مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شمارهٔ ۸، مرداد ۱۳۹۳، صفحه ۴۵-۳۹

آپوپتوز متعاقب تجویز نانو ذره آرسنیت سدیم و ارسنیت سدیم معمولی در سلول های کبدی موش صحرایی

حسین نجف زاده(PhD)[۱*]، محسن رضایی(PhD)[۲] ، علی اشرفی(PhD)[۳]، آذین صمیمی(DVM)[۴]

۱- گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهوا
۲- گروه سم شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۳- گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۴- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت: ۹۲/۷/۲۳، اصلاح: ۹۲/۱۰/۱۵، پذیرش: ۹۳/۲/۲۴

خلاصه

سابقه و هدف: آرسنیک سر دسته سموم، شبه فلزی سرطان‌زا است که به عنوان یک سم محیطی در نظر گرفته می شود. آسیب میتوکندری، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، القای مرگ برنامه ریزی شده سلول و کمک به برنامه مناسب در مقابله با برخی حالات تکثیری از جمله مکانیسم‌های آرسنیک هستند. از آنجایی که آرسنیک یک سم مهم و از طرفی یک داروی ضد تومور محسوب می شود، در این مطالعه به منظور مقایسه وقوع آپوپتوز ناشی از نانو ذرات آرسنیک که به شیوه جدید طراحی شده و با حالت معمول آن انجام گردید تا مشخص شود کوچکتر شدن ذرات آرسنیک در مقیاس نانو چه تاثیری بر وضعیت آپوپتوز در مدل سلول های تازه دارند.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی سلول‌های تازه کبد از ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم، توسط روش پرفیوژن کلاژناز جدا شده و پس از ثابت شدن در دوار، سلول های کبدی در معرض غلظت های صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و۱۰۰ میکرومولار نانوآرسنیت سدیم و هم چنین شکل معمولی آن به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. گروه بندی بر اساس غلظت نانو آرسنیت سدیم و شکل معمولی آن و در سه تکرار و یک گروه بعنوان شاهد (سرم فیزیولوژی) بوده است. بقا و آپوپتوز تعیین شده توسط تکنیک ستاره دنباله دار (Comet assay) بدست آمد. درصد سلول های دچار آپوپتوز بصورت نمره دهی بین غلظت ها و گروه ها مقایسه شد.

یافته ها: با تجویز آرسنیت سدیم معمولی و نانوآرسنیت سدیم درصد سلول‌های دچار آپوپتوز در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرد ($p<0/05$) بطوری که در امتیاز ۳، میزان آپوپتوز در غلظت ۱۰۰ میکرومول آرسنیت معمولی حدود ۲۲ درصد و در غلظت ۱۰۰ میکرومول نانو آرسنیت ۵۶ درصد بود. این افزایش در سلول‌های در معرض نانوآرسنیت سدیم به صورت وابسته به غلظت بیشتر از سول‌های در معرض آرسنیت سدیم معمولی بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که نانو ذرات آرسنیت سدیم و افزایش غلظت آن میزان آسیب سلولی و آپوپتوز بیشتری را نسبت به شکل معمولی آن ایجاد می کنند و می توانند سمی تر باشند.

واژه های کلیدی: نانوذرات، آرسنیت سدیم، سلول‌های کبدی، موش صحرایی.

مقدمه

امروزه مسمومیت و آلودگی با ارسنیک یک نگرانی جدی برای سازمان‌های بهداشتی و سلامت عمومی محسوب می‌شود. گزارشاتی از آسیب‌زایی آن در انسان در اثر آشامیدن آب‌های آلوده خصوصاً در هندوستان، بنگلادش و برخی نواحی خاورمیانه در دست است. همچنین گزارش‌های پراکنده‌ای از آلودگی و آسیب‌زایی آرسنیک در انسان در دست است که عمدتاً در نتیجه اثر بر روی سیستم آنتی-اکسیدان بدن می‌باشد (۲و۱). آرسنیک بر روی سیستم آنتی‌اکسیدان بدن اثر کرده و باعث تشکیل رادیکال‌های آزاد شده و واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون را در بدن تسهیل می‌نماید (۳). آرسنیک دارای اشکال متنوعی بوده و از منابع مهم آلودگی با آن می‌توان به آب خصوصاً آب‌های زیرزمینی، خاک، جونده‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها و داروهای ضدکنه اشاره کرد. بعلاوه ترکیبات آرسنیک‌دار در درمان لوسمی و برخی از بیماری‌های انگلی استفاده می‌شوند (۵و۴). آرسنیک با اثراتی از قبیل متیلاسیون DNA و تغییرات هیستون ها موجب تغییرات ژنتیکی، موتاژنی

