مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۲، شماره ۱
فروردین- اردیبهشت۹۸، صفحه ۱۳۹۲-۱۳۸۴

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 62, No.1 P: 1384-1392
March-May 2019

مقاله اصلی

بررسی اثرات نانو میکروحباب ها هوا و اکسیژن بر سمیت سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد (رده Huh7)

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۰٤- تاریخ پذیرش:۹۸/۰۵/۳۱

سیده مطهره قاسمی[۱]
احسان کریمی[۱]
حمید رضا رحیمی[۲،۳]

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.
۲ گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد ایران.
۳ مرکز تحقیقات التهاب نوروژنیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

* مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی و علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم و فنون نوین
تلفن: ۰۵۱۳۸۷۸۴۱۶۸
Email: rahimihr@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه

کارسینوم کبدی (کارسینوم هپاتوسلولار) یکی از شایع‌ترین سرطان‌های دنیا است و سالانه حدود یک میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. فناوری نانو یکی از فناوری‌های پیشرو در سال های اخیر است که در بخش های کشاورزی، صنعت و سیستم‌های بهداشت و درمان تاثیرات چشمگیری داشته است. در زمینه داروسازی و پزشکی، نانوذرات دارای قابلیت‌های گوناگون برای استفاده در زمینه‌های مختلف طراحی شده‌اند مخصوصا در زمینه تارگت تراپی که روش درمانی اصلی در درمان سرطان هپاتوسلولار کبد است. هدف از این مطالعه بررسی سمیت سلولی نانوحباب های هوا و اکسیژن برالقای مرگ سلولی در سلول های سرطان کبد رده (Huh7) می‌باشد.

روش کار

اثرات سیتوتوکسیک نانومیکروحباب های هوا و اکسیژن بر سلول‌های رده Huh7 که با غلظت‌های مختلف (۱/۹۵-۵۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) نانومیکروحباب‌ها تیمار شده بودند توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تغییر در مورفولوژی رده سلول بررسی شده است.

نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد نانومیکرو حباب ها باعث مهار تکثیر سلول‌های رده Huh7 به طور وابسته به غلظت شده‌اند ($IC50 = 158.60\ \mu l/ml$).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که نانومیکرو حباب‌های حاوی اکسیژن در غلظت‌های معین باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد Huh7 می‌شود و استفاده از این نانومیکرو حباب‌ها می‌تواند روشی امیدوارکننده در درمان سرطان کبد باشد.

کلمات کلیدی

سرطان، رده سلولی Huh7، نانومیکرو حباب، آپوپتوز.

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه

سرطان کبد به عنوان سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان معرفی شده است (۱). اگرچه سرطان کبد در گذشته بیشتر در کشورهای در حال توسعه رایج بوده است اما تقریباً در دو دهه گذشته بروز این نوع سرطان در کشورهای توسعه یافته دو برابر شده است که می‌تواند نتیجه سیروز کبدی باشد (۲). شیمی درمانی به همراه جراحی و تارگت تراپی از روش‌های مرسوم درمان این بیماری است (۳). در حال حاضر داروی دوکسوروبیسین به همراه داروهای دیگر برای بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد(۳،۴). استفاده از چند داروی سایتوتوکسیک، عوارض بسیار زیادی برای بیماران به همراه دارد و در مقابل تاثیری در روند درمان این بیماران ندارد. بنابراین کشف، شناسایی و تولید داروهای جدید با سمیت و اثرات جانبی کمتر و قدرت بیشتر مورد نیاز است(۵،۶). امروزه می‌دانیم که اکثر فرایندهای طبیعی نیز در مقیاس نانومتری اتفاق می‌افتد بنابراین تلفیق نانوفناوری و بیوفناوری خواهد توانست بسیاری از مسائل مرتبط با زیست پزشکی را برطرف نماید و تحول قابل ملاحظه‌ای در زمینه ارتقای سلامت ایجاد کند.

کلمه نانوتکنولوژی اولین بار توسط پروفسور Taniguchi در سال ۱۹۷۴ برای توصیف ساخت درست مواد در مقیاس نانو ابداع شد (۷). نانو فناوری به شناخت و کنترل مواد در ابعاد ۱۰۰-۱ نانومتر اطلاق می‌گردد که در این ابعاد خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی مواد غیر معمول است و می‌توان شاهد کاربردهای جدید و بی‌همتایی از این مواد بود (۸). مواد در ابعاد نانو دارای نسبت سطح به حجم بیش‌تری در مقایسه با ذرات بزرگ تر با ترکیب شیمیایی یکسان هستند و همین امر موجب می شود تا از نظر بیولوژیکی فعال‌تر باشند. بنابراین می‌توان گفت کاهش اندازه ذرات مواد در ابعاد نانو می‌تواند سبب بهبود ویژگی‌های زیستی آن گردد. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و ایمونوتراپی اشاره نمود. بجز درمان‌های رایج ذکر شده، استفاده از میکروحباب‌ها و نانو حباب‌ها در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است زیرا این ترکیبات دارای رفتارهای منحصر به فردی می‌باشند. به عبارتی یک ماکرو حباب مسیری به سمت بالا را با سرعت زیاد طی کرده و پس از رسیدن به سطح متلاشی می‌شود ولی یک نانو حباب می‌تواند در جهت های مختلفی حرکت کرده و برای مدت طولانی پایدار باقی بماند و به تدریج به صورت حباب کوچک شود تا محو گردد (۹).

