Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(87): 74-83

Cytotoxicity of Zno and Ag/Zno nano-composites on malignant melanoma cell line (A375)

Mahdavirad M[1], Najafzadeh N[2]*, Ali Niapour A[2], Jafari A[3]

1- Department of Biology, Tehran Shargh branch, University of Payame Noor, Tehran, Iran
2- Department of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3- Department of Microbiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Received:28 Apr 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: Melanoma is a malignant tumor of melanocytes, early-stage melanomas can be treated effectively with surgery alone, but more advanced cancers often incurable. The incidence of melanoma malignancy in most countries has risen faster than any other cancer types. It was the first time which we evaluated the cytotoxic effects of zno and Ag/zno nano-composites (NP) on melanoma cell line, A375, viability.

Materials and Methods: In this experimental study**,** A375 cell line was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) at 37°C in 5% CO2, then the effects of different concentrations of zno and Ag/zno nano-composites on melanoma cell were evaluated by MTT, clonogenic survival assays, and acridine orange/ ethidium bromide staining.

Results: Herein, we demonstrated that Zno and Ag/zno nano-composites showed similar effects on cytotoxicity of melanoma cancer cells. In a dose dependent manner, a significant cytotoxicity was observed with increasing of zno and Ag/zno. The inhibitory concentration 50% (IC50) values of the nano-composites for A375 cell line after 24 hrs were 7.24±1.55 and 15.93±1.73 µg/ml for zno and Ag/zno, respectively.

Conclusion: The results showed that zno and Ag/zno has ability to induce cytotoxicity in the human melanoma cancer cell line in lower micromolar concentrations. In conclusion, these findings may introduce a new view on the mode of action and possible application of new nano-composites in the cancer chemotherapy.

Keywords: Ag, Zno, Apoptosis, Nano-composites

*Corresponding Author:
Address: Department of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
Email: n.najafzade@arums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره۶ (شماره پیاپی۸۷)، شهریور ۱۳۹۳، ۸۳-۷۴

اثرات ضد سرطانی نانوکامپوزیت اکسید روی و ترکیب نانویی نقره با اکسید روی بر سلول‌های رده سرطانی بدخیم ملانوما (A-375)

مینا مهدوی راد[۱]، نوروز نجف زاده[۲*]، علی نیاپور[۲]، علیرضا جعفری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۳- مربی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد واحد اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: ملانوما تومور بدخیمی است که از ملانوسیت‌های پوست منشاء می‌گیرد و این بیماری در مراحل اولیه جراحی قابل درمان است ولی با پیشرفت بیماری غیرقابل درمان می‌شود. مطالعه حاضر اولین مطالعه در مورد اثر ضد سرطانی نانوکامپوزیت Ag/Zno و Zno روی میزان بقاء رده سلولی سرطان ملانوما (A-375) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی(مداخله‌ای) رده سلولی سرطان ملانوما در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شد و سپس تاثیر رقت‌های مختلف نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره بر روی این سلول‌ها به روش‌هایMTT، ارزیابی کلونی و رنگ آمیزی آکریدین و اتدیوم بروماید بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد تاثیر نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/نقره، روی مرگ سلول‌های سرطانی ملانوما مشابه اکسید روی است. با افزایش غلظت‌های اکسید روی و ترکیب اکسید روی با نقره اثرات ضد سرطانی قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. IC50 (غلظتی از ترکیب مورد بررسی که ۵۰ درصد از حیات سلولی را به نصف کاهش می‌هد) دارو بر روی سلول‌های رده A-375 به ترتیب برای نانوکامپوزیت اکسید روی و ترکیب آن با نقره، ۱/۵۵±۷/۲۴ و ۱/۷۳±۱۵/۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت اکسید روی و ترکیب آن با نقره، توانایی القا مرگ سلولی روی سلول‌های سرطان ملانوما در غلظت‌های در حد میکرومولار دارد و این یافته‌ها دیدگاه جدیدی را در زمینه استفاده از نانوکامپوزیت در شیمی درمانی سرطان فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: اکسید روی، نقره، آپوپتوز، ترکیب نانویی

