

## Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles Functionalized by Glutamine and Conjugated to Thiosemicarbazide and their Effect on the Expression of the CASP3, Bcl2, and BAX genes

Shahrzad Sadat Shahmoradi <sup>1</sup> , Ali Salehzadeh <sup>1\*</sup> , Najmeh Ranji <sup>1</sup> , Hadi Habibollahi <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

### Article Info

**Article type:**  
Research article

**Article History:**  
Received: 05 July 2022  
Revised: 25 September 2022  
Accepted: 25 October 2022  
Published Online: 26 February 2023

**\* Correspondence to:**  
Ali Salehzadeh  
Dept of Biology, Rasht Branch,  
Islamic Azad University, Rasht,  
Iran.  
Email:  
salehzadeh@iaurasht.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** The increasing trend of cancer morbidity and mortality is a major human health concern, indicating the necessity for the design and introduction of novel anticancer compounds. The use of nanotechnology products is a new approach to cancer treatment. Therefore, the current study was performed to synthesize Titanium Dioxide nanoparticles (NPs) functionalized with glutamine and conjugated to Thiosemicarbazide (TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC) to inhibit the proliferation of liver cancer cells line (HepG2) and evaluate the effect of TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC NPs on the expression of apoptotic genes.

**Material & Methods:** TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC NPs were synthesized by a chemical method and characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), Scanning electron microscopy (SEM), and Transmission electron microscopy (TEM). The cytotoxicity of the Titanium Dioxide nanoparticles was evaluated by the MTT assay, and relative gene expression was studied by Real Time PCR method.

**Findings:** The results showed that the synthesized Titanium Dioxide nanoparticles were spherical with a size range of 59 to 82 nm. The particles had a considerable anti-proliferative effect on liver cancer cells line with IC<sub>50</sub> of 80 µg/mL. The treatment of the cancer cell line with TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC NPs significantly increased the expression of the CASP3, BAX, and BCL2 by 2.8, 2.7, and 1.3 folds, respectively, which indicated the activation of apoptotic pathways in the treated cells.

**Discussion & Conclusion:** The results showed that the TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC NPs could inhibit the proliferation of liver cancer cells line and by triggering the apoptosis pathway.

**Keywords:** Apoptosis; Caspase; Liver cancer; Thiosemicarbazide

### How to cite this paper

Shahmoradi SS, Salehzadeh A, Ranji N, Habibollahi H. Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles Functionalized by Glutamine and Conjugated to Thiosemicarbazide and their Effect on the Expression of the CASP3, Bcl2, and BAX genes. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(1): 19-28.

## سنتر نانوذره دی اکسید تیتانیوم عامل دار با گلوتامین و کنزوگه با تیوسمی کاربازید و اثر آن روی بیان ژن های BAX، BCL2 و CASP3

شهرزادسادات شاهمرادی<sup>۱</sup>، علی صالحزاده<sup>۱\*</sup>، نجمه رنجی<sup>۱</sup>، هادی حبیب‌اللهی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷

**مقدمه:** افزایش روزافزون موارد ابتلا و مرگ‌ومیر ناشی از بیماری سرطان نگرانی‌های جدی در حوزه سلامت بشر به وجود آورده است و این امر لزوم طراحی و معرفی ترکیبات ضدسرطانی جدید را بیش از پیش نمایان می‌سازد. استفاده از محصولات بر پایه فناوری نانو رویکرد جدیدی در این حوزه است. مطالعه حاضر با هدف سنتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم عامل‌دار با گلوتامین و کنزوگه با تیوسمی کاربازید (TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC)، به منظور مهار تکثیر سلول‌های رده سرطانی کبد (HepG2) و بررسی بیان برخی ژن‌های مؤثر در آپوپتوز انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به روش شیمیایی سنتر شدند و ویژگی‌های آن‌ها با استفاده از آنالیزهای FT-IR، EDS، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی گردید. بررسی میزان سمیت سلولی با استفاده از آزمایش MTT و بررسی بیان ژن‌های CASP3، BAX و BCL2 با استفاده از Real Time PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که نانوذرات سنتر شده ظاهری تقریباً کروی و با اندازه حدود ۵۹ تا ۸۲ نانومتر دارند. این ذرات در غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر، از آثار مهاری مناسبی بر سلول‌های سرطانی برخوردارند و میزان دوز نیمه‌مهاری آن‌ها ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد؛ همچنین مواجهه‌سازی سلول‌های سرطانی کبد با نانوذرات یادشده سبب افزایش بیان ژن‌های CASP3، BAX و BCL2 به ترتیب به میزان ۲/۸، ۲/۷ و ۱/۳ برابر گردید که نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیر آپوپتوز در سلول‌های مورد مطالعه است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوتیک می‌توانند به مهار تکثیر سلول‌های رده سرطانی کبد منجر شوند.

