



ارزیابی اثر نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  بیوسنتز شده توسط *Scenedesmus obliquus* بر بیان ژن های *CAD*، *CASP8* و *p53* در رده سلولی سرطان معده

حسین شمسی<sup>۱</sup>، رضا یاری<sup>۲\*</sup>، علی صالح زاده<sup>۳\*</sup>

DOI: 10.22124/japb.2022.22631.1473

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱

چکیده

استفاده از محصولات نانوفناوری در تشخیص و درمان انواع سرطان مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف ساخت نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  کنژوگه با نقره با استفاده از عصاره جلبک *Scenedesmus obliquus* و تعیین اثر آن بر زندهمانی و بیان ژن های آپوپتوز در سلول های رده سرطان معده (AGS) انجام پذیرفت. اثر ضدسرطانی نانوکامپوزیت بر سلول های AGS و رده نرمال (HEK293) با استفاده از آزمایش MTT بررسی شد و غلظت مهاری ۵۰ درصد ( $\text{IC}_{50}$ ) تعیین شد. سپس، بیان ژن های *CASP8*، *p53* و *CAD* در سلول های تیمار شده در مقایسه با سلول های شاهد با آزمایش Real Time PCR تعیین شد. نتایج نشان داد که در غلظت های ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و بالاتر، نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  سبب مهار تکثیر سلول های سرطان معده شد. غلظت نیمه مهاری برای رده سرطانی ۵۶ میکروگرم در میلی لیتر و برای رده نرمال ۱۳۴ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. همچنین، مواجهه سلول ها با نانوکامپوزیت ساخته شده سبب افزایش معنی دار بیان ژن های *CASP8*، *p53* و *CAD* به ترتیب به میزان ۳/۲۷، ۲/۵۱ و ۳/۵ برابر شد. بر اساس نتایج این مطالعه، نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  از ویژگی ضدسرطانی مناسبی علیه سلول های سرطان معده برخوردار است و فعال سازی مسیرهای سیگنالی مرگ سلولی به عنوان مکانیسم مهار سلولی مطرح می شود.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، بیسموت، سرطان معده، نانوکامپوزیت.

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
  - ۲- استادیار گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.
  - ۳- دانشیار گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
- \* نویسندگان مسئول: [rezayari@iaub.ac.ir](mailto:rezayari@iaub.ac.ir); [salehzadeh@iaurasht.ac.ir](mailto:salehzadeh@iaurasht.ac.ir)

## مقدمه

می‌شود. افزایش روز افزون موارد ابتلا و مرگ و میر ناشی از برخی از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان معده، نشانگر کارآمدی نه چندان بالای روش‌های درمانی حاضر است. بنابراین، استفاده از محصولات زیست‌فناوری در زمینه مبارزه با سرطان بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند. ساخت نانوذرات دارای خاصیت مغناطیسی به عنوان یک روش ساده، کاربردی و موثر در زمینه هدایت هوشمندانه ترکیبات دارویی به سوی بافت‌های هدف مطرح است. نانوذرات مغناطیسی به آسانی تحت یک میدان مغناطیسی هدایت می‌شوند و می‌توانند اثر تشخیصی و یا درمانی خود را به نحو موثرتری اعمال کنند. بر اساس چنین هدفی، نانوذرات حاوی آهن یک انتخاب مناسب در زمینه دارورسانی هدفمند هستند. مطالعات بسیاری در زمینه طراحی نانوذرات حاوی لیگاندهای مغناطیسی به منظور شناسایی یا درمان سلول‌های سرطانی انجام پذیرفته است (Yigit et al., 2012).

ساخت نانوذرات با استفاده از روش‌های شیمیایی دارای معایب مختلفی همچون آلودگی‌های زیست محیطی، استفاده از مواد سمی، نیاز به استفاده از تجهیزات و شرایط

به دنبال ظهور دانش فناوری نانو، استفاده از محصولات در ابعاد نانو در زمینه‌های گوناگون شامل صنعت، محیط زیست، پزشکی و بهداشت مورد توجه فراوان قرار گرفته است. محصولات نانو به ترکیباتی گفته می‌شود که حداقل یکی از ابعاد آنها کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد (Khan et al., 2019). چنین محصولاتی به دلیل اندازه بسیار کوچک و نسبت سطح به حجم بالایی که دارند می‌توانند در مصارف زیست پزشکی مورد توجه و استفاده قرار گیرند. به دلیل اندازه کوچک، نانوذرات می‌توانند به آسانی در بدن بیماران حرکت کنند و خود را به اندام‌های هدف برسانند. علاوه بر این، ساخت نانوکامپوزیت‌های پیچیده چند مولکولی امکان هدایت هدفمند آنها را در بدن فراهم می‌سازد. به همین دلیل، استفاده از این گونه ذرات به منظور تشخیص و یا درمان بیماری‌هایی همچون سرطان، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. به علاوه، دارورسانی هدفمند با استفاده از محصولات نانو می‌تواند منجر به کاهش عوارض ناخواسته و سمی ترکیبات دارویی شود (Awasthi et al., 2018).

