



## بررسی سمیت سلولی نانوذرات الماس بر روی سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و لنفوسیت و میانگش آنها با آلبومین سرم انسانی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی

سیده الهه موسوی: استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) semousavi@sina.tums.ac.ir

مریم زیوری فرد: دکتری تخصصی علوم سلولی کاربردی، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

سید مهدی رضایت: استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

فرنوش عطار: استادیار، گروه سم‌شناسی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

نانوذرات الماس،

آلبومین،

سلول سرطان سینه (MCF-7)

،

سلول لنفوسیت،

سمیت سلول

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲

**زمینه و هدف:** استفاده از نانومواد کربن، برای اهداف مختلف زیست‌پزشکی در زمینه‌های تشخیص و درمان کاربرد فراوانی دارد. این مطالعه به منظور بررسی نوع تعامل نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین و همچنین بررسی سمیت سلولی نانوذرات الماس در سلول سرطان سینه (MCF-7) و سلول لنفوسیت انجام شد.

**روش کار:** به منظور بررسی تعامل نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین، تکنیک‌های طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی، طیف‌سنجی Visible-UV و طیف‌سنجی فلورسانس طبق دستورالعمل صورت گرفت. به منظور بررسی سمیت نانوذرات بر روی سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و سلول لنفوسیت تست MTT، LDH، آپوپتوز مطابق دستورالعمل انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT نشان داد بیشترین سمیت سلولی نانوذرات الماس بر روی سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است که میزان زنده ماندن سلول‌ها را به ترتیب به ۵۳/۲٪ - ۴۹/۳٪ ( $p < 0.01$ ) و ۶۸/۴٪ - ۶۴/۳٪ ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش داد. درحالی‌که تأثیری در کاهش میزان زنده ماندن سلول‌های لنفوسیت نشان نداد. نتایج تست LDH نشان داد که نانوذرات برخلاف سلول‌های لنفوسیت منجر به افزایش میزان نشت لاکتات دهیدروژناز و القاء آپوپتوز در سلول سرطان سینه (MCF-7) می‌شود. پژوهش‌های طیف‌سنجی فلورسانس جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر و کاهش شدت نشر ماکزیموم در اثر افزایش غلظت نانوذرات را نشان داد. این تغییر در ویژگی فلورسانس پروتئین آلبومین حاکی از این است که نانو ذرات الماس با پروتئین آلبومین کمپلکس تشکیل می‌دهد. دمای نیمه ذوب آلبومین در حالت آزاد برابر با ۶۱ درجه سانتی‌گراد است و دمای نیمه ذوب در حضور نانوذرات الماس به ۵۸ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات الماس منجر به کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی می‌شوند درحالی‌که تأثیری در کاهش زنده ماندن سلول‌های لنفوسیت نداشت. همچنین این نانوذرات با تغییر ویژگی‌های ساختاری پروتئین آلبومین منجر به تغییر عملکرد آن می‌شوند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Mousavi SE, Zivari fard M, Rezayat SM, Attar F. Evaluation of Diamond Nanoparticles Cytotoxicity on Breast Cancer Cells (MCF-7) and Lymphocyte and their Interaction with Human Serum Albumin using Spectroscopic Methods. Razi J Med Sci. 2021;28(11):1-13.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

## Evaluation of Diamond Nanoparticles Cytotoxicity on Breast Cancer Cells (MCF-7) and Lymphocyte and their Interaction with Human Serum Albumin using Spectroscopic Methods

- © **Seyyede Elaheh Mousavi:** Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\* Corresponding author) [semousavi@sina.tums.ac.ir](mailto:semousavi@sina.tums.ac.ir)  
**Maryam Zivari fard:** Department of Applied Cell Science, School of Medicine, kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran  
**Seyed Mahdi Rezayat:** Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
**Farnoosh Attar:** Department of Food Toxicology, Research Institute of Food Industries and Agricultural Products, Standard Research Institute, Karaj, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** In the last decade, diamond nanoparticles (DI-NPs) have gained considerable attention in both industries such as medicine and academia. Numerous studies have used various nanoparticles, including diamond nanoparticles, as drug carriers, but the direct effect of diamond nanoparticles on different cell lines, including breast cancer cells (MCF-7) and lymphocyte, is obscure. Therefore, in this study, we investigated and compared the effect of diamond nanoparticles on the cells of breast cancer cells (MCF-7) and human lymphocyte. Some authors have pointed to the destructive effect of DI-NPs on red blood cells. These studies revealed that the characteristics of blood cells, including red blood cells change during the incubation of whole human blood samples with the suspension of DI-NPs in vitro. Blood cell aggregation and their ability to deform are among the most considerable changes that these cells experience. The mechanisms responsible for this effect may be based on the interaction of Nanodiamonds with red blood cells directly or with plasma proteins such as albumin, the major molecular component of blood plasma, indirectly. Numerous studies have been conducted to investigate the effect of nanoparticles on the protein structure of albumin. However, a detailed study has not been performed to investigate the binding mechanisms and the exact interaction of DI-NPs with albumin protein, as well as to compare the effect of DI-NPs on healthy cells and cancer cells. Therefore, this study aimed to investigate the interaction of albumin protein with DI-NPs using spectroscopic methods and comparing the effect of DI-NPs on the viability of lymphocytes and cancer cells.

**Methods:** Cells were cultured in a 96-well culture plate and treated with different concentrations of DI-NPs (0, 1, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hours. Then, 10  $\mu\text{L}$  of MTT solution were added to the cells. After four hours of holding in a 37 ° incubator, the reaction was stopped by adding DMSO solution, and finally, the adsorption rate was measured by an ELISA plate reader at 570 nm. Lactate dehydrogenase test: Cells were treated in a 24-well culture plate with specific concentrations of DI-NPs for 24 hours. The activity of the LDH enzyme in the supernatant and cell lysed was measured using the Pars Azmoun LDH diagnostic kit. Cells were cultured in a 96-well culture plate and treated with DI-NPs for 24 hours. Next, cells were precipitated and washed with PBS solution; after that 100  $\mu\text{l}$  of cell solution with 1  $\mu\text{l}$  of Acridine Orange-Ethidium Bromide dye, the mixture was kept at laboratory temperature for 5 minutes. In the final step, 10  $\mu\text{L}$  of cell suspension were placed on a slide and examined by fluorescence microscopy. Fluorescence measurements were recorded on a fluorescence spectrophotometer. To do so, 2  $\mu\text{M}$  protein solution concentration and different concentrations of DI-NPs (0, 1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were used. The excitation wavelength was set at 270 nm and the emission rate was measured in the range of 300-400 nm. Three sets of fluorescence measurements were recorded at 310, 298, and 315 ° K for different concentrations of DI-NPs. To record the Spectra, a spectropolarimeter was used, and in the ultraviolet region ranging from 190 nm to 260 nm measurements were performed. 2 micromolar protein solution concentration and different concentrations of nanoparticles (0, 1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were utilized. It is also worth mentioning, the experiments were done in the

### Keywords

Diamond nanoparticles,  
Albumin,  
Breast cancer cell (MCF-7),  
Lymphocyte cell

Received: 04/09/2021

Published: 22/01/2022

presence and absence of nanoparticles. Measurements were recorded after at least 2 minutes of incubation required for the interaction between DI-NPs and albumin protein.

