

## اثر سیتوتوکسیک نانوکامپوزیت تیتانیوم دی اکساید- هیدروکسی اوره روی رده سلول سرطانی Hela

ریحانه قهرمانی فرسجی (MSc)<sup>۱</sup>، مریم بی خوف تربتی (PhD)<sup>۲\*</sup>، فرزانه تفویضی (PhD)<sup>۳</sup>، مسعود شعبانزاده (PhD)<sup>۴</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

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

دریافت: ۹۷/۵/۱۸، اصلاح: ۹۷/۹/۳، پذیرش: ۹۸/۱/۲۰

### خلاصه

**سابقه و هدف:** استفاده از فناوری نانو در دارورسانی علاوه بر افزایش اثر پذیری دارو، باعث کاهش عوارض جانبی داروها نیز می‌شود. در این تحقیق از نانوذرات  $TiO_2$  به عنوان حامل داروی هیدروکسی اوره استفاده شد تا ضمن افزایش سطح تماس دارو با سلولها، با پیگله کردن سطح نانوذرات، ایمونوژیستی، حلالیت و نفوذ دارو به سلول افزایش یابد. هدف از این پژوهش بررسی سمیت سلولی نانو کامپوزیت  $TiO_2$ -PEG-HU سنتز شده بر رده سلولی Hela و القای آپوپتوز در سلولهای تیمار شده جهت تعیین دوز موثر نانودارو می باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی پس از کشت سلولهای Hela (تهیه شده از انستیتو پاستور)، اثر نانوداروی  $TiO_2$ -PEG-HU بر فعالیت حیاتی سلولها با استفاده از روش MTT در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. جهت آنالیز القای آپوپتوز از روش فلوسایتومتری Annexin-V/PI استفاده گردید.

**یافته‌ها:** افزایش غلظت نانو کامپوزیت به صورت وابسته به دوز و زمان تاثیر، توان زیستی سلولها را کاهش داد. به طوری که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکامپوزیت در مدت زمان تاثیر ۷۲ ساعت نسبت به زمان تاثیر ۴۸ ساعت میزان توان زیستی ۱/۵۲ برابر کاهش یافت. برای هر دو زمان این کاهش توان زیستی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده گردید ( $p < 0.001$ ). همچنین، نانو دارو سبب افزایش القاء ۲/۵ برابری آپوپتوز در سلولهای Hela تیمار شده گردیده است ( $p = 0.0114$ ).  
**نتیجه‌گیری:** نانو کامپوزیت  $TiO_2$ -PEG-HU بر روی رده سلولی Hela، سیتوتوکسیک و القا کننده آپوپتوز می‌باشد و می‌تواند به عنوان دارویی امیدبخش در درمان سرطان در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** هیدروکسی اوره، تیتانیوم، سلول های Hela، داروهای ضدسرطان، آپوپتوز.

### مقدمه

کنترل شده اشاره نمود (۶). نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ( $TiO_2$ ) بدلیل دارا بودن خواصی از قبیل پایداری نوری، عدم سمیت، خاصیت اکسیداتیو بالا، خواص بیولوژیکی و در دسترس بودن به طور گسترده‌ای در مطالعات ضد سرطانی به کار برده شده‌اند و میتوان از آن به عنوان نانوحامل دارویی استفاده نمود. نانوذرات  $TiO_2$  به دلیل تولید ROS تحت تابش UV، اثر ضد التهابی داشته و سبب افزایش حساسیت پرتوی سلولهای توموری می‌شوند. ROS با اختلال در فرآیند تنفس سلولی و ایجاد آسیب‌های غشایی سبب سمیت و مرگ سلولی گردد (۷، ۸). در طراحی نانوحامل‌های دارویی برای اثرگذاری و افزایش ورود دارو به سلول هدف، کاهش ایمونوژنسیته، پایداری و انحلال پذیری بیشتر دارو در جریان خون معمولاً از پلیمرهایی مانند PEG استفاده می‌کنند. بنابراین پیگلیاسیون نانوحامل‌هایی نظیر  $TiO_2$  که انحلال ضعیفی در pH فیزیولوژیک دارند، حلالیت آنها را در مایعات بدن افزایش می‌دهد (۹). در این مطالعه با هدف افزایش خاصیت سیتوتوکسیک

