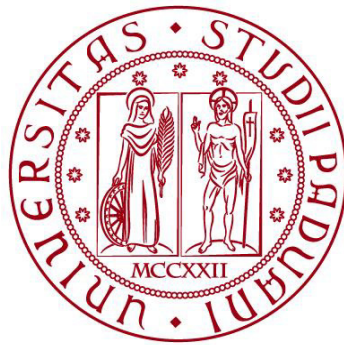


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Le nanoparticelle d'argento stimolano la morte
delle cellule tumorali del colonretto indotta dal
5-fluorouracile attraverso la sovraregolazione
delle vie di segnalazione del calcio mediate da
TRPV1**

**Relatore: Prof.ssa Sofia Pavanello
Dipartimento di Medicina Molecolare - DMM**

Laureanda: Gaia Antolini

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	1
1. STATO DELL'ARTE	2
1.1 Il cancro coloretale	2
1.2 Gli agenti chemioterapici: il 5-fluorouracile	3
1.3 Le nanoparticelle d'argento SiNP	4
1.4 I ruoli di TRPV1	4
2. MATERIALI E METODI	6
2.1 Coltura cellulare e gruppi di studio	6
2.2 Immunoblotting nelle cellule HT-29 per il canale TRPV1	6
2.3 Saggi per la vitalità, la conta e il volume cellulare, la quantità di detriti, saggi di apoptosi e dell'attività di CASP3, CASP8 e CASP9	6
2.4 Misurazione di mROS, iROS e potenziale della membrana mitocondriale	7
2.5 Analisi intracellulari di ione zinco libero e glutazione (iGSH). Analisi dell'attività della glutazione perossidasi (GPx), del glutazione ridotto (rGSH) e della perossidazione lipidica (LPO).	8
2.6 Misurazione dell'intensità della fluorescenza della concentrazione intracellulare dello ione calcio	8
2.7 Dati elettrofisiologici	8
3. RISULTATI	9
3.1 Livelli di espressione di TRPV1 nelle cellule HT-29	9
3.2 I trattamenti con le SiNP diminuiscono ulteriormente la vitalità, il numero e il volume delle cellule HT-29 indotte dal 5-FU attraverso aumento dell'apoptosi e dell'attività delle caspasi. L'inibizione di TRPV1 ha ridotto la morte cellulare indotta da 5-FU e SiNP.....	10
3.3 La terapia sinergica di 5-FU e SiNP aumenta mROS, iROS e potenziale di membrana in HT-29.....	11
3.4 Il livello di iGSH, rGSH e l'attività GPx sono diminuiti attraverso l'aumento dello ione zinco e LPO mediante le incubazioni con SiNP e 5-FU. Le SiNP stimolano ulteriormente l'aumento di calcio indotto dal 5-FU.....	12
3.5 L'azione sinergica di 5-FU e SiNP sulla densità di corrente di TRPV1.....	13
4. DISCUSSIONE	14
5. BIBLIOGRAFIA	17

ABSTRACT

In questo articolo è presentata la capacità di TRPV1 di fungere da oncosoppressore grazie alla stimolazione con nanoparticelle d'argento e 5-fluorouracile. Il recettore TRPV1 (TRP vanilloid 1) è un canale cationico non selettivo coinvolto in molti processi biologici come infiammazione, asma e dolore, ma la sua importanza è nota anche in ambito chemioterapico.

Il 5-fluorouracile è spesso usato come farmaco antitumorale, ma spesso comporta l'insorgenza di resistenza nei pazienti. In questo studio si vuole analizzare se possa funzionare in sinergia, in antagonismo oppure non essere influenzato dalle nanoparticelle d'argento.

L'esperimento è stato condotto sulla linea cellulare HT-29 per analizzare il cancro coloretale, una delle principali cause di morte al mondo. Per valutare le proprietà chemioterapiche, è stata misurata l'attività del canale TRPV1 in relazione all'apoptosi e alla produzione di ROS. Sono stati quindi eseguiti diversi test come Western Blot, saggi di vitalità cellulare, misurazione del potenziale della membrana mitocondriale e saggi sull'apoptosi, oltre a tecniche elettrofisiologiche come il patch clamp.

Per questo scopo le cellule sono state divise in 4 gruppi, poi confrontati tra loro sulla base delle misurazioni eseguite: un gruppo di controllo, un gruppo a cui sono state somministrate le nanoparticelle d'argento, uno che ha ricevuto il 5-fluorouracile e l'ultimo che ha beneficiato di entrambi.

È emerso che la combinazione di nanoparticelle d'argento e 5-fluorouracile effettivamente amplifica l'effetto finale, dimostrando un'azione sinergica. Questo risultato potrebbe costituire la base per lo sviluppo di terapie innovative per la cura del cancro coloretale, il quale è spesso causa di metastasi.

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Il cancro coloretale

Il cancro al colon-retto è attualmente una delle cause di morte più comuni al mondo, sia in uomini che in donne, ed è il terzo tipo di tumore più diagnosticato, solamente dopo il cancro ai polmoni e quello al seno. Nel nostro Paese, secondo i dati del Ministero della Salute, la situazione a riguardo è ancora più preoccupante, ponendolo al secondo posto con 50500 nuove diagnosi nel 2023 (*Fondazione Aiom, 2023*). Nel mondo rimane la seconda causa di morte più frequente correlata al cancro, soprattutto tra gli uomini con età inferiore ai 50 anni. Per questo in molti Paesi, tra cui l'Italia, sono stati introdotti screening di massa per rintracciare la presenza di sangue occulto nelle feci, tipico sintomo associato a questa malattia. Lo screening di massa è classificato tra gli screening secondari, poiché il suo scopo è la prevenzione per scovare anticipatamente la malattia. Al contrario, la prevenzione primaria viene eseguita quando non è ancora presente la malattia ed è volta ad eliminarne la causa, come l'utilizzo di sostanze cancerogene. In Italia, ad oggi, sono incoraggiati vari screening per i tipi di tumore più frequenti, in particolare alla mammella (mammografia, ogni 2 anni nelle donne tra i 50 e i 69 anni), alla cervice uterina (pap test, ogni tre anni dai 25 ai 64 anni) e, appunto, al colonretto. In questo caso sono presenti due tipi di screening. Il Sof, già descritto, ovvero la presenza di sangue occulto nelle feci, consigliato ogni due anni in donne e uomini tra i 50 e i 70 anni e la Rss, la rettosigmoidoscopia, da eseguire tra i 58 e i 60 anni ed eventualmente da ripetere ogni 10 anni.

Il cancro coloretale consegue spesso la formazione di polipi adenomatosi, formazioni tumorali benigne che però possono trasformarsi in forme maligne. Anche uno stile di vita poco sano ed equilibrato espone maggiormente al rischio, come abuso di alcol, fumo, sovrappeso, ridotta attività fisica, apporto eccessivo di carni rosse e zuccheri raffinati. Altre cause che ne aumentano l'insorgenza possono essere ricollegate alla suscettibilità genetica, come nel caso di individui affetti da poliposi adenomatosa familiare o sindrome di Lynch. Anche patologie come la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa possono contribuire (*Airc, 2021*). Sebbene spesso il tumore sia asportabile chirurgicamente per mezzo di laparoscopia o laparotomia, il grande problema di questo tipo di cancro risiede nella rapida diffusione di metastasi. Per questo motivo è fortemente consigliato l'affiancamento della terapia chemioterapica all'operazione chirurgica, sia prima che in seguito all'intervento. Gli agenti chemioterapici usati sono i più vari, come l'oxaliplatino o il 5-fluorouracile.

1.2 Gli agenti chemioterapici: il 5-fluorouracile

Attualmente sono note centinaia di molecole con effetto antitumorale che possono essere combinate per dare origine a svariati cicli di chemioterapia a cui vengono sottoposti i pazienti. Questi cicli prendono il nome dai farmaci da cui sono composti. Uno dei più noti è il Folfox, formato da acido folico, fluorouracile e oxaliplatino. Molti dei cicli più usati contengono il fluorouracile, come (oltre al Folfox) CMF (ciclofosfamide, metotrexato e fluorouracile) e FEC (fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide). È proprio questo ampio uso del 5-fluorouracile (5-FU) che ha portato all'insorgenza della resistenza ad esso. Va anche specificato, però, che molte molecole che possono essere combinate nella terapia vengono scoperte continuamente, come le nanoparticelle d'argento presentate in questo studio.

Vengono usati spesso come chemioterapici gli analoghi delle pirimidine, poiché il loro compito è quello di fungere da antimetabolita, impedendo la sintesi corretta degli acidi nucleici, bloccando quindi la crescita e la proliferazione cellulare. Il 5-fluorouracile, che presenta un fluoro al posto dell'idrogeno in posizione 5 dell'anello dell'uracile, produce 5-fluorodeossipuridiltrifosfato (5-FDUTP) che, non essendo un nucleotide base, blocca la replicazione del DNA, causando possibili mutazioni e condizioni di stress. Al contempo il 5-FDUTP, tramite la timidilato sintetasi, porta alla formazione di timidilato (dTMP). Il farmaco 5-FU sfrutta proprio questo passaggio per inibire la timidilato sintasi. La sua inibizione provoca il blocco della sintesi di DNA, con il conseguente blocco del ciclo cellulare. In questo modo la cellula non potrà più andare incontro a mitosi e la proliferazione cellulare subirà un calo drastico. Dopo essersi resi conto del beneficio chemioterapico del 5-fluorouracile, è stato ampiamente usato in molte terapie antitumorali. Questo ripetuto utilizzo ne ha però diminuito l'efficacia, portando al fenomeno della resistenza dal farmaco. Si pensa che la causa principale sia dovuta all'immortalità tipica delle cellule tumorali. Le motivazioni possono essere molteplici, come l'acquisizione di uno stato di quiescenza, uno switch metabolico oppure una resistenza al danno al DNA. I tumori resistenti, infatti, upregolano marcatori delle cellule staminali come Notch (*Chinmayee and Nath Kundu, 2021*). Per questi motivi sono state ricercate altre strategie per poter abbattere questo problema, rendendo in questo modo le cellule più sensibili al 5-FU. Nello studio di J. Gu "*Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four protein immunohistochemical method*" è riportata infatti l'efficacia del 5-FU nelle terapie chemioterapiche se somministrato da solo oppure con altre sostanze: negli stadi avanzati funziona solo nel 15% dei casi se somministrato da solo, mentre fino al 50% in caso di integrazione con altri farmaci come Folfox e Sox. Questo ha

aperto le strade a molte altre ricerche, nella speranza di trovare altri composti che possano aggirare questa resistenza e che anzi, possano addirittura lavorare in sinergia con il 5-FU aumentandone l'efficacia anche in casi in cui le cellule siano già sensibili ad esso. È proprio in questo contesto che si inserisce l'articolo in esame, in cui è stato analizzato l'effetto delle nanoparticelle d'argento come chemioterapico e soprattutto la loro azione in combinazione con il 5-fluorouracile.

1.3 Le nanoparticelle d'argento SiNP

Le nanoparticelle d'argento (SiNP) vengono sintetizzate con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm. Inizialmente, venivano prodotte soprattutto attraverso metodi chimici e fisici, ma dopo alcune analisi ne è stata rilevata la tossicità. Per questo, ora il metodo più sollecitato è quello di tipo biologico, chiamato anche metodo "verde", che non si avvale di sostanze artificiali ma utilizza principalmente organismi come batteri, piante o funghi. Il metodo fisico è anche chiamato top-to-bottom, poiché parte da materiali di partenza che vengono ridotti in piccolissime particelle (nanoparticelle, appunto). Gli altri due appartengono invece alla categoria bottom-to-top che, al contrario, si serve di reagenti chimici oppure organismi (o parti di essi) di partenza che vengono assemblati tra loro. Le SiNP sono principalmente note per le loro proprietà antimicrobiche. Esse, infatti, si legano alla superficie del batterio e penetrano all'interno, formando dei pori che inizialmente aumentano la permeabilità della parete (se presente) e della membrana, causandone successivamente la morte per lisi. Possono però portare alla morte cellulare anche attraverso la generazione di quantità eccessive di ROS. È quest'ultima la tipica modalità con cui le nanoparticelle d'argento operano nelle cellule HT-29 esaminate in questo studio. Lo ione argento può infatti reagire con il glutathione, un antiossidante, formando complessi di polimeri composti da glutathione e ione argento, riducendo la quantità di antiossidanti liberi, che in questo modo non possono più svolgere la loro funzione. Interrompe quindi la catena respiratoria mitocondriale, portando ad un incremento dei ROS, alla mancata sintesi di ATP e quindi a danno genomico (Mathur, Prateek, 2018). Le nanoparticelle, oltre che per la terapia antitumorale e come antibatterici, sono usate anche come supporto al vaccino, come antidiabetici e biosensori.

1.4 I ruoli di TRPV1

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) è il canale meglio caratterizzato tra quelli appartenenti alla famiglia TRP. È composto da 6 subunità transmembrana con il poro compreso tra i segmenti TM5 e TM6. Le regioni C-terminale ed N-terminale hanno siti per la fosforilazione e per il legame di PI(4,5)P2. È selettivo per i cationi ed è coinvolto in svariati

processi biologici come infiammazione, dolore, asma e termoregolazione. Per quanto riguarda il dolore, esplica la sua funzione depolarizzando la cellula in risposta all'ingresso di cationi, portando quindi i neuroni sensitivi primari a rilasciare neuropeptidi come la sostanza P, cui segue l'intervento di NGF, che attiva i neuroni sensoriali che permettono la percezione del dolore. TRPV1 è attivato dal calore per la termoregolazione (oltre i 43°C), da tossine batteriche come LPS, ma anche da citochine proinfiammatorie (Amato e Morrone, 2017). La comunicazione tra sistema immunitario e contesto tumorale non è trascurabile nell'ambito di una possibile terapia chemioterapica, poiché le molecole infiammatorie prodotte formano la base del complesso microambiente tumorale, che poi avrà un grande impatto sul futuro sviluppo del tumore. Il recettore TRPV1 è attivato da una serie di stimoli, tra cui la capsaicina, ma anche dalla quantità di mROS. Le informazioni a riguardo sono comunque ancora molto contrastanti e sono necessarie altre analisi per verificarne la validità. Ad esempio, l'articolo "*The ion channel TRPV1 gain-of function reprograms the immune microenvironment to facilitate colorectal tumorigenesis*" (Xuehui Jiang, 2022) spiega come la stimolazione attraverso l'upregolazione di TRPV1 porti alla tumorigenesi al colonretto attraverso una riprogrammazione del microambiente immunitario. Questo perché si pensa aumenti la produzione di citochine M1 nei macrofagi, con conseguente creazione di un ambiente infiammatorio, favorevole alla tumorigenesi. È stato anche notato che nei pazienti CRC (*colorectal cancer*) un'alta espressione di TRPV1 è associata ad una sopravvivenza minore. Il ruolo di TRPV1 in pazienti CRC è quindi spesso contraddittorio e ancora molto dibattuto. Il blocco farmacologico tramite capsazepina di TRPV1 secondo lo studio "*Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROS-JNK-CHOP-mediated upregulation of death receptors*" (2012. Bokyoung Sung) rende le cellule tumorali sensibili all'apoptosi indotta da TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), che attiva le caspasi 3, 8 e 9. Questo studio mostra proprio come sia la capsazepina a deprimere la crescita tumorale e TRPV1 sembrerebbe avere invece proprietà oncogeniche. Sembra però che il richiamo dei *death receptors* indotto dalla capsazepina sia dovuto ad un *pathway* indipendente rispetto a quello attivato da TRPV1, non confutando l'ipotesi in analisi che TRPV1 possa agire da oncosoppressore. Al contrario, in altri studi come quello in esame, la stimolazione di TRPV1 può condurre all'apoptosi, per esempio attivando la via p53. In quest'ultimo caso è, al contrario, la mancanza genetica di TRPV1 ad aumentare la formazione del tumore coloretale, suggerendo quindi che TRPV1 sia un oncosoppressore. Queste contraddizioni potrebbero essere intrinseche agli approcci usati nelle analisi. Gli agonisti e gli antagonisti di TRPV1 potrebbero avere effetti aspecifici, portando quindi ad interpretazioni scorrette.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Coltura cellulare e gruppi di studio

Nello studio è stata utilizzata la linea cellulare coloretale umana HT-29. Le cellule HT-29 sono state incubate in una miscela di medium di coltura DMEM (50%) e Ham's F-12 (50%) con glucosio 1g/L. Alle miscele di terreni sono stati aggiunti anche siero bovino fetale (10%) e penicillina-streptomina (1%). Nelle indagini al microscopio confocale a scansione laser LSM-800 sono state utilizzate cellule attaccate a piastre con fondo di vetro di 35 mm. Nelle restanti analisi sono invece state seminate 2×10^6 cellule in fiasche da 25 cm^2 con tappi filtranti.

