

اثر نانوذرات اکسیدروی بر استرس اکسایشی در سلول‌های سرطان ریه غیرکوچک انسان A549

مهناز کسمتی*، فاطمه پورعطار و الهام حویزی

ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۴

چکیده

سرطان ریه از رایج‌ترین سرطان‌ها در مردان و زنان است و در سطح جهانی در حال گسترش می‌باشد. مطالعات پیشین نشان دادند که استفاده از نانوذرات اکسیدروی به علت خواص منحصر به فردشان، می‌تواند عامل امیدبخشی در درمان سرطان باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی بر استرس اکسایشی در سلول‌های سرطانی غیرکوچک ریه انسان (A549) می‌باشد. سلول‌های A549 با غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسیدروی تیمار شد و سنجش MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو برای تعیین IC50 و توان زیستی سلول در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. همچنین برای بررسی اثرات آپوپتوزی غلظت IC50 این نانوذرات از روش‌های رنگ آمیزی گیمسا و اکریدین اورنج/تیدیوم بروماید و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسیدروی درصد بقای سلول‌های A549 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داده و غلظت IC50 به دست آمده ۵ mg/mL بود. نتایج رنگ‌آمیزی نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز یافته در گروه‌های تیمار سلولی بود. همچنین نتایج آنزیمی نشان داد که فعالیت هر دو آنزیم در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسیدروی توانایی القای مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی ریه دارند و امید است که در آینده بتوان با هدفمند کردن این نانوذره به عنوان یک ترکیب دارویی جدید در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات اکسیدروی، سرطان ریه، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵-۰۶۱، پست الکترونیکی: m.kesmati@scu.ac.ir

مقدمه

سرطان ریه را براساس اندازه و بروز سلول‌های بدخیم به دو گروه اصلی طبقه‌بندی می‌نمایند: سرطان ریه با سلول‌های کوچک (SCLC) که ۱۵ درصد از موارد سرطانی را شامل می‌شود و سرطان ریه با سلول‌های غیرکوچک (NSCLC) که ۸۵ درصد موارد باقیمانده را در بر می‌گیرد و NSCLC خود به سه زیر گروه پاتولوژیکی عمده تقسیم می‌شود که شامل: ۱- سلول‌های کارسینومای سنگفرشی ۲- سلول‌های آدنوکارسینوما ۳- کارسینومای ریه با سلول‌های بزرگ (۱۱).

نحوه مقابله با سرطان ریه یکی از چالش‌های امروز سرطان

امروزه بیماری‌های صعب‌العلاج فراوانی در جامعه بشری گسترش یافته است. با پیشرفت جوامع و رواج سبک زندگی شهری حدود یک چهارم مرگ‌ومیرها به علت سرطان رخ می‌دهند (۴ و ۱۰). تا اوایل قرن بیستم سرطان ریه از جمله بیماری‌های نادری بود که پس‌از آن به تدریج گسترش یافت به طوری که امروزه سرطان ریه اولین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در خانم‌ها (۲۶٪) و آقایان (۲۹٪) و از نظر آماری دومین سرطان رایج (با نسبت ۱۵ درصد از کل سرطان‌ها) پس از سرطان سینه در خانم‌ها و پروستات در آقایان است (۳).

می‌توانند از غشا سلولی عبور کنند و با متابولیسم درون سلولی ارتباط برقرار کنند. همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که نانوذرات اکسیدروی منجر به استرس اکسیداتیو، آسیب به هموستازی کلسیم، التهاب و پاسخ‌های آپوپتوتیک سلول‌های ریه می‌شود (۶، ۱۲، ۱۶ و ۲۱).

آپوپتوز به‌عنوان یک فرایند کلیدی در بیماری سرطان مورد توجه است و توانایی فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز و ادامه‌ی تکثیر یکی از ویژگی‌های اولیه‌ی سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود و بنابراین توانایی القای آپوپتوز در این سلول‌ها یک هدف اصلی و مهم در درمان سرطان می‌باشد (۶). فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول به‌عنوان روشی حفاظت شده و تحت کنترل ژن-هاست که در تنظیم میزان رشد، تکثیر سلول‌ها، تکوین و سلامت بدن بسیار مهم است (۵).

یافته‌های کنونی نشان داده‌اند که ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن یعنی ROS در سلول‌های هدف یکی از تنظیم‌کننده‌های فرایند آپوپتوز می‌باشد (۲). در طی فعالیت‌های نرمال سلولی گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن تولید می‌گردد، این گونه‌های فعال اکسیژن در سطح پایین فیزیولوژیکی به‌عنوان پیام‌رسان ردوکس (اکسایش-کاهش) و تنظیم درون سلولی عمل می‌کنند، در حالیکه در سطح بالا تغییرات اکسیداتیو ایجاد کرده باعث مهار عملکرد پروتئین و پیشبرد مرگ سلولی می‌شوند. برای جلوگیری از عدم تعادل ردوکس و آسیب‌های اکسیداتیو، سدهای دفاعی وجود دارد که شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و تیوردوکسین ردوکتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل آسکوربیک اسید (ویتامین C)، ویتامین E، گلوکاتایون و غیره می‌باشند (۲).

