



Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Selenium Nanoparticles Toward HT29 Colon Cancer Cells

Hasani S, Sadat Shandiz SA*, Pakpour B

- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan
and read the article
online



Citation: Hasani S, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Selenium Nanoparticles Toward HT29 Colon Cancer Cells. Journal of Cell and Tissue. 2023; 15(3): 190.

<https://10.61186/JCT.15.3.190>

KEYWORDS

Selenium nanoparticles,
Colon cancer,
Apoptosis,
Anticancer,
Toxicity.

ABSTRACT

Aims: Nanoparticles due to their wide applications in medicine, industry, and biotechnology, have attracted many scientists' attentions. Recently, nanoparticles especially selenium nanoparticles are widely used to diagnosis and cancer treatment. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and anticancer effects of selenium nanoparticles on colon cancer cell line and analysis of *CAD* (Caspase Activated DNase) gene expression.

Material and methods: In this study, colon cancer HT29 and normal HEK293 cell lines were purchased from the Pasteur Institute Cell Bank of Tehran and treated with selenium nanoparticles overnight. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Scotland) medium with 10% FBS serum and 1% streptomycin antibiotic (Gibco, Scotland). The cells were then stored at 37 °C. In this study, cytotoxic effect of Selenium NPs was evaluated on HT29 and HEK293 cells using MTT (3-(4, 5-Dimethyltetrazolium Bromide) assay. Subsequently, they were treated with selenium nanoparticles in different concentrations (0, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg/mL) for 24 hours. To solubilize the viable cells formazan crystals production, we added 100 µl/well of dimethyl sulfoxide (DMSO) to them. After treatment of HT29 cells with IC₅₀ concentration, the total RNA was extracted and cDNA synthesized. Moreover, *CAD* gene expression was evaluated using Real Time PCR method. The data was evaluated by ABI StepOne utilizing the Applied Biosystems qRT-PCR (ABI 7300 system, Applied Biosystems). The quantification of the mode of Selenium NPs -induced cell death in the HT29 cells were ascertained using flow cytometry followed by staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-Annexin V and propidium iodide (PI) staining. Finally, the study of apoptosis and necrosis of Selenium NPs was evaluated using flow cytometry method. Data analysis was statistically determined by using One-way analysis of variance (ANOVA) with SPSS/22 software followed by a Tukey test.

* Corresponding author. Tel.: 021-44600136 ,Fax: 021-44600200

E-mail address: Atashandiz@yahoo.com

DOI: <https://10.61186/JCT.15.3.190>

Received: 24 Feb. 2024, Received in revised form: 20 Aug. 2024; Accepted: 1 Sep. 2024

Original Article

©Author



Results: The result showed that the treatment of Selenium NPs at 31.25 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration had maximum cytotoxic effect, revealed statistically significant ($P < 0.001$). The IC_{50} value for Selenium NPs were measured at 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 hours. In order to determine the effect of Selenium NPs on cancerous cells, alterations in the mRNA expression levels of *CAD* gene in HT29 cells were done by qRT-PCR technique followed by the exposure to nanoparticle. The *CAD* gene expression comparing to reference gene was up-regulated 4.04 ± 0.125 fold. To determine the mechanism of cell death in the cancer cells, annexin V/PI flow cytometry was carried out. In the treatment of HT29 cells by IC_{50} of selenium NPs, 10.43%, and, 24.28% of early and late stages' apoptosis were observed, respectively

Conclusion: Our results suggest that selenium NPs can display some promising cytotoxic properties through inducing apoptosis pathway. Based on the results, up-regulated gene expression involved in apoptosis (*CAD*) and activating apoptosis, it can be concluded that the selenium NPs can be used as drug candidate in colon cancer treatment, but more studies are needed regarding the medicinal importance of nanoparticles.



اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزیسی نانوذرات سلنیوم بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29)

سیده سارا حسنی^۱، سید عطا اله سادات شاندیز^{۲*}، بهاره پاکپور^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، sarahasani7733@gmail.com

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، Atashandiz@yahoo.com

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، b-Pakpour@yahoo.com

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: امروزه نانوذرات اهمیت کاربردی بالایی را در تشخیص و درمان سرطان پیدا کرده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک و ضد سرطانی نانوذرات سلنیوم بر روی رده سلولی سرطان کولون و آنالیز بیان ژن <i>CAD</i> Caspase-activated Dnase می‌باشد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ابتدا اثرات سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطان کولون HT-29 و نرمال HEK293 توسط روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال آن، پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۵۰ درصد کشندگی، RNA سلول استخراج شده و به cDNA تبدیل شد. میزان بیان ژن <i>CAD</i> با استفاده از روش Real Time PCR مطالعه شد. در نهایت، مطالعه آپوپتوزیس و نکروزیس با کمک روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج: نتایج نشان داد که نانوذره سلنیوم در غلظت‌های ۲۵ μg/mL تا ۳۱ μg/mL تا ۵۰۰ μg/mL بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0.001$). میزان IC_{50} برای نانوذرات سلنیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت ۷۵ μg/mL محاسبه شد. بیان ژن <i>CAD</i> نسبت به ژن مرجع در رده سلولی HT29 تیمار شده با نانوذرات سلنیوم طی ۲۴ ساعت به میزان $4/04 \pm 0/125$ برابر افزایش یافت. همچنین داده‌های فلوسایتومتری بیانگر افزایش به میزان ۳۴/۷۱ درصدی مرگ آپوپتوزیسی در رده سلولی سرطانی کولون بود. نتیجه گیری: با توجه به داده‌های افزایش بیان ژنی درگیر در آپوپتوزیس (<i>CAD</i>) و فعال نمودن آپوپتوزیس می‌توان از نانوذرات سلنیوم به عنوان کاندیدای دارویی در درمان سرطان کولون استفاده نمود، که نیاز به مطالعات بیشتری در خصوص اهمیت دارویی نانوذرات دارد.</p>	<p>نانوذرات سلنیوم، سرطان کولون، آپوپتوزیس، سمیت.</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱</p>

