

مقاله پژوهشی

اثر نانوذره اکسید کبالت عامل دار شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازید بر روی

بیان ژن‌های Bax و Bcl-2

عسل شاهرخشاهی^۱، علی صالح‌زاده^{*}، حمیدرضا وزیری^۲، زینب مرادی شوئیلی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^{*}مسئول مکاتبات: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1931920.1260

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۸

چکیده

سرطان دومین عامل شایع مرگ و میر پس از بیماری‌های قلبی-عروقی به شمار می‌رود. هدف از تحقیق کنونی بررسی ترکیب تیوسمی کاربازون-نانوذره اکسید کبالت (CO3O4-TSC) علیه سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 در شرایط *in vitro* می‌باشد. نانوذره CO3O4-TSC به روش شیمیایی و متراکم‌سازی سنتز گردید. تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره بر روی رشد سلول‌های نرمال Hek392 و سرطانی HepG2 با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. تاثیر نانو ذره CO3O4-TSC بر روی آپوپتوز با بررسی ژن‌های آپوپتوز Bax و آنتی‌آپوپتوز Bcl2 به روش Real-Time PCR و به واسطه پرایمرهای اختصاصی ارزیابی گردید. میانگین میزان بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذره ($0/091 \pm 2/19$) به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال ($0/27 \pm 0/1$) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده ($0/47 \pm 0/84$) بوده است ($p < 0/001$). میانگین میزان بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات ($0/33 \pm 0/65$) به طور معنی‌داری کمتر از سلول‌های نرمال ($0/17 \pm 0/1$) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده ($0/33 \pm 1/38$) بوده است ($p < 0/001$). میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات ($3/36$) به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال ($0/1$) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده ($0/61$) بوده است ($p < 0/001$). نانوذره CO3O4-TSC اثر سیتوتوکسیک بالایی بر روی سلول‌های سرطانی داشته که این اثر احتمالاً از طریق القاء بیان ژن آپوپتوز Bax و کاهش بیان ژن Bcl2 واسطه می‌گردد.

کلمات کلیدی: نانوذرات اکسید کبالت، سرطان کبد، آپوپتوز، Bax، Bcl2.

مقدمه

۲۰ سال آینده دو برابر شود (۱۱). میزان بقای پنج ساله در سراسر جهان کمتر از ۵ درصد است و هر سال در حدود ۶۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا جان خود را از دست می‌دهند (۱۵). از آنجایی که این نوع سرطان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود، درمان‌های

کارسینومای هپاتوسلولار یا HCC شایع‌ترین بدخیمی اولیه کبد در جهان و سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان محسوب می‌شود (۶). گزارشات حاکی از آن است که بروز سرطان کبد در ۲۵ سال گذشته افزایش چشمگیری داشته است و انتظار می‌رود که در ۱۰ تا

نانوذرات اثرات ضد سرطانی آنها را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهند. یکی از این ترکیبات تیوسمی‌کاربازون (Thiosemicarbazone) یا TSC می‌باشد که به عنوان یک لیگاند اساسی برای درمان بالقوه سرطان ریه استفاده می‌شود (۱۶). تیوسمی‌کاربازون به دلیل فعالیت بالقوه خود از جمله فعالیت‌های ضد توموری، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد مالاریایی دارای کاربردهای بسیار گسترده‌ای می‌باشد. مطالعات اخیر گزارش کردند که تیوسمی‌کاربازون از طریق فعالسازی کاسپاز و تنظیم مکانیسم Bax/Bcl2 سبب القاء آپوپتوز می‌گردد (۱۷). به همین منظور تیوسمی‌کاربازون امروزه به عنوان یک کاندیدای بسیار مناسبی برای درمان انواعی از سرطان‌ها در دست بررسی می‌باشد. از آنجایی که شیمی درمانی معمولاً با عوارض جانبی زیادی از جمله خستگی، تهوع و استفراغ، اسهال، التهاب و جوش پوستی (راش) و کاهش تعداد گلبول‌های سفید (نروپنیا) همراه می‌باشد، بنابراین جایگزین کردن آن با یک روش کم‌تهاجمی تر و با اثرات جانبی کمتر و کارایی بالاتر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. امروزه برخی از مطالعات جهت افزایش اثر ضد سرطانی تیوسمی‌کاربازون، آن را به صورت کنژوگه با برخی از نانوذرات از جمله نانوذرات اکسید آهن علیه لاین‌های مختلف سلول‌های سرطانی مورد مطالعه قرار دادند و نتایج رضایت بخشی در دسترس می‌باشد (۱۴). اما تاکنون تاثیر کنژوگه تیوسمی‌کاربازون-نانوذره اکسید کبالت علیه سلول‌های سرطانی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به گسترش موارد جدید سرطان و عوارض گسترده داروهای شیمی درمانی و نیز تلاش محققین در جهت سنتز ترکیبات جدید ضد سرطانی، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی نانوذره سنتتیک اکسید کبالت عامل داره شده با

موجود برای بیماران مبتلا بسیار محدود است (۱۸). اخیراً، استفاده از نانوذرات به عنوان یک عامل ضد سرطانی نظر محققین زیادی را جلب کرده است. مطالعات نشان داده است که برخی از نانوذرات می‌توانند باعث ایجاد آپوپتوز از طریق آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در شرایط آزمایشگاهی شوند، همچنین، اثرات ضد توموری، ضد تکثیری و اثرات ضد رگرایی آنها در شرایط آزمایشگاهی نیز بررسی شده است (۷).