#### نویسنده مسئول:

علی صالح زاده

گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

#### Email:

salehzadeh@iaurasht.ac.ir

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز، سرطان کبد، تیوسمی کاربازید، کاسپاز

**استناد:** شاهمرادی، شهرزادسادات؛ صالحزاده، علی؛ رنجی، نجمه؛ حبیب‌اللهی، هادی. سنتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم عامل‌دار با گلوتامین و کنزوگه با تیوسمی

کاربازید و اثر آن روی بیان ژن‌های BAX، BCL2 و CASP3. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۲؛ ۳۱(۱): ۲۸-۱۹.



روش های درمانی با کارایی بالا از سوی دیگر، این بیماری را مهم ترین تهدید سلامت بشری در سالیان آینده معرفی می کند (۴). سرطان کبد یکی از مهم ترین و فراوان ترین انواع سرطان در سراسر دنیا است. میزان مرگ و میر سالانه این بیماری بیش از ۸۳۰۰۰۰ مورد تخمین زده می شود که این امر نشان دهنده وجود نداشتن رویکردهای مؤثر و قطعی در درمان این بیماری است.

با توجه به افزایش روزافزون انواع سرطان در سرتاسر دنیا، معرفی و به کارگیری ترکیبات دارویی نوین برای درمان کاملاً ضروری است و برای این منظور، استفاده از نانو فناوری، به عنوان یک ابزار نوین و آینده دار، در دسترس محققان است. بر اساس این، مطالعه کنونی به منظور ساخت نانوذرات اکسید تیتانیوم عامل دار شده با گلوتامین و کژوگه با تیوسمی کاربازید و بررسی اثر نانوذرات ساخته شده بر ژن های تنظیم کننده مسیر آپوپتوز در سلول های رده سرطان کبد انجام گرفت.

### مواد و روش ها

سنتر نانوذرات: به منظور سنتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم عامل دار شده، ابتدا مقدار ۳۰۰ میلی گرم نمک هگزا فلورئورو تیتانات پتاسیم و ۱۵۲ میلی گرم گلوتامین در ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و در حمام آبی با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد هم زده شد؛ سپس اسیدیته محلول با افزودن تدریجی محلول سود ۱۰ درصد تا عدد ۱۱ افزایش داده و در ادامه، محلول به مدت دو ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، به صورت مستمر و یکنواخت هم زده شد و در پایان، نانوذرات ساخته شده با استفاده از سانتی فوژ جداسازی گردید. نانوذرات به دست آمده به صورت سریالی با اتانل و آب مقطر شستشو داده شد و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک گردید.

برای کژوگه کردن تیوسمی کاربازید، در مرحله نخست ۵۰۰ میلی گرم از نانوذرات ساخته شده در مرحله پیش به همراه ۲۰۰ میلی گرم تیوسمی کاربازید در اتانل خالص حل شدند و به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه سونیکاسیون قرار

تیتانیوم یکی از عناصر بسیار ارزشمند و با قابلیت به کارگیری در صنایع مختلف از جمله صنایع هوا-فضا، تولید انرژی، شیمیایی و پزشکی شناخته می شود. به سبب استحکام بالا، تراکم جرمی پایین، مقاومت در برابر خوردگی و سازگاری زیستی مناسب، استفاده از این فلز و یا آلیاژهای آن در محصولات و کاربردهای پزشکی و درمانی در حال افزایش است (۱). پیدایش فناوری نانو به طراحی و به کارگیری محصولات متنوعی در این حوزه منجر گردیده است. این محصولات به علت اندازه کوچک و سطح عملکردی وسیع می توانند به خوبی در حوزه زیست-پزشکی، برای شناسایی و درمان بیماری ها استفاده شوند. استفاده از نانوذرات تیتانیوم به منظور طراحی رویکردهای انتقال دارو، درمان های مبتنی بر تابش و گرمایش (Photothermal) و درمان های ترکیبی در مقابله و درمان بیماری سرطان، توجه پژوهشگران بسیاری را به خود جلب کرده است (۲). آثار ضدسرطانی نانوذرات تیتانیوم اغلب بر اساس توانایی تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و آسیب به اجزای سلول های سرطانی شامل غشای سیتوپلاسمی، آنزیم ها و اسید نوکلئیک است (۳). از سویی، طراحی و به کارگیری مولکول های چندعاملی که لیگاندهای مؤثر درمانی داشته باشند، به عنوان رویکرد نوینی برای افزایش کارایی و کاهش عوارض جانبی نانوذرات تیتانیوم مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵).