Le cellule HT-29 sono state separate in quattro gruppi: (1) il gruppo di controllo, che è stato mantenuto nelle stesse condizioni di coltura per 24-48 ore; (2) il gruppo 5-FU, che ha ricevuto 5-FU $25 \mu\text{M}$ per 24 ore; (3) il gruppo SiNP, a cui sono stati somministrati $100 \mu\text{M}$ di SiNP per 48 ore; (4) il gruppo 5-FU + SiNP, che ha beneficiato di entrambi. Per alcune analisi le cellule sono state ulteriormente incubate con CPZ (capsazepina) $100 \mu\text{M}$ per un'ora.

2.2 Immunoblotting nelle cellule HT-29 per il canale TRPV1

Poiché non è stato rinvenuto nessun report sull'espressione di TRPV1 nelle cellule HT-29, è stata inizialmente eseguita un'analisi della sua espressione proteica tramite Western Blot in cellule HT-29 congelate secondo i protocolli standard. Sono stati usati anticorpi per la β -actina e TRPV1 (un anticorpo anti-VR1, un anticorpo policlonale di coniglio che ha come target proteine umane e spesso anche di ratto o di topo). La concentrazione intracellulare delle proteine è stata misurata usando β -actina di coniglio (1:2000). Le intensità della banda proteica di β -actina e TRPV1 sono state registrate in un Gel Imagination System. Le intensità delle bande proteiche sono state presentate come densità relative.

2.3 Saggi per la vitalità, la conta e il volume cellulare, la quantità di detriti, saggi di apoptosi e dell'attività di CASP3, CASP8 e CASP9

È stato utilizzato il contatore cellulare automatico Casy Model TT per misurare la vitalità cellulare, il volume cellulare, il conteggio delle cellule e la quantità di detriti, un prodotto di scarto organico che rimane quando una cellula muore. Sebbene la quantità di detriti e il numero di cellule siano stati espressi come $x 10^6/mL$, i risultati della vitalità e del volume cellulare sono stati presentati come variazione percentuale e $x 10^9/mL$. Per il test dell'apoptosi delle cellule HT-29 misurato allo spettrofotometro UV-1800, il colorante rosa è stato assorbito dalle cellule apoptotiche nella fase del

movimento transmembrana della fosfatidilserina fino al verificarsi del blebbing, la formazione dei corpi apoptotici. I cambiamenti di colore sono stati registrati a 550 nm allo spettrofotometro.

Per la misurazione delle attività di CASP3, CASP8 e CASP9 sono stati usati un substrato della proteasi CASP3 attivato in condizioni apoptotiche e i substrati fluorogenici per CASP8 e CASP9. Le loro emissioni sono state analizzate a 380 e 460 nm nel lettore di piastre Infinite Pro 200. Dopo la misurazione dei livelli proteici mediante il metodo del Biureto, nelle cellule sono state calcolate le unità di fluorescenza per mg di proteina. I risultati di apoptosi, CASP3, CASP8 e CASP9 sono stati presentati come incrementi percentuali rispetto al livello di pretrattamento. Per misurare ulteriormente i livelli di apoptosi cellulare, ci si è serviti anche dei coloranti propidio ioduro e Hoechst. Il colorante Hoechst 33342 può facilmente accumularsi nei nuclei delle cellule vive e mostra un'immagine blu quando stimolato dalla luce laser. Sotto stimolazione laser, il colorante propidio ioduro (PI) si accumula invece nel nucleo delle cellule danneggiate e mostra un'immagine rossa. Le cellule nelle piastre sono state trattate con PI ($4 \mu\text{M}/\text{mL}$) e Hoechst 33342 ($4 \mu\text{M}/\text{mL}$) per 15-20 minuti prima di catturare le immagini rosso/blu nelle analisi al LSM-800. Dopo aver lavato le cellule con un buffer extracellulare, è stato utilizzato un laser a diodo per stimolare il PI a 561 nm e l'Hoechst 33342 a 405 nm.

2.4 Misurazione di mROS, iROS e potenziale della membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$)

Dopo aver incubato le cellule con il reagente MitoSox Red (una sonda a fluorescenza utilizzata per analizzare la quantità di mROS) per 15-20 minuti, esse sono state lavate con un buffer extracellulare. Le immagini rosse sono poi state catturate con un microscopio LSM-800. Nelle analisi, la stimolazione del laser a diodo è stata mantenuta a 561 nm, sebbene le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione siano state mantenute rispettivamente a 576 e 598 nm. Le cellule HT-29 sono state incubate con JC-1 ($2 \mu\text{M}/\text{mL}$), un indicatore fluorescente del $\Delta\psi_m$. Quando il colorante JC-1 è stato stimolato nel LSM-800 da un laser a diodo a 561 nm, le immagini arancioni sono state registrate al microscopio. Per analizzare i livelli di iROS nelle cellule HT-29, è stata utilizzata la sonda 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). La 2',7'-diclorofluoresceina fluorescente (DCF) è stata prodotta dal DCFH-DA non fluorescente tramite ossidazione. Le cellule sono state incubate con DCFH-DA per 15-20 minuti e lavate con un buffer extracellulare. Le immagini verdi sono poi state catturate con il microscopio LSM-800. La stimolazione del laser è stata mantenuta a 488 nm per eccitare le cellule HT-29. MitoSOX Red, DCFH-DA e JC-1 sono stati acquistati dalla ThermoFisher Scientific. Le variazioni

dell'intensità della fluorescenza delle immagini sono state calcolate utilizzando il programma ZEN e i risultati sono stati presentati come unità arbitraria (a.u.).

2.5 Analisi intracellulari di $[Zn^{2+}]_i$ e glutazione (iGSH). Analisi dell'attività della glutazione perossidasi (GPx), del glutazione ridotto (rGSH) e della perossidazione lipidica (LPO).

RhodZin3/AM è una sonda fluorescente per la marcatura di Zn^{2+} utilizzata per colorare lo ione zinco nelle cellule HT-29. Le immagini verdi di RhodZin3/AM nelle cellule sono state catturate utilizzando il programma ZEN e un microscopio LSM-800 con un obiettivo a olio 40x. ThiolTracker Violet è un reagente per il rilevamento di iGSH utilizzato per analizzare i livelli di iGSH nelle cellule HT-29. Le immagini verdi del ThiolTracker Violet nelle cellule sono state acquisite usando il programma ZEN e un microscopio LSM-800 con un obiettivo a olio 40x. Il software ZEN è stato usato per calcolare le variazioni di intensità della fluorescenza nelle immagini verdi. È stato invece utilizzato lo spettrofotometro (UV-1800) per misurare l'attività della glutazione perossidasi GPx (IU/g di proteine) e la concentrazione di GSH ($\mu M/g$ di proteine) nelle cellule HT-29 (2×10^6 cellule/mL) a 412 nm. Lo spettrofotometro è stato utilizzato anche per determinare il valore di LPO ($\mu M/g$ di proteina) nelle cellule a 532 nm. La concentrazione proteica totale nelle cellule è stata misurata allo spettrofotometro a 595 nm utilizzando il reagente di Lowry.

2.6 Misurazione dell'intensità della fluorescenza di $[Ca^{2+}]_i$

Fluo/8/AM è un colorante fluorescente che può facilmente accumularsi nel citoplasma delle cellule e presenta un colore verde dopo attivazione laser (a 405 nm). Le cellule attaccate alle piastre sono state trattate con Fluo/8/AM ($1 \mu M/mL$) per 60 minuti prima di catturare le immagini verdi al LSM-800 (con obiettivo ad olio 40x). Le variazioni nell'intensità della fluorescenza dello ione calcio nelle cellule HT-29 sono state misurate dopo averle lavate con un buffer extracellulare. Per bloccare l'ingresso di calcio nelle cellule HT-29, l'antagonista di TRPV1 (CPZ $100 \mu M$) è stato impiegato prima dell'agonista di TRPV1 (CAP $10 \mu M$). I risultati medi dell'intensità della fluorescenza di Fluo/8/AM sono indicati come a.u.

2.7 Dati elettrofisiologici

A temperatura ambiente sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche di patch-clamp di cellule intere (whole cell) con un set di patch-clamp e un amplificatore EPC 10 (HEKA). I tubi capillari in borosilicato da 1,5 mm sono stati prodotti utilizzando un estrattore. La soluzione

(intracellulare) della pipetta (pH=7.3, bilanciata con KOH) è stata integrata con CaCl₂ (1 mM/L), EGTA (5 mM/L), NaCl (10 mM/L), glucosio (10 mM/L), HEPES (10 mM/L) e KCl (140 mM/L). La soluzione extracellulare (camera patch) conteneva i seguenti ingredienti (in mM/L): MgCl₂ (1), KH₂PO₄ (2), CaCl₂ (2,5), KCl (5) e glucosio (10) (pH=7,2 stabilizzato con NaOH). L'osmolarità (300 ± 20 mOsm) delle soluzioni citosoliche ed extracellulari è stata controllata usando l'osmometro Osmomat 030. Il potenziale delle cellule è stato mantenuto costante (tramite la tecnica del voltage clamp) a -60 mV. Ad una frequenza di 0.2 Hz alle cellule sono state applicate rampe da -200 a +200 mV (400 ms). Usando il software HEKA i dati della rampa sono stati ottenuti a 10 kHz e filtrati passa-basso (passaggio di sequenze sotto una certa soglia) a 1 kHz. Negli esperimenti è stato impiegato un antagonista di TRPV1 (CPZ 100 μM) per sopprimere le correnti prodotte nelle cellule dalla CAP (10 μM). I dati delle correnti di TRPV1 sono stati descritti come pA/pF.

Dopo aver presentato i dati come media e deviazione standard (SD), le analisi dei dati sono state effettuate tramite il software SPSS. Le differenze significative tra le medie dei gruppi sono state eseguite statisticamente mediante analisi della varianza ad una via. Il livello di significatività per tutti i set di test è p≤0.5 rispetto al gruppo di controllo.

3. RISULTATI

3.1 Livelli di espressione di TRPV1 nelle cellule HT-29

Innanzitutto, è stato misurato il livello di espressione di TRPV1 nella specifica linea cellulare HT-29, poiché non esistevano report precedenti. L'analisi è stata eseguita in ognuno dei quattro gruppi tramite la tecnica del Western Blot. Come mostrato in Figura 1, il livello di espressione di TRPV1 è risultato essere più alto nel gruppo SiNP rispetto al gruppo di controllo, e ancora più elevato nel gruppo 5-FU. L'espressione è ulteriormente aumentata nel gruppo SiNP + 5-FU (p≤0.5).

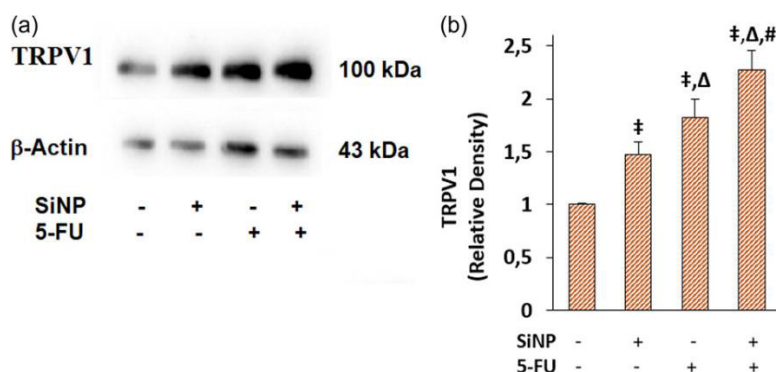


Figura 1. Livelli di espressione tramite immunoblot di TRPV1 in presenza e in assenza di SiNP e 5-FU, sia con bande su gel che con istogramma. 5-FU +

SiNP ha la banda più intensa. (Kaya, 2024)

3.2 I trattamenti con le SiNP diminuiscono ulteriormente la vitalità, il numero e il volume delle cellule HT-29 indotte dal 5-FU attraverso l'aumento dell'apoptosi e dell'attività delle caspasi. L'inibizione di TRPV1 ha ridotto la morte cellulare indotta da 5-FU e SiNP.

Nell'analisi sono stati monitorati i livelli dell'apoptosi e l'attività delle caspasi, attivate dai canali TRP. Le azioni delle SiNP sulla vitalità delle cellule tumorali, sul loro numero e sul loro volume, ma anche sull'apoptosi e sulle caspasi erano già state studiate su altri tipi di cellule. In questo caso si è voluto verificare se il processo avvenisse inalterato anche nella linea HT-29. Oltre al gruppo di controllo, sono state eseguite queste analisi anche sugli altri tre gruppi. È risultato che la vitalità, il numero e il volume delle cellule HT-29 erano inferiori nel gruppo SiNP rispetto al controllo, ma erano ancora minori nel gruppo 5-FU e nel gruppo 5-FU + SiNP. Nella Figura 2 risulta chiaro che nei gruppi a cui è stata aggiunta la capsazepina, bloccante del canale TRPV1, il risultato è stato invece opposto: nei gruppi 5-FU + CPZ e SiNP + CPZ i valori analizzati sono aumentati. Inoltre, la quantità di detriti cellulari, l'apoptosi e l'attività delle caspasi -3, -8 e -9 sono diminuite a seguito del trattamento. È risultato quindi chiaro, che la morte cellulare delle cellule tumorali avvenisse tramite l'attivazione del canale TRPV1 che, se bloccato, ne riduceva l'efficacia. L'aumento dell'utilizzo dei farmaci chemioterapici aumenta la morte delle cellule tumorali attraverso la stimolazione dei canali TRP, come affermano numerosi studi precedenti a questo. Le analisi però non erano ancora state condotte sulle cellule tumorali del colon-retto attraverso lo specifico canale TRPV1. Si vuole quindi indagare la variazione del tasso di morte in questa specifica linea cellulare dopo l'incubazione con i chemioterapici in esame. Questo consiste nel valutare la percentuale di cellule PI-positive, analisi eseguita utilizzando una telecamera CCD. La percentuale di cellule PI-positive è aumentata nel gruppo 5-FU rispetto al controllo. Sono inoltre più elevate nel gruppo SiNP e nel gruppo 5-FU + SiNP rispetto al gruppo 5-FU. Questi risultati portano alla conclusione che i chemioterapici somministrati abbiano aumentato il processo apoptotico nelle cellule tumorali. La successiva incubazione con la capsazepina porta invece ad una diminuzione della percentuale di cellule HT-29 PI-positive. La stimolazione di TRPV1 quindi sembra favorire l'apoptosi e l'attivazione delle caspasi, mentre la sua inibizione tramite il bloccante capsazepina porta a risultati opposti.

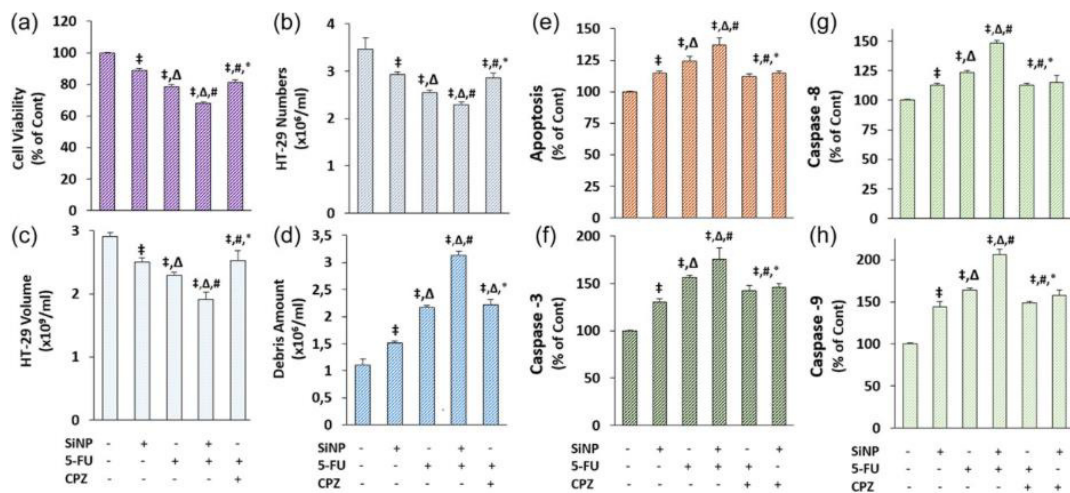


Figura 2. Istogrammi che mostrano la vitalità (a), il numero (b), il volume cellulare (c) e la quantità di detriti (d). Mostrati anche i valori di apoptosi (e) e l'attività delle caspasi (f, g, h). (Kaya, 2024)

3.3 La terapia sinergica di 5-FU e SiNP aumenta mROS, iROS e $\Delta\psi_m$ in HT-29

Diversi studi riportano l'aumento del potenziale della membrana mitocondriale a seguito di terapie antitumorali attraverso la stimolazione dei canali TRP e il conseguente influsso di calcio. La stimolazione di questi recettori può essere mediata dalla capsazicina, che apre questi canali portando all'ingresso di calcio con conseguente stimolazione dell'apoptosi. La capsazepina, al contrario, si è visto diminuire la tossicità dei farmaci chemioterapici.

