إستهداف خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري بجسيمات أوكسيد الزنك النانوية

Targeting Mice Mammary Adenocarcenoma Cells with Zinc Oxide Nanoparticles

عامرطالب توفيق حسام الدين محمد كاظم ناهي يوسف ياسين سبأ كامل خالد
طيبة حكمت جعفر أسيل فايق غيدان رشا عبد الأميرحسين
المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية

Amer Talib Tawfeeq Husam Al-Deen Mohammed Kadhim Nahi Yusif Yseen
Saba K. Kalil Teaba H. Jafar Aseel F. Ghedan Rasha A. Hussein
Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research / University of Al-Mustansiriyah

الملخص

درست تأثيرات السمية الخلوية لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية على خلايا سرطان الغدة البنية الفأري في الزجاج. صنعت جسيمات أوكسيد الزنك النانوية بطريقة الإزالة بالليزر النبضي في وسط الماء اللاأيوني بأستخدم ليزر Nd:YAG على طول موجي 1064نانومتر وكانت طاقة الليزرالمستخدمة 600 ملي جول وباقة نبضة 10 نانوثانية. وضعت قطعة من معدن الزنك النقي (99,99%) في 10 مليلتر من الماء اللاأيوني داخل وعاء زجاجي سعة 50 مليلتر وشععت بالليزر بمقدار 1000 نبضة. ثبتت الخواص النانوية لمعلق أوكسيد الزنك المصنع من خلال تحديد أقصى إمتصاصية للطيف في الطول الموجي الممتد من الأشعة فوق البنفسجية إلى الضوء المرئي وتحديد شكل وحجم الجسيمات المصنعة بمجهر القوى الذرية وتحديد هوية المادة بواسطة قياس حيود لأشعة السينية. عوملت خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري بتراكيز مختلفة من معلق أوكسيد الزنك النانوي المصنع لدراسة السمية الخلوية لهذا المعلق على هذه الخلايا وكانت التراكيز المستخدمة بمقدار 25 و50 و 100 جزء بالمليون. أظهرت النتائج أن لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية قدرة عالية على قتل الخلايا السرطانية, وإرتفعت نسب السمية الخلوية بإرتفاع تركيز جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المستخدمة في الدراسة. تشير هذه النتائج إلى ضرورة إستقصاء كافة الأبعاد العلاجية لهذ المادة وتحديد الميكانيكية الجزيئية التي تعمل من خلالها على قتل الخلايا السرطانية ليتسنى إستثمار جسيمات الزنك النانوية كعلاج ضد السرطان.

الكلمات المفتاحية: أوكسيد الزنك النانوي، سرطان الغدة اللبنية، الموت المبرمج ، التقنيات الأحيائية النانوية

Abstract

The cytotoxic effect of zinc oxide nanoparticles against mice mammary adenocarcenoma cells was carried out *in vitro*. The used nanoparticles were synthesized by pulsed laser ablation in liquid methods; the used liquid was deionized water. Colloidal suspension of zinc oxide nanoparticles was synthesized by Q-switched Nd: YAG pulse laser device (1064 nm) laser energy was 600 mJ and pulse duration was 10 nanosecond. High purity metallic zinc plate was submerged in 10 ml deionized water in 50 ml glass baker and ablated with 1000 pulse at room temperature. The nanospecificities of the synthesized nanoparticle colloidal were characterized with UV-Vis scanning spectrophotometer. Atomic force microscope was used to determine the particle size distribution and particles shape. The ZnO crestless formation was characterized by X-ray diffraction.

Mice mammary adenocarcenoma cells was treated with 25, 50, 100 ppm of ZnO nanoparticles. Results indicated a significant toxicity of the ZnO nanoparticles toward cancer cells, this toxicity correlated directly with ZnO nanoparticles elevated concentrations. These result need to be further investigated and the molecular mechanism of ZnO nanoparticles effect should be more clarify.

Key words: nanotechnology, zinc oxide nanoparticles, anticancer, nanobiotechnology, nanomedicine

المقدمة

تعد تقنية النانو nanotechnology من التقنيات الحديثة التي دخلت تطبيقاتها في شتى المجالات الصناعية والزراعية والطبية كتوليد الطاقة الكهربائية وتحسين أداء المنظفات والمواد المطهرة. ومن بين المواد النانوية التي جذبت إنتباه الباحثين هي الجسيمات النانوية المصنعة من المعادن المختلفة nonorganic nanoparticles وقد بدأت العديد من الدراسات لاستقصاء قابليتها العلاجية كمثبطات لنمو البكتريا والفطريات المرضية وغير المرضية [1] .

كما جرت العديد من الدراسات لمعرفة قدرتها على قتل وتثبيط نمو الخلايا السرطانية بغية إستخدامها كعلاج للسرطان . كما تعد الجسيمات النانوية غير العضوية المصنعة من أكاسيد المعادن معينا متميزا لمختلف التطبيقات في المجال الطبي كتصويرالخلايا cell imaging والمتحسسات النانوية وإيصال العلاجات drug delivery وإيصال الجينات genes delivery وفي علاج السرطان وقد أصبح ذلك ممكنا نتيجة لامكانية ربط الجسيمات النانوية بشكل تأصري مع مختلف الجزيئات البايولوجية الكبيرة والصغيرة كالأجسام المضادة والببتيدات المختلفة وحامض الفوليك والبلازميدات [2].

