



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 هایپر ترمی 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^۳، عاطفه اعتقادی^۲، فاطمه شاهی^۴، پرویز پروین^۴

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

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

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

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

چکیده - نانولوله های کربنی پگیله به عنوان نسل جدیدی از نانوذرات که قابلیت حساسیت زایی در برابر نور لیزر را دارند، اخیراً مورد توجه قرار گرفته اند. نانولوله های کربنی می توانند با تبدیل نور به گرما باعث افزایش دما شوند. در این پژوهش، اثر همزمان افزایش دمای ناشی از نانولوله های کربنی 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 های کربنی پگیله و نور لیزر منجر به القای بیشتر مرگ سلول های سرطانی می شود.

کلید واژه - سرطان، سرطان تخمدان، کربن نانوتیوب های پگیله، هایپر ترمی

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 Moghadam¹, Naghmeh Hadidi², Gholamreza Pazuki³, Zarin Sharifnia², Atefeh Eteghadi²,
Fatemeh Shahi⁴, Parviz Parvin⁴

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

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

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

⁴Department 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

مقدمه

سونیکیت شد. از طرف دیگر، ۸ میلی گرم پلی اتیلن گلیکول (Nanocs) (DSPE-PEG5000-N)، به ۲ میلی لیتر محیط کشت 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. پلیمر DSPE-PEG حل شده به نانولوله های کربنی که تقریباً پخش شده اند 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 سانتریفیوژ (Optima L-90 K, Beckman Coulter, California, USA) قرار گرفت تا نانولوله های کربنی محلول و عاملدار شده به عنوان سطح رویی جدا شود. ۰/۵ میلی لیتر از مایع فوقانی به دستگاه سانتریفیوژ فیلتری vivaspin افزوده شد. سپس به آن، ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM افزوده و ترکیب حاصل برای مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. پس از آن رسوب های 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. سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ در محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی ۱۰٪، پنسیلین و استروپتومايسين کشت داده شدند. سپس سلول ها 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:

سلول های چسبیده به کف پلیت ۴۸ خانه در معرض نانولوله های کربنی پیگله با غلظت های ۲/۵، ۱۳/۷۵ و ۲۵

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

Markovic و همکاران مطالعه ای بر روی سلول های 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 سلول ها به علت آسیب به میتوکندری سلول ها و القای آپوپتوز و نکروز در آن ها است (۲).

در مطالعه دیگری که توسط سبحانی و همکاران بر روی سلول های 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 نانولوله کربنی بود. بعد از مواجهه تومور با نانولوله کربن و لیزر نتایج نشان دهنده کاهش چشمگیر اندازه تومور در این گروه بود (۳).

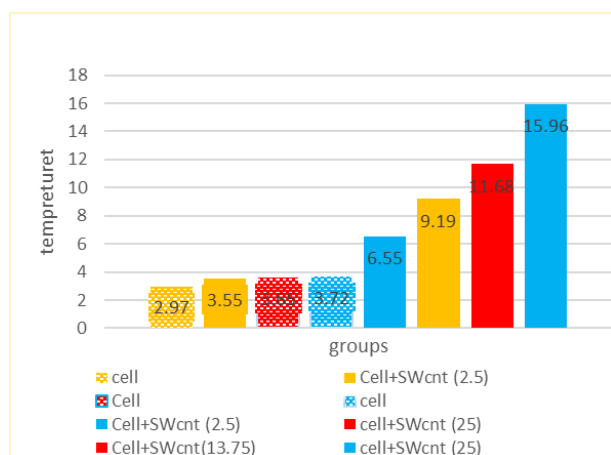
روش کار

۱- تهیه نانولوله کربنی پیگله به عنوان ماده حساس به نور:

یک میلی گرم از نانولوله کربنی خالص وزن و به ویال های شیشه ای حاوی ۲ میلی لیتر محیط کشت DMEM اضافه و در آن پراکنده شد. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه

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 سلول‌ها به کمک تست آپوپتوز انجام شد. نتایج تغییرات دما برای دو سیستم سلول با نانولوله کربن و بدون نانولوله کربن برای غلظت‌ها و زمان‌های تابش مختلف در شکل ۱ آمده است. هر چه غلظت نانولوله کربن تک دیواره (بر حسب $\mu\text{g/ml}$) 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 می‌دهد. همانطور که در جدول ۱ مشخص است مواجهه هم‌زمان سلول‌ها با نانولوله‌های 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 AAD-۷ می‌باشد. گروه‌هایی که

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 $300 \times g$ 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 fluorochrome-conjugated آنتی‌بادی Annexin V اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی در دمای ۴°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 رنگ‌آمیزی در دمای ۴°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.

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

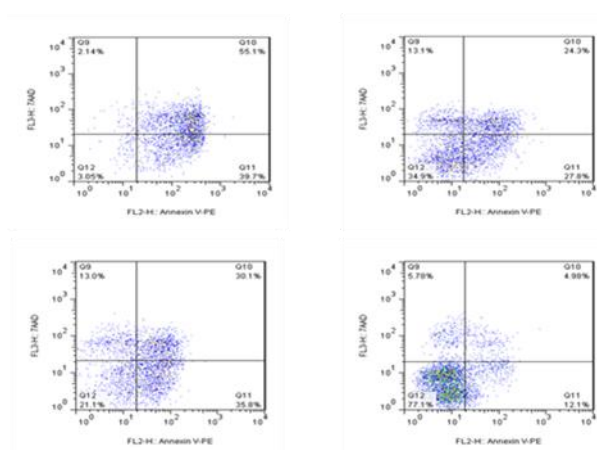
جدول ۲. نتایج تست آپتوز

Groups	Early apoptosis		Late apoptosis		Necrosis	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1: (1min laser+2.5 $\mu\text{g/ml}$)	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 $\mu\text{g/ml}$)	25.67%	39.03%	9.44%	46.28%	9.18%	2.77%
4: (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	23.63%	35.47%	8.87%	23.46%	9.39%	3.53%
5: (25 $\mu\text{g/ml}$)	38.83%	39.70%	11.13%	22.42%	12.60%	3.55%
6: (13.75 $\mu\text{g/ml}$)	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%

شده سلولی (آپتوز) در غلظت های ذکر شده می باشند.
اما حضور هم زمان نانولوله کربنی پگیله شده و تابش لیزر
مرگ سلولی را به طور قابل ملاحظه ای افزایش می دهد.

مرجع ها

- [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 Nanomedicine*, 4509—4517



شکل ۲: نتایج تصویری مربوط به تست فلوسایومتری

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که کربن
نانولوله پگیله به تنهایی قادر به القای مرگ برنامه ریزی