



Comparison between Three-Dimensional Spheroid and Two-Dimensional Monolayer in A549 Lung Cancer and PC9 Normal Cell Lines under Treatment of Silver Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hashemzadeh H.¹ PhD,
Allahverdi A.² PhD,
Ertl P.³ PhD,
Naderi-Manesh H.^{*1} PhD

How to cite this article

Hashemzadeh H, Allahverdi A, Ertl P, Naderi-Manesh H. Comparison between Three-Dimensional Spheroid and Two-Dimensional Monolayer in A549 Lung Cancer and PC9 Normal Cell Lines under Treatment of Silver Nanoparticles. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):573-580.

ABSTRACT

In view of the constant increase of nanotechnology and nanomaterials applications in our daily life, to determine whether they are safe, "in vitro" and "in vivo" screening methods are needed. Obviously, application of models that are similar to the physiological tissues process of the human body could be a better candidate. The three-dimensional spheroid method, spheroid were generated using commercial microplates, has many benefits (in comparison with traditional methods or monolayer cell culture) such as the growth of the cells in 3D, similar to the body's physiological tissue, an alternative for animal models, cell-to-cell interactions, and better cell signaling. In this study, the toxicity of silver nanoparticles by using three factors such as metabolic activity, live/dead assay, and spheroid surface area was evaluated using two different methods (2D vs 3D) under treatment with various concentrations of silver nanoparticles at different times. The results showed that different cells types, cancer and/or normal lung cells, have significant differences. In addition, it was observed that distinct differences in terms of cytotoxicity of silver nanoparticles between 2D and 3D culture systems and also the rate of growth/non-growth of spheroids are highly depended on cell type and various concentrations have fundamental importance in such studies. The present study provides evidence that cellular dimensions (3D vs 2D) play a pivotal role in the results and outcomes of inflammation and cytotoxicity with nanoparticles due to the spatial-temporal structure.

Keywords Spheroid; Metal Nanoparticles; Toxicity Test; Cancer; Cell Culture Techniques

CITATION LINKS

[1] Evaluation of CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dot toxicity on three-dimensional spheroid cultures [2] Cell spheroids: The new frontiers in in vitro models for cancer drug validation [3] The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue [4] Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids [5] Impact of the spheroid model complexity on drug response [6] Targeted DNA delivery to cancer cells using a biotinylated chitosan carrier [7] Telomere, chromosome end and telomerase enzyme as a cancer biomarker [8] Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines [9] Toxicological studies on silver nanoparticles: Challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging [10] A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives [11] Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent [12] Investigating the responses of human epithelial cells to predatory bacteria [13] Cytotoxic effect of silver nanoparticles synthesized from Padina tetrastomatica on breast cancer cell line [14] Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells [15] The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays [16] Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles [17] 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained [18] Comparisons of robustness and sensitivity between cancer and normal cells by microarray data [19] Transport and toxicity of silver nanoparticles in HepaRG cell spheroids

¹Nanobiotechnology Department, Biosciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Biophysics Department, Biosciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of Technology, Vienna, Austria

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884410

Fax: +98 (21) 82884410

naderman@modares.ac.ir

Article History

Received: January 23, 2019

Accepted: February 27, 2019

ePublished: December 21, 2019

مقایسه سامانه‌های کشت سه‌بعدی اسفروید و دوبعدی تک‌لایه سلول‌های سرطانی A549 و نرمال ریه PC9 تحت تیمار نانوذرات نقره

هادی هاشم‌زاده PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

عبداله الهوردی PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پتر ارئل PhD

موسسه شیمی مصنوعی کاربردی، دانشگاه صنعتی وین، وین، اتریش

حسین نادری‌منش* PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

با توجه به رشد روزافزون کاربرد نانوتکنولوژی، استفاده از نانومواد و همچنین ترکیبات شیمیایی منحصربه‌فرد در زندگی روزمره بشریت، به‌منظور بررسی ایمن‌بودن آنها نیاز به روش‌های غربالگری "درون‌تنی" و "بیرون‌تنی" جدید است. بدیهی است هر چه این روش‌ها دارای الهام بیشتر از بافت فیزیولوژیک بدن انسان باشند، می‌توان نتایج بهتری از سمیت یا ایمن‌بودن آنها به دست آورد. استفاده از روش سه‌بعدی اسفروید، اسفرویدها با استفاده از میکروپلیت تجاری ایجاد شدند، به‌دلیل مزایای زیادی از جمله رشد سلول‌های در سه بعد، مدل واقعی و شباهت زیاد به بافت فیزیولوژیک بدن، قابلیت استفاده به‌عنوان جایگزین مدل‌های حیوانی، اندرکنش سلول-سلول، پیام‌رسانی بهتر سلول‌ها به‌دلیل ارتباط نزدیک، در مقایسه با کشت تک‌لایه سلول‌ها، در این تحقیق به‌منظور بررسی سمیت نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت. سه فاکتور فعالیت متابولیکی، میزان زنده‌مانی/مرگ سلولی و سطح مقطع اسفرویدها با دو روش سه‌بعدی و دوبعدی تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در زمان‌های متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های مختلف سرطانی و نرمال ریه واکنش متفاوتی از خود نشان می‌دهند. همچنین سمیت سلولی نانوذرات نقره با استفاده از سیستم‌های دوبعدی و سه‌بعدی و مقایسه آنها با هم اختلاف معنی‌داری داشته و میزان رشد/عدم رشد اسفرویدهای وابسته به نوع سلول بوده و غلظت‌های مختلف نیز اهمیت اساسی در مطالعات دارند. مطالعه حاضر شواهدی ارائه می‌دهد که ابعاد سلولی در دوبعدی و سه‌بعدی به‌دلیل ساختار فضایی- زمانی متفاوت نقش حیاتی در نتایج و پیامدهای حاصل از التهابات و سمیت سلولی با نانوذرات بازی می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: اسفروید، نانوذرات فلزی، آزمون سمیت، سرطان و روش‌های کشت سلول

