



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-Curcumin 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 luciferase 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

¹Nutrition Sciences & Food Technology Research Center, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Research Institute of Police Science & Social Studies, Tehran, Iran

³Genetics 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

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 متابولیسم 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 ۳۰ میکرومولار سرب به‌عنوان یک اکسیدان قوی قرار گرفت. سپس روی رده سلولی مذکور، اثر آنتی‌اکسیدانی شیر کم‌چرب و پرچرب (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر)، نانوکورکومین در غلظت‌های آنتی‌اکسیدان (۴ و ۸ میکرومولار) 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 ۳۰ میکرومولار سرب، ۲۰ میکرولیتر شیر و ۴ میکرومولار نانوکورکومین) نسبت به شیر فاقد نانوکورکومین (ترکیب ۳۰ میکرومولار سرب و ۸۰ میکرولیتر 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 لوسیفراز

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 آگروز 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 ۵-۵۰ppm 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. علائم 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 ۱ppm/۰ و معادل ۰/۱ میلی‌گرم 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 پراکسید هیدروژن 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 در نتیجه 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 پراکسید هیدروژن، 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: Aminolevulinic acid dehydrates) دچار مشکل می‌کند^[6,7].

آلودگی‌های حاصل از ترافیک هستند، در این پژوهش سعی شده است اثر آنتی‌اکسیدانی شیر با شیر حاوی نانوکوکومین مقایسه شود و قابلیت دفع سرب توسط شیر به‌تنهایی و شیر حاوی نانوکوکومین و همچنین مناسب‌ترین غلظتی از نانوکوکومین 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 پروموتور پاسخ‌گو به اکسیدان‌ها است (زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc) برای بررسی تاثیر شیر و شیر حاوی نانوکوکومین 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 کارایی 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 اولئیل کلرید (۳/۰ گرم؛ سیگما؛ ایالات متحده) و پلی‌اتیلن‌گلیکول ۴۰۰ (PEG 400؛ ۴ گرم؛ سیگما؛ ایالات متحده) در حضور تری‌اتیل‌آمین (۲/۱ گرم؛ 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 ۴ ساعت به دست آمد^[16]. نانوکوکومین مطابق دستورالعمل بهینه‌شده‌ای که در مطالعات قبلی انجام شده بود، آماده‌سازی شد^[15]. به‌طور خلاصه طیف غلظتی از نانوکوکومین (نسبت ۱:۵۰ تا ۱:۱۰) به‌منظور انتخاب نسبت مناسب از نانوکوکومین توسط اسپکتروفتومتری بررسی و در نهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به‌عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نانوکوکومین با غلظت ۲۷۰۰ میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور و ۴°C نگهداری شد.

سنجش میزان بیان لوسیفراز در رده سلولی Huh7-ARE-1x-luc

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 تیمار شده با سرب استفاده شد. غلظت سرب به‌کاررفته به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی ۳۰ میکرومولار است که در مطالعه مربوط به کاووسی و همکاران به روش MTT و لوسیفراز قبلاً به دست آمده است^[17].

سرب همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون (GHS) را در انسان و سایر موجودات زنده دچار تغییر می‌کند. از سویی باعث هیپرتانسیون و 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 *GSTYα* تاثیر می‌گذارد و باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود^[10]. به نظر می‌رسد که کورکومین باعث جلوگیری از تخلیه GSH، 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 پروموتور 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 نانوکوکومین 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 سبب غذایی خانواده‌ها قرار گیرد، به‌خصوص در سبب تغذیه افرادی مانند پلیس راهور که در معرض شدید

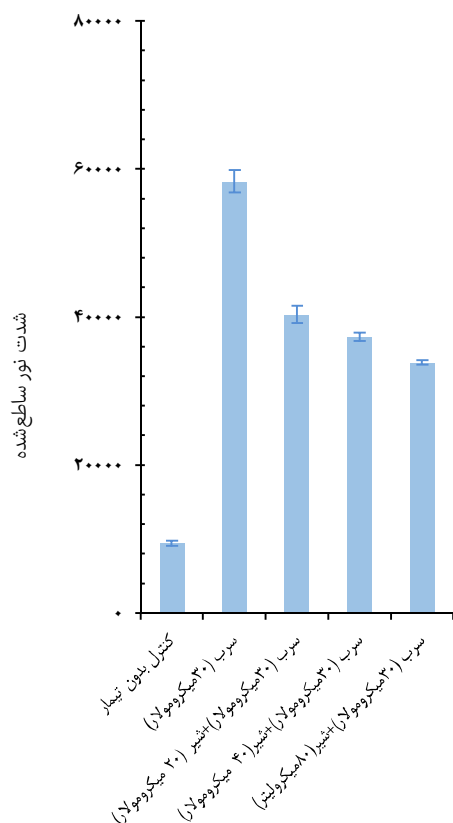
تحلیل‌های آماری

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 ۳۰ میکرومولار منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و پاسخ سلولی بیوسنسور به صورت افزایش شدید در فعالیت لوسیفراز می‌شود، یکی از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش (استرس اکسیداتیو شدید) با غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب تیمار شد. کنترل منفی نیز سلول‌های بدون تیمار هستند که حداقل فعالیت لوسیفراز (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.



