تماس با مواد نانو ناشی از فاکتورهای سلولی مثل سطح ذرات، اندازه، ترکیب و حضور فلزات است؛ در حالی که پاسخ‌های سلولی مثل تنفس میتوکندری، تداخل سلول و نانو ذره، فعال‌سازی سلول‌های ایمنی مسئول آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. پاسخ‌های استرس اکسیداتیو ناشی از نانو ذرات می‌تواند شروع‌کننده اثرات پاتوفیزیولوژیک بیش‌تری مانند ژنوتوکسیستی باشد (۲۳).

مطالعات قبلی در رابطه با ارزیابی میکرونوکلئوس‌ها و آزمون کامت در رده سلولی CHS-20 نشان داد که نانو ذرات مس باعث افزایش تعداد میکرونوکلئوس و شکست رشته‌های DNA می‌شوند (۲۴).

هم‌چنین مطالعات *in vivo* و *in vitro* ثابت کرده‌اند که سمیت نانو ذرات مس با تولید ROS، که ممکن است در نتیجه مهار دهیدروژنازهای میتوکندریایی باشد، همراه است (۲۵، ۲۶).

مطالعات ارزیابی سمیت اکسید نانو ذرات فلزی در مقایسه با نانوتیوب‌های کربن، ثابت کردند که نانو ذرات CuO به شدت برای سلول و DNA سمی هستند (۲۷). در این مطالعه نیز نانو ذرات مس موجب شکست رشته‌های DNA و افزایش تعداد میکرونوکلئوس در سلول شدند. هم‌چنین باعث کاهش عوامل کاهنده سلولی مس گلوکاتایون و هم‌چنین تخریب غشای سلولی شد که از طریق اندازه‌گیری MDA و افزایش آن ثابت گردید که این نتایج با مطالعات قبلی هم‌خوانی داشت.

در این مطالعه، میزان سمیت ژنتیکی سولفات مس و ذرات نانو اکسید مس از طریق میزان میکرونوکلئوس ایجاد شده در لئوسیت‌های خونی بررسی شد و با یکدیگر مقایسه گردید. هم‌چنین فاکتورهای استرس

اکسیداتیو شامل گلوکاتایون و مالون دی‌آلدئید بررسی گردید. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که ذرات مس و نانو مس هر دو در سمیت سلولی ایجاد شده نقش دارد و با افزایش غلظت آن‌ها، تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سلول افزایش می‌یابد، به این صورت که بیش‌ترین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده در سولفات مس و نانو ذرات اکسید مس مربوط به غلظت ۱۰۰ نانومولار و کم‌ترین تعداد میکرونوکلئوس ایجاد شده مربوط به غلظت ۱۰ نانومولار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که با مطالعات و تحقیقات قبلی هم‌خوانی داشت. هم‌چنین مواجهه لئوسیت‌های خونی با فرم نانو ذرات اکسید مس باعث ایجاد تعداد میکرونوکلئوس بیش‌تری در لئوسیت‌های خونی نسبت به ذرات سولفات مس و در نتیجه سمیت سلولی بیش‌تری شد.

در ارتباط با میزان MDA ایجاد شده در سلول با افزایش غلظت ذرات، میزان MDA ایجاد شده نیز افزایش می‌یابد و فرم نانو ذرات MDA بیش‌تری نسبت به فرم معمولی آن ایجاد می‌کند.

در ارتباط با گلوکاتایون ایجاد شده در سلول نیز با افزایش غلظت ذرات سولفات مس و نانو اکسید مس، میزان گلوکاتایون سلولی کاهش یافت که این امر منجر به تولید رادیکال آزاد بیش‌تر و در نتیجه آسیب بیش‌تر سلولی می‌شود. فرم نانو ذرات مس، سهم بیش‌تری در کاهش گلوکاتایون سلولی داشته و در نتیجه موجب سمیت بیش‌تر سلولی می‌شود.

## سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه دکترای داروسازی آقای امیرمحمد تصدیقی ثانی، مصوب دانشکده داروسازی ساری، با کد طرح ۲۴۳۸ است. هم‌چنین نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت و تامین هزینه این طرح کمال تشکر را دارند.