این مقاله حاصل پایان نامه آذین صمیمی دانشجو دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر حسین نجف زاده
آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۳۳۳۰۰۷۳-۰۶۱۱
e-mail:najafzadeh@scu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

و سرطان زایی می شود (۴). نانو داروها نسبت به داروهای معمولی از مزیت بیشتری برخوردارند، از جمله انتخابی‌تر عمل کردن دارو برای رسیدن به بافت هدف، خلوص بالاتر، جذب بیشتر دارو، افزایش اثر دارو در بدن، تجویز مقادیر کمتر دارو همراه با کاهش دفعات تجویز. در واقع خصوصیت مهم نانو داروها بالاتر بودن نسبت سطح به حجم آن‌ها در مقایسه با داروهای معمولی است که این افزایش نسبی، به افزایش حلالیت، سرعت جذب و عبور راحت‌تر آنها از سد خونی مغزی کمک می کند. از طرفی کوچکتر شدن اندازه ذره، واکنش شیمیایی و بیولوژیکی آن را با سایر مواد موجود در بدن تسهیل می‌کند که می‌تواند باعث تولید بیشتر رادیکال‌های آزادی از جمله رادیکال آزاد اکسیژن شود. به همین دلیل توجه به عوارض و سمیت نانو داروها نیز از جمله موارد مهمی است که در به کارگیری آنها، باید مورد توجه خاص قرار گیرد (۷و۶).

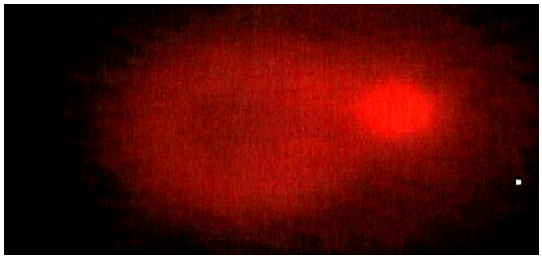
آرسنیک از طریق کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم c به سیتوپلاسم، منجر به فعال شدن پروکاسپاز ۹ می‌گردد که کاسپازهای فعال ۸ و ۹ با انتقال پیام به کاسپازهای موثری مانند کاسپازهای ۳، ۶ و۷ آن‌ها را فعال کرده و منجر به القای آپوپتوز می‌گردند (۸). تری اکسید آرسنیک به شکل نانولیپوزوم خواص فارماکوکینتیکی بهتری را نشان داده و اثرات ضد توموری موثرتری در سلول های سرطانی پستان داشت (۹). با توجه به اهمیت آرسنیک و خواص توکسیکولوژیک آن و از آنجایی که آرسنیک یک سم مهم و از طرفی یک داروی ضد تومور محسوب می شود، در مطالعه حاضر اثر القای آپوپتوز توسط آرسنیت سدیم معمولی با نانوذره آرسنیت سدیم به روش Comet Assay مقایسه شد تا مشخص شود کوچکتر شدن ذرات آرسنیک در مقیاس نانو چه تاثیری بر وضعیت آپوپتوز در مدل سلول های تازه دارند تا بتوان در ارزیابی میزان آپوپتوز ناشی از آرسنیک قضاوت دقیق تری داشت.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی که بر روی سلول های تازه جدا شده از کبد موش صحرایی نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم انجام شد، سلول هات وسط روش پرفیوژن کلاژناز جدا شدند و تست Comet Assay برای ارزیابی میزان آپوپتوز سلولی استفاده شد. Comet Assay متدی پیشرفته در آشکارسازی آسیب‌های DNA در مطالعات سم شناسی ژنتیکی است. اساس این تکنیک حرکت سریع‌تر قطعات شکسته شده DNA در یک میدان الکتریکی نسبت به DNA سالم و تشکیل تصاویر مشابه ستاره دنباله‌دار می‌باشد (۱۰). این روش دارای مزیت‌هایی چون حساسیت بالا، تشخیص سطوح پایین آسیب دیدگی DNA، امکان استفاده از انواع سلول‌ها تقریبا با منشا نامحدود، انجام آزمایش با مقادیر نسبتا کم سلول، جمع آوری اطلاعات در سطح سلول منفرد، ارزیابی تعداد زیادی نمونه در زمان نسبتا کوتاه و ارائه نتایج به صورت کیفی و کمی است.