طبق بررسی‌های آماری سرطان دهانه رحم یا سرویکس چهارمین سرطان شایع زنان در جهان محسوب می‌گردد. شیوع سرطان دهانه رحم در ایران نسبت به برخی کشورهای جهان کمتر است. با این وجود در برخی استان‌ها رتبه هفتم را دارد (۱ و ۲). امروزه محققان در تهیه داروهای ضدسرطان به دنبال فناوری‌هایی هستند که کمترین عارضه جانبی را داشته باشند و با هدف گیری سلول‌های سرطانی اثرات درمانی خود را افزایش دهند (۳). هیدروکسی اوره یک داروی استاندارد ضد سرطان می باشد که در درمان برخی از سرطان‌ها از جمله سرطان سرویکس و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). مکانیسم اثر آن جلوگیری از ساخته شدن داکسی ریبونوکلئوتیدها و همانند سازی DNA از طریق مهار آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز است (۵). از مزیت‌های نانوحامل‌های دارویی در دارورسانی می‌توان به بازده بالا، رسانش هدفمند، کاهش دوز مصرفی، کاهش اثرات سمی جانبی، امکان عبور از موانع مختلف زیست محیطی درون بدن، سینتیک دارویی منظم و توزیع زیستی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد ریحانه قهرمانی فرسجی دانشجوی رشته زیست سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری می باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر مریم بی خوف تربتی

آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، گروه زیست‌شناسی. تلفن: ۰۲۱-۵۵۲۲۹۲۰۱

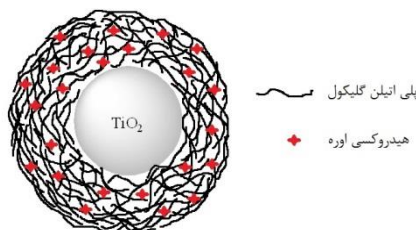
E-mail: maryam.bikhof@gmail.com

رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری در طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و فیلتر قرائت ۵۱۵ نانومتر برای فلوروسین ایزوتیوسیانات (FITC) و با فیلتر ۶۰۰ نانومتر برای رنگ (PI) ارزیابی و درصد هریک از مربعات چهارگانه نسبت به کل ثبت گردید (۱۲).

**تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌ها و میزان IC50 با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۶/۱ آنالیز شد. نتایج با استفاده از روش واریانس یک طرفه و آزمون T مستقل تجزیه و تحلیل گردید. تحلیل راندمان و نوع مرگ سلولی در روش فلوسایتومتری نیز توسط نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷/۶/۱ صورت گرفت و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

**تأیید ساختار و اندازه نانوداروی تیتانیوم دی اکساید-پلی اتیلن گلیکول-هیدروکسی اوره:** با مطالعه طیف FTIR نانوذرات سنتز شده، ساختار شیمیایی نانو دارو تأیید شد. فرکانس جذبی ارتعاشات کششی در  $2920$ ،  $1660$ ،  $1120$ ،  $664$  و  $540$  به ترتیب مربوط به گروه‌های  $\text{CH}_2$  پلی اتیلن گلیکول، OH و NH در پلی اتیلن گلیکول و داروی هیدروکسی اوره،  $\text{C}=\text{O}$  هیدروکسی اوره، C-O-C در پلی اتیلن گلیکول و پیوندهای Ti-O-Ti نانوذرات  $\text{TiO}_2$  در ساختار نانو دارو است. افزایش شدت جذب گروه  $\text{CH}_2$  تأیید کننده لود شدن پلی اتیلن گلیکول بر روی هسته  $\text{TiO}_2$  است. مورفولوژی سطح کروی و قطر نانوذرات به کمک تصویر SEM بین ۳۰ تا ۶۰ نانومتر تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. ساختار شیمیایی نانوذرات تیتانیوم دی اکساید-پلی اتیلن گلیکول حاوی هیدروکسی اوره

