

بررسی اثر نانوذره مس بر زنده‌مانی و مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۹/۰۷

زمینه و هدف: اپیتلیال‌زایی نقش مهمی در ترمیم زخم‌های پوستی ایفا می‌کند. تاخیر در اپیتلیال‌زایی مجدد منجر به ایجاد زخم مزمن می‌شود. روش‌های درمانی متعددی بر پایه پیوند وجود دارد که شامل محدودیت‌هایی مانند کمبود دهنده قابل دسترس، انتقال بیماری و رد پیوند می‌باشد. استفاده از نانوذرات مانند مس به دلیل هزینه پایین، نسبت سطح به حجم بالا، سطح کافی برای جذب و واکنش‌پذیری بالاتر نسبت به مواد بزرگتر مورد توجه قرار گرفته است. از آن‌جایی که اپیتلیال‌زایی شامل مهاجرت و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت به جایگاه زخم می‌باشد، این پژوهش با هدف بررسی اثر نانوذره مس بر زنده‌مانی و مهاجرت سلول کراتینوسیت انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در پژوهشگاه رویان (شهر تهران) در مهر و آبان ۱۳۹۶ انجام شد، نانوذره مس با غلظت‌های (۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol) و اندازه‌های (۴۰ و ۸۰ nm) را بر روی سلول‌های کراتینوسیت (که از ناحیه ختنه‌گاه نوزادان ۱۰ روز تا یک ماهه جمع‌آوری شد) اثر داده، سپس زنده‌مانی سلول‌ها در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTS و مهاجرت سلولی با تست Scratch بررسی شد.

یافته‌ها: نانوذره مس در اندازه‌های ۴۰ و ۸۰ nm با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol پس از ۲۴ ساعت غیرتوکسیک بوده و سبب افزایش مهاجرت سلولی شد. همچنین پس از ۷۲ ساعت در اندازه ۸۰ nm و غلظت ۱ μmol سبب افزایش تکثیر سلول‌های کراتینوسیت شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد، نانوذره مس در غلظت ۱ μmol و اندازه ۸۰ nm سبب افزایش مهاجرت و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت شده است.

کلمات کلیدی: سنجش مهاجرت سلولی، نانوذره، سمیت.

ساناز علیزاده^{۱،۲}، ناصر اقدمی^۲

باقر سیدعلیپور^۱، پروانه محمدی^{۳*}

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۲- گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده

زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد

دانشگاهی پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

۳- گروه زیست پزشکی ترمیمی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و

فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی،

پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۳۰۶۴۸۵

E-mail: Pmohammadi33@gmail.com

مقدمه

اجزای ماتریکس خارج سلولی می‌باشد.^۱ با این حال هرگونه تاخیر در اپیتلیال‌زایی مجدد سبب ایجاد زخم‌های مزمن و غیرقابل بهبود نسبت به مواردی می‌شود که مهاجرت اپیتلیال به میزان طبیعی انجام می‌شود.^۲ از دیگر چالش‌های اساسی عدم ترمیم زخم، وجود باکتری‌های غالب مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی* در سطح زخم می‌باشد. باکتری‌های مهاجم سطح زخم را اشغال کرده و با انتشار خود سبب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی شده و مانع ترمیم زخم و ایجاد زخم‌های عفونی می‌شوند.^۳

بهبود زخم‌های پوستی یک فرآیند چند مرحله‌ای شامل تشکیل لخته خون، التهاب، اپیتلیال‌زایی مجدد، رگ‌زایی و تشکیل بافت گرانوله می‌باشد.^۱ تحت شرایط مطلوب، بازسازی اپیدرم در عرض چند ساعت پس از آسیب آغاز شده و طی چند روز سطح اپیتلیال بار دیگر ساخته می‌شود. بازسازی پوست وابسته به انواع مختلف فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، متالوپروتئینازها، گیرنده‌های سلولی و

اندازه‌های کوچکتر تقسیم شدند. قطعات پوستی، به درون آنزیم دیسپاز ۱،۲u (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) به مدت ۱۷ تا ۱۸ ساعت در دمای 4°C انتقال داده شد. پس از تیمار آنزیمی، درم از اپی‌درم جدا گردید، و سپس اپیدرم با آنزیم Trypsin/EDTA (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA) در دمای 37°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون و ختنی‌سازی آنزیم، سلول‌های اپیدرمی جدا شده با محیط کشت سلول حاوی سرم گاوی، با دور 1800 rpm و دمای 4°C به مدت ۱۰ دقیقه ساترفیوژ شدند. رسوب سلولی به دست آمده، در محیط کشت کراتینوسیت KGM (Lonza, Switzerland, CC-4131) و در ظرف کشت دوازده خانه کشت داده شد.

