

تأثیر تابش امواج فراصوت در ترکیب با نانوذرات طلا بر میزان کولونی‌زایی

سلول‌های همسایه A375 و MCF-7

معصومه رضایی^۱، رقیه کامران سامانی^۲، سید حسین حجازی^۳، احمد شائنی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پاسخ بیولوژیک سلول‌هایی که به طور مستقیم تحت تابش پرتو نیستند، بلکه در مجاورت و یا در محیط سلول‌های تابش دیده قرار دارند، به عنوان اثر همسایگی پرتوی (Radiation-induced bystander effect یا RIBE) شناخته می‌شود. در مطالعات پیشین، وجود و مکانیسم RIBE ناشی از پرتوهای یونیزان بررسی شده است. به تازگی امواج فراصوت درمانی به عنوان یک روش جدید برای درمان برخی از سرطان‌ها معرفی شده است. این مسأله بیانگر ضرورت بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از این روش درمانی (Ultrasound-induced bystander effect) می‌باشد.

روش‌ها: جهت بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از امواج فراصوت، دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7 درون پلیت‌های هدف و همسایه کشت داده شد. پلیت‌های هدف شامل چهار گروه شاهد (بدون مداخله)، فراصوت (تحت تابش امواج فراصوت درمانی)، نانوذره (درمان با نانوذرات طلا)، گروه فراصوت + نانوذره (تابش فراصوت در حضور نانوذرات طلا) بود و گروه‌های همسایه نیز به ترتیب دریافت‌کننده‌ی محیط کشت گروه‌های هدف بودند. به منظور بررسی القای اثر همسایگی پرتوی ناشی از امواج فراصوت، تست‌های MTT و سنجش میزان کولونی‌زایی انجام گرفت.

یافته‌ها: درصد کولونی‌زایی در گروه‌های همسایه‌ی دریافت‌کننده‌ی امواج فراصوت با وجود نانوذرات طلا یا بدون وجود نانوذرات طلا، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت و وجود نانوذرات طلا سبب افزایش اثر گردید. همچنین، مقدار کولونی‌زایی برای رده‌ی سلولی MCF-7 بیش از A375 بود.

نتیجه‌گیری: امواج فراصوت منجر به القای اثر همسایگی پرتوی می‌شود و میزان این اثر در حضور نانوذرات طلا تشدید می‌گردد.

واژگان کلیدی: امواج فراصوت؛ اثر همسایگی؛ نانوذرات؛ طلا؛ سنجش میزان کولونی‌زایی

ارجاع: رضایی معصومه، کامران سامانی رقیه، حجازی سید حسین، شائنی احمد. تأثیر تابش امواج فراصوت در ترکیب با نانوذرات طلا بر میزان

کولونی‌زایی سلول‌های همسایه A375 و MCF-7. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۴۱): ۶۸۸-۶۹۵

پرداخته‌اند. پاسخ سلول‌های مجاور میدان پرتوی که به طور مستقیم تحت تابش قرار نگرفته‌اند، به عنوان اثر همسایگی پرتوی (Radiation-induced bystander effect یا RIBE) شناخته می‌شود (۱). تغییرات بیولوژیک القایی در سلول‌های خارج از ناحیه‌ی تابش، با انتقال سیگنال از سلول‌های هدف تحت تابش صورت می‌پذیرد (۲). RIBE شامل طیف گسترده‌ای از فرایندهای بیولوژیک مانند آسیب DNA، ناهنجاری‌های کروموزومی، مرگ سلولی، آپوپتوز، پاسخ

مقدمه

طبق نظریه‌ی کلاسیک رادیوبیولوژی، اثرات ژنتیک تابش، از واکنش مستقیم ذرات پرانرژی و رادیکال‌های آزاد با مولکول‌های DNA ناشی می‌شود. بنابراین، تابش یونیزان به دلیل هدف قرار دادن مستقیم هسته، منجر به آسیب DNA و بروز اثرات بیولوژیک در بافت‌های موجود در میدان تابش می‌شود. به تازگی تحقیقات رادیوبیولوژیک به بررسی اثرات غیر هدفمند تابش در بافت‌های مجاور ناحیه‌ی تحت تابش

۱- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دکتری تخصصی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: احمد شائنی؛ استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

بروز آثار بیولوژیک می‌شود (۱۸). کاهش شدت امواج فراصوت در درمان تومورهای بدخیم ارزشمند خواهد بود؛ چرا که ضمن تخریب انتخابی سلول‌های سرطانی، از آسیب به بافت‌های سالم اطراف جلوگیری می‌کند. در پژوهشی، اثر ترکیبی استفاده از امواج فراصوت و نانوذرات در درمان سلول‌های سرطانی پستان به اثبات رسیده است (۱۷). با توجه به این که در سال‌های اخیر از امواج فراصوت به عنوان یکی از روش‌های درمانی سرطان استفاده می‌گردد، بررسی اثر همسایگی پرتوی در این روش درمانی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از این روش درمانی در دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7 پرداخت.