در این مطالعه ابتدا برای سنتز نانو ذره‌ی آرسنیت سدیم از روش آسیاب کاری مکانیکی استفاده شد. که این سنتز در دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. برای سنتز آن از فرآیند آسیاب کاری درون آسیاب سیاره‌ای به مدل FRETH استفاده شده است. سرعت چرخش برابر با ۳۰۰ rpm انتخاب و نسبت گلوله به ماده درون آسیاب برابر با ۳۰ بوده است. جنس گلوله مورد استفاده آلومینا با قطر ۵mm و زمان آسیاب کاری برای پودر مورد نظر ۴۸ ساعت انتخاب شد. پس از تهیه بافرهای استخراج و Comet، هپاتوسیت‌ها به روش پرفیوژن از کبد رت جدا شدند. برای تهیه سلول، حیوان تحت القای بیهوشی با کتامین و زایلازین قرار گرفت و ناحیه شکم باز شد. سیاهرگ باب کانوله و کبد به مدت ۱۰ دقیقه با بافر شست و شو داده شد. سپس این کار به مدت ۱۲ دقیقه با بافر کلاژناز ادامه یافت. کبد به ظرفی دیگر منتقل و سلول ها جداسازی شدند (۱۱).

سوسپانسیون سلولی بدست آمده به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب بدست آمده برای سنجش توان زیستی مورد استفاده قرار گرفت که برای دارو دهی تعداد سلول های زنده باید در هر میلی لیتر ۱۰ به توان ۶ باشد. سپس سلول‌های جدا شده در فلاسک های ته گرد در یک حمام آب با درجه ثابت ۳۷ و تحت یک اتمسفر ثابت به مدت نیم ساعت قرار گرفتند و دوزهای ۱۰۰،۴۰،۲۰،۱۰ میکرومولار از نانو آرسنیت سدیم و آرسنیت سدیم معمولی به فلاسک ها اضافه شد. حداقل ۳ مرتبه برای هر دوز تکرار گردید. مدت زمانی که سلول ها در معرض دارو قرار گرفتند یک ساعت بود. سوسپانسیون سلولی مخلوط شده با LMPA ۱٪ بر روی اسلایدها ریخته و لامل بر روی آن ها قرار گرفت .اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه در جا یخی یخچال قرار گرفته و ۵ دقیقه پس از خروج، لامل از روی آن ها برداشته شد. سپس به مدت یک ساعت در محلول لیز کننده در یخچال قرار گرفتند و پس از آن ۲۰ دقیقه الکتروفورز شدند. از سوسپانسیون سلولی رقیق شده با بافر انکوباسیون که در معرض قرار نگرفته بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۳و۱۲). در مرحله آخر اسلایدها با قرار گرفتن در محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس نتایج بررسی شد. در ارزیابی الگوهای Comet به منظور تشخیص آپوپتوز، سلول‌ها با نمره صفر و ۱ به عنوان سلول سالم در نظر گرفته می شوند و نمره‌های ۲ و ۳ فراوانی سلول‌های آپوپتوتیک را نشان می دهد. به سلول دارای دنباله متوسط (طول۳-۲ برابر عرض سر) نمره ۲ و دنباله بلند (طول بیشتر از ۳ برابر عرض سر) نمره ۳ داده می شود (تصویر ۱) (۱۴).



شکل۱: تصویر میکروسکوپی الگوی Comet (Score۳) سلولهای کبدی در مواجهه با آرسنیت سدیم (بزرگنمایی ۴۰x)

داده ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD تجزیه و تحلیل شدند و $p\leq ۰/۰۵$ معنی دار تلقی شد.

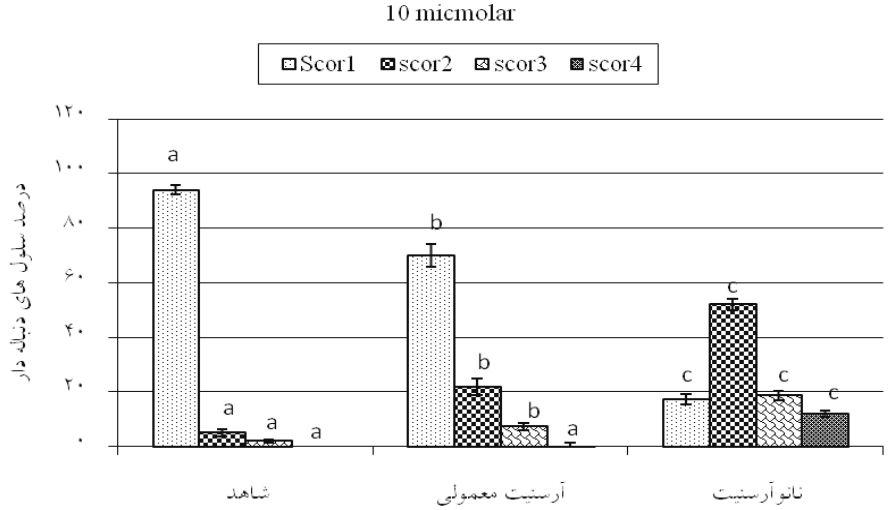
یافته‌ها

در این مطالعه با تجویز آرسنیت سدیم در غلظت ۱۰ میکرو مولار، در سلول تازه کبد موش صحرایی، میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله دار سلول‌های کبدی در گروه شاهد، در نمره‌های صفر تا ۳ به ترتیب ۱/۷۳±۹۴٪،