***نویسنده مسئول:** اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی،

Email: n.najafzade@arums.ac.ir

مقدمه

نانوتکنولوژی شاخه جدیدی از علم می‌باشد که کاربردهای وسیعی داشته و نانوذرات با ترکیبات و اندازه‌ها، شکل و خصوصیات شیمیایی سطحی مختلف می‌توانند کاربردهای بیولوژیکی و زیست پزشکی مختلفی داشته باشند. کاهش اندازه مواد در مقیاس نانو می‌تواند اغلب باعث تغییرالکتریکی، مغناطیسی، خواص ساختاری و مورفولوژیکی و شیمیایی آنها شود. ذرات نانو به طور معمول دارای درصد بیشتری از اتم‌ها در سطح خود هستند که باعث افزایش واکنش‌های سطحی می‌شود. طراحی مناسبی از نانو مواد می‌تواند در هدف قراردادن سلول‌های سرطانی خاص کاربرد داشته باشد. نانوذرات به علت دارا بودن ویژگی‌هایی چون بالابودن نسبت سطح به حجم وکوچک بودن ابعاد، با نفوذ به میکرو ارگانیسم‌ها خواص ضد باکتری و مغناطیسی دارند، هم‌چنین با داشتن خواص فتو کاتالیستی، کاتالیستی و یونی، کاربرد گسترده‌ایی در مبارزه با میکروب‌های پاتوژن انسانی، باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها دارند(۴-۱).

محققان نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی با آزاد کردن zn^{+2} باعث مرگ سلول‌های شوان (Schwann) می‌شود. تحقیقات بر روی مکانیسم حفاظتی نانوذرات اکسید فلزی رو به افزایش است. مطالعات بادکوبه و همکاران نشان داده است که مصرف هم‌زمان اکسید روی و داکسوروبیسین باعث کاهش سمیت تولید مثلی دوکسوروبیسین می‌شود(۵). نانو ذرات نقره با تولید بنیان‌های فعالی هم‌چون یون‌های اکسیژن و هیدروکسید، با تخریب ساختارهای آلی و برهم کنش شدید با پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیستم انتقال الکترون، اقدام به مختل نمودن متابولیسم، تکثیر و تنفس میکروارگانیسم نموده و قادر است در شرایط آزمایشگاهی تا ۹۹/۹ درصد، بیش از ۶۵۰ نوع از باکتری‌ها گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک‌های رایج را از بین ببرد. نانوذرات فلزی در بافت‌های انسانی و کشت‌های سلولی سمومی تولید می‌کنند که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش فرآورده‌های التهابی هم‌چون سایتوکین‌ها می‌شود و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌گردد. نانوذرات بزرگ‌تر توسط میتوکندری و هسته جذب می‌شوند و موجب ایجاد جهش در DNA و تخریب ساختار میتو کندری و حتی مرگ سلول می‌گردند. اندازه و ابعاد، ترکیب شیمیایی، شکل، ساختار سطحی، بارالکتریکی سطح، تراکم و میزان حلالیت، فاکتورهای کلیدی در تعیین میزان سمیت نانو ذرات می‌باشند. تاثیر دقیق نانوذرات اکسید روی و نقره بر روی سلول‌های سرطانی کاملا مشخص نشده است اما افزایش تولید ROS یکی از مکانیسم‌های احتمال محسوب می‌شود زمانی که ترکیبات نانو مواد به سلول‌های سرطانی برخورد می‌کند مکانیسم دفاعی سلولی برای به حداقل رساندن آسیب فعال می‌شوند، با این حال اگر تحریک تولید ROS در داخل سلول توسط نانوذرات بیش از ظرفیت دفاعی آنتی اکسیدانی سلول باشد سلول‌ها طی فرایند مرگ سلولی آپوپتوز از بین می‌روند(۶، ۷).

تعامل الکترواستاتیکی نانو ذرات باعث جذب آنها به سلول‌های هدف شده است. نانوذرات با بار مثبت به سلول‌های سرطانی که دارای درصد بالایی از فسفولیپیدهای آنیونی و گروهای خاصی از پروتئین‌های باردار و کربو هیدرات‌ها را در سطح بیرونی خود دارند جذب می‌شوند(۲، ۸).

ملانوما تومور بدخیمی است که از ملانوسیت‌ها یا خال‌های تغییر شکل یافته ایجاد می‌شود. ملانومای بدخیم دو درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود ولی عامل یک درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان است. در دنیا تعداد افراد مبتلا به سرطان ملانوما نسبت به بقیه سرطان‌ها به سرعت در حال افزایش است و شیوع آن در بین جوامع مختلف متفاوت می‌باشد و هر ۱۰ تا ۲۰ سال میزان مبتلا به ایین بیماری دو برابر می‌شود. در استرالیا این بیماری چهارمین سرطان شایع در بین مردان و سومین سرطان رایج در بین زنان می‌باشد(۹). علیرغم این که شیوع این بیماری در آمریکا بین سال‌های ۱۹۵۰الی ۱۹۹۰ پنج برابر شده است اما میزان مرگ و میر ناشی از بیماری تنها دو برابر شده است. مطالعات اولیه روی شیوع این بیماری روی قسمت‌های مختلف بدن نشان داد که در مردان بیشتر در پشت بدن و

شانه‌ها و در خانم‌ها در اندام تحتانی بیشتر شایع است. اخیرا استراتژی کنترل بیماری بیشتر روی پیش‌گیری این بیماری متمرکز شده است.

