

The effect of glucose and ultraviolet irradiation as cross-linking methods on properties of albumin nanoparticles

Raziyeh Mahmoudzadeh¹,
Hassan Niknejad²

¹ Student of Medicine, Department of Tissue Engineering AND Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Tissue Engineering AND Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 15, 2013; Accepted November 17, 2013)

Abstract

Background and purpose: In the last step of preparation of nanoparticles, glutaraldehyde (GA) is added to stabilize the formed nanoparticles. There are several reports indicating the harmful effects of glutaraldehyde on different organ systems and tissues. The aim of this study was to evaluate the effects of different cross-linking methods like using ultraviolet (UV) irradiation, glucose and combination of these methods on nanoparticles.

Materials and methods: Nanoparticles were prepared by desolvation method and in the last step were cross-linked by four different methods. Nanoparticles were compared with each other based on properties like size, zeta potential [by Photon correlation spectroscopy (PCS)], Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron micrograph, cellular uptake and toxicity.

Results: All nanoparticles had the same range of size (100-200 nm) and only the zetapotential of UV treated group had significant difference with glutaraldehyde group. The results of scanning electron micrograph and FTIR assay were the same for all groups. Cross-linking by combination of UV and glucose had less toxic effects and more viable cells (76.59 ± 7.67 percent) compared to glutaraldehyde (40.08 ± 6.60 percent) ($P < 0.01$). Cellular uptake of nanoparticles cross-linked with UV and glucose and glutaraldehyde showed similar results.

Conclusion: These findings support the idea that using combination of UV and glucose as cross-linking method can be an appropriate alternative method for toxic glutaraldehyde with less toxic effects.

Keywords: Nanoparticles, albumin, cross-linking, glutaraldehyde, ultraviolet, glucose

بررسی استفاده از گلوکز و اشعه فرابنفش به عنوان روش‌های اتصال متقاطع بر خواص نانوذرات آلبومین

راضیه محمود زاده^۱

حسن نیک‌نژاد^۲

چکیده

سابقه و هدف: در مرحله آخر آماده‌سازی نانوذرات آلبومین، گلوکز آلدئید جهت استحکام به نانوذرات تازه شکل گرفته اضافه می‌شود. گزارش‌های متعددی از تأثیرات نامطلوب گلوکز آلدئید بر بافت زنده وجود دارد. هدف این مطالعه، بررسی تأثیرات روش‌های جایگزین اتصال متقاطع مانند تابش اشعه فرابنفش، گلوکز و ترکیب این دو روش بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی حاضر نانوذرات آلبومین به روش محلول‌زدایی (Desolvation) تهیه شدند و در مرحله آخر توسط چهار روش گلوکز آلدئید، تابش اشعه فرابنفش، گلوکز و ترکیب اشعه فرابنفش و گلوکز اتصال متقاطع انجام شد. ذرات به دست آمده از لحاظ اندازه و پتانسیل زتا (Zeta)، طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy)، خواص سطحی ذرات (به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی)، برداشت سلولی و میزان سمیت برای سلول‌ها با هم مقایسه شدند.

یافته‌ها: اندازه ذرات در تمام گروه‌ها مشابه بود (۲۰۰-۱۰۰ نانومتر) و تنها پتانسیل زتا نانوذرات دارای اتصال متقاطع با اشعه فرابنفش در مقایسه با نانوذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکز آلدئید تفاوت معنی‌داری را نشان داد. خواص ظاهری و نتایج طیف FTIR در هر چهار گروه مشابه بود. میزان سمیت برای سلول‌های طبیعی در گروه اتصال متقاطع به وسیله گلوکز به همراه اشعه فرابنفش (۷/۶۷ ± ۷۶/۵۹ درصد) کمتر از گروه اتصال متقاطع شده با گلوکز آلدئید (۶/۶۰ ± ۴۰/۰۸ درصد) بود. میزان برداشت سلولی نیز تنها در دو گروه دارای اتصال متقاطع توسط گلوکز آلدئید و گلوکز به همراه اشعه فرابنفش مشابه بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه از این فرضیه که اتصال متقاطع نانوذرات آلبومین توسط گلوکز و اشعه فرابنفش می‌تواند روش جایگزین مناسب با سمیت کمتر برای گلوکز آلدئید سمی باشد، حمایت می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، آلبومین، اتصال متقاطع، گلوکز آلدئید، اشعه فرابنفش، گلوکز

مقدمه

این، این ذرات امکان رساندن داروهای غیر محلول در آب به هدف مورد نظر را امکان‌پذیر می‌نمایند. نانوذرات در مقایسه با سایر حامل‌های دارویی، توانایی دارورسانی دقیق‌تر به محل و بافت مورد نظر را دارند (۸). نانوذرات از مواد مختلف به دست می‌آیند که به نظر می‌رسد استفاده از مواد طبیعی مانند آلبومین سرم فواید بیشتری دارد (۹).

