

مقاله پژوهشی

اثر نانوذره اکسید روی (ZnO) عامل دار شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازید (TSC) بر روی بیان ژن‌های *Bax*، *bcl-2* و *caspase-3* در رده سلولی آدنوکارسینوما معدهصدف بیگی^۱، علی صالح‌زاده^{۱*}، هادی حبیب‌اللهی^۱، سیدعطاله سادات شان‌دیز^۲، فریبا صفا^۳

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

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1936578.1279

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶

چکیده

کنژوگه کردن نانوذرات فلزی با تیوسمی کاربازید یا مشتقات آن می‌توند منجر به بهبود پایداری و قابلیت ضدسرطانی آنان از طریق القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شود. بنابراین، هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات اکسید روی عامل دار شده با گلوتامیک اسید کنژوگه شده با تیوسمی کاربازید (Zn@Glu/TSC) و سپس ارزیابی قابلیت ضد سرطانی آنان از طریق سنجش سمیت سلولی و بیان ژن‌های دخیل در تنظیم آپوپتوزیس در سلول‌های آدنوکارسینوما معده (AGS) است. ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانوذرات سنتز شده از طریق آنالیزهای FT-IR، میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره و اندازه‌گیری پتانسیل زتا تعیین گردید. میزان سمیت سلولی و دوز مهاری میانه نانوذرات بر سلول‌های AGS از طریق آزمایش MTT تعیین گردید. سپس میزان بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax*، *caspase-3* در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات از طریق آزمایش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات ساخته‌شده کروی بوده و دارای اندازه ۱۰ تا ۹۰ نانومتر بودند. ماهیت ذرات توسط طیف‌سنجی FT-IR تأیید شد و مقدار پتانسیل زتا نیز -11.7 mV- به دست آمد. نانوذرات ساخته‌شده در غلظت‌های $15/62$ $\mu\text{g/mL}$ و بالاتر به‌طور چشمگیری باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های AGS شدند و مقدار دوز مهاری میانه 90 $\mu\text{g/mL}$ به دست آمد. همچنین، در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات بیان ژن‌های *caspase-3* و *bax* به میزان $1/67$ و $1/80$ برابر افزایش داشت درحالی‌که میزان بیان ژن *bcl-2* به میزان $0/70$ برابر در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش معنی‌دار داشت.

کلمات کلیدی: سرطان معده، تیوسمی کاربازید، نانوذرات اکسید روی، ضد سرطان.

مقدمه

رایج شده و چالش‌هایی جدی در زمینه درمان مؤثر سرطان معده به وجود آورده است (۶). علاوه بر این، تشخیص دیرهنگام این بیماری منجر به کاهش اثربخشی روش‌های مبتنی بر جراحی و شیمی‌درمانی

سرطان معده به‌عنوان یکی از رایج‌ترین انواع سرطان و دومین عامل مرگ‌ومیرهای مرتبط با سرطان در دنیا شناخته می‌شود. از سویی بروز انواع متاستاتیک و مقاوم به درمان، منجر به ناکارآمدی روش‌های درمانی

در سالیان اخیر، تیوسمی کاربازید (TSC) به‌عنوان یک ماده دارای عملکردهای ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد سرطانی معرفی شده است (۲۰). استفاده از مشتقات تجاری این ماده بر علیه برخی از سرطان‌ها وارد فازهای کارآزمایی بالینی شده است (۱۷). مطالعات اخیر نشان داده است که کمپلکس‌های این ماده با ذرات فلزی منجر به بهبود کارایی آنان بر علیه سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۶، ۲۴).

با توجه به نقش ژن‌های دخیل در فرایند تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوزیس، بروز هرگونه تغییرات در بیان این ژن‌ها می‌تواند منجر به اختلال در فرایند چرخه سلولی سرطانی شوند. مطالعات پیشین، نقش کمپلکس‌های تیوسمی کاربازید و نانوذرات فلزی بر تغییر بیان چنین ژن‌هایی را به‌خوبی نشان داده‌اند (۱۶، ۲۴).

بر این اساس، هدف از این پژوهش، سنتز نانوذرات اکسید روی عامل دار شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازید، تعیین قابلیت سمیت سلولی و ارزیابی اثر آنان بر بیان ژن‌های *bax*، *bcl-2* و *caspase-3* آنان در سلول‌های آدنوکارسینوما معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات: به‌منظور سنتز نانوذرات اکسید روی (ZnO) محلول آمونیاک غلیظ به آرامی به محلول نیم مولار $ZnCl_2$ تا رسیدن به $pH=11$ افزوده شد. محلول فوق به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد تا رسوب سفیدرنگ نانوذرات اکسید روی حاصل شود. نانوذرات حاصله با استفاده از سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه) و به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی گردید و با استفاده از آب مقطر و اتانل شستشو شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نانوذرات عامل دار شده با گلوتامیک

می‌گردد. در کشور ما، ایران، سرطان معده با تعداد موارد جدید سالیانه ۷۳۰۰ مورد، به‌عنوان یکی از رایج‌ترین انواع سرطان و درعین‌حال مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در مردان و زنان ایرانی در نظر گرفته می‌شود. از سویی، به دلیل تشخیص دیر هنگام و عدم پاسخ مؤثر در برابر درمان دارویی، نرخ زنده‌مانی ۵ ساله این بیماری در بیماران ایرانی کمتر از ۲۵ درصد گزارش شده است (۸). بنابراین، یافتن ترکیبات طبیعی یا شیمیایی جدید، مؤثر و کارآمد علیه سرطان معده مورد توجه محققین دنیا قرار گرفته است. استفاده از ذرات با ابعاد نانو به دلیل دارا بودن ویژگی‌های خاصی همچون نسبت سطح به حجم بالا، اندازه بسیار پایین و قابلیت نفوذ به سلول‌ها، جایگاه ویژه‌ای را در حوزه کاربردهای پزشکی به خود اختصاص داده است. کارایی استفاده از نانوذرات مختلف همچون نقره و روی علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۳، ۱۰). به دلیل وجود ویژگی‌های ضد توموری و همچنین زیست سازگاری مناسب، نانوذرات روی، جایگاه ویژه‌ای را در مطالعات بر روی ترکیبات ضد سرطانی به خود اختصاص داده‌اند. عملکرد این ذرات عمدتاً با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و القا، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) مرتبط بوده‌اند (۱).

