Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(4):181-187

Comparative Evaluation of the Efficacy of Milk and Milk Containing Nano-Curcumin on Lead Toxicity in Huh7-1x-ARE-luc cell-line

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Seyed Ahmadian S.M.[1] *MSc,*
Jalili Sh.[2] *PhD,*
Shirzad H.*[2] *PhD,*
Sadeghizadeh M.[3] *PhD*

How to cite this article
Seyed Ahmadian S.M, Jalili Sh, Shirzad H, Sadeghizadeh M. Comparative Evaluation of the Efficacy of Milk and Milk Containing Nano-Curcum-in on Lead Toxicity in Huh7-1x-ARE-luc cell-line. Pathobiology Research. 2019;22(4):181-187.

ABSTRACT

Aims Oxidative substances are chemically reactive molecules and a byproduct of oxidative metabolism. Oxidative stress is one of the most lethal mechanisms in the toxicity of heavy metals such as lead. Since curcumin is an active ingredient in turmeric and has many properties, including antioxidant properties, the present study was conducted to evaluate the effect of milk and milk containing nano-curcumin on lead toxicity and to determine the effective concentration of nano-curcumin in controlling lead toxicity.

Materials & Methods In the present study, the Huh7-1x-ARE-luc cell line, a biosensor of oxidative stress, was treated with 30μM of lead as a strong oxidant. Then the antioxidant effect of low-fat and high-fat milk (20, 40, and 80μL), nano-curcumin in antioxidant concentrations (4 and 8μM) and simultaneous treatment with the combination of these two antioxidants was tested using Luciferase assay.

Results Based on statistical analyses, the combination of milk and nano-curcumin (combination of 30μM lead, 20μL milk and 4μM nano-curcumin) was able to significantly reduce lead toxicity at low concentrations of milk compared to the milk without nano-curcumin (combination of 30μM lead and 80μL milk), with RLU of 1266 and 34000, respectively.

Discussion & Conclusion Nano-curcumin reveals a stronger antioxidant effect compared to milk, and ultimately, the combination of nano-curcumin and milk greatly neutralizes lead toxicity.

Keywords Huh7-1x-ARE-luc Biosensor; Lead; Nano-Curcumin; Milk; Luciferase Assay

CITATION LINKS

[1] Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects [2] Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals [3] Lead toxicity update [4] Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification [5] Blood-urine and cognitive-mental parameters in mine workers exposed to lead and zinc [6] Bilirubin is highly effective in preventing in vivo δ-aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage [7] Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation [8] Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis [9] Evaluation of the role of glutathione in the lead-induced toxicity in Saccharomyces cerevisiae [10] Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats [11] Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings [12] Monitoring the nanocurcumin effect on lead exposure in the Huh7-1x-ARE-luc cell line [13] Generation of stable ARE-driven reporter system for monitoring oxidative stress [14] Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells [15] Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo [16] Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin [17] Monitoring lead toxicity by Huh7-1x-ARE-luc cell line lucifersae biosensor [18] Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine [19] Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [20] The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review [21] Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by a combination of curcumin and sulforaphane [22] Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs

[1]Nutrition Sciences & Food Technology Research Center, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Research Institute of Police Science & Social Studies, Tehran, Iran
[3]Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Rashid Yasimi Street, Research Institute of Police Science & Social Studies, Tehran, Iran.
Postal Code: 651619395
Phone: +98 (21) 81886062
Fax: +98 (21) 81885055
hadi_shirzad@yahoo.com

Article History
Received: March 2, 2019
Accepted: November 20, 2019
ePublished: December 21, 2019

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی مقایسه‌ای اثربخشی شیر و شیر حاوی نانوکورکومین بر سمیت سرب در رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc

سیدمهدی سیداحمدیان MSc
مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
شیرین جلیلی PhD
پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران
هادی شیرزاد* PhD
پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران
مجید صادقی‌زاده PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: مواد اکسیداتیو، مولکول‌های واکنش‌پذیر شیمیایی و محصول جانبی متابولیزم اکسیژن محسوب می‌شوند. استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از کشنده‌ترین مکانیزم‌های موثر در سمیت فلزات سنگین نظیر سرب مطرح شده است. از آنجا که کورکومین جزء فعال زردچوبه و دارای خواص زیادی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی است، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر شیر و شیر حاوی نانوکورکومین بر میزان سمیت سرب و تعیین غلظت موثر نانوکورکومین در مهار سمیت سرب انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc که یک زیست‌حسگر حساس به مواد اکسیدانی است، در تیمار با غلظت ۳۰میکرومولار سرب به‌عنوان یک اکسیدان قوی قرار گرفت. سپس روی رده سلولی مذکور، اثر آنتی‌اکسیدانی شیر کم‌چرب و پرچرب (۲۰، ۴۰ و ۸۰میکرولیتر)، نانوکورکومین در غلظت‌های آنتی‌اکسیدان (۴ و ۸میکرومولار) و همچنین تیمار همزمان با ترکیب این دو آنتی‌اکسیدان با استفاده از تکنیک لوسیفراز (Luciferase assay) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج حاصل از آنالیزهای آماری، مشخص شد که در مقایسه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی شیر، ترکیب شیر و نانوکورکومین (ترکیب ۳۰میکرومولار سرب، ۲۰میکرولیتر شیر و ۴میکرومولار نانورکورمین) نسبت به شیر فاقد نانوکورکومین (ترکیب ۳۰میکرومولار سرب و ۸۰میکرولیتر شیر) قادر به کاهش چشمگیر سمیت سرب در غلظت‌های پایین شیر به ترتیب با شدت نور ساطع‌شده برابر با ۱۲۶۶۶ و ۳۴۰۰۰ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: شیر حاوی نانوکورکومین اثر آنتی‌اکسیدانی به‌مراتب قوی‌تری از شیر دارد و در نهایت ترکیب نانوکورکومین با شیر به‌طور چشمگیری سمیت سرب را خنثی کرده است.

