

بررسی اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی داروی بواسیزومب و نانوذرات نقره بر روی رده سلولی سرطان تخمدان (A2780) و بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bcl-2* و کاسپاز ۳

امیر میرزایی ^{۱*} Ph.D.، هدیه دیباه ^۲ Ph. D.، فریبا خسروی نژاد ^۳ Ph.D.، هدی جوانمردی ^۴ M.Sc.

- ۱- گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
- ۲- گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
- ۳- گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۴- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Amir.Mirzaie@piaou.ac.ir ، Amir_mirzaie92@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۴

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، بررسی اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی نانوذرات نقره و داروی بواسیزومب علیه رده سلولی سرطانی تخمدان (A2780) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و *Bcl-2* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا میزان سمیت سلولی نانوذرات نقره و داروی بواسیزومب به ترتیب در غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر علیه رده سلولی A2780 توسط روش رنگ سنجی MTT به صورت تک‌دارویی و ترکیبی انجام گرفت. سپس میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و *Bcl2* با استفاده از روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره و دارو بواسیزومب دارای سمیت سلولی وابسته به دوز می‌باشد و میزان سمیت سلولی در حالت استفاده هم‌زمان نسبت به حالت تک دارویی معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$). هم‌چنین میزان IC50 نانوذرات نقره و بواسیزومب به ترتیب برابر با $12/72 \pm 0/56$ و $22/72 \pm 1/21$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. هم‌چنین استفاده هم‌زمان نانوذره نقره-دارو بواسیزومب باعث تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و *Bcl2* شد که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد نانوذرات نقره و بواسیزومب به صورت الگو وابسته به دوز با اثرات سمیت سلولی هم‌افزایی داشته و با توجه به القا آپوپتوزیس با مطالعات پیش‌تر می‌توان از ترکیب نانوذرات نقره و بواسیزومب به عنوان کاندید دارویی استفاده شود.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، بواسیزومب، سرطان تخمدان، سمیت سلولی، نانوذرات نقره، رده سلولی A2780

مقدمه

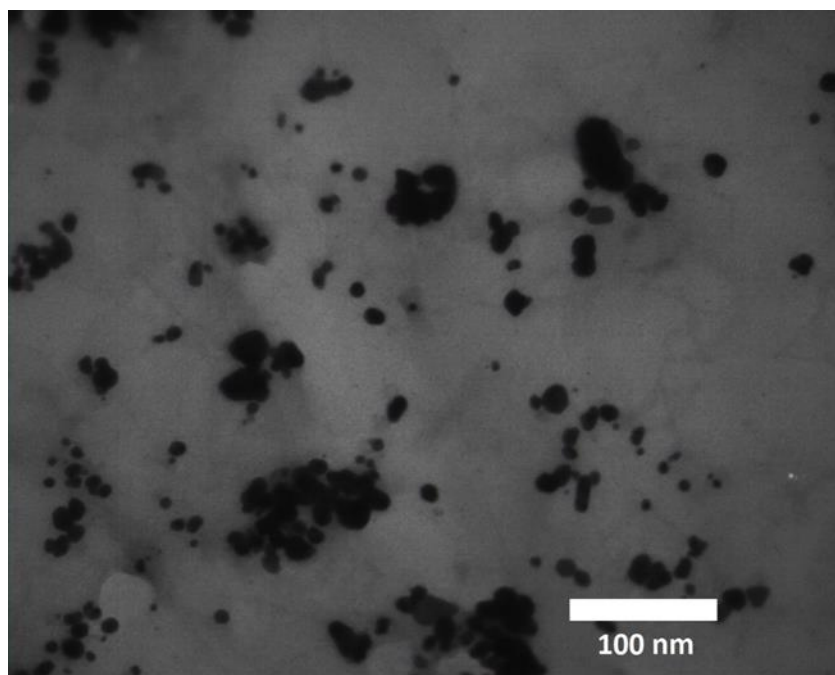
امروزه استفاده از نانو مواد در ترکیب با داروهای ضدسرطانی به‌طور گسترده‌ای در حال افزایش است و استفاده از این ترکیبات در پزشکی کاربردهای فراوان دارد (۱). یکی از جنبه‌های کاربردی نانو مواد، ترکیب آن‌ها با داروهای ضدسرطانی است تا دارو با کارایی بالاتری به سلول تحویل داده شود و از طرفی سمیت و عوارض جانبی آن بر روی سلول‌های سالم کاهش یابد (۲-۴). امروزه به‌دلیل افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص در روش‌های شیمی‌درمانی و رادیودرمانی در مراحل پیشرفته سرطان نیاز به یافتن تکنیک‌های نوین جهت کنترل و درمان سرطان وجود دارد (۵). استفاده از نانوذرات با اندازه ۱۰۰ نانومتر یا کم‌تر در ترکیب با داروهای ضدسرطانی جهت هدف‌گیری سلول‌های سرطانی در پروژه‌های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است و ارتباط معنی‌داری بین سایز نانوذره و میزان اثرات سمیت سلولی گزارش شده است (۶-۸). یکی از نانوذرات بسیار رایج در این عرصه، نانوذرات نقره می‌باشد که به‌عنوان یکی از عوامل بالقوه ضدسرطانی محسوب می‌شود (۹). مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با دو مکانیسم باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. یکی تاثیر مستقیم یا برهم‌کنش آن با ترکیبات سلولی (DNA، RNA و پروتئین) و ساختارهای سلولی (اندامک‌ها و غشاهای سلولی) می‌باشد که منجر به‌الفا مرگ سلولی می‌شود. دوم تاثیر غیرمستقیم آن‌ها در ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن که در نهایت موجب تقویت مرگ سلولی می‌شود (۱۰-۱۱).

سرطان تخمدان یکی از کشنده‌ترین نوع سرطان‌ها در میان زنان شناخته شده است، به‌طوری‌که هفتمین جایگاه بین تومورهای بدخیم و چهارمین جایگاه به‌عنوان علت مرگ در بین زنان را به‌خود اختصاص داده است. در سال ۲۰۱۹، ۲۲۲۴۵ مورد ابتلا جدید و ۱۴۱۷۰ مورد منجر به‌مرگ در سراسر جهان گزارش شده است (۱۲). درمان‌های معمول این بیماری روش‌های شیمی‌درمانی، رادیودرمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و غیره می‌باشد، اما به‌دلیل عوارض جانبی ناشی از این راه‌کارها، استفاده از شیوه‌های درمانی جایگزین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۳-۱۴). یکی از این راه‌کارهای جایگزین استفاده از نانوذرات در ترکیب با داروهای ضدسرطانی مانند بواسیزومب می‌باشد (۱۵). بواسیزومب یکی از داروهای رایج در این حوزه است که کاندیدای خوبی جهت ترکیب با نانومواد و داروهای دیگر می‌باشد. این دارو، یک آنتی‌بادی مونوکلونال نوترکیب انسانی می‌باشد که با اتصال به‌فاکتور رشد اندوتلیال عروقی با رشد و گسترش سلول‌های سرطانی مقابله می‌کند. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره و بواسیزومب انجام شده است (۱۶). Spitzer و همکاران (۱۷) اثرات سمیت سلولی بواسیزومب را علیه رده‌های مختلف سلولی چشم انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بواسیزومب در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و بعد از مدت ۴۸ ساعت دارای سمیت سلولی می‌باشد و به‌صورت وابسته به‌دوز باعث کاهش سنتز DNA می‌شود.

