Investigating the effect of alpha-amanitin on the proliferation of HepG2 cells cultured on the amniotic membrane containing HUVEC cells

Ghazaleh Hajimokhtari[1], Hanieh Jafary[1*], Zahra Kianmehr[2]

1. Department of Biology, SR. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University

Abstract

Aim and Background: The use of chemical drugs to treat liver cancer has many side effects. Therefore, the use of a drug that can affect the survival of cancer cells with fewer side effects is of great importance. The aim of the present study was to investigate the inhibitory effect of alpha-amanitin on HepG2 cells.

Materials and Methods: In this study, HepG2 cells were cultured on amniotic membrane containing HUVEC and after treatment with alpha-amanitin, cell viability was assessed using MTT assay and apoptosis was assessed using flow cytometry. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) were quantified using calorimetry. Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) levels were assessed using immunocytochemistry (ICC).

Results: The results of the MTT test showed that the treatment of HepG2-Amnion and HepG2-Amnion-HUVEC cells with concentrations of 250 and 500 pg/ml of alpha-amanitin significantly reduced the viability of HepG2 cells. Also, the results of flow cytometry showed that the incidence of apoptosis in HepG2-Amnion-HUVEC and HepG2-Amnion cells treated with alpha-amanitin significantly increased. The results of the biochemical test showed an increase in the levels of MDA, TOS and a decrease in the levels of SOD and TAC in both groups co-cultured with amnion and Amnion-HUVEC and treated with alpha-amanitin. The results of the ICC showed that the expression of TNF-α protein in both groups treated with alpha-amanitin significantly increased.

Conclusion: Using amniotic membrane to culture HepG2 cells can result in a significant anticancer effect of alpha-amanitin on this type of cell.

Keywords: Alpha-Amanitin, Hepatocellular Carcinoma, Amniotic Membrane, Apoptosis, TNF-α, HepG2

***Corresponding author:**
Science and Research Branch, shohada Hesarak blvd, Daneshgah Square, Sattari Highway, Tehran, I.R. IRAN,
E-mail: h-jafary@iau.ac.ir

بررسی تأثیر آلفا-آمانیتین بر تکثیر سلول‌های HepG2 کشت داده‌شده بر غشای آمنیونی حاوی سلول HUVEC

غزاله حاجی مختاری[۱]، هانیه جعفری[۱*]، زهرا کیان‌مهر[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ علوم‌زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از داروهای شیمیایی به‌منظور درمان سرطان کبد دارای عوارض جانبی متعددی می‌باشد. ازاین‌رو استفاده از دارویی که با عوارض کمتر بتواند بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تأثیرگذار باشد از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. هدف از مطالعهٔ حاضر، بررسی تأثیر مهاری آلفا-آمانیتین بر سلول‌های HepG2 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، کشت سلول‌های HepG2 بر روی پردهٔ آمنیون حاوی HUVEC انجام شد و پس از تیمار با آلفا-آمانیتین، زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از تست MTT و میزان آپوپتوز با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد. تعیین کمیّت مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، میزان فعالیت آنزیمی سوپراُکسید دیسموتاز (SOD)، وضعیت اُکسیدانی کل (TOS) و ظرفیت آنتی‌اُکسیدانی کل (TAC) با استفاده از روش کالریمتری انجام شد. ارزیابی میزان فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) با تکنیک ایمونوسیتوشیمی (ICC) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تست MTT نشان داد که تیمار سلول‌های HepG2-Amnion و HepG2-Amnion-HUVEC با غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر داروی آلفا-آمانیتین باعث کاهش معنادارِ زنده‌مانی سلول‌های HepG2 شد. همچنین نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بروز آپوپتوز در سلول‌های HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با آلفا-آمانیتین به‌طور معناداری افزایش یافته است. نتایج آزمون بیوشیمیایی افزایش میزان MDA، TOS و کاهش سطح SOD و TAC را در هر دو گروه هم‌کِشتی‌شده با آمنیون و Amnion-HUVEC و تیمارشده با آلفا-آمانیتین را نشان داد. نتایج ICC نشان داد که میزان بیان پروتئین TNF-α در هر دو گروه تیمارشده با آلفا-آمانیتین افزایش معناداری داشته است.

نتیجه‌گیری: استفاده از غشای آمنیونی برای کشت سلول‌های HepG2 می‌تواند سبب تأثیر ضدسرطانی قابل‌توجه آلفا-آمانیتین بر این نوع سلول‌ها شود.

واژگان کلیدی: آلفا-آمانیتین، سرطان کبد، پردهٔ آمنیون، آپوپتوز، TNF-α، HepG2 .

نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم‌وتحقیقات، تهران، ایران

-پست الکترونیکی:
h-jafary@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰

۱- مقدمه

هر سال حدود ۰/۸ میلیون مورد جدید بالینی سرطان کبد تشخیص داده می‌شود. براساس گزارش‌های نظارتی سازمان جهانی بهداشت، تنها در سال ۲۰۲۰ حدود ۸۳۰۱۸۰ نفر از این بیماری در سراسر جهان جان خود را از دست دادند و به‌نظر می‌رسد این رقم روزانه درحال افزایش است (۱). در میان انواع مختلف سرطان کبد، کارسینوم سلول‌های کبدی[1] (HCC) شایع‌ترین نوع است و تقریباً ۸۵ درصد موارد سرطان اولیهٔ کبد را تشکیل می‌دهد و اغلب در افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن کبدی رخ می‌دهد. این شایع‌ترین و دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در کشورهای آسیایی و جنوب صحرای آفریقا است (۲). عوامل خطر اصلی برای HCC شامل مصرف مزمنِ الکل، هپاتیت B و C و نیز بیماری کبد چرب غیرالکلی است (۳). در سال‌های اخیر، تلاش‌های متعددی برای مدیریت HCC با استفاده از روش‌های شیمی‌درمانیِ مختلف صورت گرفته است که مهارکننده‌های تیروزین کیناز هدفمند، ایمونوتراپی و درمان‌های ترکیبی ضدسرطان از اصلی‌ترین آن‌ها هستند (۴). همچنین برداشتن عضو با جراحی، انتخاب اولیه برای درمان HCC است؛ جراحی می‌تواند احتمال بروز متاستاز را افزایش دهد و همین امر یکی از عوامل محدود کردن این روشِ درمانی محسوب می‌شود. همچنین با توجه به تعداد کم داروهای موجود برای درمان HCC، شیمی‌درمانی نمی‌تواند موفقیت صددرصد را برای درمان HCC تضمین نماید. ازاین‌رو نیاز به روش درمانیِ کم‌خطرتر و سالم‌تر برای مقابله با سرطان HCC احساس می‌شود (۵ و ۶).

