

## Investigating the effect of iron oxide nanoparticles coated with glucose and conjugated with safranal on the survival and expression of some genes related to cell death in liver cancer cells

Somayeh Mikaeili Ghezljeh<sup>1</sup> , Ali Salehzadeh<sup>1\*</sup> , Somayeh Ataei-e jaliseh<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: Dec. 07, 2023

Received in revised form:

Jul. 11, 2024

Accepted: Jul. 14, 2024

Published Online: Dec. 05, 2024

#### \* Correspondence to:

Ali Salehzadeh

Dept of Biology, Rasht Branch,  
Islamic Azad University, Rasht,  
Iran

Email:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** The high incidence and mortality rates of liver cancer have raised concerns about the effectiveness of current treatments. This study aimed to synthesize iron oxide nanoparticles coated with glucose and conjugated with Safranal ( $Fe_3O_4@Glu$ -Safranal) and investigate its effect on the viability and expression of the *CASP8*, *CASP9*, *p53*, and *CAD* genes in a liver cancer cell line (HepG2).

**Materials & Methods:** HepG2 cells were treated with different concentrations of the nanoparticles, and the effect of nanoparticles on cell viability was determined using the MTT test. After determining the inhibitory percentage of different concentrations of nanoparticles, the cells were treated with 50% inhibitory concentration of the nanoparticles, their total RNA was extracted, cDNA was synthesized, and gene expression level was evaluated by real-time PCR. The statistical tests included one-way ANOVA and paired t-test, which were analyzed by SPSS V.22 at a level of significance less than 0.05.

**Results:** The results showed that the  $Fe_3O_4@Glu$ -Safranal nanoparticle at concentrations higher than 62.5  $\mu g/ml$  causes a significant decrease in the survival rate of cancer cells. A 50% inhibitory concentration of the nanoparticle for liver cancer cell lines was found to be 277 and 458  $\mu g/ml$ , respectively. This showed that the nanoparticle had stronger cytotoxic effects on cancer cells. Also, it was observed that treatment of the cells with  $Fe_3O_4@Glu$ -Safranal caused a significant increase in the expression of the *CASP8*, *CASP9*, *p53*, and *CAD* genes by 4.27, 2.09, 3.92, and 1.76 folds, respectively, in liver cancer cells ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Apoptosis induction can be considered the main anticancer mechanism of the  $Fe_3O_4@Glu$ -Safranal nanoparticle, which is caused in response to direct cell damage or generated oxidative stress.

**Keywords:** Apoptosis, Caspase, Liver cancer, Safranal

**How to cite this paper:** Mikaeili Ghezljeh S, Salehzadeh A, Ataei-e jaliseh S. Investigating the effect of iron oxide nanoparticles coated with glucose and conjugated with safranal on the survival and expression of some genes related to cell death in liver cancer cells. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(5):50-66.

### Introduction

Liver cancer, the seventh most common type of cancer and the second cause of cancer-related deaths worldwide, is known for its widespread and acute nature (1). Treatment approaches for this disease often fail due to the complex treatment process, unwanted toxic side effects of current drugs, the emergence of drug-resistant types, and metastasis (3). Researchers have studied a wide range of nanoparticles, especially metal nanoparticles, in the field of cancer detection and treatment since the emergence of nanotechnology (2,3). Due to their small size, these substances can easily

penetrate the body's tissues and effectively influence cells through their large surface area (4). Safranal is one of the most important metabolites of the saffron plant, which has many medicinal properties, including anti-inflammatory, antioxidant, anti-pain, and anti-cancer effects (5). Previous studies have shown that this substance can disrupt DNA replication and repair in some cancer cells and cause cell death (9). This study aimed to synthesize iron oxide nanoparticles coated with glucose and conjugated with safranal ( $Fe_3O_4@Glu$ -Safranal) and investigate their effect on the viability and expression of the *CASP8*, *CASP9*, *p53*, and *CAD* genes in a liver cancer cell line (HepG2).



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

## Methods

All materials and solutions used in this research were of laboratory-grade purity. Liver cancer cell line (HepG2) and normal human fibroblast cells (HEK293) were obtained from the cell bank of Pasteur Institute of Iran. Nanoparticle fabrication was done according to the method reported in study (10), which evaluated the physical and chemical properties of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  nanoparticles, FT-IR (Fourier Transform Infrared), XRD (X-ray Diffraction), measurement of adulteration potential, and imaging of transmission electron microscopes (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), and the elemental composition was analyzed by X-ray diffraction spectroscopy (EDS-mapping) test. HepG2 cells were treated with different concentrations of the nanoparticles, and the effect of nanoparticles on cell viability was determined using the MTT test. After determining the inhibitory percentage of different concentrations of nanoparticles, the cells were treated with 50% inhibitory concentration of the nanoparticles, their total RNA was extracted, cDNA was synthesized, and gene expression level was evaluated by real-time PCR. The statistical tests included one-way ANOVA and paired t-test, which were analyzed by SPSS V.22 at a level of significance less than 0.05.

## Results

Based on the FTIR spectrum, the peaks for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and Safranal show that the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  nanoparticle was made correctly. Electron microscope imaging showed that  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  nanoparticles are spherical, and their size is in the range of 17-49 nm. The MTT test showed that the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  nanoparticle lowers the survival rate of cancer cells by a large amount when the concentration is higher than 62.5  $\mu\text{g/ml}$ . A 50% inhibitory concentration of the nanoparticle for liver cancer cell lines was found to be 277 and 458  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. This showed that the nanoparticle had stronger cytotoxic effects on cancer cells. Also, it was observed that treatment of the cells with  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  caused a significant increase in the expression of the *CASP8*, *CASP9*, *p53*, and *CAD* genes by 4.27, 2.09, 3.92, and 1.76 folds, respectively, in liver cancer cells ( $P < 0.05$ ).

## Conclusion

The findings showed that the

synthesized nanoparticle made it much less likely for cancer cells to survive and increased the expression of the *CASP8*, *CASP9*, *CAD*, and *p53* genes. Besides, it can be concluded that the activation of apoptosis is the most likely mechanism of the anticancer effect of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  nanoparticle in studied cells.

## Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation, Software, Formal Analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing–Original Draft Preparation, Writing–Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration: SMG, AS, SA.

## Ethical Statement

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

No funding.

## Acknowledgment

The authors of the article are extremely grateful to the Biology Laboratory of Islamic Azad University of Rasht for the support of this study.

## بررسی اثر نانوذره اکسید آهن پوشش دهی شده با گلوکز و کنژوگه شده با ساfranال روی زنده‌مانی و بیان ژن‌ها در سلول‌های رده سرطان کبد

سمیه میکائیلی قزلیجه<sup>۱</sup>، علی صالح زاده<sup>۱\*</sup>، سمیه عطایی جلیسه<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**مقدمه:** نرخ بالای ابتلا و تلفات ناشی از سرطان کبد نگرانی‌های فراوانی درباره میزان اثربخشی درمان‌های کنونی ایجاد کرده است. این مطالعه با هدف ساختن نانوذره اکسید آهن پوشش دهی شده با گلوکز و کنژوگه شده با ساfranال و بررسی اثر آن روی زنده‌مانی و بیان ژن‌های کاسپاز ۸، کاسپاز ۹، p53 و CAD در سلول‌های رده سرطان کبد انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های رده سرطان کبد به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف نانوذره تیمار شدند و اثر نانوذره بر زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمایش ام‌تی تی تعیین گردید؛ پس از محاسبه درصد مهارت غلظت‌های مختلف نانوذره، سلول‌ها با غلظت نیمه‌مهارت تیمار شدند، محتوی آر ان ای همه آنان استخراج گردید، مولکول دی‌ان‌ای تکمیل سنتز شد و میزان بیان ژن‌ها با آزمایش Real-Time PCR بررسی گردید.

**یافته‌های پژوهش:** نانوذره ساfranال در غلظت‌های بالاتر از ۶۲/۵ میکروگرم/میلی لیتر سبب کاهش چشمگیر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شد؛ همچنین غلظت نیمه‌مهارت نانوذره برای سلول‌های رده سرطان کبد و سلول‌های غیرسرطانی به ترتیب ۲۷ و ۴۵۸ میکروگرم/میلی لیتر بود که نشان‌دهنده آثار سایتوتوکسیک قوی‌تر نانوذره بر سلول‌های سرطانی بود. مشاهده شد که تیمار سلول‌ها با ساfranال سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های کاسپاز ۸، کاسپاز ۹، p53 و CAD به میزان به ترتیب ۴/۲۷، ۲/۰۹، ۳/۹۲ و ۱/۷۶ برابری در سلول‌های رده سرطان کبد می‌شود.