از عوامل مستعدکننده این بیماری داشتن نژاد سفید، در معرض آفتاب شدید قرار گرفتن، سابقه خانوادگی، ژنتیک، سابقه ملانومای قبلی، سرکوب ایمنی و خال‌های غیرطبیعی است. تلاش‌های متعددی جهت درمان مؤثر این بیماری انجام شده است و روش‌های درمانی آن شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و ایمنی درمانی می‌باشد. در نوع موضعی بیماری، جراحی مؤثرترین روش درمانی است، ولی این نوع بدخیمی معمولاً متاستاتیک می‌شود که بیان‌گر اهمیت سایر روش‌های درمانی است(۱۰).

از زمان کشف نانوذرات، بسیاری از نانو ذرات تولید شده‌اند و ممکن است فعالیت سیتوتوکسیک آنها هم مورد بررسی قرارگرفته باشد. اخیرا تعداد کمی از آنها به عنوان داروی ضد سرطان در برابر چندین سرطان انسانی استفاده می‌شود(۱۱، ۱۲).

اگرچه امروزه استفاده از داروهای شیمی درمانی رایج می‌باشد ولی در بسیاری از موارد به علت ایجاد مقاومت بدن در مقابل آنها سبب مرگ بیمارشده است(۱۳). بنابراین، بسیاری از تلاش در جهت کشف داروهای ضدسرطانی با تأثیر بیشتر و با سمیت کمتر می‌باشد(۱۶-۱۴). در این مطالعه، برای اولین بار اثرسیتوتوکسیکی و مکانیسم‌های عمل نانوذرات اکسید روی ونانوکامپوزیت اکسید روی و نقره برروی سلول‌های سرطانی ملانوما رده (A-375) را مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

داروها: جهت انجام این مطالعه تجربی (مداخله‌ای) از نانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره سنتز شده طی تجزیه اگزالات استفاده شد، فرایند سنتز این نانو ذرات قبلا شرح داده شده است. اندازه نانوذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره به ترتیب برابر ۲۴/۷۵و۱۲/۱۵ نانومتر می‌باشد و تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ SEM نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره دقیقا به شکل کروی وخوشه‌ایی می‌باشد(۱۴، ۱۷). استوک اولیه نانوذرات در آب مقطر و در محیط اسیدی تهیه شد.

کشت سلولی: رده سلولی A375 از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (شرکت Gibco) و ۱ درصد محلول آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (شرکت Gibco) کشت داده شد و در انکوباتور، در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری گردید.

گروه‌های مورد سنجش

الف)گروه کنترل که تحت تاثیر هیچ گونه دارویی قرار نگرفت.

ب) گروه‌های درمانی که تحت تیمار با غلظت‌های بین ۶/۱۵ و ۹۸/۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانو ذرات اکسید روی و با غلظت‌های بین ۵ و ۸۰ میکروگرم از نانوکامپوزیت ترکیب نقره با اکسید روی قرار گرفت.

ارزیابی مورفولوژی سلولی برای آپوپتوز: سلول‌ها در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند سپس با Trypsin/EDTA جدا شده و بعد از سانتریفوژ، ۱۲۰۰۰ سلول در پلیت شش خانه کشت شده و به مدت هفت روز، با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره تیمار شدند. بعد از ۷۲ ساعت تیمار، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید(شرکت سیگما) به هر خانه پلیت اضافه شد و ۵ دقیقه بعد با میکروسکوپ فلوئورسنت مدل المپیوس تصاویری تهیه گردید. سلول‌های آپوپتوتیک، هسته قطعه قطعه شده دارند و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل تشخیص می‌باشند. علاوه بر آن با این روش می‌توان سلول‌های آپوپتوتیک اولیه با هسته متراکم سبز کم رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم را از سلول‌های آپوپتوتیک تاخیری با هسته متراکم قرمز فلوئوروسنت و

قطعه قطعه شده تشخیص داد. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص می‌باشند و هم‌چنین سلول‌های سالم به رنگ سبز پررنگ، قابل تشخیص هستند.

برای ارزیابی کلونی سلولی، ابتدا سلول‌ها از کف پلیت جدا شدند و تعداد ۱۲۰۰۰ سلول در ۶ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شده و در پلیت شش خانه به تعداد ۲۰۰۰ سلول درهر خانه کشت، اضافه شد. سلول‌ها به مدت یک شب انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانویی اکسید روی و نقره قرار گرفتند. بعد از ۱۰روز سلول‌ها با کریستال ویوله (۰/۵ درصد کریستال ویوله که درمتانول ۲۰ درصد حل شده است) رنگ آمیزی شدند. از کلونی‌های سلولی، تصاویری با میکروسکوپ معکوس (Invert) تهیه شد و کلونی‌ها با بیش از ۵۰ سلول، با برنامه ایمیج جی (Image J) شمارش شدند.