درحال‌حاضر، ریزمحیط تومورِی سرکوب‌کنندهٔ تومور می‌تواند چشم‌اندازی برای ایجاد ایمنی علیه سرطان باشند. پژوهشی توسط Liao در سال ۲۰۲۲ بر روی نقش سلول‌های ایمنیِ ذاتی مانند نوتروفیل‌ها، سلول‌های کُشندهٔ طبیعی، ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک در ریزمحیطِ توموری کبد انجام شد. نتایج تحقیق‌های وی موجب روشن‌شدن تعامل سیستم ایمنی و تومور توسعه‌یافته در پیشرفت تومور و مقاومت درمانی گردید. ریزمحیط توموری می‌تواند یک سرکوب‌کنندهٔ قوی برای آنزیم‌هایی باشد که در رشد و تقسیم سلولی نقش دارند. این یافته‌ها بر ضرورت شناختِ ریزمحیط‌های توموری برای دستیابی به درمان دقیق و موفق تأکید دارند (۷).

اکسیداسیون که در بیش از یک‌چهارم واکنش‌های شیمیایی شناخته شده است، توسط آنزیم‌های اختصاصی در سلول‌های زنده کاتالیز می‌شوند. اکسیژن یک مولکول بسیار واکنش‌پذیر است که با تولید گونه‌های اکسیژن فعال از جمله پراُکسید هیدروژن (H_2O_2)، اسیدهیپوکلرو (HOCl) و رادیکال‌های آزاد (مانند رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، آنیون‌سوپراُکسید (O_2^{-}) و پراُکسیدهای لیپیدی می‌تواند به سلول‌های زنده آسیب برساند. این گونه‌های شیمیاییِ اکسیژن می‌توانند به‌طور موقت یا دائمی به اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب بزنند. آسیب اکسیداتیو به این ماکرومولکول‌های سلولی در پیدایش چندین بیماری از جمله سرطان نقش دارد (۸ و ۹).

التهاب مزمن یک عامل خطر شناخته‌شده برای ایجاد و پیشرفت سرطان، متاستاز و مقاومت در برابر درمان سرطان است (۱۰). فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) یک سایتوکاین التهابی است و برای اولین‌بار به‌عنوان یک سایتوکین ضدتومور شناسایی شد که باعث نکروز تومور می‌شود. این فاکتور یکی از چندین واسطهٔ موجود در سطوح بالا در تومورهای جامد و سرم بیماران مبتلا به سرطان است که در ایجاد متاستاز نقش دارد (۱۱). یکی از مهم‌ترین شواهد اخیر نشان داده است که TNF-α یک واسطهٔ مرکزیِ التهاب است و بنابراین یک پیوند مولکولی بین التهاب مزمن و توسعهٔ بدخیمی‌ها فراهم می‌کند (۱۲). TNF-α عمدتاً توسط ماکروفاژها تولید می‌شود، اما مطالعه‌هایی نشان داده است که توسط انواع سلول‌های تومور از جمله سرطان کیسهٔ صفرا و کلیه نیز تولید می‌شود و تهاجم تومور و متاستاز را تسهیل می‌نماید (۱۳). مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که بیان TNF-α در HCC به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از بافتِ طبیعی کبد است (۱۴ و ۱۵).

داروهای هدفمند متفاوتی جهت مقابله با سرطان کبد تولید شده‌اند که با عوارضِ جانبی شدید

[1] Hepato Cellular Carcinoma

همراه هستند. آلفا-آمانیتین با فرمولِ شیمیایی $C_{39}H_{54}N_{10}O_{14}S$ یک اُکتاپپتید[1] حلقوی بسیار سمّی است که در جنسی از قارچ‌های معروف به *Amanita* از جمله *Amanita phalloides*، *Amanita verna* و *Amanita virosa* یافت می‌شود. سمیّت سلولی یافت‌شده در آمانیتین نتیجهٔ مهار RNAپلیمرازها به‌ویژه RNAپلیمراز II است که از سنتز mRNA جلوگیری می‌کند (۱۶). مطالعه‌های تجربی درون‌تنی (*In-vivo*) و برون‌تنی (*In-vitro*) و *In-vivo* نشان می‌دهد که آلفا-آمانیتین نه‌تنها باعث نکروز سلول‌های کبدی می‌شود، بلکه ممکن است منجر به مرگ‌سلولیِ آپوپتوز شود. علاوه‌بر این، افزودن آلفا-آمانیتین به سلول‌های کبدی کشت‌شده باعث ایجاد نکروز و آپوپتوز می‌شود و علائم مورفولوژیکی این دو نوع مرگ‌سلولی هم‌زمان رخ می‌دهد (۱۷). در پژوهش حاضر، پس از هم‌کِشتی سلول‌های HepG2 با پردهٔ آمنیون آسِلولار حاوی سلول‌های HUVEC و تیمار با آلفا-آمانیتین، خواص ضدسرطانی آلفا-آمانیتین بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه پس از خرید ردهٔ سلول‌های HUVEC و HepG2 از مرکز ذخایر ژنتیک ایران، سلول‌ها در محیط RPMI 1640 حاوی FBS 10% کشت داده شدند و جهت تکثیر در انکوباتور قرار گرفتند. تعویض محیط سلول‌ها هر سه روز یک‌بار انجام گردید.

۵۰۰۰ سلول HUVEC در کفِ پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت به سلول‌ها اجازه داده شد تا به کف پلیت بچسبند. پردهٔ آمنیون آسِلولار خریداری‌شده از شرکت سیناسِل-تهران به ابعاد ۴ میلی‌متر در ۴ میلی‌متر روی سلول‌های HUVEC قرار گرفت. ۵۰۰۰ سلول HepG2 در هر چاهک روی پردهٔ آمنیون آسِلولار کشت داده شد.