نشان داده شده است که اثرات سمی نانوذرات اکسیدروی در سلول‌های سرطانی که سرعت تکثیر بیشتری نسبت به سلول‌های نرمال دارند بیشتر است (۷) رشما و همکاران در

شناسان محسوب می‌گردد. طی دهه‌های اخیر معمولاً از روش‌های شیمی‌درمانی، پرتو درمانی و جراحی برای مقابله با این سرطان استفاده شده است. این روش‌ها دارای نقاط ضعفی مانند نرسیدن دارو با غلظت کافی به تومور و عدم دقت لازم در دارو رسانی هستند که از عوارض جانبی آن-ها مقاوم شدن بدن در برابر دارو است. بنابراین ابداع راهکارهای درمانی جدید و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد (۳ و ۲۷).

یکی از این راهکارهای جدید در زمینه‌ی درمان سرطان استفاده از نانو تکنولوژی می‌باشد (۲۰). فناوری نانو امکان دستکاری مواد در سطح نانو (۱ الی ۱۰۰ نانومتر) را می‌دهد که زمینه کنترل دقیق خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات و نیز تعاملات آن‌ها با سیستم‌های بیولوژیکی را فراهم می‌سازد (۱). با پیشرفت‌های تکنولوژی و ابزارهای پزشکی کاربرد نانوذرات رشد چشم‌گیری داشته است. نانوذرات مواد طبیعی یا مصنوعی هستند که می‌توانند از روش‌های مختلف سنتز شوند و معمولاً ساختار کریستالی دارند. تبدیل کردن مواد به مقیاس نانو عمدتاً می‌تواند خواص الکتریکی، مغناطیسی، ساختاری، مورفولوژیکی و شیمیایی آن‌ها را تغییر دهد (۷، ۱۹ و ۲۸).

نانوذرات اکسیدروی جزء پرمصرف‌ترین نانو مواد در تولیدات مصرفی هستند که به‌طور فزاینده‌ای در صنعت از جمله الکترونیک، لوازم آرایشی و غیره کاربرد دارند و با داشتن خواص منحصر به فردی مثل اندازه‌ی کوچک، نسبت بیشتر سطح به حجم، سازگاری زیستی، قدرت انتخابی بالا، سمیت افزایش یافته، سنتز آسان و عملکرد برترشان اهمیت روز افزونی در درمان مدرن سرطان دارند (۱۶ و ۲۱).

با این حال دانش کمی درباره مکانیسم‌های سمیت نانوذرات اکسیدروی در سلول‌های انسانی وجود دارد. این خواص منجر به واکنش دهندگی شیمیایی بالاتر و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. نانوذرات به‌راحتی

لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت شمارش سلولی انجام گرفت. همچنین مورفولوژی سلولی نیز در همه گروه‌ها پس از تیمار با میکروسکوپ اینورت مشاهده و عکس‌برداری شد و به‌منظور تمییز بهتر تغییرات مورفولوژی از رنگ آمیزی گیمسا (سیب زیست فن، ایران) استفاده شد. در ادامه جهت تعیین نوع مرگ سلولی القا شده در گروه‌های تیمار از روش رنگ آمیزی اکریدین اورنج/تیدیوم بروماید استفاده شد. برای بررسی اثر نانوذره اکسیدروی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های A549 ابتدا عصاره سلولی تهیه شد. بدین صورت که پس از کشت و تیمار سلول‌ها با استفاده از تریپسین EDTA (USA, Gibco) جدا شدند. پس از سانتریفیوژ دو بار با PBS سرد شست‌وشو داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر لیزبافر به رسوب سلول‌ها اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه با دور ۱۰۰۰۰ RPM سوپرناتانت حاصل جهت انجام تست مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری پروتئین کل نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد انجام شد. همچنین اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس مهار احیای نیتروبلو ترازولیوم توسط آنزیم موجود در نمونه انجام گرفت. اندازه‌گیری کاتالاز نیز براساس کاهش پراکسید هیدروژن در واحد زمان در اثر فعالیت آنزیم موجود در نمونه انجام شد. جهت آنالیز آماری داده‌های بدست آمده از نرم‌افزار Instat نسخه‌ی ۳ و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel 2016 رسم و تفاوت‌ها در سطح ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

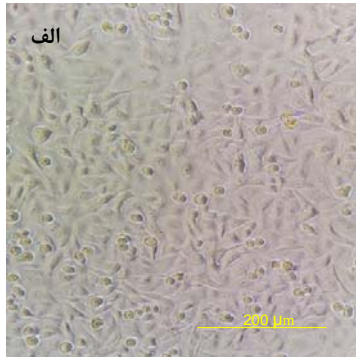
بررسی مورفولوژی سلولی: سلول‌های سرطانی A549 پس از کشت و تیمار با غلظت IC50 از نانوذره اکسیدروی با میکروسکوپ اینورت مشاهده و بررسی شدند. در مورفولوژی سلولی گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه

سال ۲۰۱۷ افزایش تولید ROS را به‌عنوان مکانیسم اولیه‌ی سمیت در رده‌ی سلولی HEK293 معرفی کردند (۲۰). همچنین مشخص شده که نانوذرات اکسیدروی از تکثیر سلولی جلوگیری کرده و آپوپتوز را به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در سلول‌های آدنوکارسینوما‌ی ریه‌ی انسان القا می‌کند (۲۶). بدین ترتیب نانوذرات اکسیدروی قابلیت ضد تکثیری را در سلول‌های سرطانی دارا می‌باشند. اما سمیت آن برای سلول‌های نرمال چالشی است که باید چاره‌ای برای آن اندیشید. از این‌رو، هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی بر القای استرس اکسایشی و مرگ سلول‌های سرطانی A549 است.

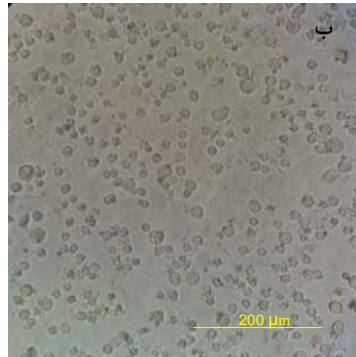
مواد و روشها

رده‌ی سلولی آدنو کارسینوما‌ی ریه A549 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شده و براساس پروتکل رایج نگهداری و تکثیر شد. به‌منظور سنجش سمیت سلولی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. سلول‌ها به تعداد 1×10^4 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید روی (Lolitec Co., Germany) تیمار شدند. پس از طی ۲۴ ساعت از تیمار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma, USA) با غلظت ۰/۵ mg/mL به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck, آلمان) به هر چاهک اضافه شد و در ادامه جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ساخت شرکت Biotek آمریکا خوانده شد. همچنین این تست در روزهای ۱، ۳، ۵، و ۷ روز پس از تیمار با غلظت IC50 نیز انجام شد. در ادامه میزان بقای سلولی با روش رنگ‌سنجی تریپان بلو برای مدت ۱، ۳، ۵، و ۷ روز با غلظت IC50 از تیمار سنجیده شد. بدین صورت که پس از کشت سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه، تیمار سلولی انجام شد. سپس با استفاده از

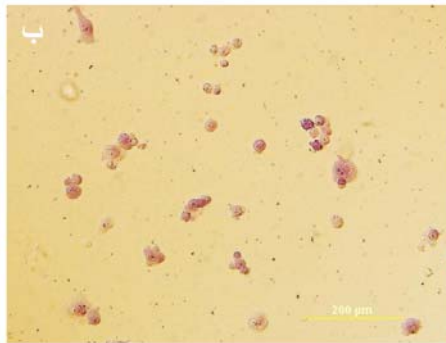
به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. مورفولوژی سلول‌ها در نمونه کنترل کاملاً طبیعی بود به طوری که، سلول‌ها کاملاً کشیده با غشاء سالم و برخی در حال تقسیم دیده شدند. اما سلول‌های تحت تیمار تغییراتی مانند کاهش حجم سلولی گرانوله شدن سلول‌ها، تراکم کروماتین درون هسته و تولید اجسام آپوپتوزی را از خود نشان دادند (شکل ۲).



کنترل تغییراتی مشاهده شد که شامل کروی شدن سلول، چروکیده شدن، جمع شدن سلولی و دانه‌دار شدن سلول‌ها بود (شکل ۱). باگذشت زمان این تغییرات در تعداد بیشتری از سلول‌های تیمار مشاهده شد به طوری که پس از گذشت ۷ روز بسیاری از سلول‌های گروه تیمار معلق و مرده بودند. به‌منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات مورفولوژیکی پس از تیمار سلول‌ها، با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و



شکل ۱- مورفولوژی رده سلولی A549: در تصویر "الف"، مورفولوژی طبیعی سلول‌های A549 بدون هیچ تیمار ویژه‌ای قابل مشاهده می‌باشد، در تصویر "ب"، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با ۰/۱ mg/mL نانوذره اکسیدروی نشان داده شده است. کاهش حجم سلول، گرانوله شدن سلول‌ها و همچنین چروکیده شدن غشاء سلول‌ها در تصاویر "ب" قابل مشاهده می‌باشد.