**کاهش توان زیستی سلولهای Hela تیمار شده با نانودارو:** توان زیستی سلول‌های تیمار شده در مدت زمان تأثیر ۴۸ ساعت با غلظت بالای نانو داروی هیدروکسی اوره،  $1600$  میکروگرم در میلی‌لیتر، معادل  $52 \pm 44.78$  درصد بدست آمد که نسبت به گروه کنترل کاهش زیستایی معنی داری یافته است ( $p < 0.001$ ). غلظت‌های کمتر نانودارو در مدت زمان تأثیر مشابه علی‌رغم آنکه سبب کاهش زنده ماندن سلولی گردید ولی این کاهش نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی دار نبود (نمودار ۱-الف). درحالی‌که با افزایش زمان تأثیر نانودارو به  $120$  ساعت، توان زیستی سلول‌های تیمار شده در غلظت‌های  $400$ ،  $800$  و  $1600$  میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب  $41 \pm 15.87$  ( $p < 0.05$ )،  $55 \pm 3.82$  ( $p < 0.01$ ) و  $83 \pm 5.73$  ( $p < 0.001$ ) درصد در مقایسه با گروه کنترل بدست آمد که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را نشان می‌دهند (نمودار ۱-ب). بنابراین افزایش غلظت نانودارو و سبب افزایش مرگ و میر سلولی شده است. غلظت IC50 نانو داروی تیتانیوم دی اکساید-هیدروکسی اوره در مدت ۴۸ ساعت تیمار سلولهای Hela،  $3876$

هیدروکسی اوره، دارورسانی موثرتر و کاهش عوارض جانبی آن در شیمی درمانی سرطان، نانوداروی هیدروکسی اوره بر پایه نانو حامل زیست تخریب پذیر تیتانیوم دی اکسید پگیله استفاده گردید. لذا به منظور بررسی ویژگی‌های ضدسرطانی این نانوداروی سنتز شده، میزان سمیت نانوداروی تیتانیوم دی اکساید-هیدروکسی اوره و القا مرگ سلولی آپوپتوز در شرایط *in vitro* بر روی رده سلولی Hela مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

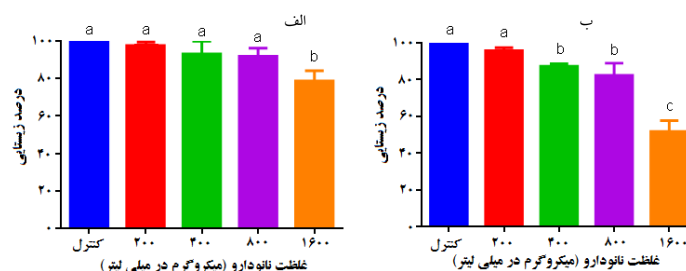
در این مطالعه آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم انسان Hela (C155) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر مرطوب با ۵٪ دی اکسید کربن به صورت تک لایه کشت داده شدند (۱۰). مواد کشت سلول و سایر مواد از شرکت (Gibco BRL, Scotland) یا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شدند. نانوداروی  $\text{TiO}_2$ -PEG-HU پس از تأیید ساختار به روش اسپکتروسکوپی FTIR و تعیین مورفولوژی و ابعاد توسط تصویربرداری SEM در این مطالعه استفاده شد. نانوداروی هیدروکسی اوره در حلال DMSO با غلظت‌های  $200$ ،  $400$ ،  $800$  و  $1600$  میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و پس از ۲ ساعت اولتراسونیک، با فیلتر  $0.22$  میکرون فیلتر گردید.

