مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۱۲۱-۱۱۶

اثر سیتوتوکسیک نانوکامپوزیت تیتانیوم دی اکساید- هیدروکسی اوره روی رده سلول سرطانی Hela

ریحانه قهرمانی فرسفجی (MSc)[۱]، مریم بی خوف تربتی (PhD)[۱*]، فرزانه تفویضی (PhD)[۲]، مسعود شعبانزاده (PhD)[۳]

۱-گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲-گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۳-گروه شیمی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

دریافت: ۹۷/۵/۱۸، اصلاح: ۹۷/۹/۳، پذیرش: ۹۸/۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: استفاده از فناوری نانو در داروسازی علاوه بر افزایش اثر پذیری دارو، باعث کاهش عوارض جانبی داروها نیز می‌شود. در این تحقیق از نانوذرات TiO_2 به عنوان حامل داروی هیدروکسی اوره استفاده شد تا ضمن افزایش سطح تماس دارو با سلولها، با پگیله کردن سطح نانوذرات، ایمونوژیستی، حلالیت و نفوذ دارو به سلول افزایش یابد. هدف از این پژوهش بررسی سمیت سلولی نانو کامپوزیت TiO_2-PEG-HU سنتز شده بر رده سلولی Hela و القای آپوپتوز در سلولهای تیمارشده جهت تعیین دوز موثر نانودارو می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی پس از کشت سلولهای Hela (تهیه شده از انستیتوپاستور)، اثر نانوداروی TiO_2-PEG-HU بر فعالیت حیاتی سلول‌ها با استفاده از روش MTT در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان های ۴۸ و ۱۲۰ ساعت ارزیابی شد. جهت آنالیز القای آپوپتوز از روش فلوسایتومتری Annexin-V/PI استفاده گردید.

یافته‌ها: افزایش غلظت نانو کامپوزیت به صورت وابسته به دوز و زمان تاثیر، توان زیستی سلول‌ها را کاهش داد. به‌طوری‌که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت در مدت زمان تاثیر ۱۲۰ ساعت نسبت به زمان تاثیر ۴۸ ساعت میزان توان زیستی ۱/۵۲ برابر کاهش یافت. برای هر دو زمان این کاهش توان زیستی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده گردید($p<۰/۰۰۰۱$). همچنین، نانو دارو سبب افزایش القاء ۲/۵ برابری آپوپتوز در سلول‌هایHela تیمارشده گردیده است ($p=۰/۰۱۱۴$).

نتیجه‌گیری: نانو کامپوزیت TiO_2-PEG-HU بر روی رده سلولی Hela، سایتوتوکسیک و القا کننده آپوپتوز می‌باشد و می‌تواند به عنوان دارویی امیدبخش در درمان سرطان در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی‌اوره، تیتانیوم، سلول های Hela، داروهای ضدسرطان، آپوپتوز.