Kakarla V Chalam و همکاران (۱۸) اثرات سمیت سلولی بواسیزومب را علیه سلول‌های قرنیه و فیبروبلاست انسان بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که بواسیزومب در هیچ غلظتی دارای اثرات سمیت سلولی نبود. قدیمی و همکاران (۱۹) اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره را علیه رده سلولی سرطان پستان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی وابسته به‌دوز هستند و می‌توانند آپوپتوزیس را القا کنند. با توجه به‌این‌که محققان به‌دنبال کاهش غلظت داروی مورد استفاده جهت درمان سرطان و هم‌چنین افزایش سمیت سلولی هستند. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی نانوذرات نقره به‌همراه داروی بواسیزومب بر روی رده سلولی سرطان تخمدان (A2780) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bcl-2* و *کاسپاز ۳* بود.

مواد و روش‌ها

نانوذرات نقره (AgNPs) و داروی بوسیزومب: در این مطالعه، نانوذرات نقره از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان با برند US nano دارای اندازه بین ۵-۸ نانومتر و ۹۹/۹۹ درصد خلوص تهیه شد که دارای مورفولوژی کروی می‌باشد (شکل ۱). هم‌چنین داروی بوسیزومب با کد MSQC20 با خلوص کمتر از ۹۰ درصد از شرکت مرک-آلمان تهیه شد.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذره نقره، بزرگ‌نمایی $\times 1,000,000$.

کشت سلولی و بررسی اثرات سمیت سلولی

کشت سلول: رده سلولی سرطان تخمدان اپی‌تلیالی (A2780) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد NCBI461 تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین در ۵ درصد CO_2 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

بررسی اثرات سمیت سلولی: به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره و بوسیزومب علیه رده سلولی A2780 از روش رنگ‌سنجی MTT (۳-۴،۵-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide استفاده شد. در ابتدا تعداد 1×10^6 سلول در پلیت ۹۶ خانه کاشته شدند و سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره و سپس غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو بوسیزومب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و به‌دنبال آن پس از طی زمان‌های مذکور محتوی پلیت ۹۶ خانه‌ای تخلیه شده، سپس رنگ MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به‌وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شد. درنهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر (Bio Tek, آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد و میزان کشدگی سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده} = \text{میزان بقا سلولی}$$

هم‌چنین میزان غلظت در ۵۰ درصد کشندگی (Concentration half maximal inhibitory) یا IC50 بررسی شد (۱۸). هم‌چنین پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره و بواسیزومب، مورفولوژی سلول‌های A2780 نیز با گروه کنترل (تیمار نشده) مقایسه شدند.

بررسی اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال: اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی نانوذرات نقره و بواسیزومب بر روی رده سلولی نرمال HEK-293 به ترتیب در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو بواسیزومب با استفاده از روش MTT انجام گرفت و میزان سمیت سلولی آن مورد بررسی قرار گرفت.

سنتر cDNA و اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bcl-2 و کاسپاز ۳: در این مطالعه میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bcl-2 و کاسپاز ۳ با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا RNA سلول‌های تیمار شده و کنترل (تیمار نشده) با ترکیب نانوذرات نقره و داروی بواسیزومب با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آمریکا) استخراج شد. سپس غلظت آن توسط دستگاه نانودراپ (Thermo fisher scientific، آمریکا) اندازه‌گیری شد. سنتر مولکول‌های cDNA با استفاده از کیت سنتر cDNA (Takara، ژاپن) انجام گرفت که مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر، ۱/۸ میکرولیتر RNA بوده و با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دمایی-زمانی به صورت درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای اتصال آغازگر، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه جهت ساخت cDNA و ۸۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیرفعال‌سازی آنزیم رونوشت‌بردار معکوس انجام گرفت. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی (ژن خانه‌دار) در نظر گرفته شد. آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های Bcl-2، کاسپاز ۳ و GAPDH در جدول ۱ آمده است. واکنش Real Time PCR شامل ۵ میکرولیتر Syber Green PCR Master، ۰/۴ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشتی اختصاصی هر ژن، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۴ میکرولیتر Reference Dye و با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسید، در نهایت واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه (ABI.Step One، آمریکا) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۴ ثانیه انجام گرفت (۲۰).

بررسی میزان القای آپوپتوزیس: به‌منظور بررسی میزان القای آپوپتوزیس در سلول‌های A2780 تیمار شده با نانوذرات نقره-بواسیزومب از روش فلوسیتومتری استفاده شد. در ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول با نانوذرات نقره-بواسیزومب تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان آپوپتوزیس توسط روش Annexin V/propidium iodide (PI) برطبق دستورالعمل کیت مربوطه انجام گرفت و در نهایت نتایج توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانش شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای ژن‌های Bcl-2، کاسپاز ۳ و GAPDH.

منبع	توالی آغازگر 5' به 3'	نام ژن
۳۵	F TTAATAAAGGTATCCATGGAGAACACT R TTAGTGATAAAAATAGAGTCTTTTGTGAG	کاسپاز ۳
۳۶	F GGACTGTGGCATTGAGAGAG R GGAGCCATCCTTTCAA	Bcl-2
۳۷	F GGAGTCCCCTGGCGTCTTCAC R GAGGCATTGCTGATGATCTTG	GAPDH

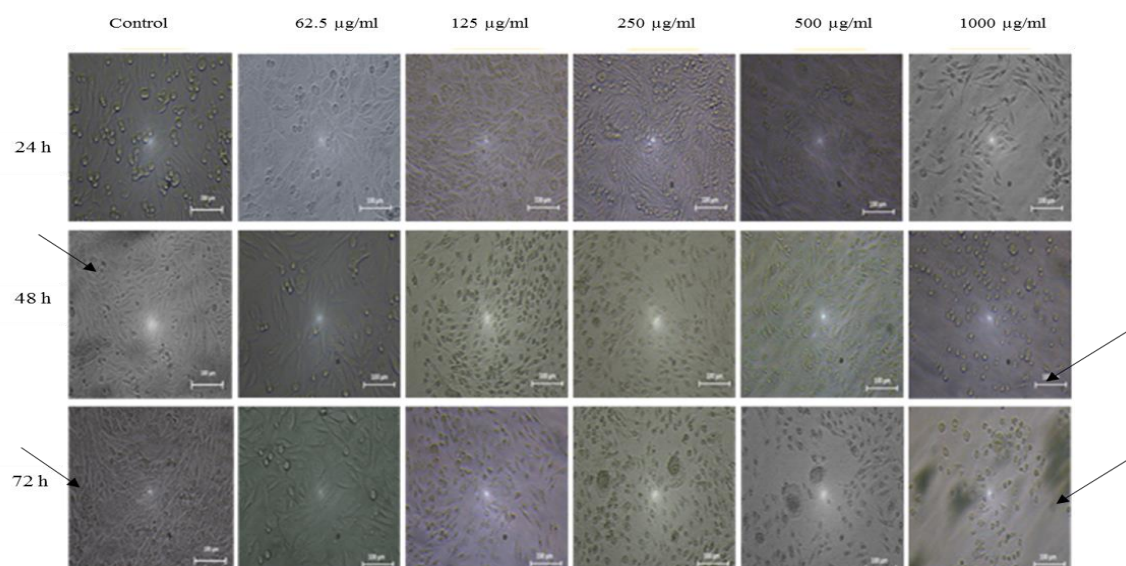
آنالیز آماری

تمامی تست‌های این مطالعه به صورت ۳ بار تکرار بوده و تجزیه و تحلیل آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Graph pad Prism نسخه ۸ انجام شد و داده‌های سمیت سلولی و بیان ژن با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر قرار گرفته شد و اطلاعات به صورت SD (mean \pm standard deviation) نمایش داده شد. همچنین در این تحقیق اختلاف سیکل‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره و دارو بواسیزومب) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با ترکیب فوق) در واکنش Real-Time PCR محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع (GAPDH) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