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۸

*نویسنده مسئول: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های گذشته، ارزیابی داروها، نانوذرات و مواد شیمیایی با استفاده از روش کشت سلول دوبعدی (تک‌لایه) بیشتر مورد استفاده قرار می‌گرفته است. روش‌های سنتی دوبعدی کشت سلول که سلول‌ها به‌صورت تک‌لایه روی سطوح شیشه یا پلاستیکی صاف رشد داده شده‌اند، به‌منظور آنالیزهای داروشناختی بسیار مفید هستند. با این حال نتایج به‌دست‌آمده از این روش‌ها بازتاب‌دهنده

فعالیت‌های فیزیولوژیک مهم بافت واقعی نبوده است^[1, 2]. از طرف دیگر نتایج این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی از جمله محدودیت تعمیم نتایج حاصله از سیستم کشت دوبعدی سلول به فاز کلینیکی و استفاده از آنها به‌عنوان یک مدل سه‌بعدی در مرحله پیش‌کلینیکال به‌منظور تست‌های دارویی است. در مقایسه روش‌های کشت سلولی دوبعدی که فاقد خصوصیات "درون‌تنی" (*in vivo*) هستند، سامانه‌های کشت سلول به‌صورت سه‌بعدی، از جمله اسفرویدهای سلولی، الهام بهتر خصوصیات و محیط میکروبی بافت‌های فیزیولوژیک هستند و همچنین مدل‌های بسیار مناسب‌تری برای بررسی کاندیدهای دارویی بوده و از لحاظ اندرکنش سلول-سلول و همچنین شرایط محیط میکروبی که باعث تعدیل بیان ژن و پروتئین پیام‌رسانی مولکولی می‌شود نتایج قابل اعتمادتری را می‌توان از این مدل‌ها استخراج کرد^[2-4]. استفاده از مدل‌های حیوانی از جمله ماهی زبرافیش، خرگوش، موش و غیره به‌منظور تست‌های سمیت نانوذرات و داروهایی که کاربرد انسانی دارند دارای محدودیت‌هایی است زیرا به‌عنوان مثال ماهی زبرافیش به‌طور دقیق نمی‌تواند به‌عنوان یک مدل خون‌گرم استفاده شود و بیولوژی موش نیز یک مدل معتبر و مناسب بافت و سلول‌های انسانی را ارائه نمی‌دهد. از طرف دیگر زمانی که تعداد زیادی از مدل‌های حیوانی مورد نیاز باشد بسیار هزینه‌بر است^[5]. فناوری نانو، علم فهم و به‌کارگیری مواد در مقیاس زیر ۱۰۰ نانومتر، امروزه کاربرد فراوانی در زندگی روزمره ما از جمله داروسازی، صنعت، پزشکی، کشاورزی و غیره دارد^[6]. نانوذرات نقره به‌عنوان یکی از محصولات مهم این تکنولوژی قادر به بهبود زندگی بشریت شده است. به‌عنوان مثال سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود^[7]. این در حالی است که روش‌هایی که برای درمان این نوع بیماری استفاده می‌شوند به‌طور قطع نتوانسته‌اند این بیماری را درمان کنند. بنابراین نیاز به روش‌های جدید با توجه به پیشرفت روزافزون علم احساس می‌شود. روش‌های رایج درمان سرطان از جمله جراحی، شیمی‌درمانی و غیره اغلب روش‌های تهاجمی بوده که نه‌تنها سبب از بین رفتن سلول‌های بیمار بلکه موجب از بین رفتن سلول‌های سالم نیز می‌شوند و همچنین دارای محدودیت‌هایی نیز هستند. استفاده از روش‌های غیرتهاجمی به‌طوری که فقط سلول‌های هدف (سرطانی) تحت تیمار قرار گیرند و تحویل اختصاصی دارو به بافت یا سلول سرطانی در جهت کم‌نمودن عوارض جانبی هدفی مهم است که با استفاده از علم نانوتکنولوژی می‌توان به این مهم نایل شد. نانوذرات نقره علاوه بر ویژگی ضدباکتریایی، در صورت عامل‌دارکردن آنها، قابلیت حمل داروهای پروتئینی، شیمیایی و اسیدنوکلئیکی را نیز با خود دارند^[8]. از طرف دیگر نانوذرات نقره به‌طور چشمگیری در صنایع مختلف از جمله محصولات مصرفی به‌عنوان عناصر ضدباکتریایی در کاشی‌ها، زخم‌پوش‌ها، ابزارآلات پزشکی و همچنین در یخچال‌ها و ماشین‌های لباس‌شویی کاربرد فراوانی دارند^[9]. افزایش کاربرد استفاده از نانوذرات نقره در محصولاتی که ویژگی آنها از طریق این نانوذرات بهبود یافته‌اند ممکن است نتیجه افزایش خطر سمیت و

محل/ماده شیمیایی	فعالیت	شرکت
سطح اتصال فوق‌العاده کم	میکروپلیت برای تشکیل اسفرود	Corning® spheroid microplates 96 well
رنگ سبز ردیابی سلول	رنگ‌آمیزی سلول زنده	Molecular Probes, Thermo Scientific
کلستین-AM	رنگ‌آمیزی سلول زنده	Calbiochem (Merck Biosciences)
اتیدیدوم همودایمر (EthD-1)	رنگ‌آمیزی سلول مرده	Invitrogen, Thermo Scientific
معرف زنده‌ماندن سلولی	فعالیت متابولیک و تکثیر	Invitrogen, Thermo Scientific
پروستو بلو	سلول‌ها	

فعالیت متابولیکی: به‌منظور بررسی فعالیت متابولیکی با استفاده از محلول پروستو بلو، عنصری است که به سرعت توسط فعالیت متابولیکی سلول‌های فعال احیا می‌شود، طبق پروتکل شرکت سازنده نسبت ۱۰:۱ با محیط کشت در محیط تاریکی رقیق شد. سپس به آرامی محیط کشت قبلی (اسفرودها بسیار حساس بوده و به دلیل عدم اتصال به سطح ممکن است در حین تعویض محیط به همراه محیط کشتی که قرار است خارج شود از درون چاهک‌ها خارج شوند) خارج و محیط حاوی پروستو بلو اضافه شد. به مدت ۲ ساعت در دمای انکوباتور نگهداری شد (بدون نور). سپس جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط پلتریدر خوانده شد. درنهایت طبق فرمول زیر اقدام به محاسبه فعالیت متابولیکی و تخمین رشد سلول و زنده‌مانی سلول‌ها شد [11]:

$$(OD_{test} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank}) \times 100\%$$

که در اینجا OD_{test} مربوط به جذب نوری نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات، OD_{blank} مربوط به جذب نوری نمونه‌ها یا چاهک‌های بدون سلول و $OD_{control}$ مربوط به جذب نوری نمونه‌های بدون نانوذرات ولی حاوی سلول است. درنهایت داده‌های کیفی به‌دست‌آمده از این آزمون (داده‌های عددی میکروپلیت‌ریدر) در نرم‌افزارهای تخصصی به‌منظور بررسی میزان فعالیت متابولیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی برای مقایسه میانگین داده‌ها در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ استفاده شد ($p < 0.01$ و $p < 0.05$).

