

تأثیرات سمی و ارزیابی بیان ژن *p53* در رده سلولی سرطان معده بعد از تیمار با نانوذرات پالادیوم

محدثه منصوری^۱، فهیمه باغبانی آرانی^{۱*}، سید عطا اله سادات شانديز^۲

^۱گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، واحدورامین-پیشوا، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، ایران. ^۲گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در بین افراد مختلف سرتاسر جهان می‌باشد. امروزه، نانوذرات، به عنوان یک فاکتور ضد سرطانی در تحقیقاتی حوزه درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا که ژن *P53* به عنوان ژن سرکوبگر توموری در بسیاری از سرطان‌ها مشخص شده، هدف از این مطالعه ارزیابی بیان ژن *P53* بر روی رده سلولی سرطان معده AGS بعد از اثر نانوذرات پالادیوم بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۶، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام شد. در این تحقیق رده‌های سلولی سرطانی AGS و نرمال HEK293 با غلظت‌های مختلفی از نانوذرات پالادیوم (۵۷۰، ۵۷۰۰، ۵۷، ۵/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. اثر نانوذرات بر میزان زنده ماندن سلول‌ها با کمک روش MTT اندازه‌گیری شد. استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. در نهایت، بیان ژن *P53* با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج سمیت سلولی بیانگر آن است که در غلظت‌های بالا از نانوذرات پالادیوم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری منجر به مرگ سلولی شده‌اند ($P=0/002$). نتایج تست Real Time PCR حاکی از آن بود که میزان بیان ژن *P53* در مقایسه با ژن مرجع، طی مدت زمان ۴۸ ساعت افزایش معنی‌داری نداشته است ($P=0/09$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات پالادیوم توانایی نابود کردن رده سلولی سرطانی AGS را در مقایسه با رده نرمال HEK293 دارد، اما این کشندگی در اثر افزایش بیان ژن *P53* نمی‌باشد. جهت تعیین نوع مرگ سلولی حاصل از سمیت نانوذرات پالادیوم نیاز به انجام تست‌های بیشتر و گسترده‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات پالادیوم، سرطان معده، ژن *P53*

* نویسنده مسئول: فهیمه باغبانی آرانی، ورامین، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

مقدمه

سرطان معده دومین سرطان رایج در دنیا می‌باشد، که به شکل گسترده‌ای در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است (۱). بر مبنای آخرین آمار مرکز تحقیق‌های سرطان کشور طی چند سال اخیر، سرطان معده بیشترین بروز را در مردان و سومین رتبه را در میان زنان پس از سرطان‌های پستان و روده بزرگ دارد (۲). سرطان معده با وجود پیدایش تکنیک‌های پیشرفته در عمل‌های جراحی هنوز هم سرطانی خطرناک به حساب می‌آید. حدود ۹۰ درصد از تومورهای معده بدخیم می‌باشند و آدنوکارسینومای معده ۹۵ درصد از همه بدخیمی‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۳ و ۱). علاوه بر جراحی، شیمی‌درمانی و پرتو درمانی، یکی از جدیدترین سیستم‌های درمانی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده از نانوذرات می‌باشد (۴).

یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های موجود در سلول سرکوب‌گرهای توموری یا Tumor suppressors می‌باشند. از مهم‌ترین سرکوب‌گر تومورها $p53$ می‌توان نام برد. ژن $p53$ با تولید پروتئین $p53$ چرخه سلولی را کنترل می‌کند و مانع از وقوع جهش‌های ژنتیکی سرطان‌زا می‌شود (۵). همچنین این پروتئین با افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی و کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی مانند $Bcl-2$ موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۶).

تهیه و استفاده از داروهای جدید که نسبت به سلول‌های طبیعی کمتر سمی بوده و نسبت به

سلول‌های بدخیم قابلیت تخریب بالایی را داشته باشد دلخواه است که از آن میان می‌توان به داروهایی بر پایه پلاتین یا پالادیوم اشاره کرد (۷).

نانوذرات به دلیل ریز بودن قادرند به درون سلول‌ها نفوذ کرده، در حالی که تداخل عمده‌ای در کار سلول ایجاد نشود (۸). سازگاری زیستی یک حامل دارو به دو مورد سیستم ایمنی بدن و سمیت ذاتی حامل ارتباط دارد و کلوئیدها و مواد حاصله از تخریب آن باید در کمترین زمان پس از رهاسازی آنها پاک‌سازی شود. واضح است که سمیت ذرات مغناطیسی می‌تواند به عوامل متعددی از جمله؛ دوز نانو ذرات، ترکیب شیمیایی، اندازه، ساختار، حلالیت، شیمی سطح و تجزیه بیولوژیکی بستگی دارد (۹). عنصر پالادیوم Pd یکی از کارآمدترین فلزاتی است که در این ذرات به کار برده می‌شود. همچنین نسبت سطح به حجم بالا و انرژی سطحی بالای این ذرات از دیگر قابلیت‌های آن است. معمولاً نانوذرات پالادیوم در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تهیه می‌شوند (۸). پالادیوم بر روی سلول‌های سرطانی اثرات متفاوتی دارند که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. سلول‌هایی که با PdNPs انکوباسیون شوند و نشانه‌های سمیت در آنها ظاهر شود، دچار یکسری تغییرات مورفولوژیکی مانند چروکیدگی شدن غشای سلولی شده و مشاهده قطعه‌های ریز باقی مانده سلولی را می‌توان نام برد. این تغییرات در سلول‌های نرمال گروه کنترل مشاهده نمی‌شود (۷). مطالعه‌ها حاکی از آن است که این نانوذرات از بهترین فعال‌کننده‌های اتوفازای هستند.