ارزیابی تکثیر سلولی با روشMTT: برای ارزیابی تکثیر سلولی، بعد از تریپسینه شدن حدود ۴ میلیون سلول در ۱۴ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شده و در پلیت ۹۶ خانه در حدود ۱۰۰ میکرو لیتر در هر خانه اضافه شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی با استوک‌هایی از نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانویی اکسید روی و نقره با غلظت‌های ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تعویض شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و بعد به هر خانه ۲۰ میکرولیترMTT (شرکت مرک آلمان) و۱۸۰میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. سپس به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و پس از ۴ ساعت سانتریفوژ شده و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO (شرکت مرک آلمان) اضافه شد. جهت تعیین IC50 (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد از سلول‌ها را از بین می‌برد) به دستگاه الایزا انتقال داده شد، سپس جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

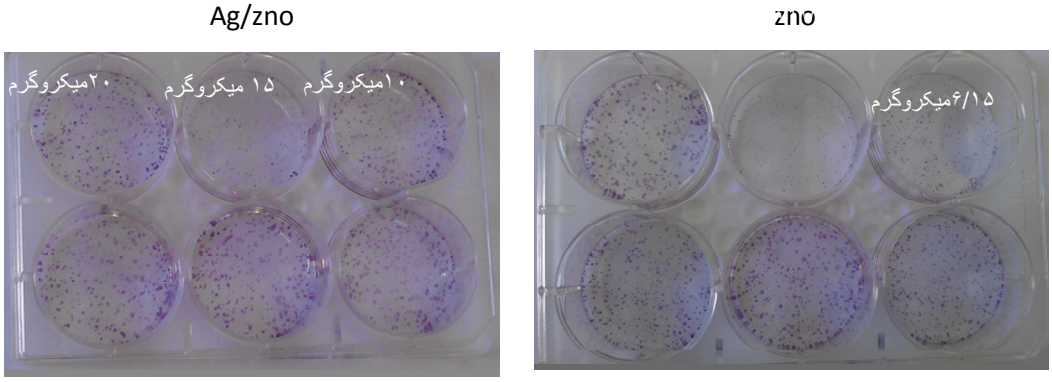
در پایان اطلاعات به دست آمده از شمارش کلونی‌ها با نرم افزار آماریSPSS نسخه ۱۶ و تست‌های آماری آنووا و تست تکمیلی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند. هم‌چنین میزان IC50 با استفاده از نرم افزار سیگما پلات (Sigma plot ver.11) تعیین شد.

یافته ها

ارزیابی تعداد کلونی: ارزیابی تعداد کلونی‌ها با رنگ آمیزی کریستال ویوله نشان داد که تعداد کلونی‌هایی با بیش از پنجاه سلول با افزایش غلظت نانوکامپوزیت کاهش یافته به طوری که در سلول‌های تیمار شده با اکسید روی، تعداد کلونی‌ها در غلظت‌های بالای ۲۴/۶۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت و غلظت‌های ۳۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره باعث جلوگیری از شکل‌گیری کلونی شدند، ولی غلظت‌های ۱۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره در مقایسه با گروه کنترل تاثیر چندانی بر کاهش تعداد کلونی نداشته است(جدول۱ و شکل ۱).

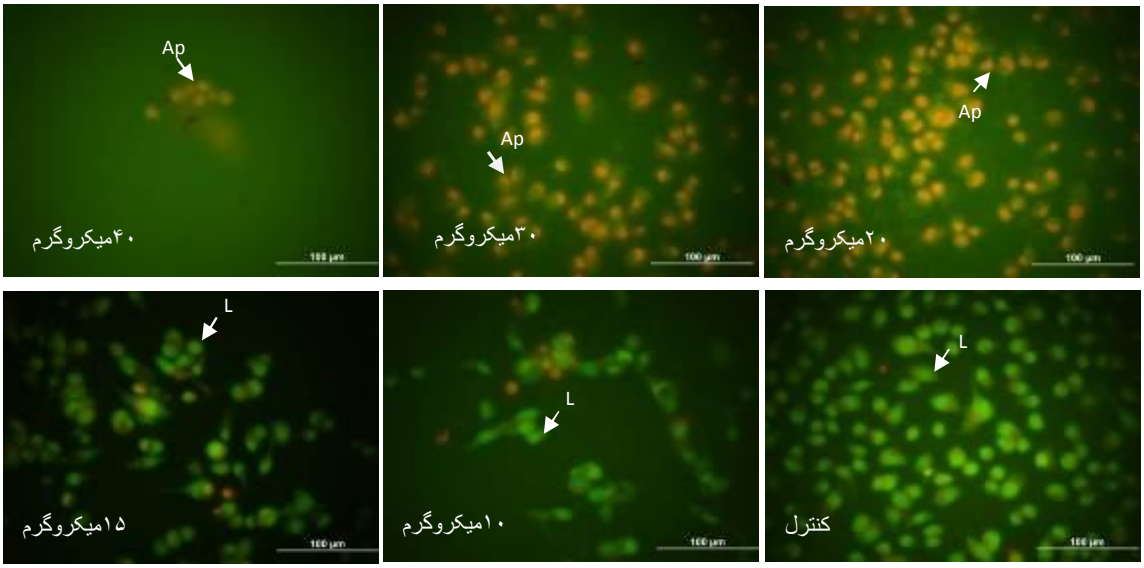
جدول ۱. ارزیابی تعداد کلونی تحت تاثیر غلظت نانوکامپوزیست