آلبومین فراوان‌ترین پروتئین پلاسما می‌باشد (۵۰-۳۵ گرم بر لیتر) که به عنوان حامل دارو در چندین مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. نانوذرات آلبومین بدون هیچ عارضه خاصی تحمل می‌شوند که این امر توسط چند مطالعه کلینیکی ثابت

تلاش‌های زیادی برای پیشبرد سیستم‌های دارورسانی صورت می‌گیرد که در نهایت بتواند اثربخشی داروها را بهتر نماید. برای نایل شدن به این هدف مطالعات زیادی انجام شده است که شامل استفاده از نانوذرات (۱)، لیپوزوم‌ها (۲)، دندریمرها (۳)، میسل‌ها (۴) نانولوله‌های کربنی (۵)، کونژوگه‌های مولکولی (۶) و ذرات کوانتومی (۷) می‌باشد. در میان حامل‌های دارویی، نانوذرات انتخاب بهتری به نظر می‌آیند؛ چرا که این ذرات از تخریب مواد دارویی جلوگیری می‌کنند و ورود آن‌ها به سلول را بهبود می‌بخشند. علاوه بر

مؤلف مسئول: حسن نیک‌نژاد - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت. E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

۱. دانشجوی پزشکی، گروه مهندسی بافت و مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه مهندسی بافت و مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۸/۲۶

شده است (۱۱، ۱۰). این ذرات فاقد سمیت و ایمنونژنسیستی هستند که آن‌ها را داوطلب مناسبی برای دارورسانی می‌نماید. توزیع نانوذرات به عنوان سیستم‌های دارورسانی در بدن با دو خصوصیت فیزیکی و شیمیایی کنترل می‌شود که شامل اندازه ذره و خصوصیت سطحی ذرات می‌باشد (۱۲). تولید نانوذرات آلبومین با اندازه مناسب امکان‌پذیر می‌باشد. علاوه بر این، نانوذرات آلبومین دارای گروه‌های عملکردی بر سطح خود هستند که امکان اتصال کوالانسی داروها را به آن‌ها می‌دهند (۱۳). این گروه‌ها شامل آمین‌های لیزین، گروه‌های کربوکسیل آسپاراژیک و گلوتامیک اسید و گروه‌های هیدروکسیل تیروزین می‌باشد (۱۴). تا به حال سه روش متفاوت برای آماده‌سازی نانوذرات بر پایه آلبومین معرفی شده است که شامل تشکیل امولسیون، محلول‌زدایی (Desolvation) و جدایش فازی در محلول آبی (Coacervation) می‌باشد. نانوذرات آلبومین به طور معمول با روش محلول‌زدایی تهیه می‌شوند. در این روش ماده‌ای مانند استون یا اتانول قطره قطره به محلول آبی آلبومین در $pH = 7-9$ اضافه می‌شود و در ادامه با گلو تار آلدئید اتصال متقاطع انجام می‌گردد (۱۵، ۱۴). گلو تار آلدئید به طور معمول برای اتصال متقاطع و تثبیت نانوذرات حاصل از آلبومین به کار می‌رود (۱۶).

اتصال متقاطع مرحله‌ای اساسی در آماده‌سازی نانوذرات به شمار می‌رود که زیست‌دستیابی و میزان آزاد شدن دارو از سیستم حامل را تعیین می‌نماید (۴). البته سمیت گلو تار آلدئید و احتمال واکنش این ماده با دارو و حامل آن، این ماده را به یک ایجاد کننده اتصال متقاطع نامطلوب تبدیل کرده است؛ چرا که گلو تار آلدئید می‌تواند بر فعالیت و اثربخشی داروها نیز تأثیر بگذارد (۱۷). چندین روش دیگر برای ایجاد اتصال متقاطع موجود است که می‌تواند جایگزین احتمالی گلو تار آلدئید باشد. روش‌های فیزیکی اتصال متقاطع شامل خشک کردن، گرما دادن و اشعه فرابنفش می‌باشد. روش‌های شیمیایی شامل استفاده از گلوکز نیز می‌تواند روش جایگزین دیگری باشد (۱۸). تمام روش‌های ذکر شده پیش‌تر بر روی پروتئین‌هایی مانند کلاژن آزمایش شده‌اند. در این آزمایش‌ها اشعه فرابنفش

قدرت کششی پروتئین را افزایش می‌دهد و بر درصد نهایی افزایش طول فیبرهای کلاژن تأثیر دارد. نتیجه نهایی به شدت به مدت زمان در معرض تابش قرار گرفتن بستگی دارد؛ به طوری که تابیدن طولانی‌تر اشعه به پروتئین اثرات مخرب داشته است (۱۹). در آزمایش دیگری همراهی گلوکز با اشعه فرابنفش میزان استحکام فیلم‌های کلاژن را افزایش داد (۲۰). با توجه به مطالب ذکر شده، در این روش نانوذرات آلبومین تولید شده خواص فیزیکی لازم را حفظ نمودند و هم‌زمان سمیت کمتری برای سلول‌های زنده داشتند. در صورت استفاده از این نانوذرات در مواردی چون سیستم دارورسانی، با حذف سمیت از ذرات آسیب کمتری به سلول‌های زنده تحمیل خواهد شد. هدف از این مطالعه، بررسی نتایج حاصل از استفاده از اشعه فرابنفش، گلوکز و همراهی این دو روش به عنوان اتصال دهنده متقاطع نانوذرات آلبومین بود و نتایج با نانوذرات حاصل از اتصال متقاطع با ماده سمی گلو تار آلدئید مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بود که در آن آلبومین سرم گاوی (با خلوص ۹۹-۹۶ درصد) و گلو تار آلدئید از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. برای آزمایش سمیت در شرایط برون‌تن، سلول‌های اپی‌تلیال پرده آمیون از سزارین‌های گزینشی و جهت بررسی میزان برداشت سلولی، سلول‌های HeLa از انستیتو پاستور تهیه شدند. 1×10^4 IRPM، DMEM/F12 و سرم (Dulbecco's modified eagle's medium) و سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) از GIBCO Invitrogen و diphenyl tetrazolium (MTT) و 5-bromide $3-(4,5 \text{ Dimethylthiazol-2-yl})-2$ Dimethylsulfoxide (DMSO) و فاکتور رشد اپیدرمال (Epidermal Growth Factor یا EGF) از Sigma-Aldrich تهیه شدند.

