

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

Zahra Ghavamifard¹ , Abdolhassan Doulah^{1*} , Ali Salehzadeh² 

¹Dept of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

²Dept 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

ABSTRACT

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 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$) 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 (IC_{50}) 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ 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 IC_{50} was $93\mu\text{g/ml}$. 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ 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.

بررسی فعالیت مهاري نانوذره اکسيد آهن متصل به کومارين بر رده سلولي سرطان پستان

زهرا قوامي فرد^۱، عبدالحسن دولاح^{۱*}، علي 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

چکیده

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

مقدمه: امروزه استفاده از نانوذرات فلزی عامل دار شده در مهار سلول های سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت مهاري نانوذره اکسيد آهن پوشش دهی شده با گلوکز و متصل به کومارين ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-}$ Coumarin) بر رده سلولي سرطان پستان و بررسی بیان ژن های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ انجام شد.

مواد و روش ها: ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات با استفاده از آنالیزهای FT-IR، XRD، EDS-map و تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی ارزیابی گردید. بررسی میزان سمیت نانوذرات سنتز شده با استفاده از آزمایش MTT تعیین شد و دوز نیمه مهاري (IC_{50}) محاسبه گردید؛ همچنین اثر نانوذرات بر القای آپوپتوز از طریق سنجش میزان بیان ژن های کاسپاز ۸ و ۹ و آنالیز فلوسایتومتری بررسی شد. تجزیه و تحلیل های آماری با نرم افزار SPSS صورت گرفت. از آنالیز واریانس یک طرفه برای ارزیابی تفاوت معنی داری میان گروه های تیمار شده با نانوذرات و کنترل استفاده گردید و P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش: سنتز نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ با آزمایش های 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 سلول های MCF-7 با نانوذرات سبب کاهش معنی دار زنده ماندن سلول های سرطانی شد و مقدار IC_{50} ، ۹۳ میکروگرم/میلی لیتر بود. مواجهه سلول ها با دوز نیمه مهاري نانوذرات سبب افزایش معنی دار بیان کاسپاز های ۸ و ۹ به ترتیب به میزان ۲/۶ و ۲/۹ برابر در مقایسه با گروه شاهد گردید، ضمن اینکه فراوانی سلول های آپوپتوزی پس از تیمار با نانوذرات، از ۲/۲۱ درصد به ۸۴ درصد رسید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ باعث افزایش بیان کاسپاز های ۸ و ۹ در سلول های رده سرطان پستان شد و در نتیجه، سبب فعال سازی مسیر های آپوپتوز برون زاد و درون زاد می گردد و به این ترتیب، از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کند.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، کومارين، سرطان پستان، فلوسایتومتری

استناد: قوامي فرد زهرا، دولاح عبدالحسن، صالح زاده علی. بررسی فعالیت مهاري نانوذره اکسيد آهن متصل به کومارين بر رده سلولي سرطان پستان.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرداد ۱۴۰۳؛ ۳۲(۳): ۳۴-۲۱.



به علت داشتن خاصیت مغناطیسی و زیست سازگاری نسبتاً قابل قبول، استفاده از نانوذرات اکسید آهن در طراحی نانومحصولات جدید در زمینه تشخیص و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این ذرات علاوه بر اینکه اندازه کوچک و سطح مؤثر وسیع دارند، به سبب ویژگی مغناطیسی شان به راحتی می توانند با استفاده از یک نیروی مغناطیسی خارجی، در بافت های میزبان هدایت شوند؛ بنابراین، نانوذرات مغناطیسی را می توان به عنوان ابزاری برای دارورسانی هدفمند به بافت های میزبان در نظر گرفت. استفاده از نانوذرات اکسید آهن تاکنون بیشتر در زمینه تصویربرداری و شناسایی بافت های توموری و همچنین استفاده از آنان در زمینه گرمادرمانی بافت های توموری مورد توجه بوده اند (۱)، در حالی که این ذرات می توانند در انتقال ترکیبات دارویی به بافت های سرطانی نیز مورد توجه و مطالعه قرار گیرند.