**بحث و نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، القای آپوپتوز را می‌توان به‌عنوان سازوکار اصلی ضدسرطانی نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  در نظر گرفت که در پاسخ به آسیب‌های سلولی مستقیم یا ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو توسط نانوذره رخ می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** ساfranال، سرطان کبد، آپوپتوز، کاسپاز

### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

### نویسنده مسئول:

علی صالح زاده

گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

### Email:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

**استاد:** میکائیلی قزلیجه سمیه، صالح زاده علی، عطایی جلیسه سمیه. بررسی اثر نانوذره اکسید آهن پوشش دهی شده با گلوکز و کنژوگه شده با ساfranال روی زنده‌مانی و بیان ژن‌ها در سلول‌های رده سرطان کبد. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، آذر ۱۴۰۳؛ ۳۲(۵): ۶۶-۵۰.

## مقدمه

سرطان کبد یکی از فراگیرترین و حادترین انواع سرطان در سرتاسر جهان شناخته می‌شود، به طوری که در سالیان اخیر این بیماری هفتمین نوع سرطان از نظر فراوانی و دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان بوده است (۱). روند پیچیده درمانی، عوارض سمیتی ناخواسته داروهای کنونی، پیدایش انواع مقاوم به دارو و متاستاز را می‌توان به‌عنوان علل مهم شکست رویکردهای درمانی این بیماری دانست (۲).

به دنبال ظهور فناوری نانو، طیف گسترده‌ای از نانوذرات، به‌ویژه نانوذرات فلزی، در زمینه شناسایی و درمان سرطان مطالعه شده‌اند. چنین موادی به‌سبب اندازه کوچک که دارند، می‌توانند به‌خوبی به بافت‌های بدن برسند و به علت سطح وسیعشان اثر مدنظر را بر سلول‌ها اعمال کنند. نانوذرات فلزی در شکل خالص خود موفقیت چندانی در این زمینه نداشته‌اند. بیشترین موانع در کاربرد فراگیر آنان در این حوزه را می‌توان به آثار غیراختصاصی آنان و زیست‌سازگاری اندکشان مرتبط دانست (۳). با در نظر گرفتن چنین معایبی، مطالعات جدید به حوزه طراحی و به‌کارگیری نانوذرات مهندسی شده معطوف گردیده است. در چنین فرایندی، با دست‌کاری‌های سطحی نانوذرات می‌توان پایداری، اثربخشی یا هدایت‌پذیری آنان در بدن را بهبود داد. یکی از رویکردهایی که اخیراً در این زمینه موردتوجه قرار گرفته است، پوشش‌دهی و عامل‌دسازی نانوذرات با مولکول‌های آلی زیست‌سازگار همچون اسیدهای آمینه، پلیمرها و قندهایی مثل گلوکز است. چنین ترکیباتی می‌توانند مولکول‌های طبیعی و یا مشتقات آنان باشند و با هدف بهبود کارآمدی نانوذرات استفاده شوند (۴).

به‌سبب قابلیت هدایت‌پذیری تحت نیروی مغناطیسی، نانوذرات مغناطیسی ابزار نویدبخشی در زمینه‌های مختلف پزشکی از جمله تشخیص بافت‌های سرطانی بوده‌اند. علاوه بر این، این ذرات می‌توانند به‌عنوان حاملی برای دارورسانی به سلول‌های سرطانی همراه باشند. در این فرایند، نانوذرات مغناطیسی می‌توانند به‌عنوان بستری به‌منظور لایه‌نشانی ترکیبات دارویی عمل کنند و به کمک استفاده از یک نیروی

مغناطیسی بیرونی، به بافت‌های هدف هدایت شوند. استفاده از چنین سامانه‌هایی در درمان سرطان می‌تواند مزیت‌های متعددی داشته باشد؛ از جمله کاهش عوارض سمیت عمومی به علت کاهش انتشار و انباشت نانوذرات در سایر نقاط بدن، بهبود اثربخشی به‌سبب افزایش غلظت منطقه‌ای دارو در ناحیه توموری و دسترسی سریع‌تر دارو به سلول‌های سرطانی (۵). بر اساس این، استفاده از نانوذرات اکسید آهن بسیار موردتوجه قرار گرفته است. این ذرات علاوه بر داشتن خاصیت مغناطیسی، به‌عنوان ترکیبات نسبتاً زیست‌سازگار در نظر گرفته می‌شوند و بر اساس این، استفاده گسترده‌ای در زمینه‌های زیستی و پزشکی یافته‌اند؛ همچنین تعدادی از مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این ذرات خودشان نیز خاصیت مهاری علیه برخی از انواع سلول‌های سرطانی داشته‌اند (۶، ۷).

استفاده از گیاه زعفران به‌منظور کنترل و درمان برخی از بیماری‌ها از گذشته موردتوجه بوده است. سافرانال به‌همراه کروسین و کروستین مهم‌ترین متابولیت‌های این گیاه به‌شمار می‌آیند. سافرانال که عامل اصلی طعم و عطر زعفران است، خواص متعدد دارویی از جمله آثار ضدالتهابی، ضداکسیدانی، ضد درد و ضدسرطانی دارد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این ماده می‌تواند تکثیر و ترمیم DNA را در برخی از سلول‌های سرطانی مختل کند و سبب مرگ سلول‌ها شود، اگرچه حلالیت اندک این ماده در آب یکی از معایب آن به‌منظور استفاده‌های درمانی است (۸، ۹).

بر اساس مطالب ذکر شده، در این پژوهش به بررسی اثر نانوذره اکسید آهن پوشش‌دهی‌شده با گلوکز و کنژوگه‌شده با سافرانال ( $Fe_3O_4@Glu-Safranal$ ) روی زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد و بیان برخی از ژن‌های مؤثر در فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) شامل *CASP8*، *CASP9*، *p53* و *CAD* در سلول‌های رده سرطان کبد (HepG2) پرداخته شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در طراحی و فرمولاسیون نانوذرات مهندسی‌شده با استفاده از ترکیبات طبیعی به‌منظور کنترل و درمان بیماری‌ها استفاده گردد.

## مواد و روش‌ها

**مواد و سلول‌های مورد استفاده شده:**

همه مواد و محلول‌های استفاده شده در این پژوهش دارای خلوص با درجه آزمایشگاهی بودند. سافراناال مورد استفاده شده از شرکت سیگما-آلدريج (CAS number: 116-26-7) تهیه شد. رده سلولی سرطان کبد (HepG2) و سلول‌های فیروبلاست طبیعی انسان (HEK293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. کشت سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) medium ساخت شرکت مرک انجام پذیرفت.

**ساخت نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal:**

ساخت نانوذره نانوذره بر اساس روشی صورت گرفت که در مطالعه‌ای قبلی توسط شکراللهی و همکاران (۲۰۲۳) گزارش شده گزارش شده بود انجام شد (۱۰). در ابتدا، به منظور به منظور ساختن نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>، مقدار ۷/۵۷ گرم نمک‌های کلرید آهن شش آب و ۳/۱۷ گرم کلرید آهن چهار آب به آب مقطر افزوده شد. گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. در مرحله بعد، ۴۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک افزوده گردید و به مدت یک ساعت دیگر ادامه یافت. در پایان، نانو ذرات نانوذرات اکسید آهن جمع‌آوری شده جمع‌آوری شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (شدند) (۱۰).

به منظور به منظور پوشش دهی نانوذره نانوذره، ابتدا نانوذره نانوذره اکسید آهن (یک گرم) و د-گلوکز (نیم گرم) در آب مقطر با یکدیگر مخلوط گردیدند شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت شدند و مخلوط واکنش به مدت ۳ ساعت در ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. در نهایت، نانوذره نانوذره پوشش دهی شده پوشش دهی شده با گلوکز جمع‌آوری گردید شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (شد) (۱۰). برای کنتر و گه کردن سافراناال، نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu و سافراناال با نسبت ۱:۱۰ در آب مقطر با یکدیگر مخلوط گردید شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد؛ سپس، نانوذره نانوذره

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal با استفاده از سانتریفوژ جمع‌آوری و سپس خشک گردید شد (شد) (۱۱).