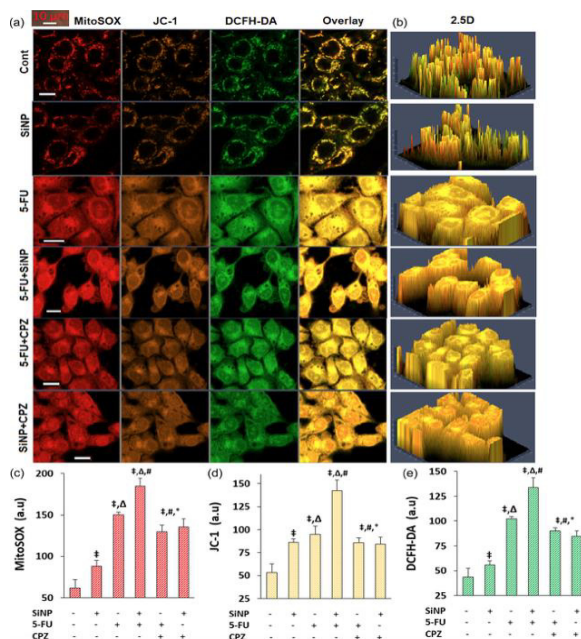


Figura 3. Fluorescenza di mROS (con MitoSOX), iROS (con DCFH-DA) e $\Delta\psi_m$ (con LC-1). (Kaya, 2024).

Per le analisi sulla quantità di mROS e iROS e $\Delta\psi_m$ sono stati utilizzati un microscopio LSM-800 e vari dyes colorati: MitoSox nel rosso per evidenziare gli mROS, JC-1 nell'arancione per valutare il potenziale di membrana mitocondriale, DCFH-DA nel verde per analizzare gli iROS e la

loro sovrapposizione per avere una visione generale. Sono state ottenute anche immagini 2.5D. Tutti questi risultati sono mostrati nella Figura 3. I livelli di tutti i coloranti sono maggiori nel gruppo SiNP rispetto al gruppo di controllo. Aumentano poi ancora nel trattamento con 5-FU, ma i livelli massimi si hanno nel gruppo 5-FU + SiNP. I livelli vanno poi a decrescere dopo il trattamento con la capsazepina.

3.4 Il livello di iGSH, rGSH e l'attività GPx sono diminuiti attraverso l'aumento di $[Zn^{2+}]_i$ e LPO mediante le incubazioni con SiNP e 5-FU. Le SiNP stimolano ulteriormente l'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ indotto dal 5-FU.

Molte evidenze in diversi studi dimostrano che l'aumento di $[Zn^{2+}]_i$ nei mitocondri aumenti la lipoperossidazione, con conseguente diminuzione di iGSH, rGSH e GPx. Inoltre, l'ingresso di Zn^{2+} dipende fortemente dall'attivazione di TRPV1. TRPV1 è a sua volta stimolato dalla carenza di glutatione. Sono quindi stati analizzati i livelli di rGSH, GPx, LPO, Zn^{2+} e iGSH nella linea HT-29 (Tabella 1).

Valori	Controllo	SiNP	5-FU	SiNP + 5-FU
GPx (IU/g proteina)	19.20±1.24	16.00±1.25	12.90±2.21	9.72±1.69
rGSH (microM/g proteina)	12.50±0.79	10.90±0.47	8.95±0.59	6.77±0.84
LPO (microM/g proteina)	19.11±0.82	23.86±2.92	28.50±1.84	32.72±1.75

Tabella 1. Vengono mostrati i livelli di GPx, rGSH e LPO nei vari gruppi, con i relativi errori assoluti. I dati riportati hanno $p \leq 0.5$.

I livelli di $[Zn^{2+}]_i$ e LPO sono maggiori nei gruppi 5-FU e SiNP rispetto al controllo, e ancora più alti nella combinazione dei due. La capsazepina ha ancora una volta ridotto i livelli. Per quanto riguarda gli antiossidanti analizzati, invece, sono bassi in 5-FU e SiNP, ancora più bassi in 5-FU + SiNP, e in accordo con le aspettative, più elevati nei gruppi incubati con la capsazepina. È stato inoltre usato il microscopio LSM-800 per misurare i livelli di fluorescenza del calcio attraverso TRPV1, scattando foto nel verde attraverso l'utilizzo di Fluo/8/AM nei quattro gruppi. La concentrazione di calcio dopo la stimolazione indotta dalla capsaicina è maggiore nei gruppi SiNP e 5-FU rispetto al controllo, ed è ulteriormente aumentata nel gruppo combinato. Come previsto, la quantità di calcio è ridotta dopo la somministrazione della capsazepina. Sono anche state effettuate immagini dipendenti dal tempo, che hanno confermato i risultati (Figura 4). Questi

risultati, mediati da Fluo/8/AM, hanno supportato l'ipotesi del contributo di TRPV1 all'efficacia delle SiNP e del 5-FU. Gli stessi dati sarebbero probabilmente stati ottenuti anche con analisi spettrofluorimetriche. Il colorante Fura-2, infatti, si lega al calcio in modo specifico, potendo agire quindi come indicatore delle variazioni della concentrazione di calcio citosolica.

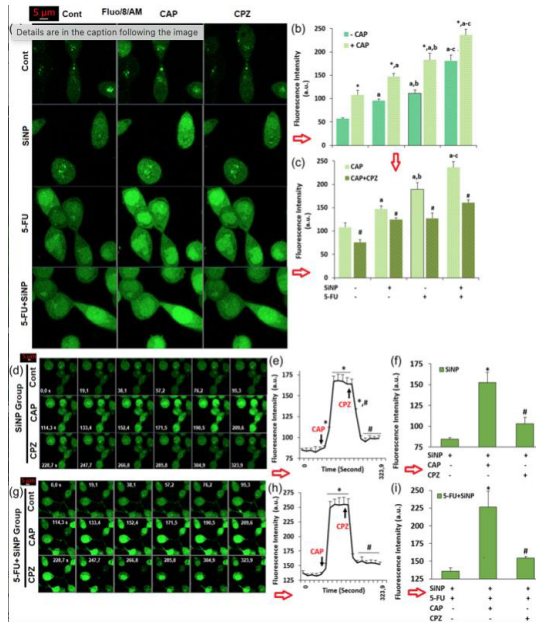
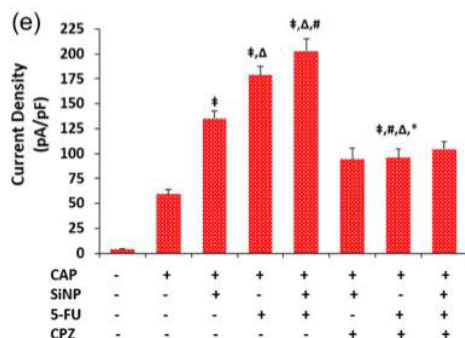


Figura 4. Grafici che mostrano la concentrazione del calcio. Sono state usate immagini a fluorescenza (a,d,g) e istogrammi (f,i), oltre a diagrammi a linea (e,h). (Kaya, 2024).

3.5 L'azione sinergica di 5-FU e SiNP sulla densità di corrente di TRPV1

Tramite la tecnica del patch clamp, sono state misurare le correnti che attraversano il canale TRPV1. Il gruppo di controllo è caratterizzato da correnti basse. Queste correnti però vengono aumentate dalla sola presenza della capsaicina, poiché stimola l'apertura di TRPV1, portando la corrente media a 59,33 pA/pF. Le correnti aumentano ulteriormente nei gruppi SiNP (135,40 pA/pF), 5-FU (179,02 pA/pF) e SiNP + 5-FU (202,69 pA/pF). Gli istogrammi relativi sono mostrati in Figura 5. Il canale viene attivato in modo reversibile da CAP. Le correnti diminuiscono significativamente dopo l'aggiunta della capsazepina. Questi risultati dimostrano che l'esposizione alle SiNP aumenta la concentrazione di calcio nelle cellule attraverso la stimolazione del canale TRPV1 mediata dal 5-FU.



nelle cellule attraverso la stimolazione del canale TRPV1 mediata dal 5-FU.

Figura 5. Densità della corrente attraverso TRPV1 misurata tramite esperimenti di patch clamp. (Kaya, 2024).

4. DISCUSSIONE

In questo studio è stata analizzata la potenziale efficacia delle nanoparticelle d'argento nei trattamenti antitumorali, sia da sole che in combinazione con il 5-fluorouracile, un potente chemioterapico già ben noto. I risultati hanno riportato all'unisono una risposta affermativa: soprattutto se in combinazione, SiNP e 5-FU lavorano sinergicamente per aumentare i livelli di LPO, $[Ca^{2+}]_i$, $[Zn^{2+}]_i$, iROS, mROS, morte apoptotica tramite l'attivazione di CASP3, CASP8 e CASP9 e, al contrario, diminuire l'azione degli antiossidanti iGSH, rGSH e GPx. È stato inoltre dimostrato che questi chemioterapici agiscono attivando TRPV1, che ne amplifica il risultato. Inibendo questo canale tramite il bloccante capsazepina, infatti, si nota una diminuzione dell'attività proapoptotica.

Nei tumori, la proliferazione delle cellule maligne è indotta spesso dall'eccessiva generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia mitocondriali, causate principalmente dalla respirazione cellulare, che intracellulari, causate da processi come la beta-ossidazione degli acidi grassi o dall'attività dei fagociti del sistema immunitario. Le cause possono essere anche esterne, come condizioni di stress, radiazioni UV, alcol e fumo. Può sembrare, quindi, una contraddizione, che agenti chemioterapici come il 5-fluorouracile uccidano le cellule tumorali tramite un'eccessiva generazione di ROS. Per comprenderne il significato, in questo studio sono stati anche misurati i livelli di queste specie reattive. È proprio per questo motivo che pazienti sottoposti a terapie che si servono di antiossidanti non hanno portato alla morte delle cellule tumorali, ma anzi ne hanno aumentato l'incidenza. È il caso, ad esempio, della proposta di Linus Pauling negli anni '70, il quale ha avanzato l'ipotesi che un supplemento di vitamina C potesse fungere da antiossidante nella lotta contro i tumori. Ad oggi quest'idea, dopo vari studi, è stata completamente surclassata. È necessaria quindi un'azione pro-ossidante, che induca talmente tanto stress nelle cellule tumorali da indurle all'apoptosi. (*Fondazione Umberto Veronesi, 2015*).

I meccanismi di proliferazione e apoptosi sono mediati dalla concentrazione intracellulare di calcio. Un aumento di questa concentrazione provoca un aumento del potenziale della membrana mitocondriale, con conseguente aumento di mROS, quindi maggiore stress ossidativo, che stimola i canali cationici ad aprirsi, incrementando ulteriormente la concentrazione di calcio attraverso l'instaurarsi di un ciclo a feedback positivo e portando le cellule all'apoptosi tramite l'attivazione di caspasi proapoptotiche (CASP3, CASP8 e CASP9). Tra questi canali, in questo contesto vengono presi in considerazione soprattutto quelli della superfamiglia TRP (*transient receptor potential*), recettori cationici responsabili di molteplici processi fisiologici.

Uno dei metodi sperimentati per le tecniche più innovative dei farmaci chemioterapici è, come appena accennato, l'aumento dello stress ossidativo nelle cellule tumorali. Si è sempre pensato infatti che la presenza di ROS portasse all'aumento della proliferazione cellulare nei tumori, contrariamente alla condizione fisiologica. Recentemente, però, sono stati eseguiti studi che supportano l'ipotesi che livelli superiori di ROS portino alla proliferazione tumorale. Se questi livelli vengono portati all'esasperazione provocano invece l'effetto opposto, ovvero l'apoptosi, causando un danno troppo elevato alla cellula per poter sopravvivere. È per questo motivo che nel presente studio sono stati analizzati anche i livelli di questi antiossidanti: il canale TRPV1 opera, proprio come ci si aspettava da queste premesse, diminuendo la quantità di antiossidanti come iGSH, rGSH e GPx, aumentando la generazione di ROS, i quali provocano danno cellulare e condizioni di stress, che permettono l'attivazione delle caspasi proapoptotiche. Erano già stati condotti studi precedenti sull'azione delle nanoparticelle d'argento su altri tipi di tumori, come il cancro al seno su cellule MCF-7 e al fegato su cellule HepG2. I risultati di questi studi coincidono con quelli del presente studio. Oltre alle nanoparticelle d'argento sono anche state analizzate, in altri studi, quelle di solfuro di rame o di idrossiapatite. Tutte queste nanoparticelle hanno come target le caspasi, che vengono attivate e agiscono stimolando, ancora una volta, l'apoptosi. Tutti questi risultati sono stati ribaltati dall'incubazione con la capsazepina: diminuiscono i ROS e la lipoperossidazione, mentre aumentano i livelli degli antiossidanti. Questa evidenza dimostra l'importanza dell'attivazione del canale TRPV1 nella lotta contro i tumori: i chemioterapici come il 5-FU o le nanoparticelle vanno incontro ad una diminuita efficacia antitumorale se non possono attivare questo recettore. La stimolazione di TRPV1, infatti, permette l'aumento del $\Delta\psi_m$ tramite l'ingresso di Ca^{2+} e Zn^{2+} , che portano il potenziale di membrana ad un potenziale meno negativo. Questa depolarizzazione aumenta la produzione di ROS attraverso la downregolazione del *glutathione thiol redox system*, riducendo il suo effetto antiossidante.

La cellula può andare in direzione apoptotica tramite due vie: la via intrinseca e la via estrinseca. Quest'ultima è determinata da fattori esterni alla cellula, che si legano ai *death receptors*, mentre la via intrinseca è causata da segnali interni come un eccessivo stress cellulare (es. aumento di ROS). Le vie poi attivano anche caspasi diverse. Da questo studio è facile intuire che vengono attivate entrambe le vie nel caso del cancro al colon-retto, poiché viene aumentata sia l'attività della caspasi-8 (via estrinseca) che della caspasi-9 (via intrinseca). Entrambe queste caspasi sono dette caspasi "iniziatrici", poiché sono tra le prime ad essere attivate, ed il loro compito è quello di tagliare le caspasi "effettrici", tra cui CASP3, attivandola. Diversi esperimenti indicano come il meccanismo di funzionamento di

TRPV1 cambi radicalmente in base al tipo di tumore. Dagli studi di Yang Y. et al. è stato dimostrato infatti che in tumori come quello al colon-retto TRPV1 viene espresso a livelli molto bassi e in questo modo viene favorita la crescita tumorale attraverso l'attivazione del pathway calcineurina-ATF3-p53, e una conseguente stimolazione di TRPV1 porterebbe quindi al blocco della crescita tumorale e all'apoptosi. In tumori invece come quello alla prostata, è proprio la mancanza di TRPV1 stesso ad inibire la crescita tumorale.

In conclusione, le SiNP, nell'esplicare il loro effetto antitumorale, stimolano il canale TRPV1 e la loro presenza aumenta l'azione del 5-FU. Le SiNP, infatti, hanno aumentato le prestazioni del 5-FU, come dimostrato da un ulteriore aumento di mROS, iROS, LPO, $[Ca^{2+}]_i$, $[Zn^{2+}]_i$, $\Delta\psi_m$, corrente attraverso TRPV1, e da un'ulteriore diminuzione di iGSH, rGSH e GPx. L'inibizione del canale TRPV1 tramite capsazepina, invece, ha dimostrato il coinvolgimento del recettore nell'aumentare l'efficacia di questi trattamenti. La capacità apoptotica dopo l'incubazione con la capsazepina, infatti, è diminuita, mentre è aumentato l'effetto antiossidante nella cellula.