مقدمه

طبق بررسی های آماری سرطان دهانه رحم یا سرویکس چهارمین سرطان شایع زنان در جهان محسوب می‌گردد. شیوع سرطان دهانه رحم در ایران نسبت به برخی کشورهای جهان کمتر است. با این وجود در برخی استان‌ها رتبه هفتم را دارد (۲و۱). امروزه محققان در تهیه داروهای ضدسرطان به دنبال فناوری‌هایی هستند که کمترین عارضه جانبی را داشته باشند و با هدف گیری سلول‌های سرطانی اثرات درمانی خود را افزایش دهند(۳). هیدروکسی اوره یک داروی استاندارد ضد سرطان می باشد که در درمان برخی از سرطان‌ها از جمله سرطان سرویکس و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). مکانیسم اثر آن جلوگیری از ساخته شدن داکسی ریبونوکلئوتیدها و همانند سازی DNA از طریق مهار آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز است (۵). از مزیت‌های نانوحامل های دارویی در داروسانی می‌توان به بازده بالا، رسانش هدفمند، کاهش دوز مصرفی، کاهش اثرات سمی جانبی، امکان عبور از موانع مختلف زیست محیطی درون بدن، سینتیک داروئی منظم و توزیع زیستی کنترل شده اشاره نمود (۶). نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (TiO2) بدلیل دارا بودن خواصی از قبیل پایداری نوری، عدم سمیت، خاصیت اکسیداتیو بالا، خواص بیولوژیکی و در دسترس بودن به طور گسترده‌ای در مطالعات ضد سرطانی به کار برده شده‌اند و میتوان از آن به عنوان نانوحامل دارویی استفاده نمود. نانوذرات TiO2 به دلیل تولید ROS تحت تابش UV، اثر ضد التهابی داشته و سبب افزایش حساسیت پرتوی سلول‌های توموری می‌شوند.ROS با اختلال در فرآیند تنفس سلولی و ایجاد آسیب‌های غشایی سبب سمیت و مرگ سلولی گردد (۸و۷). در طراحی نانوحامل های دارویی برای اثرگذاری و افزایش ورود دارو به سلول هدف، کاهش ایمونوژنسیته، پایداری و انحلال پذیری بیشتر دارو در جریان خون معمولا از پلیمرهایی مانند PEG استفاده می‌کنند. بنابراین پگیلاسیون نانوحامل هایی نظیر TiO_2 که انحلال ضعیفی در pH فیزیولوژیک دارند، حلالیت آنها را در مایعات بدن افزایش می‌دهد (۹). در این مطالعه با هدف افزایش خاصیت سایتوتوکسیک

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد ریحانه قهرمانی فرسفجی دانشجوی رشته زیست سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر مریم بی خوف تربتی
آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۲۱-۵۵۲۲۹۲۰۱
E-mail: maryam.bikhof@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]

هیدروکسی اوره، دارورسانی موثرتر و کاهش عوارض جانبی آن در شیمی درمانی سرطان، نانوداروی هیدروکسی اوره بر پایه نانو حامل زیست تخریب پذیر تیتانیوم دی اکسید پگیله استفاده گردید. لذا به منظور بررسی ویژگی های ضدسرطانی این نانوداروی سنتز شده، میزان سمیت نانوداروی تیتانیوم دی اکسید- هیدروکسی اوره و القا مرگ سلولی آپوپتوز در شرایط in vitro بر روی رده سلولی Hela مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم انسان Hela (C155) از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر مرطوب با ۵ ٪ دی اکسیدکربن به صورت تک لایه کشت داده شدند (۱۰). مواد کشت سلول و سایر مواد از شرکت (Gibco BRL, Scotland) یا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شدند. نانوداروی TiO_2-PEG-HU پس از تایید ساختار به روش اسپکتروسکوپی FTIR و تعیین مورفولوژی و ابعاد توسط تصویربرداری SEM در این مطالعه استفاده شد. نانوداروی هیدروکسی اوره در حلال DMSO با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و پس از ۲ ساعت اولتراسونیک، با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر گردید.

سنجش سمیت سلولی به روش MTT assay: در آزمون MTT، رنگ زرد تترازولیوم بروماید به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده احیا شده و کریستال های فرمازان تشکیل میشود. در این تست تعداد ۱۰۰۰۰ سلول Hela به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول‌های دارویی با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به هر حفره اضافه شد. به عنوان کنترل فقط سلول بدون دارو اضافه گردید. پس از ۴۸ و ۱۲۰ ساعت انکوباسیون، رنگ MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر به هر حفره اضافه و پس از ۴ ساعت، کریستال‌های فرمازان در حلال DMSO حل‌شده و در نهایت میزان جذب توسط دستگاه پلیت الایزا ریدر (Tecan - آمریکا) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شده و درصد زیستایی (Viability)و نیز IC50 (Inhibitory concentration 50) گزارش گردید. توان زیستی سلول‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد(۱۱).