**بررسی ویژگی‌های نانوذره نانوذره ساخته شده:**

به منظور به منظور ارزیابی برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal از آنالیزهای سری تبدیل فوریه، پراش اشعه ایکس، سنجش پتانسیل زنا و تصویربرداری میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره و نگاره و آنالیز ترکیب عنصری با آزمایش طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس استفاده شد. آزمایش FT-IR با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nicolet IR-100 و در محدوده ۴۰۰۰-۵۰۰ cm<sup>-1</sup> و با هدف مقایسه گروه‌های عاملی سطحی سافراناال، نانوذره نانوذره اکسید آهن و نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal انجام گردید شد. آزمایش پراش اشعه ایکس نیز با هدف بررسی ویژگی‌های کریستالی نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal انجام صورت پذیرفت. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی با استفاده از میکروسکوپ‌های Zeiss EM-900 TEM و Tescan Mira3 SEM و با هدف بررسی ویژگی‌های شکلی و اندازه ذرات انجام شد. همچنین، با استفاده از آنالیز پتانسیل زتا بار سطحی نانوذره نانوذره در محیط آبی مورد ارزیابی گردید قرار گرفت (Malvern zetasizer Instruments Ltd, 6.32).

**آزمایش زنده‌مانی سلولی:**

به منظور به منظور ارزیابی اثر نانوذره نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal بر زنده‌مانی سلول از آزمایش ام تی تی استفاده شد. در این آزمایش اثر نانوذره نانوذره بر زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد و سلول‌های طبیعی فیروبلاست انسانی مورد بررسی قرار گردید گرفت. ابتدا سلول‌های مذکور یاد شده در محیط کشت سلولی DMEM و در پلیت‌های پلیت‌های کشت سلولی رشد داده شد و پس از تهیه تک لایه سلولی، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذره نانوذره (۳۱/۲۵ - ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) تیمار گردیدند شدند. تعدادی از چاهک‌های پلیت نیز به عنوان عنوان شاهد در نظر گرفته شدند که و دارو دریافت نکردند.

آپتوز شامل دی ان آز فعال شونده توسط کاسپاز، پی ۵۳، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ در سلول‌های سرطان کبد تیمار شده با  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  نسبت به سلول‌های شاهد، با استفاده از آزمایش ریل تایم پی سی آر ارزیابی شد. در ابتدا، سلول‌ها با نانوذره نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  در محیط DMEM با غلظت نیمه مهارنیمه‌مهار تیمار گردیدند. چاهک‌های فاقد بدون نانوذره نانوذره نیز به‌عنوان عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها جداسازی گردیدند و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. محتوی RNA کل از سلول‌ها با استفاده از محلول تجاری TriZol (امریکا) استخراج گردید شد و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد؛ سپس مولکول cDNA با استفاده از کیت تجاری سنتز cDNA (Takara، ژاپن) ساخته شد. به‌منظور به منظور تکثیر ژن‌ها از پرایمرهای ذکر شده ذکر شده در جدول شماره ۱ و کیت تجاری یکتا تجهیز (ایران) استفاده گردید شد (ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems)). شرایط دمایی و زمانی تکثیر ژن‌ها در جدول شماره ۲ ذکر شده ذکر شده است.

سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس محیط کشت سلولی به آرامی به آرامی از چاهک‌ها تخلیه گردید شد و ۲۰۰ میکرولیتر میکرولیتر محلول 2,5-(2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) MTT diphenyltetrazolium bromide) به چاهک‌ها افزوده شد. پس از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، چاهک‌ها تخلیه گردید شد و تخلیه شده تخلیه شده و ۲۰۰ میکرولیتر میکرولیتر محلول دی‌متیلدی سولفو کسید افزوده شد. پس از سپری شدن زمان ۳۰ دقیقه به‌منظور به منظور انحلال کریستال‌های تشکیل شده تشکیل شده، جذب نوری هر چاهک در طول موج طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت الایزا (Bio-Rad) سنجیده شد و با چاهک‌های شاهد مقایسه گردید. درصد مهار رشد سلولی توسط غلظت‌های مختلف نانوذره نانوذره از طریق رابطه زیر محاسبه شد و غلظت مهار ۵۰٪ درصد به‌منظور به منظور استفاده در آزمایش بعدی مورد استفاده گردید قرار گرفت (۱۰-۱۲).

$$\text{جذب نوری نمونه} = 100 - \left[ \frac{\text{جذب نوری شاهد}}{\text{جذب نوری نمونه}} \times 100 \right] = \text{درصد مهار}$$

### بیان ژن‌های مسیر آپتوز:

بیان برخی از ژن‌های تنظیم‌کننده تنظیم‌کننده مسیر

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای سنتز ژن‌ها

منبع	توالی (۵'-۳')	نام ژن
(۲۵)	TGGCAGAGATCGGAGAGCAT	CAD (Forward)
	TCCTTCCATCCCTTCAGAGACTT	CAD (reverse)
(۲۴)	CCCACTCCTCCACCTTTGAC	GAPDH (forward)
	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	GAPDH (reverse)
(۲۵)	CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	p53(forward)
	CAACCTCAGCGGCTCATAG	p53(reverse)
(۲۴)	GACTGGATTTGCTGATTACCTACCTAA	CASP8 (forward)
	CCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT	CASP8(reverse)
(۲۵)	CCAGATGCCACCCCGTT	CAS 9(forward)
	CCCACTGCTCAAAGATGTCGT	CASP9 (reverse)

جدول شماره ۲. شرایط زمانی و دمایی تکثیر ژن‌ها در واکنش Real-Time PCR

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	۴۰ سیکل
واسرشت سازی اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	
واسرشت سازی	۹۵	۱۵ ثانیه	
اتصال پرایمر به الگو	۶۰	۶۰ ثانیه	



بسط	۷۲	۱۵ ثانیه	
-----	----	----------	--

نتایج آزمایش FT-IR روی سافرانال، نانوذره  $Fe_3O_4$  و نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  به منظور بررسی تفاوت‌های گروه‌های عاملی سطحی آنان انجام گردید. بر اساس نتایج، در طیف مربوط به سافرانال پیک‌هایی در طول موج 803  $cm^{-1}$  و 1000 و ۱۳۹۳ مشاهده شد که با پیوندهای C-H، C-O، C-C مرتبط است؛ همچنین پیک‌های جذبی در 1612  $cm^{-1}$  و ۲۴۲۳ مربوط به پیوندهای C=C و C-O هستند. پیک‌هایی نیز مرتبط با پیوند O-H در طول موج‌های 2935  $cm^{-1}$  و ۳۴۰۶ نانومتر مشاهده گردید. در طیف مربوط به نانوذره  $Fe_3O_4$ ، پیک‌های مرتبط با پیوند Fe-O مربوط به یون‌های  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  در فازهای هشت‌وجهی و  $Fe^{3+}$  در فاز چهاروجهی به ترتیب در طول موج‌های 1420، 580 و ۶۲۴ مشاهده شد (۱۱). بر اساس طیف نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$ ، پیک‌های مرتبط با هر دو ماده در محصول نهایی دیده می‌شود که تأییدکننده سنتز مناسب نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  است (شکل شماره ۱).

ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و از فرمول‌های زیر به منظور ارزیابی بیان ژن‌ها استفاده گردید (۱۳).

$$\Delta Ct = Ct - (\text{ژن هدف})$$

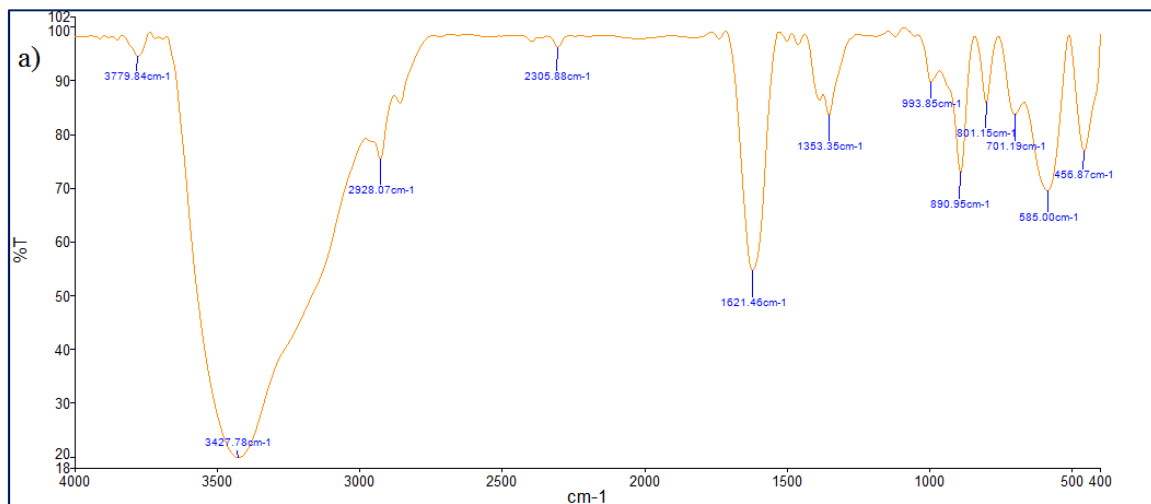
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (\text{تیمار})$$

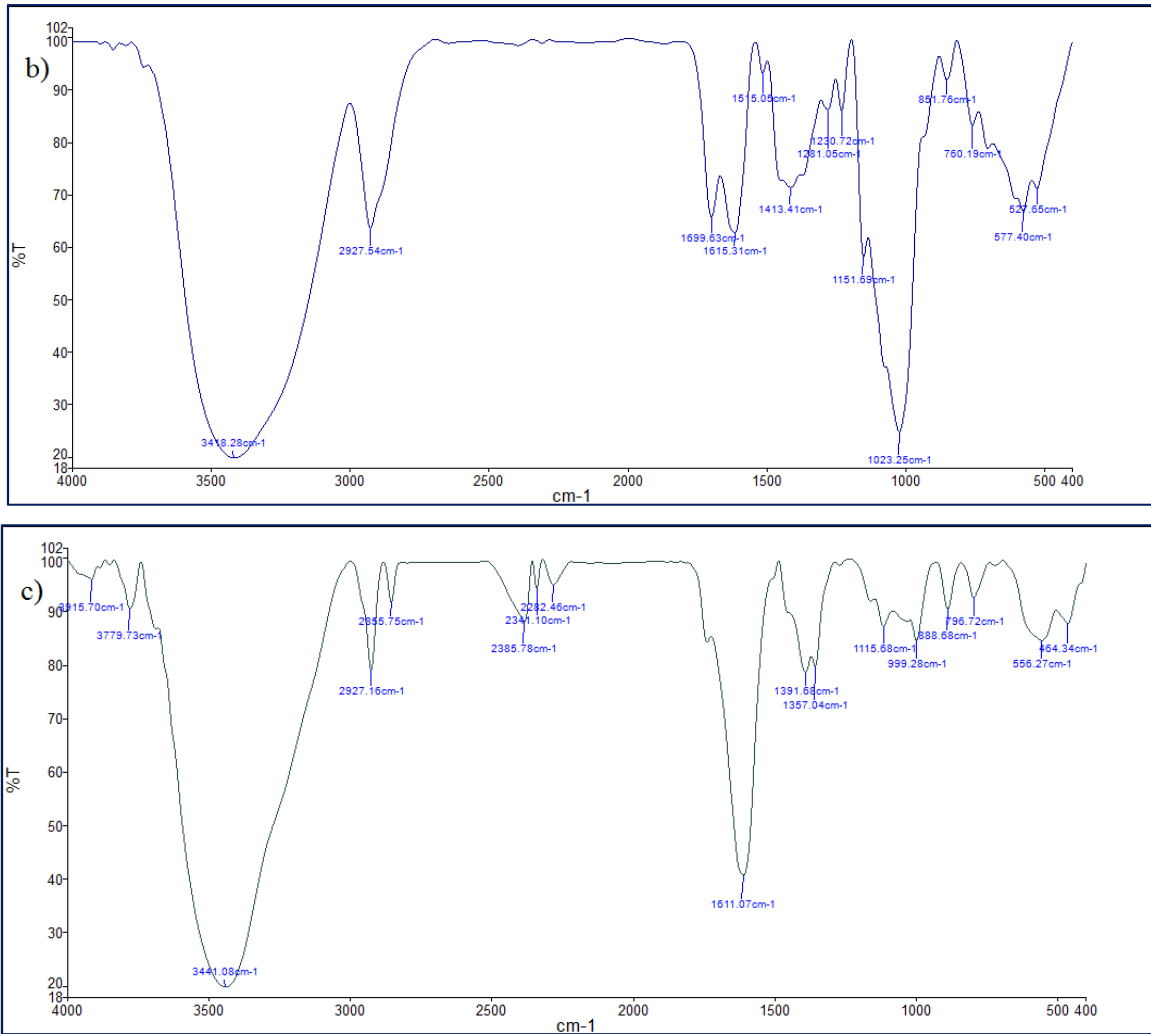
$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{تغییر بیان}$$

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS vol.22 صورت گرفت و بررسی تفاوت آماری در آزمایش MTT توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تغییرات بیان ژن نیز با آزمون تی (t student test) بررسی شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ نیز به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌های پژوهش

بررسی گروه‌های عاملی، ساختار کریستالی و پتانسیل زتا:



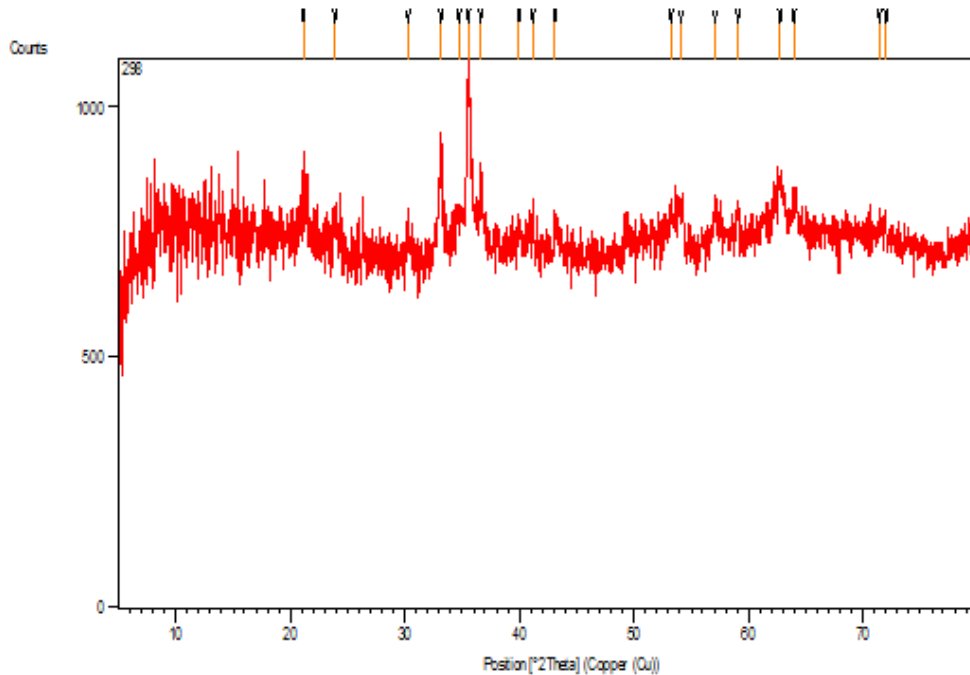


شکل شماره ۱. بررسی گروه‌های عاملی؛ a. نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>، b. سافراناال و c. نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal با آزمایش FT-IR

در ۲۱/۱۵ و ۳۱/۵۶ درجه با سافراناال مرتبط هستند و پیک مرتبط با گلوکز در ۳۶/۶۲ درجه مشاهده می‌شود (شکل شماره ۲).

