

مقاله پژوهشی

اثر نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ بیوسنتز شده توسط *Chlorella vulgaris* روی بیان ژن‌های *CAD*، *caspase 9* و *p53* در رده‌ی سلولی سرطان پستانآیدا محمدعمویی^۱، وجیهه زرین‌پور^{۱*}، سید عطااله سادات شانديز^۲، علی صالح‌زاده^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: zarrinpour@damghan.iau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1963993.1407

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۴

چکیده

با توجه به افزایش روزافزون موارد و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان پستان، استفاده از محصولات نانوفناوری در درمان این بیماری مورد توجه محققین قرار گرفته است. این مطالعه با هدف ساختن نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با استفاده از عصاره جلبک *Chlorella vulgaris*، ارزیابی اثرات ضدسرطانی آن بر رده‌ی سلولی سرطان پستان و همچنین بررسی اثرات نانوکامپوزیت ساخته شده بر بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز انجام پذیرفت. اثرات ضدسرطانی $ZnFe_2O_4@Ag$ و دوز نیمه کشنده آن برای سلول‌های MCF-7 با استفاده از آزمایش MTT تعیین شد و از آزمایش Real Time PCR به منظور بررسی اثر مواجهه با نانوکامپوزیت مذکور بر بیان نسبی ژن‌های *p53*، *caspase 9* و *CAD* استفاده شد. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ سبب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان شد و دوز نیمه کشنده آن ۲۸ میکروگرم/میلی‌لیتر تعیین گردید. همچنین، نتایج آزمایش real time PCR نشان داد که مواجهه با نانوکامپوزیت سبب افزایش معنی‌دار ژن‌های *p53*، *caspase 9* و *CAD* به میزان به ترتیب ۲/۲۲، ۱/۹۸ و ۵/۹۶ برابر گردید. به نظر می‌رسد که نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ به دلیل دارا بودن عناصر نقره و روی، با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب آسیب به اجزای سلول‌های سرطانی شده که متعاقباً باعث القاء آپوپتوز و مرگ سلولی خواهد شد.

کلمات کلیدی: نانوکامپوزیت، سرطان پستان، آپوپتوز، کاسپاز.

مقدمه

برخوردارند و می‌توانند اثرات درمانی یا تشخیصی خود را اعمال نمایند (۴). در سالیان اخیر تلاش‌های زیادی در زمینه افزایش کارآمدی، کاهش اثرات سمیتی ناخواسته و هدایت‌پذیری هدفمند نانوذرات فلزی به منظور درمان انواع مختلف سرطان انجام

استفاده از نانوذرات فلزی در زمینه تشخیص و درمان انواع مختلف سرطان مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است. چنین ذراتی به دلیل بالا بودن نسبت سطح به حجمشان و اندازه‌ی کوچکشان، از قابلیت خوبی در توزیع و رسیدن به بافت‌های مختلف بدن

اکسیداسیون ساختارهای زیستی می‌تواند علیه سلول‌های سرطانی به کار گرفته شوند (۶).

با بیش از ۴ میلیون مرگ سالانه، سرطان سینه به عنوان یکی از مهلک‌ترین و مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان شناخته می‌شود (۱۸).

افزایش موارد ابتلا و تلفات سالانه ناشی از این بیماری نشانگر کارآمدی پایین روش‌های شیمی درمانی بوده و نیاز به طراحی و به‌کارگیری داروهای جدید را نمایان می‌سازد. اگرچه روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی در زمینه ساختن نانوذرات فلزی مطرح هستند، اکثر این روش‌ها به دلیل استفاده از ترکیبات شیمیایی خطرناک، آلودگی‌های زیست محیطی، هزینه بالا و غیره، از مقبولیت زیادی برخوردار نیستند. در مقابل، روش‌های سبز ساختن نانوذرات که مبتنی بر استفاده از محصولات زیستی و یا موجودات زنده است، به عنوان روش‌های ساده، ارزان و امن، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۷).

استفاده از جلبک‌ها یکی از رایج‌ترین و پرکاربردترین روش‌های سنتز نانوذرات فلزی محسوب می‌شود. به دلیل وجود ترکیبات احیاء کننده طبیعی همچون پیگمان‌ها، عصاره‌های جلبکی در سنتز انواع مختلفی از نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به دلیل سرعت رشد بالا و هزینه پرورش پایین استفاده از *Chlorella* برای مصارف مختلف آرایشی، زیستی و پزشکی بسیار رایج است. تاکنون سنتز انواع مختلف نانوذرات شامل نقره، روی، مس و غیره با استفاده از این جلبک گزارش شده است (۸).

بر همین اساس، مطالعه کنونی با هدف ساختن نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4$ کتزوگه با نقره ($ZnFe_2O_4@Ag$) با استفاده از جلبک *Chlorella vulgaris* و بررسی اثر آن بر بیان ژن‌های آپوپتوز

پذیرفته است. طراحی و به‌کارگیری نانوذرات چندعاملی به‌عنوان رویکرد نوینی در زمینه استفاده از نانوفناوری در درمان سرطان محسوب می‌شود. در این فرایند، به‌منظور اثربخشی بیشتر و یا دارورسانی هدفمند، نانوذرات با لیگاندهای مختلف کتزوگه می‌گردند. استفاده از ذرات مغناطیسی یک راهکار ساده، ارزان و در دسترس به شمار می‌آید که امکان دارورسانی هدفمند را با استفاده از اعمال یک نیروی مغناطیسی بر روی چنین ذراتی فراهم می‌نماید. به‌این‌ترتیب، امکان هدایت ترکیبات دارویی به سوی مکان‌های هدف در بدن بیمار فراهم شده که می‌تواند باعث افزایش اثربخشی و کاهش عوارض جانبی دارو شود (۳).