کلیدواژه‌ها: زیست‌حسگر Huh7-1x-ARE-luc، سرب، نانوکورکومین، شیر، سنجش لوسیفرازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۹
*نویسنده مسئول: hadi_shirzad@yahoo.com

مقدمه

تجمع عناصر غیر حیاتی مانند جیوه، کادمیوم و از جمله سرب در موجودات زنده و به‌خصوص پستانداران باعث بیماری‌های خطرناکی می‌شود. سرب به‌طور طبیعی در محیط زیست وجود دارد، ولی آلودگی‌های ناشی از آن در اکثر موارد حاصل فعالیت‌های بشری از قبیل کاربرد در تولید بنزین است. نمک‌های سرب از راه اگزوز اتومبیل‌ها وارد محیط زیست می‌شوند و خاک، آب و هوا را آلوده می‌کنند. اگرچه هیچ نقش حیاتی برای سرب شناخته نشده است، ولی می‌تواند در سیستم‌های زیستی آن‌قدر تجمع یابد تا به حد سمی برسد. سرب یکی از چهار فلزی است که بیشترین عوارض را بر سلامت انسان دارد. هرچند در گذشته عده‌ای از محققان تنها سرب موجود در هوا را مسئول آلودگی و سمیت سرب در انسان و دیگر جانداران می‌دانستند، اما امروزه معتقدند که روزانه تنها ۳۳% سرب واردشده به بدن افراد شهرنشین از طریق استنشاق هوا است. سرب از طریق مصرف فرآورده‌های دریایی هم می‌تواند وارد بدن انسان شود[1]. گزارش شده است که مواد غذایی حاوی ۵۰-۵ppm سرب باعث تغییر قابل توجه در رفتارهای حیوانات آزمایشگاهی می‌شوند[2].

عوارض مسمومیت سرب در انسان شامل بالارفتن میزان سرب در خون انسان و ایجاد مسمومیت در دو نوع حاد و مزمن است. در اثر مسمومیت مزمن، بیماری‌هایی نظیر فلج‌شدن، التهاب کلیه، کم‌خونی، بالارفتن میزان اسیداوریک خون، نقرس سربی و سقط جنین در انسان و حیوانات باردار ایجاد می‌شود. علایم مسمومیت حاد با سرب در حیوانات شامل کوری، ترشح بیش از حد بزاق، انقباض ماهیچه، ساییدگی دندان‌ها و مرگ ناگهانی است[3]. حد تعیین‌شده مجاز سرب توسط سازمان بهداشت جهانی در آب آشامیدنی برابر با ۰/۰۱ppm و معادل ۰/۰۱میلی‌گرم بر لیتر است.

سرب از جمله آلاینده‌های زیستی محیطی است که می‌تواند از طریق تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و نهایتاً تخریب پلیمرهای زیستی شود. این ترکیبات همچون رادیکال‌های آزاد (مانند آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسید) و اکسیدکننده‌هایی نظیر پراکسیدهیدروژن هستند. در بدن سیستم‌های خاصی برای مقابله با آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد وجود دارد که به سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی معروف هستند. عدم تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را استرس اکسیداتیو می‌نامند[4].

سرب از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و درنتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی باعث اختلال در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن از جمله هورمون‌ها و دستگاه تولیدمثل می‌شود[5]. همچنین این ماده می‌تواند باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسیدهیدروژن، یون سوپراکسید، اکسیژن منفرد و رادیکال هیدروکسیل شود. بنابراین اثرات مخربی بر اندام‌های مختلف موجودات زنده از جمله انسان دارد. سرب تغییرات عمده‌ای در ساختار لیپیدها و پروتئین‌های غشای گلبول‌های قرمز ایجاد و سنتز هموگلوبین را مهار می‌کند. همچنین این سیستم را از طریق تولید ROS و اختلال در عملکرد آنزیم موثر در تولید هم (ALA: Aminolevunic acid dehydrates) دچار مشکل می‌کند[6, 7].

www.SID.ir

Archive of SID

سرب همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز، گلوتانیون‌پراکسیداز (GPX) و مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون (GHS) را در انسان و سایر موجودات زنده دچار تغییر می‌کند. از سویی باعث هیپرتانسیون وابسته به سرب ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به‌هم‌خوردن تعادل پرواکسیدان و آنتی‌اکسیدان در بافت قلبی نیز می‌شود[8, 9].

