مقایسه اثرات حفاظتی سنتز کلوئیدی نانوذرات سلنیوم در عصاره آبی رزماری در برابر پرتو یونیزان در سلول‌های تخمدان همستر چینی

1- مژگان حسن زاده
2- دکتر محمد تقی بحرینی طوسی
3- فرشته وزیری نظام دوست
4- دکتر سارا خادمی
5- دکتر مجید درودی
6- دکتر حسین عظیمیان

1-کارشناسی ارشد رادیوبیولوژی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: hassanzade918@gmail.com
2-استاد مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: BahreyniMT@mums.ac.ir
3-کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: vazirinf3@mums.ac.ir
4-استادیار گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: khademisr@mums.ac.ir
5-استادیار مرکز تحقیقات پزشکی هسته ای، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و گروه بیوتکنولوژی پزشکی و نانوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: DarroudiM@mums.ac.ir
6-نویسنده مسئول، استادیار مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: AzimianH@mums.ac.ir

چکیده

رادیوتراپی می تواند اثر منفی بر عملکرد تخمدان و باروری داشته باشد. محافظت کننده های پرتویی می توانند اثرات پرتوهای یونیزان را کاهش دهند. این مطالعه توانایی عصاره رزماری و نانوذرات سلنیوم در حذف رادیکال‌های آزاد را بررسی می کند. ابتدا

سلول‌های CHO در شرایط آزمایشگاهی کشت و با غلظت‌های مختلف نانوذرات حاوی رزماری و عصاره رزماری تیمار شده اند و تحت تابش پرتوهای یونیزان قرار گرفتند. و میزان بقا با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. برخلاف انتظار، نانوذرات در مقایسه با رزماری اثر هم افزایی نشان نداد و اثر محافظتی در این دو روش تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان نداد.($P>0.05$)

کلمات کلیدی: محافظ پرتویی، نانوذرات، رزماری، پرتو یونیزان، اثر هم افزایی

1_ مقدمه

پرتودرمانی یکی از راههای درمان سرطان است که از طریق ایجاد آسیب توسط پرتوهای یونیزان در بافت توموری از رشد تومور جلوگیری می کند. پرتو های یونیزان در سلول های بدن رادیکال آزاد تولید می کنند و علاوه بر مرگ سلول های سرطانی می تواند در بافت های سالم نیز آسیب وارد کنند[1]. آسیبی که پرتو به سلول های سالم وارد می کند می تواند پرتودرمانی را محدود کند و از تابش دوز مورد نیاز برای درمان تومور جلوگیری کند[2]. بنابراین برای کاهش عوارض جانبی پرتودرمانی در سلول های طبیعی می توان از موادی با خاصیت محافظتی در برابر اشعه استفاده کرد. آنتی اکسیدان ها در کاهش عوارض ناشی از تابش اشعه ی یونیزان بسیار موفق عمل کرده اند[3]. آنتی اکسیدان های گیاهی مانند رزماری به دلیل عدم سمیت ذاتی به عنوان محافظت کننده ی پرتویی می توانند گزینه ی مناسبی باشند[4-7]. سلنیوم نیز مانند رزماری اثر آنتی اکسیدانی بالایی از خود نشان داده است. ولی به دلیل اینکه فقط در غلظت های بسیار پایین برای بدن سمی نیست در تحقیقات بیولوژی از نانوذرات آن استفاده می شود[8, 9].

در سنتز کلوئیدی نانوذرات سلنیوم در محیط آبی عصاره رزماری(CSSNANO) به دلیل وجود دو آنتی اکسیدان احتمال داده شد که نسبت به رزماری تنها اثر آنتی اکسیدانی و محافظت پرتویی بیشتری مشاهده شود. به منظور بررسی این فرضیه، در این مطالعه اثر بقای سلولی برای سلول های همستر چینی (CHO) تیمار شده با رزماری و نانوذرات (CSSNANO) درمقابل اشعه اندازه گیری و با هم مقایسه شد.

