Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Investigating the inhibitory activity of iron oxide nanoparticles attached to coumarin on breast cancer cell line

Zahra Ghavamifard [1], Abdolhassan Doulah [1*], Ali Salehzadeh [2]

[1] Dept of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran
[2] Dept of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Jun. 06, 2023
Revised: Mar. 03, 2024
Accepted: Mar. 09, 2024
Published Online: July. 27,2024

**** Correspondence to:***
Abdolhassan Doulah
Dept of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Email:
h_doulah@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: The use of functionalized metal nanoparticles against cancer cells has gained assiduous attention. This study aimed to assess the inhibitory activity of iron oxide nanoparticles coated with glucose and conjugated with coumarin (Fe_3O_4@Glu-Coumarin) on breast cancer cell line, as well as the expression of the *caspase-8* and *caspase-9* genes.

Material & Methods: The physical and chemical properties of nanoparticles were evaluated using FT-IR, XRD, EDS-map, and electron microscope imaging. The toxicity of the synthesized nanoparticles was determined using the MTT assay, and the 50% inhibitory dose (IC50) was calculated. Moreover, the effect of nanoparticles on apoptosis induction was investigated by measuring the expression level of the *caspase 8* and *9* genes and flow cytometry analysis. Statistical analyses were performed in SPSS software. One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to assess significant differences between nanoparticle-treated and control groups. A p-value of less than 0.05 was regarded as statistically significant.

Results: The synthesis of Fe_3O_4@Glu-Coumarin nanoparticles was confirmed by physicochemical tests, including FT-IR, XRD, EDS-mapping, and electron microscope imaging. The nanoparticles had dimensions of 25 to 50 nm and contained Fe, O, and C elements. The treatment of MCF-7 cells with nanoparticles caused a significant decrease in the survival of cancer cells, and the IC50 was 93µg/ml. The exposure of cells to the nanoparticles caused a marked increase in the expression of *caspases 8* and *9* by 2.6 and 2.9 folds, respectively, compared to the control group. In addition, the frequency of apoptotic cells after treatment with the nanoparticles increased from 2.21% to 84%..

Discussion & Conclusion: The results of this study pointed out that Fe_3O_4@Glu-Coumarin increased the expression of the *caspases 8* and *9* genes in breast cancer cells and, as a result, can activate the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, thereby inhibiting the proliferation of cancer cells.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer, Coumarin, Flow cytometry

➢ **How to cite this paper**
Ghavamifard Z, Doulah A, Salehzadeh A. Investigating the inhibitory activity of iron oxide nanoparticles attached to coumarin on breast cancer cell line. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;32(3): 21-34.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

© The Author(s) Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی فعالیت مهاری نانوذرهٔ اکسید آهن متصل به کومارین بر ردهٔ سلولی سرطان پستان

زهرا قوامی‌فرد [۱]، عبدالحسن دولاح [۱*]، علی صالح زاده [۲]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶

نویسنده مسئول:
عبدالحسن دولاح
گروه زیست شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
Email:
h_doulah@yahoo.com

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده از نانوذرات فلزی عامل‌دارشده در مهار سلول‌های سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت مهاری نانوذرهٔ اکسید آهن پوشش‌دهی‌شده با گلوکز و متصل به کومارین (Fe_3O_4@Glu-Coumarin) بر ردهٔ سلولی سرطان پستان و بررسی بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ انجام شد.

مواد و روش‌ها: ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات با استفاده از آنالیزهای FT-IR، XRD، EDS-map و تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی ارزیابی گردید. بررسی میزان سمیت نانوذرات سنتزشده با استفاده از آزمایش MTT تعیین شد و دوز نیمه‌مهاری (IC50) محاسبه گردید؛ همچنین اثر نانوذرات بر القای آپوپتوز از طریق سنجش میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ و آنالیز فلوسایتومتری بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای ارزیابی تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های تیمارشده با نانوذرات و کنترل استفاده گردید و P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش: سنتز نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin با آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی شامل FT-IR، XRD، EDS-mapping و تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی تأیید گردید. نانوذرات ابعاد ۲۵ تا ۵۰ نانومتر و عناصر آهن، اکسیژن و کربن داشتند. تیمار سلول‌های MCF-7 با نانوذرات سبب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شد و مقدار IC50، 93 میکروگرم/میلی‌لیتر بود. مواجههٔ سلول‌ها با دوز نیمه‌مهاری نانوذرات سبب افزایش معنی‌دار بیان کاسپازهای ۸ و ۹ به‌ترتیب به میزان ۲/۶ و ۲/۹ برابر در مقایسه با گروه شاهد گردید، ضمن اینکه فراوانی سلول‌های آپوپتوزی پس از تیمار با نانوذرات، از ۲/۲۱ درصد به ۸۴ درصد رسید.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که Fe_3O_4@Glu-Coumarin باعث افزایش بیان کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول‌های ردهٔ سرطان پستان شد و درنتیجه، سبب فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز برون‌زاد و درون‌زاد می‌گردد و به این ترتیب، از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، کومارین، سرطان پستان، فلوسایتومتری

استناد: قوامی‌فرد زهرا ، دولاح عبدالحسن ، صالح زاده علی. بررسی فعالیت مهاری نانوذرهٔ اکسید آهن متصل به کومارین بر ردهٔ سلولی سرطان پستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرداد ۱۴۰۳؛۳۲(۳): ۳۴-۲۱.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

به علت داشتن خاصیت مغناطیسی و زیست‌سازگاری نسبتاً قابل‌قبول، استفاده از نانوذرات اکسید آهن در طراحی نانومحصولات جدید در زمینهٔ تشخیص و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این ذرات علاوه بر اینکه اندازهٔ کوچک و سطح مؤثر وسیع دارند، به‌سبب ویژگی مغناطیسی شان به‌راحتی می‌توانند با استفاده از یک نیروی مغناطیسی خارجی، در بافت‌های میزبان هدایت شوند؛ بنابراین، نانوذرات مغناطیسی را می‌توان به‌عنوان ابزاری برای دارورسانی هدفمند به بافت‌های میزبان در نظر گرفت. استفاده از نانوذرات اکسید آهن تاکنون بیشتر در زمینهٔ تصویربرداری و شناسایی بافت‌های توموری و همچنین استفاده از آنان در زمینهٔ گرمادرمانی بافت‌های توموری مورد توجه بوده‌اند (۱)، درحالی‌که این ذرات می‌توانند در انتقال ترکیبات دارویی به بافت‌های سرطانی نیز مورد توجه و مطالعه قرار گیرند.