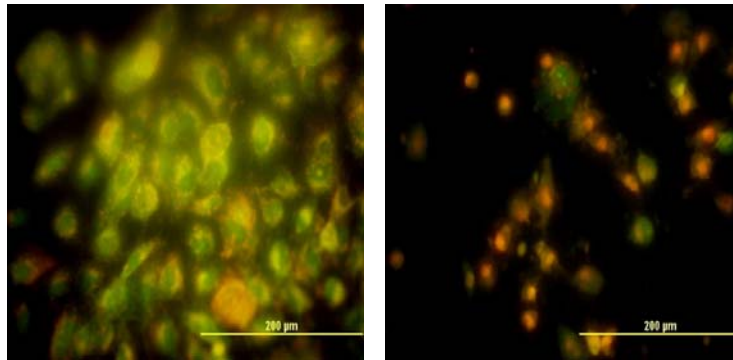


شکل ۲- رنگ‌آمیزی رده سلولی A549: در تصویر "الف" مورفولوژی طبیعی سلول‌های A549 بدون هیچ تیمار ویژه‌ای، به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی گیمسا قابل مشاهده می‌باشد. تصویر "ب"، مورفولوژی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت IC50، ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسیدروی و رنگ‌آمیزی گیمسا نشان داده شده است و چروکیدگی سیتوپلاسم سلولی، کاهش حجم سلولی، گرانوله شدن سلول‌ها، تراکم کروماتین درون هسته و تولید اجسام آپوپتوزی قابل مشاهده می‌باشد.

سبز دیده می‌شوند در حالی که سلول‌هایی که در مرحله‌ی آپوپتوز قرار دارند نارنجی‌رنگ مشاهده می‌شوند. در گروه‌های تحت تیمار با نانوذره اکسیدروی تعداد سلول‌ها با رنگ نارنجی افزایش چشمگیری در مقایسه با گروه

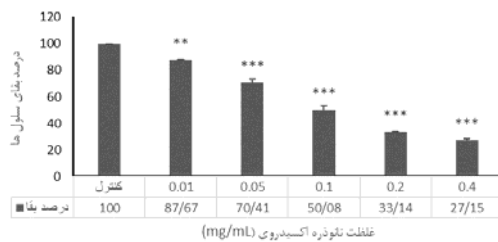
بررسی مرگ سلولی: در ادامه به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط نانوذره اکسیدروی بر رده‌ی سلولی A549 از روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/تیدیوم بروماید استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده به رنگ

کنترل داشتند (شکل ۳).



شکل ۳- رنگ آمیزی اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید رده سلولی A549: در تصویر "چپ"، که نشان‌دهنده‌ی گروه کنترل است، بیشتر سلول‌ها سبز رنگ می‌باشند و در حالت نرمال قرار دارند. تصویر "راست"، سلول‌ها پس از تیمار با غلظت IC₅₀، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذره اکسیدروی و رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید نشان داده شده اند و تعداد کمی از سلول‌ها زنده با کروماتین سبز رنگ و بیشتر آن‌ها سلول‌های آپوپتوزی با کروماتین نارنجی رنگ با تراکم بالا و قطعه قطعه شده قابل مشاهده می‌باشد.

MTT بود (نمودار ۳). در روز هفتم پس از تیمار همهی سلول‌های گروه تیمار از کف چاهک جدا شده و در شمارش سلولی زیر لام نئوبار سلولی دیده نشد.



نمودار ۱- بررسی بقای سلول‌ها در گروه‌های کنترل و تیمار با نانوذره اکسید روی با روش MTT. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذره اکسیدروی بر زیست پذیری سلول‌های A549 در زمان ۲۴ ساعت. IC₅₀ به دست آمده برای سلول‌های A549 در دوز ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

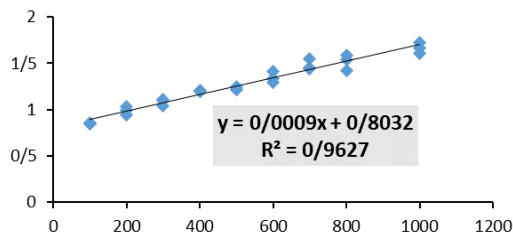
*** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار درصد بقای گروه‌های تیمار با کنترل در سطح ($P < 0.001$) است.

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار درصد بقا در مقایسه با کنترل در سطح ($P < 0.01$) است.

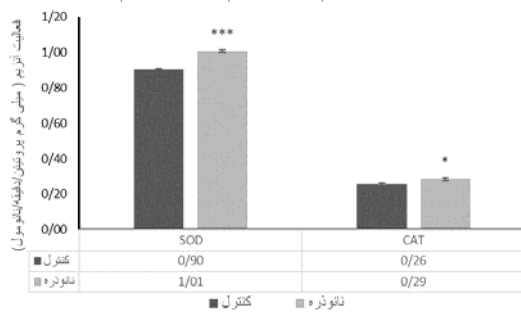
سنجش فعالیت‌های آنزیمی: جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین در همهی نمونه‌ها، (تیمار و کنترل)، از روش برادفورد استفاده شد و ابتدا نمودار استاندارد آن رسم شد

بقای سلولی: آزمایش MTT جهت بررسی اثر نانوذره اکسیدروی بر زیست‌پذیری سلول‌های A549 در زمان ۲۴ ساعت و با غلظت‌های (۰/۴، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر) انجام شد. نتایج آماری نشان داد که زیست‌پذیری سلول‌های A549 بعد از مواجهه با این دوز-ها از نانوذره اکسیدروی به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه-ی کنترل کاهش یافت به طوری که بقای سلولی به ترتیب به میزان (۲۷/۱۵، ۳۳/۱۴، ۵۰/۰۸، ۷۰/۴۱ و ۸۷/۶۷ درصد) رسید (نمودار ۱). IC₅₀ به دست آمده برای سلول‌های A549 در دوز ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد.