2_ مواد:

عصاره رزماری (Rosmarinus officinalis L) با غلظت 19.7mgr/ml، سنتز کلوئیدی نانوذرات سلنیوم در عصاره آبی رزماری انجتم شد. سلول های تخمدان همستر چینی (CHO) از انستیتو پاستور در ایران خریداری شد. RPMI 1640، MTT (3-[10] -2،5-دی فنیل تترازولیوم بروماید) ، سرم جنین گاوی (10٪) از شرکت GIBCO تهیه گردید.

2_الف) سنتز نانوذرات سنتز کلوئیدی نانوذرات سلنیوم در عصاره آبی رزماری:

ابتدا گیاه رزماری (Rosmarinus officinalis L) با کد هرباریوم E1131-FUMH به روش مورد استفاده توسط حسینی و همکاران [11] استخراج شد، سپس محلول 100 میلی‌لیتری از محلول نمک سلنیوم 10 میلی‌مولار تهیه و قطره قطره 20 میلی‌لیتر از عصاره به محلول نمک اضافه می‌شود. محلول به مدت یک ساعت در دمای 80 درجه سانتیگراد و سپس به مدت 24 ساعت در دمای محیط هم زده می شود. سپس محلول به دست آمده سانتریفیوژ می شود (10000 دور در دقیقه) و رسوب در فریزر 80- درجه سانتی گراد قرار می گیرد و توسط فریزر خشک کن به مدت 48 ساعت خشک می شود.

2–مشخصه یابیCSSNANO :

اندازه و شـــکل نانوذرات توســـط میکروســـکوپ الکترونی عبوری (TEM) به دســـت می‌آید. طیف جذبی این نانوذرات توســـط اسپکتروفتومتر (UNICO UV-2100, USA) ثبت می شود. (تصویر 1)

3– سمیت برای رزماری و نانوذرات CSSNANO :

در پلیت 96 خانه ای سـلول‌های CHO با غلظت‌های مختلف رزماری و نانوذرات CSSNANO به مدت 6، 12 و 24 سـاعت تیمار شـدند. سـپس سـلول ها در RPMI 1640 حاوی 10 درصـد سـرم جنین گاو، پنی سـیلین (100 واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند. سلول ها در دمای 37 درجه سانتی گراد و فشار 5 درصد CO2 انکوبه شدند. این سلول ها در صفحات 96 چاهی در 200 میکرولیتر محیط 10 درصد به مدت 24 ساعت حاوی 200 میکرولیتر محیط 3 درصد در انکوباتور CO2 کاشته شدند. سپس پس از 24، 12 و 6 ساعت، محیط را تخلیه و 100 میکرولیتر محیط تازه با 20 میکرولیتر محلول

MTT (5 mg/ml) در محیطی بدون نور به آنها اضافه شد، از فویل آلومینیومی برای پوشاندن پلیت ها استفاده شد، زیرا MTT به نور بسـیار حسـاس اسـت. پلیت ها را در انکوباتور قرار داده ، بعد از 4 سـاعت از انکوباتور خارج شـده و محلول MTT آن تخلیه گردید سپس 200 میکرولیتر DMSO به هر چاهک ا ضافه شد. پلیت ها 10 دقیقه روی روتور قرار گرفت تا DMSO در پلیت ها حل شود. پس از آن تو سط د ستگاه Epoch و طول موج 570 و 630 پیک جذب خوانده شد. با تجزیه و تحلیل نتایج آزمون MTT مشخص شد که 6000 سلول در هر چاهک با غلظت 0.21625 میکروگرم در میلی لیتر برای رزماری و CSSNANO نسبت به گروه نرمال برای سلول های CHO غیر سمی است.

4–آزمایش های درون تنی:

پس از تعیین غلظت منا سب برای رزماری و نانوذره، از آن غلظت در چهار پلیت (شاهد، تابش 0.5 گری، 1 گری، 2 گری) ا ستفاده شد که هر پلیت شامل سه گروه کنترل، رزماری و CSSNANO است.