به همین دلیل کاهش اثرات سمی سرب جزء یکی از اولویت‌های تحقیقاتی بسیاری از محققین است. یکی از زمینه‌های تحقیقاتی مورد توجه بسیاری از محققین، شناسایی و به‌کارگیری ترکیباتی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی داشته باشند. از جمله این ترکیبات می‌توان به کورکومین اشاره کرد.

مطالعات پیشین نشان داده است که کورکومین اثر سوء فلزات سنگین بر کبد همچون کاهش تولید نیتروژن‌اکسید، کاتالیز پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع و القای تولید هیدروکسیل رادیکال‌ها را کاهش می‌دهد. درواقع کورکومین توسط سیستم رونویسی Nrf2/keap1/ARE روی mRNA ژن‌های *NQO1* و *GSTYa* تاثیر می‌گذارد و باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود[10]. به نظر می‌رسد که کورکومین باعث جلوگیری از تخلیه GSHها، توقف پراکسیداسیون لیپیدها، پایدارکردن فعالیت ترکیبات GSTs، کاتالاز (CAT)، SOD، کینون اکسید و ردوکتاز یک (NQO1) و GPX می‌شود. به علاوه این ترکیب با ممانعت از به‌هم‌خوردن تعادل کلسیم در سلول و اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو باعث کاهش اثر سمی فلزاتی همچون سرب بر کبد می‌شود[11].

از این رو سنجش میزان سرب موجود در محیط و همچنین بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیباتی که باعث کاهش اثرات سمی سرب می‌شوند بسیار مهم و حساس است. زیست‌حسگرهای سلولی یا بیوسنسورها یکی از ابزارهای مفید در این زمینه هستند. زیست‌حسگرهای سلولی حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر حساس به حضور یک عامل نظیر آلوده‌کننده‌های محیطی مانند فلزات سنگین هستند. درنتیجه قادرند در حضور این فاکتورها سیگنالی ایجاد کنند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است. با وجود اهمیت ترکیبات اکسیداتیو و اثرات سمی آن در انسان استفاده از رده سلولی حامل ژن پاسخ‌دهنده به ترکیبات اکسیداتیو برای سنجش سمیت فلزات سنگین همچون سرب مفید به نظر می‌رسد و از آنجا که طبق مطالعات انجام‌شده، اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین اثبات شده است[12] پیش‌بینی می‌شود که این ماده اثر آنتی‌اکسیدانی شیر را تقویت کند و ترکیب شیر با نانوکورکومین باعث خنثی‌شدن هر چه بیشتر سمیت حاصل از ترکیبات اکسیدانی همچون سرب خواهد شد.

از آنجایی که همواره توصیه می‌شود شیر به‌عنوان دفع‌کننده مسمومیت سرب در سبد غذایی خانواده‌ها قرار گیرد، به‌خصوص در سبد تغذیه افرادی مانند پلیس راهور که در معرض شدید آلودگی‌های حاصل از ترافیک هستند، در این پژوهش سعی شده است اثر آنتی‌اکسیدانی شیر با شیر حاوی نانوکورکومین مقایسه شود و قابلیت دفع سرب توسط شیر به‌تنهایی و شیر حاوی نانوکورکومین و همچنین مناسب‌ترین غلظتی از نانوکورکومین که در ترکیب با شیر بتواند بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را داشته باشد، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از رده سلولی Huh7 پایداری که حاوی سازه نوترکیب pGL4.26/ARE، که دارای ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر پاسخ‌گو به اکسیدان‌ها است (زیست‌حسگر لوسیفرازی رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc) برای بررسی تاثیر شیر و شیر حاوی نانوکورکومین بر سمیت سرب استفاده شد. این رده سلولی توسط *مطهری* و همکاران[13] برای شناسایی مواد اکسیداتیو طراحی و ساخته شده است.

به‌طور کلی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان و یا سیگما ایالات متحده تهیه شده است. کورکومین مورد استفاده در این پژوهش با خلوص ۹۵% خریداری شد (مرک؛ آلمان). در این مطالعه از دندروزوم‌های OA 400 به‌عنوان نانوحامل‌های پلیمری که در آزمایشات پیشین کارآیی بسیار بالایی در افزایش دسترس‌پذیری زیستی را نشان داده بودند، برای افزایش حلالیت کورکومین استفاده شد[14-16] حامل‌های دندروزومی OA 400 طی واکنش استریفیکاسیون اولئیل‌کلرید (۰/۳گرم؛ سیگما؛ ایالات متحده) و پلی‌اتیلن‌گلیکول ٤٠٠ (PEG 400؛ ۴گرم؛ سیگما؛ ایالات متحده) در حضور تری‌اتیل‌آمین (۱/۲گرم؛ مرک؛ آلمان) و کلروفرم به‌عنوان حلال ساخته شد. در نهایت حاملین دندروزومی OA 400 پس از جداسازی نمک تری‌اتیل‌آمین هیدروکلرید از فاز آلی و تبخیر کلروفرم در دمای ۴۰°C و در شرایط خلاء به مدت ۴ساعت به دست آمد[16]. نانوکورکومین مطابق دستورالعمل بهینه‌شده‌ای که در مطالعات قبلی انجام شده بود، آمادسازی شد[15]. به‌طور خلاصه طیف غلظتی از نانوکورکومین (نسبت ۱:۵۰ تا ۱:۱۰) به‌منظور انتخاب نسبت مناسب از نانوکورکومین توسط اسپکتروفتومتری بررسی و در نهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به‌عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نانوکورکومین با غلظت ۲۷۰۰میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور و ۴°C نگهداری شد.