تاکنون نانوذرات فلزی متعددی به‌منظور مقابله با سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به دلیل کاربردهای مختلف زیست-پزشکی و همچنین سازگاری زیستی مناسب، استفاده از نانوذرات نقره و روی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نقره به‌عنوان یکی از اولین فلزاتی شناخته می‌شود که استفاده از آن در مصارف بهداشت و سلامت بشر مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات بسیاری اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد توموری نانوذرات نقره را گزارش کرده‌اند. همچنین، به دلیل زیست-سازگاری مناسب این عنصر یکی از پرکاربردترین فلزات در محصولات زیست‌فناوری شناخته می‌شود (۱۷).

از سوی دیگر، نانوذرات روی نیز به دلیل خصوصیات ضد میکروبی و ضد سرطانی و همچنین، اثرات سمیتی پایین‌تر در مقایسه با بسیاری از فلزات دیگر، به عنوان یک کاندیدای مناسب در زمینه طراحی نانو داروهای ضد سرطانی مطرح می‌شوند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نانوذرات روی باعث القاء تولید و آزادسازی رادیکال‌های آزاد شده و این مولکول‌ها با

شامل *p53, CAD* و *caspase 9* در سلول‌های رده‌ی سرطان سینه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره جلبکی: به منظور تهیه عصاره جلبک، یک سوسپانسیون ۰/۲ درصد از پودر خشک شده جلبک *C. vulgaris* که از شرکت پارسیان جلبک (ایران) تهیه گردید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آبی ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، سوسپانسیون مذکور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع رویی جمع‌آوری گردید و پس از عبور از کاغذ صافی، تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (۱۳).

سنتز نانوکامپوزیت: در مرحله نخست، نانوذرات $ZnFe_2O_4$ با استفاده از روش Shokoofeh و همکاران سنتز شدند (۱۶). به این منظور، ۰/۲ گرم $ZnCl_2 \cdot 2H_2O$ و ۰/۴ گرم $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ به ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد و سوسپانسیون حاصله به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد هم زده شد. سپس، میزان pH سوسپانسیون با افزودن تدریجی محلول سود یک نرمال به ۱۲ افزایش یافت و به این ترتیب نانوذرات $ZnFe_2O_4$ به شکل رسوب تشکیل یافتند. رسوب حاصله با استفاده از سانتریفوژ جداسازی شد و به صورت سریالی با آب مقطر و اتانل شستشو داده شد و در پایان، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید.

در مرحله بعدی، ۵۰ میلی‌گرم نیترات نقره به سوسپانسیون ۵٪ $ZnFe_2O_4$ اضافه شد و گرمادهی در حمام آبی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه، انجام پذیرفت. سپس، ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره *C. vulgaris* به مخلوط واکنش افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. در پایان، نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با استفاده از سانتریفوژ

جداسازی شد و پس از شستشو با آب مقطر و اتانل، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۱۶).

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ذرات:

بررسی گروه‌های عاملی $ZnFe_2O_4$ و $ZnFe_2O_4@Ag$ به منظور بررسی صحت سنتز ذرات با استفاده از آزمایش FT-IR و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Nicolet مدل IR 100 و در دامنه $4000-400\text{ cm}^{-1}$ صورت پذیرفت. همچنین، ساختار کریستالی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با استفاده از آزمایش XRD و توسط دستگاه دفرکتومتر Philips X'Pert MPD انجام گرفت. علاوه بر این، از تصویربرداری میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره (Zeiss-EM10C- 100 KV TEM, Germany) و نگاره (TESCAN MIRA3, Japan) به منظور بررسی مورفولوژی، اندازه و توزیع ذرات استفاده گردید.

کشت سلولی و تعیین دوز نیمه کشنده: در این مطالعه از سلول‌های رده‌ی سرطان سینه (MCF-7) استفاده شد. سلول‌های مذکور از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط RPMI1640 حاوی سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. به منظور بررسی اثرات سمیتی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ و تعیین دوز نیمه کشنده از آزمون MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. به این منظور، سلول‌های MCF-7 در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی تکثیر یافتند و سپس غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت از صفر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به همه چاهک‌ها افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، محتویات محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل

TriZol (امریکا) انجام گرفت. به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد و cDNA با استفاده از کیت تجاری سنتز cDNA (Takara، ژاپن) ساخته شد. تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول یک) و با استفاده از کیت تجاری یکتا تجهیز (ایران) و در دستگاه ترموسایکلر ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) پذیرفت. ژن *GAPDH* به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت و از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به منظور تعیین میزان بیان نسبی ژن‌ها استفاده گردید (Pfaffl, 2001).