تیوسمی کاربازید یک مولکول شیمیایی با ویژگی های مؤثر در زمینه های زیست-پزشکی شامل فعالیت های ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و همچنین ضدسرطانی است. طراحی و به کارگیری کمپلکس های دارویی تیوسمی کاربازید به منظور مقابله با سلول های سرطانی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (۶، ۷). بر اساس این، این ماده به عنوان یک لیگاند درمانی مؤثر برای طراحی داروهای چندعاملی ضدسرطانی مطرح می گردد.

بیماری سرطان یکی از بزرگ ترین عوامل مرگ و میر و کاهش کیفیت زندگی در سراسر دنیا شناخته می شود. افزایش روزافزون انواع مختلف سرطان از یک سو و نبود

چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در ادامه، غلظت نیمه‌مهارى نانوذرات با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۸):

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

بررسی اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های BAX، BCL2 و CASP3: ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های مؤثر در فرایند آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطانی مواجهه‌یافته با نانوذرات ساخته‌شده با استفاده از فن Real Time PCR انجام گرفت. ابتدا سلول‌های HepG2 به مدت ۲۴ ساعت با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و در غلظت نیمه‌مهارى مواجهه‌سازی شدند. پس از جداسازی و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، RNA کل با استفاده از محلول تجاری TriZol (سیگما، آمریکا) استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ارزیابی و تأیید شد؛ سپس مولکول cDNA با استفاده از کیت تجاری یکتا تجهیز (ایران) ساخته شد و تکثیر ژن‌های مطالعه‌شده به روش SYBR Green real time PCR و با استفاده از کیت تجاری یکتا تجهیز (ایران) و در دستگاه ترموسایکلر (Techne، آلمان) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مطالعه‌شده در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است؛ همچنین از ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید و محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش Pfaffl انجام شد (۹).

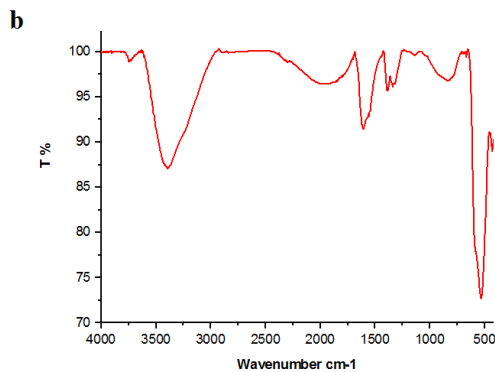
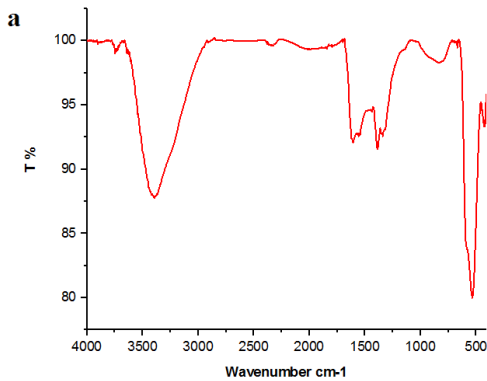
گرفتند. در ادامه، این مخلوط به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور پیوسته هم زده شد و در پایان، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم جداسازی، شستشو و خشک گردیدند و برای آزمایش‌های بعدی استفاده شدند (۷).

تعیین ماهیت و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC: با هدف تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، نانوذرات ساخته‌شده با استفاده از آنالیزهای FT-IR، EDX، IR، میکروسکوپ الکترونی عبوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردیدند. آزمایش FT-IR با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nicolet مدل IR 100 و روی نانوذرات TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC و TiO<sub>2</sub>@Gln و در محدوده 500 تا ۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> صورت گرفت. آزمایش EDX به‌منظور بررسی ترکیب عناصر موجود در نانوذرات ساخته‌شده انجام شد و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (TESCAN MIRA3) و عبوری (Zeiss-EM10C-100 KV TEM) نیز برای تعیین شکل و اندازه ذرات استفاده گردیدند.