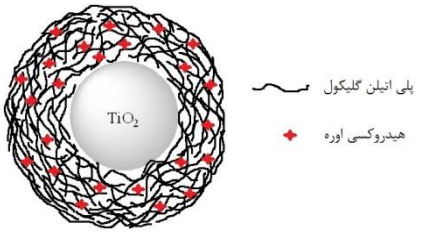
۱۰۰×(میانگین جذب نوری کنترل/میانگین جذب نوری تست)= میزان توان زیستی

ارزیابی آپوپتوز توسط فلوسایتومتری: در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از غشاء داخلی به سطح خارجی غشاء سلول منتقل می گردد و طی رنگ‌آمیزی به کونژوگه های Annexin V-FITC متصل می‌شود. در جمعیت سلولی نکروزی یا آپوپتوز تأخیری غشاء سلول تخریب شده و سلول به رنگ PI نفوذپذیر می‌شود. رنگPI به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur BD - آمریکا) تشخیص داده شد.. به‌منظور بررسی مرگ سلولی و تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده، سلولهای Hela با غلظت IC50 نانوداروی هیدروکسی اوره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس رسوب سلولی طبق دستورالعمل کیت انکسین/ پروپیدیوم یدید (Affymetrix)، رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری در طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و فیلتر قرائت ۵۱۵ نانومتر برای فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و با فیلتر ۶۰۰ نانومتر برای رنگ (PI) ارزیابی و درصد هریک از مربعات چهارگانه نسبت به‌کل ثبت گردید (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها و میزان IC50 با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۶/۱ آنالیز شد. نتایج با استفاده از روش واریانس یک طرفه و آزمون T مستقل تجزیه و تحلیل گردید. تحلیل راندمان و نوع مرگ سلولی در روش فلوسایتومتری نیز توسط نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷/۶/۱ صورت گرفت و $p<0/05$ معنی دار درنظر گرفته شد.

یافته ها

تایید ساختار و اندازه نانوداروی تیتانیوم دی اکسید-پلی اتیلن گلایکول-هیدروکسی اوره: با مطالعه طیف FTIR نانوذرات سنتز شده، ساختار شیمیایی نانو دارو تأیید شد. فرکانس جذبی ارتعاشات کششی در cm^{-1} ۲۹۲۰، ۳۴۲۰، ۱۶۶۰، ۱۱۲۰، ۶۶۴ و ۵۴۰ به ترتیب مربوط به گروه های CH_2 پلی اتیلن گلیکول، OH و NH در پلی اتیلن گلیکول و داروی هیدروکسی اوره، C=O هیدروکسی اوره، C-O-C در پلی اتیلن گلیکول و پیوندهای Ti-O-Ti نانوذرات TiO_2در ساختار نانو دارو است. افزایش شدت جذب گروه CH_2 تأیید کننده لود شدن پلی اتیلن گلیکول بر روی هسته TiO_2است. مورفولوژی سطح کروی و قطر نانوذرات به کمک تصویر SEM بین ۳۰ تا ۶۰ نانومتر تایید شد (شکل ۱).



شکل ۱. ساختارشماتیک نانوذرات تیتانیوم دی اکسید-پلی اتیلن گلیکول حاوی هیدروکسی‌اوره

کاهش توان زیستی سلولهای Hela تیمار شده با نانودارو: توان زیستی سلول‌های تیمار شده در مدت زمان تاثیر ۴۸ ساعت با غلظت بالای نانو داروی هیدروکسی‌اوره، ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، معادل۵/۵۲±۷۸/۶۴ درصد بدست آمد که نسبت به گروه کنترل کاهش زیستایی معنی داری یافته است($p<0/0001$). غلظت های کمتر نانودارو در مدت زمان تاثیر مشابه علی رغم آنکه سبب کاهش زنده ماندن سلولی گردید ولی این کاهش نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی دار نبود (نمودار ۱- الف). درحالیکه با افزایش زمان تاثیر نانودارو به ۱۲۰ ساعت، توان زیستی سلول های تیمار شده در غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۸۷/۱۵±۱/۴۱ ($p<0/05$)، ۸۲/۳۰±۶/۵۵ ($p<0/001$) و ۵۱/۷۳±۵/۸۳ ($p<0/0001$) درصد در مقایسه با گروه کنترل بدست آمد که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را نشان می دهند (نمودار ۱ -ب). بنابراین افزایش غلظت نانودار و سبب افزایش مرگ‌و میر سلولی شده است. غلظت IC50 نانو داروی تیتانیوم دی اکساید-هیدروکسی‌اوره در مدت ۴۸ ساعت تیمار سلولهای Hela، ۳۸۷۶