کومارین ها 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 می شوند و ویژگی های درمانی امیدوارکننده ای دارند (۳، ۲). این ترکیبات دارای مشتقات طبیعی متنوعی هستند و خواص زیستی آنان از جمله آثار ضد ویروسی، ضدباکتریایی و ضدقارچی، ضدانعقادی و آثار محرک بر دستگاه عصبی مرکزی گزارش شده است (۲)؛ همچنین مطالعات پیشین نشان داده اند که این ماده خواص مهار تکثیر و آثار سمیت سلولی بر بسیاری از انواع رده های سلول سرطانی از جمله سرطان های 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 توسعه مولکول های چندمنظوره ترکیبی است، به عنوان یک رویکرد جدید در طراحی داروهای شیمی درمانی ظهور کرده است. چنین ترکیباتی می توانند فعالیت های بیولوژیکی متعدد، مشخصات انتخابی اصلاح شده و عوارض جانبی کمتر داشته باشند؛ به عنوان مثال، در سالیان اخیر مطالعاتی درباره آثار ضدسرطانی کومارین-۳-سولفانامید و همچنین کومارین-

پیرازولین انجام شده است که نتایج نشان دهنده بهبود ویژگی های داروشناختی و درمانی هیبریدهای حاصله بود (۵، ۶). با توجه به ویژگی های ضدسرطانی کومارین از یک سو و خواص زیست سازگاری، مغناطیسی و ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن از سوی دیگر، هدف از این پژوهش بررسی آثار ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن پوشش دهی شده با گلوکز و متصل به کومارین بر رده سلولی سرطان پستان از طریق ارزیابی آثار مهار سلولی و بیان ژن های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ است.

مواد و روش ها

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 میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت یک ساعت بر روی هیتز با دمای حدود ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد؛ سپس به آن ۴۰ میلی لیتر 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 هیتز حرارت داده شد. رسوب حاصل شده 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 درجه سانتی گراد خشک گردید.

به منظور پوشش دهی ذرات با گلوکز، یک گرم از نانوذره Fe_3O_4 و ۰/۵ گرم از دی-گلوکز (شرکت مرک، آلمان) در ۶۰ میلی لیتر 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 درجه سانتی گراد حرارت دهی شد. پس از سانتریفوژ کردن این مخلوط با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه، رسوب حاصله جداسازی، شستشو و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید.

به منظور اتصال به کومارین، یک گرم از نانوذرات Fe_3O_4 پوشش داده شده با گلوکز با ۰/۱ گرم کومارین (شرکت سیگما-آلد ریچ، آلمان) در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر توسط دستگاه التراسونیک پراکنده شدند و این مخلوط توسط

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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ ، ویژگی‌های 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 ساخت شرکت Perkin Elmer مدل Spectrum 100 و در محدوده طول‌موج $4500-500\text{ cm}^{-1}$ صورت گرفت.

آزمایش XRD برای بررسی و تشخیص ساختار کریستالی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس (PW1730، فیلیپس هلند) با طول‌موج $1.54056\text{ \AA}$ (آنگستروم) $\text{Cu-K}\alpha$ X-ray tube، انجام شد. نمونه سنتز شده پودری روی مرکز پراش سنج چرخان در دستگاه قرار گرفت، اشعه ایکس با زاویه 10° تا 80° درجه روی نمونه تابانده شد و زاویه 2θ اندازه‌گیری گردید؛ همچنین بررسی عناصر تشکیل‌دهنده نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ با استفاده از آنالیز پراکندگی انرژی اشعه (EDS-mapping) X و با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM شرکت Tescan (MIRA3)، جمهوری چک) انجام شد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی، اندازه و میزان به‌هم‌پیوستگی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ بر سلول‌های سرطان پستان: در این پژوهش، از سلول‌های سرطان پستان رده MCF7 استفاده گردید. سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و از محیط کشت RPMI1640 (شرکت سیگما-آلد ریچ، آلمان)

برای تکثیر و آماده‌سازی سلول‌ها استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ بر سلول‌های سرطان پستان و تعیین غلظت نیمه‌مهارى آنان، از آزمایش MTT (شرکت سیگما-آلد ریچ، آلمان) استفاده شد. به این منظور، در ابتدا سلول‌ها (10000 سلول) در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی رشد گردیدند؛ همچنین یک محلول استوک اولیه از نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ در بافر نمکی فسفات (PBS) (شرکت سیگما-آلد ریچ، 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 محدوده $15/6$ تا 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ همچنین به چاهک‌های کنترل به جای نانوذرات، PBS افزوده شد.

سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند و سپس محتوی محیط کشت تخلیه شد. در مرحله بعدی، 200 میکرولیتر محلول MTT با غلظت 0.5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده و پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، مایع رویی حذف گردید و 100 میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) (شرکت سیگما-آلد ریچ، آلمان) به هر چاهک اضافه شد. پس از پیتاژ، جذب نوری در طول‌موج 570 نانومتر با استفاده از خوانشگر الیزا (مدل: Elx 800، آمریکا) قرائت گردید. زیستایی سلول‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (۸) و غلظت نیمه‌مهارى نانوذرات با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism vol.10 محاسبه گردید:

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

درصد زنده‌مانی = درصد سمیت سلولی - ۱۰۰

بررسی میزان آپوپتوز/نکروز سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتري: به‌منظور تعیین اثر نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ 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 نیمه‌مهارى‌شان تیمار گردیدند، ضمن اینکه به سلول‌های

آن‌ها با استفاده از محلول تجاری تریزول (شرکت سیگما-آلدیچ، آلمان) و بر اساس دستورالعمل سازنده 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 شماره ۱ و ۲ به ترتیب 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).