I prossimi obiettivi dovranno consistere nella messa a punto di tecniche adeguate per studiare gli effetti di questi chemioterapici innovativi anche su altri tipi di tumori, oltre al seno, al fegato e al colon-retto qui analizzato. Questo studio, inoltre, riguarda analisi su cellule nelle prime fasi della patologia, mentre sarebbe adeguato studiarne gli effetti anche in stadi avanzati e con metastasi più estese. Non è ancora chiaro, infatti, se i chemioterapici recentemente scoperti come le SiNP possano assolvere la loro funzione anche in presenza di metastasi in stadio avanzato. Inoltre, è possibile che TRPV1 non sia l'unico canale che si apre in seguito alla stimolazione tramite possibili farmaci antitumorali. Studi adeguati andrebbero eseguiti anche su canali simili che abbiano già a disposizione in natura attivanti e bloccanti, come in questo caso, rispettivamente, la capsaicina e la capsazepina. Anche questi canali, infatti, potrebbero contribuire tramite un'azione sinergica al miglioramento dell'efficacia di queste tecniche. Questa è anche proprio una delle limitazioni di questo studio. È indiscusso che il recettore TRPV1 sia un importante regolatore di questo meccanismo analizzato, ma potrebbe non essere il solo. Altri canali come TRPM7 e TRPV4 potrebbero aver influenzato alcuni dati. Perciò, oltre all'espandere questi studi su altri canali, sarebbe bene accertarsi che i risultati qui ottenuti non siano influenzati da altri canali e siano caratteristici solamente di TRPV1. Si potrebbero suggerire altri tipi di analisi, per avere a disposizione più dati che supportino i risultati già ottenuti in questo studio. Un possibile progresso in questa direzione potrebbe essere la misurazione del livello di espressione del gene myc, spesso sovraespresso nella maggior parte dei tumori, analizzando come cambia il suo livello in conseguenza a terapie chemioterapiche e all'attivazione del recettore

TRPV1. Inoltre, si potrebbe rilevare la presenza di fattori legati all'apoptosi, come Apaf1, oppure di proteine appartenenti al dominio CARD. Un altro progresso potrebbe consistere nelle analisi dei livelli di calcio allo spettrofotometro tramite il colorante Fura-2, potendo ottenere in questo modo un'altra conferma che irrobustisca ulteriormente i dati ottenuti in questo studio.

5. BIBLIOGRAFIA

- Fondazione AIOM, editor. *I numeri del cancro in Italia 2023*. Intermedia, 2023. *Aiom*, https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2023/12/2023_AIOM_NDC-web.pdf , pp.146–147
- “Tumore colon-retto: sintomi, prevenzione, cause, diagnosi.” *AIRC*, 1 October 2021, <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-colon-retto>. Accessed 16 May 2024.
- Sethy, Chinmayee, and Chanakia Nath Kundu. “5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition.” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 137, Maggio 2021. *Pubmed*.
- Gu, Junjie et al. “Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model.” *Oncology Letters*, vol. 18, 2019, pp. 2091-2101.
- “Troppi antiossidanti possono far crescere un tumore.” *Fondazione Umberto Veronesi*, 30 October 2015, <https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/oncologia/troppi-antiossidanti-possono-far-crescere-un-tumore>. Accessed 17 May 2024.
- Mathur, Prateek. “Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles.” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 46, 2018. *Pubmed*.
- Amato Francesco ed Erminia Gilda Morrone. “L'ampia distribuzione dei recettori TRPV1: espressione e funzione nei diversi apparati e distretti anatomici.” *Pathos*, 2017, https://www.pathos-journal.com/2017_2_178.html. *Pubmed*.
- Jiang, Xuehui et al. “The ion channel TRPV1 gain-of-function reprograms the immune microenvironment to facilitate colorectal tumorigenesis.” *Cancer Letters*, vol. 527, 2022, pp. 95-106. *Pubmed*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34920021/>.
- Sung, Bokyoung et al. “Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROS-JNK-CHOP-

mediated upregulation of death receptors.” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 53, 2012, pp. 1977-1987. *Pubmed*.

- (Yang, Yuqi et al. “Downregulated TRPV1 Expression Contributes to Melanoma Growth via the Calcineurin-ATF3-p53 Pathway.” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 138, 2018, pp. 2205-2215.). *Pubmed*.

RESEARCH ARTICLE

Silver nanoparticles stimulate 5-Fluorouracil-induced colorectal cancer cells to kill through the upregulation TRPV1-mediated calcium signaling pathways

Müge Maviöglü Kaya 

Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Kafkas University, Kars, Türkiye

Correspondence

Müge Maviöglü Kaya, Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Kafkas University, Kars TR-36100, Türkiye.

Email: m.mavioglu@hotmail.com

Funding information

BSN Health, Analysis and Innovation Ltd. Göller Bölgesi Teknokenti, Isparta, Türkiye, Grant/Award Number: 2022-03

Abstract

The involvement of the TRP vanilloid 1 (TRPV1) cation channel on the 5-Fluorouracil (5-FU)-caused Ca^{2+} signals through the activation of the apoptotic signaling pathway and stimulating the mitochondrial Ca^{2+} and Zn^{2+} accumulation-induced reactive oxygen species (ROS) productions in several cancer cells, except the colorectal cancer (HT-29) cell line, was recently reported. I aimed to investigate the action of silver nanoparticles (SiNPs) and 5-FU incubations through the activation of TRPV1 on ROS, apoptosis, and cell death in the HT-29 cell line. The cells were divided into four groups: control, SiNP (100 μM for 48 h), 5-FU (25 μM for 24 h), and 5-FU + SiNP. SiNP treatment through TRPV1 activation (via capsaicin) stimulated the oxidant and apoptotic actions of 5-FU in the cells, whereas they were diminished in the cells by the TRPV1 antagonist (capsazepine) treatment. The apoptotic and cell death actions of 5-FU were determined by increasing the propidium iodide/Hoechst rate, caspase-3, -8, and -9 activations, mitochondrial membrane depolarization, lipid peroxidation, and ROS, but decreasing the glutathione and glutathione peroxidase. The increase of cytosolic free Ca^{2+} and Zn^{2+} into mitochondria via the stimulation of TRPV1 current density increased oxidant and apoptotic properties of 5-FU in the cells. For the therapy of HT-29 tumor cells, I found that the combination of SiNPs and 5-FU was synergistic via TRPV1 activation.

KEYWORDS

5-Fluorouracil, apoptosis, colorectal cancer, mitochondria, silver nanoparticles, TRPV1 channel

1 | INTRODUCTION

The colorectal cancer-related death rate is high in both men and women in several counties, and it is the third most commonly diagnosed cancer in patients. However, it is the leading cause of mortality in men under the age of 50 and ranks second overall in cancer-related deaths (Siegel et al., 2023). The excessive generation of mitochondrial (mROS) and intracellular (iROS) reactive oxygen species during physiological and pathological

processes induces colorectal cancer cell proliferation (Basak et al., 2020). Nevertheless, most chemotherapeutic agents, including cisplatin and 5-Fluorouracil (5-FU), kill colorectal cancer cells via excessive generation of mROS and iROS (Afrin et al., 2021; Dey et al., 2020). Hence, antioxidant supplementations did not reduce, but rather increased, incidence and mortality in the patients with cancer (Gorrini et al., 2013). It seems that the prooxidant properties of the antioxidants via excessive generations of iROS and mROS in cancer cells may

represent an effective alternative antitumor strategy to current systemic treatments (Akyuva & Naziroğlu, 2023; Kaya et al., 2023; Nur et al., 2017). In addition, the chemotherapeutic agents have several harmful side effects on prognosis, quality of life, and waste of health care resources in patients with cancer, although the antioxidants have no adverse action during the killing of cancer cells (Tasdogan et al., 2021). The development of more effective adjuvant therapies after the insufficiency of chemotherapeutic therapies for advanced or recurrent disease represents an urgent need for colorectal cancer patients.

5-FU as a chemotherapeutic agent has been used in the treatment of tumor cells, including colorectal tumor cells (Afrin et al., 2021; Li et al., 2023). When 5-FU is combined with natural chemicals such as strawberry tree honey and tangerine, its antitumor and oxidant actions increase (Afrin et al., 2021; Dey et al., 2020). It has adverse cellular apoptosis and highly therapeutic resistance in later stages (González-Vallinas et al., 2013), although the resistance is decreased by the increase of iROS and mROS (Vladu et al., 2022). In the treatment of 5-FU, there are some problems, such as effectiveness, overcoming chemo resistance, and toxicity effects. Hence, a new possible combination application is necessary for solving the problems of 5-FU.

Cell proliferation and death signaling mechanisms are arranged by the increase of the intracellular free calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) (Naziroğlu, 2007). The increase in $[Ca^{2+}]_i$ concentration causes an increase in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). In turn, its increase stimulates three main pathways: (1) an increase in mROS production; (2) stimulation of Ca^{2+} permeable cation channels; and (3) the induction of apoptosis and cancer cell death via the stimulation of active caspase-3 (CASP3), -8 (CASP8), and -9 (CASP9) (Öz & Çelik, 2023; Xu et al., 2020). The transient receptor potential (TRP) is a superfamily of Ca^{2+} permeable cation channels. The superfamily has 28 members in mammals, and TRPV1 (TRPV1) is one of the members (Shimizu et al., 2014). TRPV1 is activated by a variety of stimuli, including capsaicin (CAP) from hot chili peppers and mROS products, although it is blocked by capsazepine (CPZ) (Caterina et al., 1997; Naziroğlu, 2017). TRPV1 activation raised caspase and apoptosis levels in various cancer cell lines (Li et al., 2021; Nur et al., 2017). Recent data have shown that chemotherapeutic agents (e.g., cisplatin and 5-FU)-mediated Ca^{2+} signals via TRPV1 activation stimulate the apoptotic signaling pathway and stimulate mitochondrial Ca^{2+} and Zn^{2+} accumulation-induced mROS and iROS production in several cancer cells, with the exception of the colorectal cancer cell line (Deveci et al., 2018; de la Harpe et al., 2022; Sakallı Çetin et al., 2017). Hence, TRPV1 channel stimulation induces chemicals that can be used as possible therapeutic agents in cancer treatments to promote tumor death and apoptosis (Liu et al., 2022; Zhou et al., 2022), and TRPV1 stimulation-mediated oxidants can potentiate the antitumor action of 5-FU in colorectal (HT-29) cells.

In the cell line experiments, the treatment of silver nanoparticles (SiNPs) induced anticancer action (Fahrenholtz et al., 2017), although conflicting reports are also present (Dağlıoğlu et al., 2023). It was demonstrated that cancer cell oxidative damage and tumor death were increased through the stimulation of TRP melastatin 2 (TRPM2), mROS, and iROS by the treatments of SiNPs (Akyuva & Naziroğlu, 2023). SiNPs may also interfere with crucial tumor cell hallmarks by raising $[Ca^{2+}]_i$ concentration and caspase-mediated apoptosis levels (Asharani et al., 2009; Li et al., 2018). Contrary to this, the antioxidant and TRP ankyrin 1 (TRPA1) channel blocker activations of SiNP against oxaliplatin-induced dorsal root ganglion death and TRPA1 activator actions were reported in mice (Gao et al., 2017). Recently, it was reported that the treatment of SiNPs induced synergic action against several cisplatin-resistant tumor cell lines through the activation of CASP3, CASP8, and CASP9. SiNPs (Akyuva & Naziroğlu, 2023) and 5-FU may operate synergistically to inhibit HT-29 cells because of their different actions on the control of Ca^{2+} signaling and apoptosis.

Understanding how SiNP and 5-FU-caused Ca^{2+} influx, ROS production, and apoptosis induction via TRPV1 activation stimulate or prevent ROS-dependent HT-29 cell death is mandatory to design alternative therapies. I suggest that synergetic SiNP toxicity via TRPV1 stimulation may be useful for enhancing the widely used conventional 5-FU therapy.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Cell culture

The HT-29 colorectal cells (Atlas Biotechnology Laboratory Equipment Ltd.) were used in the current study. The HT-29 cells were incubated in a medium mixture of DMEM (50%) and Hams' F12 (50%) with low glucose (1 g/L) (Capricorn GmbH). Fetal bovine serum (10%) and penicillin-streptomycin (1%) (both from Diagnostics Inc.) were also added to the medium mixtures. In the laser scan confocal microscope (LSM-800) (Zeiss) investigations, I used attached cells in glass bottom dishes (35 mm) (Mattek Corporation Inc.). In the remaining analyses, the 2×10^6 cells were seeded in T25 cm² flasks with filter caps.

2.2 | Study groups

The HT-29 cells were separated into four groups, which are as follows: (1) the control (Cont) group, where the cells were maintained in the same cell culture conditions for 24–48 h; (2) the 5-FU group, which received 25 μ M 5-FU for 24 h (Deveci et al., 2018); (3) the SiNP group, which received 100 μ M SiNP for 48 h; and (4) the 5-FU + SiNP group, which received both. In some experiments, the cells were further incubated with 100 μ M CPZ for 1 h (Akyuva & Naziroğlu, 2023).

2.3 | Immunoblotting in the HT-29 cells for the TRPV1 channel

To my knowledge, there was no report on the TRPV1 expression in the HT-29 cells. Hence, I first performed Western blot protein expression analyses in the frozen HT-29 cells according to the standard protocols (Kaya et al., 2023). The antibodies for β -actin and TRPV1 (an anti-VR1 antibody) (Cat #: ab10296 and 1:200) were purchased from Abcam. Secondary antibodies were purchased from GE Healthcare. The concentration of proteins was internally controlled using rabbit β -actin (1:2000). The protein band intensities of β -actin and TRPV1 were recorded in a Gel Imagination System (G:Box Gel Imagination System; Syngene) by using the ECL Western HRP Substrate. The protein band intensities were presented as relative densities in the column graphics.

2.4 | Assays for cell viability, cell count, cell volume, and debris amount

The automatic cell counter (Casy Model TT) was used to measure the cell viability, cell volume, cell count, and debris levels (González-Vallinas et al., 2013). Debris is an organic waste product left over when a cell dies. Although debris amount and cell number were expressed as $\times 10^6/\text{mL}$, the results of cell viability and cell volume were presented as a percent change and $\times 10^9/\text{mL}$.

2.5 | Assays of apoptosis, CASP3, CASP8, and CASP9

For the apoptosis assay of HT-29 cells in a spectrophotometer (UV-1800; Shimadzu), an APOPercentage commercial kit (Bicolor Ltd.) was used (Akyuva & Naziroğlu, 2023; Nur et al., 2017). In the assay, a pink-colored dye at the stage of the phosphatidylserine transmembrane movement was taken by the apoptotic cells, and its uptake occurred simultaneously until blebbing occurred. The color changes were recorded at 550 nm in the spectrophotometer.

The activities of CASP3, CASP8, and CASP9 were assayed as previously reported with minor modifications (Akyuva & Naziroğlu, 2023). A protease substrate of CASP3 is N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin, and it is activated by apoptotic conditions. N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-Trifluoromethylcoumarin and N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-Trifluoromethylcoumarin are also fluorogenic substrates for CASP8 and CASP9, respectively. The three substrates were purchased from Cayman Chemical, and cleavages of the substrates were analyzed at 380–460 in a plate reader (Infinite PRO 200; Tecan Austria GmbH).

After measurement of protein levels through the Biuret method, fluorescence units per mg protein were calculated in the cells. The results of apoptosis, CASP3, CASP8, and CASP9 were presented as percentage-increases over the pretreatment level.

2.6 | Measurements of mROS, iROS, and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$)

MitoSOX Red reagent is a fluorescence probe, and it has been used for assaying the mROS. After incubating the cells with the MitoSOX Red reagent for 15–20 min, they were washed with the extracellular buffer. Then the red images were captured with an LSM-800 microscope. In the analyses, the diode laser stimulation was kept at 561 nm, although excitation and emission wavelengths were kept at 576 and 598 nm, respectively.

JC-1 is a fluorescent indicator of $\Delta\Psi\text{m}$. The HT-29 cells were incubated with JC-1 (2 $\mu\text{M}/\text{mL}$) (Joshi & Bakowska, 2011; Keil et al., 2011). When the JC-1 dye was stimulated in the LSM-800 by a diode laser at 561 nm, the orange images of JC-1 were recorded in the microscope (Akyuva & Naziroğlu, 2023).