در گروه‌های تیمار سلولی با غلظت ۰/۱ mg/mL (IC₅₀) از نانوذره اکسیدروی باگذشت زمان در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ درصد بقای سلولی به ترتیب به میزان (۴۸/۸۶، ۲۳/۵۱، ۸/۶۸ و ۵/۶۹ درصد) کاهش یافت که بیانگر وابسته به زمان بودن تیمار بود (نمودار ۲). از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو نیز برای تأیید نتایج حاصل از سنجش MTT استفاده شد. سلول‌های A549 پس از تیمار با غلظت IC₅₀ از تیمار نانوذره اکسیدروی در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ با رنگ تریپان بلو با کمک لام نئوبار شمارش شدند. نتایج حاصل از این روش تأییدی بر نتایج حاصل از سنجش



نمودار ۴- نمودار استاندارد برادفورد. جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین در همه‌ی نمونه‌ها، (تیمار و کنترل)، ابتدا نمودار استاندارد آن رسم شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد و معادله‌ی خط آن، غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین جهت بیان میزان فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین انجام شد



نمودار ۵- مقایسه‌ی فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در گروه‌های کنترل و تیمار نانوذره سلول A549

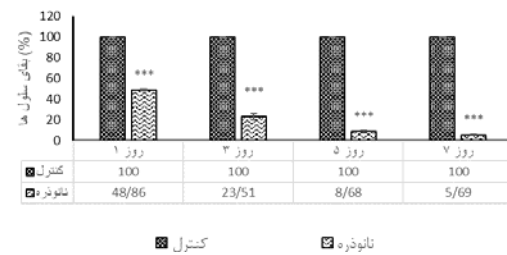
*** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌ها در گروه تیمار با کنترل در سطح ($P < 0/001$) است.

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌ها در گروه تیمار با کنترل در سطح ($P < 0/05$) است.

بحث و نتیجه‌گیری

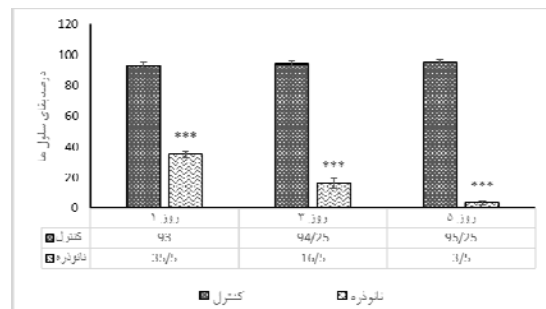
در طول صد سال گذشته مرگ‌ومیر ناشی از سرطان سیر صعودی داشته است، در این بین سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است و سالانه بیش از یک میلیون مرگ‌ومیر در سراسر جهان به سرطان ریه NSCLC (که ۸۵ درصد از موارد ریه را به خود اختصاص داده) مربوط می‌شود (۱۳ و ۱۷). استراتژی‌های درمانی به‌شدت و نوع بدخیمی و مرحله‌ی سرطان در زمان تشخیص بستگی دارد، اما در اغلب موارد شامل ترکیبی از جراحی، شیمی‌درمانی و پرتو درمانی می‌باشد. استفاده از این روش‌ها در درمان سرطان دارای معایبی است یکی از این معایب آسیب رسیدن به سلول‌های سالم اطراف تومور

(نمودار ۴). سپس با استفاده از نمودار استاندارد و معادله‌ی خط آن، غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد.



نمودار ۲- مقایسه‌ی میزان بقای سلولی A549 در سنجش MTT در غلظت IC50 از نانوذره اکسیدروی در روزهای مختلف.

*** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار درصد بقای گروه‌های تیمار با کنترل در سطح ($P < 0/001$) است.



نمودار ۳- مقایسه‌ی میزان بقای سلولی رده‌ی A549 در روش رنگ آمیزی تریپان بلو در غلظت IC50 از نانوذره اکسیدروی در روزهای مختلف.

*** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار درصد بقای گروه‌های تیمار با کنترل در سطح ($P < 0/001$) است.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین جهت بیان میزان فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین انجام شد. با محاسبه‌ی میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه کنترل و گروه تیمار با غلظت IC50 از نانوذره اکسیدروی و آنالیز آماری پس از آن، نمودار آن رسم شد (نمودار ۵).

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه تیمار با نانوذره اکسیدروی در مقایسه با کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/001$). نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه تیمار با نانوذره اکسیدروی در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/05$).

شده با نانوذره اکسیدروی، تمامی سلول‌ها از حالت کشیده خارج، کروی شده و هسته‌ها به صورت متراکم مشاهده گردید. در حالی که در گروه‌های سلولی کنترل تمامی سلول‌ها سالم، سرحال، کشیده و با مورفولوژی نرمال دیده شدند.