غلظت	Ag/zno	غلظت	zno
۰	۰±۲۱۱	۰	۱±۱۱۷
۴۰	[a]۰/۷۱±۵۸/۳۳	۳۶/۹۲	[a]۰/۵۸±۳/۳۳
۳۰	[a]۰/۷۱±۱۷۰/۳۳	۲۴/۶۱	[a]۹/۷۱±۳۴/۳۳
۲۰	[a]۰.۷۱±۱۶۵/۳۳	۱۸/۴۶	[a]۱±۸۱/۳۳
۱۵	۰/۷±۲۱۵/۳۳	۱۲/۳۱	۱/۱۵±۱۱۷/۳۳
۱۰	۶/۳۶±۲۰۵/۳۳	۶/۱۵	۱/۵۲±۱۱۷/۳۳

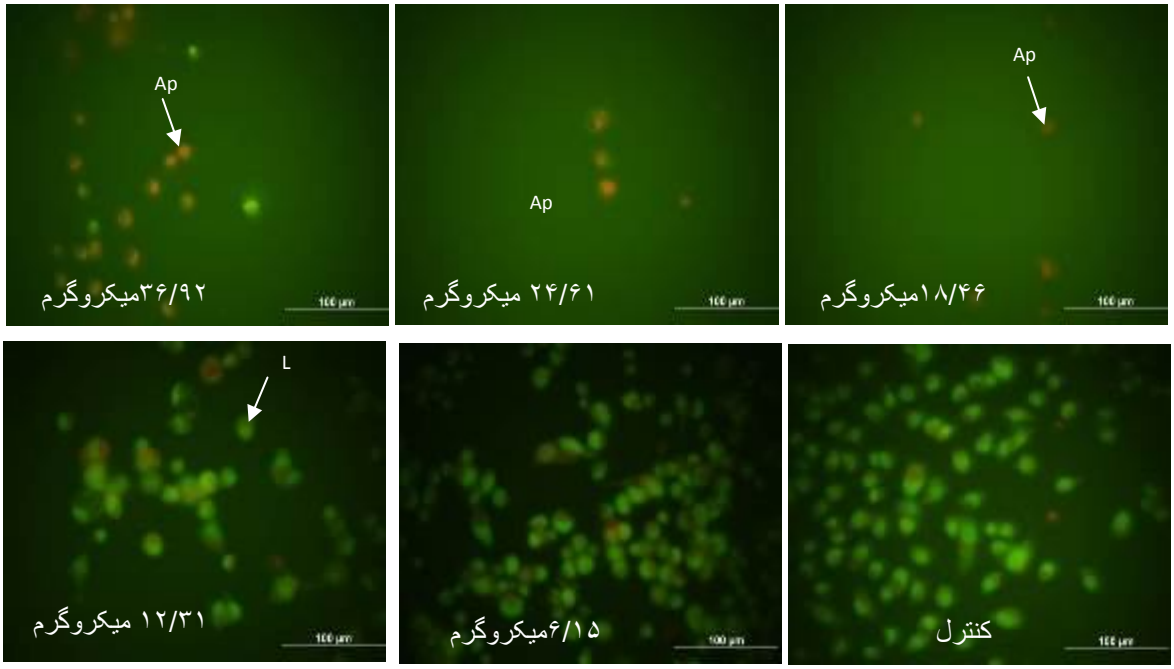


شکل ۱. تصویر کلونی های ایجاد شده رده سلولی سرطان ملانوما بعد از تیمار با غلظتهای مختلف نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانویی اکسید روی و نقره

بررسی مرگ سلولی: سلول‌ها در پلیت ۶ خانه به مدت ۳ روز تحت تاثیر رقت‌های مختلف نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره قرار گرفتند و بعد از رنگ آمیزی با آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید، سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک شمارش شدند. نتایج این رنگ آمیزی نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های بالا، مرگ سلولی بیشتری مشاهده می‌شود، به طوری که غلظت‌های بیش از ۱۵میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت اکسید روی با نقره و غلظت‌های بالای ۱۲/۳۱ میکروگرم اکسید روی باعث افزایش سلول‌های آپوپتوز شده است (شکل ۲ و ۳، جدول۲).