بیماری سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع بشری در نظر گرفته

بهداشتی مورد استفاده و توجه قرار گرفته است (Alamer et al., 2021). مطالعات جدید نشان داده‌اند که نانوذرات بیسموت قادر به تخریب ساختارهای برخی از سلول‌های سرطانی و مهار آنها هستند. اگرچه به دلیل مطالعات کمتر روی آن، استفاده از آن در زمینه مقابله با سلول‌های سرطانی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از طرف دیگر، استفاده از نقره به دلیل زیست سازگاری بالا و ویژگی‌های ضد میکروبی و ضد سرطانی قابل قبول، به عنوان یکی از رایج‌ترین نانوذرات در زمینه مقابله و تخریب سلول‌های سرطانی در نظر گرفته می‌شود (Skonieczna and Hudy, 2018). بر این اساس، پژوهش حاضر به منظور ساخت سبز نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  کنژوگه شده با نقره  $(\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag)$  با استفاده از جلبک *Scenedesmus obliquus* و بررسی اثر آن بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی شامل *CAD*، *CASP8* و *p53* در سلول‌های رده سرطانی معده انجام پذیرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### عصاره‌گیری از جلبک

تهیه عصاره جلبک *Scenedesmus obliquus* با استفاده از حمام آبی و بر اساس

آزمایشی ویژه و هزینه بالا است (Deepak et al., 2019). به همین دلیل روش‌های سبز ساخت نانوذرات مختلف، با استفاده از موجودات زنده و یا محصولات آنها، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. جلبک‌ها به دلیل داشتن سرعت رشد زیاد و آسان و ارزان بودن روش‌های کشت آنها، می‌توانند به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف به کار گرفته شوند (Khan et al., 2022). همچنین به دلیل حضور ترکیبات زیست‌فعال شامل رنگدانه‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان در عصاره‌های جلبکی، می‌توانند به عنوان احیا کننده‌های زیست‌سازگار مطرح شوند و به همین دلیل این موجودات به طور گسترده به منظور ساخت نانوذرات مختلف به کار گرفته می‌شوند (Prerna et al., 2019).

گونه جلبکی *Scenedesmus obliquus* پتانسیل فراوانی در زمینه‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله حذف آلاینده‌های شیمیایی و تولید سوخت زیستی نشان داده است. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره این جلبک می‌تواند به منظور ساخت نانوذرات فلزی مورد استفاده قرار گیرد (Sharif et al., 2022).

بیسموت یکی از عناصر جدول تناوبی است که اخیراً در زمینه صنایع پزشکی و آرایشی-

نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  و ۲۰ میلی گرم نیترا ت نقره به آب مقطر اضافه شد و مخلوط به دست آمده به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. سپس عصاره جلبکی تهیه شده به مخلوط واکنش افزوده شد و به مدت یک شب در دمای اتاق هم زده شد. در پایان، نانوکامپوزیت کنژوگه با نقره با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ و مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شده، با استفاده از اتانل و آب مقطر شستشو داده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد.

#### بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

به منظور تعیین برخی از ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی نانوذرات، از آزمایش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده شد. بررسی تغییرات در گروه‌های عاملی نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  و  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  با استفاده از آنالیز FT-IR و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (IR 100، Nicolet، کانادا) و در دامنه ۴۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی‌متر صورت پذیرفت. بررسی ساختار کریستالی نانوذره  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  با استفاده از

روش Salehzadeh و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد. در ابتدا پودر خشک شده جلبک به میزان ۰/۲ درصد در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت نیم ساعت در حمام آبی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شده و محلول رویی پس از عبور دادن از کاغذ صافی تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شد.

#### ساخت نانوکامپوزیت

ابتدا نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  بر اساس روش Salehzadeh و همکاران (۲۰۱۹) ساخته شدند. برای این کار ۰/۲ گرم از نمک بیسموت و ۰/۴ گرم از نمک نیترا ت آهن در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در حمام آبی ۸۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. در مرحله بعد، محلول  $\text{NaOH}$  ۶ مولار به صورت تدریجی و کم‌کم به محلول اضافه شد تا زمانی که رسوبات نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  پدیدار شوند. رسوبات به دست آمده به صورت متوالی در اتانل و آب مقطر شستشو داده شد و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در مرحله بعد، ۴۰ میلی‌گرم از

۱۵/۶ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و چاهک‌های فاقد نانوکامپوزیت هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به همه چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. در مرحله بعد، محیط کشت از چاهک‌ها خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شدند و سپس جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (BioTek، آمریکا) خوانده شد. در پایان، زیستایی سلول‌ها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد و غلظت مهارتی ۵۰ درصد ( $\text{IC}_{50}$ ) با استفاده از نرم‌افزار Graph Prism تعیین شد (Zhao et al., 2017).

رابطه ۱:

$$I(\%) = 100 - [(A_s / A_c) \times 100]$$

I: درصد مهارتی؛  $A_s$ : جذب نوری نمونه؛  $A_c$ : جذب نوری شاهد.

دستگاه دفرکتومتر (Cu-K $\alpha$  X-ray Tube، Philips X'Pert MPD  $\lambda=1.54056\text{\AA}$  هلند) انجام شد. همچنین بررسی ریخت‌شناسی و تعیین اندازه ذرات با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره (EM10C-100، Zeiss، آلمان) و نگاره (MIRA3، TESCAN، چک) صورت گرفت.

**بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی معده و**

**تعیین غلظت مهارتی ۵۰ درصد نانوکامپوزیت**

برای تعیین اثر سمیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@\text{Ag}$  بر سلول‌های سرطانی معده (Adenocarcinoma Gastric Cell Line: AGS Human Embryonic Kidney 293:) و رده نرمال (HEK293) از آزمایش MTT (2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) استفاده شد. سلول‌های AGS و رده نرمال از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به منظور انجام آزمایش MTT، سلول‌ها در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه و با فراوانی  $1 \times 10^4$  سلول در هر چاهک تهیه شدند. سپس، غلظت‌های مختلفی از نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@\text{Ag}$  (از

## بررسی بیان ژن‌ها

cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (Takara، ژاپن) ساخته شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (ورژن ۶) انجام پذیرفت و از ژن GAPDH به عنوان شاهد داخلی استفاده شد (جدول ۱). محاسبه مقدار بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Real Time PCR و در دستگاه ترموسایکلر (ABI 7300، آمریکا) انجام پذیرفت. تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با توجه به برنامه جدول ۲ انجام شد. محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها مورد مطالعه در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT$  انجام گرفت (Pfaffl, 2001). به منظور بررسی اثر  $BiFe_2O_4@Ag$  بر بیان ژن‌های *CAD*، *CASP8* و *p53* در رده سلولی سرطان معده، این سلول‌ها پس از آماده‌سازی و رشد در محیط کشت DMEM، به مدت ۲۴ ساعت با نانوکامپوزیت یاد شده در غلظت مهاری ۵۰ درصد ( $IC_{50}$ ) تیمار شدند. سپس سلول‌ها جداسازی و شستشو داده شدند و محتوی RNA کل با استفاده از کیت TriZol (Invitrogen، آمریکا) استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop Thermo, 2000c Spectrophotometers Scientific، آمریکا) ارزیابی شد و مولکول

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

توالی (5'-3')	نام ژن
F: TGGCAGAGATCGGAGAGCAT R: TCCTTCCATCCCTTCAGAGACTT	<i>CAD</i>
F: CCCACTCCTCCACCTTTGAC R: CATAACCAGGAAATGAGCTTGACAA	<i>GAPDH</i>
F: CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT R: CAACCTCAGGCGGCTCATAG	<i>p53</i>
F: GGAAGCAAGAACCCATCAAGG R: GCCCTGCCTGGTGTCTGA	<i>Caspase8</i>

Reverse :R ;Forward :F

جدول ۲: برنامه و مراحل واکنش qRT-PCR

تعداد چرخه	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	مراحل
۱	۳۰	۹۵	دناتوراسیون اولیه
	۵	۹۵	دناتوراسیون
۴۰	۲۰	۶۰	اتصال
	۳۰	۷۲	بسط

### آزمون آماری

ارتعاشات کششی مربوط به C-H و N-O مشاهده شد. علاوه بر این، در طول موج ۳۴۴۹ بر سانتی‌متر ارتعاشات مربوط به O-H قابل مشاهده بود.

در طیف مربوط به نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$ ، ارتعاشات مشاهده شده در طول موج‌های ۴۴۷ و ۵۳۰ بر سانتی‌متر مربوط به پیوند اکسید-فلز (M-O) و ارتعاشات در طول موج‌های ۸۲۳، ۱۰۷۹ و ۱۳۸۹ بر سانتی‌متر مربوط به پیوندهای کششی C-H، C-O و C-H بود. در طول موج ۱۶۴۸ بر سانتی‌متر ارتعاشات کششی مربوط به C=O قابل مشاهده بود. همچنین ارتعاشاتی در طول موج‌های ۲۹۲۵ و ۳۴۴۴ بر سانتی‌متر مشاهده شد که مربوط به پیوندهای O-H (هیدروکسیل و آب موجود در ساختار) بود. شکل ۱ الگوی طیفی FT-IR ذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  و  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  را نمایش می‌دهد.

آزمون آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و ویرایش ۱۸ انجام شد. بررسی تفاوت معنی‌داری در آزمایش MTT توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) و بررسی آماری تغییرات بیان ژن نیز با آزمون T (T Student Test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) انجام شد.

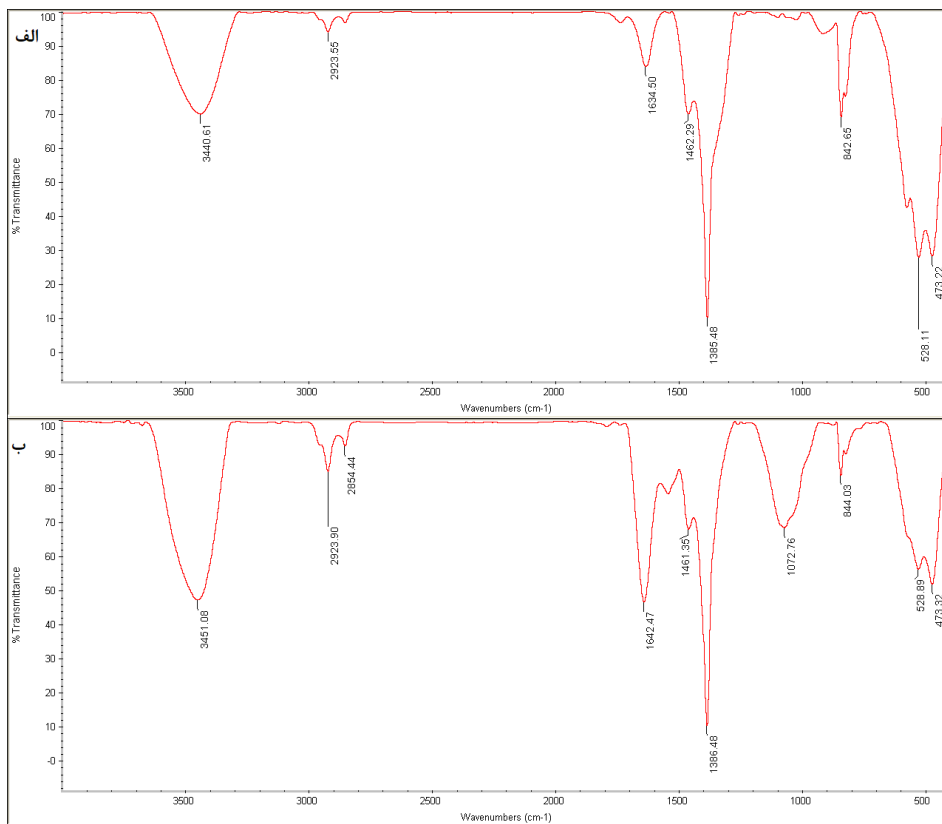
### نتایج

#### ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

بر اساس نتایج آزمون FT-IR، در الگوی طیف  $\text{BiFe}_2\text{O}_4$  پیک‌های قابل مشاهده در ۴۷۴ و ۵۲۶ بر سانتی‌متر مرتبط با ارتعاشات اکسید فلزی (M-O) بود. همچنین، طول موج ۸۲۵ بر سانتی‌متر مربوط به باندهای C-H بود و در طول موج‌های ۱۳۲۳ و ۱۳۸۳ بر سانتی‌متر به ترتیب