نانوذرات آلبومین به روشی که پیش‌تر توسط Langer و همکاران توصیف شده بود، تهیه گردید (۱۵). به طور خلاصه

۱۵۰ میلی گرم از آلبومین در ۲ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۱۰ میلی مولار حل شد و به pH برابر با ۸/۲ رسید. سپس محلول با اضافه شدن پیوسته ۸ میلی لیتر از ماده حل کننده اتانول در دمای اتاق و در حال هم زدن (۵۰۰ دور در دقیقه) به نانوذرات آلبومین تبدیل شد. اضافه شدن اتانول توسط پمپ سرنگ (Model SP-500, JMS Co., LTD; Japan) صورت گرفت. به وسیله این پمپ سرعت اضافه شدن اتانول یک میلی لیتر در دقیقه بود. بعد از این فرایند، گلو تار آلدهید ۸ درصد در آب به محلول اضافه شد تا اتصال متقاطع ذرات صورت گیرد. این روند در طی ۲۴ ساعت چرخش محلول تکمیل گردید.

روش شرح داده شده در سایر گروه‌های مورد آزمایش تا مرحله قبل از اضافه کردن ماده ایجاد کننده اتصال متقاطع مشابه بود. در مرحله آخر، گروه دوم به مدت ۳۰ دقیقه در اتاقک حاوی لامپ اشعه فرابنفش (طول موج ۲۵۴ نانومتر) قرار داده شد. فاصله بین منبع اشعه و نمونه ۱۰ سانتی متر بود. در گروه سوم اتصال متقاطع با ۶ میلی مولار گلوکز انجام گردید. در گروه چهارم مدت زمان تابیدن اشعه فرابنفش و مقدار گلوکز یکسان بود و این دو ماده اتصال متقاطع دهنده به طور هم‌زمان استفاده گردیدند. میانگین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا ذرات توسط دستگاه PCS (Photon correlation spectroscopy) و میکروالکتروفورزیس با استفاده از (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) Malvern zetasizer ۳۰۰۰ به دست آمد. نمونه‌ها به نسبت ۱:۴۰۰ با آب مقطر رقیق شدند و اندازه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زاویه پراکندگی ۹۰ درجه به دست آمدند. برای تعیین شکل نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning electron microscope) استفاده شد. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) دستگاه BOMEM ۱۰۲ MB اندازه گیری گردید. نمونه‌ها برای اندازه گیری طیف FTIR در محلول آبی ۱/۵ درصد شامل بافر فسفات (pH = ۷/۲) NaCl ۰/۱ مولار حل شدند. طیف IR (Infrared) بر روی فیلم هیدراته با استفاده از AgBr windows با رزولوشن $4-2 \text{ cm}^{-1}$ و ۵۰۰-۱۰۰ اسکن به دست آمد.

سلول‌های HeLa در پلیت‌های ۲۴ خانه با تراکم $10^4 \times 2$ سلول در هر چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن در RPMI ۱۶۴۰ کشت داده شدند. آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین) و سرم حیوانی (FBS) به مدت ۲ روز به محیط کشت اضافه شد. سپس سلول‌ها با نانوذرات کونژوگه شده با مواد فلوروسنت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. برای تصویربرداری، سلول‌های HeLa به آرامی با محلول بافر فسفات سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) دو بار شستشو داده شدند و در نهایت در فرمالدئید ۴ درصد به مدت ۵ دقیقه ثابت شدند. نانوذرات کونژوگه شده با FITC (Fluorescein isothiocyanate) به مدت ۴ ساعت در معرض سلول‌های سرطانی قرار گرفتند. سپس پلیت‌های حاوی سلول سه بار با PBS شستشو داده شدند. دو و چهار ساعت پس از انکوباسیون با نانوذرات آلبومین از سلول‌های سرطانی عکس گرفته شد. در هر چاهک پلیت، هشت میدان دید اتفاقی انتخاب شد و از میکروسکوپ معکوس فلوروسنت برای عکس برداری استفاده گردید.

سلول‌های اپی‌تلیال آمیونونی از جفت تازه انسانی بعد از زایمان‌های سزارین از قبل برنامه‌ریزی شده به روشی که پیش‌تر توضیح داده شد، به دست آمدند (۲۲، ۲۱). سپس این سلول‌ها با تراکم $10^4 \times 5$ در هر چاهک پوشش داده شده با کلاژن نوع یک (CollaNik I, YavandanAndisheh Co.) قرار داده شدند. این سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن در محیط DMEM/F۱۲ غنی شده با ۱۰ درصد FBS قرار داده شدند. سپس این سلول‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر از نانوذرات، یک شب انکوبه گردیدند. سلول‌ها با استفاده از PBS در pH برابر با ۷/۴ شستشو داده شدند و سلول‌هایی که حاوی نانوذرات نبودند به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند. برای تعیین میزان سمیت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس کریستال‌های فورمازان توسط ۱ میلی لیتر از DMSO در دمای اتاق حل گردید. سپس جذب

به وسیله گلو تار آلدئید اتصال متقاطع شده بودند و سپس نانوذراتی که به وسیله گلوکز و اشعه فرابنفش به طور هم‌زمان اتصال متقاطع شده بودند، قرار داشتند. در نهایت نیز نانوذراتی بودند که با اشعه فرابنفش اتصال متقاطع داشتند. هیچ تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌های مختلف از لحاظ اندازه ذرات و شاخص پراکندگی آن‌ها مشاهده نشد. در عکس‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی نیز نانوذرات ظاهر کروی و یکسان از لحاظ توزیع اندازه داشتند (تصویر شماره ۱).