سنجش میزان بیان لوسیفراز در رده سلولی Huh7-ARE-1x-luc توسط دستگاه لومینومتر پس از تیمار با سرب و شیر

از رده سلولی Huh7-ARE-1x-luc که قبلاً ترانسفکشن موفق سازه pGL4.26/ARE به صورت پایدار در آن انجام شده بود، به‌عنوان زیست‌حسگر برای سنجش اثر آنتی‌اکسیدانی شیر روی سلول‌های تیمارشده با سرب استفاده شد. غلظت سرب به‌کاررفته به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی ۳۰میکرومولار است که در مطالعه مربوط به *کاووسی* و همکاران به روش MTT و لوسیفراز قبلاً به دست آمده است[17].

www.SID.ir

Archive of SID

به این منظور سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۲٤ خانه کشت و پس از ۲۴ساعت تیمار با سرب ۳۰میکرومولار و شیر در مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۸۰میکرولیتر (به‌عنوان آنتی‌اکسیدان) لیز شدند. به این ترتیب که پس از تخلیه محیط کشت و شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات‌سالین (PBS)، به هر چاهک ۷۰میکرولیتر بافر لیز اضافه شد (جدول ۱) و پلیت به مدت ۱۵ تا ۲۰دقیقه بر روی ظرف یخ شیک شد. پس از خراشیدن کف سلول به‌منظور اطمینان از کنده‌شدن تمامی سلول‌ها، عصاره سلولی جمع‌آوری و ۵میکرولیتر از محصول لیزشده همراه با ۵میکرولیتر کمپلکس سنجش در داخل لوله مخصوص لومینومتر مخلوط شد (جدول ۲) و به دستگاه لومینومتر که روی طول موج ٥٦٠نانومتر تنظیم شده بود، انتقال یافت. سپس نور تولیدی دستگاه لومینومتر بر حسب شدت نور نشرشده بر ثانیه (RLU/Sec) گزارش شد.

جدول ۱) مواد مورد استفاده برای تهیه بافر لیز سلولی

مواد	غلظت
فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF)	۱میلی‌مولار
سدیم‌کلرید	۱۵۰میلی‌مولار
تریس‌کلرید (Tris-Cl)	۱۵۰میلی‌مولار
اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید (EDTA)	۱میلی‌مولار
تریتون ایکس- ۱۰۰ (Triton X-100)	%۱

جدول ۲) مواد مورد استفاده برای تهیه کمپلکس سنجش لوسیفرازی

مواد	غلظت (میلی‌مولار)
لوسیفرین	۲
منیزیم‌سولفات ($MgSO_4$)	۱۰
ATP	٤
بافر تریس	٥

سنجش میزان فعالیت لوسیفرازی پس از تیمار با سرب و شیر حاوی نانوکورکومین

در این مرحله به‌منظور تقویت اثر آنتی‌اکسیدانی شیر علیه استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط سرب (۳۰میکرومولار)، از غلظت‌های آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین (۸-۴میکرومولار) همراه با مقادیر متفاوتی از شیر (۲۰، ۴۰ و ۸۰میکرولیتر) به صورت همزمان استفاده شد. غلظت‌های مناسب آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین (۸-۴میکرومولار) از طریق واکنش لوسیفرازی و در مطالعه‌ای که توسط *کاووسی* و همکاران انجام شده، به دست آمده است[12].

سلول‌ها پس از کشت در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه با غلظت ۳۰میکرومولار از سرب به‌منظور ایجاد استرس اکسیداتیو و مقادیر مختلف از شیر و نانوکورکومین به مدت ۲۴ساعت تیمار شدند. سپس به‌منظور سنجش فعالیت لوسیفرازی ناشی از وجود ژن گزارشگر در سلول‌های زیست‌حسگر، طبق شرایط ذکرشده در بخش قبل در دستگاه لومینومتر قرار گرفتند و نور تولیدی براساس شدت نور نشرشده بر ثانیه ثبت و نتایج با استفاده از آنالیزهای آماری بررسی شدند.