بنابراین، در پلیت 96 خانه ای، 6000 سلول در هر چاهک کاشته شده، سپس همه پلیت ها 100 میکرولیتر محیط تازه (17 درصد) اضافه و در دمای 37 درجه سانتی گراد در فشار 5 درصد CO2 انکوبه شدند. بعد از 24 ساعت همه گروه ها تخلیه و با رزماری و نانوذرات جایگزین شدند و گروه کنترل بدون مداخله با محیط کشت پر شد. 24 ساعت بعد محیط تخلیه و پلیت ها دو بار با PBS شسته شده و سپس با 100 میکرولیتر محیط جدید (3٪ FBS) جایگزین شد. پلیت ها با 0.5، 1، 2 گری تابش شدند، اما پلیت کنترل در شرایط مشابه تابش نمی شود. سپس 100 میکرولیتر محیط تازه (17 درصد) به تمام پلیت ها اضافه شد. هنگامی که پلیت ها به مدت 24 ساعت انکوبه شدند، از روش MTT برای بررسی میزان بقا در سلول ها استفاده شد.

5–طراحی تابش:

پلیت ها در میدان 25*25 و روی فانتوم 1.5 سانتی متری با انرژی 100 SSD در 6 MV دستگاه Electa تابش شدند.

6–تحلیل آماری:

در این پژوهش با توجه به نرمال بودن داده ها از آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شده و تمامی تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 6 انجام شده است.

7– نتایج:

از روش MTT برای ارزیابی سمیت استفاده می شود، و به یافتن غلظتی که برای سلول‌ها غیرسمی است کمک می‌کند، غلظتی که برای اثر آنتی اکسیدانی استفاده می شود نباید برای سلول سمی باشد [11]. همچنین این تست برای مقایسه ی اینکه کدام گروه توانسته است اثر جاروبگری بهتری بر روی رادیکال های آزاد داشته باشد هم استفاده می شود و نتایج آن نشان می دهد که یک ترکیب آنتی اکسیدانی تا چه میزان می تواند سمیت ناشی از اشعه را کاهش دهد(شکل 1).

نتایج نشان داد که غلظت 1.73 ppm رزماری سمی است به همین دلیل غلظت های پایین تری از این عصاره و نانوذره برای بررسی اثر محافظت پرتویی استفاده شد. در دز 0.5 گری در غلظت 0.21625 ppm رزماری، بقای سلولی به طور معنی داری افزایش یافته ($P<0.05$) ، در حالی که در غلظت 0.865 ppm نانوذرات برای این دوز تابش، کاهش قابل توجهی در بقای سلول مشاهده شد ($P>0.05$). در دز 1 گری، برای غلظت 0.865 ppm رزماری افزایش معنی داری در بقای سلولی مشاهده می شود ($P<0/05$). در 2 گری، هم رزماری و هم نانوذرات در غلظت 0.21625 ppm افزایش قابل توجهی در بقای سلول نشان دادند ($P<0.05$). اما اثر محافظتی نانوذرات در مقایسه با رزماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

8– بحث:

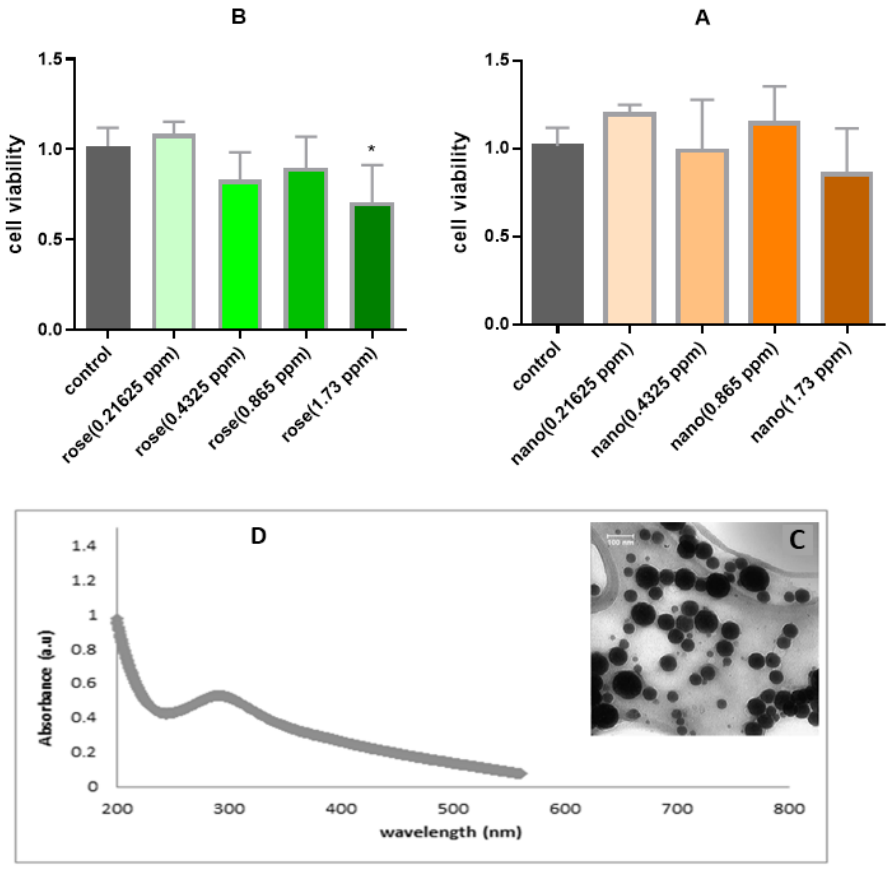
همین طور که نتایج نشان می دهد رزماری به خوبی در برابر تابش اثر آنتی اکسیدانی خود را نشان می دهد و با جاروب رادیکال های آزاد سلول های سالم را در برابر تابش محافظت می کند[6, 13].

با توجه به اینکه نانوذرات سلنیوم نیز اثر آنتی اکسیدانی بالایی دارند [12] انتظار داشتیم که نانوذرات سلنیوم که در محیط عصاره آبی رزماری سنتز کلوئیدی شده اند نسبت به رزماری اثر آنتی اکسیدانی و جاروبگری رادیکال های آزاد بیشتری داشته باشند .چون در سنتز آن ها از دو آنتی اکسیدان استفاده شده است[14]

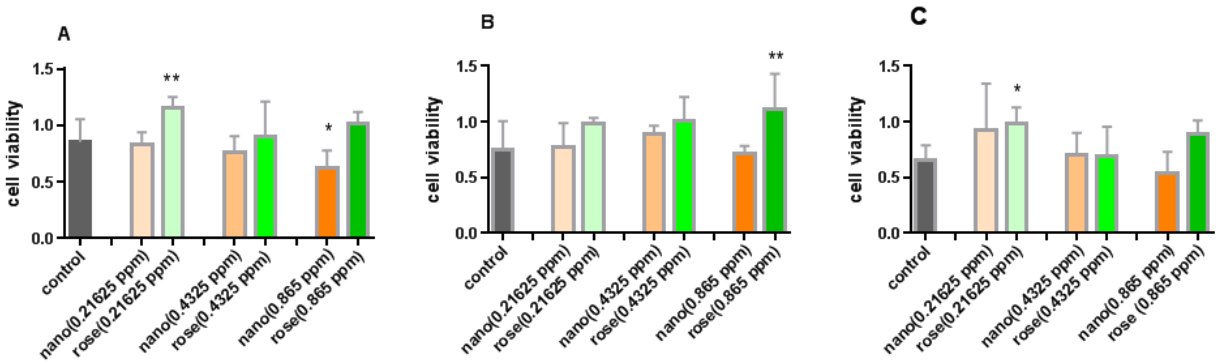
اما بر خلاف انتظار ما نانوذرات نسبت به رزماری اثر محافظتی کمتری نشان دادند. و احتمال می دهیم چون نانوذرات در محیط رزماری سنتز شده اند این عصاره مانند عایقی بر روی سطح نانوذرات قرار گرفته و مانع عملکرد آنتی اکسیدانی آن می شود.