روش‌ها

این تحقیق به صورت آزمایشگاهی، از تیر ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان طی مراحل انجام گردید که در ادامه به تفصیل آمده است.

کشت سلولی: رده‌های سلولی A375 و MCF-7 از انستیتویاستور ایران خریداری شد و درون فلاسک استریل در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (GIBCO، آلمان) حاوی ۱۰ درصد (FBS) Fetal bovine serum و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (Biosera، فرانسه) و ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Biosera، فرانسه)، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن در یک محیط مرطوب کشت و تکثیر داده شد. پس از ۳-۴ روز که سلول‌ها به صورت تک لایه کف فلاسک را پوشاندند، با استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد همراه با Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) از کف فلاسک جدا شد و پس از شمارش، جهت انجام آزمایش‌های لازم به پلیت‌های مخصوص منتقل گردید.

دستگاه فراصوت: امواج فراصوت با استفاده از یک دستگاه فراصوت درمانی (A215)، شرکت مهندسی پزشکی نوین، تهران و شرکت Berkshire Reading EMS، انگلستان) در مد پیوسته با فرکانس ۱ مگاهرتز و حداکثر شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع با ترنسدیوسر دارای سطح مقطع ۷ سانتی‌مترمربع به سلول‌ها تابیده شد. کالیبراسیون دستگاه در یک مخزن آب تصفیه شده بدون وجود هوا و هم‌دمای محیط انجام گردید. در این مخزن آب، یک صفحه‌ی دایره‌ای پلاستیکی که نقش جاذب پرتو فراصوت را ایفا می‌کند، وجود دارد که می‌تواند نیروی ناشی از موج فشاری که به سطح آن وارد می‌شود را تحمل کند. این نیروی جذب شده با استفاده از یک حسگر تعادل سونوگرافی اندازه‌گیری می‌شود و میانگین نیروی اعمال شده‌ی روی صفحه، به توان فراصوتی تبدیل می‌گردد.

انطباقی (۳)، کاهش بقای سلولی، تأخیر و جهش‌های زودرس است (۴). مرگ سلول‌های همسایه می‌تواند در نتیجه‌ی بی‌ثباتی کروموزومی و یا سایر ناهنجاری‌های کروموزومی القایی باشد (۵).

شواهد نشان می‌دهد که پیامدهای بیولوژیک RIBE، پدیده‌ای نیست که تنها در فرد تحت تابش رخ دهد، بلکه می‌تواند به صورت اثرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در نسل‌های بعدی نیز بروز کند. پژوهشگران عقیده دارند که اثرات ناشی از RIBE توسط مولکول‌های بیوشیمیایی ترشح شده از سلول‌هایی که به طور مستقیم تحت تابش قرار گرفته‌اند (از جمله سیتوکین‌ها و رادیکال‌های آزاد)، به سلول‌های خارج از میدان تابش ایجاد می‌شود (۶). به عبارت دیگر، مکانیسم‌های واسطه‌گر در ایجاد RIBE، گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) و گونه‌های نیتروژن واکنش‌پذیر (Reactive nitrogen species یا RNS) مانند سیتوکین‌ها می‌باشد که از طریق عوامل ناشناخته‌ای در بروز این پدیده نقش دارند. بنابراین، RIBE به حوزه‌ی پاسخ‌های تابشی تعلق دارد؛ هرچند دیرتر از پاسخ تابشی حاد اتفاق می‌افتد. بر این اساس، زمان آن فرا رسیده است که RIBE در مفهوم اثر تابش کلاسیک گنجانده شود. RIBE علاوه بر تابش یونیزان، در سایر عوامل استرس‌زای سلولی از جمله تابش امواج فرابنفش (۷)، شیمی درمانی (۸) و فتودینامیک درمانی (۹) و به تازگی تابش امواج فراصوت (Ultrasound) رخ می‌دهد (۱۰).

امواج فراصوت به عنوان نوعی موج مکانیکی با لرزش دوره‌ای در فرکانس‌های بالاتر از شنوایی انسان (۲۰ کیلوهرتز) تعریف می‌شود. دستگاه‌های فراصوت اغلب از یک ژنراتور و یک مبدل ساخته می‌شوند (۱۱-۱۲). در حال حاضر، امواج فراصوت به طور عمده در اقدامات بالینی برای اهداف تشخیصی و درمانی استفاده می‌گردد.