طراحی و به‌کارگیری کمپلکس‌های حاوی نانوذرات فلزی متصل شده به ترکیبات مختلف، به‌عنوان یک رویکرد نوین به‌منظور افزایش اثربخشی و زیست سازگاری نانوذرات فلزی و کاهش عوارض جانبی آنان در درمان سرطان در نظر گرفته می‌شوند. گزارش‌های متعددی در زمینه به‌کارگیری کمپلکس‌های نانوذرات مختلف بر علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی منتشر شده است (۱۸، ۱۴، ۷).

سلولی، سلول‌های مذکور به‌منظور ارزیابی اثر نانوذرات سنتز شده، تحت مواجهه با نانوذرات قرار گرفتند.

تعیین سمیت سلولی نانوذرات: به‌منظور تعیین سمیت سلولی نانوذرات ZnO@Glu/TSC بر سلول‌های AGS از آزمایش MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده گردید. سلول‌های AGS در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO@Glu/TSC (۱۲/۵ تا ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) قرار گرفتند درحالی‌که چاهک‌های کنترل فاقد نانوذرات بودند. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر MTT افزوده شد و پلیت‌ها مجدداً به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعدی، پس از خارج کردن محیط کشت، به هر چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) افزوده شد. در پایان، جذب نوری هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا (ELX800, USA, USA) مورد سنجش قرار گرفت. دوز بازدارنده میانی (50% Inhibitory concentration) با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۴):

$$\text{جذب نوری تیمار - جذب نوری شاهد} \times 100 = \frac{\text{جذب نوری تیمار}}{\text{جذب نوری شاهد}} \times 100 \text{ (\%)} \text{ مهار میزان}$$

استخراج RNA کل و سنتز cDNA: به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *bcl-2*، *bax* و *caspase-3* از آزمایش Real time PCR استفاده گردید. در ابتدا سلول‌های AGS در پلیت‌های ۶ خانه و با تراکم 10^5 × ۵ سلول/چاهک کشت داده شدند. بر اساس نتایج آزمایش MTT، سلول‌ها در مواجهه با نانوذرات

اسید (Zn@Glu) به روش فوق تولید گردید با این تفاوت که مخلوط واکنش حاوی اسید گلوتامیک و کلرید روی با نسبت مولی ۱:۲ بود. در مرحله بعد، به‌منظور کنژوگه کردن تیوسمی کاربازید، ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذرات ZnO@Glu به محلول حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم تیوسمی کاربازید حل شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانل افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم تحت التراسونیکاسیون قرار گرفت و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. در پایان نانوذرات تولیدشده (ZnO@Glu/TSC) با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی شده و پس از شستشو با آب و اتانل، در ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند (۲۴).

ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانوذرات سنتز شده: بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیز Fourier-transform infrared (FT-IR) و در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} انجام پذیرفت (spectrum 100 FT-IR devise Perkin Elmer). مورفولوژی، اندازه ذرات و میزان انباشتگی نانوذرات با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) انجام پذیرفت. همچنین، پتانسیل زتا نانوذرات ZnO@Glu/TSC با استفاده از دستگاه (SZ-100, HORIBA Scientific, Japan) Zeta-sizer مورد بررسی قرار گرفت.

کشت سلولی: در این مطالعه از سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS cells) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. کشت سلول‌های مذکور در محیط Dulbecco's modified Eagle (DMEM) غنی شده با سرم گوساله ۱۰٪ و پنی‌سیلین/استرپتومایسن و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. پس از تشکیل لایه

Green، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۲ میکرو مول)، دو میکرولیتر cDNA الگو و شش میکرولیتر آب مقطر بود. فرایند تکثیر قطعات ژنتیکی شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۱۰ دقیقه) و سپس ۴۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۱۵ ثانیه)، مکمل‌سازی (۶۰ درجه سانتی‌گراد/۶۰ ثانیه) و طولیل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۴۵ ثانیه) انجام پذیرفت. ارزیابی میزان بیان هر ژن در مقایسه با ژن کنترل بر اساس روش $\Delta\Delta CT$ انجام شد (۳). توالی پرایمرهای اختصاصی هر ژن در جدول ۱ نمایش داده شده است.

آزمون‌های آماری: به‌منظور بررسی وجود تفاوت آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز یک‌سوی واریانس (one way ANOVA) و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان حد معنی‌داری در نظر گرفته شد.

