

بررسی اثر کشندگی نانومیکرو حباب‌های اکسیژن، اوزون و هوا بر رده سلولی سرطان ملانوما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵

خلاصه

مقدمه: ملانوم پوستی به عنوان یکی از مهاجمانه‌ترین انواع سرطان پوست است. این بیماری حدود ۷۵ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان پوست را تشکیل می‌دهد و تاکنون درمان قطعی برای آن ارائه نشده است. در نتیجه تشخیص به هنگام و جلوگیری از پیشرفت این بیماری حائز اهمیت است. پژوهش‌های زیادی برای یافتن روش‌های درمان و بهبود سرطان ارائه شده است. یکی از جدیدترین روش‌ها در این زمینه استفاده از فناوری نانو برای تشخیص و مهار سلول‌های سرطانی است. در این تحقیق تاثیر استفاده از نانومیکرو حباب‌های هوا، اکسیژن و اوزون بر رده سلولی A375 سرطان ملانوما مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش کار: رده سلولی A375 که با غلظت‌های مختلف نانومیکرو حباب‌های هوا، اکسیژن و اوزون تیمار شده اند توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. به منظور سنجش زنده بودن سلول‌ها، به هر چاهک پلیت ماده MTT اضافه شده و سپس پلیت در انکوباتور قرار گرفته است.

نتایج: طبق نتایج این تحقیق کاهش درصد زیست پذیری سلول‌های سرطانی A375 با افزایش غلظت نانومیکرو حباب‌های اکسیژن و اوزون پس از ۲۴ ساعت نشان دهنده آپوپتوز بوده و مهار چشمگیری بر رشد این سلول‌ها داشته است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق گویای آن است که نانومیکرو حباب‌های اکسیژن و اوزون در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلولی رده سلول‌های A375 می‌شود. نتایج در این تحقیق کمک خواهد کرد که نقش نانومیکرو حباب‌های هوا، اکسیژن و اوزون در درمان سرطان ملانوما بررسی شود.

کلمات کلیدی: سرطان ملانوما؛ نانومیکرو حباب‌های اکسیژن، اوزون و هوا؛ MTT؛ IC₅₀

فاطمه فاضلی^۱

فاطمه صادقی‌فر^۲

حمید رضا رحیمی^{۳*}

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم

سبزواری، سبزوار، ایران

^۲ عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

^۳ گروه ژنتیک پزشکی و پزشکی مولکولی

Email: rahimih@ums.ac.ir

مقدمه

ملانوم پوستی یک تومور بدخیم از ملانوسیت‌ها است که در لایه پایه اپیدرم پوست وجود دارد. این یکی از مهاجمانه‌ترین نوع سرطان پوست است و شیوع آن در اکثر کشورهای جهان در حال افزایش است (۱). ملانوما حدود سه چهارم کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان پوست را تشکیل می‌دهد که تقریباً ده هزار نفر سالانه در ایالات متحده را شامل می‌شود (۲). از جمله فاکتورهای خطرناک ملانوما می‌توان به داشتن پوست روشن، موی قرمز، تراکم کک و مک یا تعداد زیاد لکه قرمز برجسته (دیسپلاستیک)، داشتن سابقه خانوادگی ملانوما و سرکوب سیستم ایمنی اشاره کرد (۳، ۴). سلول‌های ملانوما به سرعت مورد حمله و متاستاز قرار می‌گیرند و بقای طولانی مدت را برای بیمارانی که بیماری در آن‌ها پیشرفت داشته است، ضعیف می‌کنند. حتی با پیشرفت‌های اخیر در زمینه درمان هدفمند و ایمونوتراپی پس از گسترش آن از محل اصلی خود، ملانوما به سختی قابل درمان است (۵). جراحی در مراحل اولیه، ایمنی‌تراپی و رادیوتراپی از درمان‌هایی است که امروزه برای بیماران مبتلا به ملانوما انجام می‌دهند تا طول عمر بیماران را افزایش دهند (۶). پژوهش‌های زیادی برای یافتن روش‌های درمان و بهبود سرطان ملانوما ارائه شده است. یکی از جدیدترین روش‌ها در این زمینه استفاده از فناوری نانو برای تشخیص و مهار سلول‌های سرطانی است. موادی با ابعاد نانو نسبت به ذرات بزرگ تر با ترکیب شیمیایی یکسان نسبت سطح به حجم بیش تری دارند به همین دلیل از نظر بیولوژیکی فعال‌تر می‌باشند و کاربرد‌های گوناگونی در حوزه‌های صنعتی، زیستی و دارویی دارند (۷).

نانومیکرومباب‌ها، حباب‌های بسیار کوچکی هستند که ویژگی‌ها و رفتارهای خاص و منحصر به فردی از خود نشان می‌دهند که آن‌ها را از حباب‌های معمولی متمایز می‌کنند. با توجه به این موضوع این حباب‌ها مورد توجه محققان و پژوهشگران مختلف قرار گرفته و در نتیجه کاربردهای متفاوتی در حوزه‌های صنعتی و زیستی پیدا کرده‌اند. فناوری نانومیکرومباب روشی نوین با