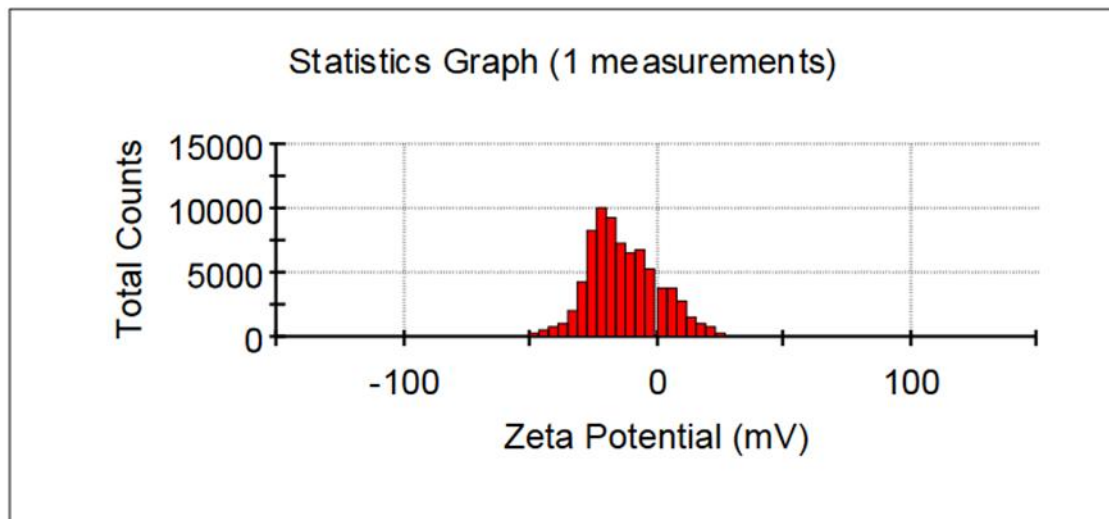
بر اساس طیف XRD نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal، پیک‌های قابل مشاهده در ۳۰/۲، ۳۳/۴ و ۴۱/۱۲ درجه با نانوذره اکسید آهن مرتبط هستند که با شماره JCPDS ۰۳-۰۸۶۳ منطبق است (۱۴)؛ همچنین پیک‌های مشاهده شده





شکل شماره ۲. طیف سنجی پراش اشعه X نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Glu-Safranal$

همچنین اندازه گیری پتانسیل زتای نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Glu-Safranal$  نشان داد که بار سطحی ذرات mV -13 است که تأمین کننده نیروی دافعه میان ذرات است (شکل شماره ۳).

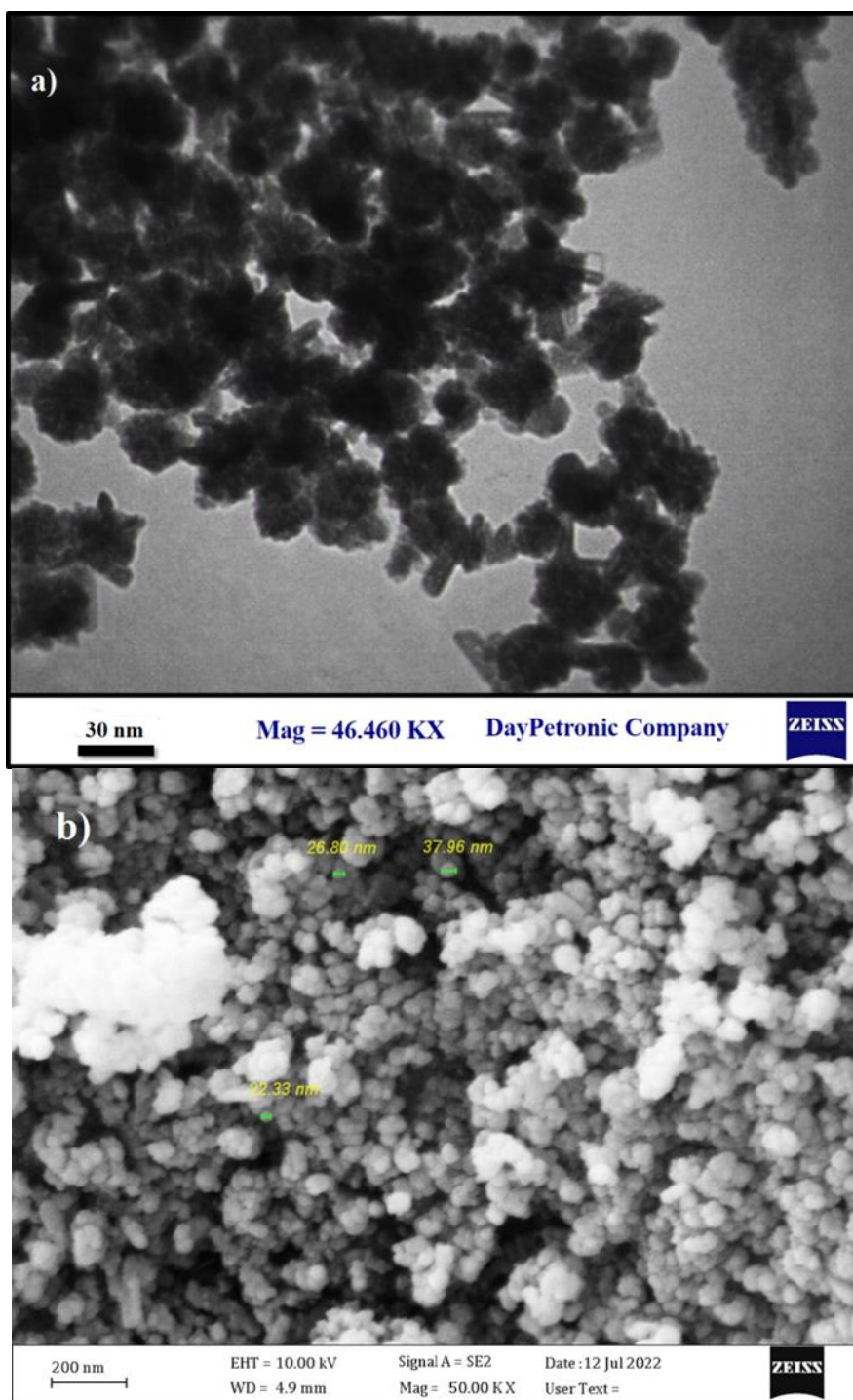


شکل شماره ۳. پتانسیل زتای نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Glu-Safranal$

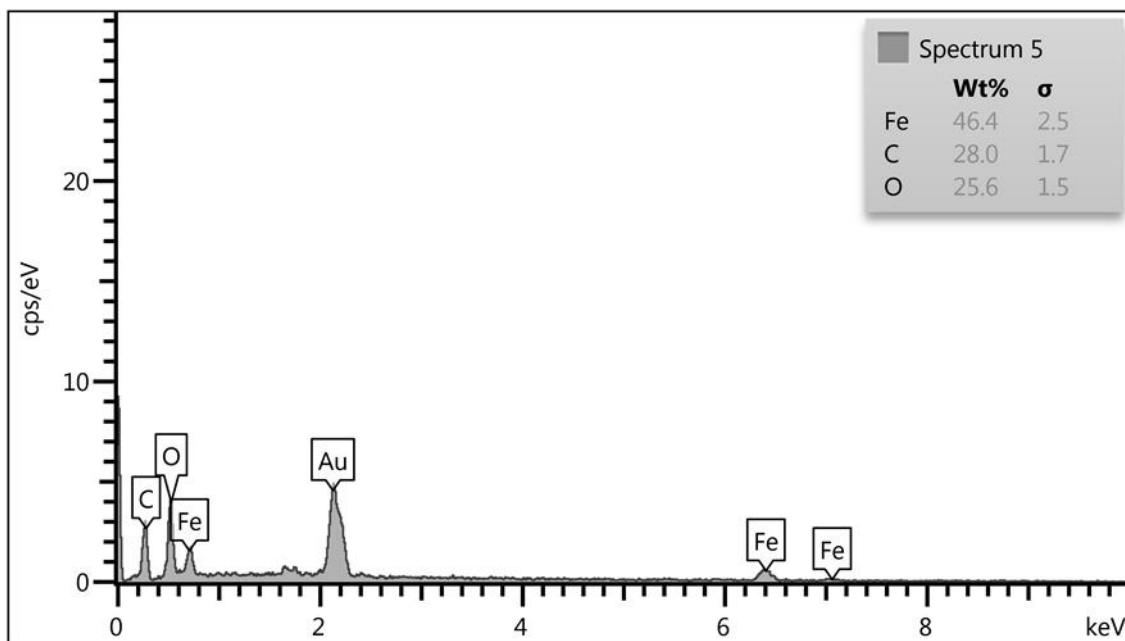
محدوده ۴۹-۱۷ نانومتر است؛ همچنین میزان به هم چسبندگی ذرات در حد متوسط بود (شکل شماره ۴). عناصر تشکیل دهنده نانوذرات نیز شامل Fe، C و O بود که نشان دهنده خلوص ذرات سنتز شده است (شکل شماره ۵).