آثار ضدسرطانی نانوذرات TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC علیه سلول‌های سرطانی کبد: رده سلولی HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت DMEM کشت داده شد. به‌منظور بررسی آثار سمیتی نانوذرات ساخته‌شده علیه سلول‌های یادشده، از آزمایش MTT و با سه تکرار برای هر غلظت استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا سلول‌های HepG2 در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و سپس غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از ۱۵/۶ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌های پلیت افزوده گردید. چاهک‌هایی که بدون نانوذرات بودند، نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند؛ سپس محلول ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT به همه چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. در مرحله بعد، محیط کشت از چاهک‌ها خارج گردید و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفو کسید اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شدند و سپس جذب نوری

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	توالی (۵'-۳')	پرایمر
(۱۸)	۱۷۹	GCCTGCCGTGGTACAGA ACT	CASP3- forward
		GCACAAAGCGACTGGATGAAC	CASP3- reverse
(۱۹)	۱۱۳	TTGCTTCAGGGTTTCATCCA	BAX- forward
		AGACACTCGCTCAGCTTCTTG	BAX- reverse
(۱۸)	۱۱۳	GGTGCCGTTTCAGGTA CTCA	Bcl2-forward
		TTGTGGCCTTCTTTGAGTT CG	Bcl2- reverse
(۱۸)	۷۴	CCCACTCTCCACCTTTGAC	GAPDH- forward
		CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	GAPDH- reverse



شکل شماره ۱. نتایج آزمایش FT-IR روی نانوذرات

a. TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC و b. TiO<sub>2</sub>@Gln

بررسی ترکیب عناصر موجود در نانوذرات دی اکسید تیتانیوم ساخته شده نشان دهنده این است که نانوذرات، تنها حاوی عناصر تیتانیوم، نیتروژن، اکسیژن، کربن و گوگرد هستند و بدون ناخالصی اند. توزیع عناصر شناسایی شده در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است. علاوه بر این، بررسی و مشاهده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات ظاهری تقریباً کروی دارند و اندازه آن‌ها در محدوده ۵۹ تا ۸۲ نانومتر ثبت گردید (شکل شماره ۲).

آنالیز آماری: به منظور انجام آنالیز آماری از نرم افزار آماری SPSS vol.18 و آزمون آماری آنالیز واریانس استفاده گردید و مقدار  $P < 0.05$  به عنوان سطح اطمینان معنی داری در نظر گرفته شد.

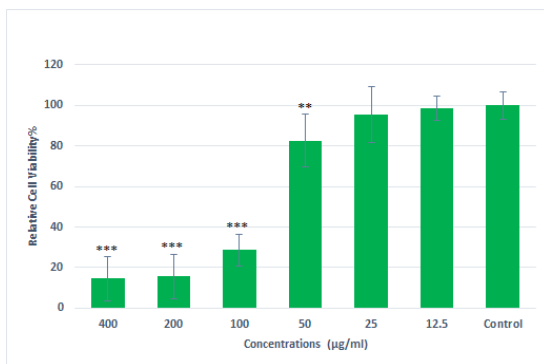
### یافته‌های پژوهش

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات ساخته شده: آزمایش FT-IR روی نانوذرات TiO<sub>2</sub>@Gln نشان دهنده وجود پیک‌هایی در مناطق  $427 \text{ cm}^{-1}$  و  $535 \text{ cm}^{-1}$  بود که می‌تواند با پیوند تیتانیوم و اکسیژن مرتبط باشد؛ همچنین پیک‌های مشاهده شده در  $1640/8$ ،  $1387$ ،  $1389/9$  و  $1607$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب به کششی  $\text{C}=\text{O}$ ،  $\text{C}-\text{H}$ ، پیوند کششی  $\text{N}-\text{H}$  و پیوند کششی  $\text{O}-\text{H}$  موجود در گلو تامین مرتبط هستند. بررسی طیف FT-IR نانوذره TiO<sub>2</sub>@Gln-TSC نشان دهنده وجود طیف‌های مرتبط با پیوند تیتانیوم و اکسیژن در  $430/96$  و  $535$   $\text{cm}^{-1}$  است. علاوه بر این، پیک‌های مشاهده شده در  $1339/2$ ،  $1337/6$  و  $1389/9$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب به پیوندهای  $\text{C}-\text{H}$ ،  $\text{C}=\text{S}$ ،  $\text{C}-\text{N}$  مربوط اند؛ همچنین پیک‌هایی که در  $1607 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شوند، به ترتیب مربوط به پیوندهای  $\text{C}=\text{N}$  و  $\text{N}=\text{O}$  و پیک‌های موجود در محدوده بین  $3000 \text{ cm}^{-1}$  تا  $4000 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند  $\text{O}-\text{H}$  هستند (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۲. درصد عناصر شناسایی شده در نانوذرات دی اکسید تیتانیوم ساخته شده