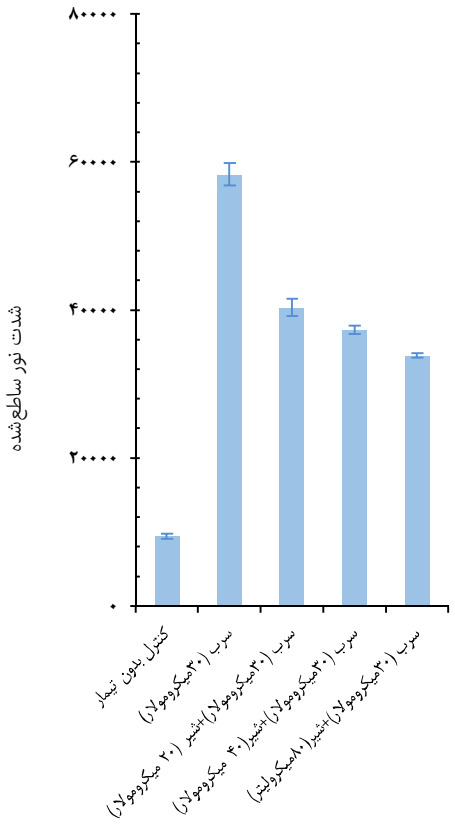
تحلیل‌های آماری

کلیه تحلیل‌های آماری این پژوهش با روش تحلیل واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با سرب و شیر

در این حالت، سلول‌ها همزمان با سرب و شیر تحت تیمار قرار گرفتند. از آنجا که سرب در غلظت ۳۰میکرومولار منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و پاسخ سلولی بیوسنسور به صورت افزایش شدید در فعالیت لوسیفرازی می‌شود، یکی از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش (استرس اکسیداتیو شدید) با غلظت ۳۰میکرومولار از سرب تیمار شد. کنترل منفی نیز سلول‌های بدون تیمار هستند که حداقل فعالیت لوسیفرازی (شرایط بدون حضور اکسیدان) را دارا هستند. به‌منظور بررسی اینکه آیا شیر قادر به خنثی‌کردن استرس اکسیداتیو ناشی از حضور سرب در محیط است یا خیر، سلول‌ها با مقادیر افزایش‌یافته‌ای از شیر تیمار شدند. نتایج آنالیز در نمودار ۱ قابل مشاهده است.همان‌طور که مشاهده می‌شود شیر قادر به خنثی‌کردن اثر اکسیدانی و سمیت سرب به صورت قابل توجه‌ای بوده است.



نمودار ۱) سنجش فعالیت لوسیفرازی سلول‌ها در حضور سرب و مقادیر افزایش‌یافته شیر

www.SID.ir

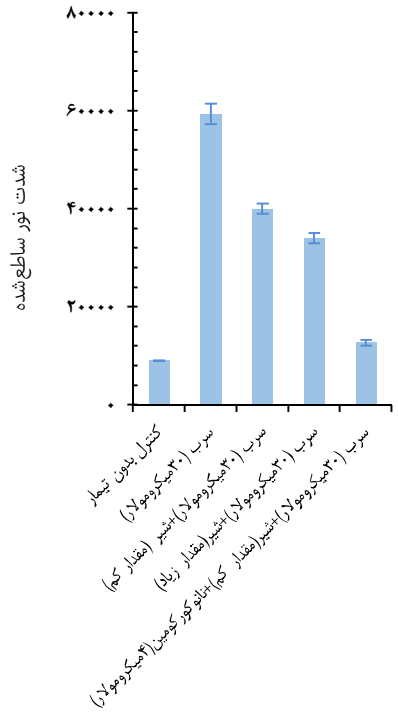
Archive of SID

نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با سرب و شیر حاوی نانوکورکومین

غلظت ۴میکرومولار نانوکورکومین

نانوکورکومین در غلظت‌های مشخصی (کمتر از ۱۰میکرومولار) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و به تبع آن قادر خواهد بود اثر اکسیدانی و سمیت ناشی از سرب را در محیط کشت سلول‌ها خنثی کند. از این رو تیمار همزمان سلول‌ها با سرب ۳۰میکرومولار به همراه غلظت ۴میکرومولار نانوکورکومین و مقادیر افزایش یافته شیر انجام شد تا تاثیر همزمان این دو آنتی‌اکسیدان (شیر و نانوکورکومین) بر روی سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، ترکیب نانوکورکومین و شیر قادر به خنثی‌کردن اثر سمیت سرب به مقدار قابل توجه‌ای بوده است.