لقد توضحت الألية التي تعمل بها الجسيمات النانوية اللاعضوية التي تقوم من خلالها بممارسة الفعل السام على الخلايا السرطانية وتتلخص في ميكانيكيتين أساسيتين هما إطلاق الأيونات المعدنية السامة إلى داخل الخلية وبشكل متدرج وكذلك حث تكون الجذور الحرة السامة في سايتوبلازم الخلية. تدخل جسيمات أوكسيد الزنك النانوية بقوة في هذا المجال إذ إنها تعود إلى مجموعة من أكاسيد المعادن التي تتميز بقابليتها على التحفيز ضوئيي photocatalytic والاكسدة الضوئية photo-oxidizing العالية بالمقارنة مع العديد من المركبات الكيميائية

والبايولوجية. فقد تم في بحث سابق تحديد قدرتها الكبيرة على تثبيط نمو بكتريا *E.coli* على الوسط الصلب, كما تم إستخدامها في تثبيط نمو الخلايا السرطانية عندما إستخدمت جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بالطريقة الكيميائية والمنتجة على هيئة قضبان rods كنواقل موصلة للصبغة المنفعلة ضوئيا إلى داخل خلايا سرطان كبد الإنسان SMMC-7721 [3] .

لقد ظهر أن لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية قدرة فائقة على قتل الخلايا السرطانية من الانوع HepG2 و A549 و BEAS-2B من خلال حث الموت المبرمج فيها, فقد إرتفع مستوى التعبير الجيني لكل من جيني P53 و Bax مع تثبيط لتعبير جين bcl-2 المقاوم لعملية حث الموت المبرمج في تلك الخلايا. كما وجد أن لتلك الجسيمات النانوية قدرة على حث إنزيم Caspase-3 وحث تحطم DNA النووي DNA fragmentation بعد معاملتها في حين أن معاملة الخلايا الطبيعية epatocytes و astrocytes المشتقة من الجرذ لم تعاني سمية عالية ولاهلاك مماثل عند معاملتها بنفس التراكيز من جسيمات أوكسيد الزنك النانوية تلك [4].

في الأبحاث على الخلايا السرطانية تعد عملية حث الموت المبرمج بطريقة مسيطر عليها لب الهدف المتوخى من العملية العلاجية وقد جرى ذلك بإستخدام إستيراتيجيات عديدة منها ما قام به Zhang وجماعته [5] عندما قاموا بتغليف جسيمات أوكسيد اللانثلايد lanthanide oxide بسلاسل ببتيدية صناعية قصيرة السلسلة مما أدى إلى تغير سميته بشكل مسيطر عليه وبالتالي حث عملية الموت المبرمج بطريقة مسيطر عليها ومحدودة بحيث لم يكن لتلك الجسيمات أي سمية على الخلايا الطبيعية عندما تم إستخدام تلك الجسيمات في الجسم الحي *in vivo*.

المواد وطرائق العمل

1- تحضير جسيمات اوكسيد الزنك النانوية

جرت عملية التحضير بإستخدام طريقة الإزالة بالليزر النبضي في وسط الماء اللاأيوني, كما ذكر ذلك في Tawfeeq وجماعته مع بعض التحويرات البسيطة [6]. وكمايأتي, أستخدم الليزر النبضي نوع Nd:YAG ذو طول موجي 1064 نانومتر (type HUAFEI) وكانت طاقة الليزرالمستخدمة 600 ملي جول وباقة نبضة 10 نانوثانية وقطر إشعاع الليزر 1 مليمتر. غمرت قطعة من معدن الزنك النقي (99,99%) في 10 مليلتر من الماء اللاأيوني داخل وعاء زجاجي سعة 50 مليلتر وشعت بالليزر لغاية 1000 نبضة. أثناء عملية التشعيع بدأ المحلول المائي بالتحول من اللون الشفاف إلى اللون الأبيض الحليبي دليل على تكون جسيمات أوكسيد الزنك النانوية. بعد الإنتهاء من عملية التشعيع تم قياس الطول الموجي الذي يشكل أعلى إمتصاص للمحلول المحضر بإستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئي الماسح (UV-visible double beam spectrophotometer CECIL, C. 72, UK.). جرى تحديد تراكيز محاليل المحضرة بإستخدام جهاز طيف الإمتصاص الذري (Atomic absorption spectroscopy AAS model GBS 933, Australia) كما ذكر في NIOSH Manual of Analytical Methods [7] .

2- تحديد حجم وشكل جسيمات أوكسيد الزنك النانوية

إستخدم مجهر القوى الذرية Atomic Force Microscope من أجل تحديد شكل وحجم جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المحضرة وكما يلي, بعد غسلها بالماء المقطر والكحول المطلق النقي لمرتين على التوالي تم تجفيف شريحة الزجاج المعدة لهذا الغرض والتي كانت بطول 1 سم وعرض 1 سم في فرن هوائي بدرجة 70م. تم وضع الشريحة النظيفة على سطح مستوي وتم تقطير 10 مايكرو ليتر من محلول أوكسيد الزنك النانوي المحضر في الخطوة السابقة فوقها بشكل مباشر ثم أعيدت إلى الفرن الهوائي لتجفف على نفس درجة الحرارة لمدة نصف ساعة. بعد إنتهاء عملية التجفيف تم وضع الشريحة المعدة في المكان المخصص لها في مجهر القوى الذرية وتم فحصها. جرت كل الخطوات أعلاه في مركز بحوث النانوتكنولوجي والمواد المتقدمة في الجامعة التكنولوجية.