سمیت نانوذرات پالادیوم بر روی رده سلولی آدنوکارسینوم معده که تشکیل دهنده بیش از ۹۰ درصد موارد سرطان معده است، انجام گرفت. همچنین هدف از این تحقیق ارزیابی تغییرات بیان ژن *P53* در رده سلولی سرطانی تیمار شده به وسیله نانوذرات پالادیوم بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۶ انجام شد. سنتز نانو ذرات پالادیوم از روش رسوب گذاری با احیای نمک کلرید پالادیوم ($PdCl_2$) به وسیله آسکوربیک اسید به عنوان عامل تثبیت کننده و احیا کننده تحت شرایط هم زدن و دمای ۸۵ درجه سانتی گراد طی مدت زمان نیم ساعت انجام شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM بررسی شد. همچنین شناخت نوع ساختار کریستالوگرافی نانوذرات پالادیوم با تست پراش اشعه ایکس (XRD) به وسیله دستگاه، X-Pert PRO Panalitical ساخت کشور هلند با زاویه ۲ تا (θ) و تشعشع لامپ $CuK\alpha$ ، در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس جهت آماده سازی نانوذره مقدار ۵۷۰ میلی گرم از پودر نانوذره در ۲ میلی لیتر بافر PBS ورتکس و حل شد و با اضافه کردن محیط DMEM high glucose به حجم ۱۰ میلی لیتر رسید. جهت کشت رده های سلولی مورد نیاز، ابتدا هر دو رده سلولی سرطانی AGS و نرمال HEK293 از

آنها می توانند به عنوان یک پاتوژن اندوزومال یا پروتئین ها، به وسیله سلول ها دریافت شوند که در نهایت منجر به القای عملکرد غیر عادی اتوفاژی می شوند. از دیگر اثرات این نانوذرات بر روی سلول این است که تیمار سلول های سرطانی به وسیله نانوذرات پالادیوم به طور محسوسی منجر به افزایش سطح یا محصول تخریب پراکسیدهای لیپیدهای (MDA) Malondialdehyde داخل سلولی شده و باعث القای تخریب اکسیداتیو در سلول می شود (۱۰). همچنین منجر به کاهش سطح آنزیم های آنتی اکسیدان و آسیب و مرگ سلولی می شوند. همچنین میزان فعال شدن کاسپاز ۳ در سلول هایی که با نانوذرات پالادیوم تیمار شده اند به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از سلول های گروه کنترل است و افزایش میزان فعالیت این آنزیم منجر به مرگ سلولی یا آپاپتوز می شود (۱۰).

بر اساس مطالعه های انجام شده، مشخص شد که تاکنون مطالعه ای بر روی اثرات سمیت نانوذرات پالادیوم بر رده سلولی سرطانی معده AGS صورت نگرفته است. علاوه بر این، مطالعه ها حاکی از آن است که تا کنون هیچ مطالعه ای در حوزه ارزیابی بیان ژن *P53* در سلول های نرمال و سرطانی تیمار شده با این نانوذرات انجام نگرفته است. از طرفی مطالعه ها در خصوص ژن *P53* به ویژه نقش آن در آپوپتوز و مهار سرطان زایی منجر به کارگیری آن به عنوان اهداف دارویی برای درمان سرطان شده است. بنابراین، در این پژوهش برای نخستین بار مطالعه بر روی اثرات

انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس از کشت سلولی در محیط DMEM high glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد کربن صورت گرفت.

جهت ارزیابی اثرات سمی نانوذرات بر رده‌های سلولی نرمال و سرطانی از تکنیک رنگ سنجی MTT استفاده گردید. سلول‌ها با رقت‌های متوالی از نانوذرات پالادیوم شامل: ۵۷۰، ۵۷۰، ۵۷۰ و ۵/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، طی مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند. این تست به صورت ۸ بار تکرار انجام شد و درصد بقای سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد؛ $100 \times$ (جذب نوری کنترل بر جذب نوری تست) = میزان بقای سلولی

پس از گذشتن ۴۸ ساعت انکوباسیون و خارج نمودن محیط، در تاریکی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT اضافه شد. ۴ ساعت انکوباسیون و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوباسیون صورت گرفت. میزان شدت رنگ ایجاد شده به وسیله دستگاه قرائت گر الایزا (DNM-9602G) در طول موج ۵۷۰ قرائت شد و در نهایت دوز IC_{50} (Inhibitory concentration) یا پنجاه درصد کشندگی محاسبه گردید.

به منظور ارزیابی میزان بیان ژن P53 از روش Real time PCR استفاده شد. برای این کار ابتدا نیاز به استخراج RNA کل سلول می‌باشد. طراحی پرایمرهای این تحقیق با نرم افزارهای Primer Express و Gene Runner انجام گرفت. در مرحله بعدی جهت تأیید

پرایمرها، با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنالین BLAST، صحت پرایمرها بررسی شد. در جدول ۱ توالی جفت پرایمرهای جلوبر و برگشتی دو ژن هدف و مرجع نشان داده شده است.