همچنین برای تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط نانوذره اکسیدروی از رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید استفاده شد. نتایج نشان داد که در گروه تیمار تعداد سلول‌های نارنجی رنگ آپوپتوز یافته بیشتر از سلول‌های سالم سبز رنگ بود و در گروه کنترل تقریباً تمامی سلول‌ها سالم و سبز رنگ دیده شدند. از مجموعه بررسی‌های مورفولوژی با رنگ‌های گیمسا و اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید می‌توان دریافت که تیمار نانوذره اکسیدروی، منجر به فعال شدن روند آپوپتوز در رده سلول‌های سرطانی A549 می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط سلواکوماری و همکارانش انجام گرفت، اثر نانوذره اکسیدروی بر سلول‌های سرطانی ریه (A549) و سلول‌های سرطانی سینه (MCF7) سنجیده شد و نشان داده شد که این نانوذره باعث سمیت قابل ملاحظه و تغییرات مورفولوژیکی در هر دو رده سلولی می‌شود (۲۰ و ۲۲). وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴ تحقیقی در مورد اثر سمیت نانوذره اکسیدروی، بر رده سلولی آدنوکارسینومای ریه‌ی انسان (LTP-a2) انجام دادند و بقای سلولی را با استفاده از روش‌های MTT و تریپان بلو سنجیدند. نتایج تحقیقاتی این گروه نشان داد که نانوذرات اکسیدروی از تکثیر سلولی جلوگیری کرده و آپوپتوز را به‌طور قابل ملاحظه‌ای در این سلول‌ها القا می‌کنند (۲۶).

شارما و همکارانش در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند که قرار دادن سلول‌های HepG2 در معرض نانوذرات اکسیدروی باعث افزایش مرگ سلولی آپوپتوزی از طریق مسیر داخلی میتوکندری می‌شود (۲۱ و ۲۳). ریشما و همکارانش در تحقیقات خود نشان دادند که نانوذرات اکسیدروی سبب

می‌باشد (۸). بنابراین یافتن اثرات درمانی ترکیبات جدید که بتواند از آن‌ها به‌عنوان دارو در ترکیب با داروهای موجود برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده کرد، یکی از اولویت‌های کلیدی محسوب می‌شود. تحقیقات نشان داده است که نانوذرات می‌توانند خواص بیولوژیکی متعدد از جمله خاصیت ضد ویروس و ضد توموری داشته باشند (۸، ۱۴ و ۱۵). در این مطالعه اثرات ضد سرطانی نانوذرات اکسیدروی با غلظت‌های مختلف بر رده سلولی (A549) مورد بررسی قرار گرفت و زیست‌پذیری و تکثیرپذیری سلول‌ها بررسی شد. آنالیز بقای سلولی نشان داد که نانوذرات اکسیدروی دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلولی A549 به صورت وابسته به دوز و زمان بودند، به گونه‌ای که در غلظت‌های پایین رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل، تغییر کمتری یافته بود اما در غلظت‌های بالاتر به‌طور بسیار معنی‌داری باعث مهار رشد این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد. و با گذشت زمان نیز کاهش بقای سلولی شدیدتر و از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین نتایج به دست آمده از دو آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT در یک راستا بوده و یکدیگر را تأیید کردند.

باتوجه به این موضوع که آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر و آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و روند مهمی در جهت کنترل تکثیر سلول‌ها و حفظ هوموستاز طبیعی بدن محسوب می‌شود (۵) بنابراین القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یکی از مکانیسم‌های عملکردی داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی است و در درمان سرطان ضروری می‌باشد. از این رو پژوهش‌گران در جهت درمان سرطان و در راستای فعال کردن سازوکار مرگ برنامه ریزی شده در تلاش هستند (۱۵). در ادامه‌ی کار توانایی ایجاد آپوپتوز توسط نانوذره اکسیدروی در رده سلولی A549 بررسی شد در این پژوهش پس از رنگ آمیزی رده سلولی سرطانی با رنگ گیمسا، تغییرات مورفولوژیک سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که در گروه‌های سلولی تیمار

را در سلول‌های آدنوکارسینوما ریه (A549) تیمار شده افزایش می‌دهند. آن‌ها در مطالعه خود پیشنهاد کردند که استرس اکسایشی مکانیسم اولیه‌ی سمیت نانو رادهای اکسیدروی در سلول‌های A549 باشد (۶). نتایج ما در این مطالعه نیز مطابق با این تحقیق بود.