یکی از مهمترین انواع نانوذرات که امروزه نظر محققین زیادی را به خود جلب کرده است، نانوذرات اکسید کبالت می‌باشد. نانوذرات اکسید کبالت (Co_3O_4) ذراتی سفید رنگ و دارای خاصیت مغناطیسی هستند که در دمای بالای ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد تبدیل به اکسید کبالت می‌شوند و با وجود کاربردها و مزایای فراوان دارای خاصیت سمی هستند و برای موجودات زنده و انسان‌ها مضر می‌باشند (۴).

مطالعات اخیر اثرات ژنوتوکسیسیته نانوذرات اکسید کبالت را گزارش کردند. برخی مطالعات گزارش کردند که اکسید کبالت از طریق اثر سینرژستیکی منجر به افزایش تولید ROS، استرس اکسیداتیو، التهاب و نهایتاً قطعه قطعه شدن DNA و مرگ سلولی می‌گردد (۱۳). به همین منظور استفاده از این ذرات نانو همچنان به عنوان یک نگرانی در بین محققین در نظر گرفته شده است. با توجه به اثر سیتوتوکسیسیته بالای نانوذرات اکسید کبالت و القاء آپوپتوز سلولی، محققین زیادی در حال بررسی اثر این محصول نانو به عنوان یک عامل ضد سرطانی علیه انواعی از لاین‌های سلولی سرطانی می‌باشند (۵). در کنار انواعی از محصولات نانویی، برخی ترکیبات نیز پیدا شدند که نه تنها خواص ضد سرطانی بالایی دارند، بلکه کنژوگه شدن آنها با برخی از انواع

سپمپلر برداشته شد و ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO ۱٪ به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه شیکر کردن، جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا (DNM-9602G) قرائت گردید و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد. میزان IC50 برای هر سه ترکیب روی رده سلولی سرطانی و نیز مقدار ۵۰CC برای رده سلول‌های نرمال، با استفاده از نرم‌افزار Graph-Pad Prism V محاسبه گردید. درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد سلول‌های زنده = (میانگین جذب نمونه تیمار / میانگین جذب نمونه کنترل) × ۱۰۰

میزان بیان mRNA ژن‌های Bax و Bcl2 با استفاده از آنالیز SYBR Green qRT-PCR ارزیابی شد. استخراج RNA کل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت (Transgen Biotech) TransZol انجام شد. سنتز cDNA بر اساس پروتوکل شرکت سازنده کیت cDNA Synthesis SuperMix (Transgen EasyScript® First-Strand Biotech) انجام شد. برای این کار ۵ μg از RNA کل، ۱ میکرولیتر Anchored oligo (DT) 18 primer (0.5 μg/μL) و ۲۰ μl آب عاری از DNase در داخل یک میکروتیوپ مخلوط شدند و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ °C آنکوبه شدند و سپس به مدت دو دقیقه روی یخ قرار داده شدند. در ادامه، ترکیبات دیگر شامل ۱ میکرولیتر EasyScript RT/RI Enzyme Mix و ۱۰ میکرولیتر ES Reaction Mix×۲ به میکروتیوپ افزوده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد آنکوبه شد. برای غیر فعال کردن آنزیم، مخلوط به مدت پنج ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد آنکوبه شد و در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جفت پرایمرهای سنتز شده بعد از دریافت (جدول ۱)، با استفاده از انزیم Premix Ex

گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازون در شرایط *in vitro* بررسی کنیم. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند بر روی مدل‌های حیوانی تومورهای سرطان کبد مورد آزمایش قرار گیرد. نهایتاً نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در روشن شدن روش‌های توقف رشد و متاستاز تومورها و نهایتاً القا مرگ سلول‌های توموری با استفاده از نانوذرات سنتزی مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

سنتز CO3O4-TSC: نانوذره CO3O4-TSC بر اساس گزارش اخیر ما سنتز گردید (۱۰). قبل از سنتز CO3O4-TSC، ترکیب تیوسمی کاربازون (۸) نانوذره (۵) Co3O4، نانوذره (۳) Co3O4-GA سنتز گردید. برای بررسی اثر CO3O4-TSC بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال، به طور خلاصه تعداد ۴ × ۱۰^۴ سلول‌های سرطانی HepG2 و سلول‌های نرمال Hek293T به طور جداگانه در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده شد. پلیت در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا ۶۰ درصد سطح چاهک‌ها پر شوند و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند و به حالت پایدار درآیند. سپس غلظت‌های ۱۵/۶۳ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره CO3O4-TSC بر روی چاهک‌های سلولی (به ازای هر غلظت ۳ چاهک) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت، محتوای چاهک‌ها به دقت خارج شد. محیط کشت رویی دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ μl از محیط کشت حاوی ۰/۵ mg/mL محلول MTT اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO2 ۵ درصد و ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان بیانگر مثبت بودن تست بود. برای حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید شده، محیط رویی چاهک‌ها با