به منظور استخراج RNA از کیت (Transgen Biotech ER101-01) استفاده شد و تمام مراحل طبق پروتکل کیت انجام شد. در نهایت با استفاده از دستگاه نانودراپ (thermo scientific، آمریکا) غلظت RNA مشخص گردید و برای اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی OD260/OD280 بررسی گردید و برابر با ۱/۹ تأیید شد. همچنین غلظت RNA با خوانش در طول موج ۲۶۰ نانومتر به دست آمد. به منظور سنتز cDNA، ۱ میکروگرم از RNA به میکروتیوب RNase free وارد نموده و ۱ میکرولیتر آنزیم DNaseI و ۱ میکرولیتر بافر این آنزیم به آن اضافه گردید. حجم نهایی محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. در نهایت جهت غیر فعال کردن آنزیم DNaseI، ۱ میکرولیتر از محلول EDTA 50 mM به آن افزوده شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت. جهت سنتز cDNA نیز از کیت (Transgen Biotech AE301-02) استفاده شد و تمام مراحل طبق پروتکل کیت انجام گرفت.

جهت انجام *PCR Real Time* از دستگاه *Real Time PCR* مدل ABI ۷۳۰۰ و *SYBR-Green Master Mix* (Applied Biosystems) استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مربوطه تهیه مخلوط واکنش با استفاده از *SYBR Green* و پرایمرهای *Forward* و *Reverse* و cDNA و آب مقطر دو بار تقطیر صورت

گرفت. همچنین الکتروفورز محصولات *PCR* روی ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت که تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید کرد. با استفاده از گرادیان *PCR*، دمای مناسب برای اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد و تعداد سیکل مناسب برای تکثیر ژن *P53* و کنترل داخلی به ترتیب ۴۰ و ۴۰ سیکل تعیین شد. برنامه *PCR* استفاده شده به ترتیب عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه که با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه ادامه یافت، برای اتصال پرایمرها در دمای مناسب به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ۵ دقیقه انجام شد.

علاوه بر این گروهی هم به عنوان کنترل منفی تست (NTC) آماده شد که در آن تمام مواد به غیر از الگو (cDNA) افزوده شد.

در مرحله بعد آنالیز نتایج *RealTimePCR* با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ طبق فرمول‌های زیر صورت گرفت:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_T - \Delta Ct_C$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

در این فرمول ΔCt اختلاف بین سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه مورد آزمون و ΔCt_C نیز اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه کنترل می‌باشد. این روش کارایی پرایمرها را کامل در نظر گرفته، به این صورت که میزان محصول در تمام سیکل‌ها دو برابر می‌باشد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و Excel و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

با توجه به تصویر ۱ در الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات پالادیوم، الگوی پیک‌های XRD مربوط به ساختار کریستالوگرافی در طیف نمونه پالادیوم دیده می‌شود. پیک‌های مجزا در زوایای ۲ تا (θ) ۴۰، ۶۸، ۸۲ و ۹۶ درجه مشاهده می‌شود که به ترتیب با سطوح کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) پالادیوم هم‌خوانی دارد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن هدف و مرجع

نام ژن	پرایمرها	اندازه محصول
<i>P53</i>	forward: 5'-CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT-3' reverse: 5'-CAACCTCAGGCGGCTCATAG-3'	۱۹۴bp
<i>GAPDH</i>	forward: 5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' reverse: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'	۷۴bp

همان‌طور که در تصویر ۲ نمایان است ساختار سه بعدی نانوذرات پالادیوم به صورت کروی می‌باشد. در برخی نقاط تجمع و آگلومره شدن صورت گرفته است که می‌توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه میکروسکوپ بررسی نمود. با توجه به نتایج حاصل از این تست اندازه نانوذرات به طور تقریبی ۷۰ نانومتر می‌باشد.

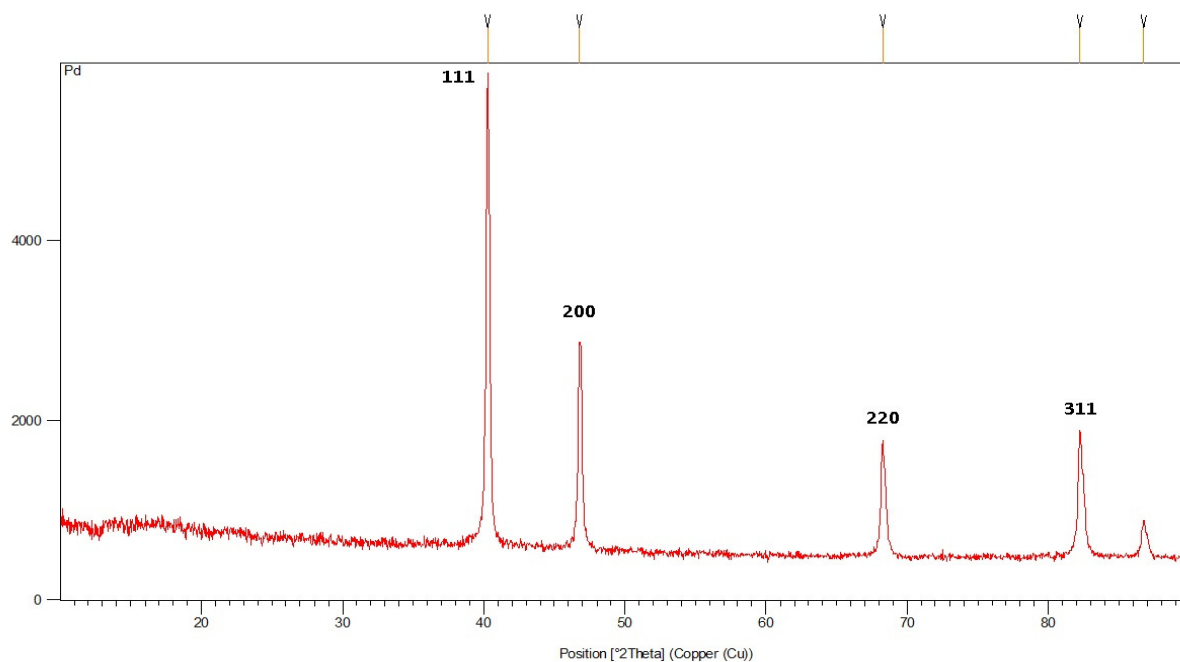
در رابطه با اثر سمیت نانوذرات پالادیوم بر روی رده سلولی سرطانی در طی ۴۸ ساعت، همان‌طور که در نمودار ۱-الف مشخص است، غلظت ۵۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حدود ۶۲ درصد موجب کشندگی شده و این اختلاف با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$). همچنین در غلظت ۵۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حدود ۳۳ درصد کشندگی داشته است که این اختلاف نیز از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$). این در حالی است که غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات پالادیوم تا ۵/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر اثرات کشندگی محسوسی مشاهده نشده است. با توجه به محاسبه‌های انجام گرفته میزان IC_{50} مقدار ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

