



Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles conjugated with thymol on liver cancer cell line and evaluation of *caspase-8* gene expression

Yasaman Alizadeh Kolangestani¹, Ali Salehzadeh^{2*}

¹MSc, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

²Associate professor, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Place of Research: Laboratory of Biology, Rasht University

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 2025.06.24

Revised 2025.07.28

Accepted 2025.07.29

KeyWords:

Iron oxide
thymol
Liver cancer
Flow cytometry

*Corresponding author:

E-mail address:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

Introduction: The application of magnetic nanoparticles for effective drug delivery to cancer tissues has gained attention. This study was conducted to determine the anticancer effects of magnetic iron oxide nanoparticles functionalized with glucose and conjugated with thymol (Fe₃O₄@Glu-Thymol NPs) on a liver cancer cell line.

Materials and Methods: Physicochemical assays including FT-IR, XRD, EDS, scanning electron microscopy, DLS, and zeta potential were performed to determine the functional groups, crystal structure, shape, size, and surface charge of the nanoparticles. The cytotoxic effects of nanoparticles on the liver cancer cell line (HepG2) and normal cell line (HDF) were performed using MTT assay. Flow cytometry was used to determine the percentage of apoptotic cells and real-time PCR was used to assess the expression of the *caspase-8* gene.

Results: Fe₃O₄@Glu-Thymol NPs had a spherical shape, diameter of less than 60 nm, a surface charge of -13.5mV, and a hydrodynamic diameter of 515nm. The nanoparticles exhibited concentration-dependent toxicity for liver cancer cells, and their IC₅₀ in cancer and normal cell lines was 67.5 and 175 µg/mL, respectively. Flow cytometry showed that Fe₃O₄@Glu-Thymol NPs caused a significant increase in the percentage of early and late apoptosis, and the expression of the *caspase-8* gene in treated cells increased by 2.45-fold ($p < 0.001$).

Conclusion: The results of this study indicate the effective inhibitory effects of Fe₃O₄@Glu-Thymol NPs on liver cancer cells, which can be helpful in the development of effective magnetic nanodrugs for targeted drug delivery to liver cancer tissues.

Cite this article: Yasaman Alizadeh Kolangestani, Ali Salehzadeh, Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles conjugated with thymol on liver cancer cell line and evaluation of *caspase-8* gene expression Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (3): 39-51



10.71631/zisti.2024.1210174

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



اثر سائیتوکسیک نانوذره اکسید آهن مگنتیک کنژوگه با تیمول روی رده سلولی سرطان کبد و ارزیابی بیان ژن کاسپاز ۸

یاسمن علیزاده کلنگستانی^۱، علی صالحزاده^{۲*}

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

^۲ دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۴/۰۳

بازنگری ۱۴۰۴/۰۵/۰۶

پذیرش ۱۴۰۴/۰۵/۰۷

کلمات کلیدی

اکسید آهن

تیمول

سرطان کبد

فلوسایتومتري

* مسئول مکاتبات:

a.salehzadeh@iaub.ac.i

مقدمه: استفاده از نانوذرات مغناطیسی برای دارورسانی مؤثر به بافت‌های سرطانی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف تعیین اثرات ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن مگنتیک عامل دار شده با گلوکز و کنژوگه با تیمول ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-Thymol}$) بر سلول‌های رده سرطان کبد انجام شد.

مواد و روش: آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی شامل EDS، XRD، FT-IR، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی، DLS، و پتانسیل زتا به منظور تعیین گروه‌های عاملی، ساختار کریستالی، شکل، اندازه، و بار سطحی نانوذرات انجام شد. اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات بر سلول‌های رده سرطان کبد (HepG2) و رده نرمال (HDF) با آزمایش MTT بررسی شد. آزمایش فلوسایتومتري به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوزی و real-time PCR برای تعیین میزان بیان ژن کاسپاز-۸ استفاده شد.

نتایج: نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-Thymol}$ دارای شکل کروی، ابعاد کمتر از ۶۰ نانومتر، بار سطحی ۱۳/۵- میلی ولت و قطر هیدرودینامیک ۵۱۵ نانومتر بودند. این نانوذرات دارای سمیت وابسته به غلظت برای سلول‌های سرطان کبد بودند و غلظت نیمه مهاری آنان در سلول‌های سرطانی و نرمال به ترتیب ۶۷/۵ و ۱۷۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. آزمایش فلوسایتومتري نشان داد که نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-Thymol}$ سبب افزایش معنادار در میزان آپوپتوز سلولی اولیه و تأخیری شدند و بیان ژن کاسپاز-۸ در سلول‌های تیمار شده به میزان ۲/۴۵ ($p < ۰,۰۰۱$) برابر افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات مهاری مؤثر نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-Thymol}$ بر سلول‌های رده سرطان کبد بوده که می‌تواند در توسعه نانو داروهای مغناطیسی مؤثر به منظور دارورسانی هدفمند به بافت‌های سرطانی کبد کمک‌کننده باشد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: یاسمن علیزاده کلنگستانی، علی صالحزاده. اثر سائیتوکسیک نانوذره اکسید آهن مگنتیک کنژوگه با تیمول روی رده سلولی سرطان کبد و ارزیابی بیان ژن کاسپاز ۸. مجله دانش زیستی ایران. ۱۹:۱۴۰۳ (۳): ۳۹-۵۱

doi: 10.71631/zisti.2024.1210174

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: ۴۵۹ X - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

سرطان کبد یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است به طوری که با میزان اکتساب سالیانه حدود یک میلیون نفر، ششمین نوع شایع سرطان در نظر گرفته می‌شود. این بیماری از نرخ تلفات بسیار بالایی برخوردار است و سالانه بیش از ۸۳۰ هزار مورد مرگ در اثر این بیماری در دنیا ثبت می‌شود، به طوری که پس از سرطان ریه، این بیماری به عنوان دومین نوع کشنده سرطان شناخته می‌شود (۱). شیوع فزاینده و نرخ کشندگی بالای این بیماری نشان دهنده کارایی پایین روش‌های درمانی کنونی بر علیه این بیماری است. در سالیان گذشته درمان‌های دارویی متعددی برای این بیماری معرفی شده‌اند، با این حال بسیاری از این داروها یا از اثرگذاری قابل قبولی برخوردار نیستند و یا دارای اثرات جانبی و سمیتی زیادی هستند. به همین دلیل نیاز به روش‌های درمانی هدفمند، با کمترین آسیب به سلول‌های سالم، باعث شده است که توسعه نانوذرات مغناطیسی به‌عنوان حامل‌های دارویی و عوامل ضدسرطانی، مورد توجه ویژه قرار گیرد (۲).