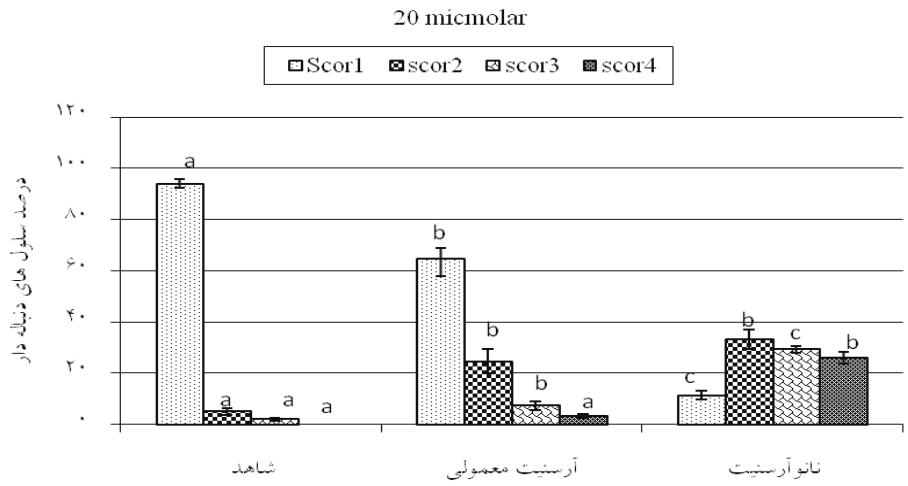
[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

۱/۱۵±۵٪، ۰/۵۷±۲٪ و صفر بوده است (نمودار ۱). تعداد سلول‌های آسیب دیده (دچار آپوپتوز) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری یافت. بطوریکه میانگین تعداد سلول‌های آسیب دیده با نمره ۱، ۲ و ۳ افزایش پیدا کرد ($p\leq ۰/۰۵$). در حالی که در گروه دریافت کننده آرسنیت سدیم معمولی این میانگین به ترتیب نمرات ۴/۱۶±۷۰٪، ۳/۰۵±۲۲٪، ۱/۳۳±۷/۳۳٪، ۰/۶۶±۰/۶۷٪ و در گروه دریافت کننده نانو آرسنیت سدیم، میانگین نمرات به ترتیب ۱/۷۶±۱۷/۳۳٪، ۲±۵۲٪، ۱/۷۶±۱۸/۶۷٪، ۱/۱۵±۱۲٪ بود.

با تجویزآرسنیت سدیم در غلظت ۲۰ میکرو مولار در سلول تازه کبد موش صحرایی، تعداد سلول های آسیب دیده (دچار آپوپتوز) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری یافت بطوری که میانگین تعداد سلول‌های آسیب دیده با نمره ۱، ۲ و ۳ افزایش پیدا کرد ($p\leq ۰/۰۵$). میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول های دنباله دار در گروه شاهد در نمره‌های صفر تا ۳ به ترتیب ۱/۷۳±۹۴٪، ۱/۱۵±۵٪، ۰/۵۷±۲٪، صفر بوده است (نمودار ۲). در حالی که در گروه دریافت کننده آرسنیت سدیم معمولی این میانگین به ترتیب نمرات ۶/۶۹±۶۴/۶۷٪، ۴/۸۰±۲۴/۶۷٪، ۱/۷۶±۷/۳۳٪، ۰/۶۶±۳/۳۳٪ و در گروه دریافت کننده نانو آرسنیت سدیم، میانگین نمرات به ترتیب ۱/۷۶±۱۱/۳۳٪، ۳/۷۱±۳۳/۳۳٪، ۱/۳۳±۲۹/۳۳٪، ۲/۳۰±۲۶٪ بود. با تجویز آرسنیت سدیم در غلظت ۴۰ میکرو مولار در سلول تازه کبد موش صحرایی، تعداد سلول‌های آسیب دیده (دچار آپوپتوز) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری یافت. بطوریکه میانگین تعداد سلول‌های آسیب دیده با نمره ۲ و۳ افزایش پیدا کرد ($p\leq ۰/۰۵$). میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله دار سلول‌های کبدی در گروه شاهد در نمره‌های صفر تا ۳ به ترتیب ۱/۷۳±۹۴٪، ۱/۱۵±۵٪، ۰/۵۷±۲٪، صفر بوده است (نمودار ۳) در حالی که در گروه دریافت کننده آرسنیت سدیم معمولی این میانگین به ترتیب نمرات ۴/۱۶±۱۸٪، ۲/۹۰±۵۱/۳۳٪، ۱/۳۳±۱۸/۶۷٪، ۱/۱۵±۱۲٪ و در گروه دریافت کننده‌ی نانو آرسنیت سدیم، میانگین نمرات به ترتیب ۲±۱۲٪، ۱/۷۶±۱۴/۶۷٪، ۲±۲۸ ٪، ۳/۷۱±۴۵/۳۳٪ بود.