امواج فراصوت سبب ایجاد اثرات حرارتی و غیر حرارتی در بافت‌های بیولوژیک می‌گردد. اثر غیر حرارتی فراصوت مجموعه‌ای پیچیده و متنوع از مکانیسم‌های مختلف شامل Cavitation پایدار، میکروجریان و نیروهای تابشی است (۱۳). این وقایع می‌توانند هم باعث افزایش دما و هم تنش‌های مکانیکی شوند که خود سبب ایجاد میکروجریان‌هایی می‌شود که در حین Cavitation می‌توانند با شعاع معینی در مایع نوسان کنند.

اثرات بیولوژیک تولید شده، به شدت و فرکانس امواج فراصوت مورد استفاده بستگی دارد (۱۴). به تازگی دانشمندان با اضافه کردن نانوذرات به امواج فراصوت کم‌شدت، به بررسی اثر ترکیبی آن‌ها در از بین بردن سلول‌های سرطانی پرداخته‌اند (۱۵-۱۶). تحقیقات نشان می‌دهد که افزودن نانوذرات به همراه تابش امواج فراصوت، باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی ریه و پستان می‌شود (۱۷-۱۶). همچنین، نانوذرات سبب کاهش آستانه‌ی شدت امواج فراصوت مورد نیاز برای

تابش فراصوت به سلول‌های هدف و همسایه: ابتدا سلول‌ها در فلاسک کشت داده شد و پس از این که سلول‌ها کف فلاسک را به طور کامل پر کردند، با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا گردید و بعد از شمارش، درون پلیت‌های هدف و همسایه کشت داده شد. پلیت‌های گروه هدف به چهار زیرگروه «گروه شاهد که هیچ تیماری دریافت نکردند، گروه تیمار شده با نانوذرات طلا با غلظت بهینه، گروه تحت تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتی‌متر مربع در مدت زمان ۴ دقیقه، گروه تیمار شده با نانوذرات طلا و امواج فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتی‌متر مربع در مدت زمان ۴ دقیقه» تقسیم شدند. چهار زیرگروه مربوط به پلیت‌های همسایه، به ترتیب دریافت‌کننده‌ی محیط کشت زیرگروه‌های پلیت‌های هدف بودند.

در روز تابش‌دهی، محیط کشت پلیت‌های هدف با محیط کشت تازه عوض شد و اطراف آن‌ها با استفاده از پارافیلیم پوشانده شد. سپس هر کدام از این پلیت‌ها درون حمام فراصوت در محدوده‌ی میدان نزدیک (Near field) دستگاه فراصوت قرار گرفت و تابش‌دهی صورت پذیرفت. پس از تابش، پلیت‌ها درون انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت ۱ ساعت از زمان تابش امواج فراصوت، محیط کشت پلیت‌های هدف با استفاده از سرنگ تخلیه شد و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی با اندازه‌ی ۰/۲ میکرون، به منظور جلوگیری از انتقال سلول‌های هدف به پلیت‌های همسایه، انتقال محیط کشت انجام گردید.

در روز تابش‌دهی، محیط کشت پلیت‌های هدف با محیط کشت تازه عوض شد و اطراف آن‌ها با استفاده از پارافیلیم پوشانده شد. سپس هر کدام از این پلیت‌ها درون حمام فراصوت در محدوده‌ی میدان نزدیک (Near field) دستگاه فراصوت قرار گرفت و تابش‌دهی صورت پذیرفت. پس از تابش، پلیت‌ها درون انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت ۱ ساعت از زمان تابش امواج فراصوت، محیط کشت پلیت‌های هدف با استفاده از سرنگ تخلیه شد و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی با اندازه‌ی ۰/۲ میکرون، به منظور جلوگیری از انتقال سلول‌های هدف به پلیت‌های همسایه، انتقال محیط کشت انجام گردید.

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا: سنتز نانوذرات طلا طبق روش FRENDS انجام شد (۱۹). ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محلول HAuCl_4 ۰/۱٪ در دمای جوش گرم شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۱ درصد تری‌سدیم سیترات اضافه شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscope یا TEM) (فیلیپس em208s، ۱۰۰kV، هلند) تعیین گردید و همچنین، توزیع اندازه‌ی ذرات با استفاده از پراکندگی نور پویا (Dynamic light scattering یا DLS) (آنالیزکننده‌ی نانوذرات، SZ-100، شرکت Horiba، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی میزان بقای رده‌های سلولی در گروه‌های هدف و همسایه، از تست MTT استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از انتقال محیط کشت پلیت‌های هدف به پلیت‌های همسایه، میزان بقای سلول‌های همسایه مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو گروه، پس از تخلیه‌ی محیط کشت به ازای هر چاهک، ۳۰۰ میکرولیتر RPMI خالص و ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت Sigma، آمریکا) ۵ درصد اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محلول MTT تخلیه گردید و به ازای هر چاهک، ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید

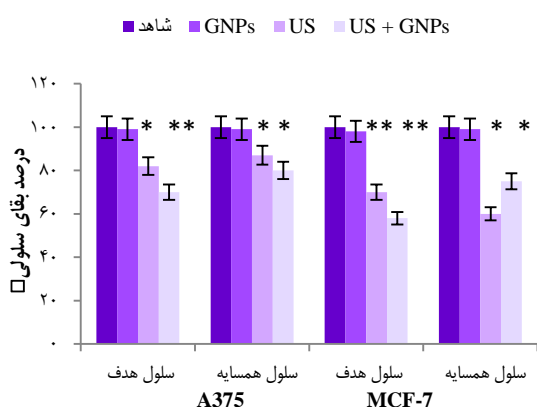
۱۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. سپس محلول درون هر یک از پلیت‌ها به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید. نهایت، با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Stat Fax 2100، آمریکا)، تراکم نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از به دست آوردن میزان چگالی نوری (Optical density یا OD)، چاهک‌های مختلف، درصد بقای سلولی با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه گردید.

رابطه‌ی ۱ $100 \times$ (میانگین چگالی نوری نمونه‌ی شاهد / میانگین چگالی نوری نمونه‌ی مورد آزمون) = درصد بقای سلول

تعیین غلظت بهینه‌ی نانوذره طلا: برای تعیین غلظت مطلوب نانوذره‌ی طلا جهت انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از آن، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی نانوذرات طلا با غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومولار نانوذره‌ی طلا جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از این زمان، اثر نانوذرات طلا بر بقای سلولی با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری گردید.

سنجش کولونی‌زایی: با استفاده از آزمون کلونی‌زایی، قابلیت ایجاد کولونی به دنبال تابش فراصوت با و بدون حضور نانوذرات طلا برای هر دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7 اندازه‌گیری شد. در این آزمون، سلول‌هایی که توانایی تکثیر نامحدود خود بعد از درمان را حفظ کرده بودند، مشخص گردید. در آزمون کولونی‌زایی، سلول‌هایی زنده محسوب می‌شوند که قابلیت تکثیر نامحدود و چند نسلی خود را حفظ نمایند؛ در حالی که در تست MTT، فقط سلول‌های زنده‌ای شمارش می‌شوند که مشخص نیست قابلیت تکثیر نامحدود دارند یا خیر. ابتدا با توجه به زمان دو برابر شدن (Doubling time) سلول‌های MCF-7 (۲۴ ساعت) و A375 (۱۸ ساعت)، به ترتیب ۳۰۰ و ۲۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کشت گردید و در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ روز، کولونی‌های ایجاد شده شرایط لازم برای رنگ‌آمیزی و شمارش را داشتند. کولونی‌ها با استفاده از فرمالدهید ۴ درصد تثبیت و با کریستال ویوله ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس شمارش کولونی با میکروسکوپ نوری انجام شد و بازده‌ی کشت با استفاده از رابطه‌ی ۲ محاسبه گردید.

هر دو رده‌ی سلولی، میزان بقا در زیرگروه‌های امواج فراصوت و گروه امواج فراصوت به همراه نانوذرات در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. این تفاوت برای گروه امواج فراصوت به همراه نانوذرات، بیشتر از امواج فراصوت به تنهایی بود ($P < 0/001$). همچنین، تفاوت معنی‌داری بین میزان بقای سلولی در گروه همسایه‌ی دریافت‌کننده‌ی محیط کشت گروه هدف تحت تابش امواج فراصوت با وجود نانوذرات طلا و بدون نانوذرات طلا، در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت. نانوذرات طلا به تنهایی نمی‌تواند سبب کاهش بقای سلولی گردد. میزان بقای سلولی در گروه هدف و همسایه در هر دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7 تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P > 0/050$) (شکل ۲).



شکل ۲. میزان بقای سلولی به دست آمده از تست

MTT) diphenyl-2H-tetrazolium bromide در دو گروه هدف و

همسایه در دو رده‌ی سلولی MCF-7 و A375

شاهد (Control)، نانوذرات طلا (GNPs)، امواج فراصوت (US) و

امواج فراصوت با نانوذرات طلا (US + GNPs)

$P < 0/001$ ، $P < 0/050$ *

تست کولونی: نتایج شکل ۳ نشان داد که تابش امواج فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۱ وات بر سانتی‌متر مربع به مدت ۴ دقیقه، به تنهایی می‌تواند سبب کاهش قابلیت کولونی‌زایی هر دو رده‌ی سلولی A375 (۸۳/۶ درصد) و MCF-7 (۷۴/۲ درصد) شود؛ هرچند این کاهش برای سلول‌های همسایه‌ی دریافت‌کننده‌ی محیط تابش سلول‌های گروه تابش فراصوت تنها کمتر بود. درصد کولونی‌زایی برای سلول‌های همسایه‌ی رده‌ی سلولی A375، ۹۰/۱ درصد و برای رده‌ی سلولی MCF-7، ۸۵/۲ درصد گزارش شد.