کارایی بسیار بالا در توزیع یکنواخت گازهای مختلف از قبیل هوا، اکسیژن، ازن، نیتروژن، دی‌اکسید کربن و غیره به داخل محیط مایع مانند آب می‌باشد (۸). به صورت کلی، حباب‌ها در جریان حبابی بر اساس ویژگی‌های مختلفی به سه دسته طبقه‌بندی می‌شوند: حباب‌های ماکرو، حباب‌های میکرو و زیرمیکرو یا نانوحباب‌ها (۸). بسیاری از محققان اغلب اندازه حباب‌ها را به عنوان پایه‌ای برای طبقه‌بندی آن‌ها استفاده می‌کنند. در نتیجه، حباب‌ها با تفاوت در اندازه آن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (۹). تشکیل حباب به عنوان یک فرایند استاتیک یا شبه استاتیک در نظر گرفته می‌شود. به دنبال آن، فرایندهای دینامیکی، یعنی تجمع و تجزیه می‌آید. به فرآیند کلی شکل‌گیری حباب، رشد و از بین رفتن حباب کاویتاسیون^۱ می‌گویند (۱۰). برای اندازه‌گیری اندازه میکرومباب‌ها و نانوحباب‌ها از تکنیک‌های مختلف استفاده شده است. از میان روش‌های اندازه‌گیری استفاده شده، اندازه‌گیری ذرات لیزر، میکروسکوپ نیروی اتمی و تحلیل تصویر به عنوان رایج‌ترین ابزارها در نظر گرفته شده است (۱۱، ۱۲).

جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و ایمونوتراپی از روش‌های مرسوم درمان سرطان می‌باشند. شیمی درمانی مرسوم سرطان باعث سمیت سیستمیک شدید و مقاومت به چند دارو شده است (۱۳). تومورهای مقاوم به دارو نیاز به دوزبالای داروهای شیمی درمانی دارند که به نوبه خود سمیت سیستمیک شیمی درمانی را افزایش می‌دهند. بنابراین، برای ننگه داشتن دوز در حداقل خود برای کاهش سمیت، یک سیستم خاص پخش دارو به محل تومور بسیار توصیه می‌شود که استفاده از میکرومباب‌ها و نانوحباب‌ها در روند درمان سرطان از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۴).

روش کار

در این تحقیق از نانومیکرومباب‌های هوا، اکسیژن و اوزون که از شرکت نو فناوریان میناب طوس خریداری شده و توسط دستگاه P.S.A پژوهشکده هوا خورشید بررسی شد که در شکل ۱ قابل

¹ Cavitation

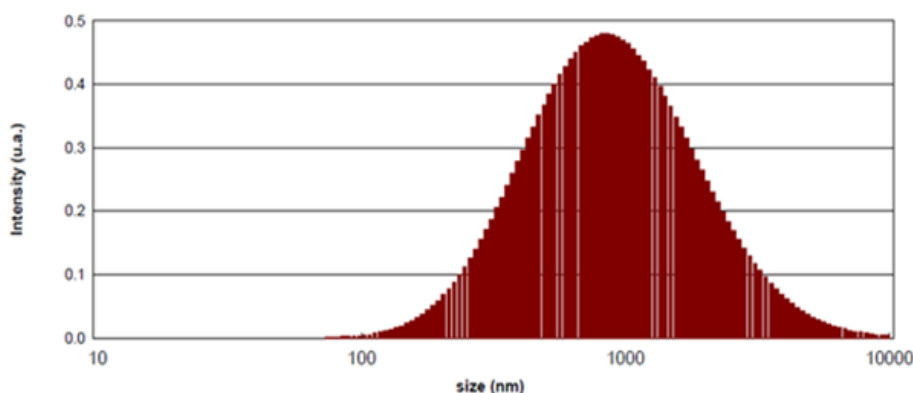
مشاهده است، استفاده کرده و از رده سلولی A375 که از بانک سلول انستیتو پاستور ایران سفارش و خریداری شد، استفاده کرده که این سلول از رده سلولی سرطان بدخیم ملانوما می باشد. هنگام کار با سلول های سرطانی تمام کار های مطالعاتی از جمله مراحل کشت، تست MTT برای ایجاد شرایط استریل باید در زیر هود لامینار انجام شود.

برای انجام این تحقیق ابتدا محیط کشت RPMI را در شرایط استریل تهیه کرده، به این صورت که ۸۹٪ محیط کشت RPMI 1640 (شرکت BETACELL)، ۱۰٪ FBS (شرکت Biochrom) و ۱٪ آنتی بیوتیک استرپتومایسین - پنی سیلین (شرکت Gibco) در شرایط استریل ترکیب شده است. کرایویال حاوی سل لاین A375 را که به صورت سلول های در حال رشد از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شده، دفریز کرده و پس از آن سل لاین را در محیط کشت RPMI کشت داده و جهت نگهداری به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ منتقل شده است. وقتی که سلول ها به تراکم حدود ۸۰٪ رسیده باشد، محیط رویی فلاسک را خارج کرده و زمانی که تعدادی سلول مرده در فلاسک مشاهده شد فلاسک را توسط PBS (شرکت Sigma) شست و شو داده و سپس از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ (شرکت BETACELL) برای جدا شدن سلول ها از کف فلاسک استفاده شده و پاساژ سلول ها انجام می شود. در مرحله بعد شمارش سلول ها انجام شده به این صورت که سلول های چسبان کف فلاسک را توسط تریپسین به حالت شناور در آورده و پس از آن دو برابر تریپسین مصرفی محیط کشت RPMI آماده به آن اضافه شده، محتویات درون فلاسک را به فالكون منتقل کرده و با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، مایع رویی خارج شده و به رسوب آن ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI آماده اضافه شده، پس از آن برای شمارش سلول ها از لام نئوبار و رنگ تریپان