استفاده از میکرو حباب‌ها و نانو حباب‌ها برای دارورسانی از اثرات جانبی داروها کاسته و عمل درمان را تسریع می‌نماید زیرا فقط بافت بیمار تحت دارورسانی قرار می‌گیرد. با میکرو حباب‌ها و نانو حباب‌ها نیز جراحی‌ها راحت‌تر انجام خواهند شد زیرا می‌توانند به نقاطی از بدن بروند که انسان و ابزار معمولی قادر به دسترسی به آنها نیست (۱۰). یکی از روش‌هایی که اخیرا در پروژه‌های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل و هم چنین هدف دار نمودن داروهای ضد سرطانی جهت تحویل اختصاصی دارو به بافت سرطانی و کم نمودن عوارض جانبی می‌باشند (۱۱) . Wenو همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، نانوحباب‌هایی با یک اندازه را توسط تغییر دادن ضخامت نوار فسفولیپیدی بدون پروسه خالص سازی، یا افزودن سورفاکتانت amphiphilic آماده کردند. نانوحباب‌های تولید شده از ضخامت بهینه لایه فسفولیپیدی، خواص فیزیکی مناسبی را همانند اندازه یکسان حباب، پایداری مناسب و سمیت پایین به نمایش گذاشتند. آن‌ها همچنین توانایی تصویر برداری بهبودیافته نانوحباب‌ها را به صورت *in vitro* و *in vivo* ارزیابی نمودند. شدت بهبود در شرایط *in vivo* در تومور قوی تر از SonoVue پس از تزریق بود. بنابراین، اندازه بهینه ضخامت لایه‌ی فسفولیپیدی می‌تواند منجر به تولید نانوحباب‌هایی شود که برای تصویر برداری تومور موثر هستند (۱۲). در روش SonoVue از گاز بی ضرر گوگرد هگزافلوراید (SF6) جهت افزایش پایداری نانومیکرو حباب‌ها در محیط‌های مایع استفاده می‌شود. بر اساس این یافته‌ها، استفاده از نانومیکرو حباب‌ها می‌تواند پیشرفت قابل توجهی در زمینه تصویربرداری و همچنین تارگت تراپی باشد (۱۳، ۱۴). با توجه به مطالعات فوق، پژوهش جاری با هدف بررسی اثرات

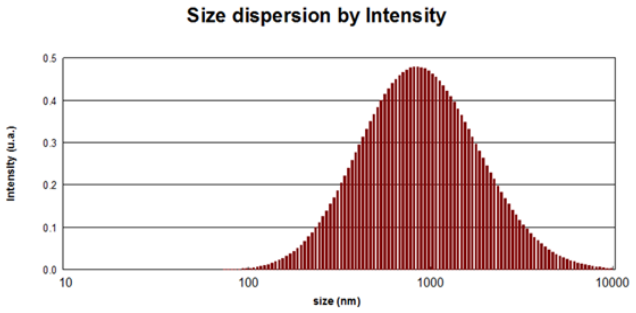
آپوپتوتیک و سمیت سلولی نانومیکروحباب بر سلول‌های رده Huh7 سرطان کبد طراحی و اجرا شد.

در مطالعه دیگر توسط مهجور و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی، نمونه آب غنی شده با نانو میکرو حباب‌های اکسیژن توانسته است به نحو چشمگیری اندازه تومور سرطان سینه(4T1) القا شده بر پشت موش را کاهش دهد و بیان برخی از ژن‌های موثر را تغییر دهد در مطالعه مهجور آمده است که سرطان سینه موش توسط آب غنی شده با میکرو-نانو حباب به شدت در اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن دچار کاهش رشد شده است و تفاوت واضحی در اندازه و موفولوژی نیز ایجاد شده است (۶۱، ۱۵).

