

Investigating the Anticancer Properties of Zinc Oxide Nanoparticles Conjugated with Thiosemicarbazide on Gastric Cancer Cells and Evaluation the Expression Level of *CASP8* and *HULC* Genes

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

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

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

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

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: May. 12, 2024

Received in revised form:

Jun. 17, 2024

Accepted: Jul. 24, 2024

Published Online: Feb. 03, 2025

* Correspondence to:

Ali Salehzadeh

Dept of Biology, Rasht Branch,
Islamic Azad University, Rasht,
Iran

Email:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Nanotechnology The invention has significantly enhanced the treatment of stomach cancer. Thiosemicarbazones, a novel class of medicines that can be complexed with nanoparticles. Thus, the aim of this study was to synthesize zinc oxide nanoparticles functionalized with glutamine and conjugated with thiosemicarbazone and their cytotoxicity and their effect on the expression of *CASP8* and *HULC* Lnc-RNA genes.

Materials & Methods: In this experimental study, zinc oxide (ZnO) nanoparticles were first synthesized and functionalized with glutamine (ZnO@Gln) and conjugated with thiosemicarbazide (ZnO@Gln-TSC). FTIR, XRD, DLS, SEM, TEM analyses were performed to investigate the synthesis of nanoparticles. The cytotoxicity of nanoparticles on AGS cells was investigated by MTT test under different concentrations. The expression level of *CASP8* and *HULC* genes under the influence of IC₅₀ concentration of nanoparticles were investigated by the real-time PCR method. Data analysis was conducted using SPSS Version 16, using ANOVA and T-tests, with a P-value threshold of less than 0.05 deemed significant.

Results: FT-IR and XRD tests confirmed what the particles were made of, and the nanoparticles were found to be between 30 and 70 nm in size. DLS showed the size of nanoparticles to be 296 nm. The MTT test showed that the IC₅₀ value of nanoparticles was 10 µg/mL. Nanoparticles turned AGS cells into a test group where the *CASP8* gene went up by 6.79 and the *HULC* gene went down by 0.65 compared to the control group (P < 0.05).

Conclusion: Nanoparticles of ZnO@Gln-TSC had an effect on AGS cancer cells by increasing the amount of *CASP8* and decreasing the expression of the *HULC* gene. This stopped cell growth and caused apoptosis, which could be further studied as a drug for treating cancer.

Keywords: Thiosemicarbazide, Gastric Cancer, Nanoparticles zinc oxide, *CASP3*, *HULC*

How to cite this paper: Beigi S, Salehzadeh A, Habibollahi H, Sadat Shandiz SA, Safa F. Investigating the anticancer properties of zinc oxide nanoparticles conjugated with Thiosemicarbazide on gastric cancer cells and evaluation the expression level of *CASP8* and *HULC* genes. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;32(6):109-127.

Introduction

Gastric cancer is the fourth most common cancer in the world. Its development is affected by many things, such as an infection with *Helicobacter pylori*, a person's family history, genes, and mutations and polymorphisms that cause changes in gene expression or protein function that lead to the development of gastric cancer (1). In Iran, 50% of the country's common cancers are related to the digestive system, among which gastric cancer is the most

common (2). Following the emergence of nanotechnology, a wide range of nanoparticles, especially metal nanoparticles, have been studied in the field of cancer detection and treatment (4). Due to their small size, these substances can easily penetrate the body's tissues and effectively influence cells through their large surface area (4). Thiosemicarbazone is a significant organic compound that can fight bacteria, viruses, and tumors (4). It can also accept a lot of different metal ion compounds as main and substituent groups. Studies have



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 32, Issue 6, 2025

shown that when thiosmecarbazone combines with metal particles, it works better, including stopping cancer cells from growing (4). Its pharmacological effect is also improved with metal ions (10). This is because genes are involved in apoptosis. Any changes in how these genes are expressed, like those in *CASP8* and *HULC* Lnc-RNA, can stop the growth of cancer cells. (16). Previous studies have clearly demonstrated the role of thiosmecarbazone complexes and metal nanoparticles in altering the expression of these genes (10,16). Accordingly, the aim of this study is to synthesize zinc oxide nanoparticles. The nanoparticles will be functionalized with glutamine and conjugated with thiosmecarbazone, assessing their cytotoxicity and their impact on the expression of *CASP8* and *HULC* LncRNA genes.

Methods

All materials and solutions used in this research were of laboratory-grade purity. The gastric cancer cell line (AGS) was obtained from the cell bank of the Pasteur Institute of Iran. In order to evaluate the physical and chemical properties of ZnO@Gln-TSC nanoparticles, physicochemical tests, including FT-IR (Fourier Transform Infrared), XRD (X-ray Diffraction), transmission electron microscopes (TEM), scanning electron microscopy (SEM), and X-ray diffraction spectroscopy (EDS) tests, were done. AGS cells were treated with different concentrations of ZnO@Gln-TSC NPs, and the effect of ZnO@Gln-TSC NPs on cell viability was determined using the MTT assay. After determining the inhibitory percentage of different concentrations of nanoparticles, the cells were treated with 50% inhibitory concentration of the ZnO@Gln-TSC NPs, their total RNA was extracted, cDNA was synthesized, and gene expression level was assessed by real-time PCR. Statistical analysis was done using SPSS V.16, and the statistical difference in MTT assay was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and gene expression changes were analyzed by t-test. A p-value of less than 0.05 was also considered a significant level.

Results

The FTIR spectrum shows that the peaks for ZnO and TSC are correct, which means that the ZnO@Gln-TSC NP was made correctly.

Through an electron microscope, it was seen that ZnO@Gln-TSC NPs are almost spherical and are about 30–70 nm in size. The results of the MTT assay showed that ZnO@Gln-TSC NP at concentrations higher than 3.90 µg/ml causes a significant decrease in the survival rate of cancer cells. Also, the 50% inhibitory concentration of ZnO@Gln-TSC NP was 10 µg/ml. Also, it was observed that treatment of a gastric cancer line with ZnO@Gln-TSC NP caused a significant increase in the expression of *CASP8* and *HULC* genes by 6.79 and 0.65 folds, respectively.

Conclusion

The synthesized nanoparticle significantly reduced the survival of cancer cells and led to a significant increase in the expression of *CASP8* and a significant decrease in *HULC* gene expression. It can be concluded that the activation of apoptosis is the most likely mechanism of the anticancer effect of ZnO@Gln-TSC nanoparticles.

Authors' Contribution

Conceptualization: AS, FS, Methodology, Visualization: AS, SS, Validation: AS, SB, Formal Analysis: AS, HH, Investigation, Resources: SB, Data Curation: AS, SB, Writing– Original Draft Preparation: AS, HH, Writing– Review & Editing: AS, Supervision, Project Administration: AS, SS, HH, FS.

Ethical Statement

The ethical concerns were adhering to the Declaration of Helsinki's guidelines, which are designed to ensure honesty in library collection and data reporting, and following principles for conducting interventions on human subjects. The authors adhered to ethical standards by avoiding data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study did not receive any financial support.

Acknowledgment

The authors would like to thank the staff of the Biology Laboratory of Islamic Azad University, Rasht Branch (Guilan, Iran).

بررسی خاصیت ضدسرطانی نانوذرات اکسید روی کنژوگه با تیوسمی کاربازید بر سلول‌های سرطانی معده و ارزیابی میزان بیان ژن‌های *CASP8* و *HULC*

صدف بیگی^۱، علی صالح زاده^{۱*}، هادی حبیب الهی^۱، سید عطااله سادات شاندیز^۲، فریا صفا^۳

^۱ گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

نویسنده مسئول:

علی صالح زاده

گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

مقدمه: سرطان معده چهارمین بدخیمی شایع و دومین علت مرگ در همه بدخیمی‌های جهان است. نانو تکنولوژی به درمان مؤثر سرطان کمک کرده است. تیوسمی کاربازون‌ها گروه جدید دارویی هستند که می‌توانند با نانوذرات کمپلکس شوند و تأثیر بیشتری در درمان داشته باشند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا نانوذرات اکسید روی (ZnO) سنتز شد و با گلو تامین (ZnO@Gln) عامل‌دار و با تیوسمی کاربازید کنژوگه گردید (ZnO@Gln-TSC). آنالیزهای FTIR، XRD، DLS، SEM و TEM برای بررسی سنتز نانوذرات انجام شد. بررسی سمیت سلولی نانوذرات بر سلول‌های AGS با تست MTT تحت غلظت‌های مختلف انجام گردید. میزان بیان ژن‌های *HULC* و *CASP8* تحت تأثیر غلظت IC_{50} نانوذرات با روش Real Time PCR بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS vol.16 و آزمون‌های آنووا و تی استفاده گردید و $P < 0.05$ برای ژن‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش: ماهیت ذرات توسط FT-IR و XRD تأیید و اندازه نانوذرات در محدوده ۳۰ تا ۷۰ نانومتر گزارش گردید. آنالیز DLS اندازه نانوذرات را ۲۹۶ نانومتر نشان داد. تست MTT نشان داد که مقدار IC_{50} نانوذرات $10 \mu g/mL$ بود. تأثیر نانوذرات بر سلول‌های AGS باعث افزایش معنی‌دار ژن *CASP8* (۶/۷۹) و کاهش معنی‌دار ژن *HULC* (۰/۶۵) نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: تأثیر نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر سلول‌های سرطانی AGS با افزایش بیان ژن *CASP8* و کاهش بیان ژن *HULC*، تکثیر سلولی را مهار کرد و باعث القای آپوپتوز گردید که می‌تواند به‌عنوان دارو برای درمان بیماران سرطانی بیشتر بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: تیوسمی کاربازید، سرطان معده، نانوذرات اکسید روی، *CASP8*، *HULC*

استناد: بیگی، صدف، صالح زاده علی، حبیب الهی هادی، سادات شاندیز سید عطااله، صفا فریا. بررسی خاصیت ضدسرطانی نانوذرات اکسید روی کنژوگه با تیوسمی کاربازید بر سلول‌های سرطانی معده و ارزیابی میزان بیان ژن‌های *CASP8* و *HULC*. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، بهمن ۱۴۰۳؛ ۳۲(۶): ۱۲۷-۱۰۹.