آنالیز آماری: با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ انجام شد. بررسی تفاوت آماری در آزمایش MTT توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد و تغییرات بیان ژن نیز با آزمون t (t student test) بررسی شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ نیز به عنوان سطح اطمینان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

سولفوکسید اضافه گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و بر روی شیکر، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت و دوز نیمه کشنده نانوکامپوزیت با استفاده از فرمول ذیل تعیین شد (Zhao et al. 2017):

$$\text{جذب نوری نمونه} \\ \text{جذب نوری شاهد} \times 100 - 100 = \text{درصد مهار}$$

بیان نسبی ژن‌های مسیر آپوپتوز: به منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌های *CAD*، *p53* و *caspase 9* از آزمایش real time PCR استفاده شد. در ابتدا سلول‌های MCF-7 در محیط RPMI1640 رشد داده شدند و سپس نانوکامپوزیت $\text{ZnFe}_2\text{O}_4@Ag$ (با غلظت نیمه کشنده) به سلول‌ها اضافه شد. چاهک‌های فاقد نانوکامپوزیت به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها جداسازی شده و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. استخراج RNA کل از سلول‌ها با استفاده از محلول تجاری

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی (5'-3')
<i>CAD</i> (Forward)	TGGCAGAGATCGGAGAGCAT
<i>CAD</i> (reverse)	TCCTTCCATCCCTTCAGAGACTT
<i>GAPDH</i> (forward)	CCCACTCCTCCACCTTTGAC
<i>GAPDH</i> (reverse)	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
<i>p53</i> (forward)	CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT
<i>p53</i> (reverse)	CAACCTCAGGCGGCTCATAG
<i>Caspase 9</i> (forward)	CCAGATGCCACCCCGTT
<i>Caspase 9</i> (reverse)	CCCACTGCTCAAAGATGTCTGT

نتایج

به ترتیب مرتبط با پیوندهای Zn-O و Fe-O بوده و همچنین یک پیک در 921.37 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H است. علاوه بر این، یک پیک در 1384 cm^{-1} مشاهده می‌شود که مربوط به پیوند H_2O بوده و پیک 1634 cm^{-1} نیز مربوط به پیوند کششی C-C می‌باشد.

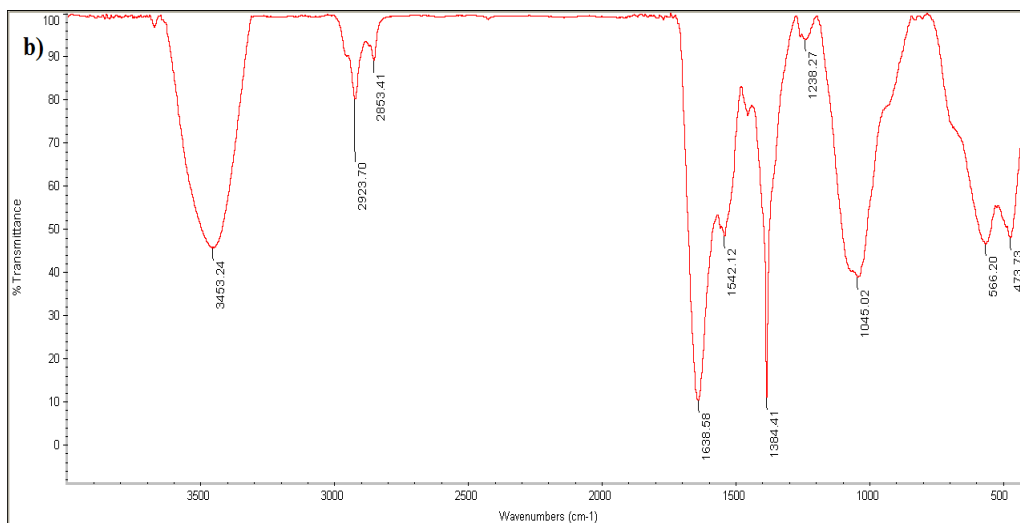
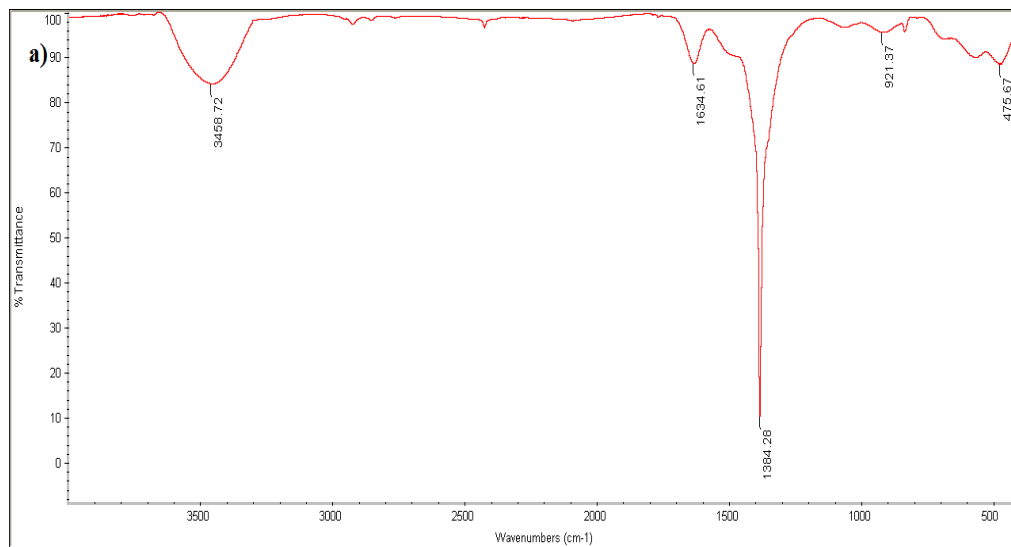
بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوکامپوزیت: بررسی گروه‌های عاملی در ZnFe_2O_4 و $\text{ZnFe}_2\text{O}_4@Ag$ با استفاده از آزمایش FT-IR انجام گرفت. در طیف FT-IR مربوط به کامپوزیت ZnFe_2O_4 پیک‌های مشاهده‌شده در 578 cm^{-1} و 475 cm^{-1}