کنترل به جای نانوذرات، PBS افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه 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-آلدیچ، آلمان) رنگ‌آمیزی گردیدند و سپس توسط دستگاه فلوسایتمتری (شرکت ParTec، ساخت آلمان) بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه Q1 تا Q4 صورت گرفت.

بیان ژن: به منظور بررسی اثر نانوذرات $Fe_3O_4@Glu$ 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

جدول شماره ۱. ویژگی پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش

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

جدول شماره ۲. مواد موردنیاز برای انجام PCR کمی

ماده 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
cdNA اختصاصی هر ژن	1µl	تهیه‌شده از مراحل قبل
آب مقطر	2.8µl	-

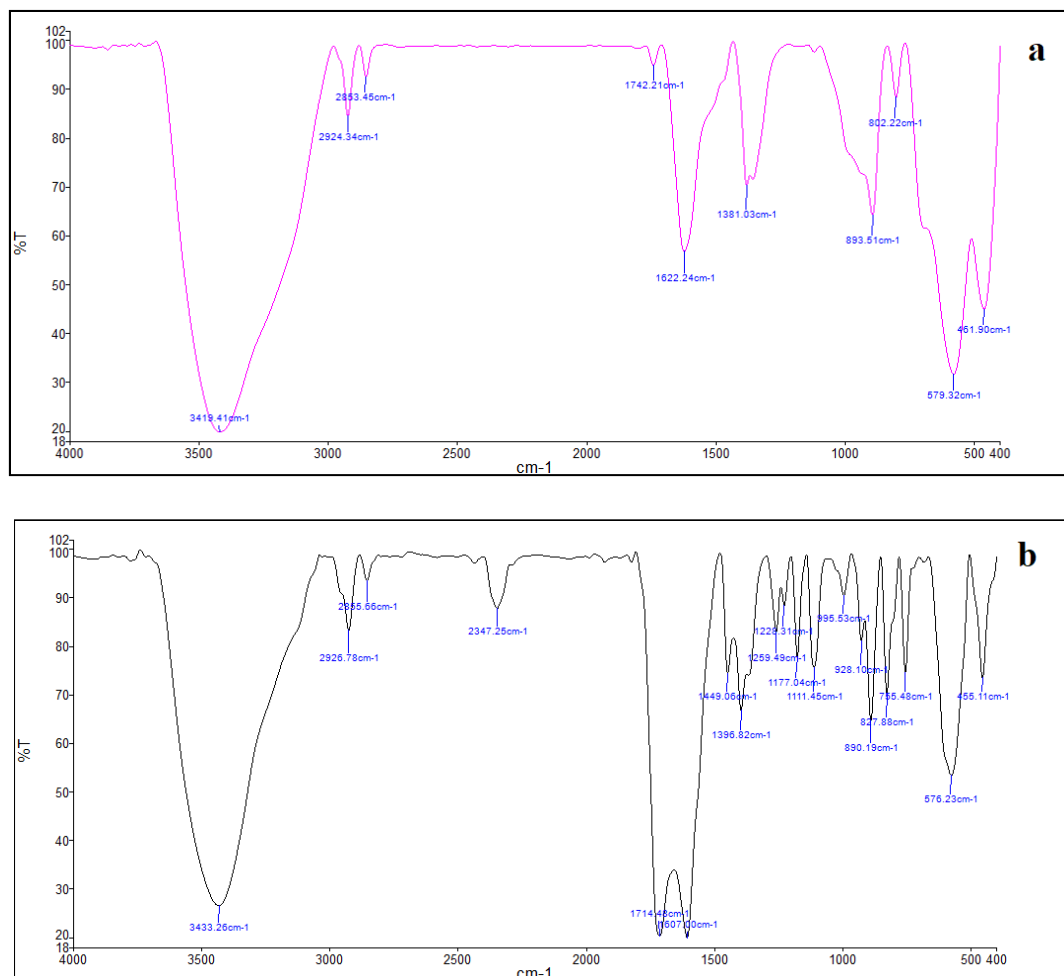
یک‌طرفه انجام گردید و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