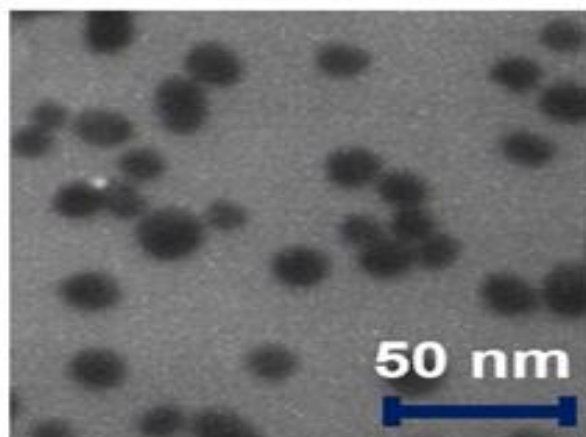
درصد کولونی‌های تشکیل شده‌ی رده‌ی سلولی A375 در گروه امواج فراصوت با نانوذرات طلا حدود ۷۱/۳ درصد به دست آمد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه تابش فراصوت به تنهایی

درمان شده با نانوذره (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار)، تحت تابش امواج فراصوت و درمان شده با فراصوت در حضور نانوذرات طلا صورت پذیرفت. سپس پلیت‌ها دوباره به انکوباتور بازگردانده شد. پس از گذشت ۱۰ روز، کولونی‌های شکل‌گیری شده، تثبیت، رنگ‌آمیزی و شمارش گردید.

تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه گردید. آزمون‌های t و Kolmogorov-Smirnov نشان داد که همه‌ی داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار هستند. بنابراین، به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان زیرگروه‌ها در هر مجموعه، از آزمون One-way ANOVA استفاده شد که اگر نتایج نشان داد بین زیرگروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$)، جهت مقایسه‌ی زیرگروه‌ها با گروه شاهد، از آزمون Dunnett استفاده گردید. در نهایت، داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا: نانوذره‌ی طلا با استفاده از روشی که پیش‌تر توسط FRENS منتشر شده بود (۱۹)، تهیه گردید. نمای TEM نانوذرات طلا در شکل ۱ نشان داده شده است که در آن نانوذرات طلای سنتز شده دارای شکل کروی با قطر متوسط ۱۴/۲ نانومتر می‌باشند. البته اندازه‌ی هیدرودینامیک نانوذرات طلا که در محلول آبی تعیین می‌شود، $3/1 \pm 26/5$ نانومتر بود.



شکل ۱. نمای TEM Transmission electron microscope (TEM) به دست آمده از نانوذرات طلا با اندازه‌ی تقریبی ۱۴/۲ نانومتر

اثر امواج فراصوت با و بدون نانوذرات طلا بر میزان بقای سلولی A375 و MCF-7: با توجه به شکل ۲، در گروه هدف برای

با هم ترکیب شوند و در این حالت، سبب افزایش بازدهی درمان می‌گردد. با این حال، همچنان مکانیسم‌های دقیق فیزیکی و شیمیایی مؤثر در اثر درمانی باید مورد بررسی قرار گیرند (۱۶). وجود RIBE به عنوان یکی از آثار جانبی رادیوتراپی در سلول‌های خارج از میدان تابش، طی سالیان گذشته به اثبات رسیده است (۲۰). با توجه به رویکرد استفاده از امواج فراصوت جهت درمان سرطان، بررسی بروز اثر همسایگی پرتوی القایی امواج فراصوت ضروری به نظر می‌رسد.

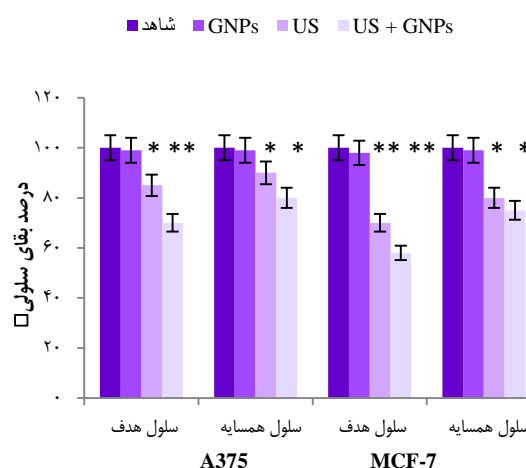
در پژوهش حاضر، میزان اثر همسایگی پرتوی القایی در سه گروه نانوذره، فراصوت و فراصوت به همراه نانوذره مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از دو تست MTT و کولونی‌زایی، تأثیر امواج فراصوت با و بدون نانوذرات طلا در گروه هدف و همسایه بررسی گردید.