ترتیب تنها ۱۳/۳۷، ۱۴/۴۴ و ۲۱/۳۸ درصد از سلول‌های سرطانی زنده ماندند، اما در گروه کنترل ۱۰۰٪ سلول‌ها زنده بودند ($p < 0/001$). تفاوت معنی داری در درصد سلول‌های زنده بین گروه‌های کنترل، غلظت‌های ۱۵/۶۲۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرمی مشاهده نگردید ($p < 0/05$). درصد سلول‌های زنده در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵/۶۲۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرمی از نانوذره به ترتیب برابر با ۹۵/۵۶ و ۸۸/۹۳ درصد بوده است. در غلظت ۶۲/۵ میکروگرمی از غلظت نانوذره درصد سلول‌های زنده برابر با ۷۰/۵۱ درصد بوده است و در غلظت ۱۲۵ میکروگرمی نانوذره ۴۸/۵۸ درصد از سلول‌ها زنده ماندند (شکل ۱). مقدار IC_{50} مربوط به اثر نانوذره بر روی رشد سلول‌های سرطانی ۱۳۳/۶۲ میکروگرم/میلی لیتر بوده است.

تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره CO3O4-TSC بر روی رشد و حیات سلول‌های نرمال Hek392T در شکل ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت نانوذره، به ویژه در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرمی، درصد سلول‌های نرمال زنده به طور معنی داری کاهش یافته بود ($P < 0/001$). درصد سلول‌های زنده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرمی از غلظت نانوذره به ترتیب برابر ۳۷/۹۴، ۵۶/۸۹ و ۷۰/۱۴ درصد بوده است، اما در گروه کنترل ۱۰۰٪ سلول‌ها زنده بودند ($p < 0/001$). تفاوت معنی داری در درصد سلول‌های زنده بین گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵/۶۲۵ تا ۱۲۵ میکروگرمی نانوذره مشاهده نگردید ($p < 0/05$). درصد سلول‌های زنده در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرمی از نانوذره به ترتیب برابر با ۹۳/۳۲، ۹۰/۹۶ و ۸۸/۹۱ درصد بوده است. مقدار IC_{50} مربوط به اثر نانوذره

(Taq (TaKaRa, Japan) تست شده و طول آنها از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز ۲/۵٪ اندازه‌گیری شد. بعد از آزمایش پرایمرها، واکنش‌های qRT-PCR با استفاده از SYBR® Premix Ex Taq™ kit (TaKaRa, Japan) و دستگاه ABI 7500 real-time (PCR system (Applied Biosystems, USA) و با استفاده از واکنشگرهای ریل تایم (cDNA 1 μl، 2 μl پرایمر، 10 μl مسترمیکس و 1 μl آب RNase free) انجام شد. از GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار (هاسکیپینگ) استفاده شد. شرایط چرخه دمایی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت فوق در جدول ۲ خلاصه شده است. در نهایت واکنش در ۴ درجه سانتیگراد پایان یافت. تمام واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد و وضعیت بیان ژن‌های هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با سطح بیان mRNA ژن GAPDH مقایسه شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز یک سوی واریانس one way ANOVA در مورد داده‌های کمی و در مورد داده‌های کیفی بسته به نوع آزمایش با توجه به نمونه‌های کنترل انجام خواهد شد. برای این آنالیزها از نرم‌افزارهای SPSS استفاده خواهد شد. ارزش $p < 0/05$ به صورت معنی‌دار تفسیر خواهد شد. داده‌های حاصل از الایزا در نرم‌افزار Graph-Pad Prism با احتساب انحراف معیار رسم شد.

نتایج

تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره CO3O4-TSC بر روی رشد و حیات سلول‌های سرطانی HepG2 در شکل ۱ نشان داده شده است. با افزایش غلظت نانوذره درصد سلول‌های سرطانی زنده به طور معنی داری کاهش یافته بود، به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرمی از غلظت نانوذره به

بر روی رشد سلول‌های نرمال ۷۰۱/۶۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بوده است. تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره CO3O4-TSC بر روی بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی و نرمال در شکل ۳ نشان داده شده است. میانگین میزان بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذره (۲/۱۹ ± ۰/۰۹۱) به طور معنی‌داری بیشتر از بیان ژن Bax در سلول‌های نرمال (۰/۱ ± ۰/۰۲۷) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده (۰/۸۴ ± ۰/۰۴۷) بوده است (p < ۰/۰۰۱). از طرفی میزان بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی تیمار نشده با نانوذرات به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بوده است (p = ۰/۰۴۷).