#### ریخت شناسی، اندازه و عناصر ساختاری:

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Glu-Safranal$  کروی و اندازه آنها در



شکل شماره ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (a) و نگاره (b)



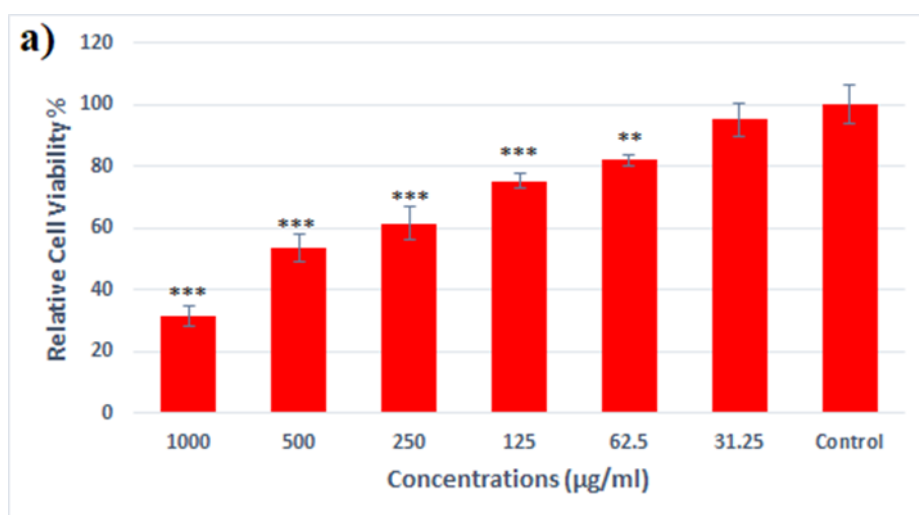
شکل شماره ۵. آنالیز عنصری نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$

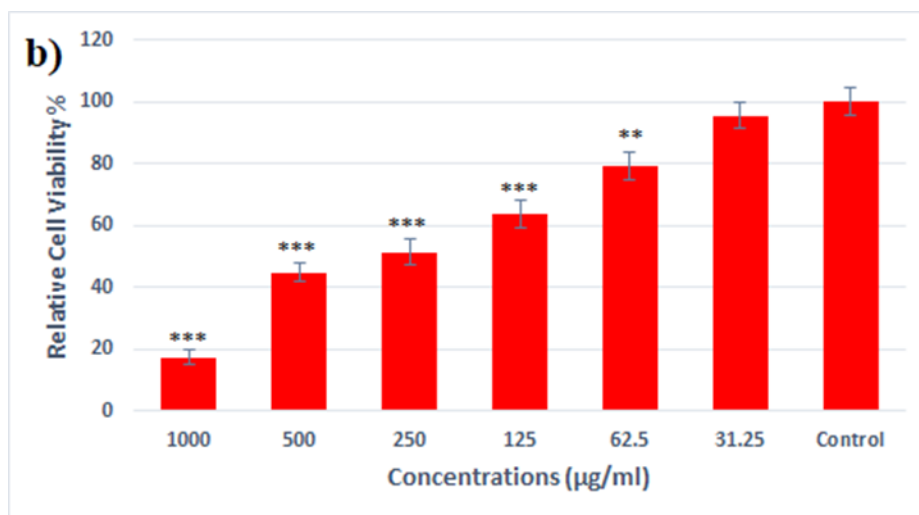
طبیعی بود. تیمار هر دو رده سلولی با غلظت‌های بزرگ‌تر از ۶۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر سبب کاهش معنی‌دار هر دو نوع سلول شد، اگرچه میزان غلظت نیمه‌مهارى نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  برای سلول‌های سرطان کبد و سلول‌های طبیعی به ترتیب ۲۷۷ و ۴۵۸ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. شکل شماره ۶ درصد زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  را نمایش می‌دهد.

#### زنده‌مانی سلول‌ها:

به منظور بررسی اثر نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$

بر زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد و سلول‌های غیرسرطانی از آزمون MTT استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد، با وجود اینکه نانوذره سنتز شده آثار مهاری بر هر دو رده سلولی مطالعه شده داشت، اما آثار مهارکنندگی آن علیه سلول‌های سرطانی به میزان چشمگیری بیشتر از سلول‌های



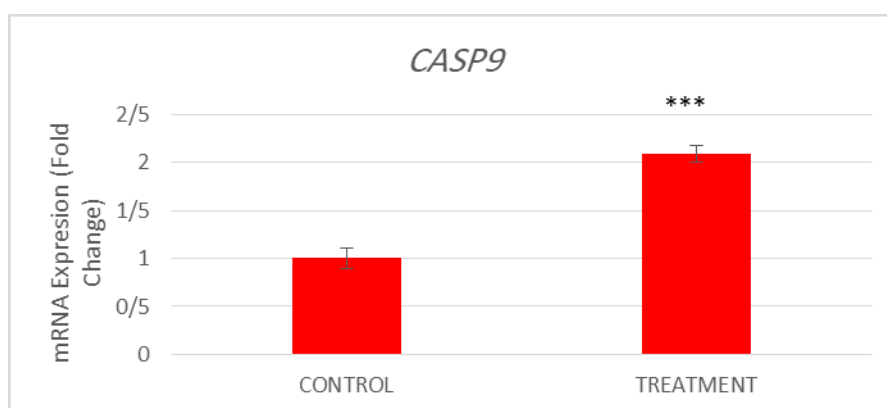
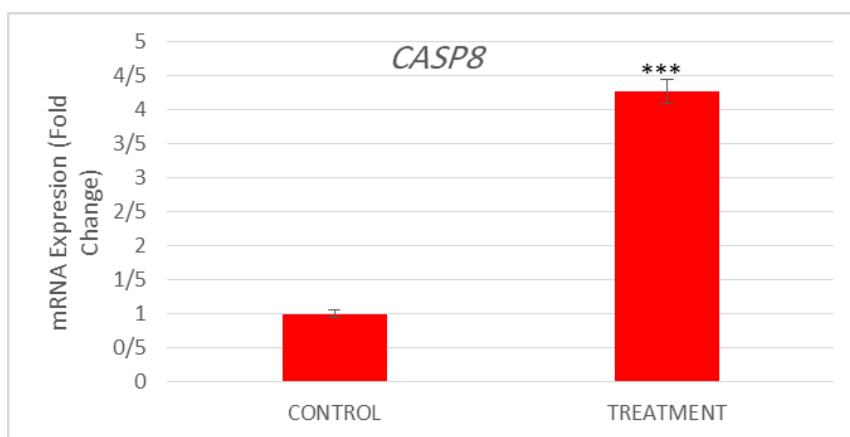


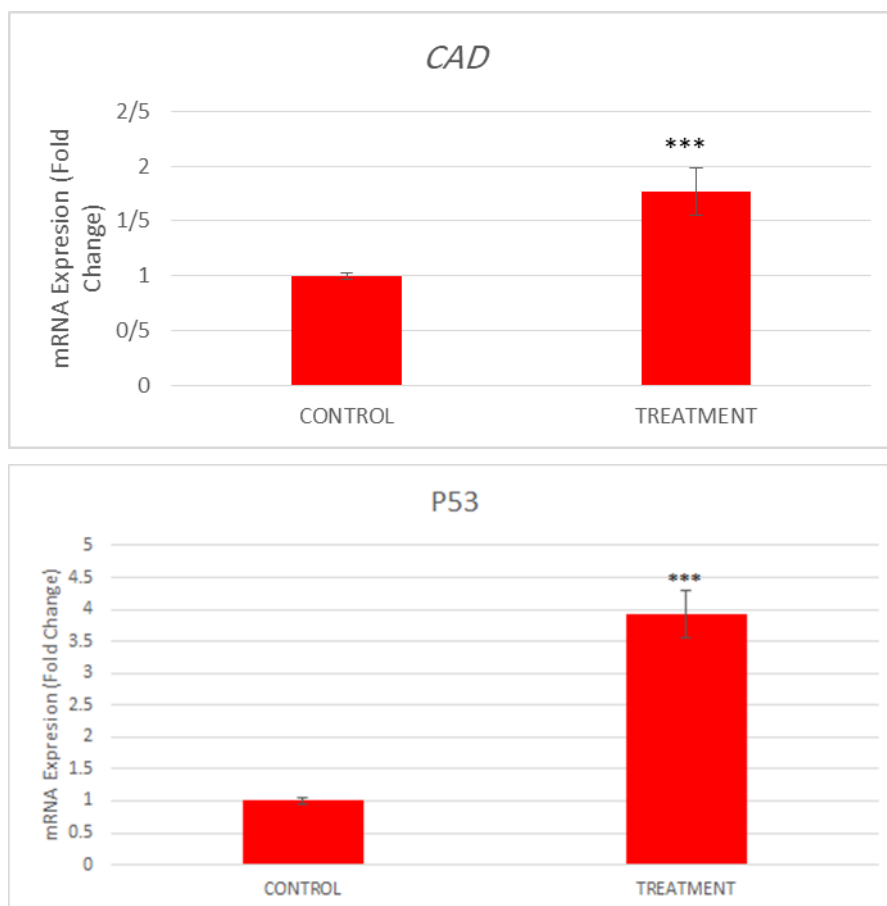
شکل شماره ۶. اثر غلظت‌های مختلف نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  بر زنده‌مانی سلول‌های طبیعی (a) HEK293 و سلول‌های رده سرطان کبد (b) (HepG2). ستاره‌ها (\*) تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند (\*\*\*= $P<0.001$ , \*\*= $P<0.01$ , \*= $P<0.05$ ).