شکل۲: رنگ آمیزی سلول‌ها با روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتدیوم بروماید. بعد از تاثیر غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های فوق، درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک از دوزهای بیشتر به کمتر افزایش یافت. همان گونه که در این تصویر دیده می‌شود سلول‌های زنده با هسته‌ای سبز رنگ از سلول‌های آپوپتوتیک که دارای هسته‌ای زرد رنگ و قطعه قطعه هستند قابل تفکیک می‌باشند، سلول‌های نکروتیک نیز با هسته‌ای قرمز رنگ در شکل مشخص می‌باشد. L مخفف Live و N مخفف Necrosis و Ap مخفف Apoptosis می‌باشد.

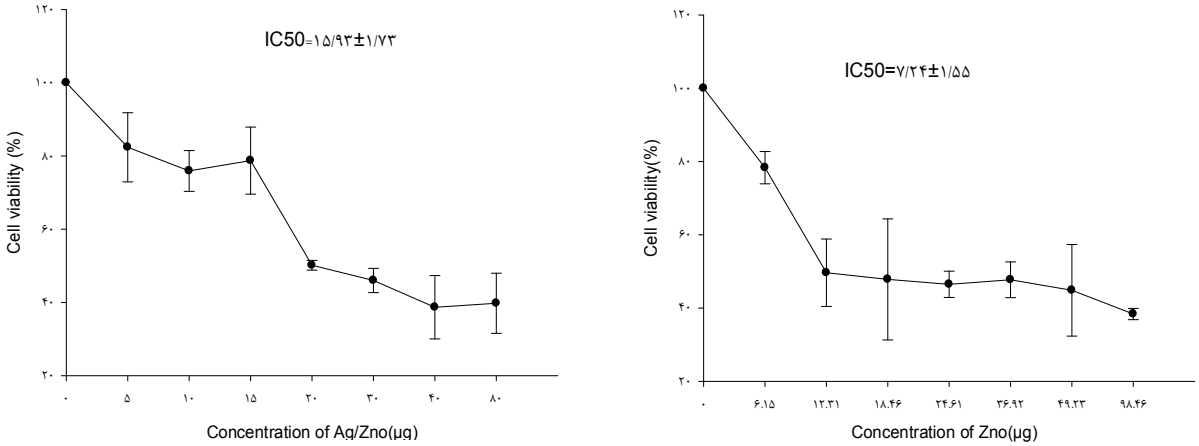


شکل ۳. رنگ آمیزی سلولها با روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتدیوم بروماید بعد از کشت سلولها در حضور غلظتهای مختلف نانوکامپوزیت اکسید روی

بررسی تکثیرسلولی: ارزیابی تکثیر سلولی طی روش MTT نشان می‌دهد که سلول‌های تیمار شده توسط غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت به مدت۲۴ ساعت طی شرایط وابسته به غلظت سبب مهار تکثیرسلول‌های رده ملانوما می‌شود. به طوری که به ترتیب غلظت ۱/۵۵±۷/۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوکامپوزیت اکسید روی و ۱/۷۳±۱۵/۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر از ترکیب نانویی اکسید روی و نقره باعث از بین رفتن نصف سلول‌های ملانوما شد(نمودار ۱).

جدول ۲. بررسی میزان مرگ سلولی در غلظت های مختلف نانو کامپوزیت

Ag/zno				zno		
غلظت(میکروگرم برمیلی لیتر)	درصد سلول‌های زنده	درصد سلول‌های آپوپتوتیک	درصد سلول‌های نکروتیک	غلظت	درصد سلول‌های زنده	درصد سلول‌های آپوپتوتیک	درصد سلول‌های نکروتیک
۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰
۴۰	۰	۱۰/۸۹±۵۹/۹۸	۱۰/۸۹±۴۰/۰۲	۳۶/۹۲	۰	۰±۶۰/۸۴	۱۳/۱±۳۹/۱۵
۳۰	۰/۵۳±۰/۵۴	۶/۱۱±۵۲/۵۰	۶/۴۰±۳۷/۵۲	۲۴/۶۱	۰	۶/۱۱±۵۳/۲	۶/۴۱±۳۷/۳۶
۲۰	۰/۳۱±۰/۳۱	۸/۱۲±۸۲/۲۲	۷/۶۴±۱۷/۴۷	۱۸/۴۶	۴/۵۶±۱۰/۲۹	۱۸/۰۴±۲۹/۲۱	۱۸/۶۵±۶۰/۴۹
۱۵	۱/۱۷±۹۷/۰۴	۰/۹۶±۲/۱۴	۰/۲۶±۰/۸۱	۱۲/۳۱	۳±۹۰	۱/۴۰±۱/۵۹	۱/۵۹±۸/۰۲
۵	۲/۴۷±۹۶/۵	۲±۳/۱۷	۰/۵۷±۰/۳۳	۶/۱۵	۱/۲±۹۸/۴۰	۱/۲±۱/۵۹	۰



نمودار۱. در این نمودار میزان بقا سلولهای رده A375 بعد از تیمار با غلظت های مختلف به صورت درصد ارایه شده است.