روش کار

اندازه و شکل نانومیکرو حباب های سنتز شده توسط دستگاه P.S.A واقع در پژوهشکده هوا خورشید پردیس دانشگاه فردوسی مشهد بررسی شد (شکل۱). به منظور ارزیابی تاثیر نانومیکرو حباب‌های تولید شده بر سلول‌های رده Huh7، سلول‌های از پژوهشکده بوعلی (مشهد، ایران) تهیه و در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (Gibco) ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (Gibco)، ۸۹ ٪ محیط کشت سلول‌های جانوری (DMEM PAN P04-04510) با گلوکز بالا دفریز و در دمای ۳۷ ^{o}c و ۵٪ CO2 انکوبه شدند. پس از تکثیر و رشد سلول‌ها به میزان کافی (۹۰ ٪ تراکم)، سلول‌ها با استفاده از (Gibco)Trypsin- EDTA 1x از کف فلاسک جدا شده و پاساژ داده شدند به این ترتیب که محیط کشت داخل فلاسک‌ها خارج و سلول‌ها توسط DMEM بدون سرم شستشو داده شدند. سپس EDTA1x-Trypsinبه میزان ۰/۵ میلی لیتر به هر فلاسک اضافه و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس فلاسک‌ها از انکوباتور خارج و زیر میکروسکوپ بررسی شدند، در این مرحله واضح بود که سلول‌ها از کف پلیت جدا و به صورت سلول تکی درآمده‌اند، سپس جهت غیرفعال کردن Trypsin،به هر فلاسک ۲میلی لیتر محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و دیواره فلاسک‌ها با پر و خالی کردن ملایم پیپت پاستور شستشو داده شد و سلول‌ها داخل لوله فالکون ۱۵ میلی لیتر منتقل و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفوژ شدند، پس از آن محلول رویی سلول‌ها خالی و به رسوب سلولی محیط حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و تعداد سلول‌ها شمارش شد. پس از شمارش، رده‌های سلولی مورد نظر داخل پلیت ۹۶ چاهکی (پلیت الیزا)، در یک طرح تکراردار ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد و پس از تعویض محیط کشت پس از ۲۴ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوحباب µl/ml ۵۰۰ تا ۱/۹۵ تیمار شده و ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

در گام بعد، محیط را خارج کرده و به منظور سنجش بقای سلولی به هر چاهک ماده MTT[1] اضافه ظرف حاوی سلول‌ها به مدت سه ساعت انکوبه گردید. پس از خارج کردن آن ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO (مرک) اضافه شد. جهت تعیین IC50 (غلظتی از دارو که ۵۰٪ از سلول‌ها را از بین می‌برد) به دستگاه الایزا انتقال داده شد، سپس جذب در طول موج ۵۹۰ و ۶۳۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.گروه‌های مورد سنجش عبارتند از: گروه کنترل که تحت تاثیر هیچ گونه دارویی قرار نگرفت. گروه‌های درمانی که تحت تیمار با غلظت‌های بین ۵۰۰ تا ۱/۹۵۳ میکرولیتر در میلی لیتر از نانوحباب قرار گرفت. با توجه به تجربیات حاصل از آزمایشات، مدت زمان ۴۸ ساعت به عنوان زمان مناسب (optimum) جهت بررسی اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک نانومیکروحباب‌ها انتخاب شد (۱۶-۱۸).



شکل ۱- پراکنش نانومیکروحباب حاوی اکسیژن براساس میزان پراش نور لیزر

[1] (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

نتایج

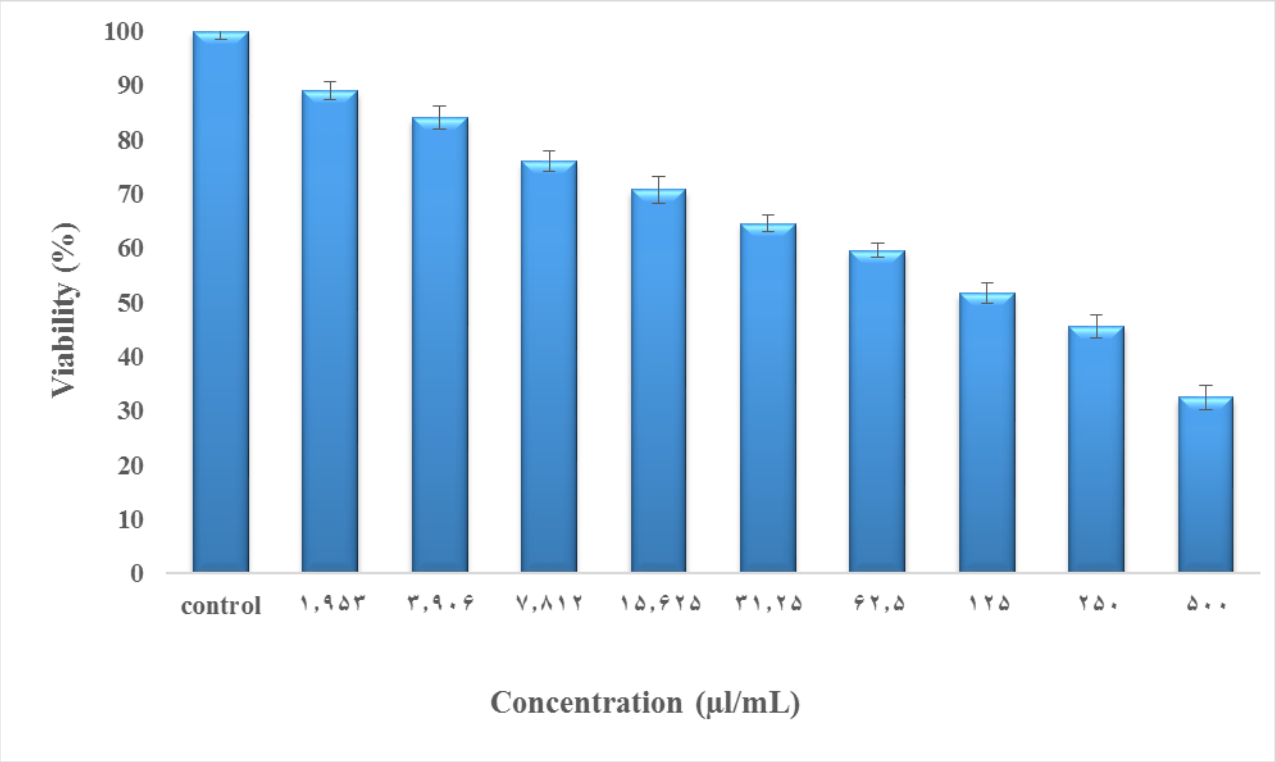
به منظور مشاهده اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانوحباب بر روی رده سلول‌های سرطانی Huh7 اثرات هر غلظت با کمک روش MTT برروی رده سلول‌های سرطانی Huh7مورد بررسی قرارگرفت.