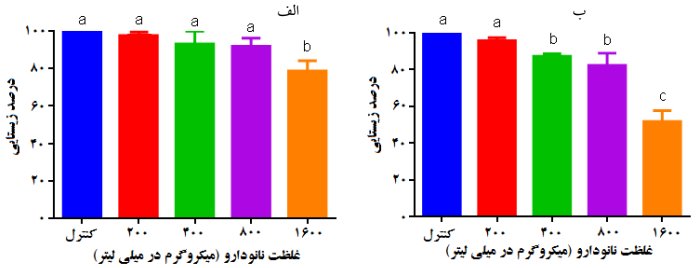
[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]

میکروگرم در میلی‌لیتر و در ۱۲۰ ساعت ۱۷۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید که بطور میانگین ۲۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می باشد. مقایسه درصد زیستایی در دو زمان ۴۸ و ۱۲۰ ساعت نشان داد که نانودارو به طور وابسته به زمان نیز در هر یک از غلظتهای ۸۰۰ ($p<۰/۰۱۵$) و ۱۶۰۰($p<۰/۰۰۰۱$) به طور معنی داری سبب مرگ و میر سلولهای Hela می شود(نمودار ۲).

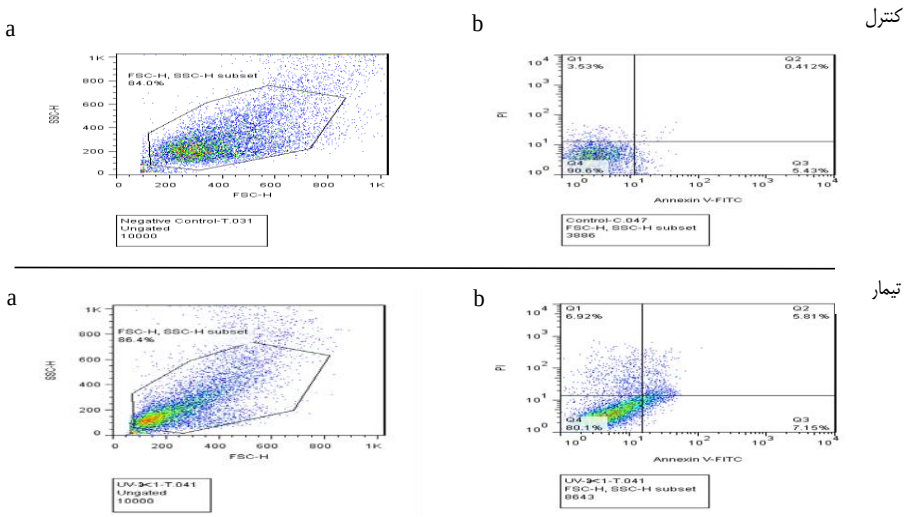
القاء آپوپتوز در سلولهای Hela تیمار شده با نانوداروی TiO_2-PEG-HU:

آنالیز نتایج فلوسایتومتری با رنگ آمیزی دوگانه انکسین/ پروپیدیوم یدید، نوع و درصد مرگ سلولی آپوپتوز و نکروز سلول‌ها را نشان داد (شکل ۲)و(جدول ۱).

میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز و نکروز شده Hela در هر دو گروه کنترل و تیمارشده با غلظتIC50 میانگین (۲۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانو دارو هیدروکسی‌اوره پس از دو بار تکرار در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه نتایج با گروه کنترل نشان می‌دهد که درصد سلول‌های آپوپتوز شده در سلول‌های تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی‌اوره نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. بطوریکه درصد فراوانی کل آپوپتوز در سلول های تیمارشده (آپوپتوز اولیه و ثانویه) حدود ۲/۵۳ برابر افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۰/۰۱۱۴ معنی‌دار می‌باشد (نمودار۳).