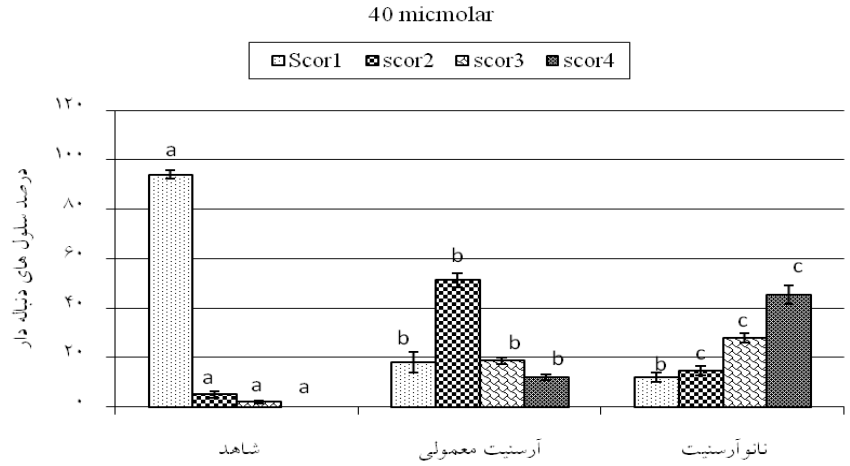
نمودار ۱. میانگین±خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله‌دار سلول‌های کبدی در گروه‌های شاهد و آرسنیت سدیم و نانو آرسنیت سدیم با غلظت ۱۰ میکرومولار. حروف نامتشابه، بیانگر تفاوت بین گروه‌ها در امتیازدهی‌های چهارگانه می‌باشد ($p\leq ۰/۰۵$)



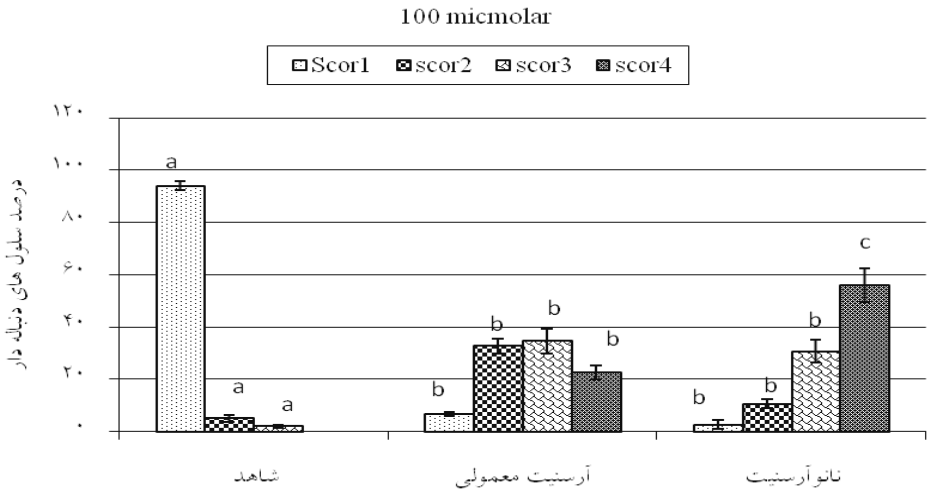
نمودار ۲. میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله‌دار سلول‌های کبدی در گروه‌های شاهد و آرسنیت و نانو آرسنیت سدیم با غلظت ۲۰ میکرومولار. حروف نامتشابه، بیانگر تفاوت بین گروه‌ها در امتیازدهی‌های چهارگانه می‌باشد($p\leq ۰/۰۵$).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