بلو استفاده می شود. پس از شمارش، سه پلیت ۹۶ خانه ای انتخاب کرده و به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه ای مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۵۰۰۰ سلول افزوده شده است. پس از Seed شدن سلول ها، پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت جهت چسبیده شدن سلول ها به کف چاهک پلیت به انکوباتور منتقل کرده، سپس زیر هود لامینار به هر خانه از پلیت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از داروهای هوا، اکسیژن و اوزون با غلظت های ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۵۳۳/۳۳۳، ۳۵۵/۵۵۵، ۳۷/۰۳۷ میکرولیتر افزوده شد و پلیت ها با فویل پوشیده شدند (با ۳ تکرار برای هر غلظت). هم چنین یک ردیف به عنوان کنترل انتخاب شد و هیچ دارویی به آن اضافه نشد. در مرحله بعد، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک انکوبه شدند. سپس زیر هود لامینار محیط رویی هر چاهک خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI آماده و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت ATOCEL) به هر چاهک اضافه شد، سپس پلیت ها به مدت ۵ ساعت در محیط تاریک انکوبه شدند، در این مرحله چاهک های سه پلیت به خوبی تخلیه شده و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (شرکت CARLO ERBA) اضافه شد و در پوش پلیت ها را روی آن ها قرار داده و پلیت ها را به مدت ۵ دقیقه شیک کرده، در انتها جذب نوری هر خانه از پلیت توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج های ۶۳۰ و ۵۹۰ نانومتر بررسی شد.

برای تعیین IC₅₀ (غلظتی است که در آن نصف سلول ها می میرند) ابتدا جذب هر غلظت را که توسط دستگاه الیزا ریدر گرفته شده، میانگین گرفته و عدد مربوطه را در نرم افزار Excel وارد نموده و در انتها برای جذب هر پلیت نموداری رسم شده و با قرار دادن غلظت دارو ها و Viability در برنامه IC₅₀.tk، مقدار IC₅₀ مربوط به نانومیکرومباب اکسیژن و اوزون مشخص شد.

Size dispersion by Intensity



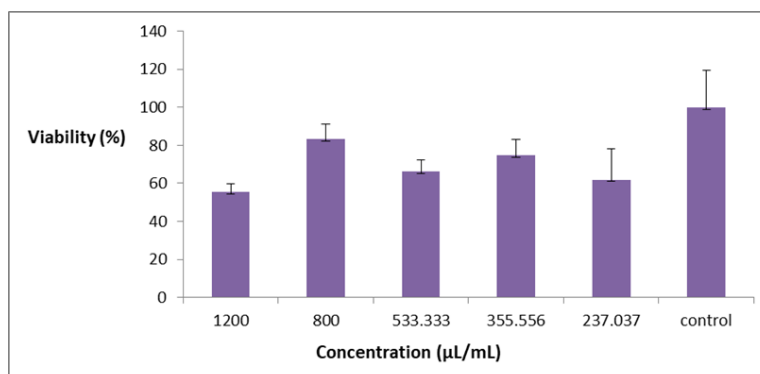
شکل ۱ - پراکنش نانوحباب بر اساس میزان پراش نور لیزر

نتایج

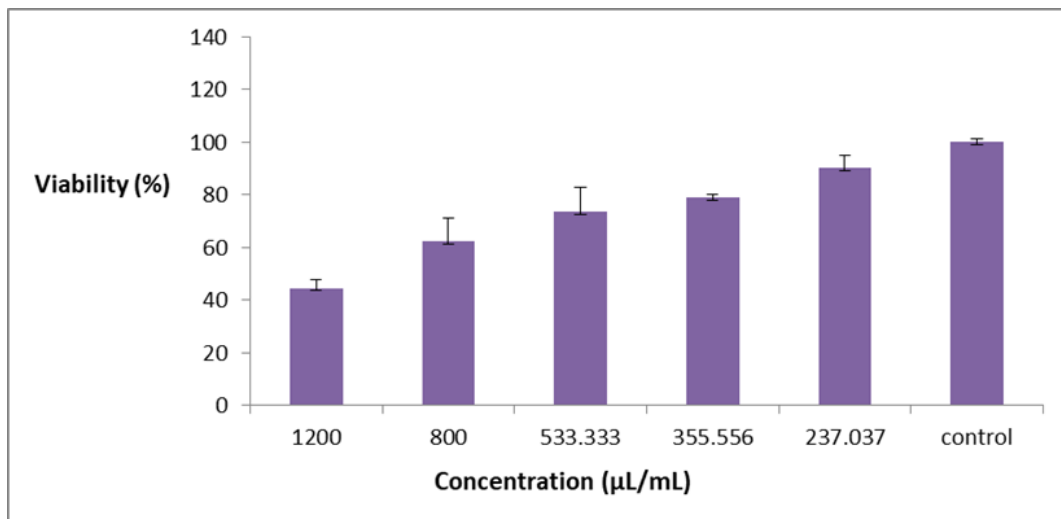
دارای زیست‌پذیری بالای ۵۰ درصد می‌باشد که این نشان‌دهنده عدم کشندگی نانومیکروحباب‌ها بر رده سلولی A375 است. اما در غلظت‌های بالای نانومیکروحباب‌های اکسیژن و اوزون طی ۲۴ ساعت درصد زیست‌پذیری سلول‌ها کاهش یافته و مهار چشمگیری بر رشد سلول‌های سرطانی داشته است در صورتی که در غلظت‌های پایین تغییر اساسی در میزان زیست‌پذیری مشاهده نشده است که در نمودارهای ۲ و ۳ قابل مشاهده است. با قرار دادن غلظت نانومیکروحباب‌های اکسیژن و اوزون و Viability آن‌ها در برنامه IC₅₀.tk، مقدار IC₅₀ مربوط به نانومیکروحباب اکسیژن و اوزون مشخص شد. میزان IC₅₀ برای اکسیژن ۵۵۱ μl/mL و برای اوزون ۳۴۷ μl/mL می‌باشد.