مقدمه

سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان است و توسعه آن روند چندعاملی دارد که میتوان به نقش عفونت هلیکوباکتر پیلوری، سابقه فامیلی، زمینه ژنتیکی، جهشها و پلی مورفیسمها اشاره کرد که با تغییر میزان بیان ژن و یا تغییر عملکرد پروتئین همراه هستند و در ایجاد سرطان معده دخیل اند (۱). در ایران، ۵۰ درصد سرطانهای شایع کشور مربوط به دستگاه گوارش است که در میان آنها، سرطان معده از همه شایع تر است. حدود ۱۰ درصد از سرطان معده با منشأ ارثی بروز می کند؛ اما از این میان، تنها ۱ تا ۳ درصد کارسینوماهای معده بر اثر سندرمهای شناخته شده ایجاد می شود (۲). در سالهای اخیر، توجه فراوانی به نانوذرات مهندسی شده در زمینه پزشکی شده است. مطالعاتی در ارتباط با شناخت خصوصیات نانوذرات طلا، نقره، پلاتین، کبالت، نیکل، آهن و ترکیبات آنها به عنوان دارو و برای درمان سلولهای بدخیم سرطانی صورت گرفته است که نشان می دهد، این نانوذرات تأثیر سوئی بر سلولهای سالم ندارند. یکی از امیدبخشترین کاربردهای نانوذرات می تواند به کارگیری آنها به منظور انجام همزمان دو عمل تشخیص تومور و رساندن دارو به تومور باشد (۳، ۴). روی یک عنصر کیمیا ضروری است که بدون آن، بسیاری از آنزیمها مانند کربنیک انیدراز، کربوکسی پپتیداز و الکل دهیدروژناز غیر فعال می شوند. اکسید روی خواص دوگانه نیمه هادی و پیزوالکتریک دارد. از نانوذرات اکسید فلزی برای افزایش حلالیت داروها، افزایش دارورسانی و افزایش مقاومت داروها استفاده می شود (۵، ۶). گلو تامین برای تولید انرژی و به عنوان پیش ماده برای تکثیر سریع سلولهای سرطانی و تأمین کننده منبع کربن و نیتروژن برای سنتز اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه استفاده می گردد (۷، ۸).

تیوسمی کاربازون یکی از ترکیبات مهم آلی است که خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدتوموری دارد و می تواند طیف وسیعی از ترکیبات یونهای فلزی را به عنوان گروه اصلی و گروه جایگزینی در خود جای دهد (۹). نتایج مطالعات نشان می دهد که کمپلکس تیوسمی کاربازون با

ذرات فلزی به بهبود کارایی آنها از جمله مهار سلولهای سرطانی منجر می شود و اثر دارویی آن به همراه یونهای فلزی افزایش می یابد (۱۱، ۱۰). کاسپازها پروتئازهای اختصاصی هستند و سوبسترای خود را از محل آسپاراتات خاصی تجزیه می کنند و باعث تخریب پروتئینها یا فعال سازی کاسپازهای دیگر می گردند (۱۲). کاسپازهای آغازگر شامل ۲، ۸، ۹ و ۱۰ در ابتدای فرایند فعال می شوند و کاسپازهای اجرایی شامل ۳، ۶ و ۷ را فعال می کنند که آنها هم آشکار کاسپازی را به راه می اندازند و موجب شکست پروتئولیتیک پروتئینهای خاصی در سلول می گردند. ژن *CASP8* در جایگاه q33.1۲ قرار دارد. این ژن در مرگ برنامه ریزی شده نقش دارد. مسیر خارجی با اتصال لیگاند مرگ فعال می شود و موجب فعال شدن *CASP8* و به دنبال آن، *CASP3* می گردد. مسیر ذاتی با آزاد سازی سیتوکروم c از میتوکندری تحریک می شود که به تشکیل مجموعه Apaf-1 و متعاقباً *CASP9* و به دنبال آن، *CASP3* فعال منجر خواهد شد (۱۳). *Lnc-RNA* ها عمدتاً به عنوان رونوشت هایی با طول بیش از 200 nt دسته بندی می گردند که مانند رونوشت های mRNA بدون ظرفیت کدگذاری پروتئین، پلی آدینله می شوند و به هم متصل می گردند. انواع *Lnc-RNA* ها بیان خاصی از نوع سلول و مرحله رشد را نشان می دهند که نشان دهنده نقشهای اساسی در هویت سلولی و سازمان دهی بافت است. اختلال عملکرد *Lnc-RNA* ارتباط نزدیکی با انواع مختلف تومور دارد که نشان دهنده پتانسیل آنها در تومورزایی و اهمیت توسعه راهبردهای درمانی در آینده است. *Lnc-RNA* ها تعداد بسیاری از فرایندهای سلولی را تعدیل می کنند؛ از جمله تمایز سلولی، توقف چرخه سلولی، آپوپتوز و اتوفازی (۱۴، ۱۵). ژن *HULC* که در ابتدا به عنوان RNA طولانی غیر کد کننده بیش از حد بیان شده در سلولهای کبدی شناسایی شد، در جایگاه p24.3۶ با طول 1638 pb قرار دارد و شامل دو اگزون و یک اینترون است. این RNA انکوژن با تنظیم چندگانه، تومورزایی را ترویج می دهد و در سلولهای سرطانی کبد استوسارکوما، معده، پستان، کولورکتال، اپیتلیال تخمدان، مثانه، گلیوما، پانکراس و مری مشاهده شده است (۱۶).

سنترشده: در این آزمایش، از FTIR برای شناسایی ماهیت شیمیایی پیوندها و تجزیه و تحلیل حضور گروه‌های عاملی مختلف در نانوذرات ZnO@Gln-TSC و ZnO@Gln توسط دستگاه اسپکترومتر از شرکت Perkin Elmer (Spectrum 100) استفاده گردید.

برای بررسی و تشخیص ساختار کریستالی و فازهای موجود ثابت نمونه سنترشده ZnO@Gln-TSC از دستگاه پراش اشعه ایکس (PW1730، فیلیپس هلند) با طول موج ۱.۵۴۰۵۶ Å (Cu-Kα X-ray tube) استفاده شد. نمونه سنترشده پودری روی مرکز پراش سنج چرخان در دستگاه قرار گرفت و اشعه ایکس با زاویه ۱۰ تا ۸۰ درجه روی نمونه تابانده و زاویه ۰۲ اندازه گیری شد.

آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ابعاد ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها است. برای تعیین اندازه نانوذرات ZnO@Gln-TSC پوشیده شده با آب از دستگاه اندازه گیری DLS مدل SZ-100 شرکت HORIBA Scientific (ژاپن) استفاده گردید. در این روش، پرتو لیزر با زاویه ثابت ۹۰ درجه و شدت عبور ۲۶۳۰۰ به سوسپانسیون تابانده و پراکندگی نور لیزر توسط آشکارساز نوری ثبت شد. برای تحلیل صحیح نرم افزار دستگاه DLS، ضریب شکست و ویسکوزیته فاز مایع مشخص گردید و به نرم افزار داده شد.

برای بررسی سطح نانوذرات ZnO@Gln-TSC از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) شرکت TESCAN مدل MIRA3 و برای بررسی اندازه نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) شرکت Zeiss آلمان مدل Zeiss-EM900 استفاده گردید.