For assaying the iROS levels in the HT-29 cells, a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe was used. The fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was produced from the nonfluorescent DCFH-DA under oxidation (Joshi & Bakowska, 2011; Keil et al., 2011). The cells were incubated with DCFH-DA for 15–20 min, and they were washed by the extracellular buffer. Then the green images were captured with an LSM-800 microscope. The diode laser stimulation was kept at 488 nm to excite the HT-29 cells.

MitoSOX Red (Cat #: M36008), DCFH-DA (Cat #: C6827), and JC-1 (Cat #: T3168) were purchased from ThermoFisher Scientific. The fluorescence intensity changes of the images were calculated using the ZEN program (Zeiss), and the results were presented as an arbitrary unit (a.u.).

2.7 | Cell death rate assays

The dye Hoechst 33342, which may easily accumulate in the nuclei of living cells and represent a blue image when stimulated by laser light. Under laser stimulation, the propidium iodide (PI) dye accumulates in the nucleus of injured cells and represents the red image. The cells in the dishes were treated with PI (4 $\mu\text{M}/\text{mL}$) and Hoechst 33342 (4 $\mu\text{M}/\text{mL}$) (Cell Signaling Technology) for 15–20 min before capturing the red/blue (PI/Hoechst) pictures in the LSM-800 analyses (objective: 40 \times oil) (Akyuva & Naziroğlu, 2023). After washing the cells with extracellular buffer, the diode laser was used to stimulate PI at 561 nm, while the laser was used to stimulate Hoechst 33342 at 405 nm. The number of PI-positive cells in the images was counted using the ZEN program (blue edition 3.2).

2.8 | Intracellular free Zn^{2+} ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) and glutathione (iGSH) analyses

RhodZin3/AM (1 $\mu\text{M}/\text{mL}$) (Cat #: T24195, ThermoFisher Scientific) is a fluorescent probe for Zn^{2+} labeling that was utilized to stain the $[\text{Zn}^{2+}]_i$ in HT-29 cells. The green images of RhodZin3/AM in the cells

were captured using the ZEN program and an LSM-800 microscope with a 40× oil objective (Ext: 404 nm, Emi: 526 nm).

ThiolTracker Violet (Cat #: T10095, ThermoFisher Scientific) is an iGSH detection reagent that was used to analyze iGSH levels in HT-29 cells. The green pictures of ThiolTracker Violet in the cells were acquired using the ZEN program and an LSM-800 microscope with a 40× oil objective (Ext: 405 nm, Emi: 526 nm) (Düzova et al., 2021).

The ZEN software (blue edition 3.2) was used to calculate the fluorescence intensity changes in the green images, and the findings were given as a.u.

2.9 | The GPx activity, reduced glutathione (rGSH), and lipid peroxidation (LPO) analyses

The spectrophotometer (UV-1800) was used to measure GPx activity (IU/g protein) and GSH concentration ($\mu\text{g/g}$ protein) in HT-29 cells (2×10^6 cells/mL) at 412 nm (Lawrence & Burk, 1976; Sedlak & Lindsay, 1968). The spectrophotometer was also used to determine the LPO value ($\mu\text{g/g}$ protein) in the cells at 532 nm (Placer et al., 1966). The total protein concentration in the cells was measured in the spectrophotometer at 595 nm using Lowry's reagent.

2.10 | Measurement of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluorescence intensity

Fluo/8/AM is a fluorescent dye that may easily accumulate in the cytoplasm of cells and exhibits a green color under laser activation (at 405 nm). The attached cells in the dishes were treated with Fluo/8/AM (1 $\mu\text{M}/\text{mL}$) (Cell Signaling Technology) for 60 min before capturing the green images in the LSM-800 analysis (with 40× oil objective) (Akyuva & Naziroğlu, 2023). The variations in fluorescence intensity of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HT-29 cells were measured after washing them with extracellular buffer (Akyuva & Naziroğlu, 2023). To block Ca^{2+} entry in the HT-29 cells, the TRPV1 antagonist (100 μM CPZ) was employed before the TRPV1 agonist (10 μM CAP). The average Fluo/8/AM fluorescence intensity results were indicated as a.u.

2.11 | Electrophysiology data

At room temperature, whole-cell patch-clamp electrophysiological recordings were made with a patch-clamp set and an EPC 10 amplifier (HEKA). The 1.5 mm borosilicate capillary tubes (GB150F-10; Science Products) were produced using a puller (PC-10; Narishige). The details of intracellular and extracellular solutions used in the records were shown in a previous study (Akyuva & Naziroğlu, 2023). The pipette (intracellular) solution (measured in mM/L; pH = 7.30, balanced with KOH) was supplemented with CaCl_2 (1), EGTA (5), NaCl (10), glucose (10), HEPES (10), and KCl (140). The extracellular (patch-chamber) solution contained the following ingredients (in mM/L): MgCl_2 (1), KH_2PO_4 (2), CaCl_2 (2.5), KCl (5),

and glucose (10) (pH = 7.2, fixed with NaOH). In some experiments, I substituted NMDG⁺ solution for Na⁺ in the extracellular buffer. The osmolality (300 ± 20 mOsm) of cytosolic and extracellular solutions were checked by using Osmomat 030 osmometer (Gonotec GmbH). The holding potential of the cells was kept constant at -60 mV. At a frequency of 0.2 Hz, ramps from -200 to $+200$ mV (400 ms) were applied to the cells. Using HEKA software, ramp data were obtained at 10 kHz and low-pass filtered at 1 kHz. A TRPV1 antagonist (100 μM CPZ) was employed in the experiments to suppress TRPV1 currents produced in cells by CAP (10 μM). The TRPV1 current data were shown as pA/pF.

2.12 | Statistical analyses

After presenting the data as mean and standard deviation (SD), the data analyses were carried out via the SPSS software (version 24.0). Significance differences between the means of groups were statistically performed by one-way analysis of variance. The level of significance for all test sets is $p \leq .05$, compared to the control group.

3 | RESULTS

3.1 | TRPV1 expression levels in the HT-29 cells

To my knowledge, there was no report on the presence of the TRPV1 channel in the HT-29 cells. As a first aim of the current study, I performed TRPV1 expression levels in the four groups by using Western blot analyses (Figure 1a). The TRPV1 expression level was higher in the SiNP group than in the Cont group ($p \leq .05$) (Figure 1b). In addition, its expression level was further increased in the 5-FU and 5-FU + SiNP groups as compared to the SiNP group ($p \leq .05$).

3.2 | The treatments with SiNP stimulate 5-FU-induced decreases of HT-29 viability, number, and volume through increases in apoptosis and caspase activities

The chemotherapeutic agent-induced cell viability, number, and volume changes were arranged via the activation of TRP channels in the tumor cells by the increases in apoptosis and caspases (Deveci et al., 2018; Sakallı Çetin et al., 2017). Except for HT-29, the tumor cell killer actions of SiNP through the modulation of cell viability, volume, number, apoptosis, and caspases were investigated in tumor cells (Dağlıoğlu et al., 2023; Li et al., 2018). In the second aim of the present study, the 5-FU and SiNP-induced modulations of cell viability, volume, number, apoptosis, CASP3, CASP8, and CASP9 in the HT-29 cells were investigated. The HT-29 viability (Figure 2a), numbers (Figure 2b), and volume (Figure 2c) were lower in the SiNP group than in the Cont group ($p \leq .05$), although they were further decreased in the 5-FU and

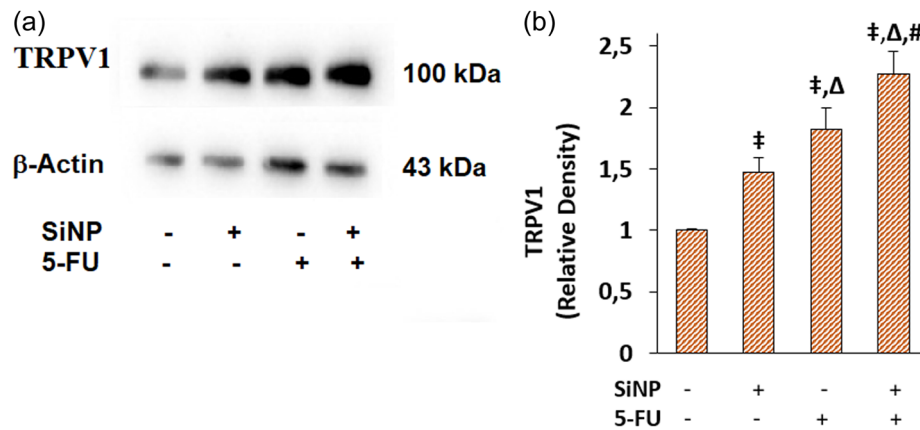


FIGURE 1 Silver nanoparticle (SiNP) treatment further increased the 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μ M for 24 h)-TRP vanilloid 1 (TRPV1) expression levels in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 3$). (a) Protein bands of TRPV1 and β -actin. (b) Mean values of the protein bands in the four group. ($\ddagger p \leq .05$ versus Cont; $\Delta p \leq .05$ versus SiNP; $\# p \leq .05$ versus 5-FU).

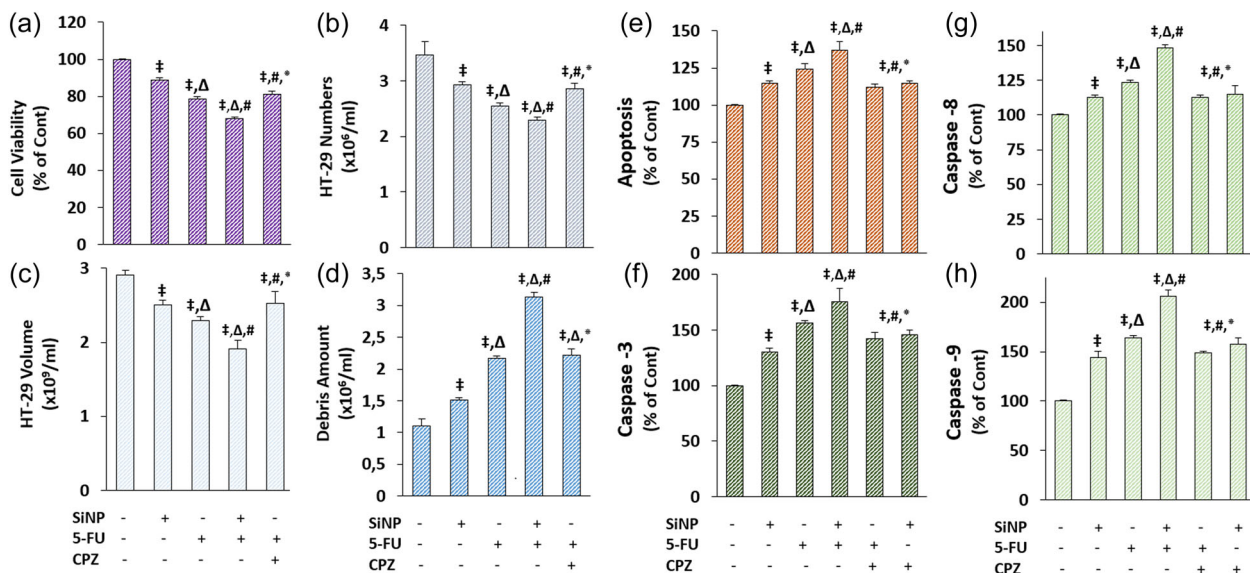


FIGURE 2 The 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μ M for 24 h)-mediated decrease in HT-29 viability and cell number was further reduced by the silver nanoparticle (SiNP) treatment, but the SiNP treatment further increased apoptosis and caspases in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 3$). The analyses of cell viability (a), HT-29 numbers (b), HT-29 volume (c), and debris amount (d) were performed in the HT-29 cells by the electronic cell counter (CASY). (e) An APOpercentage assay kit was used to perform the apoptosis in the spectrophotometer (Shimadzu-UV 1800). Using the caspase substrates, the plate reader (Infinite) analyses were used to assay the active caspase-3 (f), -8 (g), and -9 (h) studies. In the SiNP + capsazepine (CPZ) and 5-FU + CPZ groups, the cells were further incubated with CPZ (100 μ M for 1 h). ($\ddagger p \leq .05$ versus Cont; $\Delta p \leq .05$ versus SiNP; $\# p \leq .05$ versus 5-FU; $* p \leq .05$ versus 5-FU + SiNP).

5-FU + SiNP groups by the 5-FU incubations ($p \leq .05$). The amounts of debris (Figure 2d), apoptosis (Figure 2e), CASP3 (Figure 2f), CASP8 (Figure 2g), and CASP9 (Figure 2h) were higher in the SiNPs group than in the Cont group ($p \leq .05$), and their amounts were further increased in the 5-FU and 5-FU + SiNP groups by the 5-FU incubations ($p \leq .05$). In the 5-FU + CPZ and SiNP + CPZ groups, HT-29 viability, numbers, and volume were increased by the incubation of CPZ (100 μ M for 1 h), although debris amount, apoptosis level, CASP3, CASP8, and CASP9 activities were decreased by the treatment ($p \leq .05$).

3.3 | Inhibiting TRPV1 reduced the rise in HT-29 cell death induced by SiNP and 5-FU

The results of accumulating data suggested that increased chemotherapeutic drug and SiNP-mediated apoptosis and caspases via TRP channel stimulation enhance tumor cell death (Akyuva & Naziroğlu, 2023; Dağlıoğlu et al., 2023; Fahrenholtz et al., 2017; Li et al., 2018). However, the subject was not explored in colorectal cancer cells via TRPV1 stimulation. After seeing an increase in apoptosis via caspase and TRPV1 channel activations in HT-29 cells, the third aim of the present study was

to investigate the cell death rate (PI-positive cell percentage) change in HT-29 cells after SiNP and 5-FU incubations. The images of death (PI)/live (Hoechst) images (Figures 3a), 2.5D (Figure 3b), and percentages of PI-positive HT-29 (Figure 3c) were evaluated using a CCD camera.

The percentage of PI-positive cells increased in the SiNP group compared to the Cont group ($p \leq .05$). The percentages of PI-positive-

HT-29 were also higher in the SiNP and 5-FU + SiNP groups compared to the 5-FU group ($p \leq .05$). However, in the SiNP + CPZ and 5-FU + CPZ groups, CPZ incubation (100 μ M for 1 h) resulted in a decrease in the percentage of PI positive-HT-29 ($p \leq .05$). TRPV1 activation by 5-FU and SiNP appears to increase HT-29 death through the increase of caspases and apoptosis, whereas TRPV1