بر روی بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی و نرمال در شکل ۴ نشان داده شده است. میانگین میزان بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات (۳/۳۶) به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال (۰/۱) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده (۰/۶۱) بوده است (p < ۰/۰۰۱). میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار نشده حتی به طور معنی‌داری کمتر از سلول‌های نرمال بوده است (p = ۰/۰۳۸).

میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی و نرمال در شکل ۵ نشان داده شده است. میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات (۳/۳۶) به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نرمال (۰/۱) و سلول‌های سرطانی تیمار نشده (۰/۶۱) بوده است (p < ۰/۰۰۱). میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار نشده حتی به طور معنی‌داری کمتر از سلول‌های نرمال بوده است (p = ۰/۰۳۸).

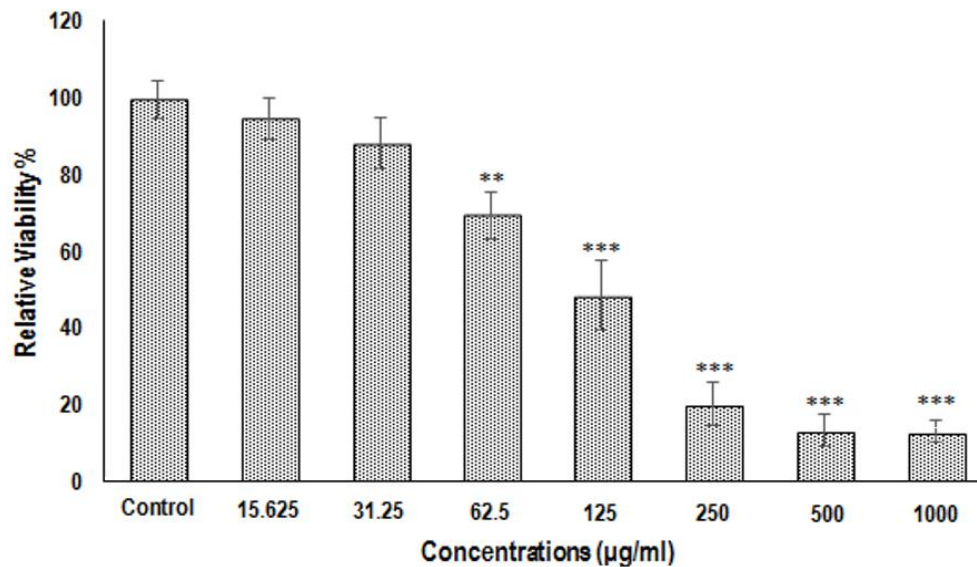
تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره CO3O4-TSC بر روی بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی و نرمال در شکل ۴ نشان داده شده است. میانگین میزان بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های BAX, Bcl2 و GAPDH

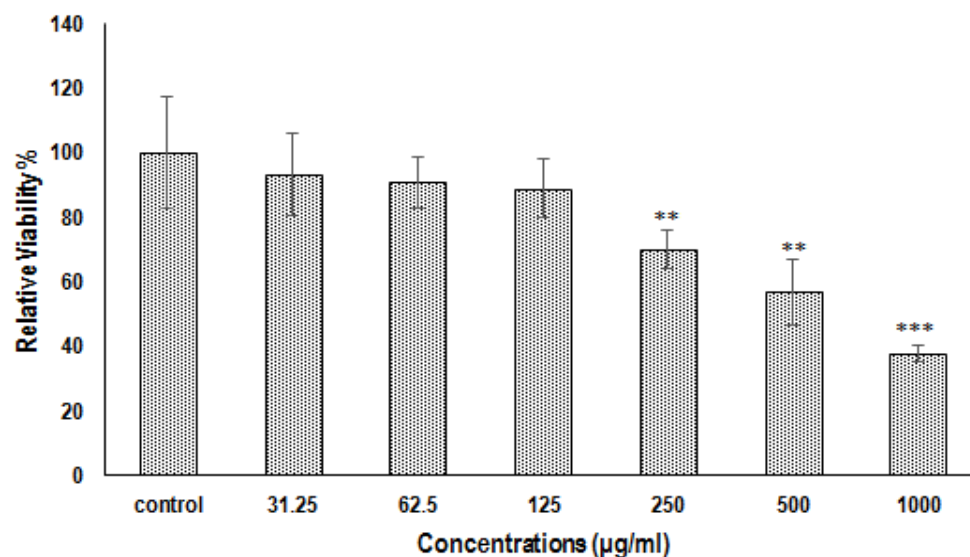
Gene	Primers
BCL2	F: 5'- TGGCCAGGGTCAGAGTTAAA -3'
	R: 5'- TGGCCTCTCTTGCGGAGTA -3'
Bax	F: 5'- CGGCAACTTCAACTGGGG -3'
	R: 5'- TCCAGCCCAACAGCCG-3'
GAPDH	F: 5'- CCCACTCCTCCACCTTTGAC -3'
	R: 5'- CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA -3'