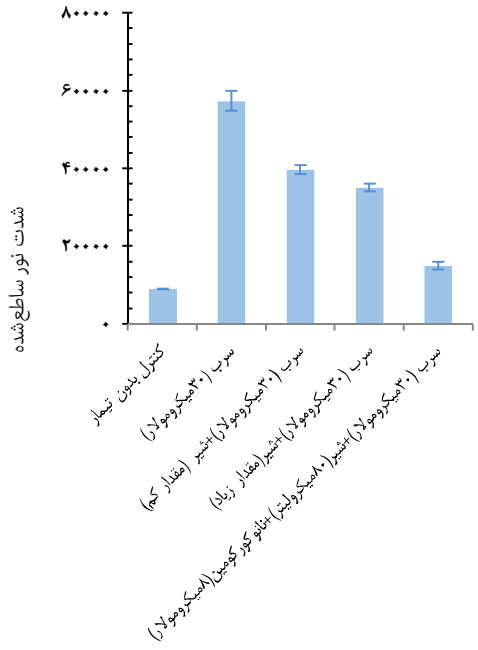
نانوکورکومین ٤میکرومولار

نمودار ۲)سنجش فعالیت لوسیفرازی سلول‌ها در حضور غلظت ۳۰میکرومولار سرب به همراه غلظت ۴میکرومولار نانوکورکومین در حضور مقادیر افزایش‌یافته شیر

غلظت ۸میکرومولار نانوکورکومین

تیمار سلول‌ها در حالتی مشابه با حالت قبل (ترکیب سرب، شیر و نانوکورکومین)، اما این‌بار در حضور غلظت ۸ماکرومولار از نانوکورکومین انجام شد تا غلظت بهینه نانوکورکومین که بهترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در ترکیب با شیر ایجاد می‌کند، مشخص شود.

همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، ترکیب نانوکورکومین و شیر قادر به خنثی‌کردن اثر سمیت سرب به مقدار قابل توجه‌ای بوده است.



نانوکورکومین ۸میکرومولار

نمودار ۳) سنجش فعالیت لوسیفرازی بیوسنسور در حضور غلظت ۳۰میکرومولار سرب به همراه غلظت ۸میکرومولار نانوکورکومین در حضور مقادیر افزایش‌یافته شیر

بحث

زندگی مدرن امروزی همراه با افزایش استرس‌های محیطی و مواجهه با مواد شیمیایی و آلودگی‌ها باعث تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود. رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی با نیمه‌عمر پایین و ناپایدار هستند که با شرکت در واکنش‌های شیمیایی مختلف و کسب الکترون قادر به ایجاد ترکیب پایداری خواهند شد[18]. ترکیبات اکسیداتیو گروهی از این رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن هستند. این گونه‌های واکنش‌پذیر به صورت طبیعی محصول جانبی متابولیزم ناشی از اکسیژن هستند. در صورت به‌هم‌خوردن تعادل بین این ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌ها شرایطی ایجاد می‌شود که استرس اکسیداتیو خوانده می‌شود. درنتیجه طبیعی به نظر می‌رسد که موجودات زنده طی دوران تکامل که در معرض این مواد قرار داشته‌اند، مکانیزم‌های متعددی برای مقابله با اثرات آنها ایجاد کرده باشند[19].

رادیکال‌های آزاد و از سوی دیگر عوامل محیطی اکسیداتیو مثل فلزات سنگینی همچون سرب، قابلیت آسیب‌رساندن به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و ایجاد اختلال در عملکرد این ماکرومولکول‌ها را دارند. در مطالعات اخیر استرس اکسیداتیو یکی از کشنده‌ترین مکانیزم‌های موثر سمیت فلزات سنگینی همچون سرب مطرح شده است. بدن انسان مکانیزم‌های متعددی را برای مواجهه با این استرس‌های اکسیداتیو در پیش می‌گیرد که مهم‌ترین آنها تولید آنتی‌اکسیدان‌ها است[20]. در نتیجه فعال‌شدن مسیر استرس اکسیداتیو در سلول در اثر مواجهه با ترکیبات اکسیدان از جمله فلزات سنگینی چون سرب میزان بیان ژن‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مسئول این مسیر که حاوی توالی ARE در پروموتور خود هستند، افزایش می‌یابد و در اثر کاهش عامل استرس اکسیداتیو بیان این ژن‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند. عوامل متعددی که اکثراً آنتی‌اکسیدان هستند، می‌توانند در کاهش استرس اکسیداتیو موثر باشند و در نهایت باعث کاهش بیان ژن‌های مربوط به این مسیر شوند. یکی از این ترکیبات کورکومین است. نتیجه پژوهش‌هایی که تاکنون روی کورکومین انجام شده است، نشان می‌دهد که این ماده با تاثیر بر مسیرهای متابولیک سلولی، خاصیت شلاته‌کنندگی و افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های دتوکسی‌کننده از طریق مسیر Nrf2/keap1/ARE، باعث کاهش سمیت فلزات سنگینی همچون سرب می‌شود[21].

