بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۵-۱۶ بهمن ۱۳۹۸

مطالعه اثر هایپرترمی به واسطه ی حضور نانوتیوب های کربنی پگیله شده و نور لیزر بر سلول های سرطان تخمدان رده SKOV3 : بررسی میزان حیات سلول ها

نیلوفر شاه بهرامی مقدم[۱]، نغمه حدیدی[۲]، غلامرضا پازوکی[۳]، زرین شریف نیا[۲]، عاطفه اعتقادی[۲] ، فاطمه شاهی[۴]، پرویز پروین[۴]

[۱]گروه نانوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]بخش تحقیقات بالینی و میکروسکوپ الکترونی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

[۳]دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

[۴]دانشکده فیزیک و مهندسی انرژی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

چکیده – نانولوله‌ها کربنی پگیله به عنوان نسل جدیدی از نانوذرات که قابلیت حساسیت زایی در برابر نور لیزر را دارند، اخیرا مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانولوله ها کربنی می توانند با تبدیل نور به گرما باعث افزایش دما شوند. در این پژوهش، اثر همزمان افزایش دمای ناشی از نانولوله‌هاکربنی پگیله شده و حضور لیزر در شرایط برون تنی بر روی سلول های سرطان تخمدان رده **SKOV3** مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان آپوپتوز توسط روش فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج آپوپتوز نشان داد که مواجهه هم زمان نانولوله ها کربنی پگیله و نور لیزر منجر به القای بیشتر مرگ سلول های سرطانی می شود.

کلید واژه- سرطان، سرطان تخمدان، کربن نانوتیوب های پگیله، هایپرترمی

Investigation of hyperthermia effect induced via the presence of carbon nanotubes and laser light on SKOV3 ovarian cancer cells line: Evaluation of cell viability

Niloufar Shahbahrami Moghadam[1],Naghmeh Hadidi[2],Gholamreza Pazuki[3], Zarin Sharifnia[2], Atefeh Eteghadi[2], Fatemeh Shahi[4], Parviz Parvin[4]

[1]Department of Nanotechnology, Faculty of New Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Department of Clinical Research and EM Microscope, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[3]Department of Chemical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

[4]Department of Energy Engineering and Physics, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

Abstract- PEGylated carbon nanotubes have been recently considered as a new generation of nanoparticles that are sensitive to laser light. Carbon nanotubes (CNT) can cause hyperthermia by converting light to heat. In this study, the effect of hyperthermia via PEGylated CNTs in the presence of 808 nm laser diode on SKOV3 ovarian cancer cell line in vitro condition was investigated. The apoptosis assay was used by the Flow Cytometry The apoptosis test results showed that laser couple with PEGylated carbon nanotubes damage cancer cell.

Keywords: Cancer, Ovarian Cancer, Hyperthermia, PEGylated Carbon Nanotubes

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]

مقدمه

هایپرترمی روشی نوین برای درمان سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود. کار مهمی که این روش انجام می دهد این است که باعث افزایش حساسیت سلول‌ها به سایر روش‌های درمانی نظیر پرتودرمانی و شیمی درمانی می‌شود. نور مادون قرمز نزدیک (NIR) باعث ایجاد حداقل گرمازایی هم در تومور و هم در بافت سالم می‌شود، زیرا کمترین جذب را برای بافت‌های بیولوژیکی متشکل از خون و آب در منطقه (700nm-900nm) دارد. تغییر شیمی سطحی و ساختار نانولوله‌ها به منظور کاهش سمیت امری ضروری است(۱).

Markovic و همکاران مطالعه‌ای بر روی سلول‌های گلیوبلاستوما انجام دادند. آنها از لیزر ۸۰۸ نانومتر با شدت ۲ وات بر سانتیمتر مربع و مدت زمان تابش ۳۰ تا ۳۰۰ ثانیه استفاده کردند. ماده حساس به نور استفاده شده گرافن و نانولوله کربنی بود و برای بررسی سمیت سلولی از تست MTT و روش فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج حاکی از آن است که مرگ سلول‌ها به علت آسیب به میتوکندری سلول‌ها و القای آپوپتوز و نکروز در آن‌ها است(۲).

در مطالعه دیگری که توسط سبحانی و همکاران بر روی سلول‌های ملانوما در فاز درون تن انجام شد از لیزر ۸۰۸ نانومتر با شدت ۸ وات بر سانتی متر مربع برای مدت ۱۰ دقیقه بر تومور استفاده شد. ماده حساس به نور استفاده شده نانولوله‌کربنی بود. بعد از مواجهه تومور با نانولوله‌کربن و لیزر نتایج نشان دهنده کاهش چشمگیر اندازه تومور در این گروه بود (۳).