داروی آلفا-آمانیتین ساخت شرکت ROCHE PHARMA سوئیس خریداری شد و سیتوتوکسیسیتیِ آن در سلول‌های سرطانی HepG2 با استفاده از تست MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ارزیابی شد. در این مطالعه، گروه‌های سلولیِ HepG2 تیمارنشده، HepG2-Aminion-HUVEC، HepG2-Amnion تیمارشده با آلفا-آمانیتین و HepG2-Amnion-HUVEC تحت تیمار با آلفا-آمانیتین موردبررسی قرار گرفتند. سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ۱۰۰ pg/mL، ۲۵۰ pg/mL و ۵۰۰ pg/mL آلفا-آمانیتین کشت داده شدند (۲۳). بعد از ۴۸ ساعت از کشت‌سلول‌ها بر روی پردهٔ آمنیون آسِلولار، سلول‌ها برای تست MTT آماده شد. برای انجام این تست، ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با رقّت ۱/۱۰ از استوک اولیه به هر خانه اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس محلول رویِ سلول‌ها خارج گردید و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[2] اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت میزان جذب در طول‌موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. بهترین غلظت آلفا-آمانیتین برای ارزیابی‌های بعدی انتخاب شد. جهت بررسیِ آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار از کیت آنِکسین خریداری‌شده از شرکت سیگما با CAT NO:A2214-SIGMA استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ۱۰۰ هزار سلول از گروه‌های مختلف سلولی، داخل میکروتیوب ریخته و با ترکیب Binding Buffer 1X موجود در کیت به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب حاوی نمونه با ۵ میکرولیتر از Annexin V/FITC ترکیب گردید. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C و در تاریکی انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، میکروتیوب با ۱ میلی‌لیتر از بافر Binding Buffer 1X با دور ۱۵۰۰rpm و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از Binding Buffer 1X به نمونه‌ها اضافه گردید و در نهایت به نمونه‌ها ۳ میکرولیتر PI[3] اضافه شد و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری calibur BD-Facs (USA) خوانش انجام گردید. برای ترسیم نمودار از نرم‌افزار Flow Jo و آنالیز آماری از نرم‌افزار Prism 5 استفاده شد.

[1] Octapeptide

[2] Dimethyl Sulfoxide
[3] Propidium iodide

جهت ارزیابیِ میزان پراُکسیداسیون لیپیدی MDA (مالون‌دی‌آلدهید) در سلول‌های سرطانی HepG2 تحت تیمار از کیت Zellbio آلمان استفاده شد. همچنین فعالیت آنزیم SOD (سوپراُکسید دیسموتاز)، TOS (وضعیت اُکسیدان کل) و TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل) در سلول‌های HepG2 تیمارشده به‌کمک کیت سنجش آنزیمی کالریمتری ZellBio GmbH، Ulm، آلمان انجام شد.

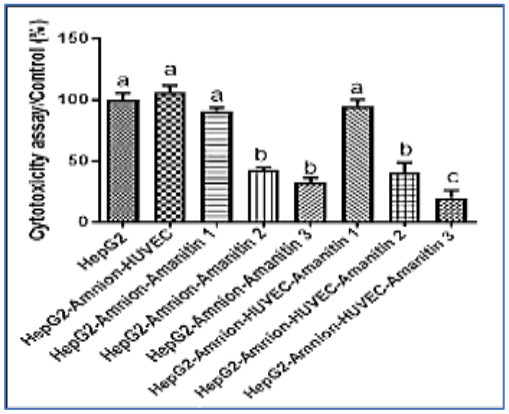
میزان فاکتور TNF-α در گروه‌های مختلف سلولی با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی (ICC) اندازه‌گیری شد. ابتدا سلول‌های داخل پلیت با پارافرمالدئید ۴ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه فیکس‌شده و با Pbs[1] شست‌وشو داده شدند. تریتون ۰/۳ درصد به‌منظور نفوذپذیر کردن غشای سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه شده و دوباره شست‌وشو با Pbs انجام شد. در ادامه به‌منظور مسدودسازیِ واکنش آنتی‌بادی ثانویه، سرمِ بز ۱۰ درصد برای مدت ۴۵ دقیقه به نمونه‌ها اضافه شد. پس از جداسازیِ سرمِ بز از نمونه‌ها، آنتی‌بادیِ اولیهٔ رقیق‌شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به نمونه‌ها اضافه شده و به‌مدت ۲۴ ساعت داخل آن گذاشته شدند. پس از ۲۴ ساعت، پلیت ۴ بار و هربار به‌مدت ۵ دقیقه با PBS شست‌وشو داده شده، سپس آنتی‌بادیِ ثانویه با رقّت ۱ به ۵۰ به نمونه اضافه گردید و در انکوباتور $37^{\circ}C$ (مدل AriaTeb) به‌مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. پس از انتقال نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک و شست‌وشوی آن، به آن‌ها رنگ DAPI اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه نمونه‌ها با PBSشست‌وشو داده شدند. سپس عکس‌برداری فلورسنت با میکروسکوپ Olympus انجام شد (۱۵).

تمامیِ محاسبه‌های آماری در مطالعهٔ حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۰ و نرم‌افزار Prism نسخهٔ ۵ با روش آنالیز واریانسِ یک‌طرفه (ANOVA) و با روش آماریTukey‘s HSD post-hoc test انجام شد و سطح معناداری $p \leq ۰/۰۵$ درنظر گرفته شد. تست‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد. همچنین اطلاعات به‌صورت mean ± standard deviation (SD) نمایش داده شدند.

[1] Phosphate Buffer Saline

۳- نتایج

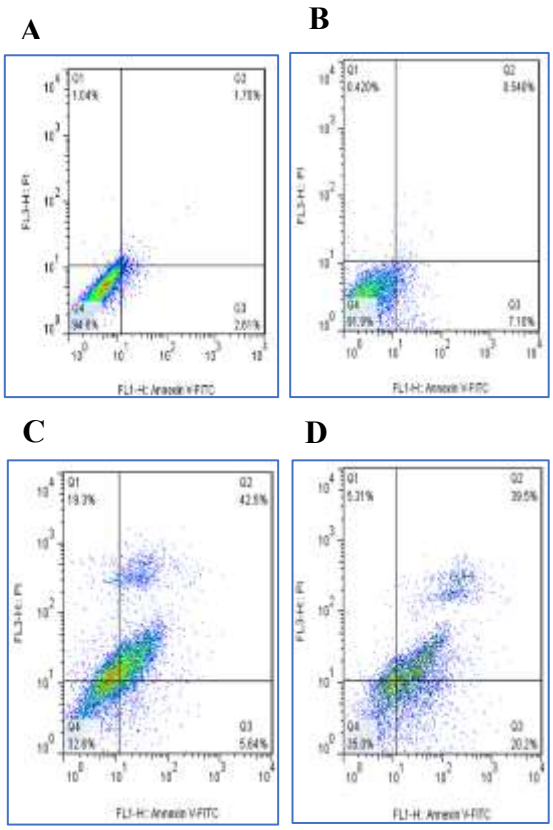
نتایج آزمون MTT نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری بین زنده‌مانی دو گروه HepG2 و سلول‌های HepG2 کشت داده‌شده بر پردهٔ آمنیون و HUVEC و نیز تیمارشده با غلظت pg/mL ۱۰۰ آمانیتین وجود ندارد (نمودار ۱). تیمار گروه‌های سلولی HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion با غلظت‌های pg/mL ۲۵۰ و pg/mL ۵۰۰ آلفا-آمانیتین باعث کاهش معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) در زنده‌مانی سلول های HepG2 شد. زنده‌مانی گروه سلولی HepG2-Amnion-HUVEC تیمارشده با غلظت pg/mL ۵۰۰ آلفا-آمانیتین به‌طور معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) نسبت به گروه سلولیِ تیمارشده با غلظت pg/mL ۲۵۰ کاهش یافت. براساس نتایج به‌دست آمده میزان IC_{50} در این پژوهش برای دو گروه سلولی HepG2-Amnion-Amanitin و HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin به‌ترتیب pg/mL ۲۳۶/۳ و pg/mL ۲۱۷/۱ محاسبه شد.