نتایج

تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره

نتایج تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره نشان داد که با افزایش غلظت و زمان نانوذرات نقره میزان بقای سلول کاهش یافته و در واقع سمیت سلولی وابسته به دوز و زمان است. تیمار سلول‌های A2780 با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت میزان بقای سلول به ترتیب به میزان $۸۲/۶۸ \pm ۱/۰۵$ ، $۶۹/۶۷ \pm ۰/۷۹$ ، $۶۶/۵۵ \pm ۰/۹۲$ ، $۶۲/۷۹ \pm ۰/۸۱$ و $۵۷/۴۱ \pm ۰/۷۶$ بود. در مدت زمان ۴۸ ساعت در همان غلظت‌ها به ترتیب میزان بقای سلول $۷۴/۱۸ \pm ۰/۸۲$ ، $۴۲/۳۲ \pm ۰/۹۸$ ، $۴۰/۳۴ \pm ۰/۸۸$ ، $۳۸/۸۰ \pm ۱/۰۵$ و $۳۸/۱۳ \pm ۱/۲۴$ شد. همچنین در مدت زمان ۷۲ ساعت میزان بقای سلول به ترتیب به میزان $۶۳/۰۳ \pm ۱/۲۷$ ، $۴۰/۱۳ \pm ۰/۸۴$ ، $۳۷/۶۵ \pm ۰/۹۸$ ، $۳۵/۳۷ \pm ۰/۹۷$ و $۳۱/۳۷ \pm ۰/۹۳$ بود. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های کنترل ظاهری طبیعی داشته و دوکی‌شکل هستند. در تیمار سلول‌های A2780 با ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت، ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تقریباً نیمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند (جدول ۲، ۳ و ۴).



شکل ۲: اثر نانوذرات نقره در غلظت‌های ۶۲/۵-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رده سلولی A2780 در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. سلول‌های کنترل در اثر تیمار با نانوذرات نقره از حالت دوکی شکل خارج شده و شکل سلولی به هم ریخته است. فلش‌ها نشان دهنده تغییر شکل ظاهری سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات نقره هستند. بزرگ‌نمایی $\times 100000$.

جدول ۲: نتایج سمیت سلولی نانوذرات نقره، بواسیزومب و نانوذرات نقره-بواسیزومب در مدت زمان ۲۴ ساعت.

میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره و بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره (میکروگرم در میلی‌لیتر)
۷۹/۵۶ ± ۱/۵۶	۳۱/۲۵ + ۱۰۰۰	۷۷/۹۷ ± ۰/۴۶	۱۰۰۰	۸۲/۶۸ ± ۱/۰۵	۶۲/۵
۷۷/۹۶ ± ۲/۶	۶۲/۵ + ۲۰۰۰	۷۰/۲۰ ± ۰/۳۳	۲۰۰۰	۶۹/۶۷ ± ۰/۷۹	۱۲۵
۶۷/۲ ± ۱/۶	۱۲۵ + ۳۰۰۰	۶۴/۱۰ ± ۰/۳	۳۰۰۰	۶۶/۵۵ ± ۰/۹۲	۲۵۰
-	-	-	-	۶۲/۷۹ ± ۰/۸۱	۵۰۰
-	-	-	-	۵۷/۴۱ ± ۰/۷۶	۱۰۰۰

جدول ۳: نتایج سمیت سلولی نانوذرات نقره، بواسیزومب و نانوذرات نقره-بواسیزومب در مدت زمان ۴۸ ساعت.

میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره و بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره (میکروگرم در میلی‌لیتر)
۷۴/۲۲ ± ۲/۴	۳۱/۲۵ + ۱۰۰۰	۷۶/۲۳ ± ۱/۲	۱۰۰۰	۷۴/۱۸ ± ۰/۸۲	۶۲/۵
۶۲/۵۵ ± ۱/۶	۶۲/۵ + ۲۰۰۰	۶۹/۴۴ ± ۱/۸	۲۰۰۰	۴۲/۳۲ ± ۰/۹۸	۱۲۵
۳۵/۶۸ ± ۱/۳	۱۲۵ + ۳۰۰۰	۶۰/۷۲ ± ۲/۳	۳۰۰۰	۴۰/۳۴ ± ۰/۸۸	۲۵۰
-	-	-	-	۳۸/۸۰ ± ۱/۰۵	۵۰۰
-	-	-	-	۳۸/۱۳ ± ۱/۲۴	۱۰۰۰

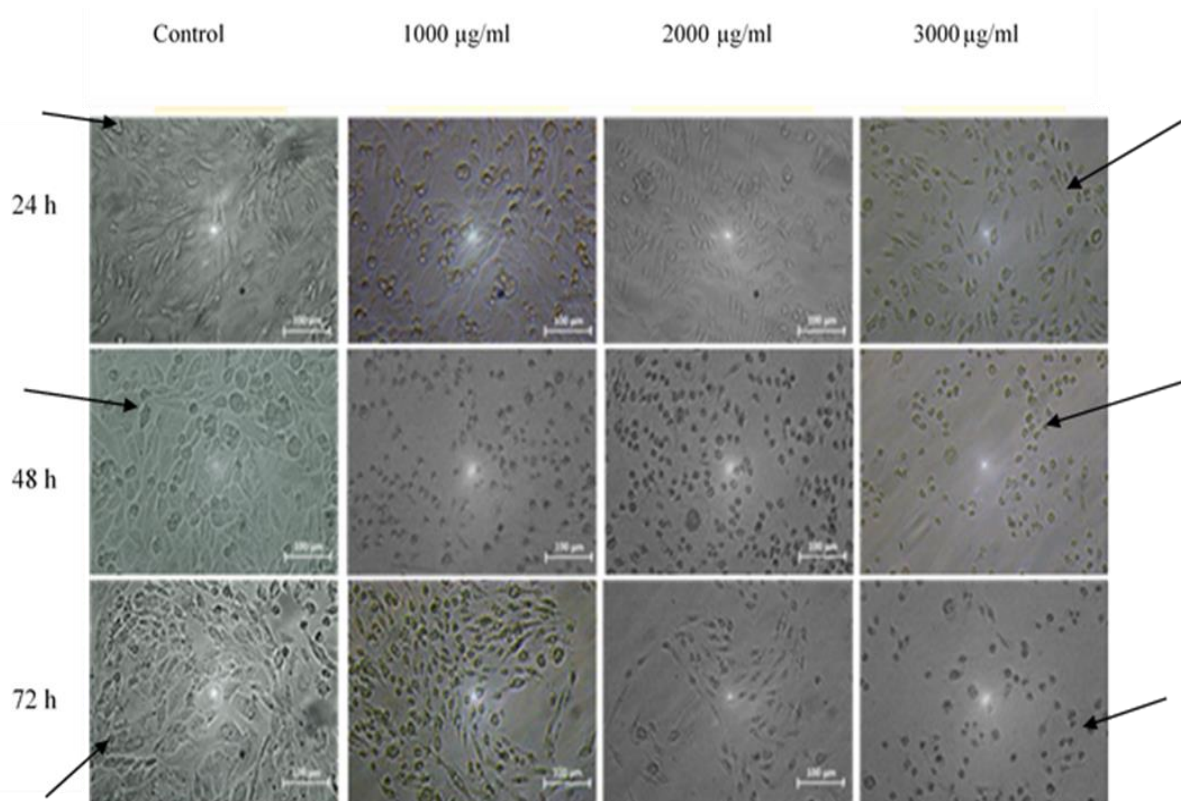
جدول ۴: نتایج سمیت سلولی نانوذرات نقره، بواسیزومب و نانوذرات نقره-بواسیزومب در مدت زمان ۷۲ ساعت.

میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره و بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت بواسیزومب (میکروگرم در میلی‌لیتر)	میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره (میکروگرم در میلی‌لیتر)
۶۸/۷۰ ± ۱/۷۴	۳۱/۲۵ + ۱۰۰۰	۶۱/۰۸ ± ۰/۸۳	۱۰۰۰	۶۳/۰۳ ± ۱/۲۷	۶۲/۵
۵۹/۳۳ ± ۱/۳	۶۲/۵ + ۲۰۰۰	۴۰/۴۲ ± ۲/۳	۲۰۰۰	۴۰/۱۳ ± ۰/۸۴	۱۲۵
۳۱/۱۳ ± ۲/۲	۱۲۵ + ۳۰۰۰	۳۵/۹۰ ± ۰/۹۸	۳۰۰۰	۳۷/۶۵ ± ۰/۹۸	۲۵۰
-	-	-	-	۳۵/۳۷ ± ۰/۹۷	۵۰۰
-	-	-	-	۳۱/۳۷ ± ۰/۹۳	۱۰۰۰

تیمار سلول‌ها با بواسیزومب

تیمار سلول A2780 با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بواسیزومب نشان داد که میزان سمیت سلولی بواسیزومب در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت معنی‌دارتر بودند به طوری که میزان بقای سلولی در مدت زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۹۷/۴۶ ± ۰/۷۷، ۷۰/۲۰ ± ۰/۳۳ و ۶۴/۱۰ ± ۰/۳ و در مدت زمان ۴۸ ساعت ۷۶/۲۳ ± ۱/۲، ۶۹/۴۴ ± ۱/۸ و ۶۰/۷۲ ± ۲/۳ و در مدت زمان ۷۲ ساعت ۶۱/۰۸ ± ۰/۸۳، ۴۰/۴۲ ± ۲/۳ و ۳۵/۹۰ ± ۰/۹۸ بود (جداول ۲، ۳ و ۴). همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، سلول‌های نمونه کنترل ظاهری طبیعی داشته و دوکی شکل هستند. در تیمار سلول‌های A2780 با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از بواسیزومب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ظاهر سلول‌ها تغییر قابل توجهی نداشته ولی کاهش در تعداد سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده می‌شود (شکل ۳). در تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بواسیزومب، در

مدت زمان ۴۸ ساعت و هم‌چنین غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۷۲ ساعت تقریباً نیمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند (جدول ۲، ۳ و ۴).



شکل ۳: اثر داروی بواسیزومب در غلظت‌های ۱۰۰۰-۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رده سلولی A2780 در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره و بواسیزومب

تیمار سلول‌های A2780 با غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره و ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از بواسیزومب در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که بیش‌ترین میزان اثربخشی در مدت زمان ۴۸ ساعت بوده به‌طوری‌که در مقایسه با بواسیزومب در مدت زمان ۴۸ ساعت معنی‌دار بوده است. میزان بقای سلول در مدت زمان ۲۴ در غلظت‌های ذکر شده نانوذرات نقره و بواسیزومب به‌ترتیب برابر است با $۷۹/۵۶ \pm ۱/۵۶$ ، $۷۷/۹۶ \pm ۲/۶$ و $۶۷/۲ \pm ۱/۶$ و در مدت زمان ۴۸ ساعت $۷۴/۲۲ \pm ۲/۴$ ، $۶۲/۵۵ \pm ۱/۶$ و $۳۵/۶۸ \pm ۱/۳$ و در مدت زمان ۷۲ ساعت $۶۸/۷۰ \pm ۱/۷۴$ ، $۵۹/۳۳ \pm ۱/۳$ و $۳۱/۱۳ \pm ۲/۲$ است (جدول ۲، ۳ و ۴).

بررسی اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال

نتایج تیمار سلول‌های نرمال HEK-293 با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو بواسیزومب نشان داد که دارای اثرات سمیت سلولی کم‌تری علیه رده سلولی نرمال می‌باشد (جدول ۵).

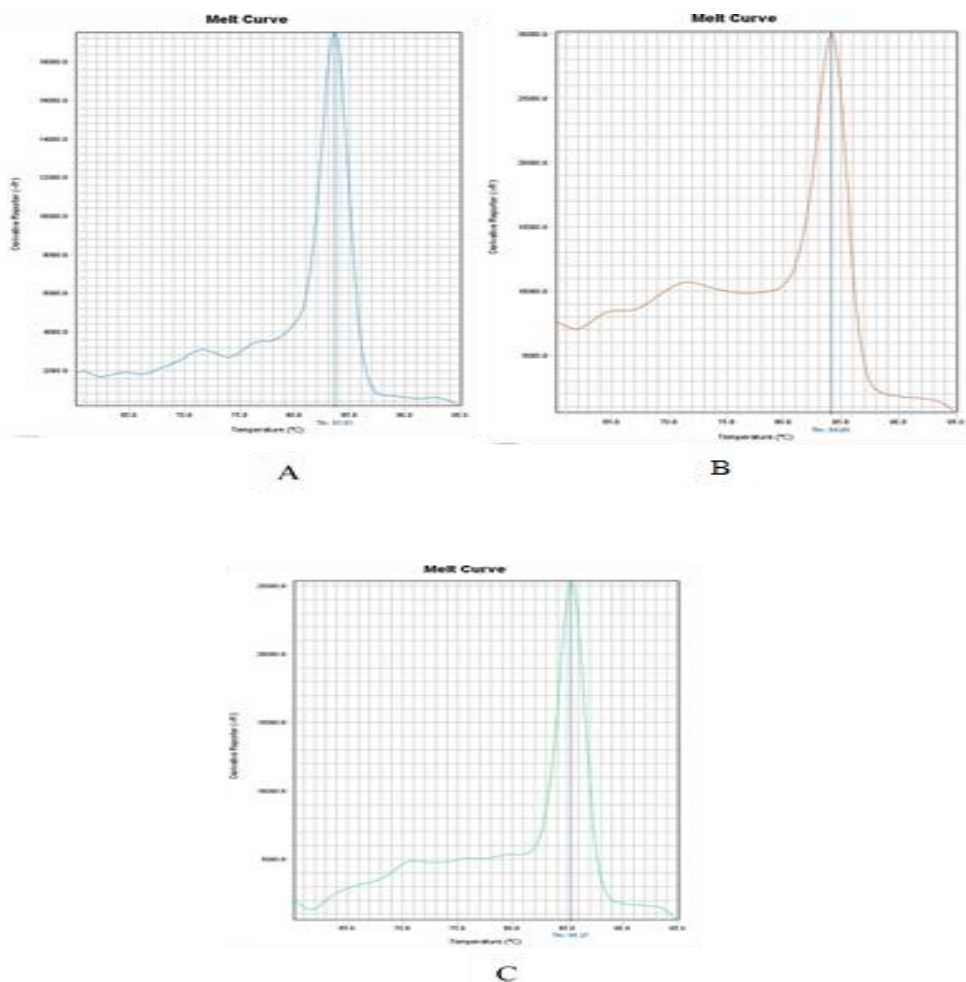
جدول ۵. میزان اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی نانوذرات نقره و بواسیزومب بر روی رده سلولی نرمال.

