

Original Research

Investigation of the Cytotoxic Effects of Selenium Nanoparticles Synthesized by a Green Method Using *Onopordum Acanthium* Plant Extract on the Activity Levels of Caspases 3, 8, and 9 in Ovarian Cancer Cells (OVCAR-3)

Ali Mehdi Araghi¹ , Rahim Ahmadi² , Seyedeh Fatemeh Siadat^{1*} , Sayeh Jafari Marandi¹ 

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, N.T.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran. ² Department of Biology, Avicenna International College, Budapest, Hungary.

Abstract

Background and Objective: Selenium nanoparticles (SeNPs) have attracted significant interest in cancer therapy due to their remarkable biological and anticancer properties. This study aimed to evaluate the cytotoxic effects of green-synthesized selenium nanoparticles, prepared using *Onopordum acanthium* extract, on the activities of caspases 3, 8, and 9 in OVCAR-3 ovarian cancer cells.

Materials and Methods: In this experimental laboratory study, selenium nanoparticles (SeNPs) were synthesized via a green method using the hydroalcoholic extract of *Onopordum acanthium*. The synthesized nanoparticles were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). OVCAR-3 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and treated with various concentrations of SeNPs (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL). Cell viability was assessed using the MTT assay. Caspase activity was evaluated following treatment with the cytotoxic dose of SeNPs (117 µg/mL). Data were analyzed using an independent t-test.

Results: XRD analysis confirmed the crystalline structure of the nanoparticles. FTIR revealed the presence of functional groups associated with the SeNPs, and EDX confirmed the high purity of elemental selenium. A significant reduction in cell viability was observed at higher concentrations (250 and 500 µg/mL) of SeNPs. Furthermore, the activities of caspases 3 and 8 increased significantly, while caspase 9 exhibited a more limited response ($P < 0.001$).

Conclusion: These findings suggest that selenium nanoparticles can induce apoptosis in ovarian cancer cells via the extrinsic pathway, highlighting their potential as a novel and effective therapeutic agent for treating ovarian cancer.

Keywords: Selenium Nanoparticles, *Onopordum acanthium*, OVCAR-3, Apoptosis, Caspase 8, 9 and- 3

* Corresponding Author: Seyedeh Fatemeh Siadat E-mail: f.siadat@iau-tnb.ac.ir



Received 29 Jul. 2025
Final Revision 03 Oct. 2025
Accepted 18 Oct. 2025
Published Online 21 Dec. 2025

Cite this article as: Mehdi Araghi A, Rahim Ahmadi A, Siadat S F, Jafari Marandi S. Investigation of the Cytotoxic Effects of Selenium Nanoparticles Synthesized by a Green Method Using *Onopordum Acanthium* Plant Extract on the Activity Levels of Caspases 3, 8, and 9 in Ovarian Cancer Cells (OVCAR-3). *Daneshvar Medicine* 2025; 33(2): 1-12. [Article in Persian]

 10.22070/daneshmed.2025.20755.1622

بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه *Onopordum acanthium* بر سطح فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی تخمدان (OVCAR-3)

علی مهدی عراقی^۱، سیده فاطمه سیادت^{۲*}، رحیم احمدی^۱، سایه جعفری مرندي^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۲ گروه بیولوژی، کالج بین‌المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان.

چکیده

مقدمه و هدف: نانوذرات سلنیوم به دلیل خواص زیستی و ضدسرطانی چشمگیر، توجه فراوانی در حوزه درمان سرطان به خود جلب کرده‌اند. هدف این مطالعه، بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه *Onopordum acanthium* بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در رده سلولی سرطان تخمدان OVCAR-3 است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، نانوذرات سلنیوم به روش سبز و با استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاه خارپنبه سنتز شدند. جهت شناسایی و تعیین ویژگی‌های نانوذرات، از تکنیک‌های FTIR، XRD و EDX بهره گرفته شد. سلول‌های سرطانی OVCAR-3 در محیط کشت DMEM رشد داده شدند و پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم (۲۵/۳۱، ۵۲/۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT ارزیابی گردید. همچنین، فعالیت کاسپازها پس از تیمار سلول‌ها با دوز سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم (۱۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t مستقل تحلیل گردیدند.

نتایج: آنالیز XRD وجود ساختار کریستالی مناسب در نانوذرات را تأیید کرد. طیف FTIR نشان‌دهنده حضور گروه‌های عاملی مرتبط با نانوذرات بود و آزمون EDX نیز وجود عنصر سلنیوم با خلوص بالا را اثبات نمود. نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کاهش معناداری در زنده‌مانی سلول‌ها ایجاد کردند. همچنین، فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ به‌طور معناداری افزایش یافت، در حالی‌که اثر بر کاسپاز ۹ محدودتر بود ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانوذرات سلنیوم می‌توانند با فعال‌سازی مسیر خارجی آپوپتوز، موجب مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های سرطانی تخمدان شوند. بنابراین، این نانوذرات پتانسیل استفاده به‌عنوان یک گزینه درمانی نوین و مؤثر در درمان سرطان تخمدان را دارند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات سلنیوم، OVCAR-3، *Onopordum acanthium*، آپوپتوز، کاسپاز ۳ و ۸ و ۹



* نویسنده مسئول: سیده فاطمه سیادت | پست الکترونیکی: f.siadat@iau-tnb.ac.ir

استناد به این مقاله: مهدی‌عراقی، ع.، احمدی، ر.، سیادت، س. ف.، جعفری مرندي، س. بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه *Onopordum acanthium* بر سطح فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی تخمدان (OVCAR-3). دانشور پزشکی: نشریه پژوهشی پایه و بالینی ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۲): ۱-۱۲. [مقاله فارسی]

وصول	۱۴۰۴/۰۷/۰۵
اصلاح نهایی	۱۴۰۴/۰۷/۱۱
پذیرش	۱۴۰۴/۰۷/۲۶
انتشار	۱۴۰۴/۰۹/۳۰

10.22070/daneshmed.2025.20755.1622



مقدمه

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر سرطان است که به حذف سلول‌های غیرطبیعی کمک می‌کند. کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ به‌عنوان نقش‌آفرینان کلیدی در مسیرهای اجرای آپوپتوز شناخته می‌شوند؛ کاسپاز ۸ به مسیر خارجی مربوط است، کاسپاز ۹ مسیر داخلی را تنظیم می‌کند و کاسپاز ۳ به‌عنوان کاسپاز اجرایی، فرایند مرگ سلولی را نهایی می‌کند (۱، ۲). در سرطان تخمدان، مقاومت سلولی در برابر فعال‌سازی این کاسپازها باعث پیشرفت بیماری و دشواری درمان می‌شود (۳).

از سویی، مطالعات بیانگر آنند که نانوذرات می‌توانند با تاثیر بر فعالیت کاسپازها اثرات سیتوتوکسیک خود را بر سلول‌های سرطانی اعمال کنند (۴). در این بین، نانوذرات سلنیوم که به روش سبز و با استفاده از عصاره گیاه خارپنبه (*Onopordum acanthium*) سنتز شده‌اند، به دلیل خواص زیستی و ضدسرطانی خود توجه ویژه‌ای را جلب کرده‌اند. گیاه *Onopordum acanthium*، معروف به خارپنبه، منبع غنی از ترکیبات زیستی فعالی همچون فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی، آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، تانن‌ها و لیگنان‌ها است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی قابل توجهی دارند (۵). این ترکیبات با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تنظیم مسیرهای آپوپتوزی، نقش مهمی در القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی ایفا می‌کنند (۶). مطالعات متعددی اثرات ضدسرطانی عصاره‌های مختلف این گیاه را بر رده‌های سلولی گوناگون گزارش کرده‌اند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ترکیبات در تقویت اثر نانوذرات سنتز شده به همراه عصاره گیاه است (۷، ۸). بنابراین، استفاده از عصاره *Onopordum acanthium* در سنتز نانوذرات، علاوه بر افزایش پایداری و زیست‌سازگاری آن‌ها، موجب بهبود اثرات ضدسرطانی این نانوذرات می‌گردد. از طرفی، سنتز سبز علاوه بر افزایش پایداری نانوذرات، از مواد طبیعی استفاده می‌کند که ممکن است اثرات ضد سرطانی نانوذرات را تقویت نماید (۴، ۹). تحقیقات نشان داده‌اند که این نانوذرات توانایی فعال‌سازی کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را دارند (۱۰، ۱۱).