با توجه به شکل ۳ و نتایج به دست آمده از تست MTT، میزان بقای سلولی در گروه هدف دریافت‌کننده امواج فراصوت با نانوذرات طلا بسیار کمتر از امواج فراصوت به تنهایی می‌باشد که بیانگر اثر هم‌افزایی امواج فراصوت و نانوذرات طلا است و سبب افزایش مرگ سلولی می‌گردد. Canavese و همکاران با استفاده از تست MTT، میزان بقای سلولی در رده‌های سلولی مختلف تحت تابش امواج فراصوت به تنهایی را بین ۶۰ تا ۷۰ درصد گزارش کردند؛ در حالی که میزان بقای سلولی در گروه‌های دریافت‌کننده امواج فراصوت به همراه نانوذرات طلا بین ۳۰ تا ۵۵ درصد گزارش شد (۱۶) که با نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین، نتایج پژوهش Kosheleva و همکاران نشان داد که استفاده از امواج فراصوت در مجاورت نانوذرات طلا، با افزایش میزان مرگ‌آوری سلول‌های سرطانی به عنوان یک راه جدید در درمان سرطان همراه است (۱۷).

در مطالعه‌ی حاضر، در گروه همسایه‌ی دریافت‌کننده امواج فراصوت با یا بدون نانوذرات طلا، مرگ سلولی معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید که این نتایج نشان دهنده تأثیر امواج فراصوت با و بدون نانوذرات طلا بر سلول‌های خارج از میدان تابش امواج فراصوت می‌باشد. افتخاری و فرید به بررسی اثر همسایگی پرتوی القایی ناشی از امواج غیر یونیزان فرابنفش پرداختند که در تحقیق آن‌ها، القای اثر همسایگی توسط امواج فرابنفش به اثبات رسید (۷). همچنین، رضایی و همکاران ایجاد اثر همسایگی پرتوی القایی توسط امواج فراصوت را با استفاده از تست‌های MTT، آپوپتوز و بیان ژن‌های مختلف گزارش نمودند که در آن‌جا نیز کاهش بقا در گروه‌های تحت تابش امواج فراصوت گزارش گردید (۱۰) که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشت.

تفاوت معنی‌داری در کولونی‌زایی گروه‌های هدف و همسایه‌ی دریافت‌کننده نانوذره‌ی طلا به تنهایی با گروه شاهد وجود نداشت

(۸۳/۶ درصد) داشت. در گروه همسایه که محیط کشت سلول‌های هدف را دریافت کرده بود، کاهش کولونی‌زایی در مقایسه با گروه شاهد رخ داد؛ به نحوی که برای گروه امواج فراصوت حدود ۹۰/۱ درصد و برای گروه امواج فراصوت با نانوذرات طلا حدود ۸۱/۶ درصد بود. برای سلول MCF-7، میزان کولونی‌زایی بعد از تابش فراصوت در حضور نانوذره‌ی طلا برای هر دو گروه هدف و همسایه کاهش بیشتری نسبت به گروه فراصوت به تنهایی داشت ($P < 0/050$).



شکل ۳. درصد تشکیل کولونی سلولی در گروه‌های هدف و همسایه در دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7
شاهد (Control)، نانوذرات طلا (GNPs)، امواج فراصوت (US) و امواج فراصوت با نانوذرات طلا (US + GNPs)
 $P < 0/010^{**}$, $P < 0/050^*$

در تمام گروه‌ها، کاهش درصد کولونی‌زایی برای رده‌ی سلولی MCF-7 بیش از رده‌ی سلولی A375 بود. نتایج نشان داد که نانوذره‌ی طلا با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استفاده شده برای انجام این تست، بر قابلیت کولونی‌زایی تأثیری ندارد. در همه‌ی گروه‌ها، میزان کولونی‌زایی سلول‌های درمان شده با نانوذره‌ی طلا به تنهایی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/050$).