وهاب و همکاران در تحقیق خود نشان دادند که نانوذرات اکسیدروی باعث ایجاد سمیت و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 و MCF7 می‌شوند و این اثرات احتمالاً از طریق تولید ROS و استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۵). نل و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که تولید ROS در نانو مواد مختلفی از جمله نانوذرات اکسید فلزی فولرن‌های کربن و نانولوله‌های کربنی دیده شده است. ROS و تولید رادیکال‌های آزاد یکی از مکانیسم‌های اصلی نانو ذرات است که باعث استرس اکسیداتیو، التهاب و منجر به آسیب ارگانسیم‌های سلولی می‌شود (۱۸). کئونگ نام و چنگ تنگ و همکارانشان اظهار داشتند که هنگامی که استرس اکسیداتیو بیش از توانایی آنتی‌اکسیدانی سلول باشد آسیب اکسیداتیو بر بیومولکول‌های حیاتی سلولی رخ می‌دهد و منجر به مرگ سلول می‌شود از این‌رو ROS ناشی از نانوذرات اکسیدروی را یکی از علل مستقیم مرگ سلولی ناشی از نانوذرات اکسیدروی دانسته‌اند (۲۴ و ۲۹). باتوجه به نتایج این تحقیق، نانوذره اکسیدروی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز و زمان درصد بقای سلول‌های سرطانی A549 را کاهش داد و باعث القای مرگ سلولی بواسطه استرس اکسیداتیو در آن‌ها شد. باین‌حال لازم است که مطالعات بیشتری برای روشن ساختن مکانیسم عمل القای مرگ سلولی ناشی از نانوذرات اکسیدروی در سلول‌های سرطانی مختلف صورت گیرد.

سپاسگزاری

هزینه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین

سمیت در سلول‌های جنین کلیه انسان HEK293 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. آن‌ها همچنین نشان دادند که تعاملات نانوذرات اکسیدروی با این سلول‌ها سبب تولید ROS در فعالیت‌های میتوکندری و منجر به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، گردید (۱۸). به‌علاوه در مطالعه‌ای که توسط اختر و همکارانش انجام شد، گزارش شد که نانوذرات اکسیدروی از طریق افزایش میزان ROS، از مسیر P53 باعث القا آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد HepG2 و سرطان ریه A549 و برونکوس BEAS-2B می‌شود. این در حالی است که تأثیر چندانی بر سلول‌های طبیعی (آستروسیت موش و هیپاتوسیت‌ها) نداشت (۷).

مکانیسم‌های مولکولی دقیق نانوذرات هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. نانوذرات میزان رادیکال‌های آزاد داخل سلولی را افزایش می‌دهند، بنابراین استرس اکسیداتیو می‌تواند به‌عنوان پاسخی برای آسیب سلولی در نظر گرفته شود. تولید رادیکال آزاد در مورد هر نانوذره دارای مکانیسم سلولی و مولکولی متفاوت است (۹). استرس اکسایشی می‌تواند تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در سلول فعال یا مهار کند. در ادامه‌ی کار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را که جزئی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند و در سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند، به‌عنوان بیومارکرهایی از استرس اکسایشی بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های سلولی تیمار شده با نانوذرات اکسیدروی از رده‌ی سلولی نسبت به گروه‌های کنترل به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت، که این نتیجه می‌تواند تأییدی بر مکانیسم سمیت نانوذره اکسیدروی از طریق القا ROS باشد.

در مطالعه‌ای که توسط احامد و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت مشخص شد که نانو رادهای (نانوذره میله‌ای شکل) اکسیدروی منجر به تولید ROS بین سلولی می‌شود و سطوح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز

چمران اهواز به خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارد.

گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید

منابع

- ۱- بایرامی، ا.، شیدایی، پ.، و اربابی، س.، ۱۳۹۷. بررسی اثرات سمیتی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر پارامترهای خونی و سرمی موش سفید آزمایشگاهی، مجله پژوهش‌های جانوری، دوره سی و یکم، شماره ۴، صفحات ۴۸۲-۴۷۲.
- ۲- خوش طبیعت، ل.، و مهدوی، م.، ۱۳۹۴. نقش استرس اکسیداتیو در تکثیر بی‌رویه و مرگ سلولی، مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره بیست و پنجم، شماره ۱۲۷، صفحات ۱۴۵-۱۳۰.
- ۳- عسکریان، س.، و کاظمی اسکویی، ر.، ۱۳۹۴. انتقال SiRNA به سرطان ریه با استفاده از نانوذرات، مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، دوره ششم، شماره ۳، صفحات ۵۷-۴۸.
- ۴- کاروی، ع.، شاهانی پور، ک.، و منجمی، ر.، ۱۳۹۶. مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدرو الکلی گیاه سداب (*Ruta graveolens*) بر رده سلولی سرطان پروستات (DU145)، مجله پژوهش‌های جانوری، سال سی‌ام، شماره ۳، صفحات ۳۵۲-۳۴۵.
- ۵- هنردوست، م.، سلیمانجاهی، ح.، و رجایی، ف.، ۱۳۹۲. آپوپتوز: مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال هفدهم، شماره ۳، صفحات ۵۷-۴۸.
- 6- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Raja, M., and Ahmad, I., 2011. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: Role of oxidative stress. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7, PP: 904-913.
- 7- Ahamed, M., Javed Akhtar, M., Kumar, S., Khan, M., Ahmad, J., and Alrokayan, S. A., 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 7, PP: 845-857.
- 8- Babu, A., Templeton, A. K., Munshi, A., and Ramesh, R., 2013. Nanoparticle-based drug delivery for therapy of lung cancer: Progress and challenges, *Journal of Nanomaterials*, 2013, PP: 1-11.
- 9- Bisht, G., and Rayamajhi, S., 2016. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent, *Nanobiomedicine*, 3, PP: 1-9.
- 10- Boyle, P., 2000. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *British Medical Journal*, 321, PP: 805-808.
- 11- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., and Matthay, R. A., 2011. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32, PP: 605-644.
- 12- Fu, J., Dang, Z., Deng, Y., and Lu, G., 2012. Regulation of c-Myc and Bcl-2 induced apoptosis of human bronchial epithelial cells by zinc oxide nanoparticles, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8, PP: 669-675.
- 13- Gursoy, O., and Kınık, O., 2010. Probiotics: a new popular option for cancer inhibition. *International Journal of Dairy Science*, 5, PP: 241-244.
- 14- Jithan, A. V., Madhavi, K., Madhavi, M., and Prabhakar, K., 2011. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International journal of pharmaceutical investigation*, 1, 119 p.
- 15- Kalepu, S., and Nekkanti, V., 2016. Improved delivery of poorly soluble compounds using nanoparticle technology: a review. *Drug delivery and translational research*, 6, PP: 319-332.
- 16- Kumar, V., Sharma, N., and Maitra, S. S., 2017. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. *International Nano Letters*, 7, PP: 243-256.
- 17- Kummalu, T., 2005. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88, PP: 1725-1734.
- 18- Nel, A., Xia, T., Madler, L., and Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *SCIENCE*, 311, PP: 622-627.
- 19- Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., and Wingett, D. G., 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and