پیدایش فناوری نانو امیدهای زیادی را در زمینه طراحی داروهای جدید، بهینه‌سازی داروهای موجود و بهبود روش‌های دارو رسانی ایجاد کرده است. استفاده از نانو داروها می‌تواند بر برخی از مشکلات رایج شیمی درمانی مانند ناپایداری دارو درون بدن و پاک‌سازی سریع دارو، اثرات سمیتی ناخواسته، دسترسی زیستی و اثر بخشی محدود داروها غلبه کند. نانوذرات فلزی از جایگاه ویژه‌ای در مطالعات پژوهشی ضد سرطان برخوردار هستند. در سالیان اخیر مطالعات زیادی در مورد اثر ضدسرطانی نانوذرات مختلف فلزی مانند نقره، روی، کبالت، تیتانیوم و ... انجام شده است (۳). نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن علاوه بر دارا بودن اندازه کوچک، سمیت پایین و زیست سازگاری قابل قبول، می‌توانند به منظور دارو رسانی هدفمند به بافت‌های توموری مورد استفاده قرار گیرند. هدایت مغناطیسی داروهای ضد سرطانی متصل به نانوذرات اکسید آهن می‌تواند از پراکنش ناخواسته ذرات در بدن جلوگیری کرده و با افزایش موضعی غلظت دارو در بافت‌های هدف سبب افزایش اثربخشی و کاهش اثرات سمیتی ناخواسته شیمی درمانی شود (۴).

تیمول، یک مشتق فنلی مونوترپن طبیعی با نام شیمیایی

۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنول است. این ماده و مشتقات آن به طور گسترده در پزشکی، لوازم آرایشی، غذا و صنایع کشاورزی استفاده می‌شوند. تیمول فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی دارد، که از جمله می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد دیابتی و ... اشاره نمود. شواهد متعددی در دست هستند که نشان می‌دهند تیمول از اثرات ضد سرطانی قابل توجهی بر علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی برخوردار است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تیمول و مشتقات آن فعالیت ضد سرطانی خود را از طریق مکانیسم‌های متعددی از جمله مهار رشد سلولی، القای آپوپتوز، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعال کردن پروتئین‌های محرک آپوپتوز مانند کاسپازها اعمال می‌کنند. با این حال، مشابه با بسیاری از فلاونوئیدهای طبیعی، تیمول از حلالیت آبی کمی برخوردار است، ویژگی‌ای که سبب کاهش دسترسی زیستی و کاربردهای دارویی این ماده می‌شود (۵-۶).

کاسپازها گروهی از پروتئین‌های با خاصیت پروتئازی هستند که در یک زنجیره آبشاری به دنبال یکدیگر فعال شده و با برش پروتئولیتیک پروتئین‌های سلولی سبب آغاز و پیشروی آپوپتوز می‌شوند. کاسپازهای ۸- و ۹- نقش کلیدی در شروع زنجیره واکنش‌های فعال‌سازی کاسپازها دارند و به ترتیب کاسپاز آغازگر در مسیرهای آپوپتوز بیرونی و درونی شناخته می‌شوند. با این حال، کاسپاز-۸ به دلیل اثراتی که بر روی برخی پروتئین‌های ضدآپوپتوز دارد، می‌تواند در پیشروی مسیر بیرونی آپوپتوز نیز دخیل باشد (۷). به همین دلیل، افزایش بیان و فعالیت این پروتئین یک شاخص کلیدی در القای آپوپتوز سلولی در نظر گرفته می‌شود.

تیمول، به‌عنوان یک ترکیب فنولی با خواص ضدسرطانی اثبات شده، می‌تواند در قالب نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی به طور مؤثری به سلول‌های سرطانی منتقل شود. لذا این مطالعه با هدف سنتز و ارزیابی اثرات ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن مگنتیک کنژوگه با تیمول بر رده سلولی سرطان کبد و بررسی مکانیسم‌های مولکولی احتمالی آن انجام شد تا بتوان گامی در جهت توسعه نانو داروهای هدفمند و موثر برداشت

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات

به منظور سنتز نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4)، در ابتدا $7/5\text{V}$ گرم $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و $3/1\text{V}$ گرم $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (شرکت مرک آلمان) در 300 میلی لیتر آب مقطر حل شدند در دمای 80 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شدند. در ادامه 40 میلی لیتر محلول یک نرمال آمونیاک (شرکت مرک آلمان) افزوده شد و مخلوط واکنش به مدت 3 ساعت در دمای 80 درجه سانتی گراد حرارت دهی شد. پس از تشکیل نانوذرات Fe_3O_4 ، مخلوط واکنش سانتریفوژ (مدل UNIVERSAL 320 شرکت Hettich آلمان) شده و نانوذرات با آب مقطر شسته و سپس در آون (مدل UNB 100 شرکت Memmert آلمان) خشک شدند. برای بهبود اتصال نانوذرات به تیمول (شرکت سیگما آلد ریچ آلمان)، نانوذرات سنتز شده با استفاده از گلوکز (شرکت مرک آلمان) عامل دار شدند. برای عامل دار کردن نانوذرات اکسید آهن، یک گرم Fe_3O_4 و $0/5$ گرم D-گلوکز به 60 میلی لیتر آب مقطر اضافه شدند و مخلوط واکنش به مدت 30 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (مدل SONIC 6MX شرکت GTSONIC چین) و سپس به مدت 30 دقیقه در دمای 180 درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس، نانوذرات عامل دار شده جداسازی شدند، و با آب مقطر و اتانول شسته شدند و در نهایت در دمای 70 درجه سانتی گراد خشک شدند. در مرحله بعد، یک گرم $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ و 100 میلی گرم تیمول به 50 میلی لیتر آب مقطر اضافه شدند، به مدت 30 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفتند و سپس مخلوط واکنش به مدت 24 ساعت در دمای اتاق هم زده شد. در پایان، نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ با استفاده از سانتریفوژ جمع آوری شده و با استفاده از خشک کن انجمادی خشک شدند (۸)