مطالعات مرتبط با سلول‌های مختلف سرطانی مانند سرطان پستان و ریه اثبات کرده‌اند که نانوذرات سلنیوم همراه با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فعالیت کاسپازها را تقویت می‌کنند و موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شوند (۱۲، ۱۳). برای مثال، کاوسی و همکاران دریافتند که نانوذرات سلنیوم سنتز شده با عصاره گیاه *Anthemis atropatana*، بیان ژن‌های Bax و کاسپازهای ۳ و ۹ را افزایش دادند و بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 را کاهش دادند (۱۲). همچنین مطالعه‌ای دیگری گزارش کرد که استفاده از نانوذرات سلنیوم اثر سینرژیک با داروی

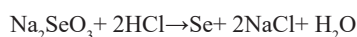
پکلیتاکسل داشته و باعث فعال شدن کاسپازهای ۸ و ۹ به همراه افزایش ROS در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۳). با وجود این شواهد، مطالعات در زمینه سرطان تخمدان به‌ویژه سلول‌های OVCAR-3 محدود است. تحقیق Zhao و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که نانوذرات سلنیوم می‌توانند به‌طور موثری سطح ROS را افزایش داده و به دنبال آن کاسپازها را فعال کنند تا آپوپتوز در سلول‌های تخمدان القا شود (۱۴). همچنین، پژوهشی که نانوذرات سنتز شده با کمک عسل را بررسی کرد، بیان کرد که این نانوذرات موجب فعال‌سازی کاسپازها و مرگ سلولی در OVCAR-3 می‌شوند (۱۵).

از سوی دیگر، مزیت استفاده از عصاره گیاه خارپنبه در سنتز نانوذرات، وجود ترکیبات زیستی شیمیایی غنی و آنتی‌اکسیدان‌های فراوان متشکل از فلاونوئیدهاست است که می‌تواند اثربخشی کاسپازمحور این نانوذرات را بیشتر کند و به بهبود پاسخ درمانی کمک نماید (۱۶، ۱۷). بدین ترتیب، سنتز سبز می‌تواند رویکردی پایدار و سازگار با محیط برای تولید نانوذرات ضدسرطان باشد. با این حال، برخی مطالعات ناهمسو نیز گزارش شده‌اند. به‌عنوان نمونه، تحقیقی نشان داد که نانوذرات سلنیوم در برخی غلظت‌ها یا در سلول‌های خاص قادر به فعال‌سازی کاسپازها نیستند و حتی بعضاً مسیرهای مرگ سلولی غیر آپوپتوزی مانند نکروپتوز را تحریک می‌کنند (۱۸). همچنین، در مطالعه دیگری بیان شده که برخی فرم‌های نانوذرات سلنیوم ممکن است اثرات سیتوتوکسیک اندکی داشته باشند و حتی در برخی سلول‌های سالم موجب سمیت شوند که به دقت در طراحی و دوز مصرفی آن‌ها باید توجه کافی داشت (۱۹).

در مجموع، با وجود شواهدی که نقش نانوذرات سلنیوم سنتز شده با عصاره خارپنبه را در فعال‌سازی کاسپازها و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تخمدان نشان می‌دهند، نتایج متناقضی در این زمینه در ادبیات علمی وجود دارد. برخی پژوهش‌ها افزایش فعالیت کاسپازها و القای مرگ برنامه‌ریزی شده را گزارش کرده‌اند، در حالی که برخی دیگر عدم پاسخ‌دهی یا اثرات متفاوت و حتی سمیت‌های احتمالی را مطرح کرده‌اند. این ناهماهنگی‌ها نشان‌دهنده وجود شکاف تحقیقاتی مهمی در درک کامل مکانیزم‌های اثر، تعیین دوز بهینه و شرایط مناسب کاربرد این نانوذرات است. اگرچه مطالعات متعددی به بررسی اثرات ضدسرطانی نانوذرات سلنیوم سنتز شده پرداخته‌اند، اما شکاف قابل توجهی در شناخت اثر این نانوذرات با عصاره خارپنبه (*Onopordum acanthium*) بر مسیرهای آپوپتوز و فعالیت سیستماتیک کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطان تخمدان وجود دارد. همچنین استفاده از روش سنتز سبز با عصاره گیاهی می‌تواند با کاهش کاربرد مواد شیمیایی مضر و افزودن ترکیبات زیستی فعال، اثربخشی نانوذرات را بهبود بخشد. بنابراین، مطالعه حاضر هدف دارد تا از طریق بررسی دقیق اثرات سایتوتوکسیک و مکانیسم آپوپتوز

آب مقطر تهیه شد. سپس ۵ میلی لیتر از محلول عصاره خارپنبه به غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر به طور قطره ای به محلول سدیم سولیت در حال همزدن افزوده شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط به همزدن ادامه داده شد. پس از آن، محلول سانتریفیوژ شده (۱۳,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و فاز مایع روئین دور ریخته شد و رسوب باقی مانده مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد. سپس رسوبات در ۵۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده، یک دقیقه آنکوبه و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا فرایند تصفیه نانوذرات سلنیوم بررسی گردد (۲۰). فرایند سنتز نانوذرات سلنیوم بر اساس احیای سدیم سولیت (Na₂SeO₃) با استفاده از ترکیبات زیستی موجود در عصاره خارپنبه به عنوان عامل احیاگر و تثبیت کننده صورت گرفت.

فرمول واکنش سنتز نانوذرات سلنیوم با استفاده از پیش ماده های سلنیوم به شرح زیر می باشد:



شناسایی و تعیین مشخصات نانوذرات سلنیوم

طیف سنجی پراکندگی انرژی اشعه ایکس (EDX)

برای تعیین عنصرهای تشکیل دهنده نانوذرات سنتز شده از روش طیف سنجی پراکندگی انرژی اشعه ایکس (EDX) همراه با میکروسکوپ الکترونی (BRUKER Q200، برلین، آلمان) استفاده شد. این روش با شناسایی نشر اشعه ایکس مشخصه هر عنصر، ترکیب شیمیایی نمونه را تعیین می کند. نتایج تحلیل نشان داد که سلنیوم عنصر غالب بوده و آلودگی قابل توجهی از عناصر دیگر وجود ندارد. همچنین، نقشه برداری عنصری، توزیع یکنواخت سلنیوم را تأیید کرد (۲۱).

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR)

نمونه های پودر خشک شده هوادهی شده به همراه گلوله های KBr آسیاب شده و با دستگاه Thermo Nicolet مدل ۶۷۰۰ در حالت بازتاب پراکنده و با رزولوشن ۴ سانتی متر^{-۱} اندازه گیری شدند. برای به دست آوردن نسبت سیگنال به نویز مطلوب، ۵۱۲ بار اسکن انجام شد. نمودار حاصل به صورت درصد عبور (%transmittance) در مقابل عدد موج (cm⁻¹) رسم گردید (۲۲).

پراش اشعه ایکس (XRD)

نقشه های پراش اشعه ایکس نانوذرات سلنیوم با استفاده از دستگاه Philips Panalytical X'pert Pro با پرتوهای Cu Ka (۱.۵۴۰۵۹) آنکستروم و در ولتاژ ۴۵ کیلوولت و جریان ۴۰ میلی آمپر ثبت شد (۲۲).