جدول ۲. برنامه و مراحل واکنش qRT-PCR

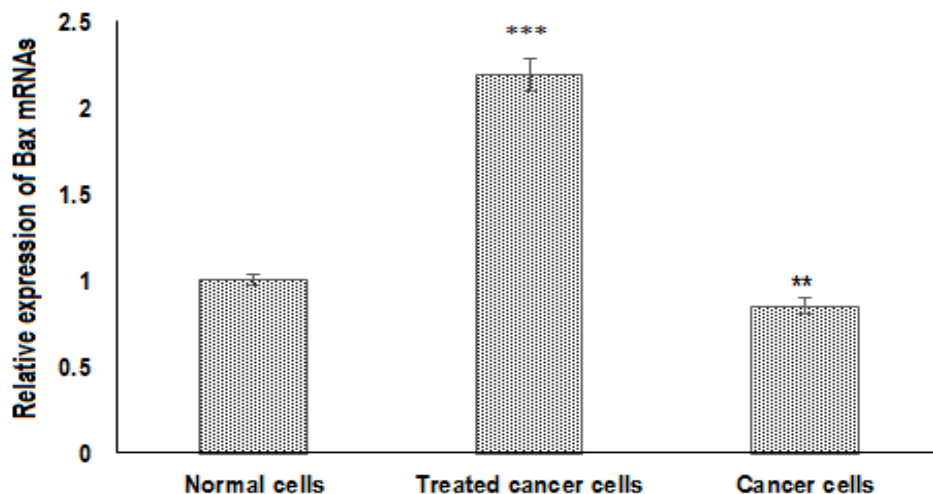
مرحله واکنش	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
مرحله دناتوراسیون اولیه	۱۰ ثانیه	۹۵
مرحله دناتوراسیون موجود در سیکل	۵ ثانیه	۹۵
مرحله آنیلینگ	۱۵ ثانیه	۶۰
مرحله تکثیر	۱۰ ثانیه	۷۲
تعداد سیکل: ۴۰ سیکل		



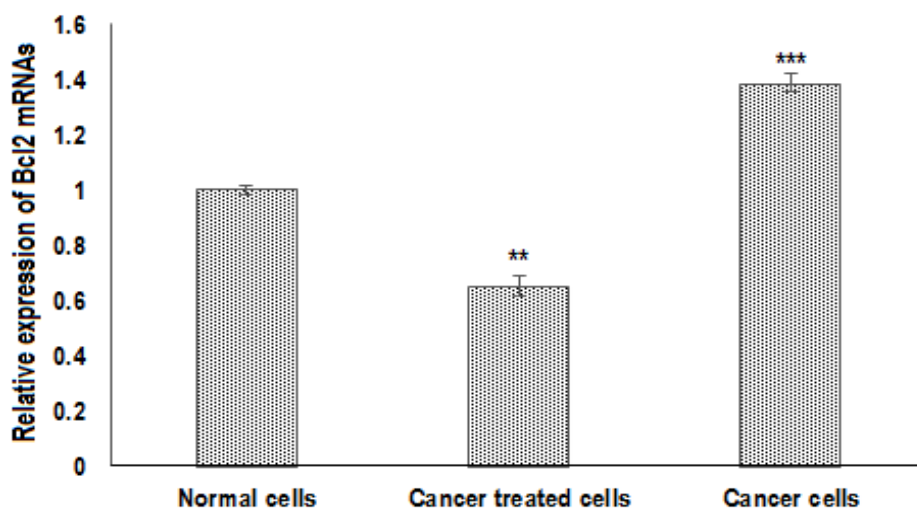
شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره CO3O4-TSC بر روی رشد سلول‌های سرطانی HepG2. معنی‌داری تمامی غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل بررسی شده است. علامت ** به معنی $p < 0.05$ و علامت ***: $p < 0.001$ می‌باشد.



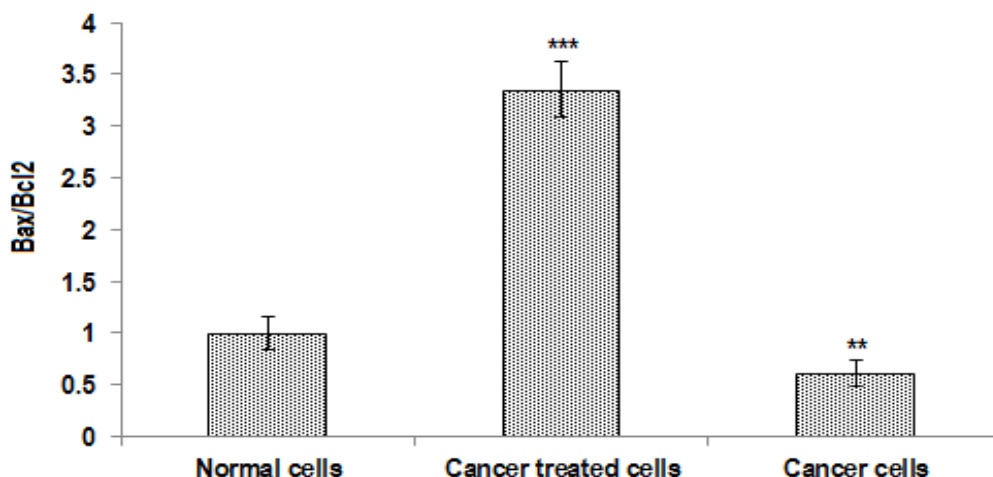
شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره CO3O4-TSC بر روی رشد سلول‌های نرمال Hek293T. معنی‌داری تمامی غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل بررسی شده است. علامت ** نشان دهنده $p < 0.05$ و علامت *** به معنای $p < 0.001$ می‌باشد.