**سنجش سمیت سلولی به روش MTT assay:** در آزمون MTT، رنگ زرد تترازولیوم بروماید به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده احیا شده و کریستال‌های فرمازان تشکیل میشود. در این تست تعداد ۱۰۰۰۰ سلول Hela به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول‌های دارویی با غلظت‌های  $200$ ،  $400$ ،  $800$  و  $1600$  میکروگرم در میلی‌لیتر به هر حفره اضافه شد. به عنوان کنترل فقط سلول بدون دارو اضافه گردید. پس از ۴۸ و ۱۲۰ ساعت انکوباسیون، رنگ MTT با غلظت نهایی  $0.5$  میلی گرم در میلی لیتر به هر حفره اضافه و پس از ۴ ساعت، کریستال‌های فرمازان در حلال DMSO حل شده و در نهایت میزان جذب توسط دستگاه پلیت الایزا ریدر (Tecan - آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شده و درصد زیستایی (Viability) و نیز IC50 (Inhibitory concentration 50) گزارش گردید. توان زیستی سلول‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۱۱).

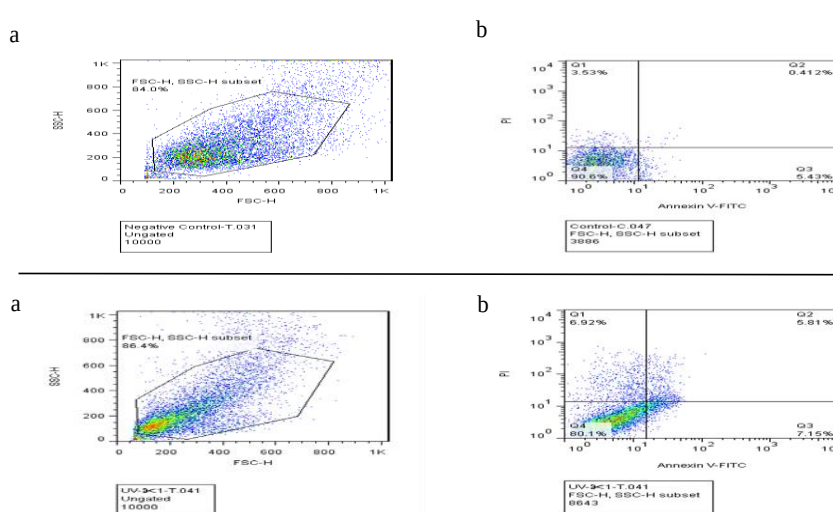
$100 \times (\text{میانگین جذب نوری کنترل} / \text{میانگین جذب نوری تست}) = \text{میزان توان زیستی}$

**ارزیابی آپوپتوز توسط فلوسایتومتری:** در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از غشاء داخلی به سطح خارجی غشاء سلول منتقل می‌گردد و طی رنگ‌آمیزی به کونژوگه‌های Annexin V-FITC متصل می‌شود. در جمعیت سلولی نکروزه یا آپوپتوز تأخیری غشاء سلول تخریب شده و سلول به رنگ PI نفوذپذیر می‌شود. رنگ PI به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur BD - آمریکا) تشخیص داده شد. به منظور بررسی مرگ سلولی و تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده، سلولهای Hela با غلظت IC50 نانوداروی هیدروکسی اوره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس رسوب سلولی طبق دستورالعمل کیت انکسین / پروپیدیوم یدید (Affymetrix)،

میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز و نکروز شده Hela در هر دو گروه کنترل و تیمار شده با غلظت IC50 میانگین (۲۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانو دارو هیدروکسی‌اوره پس از دو بار تکرار در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه نتایج با گروه کنترل نشان می‌دهد که درصد سلول‌های آپوپتوز شده در سلول‌های تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی‌اوره نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. بطوریکه درصد فراوانی کل آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده (آپوپتوز اولیه و ثانویه) حدود ۲/۵۳ برابر افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۰/۰۱۱۴ معنی‌دار می‌باشد (نمودار ۳).



نمودار ۱. نمودار ستونی اثردهی غلظت‌های مختلف نانو داروی TiO<sub>2</sub>-PEG-HU در مدت ۴۸ ساعت تاثیر (الف) و در مدت ۱۲۰ ساعت تاثیر (ب) داده‌ها به صورت میانگین درصد زیستایی  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف انگلیسی متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف سطح معنی دار، بین دو گروه مورد ارزیابی است. همچنین وجود حروف مشابه در بالای هر ستون، نشان دهنده عدم وجود اختلاف سطح معنی دار می‌باشد.