نمودار ۱- بررسی زنده‌مانیِ سلول‌های HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-Amanitin و HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin با استفاده از تست MTT. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

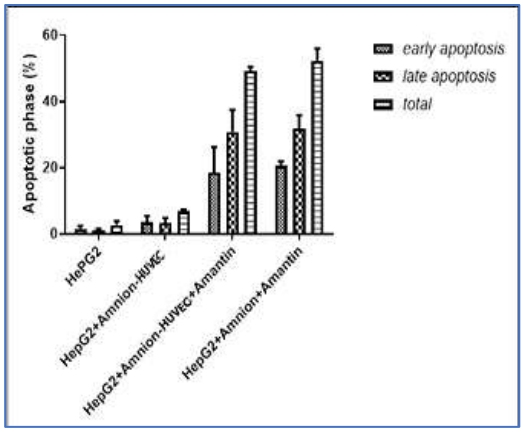
گروه‌های مختلف سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin به‌منظور سنجش میزان آپوپتوز با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری موردارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱). مطابق با نمودار A و B در شکل ۱، میزان بروز آپوپتوز در گروه‌های سلولی HepG2 و HepG2-Amnion-HUVEC بسیار ناچیز می‌باشد و تفاوت معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) بین آن‌ها دیده نمی‌شود. این درحالی است که

نمودارهای C و D در شکل ۱ میزان بالای آپوپتوز در گروه‌های سلولی HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion پس از تیمار با آلفا-آمانیتین را نشان می‌دهند که نسبت به گروه‌های تیمارنشده تفاوت معنادار ($p \leq ۰/۰۵$) را نشان می‌دهند (نمودار ۲).



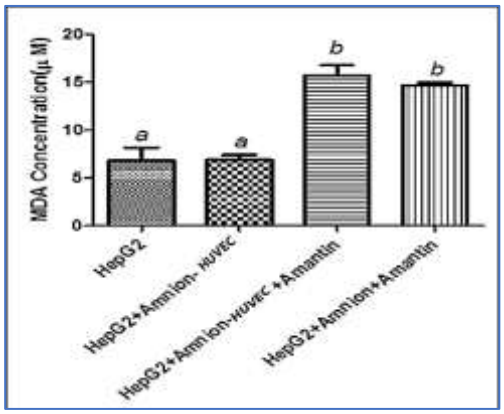
شکل ۱- درصد سلول‌های آپوپتوزشده با استفاده از روش فلوسایتومتری. A) گروه سلول‌های تیمارنشدهٔ HepG2، B) گروه سلول‌های تیمارنشدهٔ HepG2-Amnion-HUVEC، C) گروه سلول‌های تیمارشدهٔ HepG2-Amnion-Amanitin، D) گروه سلول‌های تیمارشدهٔ HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin. Q1: نشان‌دهندهٔ سلول‌های نکروتیک، Q2: نشان دهندهٔ سلول‌های آپوپتوتیک تأخیری، Q3: نشان‌دهندهٔ سلول‌های آپوپتوتیک اولیه و Q4: نشان‌دهندهٔ سلول‌های زنده می‌باشد.

در نمودار ۲ میزان بروز آپوپتوز اولیه، تأخیری و کلی در سلول‌های تیمارنشده و همچنین تیمارشده با آلفا-آمانیتین نشان داده شده است. براساس نمودار ۲ می‌توان مشاهده کرد که به‌طور معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) میزان بروز آپوپتوز اولیه، تأخیری و تام در در دو گروه سلول‌های تیمارشده با آلفا-آمانیتین (HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion) بیشتر از سلول‌های تیمارنشده می‌باشد و تفاوت معناداری در میزان آپوپتوز دو گروه سلول‌های تیمارنشده مشاهده نمی‌شود.



نمودار ۲- میزان بروز آپوپتوز اولیه، تأخیری و کلی در گروه‌های سلولیِ HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

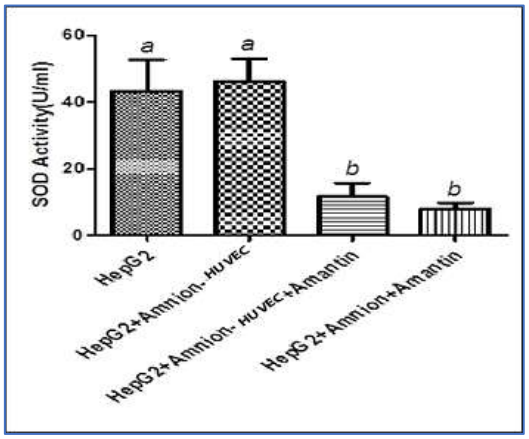
در نمودار ۳ بررسی سطح MDA در گروه‌های مختلف سلولی نشان داد که تفاوت معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) در میزانِ MDA بین دو گروهِ HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با داروی آلفا-آمانیتین دیده نمی‌شود و این درحالی است که افزایش معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) در سطحِ MDA در سلول‌های تیمارشده با آلفا-آمانیتین نسبت به سلول‌های تیمارنشده وجود دارد.



نمودار ۳- سطحِ MDA در گروه‌های سلولیِ HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

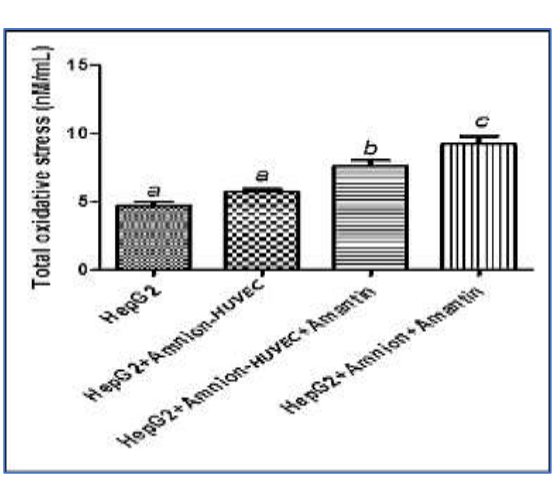
در نمودار ۴ میزان فعالیت آنزیم SOD در سلول‌های گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که هیچ گونه تفاوت معنی‌داری میان دو گروهِ HepG2-

Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشـــــــــده بـا آلفـا-آمـانتین وجـود نـدارد. درحـالی‌کـه کـاهش معنـــاداری ($p \leq ۰/۰۵$) در ســطح فعالیــت آنــزیم SOD در سـلول‌هـای تیمارشـده بـا آلفـا-آمـانیتین نسـبت بـه سلول‌های تیمارنشده دیده می‌شود.