برای مشاهده اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانومیکروحباب‌ها، اکسیژن و اوزون بر روی رده سلولی A375 از تست MTT استفاده شده است. برای این منظور هر غلظت دارویی نانومیکروحباب‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای سه مرتبه تکرار شدند و پس از ۲۴ ساعت اضافه شدن دارو به سلول در پلیت توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج‌های ۶۳۰ و ۵۹۰ نانومتر بررسی شدند.

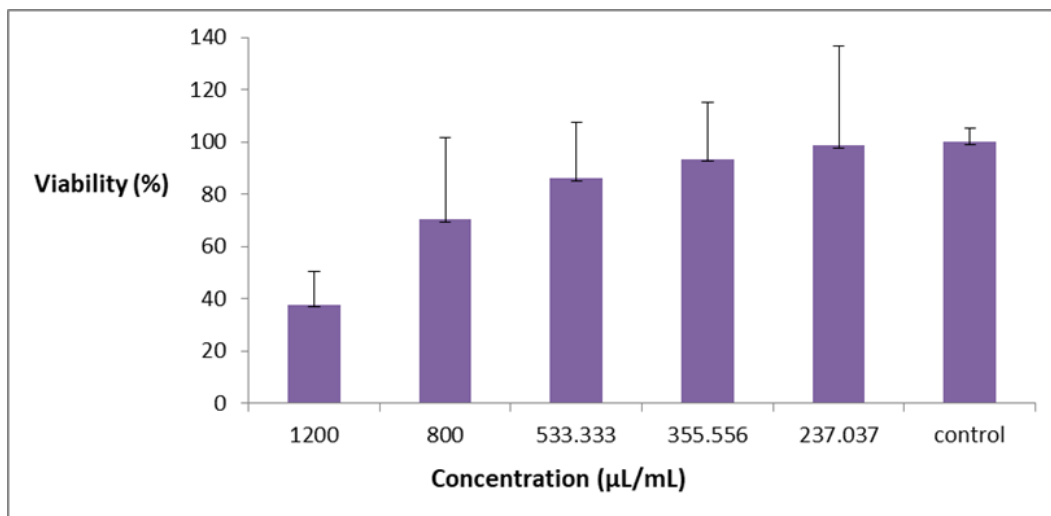
با آنالیز داده‌های MTT در Excel و محاسبه درصد زیست‌پذیری سلول‌ها مشاهده شد که در سلول‌های تحت تیمار با نانومیکروحباب‌ها تغییر اساسی مشاهده نشده است و همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است سلول‌های سرطانی پیوسته در حال رشد اند و در بالاترین غلظت دارو یعنی ۱۲۰۰ میکرولیتر



نمودار ۱ - درصد زیست‌پذیری سلول A 375 تیمار شده با نانومیکروحباب‌ها



نمودار ۲ - درصد زیست پذیری سلول A 375 تیمار شده با نانومیکروحباب اکسیژن



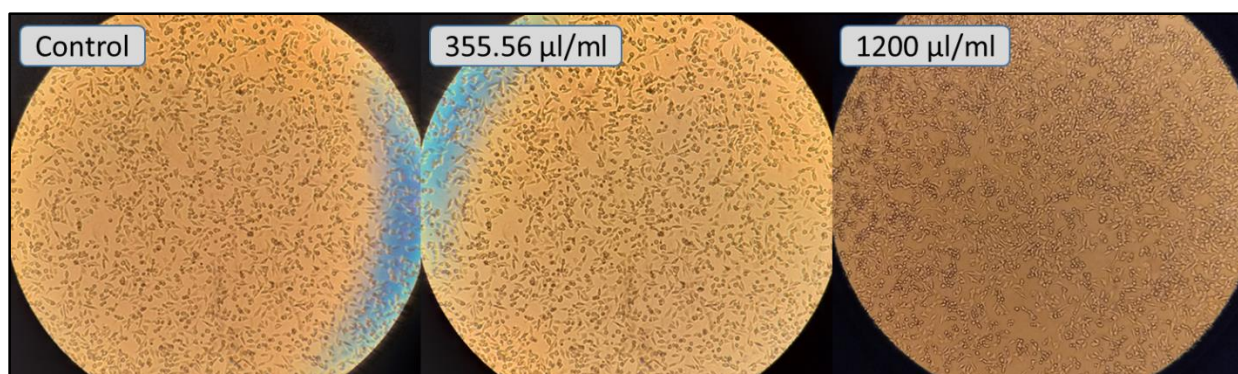
نمودار ۳ - درصد زیست پذیری سلول A 375 تیمار شده با نانومیکروحباب اوزون

سلولی A375 مشاهده می‌شود. هر چه غلظت نانومیکروحباب‌ها بیشتر شود تعداد بیشتری از سلول‌ها دچار آپوپتوز گردیده و شکل ظاهری سلول‌ها دچار تغییر شده و کروی می‌شوند که نشان دهنده تاثیر غلظت نانومیکروحباب‌ها بر سمیت سلولی می‌باشد.