۱- مقدمه

سرطان حاصل رشد و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها و دومین علت مرگ در جهان است (۱). سرطان کولورکتال چهارمین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان و شایع‌ترین بیماری بدخیم دستگاه گوارش است (۲). همچنین سومین نوع شایع تومور بدخیم در سراسر جهان است و بعد از سرطان ریه و پروستات، سومین سرطان شایع مردان و دومین سرطان شایع در زنان (بعد از

سرطان پستان) می‌باشد (۳). از عوامل اصلی ابتلا به این بیماری می‌توان به پیری، سابقه خانوادگی و سبک زندگی (سیگار کشیدن، مصرف زیاد الکل، رژیم غذایی ناسالم و اضافه وزن که قابل پیشگیری هستند) اشاره کرد (۴). پیشگیری و تشخیص به‌موقع سرطان‌ها جهت درمان بسیار حائز اهمیت است. روش‌های کولونوسکوپی، سیگموئیدوسکوپی، اندوسکوپی و آزمایش خون از جمله روش‌های غربالگری این بیماری هستند (۵). امروزه از روش‌های مختلفی همچون جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و ایمونوتراپی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود (۱). گفتنی است یکی از عوارض جانبی غیرقابل اجتناب اکثر داروهای شیمی درمانی این است که علاوه بر از بین بردن سلول‌های سرطانی به سلول‌های طبیعی نیز آسیب می‌رسانند (۶). بنابراین، یکی از اهداف اصلی درمان سرطان، دست‌یابی به روش‌های نوین درمان با عوارض جانبی کمتر و بدون آسیب رساندن به سلول‌های سالم است (۱). پیشرفت‌های اخیر حاکی از آن است که نانوذرات تاثیر چشم‌گیری بر تشخیص و درمان بیماری سرطان جهت حذف سلول‌های سرطانی بدون آسیب جدی به سلول‌های طبیعی دارند (۷). یکی از این نانوذرات، نانوذرات سلنیوم است که به‌عنوان یک ترکیب امیدوار کننده در پیشگیری و درمان سرطان گزارش شده است. طی مطالعات اخیر خواص ضد سرطانی آن نشان داده شده است که بیشترین اثر را در برابر سرطان‌های کولورکتال، ریه و پروستات دارد (۱۰). نانوذرات سلنیوم به‌علت اندازه و نسبت سطح به حجم پایین، دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متمایز نسبت به سایر فرم‌های سلنیوم هستند (۸). گزارش شده است که سلنیوم با محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو که به‌عنوان یکی از عوامل اصلی در شروع سرطان شناخته شده است، اثرات ضد سرطانی خود را نشان می‌دهد (۹). سلنیوم نقش ضد سرطانی خود را نه تنها به‌واسطه ی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بلکه توسط مکانیسم‌های مختلف دیگری، که در هر دو سطح مولکولی و ژنتیکی شناسایی شده‌اند، ایفا می‌کند، از جمله این مکانیسم‌ها عبارت است از: تحریک ترمیم DNA، القای توقف چرخه سلولی، آپوپتوزیس، مهار موضعی تهاجم و مهاجرت، توقف رگ زایی و تعدیل تکثیر سلولی (۱۰).

توانایی سلول‌های سرطانی در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) دلیل گسترش سرطان می‌باشد. به‌همین دلیل یکی از اهدافی که در درمان سرطان دنبال می‌شود، القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است. القای آپوپتوزیس توسط دو مسیر اصلی داخلی و خارجی آپوپتوتیک انجام می‌شود. یکی از اصلی‌ترین اندامک‌ها در مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس، میتوکندری است که به‌واسطه‌ی رهایی سیتوکروم C و فعال‌کننده‌های کاسپاز ۳ باعث القای آپوپتوزیس می‌شود. مسیر خارجی توسط گیرنده‌های مرگ آغاز می‌شود که در نهایت با فعال شدن کاسپازهای ۶، ۷، ۸ و ۳ در این فرایند شرکت می‌کند (۱۱). از نشانه‌های اصلی آپوپتوزیس قطعه‌قطعه شدن DNA است که توسط آنزیم CAD (Caspase Activated DNase) رخ می‌دهد. این آنزیم به‌صورت طبیعی غیرفعال است که کاسپاز ۳، مهارکننده ی CAD را تجزیه و در نتیجه CAD فعال رها می‌شود تا با خاصیت DNase خود، DNA را قطعه‌قطعه کند (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده که ترکیبات سلنیوم قادر به القای آپوپتوزیس در سلول سرطانی از طریق مکانیسم‌های متفاوتی بر اساس نوع سلول هستند. مکانیسم‌های عمل سلنیوم بر چرخه سلولی و آپوپتوزیس بسیار پیچیده بوده و هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند، که می‌تواند شامل پیام‌رسانی پروتئین کینازها، فعال شدن کاسپازها، فسفوریلاسیون پروتئین p53 و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) باشد (۱۳). در این مطالعه به آنالیز تیمار رده سلولی سرطان کولون (HT-29) و رده سلولی نرمال HEK293 با غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم پرداخته شد و هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات سلنیوم بر مرگ سلولی آپوپتوزیس و بررسی تغییرات بیان ژنی CAD می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

مشخصات نانوذرات سلنیوم: نانوذرات سلنیوم تجاری به صورت محلول کلونیدی از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان، با اندازه ۱۰ تا ۴۵ نانومتر، غلظت ۱۰۰۰ ppm و خلوص ۹۹/۹۵ درصد خریداری شد.