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری در پتانسیل زتا نانوذرات اتصال متقاطع شده با اشعه فرابنفش در مقایسه با ذرات اتصال متقاطع شده با گلو تار آلدئید مشاهده شد ($P < 0/01$). تفاوت معنی‌دار دیگری بین گروه‌های اتصال متقاطع شده با گلو تار آلدئید، گلوکز و گلوکز و اشعه فرابنفش دیده نشد.

نمودار شماره ۱ محدوده جذب نواحی واجد گروه آمید در آلبومین را نشان می‌دهد. چنان‌که در شکل به طور کامل مشخص است، نواحی آمید I و آمید II در هر چهار گروه مورد آزمایش وجود دارد که این یافته بیانگر عدم تغییر ساختاری نانوذرات اتصال متقاطع شده با روش‌های مختلف می‌باشد.

نوری توسط اسپکتروفتومتر (CE7500, Cecil, UK) در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. چاهک بلانک (فقط حاوی محیط کشت) برای تنظیم صفر استفاده شد. میزان سلول‌های زنده و قابل رشد از فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری گروه شاهد} / \text{جذب نوری گروه تیمار}) = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

جذب نوری گروه شاهد در عدم حضور نانوذرات و جذب نوری گروه تیمار در حضور نانوذرات اندازه‌گیری شدند.

تحلیل آماری

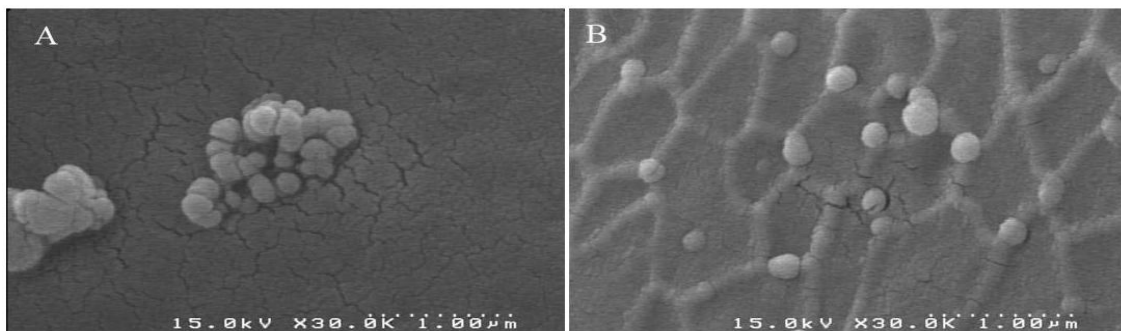
نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. برای مقایسه بین گروه‌ها آزمون ANOVA (Tukey post-test) مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت‌هایی که مقادیر کمتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج میانگین اندازه ذرات توسط دستگاه PCS در جدول شماره ۱ نشان داده شد. ذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکز دارای بیشترین میانگین قطر بودند و پس از آن، نانوذراتی که

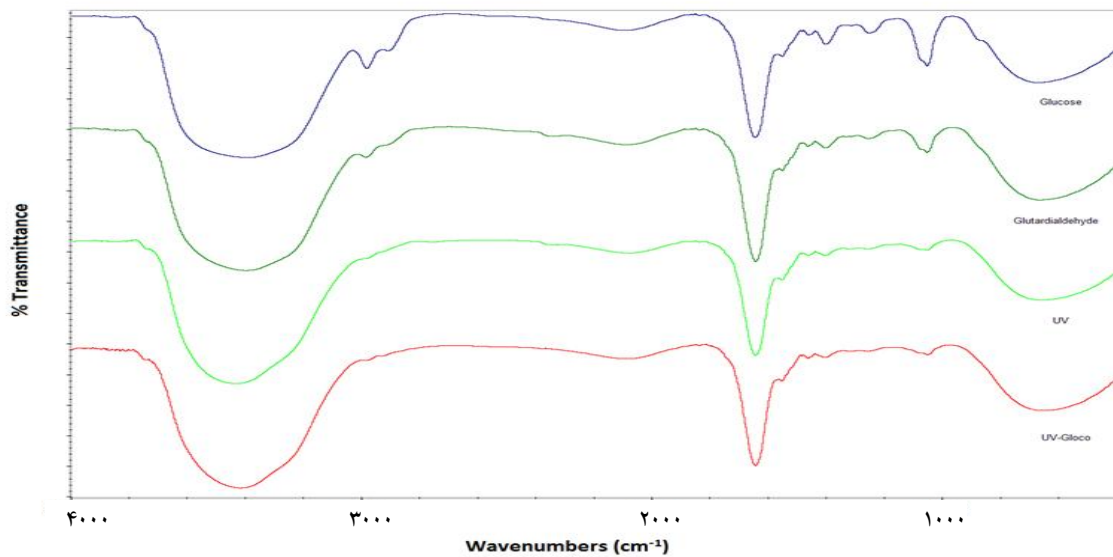
جدول شماره ۱: میانگین قطر نانوذرات آلبومین تهیه شده با روش‌های مختلف اتصال متقاطع و تأثیر روش‌های مختلف اتصال متقاطع بر پتانسیل زتا نانوذرات ماده ایجاد کننده اتصال متقاطع	پتانسیل زتا \pm خطای استاندارد (میلی ولت)	شاخص پراکندگی	میانگین قطر \pm خطای استاندارد (نانومتر)
گلو تار آلدئید	$-32/5 \pm 3/5$	$0/32 \pm 0/18$	$141/7 \pm 22/9$
اشعه فرابنفش	$-24/9 \pm 3/2$	$0/30 \pm 0/26$	$134/9 \pm 24/6$
گلوکز	$-30/1 \pm 1/5$	$0/33 \pm 0/26$	$144/6 \pm 27/2$
گلوکز به همراه اشعه فرابنفش	$-32/4 \pm 2/8$	$0/34 \pm 0/22$	$140/2 \pm 20/1$

تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌های مختلف از نظر اندازه مشاهده نشد؛ نتایج، حاصل از چهار تکرار ($n = 4$) در ۶ آزمایش مستقل می‌باشد.