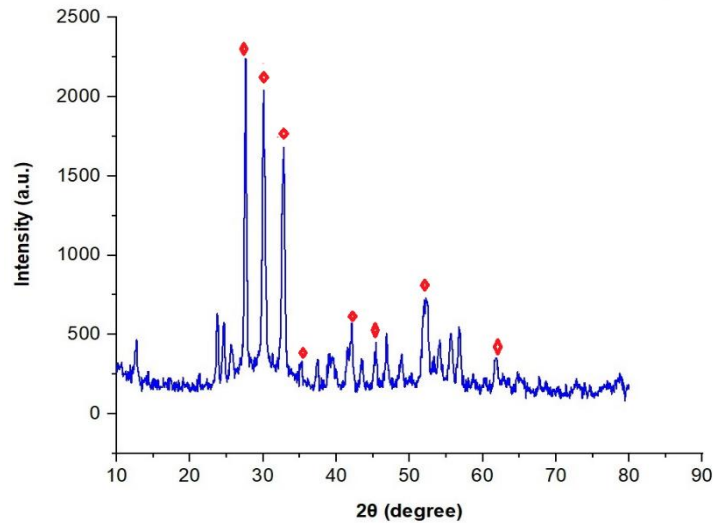
مطابق با گزارش های پیشین است ( Dadashi et al., 2015). علاوه بر این، پیکهای مربوط به  $Fe_2O_4$  نیز در دو تتای ۳۰، ۳۵، ۴۲ و ۴۵ درجه مشاهده شد (ElNahrawy et al., 2020). شکل ۲ الگوی طیف XRD نانوکامپوزیت  $BiFe_2O_4@Ag$  را نمایش می دهد.

بررسی ساختار کریستالی  $BiFe_2O_4@Ag$  با استفاده از آزمون XRD صورت پذیرفت. بر اساس نتایج، پیکهای برابر با دو تتای  $(2\theta)$  ۲۷ درجه، ۳۳ درجه و ۵۳ درجه مربوط به عنصر نقره بود که مطابق با کارت شماره ۳۷۲۲-۸۹ JCPDS است (Shameli et al., 2012). همچنین، یک پیک در دو تتای ۲۵ درجه مشاهده شد که مربوط به عنصر بیسموت بود و



شکل ۱: آزمایش FT-IR نانوذرات ساخته شده. الف)  $BiFe_2O_4$ . ب)  $BiFe_2O_4@Ag$ .





شکل ۲: آزمایش XRD نانوذرات  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$

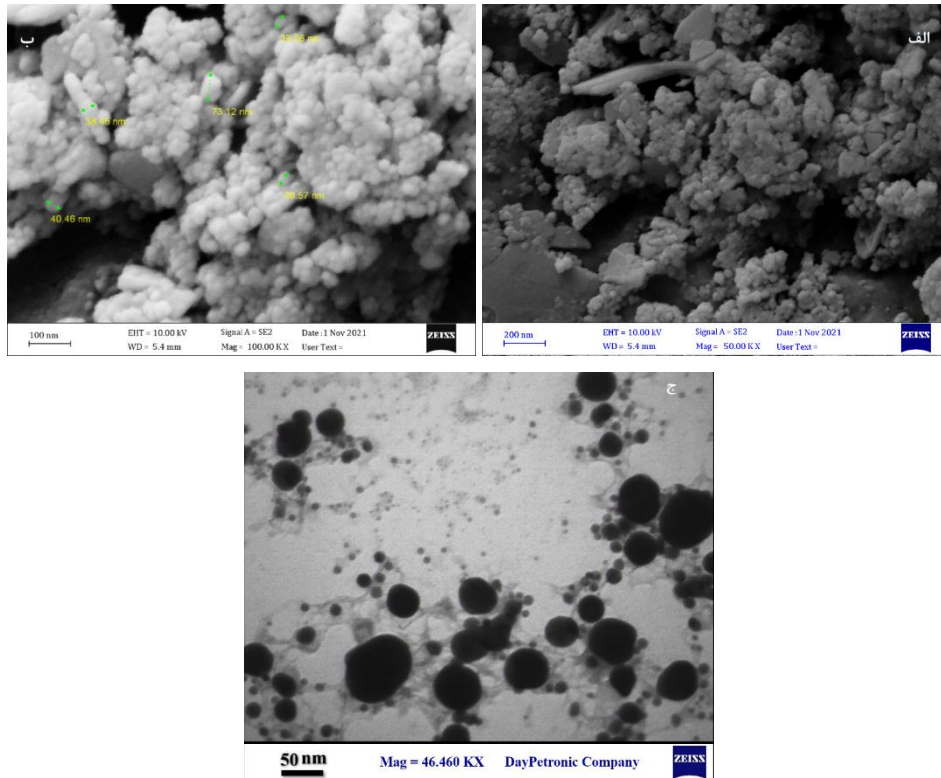
نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  با استفاده از آزمایش MTT نشان داد که ذرات ساخته شده دارای خاصیت سمیت بالایی علیه سلول‌های سرطانی معده بود به طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار میزان زنده‌مانی سلول‌های مذکور شد. به بیان دیگر، میزان زنده‌مانی سلول‌های AGS در مواجهه با نانوذرات یاد شده در غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۳۶ درصد و در تیمار حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانوذرات به میزان بیش از ۹۰ درصد کاهش داشت. شکل ۴ میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی معده و رده نرمال را در