میزان بقای سلولی (درصد)	غلظت نانوذرات نقره-بواسیزومب (میکروگرم در
-------------------------	---

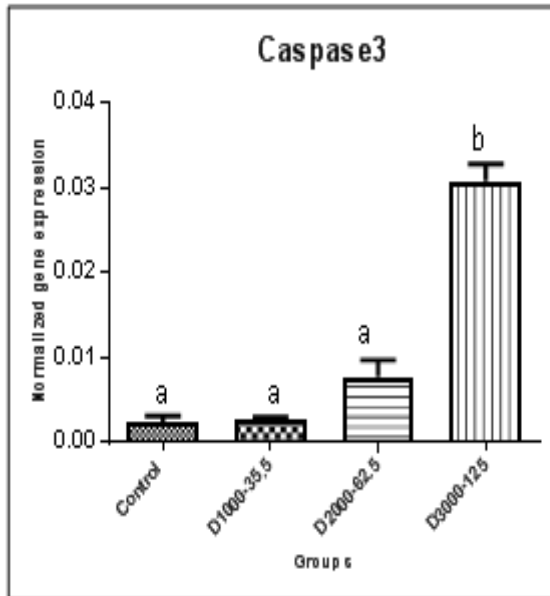
میلی لیتر)	
۳۱/۲۵+۱۰۰۰	۸۹/۲۶ ± ۱/۲۶
۶۲/۵+۲۰۰۰	۸۶/۱۱ ± ۱/۶۲
۱۲۵+۳۰۰۰	۸۱/۶۲ ± ۰/۸۲

آنالیز بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و *Bcl2*

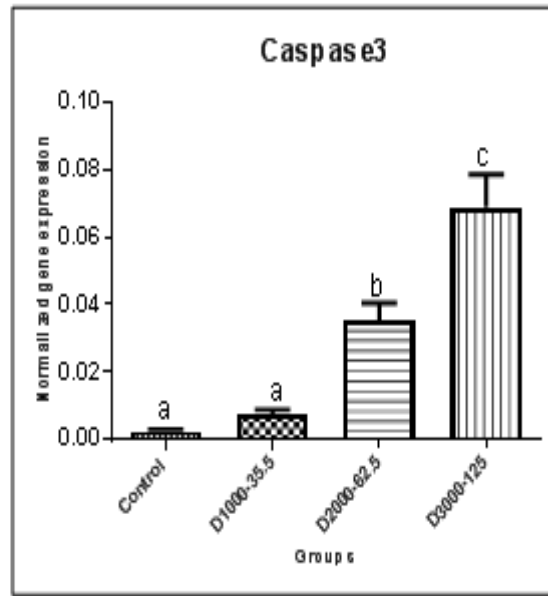
در این مطالعه، پروفایل بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و *Bcl-2* در سلول‌های A2780 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذرات نقره و بواسیزومب در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. به‌منظور بررسی صحت تکثیر ژن‌های، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. نتایج نشان داد که ژن‌های *GAPDH*، *caspase 3* و *Bcl2* به‌طور صحیح تکثیر یافته‌اند (شکل ۴). بیان ژن کاسپاز ۳ نسبت به ژن مرجع *GAPDH* در رده سلولی A2780 تیمار شده با نانوذره نقره و بواسیزومب در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۵). نسبت بیان ژن *Bcl-2* به ژن مرجع *GAPDH* در رده سلولی A2780 تیمار شده با ترکیب نانوذرات نقره و بواسیزومب در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۶).



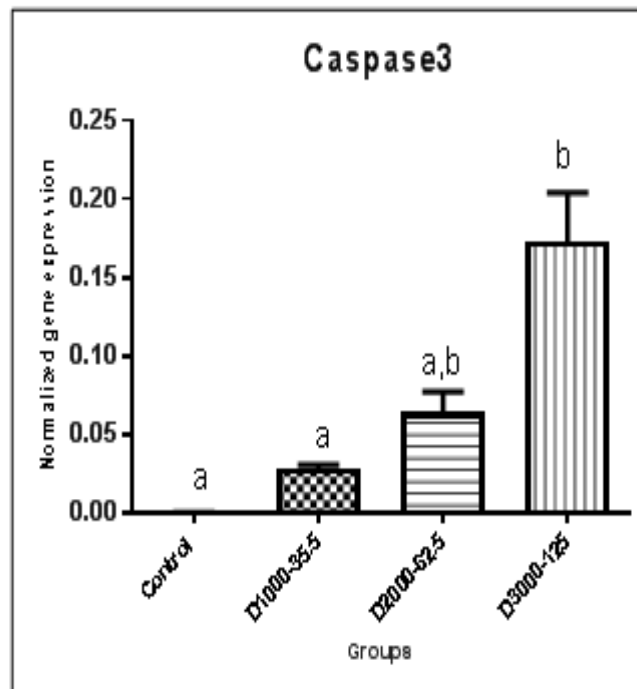
شکل ۴: آنالیز منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه. A: ژن *GAPDH*. B: *Bcl2*. C: *caspase 3*.