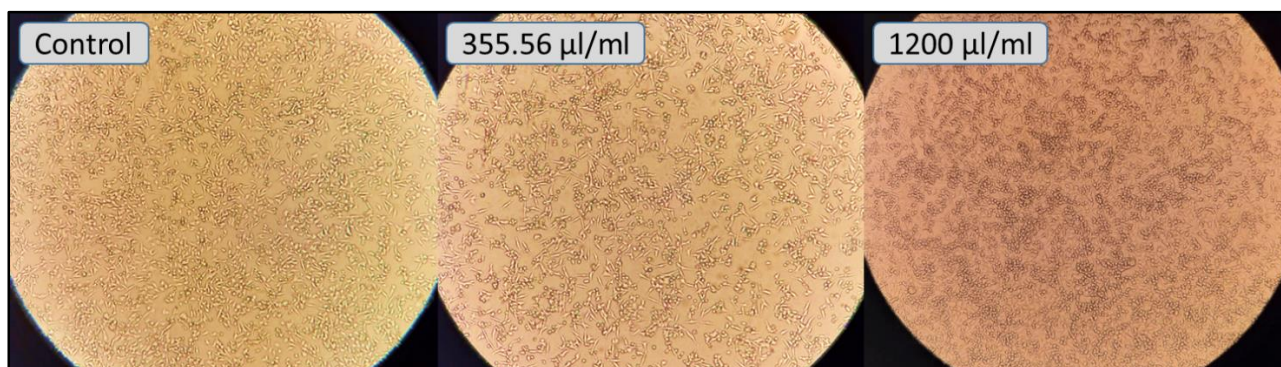
سلول‌های A375 پس از تیمار با نانومیکروحباب‌های

اکسیژن و اوزون

رده سلولی A375 از نوع سلول‌های چسبان بوده و دارای ظاهر دوکی شکل می‌باشند. پس از مرگ سلولی، سلول‌ها دچار کاهش سیتوپلاسم شده و کروی شکل می‌شوند. در شکل‌های ۲ و ۳ اثر کشندگی نانومیکروحباب‌های اکسیژن و اوزون بر رده



شکل ۲- بررسی مورفولوژی سلولهای A375 تیمار شده با نانومیکرومباب اکسیژن در غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۳۵۵/۵۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل. با افزایش غلظت نانومیکرومباب اکسیژن سلول‌های بیشتری دچار آپتوز شدند.



شکل ۳- بررسی مورفولوژی سلولهای A375 تیمار شده با نانومیکرومباب اوزون در غلظت‌های ۱۲۰۰ و ۳۵۵/۵۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل. با افزایش غلظت نانومیکرومباب اوزون سلول‌های بیشتری دچار آپتوز شدند.

بحث

مشخص شد که اثرات کشندگی نانومیکرومبابها بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما دور از انتظار نیست. در ادامه برخی از مهم‌ترین مطالعات انجام شده پیرامون کاربردهای نانومیکرومبابها مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. ناگانوما و همکارانش در مقاله (۱۵) با هدف درمان آسیب ایسکمیک نخاع با استفاد از اکسیژن رسانی مایع مغزی نخاعی (CSF) با نانومبابها آزمایشی طراحی کرده اند که در آن ۲۰ خرگوش سفید ژاپنی در ۴ گروه ۵ تایی دسته بندی شدند: گروه ساختگی^۱، با قرار دادن سوند بالون به آنورت. گروه ایسکمی، با آسیب ایسکمی نخاع توسط انسداد آنورت شکمی. گروه غیر

نانومیکرومبابها، حباب‌های بسیار کوچکی از گازهای مختلفی نظیر هوا، اکسیژن، اوزون و غیره می‌باشند که در آب محلول هستند. اندازه دقیق نانومیکرومبابها موضوع بحث برانگیزی می‌باشد، اما در اکثر تحقیقات اندازه نانومبابها کمتر از ۲۰۰ نانومتر و اندازه میکرومبابها در بازه بین ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتر در نظر گرفته شده است. در سال‌های اخیر نانومیکرومبابها به دلیل خواص ویژه و منحصر به فردشان مانند پایداری زیاد، دارا بودن بار سطحی منفی و ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن، توجه محققان و پژوهشگران متعددی را در حوزه‌های مختلفی اعم از پزشکی، زیستی و صنعتی به خود معطوف کرده است. در این تحقیق

² sham group

¹ ischemic

ژانگ و همکارانش در مقاله (۱۷) با هدف از بین بردن سلول‌های تومور با استفاده از میسل‌های پلیمری^۱ تولید کننده حباب، یک سیستم میسل پلیمری واکنشی به UV جدید بر اساس استرکومارین برای درمان تومور پیشنهاد داده اند. این میسل به دلیل فتولیز ۷-دی اتیل آمینوکومارین ۴-۱y-متیل (DEACM) می‌تواند در معرض UV (اشعه ماوراء بنفش) CO₂ تولید کند. بدون بارگیری هر گونه دارو، میسل باعث مرگ سلولی قابل توجهی در زیر تابش اشعه ماوراء بنفش ۸ ثانیه‌ای در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. به طور کلی، مقدار زیادی حباب CO₂ از این سیستم رهایی می‌یابد و فوراً منفجر می‌شود تا نکرور سلول‌های سرطانی ایجاد شود. در نتیجه تشکیل موقت، رشد و فروپاشی حباب‌های دی‌اکسید کربن یک نیروی تخریبی مشابه اثر کاویتاسیون ایجاد خواهد شد. در مقایسه با داروهای شیمی‌درمانی، درمان فیزیکی با استفاده از حباب‌های دی‌اکسید کربن هیچ عامل سمی را پشت سر نمی‌گذارد. به این ترتیب، تنها سلول‌هایی که میسل‌ها را درونی می‌کنند در معرض اشعه ماورا بنفش قرار می‌گیرند، در حالی که سلول‌های اطراف هنوز می‌توانند زنده و بدون آسیب باقی بمانند.