تصویر شماره ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی نانوذرات آلبومین

در مرحله آخر نانوذرات با گلو تار آلدئید (A) یا گلوکز + اشعه فرابنفش (B) اتصال متقاطع شده‌اند.



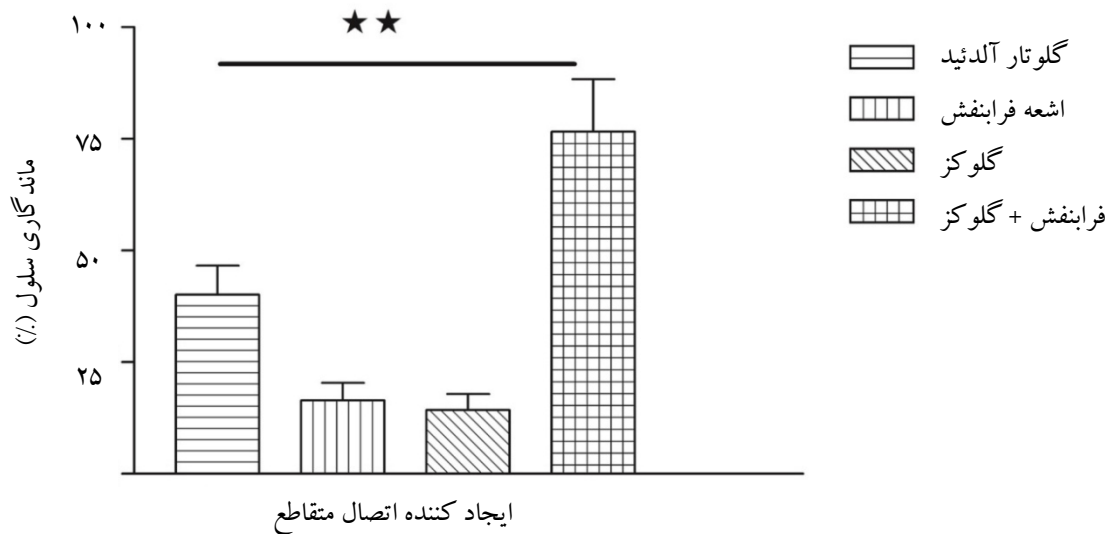
نمودار شماره ۱: نتایج طیف (Fourier transform infrared spectroscopy) FTIR نانوذرات آلبومین آماده شده با روش‌های مختلف اتصال متقاطع

نتایج گروه‌های مختلف از نظر وجود گروه‌های آمیدی I و II یکسان بود

مدت ۲ ساعت، سلول‌هایی که در معرض نانوذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش قرار داشتند، برداشت کافی سیتوپلاسمی داشتند، حال آن‌که سلول‌های انکوبه شده با نانوذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکز آلدئید در مدت زمان یکسان و شرایط یکسان برداشت بسیار کمتری نشان دادند؛ به طوری که سیگنال‌های فلورسنت بیشتر در غشای سلول‌های سرطانی قابل مشاهده بود و داخل سیتوپلاسم بسیار کمتر یافت شد (تصویر شماره ۲، قسمت‌های A-D). بعد از گذشت ۴ ساعت، برداشت سیتوپلاسمی سلول‌ها در گروه‌های انکوبه شده با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش و گلوکز آلدئید مشاهده گردید (تصویر شماره ۲، قسمت‌های B و D). سلول‌هایی که در معرض نانوذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکز و نانوذرات دارای اتصال متقاطع با اشعه فرابنفش قرار داشتند بعد از گذشت ۴ ساعت، برداشت سلولی بسیار کمی را نشان دادند که این مشاهده با نتایج آزمون MTT که بیانگر درصد اندک سلول‌های زنده در مواجهه با این گروه‌ها بود، همخوانی داشت. این یافته می‌تواند دلیلی بر برداشت کمتر نانوذرات توسط سلول‌های در معرض نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز به تنهایی و نانوذرات اتصال متقاطع شده با اشعه فرابنفش به تنهایی باشد (تصویر شماره ۲، قسمت‌های E و F).