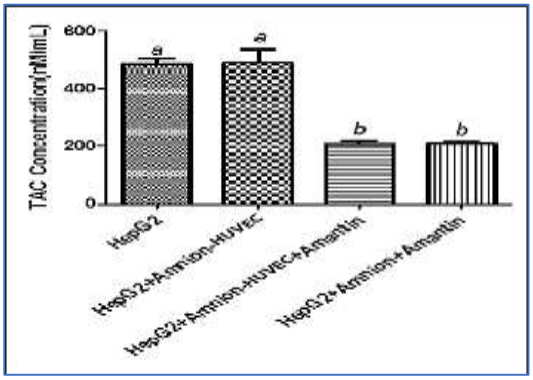
نمودار ۴- میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

بررســی TOS در گــروه‌هــای ســلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، Amnion-HepG2، Amanitin-HUVEC و Amanitin-Amnion-HepG2 در نمودار ۵ نشان داده شده است. مطابق با این نمـودار، تفـاوت معناداری $p \leq ۰/۰۵$ در سطح TOS بین دو گـروه HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با آلفـا-آمانیتین وجود داشت. همچنین افزایش معناداری $p \leq ۰/۰۵$ در سـطح TOS در گـروه‌هـای سـلولی HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion پس از تیمـار در مقایسـه بـا گـروه‌هـای سـلولی HepG2 و HepG2-Amnion-HUVEC تیمارنشده مشاهده شد.



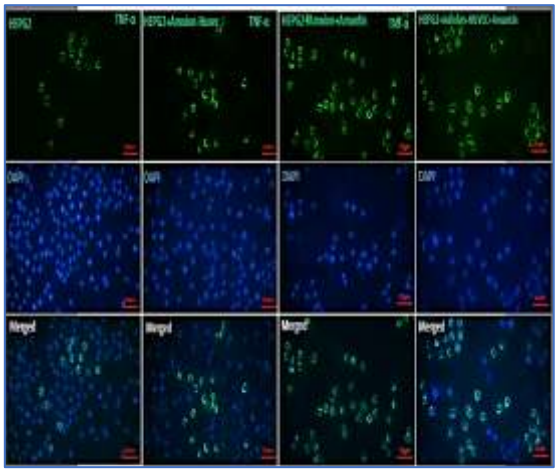
نمودار ۵- وضعیت اُکسیدانی تام سلولی در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

در این پژوهش، ظرفیت آنتی‌اُکسیدانی تام (TAS) در سلول‌های HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2+Amnion-HUVEC+Amanitin و HepG2+Amnion+Amanitin به‌کمک روش کالریمتریک بررسی شد (نمودار ۶). نشان داده شد که هیچ‌گونه تفاوت معناداری بین دو گروه HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با آلفا-آمانیتین وجود ندارد. اگرچه، کاهش معناداری $p \leq ۰/۰۵$ در سطح TAC در سلول‌های HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion پس از تیمار با دارو در مقایسه با سلول‌های HepG2 و HepG2-Amnion-HUVEC تیمارنشده مشاهده شد.

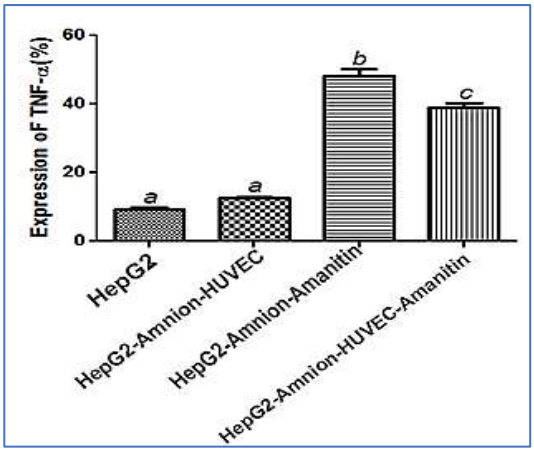


نمودار ۶- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

میزان بیان فاکتور TNF-α با استفاده آزمون DAPI به‌روش ایمونوسیتوشیمی موردبررسی قرار گرفت. شکل ۲ نشان‌دهندهٔ درصد بیان پروتئین TNF-α در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin می‌باشد. مطابق با نمودار ۷، تفاوت معناداری در درصد بیان فاکتور TNF-α بین دو گروه HepG2 و HepG2-Amnion-HUVEC تیمارنشده مشاهده نمی‌شود، درحالی‌که تفاوت معناداری $p \leq ۰/۰۵$ بین دو گروه HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با آلفا-آمانیتین وجود دارد نیز میزان بیان این پروتئین در هر دو گروه تیمارشده با آلفا-آمانیتین نسبت به گروه‌های تیمارنشده، به‌طور معناداری $p \leq ۰/۰۵$ بیشتر می‌باشد. باوجوداین کاهش معناداری $p \leq ۰/۰۵$ در بیان این فاکتور در گروه‌های سلولی HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin نسبت به گروه‌های سلولی HepG2-Amnion-HUVEC وجود داشت.



شکل ۲- رنگ‌آمیزیِ DAPI برای بررسی میزان فاکتور TNF-α در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-.Amanitin



نمودار ۷- درصد میزان فاکتور TNF-α در گروه‌های سلولی HepG2، HepG2-Amnion-HUVEC، HepG2-Amnion-HUVEC-Amanitin و HepG2-Amnion-Amanitin. (حروف مشابه تفاوت غیرمعنادار و حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشند).