**Results:** After exposure of lymphocytes and breast cancer cells (MCF-7) to DI-NPs, a decrease in cell survival was observed in breast cancer cells (MCF-7), however, no significant reduction was observed in the viability of lymphocyte cells. When Nanoparticle cytotoxicity started at a concentration of 20 µg / ml, cell viability decreased by 25-21% ( $p < 0.05$ ) compared to the control group; accordingly, cytotoxicity on breast cancer cells increased with increasing nanoparticle concentration. At a concentration of 50 and 100 µg/ml, the survival rate of cancer cells decreased 53.2% - 49.3% ( $p < 0.01$ ) and 68.4% - 64.3% ( $p < 0.001$ ), respectively compared to the control group. Therefore, MTT test results confirmed a concentration-dependent decrease in cancer cell viability. The results also showed that the leakage of LDH enzyme from breast cancer cells (MCF-7) is concentration-dependent. For instance, at the concentrations of 20, 50 and 100 µg / ml the leakage rate of LDH enzyme increased  $145.82 \pm 10.56$  % ( $p < 0.05$ ),  $160.76 \pm 12.34$  % ( $p < 0.01$ ), and  $170.46 \pm 11.43$  % ( $p < 0.001$ ) respectively compared to the control group. The highest rate of lactate dehydrogenase leakage and cell damage was observed at a concentration of 100 µg/ml (Figure 2). The outcomes of the Akredin Orange / Ethidium Bromide test demonstrated that DI-NPs lead to compaction and fragmentation of cellular DNA and induce apoptosis in cancer cells (MCF-7), while no significant effect was spotted on healthy cells.

The fluorescence spectroscopy's results showed a shift towards shorter wavelengths and a decrease in the maximum emission intensity due to the increase in nanoparticle concentration, indicating an increase in protein surface hydrophobicity and displacement of aromatic amino acids to albumin protein level due to increased nanoparticle concentration. The fluorescence spectrum of albumin protein at 298, 310, 315° K declined with increasing concentration of DI-NPs. Therefore, it can be inferred that the DI-NPs led to quenching and suppression of albumin protein. The binding mechanism between albumin protein and DI-NPs is presented using the Stern-Volmer diagram in Figure - 5. As shown in Table 1, while the temperature increases, the Stern Volmer constant decreases. The inverse relationship between temperature and Stern-Volmer constant implies a static bond between DI-NPs and albumin protein. Therefore, it can be concluded that DI-NPs are complexed with albumin protein and the type of quenching mechanism of albumin nanoparticles with albumin protein is static quenching. The CD spectrum of a protein shows information about the secondary structure of the protein. Figure 6 illustrates that the albumin protein has a peak at 208 and 222 nm, indicating the Alpha-Helix structure of the albumin protein. With the increasing concentration of DI-NPs, the structure of albumin protein changes to the random coil structure. Consequently, DI-NPs change the structure of albumin protein from alpha-helix to random coil. Although the melting point of albumin protein is 61°C (see Figure - 7), this temperature changed to 58°C in the presence of diamond nanoparticles, which indicates a decrease in albumin protein stability.

**Conclusion:** In this study, breast cancer cell lines (MCF-7) and lymphocyte cell lines were used to evaluate the toxicity of diamond nanoparticles. The results showed that nanoparticles lead to increased leakage of lactate dehydrogenase in breast cancer cells (MCF-7); while, no enzyme leakage was observed in lymphocyte cells. The results of the apoptosis test confirmed the induction of cell apoptosis in cancer cells, whereas the induction of apoptosis in lymphocyte cells produced no effect. Additionally, the structure of albumin protein in the presence of DI-NPs was investigated by a series of techniques. UV-vis spectroscopy shows an obvious change in the secondary structure of albumin protein after binding to diamond nanoparticles. UV-vis and CD spectroscopy reveal that the structural properties of albumin protein are not preserved in the collection of DI-NPs with albumin protein. Fluorescence spectroscopy shows that the amino acid tryptophan in albumin protein is placed in a more hydrophobic environment in a set of DI-NPs with albumin protein, indicating that protein expansion is likely to occur. The results confirm that DI-NPs can greatly alter the structural properties of albumin protein in the collection of DI-NPs with albumin protein. Therefore, the use of DI-NPs in medical applications needs further study.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Mousavi SE, Zivari fard M, Rezayat SM, Attar F. Evaluation of Diamond Nanoparticles Cytotoxicity on Breast Cancer Cells (MCF-7) and Lymphocyte and their Interaction with Human Serum Albumin using Spectroscopic Methods. Razi J Med Sci. 2021;28(11):1-13.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است، در سال ۲۰۰۸، مرگ حدود هشت میلیون نفر در اثر سرطان‌های بدخیم ثبت شده است و پیش بینی شده است این رقم تا سال ۲۰۳۰ به یازده میلیون نفر می‌رسد، بیماری سرطان در سراسر جهان بسیار شایع است که به دلیل عوامل مختلفی از جمله سبک زندگی، عوامل ژنتیکی و غیره ایجاد می‌شود (۱). رویکرد مبتنی بر استفاده از نانو حامل‌های دارویی یکی از راهکارهای نوظهور در درمان سرطان است که به دلیل توانایی آن در افزایش انتقال دارو به سلول‌های سرطانی است و همین امر سبب تحویل موثر داروها به سلول‌های سرطانی و مهار عوارض جانبی می‌شود، همچنین منجر به افزایش اثر درمانی و سرکوب عوارض جانبی در سلول‌های غیر سرطانی می‌شود، هدف استراتژی‌های جدید، به‌کارگیری مسیرهای سیگنالینگ منجر به مرگ سلول‌های سرطانی توسط آپوپتوز است که با کاهش عوارض در سلول‌های سالم به عنوان یکی از روش‌های مؤثر کنترل سلول‌های سرطان به‌شمار می‌رود (۲). نانومواد به ذراتی اشاره دارند که کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر هستند و به عنوان یکی از مواد استراتژیک قرن بیستم در نظر گرفته می‌شوند (۳). با توجه به خصوصیات بیولوژیکی و فیزیکی و شیمیایی نانوذرات، استفاده از فناوری‌های مبتنی بر نانوذرات در صنایع مختلف بسیار افزایش یافته است (۴). امروزه استفاده از نانوذرات به ویژه نانومواد کربن، برای اهداف مختلف زیست پزشکی در زمینه‌های تشخیص و درمان کاربرد فراوانی یافته است (۵). یکی از نانوذرات بسیار مهم که در صنایع مختلف از جمله پزشکی کاربرد دارد نانوذرات الماس است که به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فرد، در مصارف پزشکی بسیار مورد توجه قرار دارد (۶). این نانوذرات اولین بار در سال ۱۹۶۰ از طریق احتراق ناقص مواد منفجره حاوی کربن در روسیه تولید شد (۷، ۸). نانوذرات الماس دارای مشخصات متفاوت ساختاری، الکترونیکی، فیزیکی، شیمیایی، حرارتی و بیولوژیکی هستند. به عنوان مثال، پایداری شیمیایی، استحکام بالا، سطح بزرگ و همچنین ظرفیت جذب بالا از جمله خصوصیات گزارش شده آن است (۹، ۱۰). نانوذرات الماس جزء یکی از

مواد زیستی قرن بیست و یکم محسوب می‌شود که می‌تواند در شرایط برون تن و درون تن مورد استفاده قرار گیرد (۸، ۱۱). پژوهش‌های مختلفی نشان دادند که نانوذرات الماس با قابلیت انتقال بیومولکول‌های مختلف به عنوان حامل کاربرد دارد (۱۲). گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که نانوذرات الماس کمترین سمیت در بین نانومواد مبتنی بر کربن را دارد (۱۳). علاوه بر این، نانوذرات الماس دارای مزایای ویژه‌ای از قابلیت سازگاری زیست محیطی، عملکرد آسان سطح، هدایت حرارتی بالا، ویژگی‌های نوری، فیزیکی و شیمیایی مفید است که باعث می‌شود به‌عنوان یک ماده ایده آل در انتقال ژن و دارو باشد. مکانیسم کاربرد نانوذرات الماس به این صورت است که مولکول‌های دارویی یا بیومولکول‌ها می‌توانند توسط نانوذرات الماس جذب شوند و برای انجام کار بیولوژیکی خود به سلول‌ها منتقل شوند (۱۴).