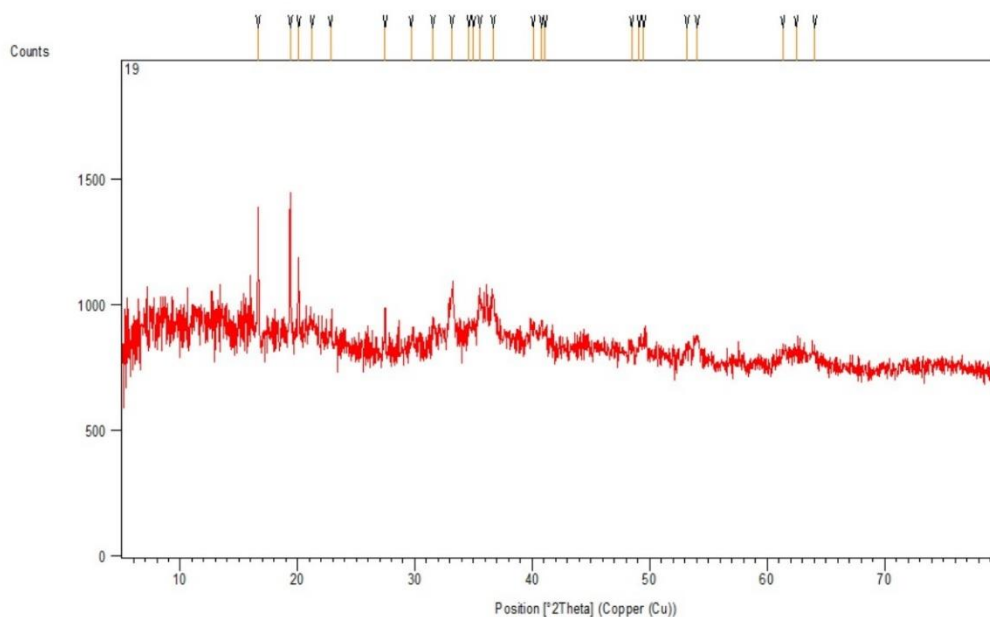
تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش MTT و بررسی بیان ژن‌ها در سه تکرار انجام شد. بررسی وجود اختلاف آماری معنی‌دار با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.18 و آنالیز واریانس

دو ماده در ساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ می‌توان نتیجه گرفت که این ذرات به درستی سنتز و کونژوگه شده‌اند. با توجه به الگوی XRD نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ ، مقادیر θ برابر ۳۵ و ۴۳ و ۶۳ مربوط به نانوذرات آهن اکسید است که مطابق با شماره کارت ۰۸۶۳-۰۳ است؛ همچنین با توجه به آمورف بودن ساختار کومارین، ساختار این ماده در طیف مشخص نبود و پیک‌ها شارپ است (شکل شماره ۲).

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات: در نوار FT-IR برای نانوذرات Fe_3O_4 (شکل شماره a)، طول‌موج‌های جذبی شدید در 451 cm^{-1} و 579 cm^{-1} ناشی از پیوندهای Fe-O مربوط به یون‌های Fe^{2+} و Fe^{3+} است که این نشانه شکل‌گیری ساختار Fe_3O_4 است؛ همچنین در نوار FTIR مربوط به $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ (شکل شماره b)، طول‌موج‌های در محدوده 755 cm^{-1} تا 1259 cm^{-1} مربوط به پیوندهای C-C ، C-H و C=CH در حلقه بنزنی موجود در ساختار کومارین هستند. با توجه به وجود پیک‌های مربوط به



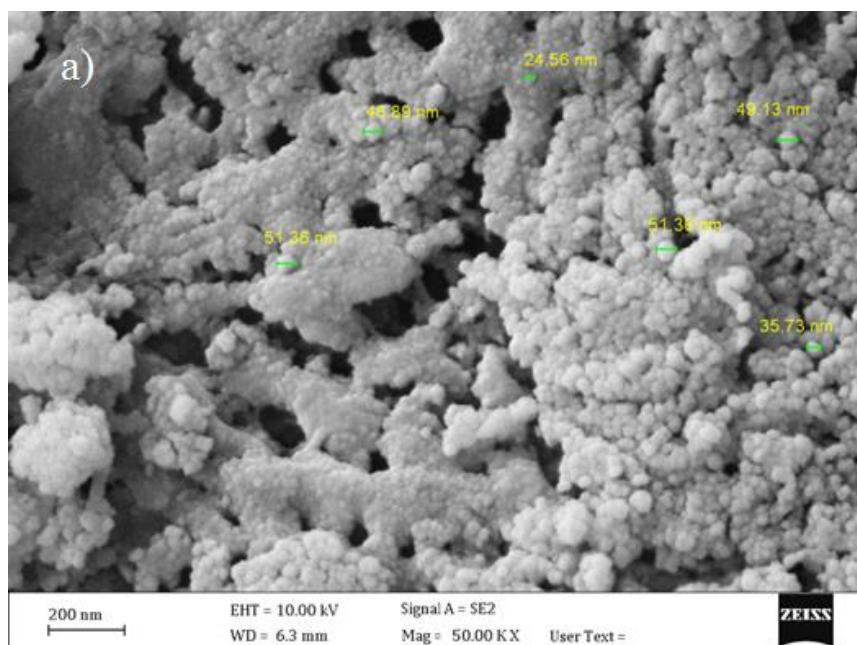
شکل شماره ۱. طیف FT-IR مربوط به نانوذرات Fe_3O_4 (a) و $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ (b).