کشت و شمارش رده سلول سرطانی معده (AGS): در این مطالعه، رده سلول سرطانی معده (AGS) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های AGS در محیط DMEM کشت گردیدند که با 10 FBS درصد و ۱ درصد استرپتومایسین و پنی سیلین (هر کدام ۱۰۰۰۰۰ ماکروگرم بر میلی لیتر) ترکیب شده بود. برای شمارش سلولی پس از تریپسینه، جداسازی و اضافه کردن ۴ میلی لیتر محیط کشت،

با توجه به نقش ژن‌های دخیل در فرایند آپوپتوز، بروز هرگونه تغییرات در بیان این ژن‌ها می تواند به اختلال در فرایند چرخه سلول سرطانی منجر شود. مطالعات پیشین نقش کمپلکس‌های تیوسمی کاربازید و نانوذرات فلزی بر تغییر بیان چنین ژن‌هایی را به خوبی نشان داده‌اند. براساس این، هدف از این پژوهش سنتر نانوذرات اکسید روی عامل دار شده با گلوتامین و کنژوگه با تیوسمی کاربازید است که آن را بر سلول‌های سرطانی معده تأثیر می دهد تا قابلیت سمیت سلولی آن تعیین شود و اثر آن بر بیان ژن‌های CASP8 و HULC Lnc-RNA مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

سنتر نانوذرات اکسید روی عامل دار شده با گلوتامین و کنژوگه با تیوسمی کاربازید: محلول آمونیاک ۰/۱ مولار به آرامی به ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار ZnCl₂ اضافه شد تا pH آن به عدد ۱۱ برسد. با مشاهده تغییر رنگ pH و تشکیل رسوب سفیدرنگ، ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه هم زده شد. محلول به دست آمده با دور ۶۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل جدا، ۳ بار با آب مقطر و ۱ بار با اتانول ۹۶ درصد شستشو داده و دوباره سانتریفیوژ شد. در نهایت، رسوب در پلیت شیشه‌ای ریخته و داخل آون به مدت ۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد تا کاملاً خشک گردید. سنتر نانوذرة اکسید روی عامل دار شده با گلوتامین با نسبت مولی ۲ به ۱ و طی مراحل پیشین صورت گرفت. برای تهیه نانوذرات اکسید روی عامل دار شده با گلوتامین و کنژوگه با تیوسمی کاربازید، ابتدا ۵۰۰ میلی گرم نانوذرة ZnO-Gln و ۲۰۰ میلی گرم تیوسمی کاربازید در ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد به صورت محلول درآورده شد و ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک و سپس به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۴۰ درجه در شیکر انکوباتور قرار گرفت. رسوب حاصل توسط سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید و ۳ بار با آب مقطر و ۱ بار با اتانول ۹۶ درصد شستشو داده شد. در نهایت، رسوب به دست آمده به مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه در آون خشک گردید (۱۷).

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات

سانتریفیوژ با دور RPM1000 و ۵ دقیقه انجام شد. برای به دست آوردن حجم ۵۰۰ ماکرولیتر محلول سلول رنگ، ۴۰۰ ماکرولیتر از محلول رنگ تریپان بلو به ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول سلولی اضافه و Mix گردید و ۱۰۰ ماکرولیتر از آن در لام هموسایتمتر ریخته شد. تعداد سلول‌های موجود در هر مربع توسط میکروسکوپ Abjective با بزرگ‌نمایی $\times 100$ شمارش گردید و میانگین سلول‌های ۴ جایگاه محاسبه شد. به علت ۵ برابر رقیق‌سازی محلول سلولی با رنگ تریپان بلو، عدد محاسبه شده در ۵ ضرب گردید تا تعداد سلول‌ها در مقیاس ۱ میلی‌لیتر به دست آید.

تعیین سمیت سلولی نانوذرات: به منظور تعیین سمیت سلولی نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر سلول‌های AGS از آزمایش MTT استفاده شد. سلول‌های AGS در پلیت ۹۶ خانه و با تراکم 1×10^4 سلول/چاهک کشت گردیدند و در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO@Gln-TSC قرار گرفتند. تکرارها در تست MTT برای هر غلظت ۶ بار

بود. چاهک‌های بدون نانوذرات به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. غلظت‌ها برای نانوذرات ZnO@Gln-TSC رده AGS به ترتیب گروه کنترل، ۱/۹۵۳۱۲۵، ۳/۹۰۶۲۵، ۷/۸۱۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر است.

سلول‌ها طی ۲۴ ساعت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ سپس ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر MTT به هر چاهک افزوده گردید و پلیت‌ها مجدداً به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ سپس محیط کشت خارج گردید و به هر چاهک ۲۰۰ ماکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شد. در انتها، جذب نوری هریک از چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (USA, USA, ELX800) سنجیده گردید. دوز بازدارنده میانی (Inhibitory concentration) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. ستنر DNA تکمیل با استفاده از کیت تجاری PrimeScript™ first strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Tokyo, Japan) انجام گردید.

طراحی پرایمر: در این پژوهش، از توالی‌های پرایمری استفاده شده در سایر مقالات بهره گرفته شد. با انجام Blast از تشکیل نشدن محصولات غیراختصاصی اطمینان حاصل گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه در جدول شماره ۱ آورده شده است (۱۸).

استخراج RNA کل و ستنر cDNA: در ابتدا سلول‌های AGS در پلیت‌های ۶ خانه و با تراکم 5×10^5 سلول/چاهک کشت گردیدند. بر اساس نتایج آزمایش MTT، سلول‌ها در مواجهه با نانوذرات ZnO@Gln-TSC با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فرایند استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNA از کشت سلول Cat.NO: PR891620 از شرکت سیناکلون انجام گردید. برای بررسی غلظت و خلوص RNA

جدول شماره ۱. توالی پرایمر ژن‌های *CASP8*، *GAPDH* و *HULC*

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Reference
GAPDH	CCCACTCCTCCACCTTTGAC	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	(۱۸)
CASP8	GACTGGATTGCTGATTACCTACCTAA	CCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT	(۱۸)
HULC	ACAGACCAAAGCATCAAGCA	TTTGCCACAGGTTGAACACTT	(۱۸)

مدت ۴۵ ثانیه پایان یافت. در پایان، میانگین چرخه‌های آستانه (CT) برای هر ژن محاسبه شد. در این مطالعه از روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده گردید و روند کاهش یا افزایش ژن بررسی شد. عدد ۲ در این فرمول پایه لگاریتمی دارد.

- $\Delta Ct(\text{Control}) = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\text{Reference gene})$
- $\Delta Ct(\text{Treatment}) = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\text{Reference gene})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Treatment}) - \Delta Ct(\text{Control})$
- $\text{Relative fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

داده‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق بر اساس دو تکرار استوار بود که با گرفتن میانگین Ct ها و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه گردید. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS vol.16 و آزمون‌های آنووا و تی استفاده شد. $P < 0.05$ برای ژن‌ها در هر آزمایش معنی‌دار در نظر گرفته شد.

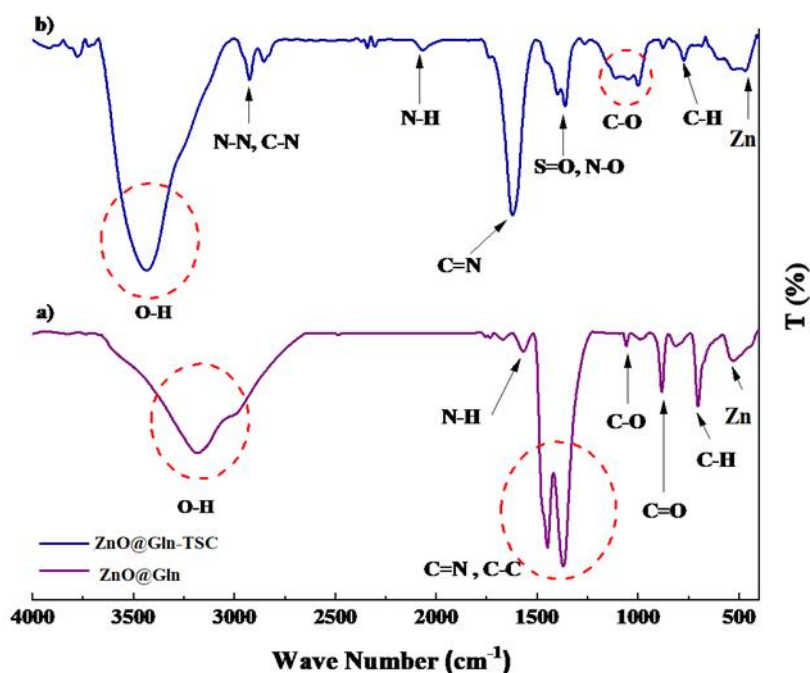
یافته‌های پژوهش

نتایج آزمایش FTIR: به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات سنتز شده از آزمایش FT-IR استفاده گردید. طیف‌های FT-IR نانوذرات ZnO@Gln و ZnO@Gln- در شکل شماره ۱ نمایش داده شده‌اند. پیک‌های جذبی این دو نمودار نشان‌دهنده ارتعاشات کششی C-N - COO و C-O - حضور گروه‌های C-S و NH_2 است.

بررسی میزان بیان ژن‌های *CASP8*، *GAPDH* و *HULC* با استفاده از آزمایش Real-time PCR: میزان بیان ژن‌های مطالعه‌شده در مقایسه با ژن *GAPDH*، به‌عنوان ژن کنترل داخلی به‌طور جداگانه برای هر ژن بررسی شد. آزمایش 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 گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۰ ماکرولیتر و حاوی ۱۰ ماکرولیتر مسترمیکس SYBR Green 1، ۱ ماکرولیتر از هر پرایمر (۲ میکرومول)، ۲ ماکرولیتر cDNA الگو و ۶ ماکرولیتر آب مقطر بود.