ارزیابی تکثیر سلولی طی روش MTT نشان میدهد که سلول‌های تیمار شده توسط غلظت های مختلف نانوحباب به مدت۴۸ ساعت طی شرایط وابسته به غلظت و زمان سبب مهار تکثیرسلول‌های رده Huh7 می‌شود. پس از ۴۸ ساعت جذب در ۵۹۰ و ۶۳۰ توسط دستگاه الایزا ریدر بررسی شد.

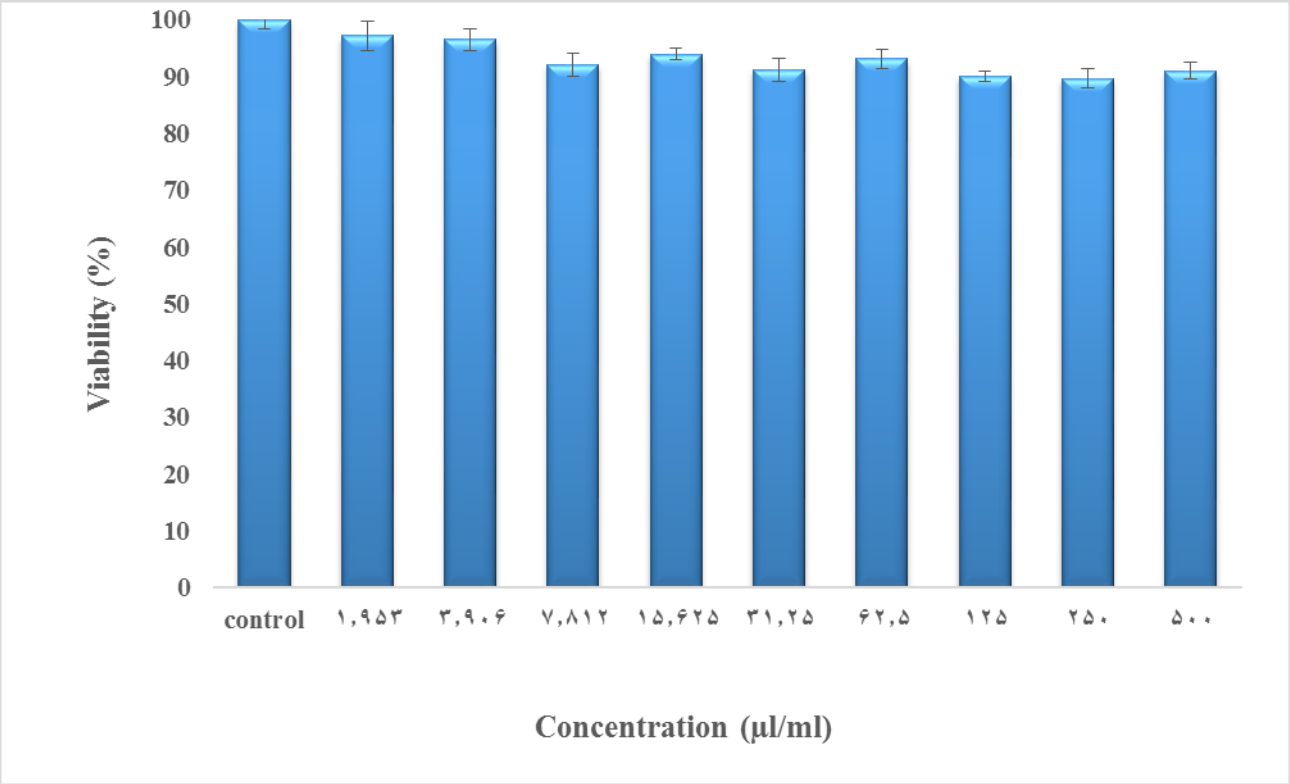
با افزایش غلظت‌های نانوحباب اثرات ضد سرطانی قابل ملاحظه همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده مشاهده شد. این نانوحباب در دوزهای بالا ، درصد بقاء سلول‌ها را به شدت کاهش داد و در زمان ۴۸ ساعت اثرات مهاری چشمگیری بر رشد سلول‌های سرطانی داشت IC50 در ۴۸ ساعت بعد از تیمار نانوحباب حدود ۱۵۸/۶۰ µl/mL گزارش شد.