همچنین اثرات این نانوذرات بر روی سلول‌های نرمال HEK293 در نمودار ۱-ب نشان داده شده است. در غلظت ۵۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

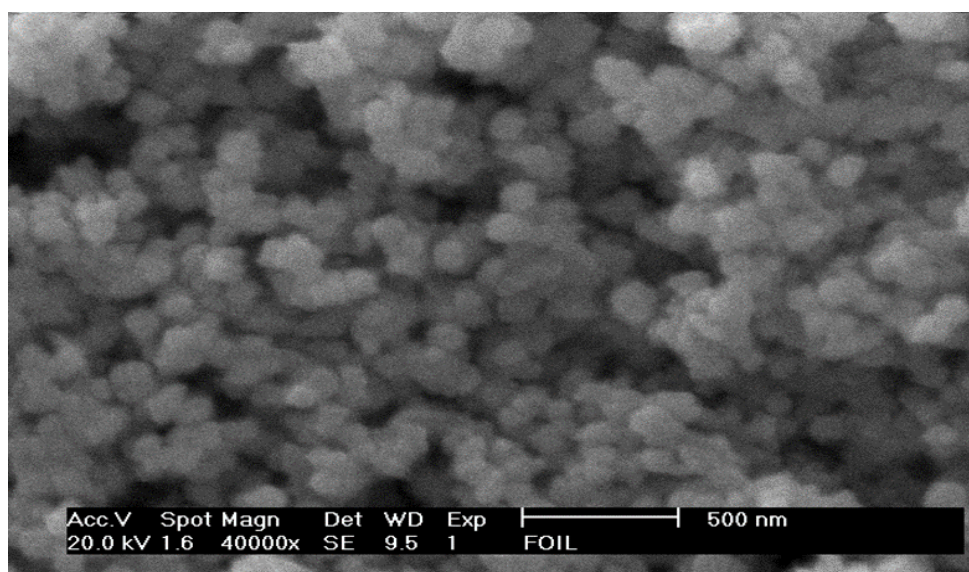
حدود ۳۱ درصد از رشد سلول‌ها کاسته شده و این کاهش رشد از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$). علاوه بر این در غلظت ۵۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز حدود ۲۰ درصد از رشد سلول‌ها کم شده است و این کاهش رشد نیز از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.005$).

همچنین تصویر ۳ منحنی‌های ذوب ژن‌های *GAPDH* و *P53* را نشان می‌دهد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مدنظر، نبود دایمر پرایمرها و عدم تکثیر قطعه‌های غیراختصاصی برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از منحنی ذوب مشخص شد. منحنی D منحنی ذوب قطعه ژنی *P53* با طول ۱۹۴ جفت باز، در رده سلولی AGS را نشان می‌دهد. همچنین منحنی F نشان دهنده منحنی ذوب قطعه ژنی *GAPDH* به طول ۷۵ جفت باز در رده سلولی AGS می‌باشد.

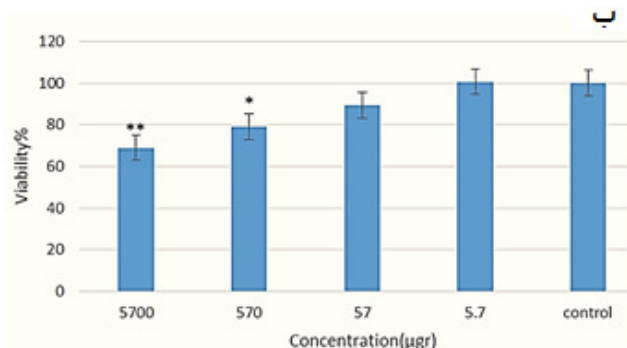
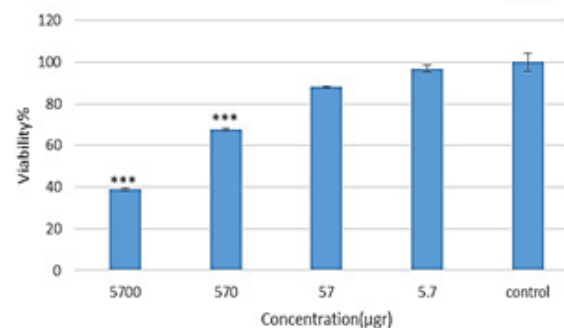
نتایج بررسی تغییر در بیان ژن‌ها در سلول‌های AGS تیمار شده با نانوذرات پالادیوم طی مدت زمان ۴۸ ساعت در نمودار ۲ نمایش داده شده است. نسبت ژن *P53* به ژن مرجع *GAPDH* در رده سلولی سرطانی AGS تیمار شده با نانوذرات پالادیوم طی ۴۸ ساعت به میزان ۱/۵ برابر کاهش یافته است، که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P = 0.09$).