کومارین‌ها که با نام ۱-۲ بنزوپیران نیز شناخته می شوند، یک دسته از ترکیبات چند فنلی طبیعی هستند که در دانه، ریشه و برگ گیاهان مختلف یافت می‌شوند و ویژگی های درمانی امیدوارکننده‌ای دارند (۳، ۲). این ترکیبات دارای مشتقات طبیعی متنوعی هستند و خواص زیستی آنان ازجمله آثار ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضدقارچی، ضدانعقادی و آثار محرک بر دستگاه عصبی مرکزی گزارش‌شده است (۲)؛ همچنین مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این ماده خواص مهار تکثیر و آثار سمیت سلولی بر بسیاری از انواع رده‌های سلول سرطانی ازجمله سرطان‌های پروستات، پستان، کلیه و سرطان ریه دارد (۴، ۲).

در چند سال اخیر، هیبریداسیون مولکولی که شامل ترکیب دو یا چند ماده در یک داربست مولکولی برای توسعهٔ مولکول‌های چندمنظورهٔ ترکیبی است، به‌عنوان یک رویکرد جدید در طراحی داروهای شیمی‌درمانی ظهور کرده است. چنین ترکیباتی می‌توانند فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد، مشخصات انتخابی اصلاح‌شده و عوارض جانبی کمتر داشته باشند؛ به‌عنوان‌مثال، در سالیان اخیر مطالعاتی دربارهٔ آثار ضدسرطانی کومارین-۳-سولفانامید و همچنین کومارین-پیرازولین انجام‌شده است که نتایج نشان‌دهندهٔ بهبود ویژگی های داروشناختی و درمانی هیبریدهای حاصله بود (۶، ۵). با توجه به ویژگی‌های ضدسرطانی کومارین از یک‌سو و خواص زیست‌سازگاری، مغناطیسی و ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن از سوی دیگر، هدف از این پژوهش بررسی آثار ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دهی‌شده با گلوکز و متصل به کومارین بر ردهٔ سلولی سرطان پستان از طریق ارزیابی آثار مهار سلولی و بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ است.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات اکسید آهن: برای سنتز نانوذرات اکسید آهن، ۷/۵۷ گرم نمک کلرید آهن ۲ و ۳/۱۷ گرم کلرید آهن ۲ (شرکت مرک، آلمان) در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت یک ساعت بر روی هیتر با دمای حدود ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس به آن ۴۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک (شرکت مرک، آلمان) غلیظ اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه و تحت گاز نیتروژن (با جریان کم) بر روی هیتر حرارت داده شد. رسوب حاصل‌شده با استفاده از سانتریفوژ جداسازی گردید و با آب مقطر و سپس اتانول شستشو داده شد و در پایان، به مدت ۸ ساعت در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک گردید.

به‌منظور پوشش‌دهی ذرات با گلوکز، یک گرم از نانوذرهٔ Fe_3O_4 و ۰/۵ گرم از دی-گلوکز (شرکت مرک، آلمان) در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و در حمام التراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا پراکنده شود و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت‌دهی شد. پس از سانتریفوژ کردن این مخلوط با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه، رسوب حاصله جداسازی، شستشو و در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید.

به‌منظور اتصال به کومارین، یک گرم از نانوذرات Fe_3O_4 پوشش داده‌شده با گلوکز با ۰/۱ گرم کومارین (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر توسط دستگاه التراسونیک پراکنده شدند و این مخلوط توسط

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

شیکر به مدت ۲۴ ساعت هم‌زده شد. پس از جداسازی و شستشو، نانوذرات به مدت ۲۴ ساعت توسط دستگاه فریز درایر خشک گردیدند (۷).

تعیین ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده: به‌منظور تأیید ماهیت و سنتز نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin، ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آنان بررسی شد. برای بررسی وجود گروه‌های عملکردی بر روی ذرات از آزمایش FT-IR استفاده گردید. این آزمایش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر FT-IR ساخت شرکت Perkin Elmer مدل Spectrum 100 و در محدودهٔ طول‌موج 500-4500 cm-1 صورت گرفت.

آزمایش XRD برای بررسی و تشخیص ساختار کریستالی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin با استفاده از دستگاه پراش اشعهٔ ایکس (PW1730، فیلیپس هلند) با طول‌موج ۱٫۵۴۰۵۶ آنگستروم (Cu-Kα X-ray tube، λ=1.54056 Å) انجام شد. نمونهٔ سنترشدهٔ پودری روی مرکز پراش‌سنج چرخان در دستگاه قرار گرفت، اشعهٔ ایکس با زاویهٔ ۱۰ تا ۸۰ درجه روی نمونه تابانده شد و زاویهٔ θ۲ اندازه‌گیری گردید؛ همچنین بررسی عناصر تشکیل‌دهندهٔ نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin با استفاده از آنالیز پراکندگی انرژی اشعهٔ X (EDS-mapping) و با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM شرکت TESCAN (MIRA3، جمهوری چک) انجام شد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی، اندازه و میزان به‌هم‌پیوستگی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin نیز با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ساخت شرکت TESCAN مدل MIRA3 و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ساخت شرکت Zeiss آلمان مدل Zeiss-EM900 صورت گرفت.

بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر سلول‌های سرطان پستان: در این پژوهش، از سلول‌های سرطان پستان ردهٔ MCF7 استفاده گردید. سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و از محیط کشت RPMI1640 (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) برای تکثیر و آماده‌سازی سلول‌ها استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر سلول‌های سرطان پستان و تعیین غلظت نیمه‌مهاری آنان، از آزمایش MTT (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) استفاده شد. به این منظور، در ابتدا سلول‌ها (۱۰۰۰۰ سلول) در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی رشد گردیدند؛ همچنین یک محلول استوک اولیه از نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin در بافر نمکی فسفات (PBS) (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) تهیه شد و سپس نانوذرات با غلظت‌های مختلف به چاهک‌های حاوی سلول‌های رشد یافته اضافه گردید، به‌طوری‌که غلظت نهایی نانوذرات در هر چاهک در محدودهٔ ۱۵/۶ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ همچنین به چاهک‌های کنترل به جای نانوذرات، PBS افزوده شد.

سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند و سپس محتوی محیط کشت تخلیه شد. در مرحلهٔ بعدی، ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده و پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، مایع رویی حذف گردید و ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) به هر چاهک اضافه شد. پس از پیپتاژ، جذب نوری در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر الایزا (مدل: Elx 800، آمریکا) قرائت گردید. زیستایی سلول‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (۸) و غلظت نیمه‌مهاری نانوذرات با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism vol.10 محاسبه گردید:

$$\text{درصد سمیت سلولی} = 1 - \frac{\text{جذب نوری سلول های تیمار}}{\text{جذب نوری سلول های شاهد}} \times 100$$

درصد زنده‌مانی= درصد سمیت سلولی-۱۰۰

بررسی میزان آپوپتوز/نکروز سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری: به‌منظور تعیین اثر نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های سرطان پستان، سلول‌های MCF7 در پلیت‌های ۶ خانه کشت سلول رشد داده شدند و سپس با نانوذرات مذکور با غلظت نیمه‌مهاری‌شان تیمار گردیدند، ضمن اینکه به سلول‌های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

کنترل به جای نانوذرات، PBS افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، سلول‌ها جمع‌آوری گردیدند و شستشو داده شدند و سپس با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از رنگ یدید پروپیدیوم و ۵ میکرولیتر از رنگ انکسین وی (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) رنگ‌آمیزی گردیدند و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری (شرکت ParTec، ساخت آلمان) بررسی شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیهٔ Q1 تا Q4 صورت گرفت.

بیان ژن: به‌منظور بررسی اثر نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹، از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) کمی استفاده گردید. در ابتدا، سلول‌های سرطان پستان (۵۰۰۰۰۰ سلول) با نانوذرات یادشده به مدت ۲۴ ساعت مواجهه‌سازی شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌های مواجهه‌سازی‌شده و شاهد جدا گردیدند و شستشو داده شدند و در ادامه، محتوی RNA کل آن‌ها با استفاده از محلول تجاری ترایزول (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) و بر اساس دستورالعمل سازندهٔ کیت استخراج گردید. پس از کسب اطمینان از غلظت و کیفیت نمونه‌های RNA استخراج‌شده که با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگاروز به‌دست آمد، نمونه‌های استخراج‌شده با آنزیم دئوکسی ریبو نوکلئاز ۱ (DNaseI) تیمار شدند تا آلودگی DNA آن‌ها حذف گردد. سنتز مولکول‌های DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت تجاری شرکت یکتا تجهیز (ایران) انجام شد و در پایان، تکثیر قطعات با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن و با استفاده از کیت PCR کمی شرکت یکتا تجهیز (ایران) صورت گرفت. آزمایش PCR کمی با سه تکرار برای هر ژن انجام شد و از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) نیز به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. جدول‌های شمارهٔ ۱ و ۲ به‌ترتیب توالی پرایمرهای استفاده‌شده و مواد موردنیاز برای آزمایش PCR کمی را نمایش می‌دهند. در پایان، میزان بیان نسبی ژن‌های مطالعه‌شده با استفاده از روش بررسی شد (۹).

جدول شماره ۱. ویژگی پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش

اسم پرایمر	توالی (′3-′5)	رفرنس	اندازهٔ محصول (جفت باز)
CASP8-forward CASP8-reverse	GACTGGATTTGCTGATTACCTACCTAA CCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT	(۱۷)	۱۴۳
CASP9-forward CASP9-reverse	CCAGATGCCACCCCGTT CCCACTGCTCAAAGATGTCGT	(۱۷)	۱۸۴
GAPDH-forward GAPDH-reverse	CCCACTCCTCCACCTTTGAC CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	(۱۷)	۷۴

جدول شماره ۲. مواد موردنیاز برای انجام PCR کمی

مادهٔ استفاده‌شده	مقدار موردنیاز برای هر واکنش	شرکت سازنده
SYBR Green	5µl	یکتا تجهیز
پرایمر مستقیم (5µM)	0.5µl	پیشگام
پرایمر معکوس (5µM)	0.5µl	پیشگام
cDNAاختصاصی هر ژن	1µl	تهیه‌شده از مراحل قبل
آب مقطر	2.8µl	-

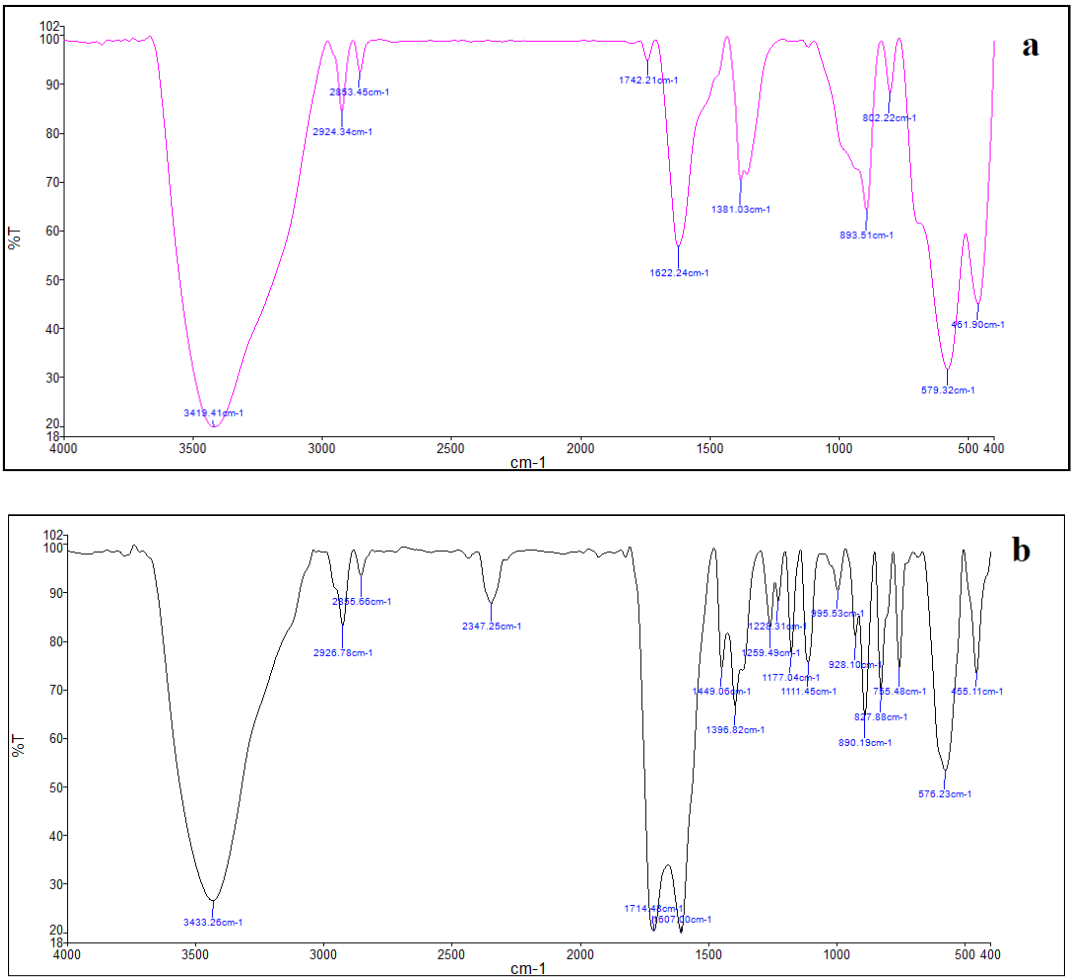
تجزیه وتحلیل آماری: آزمایش MTT و بررسی بیان ژن‌ها در سه تکرار انجام شد. بررسی وجود اختلاف آماری معنی‌دار با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.18 و آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام گردید و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