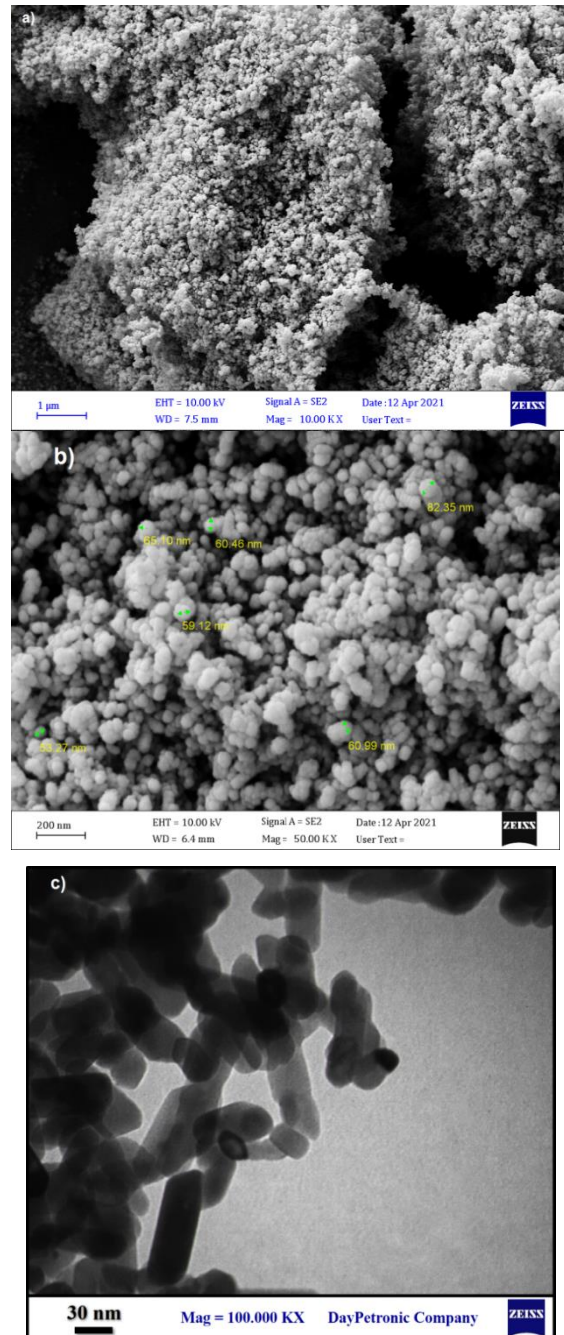
ZAF	Atomic %	Weight %	Kr	K	Elements
0.4560	6.61	3.62	0.0165	0.0303	C
0.6197	18.77	11.97	0.0742	0.1361	N
0.1526	53.85	39.22	0.0599	0.1098	O
0.9077	0.15	0.21	0.0019	0.0036	S
0.8729	20.62	44.98	0.3926	0.7203	Ti
	100.00	100.00	0.5451	1.0000	Total

آزمایش MTT: آزمایش MTT برای بررسی میزان اثر سمیتی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر سلول‌های رده سرطان کبد و تعیین غلظت نیمه‌مهارى آن‌ها انجام گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که نانوذرات یادشده در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به‌طور چشمگیری به کاهش جمعیت سلول‌های زنده منجر شدند، به طوری که در غلظت یادشده کمی بیش از ۸۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند، درحالی که در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کمتر از ۲۰ درصد ثبت شد. شکل شماره ۳ میزان زنده‌مانی سلول‌های HepG2 را در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نمایش می‌دهد.



شکل شماره ۳. بررسی اثر مهارى نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر سلول‌های سرطان کبد با استفاده از آزمایش MTT. مقدار  $P < 0.05$  به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

بررسی تغییرات بیان ژن: بیان نسبی ژن‌های CASP3، BCL2 و BAX در رده سلولی سرطان کبد مواجهه یافته با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بررسی شد. بر اساس نتایج، میزان بیان نسبی همه ژن‌های مطالعه شده در اثر مواجهه با نانوذرات به طرز چشمگیری افزایش یافتند. بیشترین میزان افزایش (۲/۸ برابر) مرتبط با ژن CASP3 بود و کمترین میزان افزایش نیز