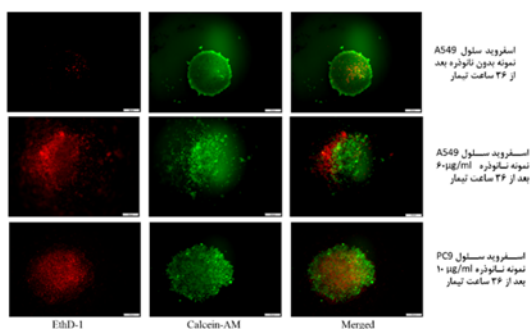
آزمون زنده‌مانی یا مرگ سلول‌ها: در آزمون زنده/مرگ‌مانی سلول از کلستین-AM و سل-تراکر برای مشخص‌نمودن سلول‌های زنده استفاده شد. برای مشخص‌نمودن سلول‌های مرده اتیدیدوم همودایمر-۱ به کار رفت. برای این منظور نسبت ۴ میلی‌مولار از کلستین-AM یا سل-تراکر (نمونه اصلی یک میکروگرم در میلی‌لیتر) به همراه یک میلی‌مولار اتیدیدوم همودایمر-۱ به یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. بعد از چند ساعت که رنگ‌ها به درون سلول وارد شدند، محیط کشت به آرامی خارج و به‌منظور خارج کردن رنگ‌ها از محیط اطراف سلول (بدون پس‌زمینه رنگی) و عکس‌برداری بهتر نمونه‌های سلولی چندین مرتبه با بافر فسفات شست‌شو داده شد و درنهایت اقدام به عکس‌برداری با میکروسکوپ

آزادسازی در محیط اطراف، آلوده‌سازی محیط، عوارض جانبی و همچنین سمیت موجودات زنده را در بر داشته باشد [9, 10]. قوانین تنظیمی و کنترل‌کننده به دلیل عدم یا کمبود اطلاعات و داده‌های بررسی سمیت این نوع نانوذرات و اثرات تخریب‌کننده آنها در زمان آزادسازی در محیط و تاثیر روی موجودات زنده وجود ندارد و نیاز است مطالعات بیشتری روی نوع، حد سمیت و بافت‌های هدف صورت گیرد. مطالعات زیادی با استفاده از لاین‌های سلولی مختلف به‌منظور نشان‌دادن سمیت نانوذرات نقره و مکانیزم‌های مولکولی تحت تاثیر این نوع سمیت انجام شده است [10]. بدیهی است که استفاده از روش‌های ارزیابی سمیت نانوذرات مثل روش کشت سه‌بعدی سلول (اسفرود) که شبیه‌ترین نتایج و قابل اعتمادترین نتایج به بافت‌های طبیعی را بدهند، ارزش بیشتری دارند. با توجه به مطالب ذکر شده، هدف مطالعه حاضر مقایسه روش‌های سه‌بعدی (اسفرود) و دوبعدی (تک‌لایه) کشت سلول‌های سرطانی و نرمال ریه تحت تیمار نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف در طول دوره زمانی متفاوت است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول، تشکیل اسفرود و تیمار با نانوذرات: به‌منظور مقایسه روش‌های کشت سلول سه‌بعدی (اسفرود) و دوبعدی (تک‌لایه) تحت تیمار با نانوذرات نقره (مرک؛ آلمان)، از نانوذراتی با اندازه زیر ۴ نانومتر و از دو لاین سلول نرمال ریه (PC9) و سلول سرطانی ریه رده A549 استفاده شد. در ابتدا در فلاسک ۲۵ میلی‌متر سلول‌ها کشت و در انکوباتور در دمای ۳۷°C با ۵٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت نسبی ۹۵٪ رشد داده شدند تا به تراکم مورد نظر برسند. محیط کشت مورد استفاده برای هر دو نوع سلول RPMI+10% FCS+1% PS: سرم جنین گوساله، PS: پنی‌سیلین-استرپتومایسین) بود. سپس سلول‌ها تحت تیمار با آنزیم تریپسین کنده، سانتیفریژ و شمارش شدند و درنهایت به تعداد $10^3 \times 3-4$ در میکروپلیت مخصوص (جدول ۱) به‌منظور تشکیل اسفرود و در میکروپلیت ۹۶ چاهکی به‌منظور بررسی کشت سلول در حالت دوبعدی کشت داده شدند. به‌منظور تشکیل اسفرود در سلول‌های مختلف به حداقل زمان نیاز است. در این تحقیق بعد از ۶ ساعت اسفرودها تشکیل و تیمار نانوذرات نقره در غلظت‌های (۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اعمال شد. برای تیمار در حالت دوبعدی نیز بعد از حدود چند ساعت که سلول‌ها مورفولوژی خود را به دست آوردند، تیمار اعمال شد. در مطالعه حاضر سه فاکتور ذیل مورد بررسی قرار گرفت: ۱) فعالیت متابولیکی سلول با استفاده از محلول پروستو بلو، ۲) میزان زنده‌بودن/مرگ سلول‌ها با آزمون Live/dead assay با استفاده از محلول‌های Calcein-AM، اتیدیدوم همودایمر-۱ (EthD-1) و سل-تراکر استفاده شد (جدول ۱). سطح مقطع یا اسفرودها (تنها برای روش کشت سه‌بعدی) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

خروج از سد غشایی را ندارد و در سیتوپلاسم باقی می‌ماند. اتیدیوم‌هومودایمر-۱ تنها قادر به ورود به سلول‌هایی است که غشای آنها آسیب‌دیده یا سلول مرده باشد و در صورت ورود به سلول قابلیت رنگ‌آمیزی هسته سلول از طریق ادغام با DNA سلولی را دارد. تاکنون مطالعات بسیاری به‌منظور مطالعه سمیت و اثبات خواص کشندگی سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوذرات نقره انجام شده است [8, 12]. در این مطالعه، مقایسه اثر نانوذرات نقره به‌صورت سیستم کشت سه‌بعدی (شکل ۱) و دوبعدی صورت گرفته است.