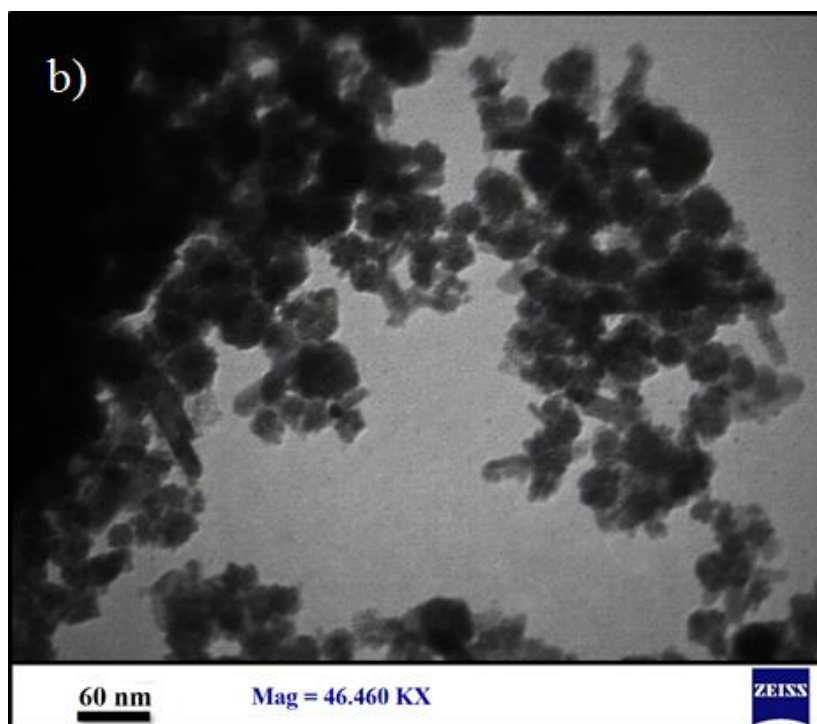


شکل شماره ۲. تجزیه و تحلیل XRD نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$

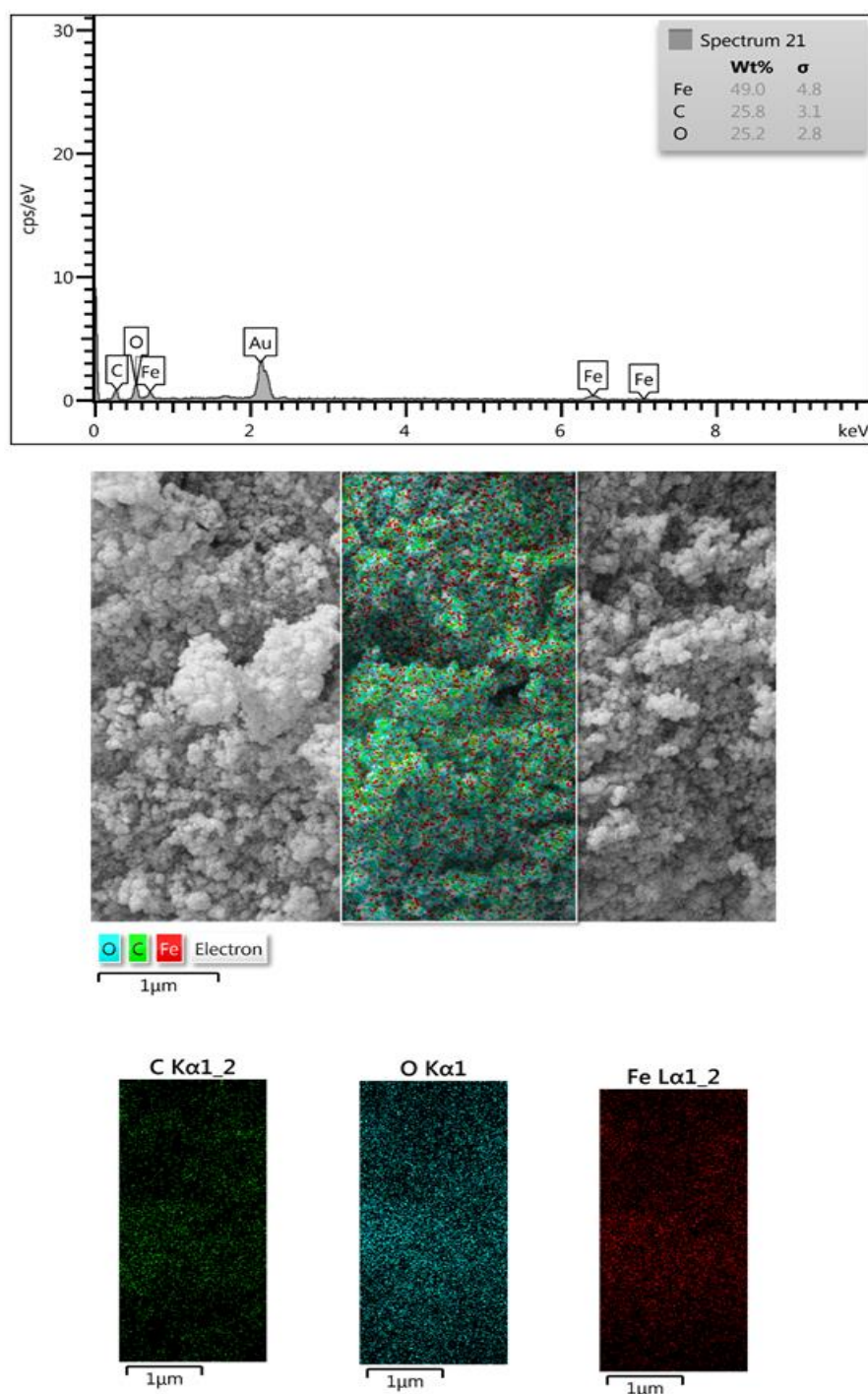
داد که نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ عناصر آهن، کربن و اکسیژن دارند و هیچ گونه ناخالصی عنصری در آنان مشاهده نشد. نتایج این تجزیه و تحلیل در شکل شماره ۴ نمایش داده شده است.