با توجه به اینکه در زمان تیمار نانومیکروحباب ها حدود ۲۴ ساعت با سلول‌های سرطانی تغییر واضحی ایجاد نشد و براساس تجربیات قبلی زمان تیمار تا ۴۸ ساعت افزایش یافت.

همان طور که در شکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد سلول‌های تحت تیمار با نانوحباب حاوی هوا تغییری نداشته و رشد سلول‌ها پیوسته ادامه داشت.



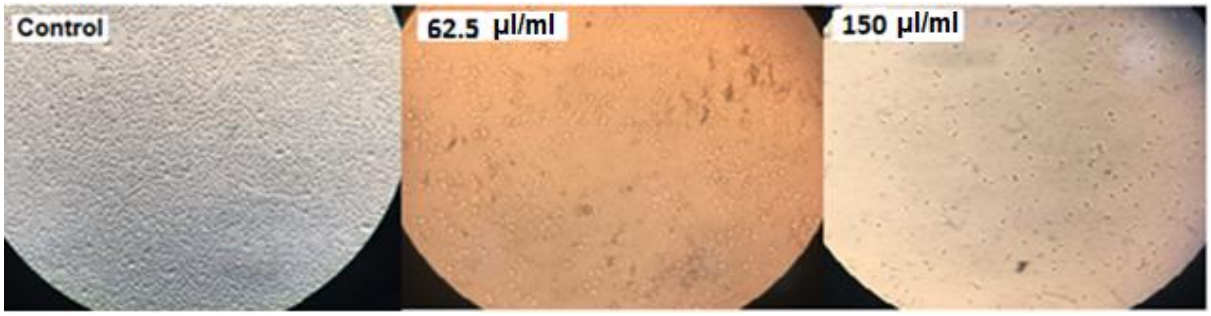
شکل ۳- نمودار حاصل از نتایج تست MTT با نانومیکرو حباب حاوی اکسیژن بر روی رده سلولی Huh7



شکل ۴- نمودار حاصل از نتایج تست MTT با نانو میکرو حباب حاوی هوا بر روی رده سلول Huh7

بررسی مورفولوژی سلول‌هایHuh7 تحت تیمار با نانومیکرو حباب حاوی اکسیژن

تغییرات مورفولوژیک سلول هایHuh7 تیمار شده با نانومیکرو حباب حاوی اکسیژن بررسی گردید. در شکل اعمال اثر سمیت نانومیکرو حباب در غلظت های پایین در مقایسه با گروه کنترل ملاحظه می‌شود. اندازه و تعداد سلول های تحت تیمار با نانومیکرو حباب کاهش یافته و تغییراتی در ظاهر آنها مانند کاهش سیتوپلاسم و جوانه زدن مشاهده می‌شود. با افزایش غلظت نانومیکرو حباب تعداد سلول ها به میزان بیشتری کاهش پیدا می‌کند و از بین می‌روند که نشان دهنده اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت نانومیکرو حباب می‌باشد.



شکل ۵- بررسی مورفولوژی سلول های Huh7 تحت تیمار با نانومیکرو حباب حاوی اکسیژن در غلظت های ۳۱/۲۵ و ۱/۹۵ میکرومول در مقایسه با گروه کنترل. سلول های تیمار شده با افزایش غلظت تغییرات مورفولوژیک بیشتری را نشان دادند و تعداد سلول ها به میزان بیشتری کاهش یافت.