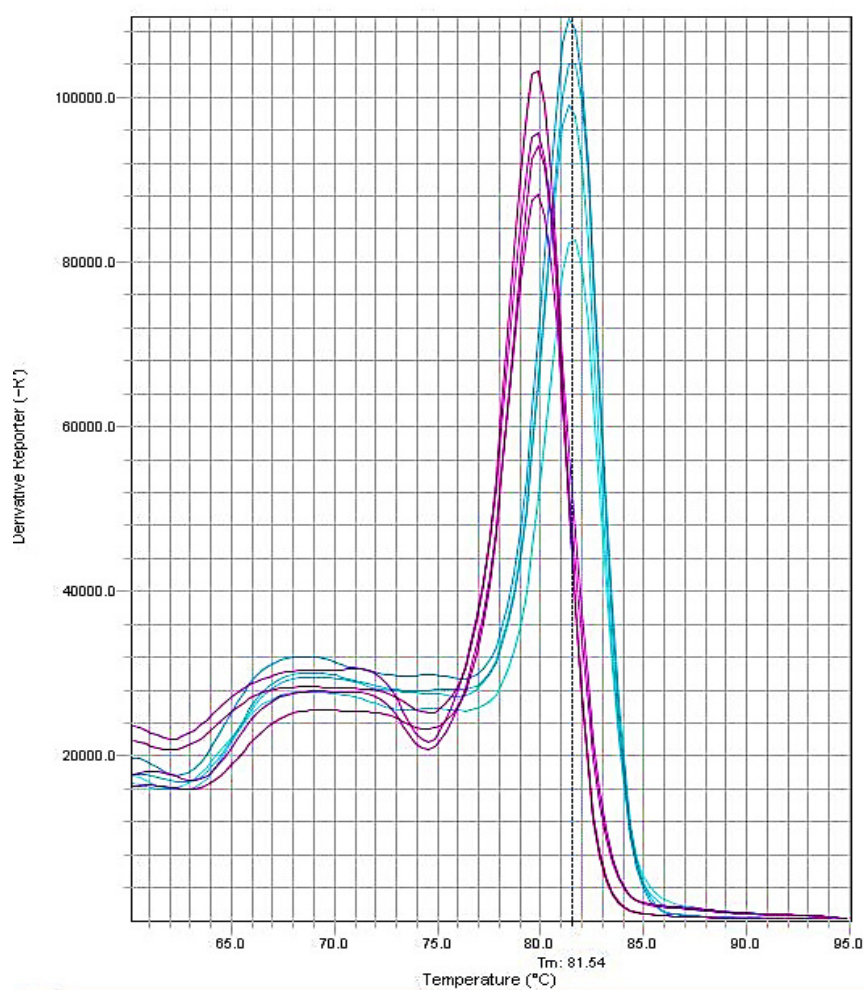
تصویر ۱: الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات پالادیوم. زوایای ۲ تتا (θ) مربوط به الگوی پالادیوم در ۴۰، ۴۶، ۶۸ و ۸۲ درجه دیده می شود.



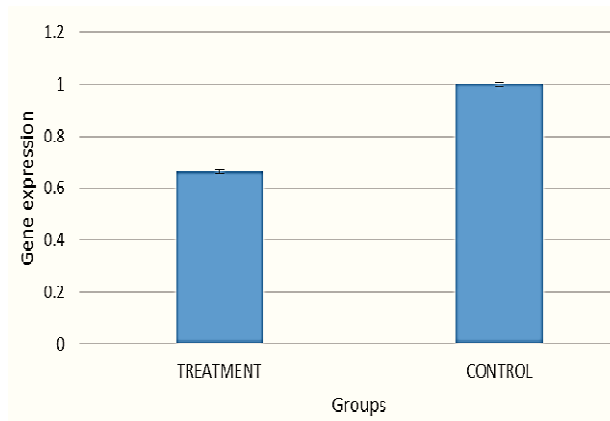
تصویر ۲: میکروگراف الکترونی نگاره (SEM) از نانوذرت پالادیوم. مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا در ولتاژ ۲۰ KV، بزرگنمایی ۴۰ هزار برابر و تحت فشار خلاء (5^{-10} Torr) انجام گرفت. نتایج حاصل از این تست اندازه نانوذرات پالادیوم را به طور تقریبی ۷۰ نانومتر نشان داد.