بر اساس تصویربرداری میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره (شکل شماره ۳)، نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ اندازه ذراتی در محدوده ۲۵ تا ۵۰ نانومتر و ظاهری نسبتاً کروی و میزان به هم پیوستگی متوسط دارند؛ همچنین آنالیز طیف‌سنجی انرژی پراکندگی پرتو ایکس نشان





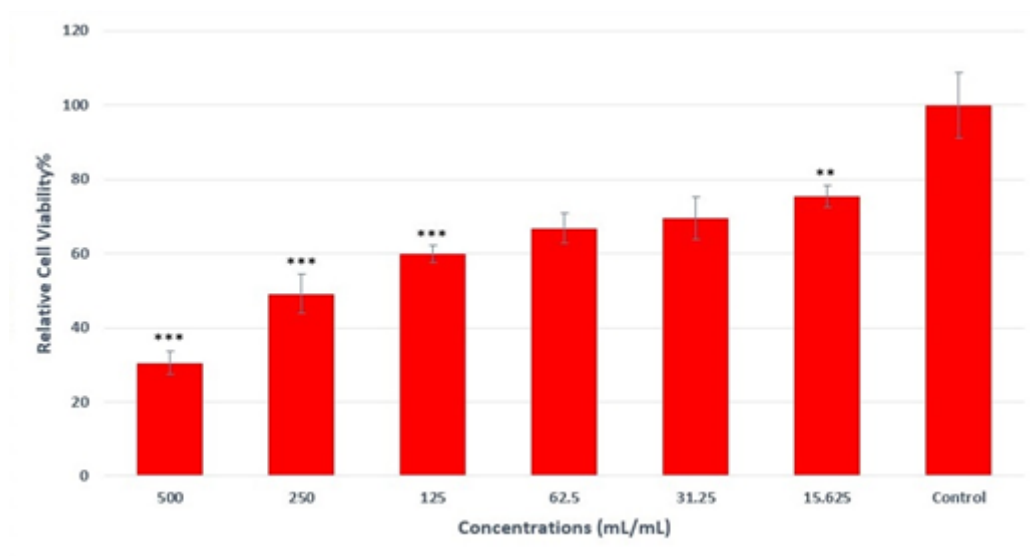
شکل شماره ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (a) و گذاره (b) از نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$



شکل شماره ۴: تجزیه و تحلیل EDS-map نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ برای نشان دادن خالص بودن نانوذرات

به طوری که سبب کاهش معنی دار میزان زنده ماندن سلول ها در مقایسه با سلول های شاهد شدند؛ همچنین غلظت نیمه مهاری نانوذرات برای سلول های سرطان پستان ۹۳ میلی گرم/میلی لیتر بود. نتایج در شکل شماره ۵ قابل مشاهده است.