بحث

می‌دانیم که اکثر فرایندهای طبیعی نیز در مقیاس نانومتری اتفاق می‌افتد بنابراین تلفیق نانوفناوری و بیوفناوری خواهد توانست بسیاری از مسائل مرتبط با زیست پزشکی را برطرف نماید و تحولی در زمینه سلامت ایجاد کند. حباب‌های نانو، هوا یا گاز پر شده از میکروسفرهای معلق در یک فاز مایع هستند که با توجه به طول عمر و ثبات آن‌ها در بسیاری جنبه‌ها مثل درمان التهاب، سرطان و اسکن تومور در بدن می‌توانند داشته باشند. میکرو حباب‌ها و نانو حباب‌ها، حباب‌های بسیار کوچکی از هوا هستند که به ترتیب دارای ابعاد ۱۰ – ۵۰ میکرومتر و کمتر از ۲۰۰ نانومتر میباشند. میکروحباب‌ها و نانوحباب‌ها هر یک رفتار منحصربه فردی از خود نشان می‌دهند. (۹) از ویژگی‌های مهم نانوحباب‌های سنتزشده میتوان به پایداری زیاد، تأثیر زیاد و سریع، سازگاری با محیط زیست را اشاره نمود. نانوحباب‌ها قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد آزمایش در غلظت‌های پایین بودند. مطالعات قبلی محققان حاکی از آن می‌باشد که نانوذرات طی شرایط وابسته به زمان و غلظت اثرسیتوتوکسیکی دارد و مطالعات نویسندگان مقاله حاضر نیزدر رابطه با نانوحباب‌ها نشان دهنده این مطلب می‌باشد.

اسکی و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ بر روی اثرات سمیت نانوذرات حاوی روی بر روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سمیت القا شده توسط روی را در سل لاین ماکروفاژ (RAW 264.7) گزارش کردند که منجر به آسیب به چرخه ی سلولی، مرگ سلول و تحریک آزادسازی میانجی های التهابی می‌شود. حلالیت و اندازه ی ذرات روی نقش عمده ای را در پاسخ های سمی القا شده دارند. ذرات محلول پایداری سلول را کاهش می‌دهند در حالیکه نانوذرات کم محلول به طور معنی داری التهاب را افزایش می‌دهند. علاوه بر این، مصرف نانوذرات روی بزرگتر در داخل سلول احتمال ایفای نقش کلیدی در توقف های چرخه سلولی ایفا می‌کند. (۱۹)

هیاکومو و همکارانش درمطالعه ای درسال ۲۰۱۴ به منظورارزیابی فعالیت آنتی باکتریال عامل ضدعفونی کننده جدید نانوحباب اوزون (NBW3) علیه باکتری های پریودنتوپاتولوژیک و همچنین برای بررسی اثرسمیت سلولی NBW3 علیه سلول های دهانی انسانی نشان دادند که NBW3 دارای فعالیت بالقوه باکتری کشی است اما در برابر سلول‌های بافت دهان خاصیت سیتوتوکسیسیتی ندارد. آنها به این منظور برای بررسی خاصیت باکتری کشی NBW3 علیه باکتری های Porphyromonas gingivalis و Aggregati bacter actinomycete mcomitans از آزمایش‌های کشنده باکتری در محیط *in vitro* استفاده نمودند. خاصیت سیتوتوکسیسیتی NBW3 با استفاده از مدل‌های سه بعدی بافت دهانی ولثه مورد ارزیابی قرارگرفت. تعداد واحدهای شکل دهنده کلنی برمیلی لیتر (CFUs)/mL از P.gingivalis و A. actinomycetemcomitans که درمعرض NBW3 قرار می‌گرفتند پس از حدود نیم ساعت تماس تا حد پایینی تشخیص افت کرد (<۱۰ CFUs mL-1). تنها میزان اندکی در حیات سلولی بافت دهانی پس از ۲۴ ساعت تماس با NBW3 تغییر ایجاد شد(۲۰).

اوتایو و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ به منظور سنتز نانوذرات کیتوزان بارگیری شده با ویتامین-سیسپلاستین برای پیشگیری شیمیایی وضعف ناشی ازسرطان انجام دادند. کامپوزیت‌های مولتی ویتامین -(C, D3, and B12) سیسپلاستین بنانوفرموله به نام NanoCisVital (NCV) برای غلبه بر ضغف ناشی از شیمی درمانی مورد استفاده قرار گرفت. برهمکنش میان ویتامین و NCV با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) تبدیل فوریه، و آنالیزور سایز ذرات مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت ممانعت کننده شیمیایی با استفاده از آزمون های زیستی در محیط *in vitro* انجام گرفت. آنالیزهای SEMنشان داد که شکل کروی و سایز کمتر از ۲۲۵ نانومتر است. NCV سلول‌های مخمر همانندسازی کننده را غیر فعال کرد و همچنین منجر به دناتوره شدن آلبومین سرم گاوی گردید و همچنین منجر به کاهش جوانه زدن رگ‌های خونی جدید به صورت وابسته به دوز گردید. مجموعا این نتایج نشان می‌دهد که ذرات NCV می‌توانند به منظور کاهش ضعف ناشی از

شیمی درمانی، بدون اثر گذاری بر روی ویژگی های ضد سرطانی سیسپلاستین به کار می‌رود (۲۱).