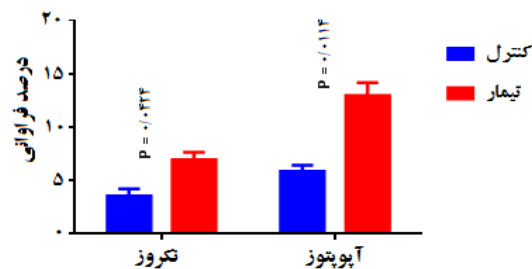


شکل ۲ - نتایج هیستوگرام Annexin/PI در تست فلوسایتومتری آپوپتوز گروه‌های کنترل و تیمار با نانو دارو هیستوگرام ناحیه مورد بررسی (Gating) می‌باشد. ناحیه Q<sub>1</sub> هیستوگرام b معرف میزان نکروز (Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)، ناحیه Q<sub>2</sub> معرف آپوپتوز تأخیری (Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)، ناحیه Q<sub>3</sub> معرف آپوپتوز اولیه (Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) و ناحیه Q<sub>4</sub> معرف سلول‌های زنده (Annexin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) می‌باشد. (در شکل فقط یک تکرار نمایش داده شده است)

جدول ۱. میانگین آپوپتوز و نکروز در گروه کنترل (بدون تیمار دارویی) و تیمار شده با غلظت میانگین IC50 نانو داروی TiO<sub>2</sub>-PEG-HU در مدت زمان تاثیر ۲۴ ساعت

| گروه                | تیمار      | کنترل      | P-value |
|---------------------|------------|------------|---------|
| مرگ سلولی           | Mean±SD    | Mean±SD    |         |
| آپوپتوز اولیه (Q3)  | ۷/۸۶±۱/۰۰  | ۵/۰۳±۰/۵۷  | ۰/۰۷۳۹  |
| آپوپتوز تأخیری (Q2) | ۵/۹±۰/۱۲   | ۰/۴۰±۰/۰۱  | ۰/۰۰۰۳  |
| آپوپتوز (Q2+Q3)     | ۱۳/۷۶±۱/۱۳ | ۵/۴۳±۰/۵۷  | ۰/۰۱۱۴  |
| نکروز (Q1)          | ۷/۸۲±۱/۲۷  | ۳/۰۷±۰/۶۵  | ۰/۰۴۲۴  |
| زنده (Q4)           | ۲/۸۲±۷۸/۱  | ۹۱/۴۹±۱/۲۶ | ۰/۰۲۵۷  |

مقادیر به دست آمده بر اساس انحراف معیار  $\pm$  میانگین و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < ۰/۰۵$  معنی دار است. نوع آزمون آماری مورد استفاده آزمون t مستقل می‌باشد.



نمودار ۳. مقایسه میانگین آپوپتوز و تکروز در دو گروه کنترل و تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی اوره

## بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد نانوداروی  $\text{TiO}_2\text{-PEG-HU}$  بصورت وابسته به دوز و زمان بر روی رده سلولی *Hela* سایتوتوکسیک می باشد و با افزایش زمان تاثیر نانودارو از ۴۸ به ۱۲۰ ساعت میزان سمیت سلولی نانودارو ۲/۲۵ برابر افزایش معنی داری یافته است بطوریکه در مدت زمان اثردهی بیشتر، غلظت های کمتر نانودارو نیز نسبت به گروه کنترل سبب کاهش معنی دار فعالیت متابولیک سلول های *Hela* گردید. این نتایج با یافته های Lotfian و همکارانش مطابقت دارد که در آن نشان دادند نانوذرات  $\text{TiO}_2$  اثر مهاري ضعيفی بر روی رده سلولی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسيون دارد. اما پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسيون، بطور قابل توجهی سبب مهار رشد رده سلولی MCF-7 خصوصاً در دوزهای بالاتر گردید (۱۳). نتایج حاصل می تواند بیانگر تأثیر نانوذرات روی غشای پلاسمایی سلولها باشد. همچنین دیده می شود که در مدت زمان تاثیر ۲۴ ساعت حدود ۷/۸ درصد از سلولها دچار آپوپتوز اولیه شده اند ولی هنوز زنده اند اما با افزایش زمان انکوباسيون نانودارو، این دسته از سلولها نیز وارد مرحله آپوپتوز ثانویه و مرگ خواهند شد و میزان سلولهای مرده در زمانهای ۴۸ و ۱۲۰ ساعت بیشتر مشاهده می شود که نشان دهنده تغییرات غشایی زیاد سلول و احتمالاً تأثیر نانوذرات روی DNA و شکست آن می باشد.