پژوهش‌های مختلفی بر روی نانوذرات الماس صورت گرفته است. Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند نانوذرات الماس هیچ تأثیری بر زنده ماندن سلول SaOS-2 ندارد. در مقابل، میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی U937 را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (۱۵). Zhan و همکاران نشان دادند که نانوذرات الماس با قطر ۲۰-۱۰ نانومتر دارای سمیت سلولی وابسته به غلظت بر روی سلول‌های دهانه رحم (Hela) هستند (۱۶). تأثیر نانوذرات در سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های خونی مانند سلول‌های لنفوسیتی مورد بررسی قرار گرفته است. سلول‌های لنفوسیت یکی از اصلی‌ترین سلول‌های ایمنی بدن به‌شمار می‌رود (۱۷). پژوهش‌های متعددی از نانوذرات مختلف از جمله نانوذرات الماس به‌عنوان حامل دارویی استفاده کرده‌اند اما تأثیر مستقیم خود نانوذرات الماس بر رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و سلول‌های لنفوسیت درهاله‌ای از ابهام است. به همین منظور در این مطالعه به بررسی و مقایسه تأثیر نانوذرات الماس بر روی سلولی سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و سلول‌های لنفوسیت انسانی پرداخته‌ایم.

پژوهشگران در سال ۲۰۱۱ با بارگذاری نانوذرات الماس با دارو ضد سرطان داکسی‌رابینسون نشان دادند

نشان داد که برهم‌کنش نانوذرات الماس با این پروتئین‌ها منجر به تغییر ساختار و در نتیجه تغییر عملکرد پروتئین‌ها می‌گردد. با توجه به تمایل استفاده از نانوذرات الماس در کاربرد های پزشکی فعل و انفعال بین نانو ذرات و مولکول‌های زیستی ممکن است منجر به تغییرات ساختاری مولکول‌های زیستی و به دنبال آن تغییر عملکرد پروتئین‌ها شود؛ بنابراین بررسی تعامل پروتئین‌ها با نانوذرات نیاز به مطالعه بیشتری دارد. هنوز مطالعه دقیقی جهت بررسی مکانسیم‌های اتصال و بررسی دقیق تعامل نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین و همچنین مقایسه سمیت نانوذرات الماس بر روی سلول‌های لنفوسیت و سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) صورت نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه بررسی تعامل پروتئین آلبومین با نانوذرات الماس با استفاده از روش‌های طیف سنجی همچنین مقایسه و بررسی سمیت نانوذرات الماس بر میزان زنده ماندن سلول‌های لنفوسیت و سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) است.

## روش کار

**مواد موردنیاز:** نانوذرات الماس با اندازه ذرات  $> 10$  نانومتر و اندازه سطح  $200-450$  مترمربع بر گرم، پروتئین آلبومین (سیگما)، قرص PBS، اتانول، رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) (مؤسسه پاستور، تهران، ایران)، خون محیطی کامل انسان، فایکول (GIBCO-USA)، محیط کشت سلول (GIBCO-USA)، سرم جنین گاو، محلول پنی‌سیلین / استرپتوماایسین  $100 \times$ ، قرص PBS،  $3-4$  و  $5$  دی متیل تیازول -  $2$  (ایل) -  $2$  و  $5$  دی فنیل تترازولیم بروماید (MTT)، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، کیت لاکتات دهیدروژناز (سیگما)، آکریدین اورنج (سیگما)، اتیدیم بروماید (سیگما).

**جداسازی سلول‌های لنفوسیت:** سلول‌های لنفوسیت خون محیطی انسان از سه اهداکننده سالم به‌وسیله گرادیان شیب سانتریفیوژ و با استفاده از Ficoll-Hypaque طبق روش تولیدکننده استاندارد آن جدا شد.

**تست MTT:** سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت و با غلظت‌های متفاوت نانوذرات الماس (صفر، ۱،

استفاده از نانوذرات الماس به‌عنوان حامل دارویی می‌تواند در بهبود درمان سرطان موثر باشد (۱۸). چندین مطالعه دیگر در خصوص استفاده از این نانوذرات به‌عنوان حامل دارویی به‌خصوص در بافت سرطانی انجام شده است (۱۴، ۱۹، ۲۰) براساس توجه متخصصان در خصوص استفاده از نانوذرات الماس به‌عنوان حامل دارویی بررسی برهمکنش این نانوذرات با مولکول‌های زیستی بسیار مهم است. تلاش‌های بسیاری برای بررسی فعل و انفعالات ذرات با مولکول‌های زیستی برای دستیابی به کاربردهای آنها در زمینه‌های پزشکی اختصاص داده شده است. به عنوان مثال، چندین محقق از برخی پروتئین‌ها مانند لیزوزیم، آلبومین سرم گاو (BSA)، سیتوکروم C و میوگلوبین برای جذب فیزیکی ذرات الماس استفاده کرده و خواص اتصال آنها را بررسی کرده‌اند (۲۱، ۲۲). پژوهش‌ها نشان داده است در طی انکوباسیون نمونه خون کامل انسان با سوسپانسیون نانوذرات الماس در شرایط برون تن، خصوصیات سلول‌های خونی از جمله گلبول‌های قرمز خون تغییر می‌کند، به ویژه پارامترهای تجمع سلول‌های خونی و تغییر شکل آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مکانسیم‌های مسئول این اثر ممکن است بر اساس فعل و انفعال نانو الماس‌ها مستقیماً با گلبول‌های قرمز خون یا غیرمستقیم با پروتئین‌های پلازما مانند آلبومین، که مؤلفه اصلی مولکولی پلاسمای خون است، باشد (۲۳، ۲۴). آلبومین جزء پروتئین‌های کروی سرم به‌شمار می‌رود (۲۵). در بین پروتئین‌های سرم، آلبومین سرم انسانی فراوان‌ترین و مهم‌ترین پروتئین پلاسمای خون و همچنین یک جزء منبع ذخیره پروتئین است (۲۶). داده‌های کریستالوگرافی پروتئین آلبومین نشان داد که حاوی ۵۸۵ اسید آمینه است. همچنین دارای اسید آمینه تریپتوفان است که فلورسانس ذاتی آن به لیگاندهای پیوند شده مجاور حساس است (۲۷). پژوهش‌های مختلفی در بررسی تاثیر نانوذرات بر ساختار پروتئین آلبومین صورت گرفته است. بررسی تعامل پروتئین آلبومین گاوی با نانوذرات طلا نشان داده است که ساختار پروتئین آلبومین در تعامل با این نانوذرات تغییر می‌کند (۲۸). بررسی میانکنش نانوذرات الماس با پروتئین فیبرونکتین (۲۹)، آلبومین سرم گاو، لیزوزوم (۳۰) و هموگلوبین (۱۳)

شد. از غلظت محلول پروتئینی ۲ میکرومولار و غلظت‌های مختلف نانوذرات الماس (صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. آزمایش‌ها در حضور و غیاب نانوذرات صورت گرفت. اندازه‌گیری‌ها پس از حداقل ۲ دقیقه انکوباسیون موردنیاز برای تعامل بین نانوذرات الماس و پروتئین آلبومین ثبت شد.