اسادا و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ به منظور حذف گونه های اکسیژن فعال (ROS) در ارتباط با پرولیفراسیون سلول‌های تومور توسط کاهش فعالیت هیدروژن، نانوحباب های عملکردی حاوی آب (قطر: <۹۰۰ نانومتر برای ٪۷۱/جمعیت) و هیدروژن ۱٫۱-۱٫۵ ppm همراه با توانایی کاهش یافته با استفاده ازیک دستگاه بیرون ریزاننده‌ی هیدروژن و دارای فیلتر با منافذ در ابعاد میکرو را طراحی کردند. آنها نشان دادند که آب هیدروژنه ROS را که برای برای رشد سلول‌های تومور ضروری‌اند را توسط دام ESR/spin، آزمایش CDCFH-DA حذف کرد، و برای سلول‌های تومور آسیت Ehrlich پس از بررسی با آزمایش EST-8، رنگ آمیزی کریستال ویوله و بررسی میکروسکوپ الکترونی نگاره، پس از ۲۴-۴۸ ساعت انکوباسیون و به دنبال آن گرم کردن از ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد ، سیتوتوکسیک بودند. آب هیدروژنه ی غنی شده با پلاتینیوم کلوئید (۰/۳ ppm از pt در ۴٪ پلی وینیل پیرولیدون) فعالیت آنتی تومور بیشتری را در مقایسه با آب هیدروژنه به تنهایی، آب معدنی به تنهایی، یا پلاتینیوم کلوئید به تنهایی داشتند که توسط کاهش تعداد سلول‌ها مشاهده شد (فشرده شدن هسته ها)/karyorrhexis (قطعه قطعه شدن هسته) که نشان دهنده ی آپوپتوز است، و همراه با بدشکل شدن سلول و ناپدید شدن ریزپزها بر روی سطح غشا. این اثرات ضد تومور در همراهی با هایپرترمی در ۴۲ درجه سانتی گراد، افزایش داشتند. بنابراین نانوحباب آب هیدروژنه همراه با کلوئید پلاتینیوم می‌تواند یک عامل ضد توموری باشد (۲۲).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که از نظر پراکنش نانوحباب‌های اکسیژن و هوا دارای اندازه متوسط ۱۰۰۰ نانومتر از دیدگاه پراش نور لیزر و حجم ذرات می‌باشند.

همچنین این نانومیکرو حباب‌های اکسیژن قادرند سلول های سرطانی کبدی رده Huh7 را (با دوز IC_{50}=158.6 µl/ml)از بین ببرند؛ در صورتی که نانوحباب های هوا تاثیر قابل مشاهده‌ای بر روی سلول های فوق ایجاد نکردند.

از نظر تغییرات ساختاری و مورفولوژیک نانوحباب‌های اکسیژن توانستند میزان تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطان کبد رده Huh7را با شرایط وابسته به غلظت و وابسته به زمان تیمار متاثر سازند به نحوی که در غلظت بالاتر میزان کمتری از سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند و در غلظت کمتر این نانومیکروحباب‌ها درصد بالاتری از سلول ها دچار آپوپتوز گردیدند. در حقیقت می‌توان گفت که این نانومیکروحباب های اکسیژن همچون بسته‌های انفجاری عمل کرده و به محض ورود به سلول‌های سرطانی با آزاد سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن اثرات کشندگی خود را القا می‌کند.

نتایج بدست آمده در مطالعه ما نشان داد که نانومیکرو حباب‌های اکسیژن در آزمایش *In Vitro* بر روی سلول‌های رده Huh7 در غلظت 31.25 µl/ml بیش از ۴۰٪ زیستایی و در غلظت ۱/۹۵µl/ml بیش از ۹٪ زیستایی ایجاد نمایند. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد می‌توان در آینده با انجام مطالعات کاملتر از آنها در مقابله با سرطان استفاده نمود. این یافته‌ها دیدگاه جدیدی را در زمینه استفاده از نانوحباب در درمان سرطان فراهم می‌آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاسگزاری را از کارکنان آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به عمل می‌آورند. این مطالعه بر اساس نتایج استخراج شده از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد انجام شده توسط سیده مطهره قاسمی به انجام رسیده است. همچنین، نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد به سبب حمایت‌های مادی و معنوی برای طرح مصوب با شماره ۹۶۰۷۱۸ تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

1. Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma from epidemiology to prevention: translating knowledge into practice. Clin Gastroenterol Hepatol 2015; 13:2140-51.

2. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. Gastroenterology 2004; 127:S35-50.
3. Leung TW, Patt YZ, Lau WY, Ho SK, Simon C, Chan AT, et al. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 1999; 5:1676-81.
4. Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. J Hepatol 2007; 46:474-81.
5. Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, et al. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. J Clin Psychopharmacol 2008; 28:110-3.
6. Lai CL, Wu PC, Chan GC, Lok AS, Lin HJ. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. Cancer 1988; 62:479-83.
7. Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. J Pharm Sci 2007; 96:2547-65.
8. Tait JF. Imaging of apoptosis. J Nucl Med 2008; 49:1573-6.
9. Fan X, Wang L, Guo Y, Xiong X, Zhu L, Fang K. Inhibition of prostate cancer growth using doxorubicin assisted by ultrasound-targeted nanobubble destruction. Int J Nanomed 2016; 11:3585-96.
10. Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. Cancer Chemother Pharmacol 2006; 57:545-53.
11. Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. Colloids Surf B Biointerfaces 2013; 105:342-52.
12. Wu B, Qiao Q, Han X, Jing H, Zhang H, Liang H, et al. Targeted nanobubbles in low-frequency ultrasound-mediated gene transfection and growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells. Tumor Biol 2016; 37:12113-21.
13. Xu JS, Huang J, Qin R, Hinkle GH, Povoski SP, Martin EW, et al. Synthesizing and binding dual-mode poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanobubbles for cancer targeting and imaging. Biomaterials 2010; 31:1716-22.
14. Tu J, Guan J, Qiu Y, Matula TJ. Estimating the shell parameters of SonoVue® microbubbles using light scattering. J Acoustical Soc Am 2009; 126:2954-62.
15. Mahjour A, Rahimi HR, Safipour Afshar A. Investigation of the effect of nanomicrobubbles on p53 gene expression, induction of apoptosis and inhibition of breast cancer (4T1). J Neyshabur Univ Med Sci 2018; 6:41-8.
16. Mahjour A, Khazaei M, Nourmohammadi E, Khoshdel-Sarkarizi H, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Rahimi HR, et al. Evaluation of antitumor effect of oxygen nanobubble water on breast cancer-bearing BALB/c mice. J Cell Biochem 2019; 120:15546-52.
17. Wood AK, Sehgal CM. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. Ultrasound Med Biol 2015; 41:905-28.
18. Sever AR, Mills P, Jones SE, Cox K, Weeks J, Fish D, et al. Preoperative sentinel node identification with ultrasound using microbubbles in patients with breast cancer. Am J Roentgenol 2011; 196:251-6.
19. Uski O, Torvela T, Sippula O, Karhunen T, Koponen H, Peräniemi S, et al. In vitro toxicological effects of Zinc containing nanoparticles with different physico-chemical properties. Toxicol In Vitro 2017; 42:105-13.
20. Hayakumo S, Arakawa S, Takahashi M, Kondo K, Mano Y, Izumi Y. Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells-in vitro studies. Sci Technol Adv Mater 2014; 15:055003.
21. Othayoth R, Mathi P, Bheemanapally K, Kakarla L, Botlagunta M. Characterization of vitamin–cisplatin-loaded chitosan nano-particles for chemoprevention and cancer fatigue. J Microencapsul 2015; 32:578-88.
22. Asada R, Kageyama K, Tanaka H, Matsui H, Kimura M, Saitoh Y, et al. Antitumor effects of nano-bubble hydrogen-dissolved water are enhanced by coexistent platinum colloid and the combined hyperthermia with apoptosis-like cell death. Oncol Rep 2010; 24:1463-70.

Original Article

Evaluation the cytotoxic and apoptotic effects of Air and Oxygen Nanobubbles on Liver Cancer Cells (HUH7)

Received: 23/02/2019 - Accepted: 22/08/2019

Seyedeh Motahareh Ghasemi[1]
Ehsan Karimi[1]
Hamid reza Rahimi [2, 3*]

[1] *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.*
2 Department of Technology and Medical Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3Neurologic inflammatory research center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

* Paradis of Ferdowsi University and Mashhad University of Medical Sciences, Department of Technology and Medical Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Tel: 05138784168
Email: rahimihr@mums.ac.ir

Abstract

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC), has been considered as a prevalent type of cancer, affects million people globally each year. Nanotechnology, a progressive field of technology in recent years, has impressively developed in agriculture, industry, and healthcare systems. In the fields of pharmacy and medicine, multifunctional nanoparticles are designed for various purposes, especially the target therapy, the current therapeutic strategy in treatments of HCC.
The aim of the present study was the determination of the cytotoxic effects of micro nano bubbles on the human liver cancer cell line (Huh7-7).

Materials and Methods: The cytotoxicity effects of air and oxygen nano-micro bubbles on HUH7 cells which were treated with different concentrations of nano micro bubbles (1.95 – 500 µl/ml) were determined by calorimetric MTT assay. Histological changes have been checked and reported.

Results: Our results show that the nano micro bubbles inhibits the Huh7 cells proliferation by dose-dependent manner after 48 hours treatment (IC50 = 158.60 µl/ml).

Conclusion: On the basis of obtained data, Oxygen nano micro bubbles induced the apoptosis in Huh7 cells in the certain concentration. Nevertheless, nano micro bubbles may light on the new therapeutic strategy in treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words: Cancer, Huh7 cell line, nano bubbles, apoptosis.
Acknowledgement: There is no conflict of interest.