ناشی از این نانوذرات سنتز شده به روش سبز بر سلول های تخمدان، این خلأ را پر کند. با توجه به اهمیت اثرات متقابل نانوذرات سلنیوم سنتز شده با عصاره خارپنبه، انجام پژوهش های جامع تر و دقیق تر در این زمینه ضروری است. علاوه بر این، با توجه به اینکه اغلب پژوهش ها تمرکز بر سلول های سرطانی داشته اند و بررسی اثرات نانوذرات بر سلول های سالم به طور مستقل کمتر مورد توجه قرار گرفته، مطالعات آینده باید به ارزیابی کامل تر ایمنی زیستی نانوذرات در سلول های سالم بپردازد تا ضمن افزایش دقت علمی، مسیر توسعه درمان هایی با عوارض جانبی کمتر و کیفیت زندگی بهتر برای بیماران هموار گردد.

روش بررسی

در این مطالعه، تمامی فرایندهای تحقیق پیش از آغاز آزمایش ها به تأیید کمیته اخلاق در پژوهش انجمن بین المللی دانشمندان (IAS) (Ref.) (IASRPGNPOCC.24.06) اخذ گردیده است. همچنین، در تمامی مراحل، الزامات اخلاقی مرتبط با استفاده از سلول های انسانی مطابق با استانداردهای بین المللی رعایت شده است. مطالعه حاضر از نوع تجربی - آزمایشگاهی بوده و بر سنتز نانوذرات سلنیوم به روش سبز متمرکز است. در این تحقیق، به منظور تمرکز بر اثرات ضد سرطانی و فعالیت آپوپتوزی نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز، از داروهای شیمی درمانی کلاسیک مانند Cisplatin یا Paclitaxel به عنوان کنترل مثبت استفاده نشده است. با این حال، به کارگیری این داروها در نقش گروه کنترل مثبت می تواند در مطالعات آتی به طور قابل توجهی به تقویت اعتبار نتایج و امکان مقایسه کارایی روش های درمانی نوین کمک نماید؛ چرا که این داروها به طور گسترده به عنوان استانداردهای درمان سرطان شناخته شده اند و اثرات سایتوتوکسیک آن ها به خوبی مستند سازی شده است. بر این اساس، پیشنهاد می شود برای تکمیل و اعتبار بخشی بیشتر آزمایشات، در پژوهش های آینده از این داروها به عنوان کنترل مثبت استفاده شود تا امکان ارزیابی دقیق تر و مقایسه ای کارایی نانوذرات سلنیوم در مقابل درمان های رایج فراهم گردد.

تهیه عصاره گیاه خارپنبه

ابتدا برای تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه، ۵۰ گرم از پودر خشک شده گیاه خارپنبه در ۲۰۰ میلی لیتر محلول الکل ۵۰٪ حل شد. سپس محلول به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول حاصل از عبور از صافی کاغذی عبور داده شد، خشک شده و در یخچال جهت آزمایش های بعدی نگهداری گردید (۲۰).

سنتز نانوذرات سلنیوم

برای سنتز نانوذرات، ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر محلول سدیم سولیت ۱ میلی مولار در

کشت سلولی

سلول‌های سرطانی تخمدان OVCAR-3 (مؤسسه پاستور، تهران، ایران) در محیط کشت DMEM (Sigma-Aldrich، انگلستان) به همراه ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، انسولین ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱٪ محلول پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند.

آزمایش سمیت سلولی (MTT)

سلول‌های OVCAR-3 در تراکم 2×10^3 سلول در هر چاهک صفحه ۹۶ چاهی کشت داده و به مدت یک شب جهت چسبیدن به سطح نگه داشته شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم به ترتیب ۵۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵ و ۱۵٫۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. نمونه‌های بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. پس از این مدت، محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS به سلول‌ها افزوده (۱۰۰ میکرولیتر) و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در این فرایند، بلورهای فورمازان غیرقابل حل در آب تشکیل شدند که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شدند (DMSO در غلظت نهایی ۰٫۱٪ سمیت برای سلول ندارد). چگالی نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها برحسب درصد نسبت به کنترل به صورت نسبت چگالی نوری نمونه بر کنترل ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید (۲۳). در آزمون MTT جهت بررسی اثر سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده، درصد بقای سلول‌ها در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. سپس برای تعیین نیمه حداکثر غلظت بازدارنده (IC₅₀) از نمودار دوز-پاسخ استفاده گردید که با رسم درصد بقای سلول در مقابل غلظت نانوذرات و برازش داده‌ها به مدل لگاریتمی انجام شد. ارزش IC₅₀ به عنوان غلظتی تعریف می‌شود که موجب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل می‌شود و این مقدار برای مقایسه کارایی سمیت نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت. این روش استاندارد در مطالعات مشابه مورد تأیید و استفاده قرار گرفته است.

سنجش فعالیت کاسپازهای کلیدی آپوپتوز تحت تأثیر دوز IC₅₀ نانوذرات سلنیوم سنتز شده

پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های OVCAR-3 با دوز IC₅₀ نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز، فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ به منظور ارزیابی القای آپوپتوز بررسی شد. در این راستا، از کیت آزمایشگاهی شرکت Abnova (تایوان) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید. تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک از پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. پس از اتصال سلول‌ها به کف پلیت، سلول‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه کنترل

(بدون تیمار با نانوذره) و گروه تیمار شده با دوز IC₅₀ نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در گروه کنترل تیماری صورت نگرفت و در گروه تیمار، سلول‌ها با دوز IC₅₀ نانوذرات سلنیوم تیمار شدند. پس از گذشت این مدت، سلول‌ها در هر دو گروه تریپسینه شده و سانتریفوژ گردیدند. به رسوب سلولی در میکروتیوب‌ها، ۵۰ لاندای لایزبافر (lysis buffer) افزوده و هموژنیزه شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و مجدداً با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. عصاره سلولی به میکروتیوبی جدید منتقل شد. در ادامه، ۵۰ لاندای از محلول Reaction buffer به هر میکروتیوب افزوده و واکنش آغاز گردید. لایزبافر و ری‌اکشن بافر در میکروتیوب حاوی عصاره سیتوزولی مخلوط شده و میزان فلورسانس کاسپازها اندازه‌گیری شد. در نهایت، میزان جذب نوری آنزیم‌ها در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه الایزاید (ELISA Reader) خوانده شد. هر آزمایش با سه تکرار انجام شد و میانگین جذب نوری در پلیت ۹۶ خانه‌ای محاسبه و ثبت گردید (۲۴).

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و تعیین نیمه حداکثر غلظت بازدارنده (IC₅₀)، از نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده شد. نمودار دوز-پاسخ با استفاده از روش رگرسیون غیرخطی برازش داده شده و مقدار IC₅₀ استخراج گردید. این روش امکان ارزیابی دقیق‌تر سمیت نانوذرات را فراهم می‌کند. در ادامه، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد. به منظور بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها، آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) به کار گرفته شد. همچنین برای مقایسه گروه‌های مختلف با گروه کنترل، از آزمون تعقیبی توکی (Tukey's Post Hoc Test) استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰٫۰۵ ($p < 0.05$) به عنوان معیار وجود تفاوت آماری معنادار در نظر گرفته شد. برای تحلیل داده‌های مرتبط با فعالیت کاسپازها، آزمون t مستقل مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) گزارش شدند. پیش از اجرای آزمون‌های آماری، توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. با توجه به اینکه در تمامی گروه‌ها مقدار p کمتر از ۰٫۰۵ به دست آمد، داده‌ها دارای توزیع نرمال تشخیص داده شدند. بنابراین، استفاده از آزمون‌های پارامتری موجه و مناسب ارزیابی گردید.

نتایج

شناسایی و تعیین مشخصات نانوذرات سلنیوم

روش پراش اشعه ایکس (XRD)

ساختار بلوری نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از تکنیک

انجام نشده است. در غلظت ۱۵,۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش بقای سلولی مشاهده شد اما این تفاوت معنی‌دار نبود. مقدار غلظتی که قادر است ۵۰ درصد بقای سلول‌ها را مهار کند (IC₅₀)، با استفاده از تحلیل رگرسیون غیرخطی در نرم‌افزار GraphPad Prism محاسبه شد و مقدار آن تقریباً برابر با ۱۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید (شکل ۳).