تعیین ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات

آنالیزهای فیزیکوشیمیایی مورد استفاده شامل FT-IR، XRD، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی، آنالیز عنصری (EDS)، تعیین پتانسیل زتا و DLS بود. آزمایش FT-IR با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nicolet-IR 100 در محدوده جذبی 400 تا 4000-cm^{-1} و با هدف ارزیابی گروه های عاملی نانوذرات Fe_3O_4 ، تیمول و $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ انجام پذیرفت. آزمایش XRD

نیز به منظور تخمین ساختار کریستالی نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ و با استفاده از منبع پرتو کبالت و توسط دستگاه شکست اشعه ایکس با مدل XPert Pro (شرکت Malvern Panalytical هلند) انجام شد. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره و نگاره با استفاده از میکروسکوپ های TEM 900-Zeiss EM (آلمان) و SEM TESCAN Mira3 (جمهوری چک) و با هدف تعیین شکل و اندازه ذرات انجام شد و از آنالیز EDS به منظور آنالیز عنصرهای تشکیل دهنده ذرات کمک گرفته شد. همچنین، آزمایش های تعیین پتانسیل زتا و DLS (مدل Zetasizer Nano ZS / ZSP شرکت Malvern Panalytical هلند) با هدف اندازه گیری بار سطحی و قطر هیدرودینامیک ذرات انجام شدند

رده های سلولی و کشت سلول

رده های سلولی مورد استفاده در این پژوهش شامل رده سلولی HDF، به عنوان رده سلول نرمال، و رده سلولی HepG2، به عنوان رده سلولی سرطان کبد بود. سلول های مورد استفاده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. کشت سلول ها در محیط کشت DMEM (شرکت Gibco آمریکا) حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) (شرکت Gibco آمریکا) و پنی سیلین-استرپتومایسین (شرکت PanBiotech آلمان) انجام شد و سلول ها در انکوباتور (مدل ICB 150 شرکت Memmert آلمان) با دمای 37 درجه سانتی گراد و غلظت دی اکسید کربن 5% رشد داده شدند

تعیین زنده ماندن سلول ها

از آزمایش MTT به منظور اندازه گیری میزان زنده ماندن سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف نانوذرات استفاده شد. برای انجام این آزمایش، در ابتدا سلول ها در چاهک های پلیت 96 خانه کشت سلولی با تراکم 10000 سلول در هر چاهک تقسیم شدند و سپس غلظت های مختلف از نانوذرات از $7/81$ تا 500 میکروگرم/میلی لیتر به چاهک ها اضافه شد. چاهک هایی هم بدون اضافه شدن نانوذرات به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سلول ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در ادامه 100 میکرو لیتر از محلول MTT $0/5$ میلی گرم/میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و سلول ها

فسفات (PBS) شستشو داده شدند و سپس با استفاده از رنگ‌های (PI propidium iodide) و Annexin V رنگ‌آمیزی شدند. در پایان، سلول‌ها با استفاده از یک دستگاه فلوسایتومتری Partec (ساخت آلمان) به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوزی آنالیز شدند (۱۰).

تعیین میزان بیان ژن کاسپاز-۸

در ابتدا سلول‌های رده سرطان کبد با غلظت نیمه مهای نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، سلول‌ها جمع‌آوری و با بافر نمکی فسفات شستشو داده شدند. در ادامه، محتوی RNA تام سلولی با استفاده از محلول تجاری تریزول ($\text{TriZol}^{\text{TM}}$) استخراج شده و در مرحله بعد، مولکول‌های cDNA، توسط کیت سنتز cDNA AddBio (کره جنوبی) و طبق دستورالعمل سازنده کیت ساخته شدند. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و تکثیر ژن‌ها با استفاده از مستر میکس سایر گرین PCR (AddBio، کره جنوبی) انجام شد. بیان نسبی ژن کاسپاز-۸ با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ محاسبه شد (۱۱).

به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محتویات چاهک‌ها با استفاده از سمپلر تخلیه شد و مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه، مقدار جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه خوانشگر پلیت سنجش شد و میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۹).

$$\text{جذب نوری نمونه} \times 100 - \left[\frac{\text{جذب نوری شاهد}}{\text{جذب نوری نمونه}} \times 100 \right] = \text{درصد مهار}$$

آزمایش فلوسایتومتری

به منظور تعیین اثر تیمار سلول‌های رده سرطان کبد با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ بر میزان آپوپتوز سلولی، در ابتدا سلول‌های رده HepG2 کشت داده شدند و سپس غلظت نیمه مهای (IC₅₀) نانوذرات به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سلول‌های تیمار نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. در ادامه، سلول‌ها با بافر نمکی

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Primers	Sequences (5'-3')	Product size	References
<i>Caspase8</i> -Forward	GACTGGATTGCTGATTACCTACCTAA	143 bp	(12)
<i>Caspase8</i> -reverse	CCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT		
<i>GAPDH</i> -forward	CCCACTCCTCCACCTTTGAC	74 bp	(12)
<i>GAPDH</i> -reverse	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA		

آنالیز آماری

استفاده شد. برای انجام آزمون آماری از نرم افزار *GraphPad Prism* نسخه ۹/۰ استفاده شد