تعیین اثرات سمیتی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ بر رده‌ی سلول‌های سرطان پستان: نتایج آزمایش MTT نشان داد که نانوکامپوزیت ساخته‌شده از اثرات مهاری مناسبی علیه سلول‌های MCF-7 برخوردار است. بر اساس نتایج، $ZnFe_2O_4@Ag$ در غلظت ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان قابل‌توجهی سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های مذکور شد (حدود ۲۲٪ کاهش). با افزایش غلظت نانوکامپوزیت، میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی روند کاهشی داشت و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان زنده‌مانی به کمتر از ۵ درصد رسید (بیش از ۹۵٪ کاهش). همچنین، غلظت نیمه‌کشنده نانوکامپوزیت ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. شکل ۴ اثر غلظت‌های مختلف $ZnFe_2O_4@Ag$ را بر زنده‌مانی سلول‌های رده‌ی سرطان پستان نشان می‌دهد.

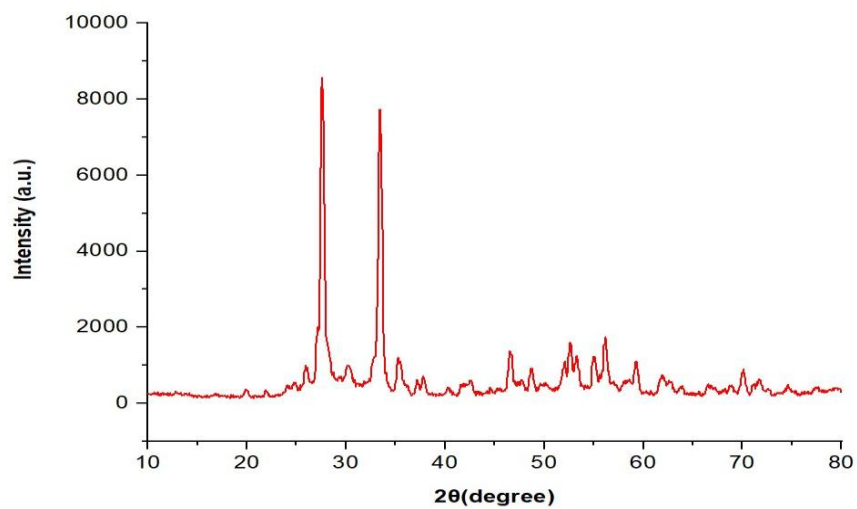
بررسی میزان بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز: به منظور بررسی اثر $ZnFe_2O_4@Ag$ بر ژن‌های مؤثر در مسیر آپوپتوز، سلول‌های MCF-7 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت نیمه‌کشنده نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ مواجه سازی شدند و سپس بیان ژن‌های *p53*، *caspase 9* و *CAD* با استفاده از آزمایش *Real-time PCR* مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج، میزان بیان همه ژن‌های مورد مطالعه پس از مواجه سازی با $ZnFe_2O_4@Ag$ به میزان قابل توجهی افزایش یافت. به بیان دیگر، میزان بیان نسبی ژن‌های *p53* و *caspase 9* در سلول‌های مواجه سازی شده به میزان ۲/۲۲ و ۱/۹۸ برابر بیشتر از سلول‌های شاهد بود. همچنین، ژن *CAD* با یک افزایش بسیار بالا (۵/۹۶ برابر) بیشترین میزان القاء را در مقایسه با سایر ژن‌ها نشان داد. شکل ۵ میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه را در سلول‌های شاهد و تیمار نشان می‌دهد.

همچنین در 3458 cm^{-1} نیز یک پیک دیده می‌شود که احتمالاً مربوط به پیوند کششی O-H موجود در ساختار نانوکامپوزیت است. در طیف مربوط به کامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ ، پیک‌های 473.73 cm^{-1} و 566.20 cm^{-1} به ترتیب مربوط به Zn-O و Fe-O هستند. پیک‌هایی که در 1045.02 cm^{-1} ، 1384.41 cm^{-1} و 1638.58 cm^{-1} وجود دارند نیز به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H، H_2O و C-C می‌باشند. پیک‌های موجود در محدوده‌ی بین 3000 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} مربوط به پیوند O-H می‌باشند. شکل ۱ طیف‌های FTIR نانوکامپوزیت‌های ساخته‌شده را نمایش می‌دهد. بررسی ساختار کریستالی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با آزمایش XRD نشان داد که پیک‌های برابر با ۲ تتای $27/55$ درجه، $37/75$ درجه و $46/5$ درجه مربوط به نانو ذرات نقره بوده که مطابق با کارت pdf شماره‌ی 04-0783 می‌باشد (۱۰).