نمودار ۱: بررسی اثرات نانوذرات پالادیوم بر روی رده سلولی AGS: (الف) و رده سلولی HEK293 (ب) داده ها به صورت میانگین درصد زنده ماندن $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. نتایج به صورت درصد بقا گزارش شده است ($P < 0.05^*$, $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$; $n=3$).



تصویر ۳: منحنی D، ذوب محصول تکثیر ژن *p53* در دمای ۸۱/۵۴ درجه. منحنی F، ذوب محصول تکثیر ژن *GAPDH* در دمای ۷۹/۸۴ درجه. محور X میزان دما و محور Y میزان فلورسنت قابل ردیابی را مشخص می‌کند. هر یک از قله ها نمایانگر یک محصول PCR است.



نمودار ۲: نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن *P53* در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات پالادیوم

بحث

مطالعه‌های اخیر بیانگر پتانسیل نانوذرات پالادیوم برای استفاده در فرمولاسیون داردهای ضد سرطانی می باشد بنابراین، مطالعه حاضر در تکمیل یافته‌های قبلی برای اثر ضد سرطانی این نانوذره طراحی گردید به طوری که اثر نانوذره پالادیوم روی سلول‌های سرطان معده بررسی گردید .

امروزه سرطان معده یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای مختلف جهان می باشد. دانشمندان سرتا سر جهان به دنبال یافتن روش‌های جدید با درصد آسیب و عوارض کمتر جهت درمان انواع تومورهای بدخیم می باشند. اصلی ترین روش‌های درمان سرطان شامل؛ شیمی درمانی، پرتو درمانی، جراحی و آنتی آنژیوژنز می شوند (۱۱). جراحی همواره همراه با خطر متاستاز همراه بوده و مشکل عمده استفاده از شیمی درمانی و پرتو درمانی در درمان سرطان آسیب به DNA و ایجاد جهش در ساختار آن در سلول‌های طبیعی است زیرا ایجاد این

جهش‌ها خود باعث تشکیل تومورهای جدید می شوند (۱).

پروتئین سرکوبگر تومور p53 می تواند موجب مهار سیکل سلولی یا القای آپوپتوز شود و از این طریق سلول را در مقابل سرطان محافظت کند. بیان بیش از حد p53 یک پاسخ فیزیولوژیکی طبیعی برای کاهش سرعت انجام سیکل سلولی در فاز G1 می باشد تا فرصت دهد DNA آسیب دیده ترمیم شود و در صورتی که امکان ترمیم وجود نداشته باشد موجب القای آپاپتوز می شود (۵).

نانوذرات پالادیوم به دلیل سایز کوچک به راحتی وارد سلول شده و عملکرد اجزای سلولی را به طرق مختلفی از جمله تأثیر بر پتانسیل غشای میتوکندری، نشئت LDH و اثر بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تأثیر قرار می دهند (۱۰). در این تحقیق تأیید مورفولوژی نانوذرات پالادیوم با استفاده از تست‌های SEM و XRD اندازه نانوذرات را ۷۰ نانومتر و شکل آن را کروی تعیین کرد که برای ایجاد

اثر سمیت سلولی مناسب می‌باشند به طوری که نتایج تیمار سلول‌های AGS با نانوذرات پالادیوم به روش MTT طی ۴۸ ساعت، نشان داد که این نانوذرات اثرات سمیت و کشندگی بالقوه‌ای بر روی سلول‌ها داشته‌اند و این اثرات در غلظت‌های ۵۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دارد ($P=0/002$). این در حالی است که طی تیمار سلول‌های نرمال درصد بقا و رشد سلول‌ها در غلظت‌های ۵۷۰ و ۵۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از سلول‌های سرطانی می‌باشد. این بدان معنی می‌باشد که نانوذرات پالادیوم هم بر روی سلول‌های سالم و هم بر روی سلول‌های نرمال اثر سمیت و کشندگی داشته اما میزان بیشتر آن در سلول‌های سرطانی قابل توجه می‌باشد، اما با این حال نمی‌توان گفت که نانوذرات به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند و نیاز به تست‌های بیشتر جهت هدفمندسازی می‌باشد. در نهایت میزان IC_{50} مقدار ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. بدین معنا که در این غلظت ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی کشته شده و از این غلظت جهت انجام تست Real Time PCR استفاده شد تا ارزیابی بیان ژن *P53* و تعیین نوع مرگ سلولی صورت گیرد. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA طبق پروتوکل شرکت سازنده و انجام تست Real Time PCR، با توجه به آنالیز آماری، نتیجه گرفته شد که میزان بیان ژن *P53* در مقایسه با ژن مرجع *GAPDH* به مقدار ۱/۵ برابر کاهش یافته که معنی‌دار نمی‌باشد و این بدین معنی می‌باشد که اثرات

سمیت نانوذره باعث القای بیان ژن *P53* نشده است. با توجه به این که این ژن اولین کاندید جهت بررسی مرگ سلولی از نوع آپاپتوز است، میزان بیان ژن افزایش پیدا نکرده و در نتیجه جهت بررسی آپاپتوز در رده سلولی سرطانی نیاز به بررسی ژن‌های آپاپتوزی بیشتر و نیز انجام تست‌های بیشتر جهت تعیین نوع مرگ سلولی می‌باشد.