اثرات نانوذرات سلیوم سنتز شده به روش سبز بر فعالیت کاسپازها

در گروه تیمار، فعالیت کاسپاز-۳ حدود ۴ برابر بیشتر از گروه کنترل است، در حالی که میزان فعالیت در گروه کنترل حدود ۱ و به مراتب کمتر از گروه تیمار می‌باشد. این افزایش معنادار در فعالیت کاسپاز-۳ نشان‌دهنده فعال شدن مسیر آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) است. با توجه به اینکه کاسپاز-۳ یک کاسپاز اجرایی محسوب می‌شود، این نتایج بیانگر اثر سیتوتوکسیک قوی نانوذرات سلیوم بر سلول‌های سرطانی است. همچنین، در گروه تیمار، فعالیت کاسپاز-۸ تقریباً دو برابر گروه کنترل گزارش شده است، در حالی که سطح فعالیت در گروه کنترل در حد پایه (حدود ۱) باقی مانده است. با توجه به اینکه کاسپاز-۸ یکی از اجزای اصلی مسیر آپوپتوز خارجی (مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ) است، این افزایش فعالیت می‌تواند نشان‌دهنده تحریک این مسیر توسط نانوذرات سلیوم باشد. از سویی، فعالیت کاسپاز-۹ در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل تنها اندکی افزایش یافته (حدود ۱.۳ برابر)، در حالی که فعالیت در گروه کنترل در حد پایه باقی مانده است. کاسپاز-۹ از اجزای کلیدی مسیر داخلی آپوپتوز (میتوکندریایی) است و این افزایش جزئی می‌تواند بیانگر مشارکت محدود این مسیر در پاسخ سلول‌ها به نانوذرات باشد، در حالی که مسیر خارجی نقش غالب‌تری ایفا می‌کند ($P < 0.001$) (شکل ۴). با توجه به افزایش معنادار فعالیت کاسپاز ۸ و غالب بودن مسیر خارجی آپوپتوز، بررسی مکانیسم‌های مرتبط با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تعامل آن‌ها با مسیرهای داخلی آپوپتوز از جمله کاسپاز ۹ و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز مانند Bcl-2 و Bax را به درک بهتر فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی رهنمون می‌سازد. لازم است ذکر شود که این موارد در مقاله‌ای جداگانه از مجموعه مطالعات جاری این پروژه به‌طور جامع و دقیق مورد بررسی قرار گرفته است. در آن مطالعه، اندازه‌گیری‌های ROS و تحلیل‌های بیان ژنی مرتبط با مسیرهای آپوپتوز، به‌ویژه نسبت Bcl-2/Bax، انجام شده و مکانیسم‌های احتمالی تاثیر نانوذرات سلیوم بر مسیرهای میتوکندریایی و مسیرهای غیر کاسپازی مانند نکروپتوز نیز مطرح شده است.

XRD بررسی شد. نمودارهای XRD نمونه‌های تهیه شده در شکل ۱ نشان داده شده است. این نمودارها بیانگر وجود پیک‌های واضح و قوی در زاویه ۲θ حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه هستند که مربوط به فاز سه‌وجهی (تریگونال) نانوذرات سلیوم می‌باشند. شدت بالای این پیک‌ها نشان‌دهنده غلظت مناسب سلیوم در نمونه است. همچنین، پهن بودن پیک‌ها و نوپس‌زمینه در نمودار به حضور برخی نانوذرات با ساختار آمورف (غیربلوری) اشاره دارد (شکل ۱-ا).

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR)

در طیف FTIR نانوذرات سلیوم، باندهای مشخصه‌ای در نقاط جذب متفاوت مشاهده شد. پیک‌های قوی در محدوده ۳۴۶۹,۴۸ و ۳۴۱۱,۶۳ سانتی‌متر-۱ نشان‌دهنده حضور گروه‌های هیدروکسیل (-OH) و ارتعاشات مرتبط با پیوندهای هیدروژنی هستند. پیک جذب در عدد موج ۲۹۲۵,۶۳ سانتی‌متر-۱ معمولاً به ارتعاشات پیوند کربن-هیدروژن (C-H) مربوط می‌شود که می‌تواند نشانگر حضور ترکیبات آلی یا پوشش‌های سطحی روی نانوذرات سلیوم باشد. همچنین، پیک جذب در محدوده ۱۴۱۳,۶۲ سانتی‌متر-۱ به ارتعاشات گروه‌های کربوکسیل اشاره دارد. سایر پیک‌های جذب در اعداد موج ۱۰۶۰,۷۱ و ۶۲۲,۹۳ سانتی‌متر-۱ ممکن است به ارتعاشات پیوندهای سیلیکون-اکسیژن یا سایر ترکیبات غیر آلی مرتبط باشند (شکل ۱-ب).

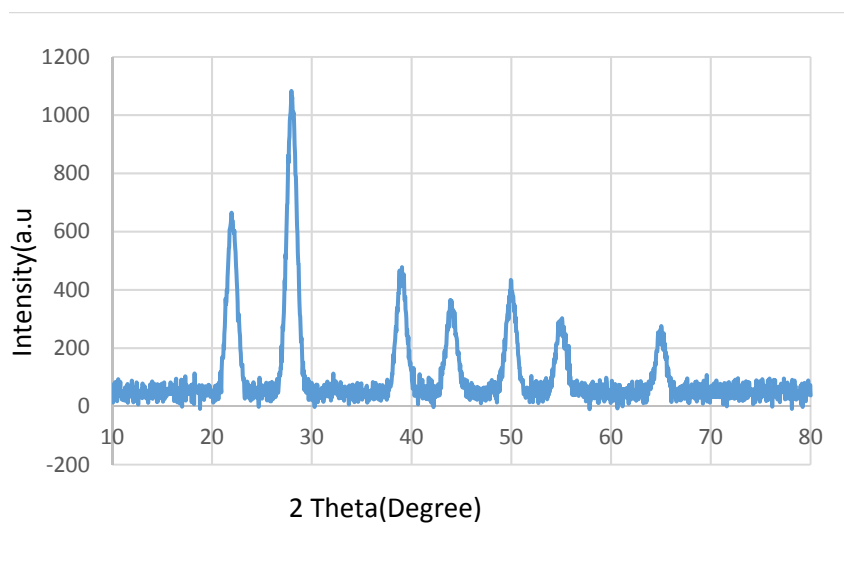
طیف انرژی پراکنده اشعه ایکس (EDAX)

نتایج EDAX حضور عنصر سلیوم را در نانوذرات سنتز شده تأیید می‌کند. قله‌های برجسته مربوط به عنصر سلیوم نشان‌دهنده خلوص بالای نانوذرات تولید شده است. همچنین، سایر پیک‌ها مربوط به عناصر کربن، سدیم، پتاسیم، کلو و کلسیم نیز مشاهده شدند که ممکن است ناشی از مواد زمینه‌ای یا باقی‌مانده‌های عصاره گیاهی باشند (شکل ۱-ج).