3- تحديد هوية المادة بحيود الأشعة السينية

إستخدمت تقنية حيود الأشعة السينية للتعرف على تكون بلورات أوكسيد الزنك النانوية في المحلول المحضر بطريقة القلع بالليزر, جرى ذلك كما في الوصف التالي, حضرت طبقة رقيقة من أكسيد الزنك على سطح شريحة زجاجية من النوع المستخدم في الفحوصات المجهرية إذ تم تقطير قطرات من المحلول المحضر فوق سطح تلك الشريحة وتركت لتجف في فرن هوائي بدرجة 60م, تم إعادة عملية التقطير لعدد من المرات كافية لتكوين طبقة من المادة مناسبة من حيث السمك لإجراء عملية الفحص. إستخدم جهاز حيود الأشعة السينية (Japan, X-ray diffractometer Shimadzu LabX3000) للفحص ووضعت الشريحة الزجاجية في المكان المخصص لوضع العينة ثم إطلقت أشعة أكس على العينة من مصدر Cu-Kα وبطول موجي لأشعة أكس مساوي λ= 1.54 A° .

4- إختبار السمية الخلوية لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية

إستخدم خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري AMN3 في تحديد قدرة جسيمات أوكسيد الزنك النانوية على قتل وتثبيط الخلايا السرطانية, تم الحصول على هذا الخط من قسم العلاج التجريبي في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية. جرت العملية بإستخدام الطريقة القياسية لفحص السمية وكما ذكر Freshney وجماعته [8].

إذ وزعت الخلايا في طبق 96 حفرة وتركت تنمو في وسط RPMI 1064 إلى أن وصلت إلى الحد الذي تم فيه تغطية كل الحفرة بخلايا من طبقة واحدة monolayer. إستخدمت ثلاث تراكيز مختلفة من محلول جسيمات أوكسيد الزنك النانوية بمقدار 25 و 50 و100 جزء بالمليون, تم مزج المادة المحضرة مع وسط الزرعي RPMI1064 بحيث يتم الحصول على التراكيز المذكورة بالمحلول النهائي المستخدم في التعريض. بعد إنتهاء فترة التعريض والتي ستمرت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م قيست حيوية الخلايا بإستخدام عدة فحص خاصة Cell Viability QMTTAssay kit (USBiological, USA) تعتمد في أساس عملها على تحول صبغة MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [9] إلى صبغة formazan نتيجة الفعاليات الأيضية الجارية في مايتوكندريا الخلايا الحية وحسبما هو محدد من قبل الشركة المصنعة.

5- التلوين بالصبغات والمتفلورة

إستخدمت صبغتي الاكردين البرتقالي و أيوديد البروبيديوم Acridine orange/Propidium iodide في تحديد الأنماط المظهرية لأنوية الخلايا المعاملة بجسيمات أوكسيد الزنك النانوية وكما وصف Petit وجماعته [10]. وأستخدم المجهر المتفلور Micros,

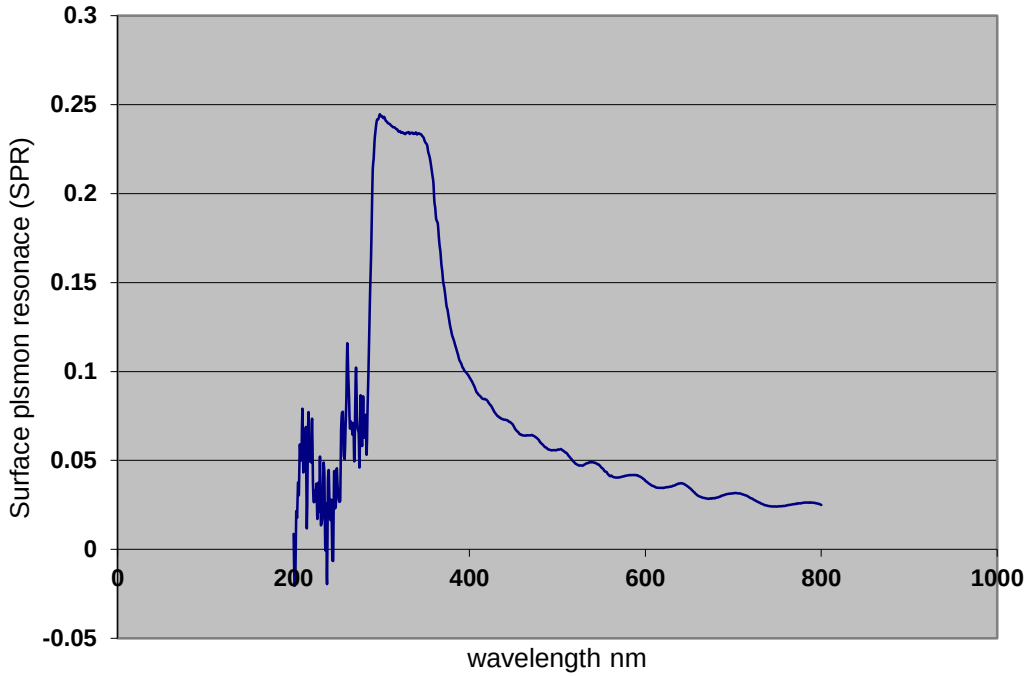
Austria. وشوهدت الخلايا تحت المرشح الأزرق والأحمر وجرى تصويرها بإستخدام كاميرة رقمية خاصة مثبتة على المجهر (Lumenira corporation, Austria) .