با تجویز آرسنیت سدیم در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار در سلول تازه کبد موش صحرایی، تعداد سلول‌های آسیب دیده (دچار آپوپتوز) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری یافت. بطوری که میانگین تعداد سلول‌های آسیب دیده با نمره ۲ و ۳ افزایش پیدا کرد ($p\leq ۰/۰۵$). میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله‌دار سلول‌های کبدی در گروه شاهد در نمره‌های صفر تا ۳ به ترتیب ۱/۷۳±۹۴٪، ۱/۱۵±۵٪، ۰/۵۷±۲٪، صفر بوده است (نمودار ۴). در حالی که در گروه دریافت کننده آرسنیت سدیم معمولی این میانگین به ترتیب نمرات، ۰/۶۶±۶/۶۷٪، ۲/۶۶±۳۲/۶۷٪، ۴/۶۶±۳۴/۶۷٪، ۲/۶۶±۲۲/۶۷٪ و در گروه دریافت کننده نانو آرسنیت سدیم میانگین نمرات به ترتیب ۱/۷۶±۲/۶۷٪، ۱/۷۶±۱۰/۶۷٪، ۴/۳۷±۳۰/۶۷٪، ۶/۴۲±۵۶٪ بود.



نمودار ۳. میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله‌دار سلول‌های کبدی در گروه‌های شاهد و آرسنیت و نانو آرسنیت سدیم با غلظت ۴۰ میکرومولار. حروف نامتشابه، بیانگر تفاوت بین گروه‌ها در امتیازدهی های چهارگانه می‌باشد($p\leq ۰/۰۵$).



نمودار ۴. میانگین ± خطای استاندارد درصد سلول‌های دنباله‌دار سلول‌های کبدی در گروه های شاهد و آرسنیت و نانو آرسنیت سدیم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار. حروف نا متشابه، بیانگر تفاوت بین گروه‌ها در امتیازدهی‌های چهارگانه می‌باشد($p\leq ۰/۰۵$).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه با مواجهه کردن سلول‌های کبد موش صحرایی در غلظتهای مختلف آرسنیت سدیم معمولی و نانو آرسنیت سدیم مشاهده گردید که این دو ماده به طور وابسته به غلظت می‌توانند موجب آپوپتوز سلول‌های کبدی گردند. به طوریکه با افزایش غلظت، درصد سلول‌های دچار آپوپتوز که به روش Comet سنجیده شدند افزایش معنی داری یافت. آرسنیت سدیم نشان داد که بر روی سلول‌های کبد موش صحرایی در غلظت ۱۰۰µm بیشترین تاثیر را بر روی مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول (آپوپتوز) داشت که این میزان برای آرسنیت سدیم معمولی ۵۷/۳۴٪ و برای نانوآرسنیت سدیم ۸۶/۶۷٪ بود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانو آرسنیت سدیم توان ایجاد آپوپتوز (Score۲و۳) بیشتری نسبت به آرسنیت سدیم معمولی دارد که این میزان برای دوزهای ۴۰µm و ۱۰۰µm از آرسنیت سدیم معمولی بترتیب ۳۰/۶۷٪ و ۵۷/۳۴٪ و برای نانو آرسنیت سدیم بترتیب ۴۲/۶۷٪ و۸۶/۶۷٪ بود. به نظر می‌رسد به لحاظ کوچک

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

شدن ذره و افزایش سطح به حجم نانو ذره‌ی آرسنیت ورود آن به داخل سلول و ایجاد سمیت در مقایسه با آرسنیت معمولی بیشتر باشد. به همین دلیل آسیب سلولی آپوپتوز ناشی از آن هم بیشتر می‌باشد. از روشComet سایر محققان هم برای بررسی آپوپتوز سلولی استفاده کردند. به عنوان مثال Yasuhara و همکاران از روش Comet در تشخیص آپوپتوز القا شده در سلول‌های عضلانی استفاده کرده و بیان نمودند که نتایج بدست آمده از این تکنیک با سایر تکنیک‌ها مطابقت دارد (۱۵).