بررسی اندازه و ریخت‌شناسی نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره و نگاره نشان داد که ذرات ساخته شده دارای ظاهر نسبتاً کروی بوده و ابعاد ذرات در محدوده ۳۹ تا ۷۳ نانومتر بود. همچنین بر اساس نتایج، ذرات ساخته شده از پراکندگی نسبتاً مناسبی برخوردار بودند. شکل ۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی و اندازه ذرات ساخته شده را نمایش می‌دهد.

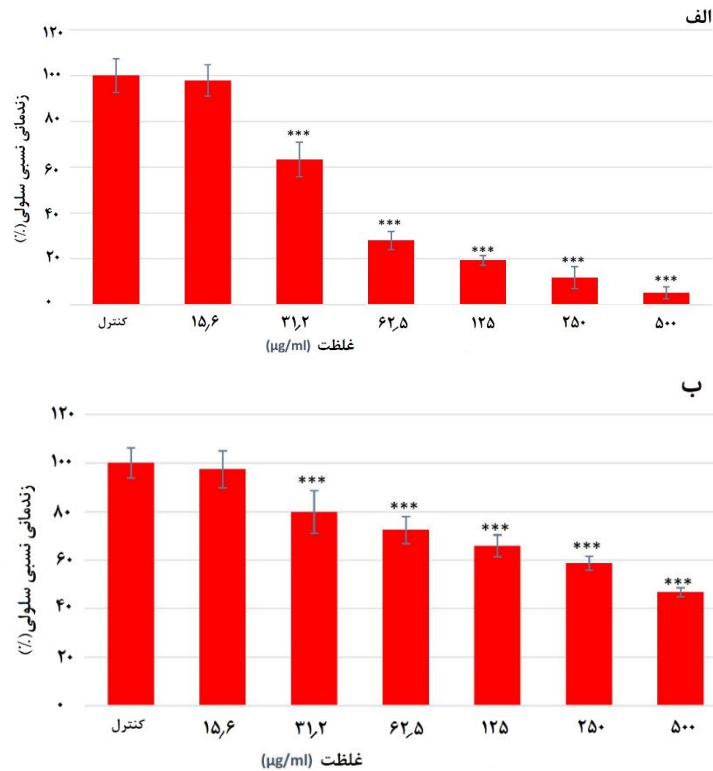
#### بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی معده در مواجهه با نانوکامپوزیت $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$

نتایج بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی معده در مواجهه با غلظت‌های مختلف

حضور غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  نمایش می‌دهد. همچنین میزان غلظت مهاری ۵۰ درصد برای رده سرطانی ۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و رده نرمال ۱۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.



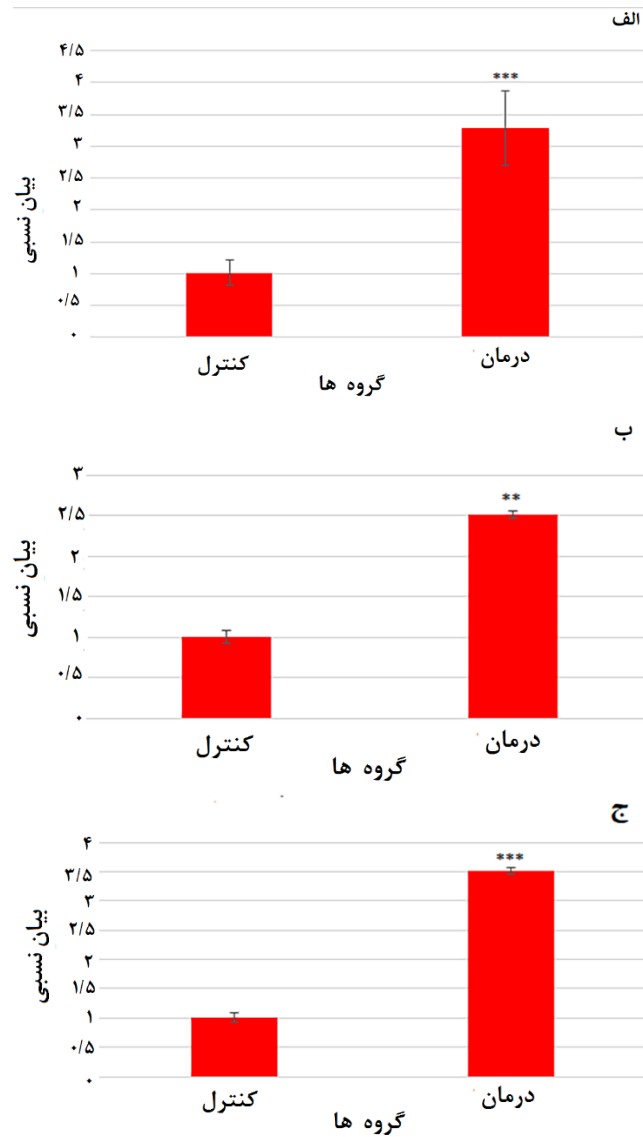
شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$ . الف و ب) میکروسکوپ الکترونی نگاره. ج) میکروسکوپ الکترونی گذاره.