در یک تحقیق مشابه شانتی و همکاران با استفاده از عصاره‌های میخک صدپر به سنتز سبز نانوذرات پالادیوم پرداختند و این نانوذرات را جهت تیمار سلول‌های سرطانی دهانه رحم و بررسی سمیت و مرگ سلولی مورد مطالعه قرار دادند. طی ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به وسیله نانوذرات پالادیوم و انکوباسیون، نانوذرات اثر سمیت و کشندگی مقبولی روی رده سلولی Hela داشتند. میزان IC_{50} به دست آمده ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر طی ۴۸ ساعت می‌باشد. اثر سمیت این نانوذرات در غلظت‌های ۴۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۱۲). در ادامه مطالعه‌ها در زمینه درمان سرطان با نانوذرات فلزی از جمله پالادیوم، گرونتان و همکاران پس از سنتز سبز نانوذرات پالادیوم به وسیله عصاره برگ میخک (بدون دخالت هیچ عامل شیمیایی)، اثرات آپاپتوتیک این نانوذرات را بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان بررسی کردند. طی این تحقیق پس از تیمار این سلول‌ها با نانوذرات پالادیوم سنتز شده، بقای سلولی از طریق نشت LDH، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و

القای اتوفازی، تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری، اثرگذاری بر روی محتوای MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فعالیت کاسپاز ۳ و در نهایت القای آپاپتوز، به میزان قابل توجهی کاهش یافت و آپاپتوز صورت گرفته از نوع وابسته به کاسپاز بود (۱۰).

در تحقیق‌های مشابه مازنی و همکاران با استفاده از فرم‌های دیگری از پالادیوم، اثرات آن را بر روی چندین سرطان ارزیابی کردند. آن‌ها پس از تهیه ۳ کمپلکس جدید از پالادیوم به نام‌های ۱۱-۱، ۳-الکیلن (دی تیو کربامات) بیس (۱، ۱۰-فنانترولین پالادیوم (II)) نیترات که الکیلن می‌تواند پروپیلن (کمپلکس ۱) بوتیلن (کمپلکس ۲) و یا اکتیلن (کمپلکس ۳)، به بررسی اثر سمی و ضد سرطانی آن‌ها بر رده سلولی سرطانی معده AGS و ارزیابی مرگ سلولی پرداختند و در نهایت نتیجه گرفتند کمپلکس‌های جدید نسبت به یکدیگر تأثیر گوناگون وابسته به غلظت دارند. به طوری که کمپلکس ۱ در غلظت بیش از ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کمپلکس ۲ در بیش از ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمپلکس ۳ هم در بیش از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مرگ سلولی به صورت آپاپتوز و نکروز شدند (۷). در مطالعه دیگری به وسیله مازنی و همکاران به بررسی تأثیر ضد توموری کمپلکس‌های پالادیوم با مشتقات دی تیو کربوماتی بر روی رده سلولی سرطانی مری (KYSE-30) پرداختند. طی این مطالعه کمپلکس‌های ساخته شده، پس از تیمار سلول‌ها به روش MTT، در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ اثرات سمی بالقوه ای بر

روی رده سلولی سرطانی مری داشتند. کمپلکس‌های پالادیوم اثرات سمی خود را از طریق مرگ سلولی از نوع آپاپتوز اعمال می‌کنند. حتی استفاده از غلظت‌های پایین پالادیوم منجر به کاهش تعداد کلونی و مرگ سلولی آپاپتوز شد (۱۳). این گروه در مطالعه دیگر خود این کمپلکس‌های جدید پالادیوم را بر روی سلول‌های کبد اثر داده و به بررسی اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی و القای مرگ سلولی پرداختند. این کمپلکس‌ها اثرات قابل توجهی بر روی رده سلولی سرطان کبد داشته و تعداد کلونی‌های شکل گرفته پس از تیمار با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمپلکس‌های پالادیوم اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با کنترل نشان داد. همچنین این کمپلکس‌ها باعث وقوع مرگ سلولی از نوع آپاپتوز شده‌اند (۱۴). این گروه تحقیق‌های خود را با استفاده از کمپلکس‌های نانوذرات انجام دادند این در حالی است که در تحقیق حاضر از کمپلکس‌های پالادیوم استفاده نشده و نانوذرات به صورت خالص مورد استفاده قرار گرفتند، اما نتایج حاکی از آن بود که نانوذراتی که به صورت کمپلکس بودند میزان سمیت بالاتری نسبت به نانوذرات خالص داشته‌اند. از طرفی در اغلب تحقیق‌های ذکر شده سنتز نانوذره به روش سبز بوده است که خود در میزان کارایی نانوذرات مؤثر است و یکی از احتمالات بالا بودن دوز سمی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه‌های ذکر شده نوع سنتز (شیمیایی) نانوذره پالادیوم در این تحقیق می‌تواند باشد.

به منظور مشخص شدن کامل مکانیسم‌های ضدتوموری نانوذرات پالادیوم، پیشنهاد می‌شود بیان ژن‌های مختلف دخیل در آپاپتوز مانند کاسپازها نیز ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که نانوذرات پالادیوم در غلظت‌های بالایی اثرات سمیت و کشندگی بر سلول‌های سرطان معده داشته‌اند. بنابراین کاندیدای مناسبی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی نمی‌تواند باشد. اگرچه این نانوذرات بر سلول‌های نرمال نیز اثر کشندگی داشته‌اند، اما میزان سمیت و کشندگی در سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های نرمال می‌باشد. همچنین ارزیابی بیان ژن *P53* با انجام تست *real time PCR* در سطح mRNA افزایشی در میزان بیان این ژن نشان داد که بیانگر این است این ژن در نوع مرگ سلولی حاصل از نانوذرات پالادیوم دخالت ندارد. بنابراین تعیین نوع مرگ سلولی با ارزیابی ژن‌های آپاپتوزی و سرکوب گر تومور بیشتری پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر استنتاج شده از داده‌های پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا می‌باشد.