۴- بحث

سرطان کبد یک نگرانی مهم بهداشت عمومی در سراسر جهان است که ششمین سرطان شایع و چهارمین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان معرفی گردیده است (۱۸). روش‌های درمانیِ جدید سرطان کبد بیشتر بر روی وقوع آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تمرکز دارند. آپوپتوز یک برنامهٔ ژنتیکی است که برای از بین بردن مؤثر سلول‌های ناکارآمد درگیر است. فرار از آپوپتوز ممکن است دروازهٔ مهمی برای شروع تومور و مقاومت به شیمی‌درمانی باشد. مانند هر برنامهٔ رشد دیگری، آپوپتوز می‌تواند توسط چندین انحراف ژنتیکی مختل شود که سلول‌های بدخیم را به‌سمت پیشرفت و بقای کنترل‌نشده سوق می‌دهد. برای رشد پایدار، سرطان در یک محیط پیچیده ایجاد می‌شود که سیگنال‌های بقا را ارائه داده و سلول‌های بدخیم را از آپوپتوز نجات می‌دهد. مطالعه‌های اخیر به‌وضوح یک تعامل گسترده بین سلول‌های تومور و ریزمحیط آن‌ها را نشان داده است که تأثیر سلول‌های اطراف را بر گسترش و تهاجم تومور تأیید می‌کند. این سلول‌های غیربدخیم نه‌تنها رشد سلول‌های تومور را تشدید می‌کنند، بلکه روند متاستاز را نیز ارتقا می‌دهند. تداخل قوی بین سلول‌های بدخیم و یک ریزمحیط واکنش‌پذیر توسط کموکاین‌ها و سایتوکین‌های محلول انجام می‌شود که از طریق گیرنده‌های سطحی روی

سلول‌های تومور اثر می‌گذارند. اختلال در سیگنال‌دهیِ ریزمحیط ممکن است یک رویکرد دلگرم‌کننده برای درمان بیمار باشد (۱۹). غشای آمنیوتیکِ انسانی به‌دلیل بسیاری از خواص مفید و کاربردهای امیدوارکنندهٔ آن به‌خوبی موردبررسی قرار گرفته است. این غشا تومورزا نیست و خاصیت تعدیل‌کنندگیِ ایمنی را نشان می‌دهد، همچنین قادر به بازسازیِ مجدد، کاهش التهاب و فیبروز، و مهار رگ‌زایی است. غشای آمنیوتیک نیز می‌تواند دارای خواص ضدتوموری باشد زیرا مقدار زیادی از عوامل ضدرگ‌زایی مانند آنتاگونیست گیرندهٔ اینترلوکین-۱، کلاژن XVIII، IL-10، ترومبوسپوندین-۱ و مهارکنندهٔ بافتیِ متالوپروتئاز (TIMP-1، 2-، 3-) را ترشح می‌کند (۲۰). ازطرف‌دیگر، سمیّت سلولی یافت‌شده بر اثر تیمار با آلفا-آمانیتین می‌تواند نتیجهٔ مهار RNAپلیمرازها، به‌ویژه RNAپلیمراز II باشد که از سنتز mRNA جلوگیری می‌کند (۲۱). لذا هدف از این پژوهش، بررسی اثر آلفا-آمانیتین بر القای آپوپتوز سلول‌های HepG-2 هم کِشتی داده‌شده بر پردهٔ آمنیونیِ حاوی سلول HUVEC از طریق تغییرهای سطح گونه‌های اکسیژنی اُکسایش‌گر و از طریق مسیر وابسته به TNF-α و اندازه‌گیری سطح MDA، SOD، TOS و TAC بود.

نتایج آزمون MTT نشان داد که تیمار سلول‌های HepG2-Amnion و HepG2-HUVEC-Amnion با غلظت‌های مختلف آلفا-آمانتین باعث کاهش معنادار در زنده‌مانی سلول‌های سرطانی می‌شود. به‌نظر می‌آید که آلفا-آمانیتین در رفتاری وابسته به غلظت باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های HepG2 شده و همچنین پردهٔ آمنیونی در کنار HUVEC باعث القای سیتوتوکسیسیتهٔ آلفا-آمانیتین درمقابل ردهٔ سلول سرطانیِ HepG2 می‌شود. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نیز نشان داد که آپوپتوز در گروه‌های سلولی HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion تیمارشده با آلفا-آمانیتین به‌طور معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) افزایش یافته که این میزان در دو گروه تحت‌تیمار با داروی آلفا-آمانتین تفاوتی نداشت و نشان داده شد که پردهٔ آمنیونی می‌تواند در القای آپوپتوز دخیل باشد.

آلفا-آمانیتین را می‌توان به‌عنوان یک القاکنندهٔ قوی آپوپتوز درنظر گرفت، اگرچه مکانیسم این فرایند القایی هنوز نامشخص است. فرض بر این است که این توکسین به زیرواحد RPB1 از کمپلکسRNA Pol II متصل می‌شود و در نتیجه سنتز پروتئین‌ها را مسدود می‌کند (۱۷). توقف طولانی‌مدت رونویسی وابسته به RNA Pol II منجر به مرگ‌سلولی در اثر آپوپتوز می‌شود. یافته‌ها نشان داده است که آلفا-آمانیتین می‌تواند سبب تجمع پروتئین p53 و آپوپتوز در فیبروبلاست‌های طبیعی و ردهٔ سلولی HCT116 بدون القای آسیب DNA شود. توقف رونویسی توسط آلفا-آمانتین منجر به فعال‌شدن کینازهای فعال‌شده با استرس و تجمع پروتئین p53 می‌شوند. پروتئین p53 که در پاسخ به توقف رونویسی تجمع پیدا کرده است به میتوکندری منتقل شده و احتمالاً می‌توانند موجب فعال‌سازی برنامهٔ آپوپتوز شوند (۱۷ و ۲۲). به‌علاوه در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که آلفا-آمانیتین می‌تواند سبب کاهش زنده‌مانی ردهٔ سلولی MCF7 به‌صورت وابسته به غلظت و زمان شود (۲۳) و نیز آلفا-آمانیتین در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث تکه‌تکه شدن DNA در هستهٔ سلول‌های هپاتوسیت‌های موش شود و با افزایش سطح کاسپاز ۳ موجب القای آپوپتوز سلول‌های هپاتوسیت شود (۲۴). در تحقیقی دیگر نشان داده شد کونژوگه‌های مونوکلونال آنتی‌بادی و آلفا-آمانیتین می‌توانند سبب کاهش معناداری در زنده‌مانیِ سلول‌های سرطانیِ پروستات، کلورکتال و پستان شوند (۲۵). در پژوهشی دیگر که در رابطه با اثر ضدسرطانی آلفا-آمانیتین مقابل سلول‌های سرطانی کبد انجام شد مشخص گردید که آلفا-آمانیتین سمیّت وابسته به غلظت را درمقابل سلول‌های سرطانی HepG2 نشان می‌دهد (۲۶).