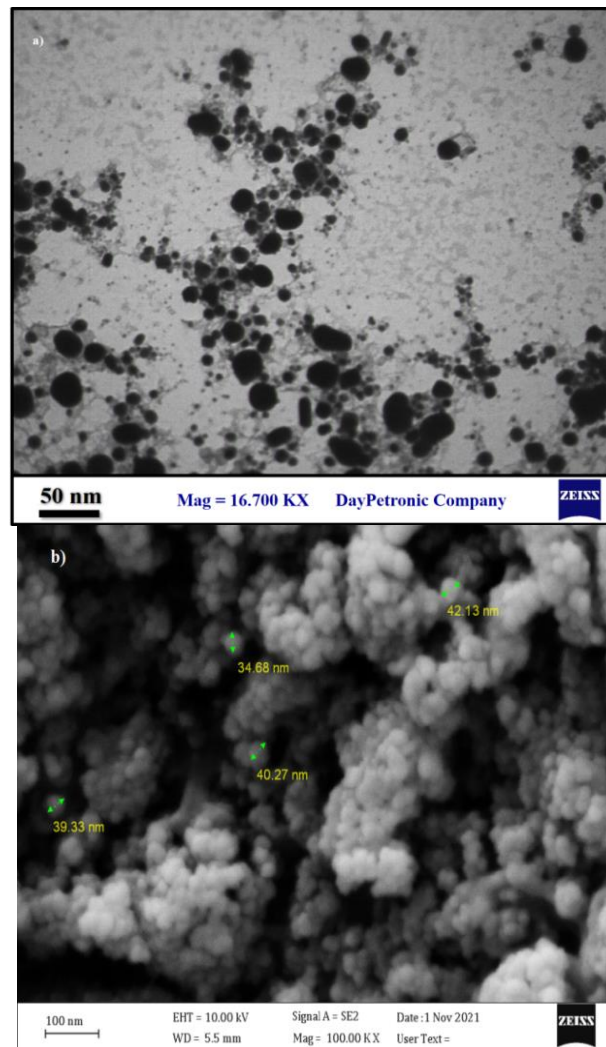
همچنین پیک‌های برابر دو تتای $30/25$ درجه، $33/44$ درجه، $35/22$ درجه، $42/45$ درجه، $52/6$ درجه، $56/16$ درجه و $62/05$ درجه نیز با توجه به رفرنس و مطابق با کارت JCPDS شماره‌ی ۸۲-۱۰۴۲ می‌باشد که مربوط به ماده‌ی $ZnFe_2O_4$ است (۱، ۱۴) (شکل ۲). علاوه بر این، ویژگی‌های شکلی، اندازه و پراکنش ذرات با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره و نگاره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ دارای ذراتی با ظاهر تقریباً کروی بوده و اندازه ذرات در محدوده ۳۴ تا ۴۲ نانومتر قرار داشتند. همچنین، ذرات ساخته‌شده از توزیع و پراکنش یکنواختی برخوردار بودند. شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ را نشان می‌دهد.



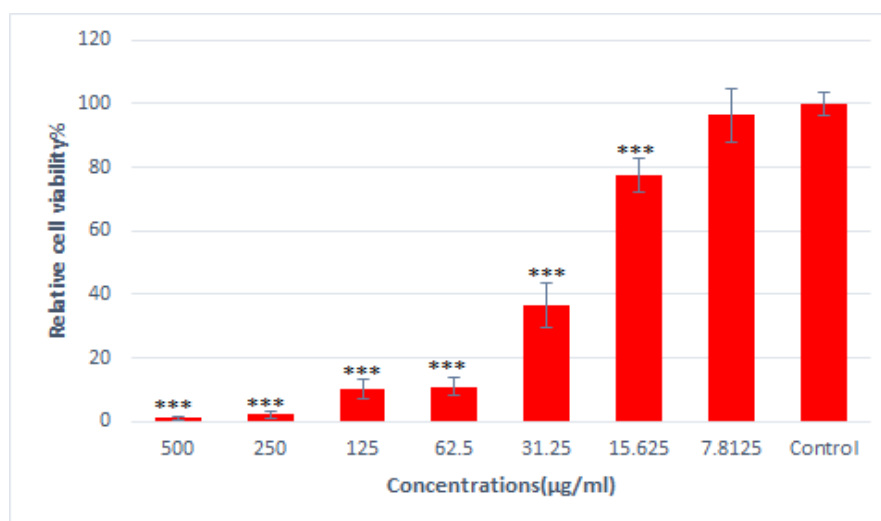
شکل ۱- طیف FT-IR نانوکامپوزیت‌های ساخته‌شده. (a) $ZnFe_2O_4$ (b) $ZnFe_2O_4@Ag$