A

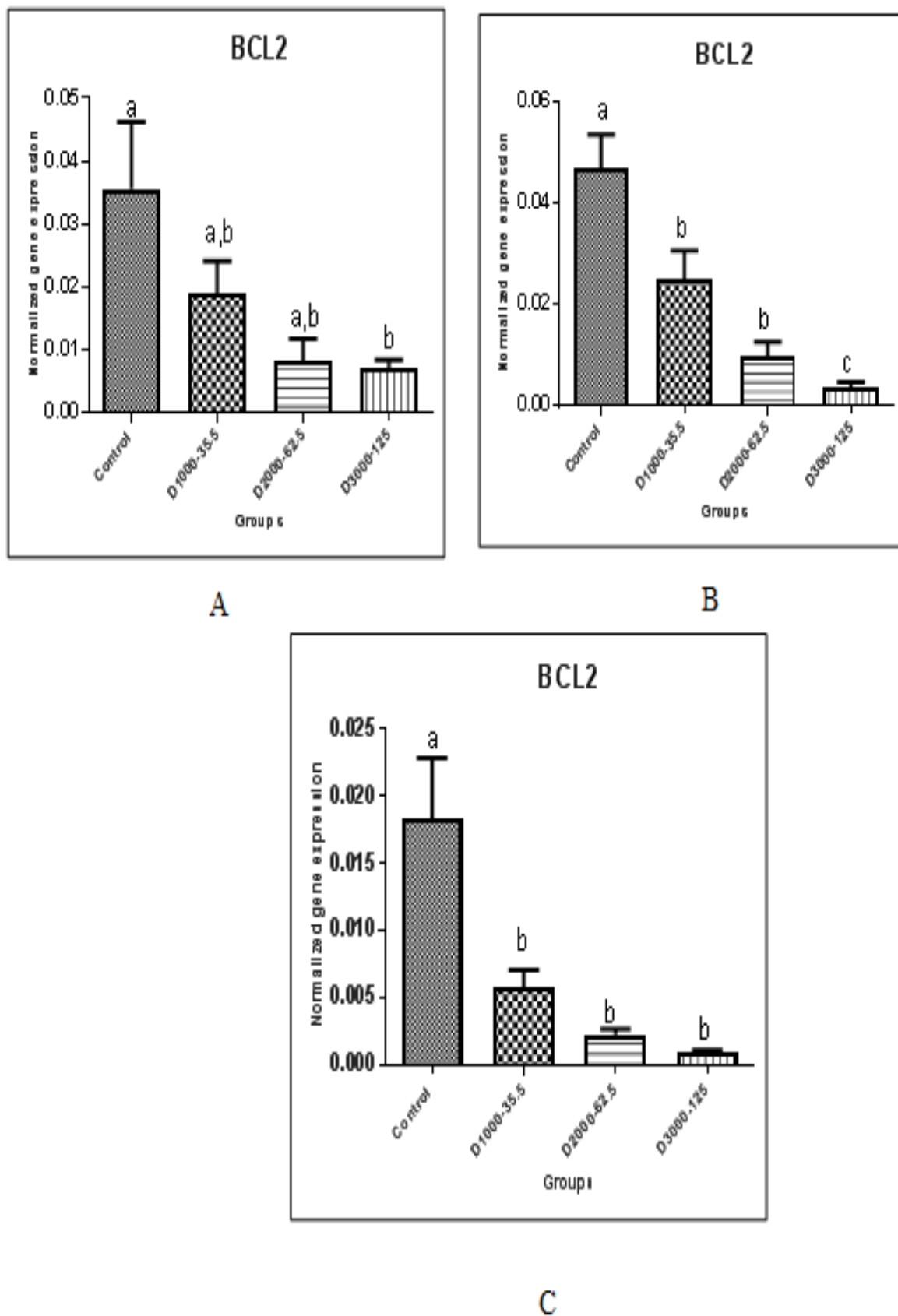


B



C

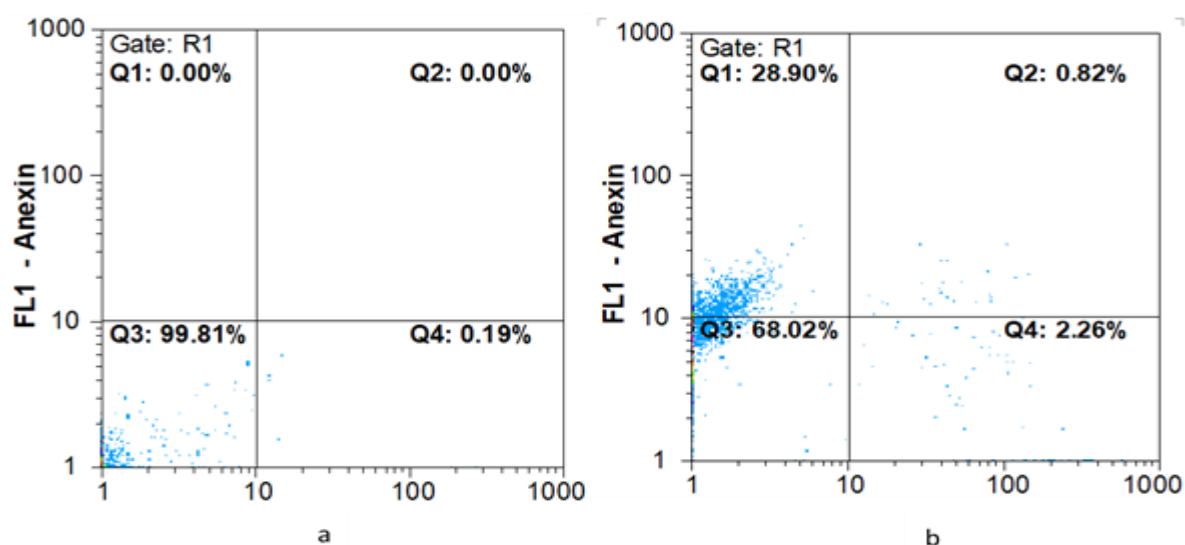
شکل ۵: تغییر بیان ژن کاسپاز ۳ در مقایسه با کنترل در مدت زمان ۲۴ (A)، ۴۸ (B) و ۷۲ (C) ساعت در سلول‌های A2780 تیمار شده با نانوذرات نقره و بواسیزومب. همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت ۱۲۵ میکروگرم نانوذرات نقره و ۳۰۰۰ میکروگرم بواسیزومب افزایش بیان معنی‌دار ژن کاسپاز ۳ نسبت به غلظت‌های دیگر مشاهده می‌شود.



شکل ۶: بررسی بیان ژن *Bcl-2* نسبت به گروه کنترل در مدت زمان ۲۴ (A)، ۴۸ (B) و ۷۲ (C) ساعت. میزان کاهش بیان ژن *Bcl2* نسبت به گروه کنترل در غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره و ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بواسیزومب معنی‌دار بوده است.

بررسی میزان آپوپتوزیس

به‌منظور تعیین میزان آپوپتوزیس القا شده در سلول‌های A2780 تیمار شده با نانوذرات نقره-بواسیزومب، این سلول‌ها با FITC Annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوزیس، فسفاتیدیل سرین به‌خارج از غشا سلولی منتقل به‌هسته سلول در PI رنگ می‌شود و رنگ Annexin V شده و توسط زمان نکروز متصل می‌شود. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۷ نشان‌دهنده شده است. مربع سمت چپ پایین (Q3) میزان سلول‌های زنده، مربع سمت چپ بالا (Q1) میزان آپوپتوزیس تاخیری، مربع سمت راست بالا (Q2) میزان آپوپتوزیس اولیه و مربع سمت راست پایین (Q4) میزان نکروز سلولی می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان آپوپتوزیس اولیه ۲۸/۹۰ درصد و آپوپتوزیس تاخیری ۰/۸۲ درصد می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷: میزان القای آپوپتوزیس در سلول‌های A2780 تیمار شده با نانوذرات نقره-بواسیزومب. a: سلول کنترل (تیمار نشده)، b: سلول تیمار شده با نانوذرات نقره-بواسیزومب. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان آپوپتوزیس سلولی اولیه (۲۸/۹۰ درصد) و آپوپتوزیس تاخیری (۰/۸۲ درصد) می‌باشد.

بحث

اخیراً نانوپزشکی پیشرفت چشمگیری در درمان سرطان داشته، به‌طوری‌که مشکلات اصلی درمان‌های رایج را به‌حداقل رسانده است (۲۱). خواص ضدسرطانی نانوذرات از چندین سال پیش به‌اثبات رسیده است و استفاده از ترکیب انواع نانوذرات با داروهای ضدسرطانی مختلف توانسته از طریق هم‌افزایی، اثرات درمانی را افزایش دهد و به‌عنوان یک استراتژی درمانی پیشرفته مطرح شود (۲۲). در این مطالعه از نانوذرات نقره و دارو بواسیزومب جهت بررسی اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی علیه رده سلولی سرطان تخمدان استفاده شد. نانوذرات نقره با تاثیر بر القای آپوپتوزیس بدون آن‌که سلول‌ها و بافت‌های طبیعی اطراف دچار صدمه شوند، سلول‌های سرطانی را از بین برده و هم‌چنین در ترکیب با داروهای ضدسرطانی به دارو اجازه می‌دهد تا بدون این‌که از بدن حذف شود، در تومور تجمع یافته، درون سلول برهم‌کنش‌هایی انجام دهد و سبب تحریک اثرات سمیت سلولی شود و به‌همین دلیل از عوامل بالقوه ضدتوموری محسوب می‌شود (۲۳).

در این مطالعه با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT نشان داده شد که نانوذرات نقره به‌همراه بواسیزومب با غلظت‌های بالا از دارو (۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غلظت‌های پایین از نانوذره نقره (۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای اثرات کشندگی وابسته به غلظت در سلول‌های سرطانی A2780 می‌باشند. همان‌طور که نتایج نشان داد که نانوذرات نقره دارای سمیت سلولی

وابسته به زمان و دوز بودند، به طوری که با افزایش زمان و غلظت میزان سمیت سلولی نانوذرات نقره افزایش یافته است که در بسیاری از مطالعات به این موضوع اشاره شده است. آیروملو و همکاران (۲۴) اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره را علیه رده سلولی سرطان ریه مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره میزان سمیت سلولی افزایش می‌یابد. Dehghanizade و همکاران (۲۵) اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره را علیه رده سلولی سرطان کولون مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه وابستگی سمیت سلولی نانوذرات نقره را به دوز نشان داد به طوری که با افزایش غلظت میزان سمیت سلولی افزایش می‌یابد. Fard و همکاران (۲۶) اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده را علیه رده سلولی سرطان ریه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره میزان سمیت سلولی افزایش می‌یابد و نانوذرات نقره می‌توانند بیان ژن‌های آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ را افزایش دهند. مکانیسم‌های سمیت سلولی نانوذرات به‌ویژگی-های مختلفی مانند غلظت، دما، نوع محیط کشت مورد استفاده و اندازه نانوذره وابسته است. نانوذرات نقره با پروتئین‌های غشای سلولی برهم‌کنش انجام داده و باعث تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن شده و منجر به تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۷).