جهت تایید کشت سلول‌های کراتینوسیت، سلول‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های anti-K14, Alexa 488 (Abcam, Cambridge, UK) با رقت $1/500$ رنگ‌آمیزی شدند.

سپس سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شدند. سلول‌ها با استفاده از دستگاه Flow cytometry (FACStar Plus@, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) بررسی شده و داده‌ها با نرم‌افزار Flowing آنالیز شدند.

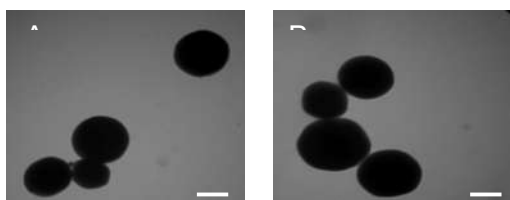
پس از اینکه سلول‌های کراتینوسیت به تراکم 100% رسیدند، سلول‌ها با استفاده از آنزیم تریپسین جدا شده و پس از ختنی‌سازی آنزیم با محیط کشت حاوی 10% سرم گاوی، سلول‌ها به تعداد 10000 سلول (100 میکرولیتر/چاهک) در هر چاهک ظرف کشت 96 خانه کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور (فشار دی‌اکسیدکربن 5% ، دمای 37°C و رطوبت 98%) قرار داده شدند. پس از یک بار تعویض محیط رویی، سلول‌ها با $50\ \mu\text{l}$ از نانوذره مس در اندازه‌های 40 و $80\ \text{nm}$ با غلظت‌های 1 ، 10 ، $100\ \mu\text{mol}$ (هر کدام از غلظت‌ها با چهار تکرار) به مدت 24 ساعت انکوبه شدند و پیش از پایان مدت انکوباسیون محیط رویی سلول‌ها حاوی نانوذرات بیرون ریخته شد. سپس $20\ \mu\text{l}$ از محلول (Abcam, MTS (Cambridge, MA, USA) رقیق شده در $100\ \mu\text{l}$ محیط کشت کراتینوسیت به چاهک‌ها اضافه شد (این عمل به دور از نور انجام شد) و پس از سه ساعت انکوبه شدن در تاریکی جذب فورمازان‌های تولید شده در $490\ \text{nm}$ با Microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) خوانده شد و میزان زندمانی

افزون‌براین نقص در بهبود زخم، سبب هزینه‌ی زیاد درمان، کیفیت پایین زندگی و اسکار در بیماران می‌گردد.^۵ در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه پزشکی بازساختی و مهندسی بافت جهت بهبود زخم انجام شده است. با این حال مسائل چالش برانگیز مانند هزینه‌ی بالا، اتصال نامناسب به جایگاه زخم و رگ‌زایی نامناسب وجود دارد.^۶ یکی از مهمترین مواد که هم اکنون در ترمیم زخم بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند، استفاده از نانومواد است. از میان نانومواد، نانوذرات به دلیل هزینه‌ی پایین، نسبت سطح به حجم بالا، سطح کافی برای جذب و واکنش‌پذیری بالاتر نسبت به مواد بزرگتر مورد توجه قرار گرفته‌اند.^۷ از میان نانوذرات، مس نقش متعددی در مراحل ترمیم زخم دارد. به‌عنوان مثال نانوذره مس در تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال و افزایش رگ‌زایی در شرایط برون‌تنی نقش دارد.^۸ همچنین خاصیت آنتی‌باکتریال مس نیز در مقالات متعددی گزارش شده است.^۹