کشت رده سلولی سرطانی و نرمال: رده‌ی سلولی سرطانی کولون HT29 و رده سلولی نرمال HEK293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های مورد مطالعه در محیط DMEM(H.G) (حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی خریداری شده از شرکت Gibco ساخت کشور برزیل و در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی پنج درصد گاز CO₂ و رطوبت ۹۰ درصد، کشت داده شدند.

بررسی میزان سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم با استفاده از تست MTT: به منظور بررسی سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم، تست رنگ سنجی MTT انجام گرفت (۱۴). برای انجام این تست، در روز اول شمارش سلولی انجام گرفت و سوسپانسیون سلولی طوری رقیق شد که در هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ده درصد FBS که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول قرار گرفت. سپس با توجه به زمان دوبرابر شدن سلول‌ها پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵، ۱۵٫۶۲، ۷٫۸۱، ۳٫۹۰ میکروگرم/میلی لیتر از نانوذرات سلنیوم تهیه شد و در ۴۹۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر DMSO به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسیده و حل شد. سپس محیط کشت تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته شده اضافه شد. همچنین یک گروه کنترل اختصاصی برای غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر و یک گروه کنترل دیگر برای مابقی غلظت‌ها به صورت ۸ بار تکرار در نظر گرفته شد (گروه کنترل فاقد تیمار با نانوذرات می‌باشد). سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت (روز سوم) به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۰/۰۵ میلی گرم/۱۰۰ میکرولیتر (۵ میلی گرم رنگ MTT در ۱۰ میلی لیتر PBS حل شد) در شرایط تاریکی اضافه شد. در هر گروه غلظتی دو ردیف آخر گروه بلانک در نظر گرفته شد (گروه بلانک فاقد رنگ MTT و فقط حاوی PBS است). پس از مدت سه ساعت تیمار در انکوباتور، جهت حل نمودن کریستال‌های فورمازان تولید شده به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا فورمازان به خوبی حل شود. در مرحله‌ی بعد جذب توسط دستگاه قرائت گر Elisa Reader در طول موج های ۶۳۰ و ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

$$100 \times \text{میانگین جذب گروه کنترل} / \text{میانگین جذب هر گروه تیمار} = \text{درصد زنده مانی}$$

بررسی بیان ژن CAD توسط روش Real Time PCR: به منظور اندازه گیری بیان ژن CAD ، استخراج RNA از رده سلولی HT29 تیمار شده با غلظت IC₅₀ نانوذرات سلنیوم انجام شد و سنتز cDNA صورت گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت بایوفکت (BioFACT, Korea) انجام شد که در آن مخلوط واکنش حاوی ۹ μl RNA استخراج شده به همراه ۱۰ μl Master mix و ۱ μl پرایمر اولیگو dT بود. برنامه دمایی-زمانی به صورت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. جهت انجام Real time PCR از دستگاه AB Applied Biosystem ساخت کشور آمریکا و کیت شرکت ترنس ساخت کشور کره استفاده شد، که در آن مخلوط واکنش حاوی ۱۰ μl Master Mix و ۲ μl پرایمر به همراه ۱ μl cDNA و ۷ μl آب به مخلوط حاصل اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ μl برسد. برنامه دمایی-زمانی به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه ، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سپس در دمای ۶۰

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. در این واکنش ژن *CAD* به عنوان ژن هدف و ژن-3-Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده در این واکنش در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

Gene	Primer	PCR Product
<i>CAD</i>	F 5'-TGGCAGAGATCGGAGAGCAT-3'	232bp
	R 5'-TCCTTCCATCCCTTCAGAGACTT-3'	
<i>GAPDH</i>	F 5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	75bp
	R 5'-CATAACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'	

بررسی آپوپتوزیسی و نکروزیس نانوذرات سلنیوم با کمک روش فلوسایتومتری: به منظور ارزیابی میزان آپوپتوزیسی و نکروزیس از خاصیت رنگی ایزوتیوسیانات-انکسین ۵ و پروپیوم آیداید با استفاده از دستور کار کیت Apoptosis Annexin V/Propidium iodide (PI) detection kit, Roch, Germany انجام گرفت. سلول‌های سرطانی کولون با غلظت IC₅₀ نانوذرات سلنیوم تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل مطالعه شدند. درصد آپوپتوزیسی/نکروزیس سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳- آنالیز آماری

محاسبه P value این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز نتایج Real Time PCR هم با استفاده از فرمول $CT_{\Delta\Delta}$ انجام پذیرفت.