ZnO@Glu/TSC با غلظت نهایی ۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. فرایند استخراج RNA کل با استفاده از کیت تجاری (Valencia, CA) Qiagen, RNeasy Plus Mini Kit و با استفاده از دستورالعمل سازنده صورت پذیرفت. پس از استخراج RNA، سنتز DNA مکمل با استفاده از کیت تجاری PrimeScript™ first strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Tokyo, Japan) انجام شد. در نهایت میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با ژن *GAPDH*، به‌عنوان ژن کنترل داخلی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن و کیت تجاری SYBR Green® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Japan) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتر و حاوی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس SYBR

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

منابع	توالی (۵'-۳')	پرایمر
(۲۶)	TTGCTTCAGGGTTTCATCCA AGACACTCGCTCAGCTTCTTG	<i>bax-forward</i> <i>bax-reverse</i>
(۲۶)	TGGCCAGGGTCAGAGTAAA TGGCCTCTCTTGCGGAGTA	<i>bcl2-forward</i> <i>bcl2-reverse</i>
(۵)	GCCTGCCGTGGTACAGA ACT GCACAAAGCGACTGGATGAAC	<i>caspase3-forward</i> <i>caspase-3-reverse</i>
(۲۶)	CCCACTCCTCCACCTTTGAC CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	<i>GAPDH-forward</i> <i>GAPDH-reverse</i>

نتایج

۳۶۳۰ cm ارتعاشات کششی گروه‌های NH- آزاد اسید گلوتامیک مرتبط باشد. همچنین، پیک جذبی مشاهده شده در cm^{-1} ۱۳۸۴ به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N گروه‌های آمیدی مرتبط است (۲۳). علاوه بر این، سیگنال

تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات: به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات سنتز شده از آزمایش FT-IR استفاده گردید. طیف‌های FT-IR نانوذرات ZnO@Glu/TSC در شکل ۱ نمایش داده شده‌اند که بر اساس آن، یک پیک جذبی قوی در cm^{-1}

مقادیر متفاوتی از نانوذرات قرار گرفتند. بر اساس نتایج، سمیت نانوذرات طی یک روند وابسته به دوز افزایش یافت به طوری که در غلظت $15/62 \mu\text{g/mL}$ و بالاتر شاهد کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی بودیم. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین زنده‌مانی سلول‌های AGS 84% و 9% بود که به ترتیب مرتبط با غلظت‌های $15/62 \mu\text{g/mL}$ و 500 بود. ضمن اینکه دوز مهاری میانه نانوذرات مذکور $90 \mu\text{g/mL}$ محاسبه گردید. نتایج آزمایش MTT در شکل ۴ نمایش داده شده است.

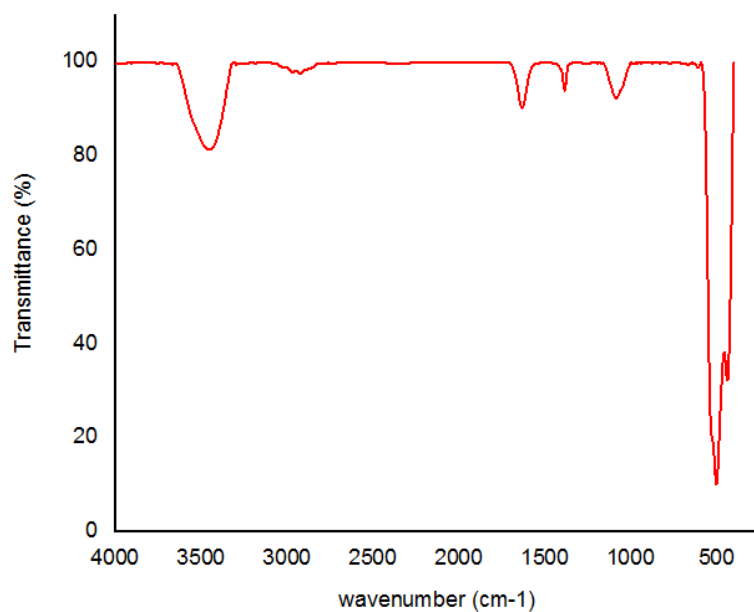
بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه: میزان بیان ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، شامل *bcl-2*، *bax* و *caspase-3*، پس از مواجهه سلول‌ها با نانوذرات Zn@Glu/TSC در غلظت $90 \mu\text{g/mL}$ با استفاده از تکنیک Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مواجهه سلول‌های AGS با نانوذرات مذکور منجر به افزایش بیان ژن *bax* به میزان $1/8$ برابر در سلول‌های تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل بود که نشانگر تفاوت معنی‌دار بین این دو گروه می‌باشد. علاوه بر این، میزان بیان ژن *caspase-3* در سلول‌های مواجهه یافته به میزان $1/67$ برابر افزایش یافت که از این نظر هم در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت چشمگیری بود. از سوی دیگر، بررسی بیان تغییرات بیان ژن *bcl-2* در دو گروه نمایانگر کاهش معنی‌دار بیان ژن مذکور در سلول‌های تیمار بود. به بیان دیگر، میزان پس از مواجهه با نانوذرات Zn@Glu/TSC میزان بیان این ژن در سلول‌های آدنوکارسینومای معده به $0/7$ برابر کاهش یافت. نتایج بیان ژن‌های مورد مطالعه در شکل ۵ نمایش داده شده‌اند.

نمایانگر گروه‌های NH_2^+ -شارژ شده اسیدآمین در طیف جذبی 2100 cm^{-1} قابل مشاهده می‌باشد (۱۹). یک پیک قوی در 1626 cm^{-1} وجود دارد که احتمالاً مربوط به ارتعاشات کششی غیرمتقارن گروه‌های COO- گلوتامین بوده که نمایانگر ماهیت آنیونی آن است (۲). از سویی، پیک‌های قابل مشاهده در 1040 و 1025 احتمالاً به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N در گلوتامین مربوط هستند (۱۲). در نهایت، پیک جذبی که در 1117 cm^{-1} مشاهده می‌گردد احتمالاً ناشی از ارتعاشات کششی پیوندهای C-O می‌باشد. همچنین مشاهده یک پیک جذبی در ناحیه حدود 1170 cm^{-1} می‌تواند با حضور گروه‌های C=S تیوسمی کاربازید مرتبط باشد که تائید کننده حضور این مولکول بر سطح نانوذرات سنتز شده است (۲۵).