شکل ۳- میزان بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی و نرمال. معنی‌داری بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی و سلول‌های سرطانی تریتم شده با نانوذره در مقایسه با سلول‌های نرمال بررسی شده است. علامت ** به معنی $p < 0/05$ و علامت ***: $p < 0/001$ می‌باشد.



شکل ۴- میزان بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی و نرمال. معنی‌داری بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی و سلول‌های سرطانی تریتم شده با نانوذره در مقایسه با سلول‌های نرمال بررسی شده است. علامت ** به معنی $p < 0/05$ و علامت ***: $p < 0/001$ می‌باشد.



شکل ۵- میزان نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی و نرمال. معنی داری نسبت بیان Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی و سلول‌های سرطانی تریت شده با نانوذره در مقایسه با سلول‌های نرمال بررسی شده است. علامت ** به معنی $p < 0/05$ و علامت ***: $p < 0/001$ می‌باشد.

بحث

همین منظور در این تحقیق، میزان بیان ژن آپوپتوز Bax و آنتی‌آپوپتوز Bcl2 در سلول‌های نرمال، سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات و سلول‌های سرطانی تیمار نشده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی‌های ما نشان داد که میزان بیان ژن آپوپتوز Bax در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال به طور معنی‌داری کمتر می‌باشد، در حالیکه میزان بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl2 افزایش چشمگیری داشته است. افزایش بیان ژن Bcl2 و از طرفی کاهش بیان ژن آپوپتوز Bax در سلول‌های سرطانی احتمالاً یکی از مهمترین دلایل نامیرا بودن سلول‌های سرطانی می‌باشد. به طور جالب توجهی، تیمار کردن سلول‌های سرطانی با نانوذرات مورد مطالعه میزان بیان ژن Bax به طور چشمگیری افزایش یافته بود، در حالیکه بیان ژن Bcl2 کاهش چشمگیری نشان داد. به طوریکه نسبت Bax/Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات برابر با $3/36$ و به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه‌ها بوده است. بنابراین،

در این تحقیق اثر نانوذره سنتتیک اکسید کبالت عامل داره شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازون بر روی رشد و آپوپتوز سلول‌های سرطانی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج تحقیق ما نشان داده است که نانوذره مورد نظر به طور معنی داری، به ویژه در غلظت‌های بالاتر، سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌گردد. در حالیکه میزان IC_{50} نانوذره بر روی سلول‌های سرطانی برابر با $133/62$ میکروگرم بوده است، میزان IC_{50} آن بر روی سلول‌های نرمال برابر با $701/65$ میکروگرم بوده است. با توجه به مقدار IC_{50} نانوذره بر روی سلول‌های نرمال و سرطانی، این نتایج دال بر این می‌باشد که این نانوذره تاثیر سایتوتوکسیسیته بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال داشته که اهمیت استفاده از آن به عنوان یک ترکیب ضدسرطانی را بیشتر می‌کند.

به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های اثر این نانوذرات القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی باشد. به

اکسیدکبالت را بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو از جمله پراکسیداسیون لیپیدی، سطح آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون، اکسیداسیون DNA، تولید ROS، آپوپتوز، و قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های سرطانی HepG2 مورد بررسی قرار دادند (۳). نتایج تحقیق آنها نشان داد که نانوذرات اکسیدکبالت به طور معنی‌داری سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون احیاء شده و افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی، تولید ROS، آسیب DNA، و القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌گردد. بنابراین، این محققین اظهار کردند که نانوذرات اکسیدکبالت از طریق القاء مسیر استرس اکسیداتیو و تولید ROS منجر به آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۲). در تحقیق دیگری Habibi و همکاران تاثیر کنتژوگه تیوسمی کاربازون-نانوذره اکسید آهن را بر روی سلول‌های سرطانی ریوی مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که کنتژوگه شدن تیوسمی کاربازون با نانوذرات اکسید آهن به طور چشمگیری با IC50 برابر با ۱۳۵.۶ میکرومولار/میلی‌لیتر سبب القاء آپوپتوز سلول‌های سرطان ریوی می‌گردد. از طرفی این کنتژوگه به طور چشمگیری با افزایش فعالیت کاسپاز ۳، افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl2 همراه بوده است که دال بر نقش بسیار مهم این کنتژوگه در القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌باشد (۸). این نتایج تا حدود زیادی همسو با یافته‌های تحقیق ما می‌باشد. در مطالعه دیگری Lessa و همکاران به بررسی سمیت نانوذرات طلا کنتژوگه شده با تیوسمی کاربازون در برابر سلول‌های توموری و مهار فعالیت تیوردوکسین پرداختند. این محققین نشان دادند که ترکیب نانوذرات طلا کنتژوگه شده با تیوسمی کاربازون باعث القاء قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های سرطانی گردید که نشان دهنده پتانسیل پرو آپوپتوزی آنهاست. به علاوه، فعالیت تیوردوکسین ردوکتاز به شدت