نمودار ۱. نمودار ستونی اثردهی غلظت های مختلف نانو داروی TiO_2-PEG-HU در مدت ۴۸ ساعت تاثیر (الف) و در مدت ۱۲۰ ساعت تاثیر (ب) داده ها به صورت میانگین درصد زیستایی±انحراف معیار بیان شده‌است. حروف انگلیسی متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف سطح معنی دار، بین دو گروه مورد ارزیابی است. همچنین وجود حروف مشابه در بالای هر ستون، نشان دهنده عدم وجود اختلاف سطح معنی دار می‌باشد.



شکل۲ – نتایج هیستوگرام Annexin/PI در تست فلوسایتومتری اپوپتوز گروه های کنترل و تیمار با نانو دارو

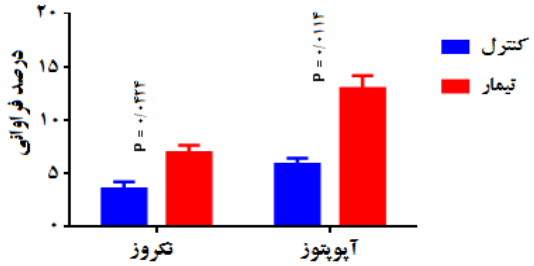
هیستوگرام aناحیه مورد بررسی (Gating) می‌باشد. ناحیه Q_1 هیستوگرام b معرف میزان نکروز ($Annexin^-/PI^+$)، ناحیه Q_2 معرف آپوپتوز تأخیری ($Annexin^+/PI^+$)، ناحیه Q_3 معرف آپوپتوز اولیه ($Annexin^+/PI^-$) و ناحیه Q_4 معرف سلول‌های زنده ($Annexin^-/PI^-$) می‌باشد. (در شکل فقط یک تکرار نمایش داده‌شده است)

جدول۱. میانگین آپوپتوز و نکروز در گروه کنترل(بدون تیمار دارویی) و تیمار شده با غلظت میانگین IC50 نانوداروی TiO2-PEG-HU در مدت زمان تاثیر ۲۴ ساعت

مرگ سلولی / گروه	تیمار Mean±SD	کنترل Mean±SD	P-value
آپوپتوز اولیه (Q3)	۷/۸۶±۱/۰۰	۵/۰۳±۰/۵۷	۰/۰۷۳۹
آپوپتوز تأخیری (Q2)	۵/۹±۰/۱۲	۰/۴۰۵±۰/۰۱	۰/۰۰۰۳
آپوپتوز (Q2+Q3)	۱۳/۷۶±۱/۱۳	۵/۴۳۵±۰/۵۷	۰/۰۱۱۴
نکروز(Q1)	۷/۸۲±۱/۲۷	۳/۰۷±۰/۶۵	۰/۰۴۲۴
زنده (Q4)	۲/۸۲±۷۸/۱	۹۱/۴۹±۱/۲۶	۰/۰۲۵۷

مقادیر به دست آمده بر اساس انحراف معیار±میانگین و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی دار است. نوع آزمون آماری مورد استفاده آزمون t مستقل می باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]



نمودار ۳. مقایسه میانگین آپوپتوز و نکروز در دو گروه کنترل و تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی اوره