شکل ۱ نتایج مربوط به تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسنس با استفاده از رنگ‌های EthD-1 و Calcein-AM سلول‌های مختلف نرمال و سرطانی تحت تیمار نانوذرات نقره

نتایج نشان داده است که از سیستم کشت سه‌بعدی نسبت به دوبعدی می‌توان نتایج بیشتری که قابل اعتمادتر باشند به دست آورد. همان‌گونه که در تجزیه و تحلیل نتایج مربوط به آزمون مرگ/زنده‌مانی مشاهده می‌شود (شکل ۱ و نمودار ۱) می‌توان دریافت که در غلظت‌های بالا (۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در یک زمان مساوی و در غلظت برابر میزان، مرگ‌ومیر سلول‌ها در سیستم سه‌بعدی در مقایسه با سیستم دوبعدی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. البته این اختلاف معنی‌دار بسیار به زمان تحت تیمار بودن سلول‌ها و غلظت وابسته است زیرا در ساعات اولیه اختلاف چندانی رخ نمی‌دهد ولی هر چه زمان بیشتری سلول‌ها تحت تیمار نانوذرات باشند در غلظت‌های بالا اختلافات پررنگ‌تر می‌شوند. در سامانه‌های سه‌بعدی در ابتدا سلول‌های سطح اسفروید میزان بیشتری از نانوذرات را جذب می‌کنند و به‌دلیل وجود مقاومت‌هایی از سوی سلول و ماتریکس خارج سلولی تشکیل‌شده، به زمان نیاز است تا نانوذرات به عمق کره اسفروید نفوذ و سمیت را ایجاد کنند. اما در سیستم‌های دوبعدی به میزان یکسان جذب نانوذرات صورت می‌گیرد. یا به‌عبارتی، چون در سامانه دوبعدی از یک بعد نفوذ نانوذره انجام می‌شود در مقایسه با سامانه سه‌بعدی (در غلظت بالا و ساعت ۳۶) میزان سمیت در سامانه سه‌بعدی بیشتر بوده و اکثر سلول‌ها از بین می‌روند اما ممکن است سلول‌های سامانه دوبعدی هنوز به‌طور کامل از بین نروند (عکس‌های سامانه سه‌بعدی نمایش داده شده و مربوط به سامانه دوبعدی نمایش داده نشده است) زیرا ممکن است فقط غشا آسیب‌دیده باشد. همچنین این میزان تفاوت در نتایج حاصل از سامانه‌های دوبعدی و سه‌بعدی نشان‌دهنده این

Olympus IX71 (Olympus Corporation; ژاپن) شد. بعد از عکس‌برداری در طول موج‌های برانگیختگی ۴۸۵ نانومتر و جذب ۵۳۵ نانومتر برای کلسئین-AM و همچنین طول موج‌های برانگیختگی ۵۳۵ نانومتر و جذب ۶۳۵ نانومتر برای اتیدیوم‌هومودایمر-۱ عکس‌ها به‌منظور بررسی شدت فلورسنس در نرم‌افزار [Image] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. درنهایت از هر تیمار به‌طور مستقل تعداد قابل توجهی عکس‌برداری و عکس‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بدین‌صورت که میزان پوشش سطح و نسبت یا شدت رنگ‌های قرمز و سبز سلول‌ها و اسفرویدهای سه‌بعدی با استفاده از نرم‌افزار [Image] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [12].

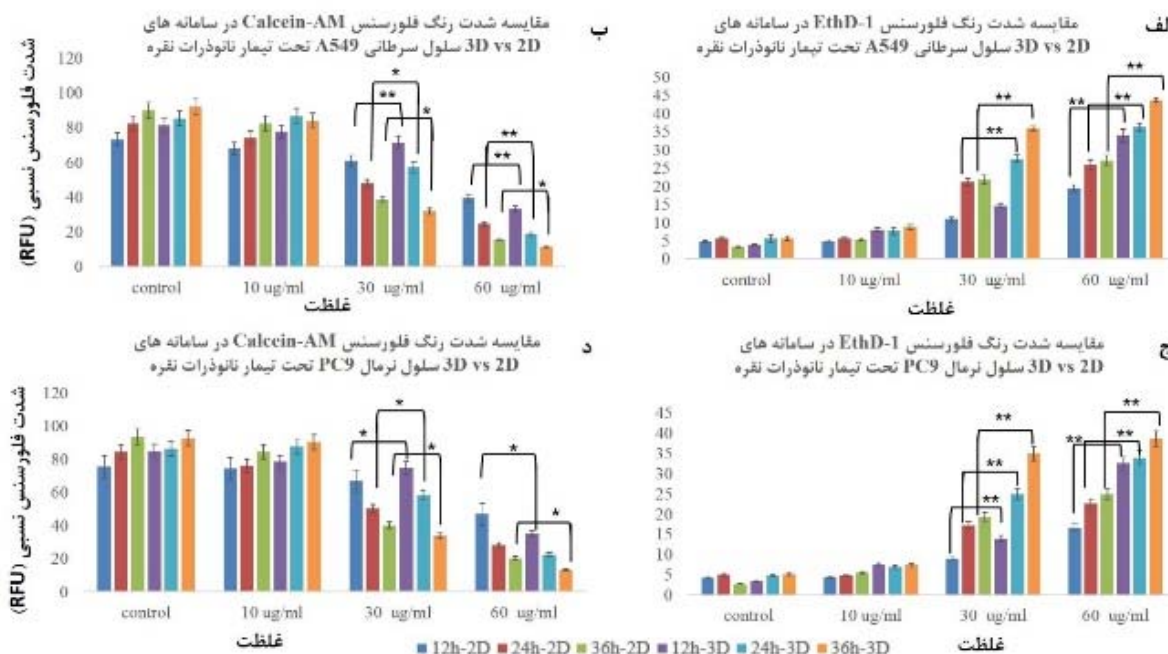
اندازه‌گیری میزان رشد/عدم رشد اسفرویدها: به‌منظور اندازه‌گیری قطر اسفرویدها از طریق میکروسکوپ نوری/فلورسنس فاز معکوس Olympus IX71 (Olympus Corporation; ژاپن) اسفرویدها در روزهای متوالی تحت تیمار نانوذرات، اقدام به عکس‌برداری شد تا میزان رشد، بزرگ‌تر شدن یا کوچک‌تر شدن یا ازدست‌دادن مورفولوژی اسفروید، قطر اسفروید مورد بررسی قرار گیرد. اندازه اسفرویدها (محاسبه قطر) توسط نرم‌افزار [NIH, Image] (Bethesda, USA) انجام شد.