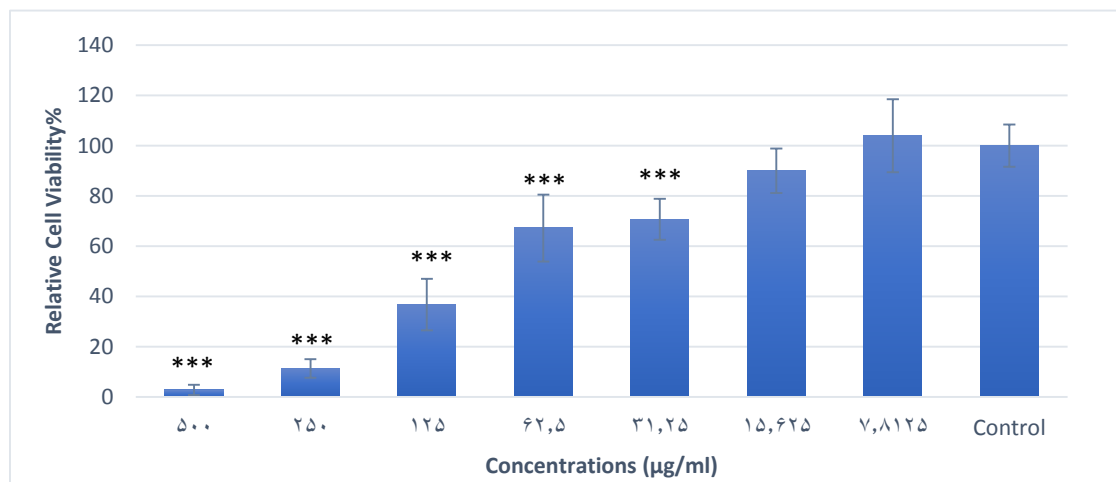
۴- نتایج

نتایج آزمایش سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم در برابر رده های سلولی با روش *MTT assay*

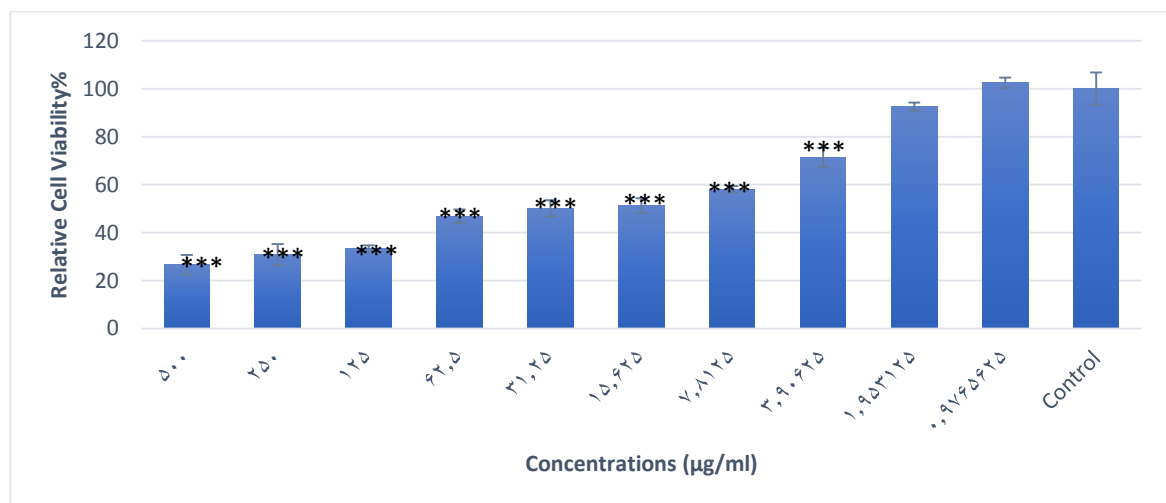
اثرات سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم در شرایط *in vitro* بر روی رده سلولی سرطانی HT-29 در غلظت‌های مختلف به صورت ۸ بار تکرار برای هر غلظت توسط تست *MTT* طی مدت ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بیش‌ترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است.

($p < 0.001$) (شکل ۱). میزان IC_{50} برای نانوذرات سلنیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت ۷۵ میکروگرم/میلی لیتر محاسبه شد. تیمار رده سلولی HT29 با نانوذرات سلنیوم نشان داد که این نانوذرات اثر سمیت وابسته به دوز دارد.

اثرات سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم در شرایط *in vitro* بر روی رده سلولی نرمال HEK293 در غلظت‌های مختلف طی مدت ۲۴ ساعت بررسی شد (شکل ۲). نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات سلنیوم در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0.001$). میزان IC_{50} برای نانوذرات سلنیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت $36/3 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.



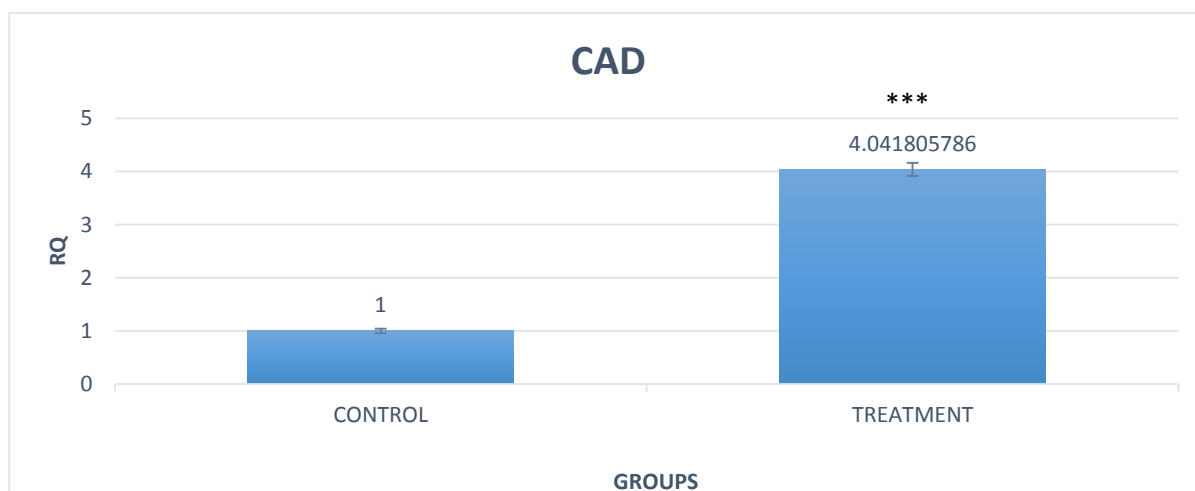
شکل ۱: درصد بقای سلول‌های HT29 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره سلنیوم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است. ستاره‌ها (*) تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان می‌دهند ($p < 0.05$), (** $p < 0.01$), (***) $p < 0.001$).