مطالعات بسیاری جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیسیته نانوذرات نقره در ترکیب با داروهای مختلف ضدسرطانی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی گوناگون به‌انجام رسیده و منجر به ایجاد آپوپتوزیس شده است که موازی با نتایج ما در این تحقیق می‌باشد. Jeyaraj و همکاران (۲۸) اثرات نانوذرات نقره را بر روند آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی دهانه رحم بررسی نمودند و نتایج این گروه نشان داد که این نانوذرات منجر به القای مرگ سلولی در سلول‌های مذکور به‌صورت وابسته به کاسپاز می‌شوند. این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر هم‌سو می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه جهت بررسی مسیر مولکولی وابسته به مرگ سلولی تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl-2* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن پروآپوپتوزی *Bax* در سلول‌های تیمار شده افزایش یافت، در حالی که بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* کاهش یافت. در سال ۲۰۱۷ Cale و همکاران تاثیر نانوذرات نقره را بر القای آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان تخمدان A2780 مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی نشان داد که نانوذرات نقره می‌توانند به‌صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها شوند (۲۹).

در سال ۲۰۱۶ Choi و همکاران (۳۰) تاثیرات سیتوتوکسیسیته نانوذرات نقره و مکانیسم اثرشان در آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطان تخمدان انسانی (A2780) بررسی کردند. آن‌ها دریافتند میزان بقای سلول‌های A2780 تیمار شده با نانوذرات نقره کاهش پیدا کرد. هم‌چنین، میان‌کنش نانوذرات نقره با غشا سلولی موجب ایجاد تغییرات در مسیرهای متابولیسمی، آپوپتوزی و استرس اکسیداتیو می‌شود. آن‌ها بیان ژن‌های پروآپوپتوزی کاسپاز ۳، *p53*، *Bax* و آنتی آپوپتوزی *Bcl-xl* و *Bcl-2* را بررسی کردند. طبق مشاهدات حاصل، بعد از تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره بیان ژن‌های پروآپوپتوزی *Bax* و *p53* افزایش یافته، در حالی که بیان ژن کاسپاز ۳ تغییری نکرده و به‌علاوه ژن‌های آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* و *Bcl-xl* کاهش بیان داشته‌اند.

Zhang و همکاران (۳۱)، اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره و سالینومایسین را به‌تنهایی و سپس استفاده هم‌زمان هر دو بر روی رده سلولی سرطان تخمدان (A2780) را با روش MTT مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل را این‌گونه بیان کردند که نانوذرات نقره و سالینومایسین هر یک به‌تنهایی ۲۵ درصد سلول‌های سرطانی را دچار مرگ می‌کنند، در صورتی که ترکیب این دو ماده به‌ترتیب در غلظت‌های ۴ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت ۲۴ ساعت به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش بقا سلول‌های سرطانی می‌شود. هم‌چنین Abd-Rabou و همکاران (۳۲)، اثرات سیتوتوکسیک ترکیب بواسیزومب و

مهارکننده CCR2 را بر سلول‌های سرطانی کبد (HepG2 و Huh-7) تیمار شده با دوکسوروبین (DOX) توسط روش MTT بررسی کردند. طبق یافته‌های حاصل از این پژوهش سلول‌های Huh-7, HepG2/DOX که با بواسیزومب به‌تنهایی تیمار شدند، حدود ۴۰ درصد باعث مرگ سلول‌های سرطانی شدند در صورتی که سیتوتوکسیسیتی در سلول‌های Huh-7 HepG2/DOX تیمار شده با بواسیزومب و نانوذره تا حدود ۶۰ درصد افزایش یافت.

از آنجایی که آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از مهم‌ترین عوامل در حوزه مطالعات سرطان به‌شمار می‌رود، مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی فرایندهای پروآپوپتوزی اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم C از آن آغاز می‌شود (۳۳). هم‌چنین نانوذرات نقره در بیان ژن‌های خانواده *Bcl-2* و کاسپازها نقش به‌سزایی دارند (۳۴). در مطالعه حاضر به‌دنبال تیمار سلول‌های A2780 با نانوذرات نقره و بواسیزومب میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bcl-2* و کاسپاز ۳ توسط روش Real Time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد بعد از تیمار سلول‌ها به‌طور چشم‌گیری بیان ژن آپوپتوزی کاسپاز ۳ افزایش داشته، در صورتی که بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* در این سلول‌ها کاهش یافت. مطالعه صورت گرفته توسط Yuan و همکاران (۳۵)، تاثیر ترکیب نانوذرات نقره با دارو جمسیتابین بر روی رده سلولی سرطان تخمدان اپی‌تلیالی (A2780) بر بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bcl-2*, *Bax*, *Bak*، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که سلول‌های A2780 تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذره نقره و جمسیتابین پس از طی ۲۴ ساعت ۵۰ درصد از سلول‌ها دچار مرگ شده است. هم‌چنین در این مطالعه، بیان ژن *Bcl-2* کاهش یافته در صورتی که بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax*، *Bak*، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ افزایش داشته است. این یافته‌ها موادی با نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌باشد که پس از سنجش بقا سلول‌های A2780 تیمار شده در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، باتوجه به گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، شاهد بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* و افزایش بیان ژن آپوپتوزی کاسپاز ۳ در مقایسه با کنترل مشاهده شد. به‌طور کلی، اهمیت بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی و هم‌چنین ژن‌های دخیل در رگ‌زایی در حوزه درمان سرطان‌هایی که در مرحله پیشرفته شناسایی می‌شوند، امری ضروری است و بنابراین نیاز به بررسی‌های گسترده‌تر در زمینه پروفایل بیانی این ژن‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان دهنده اثرات هم‌افزایی سمیت سلولی نانوذرات نقره با دارو بواسیزومب در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌باشد. هم‌چنین، استفاده از نانوذرات نقره و دارو بواسیزومب به‌صورت هم‌افزایی در افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی می‌تواند موثر باشد. بنابراین، مطالعات بالینی بر روی مدل‌های حیوانی جهت تایید این موضوع امری ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی به‌انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مسئول آزمایشگاه ژنتیک کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

- Noorbazargan H, Amintehrani S, Dolatabadi A, Mashayekhi A. Anti-cancer & anti-metastasis properties of bioorganic-capped silver nanoparticles fabricated from *Juniperus chinensis* extract against lung cancer cells. *AMB Express*. 2021; 11(1): 1-14.