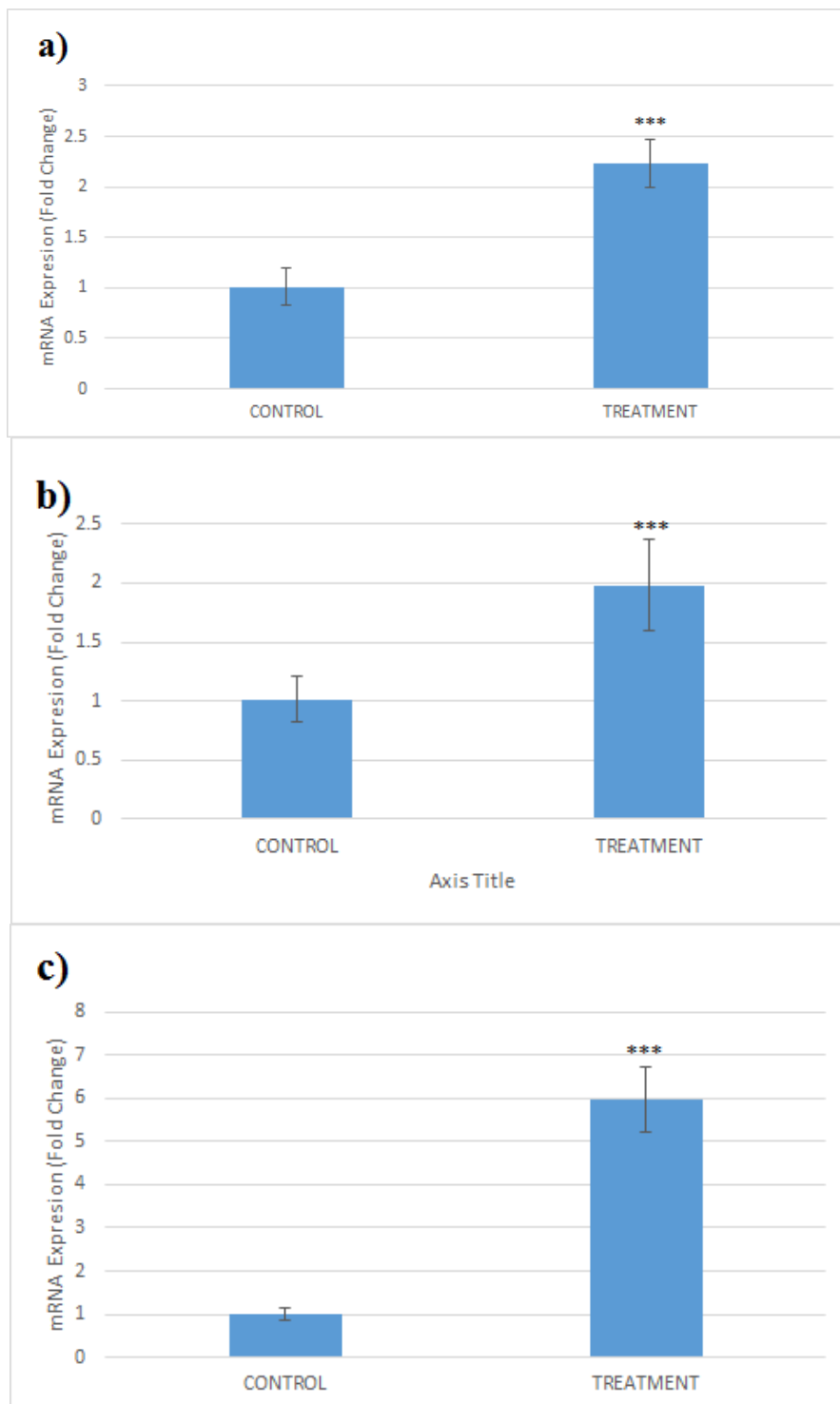
شکل ۲- الگوی XRD نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$



شکل ۳- تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره (a) و نگاره (b) از نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$



شکل ۴- تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌های رده‌ی سرطان پستان در حضور غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$



شکل ۵- بررسی اثر نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ بر بیان ژن‌های (a) *p53* (b) *caspase 9* و (c) *CAD* در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان

بحث

انواع مقاوم به دارو، سبب افزایش نرخ تلفات ناشی از این بیماری شده است. در حال حاضر روش‌های شیمی‌درمانی و جراحی به عنوان روش‌های اصلی

سرطان پستان به عنوان مهم‌ترین و فراوان‌ترین سرطان جمعیت‌های زنان در دنیا شناخته می‌شود. روند افزایشی این بیماری در سالیان گذشته و همچنین بروز

درمان این بیماری در نظر گرفته می‌شوند. در سالیان اخیر مطالعات بسیاری جهت یافتن نانوداروهای جدید علیه این بیماری انجام شده است (۲۰).

استفاده از نانوکامپوزیت‌های مغناطیسی به دلیل اندازه کوچک، پایداری بالا و همچنین هدایت‌پذیری‌شان تحت نیروهای مغناطیسی، به عنوان یک حوزه نوین در طراحی داروهای ضد سرطان در نظر گرفته می‌شود. این گونه ذرات علاوه بر بخش‌های مغناطیسی می‌توانند دارای لیگاند‌های مؤثر با ویژگی‌های ضد سرطانی نیز باشند که می‌تواند منجر به بهبود اثربخشی آنان شود. بر اساس چنین رویکردی، در مطالعه کنونی نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با استفاده از عصاره جلبک *C. vulgaris* ساخته شد و پس از تأیید ماهیت فیزیکوشیمیایی ذرات ساخته‌شده، اثرات مهاری آن علیه سلول‌های رده‌ی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه اثر $ZnFe_2O_4@Ag$ بر بیان ژن‌های مؤثر در مسیر آپوپتوز سلولی شامل *p53*، *caspase 9* و *CAD* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه انجام آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی سنتز نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ را به خوبی نشان دادند. بررسی اثرات مهاری $ZnFe_2O_4@Ag$ بر سلول‌های MCF-7 نشان داد که نانوکامپوزیت مذکور از اثرات ضد سرطانی بالایی بر سلول‌های سرطان پستان برخوردار است و حتی در غلظت‌های بسیار پایین می‌تواند به طور چشمگیری میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی را کاهش دهد. اثرات ضد سرطانی نانوذرات حاوی نقره و روی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. در این مطالعه نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ به دلیل حضور توأم فلزات روی و نقره اثرات ضد سرطانی چشمگیری نشان دادند. القاء تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به عنوان مهم‌ترین مکانیسم سمیتی ناشی از مواجهه با نانوذرات فلزی گزارش شده است (۲).