بحث

در این مطالعه اثرات ضد سرطانی نانوذرات اکسید روی ونانو کامپوزیت اکسید روی و نقره بر روی سرطان ملانوما رده A-375 بررسی شد.

یافته‌ها نشان داد که میزان حیات سلول‌های رده A-375 در محدوده غلظت‌های بیش از ۱۵میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوگامپوزیت اکسید روی با نقره و غلظت‌های بیش از ۱۲/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اکسید روی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون روند کاهشی از خود نشان می‌دهند. این روند کاهشی متناسب با غلظت نانوذرات می‌باشد به طوری که در غلظت‌های بالا میزان حیات سلولی، کاهش زیادی را در مقایسه با غلظت‌های کمتر از خود نشان می‌دهند و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در غلظت‌های بالای، نانو ذرات اکسید روی با نقره و اکسید روی به تنهایی افزایش یافته است و با کاهش غلظت‌های نانوذرات، تعداد کلونی‌ها افزایش می‌یابد و اختلاف معنی‌داری را در مقابل گروه کنترل که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده از خود نشان نمی‌دهند، ولی در غلظت‌های بالای نانوذرات تعداد کلونی‌ها کاهش می‌یابد و اختلاف معنی‌داری را در مقابل گروه کنترل که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده از خود نشان می‌دهند($p<۰/۰۵$). نتایج بررسی MTT تایید کننده نتایج بررسی‌های کلونی و آکریدین اورنج اتدیوم بروماید هست اما تناقض در عدم مشابهت نتایج MTT با روش کلونی این است که غلظت ۱۲/۳۱ و ۱۸/۴۶ اکسید روی باعث عدم تشکیل کلونی نمی‌شود ولی در روش کلونی این غلظت‌ها باعث از بین رفتن سلول‌ها می‌شود و هم‌چنین غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میکروگرم نانوکامپوزیت اکسید روی با نقره هم کلونی تشکیل می‌شود.

مطالعات قبلی محققان حاکی از آن می‌باشد که نانوذرات اکسید روی طی شرایط وابسته به زمان و غلظت اثرسیتوتوکسیکی دارد و مطالعات ما نیز نشان دهنده این مطلب می‌باشد. برای اولین بار نانوکریستال‌های نقره و اکسید روی در سال ۲۰۰۷ توسط زنگ و همکاران انجام شد، در این مطالعه نشان داده شد که این ترکیب عملکرد فوتوکاتالیستی خوبی دارد و فعالیت نانوکاتالیستی ترکیب نقره با اکسید روی وابسته با ساختار آن است و وجود اجسام نانویی نقره و اکسیژن روی اکسید روی، باعث تقویت فعالیت فوتوکاتالیستی می‌شود(۱۸).

مطالعات لین وهمکاران بر تاثیر ترکیبات نانو و میکرو اکسید روی بر روی سلول‌های سرطانی اپی تلیال ریه انسان نشان داده است که بعد از استفاده از این ترکیبات، سمیت وابسته به زمان و دوز اتفاق می افتد و به دنبال آن سلول‌ها در اثر استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید و آسیب غشا سلولی و DNA از بین می‌روند(۱۹، ۲۰). مطالعات

زیادی روی ترکیبات نانوذرات اکسید روی جهت درمان سرطان انجام شده است، محققان نشان داده اند که اکسید روی به روش وابسته به نوع سلول باعث مرگ سلولی می‌شود و به نظر می‌رسد این نانوذرات روی سلول‌های سرطانی که توانایی تقسیم زیادی دارند بیشترین تاثیر را می‌گذارد. شیمی درمانی سیستمیک اغلب تنها راه حل است، اما فقدان سمیت انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیر قابل تحمل می‌شود. غیر از استفاده از درمان‌های رایج ذکر شده، استفاده از ترکیبات نانوذرات در درمان بعضی از سرطان‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است.