مطالعات دیگر نیز نشان داده نانوذرات  $\text{TiO}_2$  دوپ شده با نیتروژن ( $\text{N-TiO}_2$ ) پس از فعال شدن با نور مرئی می تواند سبب مهار رشد سلولهای ملانوما A-۳۷۵ و سلولهای k562 لوسمی میلوئید مزمن انسانی به صورت وابسته به غلظت و زمان شده و سبب وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز گردد (۱۴ و ۱۵). مطالعات حاکی از آن است که  $\text{TiO}_2$  در رده سلولی اپیدرمال موشی JB6 نیز پس از گذشت ۷۲ ساعت با فعال کردن کاسپاز ۸، Bax، Bid، کاسپاز ۳ و کاهش Bcl-2 سبب القای مرگ سلولی آپوپتوز می گردد (۱۶).

نتایج این تحقیق نشان داد میزان  $\text{IC}_{50}$  نانو داروی هیدروکسی اوره به ترتیب در ۴۸ و ۱۲۰ ساعت تاثیر ۳۸۷۶ و ۱۷۲۴ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد که با توجه به میزان بارگذاری ۱۰ درصدی هیدروکسی اوره بر نانوحامل تیتانیوم دی اکساید پگیله، میزان هیدروکسی اوره موجود در ساختار نانو دارو در میانگین غلظت  $\text{IC}_{50}$  (۲۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) بر روی رده سلولی *Hela*، ۲۸۰ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید، در حالی که میزان  $\text{IC}_{50}$  گزارش شده داروی استاندارد هیدروکسی اوره بر روی رده سلولی *Hela*، ۴۲۸ میکروگرم در میلی لیتر می باشد (۱۷). به این ترتیب سمیت سلولی نانو داروی بررسی شده در این تحقیق بر روی رده سلولی *Hela*، ۱/۵۳ برابر نسبت به داروی استاندارد هیدروکسی اوره افزایش

یافته است که می تواند منجر به کاهش عوارض جانبی هیدروکسی اوره گردد. در مطالعه ای موافق با تحقیق حاضر، اثر سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره نانولیپوزومه شده بر روی رده ی سلولی سرطان سینه بیشتر از داروی استاندارد هیدروکسی اوره گزارش گردیده است (۱۸). این گزارشات و نیز نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که استفاده از نانوحامل های مناسب برای هیدروکسی اوره می تواند میزان جذب سلولی و خواص سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره را در سلولهای سرطانی افزایش دهد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که نانوداروی  $\text{TiO}_2\text{-PEG-HU}$  در مقایسه با گروه کنترل باعث القای ۲/۵ برابری مرگ سلولی آپوپتوز در رده سلولی *Hela* می گردد.