شاولی و همکارانش در مقاله (۱۸) با هدف رویکرد امیدوار کننده برای احیاء ریشه دندان و حذف لایه اسمیر با استفاده از فناوری نانوحباب‌ها آزمایشی طراحی کرده اند که در آن آب نانوحباب در یک ژنراتور تولید شد. اندازه، غلظت و pH نانوحباب اندازه‌گیری شد. دندان‌های خوک به ۶۰ قسمت تقسیم شدند و با آب نانوحباب و ۱۷٪ EDTA آبیاری شدند و دیگر آبیاری دریافت نکردند. توانایی آبیاری برای حذف لایه اسمیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM ارزیابی شد. سایر نمونه‌ها برای تعیین سختی عاج تحت آزمایش سختی ویکرز^۲ قرار گرفتند. ترکیب اتوفلورسنت^۳ - تتراسایکلین^۴ با آب مقطر یا آب نانوحباب در داخل فضای کانال ریشه دندان خوک قرار داده شد و عمق نفوذ دارو به لوله‌های عاجی با استفاده از

اکسید شده، با آبیاری مصنوعی CSF غیر اکسید شده پس از آسیب ایسکمیک نخاع و گروه اکسیژن دار، با آبیاری مصنوعی CSF اکسیژنه پس از آسیب ایسکمیک نخاع. ۴۸ ساعت پس از آسیب ایسکمیک نخاع، نمره اصلاح شده برای انعکاس حرکت اندام عقب ارزیابی شد. نخاع با شمارش سلول‌های شاخه قدامی از نظر هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و رونویسی معکوس کمی (qRT PCR) انجام شد و دریافتند گروه اکسیژنه عملکرد عصبی را در مقایسه با ایسکمیک و گروه‌های غیر اکسیژن دار بهبود یافته نشان می‌دهد. در نتیجه اکسیژن رسانی مایع مغزی نخاعی با نانوحباب‌ها پس از خون‌رسانی مجدد می‌تواند آسیب ایسکمیک نخاع را در خرگوش‌ها بهبود بخشد و پاسخ‌های التهابی نخاع را سرکوب کند.

فرارا و همکارانش در مقاله (۱۶) با هدف تصویربرداری مولکولی با فراصوت از نانومیکرومباب‌ها استفاده کردند. میکرومباب یک ذره گاز است که با قطر کمتر از ده میکرون در محیط‌های آبی پراکنده شده و به عنوان یک عامل کنتراست داخل عروقی برای تصویربرداری فراصوت استفاده می‌شود. علاوه بر تأمین ثبات با مهار تجزیه و به هم پیوستگی، پوسته لپید برای کاهش اثرات ترومبوژنیک، سدی بین گاز و آب ایجاد می‌کند. بنابراین سد لپیدی ثبات را ایجاد کرده و از آمبولیسم در هنگام تزریق میکرومباب در داخل بدن جلوگیری می‌کند. وقتی به میکرومباب‌ها امواج فراصوت با فرکانس نزدیک به رزونانس تابانده می‌شود، پژواک بسیار قوی ایجاد می‌کنند. در نتیجه، کاربردهای پزشکی زیادی پیدا کرده اند که مهم‌ترین آن‌ها مواردی است که در هنگام پالس فراصوت از نوسان اندازه آن‌ها استفاده می‌کند. برنامه‌های تصویربرداری با فراصوت شامل تشخیص ناهنجاری‌های قلبی، کمی سازی خون رسانی مجدد از میوکارد و تشخیص آترواسکلروز است.

³ Auto fluorescence

⁴ Tetracycline

¹ Polymeric micelles

² Vickers

در طول دوره درمان ۱۴ روز مورد بررسی قرار داده اند. موش‌هایی که دارای تومور هستند به طور تصادفی به سه گروه (شش موش در هر گروه) تقسیم شدند شامل: گروه نانوحباب اکسیژن (ONB) که آب حاوی ONB می‌نوشند، گروه نانوحباب هوا (ANB) که آب حاوی ANB می‌نوشند و گروه شاهد که آب معمولی می‌نوشند. وزن و اندازه تومور در طی دوره درمان ۱۴ روزه در فاصله ۲ روز اندازه‌گیری می‌شد. بیان mRNA ژن های p53، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور القا کننده هایپوکسی (HIF) و ژن های سیکلین D/Cdk2 در موش‌های تحت درمان و کنترل اندازه‌گیری شد. بعد از ۸، ۱۲ و ۱۴ روز درمان، اندازه تومور در گروه ONB به ترتیب ۴۰، ۵٪، ۳۲، ۸٪ و ۲۸٪ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. علاوه بر این، گروه ANB کاهش قابل توجهی در بار تومور را نیز نشان داد. سطح RNA پیام‌رسان p53 (mRNA) در سلول‌های توموری گروه ONB و ANB به ترتیب ۳۶ برابر و ۳۳ برابر بالاتر از گروه کنترل بود. در بیان mRNA ژن VEGF سلول‌های توموری موش‌های ANB نسبت به موش‌های شاهد ۹ برابر افزایش یافته است. با این حال، هیچ تغییر قابل توجهی در گروه ONB وجود ندارد. بیان ژن HIF در سلول‌های توموری گروه ONB و ANB نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی کمتر بود. نتیجه گرفته شده است که نوشیدن آب ONB پتانسیل مهار رشد تومور را دارد، با این وجود مطالعات بالینی و اثبات مفهوم بیشتری برای تأیید ایمنی و اثر درمانی آن لازم است.