- potential for drug delivery applications. *Expert opinion on drug delivery*, 7, PP: 1063-1077.
- 20- Reshma, V. G., and Mohanan, P. V., 2017. Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney HEK 293 cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, PP: 182-190.
- 21- Scherzad, A., Meyer, T., Kleinsasser, N., and Hackenberg, S., 2017. Molecular mechanisms of Zinc oxide Nanoparticle-induced genotoxicity short running title: Genotoxicity of ZnO NPs. *Materials*, 10, PP: 1-19.
- 22- Selvakumari, D., Deepa, R., Mahalakshmi, V., Subhashini, P., and Lakshminarayan, N., 2015. Anti Cancer activity of zno nanoparticles on MCF7 breast cancer cell and A549 lung cancer cell. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10, PP: 5418-5421.
- 23- Sharma, V., Anderson, D., and Dhawan, A., 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells HepG2. *Apoptosis*, 17, PP: 852-870.
- 24- Teng Ng, C., Qing Yong, I., Prakash hande, M., Nam Ong, C., Yu, I., huat Bay, B., and hun Baeg, G., 2017. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Nanomedicine*, 12, PP: 1621-1637.
- 25- Wahab, R., Siddiqui, M. A., Saquib, Q., Dwivedi, S., Ahmad, J., and Musarrat, J., et al. 2014. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, PP: 267-276.
- 26- Wang, C., Hu, X., Gao, Y., and Ji, Y., 2015. ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTP-a-2 cells, *BioMed Research International*, 2015, PP: 1-9.
- 27- Wang, X., Yang, L., Chen, Z., and Shin, D. M., 2008. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 58, PP: 97-110.
- 28- Wingett, D. G., Louka, P., B Anders, C., Zhang, J., and Punnoose, A., 2016. A role of ZnO nanoparticle electrostatic properties in cancer cell cytotoxicity, *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, PP: 29-45.
- 29- Yu, K. N., Yoon, T. J., Minai-Tehrani, A., Kim, J. E., Park, S. J., and Jeong, M. S., et al., 2013. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation, *Toxicology in Vitro*, 27 (4), PP: 1187-1195.

The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Oxidative Stress in A549 Human Non-small Lung Cancer Cells

Kesmati M., Pouratar F. and Hoveizi E.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran.

Abstract

Lung cancer is one of the most common cancers in both men and women and it is growing worldwide. Previous studies have shown that using Zinc Oxide nanoparticles (ZnO-NP) can be a promising agent in cancer treatment, because of their unique properties. The purpose of current study is to investigate the effect of ZnO-NP on oxidative stress in A549 human non-small lung cancer cells. A549 cells were treated with different concentrations of Zinc Oxide nanoparticles. MTT assay and Trypan blue staining were performed to measure IC50 concentration and cell viability on days 1, 3, 5 and 7. Also, to investigate the apoptotic effects of IC50 concentration of these nanoparticles, Giemsa and AO/EB staining methods and anti-oxidant enzymes superoxide dismutase and catalase activity measurements were used. The results showed that ZnO-NP reduced the A549 cells viabilities in a dose and time dependent manner, and the obtained IC50 concentration was 5mg/mL. The results of stainings indicated an increase in percentage of apoptotic cells in treatment groups. Furthermore, enzyme measurement results showed that the activity of both enzymes in treatment groups was significantly increased in comparison to the control group. The results of this study demonstrated that ZnO-NP have the ability to induce cell death in lung cancer cells and we hope that with organizing this nanoparticle as a new medical compound, it will be used in cancer treatment.

Key words: Zinc Oxide Nanoparticles, Lung Cancer, Oxidative Stress, Apoptosis