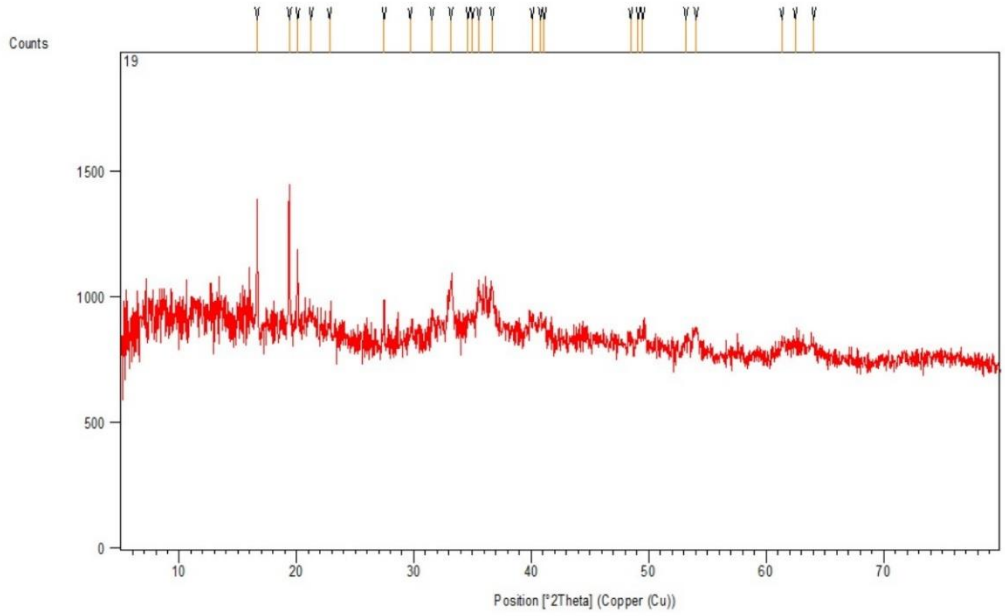
بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات: در نوار FT-IR برای نانوذرات Fe_3O_4 (شکل شمارهٔ a1)، طول‌موج‌های جذبی شدید در 451 cm-1 و ۵۷۹ ناشی از پیوندهای Fe-O مربوط به یون‌های Fe2+ و Fe3+ است که این نشانهٔ شکل‌گیری ساختار Fe_3O_4 است؛ همچنین در نوار FTIR مربوط به Fe_3O_4@Glu-Coumarin (شکل شمارهٔ b1)، طول‌موج‌های در محدودهٔ 755 cm-1 تا ۱۲۵۹ مربوط به پیوندهای C-C، C-H، CH= و C-C در حلقهٔ بنزنی موجود در ساختار کومارین هستند. با توجه به وجود پیک‌های مربوط به دو ماده در ساختار Fe_3O_4@Glu-Coumarin می‌توان نتیجه گرفت که این ذرات به‌درستی سنتز و کونژوگه شده‌اند.

با توجه به الگوی XRD نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin، مقادیر 2θ برابر ۳۵ و ۴۳ و ۶۳ مربوط به نانوذرات آهن اکسید است که مطابق با شمارهٔ کارت ۰۳-۰۸۶۳ است؛ همچنین با توجه به آمورف بودن ساختار کومارین، ساختار این ماده در طیف مشخص نبود و پیک‌ها شارپ است (شکل شمارهٔ ۲).



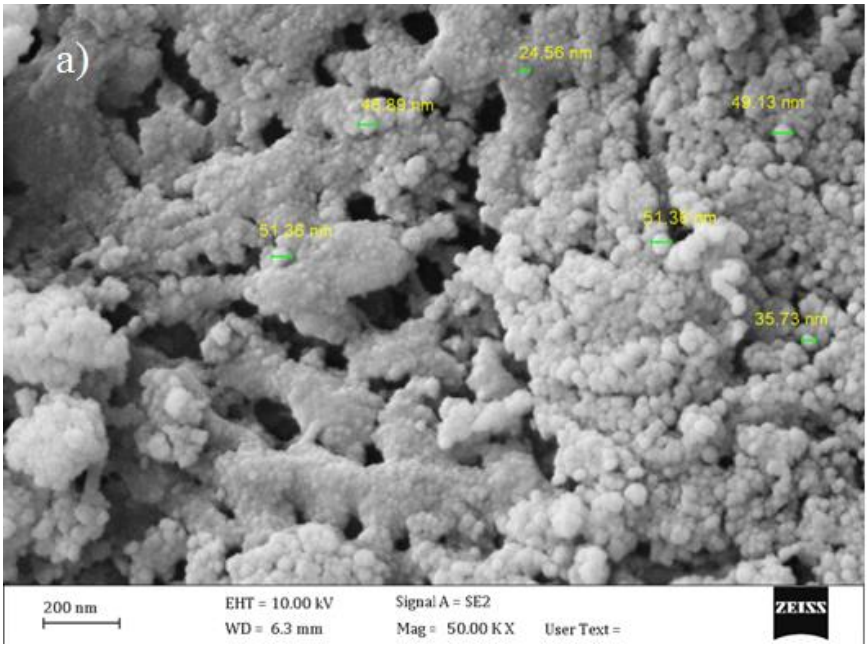
شکل شماره ۱. طیف FT-IR مربوط به نانوذرات (a). Fe_3O_4 و (b). Fe_3O_4@Glu-Coumarin