نتایج و بحث

سالیان متعددی است که خواص ضدباکتریایی و ضدسرطان نانوذرات نقره مشخص شده است. از آنجایی که سرطان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان شناخته شده است [6-8] و خواص نانوذرات نقره در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است [8, 10, 12] و با توجه به کاربرد فراوان این قبیل نانوذرات در پزشکی، صنعت، لوازم خانگی، صنایع آرایشی بهداشتی و غیره، نیاز مبرم به مطالعه و ارزیابی سمیت/ایمنی این مواد احساس می‌شود. از دهه‌های قبل تاکنون بیشتر با استفاده از سیستم‌های سنتی که سلول را روی سطوح صاف شیشه‌ای یا پلی‌استایرن کشت داده، اقدام به ارزیابی‌های اولیه نانوذرات می‌شده است. این قبیل سیستم‌ها محدودیت‌هایی داشتند. به‌تازگی توجه دانشمندان به سمت روش‌هایی معطوف شده‌اند که از این روش‌ها نتایج بیشتر، بهتر و قابل اعتمادتری را می‌توان استخراج کرد. روش‌های سه‌بعدی مثل کشت اسفروید از این قبیل روش‌ها است [2, 3]. در مطالعه حاضر سیستم کشت سلول سه‌بعدی و سیستم کشت سلول دوبعدی با استفاده از دو لاین سلول نرمال PC9 و سلول رده سرطانی A549 بافت ریه مقایسه شد. سه عامل میزان فعالیت متابولیکی/قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از محلول پروستو بلو، نسبت سلول‌های زنده/مرده با استفاده از شدت نور فلورسنس سبز/قرمز که مربوط به رنگ‌های کلسئین-AM و اتیدیوم‌هومودایمر-۱ هست و همچنین قطر اسفرویدها که تنها برای روش سه‌بعدی به کار رفت، استفاده شد. استرازه‌های درون سلولی سبب شکسته‌شدن کلسئین-AM به کلسئین فلورسنس می‌شود که این نوع رنگ قابلیت برگشت یا

میزان کمتری نانوذره نفوذ داشته و این یعنی سلول‌ها کمتر در معرض آسیب قرار می‌گیرند و در نهایت نتایج مربوط به سامانه‌های دوبعدی می‌تواند خالی از اشکال نباشد.

نکته می‌تواند باشد که از آنجایی که در سامانه‌های دوبعدی نانوذرات تنها از یک بعد به سلول نفوذ می‌کنند ولی در سامانه‌های سه‌بعدی به دلیل نفوذ نانوذرات از هر سه بعد، میزان بیشتری از نانوذرات وارد سلول شده و سبب سمیت شده است ولی در سامانه‌های دوبعدی



نمودار ۱) نمودارهای مربوط به میزان زنده‌مانی/مرگ‌ومیر سلول‌های مختلف در سیستم‌های 3D vs 2D تحت تیمار نانوذرات نقره: $p < \alpha (0/05)$, $p < \alpha (0/01)$ و $p < \alpha (0/001)$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

این مطالعه همچنین نشان داد که با افزایش زمان تعداد نانوذرات نقره در سیستم‌های سلول و هسته سلول رو به افزایش بوده است. از آنجایی که غلظت نانوذرات نقره در سمیت نقش بسزایی دارد، در مورد عدم سمیت در ساعات اولیه بعد از تیمار با نانوذره در این مطالعه می‌تواند ارتباط با عدم به حد نصاب رسیدن غلظت یا تعداد نانوذرات در سلول جهت مسموم‌کردن سلول باشد.

اثر سمیت نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طی ساعات ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت بعد از تیمار از لحاظ فاکتورهای مورد اشاره در بالا با نمونه کنترل (بدون نانوذره) برای سیستم‌های سه‌بعدی و دوبعدی مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که این مطالعه به منظور مقایسه روش سه‌بعدی اسفروید و روش دوبعدی در سیستم کشت سنتی در پلیت‌های پلی‌استایرن معمول صورت گرفت، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری از لحاظ هر سه فاکتور مورد بررسی بین سامانه‌های سه‌بعدی و دوبعدی وجود دارد. از طرف دیگر، نتایج نشان داده است که نانوذرات نقره از لحاظ غلظت‌های متفاوت و ساعات زمانی مختلف نیز اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند.

نتایج مربوط به فعالیت متابولیکی/قابلیت زنده‌مانی سلول (جدول‌های ۲ و ۳) با استفاده از محلول پروسو بلو نیز حاکی از معنی‌داربودن اختلاف بین سامانه‌های کشت سه‌بعدی و دوبعدی است و از لحاظ سمیت نانوذرات نقره در طول زمان‌های مختلف و