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد نانوداروی TiO_2-PEG-HU بصورت وابسته به دوز و زمان بر روی رده سلولی Hela سایتوتوکسیک می باشد و با افزایش زمان تاثیر نانودارو از ۴۸ به ۱۲۰ ساعت میزان سمیت سلولی نانودارو ۲/۲۵ برابر افزایش معنی داری یافته است بطوریکه در مدت زمان اثردهی بیشتر، غلظت‌های کمتر نانودارو نیز نسبت به گروه کنترل سبب کاهش معنی دار فعالیت متابولیک سلول های Hela گردید. این نتایج با یافته های Lotfian و همکارانش مطابقت دارد که در آن نشان دادند نانوذرات TiO_2 اثر مهاری ضعیفی بر روی رده سلولی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دارد. اما پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، بطور قابل توجهی سبب مهار رشد رده سلولی MCF-7 خصوصاً در دوزهای بالاتر گردید (۱۳). نتایج حاصل می‌تواند بیانگر تأثیر نانوذرات روی غشای پلاسمایی سلولها باشد. همچنین دیده می‌شود که در مدت زمان تاثیر ۲۴ ساعت حدود ۷/۸ درصد از سلولها دچار آپوپتوز اولیه شده اند ولی هنوز زنده اند اما با افزایش زمان انکوباسیون نانودارو، این دسته از سلولها نیز وارد مرحله آپوپتوز ثانویه و مرگ خواهند شد و میزان سلولهای مرده در زمانهای ۴۸ و ۱۲۰ ساعت بیشتر مشاهده می شود که نشان دهنده تغییرات غشایی زیاد سلول و احتمالا تأثیر نانوذرات روی DNA و شکست آن می باشد.

مطالعات دیگر نیز نشان داده نانوذرات TiO_2 دوپ شده با نیتروژن($N\text{-}TiO_2$) پس از فعال شدن با نور مرئی می‌تواند سبب مهار رشد سلولهای ملانومای A- ۳۷۵ و سلولهای k562 لوسمی میلوئید مزمن انسانی به صورت وابسته به غلظت و زمان شده و سبب وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز گردد (۱۵و۱۴). مطالعات حاکی از آن است که TiO_2 در رده سلولی اپیدرمال موشی JB6 نیز پس از گذشت ۷۲ ساعت با فعال کردن کاسپاز ۸، Bid، Bax، کاسپاز ۳ و کاهش Bcl-2 سبب القای مرگ سلولی آپوپتوز می گردد (۱۶).

نتایج این تحقیق نشان داد میزان IC50 نانو داروی هیدروکسی‌اوره به ترتیب در ۴۸ و ۱۲۰ ساعت تاثیر ۳۸۷۶ و ۱۷۲۴ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد که با توجه به میزان بارگذاری ۱۰ درصدی هیدروکسی‌اوره بر نانوحامل تیتانیوم دی اکساید پگیله، میزان هیدروکسی‌اوره موجود در ساختار نانو دارو در میانگین غلظت IC50 (۲۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) بر روی رده سلولی Hela، ۲۸۰ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید، در حالی که میزان IC50 گزارش شده داروی استاندارد هیدروکسی‌اوره بر روی رده سلولی Hela، ۴۲۸ میکروگرم در میلی لیتر می باشد (۱۷). به این ترتیب سمیت سلولی نانو داروی بررسی شده در این تحقیق بر روی رده سلولی Hela، ۱/۵۳ برابر نسبت به داروی استاندارد هیدروکسی‌اوره افزایش یافته است که می تواند منجر به کاهش عوارض جانبی هیدروکسی‌اوره گردد. در مطالعه ای موافق با تحقیق حاضر، اثر سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره نانولیپوزومه شده برروی رده ی سلولی سرطان سینه بیشتر از داروی استاندارد هیدروکسی اوره گزارش گردیده است (۱۸). این گزارشات و نیز نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که استفاده از نانوحامل های مناسب برای هیدروکسی اوره می تواند میزان جذب سلولی و خواص سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره را در سلولهای سرطانی افزایش دهد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که نانوداروی TiO_2-PEG-HU در مقایسه با گروه کنترل باعث القای ۲/۵ برابری مرگ سلولی آپوپتوز در رده سلولی Hela می گردد.