9– نتیجه گیری:

با توجه به اینکه رزماری و نانوذرات سلنیوم هر دو آنتی اکسیدان هستند اما در نانوذراتی که از ترکیب این دو سنتز می شوند اثر آنتی اکسیدانی به طور هم افزایی افزایش نمی یابد.



شکل 1: میزان بقا سلول های CHO تیمار شده با غلظت های مختلف رزماری (نمودار A) و نانوذرات CSSNANO (نمودار B)، *مقدار $p<0.05$ را نشان می دهد. C: TEM سنتز کلوئیدی نانوذرات سنتز نانوذرات سلنیوم در عصاره آبی رزماری(CSSNANO). D: طیف جذبی CSSNANO UV محلول.



شکل 2: در نمودارA، میزان بقا پس از 0.5 گری ، در نمودارB، میزان بقا پس از1گری و در نمودار C، میزان بقا پس از 2 گری نشان داده شده است. نماد* نشان دهنده p-value <0.05 و ** نشان دهنده p-value <0.01 است.

10– مراجع:

.1 Johnke, R.M., J.A. Sattler, and R.R. Allison, Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. Future oncology, 2014. 10(15): p. 2345-2357.

.2 Wu, W., et al., Effects of N-acetylcysteine amide (NACA), a thiol antioxidant on radiation-induced cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Life sciences, 2008. 82(21-22): p. 1122-1130.

.3 Van Hien, T., et al., Radioprotective effects of vitexina for breast cancer patients undergoing radiotherapy with cobalt-60. Integrative cancer therapies, 2002 :(1)1 .p. 38-43.

.4 Santos, G.S., et al., Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with 60Co gamma-radiation. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2014. 762: p. 17-23.

.5 Vicente, G., et al., Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. The Journal of Supercritical Fluids, 2013. 79: p. 101-108.

.6 Basaga, H., C. Tekkaya, and F. Acikel, Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. LWT-Food Science and Technology, 1997. 30(1): p. 105-108.

.7 Jindal, A., et al., Radioprotective potential of Rosemarinus officinalis against lethal effects of gamma radiation: a preliminary study. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2006. 25(4).

.8 Tapiero, H., D. Townsend, and K. Tew, The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomedicine & pharmacotherapy, 2003. 57(3-4): p. 134-1.44

.9 Hassanin, K.M., S.H. Abd El-Kawi, and K.S. Hashem, The prospective protective effect of selenium nanoparticles against chromium-induced oxidative and cellular damage in rat thyroid. International journal of nanomedicine, 2013. 8: p. 1713.

.10 Amarnath Praphakar, R., et al., Silver nanoparticle functionalized CS-g-(CA-MA-PZA) carrier for sustainable anti-tuberculosis drug delivery. Int J Biol Macromol, 2018. 118(Pt B): p. 1627-1638.

.11 Daraee, H., et al., Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016. 44(1): p. 410-22.

.12 Wang, T., et al., Preparation and antioxidant activity of selenium nanoparticles decorated by polysaccharides from Sargassum fusiforme. J Food Sci, 2021. 86(3): p. 977-986.

.13 Del Bano, M., et al., Radioprotective− antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ-rays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. 54(6): p. 2064-2068.

.14 Mei, T., et al., Encapsulation of tissue plasminogen activator in pH-sensitive self-assembled antioxidant nanoparticles for ischemic stroke treatment - Synergistic effect of thrombolysis and antioxidant. Biomaterials, 2019. 215: p. 119209.