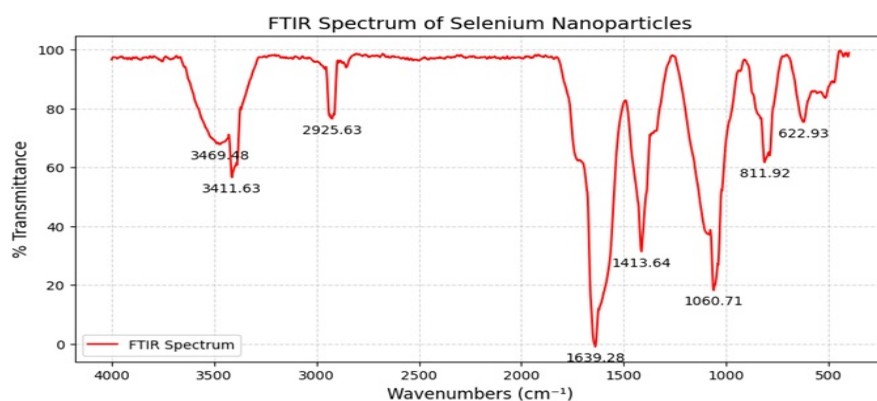
اثرات نانوذرات سلیوم سنتز شده به روش سبز بر زنده‌مانی سلول‌های OVCAR-3

در این مطالعه، اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات سلیوم بر بقای سلول‌های سرطانی تخمدان OVCAR-3 با استفاده از آزمایش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحلیل آماری انجام شده نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات سلیوم، بقای سلول‌ها به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. به‌طور خاص، تیمار سلول‌ها با نانوذرات سلیوم در غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲,۵ و ۳۱,۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) شد ($p < 0.001$) (شکل ۲). لازم به ذکر است که تمامی مقایسه‌های آماری نشان داده شده با نماد *** صرفاً مقایسه گروه تیمار با گروه کنترل می‌باشد و مقایسه بین گروه‌های مختلف تیمار

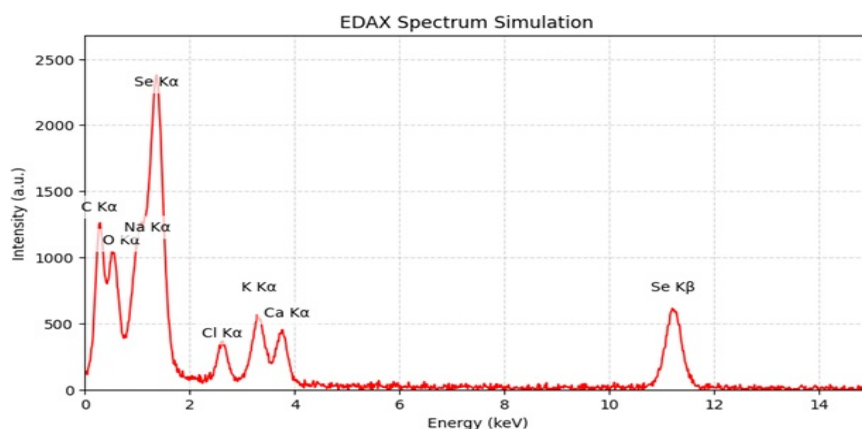
a)



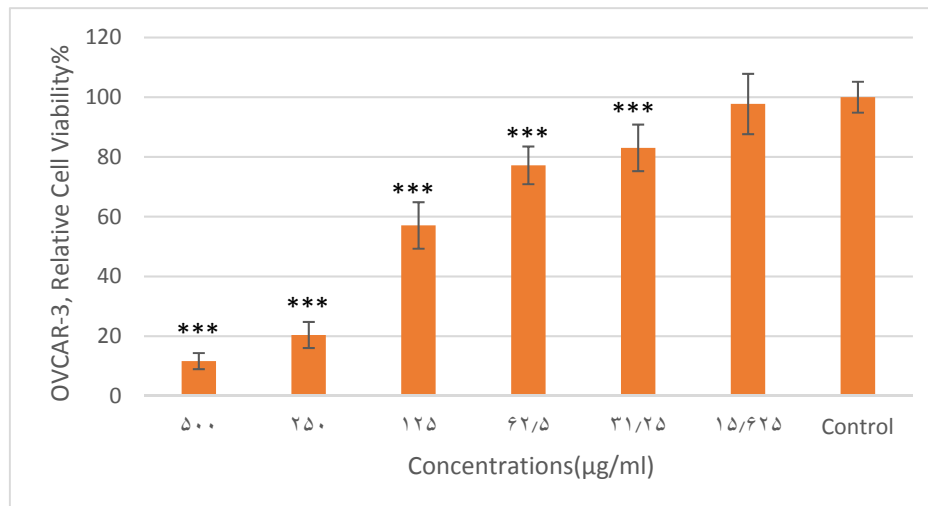
b)



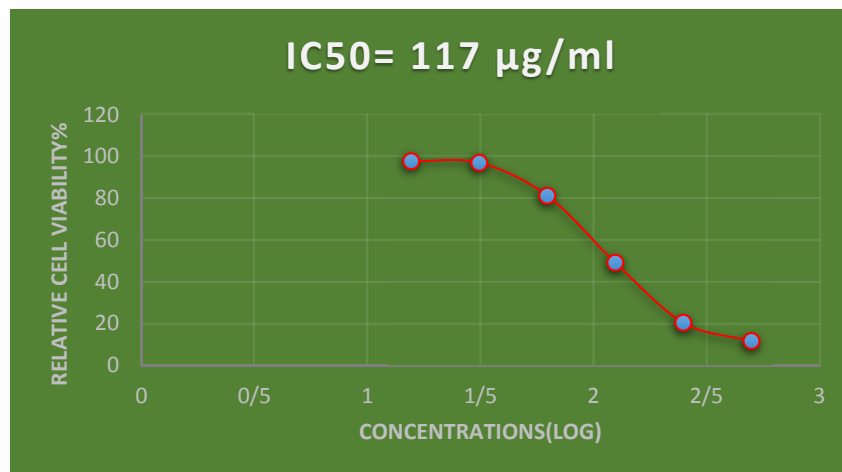
c)



شکل ۱: مشخصه‌یابی نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه خارپنبه است که شامل سه بخش اصلی می‌باشد: (a) پراش اشعه ایکس (XRD)، (b) طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، و (c) طیف انرژی پراکنده اشعه ایکس (EDAX). در بخش XRD، نمودارها وجود پیک‌های مشخص و قوی در زاویه ۲θ حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه را نشان می‌دهند که معرف ساختار کریستالی سه‌وجهی نانوسلول‌های سنتز شده هستند، همچنین گستردگی پیک‌ها و نویز پس‌زمینه وجود ذرات آمورف را نیز تأیید می‌کند. طیف FTIR نشان‌دهنده گروه‌های عملکردی مختلفی نظیر گروه هیدروکسیل (OH⁻)، پیوندهای کربن-هیدروژن (C-H)، و گروه‌های کربوکسیل بر سطح نانوذرات است که نشان‌دهنده حضور پوشش‌های آلی یا باقی‌مانده‌های محلول‌های گیاهی می‌باشد. نهایتاً طیف EDAX، بر خلوص بالای عنصر سلنیوم در نانوذرات تأکید دارد و علاوه بر آن، حضور عناصری مانند کربن، سدیم، پتاسیم، کلسیم نیز مشاهده شده که معمولاً از منابع گیاهی و فرایند سنتز ناشی می‌شود.



شکل ۲: زنده‌مانی سلول‌های OVCAR-3 ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲.۵، ۳۱.۲۵ و ۱۵.۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات سلنیوم. علامت *** نماد تفاوت معنادار ($p < 0.001$) می‌باشد. آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شده‌اند.