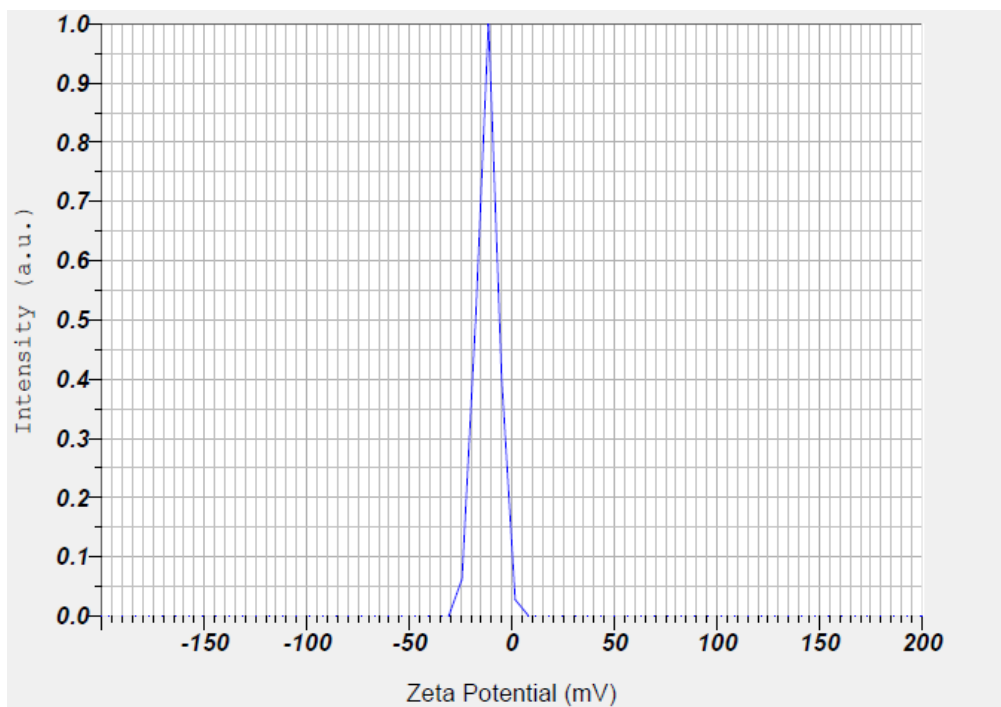
همچنین، اندازه‌گیری پتانسیل زتا نانوذرات ساخته‌شده با استفاده از دستگاه زتا سایزر نشان داد که این نانوذرات دارای پتانسیل زتا $-11/2 \text{ mV}$ می‌باشند. این نتایج نمایانگر وجود مقادیر کافی نیروی دافعه بین نانوذرات سنتز شده می‌باشد که تأمین‌کننده پایداری و جلوگیری کننده از تجمع و انباشتگی آنان است (شکل ۲).

بررسی ویژگی‌های نانوذرات ZnO@Glu/TSC با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره نمایانگر این نکته بود که نانوذرات سنتز شده ظاهری کروی دارند و اندازه ذرات ساخته‌شده در محدوده 10 تا 90 نانومتر می‌باشد که تائید کننده مقیاس نانو این ذرات است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات ZnO@Glu/TSC در شکل ۳ نمایش داده شده‌اند.

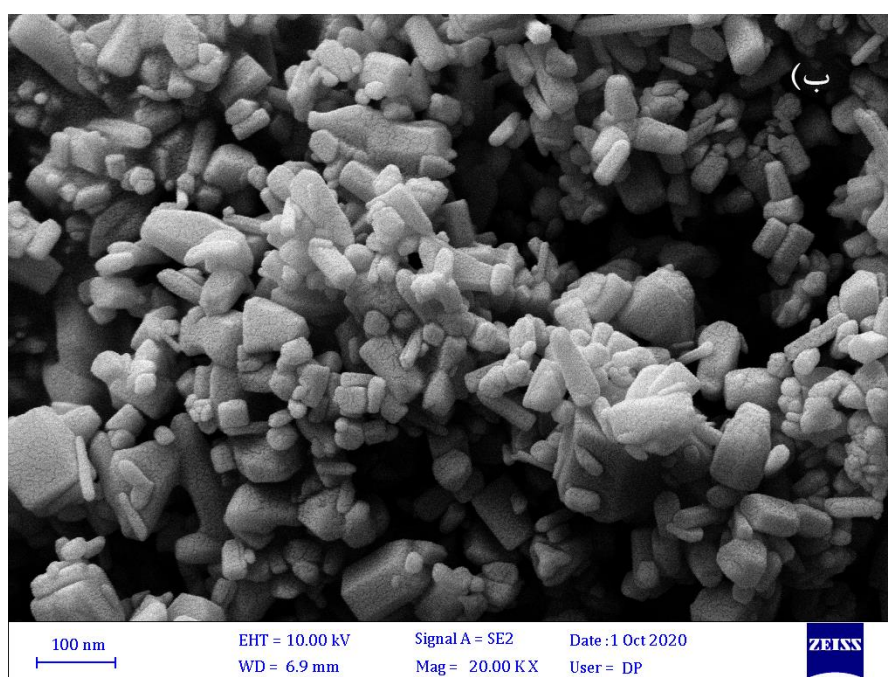
آزمون سمیت سلولی: جهت تعیین میزان سمیت نانوذرات ZnO@Glu/TSC بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده، این سلول‌ها در مواجهه با