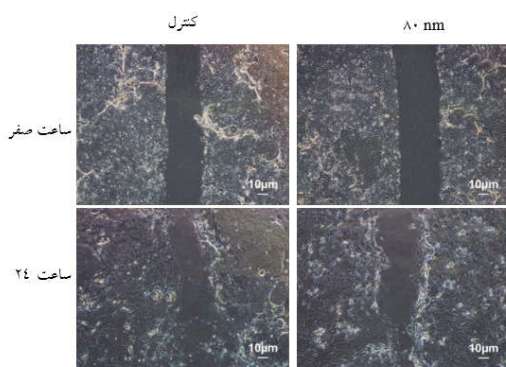
اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی اثر نانوذره مس بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت صورت نگرفته است. به‌طور معمول اپیتلیال‌زایی مجدد زخم‌ها شامل مجموعه‌ی منظمی از رویدادهایی است که در آن مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول کراتینوسیت به جایگاه زخم صورت می‌گیرد.^{۱۰} این پژوهش با هدف بررسی اثر نانوذره مس بر زندمانی و مهاجرت سلول کراتینوسیت انجام گرفت.

روش بررسی

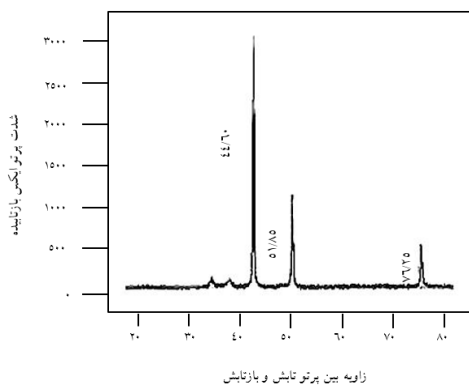
در این مطالعه‌ی تجربی که در پژوهشگاه رویان (شهر تهران) در مهر و آبان سال 1396 انجام شد. محلول نانوذره‌ی مس در اندازه‌های 40 و $80\ \text{nm}$ با خلوص $99/99\%$ و غلظت $2000\ \text{ppm}$ از شرکت Nanosany (Iranian Nanomaterials Pioneers Co. Ltd., Mashhad, Iran) استفاده شد. غلظت‌های مختلف از این نانوذرات (1 ، 10 ، $100\ \mu\text{mol}$) با استفاده از آب دی‌یونیزه تهیه شد. سلول‌های کراتینوسیت اولیه‌ی انسان (Foreskin keratinocyte cells) بر اساس استاندارد کمیته اخلاقی پژوهشگاه رویان (IR.ACER.ROYAN.REC.1395.20) از ناحیه‌ی پروپوست (Foreskin) نوزادان 10 روز تا یک‌ماهه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با بافر فسفات سالین (PBS) و الکل 70% شستشو داده و سپس به



شکل ۱: تصویر نانوذره‌ی مس در اندازه‌ی ۴۰ nm (A)، ۸۰ nm (B) با میکروسکوپ الکترونی عبوری (خط مقیاس: ۵۰nm).



شکل ۲: اثر نانوذره‌ی مس بر مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت کشت‌شده‌ی انسانی. تست مهاجرت در ساعت صفر و ۲۴ پس از ایجاد خراش در نانوذره‌های ۴۰ و ۸۰ nm.



نمودار ۱: نمودار پراش پرتوی ایکس از نانوذرات ۴۰ و ۸۰ nm طیف XRD نانوذرات به‌دست آمده در زوایای ۵۱/۸۵، ۷۶/۲ و ۷۶/۲ مربوط به پراش از صفحات بلوری نانوذرات مس می‌باشد.

بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:^{۱۱}

$$\text{فرمول رشد: } 100 \times [(T-T_0) / (C-T_0)]$$

T: جذب نوری نمونه، C: جذب نوری کنترل، T₀: جذب در

زمان صفر

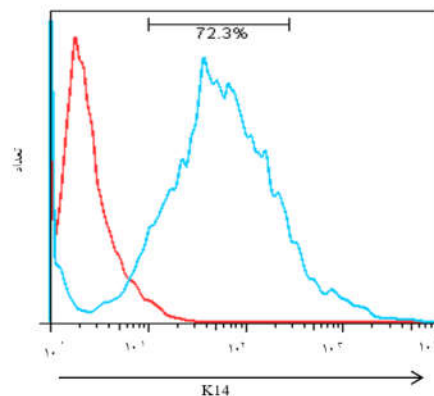
زنده‌مانی سلول‌ها از مقایسه نسبت درصد جذب سلول‌های تیمار شده به سلول‌های غیرتیماری به دست آمد.