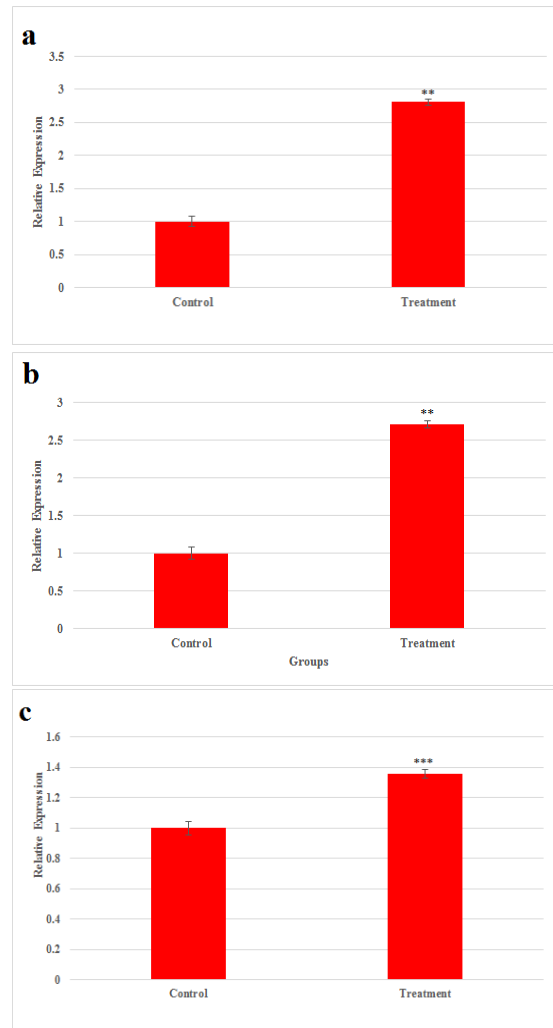


شکل شماره ۲. بررسی شکل و اندازه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (a) و (b) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و (c) میکروسکوپ الکترونی عبوری

سرطان مشتمل بر روش‌های جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی به‌عنوان یک راهبرد کلیدی در کنترل و درمان این بیماری در نظر گرفته می‌شود. به علت کارآمدی پایین، عوارض جانبی و سمیت بالا، استفاده از چنین داروهایی با محدودیت‌هایی همراه است؛ به همین سبب، امروزه مطالعات فراوانی در زمینه طراحی و به‌کارگیری ترکیبات نوین شیمیایی علیه انواع مختلف سرطان انجام می‌شود. استفاده از ترکیباتی با ابعاد نانو می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد جدید و مؤثر در زمینه تشخیص و درمان بیماری سرطان مدنظر قرار گیرد. ذرات نانو به سبب داشتن سطح مؤثر وسیع می‌توانند ویژگی‌های جدید و مؤثرتری را در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر از خود نمایش دهند. بر اساس این، مطالعه حاضر به منظور سنتز نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم عامل‌دار شده با گلوتامین و کنژوگه با تیوسمی کاربازید و بررسی اثر آن بر بیان برخی ژن‌های تنظیم‌کننده مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد انجام گرفت.

بررسی اثر مهاری نانوذرات سنتز شده بر سلول‌های سرطان کبد نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم قابلیت ضد تکثیر فراوانی علیه سلول‌های یاد شده دارد و می‌تواند در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به مقدار قابل توجهی رشد سلول‌های سرطانی را کاهش دهد. اثر مهاری این نانوذرات بر سلول‌های سرطانی را می‌توان با چندین عامل مرتبط دانست که در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرند. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از مهم‌ترین رخدادهایی است که در اثر مواجهه با نانوذرات فلزی قابل انتظار است. مطالعات گذشته نشان دادند که نانوذرات فلزی قادر به افزایش چشمگیر میزان گونه‌های فعال اکسیژن هستند و این مولکول‌ها به علت ناپایدار بودن می‌توانند به اجزای مختلف سلول‌ها از جمله غشای سلولی، DNA و پروتئین‌ها آسیب برسانند و به نکرز سلولی یا فعال‌سازی مسیر آپوپتوز منجر شوند (۷، ۱۱)؛ همچنین بروز استرس اکسیداتیو و به دنبال آن، مرگ سلولی در اثر مواجهه با نانوذرات حاوی تیتانیوم در مطالعات پیشین نیز گزارش شده

در ژن BCL2 (۱/۳ برابر) مشاهده شد؛ همچنین بیان ژن BAX به میزان ۲/۷ برابر افزایش یافت. نتایج مربوطه در شکل شماره ۴ ارائه شده‌اند.



**شکل شماره ۴.** بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مدت ۲۴ ساعت. مقدار  $P < 0.05$  به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است. a: بیان ژن CASP3 که به مقدار ۲/۸ برابر افزایش یافته است، b: بیان ژن BAX که به مقدار ۲/۷ برابر افزایش یافته است، c: بیان ژن BCL2 که به مقدار ۱/۳ برابر افزایش یافته است.

### بحث و نتیجه‌گیری

علیرغم پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها، موارد ابتلا و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر دنیا در حال افزایش است و این بیماری به یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های تهدیدکننده زندگی انسان‌ها تبدیل شده است (۱۰). اگرچه مداخلات درمانی رایج بیماری

است (۱۱).