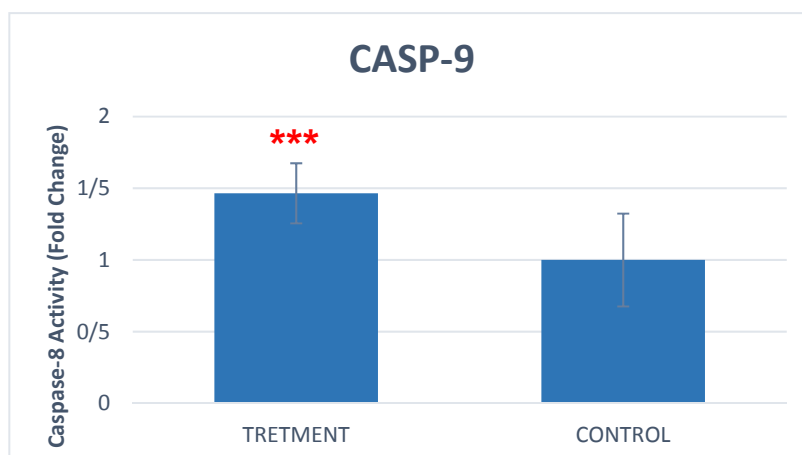
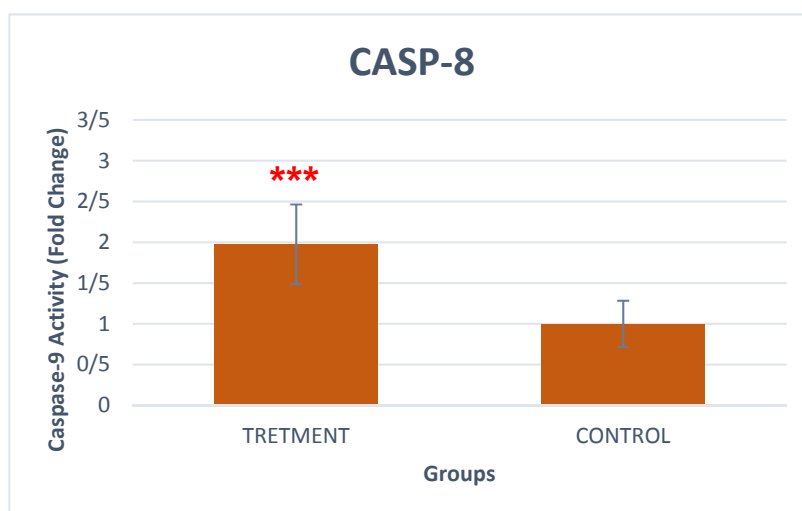
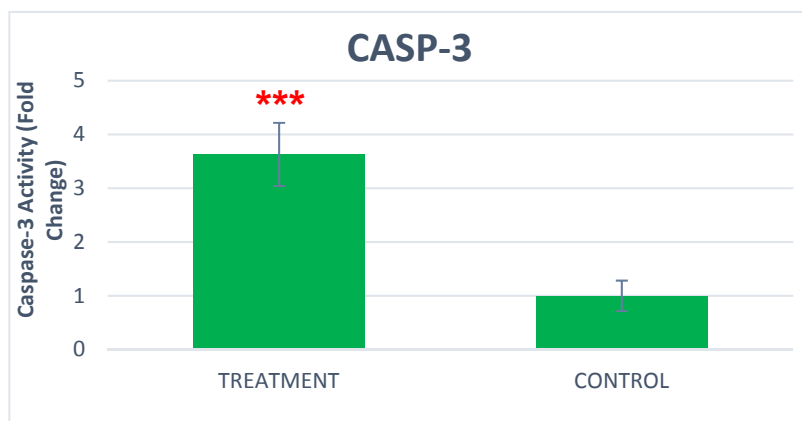
شکل ۳: بررسی اثر غلظت لگاریتمی نانوذره سلنیوم بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تخمدانی OVCAR-3. این نمودار، تغییرات درصد زنده‌مانی نسبی سلول‌های سرطانی معده را پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های مختلف (بر حسب لگاریتم غلظت) نشان می‌دهد. محور افقی لگاریتم غلظت‌ها و محور عمودی درصد زنده‌مانی نسبی سلول‌ها را نشان می‌دهد.

بحث

بود. علاوه بر این، نتایج آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR) حضور گروه‌های عاملی طبیعی نظیر هیدروکسیل (OH-)، کربوکسیل، و پیوندهای C-H را روی سطح نانوذرات نشان داد. پیک‌های جذبی قوی در حدود 3411.63 و 3469.48 cm^{-1} مشاهده شدند که بیانگر وجود این گروه‌ها در سطح نانوذرات است. این یافته‌ها بر اهمیت روش سنتز سبز تأکید دارند، زیرا این گروه‌های زیست‌سازگار نه تنها موجب پایداری و تثبیت نانوذرات می‌شوند، بلکه می‌توانند جذب سلولی بهینه و زیست‌سازگاری بیشتری را نیز فراهم آورند. نتایج حاصل از طیف‌سنجی EDAX نیز حضور عنصر سلنیوم با خلوص بالا را تأیید کرد. علاوه بر آن، عناصر موجود در عصاره گیاهی نظیر کربن، سدیم، پتاسیم و کلر نیز به‌عنوان پوشش طبیعی

در این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه خارپنبه (*Onopordum acanthium*) بر رده سلولی سرطان تخمدان انسانی OVCAR-3 و نقش این نانوذرات در القای آپوپتوز از طریق بررسی فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳، ۸ و ۹ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل از آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) نشان داد که نانوذرات سنتز شده عمدتاً دارای ساختار بلوری سه‌وجهی هستند؛ ساختاری که به‌عنوان فرم پایدار عنصر سلنیوم شناخته می‌شود. این نتایج با مطالعه امیری و همکاران (۲۵) که غلظت بهینه سلنیوم را نیز گزارش کردند، هم‌راستا



شکل ۴: مقایسه فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی تخمدان (OVARC-3) پس از تیمار با نانوذرات سلنیوم سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه خارپنبه افزایش معنی‌دار فعالیت کاسپاز-۳ و کاسپاز-۸ در گروه تیمار، نشان‌دهنده القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپتوز) به‌ویژه از طریق مسیر خارجی است. افزایش جزئی فعالیت کاسپاز-۹ نیز حاکی از مشارکت نسبی مسیر داخلی آپتوز می‌باشد. آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شده‌اند. *** بیانگر $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

را با استفاده از عصاره *Anthemis atropatana* سنتز کرده بودند، نتایج مشابهی را نشان داد (۴).

از نظر سمیت سلولی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بقای سلول‌های OVCAR-3 در مواجهه با دوزهای بالای ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

روی نانوذرات شناسایی شدند. این پوشش آلی نقش مؤثری در جلوگیری از سمیت غیراختصاصی و ناخواسته بر روی بافت‌های سالم ایفا می‌کند. این نتایج با پژوهش Alagesan و همکاران در سال ۲۰۱۹ مطابق دارد (۲۶). همچنین، یافته‌های مطالعه کاوسی و همکاران که نانوذرات سلنیوم

(۳۷) افزایش معنی‌دار فعالیت کاسپاز ۹ را پس از تیمار سلول‌های سرطانی کبدی رده HepG-2 با نانوذرات سلنیوم سنتز شده از میوه زالزالک گزارش کردند. در پژوهشی دیگر، نانوذرات سلنیوم عامل دار شده با لنتینان منجر به افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون (HCT-116) گردیدند (۳۸). ال‌خودیری و همکاران نیز دریافتند که نانوذرات سلنیوم در رده‌های سلولی MCF-7 و HepG2 سبب افزایش سطح mRNA ژن‌های آپوپتوزی و فعالیت کاسپاز ۳ می‌شوند (۳۹).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، اثر نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز از گیاه خارپنبه بر سلول‌های سرطانی OVCAR-3 تحت تأثیر عوامل مختلفی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به اندازه نانومتری، خلوص بالای نانوذره سنتز شده و ... اشاره کرد. نانوذرات سلنیوم سنتز شده با روش سبز اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی تخمدان داشتند. از سویی، مهم‌ترین بخش یافته‌ها مربوط به افزایش معنادار فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۸ و افزایش نسبتاً کمتری در فعالیت کاسپاز ۹ بود. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات سلنیوم سبب القای آپوپتوز از طریق مسیر خارجی در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شوند، همانطور که فعال شدن کاسپاز ۸ آغازگر این مسیر است و سپس کاسپاز ۳ که نقش اجرایی دارد فعال می‌شود. افزایش جزئی فعالیت کاسپاز ۹ نیز نشان می‌دهد که مسیر داخلی آپوپتوز تا حدی در این فرایند دخیل است و نانوذرات به صورت ترکیبی می‌توانند هر دو مسیر را فعال کنند.