سلول‌های کراتینوسیت به تعداد ۳۰۰ هزار سلول به ازای هر چاهک ظرف کشت شش خانه کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰٪ و با استفاده از نوک سمپلر ۱۰۰ μl، خط عمودی در راستای قطر پلیت شش خانه ایجاد شد و جهت برداشت سلول‌های جداشده، کف ظرف کشت به آرامی با محیط کشت بدون FBS شستشو داده شد. پس از ۲۴ ساعت در معرض قرار دادن سلول‌ها با محیط کشت بدون سرم، سلول‌ها با آب دیونیزه به‌عنوان گروه کنترل و نانوذره مس با اندازه ۴۰ nm و غلظت ۱۰ μmol و ۸۰ nm با غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ μmol تیمار شدند. سپس در ساعت‌های صفر و ۲۴، عکسبرداری انجام شد. میزان مهاجرت سلولی با محاسبه فاصله بین دایره خراش و مقایسه گروه کنترل و تیمار صورت گرفت. پس از گردآوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار آماری (GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از Tukey's test استفاده شد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار محاسبه گردید و اختلاف در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای بررسی ویژگی‌های شکل و اندازه نانوذره مس از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات مس مورد استفاده در این مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. نانوذرات به شکل کروی بوده و اثری از چند دانه‌ای بودن نانوذرات مشاهده نمی‌شود. متوسط اندازه ذرات با توجه به اندازه‌گیری قطر تعداد ۴۷ نانوذره در سه عکس متفاوت برابر ۴۰ و ۸۰ nm بوده است. جهت بررسی میزان

۴۰ و ۸۰ nm در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol ، با استفاده از تست MTS در سه بازه زمانی ۴۸-۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. آنالیز داده‌های حاصل از این آزمون نشان داد که نانوذره مس بر سلول کراتینوسیت با اندازه ۴۰ و ۸۰ nm و غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol اثر توکسیک نداشته است. همچنین غلظت ۱ μmol در اندازه ۸۰ nm افزایش معناداری بر تکثیر سلول‌های کراتینوسیت نسبت به گروه کنترل و سایر غلظت‌ها نشان داد ($P < 0.01$) (نمودار ۳). نتایج تست مهاجرت (Scratch assay) نیز نشان داد میزان مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت تیمار شده با نانوذره مس ۸۰ nm در غلظت ۱ μmol نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (شکل ۲).

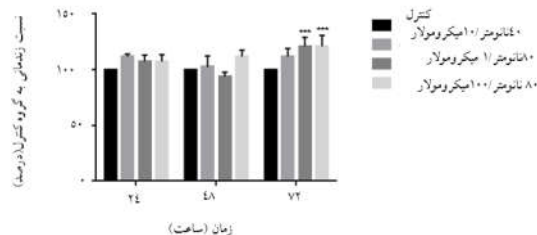


نمودار ۲: نتایج فلوسایتومتری بیان شاخص سیتوپلاسمی آنتی‌بادی K14 در سلول‌های کراتینوسیت کشت شده. تعداد تکرارها ۳ است.

بحث

پژوهش حاضر نشان داد نانوذره مس با اندازه ۴۰ و ۸۰ nm در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol اثر غیرتوکسیک بر سلول‌های کراتینوسیت داشته و سبب افزایش مهاجرت و تکثیر سلول‌ها در غلظت ۱ μmol از نانوذره ۸۰ nm شده است. از آنجایی که سلول‌های کراتینوسیت یکی از سلول‌های موثر در فرآیند ترمیم زخم جهت بازسازی بافت پوست می‌باشند، در این پژوهش از سلول‌های کراتینوسیت استفاده شده است. ترمیم زخم شامل مراحل التهاب، تکثیر و بازسازی می‌باشد که با یکدیگر همپوشانی دارند. نقص در هر کدام از این مراحل می‌تواند منجر به ایجاد زخم مزمن و آسیب‌های جدی شود.^{۱۲}