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

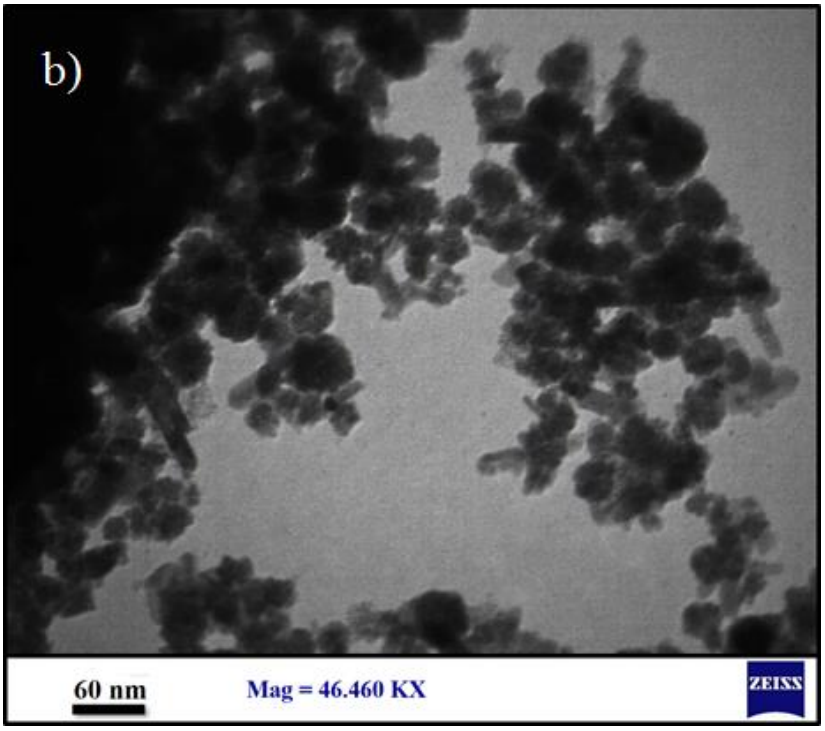


شکل شماره ۲. تجزیه‌وتحلیل XRD نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin

بر اساس تصویربرداری میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره (شکل شمارهٔ ۳)، نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin اندازهٔ ذراتی در محدودهٔ ۲۵ تا ۵۰ نانومتر و ظاهری نسبتاً کروی و میزان به‌هم‌پیوستگی متوسط دارند؛ همچنین آنالیز طیف‌سنجی انرژی پراکندگی پرتو ایکس نشان داد که نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin عناصر آهن، کربن و اکسیژن دارند و هیچ‌گونه ناخالصی عنصری در آنان مشاهده نشد. نتایج این تجزیه‌وتحلیل در شکل شمارهٔ ۴ نمایش داده‌شده است.

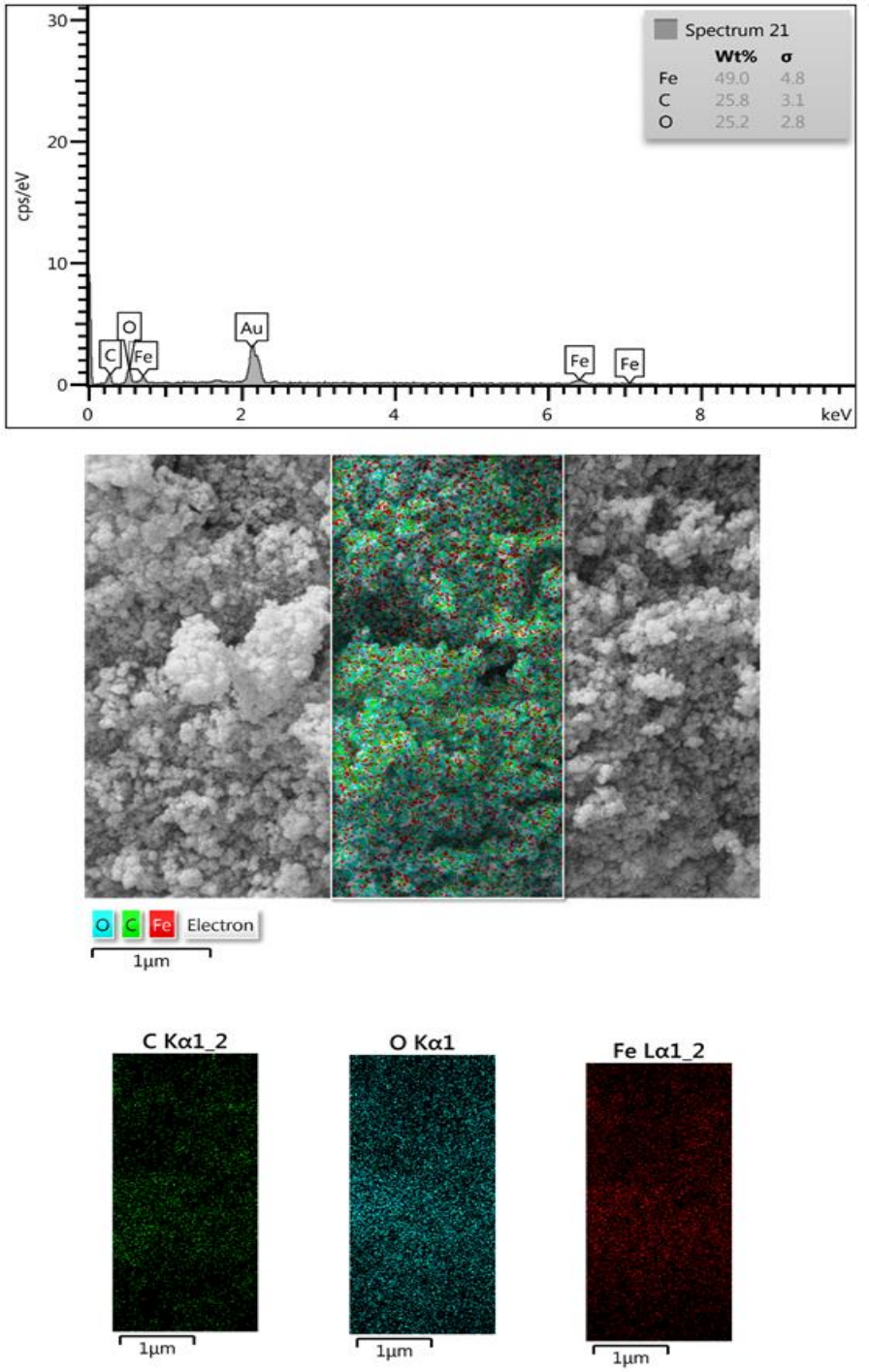


[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



شکل شماره ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (a) و گذاره (b) از نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin

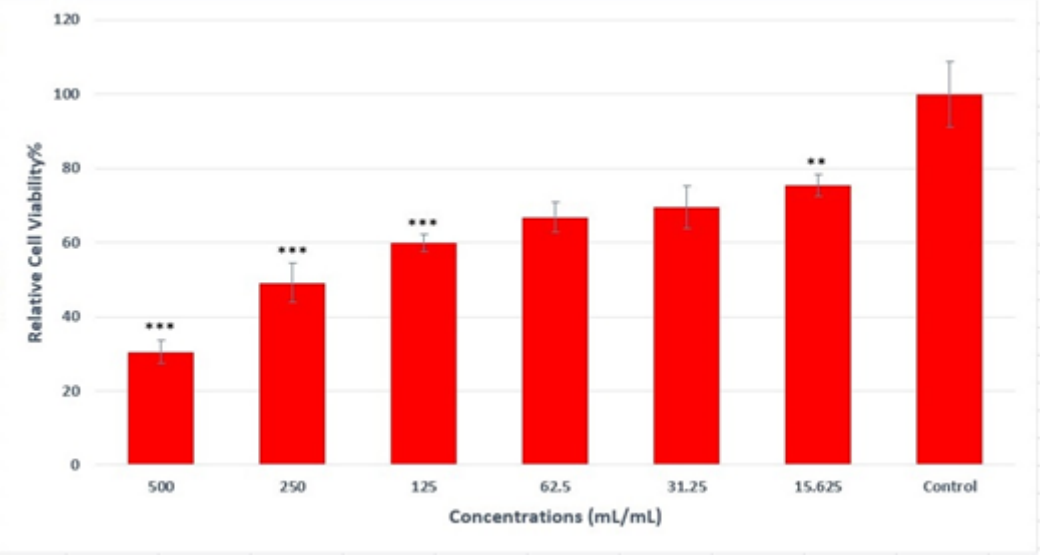
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



شکل شماره ٤. تجزیه‌وتحلیل EDS-map نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin برای نشان دادن خالص بودن نانوذرات

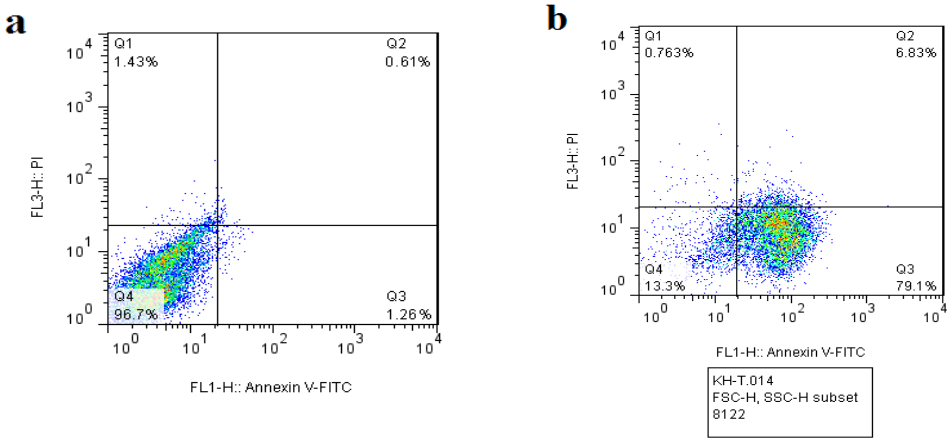
آثار سمیت سلولی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر سلول‌های سرطان پستان: نتایج نشان داد که نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin در همهٔ غلظت‌های استفاده‌شده آثار سمیتی بر سلول‌های سرطانی داشتند، به‌طوری‌که سبب کاهش معنی‌دار میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های شاهد شدند؛ همچنین غلظت نیمه‌مهاری نانوذرات برای سلول‌های سرطان پستان ۹۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. نتایج در شکل شمارهٔ ۵ قابل‌مشاهده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



شکل شماره ۵. بررسی آثار سمیت سلولی نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر سلول‌های سرطان پستان. ستاره‌ها [*] تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند (***=P<0.001، **= P<0.01، *= P<0.05).

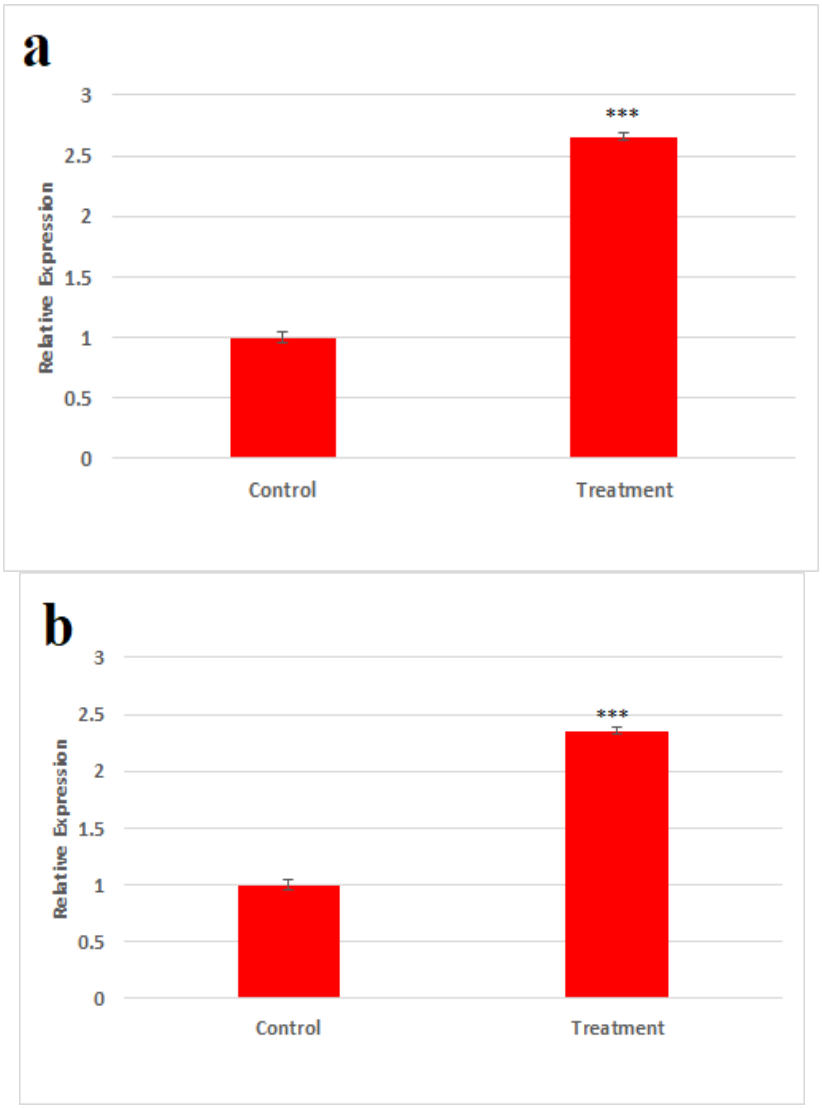
آزمایش فلوسایتومتری: بر اساس نتایج آزمایش فلوسایتومتری، میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری در سلول‌های شاهد به‌ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۶۱ درصد است، درحالی‌که پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات، میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری به‌ترتیب به ۷۹/۱ و ۶/۸۳ درصد رسید. نتایج در شکل شمارهٔ ۶ نمایش داده شده‌اند.