در این مطالعه همچنین سلول‌های سرطانی و نرمال در غلظت‌های مختلف نانوذرات رفتار متفاوتی از لحاظ سمیت از خود نشان داده‌اند. تفاوت میزان مرگ/زنده‌مانی به تفاوت در ریخت‌شناسی غشاهای سلول نرمال PC9 و سلول سرطانی A549 و مشخصاً تفاوت در اندازه منافذ سلول‌ها بر می‌گردد [8]. از طرف دیگر، از دلایل القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، که یکی از اهداف و رویکردهای جالب نانوتکنولوژی است، فعال‌سازی رویدادهای پروآپتوتیک میتوکندری که با آزادسازی سیتوکروم c از آن آغاز می‌شود و به علاوه افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی است. نقش نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در مطالعات انجام‌شده به اثبات رسیده است و با توجه به فعالیت بالای میتوکندری در تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی می‌توان این گونه نتیجه گرفت که بستر مناسب برای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول سرطانی توسط نانوذرات نقره مهیا است [8, 13]. نتایج مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثرات درمانی و سمیت نانوذرات نقره روی سلول‌های تومور انجام‌شده پیشنهاد داده که نانوذرات نقره سبب جلوگیری از رشد، تقسیم سلول‌های تومور و هسته آنها می‌شوند [14]. نویسندگان دریافتند که نانوذرات نقره مانع از تفکیک کروموزوم‌ها می‌شوند اما تکثیر آنها را متوقف نمی‌کنند. بنابراین با جلوگیری از عدم تقسیم سلول و عدم تقسیم هسته سبب تشکیل یک هسته غول پیکر تقسیم‌نشده در یک تک سلول می‌شوند. نتایج

در غلظت‌های متفاوت در مقایسه با نمونه بدون نانوذره (کنترل) نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در ساعات اولیه، از لحاظ معنی‌داری و اختلاف، سامانه‌های دوبعدی نسبت به سامانه‌های سه‌بعدی میزان بالاتر فعالیت متابولیکی را نشان می‌دهند. این به این دلیل است که در سامانه‌های دوبعدی سمیت کمتری رخ داده است در حالی که با پیشرفت زمان، سامانه‌های سه‌بعدی میزان سمیت بیشتری را تحت تیمار نانوذرات نقره متحمل شده‌اند و بنابراین میزان کمتر فعالیت متابولیکی یا قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها را از خود نشان داده‌اند. در نتیجه هر چه سامانه‌های سه‌بعدی شبیه‌تر به بافت فیزیولوژیک برای بررسی سمیت نانوذرات نقره باشد، یک برتری و مزیت نسبت به سامانه‌های دوبعدی محسوب می‌شوند زیرا سامانه‌های دوبعدی تنها از یک بعد می‌توانند در جذب نانوذرات محیط اطراف خود پراکنده هستند نقش داشته باشند در حالی که سامانه‌های سه‌بعدی به دلیل موقعیت فضایی- زمانی بهتری که دارد

هر سه بعد آن در جذب نانوذرات نقش دارند. بنابراین آزمون‌های مبتنی بر غربالگری سلولی با استفاده از اسفروید بسیار قدرتمندتر از سامانه‌های سنتی کشت سلول به‌صورت دوبعدی به‌منظور تعیین واکنش‌های دارویی بوده و بسیار شبیه‌تر به بافت فیزیولوژیک هستند^[15]. نتایج مطالعات دیگران نشان داد که میزان فعالیت متابولیکی در سامانه‌های سه‌بعدی کمتر از سامانه‌های دوبعدی است^[14]. در مطالعه دیگری که روی نانوذرات اکسیدروی صورت گرفت، نتایج حاکی از اختلاف معنی‌دار در کشت سه‌بعدی و دوبعدی از نظر میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بوده است و میزان ROS تولیدشده در سلول‌های کشت‌شده به روش دوبعدی بیشتر از روش سه‌بعدی بوده است و نویسندگان اذعان داشتند که واکنش‌های سلولی به نانوذرات تا حد زیادی به مدل کشت سلولی وابسته است^[16].

جدول ۲) مقایسه فعالیت متابولیکی سیستم‌های 3D و 2D سلول سرطانی A549 تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره طی زمان‌های متفاوت

سیستم کشت دوبعدی (2D monolayer)				
زمان/غلظت	۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۲	$76 \pm 1/04$	$60 \pm 1/40/12$	$50 \pm 1/01$	$79 \pm 1/19$
۲۴	$79 \pm 1/09$	$53 \pm 1/09$	$30 \pm 1/17$	$81 \pm 2/09$
۳۶	$84 \pm 2/19$	$45 \pm 1/03$	$17 \pm 0/09$	$85 \pm 1/17$
سیستم کشت سه‌بعدی (3D Multicellular Spheroid)				
زمان/غلظت	۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۲	$66 \pm 1/04$	$53 \pm 1/34$	$43 \pm 1/2/3$	$69 \pm 0/51/37$
۲۴	$71 \pm 1/074$	$34 \pm 1/09$	$19 \pm 1/76$	$73 \pm 2/1/22$
۳۶	$77 \pm 1/87$	$20 \pm 1/2/11$	$12 \pm 0/87$	$79 \pm 1/1/26$

($p < 0/05$), ($p < 0/01$) و ($p < 0/001$) معنی‌دار در نظر گرفته شدند. داده‌ها برحسب میانگین جذب فلورسینس نسبی (RFU) در نظر گرفته شده است (میزان زنده‌مانی سلول رابطه مستقیم با فعالیت متابولیکی و نهایتاً میزان RFU دارد). نتایج کمی میزان احیای نمک Resazurin ارائه شده به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار است. زمان برحسب ساعت و غلظت برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

جدول ۳) مقایسه فعالیت متابولیکی سیستم‌های 3D و 2D سلول سرطانی PC9 تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره طی زمان‌های متفاوت

سیستم کشت دوبعدی (2D monolayer)				
زمان/غلظت	۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۲	$78 \pm 1/1/2$	$77 \pm 0/33$	$64 \pm 0/44$	$79 \pm 0/51/01$
۲۴	$79 \pm 1/49$	$58 \pm 1/19$	$34 \pm 1/14$	$81 \pm 2/29$
۳۶	$86 \pm 1/14$	$50 \pm 1/11$	$22 \pm 2/19$	$86 \pm 0/1/45$
سیستم کشت سه‌بعدی (3D Multicellular Spheroid)				
زمان/غلظت	۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۲	$69 \pm 2/24$	$60 \pm 1/3$	$47 \pm 1/3$	$71 \pm 1/33$
۲۴	$71 \pm 1/41$	$39 \pm 0/33$	$33 \pm 1/12$	$74 \pm 1/4$
۳۶	$75 \pm 0/34$	$26 \pm 1/22$	$10 \pm 0/1$	$83 \pm 0/98$