برنامه زمان‌بندی دمایی واکنش Real-Time PCR در دستگاه ترموسایکلر به‌صورت زیر است:

ابتدا در یک چرخه به‌منظور فعال‌سازی آنزیم Taq پلیمرز و واسرشتی اولیه DNA الگو به مدت ۱۰ دقیقه و دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مرحله بعد، به‌صورت متناوب در ۴۰ چرخه به مدت ۱۵ ثانیه با دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشتی DNA و سپس به مدت ۶۰ ثانیه با دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مکمل‌سازی و اتصال پرایمر به توالی الگو و اجرای QPCR و ساطع شدن نور فلوئورسنت در طول مراحل طولیل‌سازی اعمال گردید و با ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

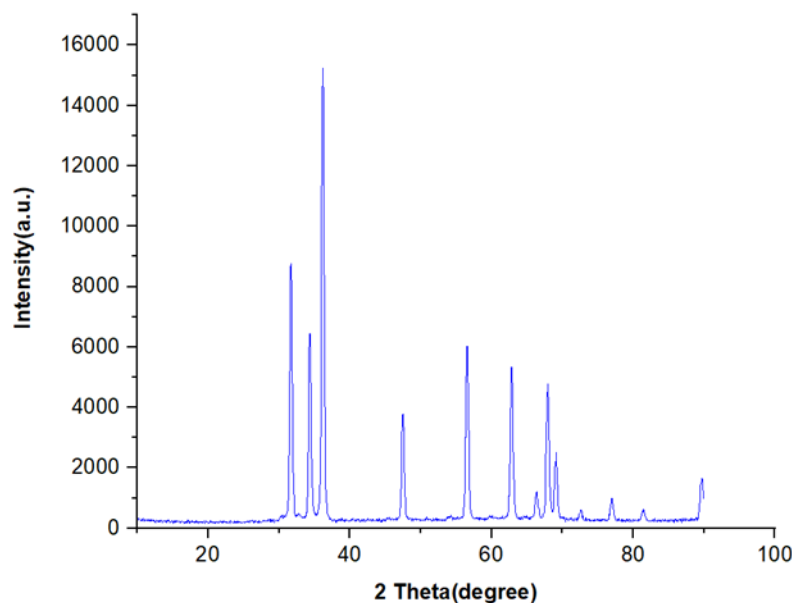


شکل شماره ۱. طیف FT-IR مربوط به نانوذرات ZnO@Gln و ZnO@Gln-TSC

۲۳). در ادامه، قله‌های ۱۶۲۲/۲۴ و ۲۰۶۷/۳ به ترتیب مربوط به پیوندهای C=N و N=H و قله‌های برابر با ۲۸۵۵/۰۸ و ۲۶۲۹/۴۱ cm^{-1} مربوط به باندهای C-N و N-N است (۲۵). قله موجود در محدوده بین ۳۰۰۰ cm^{-1} تا ۴۰۰۰ cm^{-1} مربوط به پیوند O-H است.

نتایج آزمایش XRD: از طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) برای مطالعه ساختار کریستالی نانوذرات ZnO@Gln-TSC استفاده شد. شکل شماره ۲ الگوی پراش اشعه X برای نانوذرات ZnO@Gln-TSC است. پیک‌های پراش مطابق با الگوی انعکاس تأییدکننده سطوح کریستالوگرافیک نانوذره ZnO@Gln-TSC است.

در طیف مربوط به نانوذرات ZnO@Gln (a، نوار بنفش رنگ)، قله‌های ۵۳۵ cm^{-1} مربوط به روی است (۱۹) و همچنین قله ۷۱۰ cm^{-1} مربوط به باند C-H و قله ۸۸۳ cm^{-1} مربوط به پیوند C=O و ۱۰۶۷ cm^{-1} مربوط به پیوند کششی C-O و قله‌های برابر با ۱۳۷۸، ۱۴۵۳ و ۱۵۵۵ cm^{-1} باندهای C=N، C-C (۲۰) و N-H (۲۱) است؛ همچنین قله ۳۶۳۴ cm^{-1} نیز مربوط به پیوند کششی O-H موجود در ساختار است (۲۲). در طیف مربوط به نانوذرات ZnO@Gln-TSC (b، نوار آبی رنگ)، قله ۴۶۹۲۸ cm^{-1} مربوط به روی و قله‌های ۹/۷۷۳ cm^{-1} ، ۳/۱۰۰۰ cm^{-1} و ۳/۱۳۶۲ cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوند C-H، C-O، S=O و N-O است (۲۴).

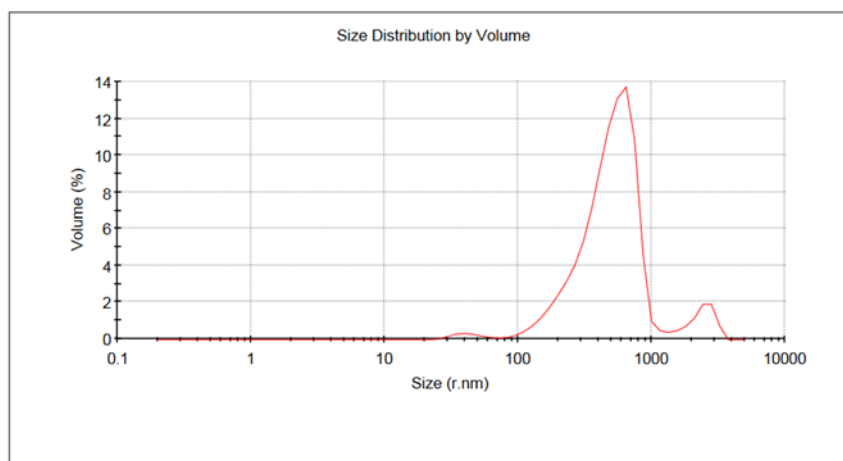


شکل شماره ۲. آنالیز XRD مربوط به نانوذره ZnO@Gln-TSC

ZnO@Gln-TSC را خالص و بلوری شکل مطرح نماید. نتایج آزمایش DLS: شکل شماره ۳ توزیع فراوانی و اندازه نانوذرات سنتز شده ZnO@Gln-TSC را نشان می‌دهد. توزیع ذرات به صورت استاندارد، با اندازه‌های مختلف و پراکنده است. میانگین اندازه ۲۹۶ نانومتر محاسبه شد.

قله‌های پراش تیز و باریک مطابق با الگوی انعکاس در مقادیر 2θ برابر با ۳۱/۵۷، ۳۴/۲۷، ۳۶/۰۷، ۴۷/۴۷، ۵۶/۴۷، ۶۲/۷۸، ۶۶/۵۲، ۶۷/۸۷، ۶۸/۹۷، ۷۲/۴۲ و ۷۷/۱۷ درجه که با جهت‌گیری‌های کریستالوگرافی ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۱۰، ۱۰۳، (۱۱۲)، ۲۰۰، ۲۰۱، ۰۰۴ و ۲۰۲ مطابقت می‌کند، می‌تواند سطوح کریستالوگرافیک مربوط به نانوذرات

Z-Average (r.nm): 296
Pdl: 0.417



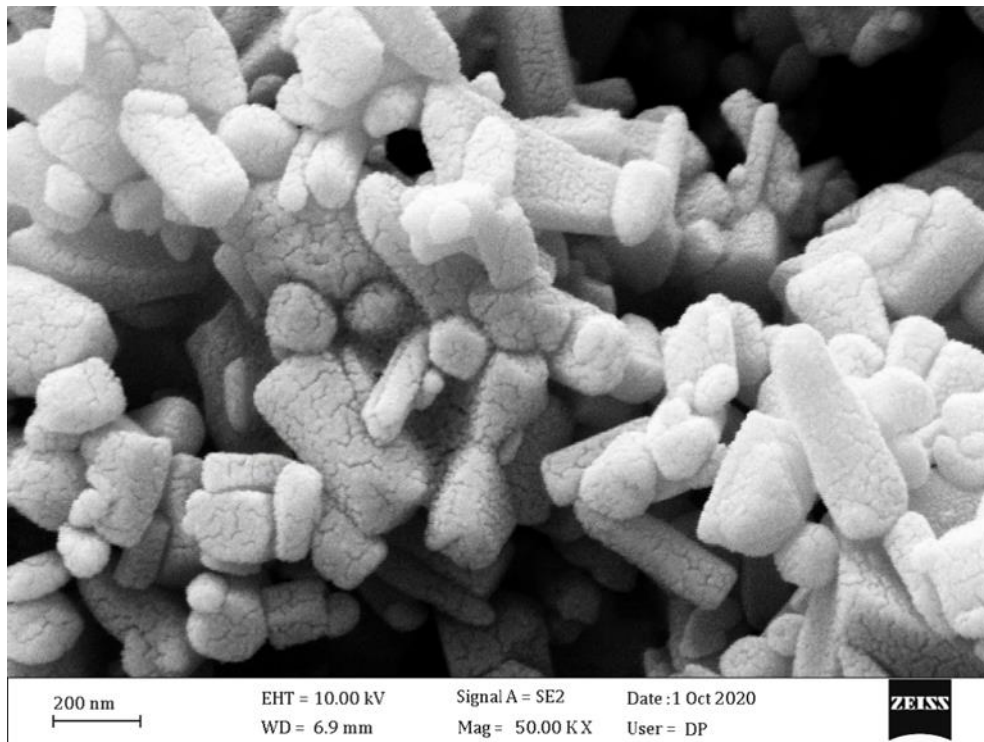
شکل شماره ۳. نمودار توزیع اندازه ذرات ZnO@Gln-TSC حاصل از آزمایش DLS