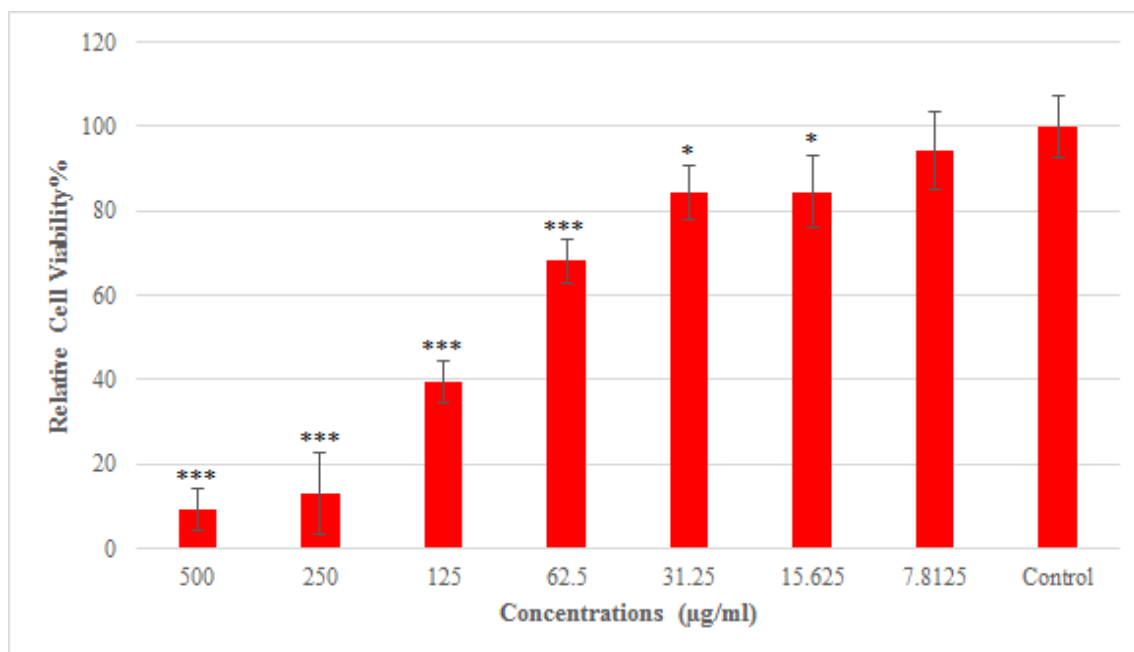
شکل ۱- آنالیز FT-IR نانوذرات Zn@Glu/TSC سنتز شده



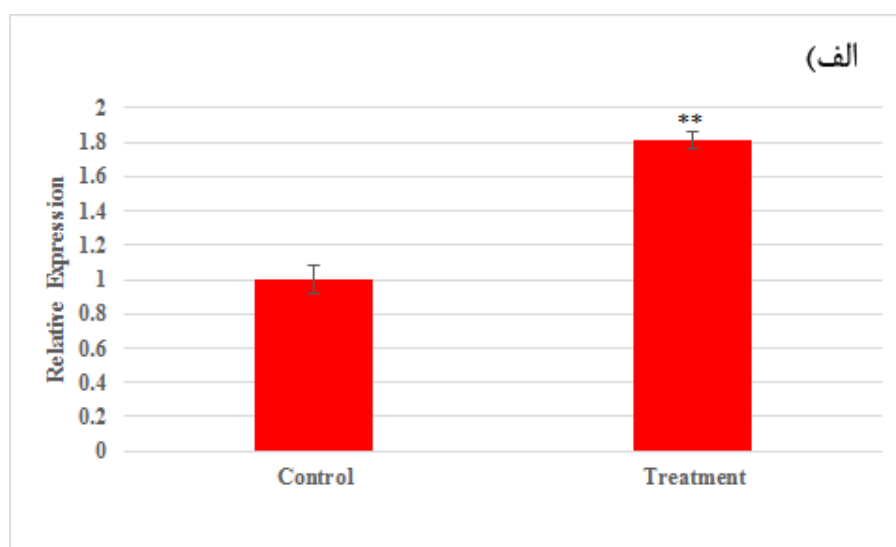
شکل ۲- سنجش میزان پتانسیل زتا نانوذرات Zn@Glu/TSC