بحث

روش‌های درمانی و تشخیصی با استفاده از امواج فراصوت، نقش مهمی در تحقیقات علمی و در زمینه‌ی بالینی دارند. نتایج مطالعات گوناگون نشان داده است که هم‌افزایی امواج فراصوت و نانوذرات گوناگون، یک روش سرطان درمانی نوآورانه است که توانایی بالقوه‌ی زیادی در درمان ارایه می‌دهد (۱۲). به نظر می‌رسد که آسیب سلولی زمانی بیشترین اثر را ایجاد می‌کند که هر دو محرک فراصوت و نانوذره

نتیجه‌گیری

استفاده از امواج فراصوت به عنوان یک روش درمانی برای برخی از سرطان‌ها، ضمن ایجاد آسیب در سلول‌های موجود در میدان تابش فراصوت، می‌تواند سبب القای اثر در سلول‌های خارج از این میدان شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سیگنال‌های بیولوژیک ارسال شده از سلول‌های هدف تابش فراصوت، سبب بروز آثاری از جمله مرگ سلولی و کاهش تشکیل کلونی در سلول‌های همسایه می‌گردد. همچنین، استفاده‌ی هم‌زمان از امواج فراصوت در مجاورت نانوذرات طلا، منجر به افزایش میزان مرگ‌آوری نسبت به امواج فراصوت به تنهایی می‌شود. نانوذرات طلا می‌تواند ضمن افزایش آسیب سلول‌های تحت تابش فراصوت، باعث افزایش سیگنال‌های همسایگی گردد. اثبات وجود RIBE ناشی از تابش فراصوت، نشان دهنده‌ی آن است که میدان بیولوژیک امواج فراصوت بزرگ‌تر از میدان تابش واقعی آن می‌باشد. بنابراین، انتظار می‌رود با اثبات وجود این پدیده در تابش فراصوت، بازدهی درمان فراصوت تغییر پیدا کند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۱۹۸۰۲۲، مصوب شورای پژوهشی طرح‌های علوم پایه‌ی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از کارکنان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در انجام این مطالعه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

(شکل ۳). Huai و همکاران (۲۱) و Marín و همکاران (۲۰)، غلظت‌های متفاوتی از نانوذره‌ی طلا را در آزمایش‌های خود استفاده کردند و با استفاده از تست کولونی، کاهش چشمگیری در تشکیل کولونی در رده‌های سلولی مختلف را گزارش نمودند؛ در حالی که Kumar و همکاران برای غلظت‌های بالای نانوذره‌ی طلا، کاهش تشکیل کولونی و در غلظت‌های پایین، افزایش تشکیل کولونی را بیان نمودند (۲۲). با توجه به گزارش‌های اعلام شده و نتایج به دست آمده از تحقیقات دیگر، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد و بیانگر این موضوع است که نانوذره‌ی طلا با این غلظت نمی‌تواند سبب کاهش کولونی‌زایی در دو رده‌ی سلولی A375 و MCF-7 شود.

فقیهی و همکاران به بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از امواج یونیزان با استفاده از تست کولونی پرداختند و کاهش تشکیل کولونی در گروه همسایه را گزارش نمودند (۲۳)، اما Kazmierczak و همکاران در بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از امواج یونیزان با استفاده از تست کولونی بر روی رده‌ی سلولی تخمدان همستر چینی، کاهش تشکیل کولونی را رد کردند (۲۴).

تا زمان نگارش پژوهش حاضر، گزارشی مبنی بر بررسی اثر همسایگی پرتوی ناشی از امواج فراصوت با یا بدون نانوذرات با استفاده از تست کولونی یافت نگردید و نتایج مطالعه، کاهش تشکیل کولونی در گروه همسایه با یا بدون نانوذرات طلا را نشان داد که بیان‌کننده‌ی ایجاد اثر همسایگی پرتوی در این روش درمانی می‌باشد.

References

- Lock M, Muinuddin A, Kocha WI, Dinniwell R, Rodrigues G, D'souza D. Abscopal effects: Case report and emerging opportunities. *Cureus* 2015; 7(10): e344.
- Widel M. Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012; 66: 828-37.
- Havaki S, Kotsinas A, Chronopoulos E, Kletsas D, Georgakilas A, Gorgoulis VG. The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Lett* 2015; 356(1): 43-51.
- Widel M, Krzywon A, Gajda K, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2014; 68: 278-87.
- Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: Inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22(45): 7058-69.
- Paluch Ferszt M, Kaźmierczak U, Szepliński Z. Radiation-induced bystander effect research: literature review. *Acta Physica Polonica A* 2021; 139(3): 266-72.
- Eftekhari Z, Fardid R. The bystander effect of ultraviolet radiation and mediators. *J Biomed Phys Eng* 2020; 10(1): 111-8.
- Di X, Bright AT, Bellott R, Gaskins E, Robert J, Holt S, et al. A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(6): 864-72.
- Chakraborty A, Held KD, Prise KM, Liber HL, Redmond RW. Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress. *Radiat Res* 2009; 172(1): 74-81.
- Rezaei M, Kamran Samani R, Kazemi M, Shanei A, Hejazi SH. Induction of a bystander effect after therapeutic ultrasound exposure in human melanoma: In-vitro assay. *Int J Radiat Res* 2021; 19(1): 183-9.
- Carovac A, Smajlovic F, Junuzovic D. Application of ultrasound in medicine. *Acta Inform Med* 2011; 19(3): 168-71.
- Santos HM, Lodeiro C, Capelo-Martinez JL. The Power of Ultrasound. In: *Ultrasound in chemistry: analytical applications*. Hoboken, NJ: Wiley; 2008. p. 1-16.
- Dubinsky TJ, Cuevas C, Dighe MK, Kolokythas O, Hwang JH. High-intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190(1): 191-9.

14. Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: A non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Res* 2011; 31(7): 2425-9.
15. Li L, Guan Y, Xiong H, Deng T, Ji Q, Xu Z, et al. Fundamentals and applications of nanoparticles for ultrasound-based imaging and therapy. *Nano* 2020; 1(3): 263-84.
16. Canavese G, Ancona A, Racca L, Canta M, Dumontel B, Barbaresco F, et al. Nanoparticle-assisted ultrasound: A special focus on sonodynamic therapy against cancer. *Chem Eng Sci* 2018; 340: 155-72.
17. Kosheleva OK, Lai TC, Chen NG, Hsiao M, Chen CH. Selective killing of cancer cells by nanoparticle-assisted ultrasound. *J Nanobiotechnol* 2016; 14(1): 46.
18. Shanei A, Sazgarnia A. An overview of therapeutic applications of ultrasound based on synergetic effects with gold nanoparticles and laser excitation. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22(8): 848-55.
19. FRENS G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat Phys Sci* 1973; 241(105): 20-2.
20. Marín A, Martín M, Liñán O, Alvarenga F, López M, Fernández L, et al. Bystander effects and radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother* 2015; 20(1): 12-21.
21. Huai Y, Zhang Y, Xiong X, Das S, Bhattacharya R, Mukherjee P. Gold Nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cell Stress* 2019; 3(8): 267-79.
22. Kumar R, Korideck H, Ngwa W, Berbeco RI, Makrigiorgos GM, Sridhar S. Third generation gold nanoplatform optimized for radiation therapy. *Transl Cancer Res* 2013; 2(4).
23. Faqihi F, Neshastehriz A, Soleymanifard S, Shabani R, Eivazzadeh N. Radiation-induced bystander effect in non-irradiated glioblastoma spheroid cells. *J Radiat Res* 2015; 56(5): 777-83.
24. Kazmierczak U, Banas D, Braziewicz J, Buraczewska I, Czub J, Jaskola M, et al. Investigation of the bystander effect in CHO-K1 cells. *Rep Pract Oncol Radiother* 2014; 19(Suppl): S37-S41.

The Effect of Ultrasound Exposure in Combination with Gold Nanoparticles on Colonization of A375 and MCF-7 Bystander Cells

Masoumeh Rezaei¹, Roghayeh Kamran-Samani², Seyed Hossein Hejazi³, Ahmad Shanei⁴

Original Article

Abstract

Background: The biological response of cells that are not directly exposed to radiation, but are in the vicinity or the environment of irradiated cells, is known as the radiation bystander effect. In previous studies, the existence and mechanism of the bystander effect induced by ionizing radiation have been investigated. Recently, ultrasound therapy was inducted as a new method for treating some cancers. Therefore, it seems necessary to evaluate the ultrasound-induced bystander effect.

Methods: To investigate the ultrasound-induced bystander effect, A375 and MCF-7 cell lines were cultured in the target and bystander plates. The target plates included four groups of control (without intervention), ultrasound, gold nanoparticles, and simultaneous ultrasound treatment and gold nanoparticles. The four bystander groups received the culture medium of the target groups, respectively. MTT and colony forming units assays were performed to investigate the ultrasound induced bystander effect.

Findings: The percentage of colonization in bystander groups receiving ultrasound without and with gold nanoparticles were significantly lower compared with the control group. However, the amount of colonization for the MCF-7 cell line was more than A375.

Conclusion: The results showed that the ultrasound-induced bystander effect was intensified in the presence of gold nanoparticles due to.

Keywords: Ultrasound; Bystander effect; Gold; Nanoparticles; Colony forming units assays

Citation: Rezaei M, Kamran-Samani R, Hejazi SH, Shanei A. The Effect of Ultrasound Exposure in Combination with Gold Nanoparticles on Colonization of A375 and MCF-7 Bystander Cells. J Isfahan Med Sch 2021; 39(641): 688-95.

1- Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- PhD in Medical Physics, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ahmad Shanei, Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: shanei@med.mui.ac.ir