شکل ۴: میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مواجهه با غلظت‌های مختلف  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=3$ ). الف) سلول‌های رده AGS. ب) سلول‌های رده نرمال. علامت «\*» نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با شاهد است (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ).

میزان بیان در مورد ژن *CAD* مشاهده شد که افزایش بیان ۳/۵ برابری را نشان داد. همچنین میزان بیان ژن‌های *CASP8* و *p53* نیز به ترتیب افزایش بیان ۳/۲۷ و ۲/۵۱ برابری را در مقایسه با شاهد نشان دادند. نتایج بررسی بیان این سه ژن در شکل ۵ نمایش داده شده است.

بیان نسبی ژن‌های موثر در آپوپتوز در سلول‌های مواجه شده با  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  بررسی تغییرات بیان ژن‌های *CAD*، *p53* و *CASP8* در سلول‌های AGS مواجه‌سازی شده با غلظت ۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت نشان داد که میزان بیان هر سه ژن به طور چشمگیری افزایش یافت. بیشترین



شکل ۵: میزان بیان ژن های آپوپتوتیک در سلول های سرطان معده مواجه یافته با  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=3$ ). الف) ژن *CASP8*. ب) ژن *p53* ج) ژن *CAD*. علامت «\*» نشان دهنده اختلاف معنی دار با شاهد است ( $P<0/001$ :\*\*\*).

## بحث

جلبک *Scenedesmus obliquus* ساخته شد، بر سلول‌های سرطان معده ارزیابی شد و اثر آن بر بیان برخی ژن‌های موثر در مرگ سلولی اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از عصاره جلبک *S. obliquus* می‌توان نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  را ساخت. عصاره‌های جلبکی سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌ها هستند و این ترکیبات می‌توانند نقش احیا کننده‌های طبیعی را ایفا کنند و از طریق مهار افزایش اندازه، منجر به ساخته شدن ذرات در ابعاد نانو شوند (Perna et al., 2019). بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی انجام شده به خوبی ساخت نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  را نشان داد. برای بررسی اثر نانوذره  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  در زیستایی سلول‌های رده سرطانی معده (AGS) و رده نرمال (HEK293)، آزمایش MTT به صورت ۲۴ ساعته انجام شد. نتیجه نشان داد که تکثیر سلول‌های سرطانی AGS به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت. در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی هم در رده AGS و هم HEK293 مشاهده شد. غلظت مهاری  $\text{IC}_{50}$  برای  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  برابر با ۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر برای رده

سرطان معده به عنوان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در تمامی کشورها شناخته می‌شود و با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه مبارزه با این بیماری، همچنان سرطان معده یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش کیفیت زندگی و مرگ و میر انسان‌ها در نظر گرفته می‌شود. میزان موارد ابتلا و مرگ و میر ناشی از سرطان در سالیان گذشته روندی افزایشی داشته است که این امر لزوم به کارگیری عوامل پیشگیرانه و روش‌های درمانی نوین را بیش از پیش نشان می‌دهد (Sung et al., 2021).

استفاده از نانوذرات فلزی در درمان انواع مختلف سرطان به عنوان یک رویکرد جدید در این زمینه معرفی شده است. این ذرات به دلیل قابلیت پراکنش در بدن و پایداری زیادی که دارند می‌توانند یک انتخاب مناسب در زمینه طراحی نانوداروها باشند. مطالعات جدید اغلب در زمینه افزایش اثربخشی و کاهش عوارض جانبی این ترکیبات متمرکز شده است. بر این اساس، استفاده از نانوذرات چند عاملی می‌تواند منجر به افزایش کارآمدی و کاهش عوارض سمیت ناخواسته این محصولات شود. بر این اساس، در مطالعه حاضر خاصیت ضدسرطانی نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  که با استفاده از

به تخریب اجزای سلولی و اختلال در فرایندهای سلولی شوند (Canaparo et al., 2020). Alamer و همکاران (۲۰۲۱) تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به عنوان مهم‌ترین مکانیسم سمیتی فلز بیسموت مطرح کردند. همچنین Ahamed و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان دادند که نانوذرات بیسموت با ایجاد استرس اکسیداتیو می‌توانند منجر به از بین رفتن سلول‌های سرطان سینه شوند.

علاوه بر این، مطالعات متعددی نشان دادند که نانوذرات نقره از طریق افزایش میزان رادیکال‌های اکسیژن و همچنین برهمکنش با پروتئین‌ها می‌توانند منجر به آسیب و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شوند (Abdel-Fattah and Ali, 2018). بنابراین، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی توسط  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  احتمالاً ناشی از بروز استرس اکسیداتیو به واسطه تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به اجزای سلولی است. گونه‌های فعال اکسیژن باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و افزایش نسبت  $\text{Bax/Bcl2}$  می‌شوند. در ادامه این مسیر با واسطه میتوکندری منجر به مرگ سلولی می‌شود (Sharma et al., 2012).

سرطانی معده و ۱۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر برای رده نرمال بود. بالا بودن مقدار  $\text{IC}_{50}$  در رده نرمال، بیانگر این است که این نانوذره سمیت کمتری روی سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی دارد. از این رو، می‌توان آن را در غلظت‌هایی به کار برد که برای سلول‌های نرمال سمیت کمتری داشته باشد. در نهایت مشخص شد که این نانوذره ساخته شده به صورت وابسته به غلظت عمل می‌کند. این اثر با مطالعاتی که در آنها نانوکامپوزیت‌های  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4@Ag$  و  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@Ag$  با عصاره جلبک ساخته شده بودند و به ترتیب روی سلول‌های رده پستان و معده بررسی شده بودند همخوانی داشت (Hajjalizadeh et al., 2022; Jodati et al., 2022).