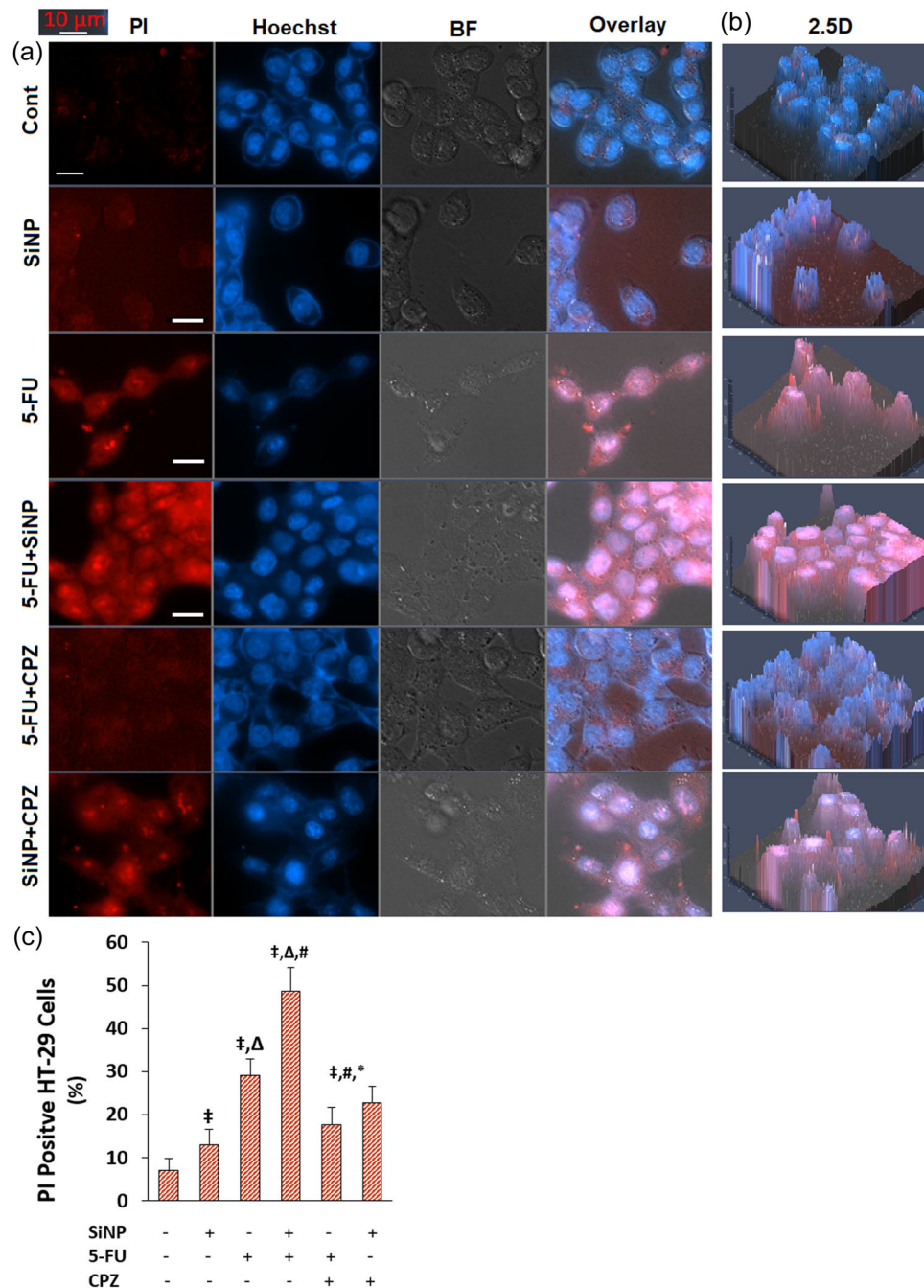


FIGURE 3 The synergistic actions of silver nanoparticle (SiNP) (100 μ M for 48 h) and 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μ M for 24 h) on the decrease of propidium iodide (PI)-positive cell number in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 3$ [8–12 each]). After incubation of the cells with PI and Hoechst dyes (4 μ M) for 15–20 min, the dyes were washed by extracellular buffer with Ca^{2+} . (a) The red (PI), blue (Hoechst), and (b) 2.5D images were captured with the CCD camera and fluorescent microscope (with a 40 \times oil objective) (10 μ m scale bar). (c) Columns displayed the variations in fluorescence intensity of PI-positive (death) cell numbers. In the SiNP + capsazepine (CPZ) and 5-FU + CPZ groups, the cells were further incubated with CPZ (100 μ M for 1 h). († $p \leq .05$ versus Cont; $\Delta p \leq .05$ versus SiNP; # $p \leq .05$ versus 5-FU; * $p \leq .05$ versus 5-FU + SiNP).

inhibition (CPZ) reduces 5-FU and SiNP-induced HT-29 apoptosis and death.

3.4 | Synergistic therapy with 5-FU and SiNP raises mROS, $\Delta\Psi_m$, and iROS in the HT-29

Several recent studies show that chemotherapeutic drug therapy causes an increase in $\Delta\Psi_m$ via activation of TRP channels in tumor cells (Deveci et al., 2018; Nur et al., 2017). CAP-mediated Ca^{2+} influx finally led to tumor cell apoptosis and death (Hong et al., 2015; Zhang et al., 2020). CPZ, as a TRPV1 channel blocker, mitigates the toxicity of chemotherapeutic drugs (Deveci et al., 2018; Nur et al., 2017). The combination apoptotic effect of SiNP and 5-FU in HT-29 is still unknown. After detecting increases in apoptosis, cell death, and caspase activity, I decided to look at the amounts of $\Delta\Psi_m$, mROS, and iROS in HT-29 cells as the fourth aim of the present study. The LSM-800 was utilized to acquire MitoSOX (red), JC-1 (orange), DCFH-DA (green), and their overlay (Figure 4a), as well as 2.5D images (Figure 4b).

According to our data, the levels of MitoSOX (Figure 4c), JC-1 (Figure 4d), and DCFH-DA (Figure 4e) were considerably ($p \leq .05$) greater in the SiNP group compared to the Cont group. In the SiNP and combination (SiNP + 5-FU) groups, the levels of MitoSOX, JC-1, and DCFH-DA increased even more ($p \leq .05$). However, the treatment with CPZ decreased the levels of MitoSOX, JC-1, and DCFH-DA in the SiNP + CPZ and 5-FU + CPZ groups ($p \leq .05$).

3.5 | The iGSH, rGSH level, and GPx activity were decreased through the increase of $[Zn^{2+}]_i$ and LPO by the incubations of SiNP and 5-FU

Accumulating evidence suggests that Zn^{2+} buildup in mitochondria increases LPO, resulting in lower iGSH, rGSH, and GPx (Zhou et al., 2022). TRPV1 activation and $[Zn^{2+}]_i$ have a direct association (Luo et al., 2018). TRPV1 is stimulated by GSH deficiency (Övey & Naziroğlu, 2015). As the fifth goal of this investigation, I evaluated the levels of rGSH, GPx, LPO (Table 1), $[Zn^{2+}]_i$ (Figure 5a), and iGSH (Figure 5c) in the HT-29. The levels of $[Zn^{2+}]_i$ (Figure 5b) and LPO (Table 1) were greater in the 5-FU and SiNP groups, and they were even higher in the combination (5-FU + SiNP) group. However, CPZ incubation reduced their levels in the SiNP + CPZ and 5-FU + CPZ groups.

The antioxidants GPx, rGSH (Table 1), and iGSH (Figure 5d) were found to be low in the SiNP and 5-FU groups, but even lower in the combination (5-FU + SiNP) group. However, CPZ incubation raised their levels in the SiNP + CPZ and 5-FU + CPZ groups.

3.6 | The synergic action of 5-FU and SiNP on the TRPV1 current densities (pA/pF) in the HT-29

In the sixth aim of the present study, I investigated the involvement of SiNP and 5-FU incubation on the TRPV1 current densities in the

HT-29 cells. Control cells had limited currents in the absence of CAP stimulation (Figure 6a). In the Cont with CAP group, nevertheless, the application of CAP elevated mean TRPV1 currents to 59.33 pA/pF (Figure 6b), although their currents further increased in the SiNP (135.40 pA/pF), 5-FU (179.02 pA/pF) (Figure 6c), and SiNP + 5-FU (202.69 pA/pF) (Figure 6d) groups. In the Cont + CAP, 5-FU + CAP, and SiNP + 5-FU + CAP groups, the TRPV1 channel is reversibly blocked by CAP and NMDG⁺ (replacement of Na⁺). When compared to the Cont group alone, the mean current density was considerably higher in the Cont with CAP group ($p \leq .05$) (Figure 6e). In addition, the current was higher in the SiNP + CAP, 5-FU + CAP, and SiNP + 5-FU + CAP groups than in the Cont + CAP group ($p \leq .05$). However, the currents significantly ($p \leq .05$) decreased in the SiNP + CAP + CPZ, 5-FU + CAP + CPZ, and SiNP + 5-FU + CAP + CPZ groups after the CPZ treatments (Figure 6e). According to the patch-clamp data summary, CAP stimulation considerably raised TRPV1 current in both the SiNP + CAP and SiNP + 5-FU + CAP groups. The results presented here undoubtedly demonstrated that SiNP exposure raised $[Ca^{2+}]_i$ in colorectal tumor cells through 5-FU-mediated activation of TRPV1.

3.7 | SiNP increased the 5-FU-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ values in HT-29 cells

In addition to patch-clamp investigations, I studied the way SiNP influenced 5-FU-induced rises in $[Ca^{2+}]_i$ fluorescence concentrations in HT-29 cells through activating TRPV1. The LSM-800 was employed to take green photos of Fluo/8/AM from the four groups (Figure 7a). The amount of $[Ca^{2+}]_i$ after CAP stimulation was greater in the SiNP and 5-FU groups than in the Cont group ($p \leq .05$), and it is significantly greater in the SiNP + 5-FU group (Figure 7b). The $[Ca^{2+}]_i$ amount was reduced in the Cont, SiNP, 5-FU, and SiNP + 5-FU groups following CPZ administrations (Figure 7c). The images of time-dependent records (Figure 7d) further supported the findings. On the other hand, the SiNP + CAP group exhibited higher mean fluorescence intensity findings for $[Ca^{2+}]_i$ as a line (Figure 7e) and column (Figure 7f) compared to the SiNP group ($p \leq .05$). On the other hand, the SiNP + CPZ group exhibited lower intensities than the SiNP + CAP group ($p \leq .05$). Figure 7g presents the imaging results of $[Ca^{2+}]_i$ in the 5-FU + SiNP group. As compared to the SiNP and 5-FU + SiNP groups, there was an additional CAP-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$ amount in the line (Figure 7h) and column (Figure 7i) intensity results of the 5-FU + SiNP + CAP groups ($p \leq .05$). CPZ treatment, however, resulted in a decline in the amounts in the 5-FU + SiNP + CPZ group. The Fluo/8/AM findings supported the contribution of TRPV1 to SiNP and 5-FU synergistic functions in HT-29 tumor cells.

4 | DISCUSSION

In the present research, I studied the usefulness of SiNP separately and in combination with 5-FU for therapy of HT-29 carcinoma cells for the initial period. The findings showed that SiNP and 5-FU had

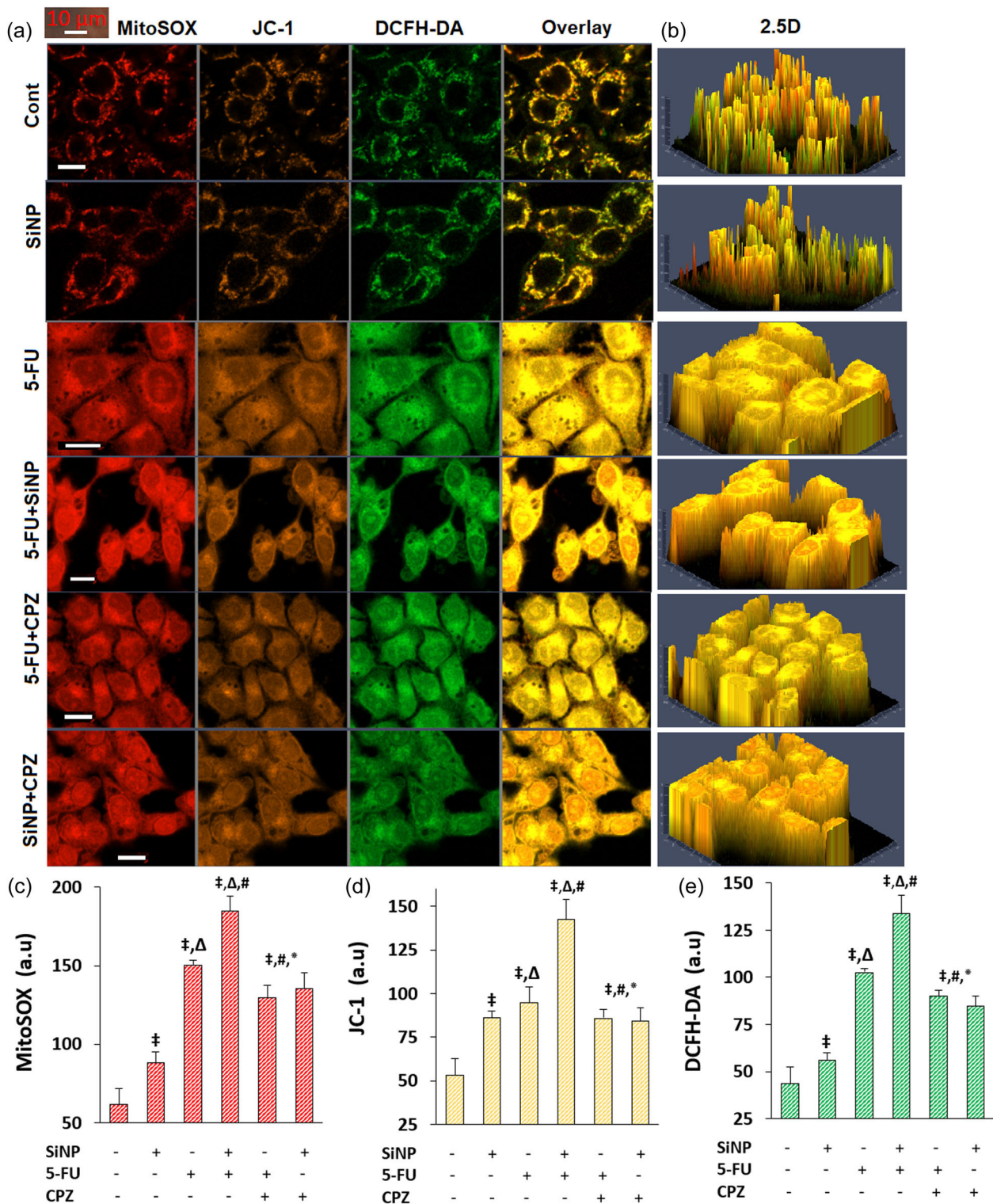


FIGURE 4 The 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μ M for 24 h)-mediated increases in mitSOX, mitPOT, and cytROS were further increased by the silver nanoparticle (SiNP) (100 μ M for 48 h) (mean \pm SD and $n = 3$ [8–12 each]). The red (MitoSOX), orange (JC-1), green (DCFH-DA), overlay (a), and 2.5D (b) images were saved in the LSM-800 microscope (with a 40 \times oil objective). Scale bar was kept at 10 μ m. The mean fluorescence intensity changes as an arbitrary unit (a.u.) of MitoSOX (c), JC-1 (d), and DCFH-DA (e) were shown by columns. In the SiNP + capsazepine (CPZ) and 5-FU + CPZ groups, the cells were further incubated with CPZ (100 μ M for 1 h) ([‡] $p \leq .05$ versus Cont; ^Δ $p \leq .05$ versus SiNP; [#] $p \leq .05$ versus 5-FU; ^{*} $p \leq .05$ versus 5-FU + SiNP).

TABLE 1 SiNP (100 μM for 48 h) and 5-FU (25 μM for 24 h) induced decreases of glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (rGSH) via the increase of lipid peroxidation (LPO) in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 6$).

Values	Cont	SiNP	5-FU	5-FU + SiNP
GPx (IU/g protein)	19.20 \pm 1.24	16.00 \pm 1.25*	12.90 \pm 2.21***	9.72 \pm 1.69***
rGSH ($\mu\text{mol/g}$ protein)	12.50 \pm 0.79	10.90 \pm 0.47*	8.95 \pm 0.59***	6.77 \pm 0.84***
LPO ($\mu\text{mol/g}$ protein)	19.11 \pm 0.82	23.86 \pm 2.92*	28.50 \pm 1.84***	32.72 \pm 1.75***

Abbreviations: 5-FU, 5-Fluorouracil; Cont, control; SiNP, silver nanoparticle.

* $p \leq .05$ versus Cont; ** $p \leq .05$ versus SiNP; *** $p \leq .05$ versus 5-FU.