یکی از مهمترین چالش‌های عدم ترمیم زخم، تاخیر در اپیتلیال‌زایی مجدد می‌باشد. اپیتلیال‌زایی مجدد از مراحل مهم ترمیم زخم می‌باشد که شامل مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت و تکثیر آن‌ها است. اپیتلیال‌زایی سریع پس از ایجاد زخم، محیط بهینه‌ای از جمله داربستی از سلول‌ها و فاکتورهای رشد مختلف که در روند ترمیم زخم ضروری می‌باشند، جهت بهبود زخم فراهم می‌کند.^{۱۳} مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نانوذرات نقش مهمی در ترمیم زخم‌های پوستی نشان داده‌اند. از میان نانوذرات، مس به‌علت خاصیت آنتی‌باکتریال و اثر بر رگ‌زایی بسیار شناخته شده است.^۸ مطالعات گذشته نشان داده‌اند که نانوذرات با اندازه کوچکتر و غلظت بالاتر سبب اثر سمیت سلولی می‌شوند.^{۱۱ و ۱۴} همچنین در



نمودار ۳: اثر سمیت نانوذره‌ی مس (۴۰ و ۸۰ nm) و غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های کشت شده کراتینوسیت. تعداد تکرارها ۳ است. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند ($P < 0.01$).

بلوری بودن نانوذرات مس، از X-ray diffraction analysis (XRD) استفاده شده و طیف به‌دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده است. طول موج‌های نمایان شده در زوایای 2θ ، 51.1° ، 44.6° در الگوی XRD مربوط به پراش از صفحات بلوری نانوذرات مس می‌باشد که با استاندارد آن به شماره‌های به‌ترتیب ۱۱۱، ۲۰۰ و ۲۲۰ همخوانی دارد (نمودار ۱). نتایج فلوسیتومتری برای ویژگی‌یابی سلول‌های کراتینوسیت نشان داد که سلول‌های کراتینوسیت کشت‌شده شاخص سیتوپلاسمی K14 را به میزان ۷۰٪ بیان می‌کنند (نمودار ۲). بررسی زنده‌مانی سلول‌های کراتینوسیت در معرض نانوذره مس با اندازه‌های

۸۰ nm نشان داده شده است ($P < 0.01$). تکثیر و تمایز سلول‌ها ممکن است با کلسیم یا فسفر و گوگرد همراه باشد.^{۲۳،۲۲} کلسیم به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه برای فعال شدن یک گروه وسیع از کلسیم/کالمودولین وابسته به کیناز و القای تکثیر و تمایز کراتینوسیت می‌شود، اما همانطور که شناخته شده است افزایش کلسیم نه تنها با تکثیر سلولی بلکه همچنین با آپوپتوز نیز ارتباط دارد.^{۲۴} بنابراین افزایش غلظت نانوذره سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد غلظت ۱ و ۱۰۰ μmol از نانوذره‌ی ۸۰ nm نه تنها غیرتوکسیک بوده بلکه سبب افزایش تکثیر سلولی نیز شده است.

همچنین نتایج تست مهاجرت نشان داده است که نانوذره‌ی مس در غلظت ۱ μmol و اندازه‌ی ۸۰ nm به صورت معناداری ($P < 0.05$) سبب افزایش مهاجرت سلولی شده است. با توجه به اثر مثبت نانوذره‌ی مس بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت و همچنین یافتن غلظت غیرسمی از نانوذره‌ی مس موثر بر سلول‌های اندوتلیال بر اساس مطالعه پیشین، پیشنهاد می‌شود به بررسی جامعی از اثر نانوذره‌ی مس با غلظت تعیین شده در مدل حیوانی ترمیم زخم نیز پرداخته شود.

بر اساس این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت نانوذره‌ی مس با اندازه‌های ۴۰ و ۸۰ nm در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر غیرتوکسیک بر سلول‌های کراتینوسیت داشته، همچنین در غلظت ۱ μmol از نانوذره ۸۰ nm اثر مثبت بر افزایش مهاجرت و تکثیر سلول‌ها نشان داده است. اما به نظر می‌رسد مطالعات حیوانی جهت بررسی اپیتلیال‌زایی نیز ضروری می‌باشد. *سپاسگزاری:* این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان "اثر نانوذره‌ی مس بر عملکرد سلول‌های فیبروبلاست، کراتینوسیت و اندوتلیال در ترمیم زخم عمیق پوستی" مصوب پژوهشگاه رویان در سال ۱۳۹۴ با کد ۹۴۰۰۰۲۷۴ می‌باشد که با حمایت پژوهشگاه رویان انجام شده است.