ZnO@Gln-TSC در محدوده ۳۰ تا ۷۰ نانومتر است. شکل شماره ۵ تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات

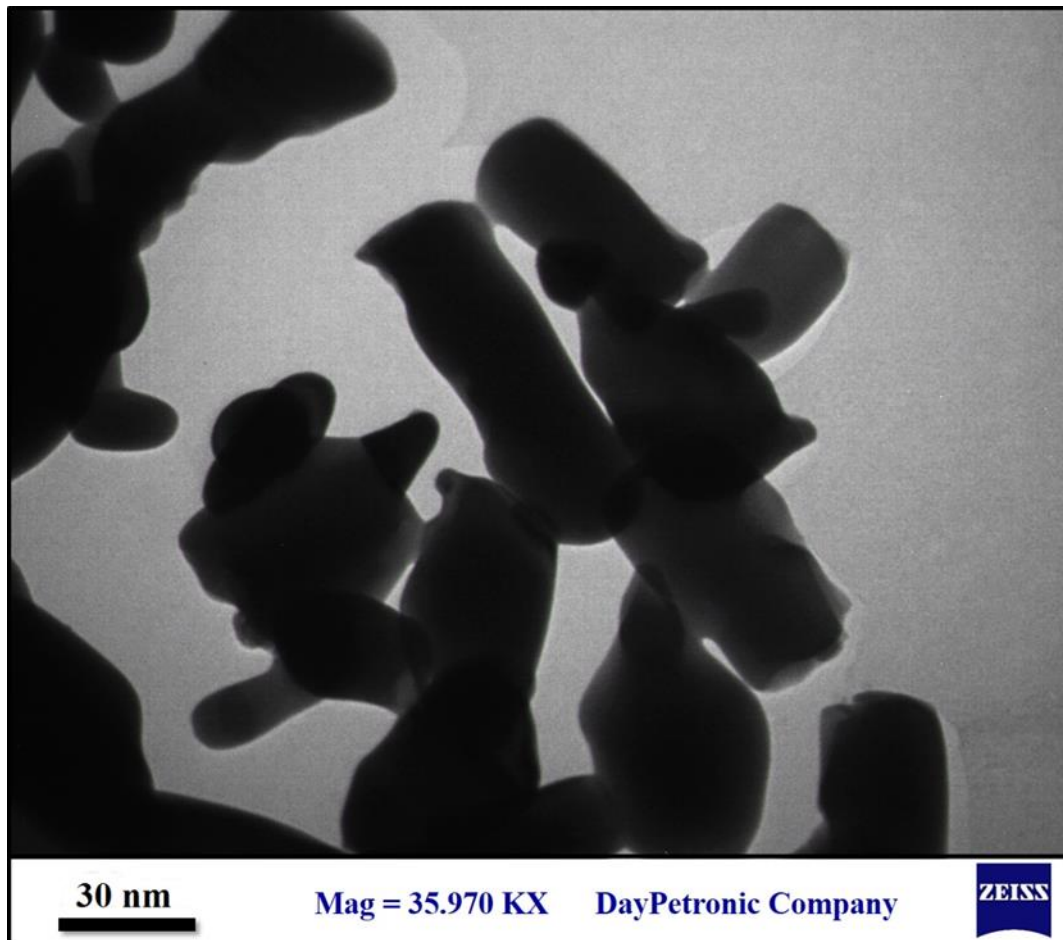
نتایج آزمایش‌های TEM و SEM: همان‌طور که در شکل شماره ۴ نشان داده شده است، اندازه نانوذرات

۳۰ تا ۶۰ نانومتر هستند.

ZnO@Gln-TSC را نشان می‌دهد. ذرات با اندازه تقریبی بین



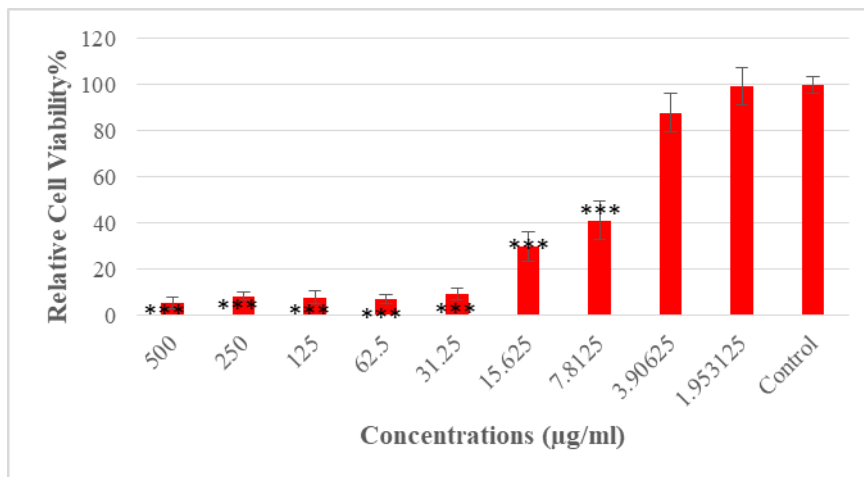
شکل شماره ۴. نتایج آزمایش SEM از نانوذره ZnO@Gln-TSC



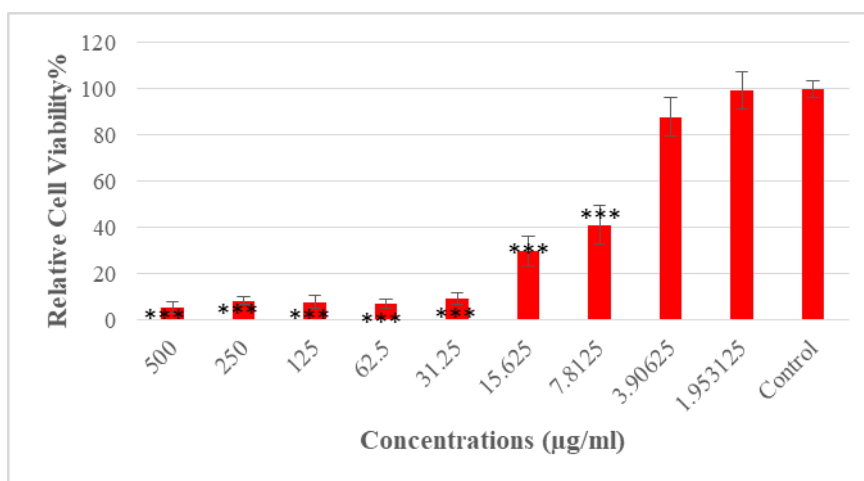
شکل شماره ۵. نتایج آزمایش TEM از نانوذره ZnO@Gln-TSC

نتایج آزمایش MTT: نتایج اثر نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) در غلظت‌های مختلف و گروه کنترل در شکل شماره ۶. a نشان داده شده است. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه

کنترل گزارش شده است. غلظت مهاري IC50 برای نانوذرات ZnO@Gln-TSC برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای رده سرطانی معده (AGS) در شکل شماره ۶. b آورده شده است.



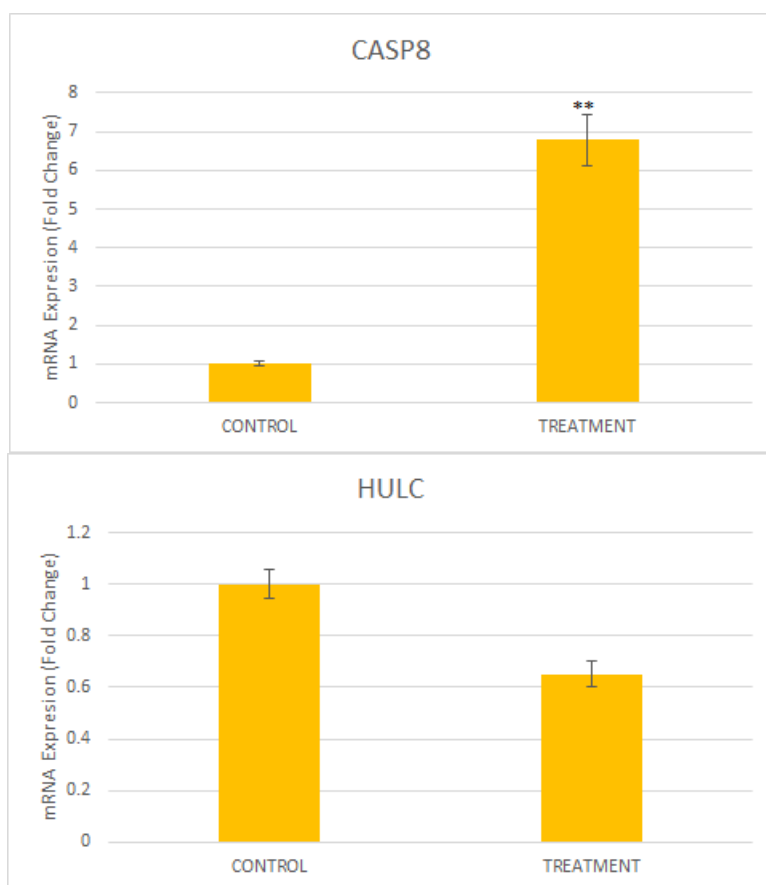
شکل شماره ۶. a. مودار MTT نانوذرات ZnO@Gln-TSC در سلول‌های سرطانی AGS ($P < 0.001^{***}$)