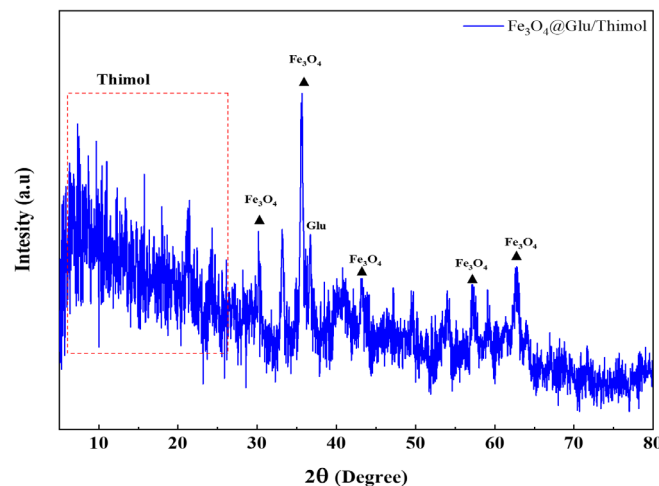
آزمایش‌های MTT و بیان ژن در سه تکرار انجام شدند و از آزمون آماری ANOVA با سطح معنی‌داری $p < 0.05$

یافته ها

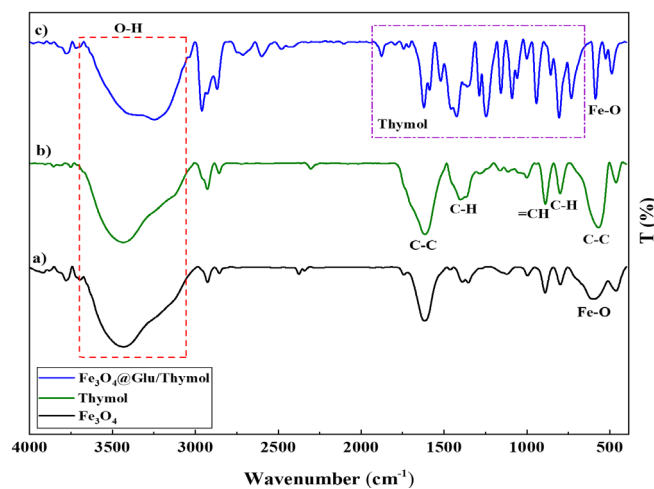
جایگاه چهاروجهی است که این نشانه‌ی شکل‌گیری ساختار Fe_3O_4 می‌باشد. در نوار FT-IR مربوط به تیمول، طول‌موج‌های در ۸۹۳، ۷۸۵، ۵۸۷ به ترتیب مربوط به پیوندهای $\text{C}-\text{C}$ ، $\text{C}-\text{H}$ ، $=\text{CH}$ می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در طیف $\text{C}-\text{H}$ ، $=\text{CH}$ پیک‌های مربوط به ماده‌ی تیمول و نانوذره اکسید آهن وجود دارد و نتایج نشان‌دهنده‌ی سنتز موفق می‌باشد (شکل ۲). بر اساس نتایج تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Thymol}$ دارای شکل کروی و با اندازه قطر کمتر از ۵۰ نانومتر بودند (شکل ۳).

بر اساس طیف XRD، با توجه به شکل مقادیر θ ۲ برابر ۳۲، ۴۲، ۵۳ و ۶۳ درجه مربوط به نانوذرات اکسید آهن است که مطابق با شماره کارت ۰۸۶۳-۰۳ می‌باشد. همچنین با توجه به آمورف بودن ساختار تیمول، پیک‌هایی در θ ۲ برابر ۱۷، ۱۹/۳، ۲۱/۴، ۲۶/۲ درجه در این طیف قابل مشاهده است، که مربوط به تیمول می‌باشد (شکل ۱).

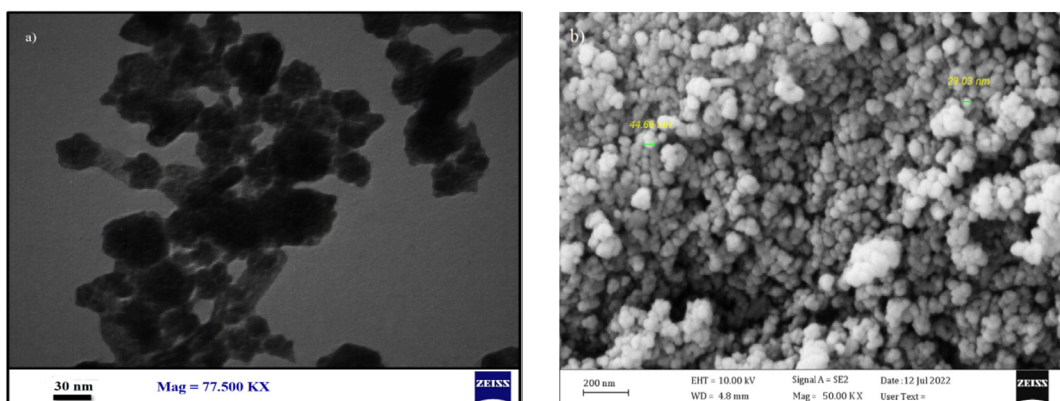
در نوار FT-IR برای نانوذرات Fe_3O_4 طول موج‌های جذبی شدید در ۵۸۰، ۴۲۰، ۶۲۴ به ترتیب ناشی از پیوندهای $\text{Fe}-\text{O}$ مربوط به یون‌های Fe^{2+} و Fe^{3+} واقع در جایگاه‌های هشت‌وجهی و یون Fe^{3+} واقع در