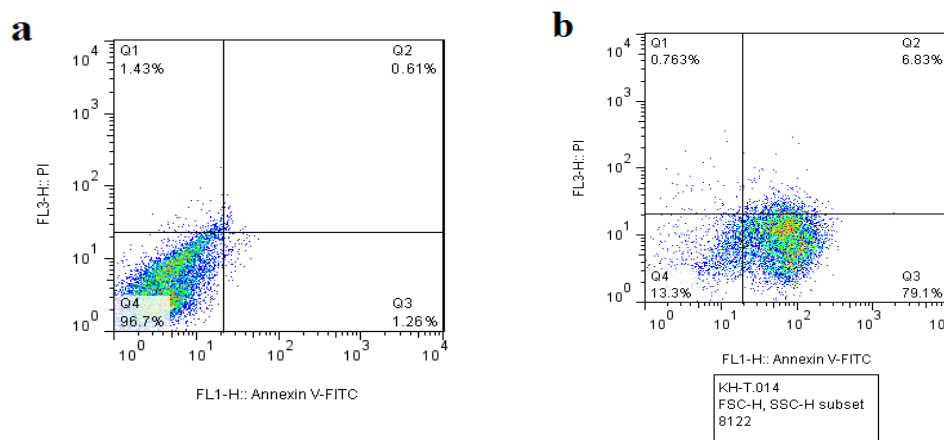
آثار سمیت سلولی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-}$ Coumarin بر سلول های سرطان پستان: نتایج نشان داد که نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ در همه غلظت های استفاده شده آثار سمیتی بر سلول های سرطانی داشتند،



شکل شماره ۵. بررسی آثار سمیت سلولی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ بر سلول‌های سرطان پستان. ستاره‌ها [*] تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند (***= $P<0.001$, **= $P<0.01$, *= $P<0.05$).

تیمار سلول‌ها با نانوذرات، میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری به ترتیب به ۷۹/۱ و ۶/۸۳ درصد رسید. نتایج در شکل شماره ۶ نمایش داده شده‌اند.

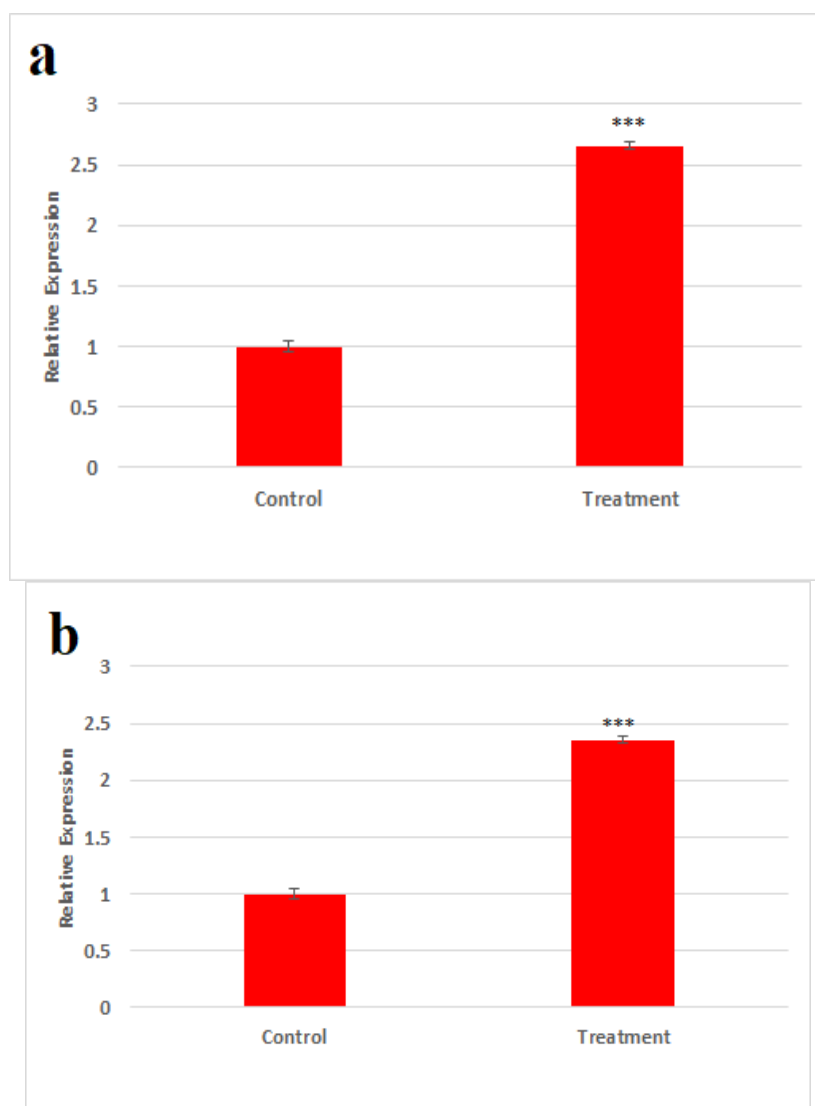
آزمایش فلوسایتومتری: بر اساس نتایج آزمایش فلوسایتومتری، میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری در سلول‌های شاهد به ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۶۱ درصد است، درحالی‌که پس از



شکل شماره ۶. بررسی اثر نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ بر میزان سلول‌های آپوپتوزی و نکروتیک. a. سلول‌های شاهد و b. تیمار شده؛ Q1. سلول‌های نکروتیک؛ Q2. آپوپتوز تأخیری؛ Q3. آپوپتوز اولیه؛ Q4. سلول‌های سالم

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 شماره ۷ نمایش داده شده‌اند.