به سبب تکثیر سلولی سریع، سلول‌های سرطانی سرعت متابولیک بالایی دارند و این امر به افزایش نفوذپذیری آن‌ها به منظور جذب بیشتر و سریع‌تر مواد غذایی منجر می‌گردد. گلوتامین ماده غذایی ارزشمندی است که برای انجام عملکردهای طبیعی سلول مورد نیاز است. گزارش شده است که سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های طبیعی، به این ماده نیاز دارند و بر اساس همین، میزان جذب این ماده در سلول‌های سرطانی بالاتر از سلول‌های طبیعی است (۱۲)؛ بنابراین، وجود گلوتامین برای عامل‌دار کردن نانوذرات ساخته شده ممکن است سبب تسهیل و افزایش نفوذ نانوذرات سنتز شده به داخل سلول‌های سرطانی شود و از این طریق باعث آسیب رساندن به سلول‌های یاد شده و مهار آن‌ها گردد. تیوسمی کاربازید و مشتقات آن از ویژگی‌های ضد سرطانی مناسبی برخوردارند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این ترکیبات از طریق مهار آنزیم‌های مؤثر در فرایند ساخته شدن اسیدهای نوکلئیک از جمله آنزیم‌های توپوایزومراز و ریونوکلئوتید ردوکتاز می‌توانند سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و القای مرگ سلولی شوند (۱۴-۱۳). شاندیز و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که نانوذرات نقره کتزوگه با تیوسمی کاربازید به مهار سلول‌های سرطان سینه به میزان چشمگیری منجر شدند (۱۵)؛ همچنین در مطالعه دیگری، حسینخواه و همکاران در سال ۲۰۲۱، آثار ضد سرطانی اکسید نیکل کتزوگه با تیوسمی کاربازید را علیه سلول‌های سرطان معده نشان دادند (۷). پژوهش حاضر نیز نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کتزوگه با تیوسمی کاربازید قادر به مهار تکثیر سلول‌های رده سرطان کبد هستند که منطبق با نتایج سایر محققان است.

بررسی اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های BAX، CASP3 و BCL2 در سلول‌های رده سرطان کبد نشان داد که مواجهه با نانوذرات یاد شده به کاهش معنی‌دار هر سه ژن مذکور منجر گردید. کاسپازها پروتئین‌هایی با قابلیت پروتئازمی هستند که نقش مهمی در فعال‌سازی آبشار آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی دارند. مطالعات بسیاری به

بررسی و گزارش نقش مهم پروتئین کاسپاز ۳ در آپوپتوز سلولی پرداخته‌اند (۱۶)؛ همچنین فعال‌سازی سیگنال‌های آپوپتوتیک یکی از رایج‌ترین پیامدهای ناشی از بروز آسیب به اجزای سلولی به ویژه مولکول‌های DNA به‌شمار می‌رود (۱۱). این مطالعه نشان داد که مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌های مطالعه شده منجر گردید. بروز آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و به دنبال آن، توقف چرخه سلولی و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز را می‌توان به‌عنوان محتمل‌ترین علت افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌های مطالعه شده در نظر گرفت که از این دیدگاه، منطبق بر یافته‌های پیشین است.

بررسی بیان ژن‌های BCL2 و BAX در سلول‌های تیمار شده نیز نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار هر دو ژن بود. پروتئین‌های Bcl2 و BAX متعلق به خانواده پروتئینی Bcl2 هستند و به ترتیب نقش القایی و مهارتی در آپوپتوز را بر عهده دارند؛ به بیان دیگر، پروتئین Bcl2 به‌عنوان مهارکننده کمپلکس پروتئینی BAX/BAK محسوب می‌شود و می‌تواند از بروز آپوپتوز جلوگیری کند. بررسی نسبت BAX به BCL2 می‌تواند به‌عنوان یک شاخص ارزیابی مناسب در پیش‌بینی رفتار سلول در پاسخ به شرایط استرس مدنظر قرار گیرد. در این مطالعه، اگرچه هر دو ژن یاد شده دچار افزایش بیان شدند، افزایش بیان بیشتر ژن BAX در مقایسه با ژن BCL2 می‌تواند به‌عنوان شرایط القاکننده بروز آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده در نظر گرفته شود (۱۷).