شکل ۱. آنالیز XRD نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Thymol}$



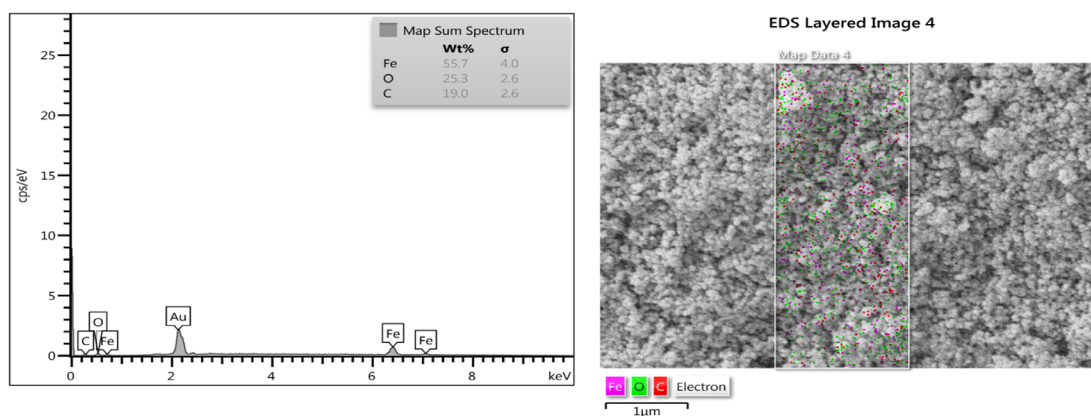
شکل ۲. طیف FT-IR تیمول، Fe_3O_4 و نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Thymol}$. وجود پیک‌های مربوط به هر دو ماده سازنده در ساختار نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Thymol}$ نشان دهنده سنتز صحیح آنان است.



شکل ۳. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره (a) و نگاره (b) نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$. ذرات سنتز شده دارای ابعاد کمتر از ۶۰ نانومتر و دارای شکل کروی هستند.

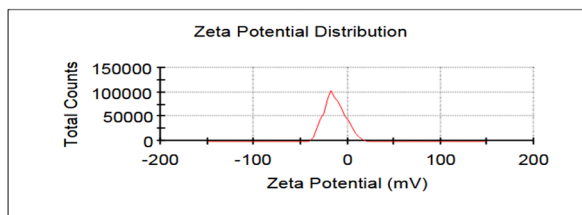
پتانسیل زتا و DLS هم نشان دادند که بار سطحی ذرات در محیط آبی ۱۳/۵- میلی ولت بوده و به دلیل جذب آب، اندازه هیدرودینامیک ذرات به ۵۱۵ نانومتر رسید (شکل ۵).

همچنین، آنالیز عنصری نانوذرات نشان داد که از عناصر آهن، اکسیژن و کربن با درصد وزنی به ترتیب ۵۵/۷٪، ۲۵/۳٪ و ۱۹٪ تشکیل شده و هیچ گونه ناخالصی عنصری در ساختار نانوذرات مشاهده نشد (شکل ۴). آنالیزهای



شکل ۴. آنالیز عنصری نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$ نشان دهنده خالص بودن عنصری ذرات می باشد.

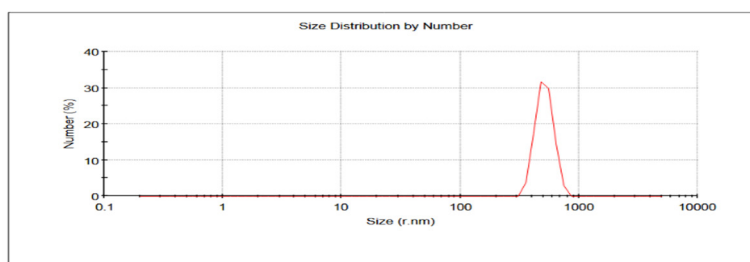
a)



Result quality **Good**
Zeta Potential (mV): -13.5
Zeta SD (mV): 11.1
Mobility (μmcm/Vs): -1.056
Mobility SD (μmcm/Vs): 0.8739
Wall Zeta Potential (mV): -4.84
Effective Voltage (V): 148
Conductivity (mS/cm): 0.0705

b)

Diam. (nm) 515.7
% Number 100.0
Width (nm) 86.46
Pdl: 0.356

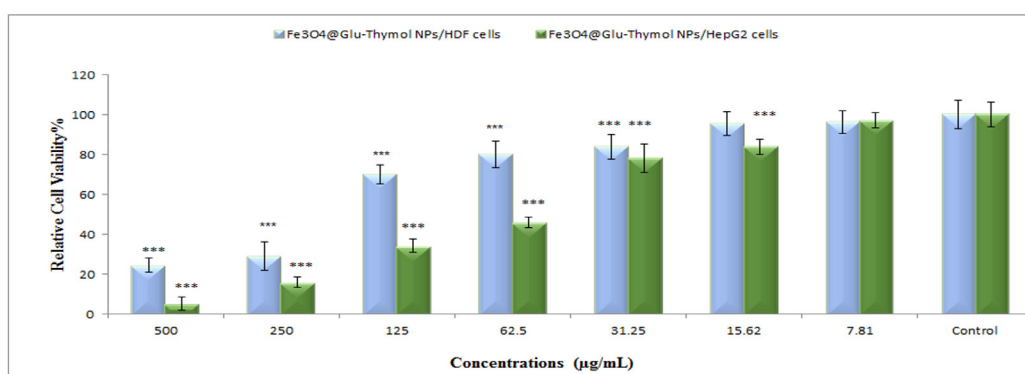


شکل ۵. تعیین بار سطحی (a) و قطر هیدرودینامیک (b) نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$

میلی-لیتر بود. این نتایج نشان دهنده اثرات سمیتی وابسته به غلظت در هر دو رده سلولی است. همچنین، غلظت نیمه مهاری نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$ در کشت‌های سلولی رده نرمال و سرطان کبد به ترتیب ۱۷۵ و ۶۷/۵ میکروگرم/میلی-لیتر بود، که نشان دهنده سمیت بیشتر نانوذرات مذکور برای سلول‌های سرطانی است. نتایج در شکل ۶ نمایش داده شده است