گزارشات قبلی توسط Gui (۱۹) و Vesela (۲۰) نیز به نقش هیدروکسی اوره در القاء آپوپتوز در رده سلولی Hela اشاره کردند. طی این بررسی ها، پاسخ القا شده تحت تأثیر هیدروکسی اوره، تراکم منظم کروماتین‌ها بر دیواره‌ی هسته سلولی به همراه تشکیل اجسام آپوپتوتیک غشایی کاملاً مشهود بود. محققان قطعات DNA شکسته شده را بر اساس clonogenic بررسی و مشاهده نمودند که قطعات DNA به‌صورت تکه‌های منظم الیگونوکلئوزومی می باشد که حاکی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی است. همچنین Yeo و همکاران نیز در مطالعات خود دریافتند هیدروکسی اوره می‌تواند منجر به پیری سلولی از طریق القای ژن‌های P53، p21 و Waf1 گردد (۲۱) که درتأیید نتایج حاصل از این تحقیق می باشند. بر طبق یافته های بدست آمده از این پژوهش نانو داروی TiO_2-PEG-HU باعث مختل شدن روند حیات سلول های Hela می‌شود. همچنین این دارو بطور معنی داری باعث القای آپوپتوز در سلول های مورد بررسی می شود. این نتایج نشان دهنده اثرپذیری مناسب‌تر نانو داروی هیدروکسی اوره با دوز پایین تر نسبت به هیدروکسی اوره استاندارد بعنوان یک داروی ضد سرطان است ولی از آن جا که این مطالعه آزمایشگاهی است با محدودیت هایی مواجه است. لذا پیشنهاد می شود بررسی های درون تنی بر روی مدل‌های حیوانی به منظور بررسی و کاهش عوارض جانبی دارو نیز انجام گیرد. شاید بتوان آن را بعنوان جایگزین داروی استاندارد ضد سرطان هیدروکسی اوره معرفی نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری جهت حمایت از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]

Cytotoxic Effect of Titanium Dioxide-Hydroxyurea Nanocamposit on Hela Cancer Cell Line

R. Ghahremani Farasfaji (MSc)[1], M. Bikhof Torbati (PhD)[1*], F. Tafvizi (PhD)[2] , M. Shaabanzadeh (PhD)[3]

1.Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R.Iran
3.Department of Chemistry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 116-21
Received: Aug 9th 2018, Revised: Nov 24th 2018, Accepted: Apr 9th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The use of nanotechnology in drug delivery Not only increase the efficacy and ease of drug penetration, but also they decrease their adverse effects. In this study, TiO2 nanoparticle was used as Hydroxyl Urea carrier to increase the contact surface of the drug and cells, and with pegylation of nanoparticle surface decrease immunogenicity, hence to increase drug solubility and penetration to cells. The goal of this study was to investigate cytotoxicity of synthesized TiO2-Poly Ethylene Glycol-Hydroxy Urea (TiO2-PEG-HU) nanocomposite on Hela cell-line and apoptosis induction of treated cells compared to the control group to determine the effective dose of nanodrug.

METHODS: In this laboratory study, the effect of TiO2-PEG-HU nano-drug was evaluated on cells bioactivity by MTT method at concentrations of 200, 400, 800, and 1800 µg/ml in 48 and 120 hours. Annexin-V/PI flowcytometry method was used to analyze apoptosis induction. Data were analyzed using uni-directional variance and independent T-test.

FINDINGS: Higher concentrations of TiO2-PEG-HU nanocomposite decreased cells bioactivity dependent on dosage and time. As the concentration of 1600 µg/ml of nanocomposite reduced amount of bioavailability by 1.52 times over a 120-hour period compared to the 48-hour time-effect. For both times, this reduced cell survival was `significantly different from that of the control group at the level of $p < 0.0001$. In addition, nano-drug significantly increased apoptosis induction 2.5 times in treated Hela cells ($p=0.0114$).

CONCLUSION: Nano-composite TiO2-PEG-HU on the Hela cell line is cytotoxic and induces apoptosis and can be a promising drug for cancer treatment.

KEY WORDS: *Hydroxy Urea, Titanium, Hela cells, Anti-cancer drugs, Apoptosis.*

Please cite this article as follows:
Ghahremani Farasfaji R, Bikhof Torbati M, Tafvizi F, Shaabanzadeh M. Cytotoxic Effect of Titanium Dioxide-Hydroxyurea Nanocamposit on Hela Cancer Cell Line. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:116-21.