شکل شماره ٦. بررسی اثر نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر میزان سلول‌های آپوپتوزی و نکروتیک. a. سلول‌های شاهد و b. تیمارشده؛ Q1. سلول‌های نکروتیک؛ Q2. آپوپتوز تأخیری؛ Q3. آپوپتوز اولیه؛ Q4. سلول‌های سالم

بررسی بیان نسبی ژن‌های کاسپاز: نتایج آزمایش PCR کمی نشان داد که مواجههٔ سلول‌های MCF7 با نانوذرات یادشده به افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ به میزان ۲/۶ برابر در سلول‌های تیمارشده در مقایسه با سلول‌های کنترل منجر شده بود که نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار میان این دو گروه است. علاوه بر این، میزان بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌های مواجهه‌یافته به میزان ۲/۳ برابر افزایش یافت که از این نظر هم در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌دار داشت. نتایج بیان ژن‌های مطالعه‌شده در شکل شمارهٔ ۷ نمایش داده شده‌اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



شکل شماره ۷. بررسی اثر مواجهه با نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر میزان بیان ژن‌های (a) کاسپاز ۸ و (b) کاسپاز ۹. ستاره‌ها [*] تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند (***=P<0.001، **= P<0.01، *= P<0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی نشان دادند که نانوذرات ساخته‌شده ابعادی در محدودهٔ نانو داشتند و به‌خوبی به کومارین اتصال یافتند. میزان به‌هم چسبیدگی ذرات در حد قابل‌قبول بود و بدون ناخالصی بودند. بر اساس نتایج آزمایش سمیت سلولی، نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin از پتانسیل ضدسرطانی بسیار مناسبی برخوردار است، به‌طوری که در همهٔ غلظت‌های استفاده‌شده سبب مهار معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شدند. مهار سلول‌های سرطان پستان توسط نانوذرات سنتزشده را می‌توان به وجود همهٔ اجزای سازندهٔ آن شامل کومارین، نانوذرات اکسید آهن و گلوکز مرتبط دانست. مطالعات انجام‌شده روی فعالیت ضدسرطانی کومارین و مشتقات آن نشان داد که سازوکار اثر این ترکیبات اغلب از طریق آپوپتوز وابسته به کاسپاز است (۶). کومارین معمولاً توسط سیتوکروم P450 2A6 (CYP 2A6) به ۷–هیدروکسی کومارین متابولیزه می‌شود. مشخص‌شده است که این ماده آثار مهار تکثیر سلولی دارد که این عمل از طریق کاهش میزان فعالیت پروتئین Bcl-2 انجام می‌گردد. این پروتئین یک مهارکنندهٔ آپوپتوز است که مانع فعال شدن کاسپازهای مسیرهای آپوپتوز درون‌زاد به‌ویژه کاسپاز ۹ می شود؛ بنابراین، کومارین به‌طور غیرمستقیم و از طریق مهار پروتئین Bcl-2 می‌تواند در القای آپوپتوز نقش داشته باشد (۱۰)؛ همچنین کومارین و مشتقات آن به‌عنوان مهارکنندهٔ آلوستریک MEK1/2 شناخته می‌گردند. MEK1/2

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

تنظیم‌کنندهٔ مهمی در مسیر تکثیر سلولی است و مهار آن توسط کومارین به‌عنوان یکی دیگر از سازوکارهای ضد تکثیر سلولی و ضدسرطانی آن در نظر گرفته می‌شود (۱۲، ۱۱). مطالعات پیشین نیز نشان‌دهندهٔ آثار مهاری مشتقات کومارین بر سلول‌های سرطان پستان هستند؛ به‌عنوان‌مثال، کوی و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که سه مشتق مختلف کومارین می‌توانند باعث مهار رگ‌زایی، کاهش میزان تکثیر، افزایش میزان بیان پروتئین آپوپتوتیک p21 و توقف چرخهٔ سلولی در فاز G0/G1 شوند (۱۳).

استفاده از گلوکز به‌منظور پوشش‌دهی نانوذرات اکسید آهن ممکن است سلول‌های سرطانی را در برابر نفوذ نانوذرات مستعدتر کند. سلول‌های سرطانی به علت قدرت و سرعت تکثیر بالایی که دارند، نیاز غذایی بالایی دارند و بنابراین وجود گلوکز، به‌عنوان منبع کربن اصلی سلول‌های سرطانی می‌تواند تسهیل‌کنندهٔ جذب و اندوسیتوز نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin باشد؛ همچنین نانوذرات اکسید آهن نیز به‌طور مشابه، با بسیاری از نانوذرات فلزی دیگر می تواند باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن گردد. این مولکول‌ها از طریق برهمکنش با اجزای سلول، به‌ویژه مولکول DNA، باعث آسیب رساندن به آن، توقف چرخهٔ سلولی و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز می‌شوند (۱۴).

بررسی اثر نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر بیان کاسپازهای ۸ و ۹ نشان داد که مواجهه با نانوذرات سبب افزایش معنی‌دار بیان هر دو پروتئین شد. کاسپازها مهم‌ترین واسطه‌های شروع‌کننده و پیش‌برندهٔ مسیرهای آپوپتوز هستند. کاسپازها بسته به اینکه سیگنال‌های سلولی فعال‌کنندهٔ آپوپتوز از خارج از سلول منشأ می‌گیرند و یا از داخل سلول، با دو مسیر سیگنالینگ مولکولی مجزا تنظیم می‌گردند. این مسیرها سبب فعال‌سازی مسیرهای برون‌زاد یا درون‌زاد آپوپتوز می‌شوند.