زنده‌مانی سلول

بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های رده نرمال و رده سرطان کبد در اثر تیمار با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$ با انجام آزمایش MTT انجام شد. بر اساس نتایج، نانوذرات سنتز شده در غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم/میلی-لیتر باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های رده نرمال شدند، در حالی که این غلظت در رده سلول سرطان کبد ۱۵/۶۲ میکروگرم/

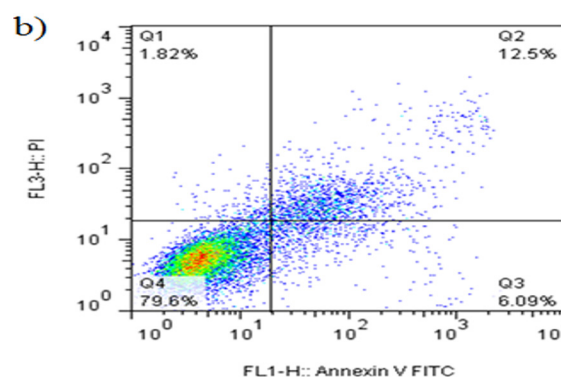
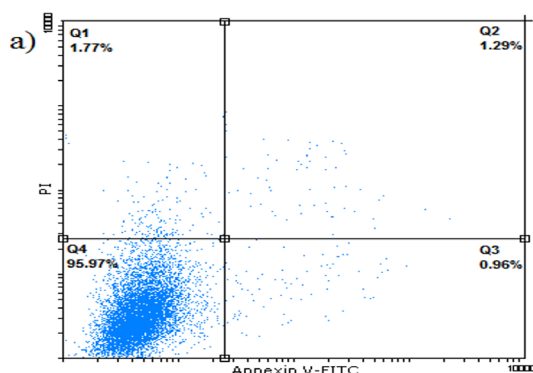


شکل ۶. زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد و رده نرمال در اثر مواجهه با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$. نتایج نشان دهنده کاهش وابسته به غلظت در زنده‌مانی سلول‌ها است. اثرات سمیتی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Thymol}$ بر سلول‌های سرطانی قوی‌تر از سلول‌های طبیعی بود. تفاوت معنی‌داری با *** نشان داده شده است ($p < 0.001$).

نتایج فلوسایتومتری

جمعیت سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه و تأخیری شدند در گروه شاهد به ترتیب ۱/۲۹٪ و ۰/۹۶٪ بود که پس از تیمار با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ به ۱۲/۵٪ و ۶/۰۹٪ افزایش یافت. نتایج در شکل ۷ نمایش داده شده است

بررسی درصد سلول‌های آپوپتوزی در سلول‌های رده سرطان کبد نشان داد که تیمار این سلول‌ها با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ سبب افزایش قابل توجه در میزان آپوپتوز سلولی می‌شود. بر اساس نتایج این آزمایش،

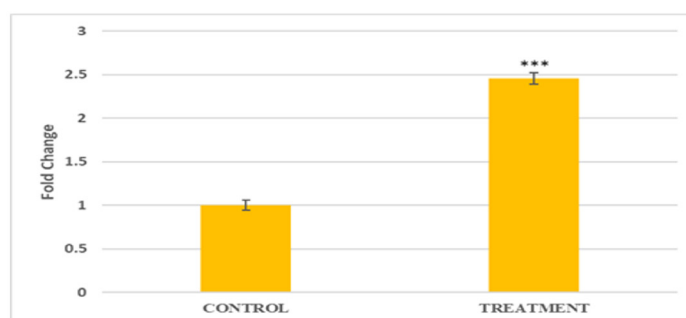


شکل ۷. آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های HepG_2 . (a) شاهد، (b) تیمار شده با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$. نتایج نشان دهنده افزایش قابل توجه آپوپتوز سلولی در سلول‌های تیمار شده است. Q1: نکروز سلولی، Q2: آپوپتوز تأخیری، Q3: آپوپتوز اولیه و Q4: سلول‌های سالم.

FeO_x به مدت ۲۴ ساعت، میزان بیان ژن کاسپاز-۸ به میزان ۲/۴۵ برابر افزایش نشان داد که نشانگر یک افزایش معنی‌دار در بیان آن است. نتایج در شکل ۸ نشان داده شده است

بررسی بیان ژن کاسپاز-۸

بررسی میزان بیان ژن کاسپاز-۸ در سلول‌های رده HepG_2 نشان داد که تیمار سلول‌ها با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ سبب افزایش معنی‌دار بیان این ژن می‌گردد. به دنبال تیمار سلول‌های مذکور با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$



شکل ۸. بیان ژن کاسپاز-۸ در سلول‌های رده HepG_2 . تیمار سلول‌ها با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ باعث افزایش بیان معنی‌دار ژن کاسپاز-۸ شد. علامت *** نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است. ($p < 0.001$).

بحث

سرطان کبد به عنوان دومین نوع کشنده سرطان شناخته می‌شود. تعداد موارد مرگ‌ومیر بالای ناشی از این بیماری نشانگر کارایی پایین روش‌های درمانی کنونی بر علیه این بیماری است. استفاده از فناوری نانو، امیدهای جدیدی را در زمینه بهبود دارو رسانی و اثربخشی داروهای ضدسرطانی ایجاد کرده است. بر این اساس، در مطالعه حاضر به ارزیابی اثرات ضد سرطانی نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ در سلول‌های رده سرطان کبد و ارزیابی مکانیسم‌های احتمالی آن پرداخته شد. نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ دارای اثرات سمیتی معنی‌داری بر روی سلول‌های سرطانی بودند و سبب کاهش قابل توجه زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شدند. اثرات ضد سرطانی نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ را می‌توان به میزان زیادی به حضور تیمول در فرمولاسیون این نانوذرات مرتبط دانست. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تیمول می‌تواند از طریق مکانیسم‌های متعددی از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کند. Chauhan و همکاران نشان دادند که تیمول می‌تواند سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های رده سرطان کولورکتال شده و با ایجاد آسیب به DNA و میتوکندری سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود. آنان همچنین نشان دادند که میزان کاسپاز-۳ و سیتوکروم c در سلول‌های تیمار شده با تیمول افزایش معنی‌داری می‌یابد، که نشان‌دهنده مکانیسم القای آپوپتوز توسط این ماده در سلول‌های سرطانی است (۱۳). همچنین، در مطالعه دیگری، مشاهده شد که تیمول می‌تواند سبب افزایش بیان ژن‌های $p53$ و Bax، که ژن‌های محرک آپوپتوز هستند، در سلول‌های سرطانی شده و به این ترتیب باعث القای آپوپتوز در سلول‌ها و کاهش زنده‌مانی آنان شود. در آن مطالعه، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به عنوان مکانیسم ضد سرطانی تیمول در نظر گرفته شد (۱۴). نتایج مشابهی نیز از اثر تیمول در سلول‌های رده سرطان پستان مشاهده شد. Jamali و همکاران نشان دادند که تیمار سلول‌های رده سرطان پستان با تیمول می‌تواند سبب افزایش بیان کاسپازهای ۳-، ۸- و ۹-، افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژن، توقف چرخه سلولی و آسیب به DNA شود، که با نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش بیان کاسپاز-۸ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد

تیمار شده با نانوذرات مطابقت دارد (۱۵). همچنین، Li و همکاران دو مکانیسم اصلی ضد سرطانی تیمول را شامل مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt ، از طریق MAPKها، و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن دانستند (۱۶). در این مطالعه مشاهده شد که تیمار سلول‌های HepG2 با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ سبب افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی می‌شود. در مطالعه مشابهی، Altintas و همکاران نشان دادند که تیمول سبب افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز سلولی در سلول‌های رده HepG2 شد که با یافته‌های این مطالعه منطبق است (۱۷). در مطالعه ما همچنین مشاهده شد که تیمار سلول‌های سرطان کبد با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن کاسپاز-۸ می‌شود. کاسپاز-۸ به عنوان یک کاسپاز آغازگر فعال‌سازی آبشار کاسپازی در مسیر آپوپتوز بیرونی شناخته می‌شود. این پروتئین در پاسخ به اتصال لیگاندهای مرگ به گیرنده‌های سطح سلولی فعال می‌شود و با برش پروتئولیتیک کاسپاز-۳ سبب پیشروی آپوپتوز در مسیر بیرونی می‌شود. علاوه بر این، کاسپاز-۸ می‌تواند از طریق برهمکنش با پروتئین Bid با مسیر درونی آپوپتوز تلاقی داشته و سبب تحریک پیشروی آن گردد. بنابراین این پروتئین، نقش بسیار مهمی در آغاز و پیشروی مسیرهای آپوپتوز بر عهده دارد (۱۸). همسو با نتایج فلوسایتمتری، افزایش بیان ژن کاسپاز-۸ در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات $\text{Glu-Thymol} @ \text{FeO}_x$ نشان دهنده قابلیت این ذرات در مهار سلول‌های سرطان کبد از طریق القای آپوپتوز می‌باشد. کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد توسط با نانوذرات $\text{FeO}_x @ \text{Glu-Thymol}$ نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید آهن می‌توانند به عنوان یک حامل مناسب برای دارو رسانی به سلول‌های سرطانی عمل کنند و به این ترتیب سبب بهبود اثر بخشی و افزایش پایداری نانو داروها شوند. همسو با نتایج این مطالعه، Adilakshmi و همکاران (۱۹) نشان دادند که نانوذرات عامل دار شده اکسید آهن مگنتیک می‌توانند به منظور دارو رسانی موفق داروی دوکسوروبیسین به سلول‌های رده سرطان پستان عمل نمایند. همچنین، در یک مطالعه جدید نشان داده شد که نانوذرات اکسید آهن پوشش دهی شده با آلبومین می‌توانند به عنوان حامل برای

و سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان رده MDA-MB-۲۳۱ شوند، که با نتایج این مطالعه منطبق است (۲۰)

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات @Glu-Thymol-FerO_۴ اثرات مهاری بسیار قوی‌تری بر روی سلول‌های رده سرطان کبد در مقایسه با سلول‌های طبیعی داشتند. این یافته نشان دهنده اثرگذاری انتخابی این نانوذرات بر سلول‌های سرطانی است. سلول‌های سرطانی از سرعت رشد و متابولیسم بالاتری نسبت به سلول‌های طبیعی برخوردارند. به همین دلیل این سلول‌ها از نیازمندی غذایی و جذب مواد غذایی بالاتری برخوردار بوده و جذب ترکیبات برون سلولی به آن‌ها با سرعت بیشتری انجام می‌شود (۲۱-۲۲). بر اساس این فرضیه، جذب

بیشتر نانوذرات @Glu-Thymol-FerO_۴ به سلول‌های سرطانی ممکن است دلیل حساسیت بیشتر آنان به این نانوذرات نسبت به سلول‌های طبیعی باشد. اگرچه، آزمایش‌های تکمیلی برای تأیید یا رد این فرضیه مورد نیاز است. علاوه بر این، سلول‌های سرطانی به دلیل تولید انرژی و سرعت متابولیک بالاتر از سلول‌های طبیعی، مقادیر بیشتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید کرده و همواره تحت تنش اکسیداتیو بالاتری قرار دارند (۲۳). مواجهه این سلول‌ها با نانوذرات @Glu-Thymol-FerO_۴ و ازدیاد تولید رادیکال‌های آزاد در این سلول‌ها نیز می‌تواند دلیل دیگری برای توضیح حساسیت بالاتر سلول‌های سرطانی به نانوذرات مذکور باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به استفاده از نانوفرمولاسیون جدید شامل نانوذرات FerO_۴ عامل‌دار شده با گلوکز و کنژوگه با تیمول، بررسی هم‌زمان اثرات زیستی (MTT) و مولکولی (Real-time PCR) و مقایسه با رده سلولی نرمال پرداخته است. همچنین، بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کامل نانوذرات با استفاده از چندین تکنیک تحلیلی از جمله FTIR، XRD، SEM، DLS و زتا پتانسیل به اعتبار داده‌ها افزوده است. با این حال، مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. اول اینکه آزمایش‌ها فقط در شرایط *in vitro* و تنها بر یک رده سلولی سرطان کبد