نتایج آزمون بیوشیمیایی افزایش میزان پراُکسیداسیون لیپیدی (MDA)، TOS و کاهش سطح فعالیت آنزیم SOD و آنتی‌اکسیدان تام (TAC) را در هر دو گروه هم‌کِشتی‌شده با آمنیون و Amnion-HUVEC و تیمارشده با آلفا-آمانیتین نشان داد. تنها در میزان سطح TOS در دو گروه تیمارشده تفاوت معنادار $p \leq ۰/۰۵$ وجود داشت که میزان TOS در گروه هم‌کِشتی‌شده با آمنیون و دارو نسبت به گروه هم

کِشتی‌شده با Amnion-HUVEC تیمارشده، به‌طور معناداری $p \leq ۰/۰۵$ بیشتر بود. بیان بیش از حد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هم در شرایط *in-vitro* و هم *in-vivo* می‌تواند مانع از پیشرفت و گسترش سرطان شود که این موضوع می‌تواند نشانه‌ای از بالقوه‌بودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان یک هدف برای پیشگیری از سرطان باشد (۲۷). آنزیم SOD خط مقدم دفاع در برابر آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌ها تبدیل رادیکال آزاد آنیون سوپراکسید $O_2^{\bullet-}$ را به اکسیژن مولکولی و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) کاتالیز می‌کنند و سطح $O_2^{\bullet-}$ را کاهش می‌دهند که در غلظت بیش از حد، به سلول‌ها آسیب می‌رساند. پایین آمدن فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی باعث تولید بیش از اندازهٔ ROS شده که در نهایت موجب القای آپوپتوز در سلول می‌شود (۲۸). استرس اکسیداتیو همچنین باعث افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد در سلول می‌شود. MDA از واکنش پراکسیداسیون لیپید به‌وجود می‌آید و می‌تواند ساختار غشای سلولی و در نهایت حتی سبب تغییر DNA در سلول شود (۲۹). همچنین افزایش یا کاهش TOS و TAC با افزایش و کاهش ROS در ارتباط است زیرا که ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها در اثر بالا رفتنِ ROS کاهش می‌یابد (۳۰ و ۳۱). در سلول‌های هپاتوسیت نشان داده شده است که آلفا-آمانیتین می‌تواند با افزایش سطح فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانیِ SOD و افزایش پراُکسیداسیون لیپیدی باعث سم‌زدایی در سلول‌های هپاتوسیتی شود (۳۲). آلفا-آمانیتین نیز می‌تواند در کلیه سبب ایجاد سمیّت شود که با افزایش سطوح MDA، TOS و کاهش سطوح SOD و TAC در موش‌های تیمارشده با داروی آلفا-آمانیتین همراه بود (۳۳).

در این مطالعه، نتایج ICC نشان داد که میزان فاکتور TNF-α در هر دو گروه تیمارشده با آلفا-آمانیتین افزایش معناداری $p \leq ۰/۰۵$ نسبت به گروه‌های تیمارنشده نشان می‌دهد. این افزایش معنادار در سلول‌های هم‌کِشتی‌شده با پردهٔ آمنیون به‌تنهایی، بیشتر از سلول‌های هم‌کِشتی‌شده با Amnion-HUVEC بود. به‌نظر می‌رسد سلول‌های HUVEC کشت داده‌شده بر پردهٔ آمنیون می‌توانند اثرهای مهاری در تولید فاکتور التهابیِ TNF-α توسط ردهٔ سلولی سرطانی HepG2 داشته باشند. TNF-α یک سایتوکین التهابی است که پاسخ سیستمیک به عفونت و آسیب را هماهنگ می‌کند. این فاکتور باعث القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز می‌شود که در نهایت باعث آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوژنیک از میتوکندری می‌شود تا آپوپتوزوم و کاسپازهای پایین‌دست را فعال نماید (۳۴ و ۳۵). ROS تولیدشده توسط TNF-α با فعال کردن کیناز N-ترمینال c-Jun عملکرد مهمی در مرگ سلولی دارند. بااین‌حال، مکانیسم دقیق تولید ROS میتوکندریایی پس از تحریک TNF-α به‌خوبی شناسایی نشده است. همچنین نشان داده شده است که تعدیل‌کنندهٔ ROS-1 (Romo1) و لنفوم سلول B بسیار بزرگ (Bcl-XL) مستقیماً با تولید ROS ناشی از TNF-α مرتبط هستند. در پاسخ به TNF-α، TNF کمپلکس II (شامل پروتئین ۱ برهم‌کُنش گیرنده، پروتئین مرتبط با گیرندهٔ TNF با دامنهٔ مرگ، فاکتور ۲ مرتبط با گیرندهٔ TNF، پروتئین دامنهٔ مرگ مرتبط با Fas و پروکاسپاز ۸) به C ترمینوس Romo1 واقع در میتوکندری متصل می‌شود. هم‌زمان، Romo1 پروتئین Bcl-XL را برای کاهش پتانسیل غشای میتوکندریایی استفاده می‌کند که منجر به تولید ROS و مرگ‌سلولی آپوپتوز می‌شود (۳۶). این مکانیسم نشان می‌دهد که چگونه القای تولید TNF-α توسط آلفا-آمانیتین می‌تواند منجر به وقوع آپوپتوز در سلول سرطانی شود.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که آلفا-آمانیتین احتمالاً می‌تواند گزینهٔ مناسبی جهت مقابله با سرطان کبد باشد. آلفا-آمانیتین دارای اثرهای آپوپتوتیک مؤثری علیه ردهٔ سلولیِ سرطانی کبدی HepG2 کشت داده‌شده با غشای آمنیونی و سلول‌های HUVEC می‌باشد. غشای آمنیونی گزینهٔ مناسبی برای شبیه‌سازیِ داربست خارج‌سلولی می‌باشد. تفاوت معنی‌داری بین تأثیر دارو بر ردهٔ سلولِ سرطانی در دو گروه HepG2-Amnion-HUVEC و HepG2-Amnion مشاهده نشد و این نتایج با نتایج آنتی‌اکسیدانیِ کل هم‌خوانی داشت. نتایج همچنین نشان دادند که آلفا-آمانیتین نیز می‌تواند سبب افزایش

معنادار فاکتور TNF-α شود. آلفا-آمانیتین دارای اثرهای آپوپتوزیِ وابسته به غلظت نیز می‌باشد. در بسیاری از پژوهش‌ها به نکروز وابسته به غلظتِ آلفا-آمانیتین اشاره شده است. به‌طور کلی نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های این پژوهش نشان دادند که استفاده از سلول‌های HUVEC کشت داده‌شده بر روی پردۀ آمنیون برای کشت سلول‌های HepG2 می‌تواند سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی آلفا-آمانیتین روی ردۀ سلولیِ HepG2 شود. این نتیجه بیانگر نقش مهم کُنام سلول‌های سرطانی در اثربخشی خاصیت ضدسرطانی داروها می‌باشد.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پژوهش انجام‌شده در دانشکدۀ علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم‌وتحقیقات تهران می‌باشد که با حمایت‌های معنویِ و مالی حوزۀ معاونت محترم پژوهشی آن واحد به انجام رسیده است. بدین وسیله از کمک و یاری این عزیزان قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند تعارض منافعی وجود ندارد.