***Corresonding Author: M. Bikhof Torbati (PhD)**
Address: Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 55229201
E-mail: maryam.bikhof@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]

References

1.Rezaei F, Saghafipour A, Mirheydari M, Eshagh Hosseini SK. Trend of Cancer Incidence in Qom Province in a Period of 8 Years (2007-2014). J Health. 2018; 8(5):530-8.

2.Khodakarami N, Farzaneh F, Yavari P, Khayamzadeh M, Taheripanah R, Esmaeil Akbari M. The New Guideline for Cervical Cancer Screening in Low Risk Iranian Women. Iran J Obstet Gynecol Infertil. 2014; 17(95): 8-17. [In Persian]

3.Sadalla JC, Andrade JM, Genta ML, Baracat EC. Cervical cancer: what's new?. Rev Assoc Med Bras. 2015;61(6):536-42.

4.Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. Expert Rev Anticancer Ther. 2012;12(1):19-29.

5.Šaban N, Stepanić V, Vučinić S, Horvatić A, Cindrić M, Perković I, et al. Antitumor mechanisms of amino acid hydroxyurea derivatives in the metastatic colon cancer model. Int J Mol Sci. 2013;14(12):23654-71.

6.Din Fu, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, Zeb A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. Int J Nanomedicine. 2017; 12:7291–309.

7.Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO_2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2007; 628(2):99-106.

8.Esmi F, Marashi SMA, Saffari A, Abyat A, Bijani A. The Effect of Light Curing Glass Ionomer Containing Various Amounts of Zinc Oxide Nanoparticles on the Streptococcus Mutans Activity. J Babol Univ Med Sci. 2014; 16(4):35-42.

9.Mishra P, Nayak B, Dey RK. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. Asian J Pharma Sci. 2016; 11(3):337-48.

10.Anjam najmedini A, Vahabpour R, Jalali F, Bashash D. Design of Lentiviral Vector of Apoptin and Investigating its Cytotoxic Effect on Reh Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(5):48-53. [In Persian]

11.Bikhof Torbati M, Ebrahimian M, Yousefi M, Shaabanzadeh M. GO-PEG as a drug nanocarrier and its antiproliferative effect on human cervical cancer cell line. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017; 45(3):568-73.

12.Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. J Vis Exp. 2011; 50:2597.

13.Lotfian H, Nemati F. cytotoxic effect of TiO_2 nanoparticles on breast cancer cell line (MCF-7). IIOAB J. 2016; 7(Supple 4):219-24.

14.Sharifi M, Moosavi M, Naji T. effect of nitrogen-nano doped of titanium dioxide in human A-375 melanoma cancer cell line. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2017; 25(108):68-80. [In Persian]

15.Moosavi SMA, Khataee A, Moasses Ghafari S. Study of the photocatalytic effects of nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles on growth inhibition and apoptosis induction in K562 cell line. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2013;18(1):47-58. [In Persian]

16.Zhao J1, Bowman L, Zhang X, Vallyathan V, Young SH, Castranova V, Ding M. Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. J Toxicol Environ Health A. 2009; 72(19):1141-9.

17.Ruswanto, Miftah AM, Tjahjono DH, Siswandono. Synthesis and in vitro Cytotoxicity of 1-Benzoyl-3-methyl thiourea Derivatives. Proc Chem. 2015;17:157-61.

18.Alavi SE, Koohi Moftakhari Esfahani M, Chiani M, Heidarinasab A, Akbarzadeh A. Evaluating the effect of nanoliposomal hydroxyurea urea on the breast cancer cell line. New Cell Mol Biotechnol J. 2013; 3(11):63-7. [In Persian]

19.Gui CY, Jiang C, Xie HY, Qian RL. The apoptosis of HEL cells induced by hydroxyurea. Cell Res. 1997;7(1):91-97.

20.Vesela E, Chroma K. Turi Z, Mistrik M. Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. Biomolecules 2017;7(1): pii: E19.

21.Yeo E, Hwang YC, Kang CM, Kim IH, Kim DI, Parka JS, et al. Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. Exp Gerontol. 2000;35(5):553-71.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.19.4]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.116]