روش کار

۱- تهیه نانولوله‌کربنی پگیله به عنوان ماده حساس به نور:

یک میلی‌گرم از نانولوله‌کربنی خالص وزن و به ویال‌های شیشه‌ای حاوی ۲ میلی‌لیترمحیط‌کشت *DMEM* اضافه و در آن پراکنده شد. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت شد. از طرف دیگر، ۸ میلی‌گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول (DSPE-PEG5000-N) (Nanocs)، به۲میلی‌لیتر محیط‌کشت استریل اضافه و در حمام اولتراسونیک با دمای ۴ تا ۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، قرار داده شد. این عمل سه بار تکرار شد. پلیمرDSPE-PEG حل شده به نانولوله‌های کربنی که تقریبا پخش شده‌اند اضافه و در دمای اتاق سونیکیت شد. سوسپانسیون به دست آمده برای مدت ۶ ساعت و در دمای اتاق و با ۱۸۰۰۰ دور در ثانیه تحت سانترفیوژ(Optima L-90 K, Beckman Coulter, California, USA) قرار گرفت تا نانو لوله های کربنی محلول و عاملدار شده به عنوان سطح رویی جدا شود. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی به دستگاه سانتریفیوژ فیلتری vivaspin افزوده شد. سپس به آن، ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM افزوده و ترکیب حاصل برای مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور دردقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. پس از آن رسوب‌های حاصله ۵ یا ۶ بار توسط محیط کشت DMEM شسته شد تا پلیمر DSPE-PEG اضافی به طور کامل شسته شود.

۲- کشت سلول:

رده سلولی SKOV3 مربوط به سرطان تخمدان از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر مرطوب حاوی ۵درصد CO_2 در محیط کشتDMEM، سرم جنین گاوی ٪۱۰، پنیسیلین و استروپتومایسین کشت داده شدند. سپس سلول‌ها توسط تریپسین از کف فلاسک کنده شدند. مقدار ۵۰۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۴۸ خانه به منظور انجام تست آپوپتوز و تابش لیزر انتقال داده شد.

۳- تابش لیزر:

سلول‌های چسبیده به کف پلیت ۴۸ خانه در معرض نانولوله‌های‌کربنی پگیله با غلظت‌های ۲/۵، ۱۳/۷۵و۲۵

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]

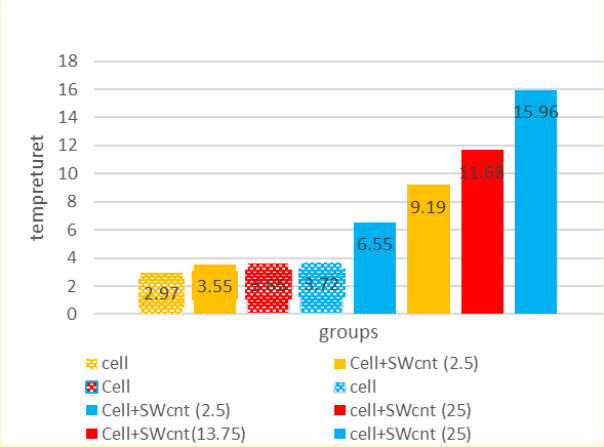
میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان مواجهه سلول‌ها چاهک‌ها به طور مجزا تحت تابش نور لیزر دیود ۸۰۸ نانومتر با شدت ثابت ۲ وات بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند. در طول تابش لیزر دمای هر چاهک با کمک دماسنج (Fluke 51 II Handheld Digital Probe Thermometer) اندازه‌گیری شد.

۴- میزان مرگ سلولی:

برای بررسی میزان مرگ سلولی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از مواجهه تست آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin V Apoptosis Detection Kit و بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. ابتدا در یک میکرولوله تعداد ۱۰۰ هزار سلول ریخته شد. سپس سلول‌ها با سرعت g × ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی سلول‌ها خالی شده و به هر میکرولوله ۱ میلی‌لیتر بافر فلوسایتومتری موجود در کیت اضافه شد و در همان شرایط سانتریفیوژ شدند. سپس به رسوب سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی fluorochrome-conjugated Annexin V اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی در دمای $4^{\circ}C$ در تاریکی با آنتی بادی مجاور گردیدند. سپس آنتی بادیهای متصل نشده با دو بار شستشو حذف شدند. در مرحله بعد به رسوب سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر 7-AAD Viability Staining Solution اضافه شد و سلولها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در محلول رنگ آمیزی در دمای $4^{\circ}C$ در تاریکی انکوبه شدند. در یک میکرولوله ۳۰۰ هزار سلول ریخته شد و پس از شستشو هیچ آنتی‌بادی به آن اضافه نشد و به عنوان لوله بلانک در نظر گرفته شد. در انتها سلولها با دستگاه فلوسایتومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج با نرم افزار فلو جو(Flow Jo) آنالیز شد.