### یافته‌ها

**تحلیل آماری داده‌ها:** داده‌ها به‌عنوان مقادیر متوسط با انحراف معیار ارائه می‌شوند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از ANOVA یک‌طرفه و با حداقل میانگین مربعات انجام شد و همچنین اختلافات آماری در سطح  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**نتایج تست MTT:** پس از مواجهه سلول‌های لنفوسیت و سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) با نانوذرات الماس کاهش بقای سلولی در سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) مشاهده شد. با این وجود کاهش معناداری در میزان زنده ماندن سلول‌های لنفوسیت مشاهده نشد (نمودار ۱). سمیت سلولی نانوذرات از غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شروع شد، میزان زنده ماندن سلول ۲۱-۲۵٪ ( $p < 0.05$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و با افزایش غلظت نانوذرات سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطان سینه افزایش پیدا کرد، به این صورت که در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه به ترتیب به میزان ۵۳٪ - ۴۹٪ ( $p < 0.01$ ) و ۶۴٪ - ۶۸٪ ( $p < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد؛ بنابراین نتایج تست MTT کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی را به‌صورت وابسته غلظت را تأیید کرد (نمودار ۱).

**نتایج تست LDH:** همان‌طور که در نمودار ۲ قابل مشاهده است نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز پس از مواجهه سلول‌های لنفوسیت و سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) با نانوذرات الماس برای مدت زمان ۲۴ ساعت بررسی شد و نتایج نشان داد که نانوذرات تأثیری در نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های لنفوسیت ندارد. درحالی‌که میزان نشت این آنزیم از سلول‌های سرطانی (MCF-7) قابل ملاحظه بود، همچنین نتایج

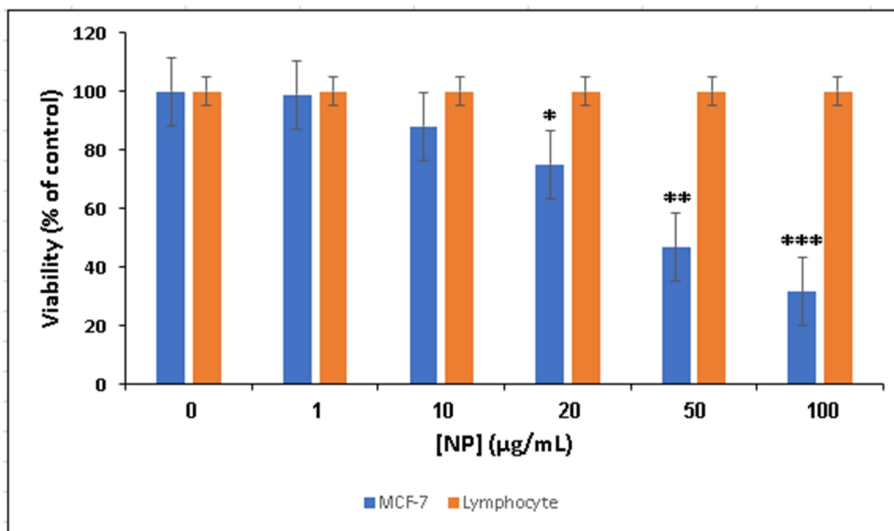
۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه، واکنش با اضافه کردن محلول DMSO متوقف شد و در نهایت میزان جذب توسط دستگاه الیزا پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

**تست لاکتات دهیدروژناز:** سلول‌ها در ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای با غلظت‌های مشخصی از نانوذرات الماس (صفر، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و برای زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری و رسوب داده شدند. میزان فعالیت آنزیم LDH در محلول رویی و رسوب لیز شده سلولی با استفاده از کیت تشخیصی LDH پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

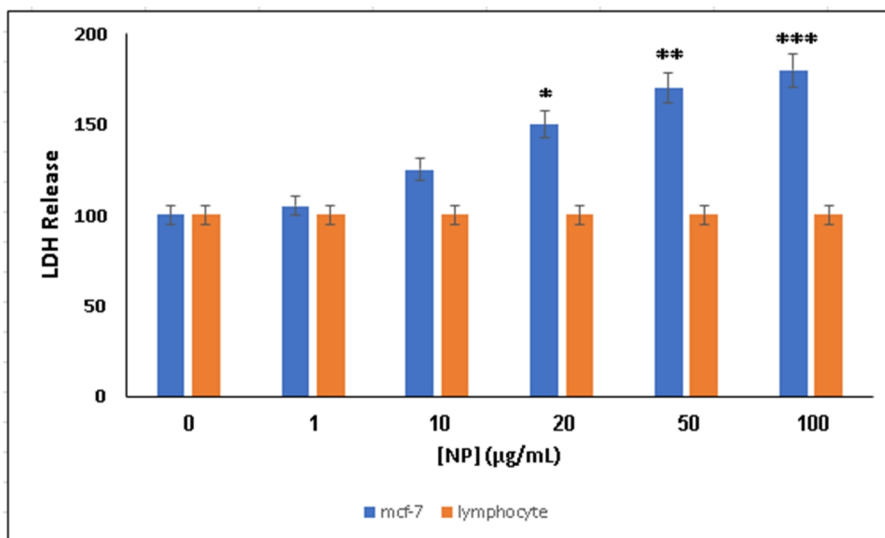
**تست آپوپتوز:** سلول‌ها در ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت توسط نانوذرات الماس تیمار شدند، سپس توسط محلول PBS رسوب و شستشو شده، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سلولی را با یک میکرولیتر از رنگ آکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. ۱۰ ماکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را روی لام قرار داده شد و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد.

**طیف‌سنجی فلورسانس:** اندازه‌گیری فلورسانس بر روی دستگاه اسپکتروفتومتر فلورسانس ثبت شد. از غلظت محلول پروتئینی ۲ میکرومولار و غلظت‌های مختلف نانوذرات الماس (صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. طول موج تحریک در ۲۷۰ نانومتر تنظیم شد و میزان انتشار در محدوده ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. عرض شکاف جذب و انتشار به ترتیب به ۱۰ و ۲۰ نانومتر تنظیم شد. سه مجموعه اندازه‌گیری فلورسانس در دمای ۳۱۰، ۲۹۸ و ۳۱۵ درجه کلونین برای غلظت‌های مختلف نانوذرات الماس ثبت شد.

**طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی Circular Dichroism (CD):** طیف‌ها با استفاده از اسپکترو پلاریمتر ثبت شد. اندازه‌گیری‌ها در منطقه پرتو فرابنفش در محدوده طول موج ۱۹۰-۲۶۰ نانومتر انجام



نمودار ۱- نمودار تست MTT بررسی سمیت نانوذرات الماس بر روی سلول لنفوسیت و سلول سرطان سینه (MCF-7)



نمودار ۲- نمودار تست LDH بررسی نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلول لنفوسیت و سلول سرطان سینه (MCF-7)

نشان داد که نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) به صورت وابسته به غلظت است. افزایش نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب منجر به نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز به میزان  $160/76 \pm 12/34\%$ ،  $(p < 0/05)$ ،  $145/82 \pm 10/56\%$ ،  $(p < 0/01)$  می‌شود و بالاترین میزان نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و آسیب سلولی در غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  مشاهده گردید (نمودار ۲).

نتایج تست آپوپتوز: نتایج تست آکردين اورنج / نتایج تست فلورسانس پروتئین آلبومین در حضور نانوذرات الماس: روش‌های مختلفی برای مطالعه تعامل بین نانوذرات و پروتئین آلبومین وجود دارد. طیف فلورسانس برای پروتئین آلبومین به تنهایی ثبت شد و سپس طیف فلورسانس پروتئین آلبومین همراه با غلظت‌های مختلف نانوذرات الماس ثبت شد تا تعامل

نشان داد که نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) به صورت وابسته به غلظت است. افزایش نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب منجر به نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز به میزان  $160/76 \pm 12/34\%$ ،  $(p < 0/05)$ ،  $145/82 \pm 10/56\%$ ،  $(p < 0/01)$  می‌شود و بالاترین میزان نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و آسیب سلولی در غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  مشاهده گردید (نمودار ۲).