REFERENCES:

1. Bail J, Meneses K, Demark-Wahnefried W. Nutritional status and diet in cancer prevention. *Semin Oncol Nurs*; 2016; 32(3): 206-14.
2. Borji A, Bayat M, Shamsabadi F, Amini F, Dayyani M, MehradMajd H. Epidemiology of Gastrointestinal Cancers (Stomach, Esophageal and Colorectal) in Neyshabur City during 2006-2012. *J Neyshabur Univ Med Sci* 2015; 04(3): 37-44.
3. Carl-McGrath S, Ebert M, Rocken C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 2007; 5(2): 877-94.
4. Iravani S. Gastric cancer as a multifactorial disease. *AMHSR* 2013; 11: 157-64.
5. Hedayatizadeh-Omran A, Alizadeh-Navaei R, Janbabaei G, Omrani-Nava V, Hasheminasab Y, Amjadi O, Tehrani M. Association of *P53* gene polymorphism with gastric cancer in Northern Iran as a high-risk region. *Biomed Rep* 2018; 8(5): 433-8.
6. Joer AC, Fersht AR. The p53 Pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. *Annu Rev Biochem* 2016; 85: 375-404.
7. Mazani M, Hadizadeh SH, Najafzadeh N, Amani M, Mansouri-Torshizi H. Anti-cancer effects of palladium complexes on gastric cancer cell line (AGS). *J Guilan Univ Med Sci* 2014; 23 (90): 72-9.
8. Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, et al. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 3287-303.
9. Markids H, Rotherham M, El Haj J. Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *J Nanomater* 2012; 16: 24-34.
10. Gurunathan S, Kim E, Han JW, Park JH, Kim JH. Green chemistry approach for synthesis of effective anticancer palladium nanoparticles. *Molecules* 2015; 20(12): 22476-98.
11. Adibi H, Zandie N, Mansouri K. Cytotoxic effects of palladium complexes containing squaric ligands and sulfosuccinic acid on cancer cell lines. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2015; 18(11): 619-30.
12. Shanthi K, Sreevani V, Vimala K, Kannan S. Cytotoxic effect of palladium nanoparticles synthesized from *Syzygium aromaticum* aqueous extracts and induction of apoptosis in cervical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci India Sect B: Biol Sci* 2017: 1101-12.
13. Najafzadeh N, Hadizade SH, Mazani M, Amani M. Anticancer effects of palladium complexes of dithiocarbamate derivatives on esophageal cancer cell line (KEYSE-30). *J Isfahan Med Sci* 2014; 32(294): 1129-41.
14. Hadizadeh S, Mazani M, Najafzadeh N, Mansouri-Torshizi H, Pourheydar B, Mirzanejad-Asl H. The effect of new palladium (II) complexes of dithiocarbamate derivatives on the morphology and clonogenicity of liver cancer cell line. *KAUMS Journal (FEYZ)* 2015; 18(6): 506-14.

Cytotoxic Effects and Evaluation of *P53* gene Expression Toward Gastric Cancer AGS Cells Treated With Palladium Nanoparticles

Mansouri M¹, Baghbani-Arani F^{1*}, Sadat Shandiz SA²

¹Department of Genetics and Biotechnology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran,

²Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 6 Jan 2018 Accepted: 3 Nov 2018

Abstract

Background & aim: Gastric cancer is one of the most common cancers in different parts of the world. Nowadays, nanoparticles, as an anticancer agent, have been considered in research on cancer treatment. Since the *P53* gene has been identified as a tumor suppressor gene in many cancers, the aim of this study was to evaluate the expression of *P53* gene on AGS gastric cancer cells after the effects of palladium nanoparticles.

Methods: The present experimental study was conducted from April to September 2011 in Varamin Islamic Azad University. In this study, AGS and normal HEK293 cancer cells were treated for 48 hours at different concentrations of palladium (5700.570, 57.5, $\mu\text{g} / \text{ml}$) nanoparticles. The effect of nanoparticles on cell survival was measured by MTT method. Extracting RNA and synthesizing of cDNA was determined. Finally, expression of *P53* gene was evaluated using Real Time PCR. The collected data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The results of cell toxicity indicated that in high concentrations of palladium nanoparticles, cell proliferation significantly lead to cell death compared to the control group ($P = 0.002$). The results of the Real Time PCR test disclosed that *P53* gene expression was not significantly increased in comparison with the reference gene during 48 hours ($P = 0.09$).

Conclusion: Palladium nanoparticles presented an ability to destroy the AGS cancer cell line compared to the normal HEK293 class, but this was not due to the increased expression of the *P53* gene. More studies are desirable to determine the type of cell death caused by the toxicity of palladium nanoparticles.

Keywords: Palladium nanoparticles, Gastric cancer, *P53* gene

Corresponding author: Baghbani-Arani F, Department of Genetics and Biotechnology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Please cite this article as follows:

Mansouri M, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Cytotoxic Effects and Evaluation of *P53* gene Expression Toward Gastric Cancer AGS Cells Treated With Palladium Nanoparticles. Armaghane-danesh 2018; 23(5): 577-590