النتائج والمناقشة

توصيف جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المحضرة

يوضح شكل (1) طيف الأمتصاص الضوئي للمحلول المائي لمعلق جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة القلع بالليزر, كما يظهر من الشكل أن أعلى إمتصاص طيفي قد بلغ 298 نانومتر ويقع ضمن المنطقة فوق البنفسجية وهذا ما يشير إلى تكون جسيمات أوكسيد الزنك النانوية إذ تمتلك هذه الجسيمات رنين بلازمون السطحي surface plasmon resonance (SPR) متفرد يقع ضمن هذا المدى. تعطي بيانات SPR للجسيمات النانوية المصنعة فكرة عن شكل وحجم تلك الجسيمات, فكلما كبر حجم الجسيمات النانوية كان هناك إنحراف لرنين البلازمون السطحي الخاص بها بإتجاه المنطقة تحت الحمراء من الطيف الضوئي [11].

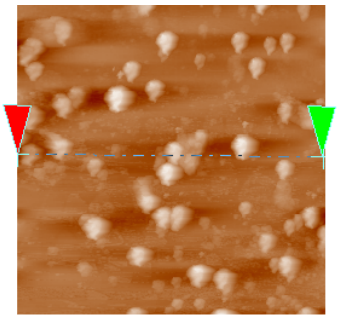
كما إن لكل نوع من أنواع الجسيمات النانوية المعدنية (غير العضوية) رنين بلازمون سطحي في طول موجي محدد خاص بها يتلائم مع بنائها الذري فضلا عن بناها النانوي ولكل شكل من أشكال الجسيمات النانوية SPR متفرد, فالقضبان النانوية للذهب تمتلك طول موجي بمقدار 650 نانومتر والكرات النانوية منه تملك طول موجي بمقدار 500 نانومتر في حين تمتلك جسيمات الفضة النانوية الكروية الشكل رنين بلازمون سطحي مقداره 400 نانومتر. هذه الخاصية الكيموفيزياوية يستفاد منها في العديد من التطبيقات الفيزياوية والكيمياوية والبايولوجية لتقنية النانو [12].

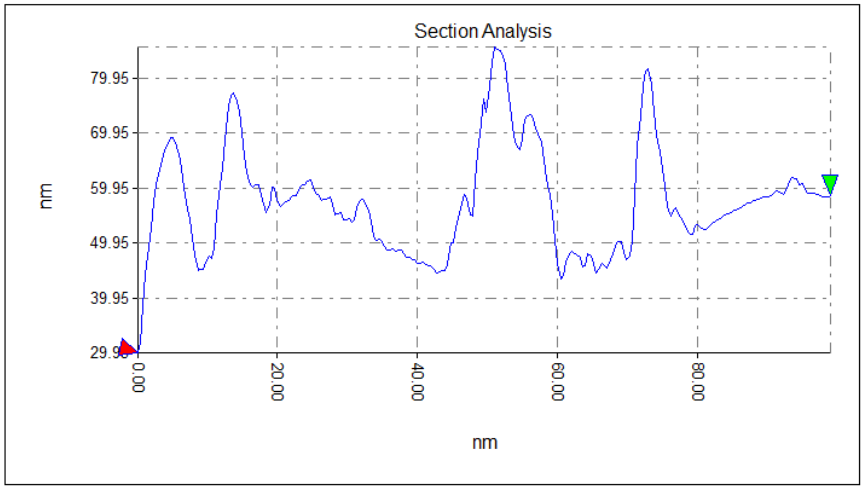


شكل(1): نقطة طيف الأمتصاص القصوى لجسيمات الزنك النانوية المصنعة بالليزر النبضي بإستخدام المطياف الماسح للأطوال الموجية الممتدة من المنطقة تحت البنفسجية إلى الضوء المرئي .

كما يستفاد من هذه الخاصية في تحديد مدى إرتباط الجزيئات الفعالة بايولوجيا كالأجسام المضادة والانزيمات والحامض النووي المنقوص الأوكسجين وذلك عند تفعيل الجسيمات النانوية بتلك الجزيئات البايولوجية الكبيرة (بروتينات أو حامض نووي) لتصنع ما أصبح يعرف الأن بالمتحسسات النانوية الأحيائية NanoBiosencers [13].