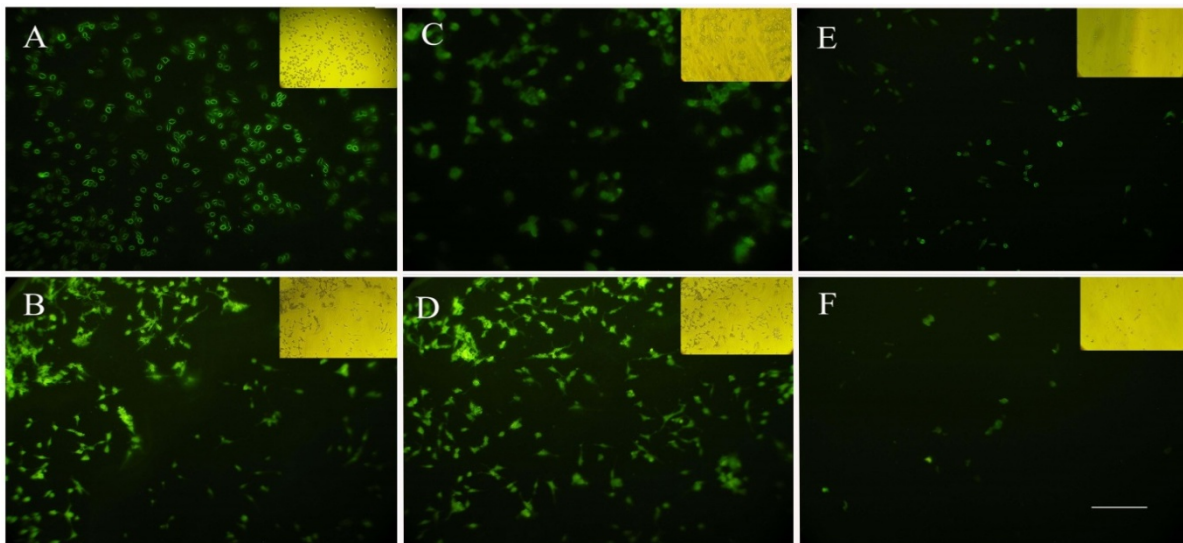
نتایج نشان داده شده در نمودار شماره ۲ سمیت گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. نانوذرات دارای اتصال متقاطع با اشعه فرابنفش و نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز، برای سلول‌ها سمیت داشتند. اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده در مواجهه با نانوذرات گروه‌های مختلف مشاهده شد. سلول‌های در معرض نانوذرات اتصال متقاطع شده با اشعه فرابنفش و در معرض گلوکز در مقایسه با سلول‌های در معرض نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز آلدئید و گلوکز به همراه اشعه فرابنفش به صورت معنی‌داری کاهش درصد سلول‌های زنده را نشان دادند ($P < 0/01$). سلول‌هایی که در معرض نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش قرار داشتند، بیشترین درصد سلول‌های زنده را دارا بودند. البته درصد سلول‌های زنده در گروه اتصال متقاطع شده با گلوکز آلدئید در مقایسه با گروه اتصال متقاطع شده با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0/01$).

به منظور بررسی توانایی نقش نانوذرات در دارورسانی، میزان برداشت سلولی این ذرات توسط سلول‌های سرطانی HeLa در طی ۴ ساعت مورد آزمون قرار گرفت. پس از انکوباسیون سلول‌ها با نانوذرات فلورسنت گروه‌های مختلف به



نمودار شماره ۲: قابلیت حیات سلول‌ها پس از مواجهه با نانوذرات اتصال متقاطع شده با روش‌های مختلف

بیشترین درصد زنده ماندن مربوط به سلول‌هایی بود که در معرض نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش قرار داشتند. نتایج، حاصل از چهار تکرار (n = 4) در 6 آزمایش مستقل می‌باشد (0/01 < P°)



تصویر شماره ۲: برداشت سلولی نانوذرات آلبومین اتصال متقاطع شده با روش‌های مختلف

گلو تار آلدئید پس از ۲ ساعت (A)، گلو تار آلدئید پس از ۴ ساعت (B)، گلوکز به همراه اشعه فرابنفش پس از ۲ ساعت (C) و گلوکز به همراه اشعه فرابنفش پس از ۴ ساعت (D)، نانوذرات آلبومین دارای اتصالات متقاطع با گلو تار آلدئید بعد از ۲ ساعت فقط در غشای سلول‌های سرطانی مشاهده شده (قسمت A) و بعد از ۴ ساعت در سیتوپلاسم نیز دیده می‌شود (قسمت B)؛ در حالی که در نمونه‌هایی که با گلوکز به همراه اشعه فرابنفش اتصال متقاطع انجام شده بود (قسمت C) برداشت نانوذرات در عرض ۲ ساعت اول نیز دیده می‌شود. اشعه فرابنفش به تنهایی (قسمت E) و گلوکز به تنهایی (قسمت F). همان‌طور که در قسمت‌های E و F دیده می‌شود، اشعه فرابنفش به تنهایی و گلوکز به تنهایی باعث کاهش تعداد سلول‌های زنده و در نتیجه کاهش برداشت سلولی نیز می‌گردد (100 میکرومتر = Scale bar)

بحث

گلو تار آلدئید روش‌های متداولی می‌باشد که توسط Langer و همکاران پس از تغییرات جزئی تثبیت شده است و تا امروز مورد استفاده می‌باشد (۱۵). در این روش گلو تار آلدئید در

آماده‌سازی نانوذرات آلبومین به روش محلول‌زدایی و ایجاد اتصالات متقاطع ذرات نانو به روش شیمیایی توسط

مرحله آخر به عنوان ماده ایجاد کننده اتصال متقاطع اضافه و نشان داده شد که سرعت و غلظت اضافه شدن اتانول و گلو تار آلدئید بسیار مهم می باشد؛ به طوری که تجمع دوباره (Reaggregation) ذرات قبل از ایجاد اتصال متقاطع بسیار سریع دیده می شود. گلو تار آلدئید مایعی بی رنگ با بویی تند و زننده می باشد که به صورت گسترده ای در صنعت و پزشکی کاربرد دارد. این ماده به عنوان ثابت کننده نمونه های بافتی و میکروسکوپ الکترونی و ماده ایجاد کننده اتصالات متقاطع در محصولات شیمیایی به کار می رود (۲۳).

شواهد زیادی مبنی بر تأثیرات سمی گلو تار آلدئید وجود دارد. بیشترین تأثیرات نامطلوب این ماده شیمیایی شامل حساسیت پوستی منجر به التهاب پوستی (Dermatitis)، سوزش چشم و بینی همراه با آب ریزش بینی می باشد (۲۴). پژوهشی سمیت گلو تار آلدئید بر سلول ها و ژن ها در رده های مختلف سلولی و هیپاتوسیت های موش را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصل از آزمایش، سمی بودن این ماده را از طریق ایجاد اتصال متقاطع بین پروتئین DNA (Deoxyribonucleic acid) و ایجاد موتاسیون نشان داد (۲۵). همچنین در تحقیق دیگری سمیت ماده دو ساخته مورد استفاده در جراحی به نام BioGlue - که از ترکیب آلبومین و گلو تار آلدئید ساخته شده است و در درمان دایسکشن آئورت به کار می رود - مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این مطالعه، اگرچه گلو تار آلدئید اتصال قوی بین بافت و مواد را تضمین می کند، ولی در عین حال آزاد شدن این ماده تأثیرات سمی به دنبال دارد. استفاده از مواد حاوی گلو تار آلدئید که در بافت هایی مانند ریه و کبد به کار می روند، تأثیرات نامطلوب جدی همچون التهاب با شدت زیاد، ادم و نکروز توکسیک را در پی دارد (۲۶).