شکل ۲: درصد بقای سلول‌های HEK293 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است. ستاره‌ها (*) تفاوت معناداری با گروه کنترل نشان می‌دهند ($p < 0.05$), (** $p < 0.01$), (***) $p < 0.001$).

نتایج ارزیابی نانوذره سلنیوم بر بیان ژن CAD در سلول های HT29

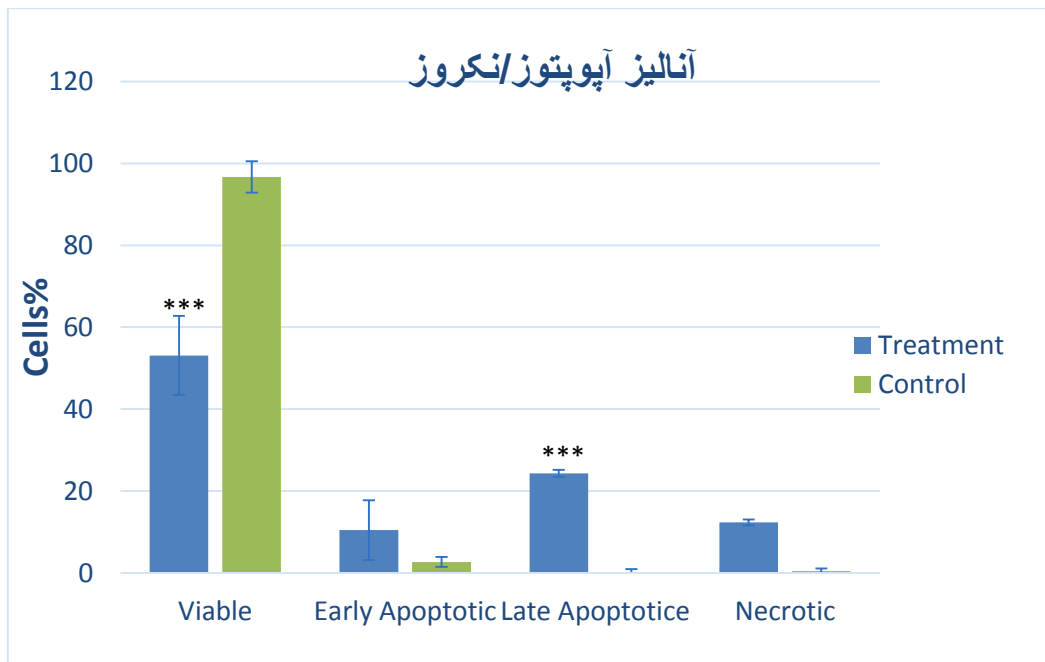
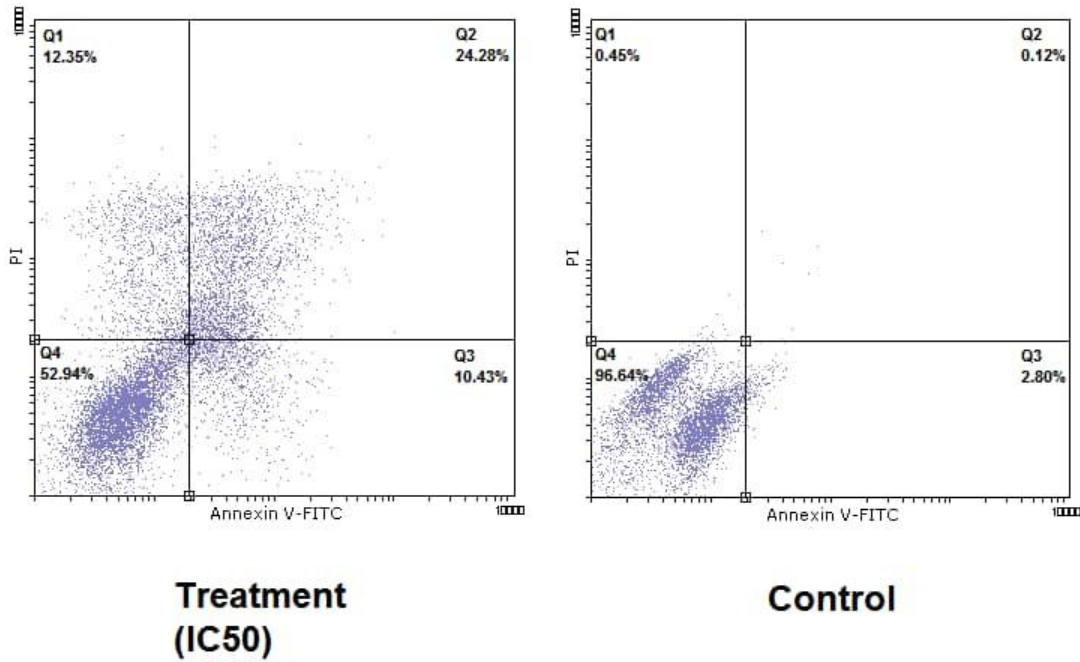
این تست به منظور اندازه گیری تغییر بیان ژن CAD در رده سلولی HT29 تیمار شده با غلظت IC₅₀ نانوذرات سلنیوم انجام شد. مطابق شکل ۳، Relative quantification (RQ) در گروه دریافت کننده دوز IC₅₀ نانوذره سلنیوم نسبت به گروه کنترل ژن GAPDH به میزان $4/04 \pm 0/125$ برابر افزایش معناداری داشته است ($p < 0/001$).