نتایج تست آپوپتوز: نتایج تست آکردين اورنج /

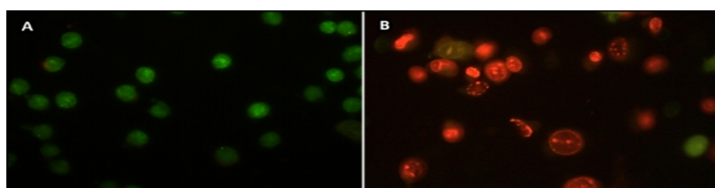
این تغییر در ویژگی فلورسانس پروتئین آلبومین حاکی از این است که نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین کمپلکس تشکیل می‌دهد (نمودار ۴).

**محاسبه پارامترهای اتصال:** مکانیسم اتصال بین پروتئین آلبومین و نانوذرات الماس را با استفاده از داده‌های نشر فلورسانس در دماهای مختلف توسط معادله اشترن - ولمر بررسی شد.

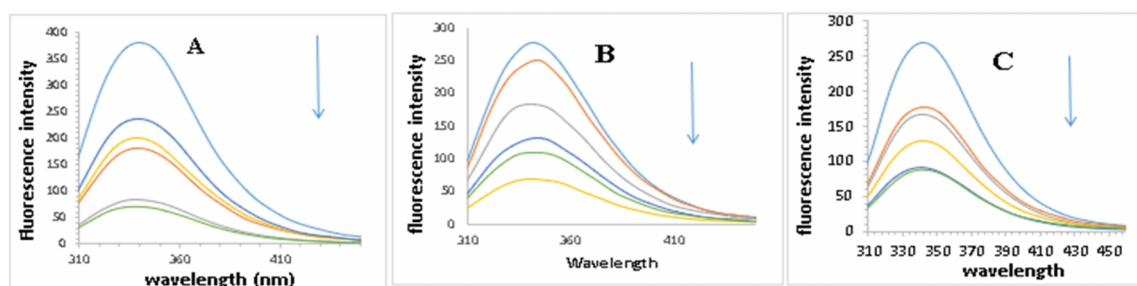
$$\frac{FO}{F} = 1 + kQ$$

نمودار اشترن - ولمر در نمودار ۵ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، با افزایش دما، ثابت اشترن - ولمر کاهش می‌یابد. ارتباط معکوس بین دما و ثابت اشترن - ولمر حاکی از اتصال استاتیک بین نانوذرات الماس و پروتئین آلبومین است؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات الماس با

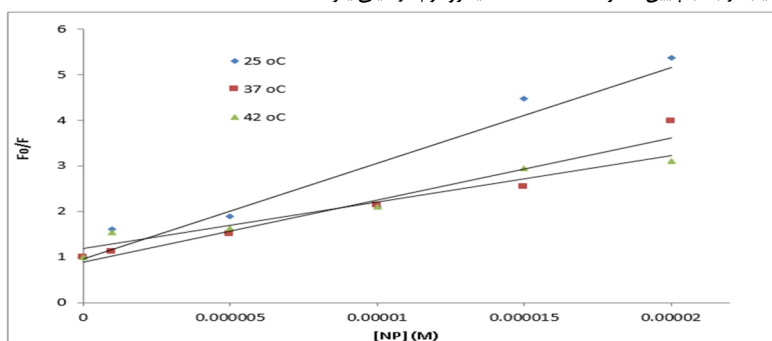
بین آنها بررسی شود. نتایج، جابه‌جایی طول موج به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر و کاهش شدت نشر ماکزیمم در اثر افزایش غلظت نانوذرات را نشان داد که حاکی از افزایش هیدروفوبیسیته سطح پروتئین و تغییر مکان اسیدآمینه‌های آروماتیک به سطح پروتئین آلبومین در اثر افزایش غلظت نانوذرات الماس است. همچنین کاهش شدت نشر فلورسانس در اثر نانوذرات الماس، گویای این است که یا محل اتصال نانوذرات در نزدیکی اسیدآمینه تریپتوفان است و یا تغییرات کنفورماسیونی ایجاد شده در اثر اتصال نانوذرات سبب کاهش فلورسانس گردیده است. شدت باند فلورسانس پروتئین آلبومین در دمای ۲۹۸، ۳۱۰، ۳۱۵ درجه کلون با افزایش غلظت نانوذرات الماس روند کاهشی داشت که نشان می‌دهد که نانوذرات الماس منجر به خاموشی و فرونشانی پروتئین آلبومین گردیده است.



**نمودار ۳-** نتایج رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید: A گروه سالم، B گروه سلول سرطان سینه (MCF-7) تیمار شده با نانوذرات الماس



**نمودار ۴-** نمودار طیف‌سنجی UV-visible حاصل برهم‌کنش پروتئین آلبومین و نانوذرات الماس در دمای (A) ۲۹۸، (B) ۳۱۰، (C) ۳۱۵ درجه کلون. همچنین غلظت نانوذره به ترتیب از بالا به پایین صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است.



**نمودار ۵-** نمودار اشترن ولمر در نتیجه تعامل نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین در دماهای مختلف ۲۹۸، ۳۱۰، ۳۱۵ درجه کلون

جدول ۱- بررسی تغییرات ثابت اشترن و المر در دماهای مختلف ۳۱۵، ۳۱۰، ۲۹۸ درجه کلون

T(K)	$K_{sv}(M^{-1})$	$R^2$
۲۹۸	$۲۰/۹۸ \times ۱۰^۴$	۰/۹۱
۳۱۰	$۱۳/۶۳ \times ۱۰^۴$	۰/۹۴
۳۱۵	$۱۰/۱۷ \times ۱۰^۴$	۰/۹۴

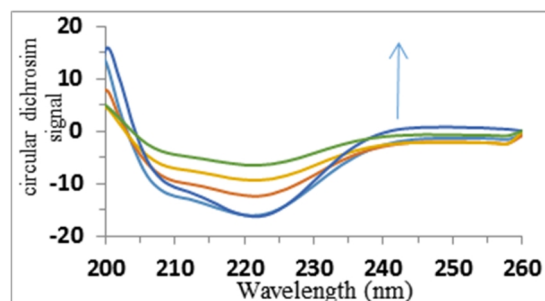
بررسی دمای نیمه ذوب پروتئین: همان‌طور که در نمودار ۷ نشان داده شده است دمای نیمه ذوب پروتئین آلبومین برابر ۶۱ درجه سانتی‌گراد است. این دما در حضور نانوذرات الماس به ۵۸ درجه سانتی‌گراد تغییر یافت که می‌تواند کاهش پایداری پروتئین آلبومین را در تعامل با نانوذرات الماس نشان دهد.