بر اساس مستندات ذکر شده، تصمیم بر آن شد که به روش های جایگزین ایجاد اتصال متقاطع مانند روش های فیزیکی و سایر مواد شیمیایی فکر شود. چند روش مختلف فیزیکی برای اتصال متقاطع شامل خشک کردن، گرما دادن و اشعه فرابنفش وجود دارد. در بین روش های فیزیکی موجود، استفاده از اشعه فرابنفش روش سریع تر و مؤثرتری به نظر

می رسد (۲۷). علاوه بر این، چندین ماده شیمیایی به جز گلو تار آلدئید مانند گلوکز وجود دارد که می تواند باعث ایجاد اتصال متقاطع شود. در این مطالعه اولین گروه نانوذرات پس از مراحل آماده سازی به منظور اتصال متقاطع در معرض اشعه فرابنفش قرار گرفتند و از نظر اندازه ذرات، پتانسیل زتا، طیف FTIR، برداشت سلولی و میزان سمیت برای سلول مورد بررسی قرار گرفتند. در مقایسه با نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلو تار آلدئید، مواجهه با اشعه فرابنفش باعث تغییرات الکتریکی پروتئین شده، در نتیجه پتانسیل زتا ذرات به طور معنی داری با ذرات اتصال متقاطع شده با گلو تار آلدئید متفاوت بود. علاوه بر این، سمیت ذرات جدید برای سلول ها به طور معنی داری بیشتر بود که این یافته می تواند به دلیل آزاد شدن رادیکال های آزاد بر اثر برخورد اشعه فرابنفش به هسته آمینواسیدهای آروماتیک مانند تیروزین و فنیل آلانین باشد (۲۸). میزان برداشت سلولی ذرات نیز تحت تأثیر اتصال متقاطع با اشعه فرابنفش قرار گرفت و بعد از گذشت زمان انکوباسیون، تنها حدود ۱۰ درصد از سلول ها زنده بودند. البته سلول های زنده باقی مانده نیز برداشت کمی داشتند. با این حال اندازه و طیف FTIR ذرات دارای اتصال متقاطع با فرابنفش مشابه سایر گروه ها بود.

روش دیگر اتصال متقاطع در این مطالعه، استفاده از گلوکز بود. تمام پارامترهای نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلوکز شامل اندازه نانوذرات، پتانسیل زتا و طیف FTIR (به جز برداشت سلولی و سمیت برای سلول ها) مشابه با نانوذرات اتصال متقاطع شده با گلو تار آلدئید بودند. اختلاف مشاهده شده در سمیت برای سلول ها می تواند ناشی از تغییرات اسموتیک ایجاد شده در محیط کشت به دلیل اضافه کردن گلوکز باشد که این امر منجر به مرگ سلولی می شود. همان طور که پیش تر اشاره شد، کاهش برداشت سلولی نانوذرات نیز می تواند به علت مرگ سلول های اتصال متقاطع شده با گلوکز باشد.

گروه آخر هم زمان با گلوکز و اشعه فرابنفش (طول موج ۲۵۴ نانومتر) اتصال متقاطع گردید. نانوذرات دارای اتصال متقاطع به این روش دارای اندازه مورد نظر و مطلوب در

(۲۵۴ نانومتر) و غلظت گلوکز بر اساس این مقالات تعیین گردید. طول موج اشعه فرابنفش (محدوده دور و نزدیک) و غلظت گلوکز دو متغیری است که می‌تواند در اندازه نانوذرات آلبومین و پتانسیل زتا مؤثر باشد و در مطالعات آینده باید مد نظر قرار گیرند.

در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که روش استفاده هم‌زمان از گلوکز به همراه اشعه فرابنفش به عنوان اتصال متقاطع کننده می‌تواند به عنوان جایگزین ایمن‌تر و مناسب‌تری برای روش اتصال متقاطع قدیمی با استفاده از گلوکارآلدئید باشد. در این روش نانوذرات آلبومین تولید شده خواص فیزیکی لازم را حفظ نمودند و هم‌زمان سمیت کمتری برای سلول‌های زنده داشتند. با حذف سمیت از ذرات و در صورت استفاده از این نانوذرات در مواردی مانند سیستم دارورسانی، آسیب کمتری به سلول‌های زنده تحمیل خواهد شد. برای بررسی عملکرد نانوذرات اتصال متقاطع شده توسط گلوکز به همراه اشعه فرابنفش به صورت درون‌تن نیاز به مطالعات بیشتری در آینده می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت گرفته است. این مطالعه حاصل قسمتی از پایان‌نامه پزشکی عمومی خانم رضیه محمود زاده می‌باشد.

References

1. Tosi G, Costantino L, Ruozi B, Forni F, Vandelli MA. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5(2): 155-74.
2. Hattori Y, Shi L, Ding W, Koga K, Kawano K, Hakoshima M, et al. Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors. *J Control Release* 2009; 136(1): 30-7.
3. Thomas TP, Shukla R, Kotlyar A, Kukowska-Latallo J, Baker JR, Jr. Dendrimer-based tumor cell targeting of fibroblast growth factor-1. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20(2): 700-3.