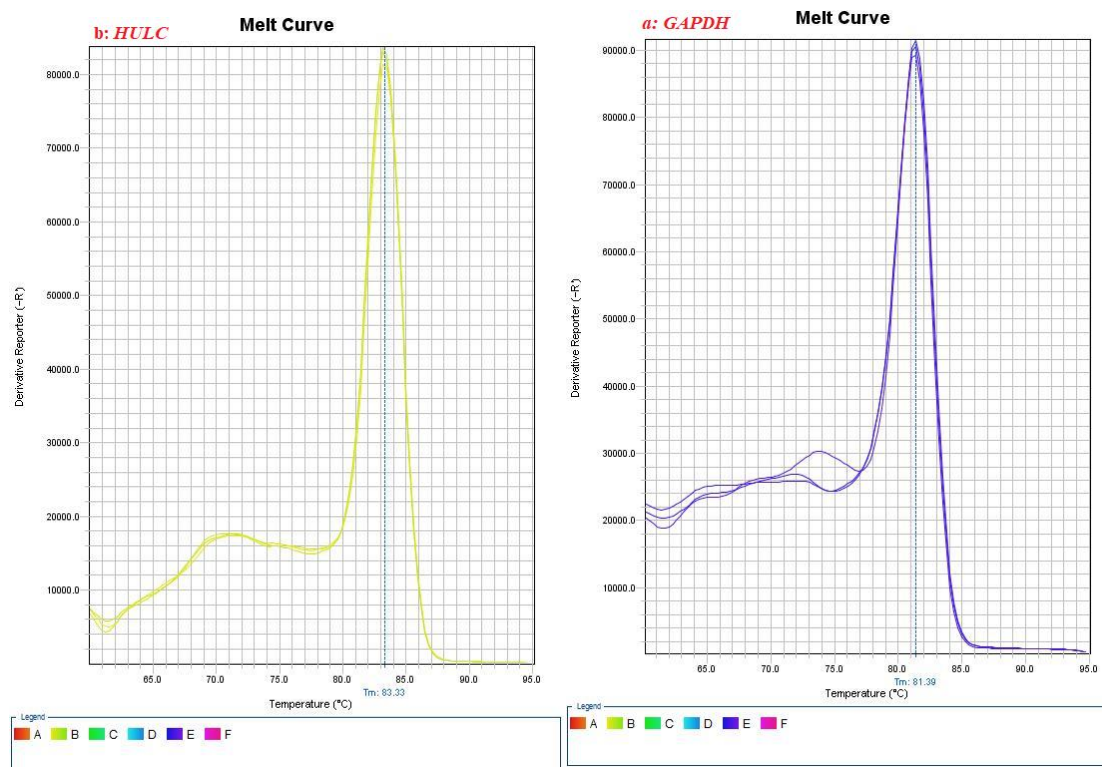
شکل شماره ۶. b. مودار IC50 نانوذرات ZnO@Gln-TSC در سلول‌های سرطانی AGS

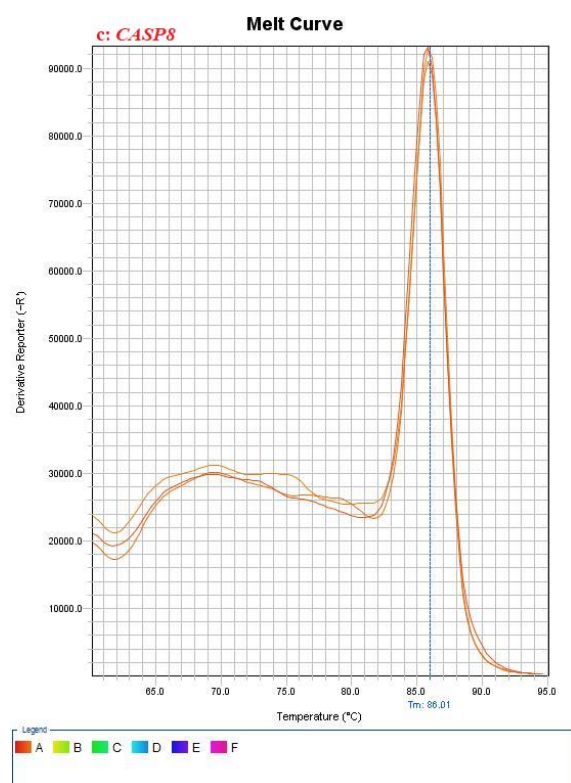
نتایج بررسی میزان بیان ژن‌های *HULC* و *CASP8*: میزان بیان ژن‌های *HULC* و *CASP8* پس از مواجهه سلول‌ها با غلظت IC50 برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات ZnO@Gln-TSC بررسی شد. نتایج نشان داد که مواجهه سلول‌های AGS با نانوذرات یادشده به تغییرات بیان ژن *CASP8* به میزان ۶/۷۹ برابر، با افزایش معنی‌دار در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل منجر گردیده بود ($P < 0.001$). تغییرات بیان ژن *HULC* در سلول‌های

مواجهه‌یافته به میزان ۰/۶۵ برابر، با کاهش معنی‌دار در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل به دست آمد ($P < 0.001$). نتایج میزان بیان ژن‌های *HULC* و *CASP8* در شکل شماره ۷. a و b نمایش داده شده‌اند. همچنین برای هریک از ژن‌های *CASP8*، *HULC*، *GAPDH* یک نمونه از منحنی ذوب در شکل شماره ۸. a، b و c و یک نمونه از منحنی تکثیر در شکل شماره ۹. a، b و c آمده است.

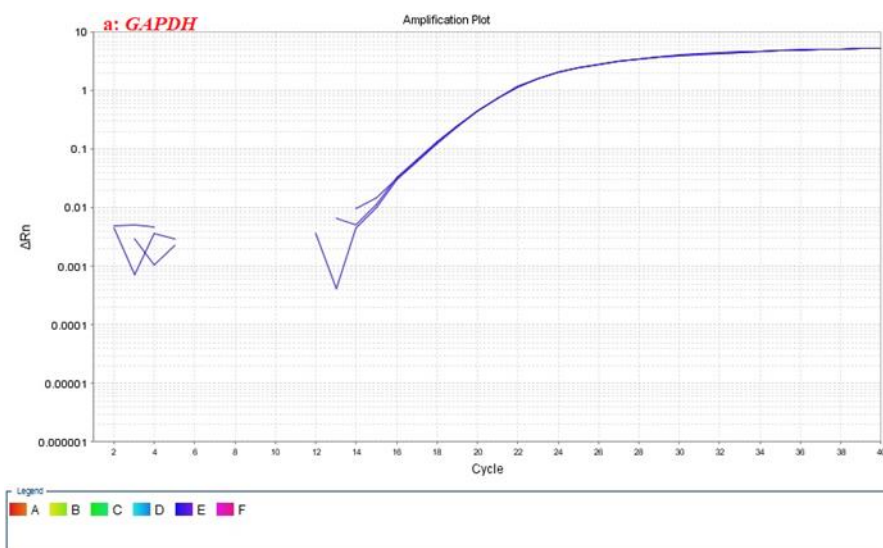


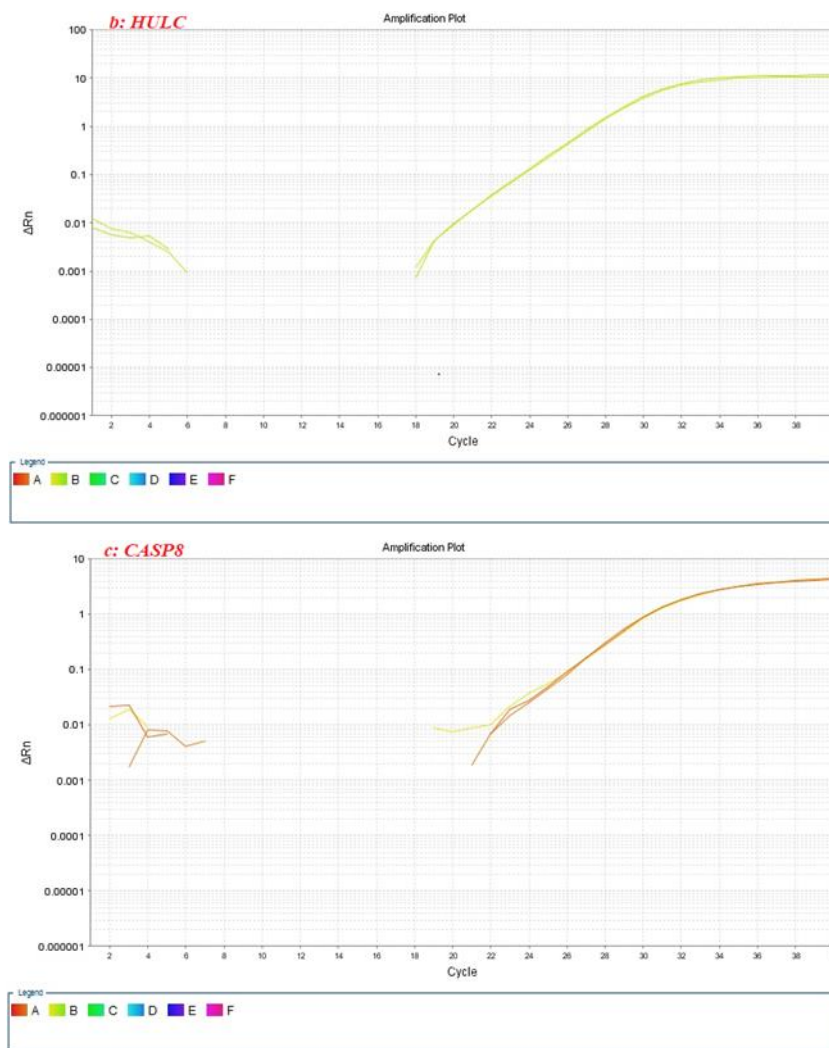
شکل شماره ۷. نمودار تغییرات بیان ژن *CASP8* و ژن *HULC* در سلولهای مواجهه یافته با نانوذرات TSC – Zmo@Gln در مقایسه با سلولهای گروه کنترل