($p < 0/05$), ($p < 0/01$) و ($p < 0/001$) معنی‌دار در نظر گرفته شدند. داده‌ها برحسب میانگین جذب فلورسینس نسبی (RFU) در نظر گرفته شده است (میزان زنده‌مانی سلول رابطه مستقیم با فعالیت متابولیکی و نهایتاً میزان RFU دارد). نتایج کمی میزان احیای نمک Resazurin ارائه شده به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار است. زمان برحسب ساعت و غلظت برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

نتایج نمودار رشد اسفرویدها (نمودار ۲) حاکی از این نکته است که در غلظت‌های بالای نانوذرات نقره (۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ساعات اولیه (۱۲ ساعت بعد از تیمار) قطر اسفروید در ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش رشد معنی‌داری نداشته اما با گذشت زمان در ساعات ۲۴ و ۳۶ نه تنها سبب جلوگیری از رشد

سلول‌ها (به‌منظور افزایش قطر اسفروید) شده بلکه اتصالات سلول-سلول را نیز از بین برده و مورفولوژی اسفرویدها نیز تغییر کرده است. در مورد غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در همان ساعات ابتدایی سبب جلوگیری از رشد شده و در ساعات ۲۴ و ۳۶ ساعت بعد از تیمار سبب از بین رفتن مورفولوژی اسفروید و از هم پاشیدن

آسیب وارد می‌کنند سپس با انتشار به درون اسفروید بقیه سلول‌ها نیز دستخوش تغییر قرار می‌گیرند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در غلظت‌های بالا در ابتدا ساختار کلی اسفروید (ساختار توپی‌بودن) در ساعات اولیه تیمار نانوذرات حفظ می‌شود ولی با گذشت زمان بیشتر ساختار اسفروید از بین می‌رود که به دلیل از بین رفتن یکپارچگی غشای سلولی و همچنین اندرکنش‌های سلول-سلول است [19] و در نهایت سلول‌ها اکثراً رنگ EthD-1 را جذب می‌کنند. نتایج مشابه در مطالعه دیگر نیز گزارش شد جایی که نویسندگان اذعان داشتند که نانوذرات در غلظت‌های بالا (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سبب آسیب و نقص ساختاری غشای سلولی می‌شود و این به نوبه خود سبب نفوذ رنگ PI (این رنگ در مطالعه آنها به منظور بررسی اسفروید استفاده شد) به سلول‌های حاشیه اسفروید در ابتدا، و سپس به درون اسفروید می‌شود [19]. با این حال گزارش شده است که نقص غشایی سبب مرگ سلولی (براساس نتایج MTT) نمی‌شود و این مخالف نتایج مطالعه حاضر است، که به نظر می‌رسد دلیل استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در این مطالعه (۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باشد که در مطالعه آنها غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.

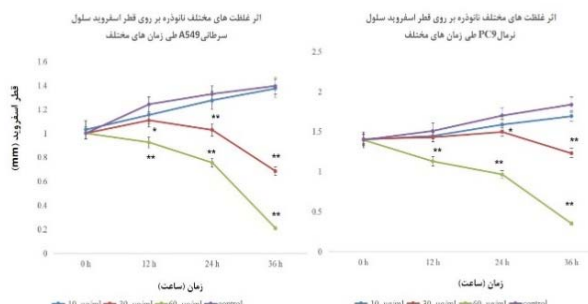
از محدودیت‌های مطالعه حاضر به این نکته می‌توان اشاره کرد که از آنجایی که ارتباط درون ساختار از نوع سلول-سلول است، ولی در بافت طبیعی بدن علاوه بر ارتباط سلول-سلول ارتباطات دیگری نیز از جمله پروتئین‌ها و سایر پروتئین‌ها دخیل هستند شاید تطابق دقیقی از بافت طبیعی بدن نباشد. اما به هر حال هرچه روش آزمایش از لحاظ ساختاری بیشتر شبیه به ساختار طبیعی باشد نتایج قابل قبول‌تر و واقعی‌تر به دست می‌آید.

در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود که در روش‌های سم‌شناختی و بررسی تاثیر داروها و نانوذرات از این قبیل روش‌ها بیشتر بهره‌گیری شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش روزافزون کاربرد نانوتکنولوژی در جوامع امروزی، بررسی ایمن‌بودن محصولات این تکنولوژی بسیار ضروری است. بدیهی است برای این منظور هر چه از روش‌هایی که شباهت بیشتر و الهام بیشتری به بافت طبیعی بدن دارند استفاده شود نتایج واقع‌گرایانه‌تری به دست می‌آید. در این مطالعه سمیت نانوذرات نقره با استفاده از روش‌های سه‌بعدی و دوبعدی در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از اسفروید به عنوان یکی از روش‌های سه‌بعدی برتری نسبی بالایی نسبت به روش‌های دوبعدی یا تک‌لایه و مرسوم بررسی سمیت نانوذرات دارد. همچنین سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال ریه دارای آسیب‌پذیری بیشتری در برابر سمیت نانوذرات از خود نشان می‌دهند زیرا طبق گزارش‌های اعلام شده این سلول‌ها دارای منافذ بزرگ‌تری بوده و این به نوبه خود سبب تسهیل

(از بین رفتن اتصالات سلول-سلول) شده است. افزایش یا کاهش قطر اسفرویدها در غلظت‌های ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین نمونه کنترل مشاهده نشده یا حداقل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. نتایج نشان داد که سلول‌های سرطانی A549 نسبت به سلول نرمال حساسیت بیشتری از لحاظ این مولفه داشته‌اند. نتایج مشابه این مطالعه در مطالعات دیگر محققان نیز مشاهده شده است، جایی که در غلظت‌های مختلف داروی 4-HPR-HSA انکپسوله شده برای بررسی میزان رشد/عدم رشد اسفرویدها و مقایسه با سیستم دوبعدی استفاده کردند [17].