از نظر محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به استفاده از تنها یک رده سلولی (OVCAR-3) اشاره کرد که تعمیم نتایج به سایر انواع سلول‌های سرطانی را محدود می‌سازد. همچنین، عدم بررسی مکانیسم‌های مولکولی دقیق‌تر در مسیرهای آپوپتوز مانند مسیرهای سیگنال‌دهی میانجی‌گر پروتئین‌های Bcl-2 یا P53، امکان تحلیل عمیق‌تر مکانیسم‌های سلولی را کاهش داده است. سایر محدودیت‌های مهم این مطالعه شامل عدم بررسی سلول‌های سالم به عنوان کنترل جهت تایید اثر اختصاصی نانوذرات، عدم انجام آزمایشات *in vivo* برای ارزیابی عملکرد در سیستم‌های فیزیولوژیک پیچیده‌تر و همچنین فقدان ارزیابی نشانگرهای مولکولی مرتبط با مسیرهای آپوپتوز می‌باشد. اذعان داریم که پرداختن به این جنبه‌ها در تحقیقات آتی، نتایج را از نظر علمی قوی‌تر و جامع‌تر خواهد نمود. همچنین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، با استفاده از مدل‌های حیوانی و سایر خطوط سلولی، داده‌های جامع‌تری برای کاربرد درمانی نانوذرات سلنیوم به دست آید.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه خارپنبه بر سلول‌های سرطان تخمدان (OVCAR-3) و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز، به‌ویژه

از نانوذرات سلنیوم کاهش معنی‌داری یافت. این کاهش بقای سلولی نشان‌دهنده اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز نانوذرات سلنیوم بود. مطالعه حاضر در هماهنگی با نتایج اسپایدوروپولو و همکاران (۲۰۲۱) قرار دارد که گزارش دادند نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش سبز دارای اثر کشندگی بر سلول‌های سرطانی کولون هستند (۲۷). به‌طور مشابه، در پژوهش دیگری مشخص شد که اثرات سمی نانوذرات سلنیوم بر روی سلول‌های سرطانی کبد Huh-7 وابسته به غلظت و زمان تیمار بوده است (۲۸). همچنین، مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نانوذرات سلنیوم بیوسنتز شده با استفاده از مخمرها بر سلول‌های سرطانی کولون (HCT-116)، کبد (HepG-2) و به‌ویژه پستان (MCF-7) اثرات سیتوتوکسیک قابل توجهی دارند (۲۹). در مطالعه‌ای از حسنی و همکاران، نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های بالا اثرات سمی بر رده سلولی سرطان کولون (HT-29) نشان دادند (۳۰). یافته‌های توبهانس و همکاران (۳۱) نیز حاکی از آن بود که درمان با نانوذرات سلنیوم موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها در هر دو رده سرطانی تخمدانی SKOV-3 و OVCAR-3 می‌شود. همچنین ایران‌نژاد و همکاران در مطالعه‌ای جداگانه تأثیر نانوذرات سلنیوم را بر تکثیر رده سلولی سرطان تخمدان A2780 گزارش کرده‌اند (۳۲). در مقابل، برخی مطالعات نشان داده‌اند که در غلظت‌های کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نانوذرات سلنیوم تأثیر معنی‌داری بر روی بیشتر رده‌های سلولی سرطانی نداشتند، از جمله Caco-2، DU-145، MCF-7؛ به استثنای رده A172 که در آن اثرات سمی مشاهده شد (۳۳).

در بخش دوم مطالعه، تأثیر غلظت سیتوتوکسیک (۱۱۷ میکروگرم/میلی‌لیتر) نانوذرات سلنیوم بر فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳، ۸ و ۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات سلنیوم موجب افزایش فعالیت هر سه کاسپاز گردید. این افزایش در مورد کاسپازهای ۳ و ۸ معنی‌دار بود، در حالی که افزایش کاسپاز ۹ به‌صورت جزئی مشاهده شد. افزایش فعالیت کاسپاز ۸ نشان‌دهنده فعال شدن مسیر خارجی آپوپتوز و در ادامه، فعال شدن کاسپاز ۳ به‌عنوان اجرایی‌ترین آنزیم این فرایند است. از سوی دیگر، افزایش جزئی فعالیت کاسپاز ۹ بیانگر آن است که مسیر درونی (میتوکندریایی) نیز در فرایند مرگ سلولی نقش دارد، اگرچه در سطح پایین‌تری نسبت به مسیر خارجی. یافته‌های مطالعه حاضر با گزارش‌های مختلفی در ادبیات علمی مطابقت دارد. به‌عنوان مثال، گزارش شده است که نانوذرات سلنیوم باعث القای آپوپتوز در سلول‌های HepG2 می‌شوند (۳۴). عثمان و همکاران نیز نشان دادند که نانوذرات سلنیوم ترکیب‌شده با عصاره گیاهی (SeNPs-CV) قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان هستند (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر، نانوذرات سلنیوم اصلاح‌شده با *Pleurotus tuber-regium* (PTR-SeNPs) موجب فعال‌سازی کاسپازها در سلول‌های سرطانی معده (AGS) شدند (۳۶). همچنین، کوی و همکاران

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه دکترای مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می‌باشد و بدینوسیله از تمامی کسانی که در این مطالعه ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

مسیر خارجی می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های طبیعی مطالعات سلولی، این نتایج مقدماتی بوده و نمی‌توان به صورت قطعی کاربرد بالینی نانوذرات را بر اساس آن‌ها اعلام کرد. از این رو، تحقیقات بیشتری برای بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی، سمیت بالقوه در بافت‌های نرمال و ارزیابی‌های جامع‌تر، به خصوص در مدل‌های *in vivo* لازم است تا امکان بهره‌برداری بالینی به شکل مطمئن فراهم گردد. این مطالعه به عنوان گام اول در جهت شناخت پتانسیل درمانی نانوذرات سلنیوم مطرح می‌شود و پایه‌ای برای مطالعات آینده با دامنه گسترده‌تر و اعتبار بالاتر است.