۹- سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی پژوهش، جمع آوری داده ها، تحلیل و نگارش مقاله مشارکت داشته اند. نویسنده مسئول (هانیه جعفری) هماهنگی ارسال مقاله و ارتباط با مجله را بر عهده داشته است. تمامی نویسندگان متن نهایی مقاله را مطالعه و تائید نموده اند و مسئولیت علمی آن را می پذیرند.

۱۰- منابع

1.Flores JE, Thompson AJ, Ryan M, Howell J. The global impact of hepatitis B vaccination on hepatocellular carcinoma. Vaccines. 2022;10(5):793.

2.Li X-Z, Zhu J-Q, Zhang S-Y, He Q-Q, Zhang G-X, Jia H-D, et al. is it appropriate to use a fatty liver index > 60 as an alternative criterion for non-alcoholic fatty liver disease? Alimentary pharmacology & therapeutics. 2022;56(2):376-7.

3.Janevska D, Chaloska-Ivanova V, Janevski V. Hepatocellular carcinoma: risk factors, diagnosis and treatment. Open access Macedonian journal of medical sciences. 2015;3(4):732.

4.Liu B-J, Gao S, Zhu X, Guo J-H, Kou F-X, Liu S-X, et al. Real-world study of hepatic artery infusion chemotherapy combined with anti-PD-1 immunotherapy and tyrosine kinase inhibitors for advanced hepatocellular carcinoma. Immunotherapy. 2021;13(17):1395-405.

5.Azbazdar Y, Karabicici M, Erdal E, Ozhan G. Regulation of Wnt signaling pathways at the plasma membrane and their misregulation in cancer. Frontiers in cell and developmental biology. 2021;9:631623.

6.Wörns MA, Weinmann A, Pfingst K, Schulte-Sasse C, Messow C-M, Schulze-Bergkamen H, et al. Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma in consideration of concomitant stage of liver cirrhosis. Journal of clinical gastroenterology. 2009;43(5):489-95.

7.Liao W, Calvisi DF, Chen X. Year in review: Liver cancer research in 2022: tumor microenvironment takes the central stage. LWW; 2023. p. e0074.

8.El-Missiry MA. Antioxidant enzyme: BoD–Books on Demand; 2012.

9.Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells.
Oxidative medicine and cellular longevity. 2019;2019.

10.Schwager SC, Taufalele PV, Reinhart-King CA. Cell–cell mechanical communication in cancer. Cellular and molecular bioengineering. 2019;12:1-14.

11.Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed M-A, Boushey R, et al. Increased expression of tumor necrosis factor-α is associated with
advanced colorectal cancer stages. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2014;20(48):18390.

12.Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. Nature Reviews Immunology. 2015;15(6):362-74.

13.Zhu G, Du Q, Wang X, Tang N, She F, Chen Y. TNF-α promotes gallbladder cancer cell growth and invasion through autocrine mechanisms. International Journal of Molecular Medicine. 2014;33(6):1431-40.

14.Liu X-L, Li F-Q, Liu L-X, Li B, Zhou Z-P. TNF-α, HGF and macrophage in peritumoural liver tissue relate to major risk factors of HCC Recurrence. Hepato-gastroenterology. 2013;60(125):1121-6.

15.Tan W, Luo X, Li W, Zhong J, Cao J, Zhu S, et al. TNF-α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. EBioMedicine. 2019;40:446-56.

16.Moshnikova A, Moshnikova V, Andreev OA, Reshetnyak YK. Antiproliferative effect of pHLIP-amanitin. Biochemistry. 2013;52(7):1171-8.

17.Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomułkiewicz A, et al. alpha-Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. Folia Histochemica et Cytobiologica. 2010;48(1):58-62.

18.Dasgupta P, Henshaw C, Youlden DR, Clark PJ, Aitken JF, Baade PD. Global trends in incidence rates of primary adult liver cancers: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in oncology. 2020;10:171.

19.Yaacoub K, Pedeux R, Tarte K, Guillaudeux T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. Cancer letters. 2016;378(2):150-9.

20.Mamede A, Guerra S, Laranjo M, Santos K, Carvalho M, Carvalheiro T, et al. Oxidative stress, DNA, cell cycle/cell cycle associated proteins and multidrug resistance proteins: targets of human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma. Pathology & Oncology Research. 2016;22(4):689-97.

21.Goodnow RA. Platform Technologies in Drug Discovery and Validation: Academic Press; 2017.

22.Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, et al. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(19):19166-76.

23.Kaya E, Bayram R, Yaykaşli KO, Yilmaz I, Bayram S, Yaykaşli E, et al. Evaluation and comparison of alpha-and beta-amanitin toxicity on MCF-7 cell line. Turkish journal of medical sciences. 2014;44(5):728-32.

24.An SH, Sun KH, Hong R, Lee BR, Park Y. The Protective Effect of Green Tea Extract on Alpha-amanitin Induced Hepatotoxicity. Journal of the Korean Society of Clinical Toxicology. 2019;17(2):58-65.

25.Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, Herr I, Anderl J, Faulstich H. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 2012;104(8):622-34.

26.Rodrigues DF, Pires das Neves R, Carvalho AT, Lourdes Bastos M, Costa VM, Carvalho F. In vitro mechanistic studies on α-amanitin and its putative antidotes. Archives of Toxicology. 2020;94(6):2061-78.

27.Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. Oxidative medicine and cellular longevity. 2013;2013.

28.Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. International journal of health sciences. 2018;12(3):88.

29.Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Oxidative medicine and cellular longevity. 2019;2019.

30.Guo-Chao Z. Total antioxidant capacity and pancreatic cancer incidence and mortality in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial.

31.Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang C-C, Kandaswamy E, Zhou T, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. Frontiers in physiology. 2018;9:477.

32.Magdalan J, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Sozański T, Szeląg A, Dziegięl P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with α-amanitin. Human & experimental toxicology. 2011;30(1):38-43.

33.Ergin M, Dundar ZD, Kilinc I, Colak T, Oltulu P, Girisgin AS. Alpha-amanitin poisoning, nephrotoxicity and oxidative stress: an experimental mouse model .Iranian Red Crescent Medical Journal. 2015;17.(۸)

34.Chau BN, Chen T-T, Wan YY, DeGregori J, Wang JY. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. Molecular and cellular biology. 2004;24(10):4438-47.

35.Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H, Vogt K, Brigelius-Flohe R, et al. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. Gastroenterology. 1997;112(3):923-34.

36.Kim J, Lee S, Park J, Yoo Y. TNF-α-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. Cell Death & Differentiation. 2010;17(9):1420-34.