نمودار ۲) نتایج رشد قطر اسفرویدهای سلول سرطانی A549 و سلول نرمال PC9 تحت تیمار نانوذرات نقره: $p < \alpha$ ($\alpha = 0.05$) و $p < \alpha$ ($\alpha = 0.01$) **معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

با توجه به سمیت بالای غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سامانه‌های سه‌بعدی به‌طور کامل مورفولوژی خود را از دست داده و میزان رنگ فلورسنس قرمز در بالاترین حد خود قرار دارد و میزان رنگ فلورسنس سبز در کمترین حد خود است در حالی که همچنان سامانه‌های دوبعدی سلول‌های سالم زیادی وجود دارد (عکس سلول‌های دوبعدی نمایش داده نشده است) و میزان رنگ فلورسنس سبز بیشتر از سامانه‌های سه‌بعدی در غلظت مشابه و زمان مشابه است. این نتایج در مورد بقیه تیمارها صدق نکرده که دلیل آن احتمالاً عدم سمیت این غلظت‌ها می‌تواند باشد. همچنین نتایج حاصل از میزان رنگ فلورسنس سبز/قرمز تاییدکننده حساسیت بیشتر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال است که در مطالعه با عنوان حساسیت بین سلول‌های سرطانی و نرمال به اثبات رسیده است [18]. در این مطالعه مشخص شد که در ساعات اولیه، قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها در سامانه‌های سه‌بعدی (در مقایسه با سامانه کشت دوبعدی) به‌طور معنی‌داری بالاتر است که دلیل این موضوع وجود مقاومت دارویی (نانوذرات) یا می‌تواند این گونه تفسیر شود که نانوذرات به‌سختی به لایه‌های درونی اسفروید انتشار می‌یابند ولی در سامانه دوبعدی همه سلول‌ها به‌طور مساوی غلظت خاصی از نانوذرات را دریافت می‌کنند. در اسفرویدها قابلیت زنده‌مانی وابسته به غلظت نانوذرات است. نتایج شبیه‌سازی ریاضی در مطالعه‌ای نشان داد که میزان انتشار نانوذرات به درون اسفروید بسیار وابسته به غلظت نانوذره مورد استفاده دارد [19]. در اسفرویدها نانوذرات ابتدا به غشای سلول‌های موجود در حاشیه اسفرویدها

- 6- Darvishi MH, Nomani A, Hashemzadeh H, Amini M, Shokrgozar MA, Dinarvand R. Targeted DNA delivery to cancer cells using a biotinylated chitosan carrier. *Biotechnol Appl Biochem*. 2017;64(3):423-32.
- 7- Zabarjadi AR, Hashemzadeh H, Taravat E. Telomere, chromosome end and telomerase enzyme as a cancer biomarker. *Genet Third Millenn*. 2013;11(1):3019-27. [Persian]
- 8- Rashmezzad MA, Ali Asgary E, Tafvizi F, Sadat Shandiz SA, Ataollah S, Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Tehran Univ Med J*. 2015;72(12):799-807. [Persian]
- 9- Stensberg MC, Wei Q, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepúlveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: Challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine*. 2011;6(5):879-98.
- 10- Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res*. 2018;9:1-16.
- 11- Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielera G, Biernat J, et al. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):116.
- 12- Monnappa AK, Bari W, Choi SY, Mitchell RJ. Investigating the responses of human epithelial cells to predatory bacteria. *Sci Rep*. 2016;6:33485.
- 13- Selvi BCG, Madhavan J, Santhanam A. Cytotoxic effect of silver nanoparticles synthesized from *Padina tetrastrum* on breast cancer cell line. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2016;7(3):035015.
- 14- Nallathamby PD, Xu XH. Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. *Nanoscale*. 2010;2(6):942-52.
- 15- Walzl A, Unger Ch, Kramer N, Unterleuthner D, Scherzer M, Hengstschläger M, et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. *J Biomol Screen*. 2014;19(7):1047-59.
- 16- Chia SL, Tay CY, Setyawati MI, Leong DT. Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small*. 2015;11(6):702-12.
- 17- Zononi M, Piccinini F, Arienti Ch, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*. 2016;6:19103.
- 18- Chu LH, Chen BS. Comparisons of robustness and sensitivity between cancer and normal cells by microarray data. *Cancer Inform*. 2008;6:165-81.
- 19- Senyavina NV, Gerasimenko TN, Pulkova NV, Maltseva DV. Transport and toxicity of silver nanoparticles in HepaRG cell spheroids. *Bull Exp Biol Med*. 2016;160(6):831-4.

ورود نانوذرات به این سلول‌ها می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که در زمان‌های مختلف میزان سلول‌های آپوپتوز در روش سه‌بعدی اسفروید، بسیار بیشتر از کشت دوبعدی سلول‌ها است. دلیل این موضوع میزان سمیت بالاتر در زمان و غلظت مشابه، نفوذ و ورود نانوذرات از سه بعد در اسفرویدها به دلیل قرارگیری سلول در فضای سه‌بعدی فضا نسبت به تک‌بعد در روش دوبعدی است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده استفاده از روش‌های سه‌بعدی در مطالعات پیش‌کلینیکی دارو و نانوذرات با توجه به شباهت بیشتر به بافت بدن بسیار برای این قبیل تحقیقات توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به‌خاطر حمایت مالی تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین نویسندگان با توجه به تامین مواد و لوازم و همچنین ارایه فضای مورد نیاز برای انجام تحقیق حاضر توسط دانشگاه صنعتی وین، مراتب تقدیر و قدردانی از این دانشگاه را دارند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: هادی هاشم‌زاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ عبداله الوردی (نویسنده دوم)، نگارنده بحث (۲۰٪)؛ پیتر ارتل (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ حسین نادری‌منش (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه صنعتی وین انجام شده است.

منابع

- 1- Ulusoy M, Lavrentieva A, Walter JG, Sambale F, Green M, Stahl F, et al. Evaluation of CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dot toxicity on three-dimensional spheroid cultures. *Toxicol Res*. 2016;5(1):126-35.
- 2- Chatzinikolaïdou M. Cell spheroids: The new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discov Today*. 2016;21(9):1553-60.
- 3- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839-45.
- 4- Eilenberger Ch, Kratz SRA, Rothbauer M, Ehmoser EK, Ertl P, Küpcü S. Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX*. 2018;5:781-7.
- 5- Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch KW, Mayer B. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *J Biotechnol*. 2015;205:14-23.