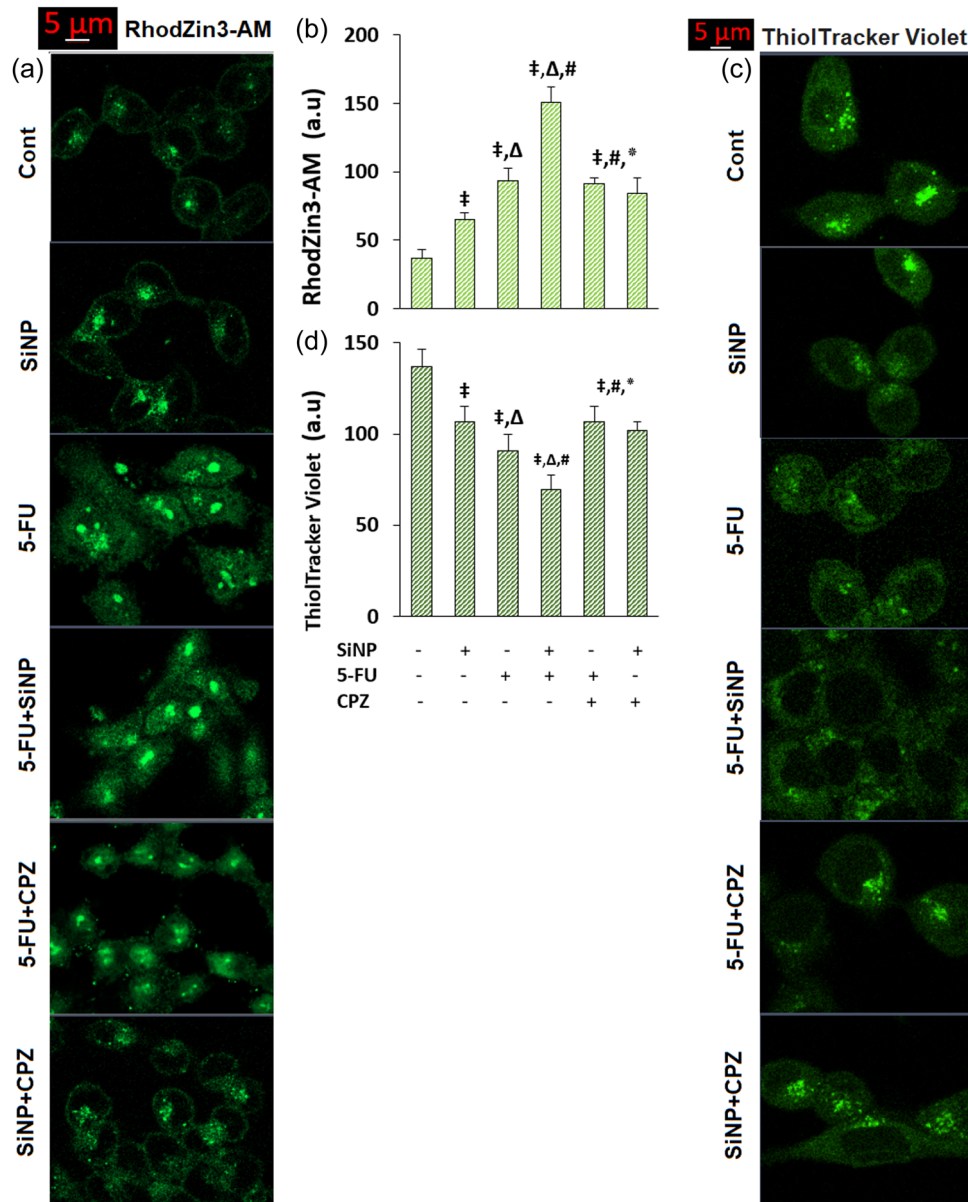


FIGURE 5 The synergic actions of 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μM for 24 h) and silver nanoparticle (SiNP) (100 μM for 48 h) on the $[\text{Zn}^{2+}]_i$ and iGSH in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 3$ [8–12 each]). The green images of $[\text{Zn}^{2+}]_i$ (RhodZin3-AM) (a) and ThiolTracker Violet (iGSH) (c) were captured in the LSM-800 microscope (with a 40 \times oil objective). The scale bar was kept at 5 μm . The mean fluorescence intensity changes as an arbitrary unit (a.u.) of RhodZin3-AM (b), ThiolTracker Violet (d) were shown by columns. In the SiNP + capsazepine (CPZ) and 5-FU + CPZ groups, the cells were further incubated with CPZ (100 μM for 1 h). († $p \leq .05$ versus Cont; $\Delta p \leq .05$ versus SiNP; # $p \leq .05$ versus 5-FU; * $p \leq .05$ versus 5-FU + SiNP).

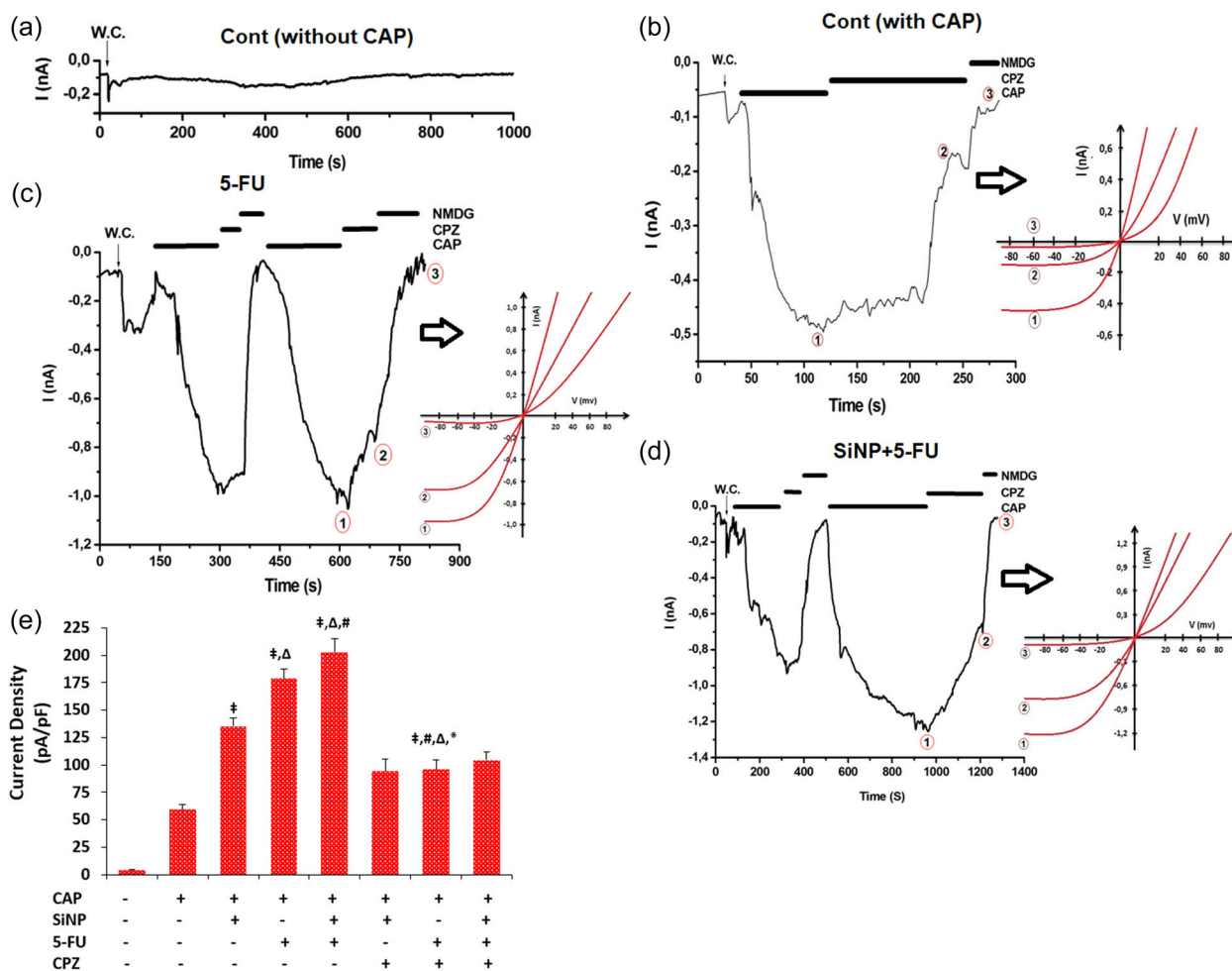


FIGURE 6 The 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μM for 24 h)-mediated increases in TRP vanilloid 1 (TRPV1) current densities were further increased by the silver nanoparticle (SiNP) (100 μM for 48 h) (mean \pm SD and $n = 3$). The 5-FU and SiNP-mediated TRPV1 currents were induced by capsaicin (CAP) (10 μM), whereas they were blocked by capsazepine (CPZ) (100 μM) and NMDG⁺. (a) Control record without CAP stimulation. (b) Control record with CAP stimulation. (c) 5-FU with CAP. (d) SiNP + 5-FU with CAP. (e) The pA/pF (current/cell capacitance) values in the groups. The current (I)/voltage (V) relationships in (b)–(d) were shown by line graphics. ($\dagger p \leq .05$ versus Cont; $\Delta p \leq .05$ versus SiNP; $\# p \leq .05$ versus 5-FU; $* p \leq .05$ versus 5-FU + SiNP).

been together cytotoxic; that they initiated cell damage and cellular alterations, raised the level of LPO, $[\text{Zn}^{2+}]_i$, and $[\text{Ca}^{2+}]_i$; harmful effects, and ultimately caused cell death that was apoptotic via an increase of CASP/3, CASP/8, and CASP/9 activity and reduction of iGSH, rGSH, and GPx values. TRPV1, which was stimulated by SiNP and 5-FU, exhibited a synergistic impact on HT-29 cell death. TRPV1 inhibition reduced the protective properties of siNP and 5-FU in HT-29 cells (Figure 8). Because the combination of siNP and 5-FU promotes TRPV1, it raises iROS, mROS, and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and causes HT-29 apoptosis and death.

One of the most potential methods for therapy in the current drug discovery system involves the activation of TRP channel stimulation-induced oxidative stress. Abnormal Ca^{2+} influx-induced iROS and mROS rises have been utilized as agents for different drugs by preferentially causing damage to cancer cells using cell biomolecule damages such as lipid, protein, and DNA and inhibiting antioxidant mechanisms, including the iGSH, rGSH, and GPx (Gorrini

et al., 2013; Kaya et al., 2023; Piciu et al., 2023). SiNP and 5-FU diminished the antioxidant defense mechanisms of HT-29 cells by promoting oxidative stress through iROS, mROS, and LPO generation, which further reduced iGSH, rGSH, and GPx antioxidants; in addition, terms of the respiration of mitochondria and $\Delta\Psi_m$ increased. I found that SiNP produced oxidative stress and that the combination of therapies was better in the SiNP plus 5-FU group than in the SiNP group. These results are consistent with other studies that evaluated the chemo-sensitizing effects of SiNP on human liver HepG2 (Xue et al., 2018), MCF-7 breast cancer (Haque et al., 2021), and HT-29 colon (Salman et al., 2022) carcinoma cells through triggering oxidative stress. The SiNP and 5-FU-induced increases of iROS, mROS, and LPO were decreased by the incubation of CPZ, although the decreases of iGSH, rGSH, and GPx were increased in the HT-29 cells by the CPZ. The results presented here indicated definitively how SiNP incubation increased TRPV1 stimulation-mediated $\Delta\Psi_m$ in HT-29, which in turn enhanced

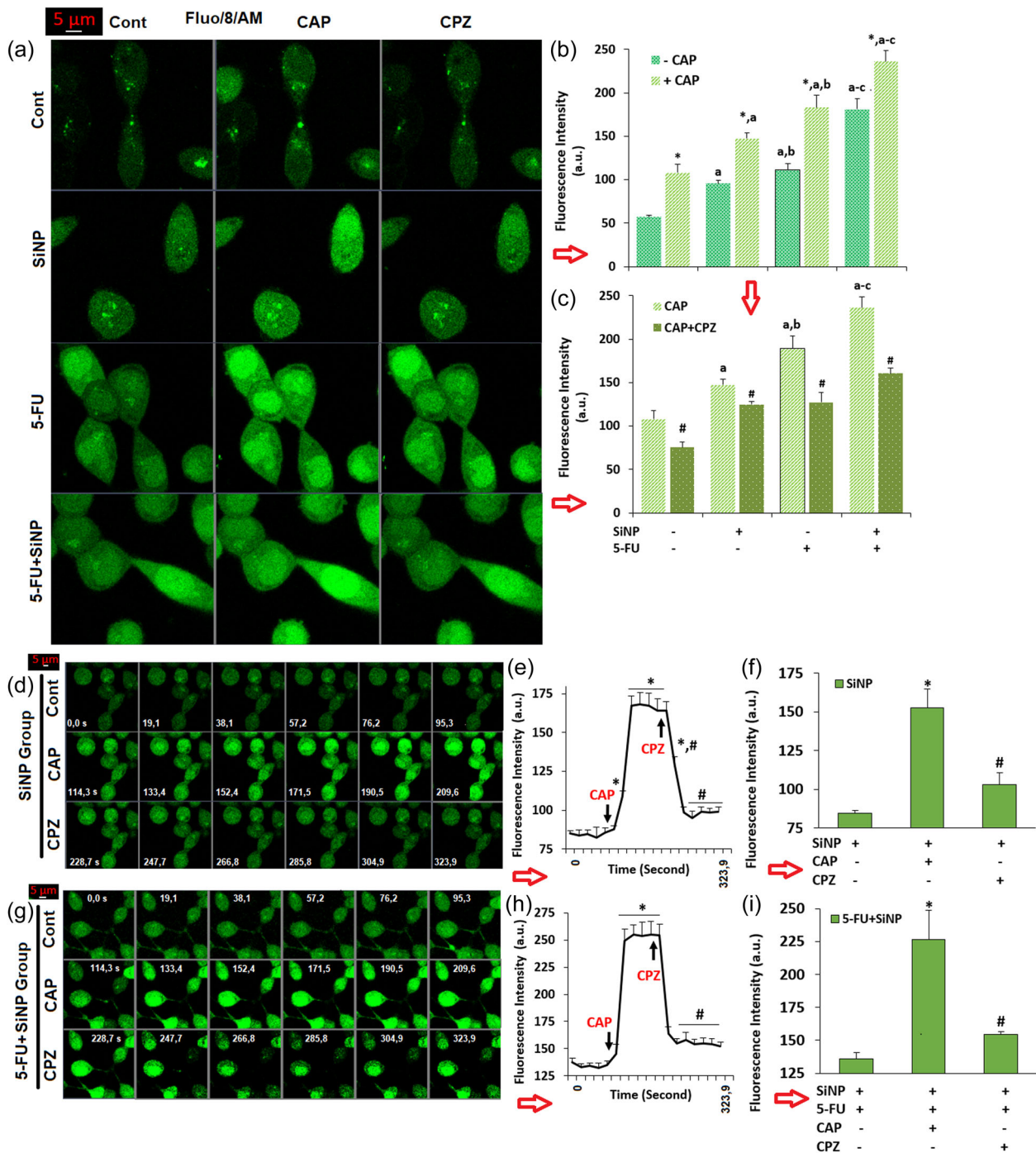


FIGURE 7 The synergistic actions of 5-Fluorouracil (5-FU) (25 μM for 24 h) and silver nanoparticle (SiNP) (100 μM for 48 h) on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the HT-29 cells (mean \pm SD and $n = 3$ [8–12 each]). The TRP vanilloid 1 (TRPV1) stimulation-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were induced by capsaicin (CAP) (10 μM), whereas they were blocked by capsazepine (CPZ) (100 μM). (a) The green images of Fluo/8/AM (1 μM for 60 min) were captured in the LSM-800 microscope (with a 40 \times oil objective). The scale bar was kept at 5 μm . The mean fluorescence intensity changes as an arbitrary unit (a.u.) of Fluo/8/AM were shown in the four groups after TRPV1 stimulation (+CAP) (b) and inhibition (CAP + CPZ) (c). The typical pictures (d), line (e), and column (f) fluorescence intensity mean values of the SiNP group within 323.9 s. (g)–(i), respectively, show the representative pictures, line, and column fluorescence intensity mean values of the 5-FU + SiNP group within 323.9 s. * $p \leq .05$ versus absence of CAP (-CAP); # $p \leq .05$ versus presence of CAP (+CAP); $^a p \leq .05$ versus Cont; $^b p \leq .05$ versus SiNP; $^c p \leq .05$ versus 5-FU.

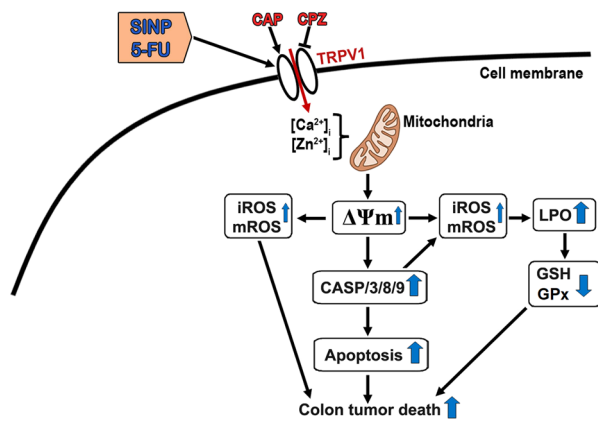


FIGURE 8 The possible synergic action of 5-Fluorouracil (5-FU) and silver nanoparticle (SiNP) through TRP vanilloid 1 (TRPV1) stimulation on colon tumor death in the HT-29 cells. The 5-FU and SiNP-mediated TRPV1 stimulations induce an increase in intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) amount in the HT-29 cells. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Zn}^{2+}]_i$ accumulation-induced increase of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) kills the tumor cells by the activating two pathways: (1) apoptosis induction and cell death through the activation of the caspases-3, -8, and -9. (2) Increase of lipid peroxidation (LPO), intracellular ROS (iROS), and mitochondrial ROS (mROS), but decreases of glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx).