References

1. Kahn SA, Beers RJ, Lentz CW. Use of acellular dermal replacement in reconstruction of nonhealing lower extremity wounds. *J Burn Care Res* 2011;32(1):124-8.
2. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):514-25.

مطالعه حاضر که به بررسی اثر نانوذره مس در اندازه ۴۰ و غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ μmol بر سلول‌های اندوتلیال انجام شده است، مشاهده شد که در غلظت‌های بالا (۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ μmol) در مدت زمان ۲۴ ساعت اثر سمی داشته است ($P < 0.05$)^{۱۶}.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داده است نانوذره‌ی مس با اندازه‌ی ۴۰ و ۸۰ nm در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μmol اثر غیرتوکسیک بر سلول‌های کراتینوسیت داشته که این خود نشان‌دهنده‌ی تعیین غلظت و اندازه‌ی مناسب از نانوذره بوده است. Rosas-Hernández و همکارانش اثر دوگانه‌ی نانوذره‌ی نقره با اندازه‌ی ۴۵ nm را بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر را بیان کردند که اثر مهارى نانوذره نقره در غلظت پایین بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال به دلیل برهمکنش مستقیم سلول‌های اندوتلیال با عروق کرونر می‌باشد و این خود سبب عبور نانوذرات از غشای سلول می‌شود.^{۱۷}

همچنین در مطالعه‌ای که توسط Trickler و همکاران منتشر شده است، نانوذره‌ی مس با اندازه‌های ۴۰ و ۶۰ nm در غلظت‌های پایین باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک در مغز موش شده در حالی که در غلظت‌های بالا سمی بوده است.^{۱۸}

در مطالعه‌ی Lu و همکاران اثر نانوذره‌ی طلا بر تکثیر سلول‌های کراتینوسیت مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج این مطالعه غلظت‌های پایین (۵ ppm) از نانوذره‌ی طلا سبب افزایش تکثیر سلول‌های کراتینوسیت و غلظت‌های بالای ۱۰ ppm اثر توکسیک بر سلول‌های کراتینوسیت داشته‌اند.^{۱۹} Liu و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود نشان داده اند نانوذره‌ی نقره بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت اثر افزایشی داشته است.^{۲۰} همچنین طی مطالعه دیگری که توسط Chigurupati و همکارانش انجام شد نانوذره‌ی سریم در غلظت ۱ و ۱۰ μmol اثر افزایشی بر مهاجرت و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت داشته است.^{۲۱} در مطالعه حاضر افزایش معنادار بر تکثیر سلول‌های کراتینوسیت در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ μmol در اندازه

3. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007;127(5):998-1008.
4. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):244-69.
5. Amini-Nik S, Yousuf Y, Jeschke MG. Scar management in burn injuries using drug delivery and molecular signaling: Current treatments and future directions. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;123:135-154.
6. Pereira RF, Barrias CC, Granja PL, Bartolo PJ. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine (Lond)* 2013;8(4):603-21.
7. Zhao S, Wang H, Zhang Y, Huang W, Rahaman MN, Liu Z, et al. Copper-doped borosilicate bioactive glass scaffolds with improved angiogenic and osteogenic capacity for repairing osseous defects. *Acta Biomater* 2015;14:185-96.
8. Kornblatt AP, Nicoletti VG, Travaglia A. The neglected role of copper ions in wound healing. *J Inorg Biochem* 2016;161:1-8.
9. Paphitou NI. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42 Suppl:S25-8.
10. Lee PY, Cobain E, Huard J, Huang L. Thermosensitive hydrogel PEG-PLGA-PEG enhances engraftment of muscle-derived stem cells and promotes healing in diabetic wound. *Mol Ther* 2007;15(6):1189-94.
11. Fede C, Selvestrel F, Compagnin C, Mognato M, Mancini F, Reddi E, et al. The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. *Anal Bioanal Chem* 2012;404(6-7):1789-802.
12. Maddaluno L, Urwyler C, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* 2017;144(22):4047-4060.
13. Feugate JE, Li Q, Wong L, Martins-Green M. The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and accelerates wound closure. *J Cell Biol* 2002;156(1):161-72.
14. Kumari M, Singh SP, Chinde S, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int J Toxicol* 2014;33(2):86-97.
15. Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:22.
16. Alizadeh S, Aghdami N, Alipour SB. Cytotoxicity assessment of copper nanoparticles (40nm) on the human umbilical vein endothelial cells viability. *Arak Med Univ J* 2017;20(1):96-106.
17. Rosas-Hernández H, Jiménez-Badillo S, Martínez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, et al. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 2009;191(2-3):305-13.
18. Trickler WJ, Lantz SM, Schrand AM, Robinson BL, Newport GD, Schlager JJ, et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine (Lond)* 2012;7(6):835-46.
19. Lu S, Xia D, Huang G, Jing H, Wang Y, Gu H. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;81(2):406-11.
20. Liu X, Lee PY, Ho CM, Lui VC, Chen Y, Che CM, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem* 2010;5(3):468-75.
21. Chigurupati S, Mughal MR, Okun E, Das S, Kumar A, McCaffery M, et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials* 2013;34(9):2194-201.
22. Shi Z, Huang X, Cai Y, Tang R, Yang D. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater* 2009;5(1):338-45.
23. Zierold K. Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2000;14(6):557-63.
24. Wang CL, Ng TB, Cao XH, Jiang Y, Liu ZK, Wen TY, et al. CLP induces apoptosis in human leukemia K562 cells through Ca²⁺ regulating extracellular-related protein kinase ERK activation. *Cancer Lett* 2009;276(2):221-7.

Investigation the effect of copper nanoparticles on the toxicity and migration of keratinocyte cells

Sanaz Alizadeh M.Sc.^{1,2}
Nasser Aghdami M.D., Ph.D.²
Bagher Seyedalipour Ph.D.¹
Parvaneh Mohammadi Ph.D.^{2,3*}

1- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

2- Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran.

3- Department of Regenerative Biomedicine, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Academic center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Banihashem St., Resalat Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22306485
E-mail: Pmohammadi33@gmail.com

Abstract

Received: 06 May 2018 Revised: 13 May 2018 Accepted: 21 Nov. 2018 Available online: 28 Nov. 2018

Background: Re-epithelialization has an important role in skin wound healing. Delays in re-epithelialization are more likely to create the chronic wound. Impaired wound healing leads to a large burden of morbidity and mortality. Current treatments based on the use of autografts, allografts and xenografts, suffer from limitations such as, quantity of donor skin available, donor-site infection, potential risk of disease transmission and rejection of the graft. Given this problems, nanomaterial such as copper nanoparticles has attracted considerable research interest because of their high surface area to volume ratio, high stability, clinical safety, and antibacterial effects. Epithelialization involves keratinocyte migration and proliferation to the wound site. Therefore, this study was conducted to investigate the effect of copper nanoparticles on keratinocyte cell migration and proliferation.

Methods: This experimental study was performed in Royan Institute, Tehran in 2016. In this study we investigated the effect of copper nanoparticles on viability, migration and proliferation of keratinocyte cells. Cultured human foreskin Keratinocyte cells were exposed to various concentration (1, 10 and 100 μmol) and sizes (40 and 80 nm) of copper nanoparticles for 24, 48 and 72 hours. The copper nanoparticles toxicity was examined by MTS assay. Cell migration has also been investigated with the Scratch assay.

Results: The results showed that the 1, 10 and 100 μmol concentrations of 40 and 80 nm copper nanoparticles were not toxic for cultured human foreskin keratinocyte cells after 24h. It was also found keratinocyte cell proliferation was increased by 1 μmol concentration of 80 nm copper nanoparticles after 72h. The results of the Scratch assay showed that the 1 μmol concentration of 80 nm copper nanoparticles significantly ($P<0.05$) increased keratinocyte cell migration compared to deionized water as of control group after 24h.

Conclusion: It seems the 1 μmol concentration of 80 nm copper nanoparticle could stimulate keratinocyte cell migration and proliferation. However, in vivo studies conducted on animal model wound healing subjects are needed for determining re-epithelialization.

Keywords: cell migration assays, nanoparticles, toxicity.