بررسی بیان نسبی ژن‌های کاسپاز: نتایج آزمایش PCR کمی نشان داد که مواجهه سلول‌های MCF7 با نانوذرات یادشده به افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ به میزان ۲/۶ برابر در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل منجر شده بود که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میان این دو گروه



شکل شماره ۷. بررسی اثر مواجهه با نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ 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 محدوده نانو داشتند و به‌خوبی به کومارین اتصال یافتند. میزان به‌هم چسبیدگی ذرات در حد قابل قبول بود و بدون ناخالصی بودند. بر اساس نتایج آزمایش سمیت سلولی، نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-Coumarin}$ از پتانسیل ضدسرطانی بسیار مناسبی برخوردار است، به‌طوری‌که در همه غلظت‌های استفاده‌شده سبب مهار معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شدند. مهار سلول‌های سرطان پستان توسط نانوذرات سنتز شده را می‌توان به وجود همه اجزای سازنده 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 $\text{P450 2A6 (CYP 2A6)}$ به ۷-هیدروکسی کومارین متابولیزه می‌شود. مشخص شده 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 مهارکننده آپوپتوز است که مانع فعال شدن کاسپازهای مسیرهای آپوپتوز درون‌زاد به‌ویژه کاسپاز ۹ می‌شود؛ 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 مهارکننده آلوستریک MEK1/2 شناخته می‌گردند. MEK1/2

تنظیم‌کننده 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 نشان‌دهنده آثار مهارى مشتقات کومارین بر سلول‌های سرطان پستان هستند؛ به‌عنوان مثال، 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 چرخه 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 تسهیل‌کننده جذب و اندوسیتوز نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ باشد؛ همچنین نانوذرات اکسید آهن نیز به‌طور مشابه، با بسیاری از نانوذرات فلزی دیگر می‌تواند باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن گردد. این مولکول‌ها از طریق برهم‌کنش با اجزای سلول، به‌ویژه مولکول DNA، باعث آسیب رساندن به آن، توقف چرخه سلولی و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز می‌شوند (۱۴).

بررسی اثر نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ 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 پیش‌برنده مسیرهای آپوپتوز هستند. کاسپازها بسته به اینکه سیگنال‌های سلولی فعال‌کننده 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 ($\text{FasL}/\text{CD95L}$)، فاکتور نکروز تومور آلفا ($\text{TNF-}\alpha$) و فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا و سیتوکین‌ها شناخته می‌شود (۱۶). افزایش میزان بیان کاسپازهای ۸ و ۹ نشان‌دهنده آثار القای آپوپتوز توسط نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ است. به‌نظر می‌رسد که نانوذرات سنتز شده از طریق تحریک هر دو مسیر سیگنالی آپوپتوز می‌توانند باعث توقف تکثیر و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی گردند. در تأیید این فرضیه، نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک پس از مواجهه با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ بود.

در این مطالعه، به بررسی آثار ضدسرطانی نانوذرة $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ بر سلول‌های رده سرطان پستان و بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ پرداخته شد. نتایج نشان داد که نانوذرة $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ سبب افزایش معنی‌دار بیان کاسپازهای ۸ و ۹ می‌شود؛ همچنین افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان پستان در سلول‌های تیمار شده با $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-Coumarin}$ مشاهده گردید که نشان‌دهنده ویژگی‌های ضدسرطانی این نانوذرات است.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه 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 منافی درباره پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق

همه مراحل این تحقیق در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی اهواز با کد ۴۹۵۹۷۱۰۱۱۴۰۱۶۲۵۵۴۵۱۶

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

بخش‌های پژوهش مشارکت داشته‌اند.

References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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-aryl coumarins. *Chin Chem Lett* 2010; 21:1295-8. doi: 10.1016/j.cclet.2010.04.034.
- 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.
- Shokrollahi F, Salehzadeh A, Kafilzadeh F, Zaefizadeh M. Evaluation the effect of Iron oxide nanoparticles functionalized by glucose and conjugated with Coumarin ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Glu-coumarin NPs}$) 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.