شکل ۳: اثر نانوذرات سلنیوم بر بیان ژن CAD در سلول HT29 در مقایسه با ژن کنترل GAPDH. *بیانگر افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل ($p < 0/001$).

نتایج بررسی آپوپتوزیس و نکروزیس

بررسی میزان درصد آپوپتوزیس و نکروزیس القا شده در سلول های سرطان کولون تیمار شده با نانوذرات سلنیوم با کمک دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شد. داده های حاصل از بررسی فلوسایتومتری نشان داد که نانوذرات سلنیوم بر روی آپوپتوزیس و نکروزیس موثر می باشد. مطابق شکل ۴ مربع سمت چپ پایین Q₄ سلول های زنده، مربع سمت چپ بالا Q₁ نکروز، مربع سمت راست پایین Q₃ آپوپتوزیس اولیه، مربع سمت راست بالا Q₂ نشان دهنده آپوپتوزیس تاخیری می باشند. درصد سلول ها در مناطق Q₁، Q₂، Q₃ و Q₄ به ترتیب برابر ۰/۴۵، ۰/۱۲، ۹۶/۶۴، ۲/۸۰ درصد و بود که بعد تیمار با نانوذرات به ترتیب ۱۲/۳۵، ۲۴/۲۸، ۵۲/۹۴ و ۱۰/۴۳ درصد تغییر یافتند.



شکل ۴: نتایج آنالیز فلوسایتومتری تأثیر نانوذرات سلنیوم بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29). نمونه کنترل تیمار نشده (سمت راست)، نمونه تحت تیمار با نانوذرات (سمت چپ). ستاره‌ها (*) تفاوت معناداری با گروه کنترل نشان می‌دهند ($p < 0.05$ ، $**p < 0.01$ ، $***p < 0.001$).

۵- بحث

مسئله اصلی در درمان سرطان، مصرف غلظتی از ماده درمانی است که در حین از بین بردن سلول‌های سرطانی به سلول‌های طبیعی آسیب نرساند. پیشرفت‌های اخیر حاکی از آن است که درمان‌های سرطانی توسط مهندسی نانو به‌عنوان یک درمان قانع‌کننده برای حذف سلول‌های سرطانی بدون آسیب جدی به سلول‌های طبیعی شناخته شده است (۷). اگرچه تحقیقات در حوزه نانوذرات و فناوری نانو در سال‌های اخیر گسترش زیادی داشته است اما اطلاعات محدودی در مورد سمیت احتمالی نانوذرات و تاثیرات آن‌ها بر بدن انسان وجود دارد (۱۵). نانوذرات سلینیوم یک نانوذره شبه فلزی است که به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانتی، ضد میکروبی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۱۶). سلینیوم یکی از املاح معدنی ضروری و کمیاب برای بدن می‌باشد و جزء مهم گلوکاتایون پراکسیداز شناخته شده است. مطالعه اخیر نشان می‌دهد سلینیوم به‌عنوان یک عنصر کمیاب قادر است در تعدیل ناهنجاری‌های سطح و سیالیت غشا زیستی در مراحل ابتدایی ایجاد سرطان بزرگ مفید واقع می‌شود. یکی از مکانیسم‌های درمانی، القای آپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌باشد. آپوپتوزیس به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مقابله با سلول‌های سرطانی به‌شمار می‌رود که در مقابل ویژگی اصلی سرطان، یعنی تکثیر غیرقابل کنترل قرار دارد. سلول‌های سرطانی به‌منظور رشد و پیشرفت خود، از مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزیسی و کاهش پروتئین‌های پیش آپوپتوزیسی، آپوپتوزیس را مهار می‌کنند. به‌همین جهت آپوپتوزیس در مطالعات ضد سرطان مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (۱۷).

در این مطالعه به آنالیز تیمار رده سلولی سرطان کولون (HT-29) با غلظت‌های مختلف نانوذرات سلینیوم پرداخته شد و هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات سلینیوم بر مرگ سلولی و بقای این سلول‌ها از طریق بررسی تغییرات بیان ژن *CAD* می‌باشد. تاکنون مطالعات مختلفی اثرات ضدسرطانی نانوذرات سلینیوم را در برابر رده‌های سلولی متفاوت نشان داده است. در مطالعه ای که *Liao, G* و همکاران (۱۸) با کمک روش‌های *qRT-PCR, MTT* و فلوسایتومتری، اثرات ضدسرطانی نانوذرات سلینیوم سنتز شده با میانگین اندازه‌ی ۸۸،۸۹ نانومتر علیه هشت رده سلولی سرطانی از جمله *Colon, LNCaP, WM-115, A498, MCF7, A549, HeLa, HepG2, 26* نشان داده شد که نانوذرات سلینیوم بیشترین اثر ضدسرطانی را در برابر سلول‌های سرطانی پروستات داشت. در مطالعه حاضر اثر ضدسرطانی نانوذرات سلینیوم فقط بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT-29) بررسی شد. همچنین در مغایرت با مطالعه حاضر در این مطالعه نشان دادند که اثر سمیت نانوذرات سلینیوم بر روی سلول‌های نرمال پروستات نسبت به رده سرطانی آن، بسیار کمتر است که این تفاوت در نتیجه ی مطالعه بر روی رده سلولی سرطانی متفاوت به‌وجود آمده است. در مقاله منتشر شده از آقاعلی‌نژاد و همکاران (۱۹) بیان شد که مصرف نانوذرات سلینیوم به‌همراه تمرین تناوبی می‌تواند تاثیر سینرژیک در مقابله با رشد تومور پستان موش‌های ماده داشته باشد و نتیجه گرفتند که این تاثیرات احتمالا تا حدودی ناشی از تغییرات در بیان ژن‌های *Bcl-2* و *LC3* در بافت تومور باشد. با مطالعه آقاعلی‌نژاد، در مطالعه حاضر نانوذرات سلینیوم تجاری از طریق القای آپوپتوزیس و افزایش بیان ژن *CAD* با رده سلولی سرطانی کولون ارزیابی شد. *Ramamurthy CH* و همکاران (۲۰) نیز با سنتز نانوذرات سلینیوم و بررسی اثر سمیت آن با استفاده از روش *MTT* بر روی رده سلولی سرطانی پستان دریافتند که نانوذرات سلینیوم قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان رده *MCF-7* به‌صورت وابسته به دوز است.