مقادیر افزایش‌یافته شیر

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

به این منظور سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت و پس از ۲۴ ساعت تیمار با سرب ۳۰ میکرومولار و شیر در مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر (به‌عنوان آنتی‌اکسیدان) لیز شدند. به این ترتیب که پس از تخلیه محیط کشت و شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات‌سالین (PBS)، به هر چاهک ۷۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه شد (جدول ۱) و پلیت به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه بر روی ظرف یخ شیک شد. پس از خراشیدن کف سلول به‌منظور اطمینان از کنده‌شدن تمامی سلول‌ها، عصاره سلولی جمع‌آوری و ۵۰ میکرولیتر از محصول لیزشده همراه با ۵۰ میکرولیتر کمپلکس سنجش در داخل لوله مخصوص لومینومتر مخلوط شد (جدول ۲) و به دستگاه لومینومتر که روی طول موج ۵۶۰ نانومتر 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

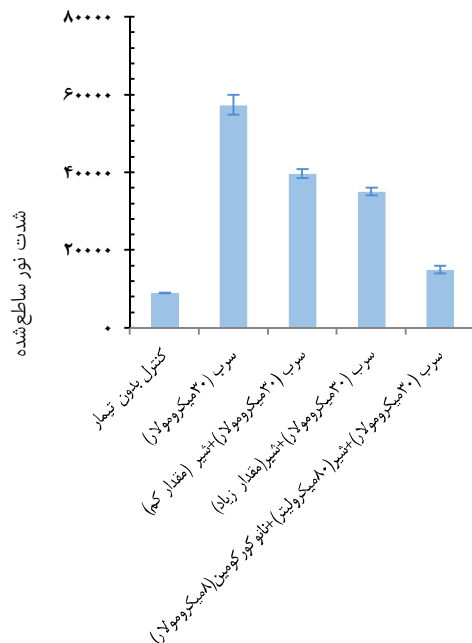
مواد	غلظت
فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF)	۱ میلی‌مولار
سدیم کلرید	۱۵۰ میلی‌مولار
تریس کلرید (Tris-Cl)	۱۵۰ میلی‌مولار
اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید (EDTA)	۱ میلی‌مولار
تری‌تون ایکس-۱۰۰ (Triton X-100)	۱٪

جدول ۲) مواد مورد استفاده برای تهیه کمپلکس سنجش لوسیفراز

مواد	غلظت (میلی‌مولار)
لوسیفیرین	۲
منیزیم‌سولفات (MgSO ₄)	۱۰
ATP	۴
بافر تریس	۵

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

در این مرحله به‌منظور تقویت اثر آنتی‌اکسیدانی شیر علیه استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط سرب (۳۰ میکرومولار)، از غلظت‌های آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین (۸-۴۰ میکرومولار) همراه با مقادیر متفاوتی از شیر (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر) به صورت همزمان استفاده شد. غلظت‌های مناسب آنتی‌اکسیدانی نانوکورکومین (۸-۴۰ میکرومولار) از طریق واکنش لوسیفراز 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 ۳۰ میکرومولار از سرب به‌منظور ایجاد استرس اکسیداتیو و مقادیر مختلف از شیر و نانوکورکومین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس به‌منظور سنجش فعالیت لوسیفراز 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.



نانوکورکومین ۸ میکرومولار

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

بحث

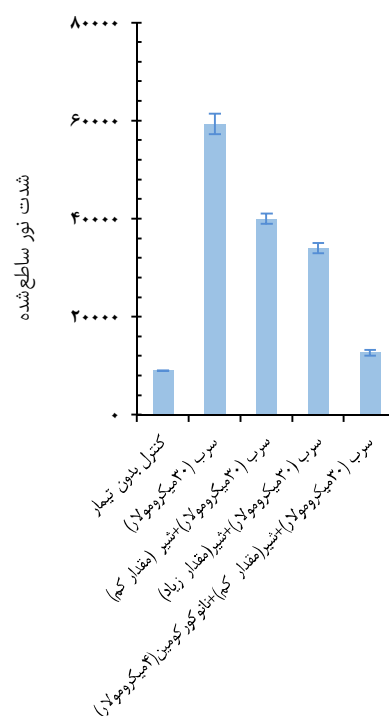
زندگی مدرن امروزی همراه با افزایش استرس‌های محیطی و مواجهه با مواد شیمیایی و آلودگی‌ها باعث تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود. رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی با نیمه‌عمر پایین و ناپایدار هستند که با شرکت در واکنش‌های شیمیایی مختلف و کسب الکترون قادر به ایجاد ترکیب پایدار خواهند شد [18]. ترکیبات اکسیداتیو گروهی از این رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن هستند. این گونه‌های واکنش‌پذیر به صورت طبیعی محصول جانبی متابولیسم ناشی از اکسیژن هستند. در صورت به هم خوردن تعادل بین این ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌ها شرایطی ایجاد می‌شود که استرس اکسیداتیو خوانده می‌شود. در نتیجه 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 فعال شدن مسیر استرس اکسیداتیو در سلول در اثر مواجهه با ترکیبات اکسیدان از جمله فلزات سنگینی چون سرب میزان بیان ژن‌های

نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با سرب و شیر حاوی نانوکورکومین

غلظت ۴ میکرومولار نانوکورکومین

نانوکورکومین در غلظت‌های مشخصی (کمتر از ۱۰ میکرومولار) 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 ۳۰ میکرومولار به همراه غلظت ۴ میکرومولار 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 خنثی کردن اثر سمیت سرب به مقدار قابل توجهی بوده است.



نانوکورکومین ۴ میکرومولار

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

غلظت ۸ میکرومولار نانوکورکومین

تیمار سلول‌ها در حالتی مشابه با حالت قبل (ترکیب سرب، شیر و نانوکورکومین)، اما این بار در حضور غلظت ۸ میکرومولار 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 خنثی کردن اثر سمیت سرب به مقدار قابل توجهی بوده است.

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 10^6 میکرومولار 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 پروموتور ۳۱ نوکلئوتیدی از ژن ARE $1NQO$ انسان (ژن هدف $Nrf2$) است و با توجه به بیان پروموتور ARE، می‌تواند تحت آزمایش لوسیفراز قرار گیرد. به این ترتیب که ژن لوسیفراز در غلظت‌های پایین نانوکورکومین 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 3×10^6 میکرومولار سرب قادر به القای حداکثری خاصیت اکسیدانی در این سلول‌ها است. به این ترتیب می‌توان از این غلظت سرب به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش‌های لوسیفراز بعدی استفاده کرد [17].

آزمایش بعدی تیمار سلول‌ها با غلظت 3×10^6 میکرومولار 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 لوسیفراز در پایین‌ترین مقدار خود قرار دارد. در حالتی که میزان 3×10^6 میکرومولار سرب به‌عنوان کنترل مثبت در محیط کشت حضور دارد، بالاترین فعالیت لوسیفراز مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده خاصیت اکسیدانی شدید سرب است. با افزایش میزان شیر در محیط (مثلاً 4×10^6 میکرولیتر) 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 تیمار شده با غلظت 3×10^6 میکرومولار از سرب و غلظت‌های ۴ و 8×10^6 میکرومولار از نانوکورکومین، فعالیت لوسیفراز 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 2×10^6 میکرومولار نانوکورکومین منجر به افزایش فعالیت لوسیفراز 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 8×10^6 میکرومولار نانوکورکومین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان انتخاب و تیمار سلول‌ها با شیر و نانوکورکومین به صورت همزمان برای دستیابی به کارایی بالاتر در سلول‌های تحت استرس اکسیداتیو انجام شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت 3×10^6 میکرومولار سرب، 4×10^6 میکرومولار نانوکورکومین و شیر تیمار شدند. با اضافه‌شدن نانوکورکومین، کاهش فعالیت لوسیفراز 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 8×10^6 میکرومولار 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 4×10^6 میکرومولار نانوکورکومین، تغییرات با شیب کمتری انجام شده است که بیان می‌کند می‌توان از غلظت 4×10^6 میکرومولار 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

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. *Oxid 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- Kavooosi 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, Bilal 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- Kavooosi 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.

بیشتر است. بنابراین برای کاهش اثرات این آلاینده‌ها باید در سبذ تغذیه این افراد آن دسته از مواد غذایی که تاثیر مناسبی در کاهش اثرات منفی این آلاینده‌ها دارند گنجانده شود. شیر به عنوان یکی از مواد تغذیه‌ای که تاثیرات مثبتی در کاهش اثرات منفی آلاینده‌ها دارد همواره به عنوان یک گزینه تغذیه‌ای توسط کارشناسان علوم تغذیه توصیه می‌شود. در این مطالعه تاثیر مصرف همزمان شیر و غلظت‌های مناسب نانوکوکومین بر کاهش استرس اکسیداتیو بررسی شد. با توجه به نتایج مثبتی که شیر حاوی نانوکوکومین در مقایسه با شیر بدون آن در کاهش میزان سمیت سرب در رده سلولی مورد مطالعه نشان داده است، می‌توان از شیر غنی‌شده با نانوکوکومین 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 هیچ گونه تعارض منافی 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- Malekiran 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