کاسپاز ۹ نقش مهمی در فعال‌سازی مسیر داخلی مرگ سلولی دارد، به این صورت که کاسپاز ۹ نفوذپذیری غشای داخلی میتوکندری را تغییر می‌دهد و باعث تسهیل آزادسازی سیتوکروم C از غشای داخلی میتوکندری و درنهایت، فعال‌سازی کاسپازهای اجرایی می‌گردد (۱۵)، ضمن اینکه فعالیت این کاسپاز به میزان فراوانی تحت تنظیم پروتئین‌های سیستم BAX/Bcl-2 است. در سوی مقابل، کاسپاز ۸ به‌عنوان کاسپاز آغازگر در مسیر برون‌زاد آپوپتوز و در پاسخ به محرک‌های سیگنالی محیطی مانند لیگاند Fas (FasL/CD95L)، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) و فاکتور رشد تبدیل‌کنندهٔ بتا و سیتوکین‌ها شناخته می‌شود (۱۶). افزایش میزان بیان کاسپازهای ۸ و ۹ نشان‌دهندهٔ آثار القای آپوپتوز توسط نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin است. به‌نظر می‌رسد که نانوذرات سنتزشده از طریق تحریک هر دو مسیر سیگنالی آپوپتوز می‌توانند باعث توقف تکثیر و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی گردند. در تأیید این فرضیه، نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌دار جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک پس از مواجهه با نانوذرات Fe_3O_4@Glu-Coumarin بود.

در این مطالعه، به بررسی آثار ضدسرطانی نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin بر سلول‌های ردهٔ سرطان پستان و بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ پرداخته شد. نتایج نشان داد که نانوذرهٔ Fe_3O_4@Glu-Coumarin سبب افزایش معنی‌دار بیان کاسپازهای ۸ و ۹ می‌شود؛ همچنین افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی سلول‌های ردهٔ سرطان پستان در سلول‌های تیمارشده با Fe_3O_4@Glu-Coumarin مشاهده گردید که نشان‌دهندهٔ ویژگی‌های ضدسرطانی این نانوذرات است.

سپاس‌گزاری

مقالهٔ حاضر برگرفته از پایان‌نامهٔ مقطع کارشناسی ارشد، مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز است. بدین‌وسیله نویسندگان از این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی دربارهٔ پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق

همه مراحل این تحقیق در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی اهواز با کد ۴۹۵۹۷۱۰۱۱۴۰۰۱۶۲۵۵۴۵۱۶

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

تصویب شده است.

حمایت مالی

هیچ گونه حمایت مالی در جهت انجام این مطالعه از طرف هیچ نهادی انجام نشده است.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش های پژوهش مشارکت داشته اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

References

1. Farzin A, Etesami SA, Quint J, Memic A, Tamayol A. Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv Healthc Mater 2020; 9:1901058. doi: 10.1002/adhm.201901058.
2. Küpeli Akkol E, Genç Y, Karpuz B, Sobarzo-Sánchez E, Capasso R. Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. Cancers 2020; 12:1959. doi: 10.3390/cancers12071959.
3. Sandhu S, Bansal Y, Silakari O, Bansal G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. Bioorg Med Chem 2014; 22: 3806-14. doi:10.1016/j.bmc.2014.05.032.
4. Stanchev S, Momekov G, Jensen F, Manolov I. Synthesis, computational study and cytotoxic activity of new 4-hydroxycoumarin derivatives. Eur J Med Chem 2008; 43:694-706. doi: 10.1016/j.ejmech.2007.05.005.
5. Xiao CF, Tao LY, Sun HY, Wei W, Chen Y, Fu LW, et al. Design, synthesis and antitumor activity of a series of novel coumarin–stilbenes hybrids, the 3-arylcoumarins. Chin Chem Lett 2010; 21:1295-8. doi: 10.1016/j.cclet.2010.04.034.
6. Amin KM, Eissa AA, Abou-Seri SM, Awadallah FM, Hassan GS. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin–pyrazoline hybrids endowed with phenylsulfonyl moiety as antitumor agents. Eur J Med Chem 2013; 60: 187-98. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.004.
7. Shokrollahi F, Salehzadeh A, Kafilzadeh F, Zaefizadeh M. Evaluation the effect of Iron oxide nanoparticles functionalized by glucose and conjugated with Coumarin (Fe_3O_4@ Glu-coumarin NPs) on expression of CASP8, CASP9, p53, mTOR1, and MAPK1 genes in liver cancer cell line. Gene Rep 2023; 33: 101818. doi:10.1016/j.genrep.2023.101818.
8. Kumari R, Saini AK, Kumar A, Saini RV. Apoptosis induction in lung and prostate cancer cells through silver nanoparticles synthesized from Pinus roxburghii bioactive fraction. JBIC J Biol Inorg Chem 2020; 25:23-37. doi:10.1007/s00775-019-01729-3.
9. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
10. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997;275:1129-32. doi: 10.1126/science.275.5303.112.
11. Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. Nat Struct Mol Biol 2004; 11:1192-7. doi:10.1038/nsmb859.
12. Goel A, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B, Saini N. 7, 8-Dihydroxy-4-methylcoumarin induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by ROS-independent mitochondrial pathway through partial inhibition of ERK/MAPK signaling. FEBS Lett 2007;581:2447-54. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.052.
13. Cui N, Lin DD, Shen Y, Shi JG, Wang B, Zhao MZ, et al. Triphenylethylene-Coumarin Hybrid TCH-5c Suppresses Tumorigenic Progression in Breast Cancer Mainly Through the Inhibition of Angiogenesis. Anti-Cancer Agents Med Chem 2019; 19:1253-61. doi: 10.2174/1871520619666190404155230.
14. Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. Biomaterials 2012; 33:1477-88. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.080.
15. Jaffri SA, Yan Y, Schwirz J, Schetelig MF. Functional characterization of the Drosophila suzukii pro-apoptotic genes reaper, head involution defective and grim. Apoptosis 2020; 25: 864-74. doi: 10.1007/s10495-020-01640-2.
16. Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, et al. Regulation of apoptosis during flavivirus infection. Viruses 2017; 9:243. doi:10.3390/v9090243.
17. Bigdeli R, Shahnazari M, Panahnejad E, Cohan RA, Dashbolaghi A, Asgary V. Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using Escherichia coli cell-free supernatant on human breast cancer MCF 7 cell line. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2019; 47:1603-9. doi:10.1080/21691401.2019.1604533.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]