ژن‌های مطالعه‌شده نسبت به تیمار شاهد گردید؛ به این معنی که میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ پس از تیمار سلول‌ها با نانوذره به ترتیب به میزان  $4/27$  و  $2/09$  برابر افزایش یافت؛ همچنین ژن‌های p53 و دی ان آر فعال‌شونده توسط کاسپاز پس از تیمار با نانوذره به میزان  $3/92$  و  $1/76$  برابر افزایش بیان داشتند. نتایج در شکل شماره ۷ نمایش داده شده است.

#### بررسی بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز:

به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های مسیر آپوپتوز شامل دی ان آر فعال‌شونده توسط کاسپاز، p53، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹، از آزمایش ریل‌تایم پی‌سی آر استفاده شد. بر اساس نتایج، تیمار سلول‌های رده سرطان کبد با نانوذره  $Fe_3O_4@Glu-Safranal$  سبب افزایش بیان معنی‌دار همه





شکل شماره ۷. بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد تیمار شده با نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Safranal}$ . همه ژن‌ها نسبت به شاهد افزایش بیان معنی‌داری دارند. ستاره‌ها (\*) تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند (\*\*\*= $P < 0.001$ , \*\*= $P < 0.01$ , \*= $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از نانوذرات مهندسی‌شده مغناطیسی که گروه‌های دارویی مؤثر داشته باشند، می‌تواند سبب بهبود اثربخشی و کاهش آثار سمیتی این داروها شود و نویدبخش درمان‌های مؤثرتر علیه انواع سرطان باشد (۱۶). از سویی، بسیاری از ترکیبات ضدسرطانی با ایجاد اختلال در روند طبیعی سلول‌ها، سبب القای آپوپتوز و مرگ در سلول‌ها می‌گردند؛ از این رو، ارزیابی شاخص‌های دخیل در آپوپتوز می‌تواند تحلیل مناسبی درباره سازوکارهای ضدسرطانی داروها در اختیار قرار دهد. بر اساس این، پژوهش حاضر به سنتز نانوذره اکسید آهن پوشش‌دهی شده با گلوکز و کتزوگه با سافرانال و ارزیابی اثر آن بر میزان زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان کبد و میزان بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز پرداخته است.

بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی نشان داد که نانوذرات

ساخته‌شده در این مطالعه شکل نسبتاً کروی و با اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارند. شکل و اندازه نانوذرات دو عامل مهم اثرگذار در میزان نفوذ و توزیع درون‌بافتی نانوذرات هستند که می‌توانند روی اثربخشی آنان تأثیرگذار باشند. ذرات کروی و کوچک راحت‌تر خود را به بافت‌های هدف می‌رسانند و آثار مدنظر را اعمال می‌کنند؛ همچنین وجود بار منفی سطحی روی نانوذرات فراهم‌آورنده نیروی دافعه میان آنان به منظور جلوگیری از تجمع و به هم پیوستگی آنان است. در این مطالعه مشاهده شد که نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Safranal}$  در یک الگوی وابسته به غلظت، آثار مهارتی بر زنده‌مانی سلول‌های مطالعه‌شده شامل سلول‌های رده سرطان کبد و سلول‌های طبیعی فیروبلات انسانی داشت، اگرچه نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در میزان اثر مهارکنندگی نانوذره بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی بود؛ به بیان دیگر، نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Safranal}$  اثر

هر دو مسیر آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان کبد شود، اگرچه افزایش بیان قوی‌تر ژن کاسپاز ۸ ممکن است نشان‌دهنده نقش پررنگ‌تر سیگنال‌های مسیر بیرونی آپوپتوز در این فرایند باشد. گفتنی است، چنین فرضیه‌ای نیازمند مطالعات تکمیلی است.

آنزیم DNase شونده با دی ان آز فعال‌شونده توسط کاسپاز یک آنزیم با قابلیت تجزیه DNA است که در گام‌های نهایی آپوپتوز، جایی که کروموزوم سلول می‌بایست تجزیه شود، دخالت دارد. این آنزیم توسط ژن دی ان آز فعال‌شونده توسط کاسپاز بیان می‌گردد که یک ژن القاپذیر در پاسخ به محرک‌های مسیر آپوپتوز است. در شرایط رشد طبیعی سلول، این ژن بیان بسیار کمی دارد که این پدیده به علت وجود اثر مهارکنندگی پروتئین ICAD بر بیان این ژن است. طی فرایند آپوپتوز و به دنبال فعال شدن آبشار کاسپازی، پروتئین مهارکننده در اثر فعالیت پروتئولیتیک کاسپاز ۳ تجزیه می‌شود و این رویداد سبب القای بیان ژن دی ان آز فعال‌شونده توسط کاسپاز در سلول می‌گردد (۲۱). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن دی ان آز فعال‌شونده توسط کاسپاز در سلول‌های تیمار شده با نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  به میزان  $1/76$  برابر افزایش بیان داشت که تأییدکننده فعال شدن مسیر آپوپتوز در سلول‌های مطالعه شده است. همسو با نتایج این مطالعه، دلالت و همکاران نشان دادند که بیان این ژن در سلول‌های سرطان سینه تیمار شده با نانوذره نقره افزایش معنی‌دار داشت (۲۲).

پروتئین P53 را می‌توان مهم‌ترین عامل در تنظیم فرایند القا یا مهار آپوپتوز در نظر گرفت. این پروتئین مهارکننده توموری مهمی در سلول‌های یوکاریوتی است که میزان بیان آن معمولاً در پاسخ به آسیب‌های سلولی به‌ویژه آسیب به DNA و یا سایر استرس‌های سلولی افزایش می‌یابد که نتیجه آن، توقف چرخه سلولی و شروع آپوپتوز است. در واقع، این پروتئین یک عامل رونویسی است که از طریق افزایش بیان ژن‌های محرک آپوپتوز همچون Bax و Bak و کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوز همچون Bcl-2، سبب القای فعالیت سیگنال‌های آپوپتوز و افزایش فعالیت کاسپازی

ضدسرطانی بیشتری بر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی داشت. آثار سایتوتوکسیک نانوذره سنتز شده را می‌توان به‌طور عمده با وجود مولکول سافراناال در فرمولاسیون آن مرتبط دانست. در مطالعه‌ای نشان دادند که سافراناال آثار ضدسرطانی خود را از طریق تخریب رشته‌های DNA و به دنبال آن، جلوگیری از تکثیر و ترمیم قطعات DNA اعمال می‌کند؛ همچنین گزارش شد که سافراناال قادر به برهم‌کنش با پروتئین‌های توپولین است و از این طریق، مانع به هم پیوستگی آن‌ها و تشکیل رشته‌های دوک تقسیم می‌شود (۸). علاوه بر این، مطالعات گذشته نقش سافراناال را در فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی گزارش کرده‌اند که می‌تواند سبب مهار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی گردد (۹)؛ همچنین نانوذرات اکسید آهن علاوه ویژگی مغناطیسی که دارند، ممکن است در مرگ سلول‌های سرطانی نیز نقش داشته باشند. مطالعات پیشین گزارش کرده‌اند که نانوذرات اکسید آهن می‌تواند سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شوند و به دنبال آسیب رساندن به بخش‌های حیاتی سلول، سبب توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز گردند (۱۷، ۱۸).

بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با مسیر آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان کبد تیمار شده با  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار همه ژن‌های مطالعه شده بود. نتایج ما نشان داد که میزان بیان ژن‌های کاسپازهای ۸ و ۹ که رمزکننده کاسپازهای ۸ و ۹ هستند، در سلول‌های تیمار شده به ترتیب  $4/27$  و  $2/09$  برابر افزایش داشتند. کاسپازهای ۸ و ۹ آغازگرهای فعالیت آبشار کاسپازی به ترتیب در پاسخ به فعال شدن مسیر آپوپتوز گیرنده‌های مرگ (مسیر بیرونی) و آپوپتوز میتوکندریایی (مسیر درونی) هستند. فعال شدن این پروتئین‌ها سبب فعال کردن کاسپازهای عملگر همچون کاسپاز ۳ و ۶ می‌شود و با برش‌های پروتئولیتیک باعث تخریب پروتئین‌های سلول و در نتیجه، مرگ سلولی می‌گردد (۲۰، ۱۹). با توجه به افزایش بیان چشمگیر در ژن‌های هر دو کاسپاز، به نظر می‌رسد که نانوذره  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Safranal}$  از طریق تخریب اکسیداتیو اجزای سلولی و مهار تکثیر اسید نوکلئیک می‌تواند سبب فعال‌سازی

می‌شود (۲۳). با توجه به افزایش بیان ۳/۹۲ برابری بیان ژن p53 در سلول‌های تیمارشده با Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal در مقایسه با سلول‌های شاهد، آسیب‌های وارده ناشی از آثار مخرب مستقیم ساfranال بر فرایندهای سلولی و همچنین ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی را می‌توان به‌عنوان عوامل فعال‌سازی این پروتئین در نظر گرفت که به دنبال آن، سبب القای فعالیت کاسپازها به‌منظور تخریب پروتئین‌های سلولی و همچنین آنزیم‌های نوکلئازی همچون دی ان آاز فعال‌شونده توسط کاسپاز، برای تجزیه کروموزوم سلول و در نهایت مرگ سلولی می‌شود.

این مطالعه با هدف بررسی اثر نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal بر زنده‌مانی سلولی و بیان ژن‌های آپوپتوتیک در سلول‌های رده سرطان کبد انجام گردید. نتایج نشان داد که نانوذره سنتز شده سبب کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی می‌شود و با توجه به افزایش بیان معنی‌دار ژن‌های CASP9، CASP8، CAD و p53 می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فعال شدن مسیرهای آپپتوز محتمل‌ترین سازوکار اثر ضدسرطانی نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Glu-Safranal در سلول‌های مطالعه شده است.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد واحد رشت تشکر می‌نمایند.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

### حمایت مالی

تحقیق حاضر بدون حمایت مالی از طرف هرگونه مؤسسه یا سازمانی و تنها به وسیله هزینه‌های شخصی نویسنده مسئول صورت گرفته است.

### مشارکت نویسندگان

نویسندگان دارای سهم مساوی در مقاله می‌باشند.



## References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71:209-49. doi:10.3322/caac.21660.
- Chi X, Liu K, Luo X, Yin Z, Lin H, Gao J. Recent advances of nanomedicines for liver cancer therapy. *J Mater Chem B* 2020;8:3747-71. doi:10.1039/C9TB02871D.
- Gavas S, Quazi S, Karpiński TM. Nanoparticles for cancer therapy: current progress and challenges. *Nanoscale Res Lett* 2021; 16:173. doi:10.1186/s11671-021-03628-6.
- Hernández-Hernández AA, Aguirre-Álvarez G, Cariño-Cortés R, Mendoza-Huizar LH, Jiménez-Alvarado R. Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer. *Chem Pap* 2020; 74:3809-24. doi:10.1007/s11696-020-01229-8
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2007; 2:22-32. doi:10.1016/S1748-0132(07)70084-1.
- 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.
- Ahamed M, Alhadlaq HA, Khan MM, Akhtar MJ. Selective killing of cancer cells by iron oxide nanoparticles mediated through reactive oxygen species via p53 pathway. *J Nanoparticle Res* 2013; 15:1-1. doi:10.1007/s11051-012-1225-6.
- Naghshineh A, Dadras A, Ghalandari B, Riazi GH, Modaresi SM, Afrasiabi A, et al. Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An in vitro study. *Chem Biol Interact* 2015; 238:151-60. doi:10.1016/j.cbi.2015.06.023.
- Al-Hrou AA, Chaiboonchoe A, Khraiweh B, Murali C, Baig B, El-Awady R, et al. Safranal induces DNA double-strand breakage and ER-stress-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* 2018; 8:16951. doi:10.1038/s41598-018-34855-0.
- Shokrollahi F, Salehzadeh A, Kafilzadeh F, Zaefizadeh M. Cytotoxic effect of iron oxide nanoparticles functionalized with glucose and conjugated with Coumarin (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ Glu-Coumarin NPs) on liver cancer, HepG2, cell line. *Inorg Chem Commun* 2023; 157:111380. doi:10.1016/j.inoche.2023.111380.
- Mikaeili Ghezalje S, Salehzadeh A, Ataei-e Jaliseh S. Iron oxide nanoparticles coated with Glucose and conjugated with Safranal (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ Glu-Safranal NPs) inducing apoptosis in liver cancer cell line (HepG2). *BMC Chem* 2024;18:33. doi:10.1186/s13065-024-01142-1.
- Sadat Shandiz SA, Montazeri A, Abdolhosseini M, Hadad Shahrestani S, Hedayati M, Moradi-Shoeili Z, et al. Functionalization of Ag nanoparticles by glutamic acid and conjugation of Ag@ Glu by thiosemicarbazide enhances the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *J Clust Sci* 2018;29:1107-14. doi:10.1007/s10876-018-1424-0.
- 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.
- Emami N, Farhadian M, Solaimany Nazar AR, Tangestaninejad S. Adsorption of cefixime and lamotrigine on HKUST-1/ZIF-8 nanocomposite: Isotherms, kinetics models and mechanism. *Int J Environ Sci Technol* 2023; 20:1645-72. doi:10.1007/s13762-022-04679-7.
- Abbaszadegan S, Al-Marzouqi AH, Salem AA, Amin A. Physicochemical characterizations of safranal-β-cyclodextrin inclusion complexes prepared by supercritical carbon dioxide and conventional methods. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 83:215-26. doi:10.1007/s10847-015-0555-2.
- Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Dev Res* 2006; 67:55-60. doi:10.1002/ddr.20067.
- Huang G, Chen H, Dong Y, Luo X, Yu H, Moore Z, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. *Theranostics* 2013; 3:116. doi:10.7150/thno.5411.
- Yusefi M, Shameli K, Su Yee O, Teow SY, Hedayatnasab Z, Jahangirian H, et al. Green synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles stabilized by a Garcinia mangostana fruit peel extract for hyperthermia and anticancer activities. *Int J Nanomedicine* 2021; 2515-32. doi:10.2147/IJN.S284134.
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:897-907. doi:10.1038/nrm1496.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; 37:719-27. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.
- Yuste VJ, Sánchez-López I, Solé C, Moubarak RS, Bayascas JR, Dolcet X, et al. The contribution of apoptosis-inducing factor,

- caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280:35670-83. doi:10.1074/jbc.M504015200.
22. Delalat R, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Antineoplastic effectiveness of silver nanoparticles synthesized from *Onopordum acanthium* L. extract (AgNPs-OAL) toward MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol Biol Rep* 2022;1-8. doi:10.1007/s11033-021-06936-3.
  23. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22:9030-40. doi: 10.1038/sj.onc.1207116.
  24. 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.
  25. Zarrinpour V, Mohammad Amoie A, Sadat Shandiz SA, Salehzadeh A. Effect of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@ Ag Nanocomposite Biosynthesized by *Chlorella vulgaris* on the Expression of P53, Caspase 9, and CAD Genes in Breast Cancer Cell Line. *Anim Biol J* 2023;1:137-148.