2. Haghghi SM, Tafvizi F, Mirzaie A. Encapsulation of *Artemisia scoparia* extract in chitosan-myristate nanogel with enhanced cytotoxicity and apoptosis against hepatocellular carcinoma cell line (Huh-7). *Industrial Crops and Products*. 2020; 155: 112790.
3. Salehzadeh A, Sadat Shandiz A, Naeemi A S. Cytotoxicity effectiveness of biosynthesized silver nanoparticles on breast cancer T47D Cell Line, using macro algae *Laurencia caspica* extract. *SIJMU*. 2018; 26 (1) :52-61.
4. Heidari F, Akbarzadeh I, Nourouzian D, Mirzaie A, Bakhshandeh H. Optimization and characterization of tannic acid loaded niosomes for enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Adv Powder Technol*. 2020; 31(12): 4768-4781.
5. Mehrabi M, Faezi Ghasemi M, Rasti B, Falahati M, Mirzaie A. Mesoporous iron oxide nanoparticle synthesis: Study of its biological effects on lymphocytes and chronic myelogenous leukemia cells K562. *Appl Bio*. 2021; 34(67): 148-162.
6. Behdad R, Pargol M, Mirzaie A, Zare Karizi S, Noorbazargan H, Akbarzadeh I. Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Basic Microb*. 2020.60: 494-507.
7. Gliga AR, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*. 2014; 17:11:11.
8. Xi-Feng Z, Sangiliyandi G. Combination of salinomycin and silver nanoparticles enhances apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells: an effective anticancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 3655–3675.
9. Sadat Shandiz SS, Montazeri A, Abdolhosseini M, Hadad Shahrestani S, Salehzadeh A. 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 Cluster Sci*. 2018; 29: 1107–1114.
10. Ebrahimzadeh Z, Salehzadeh A, Naeemi AS, Jalali A. Silver nanoparticles biosynthesized by *Anabaena flos-aquae* enhance the apoptosis in breast cancer cell line. *Bulletin of Materials Science*. 2020; 43: 7-15.
11. Sarah AE, Nadine H, Magnus B. Development of nanoscale approaches for ovarian cancer therapeutics and diagnostics. *Crit Rev Oncog*. 2016; 2: 12-21.
12. Jarestan M, Khalatbari K, Pouraei A, Sadat Shandiz SA, Beigi S, Hedayati M, Majlesi A, Akbari, F, Salehzadeh, A. Preparation, characterization, and anticancer efficacy of novel cobalt oxide nanoparticles conjugated with thiosemicarbazide. *3 Biotech*. 2020;10(5):230.

13. Bejarbaneh M, Moradi-Shoeili Z, Jalali A, Salehzadeh A. Synthesis of cobalt hydroxide nano-flakes functionalized with glutamic acid and conjugated with thiosemicarbazide for anticancer activities against human breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*. 2020. 198: 98–108.
14. Carolyn EH, Krishnansu ST. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer. *Future Oncol*. 2020; 16(7): 225–246.
15. Gillian M Keating. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*. 2014; 74(16):1891-1925.
16. Spitzer MS, Wallenfels- Thilo B, Sierra A. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90(10): 1316–1321.
17. Fathi N, Tafvizi F, Mirzaie A. Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on cyclin D1 and cyckin E genes. *J Med Plants*. 2020; 19 (74): 163-176.
18. V Chalam K, Agarwal S, Brar VS, Murthy RK, Sharma RK. Evaluation of cytotoxic effects of bevacizumab on human corneal cells. *Cornea*. 2009; 28(3):328-33.
19. Ghadimi F, Mirzaie A, Arasteh J. Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using *Erica carnea* extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of its apoptotic effects. *Razi J Med Sci*. 2019; 26 (6): 84-94.
20. Ghooshchian M, Khodarahmi P, Tafvizi F. Apoptosis-mediated neurotoxicity and altered gene expression induced by silver nanoparticles. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(10):757-764.
21. MH Hedayati, Targhi AA, Shamsi F, Heidari F, Moghadam ZS, Mirzaie A. Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomed Mat Res Part A*. 2020; 109 (6), 966-980.
22. Behdad R, Pargol M, Mirzaie A, Zare Karizi S, Noorbazargan H, Akbarzadeh I. Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. 2020. 60: 494-507.
23. Rashidian S, Keshtali AB, Mirzaie A. Antibacterial and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using *Artemisia khorassanica* extract: *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression analysis. *J Shahid Sadoughi University Med Sci*. 2019; 26(12): 1038-1049.
24. Ayromlou A, Masoudi S, Mirzaie A. *Scorzonera calyculata* aerial part extract mediated synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of their antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *J Cluster Sci*. 2018: 30: 1037-1050.

25. Dehghanizade S, Arasteh J, Mirzaie A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Anthemis atropatana* extract: characterization and in vitro biological activities. *Art Cells, Nano Biotechnol.* 2018; 46 (1), 160-168.
26. Fard NN, Noorbazargan H, Mirzaie A, Hedayati Ch M, Moghimiyani Z. Biogenic synthesis of AgNPs using *Artemisia oliveriana* extract and their biological activities for an effective treatment of lung cancer. *Art Cells, Nano Biotechnol.* 2018; 46 (sup3), S1047-S1058.
27. Mazur P, Skiba-Kurek I, Mrowiec P, Karczewska E, Drożdż R. Synergistic ROS-associated antimicrobial activity of silver nanoparticles and gentamicin against *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Nanomedicine.* 2020; 15:3551-3562.
28. Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanandhan G. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 106:86-9.
29. Cale D, Fahrenholtz I, TenVooren Brian W, Bernish James J, Sears Allison, Hooker Cristina M, Furdui Elizabeth A. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo. *FASEB Bio Advances.* 2019; 1(10): 639–660.
30. Choi Y, Gurunathan S, Kim JH. Graphene oxide–silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of Salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): a novel approach for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018; 3: 710-719.
31. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(9):1534.
32. Abd-Rabou AA, Ahmed HH. Bevacizumab and CCR2 inhibitor nanoparticles induce cytotoxicity-mediated apoptosis in doxorubicin-treated hepatic and non-small lung cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019; 20(7):2225-2238.
33. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
34. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene.* 2020; 21: 8843–8851.
35. Yuan YG, Gurunathan S. Combination of graphene oxide-silver nanoparticle nanocomposites and cisplatin enhances apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:6537-6558.

Synergistic cytotoxicity of bevacizumab and silver nanoparticles on ovarian cancer cell line (A2780) and analysis of *Bcl-2* and *caspase 3* apoptotic genes expression

Mirzaie A^{1*} Ph.D., Diba H² Ph.D., Khosravi-Nejad F³ Ph.D., Javanmardi H⁴ M.Sc.

1. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
2. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
3. Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: Amir_mirzaie92@yahoo.com †Amir.Mirzaie@piaou.ac.ir

Received: 4 May. 20201

Accepted: 11 Jul. 2021

Abstract

Aim: The aim of the present study was to investigate the synergistic cytotoxicity effects of silver nanoparticles and bevacizumab against ovarian cancer cell line (A2780) and to analyze the expression of *caspase 3* and *Bcl-2* apoptotic genes.

Material and Methods: The cytotoxicity of silver nanoparticles and bevacizumab at different concentrations including 62.5 to 1000 µg/ml and 1000 to 3000 µg/ml, respectively was investigated against A2780 cell line by MTT colorimetric method. Moreover, the expression of *caspase 3* and *Bcl2* apoptotic genes were studied using Real-Time PCR.

Results: The results of this study showed that the silver nanoparticles and bevacizumab had dose-dependent toxicity and there were more significant cytotoxic effects than the single drug ($p < 0.05$). Also, the IC₅₀ values of silver nanoparticles and bevacizumab were 12.72±0.56 and 22.72±1.21 µg/ml, respectively. Also, the silver nanoparticles and bevacizumab changed the expression of *caspase 3* and *Bcl2* genes, respectively, which was significant compared to the housekeeping gene ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the silver nanoparticles-bevacizumab has a synergistic effect. However, more studies are needed to use this compound as a drug candidate.

Keywords: apoptosis, A2780 cell line, bevacizumab, cytotoxicity, silver nanoparticles