انجام شد. دوم، تنها یک ژن آپوپتوتیک مورد بررسی قرار گرفت و سایر اجزای مسیرهای آپوپتوز مانند کاسپاز-۳، *Bcl-2*، *Bax* یا سیتوکروم c مورد ارزیابی قرار نگرفتند. همچنین، تولید ROS یا آسیب DNA مستقیماً در این مطالعه اندازه‌گیری نشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از روش‌های مکمل مانند سنجش ROS، تحلیل میتوکندری و ارزیابی پروتئین‌های کلیدی مسیرهای آپوپتوز استفاده شود. در نهایت، بررسی اثربخشی و ایمنی این نانوذرات در مدل‌های حیوانی جهت ارزیابی عملکرد - ضروری است

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(1):188314. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>
3. Gavas S, Quazi S, Karpiński TM. Nanoparticles for cancer therapy: current progress and challenges. *Nanoscale Res Lett*. 2021;16(1):173. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6>
4. Vangijzegem T, Stanicki D, Laurent S. Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019;16(1):69–78. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1554647>
5. Islam MT, Khalipha AB, Bagchi R, Mondal M, Smrity SZ, Uddin SJ, et al. Anticancer activity of Thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life*. 2019;71(1):9–19. <https://doi.org/10.1002/iub.1935>
6. Altintas F, Tunc-Ata M, Secme M, Kucukatay V. The anticancer effects of thymol on HepG2 cell line. *Med Oncol*. 2023;40(9):260. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02134-2>
7. Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. *Mol Neurobiol*. 2023;60(10):5805–37. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>
8. Habibzadeh SZ, Salehzadeh A, Moradi-Shoeili Z, Shandiz SA. Iron oxide nanoparticles functionalized with 3-chloropropyltrimethoxysilane and conjugated with thiazole alter the expression of BAX, BCL2, and p53 genes in AGS cell line. *Inorg Nano-Metal Chem*. 2023;53(2):191–8. <https://doi.org/10.1080/24701556.2021.2025074>
9. Hosseinkhah M, Ghasemian R, Shokrollahi F, Mojdehi SR, Noveiri MJ, Hedayati M, et al. Cytotoxic potential of nickel oxide nanoparticles functionalized with glutamic acid and conjugated with thiosemicarbazide (NiO@Glu/TSC) against human gastric cancer cells. *J Clust Sci*. 2022;33(5):2045–53. <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02124-2>
10. Shahmoradi SS, Salehzadeh A, Ranji N, Habibollahi H. Trigger of apoptosis in human liver cancer cell line (HepG2) by titanium dioxide nanoparticles functionalized by glutamine and conjugated with thiosemicarbazone. *3 Biotech*. 2023;13(6):195. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03609-9>
11. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
12. Faraji N, Mashkoor NR, Emamifar A, Ghamarsoorat F, Ghalehjoughi ZP, Bajgiran FA, et al. The Cytotoxic Effect of Cobalt Oxide Nanoparticle Conjugated by Menthol on Colorectal Cancer Cell Line and Evaluation of the Expression of CASP8 and FEZF1-AS1. *J Clust Sci*. 2025;36(2):39. <https://doi.org/10.1007/s10876-024-02757-z>
13. Chauhan AK, Bahuguna A, Paul S, Kang SC. Thymol elicits HCT-116 colorectal carcinoma cell death through induction of oxidative stress. *Anti-Cancer Agents Med Chem*. 2017;17(14):1942–50. <https://doi.org/10.2174/1871520617666170327121228>
14. Qoorchi Moheb Seraj F, Heravi-Faz N, Soltani A, Ahmadi SS, Shahbeiki F, Talebpour A, et al. Thymol has anticancer effects in U-87 human malignant glioblastoma cells. *Mol Biol Rep*. 2022;49(10):9623–32. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07867-3>
15. Jamali T, Kavooosi G, Safavi M, Ardestani SK. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Sci Rep*. 2018;8(1):15787. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34055-w>
16. Li Y, Wen JM, Du CJ, Hu SM, Chen JX, Zhang SG, et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(2):530–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.009>
17. Altintas F, Tunc-Ata M, Secme M, Kucukatay V. The anticancer effects of thymol on HepG2 cell line. *Med Oncol*. 2023;40(9):260. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02134-2>
18. Mandal R, Barrón JC, Kostova I, Becker S, Strebhardt K. Caspase-8: The double-edged sword. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(2):188357. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188357>

19. Adilakshmi B, Reddy OS, Hemalatha D, Rao KS, Lai WF. ROS-generating poly (Ethylene Glycol)-Conjugated Fe₃O₄ nanoparticles as cancer-targeting sustained release carrier of doxorubicin. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:4989–5004. <https://doi.org/10.2147/IJN.S379200>
20. Haghghi A, Shahanipour K, Monajemi R, Yazdanpanahi N, Fouladgar M. Evaluation of the Cytotoxic Effect of Thymol Loaded Albumin-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on MDA-MB-231 Cell Line and the Expression of Autophagic MAP1LC3A Gene. *Pharm Chem J*. 2023;57(4):486–500. <https://doi.org/10.1007/s11094-023-02910-4>
21. Papalazarou V, Maddocks OD. Supply and demand: Cellular nutrient uptake and exchange in cancer. *Mol Cell*. 2021;81(18):3731–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.026>
22. Sofi MA, Sunitha S, Sofi MA, Pasha SK, Choi D. An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *J King Saud Univ Sci*. 2022;34(2):101791. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101791>
23. Raza MH, Siraj S, Arshad A, Waheed U, Aldakheel F, Alduraywish S, et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143:1789–809. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2464-9>