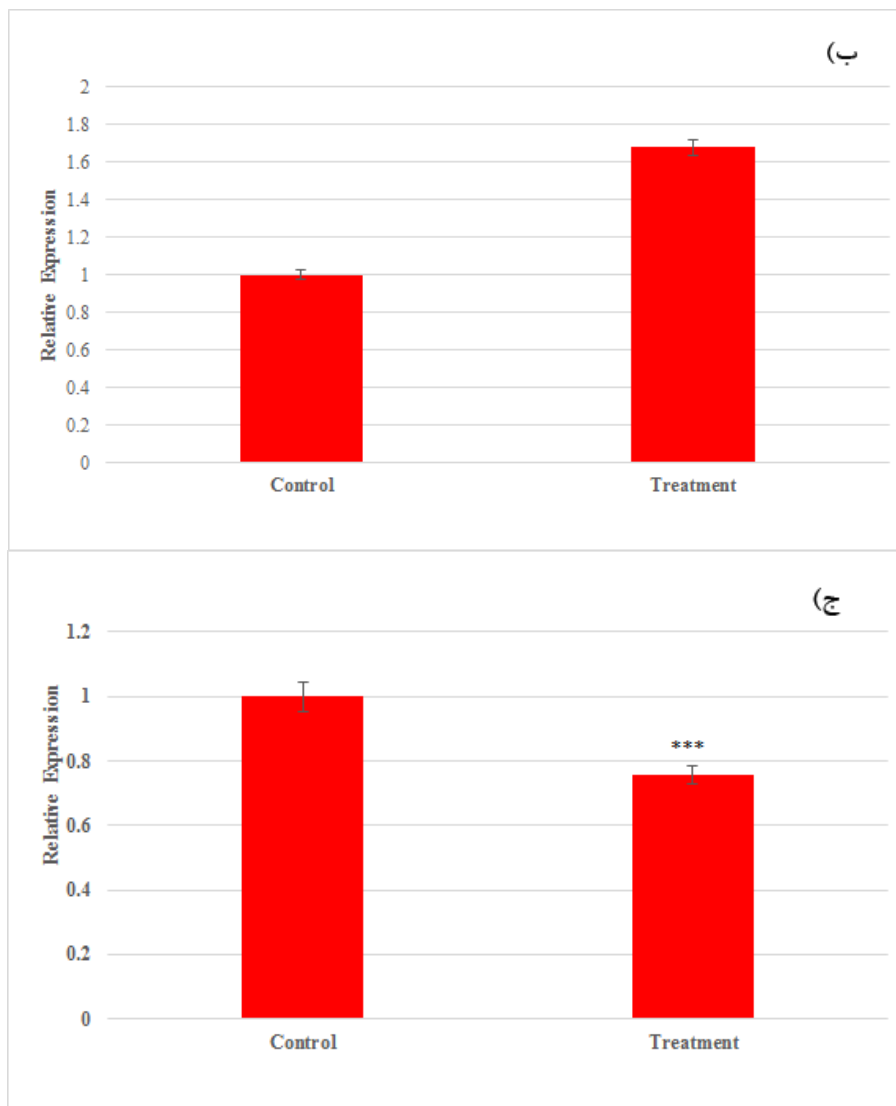


شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (الف) و میکروسکوپ الکترونی نگاره (ب) نانوذرات سنتز شده ZnO@Glu/TSC



شکل ۴- تعیین زنده مانی سلول‌های آدنوکارسینوماى معده در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO@Glu/TSC با استفاده از آزمایش MTT





شکل ۵- تغییرات بیان ژن‌های *bax* (الف)، *caspase-3* (ب) و *bcl-2* (ج) در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات ZnO@Glu/TSC در مقایسه با سلول‌های کنترل

بحث

که دارای کارایی مناسب بوده و عوارض جانبی کمتری داشته باشند هدف بسیاری از مطالعات کنونی می‌باشد. در سالیان اخیر، به دلیل افزایش روزافزون استفاده از نانوتکنولوژی در پزشکی و نتایج رضایت‌بخش استفاده از نانوذرات فلزی بر علیه سلول‌های سرطانی، استفاده از این ذرات به‌منظور مهار تکثیر سلول‌های سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴). ضمن اینکه طراحی کمپلکس‌های مولکولی نوین در مقیاس نانو، می‌تواند راهکار نوینی به‌منظور

به‌کارگیری درمان‌های مؤثر، کارآمد و با کمترین عوارض جانبی علیه سرطان یکی از اهداف اصلی محققین است. گسترش بیش از پیش سرطان معده در جوامع بشری، تشخیص دیر هنگام و گسترش انواع متاستاتیک بیماری، و همچنین بروز انواع مقاوم به داروی این سرطان، منجر به کاهش کارآمدی روش‌های فعلی درمان سرطان معده یعنی روش‌های مبتنی بر جراحی یا استفاده از داروهای رایج کنونی شده است. بنابراین، یافتن ترکیبات نوین ضد سرطانی

توجه به فعالیت کلاته‌کنندگی تیوسمی کاربازید، اختلال در عملکرد ساختارهای آنزیمی و غشای سلولی نیز قابل‌انتظار است (۲۲).

از سوی دیگر، نانوذرات فلزی با تحریک تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد استرس اکسیداتیو به ساختارهای سلولی از جمله غشاء سیتوپلاسمی و اسید نوکلئیک آسیب می‌رسانند و به‌این‌ترتیب سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۴، ۳). در مطالعات پیشین گزارش شده است که ترکیب تیوسمی کاربازون‌ها یا مشتقات آنان منجر به افزایش استرس اکسیداتیو شده و به‌این‌ترتیب منجر به افزایش خاصیت ضدسرطانی نانوترکیب در مقایسه با هر یک از اجزای تشکیل‌دهنده آن به تنهایی شدند (۲۱).

بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی سلولی در حضور نانوذرات ZnO@Glu/TSC نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای پیش آپوپتوتیک و آپوپتوتیک در این سلول‌ها می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *bax* که رمزکننده یک پروتئین فعال‌ساز مسیر آپوپتوزیس در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد در سلول‌های تیمار افزایش بیان معنی‌داری داشت. افزایش معنی‌دار بیان این ژن نشانگر القاء بروز آپوپتوزیس در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات است. همچنین، بیان ژن *caspase-3* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در آبخار پیش آپوپتوتیک به طرز چشمگیری افزایش داشت. این نتایج نیز تأییدکننده فعال‌سازی مسیر مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های تیمار می‌باشد (۱۱).