References

- [1] Aranda E, Hedayat S, Shalpour S. Caspase signaling in ovarian cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Dis.* 2023; 14(4): 210.
- [2] Smith LM, Wilson TR. Targeting caspase-mediated apoptosis in ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 2022; 532: 215–223.
- [3] Johnson A, Kasim K. Mechanisms of apoptosis resistance in ovarian cancer: Key roles of caspases. *Oncol Rep.* 2021; 46(3): 1124–1136.
- [4] Kavousi K, Faghfour L, Mirzaei H, Farahani SM, Ghaffari H, Razavi S, Poormoghadam D, Fathi F. Selenium nanoparticles synthesized using Anthemis atropatana extract induce caspase-dependent apoptosis in breast cancer cells. *J Biomed Nanotechnol.* 2025; 21(1): 135–145.
- [5] Formisano C, Rigano D, Russo A, Cardile V, Caggia S, Arnold NA, Mari A, Piacente S, Rosselli S, Senatore F, Bruno M. Phytochemical profile and apoptotic activity of *Onopordum cynarocephalum*. *Planta medica.* 2012 Oct; 78(15): 1651–60.
- [6] kamil thamer Ali S. Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Onopordum acanthium* L. in Different Regions of Western Iraq Using GC-MS Analysis. *Wasit Journal for Pure sciences.* 2024 Dec 30; 3(4): 260–72.
- [7] Delalat R, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Antineoplastic effectiveness of silver nanoparticles synthesized from *Onopordum acanthium* L. extract (AgNPs-OAL) toward MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular Biology Reports.* 2022 Feb; 49(2): 1113–20.
- [8] Shahcheraghi SN, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. An eco-friendly fabrication of silver chloride nanoparticles (AgCLNPs) using *Onopordum acanthium* L. extract induces apoptosis in breast cancer MDA-MB-232 cells. *BioNanoScience.* 2022 Jun; 12(2): 339–50.
- [9] Qian Z, Ma L, Wang X, Li Y, Liu D, Zhang T, Chen Z, Zhou Y. Green synthesis of selenium nanoparticles and their application in inducing apoptosis of cancer cells via caspase pathways. *Nanomedicine.* 2023; 41: 102484.
- [10] Bidkar AP, Patil SM, Shirke SS, Shinde DB, Ambore SS, Pawar SS. Selenium nanoparticles loaded with paclitaxel induce apoptosis through ROS-mediated caspase activation in cancer cells. *Int J Pharm.* 2023; 617: 121616.
- [11] Zhao Y, Wu J, Zhang C, Li H, Chen Y, Wang S, Liu Y. Selenium nanoparticles induce apoptosis in ovarian cancer cells via increased reactive oxygen species and caspase activation. *Front Oncol.* 2024; 14: 1078921.
- [12] Lee H, Kim S, Lee SJ, Choi JY, Park JH, Kim HJ. Honey-mediated biosynthesis of selenium nanoparticles induces apoptosis through caspase activation in OVCAR-3 cells. *J Cell Biochem.* 2024; 125(5): 717–728.
- [13] Chen M, Li J, Zhang Y, Wang H, Sun L, Xu W, Zhou Q, Mao H. Enhanced apoptosis induction by selenium nanoparticles in ovarian cancer cells through caspase-mediated pathways. *Biomed Pharmacother.* 2024; 158: 113761.
- [14] Wang F, Wu D, Xu Y, Li X, Zhang P, Zhao L, Huang J. Anticancer effects of green-synthesized selenium nanoparticles on ovarian carcinoma cells via caspase activation. *J Trace Elem Med Biol.* 2023; 70: 126939.
- [15] Liu X, Cao C, Yin J, Lin Y, Xiang M, Zhu W, He L. Synergistic anti-ovarian cancer activity of plant-extract-mediated selenium nanoparticles through apoptosis induction. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2023; 224: 113060.
- [16] Zhang T, Huang Q, Li H, Chen Z, Zhou Y, Qian Z, Ma L. Selenium nanoparticles synthesized using honey trigger apoptosis in ovarian cancer cells via ROS and caspase activation. *J Cell Physiol.* 2024; 239(3): 1884–1895.
- [17] Nasir A, Mhd Saeed FN, Omar H, Yee SK, Rajandram R, Li HC. Phytochemicals-assisted synthesis of selenium nanoparticles: characterization and anticancer activity. *Int*

- J Mol Sci. 2023; 24(15): 10922.
- [18] Farahani SM, Ghafourian A, Tavakoli A, Kavousi K, Mehdizadeh A. Green synthesis of selenium nanoparticles using plant extracts: a review of recent advancements in synthesis, characterization, and anticancer applications. J Drug Deliv Sci Technol. 2023; 77: 103953.
 - [19] Yang Y, Chen Y, Wu M, Zhang Q, Liu J, Zhao Y. Limited cytotoxicity and necroptosis induction by selenium nanoparticles in selected cancer cells. Biomolecules. 2023; 13(8): 1120.
 - [20] Shahcheraghi SN, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. An eco-friendly fabrication of silver chloride nanoparticles (AgCLNPs) using Onopordum acanthium L. extract induces apoptosis in breast cancer MDA-MB-232 cells. BioNanoScience. 2022; 12(2): 339-350.
 - [21] Ahmed ME, Alzahrani KK, Fahmy NM, Almutairi HH, Almansour ZH, Alam MW. Colistin-Conjugated Selenium Nanoparticles: A Dual-Action Strategy Against Drug-Resistant Infections and Cancer. Pharmaceutics. 2025; 17(5): 556. doi: 10.3390/pharmaceutics17050556.
 - [22] Ramamurthy CH, Sampath KS, Arunkumar P, Kumar MS, Sujatha V, Premkumar K, Thirunavukkarasu C. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. Bioprocess Biosyst Eng. 2013; 36: 1131-1139. doi: 10.1007/s00449-012-0867-1.
 - [23] Liu G, Ling J, He L, Xu Y, Chen T, Shi C, Luo L. Theranostic Cancer Treatment Using Lentinan-Coated Selenium Nanoparticles and Label-Free CEST MRI. Pharmaceutics. 2022; 15(1): 120. doi: 10.3390/pharmaceutics15010120.
 - [24] Rostami Motamed H, Shariati M, Ahmadi R, Khatamsaz S, Mokhtari M. The effect of progesterone on caspase 8, 9 and 3 activity and investigation of morphological changes in MCF-7 cells nuclei. Daneshvar. 2020; 28(3): 71-79.
 - [25] Amiri H, Hashemy SI, Sabouri Z, Javid H, Darroudi M. Green synthesized selenium nanoparticles for ovarian cancer cell apoptosis. Research on Chemical Intermediates. 2021; 47: 2539-2556.
 - [26] Alagesan V, Venugopal S. Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of Withania somnifera and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities. BioNanoScience. 2019; 9: 105-116.
 - [27] Spyridopoulou K, Aindelis G, Pappa A, Chlichlia K. Anticancer activity of biogenic selenium nanoparticles: Apoptotic and immunogenic cell death markers in colon cancer cells. Cancers. 2021 Oct 24; 13(21): 5335.
 - [28] Hosseinpour L, Baharara J, Darroudi M, Sabouri Z, Haji Ghasem Kashani M, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of selenium nanoparticles using Cordia myxa extract and assessment of their cytotoxic and antioxidant properties. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2025 Apr 23.
 - [29] Ali BA, Allam RM, Hasanin MS, Hassabo AA. Biosynthesis of selenium nanoparticles as a potential therapeutic agent in breast cancer: G2/M arrest and apoptosis induction. Toxicology Reports. 2024; 13: 101792.
 - [30] Hasani S, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Selenium Nanoparticles Toward HT29 Colon Cancer Cells. Cell and Tissue Journal. 2024; 15(3): 190-202.
 - [31] Toubhans B, Gazze SA, Bissardon C, Bohic S, Gourlan AT, Gonzalez D, Charlet L, Conlan RS, Francis LW. Selenium nanoparticles trigger alterations in ovarian cancer cell biomechanics. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2020; 29: 102258.
 - [32] Irannejad F, Shahbazi S, Reisi S, Heidari R. Study of the effect of zinc oxide, selenium, and silver nanoparticles on the expression level of oxidative stress-associated genes in ovarian cancer. Medical Oncology. 2025; 42(2): 39.
 - [33] Varlamova EG, Goltyshev MV, Mal'tseva VN, Turovsky EA, Sarimov RM, Simakin AV, Gudkov SV. Mechanisms of the cytotoxic effect of selenium nanoparticles in different human cancer cell lines. Int J Mol Sci. 2021; 22(15): 7798. doi: 10.3390/ijms22157798.
 - [34] Li Y, Lin Z, Zhao M, Xu T, Wang C, Xia H, Wang H, Zhu B. Multifunctional selenium nanoparticles as carriers of HSP70 siRNA to induce apoptosis of HepG2 cells. International journal of nanomedicine. 2016 Jul 5: 3065-76.
 - [35] Othman MS, Obeidat ST, Al-Bagawi AH, Fareid MA, Fehaid A, Moneim AE. Green-synthesized selenium nanoparticles using berberine as a promising anticancer agent. J Integr Med. 2022; 20(1): 65-72. doi: 10.1016/j.joim.2021.11.002.
 - [36] Shi XD, Tian YQ, Wu JL, Wang SY. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2021 Jul 20; 61(13): 2225-36.
 - [37] Cui D, Liang T, Sun L, Meng L, Yang C, Wang L, Liang T, Li Q. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. Pharmaceutical Biology. 2018; 56(1): 528-534.
 - [38] Gao X, Yao Y, Chen X, Lin X, Yang X, Ho CT, Li B, Chen Z. Lentinan-functionalized selenium nanoparticles induce apoptosis and cell cycle arrest in human colon carcinoma HCT-116 cells. Front Nutr. 2022; 9: 987807.
 - [39] Alkhudhayri AA, Wahab R, Siddiqui MA, Ahmad J. Selenium nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) and liver (HEPG2) cell lines. Nanoscience and Nanotechnology Letters. 2020 Mar 1; 12(3): 324-30.