Nesslany و همکاران از این روش برای تشخیص عامل ژنوتوکسیک سرطان‌زا از عامل اپی‌ژنتیک سرطان‌زا در سلول‌های تازه‌ی کلیه استفاده کرده و بیان نمودند که این روش برای ارزیابی آپوپتوز سلولی مناسب می‌باشد (۱۶). همچنین نتایج تحقیقات Ueno و همکاران برای تعیین خطی بودن منحنی استاندارد و تعیین میزان آسیب دیدگی DNA در ارگان‌های مختلف موش در معرض اشعه X نشان داد که برای ایجاد سرعت جذب ۱/۳-۱ Gy/min یا بیشتر، به DNA های آسیب دیده قابل اندازه‌گیری در بسیاری از اندام‌ها به روش Comet نیاز است (۱۷). در همین راستا Brink و همکاران در طی مطالعاتی که برای تعیین میزان آسیب دیدگی DNA و آپوپتوز ناشی از آرسنیت سدیم در زمان‌های مختلف انجام دادند، بیان نمودند که با افزایش زمان، میزان آسیب دیدگی افزایش یافته و آسیب DNA ناشی از آرسنیت سدیم بدون روش Comet و آنالیز استاندارد، قادر به تفسیر آپوپتوز ناشی از آن نخواهد بود (۱۸).

در مطالعات دیگران، آسیب سلولی ناشی از آرسنیت معمولی ارزیابی شد و بیان گردید که این ماده در سلول‌های بدن، بسته به غلظت و مدت زمان تماس سلول با این سم، ایجاد آپوپتوز یا نکروز سلولی می‌کند. در این زمینه Santra و همکاران به بررسی آپوپتوز سلول‌های موش در مواجهه با آرسنیت سدیم پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که آسیب کبدی ایجاد شده همراه با افزایش استرس اکسیداتیو در میتوکندری است و استرس اکسیداتیو ناشی از آرسنیت، نقش مهمی در آپوپتوز سلول‌های کبدی دارد (۱۹). Wang و همکاران نشان دادند که نانوتری اکسید آرسنیک با القای آپوپتوز در سلول های سرطانی اثرات ضد سرطانی بهتری داشته است (۲۰). همچنین Zeng و همکاران مشاهده کردند که نانوارسنیت با القای آپوپتوز اثرات ضد توموری قابل توجهی در سرطان پانکراس دارد (۲۱). همچنین در بررسی ما مشاهده گردید که نانو آرسنیت سدیم در غلظت برابر با آرسنیت سدیم معمولی قدرت بیشتری در ایجاد آپوپتوز دارد به طوریکه در بین غلظت‌های استفاده شده، در صد سلول‌های دچار آپوپتوز را به طور معنی داری افزایش داد. به نظر می‌رسد که هر چه اندازه نانو ذرات کاهش بیشتری داشته باشد، تغییر در رفتار این مواد نیز بیشتر خواهد شد، چرا که کاهش اندازه ذرات، پیدایش خواص جدیدی از جمله افزایش واکنش پذیری، افزایش خواص جذب، افزایش بر همکنش های فیزیکی در سطح ذره، کاهش دمای ذوب و تغییر خواص الکتریکی را بدنبال خواهد داشت.

در این مطالعه با تجویز آرسنیت سدیم معمولی و نانوآرسنیت سدیم در صد سلول‌های دچار آپوپتوز در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرد. این افزایش در سلول‌های در معرض نانوآرسنیت سدیم به صورت وابسته به غلظت بیشتر از سول‌های در معرض آرسنیت سدیم معمولی بود. بنابراین با کاهش اندازه‌ی مولکولی آرسنیت سدیم و افزایش غلظت آن میزان آسیب سلولی و آپوپتوز به طور قابل توجهی افزایش یافت که این موضوع می‌تواند در زمینه‌ی استفاده از این عامل به عنوان دارو در درمان بدخیمی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز بخاطر تامین اعتبار مالی این مطالعه سپاسگزاری می شود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

Apoptosis following Conventional and Nano-Particles of Sodium Arsenite Treatment in Hepatocytes of Rat

H. Najafzadeh (PhD) [1*], M. Rezaei (PhD) [2], A. Ashrafi (PhD) [3], A. Samimi (DVM) [4]

1. Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran
2. Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R. Iran
3. Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran
4. Department of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(8); Aug 2014; pp: 39-45

Received: Oct 15th 2013, Revised: Jan 5th 2014, Accepted: May 14th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Arsenic, the king of poisons, is a carcinogenic metalloid and considered as an environmental toxicant. Mitochondrial damage, reactive oxygen species elevation and eventually apoptosis induction are some mechanisms of action and also contributed to its convenient application against some proliferative states. Since arsenic is important toxin and as a antineoplasm agent, in this study, apoptosis induction of a newly designed arsenic nanoparticles were evaluated and compared to the conventional form in order to evaluate its effect of more small size as nanoparticles on apoptosis in fresh cells.