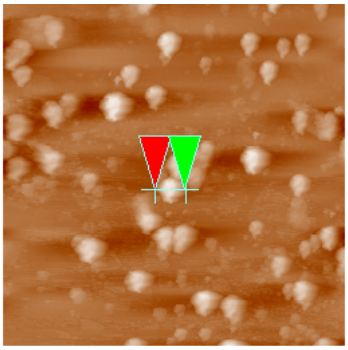
يوضح شكل (2) صورة لمجهر القوة الذرية لجسيمات الزنك النانوية المصنعة مع قياس طول الحقل المجهري المستخدم في الفحص, يظهر من تلك الصورة أن للجسيمات النانوية المصنعة شكلا كرويا . وأن المسافة السطحية للحقل تحت الفحص كانت بمقدار 410,35 نانومتر في حين كانت المسافة الأفقية للحقل المقاس بمقدار 100 نانومتر ويظهر مخطط تحليل المقطع section analysis مستويات إرتفاع وإنخفاض سطح الجسيمات النانوية عن مستوى سطح الشريحة الزجاجية المرسبة عليها. ويظهر واضحا أن حجم كل الجسيمات المصنعة لايتجاوز 100 نانومتر. يظهر شكل (3) نفس صورة الحقل المجهري الملتقطة بواسطة مجهرالقوى الذرية وبنفس أبعاد الحقل في شكل (2) 100×100 نانومتر ولكن في هذه المرة تم قياس المسافة الفاصلة بين مماسين طرفيين لأحدى الجسيمات النانوية ليتبين أن المسافة الأفقية بين طرفيها كان بمقدار9 نانومتر. يشير ذلك إلى أن الجسيمات المصنعة كانت ضمن المدى الذي تنص عليه تقنية النانو (من صفر إلى 100نانومتر). كما أن شكل (4) يوضح صورة ثلاثية الأبعاد لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية المصنعة والتي تظهر بشكل واضح الشكل الكروي لتلك الجسيمات.

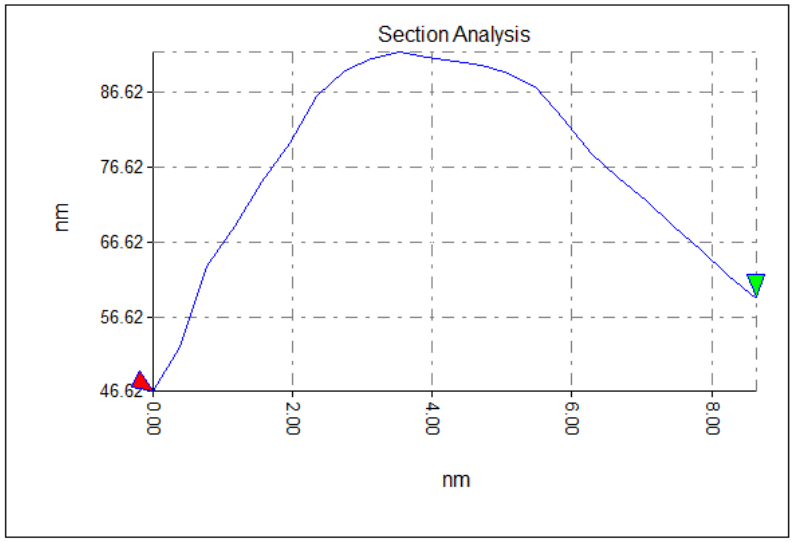




Surface distance(nm):410.35
Horizontal distance(nm):99 Vertical distance(nm):28.49
Angle(degree):16.02 Roughness Ra(nm):7.31
Height[Red](nm):29.95 Height[Greeb](nm):58.44
Size(nm*nm):100.0*100.4 Image Height(nm):100.00

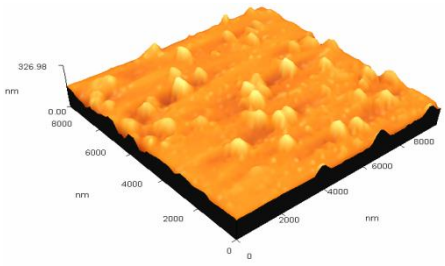
شكل (2): صورة بمجهر القوى الذرية لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية المحضرة بطريقة القلع بالليز مع مخطط تحليلي لمقطع الحقل المجهري الذي تم إلتقاط الصورة له يبين المسافة السطحية للحقل المصور (الخط الأزرق) والمسافة الأفقية له (المسافة بين المؤشر الأحمر والمؤشر الأخضر)





Surface distance(nm):78.91
Horizontal distance(nm):9 Vertical distance(nm):12.51
Angle(degree):54.21 Roughness Ra(nm):11
Height[Red](nm):46.63 Height[Greeb](nm):59.13
Size(nm*nm):100.0*100.4 Image Height(nm):100.00

شكل (3): المسافة بين مماسين متقابلين لأحدى جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بواسطة الإزالة بالليزر