این مولکول‌ها به دلیل ناپایداری بالا با بخش‌های مختلف سلول به ویژه غشای سلولی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و سبب آسیب به اجزای سلول می‌شوند. از طرفی، ایجاد آسیب در غشای سلولی باعث افزایش نفوذپذیری سلول شده و این اتفاق سبب تسهیل ورود ذرات نانوکامپوزیت به درون سلول می‌گردد. بنابراین، به نظر می‌رسد که عناصر نقره و روی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به آسیب رساندن به سلول و در نتیجه اختلال در عملکردهای سلولی از جمله تکثیر سلولی شوند.

القاء آپوپتوز و فعال‌سازی آبشار سیگنال آپوپتوز در مواجهه با بروز آسیب‌های سلولی به عنوان یکی از رایج‌ترین پیامدها شناخته می‌شود (۱۱).

بر اساس مطالعات پیشین، به دنبال مواجهه با نانوذرات فلزی، آسیب‌های وارده به DNA سلول به عنوان مهم‌ترین القاء‌کننده توقف چرخه سلولی و فعال‌سازی مسیر سیگنالی آپوپتوز شناخته می‌شود (۱۳). در این مطالعه مشاهده شد که پس از مواجهه سلول‌های رده‌ی سرطان پستان با $ZnFe_2O_4@Ag$ ، میزان بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز به طرز چشمگیری افزایش یافتند. پروتئین P53 به عنوان مهم‌ترین پروتئین مهارکننده تومور در سلول‌های انسانی شناخته می‌شود. مهم‌ترین عامل فعال‌سازی این پروتئین، آسیب‌های وارده به مولکول DNA و توقف چرخه سلولی می‌باشد (۱۵).

در این مطالعه میزان بیان ژن *p53* پس از مواجهه سلول‌ها با $ZnFe_2O_4@Ag$ به میزان ۲/۲۲ برابر افزایش یافت. افزایش بیان این ژن نشانگر القاء، فرایند مهاری و ضد توموری نانوذرات $ZnFe_2O_4@Ag$ در سلول‌های MCF-7 می‌باشد. مطالعات پیشین نیز افزایش بیان یا فعالیت پروتئین P53 را در مواجهه با نانوذرات فلزی نشان دادند و این افزایش بیان را با آسیب‌های وارده به سلول مرتبط دانستند (۵).

سلول‌های رده سرطان پستان برخوردار بودند. دوز نیمه کشنده نانوکامپوزیت ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید و در این غلظت میزان بیان ژن‌های مؤثر در مرگ سلولی شامل *p53*، *caspase 9* و *CAD* به میزان قابل‌توجهی افزایش یافت. این مطالعه نشان می‌دهد که $ZnFe_2O_4@Ag$ با القاء آپوپتوز سلول‌های سرطان پستان باعث مهار تکثیر آنان شده و علاوه بر ویژگی‌های ضد سرطانی مناسب، به دلیل دارا بودن خصوصیات مغناطیسی می‌تواند در مطالعات آتی جهت دارورسانی هدفمند به بافت سرطان پستان مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

منابع

1. Abbasian A.R., Shafiee Afarani M. 2019. One-step solution combustion synthesis and characterization of $ZnFe_2O_4$ and $ZnFe_1.6O_4$ nanoparticles. *Applied Physics A*, 125(10):1-2.
2. Akhtar M.J., Ahamed M., Kumar S., Khan M.M., Ahmad J., Alrokayan S.A. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 7:845.
3. Avval Z.M., Malekpoor L., Raeisi F., Babapoor A., Mousavi S.M., Hashemi S.A., Salari M. 2020. Introduction of magnetic and supermagnetic nanoparticles in new approach of targeting drug delivery and cancer therapy application. *Drug Metabolism Reviews*, 52(1):157-184.
4. Awasthi R., Roseblade A., Hansbro P.M., Rathbone M.J., Dua K., Bebawy M. 2018. Nanoparticles in cancer treatment: opportunities and obstacles. *Current Drug Targets*, 19(14): 1696-1709.
5. Banu H., Renuka N., Faheem S.M., Ismail R., Singh V., Saadatmand Z., Khan S.S., Narayanan K., Raheem A., Premkumar K., Vasanthakumar G. 2018. Gold and silver nanoparticles

کاسپاز ۹ به عنوان یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های کاسپاز است که دارای عملکرد سیستمی پروتئازی است. گزارش شده است که در پاسخ به محرک‌های خارجی آپوپتوز، و آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری، این پروتئین فعال می‌شود و با فعالیت پروتئازی خود سبب فعال‌سازی کاسپازهای پایین‌دستی شامل کاسپاز ۳، ۶ و ۷ شده و به این ترتیب باعث راه‌اندازی آبشار کاسپازی می‌گردد که نتیجه آن فعال شدن مسیرهای سیگنالی آپوپتوز سلولی است (۹).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، میزان بیان ژن مذکور در سلول‌های مواجهه یافته با نانوکامپوزیت تقریباً به میزان دو برابر افزایش نشان داد. همسو با مطالعات پیشین، افزایش بیان ژن *caspase 9* نشانگر فعال‌سازی مسیر آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان پستان توسط نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ است. یکی از پیامدهای فعال شدن کاسپازها، فعال‌سازی DNase فعال شونده توسط کاسپاز (CAD) است. این آنزیم در پاسخ به فعال‌سازی سیگنال‌های آپوپتوز فعال شده و با عملکرد DNase سبب شکستن قطعات DNA سلول و قطعه‌قطعه شدن کروموزوم می‌گردد (۱۹).