در مقابل، بیان ژن *bcl-2* در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات ZnO@Glu/TSC کاهش معنی‌داری داشت. از آنجاکه ژن مذکور رمزکننده یک پروتئین مهارکننده آپوپتوزیس است، کاهش بیان این ژن در سلول‌های مواجهه یافته با نانوذرات، تأییدکننده سایر نتایج مشاهده شده است. در تأیید این نتایج، مطالعات

بهینه‌سازی و بهبود عملکرد ضدسرطانی این ذرات و درعین‌حال کاهش عوارض جانبی آنان باشد. بر این اساس، در این مطالعه نانوذرات اکسید روی با استفاده از اسیدگلوتامیک عامل دار شده و سپس به مولکول تیوسمی کاربازید کتزوگه شدند. درنهایت، پس از مواجهه نانوذرات سنتز شده با سلول‌های آدنوکارسینومای معده، دوز سمی سلول‌ها تعیین شده و اثر آنان بر بیان ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تیوسمی کاربازون‌ها یک گروه از مواد شیمیایی دارای ویژگی‌های زیست‌فعال شامل فعالیت‌های ضد میکروبی و ضدسرطانی هستند. مطالعات اخیر نشان داده که کتزوگه کردن تیوسمی کاربازید یا مشتقات آن به نانوذرات فلزی می‌تواند منجر به بهبود پایداری آنان و همچنین افزایش ویژگی ضد توموری و ضد سرطانی آنان شود. از سوی دیگر، مطالعات پیشین به‌خوبی خصوصیات ضدسرطانی نانوذرات روی را تبیین کرده‌اند (۱۰).

بر اساس نتایج این مطالعه، نانوذرات ZnO@Glu/TSC به طرز مؤثری از تکثیر سلول‌های سرطانی AGS جلوگیری کرده و با افزایش جزئی غلظت نانوذرات، میزان زنده‌مانی سلول‌های مذکور به طرز چشمگیری کاهش پیدا کرد. چندین مکانیسم ممکن است با فعالیت ضدسرطانی نانوذرات Zn@Glu/TSC مرتبط باشند. بخشی از ویژگی‌های ضدسرطانی نانوذرات سنتز شده با فعالیت تیوسمی کاربازید مرتبط است. مطالعات پیشین نشان دادند که تیوسمی کاربازید از طریق مهار برخی آنزیم‌های مرتبط با تکثیر اسید نوکلئیک همچون توپوایزومرازها می‌تواند سبب بروز اختلال در فرایند همانندسازی DNA سلول شود. همچنین ایجاد آسیب‌های DNA و آسیب‌های غشایی در مواجهه سلول‌ها با تیوسمی کاربازید یا مشتقات آن گزارش شده است (۳، ۹). با

2- Barrak H., Saied T., Chevallier P., Laroche G., M'nif A., Hamzaoui A. H. 2019. Synthesis, characterization, and functionalization of ZnO nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMSEDTA): Investigation of the interactions between Phloroglucinol and ZnO@ TMSEDTA. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8): 4340-4347.

3- Bejarbaneh M., Moradi-Shoeili Z., Jalali, A. Salehzadeh A. 2020. Synthesis of Cobalt Hydroxide Nano-flakes Functionalized with Glutamic Acid and Conjugated with Thiosemicarbazide for Anticancer Activities Against Human Breast Cancer Cells. *Biological Trace Element Research*, 198(1): 98-108.

4- Bendale Y., Bendale V., Paul S. 2017. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *Integrative medicine research*, 6(2): 141-148.

5- Bigdeli R., Shahnazari M., Panahnejad E., Cohan R. A., Dashbolaghi A., Asgary V. 2019. Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using Escherichia coli cell-free supernatant on human breast cancer MCF 7 cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1): 1603-1609.

6- Carcas L. P. 2014. Gastric cancer review. *Journal of Carcinogenesis*, 13: 14.

7- Chen X., Yang Q., Chen J., Zhang P., Huang, Q., Zhang, X., Yang L., Xu D., Zhao C., Wang X., Liu, J. 2018. Inhibition of proteasomal deubiquitinase by silver complex induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(2): 780-797.

8- Farmanfarma, K.K, Mahdaviifar, N., Hassanipour S., Salehiniya H. 2020. Epidemiologic Study of Gastric Cancer in Iran: A Systematic Review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 13: 511-542.

گذشته کاهش بیان ژن *bcl-2* و افزایش بیان ژن‌های *bax* و *caspase-3* را در مواجهه با نانوذرات مختلف گزارش کردند. به نظر می‌رسد تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه، با فعال‌سازی مسیر آپوپتوزیس همسو باشد. به بیان دیگر، مواجهه با نانوذرات ZnO@Glu/TSC و بروز آسیب‌های سلولی ناشی از آن به‌ویژه آسیب‌های وارده به مولکول DNA، منجر به فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌گردد و تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نیز با این فرضیه همسو است. القای آپوپتوزیس در مواجهه با نانوکامپوزیت‌های حاوی یون‌های فلزی و مشتقات تیوسمی کاربازون در گذشته نیز گزارش شده است (۱۵).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانوذرات ZnO@Glu/TSC سنتز شد و فعالیت مهارکنندگی آنان بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده نشان داده شد. نانوذرات مذکور منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوزیس *Bax* و *Caspase-3* و همچنین کاهش چشمگیر ژن مهارکننده آپوپتوزیس *Bcl-2* شدند. به نظر می‌رسد که نانوذرات ZnO@Glu/TSC با ایجاد آسیب در ساختارها و اختلال در عملکردهای طبیعی سلول منجر به تحریک و فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول می‌گردند که می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی بالقوه کارآمد علیه سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1- Akhtar M. J., Ahamed M., Kumar S., Khan M. M., Ahmad J., Alrokayan, S. A. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 845.