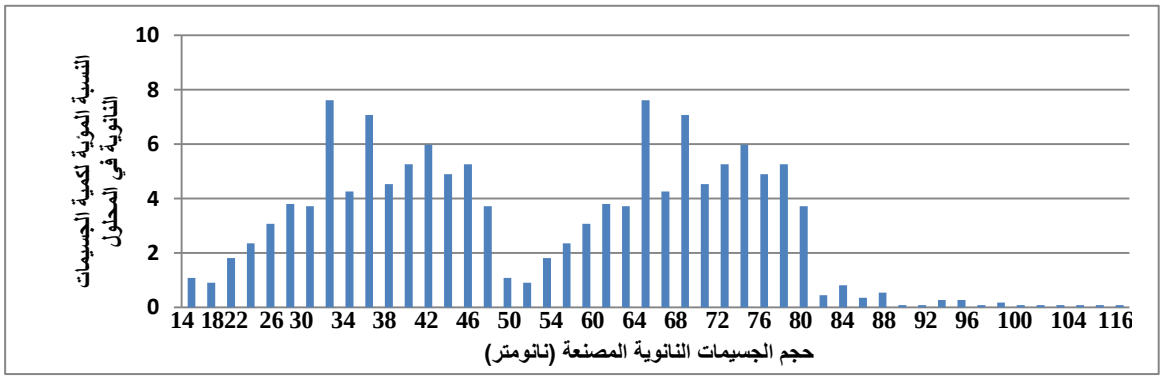


شكل (4): صورة ثلاثية الأبعاد للحقل المجهري الملتقطة بواسطة مجهر القوى الذرية

Avg. Diameter:40.70 nm ≤10% Diameter:22.00 nm

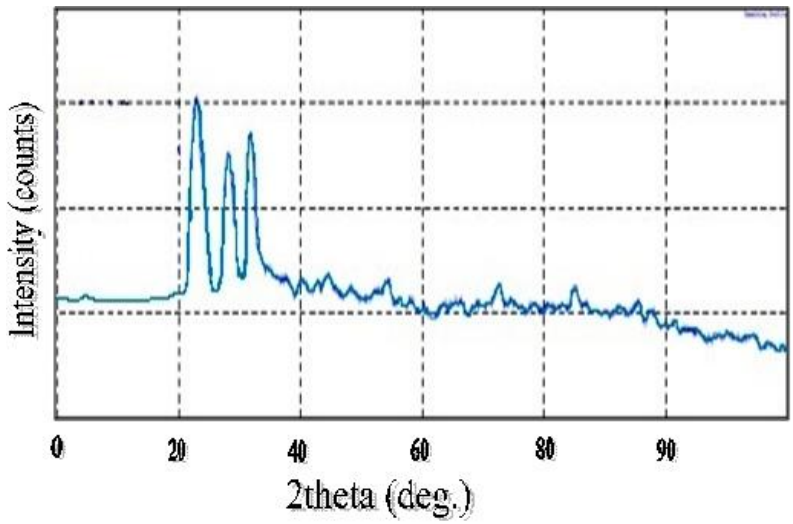
≤50% Diameter:36.00 nm ≤90% Diameter:62.00 nm

يظهر شكل (5) النسب المؤية لتوزيع حجوم جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة القلع بالليزر في المحلول المائي والتي تم الحصول عليها من برنامج حاسوبي لتحليل حجوم الجسيمات النانوية المثبت الكومبيوتر الملحق بالجهازالمستخدم (CSPM software, Angstrom, USA.) يظهر منه أن أكبر نسبة مؤية كانت لحجم الجسيمات التي يتراوح قطرها بين 28-60 نانومتر إذ شكلت نسبة تتراوح بين 7-7,6 % من كمية الجسيمات النانوية المتكونة في المحلول.
في حين لم تتجاوز نسبة الجسيمات النانوية التي زاد قطرها عن 100 نانومتر على 0,09% من كمية الجسيمات النانوية المتكونة. كما يمتلك البرنامج قدرة على تحديد معدل حجوم الجسيمات النانوية تحت الفحص وفي هذه الحالة كانت بمقدار 40,70 نانومتر شكل (5).



شكل (5): النسب المؤية لحجوم جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة الإزالة بالليزر النبضي في المحلول المائي .

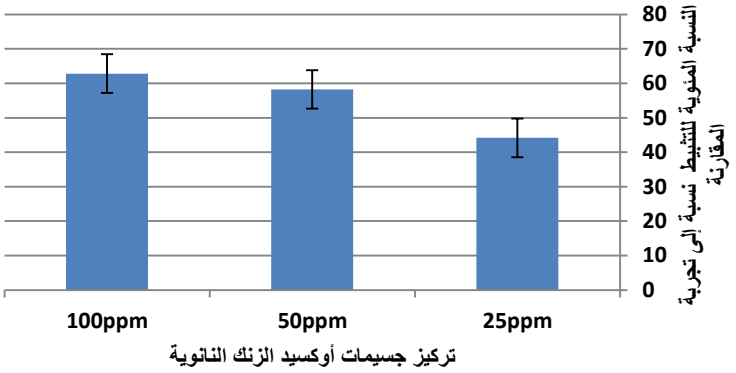
من النتائج أعلاه يتضح أن عملية تحضير معلق أوكسيد الزنك النانوي كانت ناجحة إذ تم الحصول على جسيمات نانوية متوسط حجمها 40,70 نانومتر وذات شكل كروي. إن لمجهر القوى الذرية دور مميز في تحديد الخواص الحجمية والشكلية للجسيمات النانوية بشكل خاص و للتراكيب النانوية بشكل عام فهو يستطيع تحديد أدق التفاصيل في العينة تحت الفحص.
يوضح شكل (6) نمط حيود الأشعة السينية عند مرورها بعينة أوكسيد الزنك النانوية المحضرة بطريقة القلع بالليزر. يظهر من الشكل تكون نظام بلوري متطابق تماما مع النظام البلوري الخاص ببلورات أوكسيد الزنك وأن القمم المتكون الناتجة عن حيود الأشعة السينية في قيم 2theta مطابقة لما موجود في International Centre for Diffraction Data (ICDD) Collection Code: 65122 إذ كانت بمقدار 35.8566 و 31.4100 و 22.2600 درجة. كل ذلك يدل على إن البلورات المتكونة متخذ شكل the hexagonal phase كما إن عدم وجود قمم أخرى في نمط حيود الأشعة السينية يؤيد عدم وجود عناصر أخرى ملوثة في المحلول المحضر وهذا ناتج عن إستخدام قطعة عالية النقاوة من معدن الزنك في عملية القلع بالليزر [14] . يعد إستخدام فحص حيود الأشعة السينية في عملية توصيف الجسيمات النانوية المصنعة من المعادن واحدة من التوصيفات الأساسية لتوضيح البناء البلوري للجسيمات النانوية وهذا الفحص مهم في عملية توصيف جسيمات أوكسيد الزنك النانوية لانها من الجسيمات المعروف عنها أنها تتخذ شكلا بلوريا عند تكونها بطرق التصنيع المختلفة الكيميائية منها أو الفيزيائية وقد إعتمد الكثير من الباحثين على هذه الطريقة في إثبات حصولهم على بلورات أوكسيد الزنك النانوية بطرق التصنيع التي إستخدموها [15-18].