METHODS: In this experimental study, fresh hepatocytes of 30 Wistar rats (with 180-200 gram weight) was isolated by two step collagenase perfusion method and following stabilization in rotary, exposed to 0, 10, 20, 40 and 100 microM sodium arsenite nanoparticles and also conventional form for 1 hour. Groups were divided base on type and concentration of arsenite and control (normal saline) group and treatment was triple. Viability was obtained and apoptosis determined by modified comet assay and scored accordingly and compared between groups.

FINDINGS: Percent of apoptotic cells was significantly increased by conventional and nano particles of sodium arsenite ($p<0.05$) in comparison to control group. While apoptosis percent in score 3 was 22% in 100 microM concentration of conventional sodium arsenite; it was reached to 56% by 100 microM concentration of nanoparticles of sodium arsenite. Apoptosis was clearly more prominent in hepatocytes exposed to arsenic nanoparticles.

CONCLUSION: Our results showed that arsenic nanoparticles robustly induced apoptosis that can potentially make it more toxic than conventional form.

KEY WORDS: *Nanoparticles, Sodium Arsenite, Hepatocytes, Rat.*

Please cite this article as follows:

Najafzadeh H, Rezaei M, Ashrafi A, Samimi A. Apoptosis following conventional and nano-particles of sodium arsenite treatment in hepatocytes of rat. J Babol Univ Med Sci 2014;16(8):39-45.

* **Corresponding Author; H. Najafzadeh (PhD)**

Address: Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran

Tel: + 98 611 3330073

E-mail: najafzadeh@scu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]

References

1.Wang SL, Chiou JM, Chen CJ, et al. Prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus and related vascular disease in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan. Environ Health Perspect 2003;111(2): 155-9.

2.Walton FS, Harmon AW, Paul DS, Patel YM, Styblo M. Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes. Toxicol Appl Pharmacol 2004;198(3):424-33.

3.Lim KT, Shukor MY, Wasoh H. Physical, chemical, and biological methods for the removal of arsenic compounds. Biomed Res Int 2014;2014:503784.

4.Martinez-Zamudio R, Ha HC. Environmental epigenetics in metal exposure. Epigenetics 2011;6(7):820-7.

5.Druwe IL, Vaillancourt RR. Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update. Arch Toxicol 2010;84(8):585-96.

6.Donaldson K, Tran L, Duffin R, et al. Combustion derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. Particle Fibre Toxicol 2005;2:10.

7. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacology and toxicology significance. Br J Pharmacol 2007;150(5): 552-8.

8.Kitamura K, Minami Y, Yamamoto K, et al. Involvement of CD95-independent caspase 8 activation in arsenic trioxide-induced apoptosis. Leukemia 2000;14(10):43-50.

9.Ahn RW, Chen F, Chen H, et al. A novel nanoparticulate formulation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer. Clin Cancer Res 2010;16(14):3607-17.

10.Giovannelli L. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay Mutat Res 2003;538(1-2): 71-80.

11.Rezaei M, Rasekh HR, Ahmadiani A, Pourahmad J. Involvement of sub cellular organelles in inflammatory pain-induced oxidative stress and apoptosis in the rat hepatocytes. Arch Iran Med 2008;11(4):407-17.

12.Lee AJ, Hodges NS, Chipman JK. Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility. Biomarkers 2004;9(2):103-15.

13.Blasiak J, Kowalik J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri and hexavalent chromium. Mutat Res 2000; 469(1):135-45.

14.Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. MMs Commun 1995;3:103-15.

15.Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, et al. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. J Histochem Cytochem 2003;51(7):837-85.

16.Nesslany F, Zennouche N, Simar-Meintières S, Talahari I, Nkili-Mboui EN, Marzin D. In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. Mutat Res 2007;630(1-2):28-41.

17.Ueno S, Kashimoto T, Susa N, et al. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body x-irradiation using the comet assay. Mutat Res 2007;634(1-2):135-45.

18.Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stopper H. Time dependent effect sodium arsenit on DNA breakage and apoptosis observedin the comet assay. Mutat Res 2006;603(2):121-8.

19.Santra A Chowdhung A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. Toxicol Applied Pharmacol 2007;220(2):146-55.

20.Wang L, Zhang J, An Y, Wang Z, Liu J, Li Y, Zhang D. A study on the thermochemotherapy effect of nanosized As2O3/MZF thermosensitive magnetoliposomes on experimental hepatoma in vitro and in vivo. Nanotechnology 2011;22(31):315102

21.Zeng L, Li J, Wang Y, et al. Combination of siRNA-directed Kras oncogene silencing and arsenic-induced apoptosis using a nanomedicine strategy for the effective treatment of pancreatic cancer. Nanomedicine 2014;10(2):463-72.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.39]