- anticancer agent. *Journal of Coordination Chemistry*, 68(2): 277-294.
- 17- Nutting C.M., Van Herpen C.M.L., Miah A.B., Bhide S.A., Machiels J.P., Buter J., Kelly C., De Raucourt D., Harrington K.J. 2009. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of oncology*, 20(7): 1275-1279.
- 18- Oliveira D.M., Lacava Z.G., Lima E.C., Morais P.C., Tedesco A.C. 2006. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(8): 2432-2437.
- 19- Pawlukoć A., Hołderna-Natkaniec K., Bator G., Natkaniec I. 2014. L-glutamine: Dynamical properties investigation by means of INS, IR, RAMAN, ¹H NMR and DFT techniques. *Chemical physics*, 443: 17-25.
- 20- Pelosi G. 2010. Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. *The Open Crystallography Journal*, 3(1).
- 21- Rameshthangam P., Chitra J. P. 2018. Synergistic anticancer effect of green synthesized nickel nanoparticles and quercetin extracted from *Ocimum sanctum* leaf extract. *Journal of materials science & technology*, 34(3): 508-522.
- 22- Richardson D. R., Sharpe P. C., Lovejoy D. B., Senaratne D., Kalinowski D. S., Islam M., Bernhardt P. V. 2006. Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity. *Journal of medicinal chemistry*, 49(22): 6510-6521.
- 23- Senthilkumar S. R., Sivakumar T. 2014. Green tea (*Camellia sinensis*) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6): 461-465.
- 9- Habibzadeh S.Z., Salehzadeh A., Moradi-Shoeili Z., Shandiz S.A.S. 2020. A novel bioactive nanoparticle synthesized by conjugation of 3-chloropropyl trimethoxy silane functionalized Fe₃O₄ and 1-((3-(4-chlorophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)-2-(4-phenylthiazol-2-yl)hydrazine: assessment on anti-cancer against gastric AGS cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 47(3): 1637-1647.
- 10- Hamrayev H., Shameli K., Yusefi M. 2020. Preparation of zinc oxide nanoparticles and its cancer treatment effects: A review paper. *Journal of Advanced Research in Micro and Nano Engineering*, 2(1): 1-11.
- 11- Jalili A., Irani S., Mirfakhraie R. 2016. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study. *OncoTargets and therapy*, 9: 5911.
- 12- Jamdagni P., Khatri P., Rana J. S. 2018. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University-Science*, 30(2): 168-175.
- 13- Karuppaiya P., Satheeshkumar E., Tsay H. S. 2019. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using rhizome extract of *Dyosma pleiantha* and its antiproliferative effect against breast and human gastric cancer cells. *Molecular biology reports*, 46(5): 4725-4734.
- 14- Liao W., Lu Y., Fu J., Ning Z., Yang J., Ren J. 2015. Preparation and characterization of dictyophora indusiata polysaccharide-zinc complex and its augmented antiproliferative activity on human cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(29): 6525-6534.
- 15- Lodish H.F. 2000. *Molecular cell biology* (4th ed.) New York: W.H. Freeman.
- 16- Ma Z. Y., Shao J., Bao W. G., Qiang Z. Y., Xu J. Y. 2015. A thiosemicarbazone copper (II) complex as a potential

25- Sinha S. K., Ram S., Lamba O. P. 1988. Vibrational (ir and Raman) spectra and conformational studies of 1-formyl-3-thiosemicarbazide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 44(7): 713-721.

26- Xu Y., Liu L., Qiu X., Liu Z., Li H., Li Z., Luo W., Wang E. 2012. CCL21/CCR7 prevents apoptosis via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PloS one*, 7(3): e33262.

24- Shandiz S. A. S., Montazeri A., Abdolhosseini M., Shahrestani S. H., Hedayati M., Moradi-Shoeili Z., Salehzadeh A. 2018. Functionalization of Ag nanoparticles by glutamic acid and conjugation of Ag@ Glu by thiosemicarbazide enhances the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Cluster Science*, 29(6): 1107-1114.

The Effect of ZnO Nanoparticles Functionalized with Glutamic Acid and Conjugated with Thiosemicarbazide on the Expression of *Bax*, *caspase-3*, and *bcl-2* Genes in Adenocarcinoma Gastric (AGS) Cell Line

Sadaf Beigi¹, Ali Salehzadeh^{1,*}, Hadi Habibollahi¹, Seyed Ataollah Sadat Shandiz², Fariba Safa³

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

²Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Department of Chemistry, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Abstract

Conjugation of metal nanoparticles (NPs) to thiosemicarbazide improves their stability and anticancer potential. This work was aimed at preparing ZnO NPs functionalized with glutamic acid conjugated to thiosemicarbazide (Zn@Glu/TSC). Then, the anticancer potential of nanoparticles was studied by evaluating their cytotoxicity and the expression of the genes involved in cell apoptosis in AGS cancer cells. Physicochemical properties of the NPs were characterized using FT-IR, SEM, and TEM imaging, and Zeta potential assays. Cytotoxicity and inhibitory concentration 50% value of the NPs was determined using the MTT assay. Moreover, the expression of the *caspase-3*, *bax*, and *bcl-2* genes among NPs treated AGS cells was investigated using Real-time PCR assay. According to the results, the NPs were spherical with a size range of 10-90 nm. FT-IR assay confirmed the proper synthesis of the NPs and the zeta potential was determined -11.7 mV. The synthesized NPs showed significant cytotoxicity at concentrations $\geq 15.62 \mu\text{g/mL}$ and 50% inhibitory concentration was determined $90 \mu\text{g/mL}$. Besides, the expression of *caspase-3* and *bax* genes in NPs treated cells increased by 1.67 and 1.80 folds, respectively, while the *bcl-2* gene was regulated by 0.70 folds, compared to the control cells.

Keywords: Anticancer; Gastric Cancer; Thiosemicarbazide; Zinc Oxide Nanoparticles