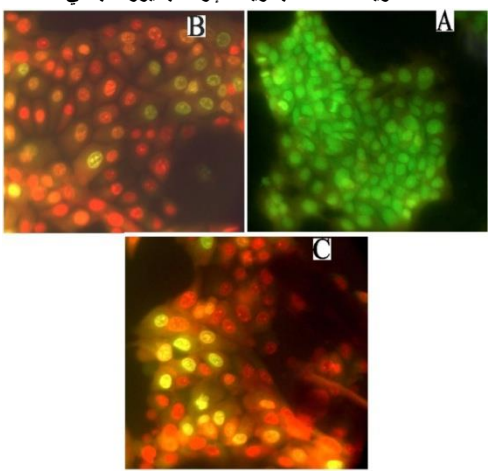
شكل (6): نمط إنحراف الاشعة السينية المسلطة على جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة الإزالة بالليزر في الوسط المائي .

يظهر شكل (7) قدرة جسيمات أوكسيد الزنك النانوية على تثبيط نمو خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري بعد تعرض لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مئوية وقد أظهرت التراكيز الثلاث المستخدمة في التجربة 25 و50 و100 جزء بالمليون نسب تثبيط مقدارها 44,15% و 58,23% و62,81 % على التوالي. لقد أشارة العديد من البحوث إلى قدرة مختلف أنواع جسيمات المواد اللاعضوية على تثبيط نمو الخلايا السرطانية وذلك من خلال العديد من الأليات كتكوين الجذور الحرة وقدرة الأيونات المتحررة من الجسيمات المذكورة على الإرتباط بمختلف أنواع البروتينات الوظيفية العاملة داخل الخلية وبالتالي عرقلة عمل تلك البروتينات نتيجة التغير في طبيعتها وتركيبها الثلاثي الأبعاد كما أن لتلك الجسيمات قدرة على النفاذ إلى داخل النواة والإرتباط بالمادة الوراثية وإحداث الخلل في وظيفتها وبالتالي موت الخلية [19-21]. ولملاحظة تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية على شكل الخلايا السرطانية تحت التجربة وإمكانية حث الموت البرمج فيها إستخدمت طريقة التلوين بالصبغات المتفلورة.

يظهر شكل (8) نتائج تلوين الخلايا المعرضة للجسيمات النانوية بالملونات المتفلورة وهي طريقة تستخدم للتعرف على حدوث ظاهرة الموت المبرمج في الخلايا. تحت المجهر المتفلور تظهر الخلايا الطبيعية غير المعرضة لعوامل حاثة للموت المبرمج بلون أخضر وتكون نواتها متجانسة التلون نتيجة لمقدرة صبغة الأكردين البرتقالي الدخول إلى الخلايا الحية وعدم قدرة صبغة أيوديد البروبيديوم الدخول إلى الخلايا الحية وهذه الحالة تظهر جليا في الصورة A من شكل (8). عند حدوث ظاهرة الموت المبرمج والخلايا لاتزال حية فإنها والحالة هذه سوف تتلون بالون الأخضر إلا أن نواتها ستكون غير متجانسة التلون حيث تظهر فيها مناطق يتكثف فيها الدنا وأخرى يقل ذاك التكثف. وتكون الخلايا الميتة متلونة بلون أحمر نتيجة لدخول صبغة أيوديد البروبيديوم إلى داخلها كما يظهر واضحا في الصورة B في الشكل (8). إن الصفة الرئيسية التي تشير إلى حدوث ظاهرة الموت المبرمج في الخلايا المعاملة بالمواد الحاثة لهذه الظاهرة هي وجود تكثفات للمادة الوراثية داخل النواة والتي تكون بهيئة بقع شديدة التلون وأخرى ضعيفة التلون وهي حالة تعرف DNA condensations, فضلا عن تشوه شكل الخلية عن حالتها الطبيعية بالأخص فقدان الغشاء السايتوبلازمي لصفة النفاذية الإنتقائية بحيث تستطيع صبغة أيوديد البروبيديوم النفاذ إلى داخل الخلية [22]. هذه الحالة والوصف تتطابق مع نتائج هذا البحث كما توضحه الصورتين B و C في شكل (8). إن النتائج الوارده في هذا البحث تشير بشكل واضح إلى قدرة جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة الإزالة باليزر النبضي على تثبيط نمو الخلايا السرطانية إلى مستوى أكبر من النصف من خلال حث الموت المبرمج عند ستخدام تركيز 100 جزء بالمليون. إن النتائج هذه تفرض ضرورة الإستمرار في دراسات من هذا النوع لمعرفة الأليات الجزيئة من وراء هذا الفعل لفهم هذه العملية بشكل أكثر دقة وبالتالي التعرف على إمكانية إقتراح إستخدام هذه المادة كعلاج للسرطان.