بررسی قابلیت ضدسرطانی نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  نشان داد که این نانوذرات به خوبی قادر به مهار تکثیر سلول‌های سرطانی معده هستند. به طور کلی، تولید رادیکال‌های واکنشگر اکسیژن شامل یون‌های هیدروکسیل، پراکسید و سوپراکسید مهم‌ترین پیامد مواجهه با نانوذرات فلزی گزارش شده است. این مولکول‌ها به دلیل ناپایداری بسیار زیاد با ساختارهای سلولی از جمله اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و می‌توانند منجر

ذرات در القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطان معده است.

قطعه قطعه شدن DNA به عنوان یکی از مراحل اصلی در مرگ سلولی مطرح است. به بیان دیگر، به دنبال آسیب‌های سلولی و توقف چرخه سلولی، گروهی از آنزیم‌های DNase فعال شده و سبب قطعه قطعه شدن اسید نوکلئیک می‌شوند. DNase‌های فعال شونده توسط کاسپاز (CAD) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های موثر در فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی هستند. این پروتئین‌ها که در حالت طبیعی غیرفعال هستند به دنبال افزایش فعالیت کاسپازها فعال شده و می‌توانند سبب آسیب به اسید نوکلئیک سلول شوند (Widłak, 2000). نتایج این مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار ژن CAD در سلول‌های مواجه یافته با  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  بود. با توجه به افزایش بیان این ژن، به نظر می‌رسد که تخریب DNA سلول‌های سرطانی یکی از پیامدهای احتمالی مواجه با نانوکامپوزیت ساخته شده است.

در مجموع، در این مطالعه نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  با استفاده از عصاره جلبک *Scenedesmus obliquus* ساخته شد که این نانوذرات از عملکرد مهاری مناسبی علیه سلول‌های سرطان معده برخوردار بودند. علاوه

به منظور بررسی اثر  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  بر فرایند مرگ سلولی، در این مطالعه بیان نسبی ژن‌های CAD، CASP8 و p53 مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در بالا اشاره شد، مواجهه سلول‌های AGS با  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  منجر به بیان چشمگیر همه ژن‌های مورد مطالعه شد. کاسپازها گروهی از آنزیم‌ها با خاصیت پروتئازی هستند که فعالیت آنها نقش مهمی در شروع آبشار سیگنالی مرگ سلولی دارد (Tummers and Green, 2017). کاسپاز ۸ یک سیستمین پروتئاز است که در پاسخ به محرک‌های خارجی نقش بسیار مهمی در فعال‌سازی مسیر برون‌زاد آبشار سیگنالی مرگ سلولی دارد. افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ نشان‌دهنده فعال‌سازی و القای مسیر برون‌زاد مرگ سلولی در سلول‌های سرطان معده است.

پروتئین P53 یک مهارکننده تومور است که به دنبال بروز آسیب‌های سلولی شامل آسیب به اسید نوکلئیک منجر به مهار چرخه سلولی شده و با تنظیم ژن‌های آپوپتوتیک سبب القای مرگ سلولی می‌شود (Shen and White, 2001). نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن p53 در سلول‌های مواجه شده با نانوذرات به طرز چشمگیری افزایش یافت که نشانگر نقش این

بر این، در سلول‌های مواجهه یافته با  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  میزان بیان ژن‌های موثر در فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به میزان چشمگیری افزایش یافت که نشانگر القای مسیر مرگ سلولی در این سلول‌ها است. با توجه به این نتایج، نانوکامپوزیت  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@Ag$  به دلیل دارا بودن ویژگی مغناطیسی می‌تواند در مطالعات آتی به عنوان مبنایی برای به‌کارگیری نانوذرات فلزی مغناطیسی علیه سرطان مورد توجه قرار گیرد.



## منابع

- Abdel-Fattah W.I. and Ali G.W. 2018.** On the anti-cancer activities of silver nanoparticles. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 5(1): 43–46.
- Ahamed M., Akhtar M.J., Khan M.M., Alrokayan S.A. and Alhadlaq H.A. 2019.** Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. *Chemosphere*, 216: 823–831.
- Alamer A., Ali D., Alarifi S., Alkahtane A., Al-Zharani M., Abdel-Daim M.M., Albasher G., Almeer R., Al-Sultan N.K., Almalik A., Alhasan A.H., Stournaras C.H., Hasnain S. and Alkahtani S. 2021.** Bismuth oxide nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in human breast cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(6): 7379–7389.
- Awasthi R., Roseblade A., Hansbro P.M., Rathbone M.J., Dua K. and Bebawy M. 2018.** Nanoparticles in cancer treatment: Opportunities and obstacles. *Current Drug Targets*, 19(14): 1696–1709.
- Canaparo R., Foglietta F., Limongi T. and Serpe L. 2020.** Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Materials*, 14(1): 53–67.
- Dadashi S., Delavari H. and Poursalehi R. 2015.** Optical properties and colloidal stability mechanism of bismuth nanoparticles prepared by Q-switched Nd: Yag laser ablation in liquid. *Procedia Materials Science*, 11: 679–83.
- Deepak P., Amutha V., Kamaraj C., Balasubramani G., Aiswarya D. and Perumal P. 2019.** Mosquitolarvicidal potential of metal and oxide nanoparticles synthesized from aqueous extract of the seagrass, *Cymodocea serrulata*. *Journal of Cluster Science*, 30: 797–812.
- ElNahrawy A.M., Mansour A.M., ElAttar H.A., Sakr E.M., Soliman A.A. and Hammad A.B.A. 2020.** Impact of Mn-substitution on structural, optical, and magnetic properties evolution of sodium-cobalt ferrite for optomagnetic applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(8): 6224–6232.
- Hajjalizadeh D., Saber A.A., Jameh M., Ahang B., Moafy A., Bijarpas Z.K., Masouleh R.S., Kia M.B., Mojdehi S.R. and Salehzadeh A. 2022.** Potential of apoptosis-inducing by a novel biosynthesized  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@Ag$  nanocomposite in gastric cell line at the