شکل شماره ۸. یک نمونه از منحنی ذوب متعلق به هر یک از ژن‌های *GAPDH* (a) ، *HULC* (b) و *CASP8* (c)





شکل شماره ۹. یک نمونه از منحنی تکثیر متعلق به هر یک از ژن های *GAPDH* (a)، *HULC* (b) و *CASP8* (c)

آنان باشد. بر اساس این، در این مطالعه، نانوذرات اکسید روی با استفاده از گلوتامین عامل دار گردیدند و سپس با مولکول تیوسمی کاربازید کثروگه شدند. آزمایش های تأییدی شامل TEM، SEM، DLS، XRD، FT-IR برای بررسی سنتز صحیح نانوذرات انجام گردید که خوشبختانه همگی با نتایج مناسبی گزارش شد. درنهایت، پس از مواجهه نانوذرات سنتز شده با سلول های آدنوکارسینومای معده، دوز سمی (IC_{50}) تعیین گردید و اثر آن بر فرایند آپوپتوز و میزان بیان ژن های دخیل در مرگ برنامه ریزی شده سلولی ارزیابی شد. مطالعات مهمی در ارتباط با عملکرد نانوذرات اکسید فلزی به ویژه اکسید روی بر سلول های سرطانی انجام شده است که تأثیر مثبت آن ها را نشان می دهد. در مطالعه پاندورانگان در سال ۲۰۱۶، تأثیر نانوذرات ZnO بر سلول های کارسینوم سرویکس انسان و همچنین در مطالعه اختر در سال ۲۰۱۲،

بحث و نتیجه گیری

نانوتکنولوژی علم تولید و به کارگیری فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک اتم یا مولکول هایی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که خواصی متمایز از مواد دیگر دارند و شامل نسبت سطح به حجم بسیار و فعالیت بالای شیمیایی است. افزایش نسبت سطح به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی نانوذره می شود. این پدیده بر خصوصیات ذره و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد. افزایش سطح واکنش پذیری نانوذرات را به شدت بالا می برد (۲۶). طراحی کمپلکس های مولکولی نوین در مقیاس نانو می تواند راهکار نوینی به منظور بهینه سازی و بهبود عملکرد ضدسرطانی این ذرات و درعین حال، کاهش عوارض جانبی

تأثیر نانوذرات ZnO بر سلول‌های MCF-7 موجب بروز ویژگی‌های ضدسرطانی و آپوپتوزی نظیر گرد شدن سلول‌ها و از دست دادن چسبندگی سلول‌ها شد. نتایج هردو مطالعه همسو با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر بود (۲۷، ۲۸). نقش گلوتامین در افزایش اثربخشی نانوذرات سنتز شده بر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های گروه کنترل بسیار مهم است. گلوتامین منبع انرژی و پیش‌ساز برای ساخت پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها است که برای رشد و تکثیر سلول‌ها ضروری است. ویژگی ساختاری و مهم گلوتامین این است که دو اتم نیتروژن دارد که با انتقال میان اعضا و بافت‌های مختلف، اعمال خود را انجام می‌دهد. گلوتامین نقش مهمی در تنظیم تعادل اسید-باز دارد (۲۹، ۳۰). نیازهای متابولیکی سلول‌های سرطانی به گلوتامین به علت منبع سوخت سلولی در جدار مجاری معده‌ای-روده‌ای می‌تواند برای توسعه درمان‌های هدفمند مناسب باشد که به بهبود کارایی و به حداقل رساندن آسیب به سلول‌های سالم منجر می‌شود (۱۸). با توجه به تقاضای بیشتر سلول‌های سرطانی برای مواد مغذی حیاتی از جمله اسیدهای آمینه، عامل دار کردن نانوذرات اکسید روی با گلوتامین می‌تواند نفوذ دارو به سلول‌های سرطانی را بهبود بخشد. در درمان هدفمند، دستگاه‌های تحویل‌دهی بر پایه نانوذرات مختلف توسعه یافته است. در این درمان‌ها، دارو به‌صورت تهاجمی عمل نمی‌کند، بلکه به‌صورت منطقه‌ای عمل می‌نماید و روی سلول‌ها و بافت‌های سالم اثر جانبی و سمی ندارد. مطالعات اخیر نشان داده است که کنژوگه کردن تیوسمی کاربازید یا مشتقات آن به نانوذرات فلزی می‌تواند به بهبود پایداری آنان و همچنین افزایش ویژگی ضدتوموری و ضدسرطانی آنان منجر گردد (۳۱). تیوسمی کاربازون‌ها با اتصال به نانوفلزات می‌توانند با تشکیل کمپلکس فعال اکسیداسیون و احیا، گونه‌های اکسیژن‌گرای فعال تولید کنند (۳۲، ۳۳). نتایج یک مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره به همراه گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازون باعث القای آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 شدند (۱۰). تشکیل کمپلکس‌های فلزی از طریق پیوند با اتم‌های گوگرد و گروه نیتروژن صورت می‌گیرد. وجود باندهای گوگردی و

نیتروژنی در TSC موجب تشدید تمایل اتصال نانوذرات به یون‌های فلزات سنگین با استفاده از برهم کنش کووالانسی بین آن‌ها می‌شود (۳۴، ۳۵، ۹). با توجه به نتایج سنجش MTT، مشخص شد که نانوذرات ZnO@Gln-TSC پتانسیل مهار سلول سرطانی با الگوی وابسته به دوز دارند؛ پس می‌توان عنوان کرد که عملکرد نانوذرات یادشده در درمان سرطان با توانایی آن‌ها در القای مرگ سلولی مرتبط است. مطالعات مفیدی برای شناخت بهتر عملکردهای کمپلکس نانوذرات اکسید فلزی و تیوسمی کاربازون‌ها بر سلول‌های سرطانی معده انجام شده است که می‌تواند تأییدی بر نتایج مطالعه پیش‌رو باشد. تأثیر نانوذرات اکسید کبالت عامل‌دار شده با گلوتامیک اسید و کنژوگه با تیوسمی کاربازید و همچنین تأثیر نانوذرات آهن کنژوگه با مشتق تiazولی تیوسمی کاربازون بر رده سلولی سرطان معده باعث القای آپوپتوز در این رده سلولی گردیده است (۳۶، ۳۷). در مطالعه‌ای تأثیر نانوذرات اکسید نیکل کنژوگه با تیوسمی کاربازید و همچنین تأثیر نانوذرات مس کنژوگه با تیوسمی کاربازید بر سلول‌های AGS نشان داد که این نانوذرات با خاصیت کشندگی سلول سرطانی، موجب راه‌اندازی آبشار آپوپتوزی خواهند شد (۳۸، ۳۹).

CASP8 آنزیم مهمی در آغاز آپوپتوز بیرونی است که در پاسخ به سیگنال‌های خارج سلولی القا می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تأثیر نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر سلول‌های سرطانی معده بیان ژن *CASP8* را به میزان ۶/۷۹ نسبت به گروه کنترل افزایش داده و موجب فعال شدن مسیر آپوپتوز بیرونی شده است. *miRNA* ها انواعی از مولکول‌های تک‌ رشته‌ای کوچک غیرکدکننده RNA هستند که بر فرایندهای بیولوژیکی متعددی مانند رشد سلولی، تمایز و سرطان‌زایی تأثیر می‌گذارند. *HULC* که با ایجاد سرطان‌های مختلف مرتبط است، می‌تواند توسط CREB فعال گردد و با هدف قرار دادن RNAهای تنظیم‌کننده از جمله *miR-613*، با رشد سریع سلول‌های سرطانی درگیر شود (۴۰، ۴۱). در این مطالعه، اثر نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر بیان RNA طولانی غیرکدکننده *HULC* در سلول‌های AGS بررسی گردید. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن *HULC* تا ۰/۶۵ در

مقایسه با سلول‌های گروه کنترل کاهش یافته است. نتایج یک مطالعه به منظور بررسی خصوصیات آپوپتوزی نانوذرات نقره عامل دار شده با گلوتامین و کنژوگه با تیوسمی کاربازید (Ag@Gln-TSC) بر سلول‌های سرطانی نشان داد که ژن CASP8 با افزایش معنی‌دار ($3/8$) و ژن HULC با کاهش معنی‌دار ($0/3$)، سلول سرطانی را به سوی آپوپتوز پیش بردند (۱۸).