این نتایج تا حدودی این فرضیه را تقویت می‌کند که نانوذرات اکسیدکبالت عامل داره شده با گلوتامیک اسید و کنتژوگه با تیوسمی کاربازون احتمالاً از طریق القاء مسیر آپوپتوز، به طور معنی‌داری سبب کاهش درصد سلول‌های زنده سرطانی می‌شوند، در حالیکه اثر سایتوتوکسیسته آنها بر روی سلول‌های نرمال کمتر از سلول‌های سرطانی بوده است. این نتایج تا حدود زیادی استفاده از این نانوذرات را در جهت درمان سلول‌های سرطانی تقویت می‌کند. در همین زمینه چندین مطالعه تاکنون تاثیر نانوذرات اکسید کبالت را بر روی چندین رده از سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار دادند. برای مثال، در یک تحقیقی Ahmed و همکاران، با بررسی نانوذره اکسید آهن کبالت بر روی سلول‌های کبدی سرطانی HepG2 نشان دادند که این نانوذرات از طریق القاء تولید ROS، و افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax، P53، کاسپازهای ۳ و ۹ و از طرفی کاهش بیان ژن ضدآپوپتوزی Bcl2 سبب افزایش مرگ سلول‌های سرطانی می‌گردد که تا حدود زیادی همسو با نتایج تحقیق ما می‌باشد (۱). بنابراین، بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن احتمالاً یکی از مکانیسم‌های محوری اثر این نانوذرات در القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌باشد. در همین زمینه Abudayyak و همکاران با بررسی نانوذرات اکسیدکبالت بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 نشان دادند که تیمار کردن سلول‌های سرطانی با نانوذرات منجر به افزایش محصولات اکسیداتیوی از جمله مالون در آلدئید (محصول پراکسیداسیون لیپیدی)، پروتئین کربونیل (محصول اکسیداسیون پروتئین‌ها)، 8-OH-dG (محصول اکسیداتیوی DNA) و از طرفی کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های گلوتاتیون (GSH) می‌گردد (۲). به طور مشابهی، Alarifi و همکاران تاثیر نانوذرات

A.A. 2013. Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 8:189-199.

4. Azizi M., Ghourchian H., Yazdian F., Dashtestani F., AlizadehZeinabad H. 2017. Cytotoxic effect of albumin coated copper nanoparticle on human breast cancer cells of MDA-MB 231. *PLoS One*, 12(11): e0188639.

5. Chattopadhyay S., Sandeep K., Tripathy S., Das B., Mandal D., Pramanik P., Roy S. 2014. Toxicity of cobalt oxide nanoparticles to normal cells; an in vitro 4 and in vivo study. *Chemico-Biological Interactions*, 5: 1-14.

6. El-Serag H.B., Marrero J.A., Rudolph L., Reddy K.R. 2008. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134(6):1752-1763.

7. Gurunathan S., Raman J., Abd Malek S.N., John P.A., Vikineswary S. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 8:4399-413.

8. Habibi A., Shandiz S., Moradi-Shoeli Z., Salehzadeh A. 2019. Novel pyridinecarboxaldehyde thiosemicarbazone conjugated magnetite nanoparticulates (MNPs) promote apoptosis in human lung cancer A549 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 3:1-12.

9. Hu B., Wang B., Zhao B., Guo Q., Li Z.H., Zhang X.H., Liu G.Y., Liu Y., Tang Y., Luo F., Du Y., Chen Y.X., Ma L.Y., Liu H.M. 2017. Thiosemicarbazone-based selective proliferation inactivators inhibit gastric cancer cell growth, invasion, and migration. *Medicinal Chemistry Communications*, 8(12): 2173-2180.