از جمله نقاط قوت پژوهش حاضر این است که در طی آن تأثیر سه نوع نانومیکرو حباب هوا، اکسیژن و اوزون بر سرطان ملانوما بررسی شده است. استفاده از نانومیکرو حباب‌ها به عنوان یکی از روش‌های جدید برای درمان و مهار سلول‌های سرطانی در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای صرفه اقتصادی بیشتر بوده و دسترسی به مواد اولیه آن نیز آسان‌تر است. از جمله نقاط ضعف این پژوهش این است که این تحقیق در محیط *In vitro* انجام شده و برای استفاده از آن در محیط *In vivo* نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

استریومیکروسکوپ^۱ فلورسنت مشاهده شد. برای آزمایش ضد عفونی، ریشه‌های دندان انسان تهیه شد، اتوکلاو شد و به مدت ۳ هفته با باکتری اتروکوکوس فاکالیس^۲ تلقیح شد. سپس کانال‌ها توسط آبیاری سوزنی استاندارد (SNI) با ۵،۲۵٪ NaOCl در آب نانوحباب ضد عفونی شدند. دندان‌ها شکافته شده و با LIVE/DEAD BackLight لکه دار شده و با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) در سه قسمت تاجی، میانی و انتهایی کانال مشاهده شد. نسبت باکتری‌های مرده به کل در لوله‌های عاجی در سطوح عمق مختلف (۵۰ میکرومتر، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومتر) محاسبه شد. آب نانوحباب می‌تواند باعث حذف لایه اسمیر شود و نفوذ لوله ای داروها را بدون تغییر سختی عاج افزایش دهد. البته در مدل‌های کانال بزرگ، آب نانوحباب ضد عفونی لوله ای غلظت کم NaOCl را تا ۵۰ میکرومتر بهبود می‌بخشد. از طرف دیگر، استفاده از فعال سازی آبیاری (ultrasonication XP) در مقایسه با آبیاری استاندارد با سوزن، هیچ ضد عفونی اضافی در لوله‌های عاجی ایجاد نکرد. این نتایج نشان می‌دهد که آب نانوحباب ممکن است یک داروی کمکی امیدوار کننده برای درمان ریشه دندان باشد. خانم قاسمی و همکارانش در مقاله (۱۹) اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانوحباب‌های اکسیژن و هوا بر روی رده سلولی Huh7 را با کمک روش MTT مورد بررسی قرار داده اند. ارزیابی تکثیر سلولی طی روش MTT نشان می‌دهد که سلول‌های تیمار شده توسط غلظت‌های مختلف نانوحباب به مدت ۴۸ ساعت طی شرایط وابسته به غلظت و زمان سبب مهار تکثیر سلول‌های رده Huh7 می‌شود. پس از ۴۸ ساعت جذب در ۵۹۰ و ۶۳۰ توسط دستگاه الیزا ریدر بررسی شد. نانومیکرو حباب‌های اکسیژن قادرند سلول‌های سرطانی کبدی رده Huh7 را با دوز $IC_{50}=158.6$ $\mu\text{l/ml}$ از بین ببرند؛ در صورتی که نانوحباب‌های هیدروژن تأثیر قابل مشاهده‌ای بر روی سلول‌های سرطانی کبد ایجاد نکردند. خانم مهجور و همکارانش در مقاله (۲۰) اثر آب حاوی نانوحباب اکسیژن (ONB) بر رشد تومور سرطان پستان T14 در موش‌ها را

² *Enterococcus faecalis*¹ Stereo microscope

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که نانومیکروجباب هوا تأثیر چندانی بر رده سلولی A375 نداشته که نشان دهنده عدم کشندگی این دارو بر رده سلولی A375 سرطان ملانوما است. همچنین مشخص شد که نانومیکروجباب‌های اکسیژن و اوزون تحت شرایط خاص دما و زمان قادرند باعث آپوپتوز تعدادی از سلول‌های سرطانی ملانوما A375 شوند. دوز مؤثر برای نانومیکروجباب اکسیژن $IC_{50} = 551 \mu\text{l/ml}$ و برای نانومیکروجباب اوزون $IC_{50} = 347 \mu\text{l/ml}$ می‌باشد، به گونه‌ای که در غلظت‌های بالاتر از دوز مؤثر تعداد بیشتری از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده و در غلظت‌های پایین‌تر، تعداد کمتری از سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند. طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق نانومیکروجباب اکسیژن در غلظت $1200 \mu\text{l/ml}$ قادر است بیش از 55 درصد از سلول‌های سرطانی ملانوما را بکشد، در حالی که در غلظت $237/037 \mu\text{l/ml}$ می‌تواند حدود 10 درصد از رده

سلولی A375 را از بین ببرد. نانومیکروجباب اوزون نیز در غلظت $1200 \mu\text{l/ml}$ قادر است بیش از 62 درصد از سلول‌های سرطانی ملانوما را بکشد، در حالی که در غلظت $237/037 \mu\text{l/ml}$ می‌تواند تنها حدود 2 درصد از رده سلولی A375 را از بین ببرد. با توجه به دستاوردهای حاصل از این تحقیق و انجام مطالعات تکمیلی پیرامون آن می‌توان به شناسایی و کشف روش‌هایی برای درمان سرطان ملانوما در آینده نزدیک امیدوار بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش سلولی مولکولی دانشگاه حکیم سبزواری است. از همکاری‌های شرکت نو فناوریان میناب طوس در تهیه نانومیکروجباب‌های مورد استفاده در این پژوهش تقدیر به عمل می‌آید.