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات سلینیوم بر روی سلول‌ها، بستگی به غلظت (وابسته به دوز) آن دارد. در مطالعه‌ی دیگری توسط *Chen YC* و همکاران (۲۱) نشان داده شد که مصرف مکمل سلینیوم به‌عنوان یک عامل ضد متاستاز می‌تواند به‌دلیل مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی، تهاجم و رگ‌زایی، متاستاز سرطان پستان را به تاخیر اندازد. در مطالعه‌ی توسط *Geoffrion LD* و همکاران (۲۲) نشان داده شد که می‌توان از نانوذرات سلینیوم به‌دلیل خواص ضدباکتریایی و

ضدسرطانی در غلظت‌های بسیار کم بهره برد که هم‌سو با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Wadhvani SA و همکاران، (۲۳) خاصیت ضدسرطانی نانوذرات سلنیوم در سرطان پستان پیشنهاد شد که در مطالعه حاضر خاصیت ضدسرطانی نانوذرات سلنیوم در سرطان کولون پیشنهاد و بررسی شد. Othman MS و همکاران (۲۴) با سنتز نانوذرات سلنیوم به این نتایج دست یافتند که نانوذرات سلنیوم از طریق تاثیر بر میزان بیان *BCL2* و کاسپاز ۳، آپوپتوزیس را در سلول‌های توموری فعال می‌کند و در مطالعه حاضر میزان بیان ژن *CAD* بررسی شد. Spyridopoulou K و همکاران (۸) در مطالعه‌ای از طریق نتایج فلوسایتومتری استنباط کردند که نانوذرات سلنیوم تولید شده از باکتری *Lactocaseibacillus L. casei* می‌تواند از طریق القای تولید ROS، باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کولون شوند (۸). Huang G و همکاران (۶) با استفاده از روش فلوسایتومتری بعد از ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت و با دوزهای متفاوت نشان داده اند که کمپلکس پلی ساکارید-پروتئین پوشش داده شده با نانوذرات سلنیوم (PTR-SeNPs) می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز اتوفازی را در رده سلول سرطانی کولون (HCT116) تحریک کنند که در نهایت منجر به آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌شود، در نتیجه نقش ضد سرطان بازی می‌کنند (۶).

هم‌سو با مطالعات پیشین در مطالعه حاضر القای آپوپتوزیس توسط نانوذرات سلنیوم نشان داده شد، به‌طوری‌که بیان ژن *CAD* در سطح mRNA مورد بررسی قرار گرفت و نسبت به ژن مرجع در رده سلولی HT29 به میزان $4,04 \pm 0,125$ برابر افزایش یافت و همچنین افزایش ۳۴/۷۱ درصدی مرگ آپوپتوزیسی در رده سلولی سرطانی کولون از طریق نتایج فلوسایتومتری نشان داده شد. در مطالعاتی که تاکنون انجام شده به خاصیت ضدسرطانی نانوذرات سلنیوم به‌صورت وابسته به دوز اتفاق نظر داشتند. نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر، بیشترین اثر کشندگی را در برابر سلول‌های سرطانی دارد که وابسته به دوز بودن سمیت نانوذرات سلنیوم را تایید می‌کند. تاکنون مطالعه مشابهی بر روی سمیت نانوذرات سلنیوم و تاثیر آن بر بیان ژن *CAD* و بررسی میزان آپوپتوزیس القا شده در رده سلولی HT-29 انجام نشده است. نانوذرات با توجه به پارامترهای سایز، شکل، بار و میزان سختی می‌توانند توسط مکانیسم‌های مختلفی از جمله فاگوسیتوز، اندوسیتوز و مکانیسم‌های جایگزین که هنوز به‌طور کامل مشخص نشده‌اند، وارد سلول شوند (۲۵). با این حال، مطالعات حیوانی جهت سنجش ایمنی و تاثیر ترکیبات سلنیوم در افزایش اثربخشی و کاهش سمیت درمان‌های ضد سرطانی رایج مورد نیاز است.

۶- نتیجه گیری

در این مطالعه، اثرات نانوذرات سلنیوم بر روی تکثیر رده های سلولی سرطانی کولون HT29 و سلول نرمال HEK293 با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات سلنیوم بر روی سلول‌ها، بستگی به غلظت آن دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از qRT PCR و افزایش فعالیت ژن در گیر در آپوپتوزیس (*CAD*) و همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری در سلول‌های سرطانی استنباط می‌شود که سمیت به میزان بیشتری از طریق القای آپوپتوزیس به‌جای نکرور رخ داده است. براساس نتایج این پژوهش و مطالعات پیشین نتیجه گرفت که نانوذرات سلنیوم اثرات ضد سرطانی قابل قبولی بر رده سلولی سرطان کولون دارد، بنابراین این نانوذرات می‌تواند در آینده نقش به‌سزایی در درمان این نوع سرطان بازی کنند.