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که نانوکورکومین در غلظت‌های کمتر از ۱۰میکرومولار دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و در غلظت‌های بیشتر از آن دارای خاصیت القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده و استرس اکسیداتیو است[22]. در مطالعه‌ای که پیش از این توسط *مطهری* و همکاران انجام شده، رده سلولی تحت عنوان Huh7-1x-ARE-luc از کبد انسان تهیه شده است[13]. این رده سلولی دارای یک هسته پروموتر ۳۱نوکلئوتیدی از ژن *ARE 1NQO* انسان (ژن هدف *Nrf2*) است و با توجه به بیان پروموتور ARE، می‌تواند تحت آزمایش لوسیفرازی قرار گیرد. به این ترتیب که ژن لوسیفراز در غلظت‌های پایین نانوکورمین که در آن استرس اکسیداتیو ایجاد نمی‌شود بیانی ندارد و این نشان‌دهنده اختصاصیت حسگر زیستی به ترکیبات اکسیداتیو است. در حالی که با افزایش غلظت نانوکورکومین با ایجاد خاصیت اکسیداتیو بیان ژن گزارشگر افزایش می‌یابد. بنابراین از این خصوصیات می‌توان در ارزیابی دفع سمیت فلزات سنگین بهره گرفت. در نتایج آزمایش‌های قبلی که توسط *کاووسی* و همکاران روی همین رده سلولی و با همین شرایط انجام شده بود، نیز مشخص شد که غلظت ۳۰میکرومولار سرب قادر به القای حداکثری خاصیت اکسیدانی در این سلول‌ها است. به این ترتیب می‌توان از این غلظت سرب به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش‌های لوسیفرازی بعدی استفاده کرد[17].

آزمایش بعدی تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۰میکرومولار از سرب به همراه مقادیر افزایش‌یافته شیر بود. با توجه به نمودار ۳، می‌توان گفت که با افزایش میزان شیر در محیط کشت سلول‌ها اثر اکسیداتیو سرب تا حدودی خنثی شده است. در حالت پایه (سلول‌های کنترل بدون تیمار) فعالیت لوسیفرازی در پایین‌ترین مقدار خود قرار دارد. در حالتی که میزان۳۰میکرومولار سرب به‌عنوان کنترل مثبت در محیط کشت حضور دارد، بالاترین فعالیت لوسیفرازی مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده خاصیت اکسیدانی شدید سرب است. با افزایش میزان شیر در محیط (مثلا ۴۰میکرولیتر) خاصیت اکسیدانی سرب به میزان زیادی کاهش یافته است.

از آنجایی که نانوکورکومین در غلظت‌های مختلف اثرات دو سویه اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی را اعمال می‌کند بیوسنسور سلولی Huh7-ARE-1x-luc در غلظت‌های مختلف این ماده پاسخ‌های مختلفی را ایجاد می‌کند. در نمونه‌های تیمارشده با غلظت ۳۰میکرومولار از سرب و غلظت‌های ۴ و ۸میکرومولار از نانوکورکومین، فعالیت لوسیفرازی کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین در این غلظت است و خاصیت اکسیدانی سرب را به میزان قابل توجه‌ای خنثی می‌کند. در مقابل، تیمار با سرب و غلظت‌های ۱۶ و ۲۰میکرومولار نانوکورکومین منجر به افزایش فعالیت لوسیفرازی می‌شود که خاصیت اکسیدانی کورکومین در غلظت‌های بالا را نشان می‌دهد[12].

با توجه به نتایج استنباط‌شده از مطالعات پیشین[12, 13, 17]، غلظت‌های ۴ و ۸میکرومولار نانوکورکومین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان انتخاب و تیمار سلول‌ها با شیر و نانوکورکومین به صورت همزمان برای دست‌یابی به کارآیی بالاتر در سلول‌های تحت استرس اکسیداتیو انجام شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت ۳۰میکرومولار سرب، ۴میکرومولار نانوکورکومین و شیر تیمار شدند. با اضافه‌شدن نانوکورکومین، کاهش فعالیت لوسیفرازی که به معنی کاهش آسیب اکسیداتیو سلول‌ها است، به طرز قابل توجه‌ای مشاهده شد که بسیار بیشتر از اثر شیر به‌تنهایی بود. با مقایسه این نتایج با نتایج قبلی می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب شیر و نانوکورکومین اثر اکسیدانی قوی‌تری نسبت به استفاده از شیر به‌تنهایی روی سلول‌ها دارد. به این ترتیب می‌توان از شیر غنی‌شده با نانوکورکومین به‌منظور خنثی‌کردن استرس اکسیداتیو برای مصرف روزانه افراد در معرض آلودگی هوا و سمیت سرب از جمله پلیس راهور استفاده کرد.

در نهایت از غلظت ۸میکرومولار نانوکورکومین نیز برای دست‌یابی به غلظت مناسب در خنثی‌کردن اثر سمیت سرب به کمک شیر نیز استفاده شد. در این حالت نیز کاهش خاصیت اکسیدانی سرب از طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین به‌وضوح قابل مشاهده است که بسیار بیشتر از تاثیر شیر به‌تنهایی است. در مقایسه با حالت مشابه با غلظت ۴میکرومولار نانوکورکومین، تغییرات با شیب کمتری انجام شده است که بیان می‌کند می‌توان از غلظت ۴میکرومولار نانوکورکومین به‌عنوان غلظت بهینه در خنثی‌کردن سمیت ناشی از مواد اکسیدان موجود در محیط از جمله سرب بهره برد.