### بحث

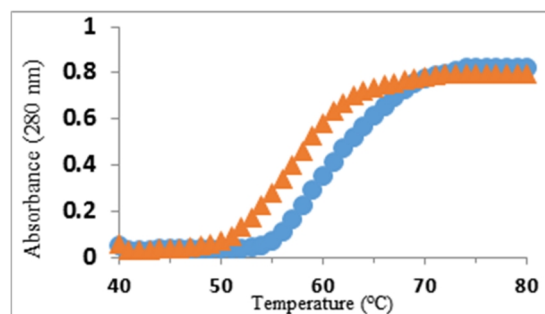
بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر در دنیا است و از هر شش مورد مرگ، یک مورد به دلیل سرطان است (۳۱). امروزه از نانوذرات الماس به‌عنوان نانوحامل‌های دارویی به‌منظور دارورسانی هدفمند به بافت سرطانی استفاده می‌شود (۱۴). تا این مرحله، داروی ضد سرطان cis-dichlorodiammineplatinum (II) (CDDP) (cisplatin) با جذب بر روی سطح نانوذرات الماس بارگیری شده است، CDDP با سرعت بالاتری در PH 6.0 نسبت به pH 7.4 از کامپوزیت آزاد می‌شود؛ بنابراین در مایع خارج سلولی اسیدی‌تر در یک محیط تومور یا در داخل منطقه سیتوپلاسم سلول سرطانی، این امکان وجود دارد که کمپلکس ND-CDDP داروهای بیشتری نسبت به بافت طبیعی ترشح کند (۳۲). روش مشابهی برای تهیه نانوذرات الماس بارگذاری شده با داکسی‌رابینسون (NPDC) برای درمان سرطان هدفمند استفاده شده است. NPDC پس از این‌که وارد سلول‌ها شد DOX تجزیه شده به درون هسته منتقل شد و رشد سلول‌های سرطانی را سرکوب کرد. تحت شرایط فیزیولوژیکی، DOX به‌صورت وابسته به pH آزاد شد. NPDC به‌طور قابل توجهی جذب سلولی داکسی‌رابینسون را افزایش داد تا اثر درمانی را در مقایسه با داروی آزاد را افزایش دهد (۱۸، ۳۲). در مطالعه حاضر به منظور بررسی سمیت نانوذرات الماس، از مدل سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و همچنین

پروتئین آلبومین کمپلکس تشکیل داده است و نوع مکانیسم خاموشی نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین از نوع خاموشی استاتیک است.

**طیف‌سنجی دورنگ نمای دورانی Circular Dichroism (CD)** طیف یک پروتئین اطلاعات مربوط به ساختار ثانویه پروتئین را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود، پروتئین آلبومین در طول موج ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر دارای یک پیک است که تأییدکننده ساختار آلفا هلیکس پروتئین آلبومین است. با افزایش غلظت نانوذرات الماس ساختار پروتئین آلبومین به سمت ساختار رندم کوئل تغییر یافته است؛ بنابراین نتایج نشان داد که نانوذرات الماس ساختار پروتئین آلبومین را از آلفا هلیکس به رندم کوئل تغییر می‌دهد.



نمودار ۶- نمودار CD رسم شده برای پروتئین آلبومین با غلظت ۲ میکرومولار در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات الماس (صفر، ۱۵، ۲۰، ۱۰۱، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر).



نمودار ۷- نقطه ذوب پروتئین آلبومین در حضور و عدم حضور نانوذرات الماس در pH = ۷/۵، ۱۰ میکرومولار بافر فسفات در ۲۹۸ نانومتر.

طیف سنجی اشعه ماوراء بنفش اطلاعاتی در مورد تغییر ساختار پروتئین‌ها به ما می‌دهد، جذب پروتئین در محدوده ۳۰۰-۲۳۰ نانومتر عمدتاً به اسید آمینه‌های آروماتیک (تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین) نسبت داده می‌شود. محیط مولکولی پروتئین‌ها طیف جذب اسید آمینه‌های آروماتیک را تعیین می‌کند، در واقع طیف جذبی به محیط مولکولی پروتئین بستگی دارد، که باعث تغییر طول موج و شدت آن شود (۳۴). نتایج تست UV-vis نشان داد که دمای نیمه ذوب پروتئین آلبومین پس از مواجهه با نانوذرات الماس کاهش می‌یابد. میزان  $T_m$  یا نیمه ذوب پروتئین آلبومین برابر ۶۱ درجه سانتی گراد است. در حالی که دمای نیمه ذوب پروتئین در حضور نانوذرات الماس ۵۸ درجه سانتی گراد است. که حاکی از کاهش پایداری و تغییر ساختار پروتئین آلبومین در حضور نانوذرات الماس است. طیف سنجی فلورسانس اطلاعات مفیدی را در مورد تغییرات ساختاری پروتئین فراهم می‌کند (۳۵). به طور معمول فعل و انفعال بین یک فلوروفور و یک مولکول باعث ایجاد اختلال یا تغییر در پارامترهای فلورسانس مانند شدت نشر طیف فلورسانس و غیره می‌شود و این اختلالات در پارامترهای فلورسانس اجازه می‌دهد اطلاعاتی در مورد محیط فلوروفور به دست آید، که درک درستی از ماهیت و منشأ فعل و انفعالات بین فلوروفور و سایر مولکول‌ها را فراهم می‌کند (۳۵). اسید آمینه‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین سه فلوروفور ذاتی هستند که مسئول خواص فلورسانس پروتئین‌ها می‌باشند. اسید آمینه فلورسانس تریپتوفان (Trp) حساس‌ترین اسید آمینه نسبت به تغییر محیط است (۳۵). آلبومین سرم انسانی مهم‌ترین پروتئین در پلاسما است، که عملکردهای مختلفی را در بدن بر عهده دارد، آلبومین توانایی اتصال به مواد درون زاد و خارجی را دارد و یک به عنوان یک عامل مهم در توزیع داروها در بدن انسان نقش مهمی دارد. اتصال آلبومین به داروها می‌تواند سبب افزایش نیمه عمر داروها، و افزایش حلالیت و کاهش سمیت آنها گردد (۳۶). لیگاندها نقش به‌سزایی در تغییرات ساختار فضایی مولکول آلبومین دارند که با اتصال به جایگاه‌های مختلف آلبومین منتقل می‌شوند و این تغییرات همراه با تغییرات ساختار دوم پروتئین است. آلبومین نیز

از مدل سلول لنفوسیت به منظور مقایسه دقیق‌تر نتایج استفاده شد. نتایج تست MTT مشخص کرد که نانوذرات الماس بر روی مدل سلول لنفوسیتی فاقد سمیت است در حالی که منجر به کاهش زنده ماندن سلول سرطان سینه (MCF-7) می‌شود؛ بنابراین این نانوذرات نه تنها می‌توانند به‌عنوان نانوحامل استفاده شوند بلکه می‌توانند به‌طور مستقیم منجر به کاهش میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی گردد. بسیاری از مطالعات اولیه در مورد سمیت سلولی سلول نانوذرات الماس در مدل سلولی راه را برای کاربردهای زیستی / پزشکی نانوذرات الماس هموار کرده است. یو و همکاران زیست‌سازگاری پودرهای الماس، با قطر متوسط ۱۰۰ نانومتر، در مدل سلولی را بررسی کرد و سمیت سلولی بسیار کمی را در سلول‌های کلیه یافت (۳۳). در راستای نتایج ما Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند نانوذرات الماس با قطر ۴/۴۲ - ۲/۳۶ نانومتر هیچ تأثیری بر زنده ماندن سلول SaOS-2 ندارد. در مقابل، میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی U937 را به‌طور قابل توجهی کاهش داد (۱۵). Zhan و همکاران نشان دادند که نانوذرات الماس با قطر ۲۰-۱۰ نانومتر دارای سمیت سلولی وابسته به غلظت بر روی سلول‌های دهانه رحم (Hela) هستند (۱۶). در این پژوهش سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف نانوذره الماس از  $1 \mu\text{g/ml}$  تا  $100 \mu\text{g/ml}$  بررسی شده‌اند سمیت سلولی سرطانی سینه (MCF-7) از طریق فعال شدن لاکتات دهیدروژناز و رادیکال‌های آزاد در مجاورت نانوذرات الماس حاصل شد و در نهایت القاء آپوپتوز با استفاده از نوعی رنگ آمیزی خاص به نام آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید بررسی نمودیم و به بررسی آپوپتوز از طریق مشاهده مستقیم سلول پرداختیم که نتایج این تست همچنین حاکی از آن است که سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) که در معرض نانوذرات الماس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند متراکم شده و DNA آنها قطعه قطعه شده و دچار آپوپتوز گردیدند و درصد بقای این سلول‌ها کاهش یافت. در صورتی که در سلول‌های سالم لنفوسیتی این اثر مشاهده نگردید؛ بنابراین نشان داده شده است که نانو ذرات الماس احتمالاً می‌توانند گزینه مناسبی برای کمک به درمان سرطان پستان باشد.