۷- تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه نویسنده اول است. بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته اند، قدردانی می‌شود.

۸- منابع

1. Kim C, Kim B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. *Nutrients*. 2018 Aug 4;10(8):1021.
2. Keshtvarz AK, Peeri M. The Effect of Aerobic Exercise and Aqueous Extract of *Portulaca Oleracea* on Gene Expression of Factors Involved in Apoptosis in Rats With Colon Cancer. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences*. 2022 May 10;9(1):905-14. (In Persian)
3. Abrudan R, Abrudan L, Pop O, Zaha DC. A Rare Case of an Occult Primary Tumor With a Profile of Colon Cancer and Synchronous Metastasis in the Lung, Liver, Bone, and Cerebellum: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2023 Oct 27;15(10).
4. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020 May;70(3):145-64.
5. Kanth P, Inadomi JM. Screening and prevention of colorectal cancer. *Bmj*. 2021 Sep 15;374.
6. Huang G, Liu Z, He L, Luk KH, Cheung ST, Wong KH, Chen T. Autophagy is an important action mode for functionalized selenium nanoparticles to exhibit anti-colorectal cancer activity. *Biomaterials science*. 2018;6(9):2508-17.
7. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug discovery today*. 2010 Oct 1;15(19-20):842-50.
8. Spyridopoulou K, Tryfonopoulou E, Aindelis G, Ypsilantis P, Sarafidis C, Kalogirou O, Chlichlia K. Biogenic selenium nanoparticles produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Nanoscale Advances*. 2021;3(9):2516-28.
9. Tan HW, Mo HY, Lau AT, Xu YM. Selenium species: current status and potentials in cancer prevention and therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018 Dec 25;20(1):75.
10. Kuršvietienė L, Mongirdienė A, Bernatoniene J, Šulinskiene J, Stanevičienė I. Selenium anticancer properties and impact on cellular redox status. *Antioxidants*. 2020 Jan 17;9(1):80.
11. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018 Feb 2;19(2):448.
12. Takikita S, Takano T, Narita T, Takikita M, Ohno M, Shimada M. Neuronal apoptosis mediated by IL-1 β expression in viral encephalitis caused by a neuroadapted strain of the mumps virus (Kilham Strain) in hamsters. *Experimental neurology*. 2001 Nov 1;172(1):47-59.
13. Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2012 Aug 2;13(8):9649-72.
14. Abdallah LA, Omar G, Khdeer SA, Heeh H, Khateeb D, Salameh N. Screening of anticancer potential of leaf aqueous extract from *Pulicaria incisa* growing wild in Palestine. *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)[Formerly Natural Product Radiance (NPR)]*. 2023 Oct 25;14(3):402-8.
15. Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *International journal of nanomedicine*. 2009 Apr 1:1-7.

16. Shakibaie M, Jafari M, Ameri A, Rahimi HR, Forootanfar H. Biosynthesis and physicochemical characterization, and cytotoxic evaluation of selenium nanoparticles produced by streptomyces lavendulae FSHJ9 against MCF-7 cell line. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2018 Nov 10;17(7):625-38. (In Persian)
17. Kheiltash F, Parivar K, Roodbari NH, Sadeghi B, Badieli A. Effects of 8-hydroxyquinoline-coated graphene oxide on cell death and apoptosis in MCF-7 and MCF-10 breast cell lines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020 Jul;23(7):871.
18. Liao G, Tang J, Wang D, Zuo H, Zhang Q, Liu Y, Xiong H. Selenium nanoparticles (SeNPs) have potent antitumor activity against prostate cancer cells through the upregulation of miR-16. *World Journal of Surgical Oncology*. 2020 Dec;18:1-1.
19. Agha-Alinejad H, Hashemi Jokar E. Effect of Six Weeks of Interval Exercise Training along with Selenium Nanoparticle Ingestion on Bcl-2 and LC3 Genes expression in the Tumor Tissue of Breast Tumor-Bearing Mice. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2019 Aug 10;12(2):26-37. (In Persian)
20. Ramamurthy CH, Sampath KS, Arunkumar P, Kumar MS, Sujatha V, Premkumar K, Thirunavukkarasu C. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2013 Aug;36:1131-9.
21. Chen YC, Prabhu KS, Das A, Mastro AM. Dietary selenium supplementation modifies breast tumor growth and metastasis. *International journal of cancer*. 2013 Nov;133(9):2054-64.
22. Geoffrion LD, Hesabizadeh T, Medina-Cruz D, Kusper M, Taylor P, Vernet-Crua A, Chen J, Ajo A, Webster TJ, Guisbiers G. Naked selenium nanoparticles for antibacterial and anticancer treatments. *ACS omega*. 2020 Feb 5;5(6):2660-9.
23. Wadhvani SA, Gorain M, Banerjee P, Shedbalkar UU, Singh R, Kundu GC, Chopade BA. Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30: Optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells. *International journal of nanomedicine*. 2017 Sep 13:6841-55.
24. Othman MS, Obeidat ST, Al-Bagawi AH, Fareid MA, Fehaid A, Moneim AE. Green-synthesized selenium nanoparticles using berberine as a promising anticancer agent. *Journal of Integrative Medicine*. 2022 Jan 1;20(1):65-72.
25. Francia V, Montizaan D, Salvati A. Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2020 Feb 14;11(1):338-53.