گزارشات قبلی توسط Gui (۱۹) و Vesela (۲۰) نیز به نقش هیدروکسی اوره در القاء آپوپتوز در رده سلولی *Hela* اشاره کردند. طی این بررسی ها، پاسخ القا شده تحت تأثیر هیدروکسی اوره، تراکم منظم کروماتین ها بر دیواره ی هسته سلولی به همراه تشکیل اجسام آپوپتوتیک غشایی کاملاً مشهود بود. محققان قطعات DNA شکسته شده را بر اساس clonogenic بررسی و مشاهده نمودند که قطعات DNA به صورت تکه های منظم الیگونوکلوئومی می باشد که حاکی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی است. همچنین Yeo و همکاران نیز در مطالعات خود دریافتند هیدروکسی اوره می تواند منجر به پیری سلولی از طریق القای ژن های p53، p21 و Waf1 گردد (۲۱) که در تأیید نتایج حاصل از این تحقیق می باشند. بر طبق یافته های بدست آمده از این پژوهش نانو داروی  $\text{TiO}_2\text{-PEG-HU}$  باعث مختل شدن روند حیات سلول های *Hela* می شود. همچنین این دارو بطور معنی داری باعث القای آپوپتوز در سلول های مورد بررسی می شود. این نتایج نشان دهنده اثرپذیری مناسب تر نانو داروی هیدروکسی اوره با دوز پایین تر نسبت به هیدروکسی اوره استاندارد بعنوان یک داروی ضد سرطان است ولی از آن جا که این مطالعه آزمایشگاهی است با محدودیت هایی مواجه است. لذا پیشنهاد می شود بررسی های درون تنی بر روی مدل های حیوانی به منظور بررسی و کاهش عوارض جانبی دارو نیز انجام گیرد. شاید بتوان آن را بعنوان جایگزین داروی استاندارد ضد سرطان هیدروکسی اوره معرفی نمود.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری جهت حمایت از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

## Cytotoxic Effect of Titanium Dioxide-Hydroxyurea Nanocomposit on Hela Cancer Cell Line

R. Ghahremani Farasfaji (MSc)<sup>1</sup>, M. Bikhof Torbati (PhD)<sup>1\*</sup>, F. Tafvizi (PhD)<sup>2</sup>, M. Shaabanzadeh (PhD)<sup>3</sup>

1.Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

2.Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R.Iran

3.Department of Chemistry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 116-21

Received: Aug 9<sup>th</sup> 2018, Revised: Nov 24<sup>th</sup> 2018, Accepted: Apr 9<sup>th</sup> 2019.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** The use of nanotechnology in drug delivery Not only increase the efficacy and ease of drug penetration, but also they decrease their adverse effects. In this study, TiO<sub>2</sub> nanoparticle was used as Hydroxyl Urea carrier to increase the contact surface of the drug and cells, and with pegylation of nanoparticle surface decrease immunogenicity, hence to increase drug solubility and penetration to cells. The goal of this study was to investigate cytotoxicity of synthesized TiO<sub>2</sub>-Poly Ethylene Glycol-Hydroxy Urea (TiO<sub>2</sub>-PEG-HU) nanocomposite on Hela cell-line and apoptosis induction of treated cells compared to the control group to determine the effective dose of nanodrug.

**METHODS:** In this laboratory study, the effect of TiO<sub>2</sub>-PEG-HU nano-drug was evaluated on cells bioactivity by MTT method at concentrations of 200, 400, 800, and 1800 µg/ml in 48 and 120 hours. Annexin-V/PI flowcytometry method was used to analyze apoptosis induction. Data were analyzed using uni-directional variance and independent T-test.

**FINDINGS:** Higher concentrations of TiO<sub>2</sub>-PEG-HU nanocomposite decreased cells bioactivity dependent on dosage and time. As the concentration of 1600 µg/ml of nanocomposite reduced amount of bioavailability by 1.52 times over a 120-hour period compared to the 48-hour time-effect. For both times, this reduced cell survival was `significantly different from that of the control group at the level of  $p < 0.0001$ . In addition, nano-drug significantly increased apoptosis induction 2.5 times in treated Hela cells ( $p=0.0114$ ).

**CONCLUSION:** Nano-composite TiO<sub>2</sub>-PEG-HU on the Hela cell line is cytotoxic and induces apoptosis and can be a promising drug for cancer treatment.

**KEY WORDS:** Hydroxy Urea, Titanium, Hela cells, Anti-cancer drugs, Apoptosis.

### Please cite this article as follows:

Ghahremani Farasfaji R, Bikhof Torbati M, Tafvizi F, Shaabanzadeh M. Cytotoxic Effect of Titanium Dioxide-Hydroxyurea Nanocomposit on Hela Cancer Cell Line. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:116-21.