نتیجه‌گیری

در زندگی ماشینی عصر حاضر وجود آلاینده‌های زیست‌محیطی از جمله سرب ناشی از سوخت خودروها، جزء جدانشدنی زندگی بشر شده است که به دنبال آن بیماری‌های گوناگونی از جمله بیماری‌های تنفسی افزایش پیدا کرده‌اند. خطرات آلودگی هوا برای افرادی از جمله پلیس راهور که از لحاظ شغلی در معرض این آلاینده‌ها هستند و کسانی که در محیط‌های صنعتی فعالیت دارند

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر است. بنابراین برای کاهش اثرات این آلاینده‌ها باید در سبد تغذیه این افراد آن دسته از مواد غذایی که تاثیر مناسبی در کاهش اثرات منفی این آلاینده‌ها دارند گنجانده شود. شیر به‌عنوان یکی از مواد تغذیه‌ای که تاثیرات مثبتی در کاهش اثرات منفی آلاینده‌ها دارد همواره به‌عنوان یک گزینه تغذیه‌ای توسط کارشناسان علوم تغذیه توصیه می‌شود. در این مطالعه تاثیر مصرف همزمان شیر و غلظت‌های مناسب نانوکورکومین بر کاهش استرس اکسیداتیو بررسی شد. با توجه به نتایج مثبتی که شیر حاوی نانوکورکومین در مقایسه با شیر بدون آن در کاهش میزان سمیت سرب در رده سلولی مورد مطالعه نشان داده است، می‌توان از شیر غنی‌شده با نانوکورکومین برای خنثی‌کردن استرس اکسیداتیو برای مصرف روزانه افراد در معرض آلودگی هوا و سمیت سرب از جمله پلیس راهور بهره برد.

تشکر و قدردانی: این پژوهش نتیجه بخشی از یک طرح تحقیقاتی مشترک است که با حمایت مالی و معنوی پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا و آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که بدین وسیله کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع: این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارد.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سیداحمد سیداحمدیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/ پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ شیرین جلیلی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/ نگارنده بحث (۲۵%)؛ هادی شیرزاد (نویسنده سوم)، روش‌شناس/ نگارنده بحث (۲۵%)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری/ نگارنده بحث (۲۵%).

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا انجام شده است.

منابع

1- Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. Japi. 2004;52(794804):794-804.

2- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip Toxicol. 2014;7(2):60-72.

3- Papanikolaou NC, Hatzidaki EG, Belivanis S, Tzanakakis GN, Tsatsakis AM. Lead toxicity update. A brief review. Med Sci Monit. 2005;11(10):RA329-36.

4- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact. 2014;224:164-75.

5- Malekirad AA, Fani A, Abdollahi M, Oryan SH, Babapour V, Shariatzade SM, et al. Blood-urine and cognitive-mental parameters in mine workers exposed to lead and zinc. Arak Med Univ J. 2011;13(4):106-13. [Persian]

6- Noriega GO, Tomaro ML, Del Batlle AM. Bilirubin is highly effective in preventing in vivo δ-aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage. Biochimica et Biophysica Acta. 2003;1638(2):173-8.

7- Flora SJ, Flora G, Saxena G, Mishra M. Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. Cell Mol Biol. 2007;53(1):26-47.

8- Patil A, Bhagwat V, Patil J, Dongre N, Ambekar J, Jailkhani R, et al. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. Int J Environ Res Public Health. 2006;3(4):329-37.

9- Perez RR, Sousa CA, Vankeersbilck T, Machado MD, Soares EV. Evaluation of the role of glutathione in the lead-induced toxicity in Saccharomyces cerevisiae. Curr Microbiol. 2013;67(3):300-5.

10- Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega KM, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, et al. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. Oxida Med Cell Longev. 2012;2012:269039.

11- Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. Redox Biol. 2013;1(1):448-56.

12- Kavoosi S, Shirzad H, Jalili Sh, Sadeghizadeh M. Monitoring the nanocurcumin effect on lead exposure in the Huh7-1x-ARE-luc cell line. Pathobiol Res. 2016;19(3):73-88. [Persian]

13- Motahari P, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, Sabri S, Zolghadr F. Generation of stable ARE-driven reporter system for monitoring oxidative stress. DARU J Pharm Sci. 2015;23(1):38.

14- Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. Int J Nanomed. 2014;9(1):403-17.

15- Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Hosseinpour Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. Int Immunopharmacol. 2012;12(1):226-34.

16- Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. Prog Biol Sci. 2015;5(2):143-58.

17- Kavoosi S, Shirzad H, Jalili Sh, Sadeghizadeh M, Motahari P. Monitoring lead toxicity by Huh7-1x-ARE-luc cell line lucifersae biosensor. Modares J Biotechnol. 2019;10(1):125-31. [Persian]

18- Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 2015;4:180-3.

19- Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, Leon R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. Pharmacol Ther. 2016;157:84-104.

20- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur J Med Chem. 2015;97:55-74.

21- Fuentes F, Gomez Y, Paredes-Gonzalez X, Barve A, Nair S, Yu S, et al. Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by a combination of curcumin and sulforaphane. J Chin Pharm Sci. 2016;25(8):559-69.

22- Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, Priyadarsini KI. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. Chem Biol Interact. 2008;174(2):134-9.

www.SID.ir