5-FU-induced mROS and iROS outputs through the downregulation of the glutathione thiol redox system. In accordance with the results, 5-FU, through TRPV1 activation and mROS generation, killed MCF-7 breast cancer cells (Deveci et al., 2018).

The intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis are the two fundamental processes that regulate caspase and protease cascade activation. A variety of proapoptotic signals, including calcium signaling, intracellular redox reactions, and activation of caspase, modulate the intrinsic apoptotic process, also known as the mitochondrial routes. Plate reader apoptosis and caspase investigations indicated apoptotic development in HT-29 tumor cells after treatment with SiNP and 5-FU individually or together in combination, with the combined effect becoming stronger due to TRPV1 stimulation in the cells. Although TRPV1 blocker (CPZ) incubations diminished PI-positive cell number, apoptosis, and activity of the key apoptotic markers (CASP3, CASP8, and CASP9), both treatments significantly raised PI-positive cell number, apoptosis, and activity of the main apoptotic markers. Furthermore, the results of the current study indicated that SiNP and 5-FU caused apoptosis in HT-29 cells via intrinsic (CASP9) and extrinsic (CASP8) apoptotic processes. Our findings correspond with previous studies that observed that natural nanoparticles increased the therapeutic efficacy of chemotherapy drugs by activating apoptosis by targeting caspase apoptotic routes, CASP3, CASP8, and CASP9 in diverse tumor cells, as demonstrated for copper sulfide nanoparticles (Ma et al., 2020), SiNPs (Akyuva & Naziroğlu, 2023), and hydroxyapatite nanoparticles (Dong et al., 2023).

Antioxidants are the major defense of the body against oxidative stress. Antioxidants, which include GPx and GSH, reduced the levels

of potentially harmful substances like iROS and mROS. Recent studies show that Ca^{2+} and Zn^{2+} buildup in mitochondria promotes excessive mROS formation, leading to TRPV1 stimulation and GSH and GPx depletion in a variety of cells (Nur et al., 2017; Övey & Naziroğlu, 2015). GSH and GPx reduction raised 5-FU's anticancer activity against colon cancer cells (Afrin et al., 2021). Any alteration in the action of these antioxidants causes severe oxidative stress (Naziroğlu, 2007). The current study's significant increase in LPO levels and a reduction in GPx activity and GSH contents suggest that 5-FU and SiNP may synergistically raise the production of ROS, generating oxidative stress (Afrin et al., 2021; Akyuva & Naziroğlu, 2023). These findings correspond with those of MCF-7 breast tumors (Hamida et al., 2020) and Hep2 tumoral cells from the liver (Rank Miranda et al., 2020; Ren et al., 2022), which observed that SiNPs enhanced LPO while reducing levels of GSH and activity of GPx when compared with untreated cells.

In conclusion, TRPV1 stimulation has been used to improve the chemo-sensitizing effects of 5-FU by SiNP in colorectal cancer. The current investigation determined that SiNP enhanced the 5-FU effect in colon cells with cancer. Induction of apoptosis has been associated with molecular processes involved with tumor cell death. Apoptotic indicators have been identified. SiNP enhanced 5-FU-induced cell death by increasing TRPV1-stimulated current density, Ca^{2+} influx, $\Delta\Psi_m$, iROS, mROS, and LPO despite lowering iGSH, rGSH, and the GPx protective antioxidant mechanism. Apoptosis inductions have been shown after the combined treatment by modifying the levels of caspase activities and $\Delta\Psi_m$ increase-induced apoptotic and cell death signals. CPZ reduced the apoptotic and oxidative functions of SiNP and 5-FU in HT-29 carcinoma cells (Figure 8). In general, this research provides an innovative approach to treating colon cancer using a combination of SiNP and 5-FU via TRPV1 stimulation, but it has to be further confirmed in experimental animals to determine the potential chemo-sensitizing impact of SiNP.

4.1 | Study limitations

I have a few limitations in the manuscript. The spectrofluorimetric Fura-2 analysis is also an indicator of cytosolic Ca^{2+} changes in several cell lines. In addition to the patch-clamp and LSM-800 microscope analyses, I was not able to use Fura-2 analyses in the current study. The SiNP may affect other oxidative stress-dependent TRP channels, such as TRPM7 and TRPV4, but they were not able to investigate in the current study because of the limited budget of the project.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Müge Maviöglü Kaya performed the cell culture, antioxidant, cell viability, and caspase investigations in this present experiment at the 7th International Brain Research School, June 27 and July 3, 2022, in Isparta, Türkiye. (<http://2022.brs.org.tr/>). Technicians (Muhammet

Şahin and Fatih Şahin- BSN Health, Analysis and Innovation Ltd. Inc. Göller Bölgesi Teknokenti, Isparta, Türkiye) carried out the other analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

The author wishes to thank the technicians (M. Şahin and F. Şahin) for helping patch-clamp and plate reader analyses. SN Health, Analysis and Innovation Ltd. Göller Bölgesi Teknokenti, Isparta, Türkiye (Project No: 2022-03) funded the current study. Dr. Müge Mavioğlu Kaya is the project's owner.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The author declares no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data employed for supporting the present investigation's conclusions are accessible upon request from the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

This article does not contain human participants and animal samples.

ORCID

Müge Mavioğlu Kaya  <http://orcid.org/0000-0003-1276-3745>

REFERENCES

- Afrin, S., Giampieri, F., Cianciosi, D., Alvarez-Suarez, J. M., Bullon, B., Amici, A., Quiles, J. L., Forbes-Hernández, T. Y., & Battino, M. (2021). Strawberry tree honey in combination with 5-fluorouracil enhances chemosensitivity in human colon adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, *156*, 112484. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112484>
- Akyuva, Y., & Nazıroğlu, M. (2023). Silver nanoparticles potentiate antitumor and oxidant actions of cisplatin via the stimulation of TRPM2 channel in glioblastoma tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, *369*, 110261. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110261>
- Asharani, P., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, *10*, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
- Basak, D., Uddin, M. N., & Hancock, J. (2020). The role of oxidative stress and its counteractive utility in colorectal cancer (CRC). *Cancers (Basel)* *12*(11), 3336. <https://doi.org/10.3390/cancers12113336>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Dağlıoğlu, Y., Öztürk, B. Y., & Khatami, M. (2023). Apoptotic, cytotoxic, antioxidant, and antibacterial activities of biosynthesized silver nanoparticles from nettle leaf. *Microscopy Research and Technique*, *86*(6), 669–685. <https://doi.org/10.1002/jemt.24306>
- Deveci, H. A., Nazıroğlu, M., & Nur, G. (2018). 5-Fluorouracil-induced mitochondrial oxidative cytotoxicity and apoptosis are increased in MCF-7 human breast cancer cells by TRPV1 channel activation but not *Hypericum perforatum* treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *439*(1–2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3147-1>
- Dey, D. K., Chang, S. N., Vadlamudi, Y., Park, J. G., & Kang, S. C. (2020). Synergistic therapy with tangeretin and 5-fluorouracil accelerates the ROS/JNK mediated apoptotic pathway in human colorectal cancer cell. *Food and Chemical Toxicology*, *143*, 111529. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111529>
- Dong, X., Zang, C., Sun, Y., Zhang, S., Liu, C., & Qian, J. (2023). Hydroxyapatite nanoparticles induced calcium overload-initiated cancer cell-specific apoptosis through inhibition of PMCA and activation of calpain. *Journal of Materials Chemistry B*, *11*, 7609–7622. <https://doi.org/10.1039/d3tb00542a>
- Düzova, H., Nazıroğlu, M., Çiğ, B., Gürbüz, P., & Akatlı, A. N. (2021). Noopept attenuates diabetes-mediated neuropathic pain and oxidative hippocampal neurotoxicity via inhibition of TRPV1 channel in rats. *Molecular Neurobiology*, *58*(10), 5031–5051. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02478-8>
- Fahrenholtz, C. D., Swanner, J., Ramirez-Perez, M., & Singh, R. N. (2017). Heterogeneous responses of ovarian cancer cells to silver nanoparticles as a single agent and in combination with cisplatin. *Journal of Nanomaterials*, *2017*, 5107485. <https://doi.org/10.1155/2017/5107485>
- Gao, L., Zheng, Y., Zhao, C., & Teng, H. (2017). Investigation on effect of basalin coated silver nanoparticles as antioxidant for alleviating peripheral neuropathy in mice treated with oxaliplatin. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, *177*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.003>
- González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., de la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., & Ramírez de Molina, A. (2013). Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research*, *72*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.010>
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Hamida, R. S., Albasher, G., & Bin-Meferij, M. M. (2020). Oxidative stress and apoptotic responses elicited by Nostoc-synthesized silver nanoparticles against different cancer cell lines. *Cancers*, *12*(8), 2099. <https://doi.org/10.3390/cancers12082099>
- Haque, S., Norbert, C. C., Acharyya, R., Mukherjee, S., Kathirvel, M., & Patra, C. R. (2021). Biosynthesized silver nanoparticles for cancer therapy and in vivo bioimaging. *Cancers*, *13*(23), 6114. <https://doi.org/10.3390/cancers13236114>
- de la Harpe, A., Beukes, N., & Frost, C. L. (2022). CBD activation of TRPV1 induces oxidative signaling and subsequent ER stress in breast cancer cell lines. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *69*(2), 420–430. <https://doi.org/10.1002/bab.2119>
- Hong, Z. F., Zhao, W. X., Yin, Z. Y., Xie, C. R., Xu, Y. P., Chi, X. Q., Zhang, S., & Wang, X. M. (2015). Capsaicin enhances the drug sensitivity of cholangiocarcinoma through the inhibition of chemotherapeutic-induced autophagy. *PLoS one*, *10*(5), e0121538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121538>
- Joshi, D. C., & Bakowska, J. C. (2011). Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *51*, 2704. <https://doi.org/10.3791/2704>
- Kaya, M. M., Kaya, İ., & Nazıroğlu, M. (2023). Transient receptor potential channel stimulation induced oxidative stress and apoptosis in the colon of mice with colitis-associated colon cancer: Modulator role of *Sambucus ebulus* L. *Molecular Biology Reports*, *50*(3), 2207–2220. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08200-8>
- Keil, V. C., Funke, F., Zeug, A., Schild, D., & Müller, M. (2011). Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *462*, 693–708. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1012-8>
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *71*, 952–958.

- Li, L., Chen, C., Chiang, C., Xiao, T., Chen, Y., Zhao, Y., & Zheng, D. (2021). The impact of TRPV1 on cancer pathogenesis and therapy: A systematic review. *International Journal of Biological Sciences*, 17(8), 2034–2049. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59918>
- Li, L., Cui, J., Liu, Z., Zhou, X., Li, Z., Yu, Y., Jia, Y., Zuo, D., & Wu, Y. (2018). Silver nanoparticles induce SH-SY5Y cell apoptosis via endoplasmic reticulum- and mitochondrial pathways that lengthen endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites and alter inositol-3-phosphate receptor function. *Toxicology Letters*, 285, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.004>
- Li, X., Ma, Y., Wu, J., Ni, M., Chen, A., Zhou, Y., Dai, W., Chen, Z., Jiang, R., Ling, Y., Yao, Q., & Chen, W. (2023). Thiol oxidative stress-dependent degradation of transglutaminase2 via protein S-glutathionylation sensitizes 5-fluorouracil therapy in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells. *Drug Resistance Updates*, 67, 100930. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100930>
- Liu, L., Sun, X., Guo, Y., & Ge, K. (2022). Evodiamine induces ROS-dependent cytotoxicity in human gastric cancer cells via TRPV1/Ca²⁺ pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 351, 109756. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109756>
- Luo, J., Bavencoffe, A., Yang, P., Feng, J., Yin, S., Qian, A., Yu, W., Liu, S., Gong, X., Cai, T., Walters, E. T., Dessauer, C. W., & Hu, H. (2018). Zinc inhibits TRPV1 to alleviate chemotherapy-induced neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, 38(2), 474–483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1816-17.2017>
- Ma, Z., Zhang, J., Zhang, W., Foda, M. F., Zhang, Y., Ge, L., & Han, H. (2020). Intracellular Ca²⁺ cascade guided by NIR-II photothermal switch for specific tumor therapy. *iScience*, 23(5), 101049. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101049>
- Naziroğlu, M. (2007). New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research*, 32, 1990–2001. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9386-x>
- Naziroğlu, M. (2017). Activation of TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion by NADPH oxidase and protein kinase C molecular pathways: A patch clamp study. *Journal of Molecular Neuroscience*, 61(3), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0882-4>
- Nur, G., Naziroğlu, M., & Deveci, H. A. (2017). Synergic prooxidant, apoptotic and TRPV1 channel activator effects of alpha-lipoic acid and cisplatin in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 37(6), 569–577. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017>
- Övey, İ. S., & Naziroğlu, M. (2015). Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*, 284, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.078>
- Öz, A., & Çelik, Ö. (2023). Downregulation of TRPM7, TRPM8, and TRPV1 channels modulate apoptotic parameters and neurodegenerative markers: Focus on neuronal differentiation and Parkinson's disease model. *Cell Biology International*, 47, 1502–1518. <https://doi.org/10.1002/cbin.12048>
- Piciu, F., Balas, M., Badea, M., & Cucu, D. (2023). TRP channels in tumoral processes mediated by oxidative stress and inflammation. *Antioxidants*, 12(7), 1327. <https://doi.org/10.3390/antiox12071327>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16, 359–364.
- Rank Miranda, R., Pereira da Fonseca, M., Korzeniowska, B., Skytte, L., Lund Rasmussen, K., & Kjeldsen, F. (2020). Elucidating the cellular response of silver nanoparticles as a potential combinatorial agent for cisplatin chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00719-x>
- Ren, G., Hao, X., Yan, S., Chen, J., Qiu, G., Ang, K. P., & Tamrin, M. I. M. (2022). Abies spectabilis-mediated silver nanoparticles inhibits cell growth and promotes apoptosis in breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 41(1), 73–83. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2021039805>
- Sakallı Çetin, E., Naziroğlu, M., Çiğ, B., Övey, İ. S., & Aslan Koşar, P. (2017). Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of the TRPV1 channel. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 37(1), 84–93. <https://doi.org/10.3109/10799893.2016.1160931>
- Salman, G., Pehlivanoglu, S., Aydin Acar, C., & Yesilot, S. (2022). Anticancer effects of *Vitis vinifera* L. mediated biosynthesized silver nanoparticles and cotreatment with 5 fluorouracil on HT-29 cell line. *Biological Trace Element Research*, 200(7), 3159–3170. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02923-8>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192–205.
- Shimizu, S., Takahashi, N., & Mori, Y. (2014). TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223, 767–794. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_3
- Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(3), 233–254. <https://doi.org/10.3322/caac.21772>
- Tasdogan, A., Ubellacker, J. M., & Morrison, S. J. (2021). Redox regulation in cancer cells during metastasis. *Cancer Discovery*, 11(11), 2682–2692. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0558>
- Vladu, A. F., Fica, D., Ene, A. G., & Fica, A. (2022). Combination therapy using polyphenols: An efficient way to improve antitumoral activity and reduce resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10244. <https://doi.org/10.3390/ijms231810244>
- Xu, S., Cheng, X., Wu, L., Zheng, J., Wang, X., Wu, J., Yu, H., Bao, J., & Zhang, L. (2020). Capsaicin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in anaplastic thyroid carcinoma cells via TRPV1-mediated mitochondrial calcium overload. *Cellular Signalling*, 75, 109733. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109733>
- Xue, Y., Wang, J., Huang, Y., Gao, X., Kong, L., Zhang, T., & Tang, M. (2018). Comparative cytotoxicity and apoptotic pathways induced by nanosilver in human liver HepG2 and L02 cells. *Human & Experimental Toxicology*, 37(12), 1293–1309. <https://doi.org/10.1177/0960327118769718>
- Zhang, S., Wang, D., Huang, J., Hu, Y., & Xu, Y. (2020). Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(1), 16–28. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13039>
- Zhou, M., Li, B., Li, N., Li, M., & Xing, C. (2022). Regulation of Ca²⁺ for cancer cell apoptosis through photothermal conjugated nanoparticles. *ACS Applied Bio Materials*, 5(6), 2834–2842. <https://doi.org/10.1021/acsbm.2c00236>

How to cite this article: Kaya, M. M. (2024). Silver nanoparticles stimulate 5-Fluorouracil-induced colorectal cancer cells to kill through the upregulation TRPV1-mediated calcium signaling pathways. *Cell Biology International*, 48, 712–725. <https://doi.org/10.1002/cbin.12141>