## References

- Okereke T, Sternlieb I, Morell AG, Scheinberg IH. Systemic absorption of intrauterine copper. *Science* 1972; 177(4046): 358-360.
- Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M. Elements and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004.
- Resistance Welder Manufacturers' Association (RWMA). Resistance Welding Manual. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Resistance Welder Manufactures assn. 2003.
- Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *The Am J Clin Nutr* 1998; 67(5): 960S-964S.
- Xiao X, Fan FR, Zhou J, Bard AJ. Current transients in single nanoparticle collision events. *J Am Chem Soc* 2008; 130(49): 16669-16677.
- Patil MA, Parikh PA. Investigation on likely effects of Ag, TiO<sub>2</sub>, and ZnO nanoparticles on sewage treatment. *Bullet Environ Contamin Toxicol* 2014; 92(1): 109-114.
- Liu G, Li X, Qin B, Xing D, Guo Y, Fan R. Investigation of the mending effect and mechanism of copper nano-particles on a tribologically stressed surface. *Tribol Lett* 2004; 17(4): 961-966.
- Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Möller L, Leygraf C, et al. Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano-and Micrometer-Sized Copper and Copper (II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small* 2009; 5(3): 389-399.
- Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 2009; 407(4): 1461-1468.
- Wang H, Huang Y, Tan Z, Hu X. Fabrication and characterization of copper nanoparticle thin-films and the electrocatalytic behavior. *Anal Chim Acta* 2004; 526(1): 13-17.
- Hashimoto K, Nakajima Y, Matsumura S, Chatani F. An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneuploids from clastogens. *Toxicol Vitro* 2010; 24(1): 208-216.
- Shokrzadeh M, Shaki F, Mohammadi E, Rezagholizadeh N, Ebrahimi F. Eदारavone decreases paraquat toxicity in a549 cells and lung isolated mitochondria. *Iran J Pharm Res( IJPR)* 2014;13(2): 675-681 (Persian).
- Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70(1): 367-381.
- Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RC, Ribas BO, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(12): 2053-2060.
- Shokrzadeh M, Habibi E, Modanloo M. Cytotoxic and genotoxic studies of essential oil from *Rosa damascena* Mill, Kashan, Iran. *Med Glas (Zenica)* 2017; 14(2): 152-157.
- Shaki F, Hosseini MJ, Shahraki J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated liver mitochondria: a revised mechanistic vision for justification of clinical complication of depleted uranium (DU) on liver. *Toxicol Environ Chem* 2013; 95(7):1221-1234.



17. Pourahmad J, Eskandari MR, Alavian G, Shaki F. Lysosomal membrane leakiness and metabolic biomethylation play key roles in methyl tertiary butyl ether-induced toxicity and detoxification. *Toxicol Environ Chem* 2012; 94(2): 281-293.
18. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189(1-2): 147-163.
19. Georgieva S, Popov B, Petrov V. Genotoxic effects of copper sulfate in rabbits. *Arch Biol Sci* 2013; 65(3): 963-937.
20. Shahani S, Behzadfar F, Jahani D, Ghasemi M, Shaki F. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Nasturtium officinale* involved in attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Mech Methods* 2017; 27(2): 107-114.
21. Mojtahedzadeh M, Ahmadi A, Mahmoodpoor A, Beigmohammadi MT, Abdollahi M, Khazaeipour Z, et al. Hypertonic saline solution reduces the oxidative stress responses in traumatic brain injury patients. *J Res Med Sci* 2014; 19(9): 867-874 (Persian).
22. Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D, et al. Role of radicals and singlet oxygen in photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug camptothecin: an electron paramagnetic resonance study. *J Phys Chem B* 2003; 107(10): 2415-2425.
23. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International* 2013; 2013.
24. Sadiq R, Khan QM, Mobeen A, Hashmat AJ. In vitro toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. *Drug Chem Toxicol* 2015; 38(2): 152-161.
25. Sheline CT, Choi DW. Cu<sup>2+</sup> toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 2004; 55(5): 645-653.
26. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12(10): 1161-1208.
27. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009; 188(2): 112-118.