شكل (7): مستويات تثبيط نمو خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري بتراكيز مختلفة من جسيمات أوكسيد الزنك النانوية المصنعة بطريقة الإزالة باليزر النبضي



شكل (8): حدوث ظاهرة الموت المبرمج والتنخر في خلايا خط سرطان الغدة اللبنية الفأريالمعاملة بجسيمات أوكسيد الزنك النانوية والمصبغة بصبغتي الأكردين البرتقالي وأيوديد اللبروبيديوم. الصورة (A) تظهر تجربة السيطرة حيث عوملت الخلايا بدارء الفوسفات و الصورة (B) تظهر الخلايا المعاملة بتركيز 50 جزء بالمليون والصورة (C) تظهر الخلايا المعاملة بتركيز 100 جزء بالمليون.

References

1. Yıldırım, Ö. A. and Durucan, C. (2010). Synthesis of zinc oxide nanoparticles elaborated by microemulsion method. J. Allo. Comp. 506. 944–949.
2. Arruebo, M.,Valladares, M. and Gonzalez-Fernandez, A. (2009). Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. J. Nanomater. 43: 9365-9389.
3. Zhang, H., Chen, B., Jiang, H., Wang, C., Wang, H. and Wang, X. (2011). A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment. Biomaterials. 32: 1906-1914.
4. Akhtar, M. J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M. M. A, Ahmad, J. and Alrokayan, S. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. Inter. J. Nanomedicine. 7: 845–857.
5. Zhang, Y., Zheng, F., Yang T., Zhou, W., Liu, Y., Man, N., Zhang, L., Jin, N., Dou, Q., Zhang, Y., Li, Z., and Wen, L. (2012). Tuning the autophagy-inducing activity of lanthanide-based nanocrystals through specific surface-coating peptides. Nat. Mate. 11: 817–826.
6. Tawfeeq, A.T., Al-Bakri, S.A. and Ajeel, E.A. (2011). Applied Study of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized by Pulse Laser Ablation as antibacterial agent. proceeding of the third international conference of nanotechnology and advanced materials and their applications. University of Technology, Baghdad, Iraq.
7. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM®), method No. 173, Schlecht, P.C. & O'Connor, P.F. Edr. 4th ed. DHHS (NIOSH) Publication. USA. (1994).
8. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells : A manual for basic technique (4thed.). Wiley-liss, A John wiley & sons, Inc. publication, New york.
9. Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotech. Annual Rev.11: 127-152.
10. Petit, T., Davidson, K., Izbicka, E. and Von Hoff, D. D. (1999). Elimination of extrachromosomal c-myc genes by hydroxyurea induces apoptosis. Apoptosis. 4: 163–167.
11. Yoo, J., Kim, J., Lee, K., Lee, S., Kim, S., Park, H., Kim, S., Bae, J., Parkd, J., and Choi, D. (2013). Dewetted gold nanoparticles on ZnO nanorods for three-dimensionally distributed plasmonic hot spots. 69: 654–657.
12. Prabaharan, M., Grailer, J.J., Pilla, S., Steeber, D.A. and Gong, S. (2009). Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. Biomaterials 30: 6065–6075.
13. Day, E. S., Bickford, L.R., Slater, J.H., Riggall, N.S., Drezek R.A. and West, J.L. (2010). Antibody-conjugated gold-gold sulfide nanoparticles as multifunctional agents for imaging and therapy of breast cancer. Inter. J. Nanomedicine. 5: 445–454.
14. Mishra, S.K., Srivastava, R.K. and Prakash, S.G. (2012). ZnO nanoparticles: Structural, optical and photoconductivity characteristics. J. Alloys and Compounds. 539: 1–6.
15. Hammad, T. M., Salem, J. K. and Harrison, R. G. (2010). The influence of annealing temperature on the structure, morphologies and optical properties of ZnO nanoparticles. Superlattices and Microstructures. 47: 335-340.
16. Kripala, R., Gupta, A.K., Srivastava, R.K. and Mishra, S. K. (2011). Photoconductivity and photoluminescence of ZnO nanoparticles synthesized via co-precipitation method. Spectrochimica Acta Part A. 79: 1605–1612.
17. Chand, P., Gaur, A. and Kumar, A. (2012). Structural and optical properties of ZnO nanoparticles synthesized at different pH values. J. Alloys and Compounds. 539: 174–178.
18. Ruhela, S. and Srivastava, S.K. (2013). Study of XRD Pattern of Mixed Composite of MgTiO3 and ZnO. Inter. J. Innovative Res. Sci., Eng. and Technol. 2: 1320-1322.
19. Bhattacharyya , S., Kudgus, R.A., Bhattacharya, R. and Mukherjee, P. (2011). Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. Pharm. Res. 28:237–259.
20. Yang, F., Jin, C., Subedi, S., Lee, C.L., Wang, Q., Jiang, Y., Li, J., Di, Y. and Fu, D. (2012). Emerging inorganic nanomaterials for pancreatic cancer diagnosis and treatment. Cancer Treat. Rev. 38: 566–579.
21. Probst, C. E., Zrazhevskiy, P., Bagalkot, V. and Gao, X. (2013). Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. Adv. Drug Delivery Rev.65: 703–718.
22. Kempaiah, P. and Kisiel, W. (2013). Human tissue factor pathway inhibitor-2 induces caspase-mediated apoptosis in a humanfibrosarcoma cell line. Apoptosis. 13:702–715.