محدوده (۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر) بودند. پتانسیل زتا ذرات حاصل شده مشابه گروه اتصال متقاطع شده با گلوکارآلدئید بود و مطالعه طیف FTIR تغییری در ساختار ذرات نشان نداد. نتایج حاصل با گزارش تحقیقی مبنی بر این که ماتریکس پروتئینی هنگام اتصال متقاطع شدن با گلوکز و اشعه فرابنفش تغییر ساختاری ندارد، همخوان بود (۲۹). پس از اضافه کردن گلوکز، قدرت و استحکام ماتریکس اضافه می‌شود که این مشاهده به این یافته که رادیکال‌های آزاد شده بر اثر تابش اشعه فرابنفش با گلوکز از طریق ایجاد مولکول‌های خطی واکنشی اتصال متقاطع ایجاد کرده است، نسبت داده می‌شود (۲۹، ۳۰).

مطالعه دیگری بر روی فیلم‌های کلاژنی مشخص نمود که استفاده هم‌زمان از گلوکز و اشعه فرابنفش به طور تجمعی باعث بهبود عملکرد مکانیکی و مقاومت آنزیمی کلاژن می‌شود (۳۰). احتمال دارد مکانیسم مشابهی در روند ایجاد اتصال متقاطع بین نانوذرات آلبومین هنگام استفاده هم‌زمان از گلوکز و اشعه فرابنفش اتفاق بیافتد. یافته جالب در این روش سمیت کمتر این نانوذرات برای سلول‌ها می‌باشد که نشان دهنده این است که نانوذرات آلبومین تولید شده به این روش از نانوذرات دارای اتصال متقاطع با گلوکارآلدئید مطلوب‌تر هستند. همان‌طور که ذکر شد، برای ایجاد اتصالات متقاطع در این مطالعه از روش استاندارد شناخته شده برای پروتئین‌هایی مانند کلاژن استفاده شد که پیش‌تر توسط Ohan و Dunn گزارش شده است (۳۰). بنابراین طول موج اشعه فرابنفش

4. Lee TK, Sokoloski TD, Royer GP. Serum albumin beads: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs. *Science* 1981; 213(4504): 233-5.
5. Heister E, Lamprecht C, Neves V, Tilmaciu C, Datas L, Flahaut E, et al. Higher Dispersion Efficacy of Functionalized Carbon Nanotubes in Chemical and Biological Environments. *ACS NANO* 2010; 4(5): 2615-26.
6. Dosio F, Arpicco S, Stella B, Brusa P, Cattel L. Folate-mediated targeting of albumin conjugates of paclitaxel obtained through a heterogeneous phase system. *Int J Pharm* 2009; 382(1-2): 117-23.

7. Gao J, Chen K, Xie R, Xie J, Lee S, Cheng Z, et al. Ultrasmall near-infrared non-cadmium quantum dots for in vivo tumor imaging. *Small* 2010; 6(2): 256-61.
8. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(2): 184-98.
9. Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 194(1): 91-102.
10. Geny B, Mettauer B, Muan B, Bischoff P, Epailly E, Piquard F, et al. Safety and efficacy of a new transpulmonary echo contrast agent in echocardiographic studies in patients. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(4): 1193-8.
11. Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault RL, Rivera E, et al. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5): 1038-44.
12. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 2012; 157(2): 168-82.
13. Langer K, Coester C, Weber C, von BH, Kreuter J. Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49(3): 303-7.
14. Wang G, Siggers K, Zhang S, Jiang H, Xu Z, Zernicke RF, et al. Preparation of BMP-2 containing bovine serum albumin (BSA) nanoparticles stabilized by polymer coating. *Pharm Res* 2008; 25(12): 2896-909.
15. Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, von BH, Schubert D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 257(1-2): 169-80.
16. Merodio M, Arnedo A, Renedo MJ, Irache JM. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12(3): 251-9.
17. Truong-Le VL, August JT, Leong KW. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum Gene Ther* 1998; 9(12): 1709-17.
18. Qi J, Huang C, He F, Yao P. Heat-treated emulsions with cross-linking bovine serum albumin interfacial films and different dextran surfaces: effect of paclitaxel delivery. *J Pharm Sci* 2013; 102(4): 1307-17.
19. Sionkowska A, Wess T. Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon (RTT) collagen. *Int J Biol Macromol* 2004; 34(1-2): 9-12.
20. Ohan MP, Weadock KS, Dunn MG. Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(3): 384-91.
21. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 2012; 506(1): 22-7.
22. Niknejad H, Peirovi H. The effects of cryopreservation on epithelial cells before and after isolation from human amniotic membrane. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(94): 15-26. (Persian).
23. Beauchamp RO, Jr., St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22(3-4): 143-74.
24. Wiggins P, McCurdy SA, Zeidenberg W. Epistaxis due to glutaraldehyde exposure. *J Occup Med* 1989; 31(10): 854-6.
25. St Clair MB, Bermudez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L. Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(2): 113-9.
26. Furst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Ann Thorac Surg* 2005; 79(5): 1522-8.
27. Suh H, Lee C. Biodegradable ceramic-collagen composite implanted in rabbit tibiae. *ASAIO J* 1995; 41(3): M652-M656.
28. Weadock KS, Miller EJ, Bellincampi LD, Zawadsky JP, Dunn MG. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(11): 1373-9.
29. Kim YH, Cho CS, Kang IK, Kim SY, Kwon OH. Enhancement of the strength and stability of ultraviolet-irradiated acellular dermal matrix by adding glucose. *Key Engineering Materials* 2007; 342: 337-40.
30. Ohan MP, Dunn MG. Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67(4): 1188-95.