را حفظ کند یا خیر. پروتئین آلبومین که دارای محتوای غالب مارپیچ آلفا در ساختار ثانویه است، محتوای مارپیچ آلفا در واقع شاخص خوبی از ویژگی‌های ساختاری آن است، و از دست دادن عمده محتوای مارپیچ آلفا احتمالاً از بین رفتن عملکرد بیولوژیکی پروتئین را نشان می‌دهد (۳۹، ۴۰). در طیف سنجی CD، مارپیچ آلفا از سیگنالهای CD منفی در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر برخوردار است. در مطالعه حاضر همانطور که در شکل ۳- نشان داده شده است، مینیموم‌ها در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر به تدریج با افزایش غلظت نانوذرات از بین رفته و به خطی صاف تبدیل می‌شود که حاکی از این است که ساختار دوم پروتئین آلبومین از ساختار مارپیچ آلفا به ساختار رندم‌کوئل تغییر یافته است. مطالعات محدودی در خصوص تعامل نانوذرات الماس با پروتئین‌ها صورت گرفته است. نتایج مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ نشان داد که نانوذرات الماس منجر به تغییر ساختار پروتئین هموگلوبین انسانی می‌شود و منجر به کاهش میزان ساختار مارپیچ آلفا در پروتئین هموگلوبین می‌شود، همچنین در راستای مطالعه ما نتایج نشان داد دما نیمه ذوب پروتئین پس از تعامل با نانوذرات کاهش یافت (۱۳). Khanal و همکاران نشان دادند نانوذرات الماس با قطر ۵-۴ نانومتر منجر به تغییر ساختار پروتئین فیبرونکتین می‌شود (۲۹). Aramesh و همکاران نشان دادند نانوذرات الماس می‌تواند منجر به تغییر ساختار پروتئین آلبومین سرم گاو و لیزوزوم گردد، نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات الماس با قطر  $1 \pm 5$  نانومتر ساختار پروتئین را از آلفا هلیکس به رندم‌کوئل تغییر می‌دهد در نتیجه می‌تواند منجر به تغییر در عملکرد پروتئین گردد (۳۰)؛ بنابراین با توجه به بررسی‌های صورت گرفته استفاده از نانوذرات الماس در کاربرد های پزشکی نیاز به بررسی بیشتری دارد.

در این مطالعه به‌منظور بررسی سمیت نانوذرات الماس از رده سلول سرطان سینه (MCF-7) و سلول لنفوسیت استفاده شد که نتایج نشان داد نانوذرات منجر به افزایش نشت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) می‌شود، در حالی نشت آنزیم در سلول‌های لنفوسیت مشاهده نشد. در ادامه مطالعه نتایج تست آپوپتوز، القاء آپوپتوز سلولی در

می‌تواند بر روی خواص فارماکینتیک داروها اثرگذار باشد (۳۷). پروتئین آلبومین که در مطالعه حاضر بررسی شده است یک پروتئین پر کاربرد است، که دارای اسید آمینه تریپتوفان است (۳۸). با تجزیه و تحلیل طیف‌های انتشار فلورسانس تریپتوفان در کمپلکس پروتئین آلبومین و نانوذرات الماس، می‌توان تغییر ساختاری پروتئین آلبومین را در منطقه تریپتوفان بدست آورد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان نشر فلورسانس با افزایش دما کاهش می‌یابد؛ بنابراین نتایج حاکی از این است که نانوذرات الماس منجر به خاموشی و فرونشانی پروتئین آلبومین می‌شود. همچنین نتایج نشان داد با افزایش دما، ثابت اشتراک-ولمر کاهش پیدا میکند، که تاییدی بر ارتباط معکوس بین دما و مکانیسم اتصال پروتئین آلبومین و نانو ذره است، این حالت در اتصال استاتیکی مشاهده می‌شود. اتصال استاتیک حاکی از تشکیل کمپلکس بین پروتئین و نانو ذره است. ساختار سوم پروتئین عمدتاً توسط فعل و انفعالات آبریز ننگه داشته می‌شود. طیف سنجی فلورسانس می‌تواند آبریزی فلوروفور مدفون شده در داخل منطقه آبریز پروتئین را تشخیص دهد تا اطلاعات مربوط به تغییر ساختار سوم پروتئین آشکار شود. تغییرات در ساختار سوم پروتئینی (مانند باز شدن) اغلب منجر به تغییر زیادی در حداکثر انتشار فلورسانس می‌شود. به طور معمول، هنگامی که پروتئین باز می‌شود، حداکثر انتشار به یک طول موج طولانی‌تر منتقل می‌شود (۳۴)، که می‌تواند ناشی از در معرض قرار گرفتن فلوروفور در معرض حلال باشد. در مطالعه حاضر، تغییر در موقعیت حداکثر انتشار پروتئین آلبومین نشان می‌دهد که نانوذرات الماس ساختار سوم پروتئین آلبومین را آشفته می‌کند. این با برخی از پژوهش‌ها گذشته، مبتنی بر مطالعه طیف سنجی فلورسانس بر روی تغییرات ساختار سوم پروتئین سازگار است (۱۳). به‌منظور تجزیه و تحلیل کمی از اینکه تا چه حد ویژگی‌های ساختاری پروتئین آلبومین می‌تواند پس از اتصال به سطح نانوذرات الماس حفظ شود، از طیف سنجی CD استفاده می‌شود. ویژگی ساختاری پروتئین، عملکرد بیولوژیکی آن را تعیین می‌کند؛ بنابراین مطالعه طیف CD پروتئین نشان می‌دهد که آیا پروتئین می‌تواند عملکرد بیولوژیکی خود

of Paclitaxel in the Combination of Diamond Nanoparticles on the Structure of Human Serum Albumin (HSA) and Their Antiproliferative Role on MDA-MB-231 cells. *Protein J*. 2020;1-16.

5. Grall R, Girard H, Saad L, Petit T, Gesset C, Combis-Schlumberger M, et al. Impairing the radioresistance of cancer cells by hydrogenated nanodiamonds. *Biomaterials*. 2015;61:290-8.

6. Barnard AS, Opletal G, Chang SL. Does Twinning Impact Structure/Property Relationships in Diamond Nanoparticles? *J Physic Chem C*. 2019;123(17):11207-15.

7. Moosa B, Fhayli K, Li S, Julfakyan K, Ezzeddine A, Khashab NM. Applications of nanodiamonds in drug delivery and catalysis. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):332-43.

8. Kaur R, Chitanda JM, Michel D, Maley J, Borondics F, Yang P, et al. Lysine-functionalized nanodiamonds: synthesis, physicochemical characterization, and nucleic acid binding studies. *Int J Nanomed*. 2012;7:3851.

9. Keremidarska M, Ganeva A, Mitev D, Hikov T, Presker R, Pramatarova L, et al. Comparative study of cytotoxicity of detonation nanodiamond particles with an osteosarcoma cell line and primary mesenchymal stem cells. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2014;28(4):733-9.

10. Wang P, Zhou R, Zhou R, Recek N, Prasad K, Speight R, et al. Chemo-Radiative Stress of Plasma as a Modulator of Charge-Dependent Nanodiamond Cytotoxicity. *ACS Appl Bio Mat*. 2020;3(10):7202-10.