در این مطالعه، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز گردید و اثر آن بر سلول‌های رده سرطان کبد و همچنین بیان ژن‌های مؤثر در فرایند آپوپتوز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده قابلیت ضد تکثیر مناسبی علیه سلول‌های رده سرطان کبد دارند و در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به‌طور چشمگیری زنده‌مانی سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهند؛ همچنین مواجهه با نانوذرات یاد شده به افزایش بیان ژن‌های BAX و CASP3 در سلول‌های مطالعه شده منجر گردید. به نظر می‌رسد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از طریق القای آسیب‌های سلولی



بخش تفسیر نتایج شیمی تشکر می نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ تضاد منافی

ندارند.

### References

- Jackson MJ, Kopac J, Balazic M, Bombac D, Brojan M, Kosel F. Titanium and titanium alloy applications in medicine. *Surg Tools Med Devices* 2016; 475-517. doi:org/10.1007/978-0-387-27028-9\_15.
- Wang X, Zhong X, Cheng L. Titanium-based nanomaterials for cancer theranostics. *Coord Chem Rev* 2021; 430: 213662. doi: 10.1016/j.ccr.2020.213662.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 1871-77. doi:10.1021/tx800179f.
- Çeşmeli S, Biray Avcı C. Application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in cancer therapies. *J Drug Target* 2019; 27: 762-6. doi:10.1080/1061186X.2018.1527338.
- Sadat Shandiz SA, Montazeri A, Abdolhosseini M, Hadad Shahrestani S, Hedayati M, Moradi-Shoeili Z, et al. Functionalization of Ag nanoparticles by glutamic acid and conjugation of Ag@ Glu by thiosemicarbazide enhances the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *J Clust Sci* 2018; 29: 1107-14. doi:10.1007/s10876-018-1424-0.
- Xie F, Cai H, Peng F. Anti-prostate cancer activity of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazide copper complexes in vivo by bioluminescence imaging. *J Biol Inorg Chem* 2018; 23: 949-56. doi:10.1007/s00775-018-1596-y.
- Hosseinkhah M, Ghasemian R, Shokrollahi F, Mojdehi SR, Noveiri MJS, 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* 2021; 1-9. doi:10.1007/s10876-021-02124-2.
- Zhao Y, Guo C, Wang L, Wang S, Li X, Jiang B, et al. A novel fluorinated thiosemicarbazone derivative-2-(3, 4-difluorobenzylidene) hydrazinecarbothioamide induces apoptosis in human A549 lung cancer cells via ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 491: 65-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.042.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

می توانند به فعال سازی مسیر آپوپتوز و در نتیجه، مهار

سلول های سرطان کبد منجر شوند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانم دکتر زینب مرادی بابت مشاوره در

- Nucleic Acid Res* 2001; 29: e45-e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- 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: A Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- Canaparo R, Foglietta F, Limongi T, Serpe L. Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Mater* 2020; 14: 53. doi:10.2147/IJN.S28647.
- Jolfaie NR, Mirzaie S, Ghiasvand R, Askari G, Miraghajani M. The effect of glutamine intake on complications of colorectal and colon cancer treatment: A systematic review. *J Res Med Sci* 2015; 20: 910. doi:10.4103/1735-1995.170634.
- Zaltariov MF, Hammerstad M, Arabshahi HJ, Jovanovic K, Richter KW, Cazacu M, et al. New iminodiacetate-thiosemicarbazone hybrids and their copper (II) complexes are potential ribonucleotide reductase R2 inhibitors with high antiproliferative activity. *Inorg Chem* 2017; 56: 3532-49. doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b03178.
- Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS. Role of metalation in the topoisomerase II $\alpha$  inhibition and antiproliferation activity of a series of  $\alpha$ -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu (II) complexes. *J Medicin Chem* 2011; 54: 2391-98. doi:10.1021/jm101532u.
- Abbaszadeh N, Jaahbin N, Pouraei A, Mehraban F, Hedayati M, Majlesi A, et al. Preparation of Novel Nickel Oxide@ Glutamic/Thiosemicarbazide Nanoparticles: Implications for Cytotoxic and Anti-cancer Studies in MCF-7 Breast Cancer Cells. *J Clust Sci* 2022; 33: 457-65. doi:10.1007/s10876-018-1424-0.
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 897-907. doi:10.1038/nrm1496.
- Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 48-54. doi: 10.1038/sj.cdd.4400453.
- Bigdeli R, Shahnazari M, Panahnejad E, Cohan RA, Dashbolaghi A, Asgary V.

- Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using *Escherichia coli* cell-free supernatant on human breast cancer MCF7 cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47: 1603-09. doi: 10.1080/21691401.2019.1604533.
19. Xu Y, Liu L, Qiu X, Liu Z, Li H, Li Z, et al. CCL21/CCR7 prevents apoptosis via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PloS one* 2012; 7: e33262. doi: 10.1371/journal.pone.0033262.