- cellular and molecular level. *Journal of Cluster Science*, 34: 359–371.
- Jodati S., Gorji S., Sharif A.P., Taramsari S.M. and Salehzadeh A. 2022.** A novel biosynthesized ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanocomposite: Implications for cytotoxicity, gene expression and antiproliferative studies in breast cancer cell line. *Journal of Cluster Science*, 34: 415–426.
- Khan F., Shahid A., Zhu H., Wang N., Javed M.R., Ahmad N., Xu J., Alam M.A. and Mehmood M.A. 2022.** Prospects of algae-based green synthesis of nanoparticles for environmental applications. *Chemosphere*, 293: 133571.
- Khan I., Saeed K. and Khan I. 2019.** Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*: 12(7): 908–931.
- Pfaffl M.W. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 45–45.
- Prerna K., Kaur A. and Goyal D. 2019.** Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 163: 1–24 (105656).
- Salehzadeh A., Naeemi A.S., Khaknezhad L., Moradi-Shoeili Z. and Shandiz S.A.S. 2019.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag nanocomposite biosynthesized using *Spirulina platensis* extract and its enhanced anticancer efficiency. *IET Nanobiotechnol*, 13: 766–770.
- Shameli K., Ahmad M.B., Zamanian A., Sangpour P., Shabanzadeh P., Abdollahi Y. and Zargar M. 2012.** Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 5603–5610.
- Sharif A.P., Habibi K., Tolami H.F., Alkinani T.A., Jameh M., Dehkaei A.A., Monhaser S.K., Daemi H.B., Mahmoudi A., Masouleh R.S. and Salehzadeh A. 2022.** Cytotoxic effect of a novel GaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanocomposite synthesized by *Scenedesmus obliquus* on gastric cancer cell line and evaluation of BAX, Bcl-2 and CASP8 genes expression. *Journal of Cluster Science*, 34: 1065–1075.
- Sharma V., Anderson D. and Dhawan A. 2012.** Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17(8): 852–870.
- Shen Y. and White E. 2001.** p53-dependent apoptosis pathways. *Advances in Cancer Research*, 82: 55–84.

- Skonieczna M. and Hudy D. 2018.** Biological activity of silver nanoparticles and their applications in anticancer therapy. IntechOpen, UK. 17P.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. and Bray F. 2021.** Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. A Cancer Journal for Clinicians, 71(3): 209–249.
- Tummers B. and Green D.R. 2017.** Caspase-8: Regulating life and death. Immunological Reviews, 277(1): 76–89.
- Widlak P. 2000.** The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. Acta Biochimica Polonica, 47(4): 1037–1044.
- Yigit M.V., Moore A. and Medarova Z. 2012.** Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. Pharmaceutical Research, 29(5): 1180–1188.
- Zhao Y., Guo C., Wang L., Wang S., Li X., Jiang B., Wu N., Guo S., Zhang R., Liu K. and Shi D. 2017.** A novel fluorinated thiosemicarbazone derivative-2-(3, 4-difluorobenzylidene) hydrazinecarbothioamide induces apoptosis in human A549 lung cancer cells via ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications, 491(1): 65–71.



Research Paper

**Assessment the effect of  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@ \text{Ag}$  nanocomposite biosynthesized by *Scenedesmus obliquus* on expression of *CAD*, *CASP8* and *p53* genes in gastric cancer cell line**

Hossein Shamsi<sup>1</sup>, Reza Yari<sup>2\*</sup>, Ali Salehzadeh<sup>3\*</sup>

DOI: 10.22124/japb.2022.22631.1473

Received: July 2022

Accepted: November 2022

**Abstract**

The use of nanotechnology products in cancer diagnosis and treatment has gained attention. The current study was performed to synthesize  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@ \text{Ag}$  nanocomposite using the extract of alga *Scenedesmus obliquus* and to evaluate its effect on the viability and apoptotic genes expression of gastric cancer cells (AGS). MTT was performed to determine the effect of the nanocomposite on cell viability of cancer cell line (AGS) and normal cell line (HEK293) and calculation of 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ). Also, Real Time PCR was used to determine the relative expression of *CASP8*, *CAD*, and *p53* genes. According to the results, at  $31.25\mu\text{g/mL}$  and higher,  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@ \text{Ag}$  was considerably cytotoxic for AGS cells. 50% inhibitory concentration was  $56\mu\text{g/mL}$  for cancer line and  $134\mu\text{g/mL}$  for normal line. Also, exposure of cancer cells to  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@ \text{Ag}$  significantly increased the expression of the *CAD*, *CASP8* and *p53* by 3.5, 3.27, and 2.51 folds, respectively. According to the results of this study,  $\text{BiFe}_2\text{O}_4@ \text{Ag}$  nanocomposite has proper anticancer potential against gastric cancer cells and activation of apoptotic signaling pathways is proposed as a mechanism of cell inhibition.

**Key words:** *Apoptosis, Bismuth, Gastric Cancer, Nanocomposite.*

1- Ph.D. Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, Medicinal Plants, Health and Food Security Research Center, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

\*Corresponding Authors: [rezayari@iaub.ac.ir](mailto:rezayari@iaub.ac.ir); [salehzadeh@iaurasht.ac.ir](mailto:salehzadeh@iaurasht.ac.ir)