10. Jarestan M., Khalatbari K., Shandiz A., Beigi S., Hedayati M., Majlesi A., Akbari F., Salehzadeh A. 2020. Preparation, characterization, and anticancer efficacy of

مهار گردید که نشان دهنده بخشی از مکانیسم عمل آنهاست (۱۲). در پژوهش دیگری Hu و همکاران گزارش کردند که غیرفعال کننده انتخابی بر پایه تیوسمی کاربازون، رشد سلولی، مهاجرت سلول‌های سرطانی معده را مهار می‌کند. آنها نشان دادند که سلول سرطانی رده MGC 803 به طور قابل توجهی به تمام ترکیبات سنتزی تیوسمی کاربازون حساس است. این مشتقات رشد سلول‌های سرطانی MGC 803 را با القا آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در مرحله S مهار نمودند (۱۶).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، نانوذره سنتتیک اکسید کبالت عامل داره شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازون اثر سیتوتوکسیک بالایی بر روی سلول‌های سرطانی داشته که این اثر احتمالاً از طریق القاء بیان ژن آپوپتوز Bax و کاهش بیان ژن Bcl2 واسطه می‌گردد. با توجه به مقدار IC50 کمتر این نانوذرات علیه سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال، به نظر می‌رسد که استفاده از دوز مناسب این نانوذرات در درمان سرطان بسیار ارزشمند می‌باشد، هر مطالعات بیشتری در آینده مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1. Ahamed M., Akhtar M.J., Majeed Khan A.M., Alhadlaq H.A., Alshamsan A. 2016. Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cells (HepG2). *Colloids Surf B Biointerfaces*, 148:665-673.
2. Abudayyak M., Gurkaynak T.A., Ozhan G. 2017. In vitro evaluation of cobalt oxide nanoparticle-induced toxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 33:646-654.
3. Alarfi S., Ali D., Al Omar Suliman Y., Ahamed M., Siddiqui M.A., Al-Khedhairi

transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis*, 24(5):439-445.

15. Shaker M.K., Abdella H.M., Khalifa M.O., El Dorry A.K. 2013, Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma in Egypt: a retrospective analysis of 1313 cases. *Liver International*, 33(10):1601-1606.

16. Vanneste P, Page C. 2019. Otitis media with effusion in children: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Journal of Otolaryngology*, 14(2):33-39.

17. Williamson I. 2011. Otitis media with effusion in children. *BMJ Clinical Evidence*, 2011:0502.

18. Wei Z., Doria C., Liu Y. 2013. Targeted therapies in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 7:87-102.

novel cobalt oxide nanoparticles conjugated with thiosemicarbazide. *Biotech*, 10(5):1-9.

11. Lee J.S. 2013. Genomic profiling of liver cancer. *Genomics and Informatics*, 11(4): 180-185.

12. Lessa J.A., Guerra J.C., de Miranda L.F., Romeiro C.F., Da Silva J.G., Mendes I.C., Speziali M., Souza Fagundes E.M., Beraldo H. 2011. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(12):1729-1739.

13. Ahamed M., Akhtar M.J., Majeed Khan M.A., Alhadlaq H.A., Alshamsan A. 2016. Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cells (HepG2). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148:665-673.

14. Ponti J., Sabbioni E., Munaro B., Broggi F., Marmorato P., Franchini F. 2009, Genotoxicity and morphological

The Effect of Cobalt-oxide Nanoparticles Conjugated with Glutamic Acid and Thiosemicarbazone on Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cancer Cells

Asal Shahrokhshahi¹, Ali Salehzadeh^{1*}, Hamidreza Vaziri², Zeinab Moradi shoeili³

¹ Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

³Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Cancer is the second most common cause of death after cardiovascular disease. The present study was aimed at assessing the cobalt oxide nanoparticles conjugated with thiosemicarbazone (CO₃O₄-TSC) against hepatic cancer cells HepG2 *in vitro*. The CO₃O₄-TSC nanoparticles were synthesized by chemical and condensation methods. The effect of different concentrations of nanoparticles on the growth of Hek392 normal and HepG2 cancerous cells was assessed by MTT assay. The effect of CO₃O₄-TSC nanoparticles on apoptosis was assessed by measuring apoptotic *Bax* and anti-apoptotic *Bcl2* genes using specific primers with the Real-Time PCR method. Mean expression of *Bax* gene in nanoparticle-treated cancer cells (2.19 ± 0.091) was significantly higher than normal cells (1.0 ± 0.027) and untreated cancer cells (0.84 ± 0.047) ($p < 0.001$). The mean expression of *Bcl2* gene was significantly lower in nanoparticle-treated cancer cells (0.65 ± 0.033) than in normal (1.0 ± 0.017) and untreated cancer cells (1.38 ± 0.033) ($p < 0.001$). The expression ratio of *Bax/Bcl2* in nanoparticle-treated cancer cells (3.36) was significantly higher than normal (1.0) and untreated cancer cells (0.61) ($p < 0.001$). CO₃O₄-TSC nanoparticle has a high cytotoxic effect on cancer cells, possibly mediated by the induction of apoptotic *Bax* expression and decreased expression of anti-apoptotic *Bcl2* gene.

Keywords: Cobalt-oxide Nanoparticles, Liver Cancer, Apoptosis, *Bax*, *Bcl2*