مطالعه اختر و همکاران نشان داد که ترکیبات نانوذرات اکسید روی از طریق مسیر P53 و افزایش میزان Ros باعث القا آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد(HepG2)، ریه (A-549) و برونکوس (BEAS-2B) می‌شود(۱۶، ۱۷). هم‌چنین آشارانی و همکاران تاثیر نانوذرات نقره را روی رده‌های سرطان انسان بررسی کرده‌اند و اثبات کرده‌اند که نانو ذرات نقره در زنجیره تنفسی میتوکندری با تولید Ros اختلال ایجاد می‌کند و نانوذرات نقره با اتصال به DNA باعث توقف سیکل سلولی در فاز G2/M می‌شود(۱۸). هم‌چنین حیدر نژاد و همکاران با مطالعه اثر نانوذرات نقره روی زخم نشان داده‌اند که استفاده از این نانوذرات اثرات سمی روی کبد و هموگلوبین ندارد(۲۱).

نتیجه گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانویی اکسید روی و نقره اثر ضد سرطانی بر روی سلول‌های رده سرطانی ملانومای بدخیم A-375 در غلظت‌های پایین در حد میکرومولار دارد و می‌توان در آینده با انجام مطالعات کامل‌تر از آنها در مقابله با سرطان استفاده نمود. این یافته‌ها دیدگاه جدیدی را در زمینه استفاده از نانوکامپوزیت در درمان سرطان فراهم می‌آورد.

تشکر و قدر دانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب شورای پژوهشی دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق با عنوان "بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات اکسید روی ونانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره روی سلول‌های رده سرطانی ملانوما(A-375) و رده سرطانی معده(AGS)" می‌باشد. کلیه مراحل این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی گروه علوم تشریحی و پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گردیده، لذا بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به عمل می‌آید.

منابع

1. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Journal of nanobiotechnology. 2004;2(1):3-4.
2. Wang ZL. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. Journal of Physics: Condensed Matter. 2004;16(25):R829-30.
3. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 2006; 311(5761):622-7.
4. Alizadeh H, Salouti M, Shapouri R, Abdollahzadeh P, Nasseryan J. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Brucella melitensis 16M in an animal model in Vitro. Arak Medical University Journal. 2012;14(7):64-70.[Persian]
5. Hosseini D. Protective effect of nano-zinc oxide on reproductive system and fertility of adult male Wistar rats following doxorubicin treatment. Arak Medical University Journal. 2013; 16(1):1-9.[Persian]
6. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert opinion on drug delivery. 2010;7(9):1063-77.
7. Wang EC, Wang AZ. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. Integrative Biology. 2014;6(1):9-26.
8. Meulenkamp EA. Synthesis and growth of ZnO nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry B. 1998;102(29):5566-72.
9. Lens M, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of c

utaneous malignant melanoma. British Journal of Dermatology. 2004;150(2):179-85.
10. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. Clinics in dermatology. 2009; 27(1): 3-9.
11. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2007;7(1):3-18.
12. Vekris A, Meynard D, Haaz M-C, Bayssas M, Bonnet J, Robert J. Molecular Determinants of the Cytotoxicity of Platinum Compounds The Contribution of in Silico Research. Cancer research. 2004;64(1):356-62.
13. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer treatment reviews. 2007;33(1):9-23.
14. Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(30): 5465-73.
15. Aryanpour N, Mansouri-Torshizi H, Nakhjavan M, Shirazi FH. Cytotoxicity of Diimine Palladium (II) Complexes of Alkyldithiocarbamate Derivatives on Human Lung, Ovary and Liver Cells. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2012;11(2):689-90.
16. Mansouri-Torshizi H. 2, 2′-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum (II) and palladium (II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. Bioorganic & medicinal chemistry. 2008;16(21):9616-25.
17. Jafari A, Ghane M, Sarabi M, Siyavoshifar F. Synthesis and Antibacterial Properties of Zinc Oxide Combined with Copper Oxide Nanocrystals. Oriental Journal of Chemistry. 2011; 27(3):811-2.
18. Zheng Y, Zheng L, Zhan Y, Lin X, Zheng Q, Wei K. Ag/ZnO heterostructure nanocrystals: synthesis, characterization, and photocatalysis. Inorganic chemistry. 2007; 46(17): 6980-6.
19. Lin W, Xu Y, Huang C-C, Ma Y, Shannon KB, Chen D-R, et al. Toxicity of nano-and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. Journal of Nanoparticle Research. 2009;11(1):25-39.
20. Zhou G, Wang W. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Antiproliferation against Human Lung Cancer Cells In vitro. Oriental Journal of Chemistry. 2012;28(2):651-2.
21. Heydarnejad M, Yarmohammadi-Samani P, Mobini-Dehkordi M, Rahnama S. The influence of topical treatment of dermal wounds with silver nanoparticles on ALT and AST enzymes and hemoglobin in mice (Mus Musculus). ZUMS Journal. 2013;21(86):35-44.