\*Corresonding Author: M. Bikhof Torbati (PhD)

Address: Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini Shahr-e-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 55229201

E-mail: maryam.bikhof@gmail.com

## References

1. Rezaei F, Saghaipour A, Mirheydari M, Eshagh Hosseini SK. Trend of Cancer Incidence in Qom Province in a Period of 8 Years (2007-2014). *J Health*. 2018; 8(5):530-8.
2. Khodakarami N, Farzaneh F, Yavari P, Khayamzadeh M, Taheripana R, Esmaeil Akbari M. The New Guideline for Cervical Cancer Screening in Low Risk Iranian Women. *Iran J Obstet Gynecol Infertil*. 2014; 17(95): 8-17. [In Persian]
3. Sadalla JC, Andrade JM, Genta ML, Baracat EC. Cervical cancer: what's new?. *Rev Assoc Med Bras*. 2015;61(6):536-42.
4. Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012;12(1):19-29.
5. Šaban N, Stepanić V, Vučinić S, Horvatić A, Cindrić M, Perković I, et al. Antitumor mechanisms of amino acid hydroxyurea derivatives in the metastatic colon cancer model. *Int J Mol Sci*. 2013;14(12):23654-71.
6. Din Fu, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, Zeb A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12:7291–309.
7. Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007; 628(2):99-106.
8. Esmi F, Marashi SMA, Saffari A, Abyat A, Bijani A. The Effect of Light Curing Glass Ionomer Containing Various Amounts of Zinc Oxide Nanoparticles on the Streptococcus Mutans Activity. *J Babol Univ Med Sci*. 2014; 16(4):35-42.
9. Mishra P, Nayak B, Dey RK. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian J Pharma Sci*. 2016; 11(3):337-48.
10. Anjam najmedini A, Vahabpour R, Jalali F, Bashash D. Design of Lentiviral Vector of Apoptin and Investigating its Cytotoxic Effect on Reh Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *J Babol Univ Med Sci*. 2018; 20(5):48-53. [In Persian]
11. Bikhof Torbati M, Ebrahimian M, Yousefi M, Shaabanzadeh M. GO-PEG as a drug nanocarrier and its antiproliferative effect on human cervical cancer cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017; 45(3):568-73.
12. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011; 50:2597.
13. Lotfian H, Nemati F. cytotoxic effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on breast cancer cell line (MCF-7). *IIOAB J*. 2016; 7(Supple 4):219-24.
14. Sharifi M, Moosavi M, Naji T. effect of nitrogen-nano doped of titanium dioxide in human A-375 melanoma cancer cell line. *J Zanjan Univ Med Sci Health Serv*. 2017; 25(108):68-80. [In Persian]
15. Moosavi SMA, Khataee A, Moasses Ghafari S. Study of the photocatalytic effects of nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles on growth inhibition and apoptosis induction in K562 cell line. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci*. 2013;18(1):47-58. [In Persian]
16. Zhao J1, Bowman L, Zhang X, Vallyathan V, Young SH, Castranova V, Ding M. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *J Toxicol Environ Health A*. 2009; 72(19):1141-9.
17. Ruswanto, Miftah AM, Tjahjono DH, Siswandono. Synthesis and in vitro Cytotoxicity of 1-Benzoyl-3-methyl thiourea Derivatives. *Proc Chem*. 2015;17:157-61.
18. Alavi SE, Koohi Moftakhari Esfahani M, Chiani M, Heidarinasab A, Akbarzadeh A. Evaluating the effect of nanoliposomal hydroxyurea urea on the breast cancer cell line. *New Cell Mol Biotechnol J*. 2013; 3(11):63-7. [In Persian]
19. Gui CY, Jiang C, Xie HY, Qian RL. The apoptosis of HEL cells induced by hydroxyurea. *Cell Res*. 1997;7(1):91-97.
20. Vesela E, Chroma K, Turi Z, Mistrik M. Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules* 2017;7(1): pii: E19.
21. Yeo E, Hwang YC, Kang CM, Kim IH, Kim DI, Parka JS, et al. Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2000;35(5):553-71.