References

- (۱) de Waal, A., *Cutaneous Melanoma. Population-based studies on epidemiological and clinical aspects*. 2015, (SI: sn).
- (۲) Sheets, S.S.F., *Melanoma of the Skin*. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Available online :<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>, 2018.
- (۳) Goldstein, A.M. and M.A. Tucker, *Dysplastic nevi and melanoma*. 2013, AACR.
- (۴) Olsen, C.M., et al., *Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction*. 2010. 19(1): p. 65-73.
- (۵) Flaherty, K.T.J.A.r.o.m., *Targeting metastatic melanoma*. 2012. 63: p. 171-183.
- (۶) D'Orazio, J., et al., *UV radiation and the skin*. 2013. 14(6): p. 12222-12248.
- (۷) Guimarães, M.V., et al., *Dry Extract of Matricaria recutita L.(Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β* . 2016. 87(6): p. 706-715.
- (۸) Temesgen, T., et al., *Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review*. 2017 :۲۴۶ .p. 40-51.
- (۹) Wu, C., et al., *Generation and characterization of submicron size bubbles*. 2012. 179: p. 123-132.
- (۱۰) Agarwal, A., W.J. Ng, and Y.J.C. Liu, *Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment*. 2011. 8 :^(۹)p. 1175-1180.
- (۱۱) Li, X., et al., *Gas-Liquid Mass Transfer Characteristics with Microbubble Aeration-I. Standard Stirred Tank*. 2016. 39(5): p. 945-952.
- (۱۲) Xiong, Y., F.J.I.j.o.m.s. Peng, and technology, *Optimization of cavitation venturi tube design for pico and nano bubbles generation*. 2015. 25(4): p. 523-529.
- (۱۳) Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. 2008. 14(5): p. 1310-1316.
- (۱۴) Nikseresht, M., et al., *The hydroalcoholic extract of Matricaria chamomilla suppresses migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-468 and MCF-7 cell lines*. 2017. 9(1): p. 87.
- (۱۵) Naganuma, M., et al., *Nanobubble technology to treat spinal cord ischemic injury*. 2020. 3: p. 1-11.
- (۱۶) Ferrara, K.W., M.A. Borden, and H.J.A.o.c.r. Zhang, *Lipid-shelled vehicles: engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery*. 2009. 42(7): p. 881-892.
- (۱۷) Zhang, Y., et al., *Light-responsive CO 2 bubble-generating polymeric micelles for tumor cell ablation*. 2017. 8(2): p. 405-407.

- (۱۸) Shawli, H., et al., *Nanobubble-enhanced antimicrobial agents: a promising approach for regenerative endodontics*. 2020. 46(9): p. 1248-1255.
- (۱۹) Seyedah Motahara Ghasemi, Ehsan Karimi and Hamidreza Rahimi, Investigation of the effects of air and oxygen nano-microbubbles on cytotoxicity and induction of apoptosis in liver cancer cells (Huh7 grade), Journal of Mashhad University of Medical Sciences Faculty of Medicine, 2018
- (۲۰) Mahjour, A., et al., *Evaluation of antitumor effect of oxygen nanobubble water on breast cancer-bearing BALB/c mice*. 2019. 120(9): p. 15546-1555۲.

*Original Article***Investigating the Apoptotic Effect of Oxygen, Ozone and Air Nano microbubbles on Melanoma Cell Line**

Received: 30/03/2021 - Accepted: 06/08/2022

Fateme Fazeli¹
Fateme sadeghifar²
Hamid reza rahimi^{3*}

¹ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

² Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

³ Department of Medical Genetics and Molecular Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Email: rahimih@ums.ac.ir

Abstract

Introduction: Skin melanoma is one of the most invasive types of skin cancer. It accounts for about 75% of all skin cancer deaths and has not yet been definitively treated. As a result, early diagnosis and prevention of the disease is important. Much research has been done to find ways to treat and cure cancer. One of the newest methods in this field is the use of nanotechnology to detect and inhibit cancer cells. In this study, the effect of using Nano microbubbles of Air, Oxygen and Ozone on A375 melanoma cancer cell line was evaluated.

Materials and Methods: A375 cell line treated with different concentrations of Nano microbubbles of Air, Oxygen and Ozone and were evaluated by MTT method. In order to measure cell viability, MTT plate was added to each well and then the plate was incubated.

Results: According to the results of this study, a decrease in the viability of A375 cancer cells with an increase in the concentration of Oxygen and Ozone Nano microbubbles after 24 hours indicates apoptosis and has a significant inhibition of the growth of these cells.

Conclusion: The results of this study indicate that Nano microbubbles of Oxygen and Ozone in high concentrations cause cell death of A375 cell line. The results of this study will help investigate the role of Nano microbubbles of Air, Oxygen and Ozone in the treatment of melanoma cancer.

Key words: Melanoma cancer; Nano microbubbles of Air, Oxygen and Ozone; MTT; IC₅₀