نتایج

مطالعه در دو بخش مورد بررسی قرار گرفت. بخش اول، تغییرات دمایی سلول‌ها در حالت بدون ماده حساس به نور و با ماده حساس به نور به منظور بررسی اثر افزایش دمای مورد مطالعه قرار گرفت. در بخش دوم، بررسی اثر افزایش دما بر مرگ سلول ها به کمک تست آپوپتوز انجام شد. نتایج تغییرات دما برای دو سیستم سلول با نانولوله‌کربن و بدون نانولوله‌کربن برای غلظت‌ها و زمان‌های تابش مختلف در شکل ۱ آمده است. هر چه غلظت نانولوله کربن تک دیواره (بر حسب µg/ml) بیشتر باشد افزایش دما نیز بیشتر است.



شکل ۱: تغییرات دمایی ناشی از تابش لیزر به سلول‌ها حاوی/فاقد نانولوله‌های کربنی پگیله شده

فلوسایتومتری نتایج علائم مرگ سلولی را با رنگ آمیزی آنتی بادی‌های مختلف به صورت آپپتوز اولیه، ثانویه و نکروز نشان می دهد. همانطور که در جدول ۱ مشخص است مواجهه هم زمان سلول‌ها با نانولوله‌ها کربنی پگیله شده و لیزر باعث القای بیشتر مرگ سلول‌های سرطانی(گروه سه) ۴۸ ساعت بعد از مواجهه نسبت به گروه‌های تحت مواجهه با تابش لیزر به تنهایی یا نانولوله‌های کربنی پگیله به تنهایی می‌باشد. شکل ۲ نشان دهنده جمعیت‌های سلولی مورد مطالعه است. محور x مربوط به رنگ Annexin V و محور y نشان دهنده رنگ ۷- AAD می‌باشد.گروه هایی که

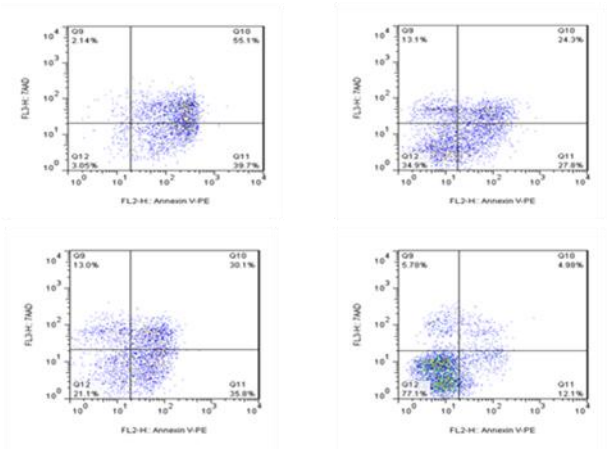
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]

فقط رنگ Annexin V را دریافت کرده اند دچار آپپتوز اولیه، گروه هایی که فقط رنگ AAD-۷ را دریافت کرده‌اند دچار نکروز و گروه هایی که هر دو رنگ را دریافت کرده اند دچار آپپتوز ثانویه شده‌اند.

جدول ۲. نتایج تست آپوپتوز

Groups	Early apoptosis		Late apoptosis		Necrosis	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1: (1min laser+2.5 µg/ml)	12.77%	35.53%	5.03%	14.30%	18.45%	2.99%
2: (1min laser)	13.51%	43.47%	6.96%	13.38%	10.14%	3.06%
3: (1min laser+25 µg/ml)	25.67%	39.03%	9.44%	46.28%	9.18%	2.77%
4: (2.5 µg/ml)	23.63%	35.47%	8.87%	23.46%	9.39%	3.53%
5:(25 µg/ml)	38.83%	39.70%	11.13%	22.42%	12.60%	3.55%
6: (13.75 µg/ml)	43.30%	22.63%	11.06%	17.01%	12.62%	2.46%
7:(2min laser+13.75)	26.57%	35.03%	11.55%	21.83%	16.74%	4.45%
8: (2min laser)	22.80%	20.23%	6.70%	20.95%	16.00%	7.77%
9: (3min laser+2.5)	25.23%	27.10%	6.45%	17.78%	11.25%	6.33%
10: (3min laser)	16.47%	32.45%	9.84%	19.29%	20.48%	2.58%
11: (3min laser+25)	22.53%	26.20%	5.56%	16.44%	12.89%	6.58%
12: Row cells	5.90%	12.11%	0.30%	8.21%	2.47%	4.85%



شکل ۲: نتایج تصویری مربوط به تست فلوسایومتری

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کربن نانولوله پگیله به تنهایی قادر به القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) در غلظت‌های ذکر شده می‌باشند. اما حضور هم زمان نانولوله‌کربنی پگیله شده و تابش لیزر مرگ سلولی را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد.

مرجع‌ها

[1] Rossella, F., et al. (2012). "Metal-Filled Carbon Nanotubes as a Novel Class of Photothermal Nanomaterials." Advanced materials 24(18): 2453-2458.

[2] Zoren M. Markovic, L. M.-T.-M. et al.(2011). In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes.Biomaterials, 1121-1129

[3] Zahra Sobhani, M. A. et al. (2017). Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. International Journal of Nanomedicin, 4509—4517

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-23]