در این مطالعه، نانوذرات ZnO@Gln-TSC سنتز شد و ویژگی سمیت و کشندگی سلول سرطانی از طریق آپوپتوز با بیان ژن‌های مهم در سلول‌های سرطانی معده بررسی گردید. نتایج نشان داد که تأثیر نانوذرات ZnO@Gln-TSC بر سلول‌های سرطانی AGS موجب مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز از طریق افزایش میزان بیان ژن CASP8 و کاهش میزان بیان ژن HULC شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد که این نانوذرات به عنوان ماده‌ای ضد تکثیر قوی برای شیمی درمانی بیماران سرطانی می‌تواند بیشتر بررسی شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد رشت تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در انجام این پژوهش، هیچگونه تعارض منافع گزارش نشده است.

حمایت مالی

این پروژه هیچ حمایت مالی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان دارای سهم مساوی در مقاله می‌باشند.

References

1. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet* 2020; 396:635-48. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
3. Wydra RJ, Oliver CE, Anderson KW, Dziubla TD, Hilt JZ. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC Adv* 2015;5:18888-93. doi: 10.1039/C4RA13564D.
4. Mokwena MG, Kruger CA, Ivan MT, Heidi A. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 22:147-54. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.03.006.
5. Jayarambabu N, Kumari BS, Rao KV, Prabhu YT. Beneficial role of zinc oxide nanoparticles on green crop production. *Int J Multidiscip Adv Res Trends* 2015;2273-82.
6. Han N, Xu L, Zheng H, Yang Y, Fan W. In vivo co-delivery of paclitaxel and herceptin for Her2/Neu+ breast cancer treatment using micellar nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2016; 12:513-4. doi: 10.1016/j.nano.2015.12.191.
7. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 619-34. doi: 10.1038/nrc.2016.71.
8. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients* 2018; 10:1564. doi: 10.3390/nu10111564.
9. Pelosi G. Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. *Open Crystallogr J* 2010; 3: 16-28. doi: 10.2174/1874846501003010016.
10. Sadat Shandiz SA, Montazeri A, Abdolhosseini M, Hadad Shahrestani S, Hedayati M, 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.
11. Ma ZY, Shao J, Bao WG, Qiang ZY, Xu JY. A thiosemicarbazone copper (II) complex as a potential anticancer agent. *J Coord Chem* 2015; 68: 277-94. doi:10.1080/00958972.2014.979811.
12. Paul-Samojedny M, Kokocińska D, Samojedny A, Mazurek U, Partyka R, Lorenz Z, et al. Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741:25-29. doi: 10.1016/j.bbdis.2004.11.021.
13. Rofeal M, El-Malek FA. Valorization of lipopeptides biosurfactants as anticancer agents. *Int J Pept Res Ther* 2021; 27:447-55. doi:10.1007/s10989-020-10105-8.
14. Peng W, Gao W, Feng J. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Clin Oncol* 2014; 31:1-7. doi: 10.1007/s12032-014-0346-4.
15. Gonzalez I, Munita R, Agirre E, Dittmer TA, Gysling K, et al. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22:370-6. doi: 10.1038/nsmb.3005.
16. Zhao Y, Guo Q, Chen J, Hu J, Wang S, Sun Y. Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation. *Oncol Rep* 2014; 31:358-64. doi:10.3892/or.2013.2850.
17. Nejabatdoust A, Salehzadeh A, Zamani H, Moradi-Shoeili Z. Synthesis, characterization and functionalization of ZnO nanoparticles by glutamic acid (Glu) and conjugation of ZnO@ Glu by thiosemicarbazide and its synergistic activity with ciprofloxacin against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clust Sci* 2019; 30:329-36. doi:10.1007/s10876-018-01487-3.
18. Taati H, Sangani H, Davoudi A, Safabakhsh Kouhshfahani S, Hedayati M, et al. Silver nanoparticle functionalized by glutamine and conjugated with thiosemicarbazide induces apoptosis in colon cancer cell line. *Sci Rep* 2024; 14:3809. doi: 10.1038/s41598-024-54344-x. Ramesh P, Saravanan K, Manogar P, Johnson J, Vinoth E, et al. Green synthesis and characterization of biocompatible zinc oxide nanoparticles and evaluation of its antibacterial potential. *Sens Bio Sens Res* 2021; 31:100399. doi: 10.1016/j.sbsr.2021.100399.
19. Senthilkumar SR, Sivakumar T. Green tea (*Camellia sinensis*) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. *Int J Pharm Sci* 2014; 6: 461-5.
20. Pawlukojć A, Hołderna-Natkaniec K, Bator G, Natkaniec I. L-glutamine: Dynamical properties investigation by means of INS, IR, RAMAN, 1H NMR and DFT techniques.

- Chem Phys 2014; 443:17-25. doi: 10.1016/j.chemphys.2014.08.003.
21. Khurana N, Arora P, Pente AS, Pancholi KC, Kumar V, et al. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by vinyltriethoxy silane (VTES). *Inorg Chem Commun* 2021; 124:108347. doi: 10.1016/j.inoche.2020.108347.
 22. Barrak H, Saied T, Chevallier P, Laroche G, M'nif A, Hamzaoui AH. Synthesis, characterization, and functionalization of ZnO nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMSEDTA): Investigation of the interactions between Phloroglucinol and ZnO@ TMSEDTA. *Arab J Chem* 2019; 12:4340-7. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.04.019.
 23. Dehkaei AA, Khalatbari K, Emamifar A, Taramsari SM, Balkhi S, et al. Cytotoxicity effect of nickel hydroxide nanoparticles functionalized by glutamine and conjugated by thiosemicarbazide on human lung cancer cell line (A549) and evaluation of bax and bcl-2 genes expression. *Gene Rep* 2022; 29:101700. doi: 10.1016/j.genrep.2022.101700.
 24. Jamdagni P, Khatri P, Rana JS. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *J King Saud Univ Sci* 2018; 30:168-75. doi: 10.1016/j.jksus.2016.10.002.
 25. Wang MS, Chen L, Xiong YQ, Xu J, Wang JP, et al. Iron oxide magnetic nanoparticles combined with actein suppress non-small-cell lung cancer growth in a p53-dependent manner. *Int J Nanomedicine* 2017; 17:7627-51. doi: 10.2147/IJN.S127549.
 26. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine* 2012; 21:845-57. doi: 10.2147/IJN.S29129.
 27. Pandurangan M, Enkhtaivan G, Kim DH. Anticancer studies of synthesized ZnO nanoparticles against human cervical carcinoma cells. *J Photochem Photobiol B* 2016; 158:206-11. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.002.
 28. Antonio J, Street C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. *Can J Appl Physiol* 1999; 24:1-4. doi: 10.1139/h99-001.
 29. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* 2013; 123:3678-84. doi: 10.1172/JCI69600.
 30. Hamrayev H, Shameli K, Yusefi M. Preparation of zinc oxide nanoparticles and its cancer treatment effects: A review paper. *J Adv Res Micro Nano Engin* 2020; 2:1-1.
 31. Ma ZY, Shao J, Bao WG, Qiang ZY, Xu JY. A thiosemicarbazone copper (II) complex as a potential anticancer agent. *J Coord Chem* 2015; 68: 277-94. Doi:10.1080/00958972.2014.979811.
 32. Yildirim H, Guler E, Yavuz M, Ozturk N, Yaman PK, et al. Ruthenium (II) complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, biosensor applications and evaluation as antimicrobial agents. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 44:1-8. doi: 10.1016/j.msec.2014.08.007.
 33. Gou Y, Wang J, Chen S, Zhang Z, Zhang Y, et al. α -N- heterocyclic thiosemicarbazone Fe (III) complex: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. *Eur J Med Chem* 2016; 123:354-64. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.07.041.
 34. Goya GF, Grazu V, Ibarra MR. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Curr Nanosci* 2008; 4:1-6. doi:10.2174/157341308783591861.
 35. Jarestan M, Khalatbari K, Pouraei A, Sadat Shandiz SA, Beigi S, et al. Preparation, characterization, and anticancer efficacy of novel cobalt oxide nanoparticles conjugated with thiosemicarbazide. *3 Biotech* 2020; 10:1-9. doi: 10.1007/s13205-020-02230-4.
 36. Habibzadeh SZ, Salehzadeh A, Moradi-Shoeili Z, Shandiz SA. 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. *Mol Biol Rep* 2020; 47:1637-47. doi:10.1007/s11033-020-05251-7.
 37. Hosseinkhah M, Ghasemian R, Shokrollahi F, Mojdehi SR, Noveiri MJ, 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; 33:2045-53. doi:10.1007/s10876-021-02124-2.
 38. Badrooh M, Shokrollahi F, Javan S, Ghasemipour T, Rezaei Mojdehi S, et al. Trigger of apoptosis in adenocarcinoma gastric cell line (AGS) by a complex of thiosemicarbazone and copper nanoparticles. *Mol Biol Rep* 2022; 49:2217-26. doi: 10.1007/s11033-021-07043-z.
 39. Dong Y, Wei MH, Lu JG, Bi CY. Long non-coding RNA HULC interacts with miR-613 to regulate colon cancer growth and metastasis through targeting RTKN. *Biomed*

- Pharmacother 2018; 109:2035-42. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115370.
40. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6:259-69. doi:10.1038/nrc1840.