در این مطالعه مشاهده شد که میزان بیان ژن *CAD* به دنبال مواجهه‌سازی سلول‌ها با نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ به میزان بسیار چشمگیری افزایش یافت. افزایش نزدیک به شش برابری بیان این ژن نشان‌دهنده تخریب DNA سلول و قطعه‌قطعه شدن کروموزوم به عنوان یکی از محتمل‌ترین پیامدهای ناشی از مواجهه سلول‌ها با نانوذرات فلزی بوده و از این منظر منطبق با مطالعات پیشین است (۱۳، ۱۶).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانوکامپوزیت $ZnFe_2O_4@Ag$ با استفاده از عصاره جلبک *C. vulgaris* ساخته شد و ذرات سنتز شده از عملکرد مهاری خوبی علیه

- mediated zinc ferrite nanoparticles for magnetic studies and anticancer activity against breast cancer (MCF-7) cell lines. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(11):8589-8596.
15. Shen Y., White E. 2001. p53-dependent apoptosis pathways. *Advances in Cancer Research*, 82:55-84.
16. Shokoofeh N., Moradi-Shoeili Z., Naeemi A.S., Jalali A., Hedayati M., Salehzadeh A. 2019. Biosynthesis of Fe₃O₄@Ag nanocomposite and evaluation of its performance on expression of *norA* and *norB* efflux pump genes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological Trace Element Research*, 191(2):522-530.
17. Sofi M.A., Sunitha S., Sofi M.A., Pasha S.K., Choi D. 2021. An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University-Science*, 3032:101791.
18. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3):209-249.
19. Widłak P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4):1037-1044.
20. Yu W., Hu C., Gao H. 2021. Advances of nanomedicines in breast cancer metastasis treatment targeting different metastatic stages. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 178:113909.
21. Zhao Y., Guo C., Wang L., Wang S., Li X., Jiang B., Wu N., Guo S., Zhang R., Liu K., Shi D. 2017. A novel fluorinated thiosemicarbazone derivative-2-(3, 4-difluorobenzylidene) hydrazine carbothio amide induces apoptosis in human A549 lung cancer cells via ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(1):65-71.
- biomimetically synthesized using date palm pollen extract-induce apoptosis and regulate p53 and Bcl-2 expression in human breast adenocarcinoma cells. *Biological Trace Element Research*, 186(1):122-134.
6. Bisht G., Rayamajhi S. 2016. ZnO nanoparticles: a promising anticancer agent. *Nanobiomedicine*. 3(2016): 3-9.
7. Gour A., Jain N.K. 2019. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1):844-851.
8. Khan F., Shahid A., Zhu H., Wang N., Javed M.R., Ahmad N., Xu J., Alam M.A., Mehmood M.A. 2022. Prospects of algae-based green synthesis of nanoparticles for environmental applications. *Chemosphere*, 293:133571.
9. Kuida K. 2000. Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(2):121-124.
10. Mladenova B., Milusheva Y., Karsheva M., Hinkov I., Stankulov T., Borisov G., Boukoureshhtlieva R. 2018. Nanosized Ag particles as catalyst in gas-diffusion electrodes for ORR. *Bulgarian Chemistry Communication*, 50:114-118.
11. Norbury C.J., Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(16):2797-2808.
12. Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45-e45.
13. Salehzadeh A., Naeemi A.S., Khaknezhad L., Moradi-Shoeili Z., Shandiz S.A.S. 2019. Fe₃O₄/Ag nanocomposite biosynthesized using *Spirulina platensis* extract and its enhanced anticancer efficiency. *IET Nanobiotechnology*, 13(7): 766-770.
14. Sarala E., Madhukara Naik M., Vinuth M., Rami Reddy Y.V., Sujatha H.R. 2020. Green synthesis of Lawsonia inermis-

Effect of ZnFe₂O₄@Ag Nanocomposite Biosynthesized by *Chlorella vulgaris* on the Expression of *P53*, *Caspase 9*, and *CAD* Genes in Breast Cancer Cell Line

Ayda Mohammad Amooie¹, Vajiheh Zarrinpour^{1*}, Seyed Ataollah Sadat Shandiz², Ali Salehzadeh³

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Abstract

Regarding the increasing trend of the morbidity and mortality of breast cancer, the use of nanotechnology products in breast cancer treatment has gained interest. The current work aims to synthesize ZnFe₂O₄@Ag nanocomposite using the *Chlorella vulgaris* extract, assessment of its anticancer potential on breast cancer cells, and evaluate the effect of the nanocomposite on the expression of apoptotic genes. Anticancer potential and lethal dose 50% (IC₅₀) of ZnFe₂O₄@Ag were determined using the MTT assay and real-time PCR was employed to evaluate the expression of *p53*, *caspase 9*, and *CAD* genes. According to the results, at concentrations greater than 15.62 µg/mL, ZnFe₂O₄@Ag considerably decreased the viability of breast cancer cells and IC₅₀ was determined 28µg/mL. Moreover, the relative expression of the *p53*, *caspase 9*, and *CAD* genes was significantly increased by 2.22, 1.98, and 5.96 folds, respectively after exposure to the nanocomposite. Owing to the presence of silver and zinc, it seems that ZnFe₂O₄@Ag generates reactive oxygen species that could damage cell components and subsequently induce cell apoptosis.

Keywords: Apoptosis; Breast Cancer; Caspase; Nanocomposite.