11. Khanal D, Lei Q, Pinget G, Cheong DA, Gautam A, Yusoff R, et al. The protein corona determines the cytotoxicity of nanodiamonds: Implications of corona formation and its remodelling on nanodiamond applications in biomedical imaging and drug delivery. *Nanoscale Adv*. 2020;2(10):4798-812.

12. Purtov K, Petunin A, Burov A, Puzyr A, Bondar V. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances. *Nanoscale Res Lett*. 2010;5(3):631-6.

13. Pishkar L, Taheri S, Makarem S, Alizadeh Zeinabad H, Rahimi A, Saboury AA, et al. Studies on the interaction between nanodiamond and human hemoglobin by surface tension measurement and spectroscopy methods. *J Biomol Struct Dynamics*. 2017;35(3):603-15.

14. Perevedentseva E, Lin YC, Cheng CL. A review of recent advances in nanodiamond-mediated drug delivery in cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18(3):369-82.

15. Ibrahim M, Xue Y, Ostermann M, Sauter A, Steinmueller - Nethl D, Schweeberg S, et al. In vitro cytotoxicity assessment of nanodiamond particles and their osteogenic potential. *J Biomed Mat Res Part A*.

سلول‌های سرطان را تأیید کرد درحالی‌که تأثیری بر القاء آپوپتوز در سلول‌های لنفوسیت مشاهده نشد؛ بنابراین نانوذرات الماس می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی جهت درمان سرطان سینه معرفی شود با این وجود نیاز به بررسی بیشتری در این خصوص است، همچنین ساختار پروتئین آلبومین در حضور نانوذرات الماس توسط یک سری تکنیک‌ها بررسی شد. طیف‌سنجی UV-vis تغییر آشکاری در ساختار ثانویه پروتئین آلبومین پس از اتصال با نانوذرات الماس نشان می‌دهد. طیف‌سنجی UV-vis و CD نشان می‌دهد که ویژگی‌های ساختاری پروتئین آلبومین در مجموعه نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین حفظ نمی‌شود. طیف‌سنجی فلورسانس نشان می‌دهد که اسیدآمینه تریپتوفان در پروتئین آلبومین در یک محیط آب‌گریزتر در مجموعه نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین قرار می‌گیرد که نشان می‌دهد احتمالاً گسترش پروتئین رخ می‌دهد. نتایج به‌دست‌آمده تأیید می‌کند که نانوذرات الماس قادرند ویژگی‌های ساختاری پروتئین آلبومین را تا حد زیادی در مجموعه نانوذرات الماس با پروتئین آلبومین تغییر دهد؛ بنابراین استفاده از نانوذرات الماس در مصارف پزشکی نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۹۷-۰۲-۳۰-۳۶۸۶۵ با کد اخلاق IR.TUMS.MEDICINE.REC.1398.192 است.

## References

1. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets Ther*. 2019;11:151.
2. Tiwari A, Saraf S, Jain A, Panda PK, Verma A, Jain SK. Basics to advances in nanotherapy of colorectal cancer. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(2):319-38.
3. Zivari Fard M, Sharifi M, Shojaei A, Rezayat SM, Mousavi SE, Falahati M. The Investigation of the Toxicity of Palladium Nanoparticles on Human Lymphocyte. *J Nanoanalys*. 2020.
4. Hekmat A, Salavati F, Tackallou SH. The Effects

- 2018;106(6):1697-707.
16. Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol Res.* 2012;1(1):62-8.
  17. Behnke V, Wolf A, Langmann T. The role of lymphocytes and phagocytes in age-related macular degeneration (AMD). *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(5):781-8.
  18. Li Y, Zhou X, Wang D, Yang B, Yang P. Nanodiamond mediated delivery of chemotherapeutic drugs. *J Mat Chem.* 2011;21(41):16406-12.
  19. Xi G, Robinson E, Mania-Farnell B, Vanin EF, Shim KW, Takao T, et al. Convection-enhanced delivery of nanodiamond drug delivery platforms for intracranial tumor treatment. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2014;10(2):381-91.
  20. Yang G, Long W, Yan W, Huang H, Liu M, Ouyang H, et al. Surface PEGylation of nanodiamond through a facile Michael addition reaction for intracellular drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;57:101644.
  21. Lin CL, Lin CH, Chang HC, Su MC. Protein attachment on nanodiamonds. *J Physic Chem A.* 2015;119(28):7704-11.
  22. Perevedentseva E, Cai PJ, Chiu YC, Cheng CL. Characterizing protein activities on the lysozyme and nanodiamond complex prepared for bio applications. *Langmuir.* 2011;27(3):1085-91.
  23. Lin YC, Tsai LW, Perevedentseva EV, Mona J, Cheng CL, Chang HH, et al. The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells in vitro. *J Biomed Opt.* 2012;17(10):101512.
  24. Samsonova YS, Priezzhev AVE, Lugovtsov AE, Petrova GP, Gibizova VVe, Ye YS, et al. Investigation of interaction of albumin molecules with diamond nanoparticles in aqueous solutions by dynamic light scattering. *Quantum Electron.* 2012;42(6):484.
  25. He H, Yang C, Wang F, Wei Z, Shen J, Chen D, et al. Mechanically Strong Globular - Protein - Based Fibers Obtained Using a Microfluidic Spinning Technique. *Angewandte Chemie International Edition.* 2020;59(11):4344-8.
  26. Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin Lab.* 2013;59(9-10):945-52.
  27. Wang Y, Wang X, Wang J, Zhao Y, He W, Guo Z. Noncovalent interactions between a trinuclear monofunctional platinum complex and human serum albumin. *Inorgan Chem.* 2011;50(24):12661-8.
  28. Chakraborty S, Joshi P, Shanker V, Ansari Z, Singh SP, Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir.* 2011;27(12):7722-31.
  29. Khanal D, Kondyurin A, Hau H, Knowles JC, Levinson O, Ramzan I, et al. Biospectroscopy of nanodiamond-induced alterations in conformation of intra-and extracellular proteins: a nanoscale IR study. *Analyt Chem.* 2016;88(15):7530-8.
  30. Aramesh M, Shimoni O, Ostrikov K, Prawer S, Cervenka J. Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds. *Nanoscale.* 2015;7(13):5726-36.
  31. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
  32. Guan B, Zou F, Zhi J. Nanodiamond as the pH - responsive vehicle for an anticancer drug. *Small.* 2010;6(14):1514-9.
  33. Yu SJ, Kang MW, Chang HC, Chen KM, Yu YC. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity. *J Am Chem Soc.* 2005;127(50):17604-5.
  34. Wang HD, Niu CH, Yang Q, Badea I. Study on protein conformation and adsorption behaviors in nanodiamond particle-protein complexes. *Nanotechnology.* 2011;22(14):145703.
  35. Albani JR. Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies: Elsevier; 2011.
  36. Maciążek-Jurczyk M, Morak-Młodawska B, Jeleń M, Kopeć W, Szkudlarek A, Owczarzy A, et al. The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity. *Pharmaceuticals.* 2021;14(3):285.
  37. Sleep D. Albumin and its application in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(5):793-812.
  38. Chakraborty B, Sengupta C, Pal U, Basu S. Acridone in a biological nanocavity: detailed spectroscopic and docking analyses of probing both the tryptophan residues of bovine serum albumin. *New J Chem.* 2017;41(21):12520-34.
  39. Kanakis C, Tarantilis P, Polissiou M, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi H. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *J Mol Struct.* 2006;798(1-3):69-74.
  40. Pi Y, Shang Y, Peng C, Liu H, Hu Y, Jiang J. Interactions between bovine serum albumin and gemini surfactant alkanediyl -  $\alpha$ ,  $\omega$  - bis (dimethyldodecyl - ammonium bromide). *Biopolymers: Original Res Biomol.* 2006;83(3):243-9.