



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



Investigation of the anticancer properties of iron oxide nanoparticles conjugated with coumarin and hyaluronic acid in breast cancer cell line (MCF-7)

Javad Solati, Ali Salehzadeh*

Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 2025.07.28

Revised 2025.08.28

Accepted 2025.08.19

KeyWords:

Apoptosis
Breast cancer
Coumarin
Hyaluronic acid

*Corresponding author:

E-mail address:

a.salehzadeh@iau.ac.ir

Introduction: Treatment of breast cancer is difficult due to the diverse, drug-resistant and metastatic types of the disease. New pharmaceuticals have been focused on the specific targeting of cancer cells to improve the efficacy of chemotherapy. This study aimed to investigate the anticancer effects of iron oxide nanoparticles conjugated with coumarin and hyaluronic acid (Fe₃O₄@Glu-CO-HA) on breast cancer cell line (MCF-7).

Materials and Methods: Fe₃O₄ nanoparticles were chemically synthesized and conjugated with hyaluronic acid and coumarin. The physicochemical properties of the nanoparticles were evaluated by FT-IR, XRD, zeta potential and SEM and TEM imaging. The inhibitory effects of nanoparticles on cancer cells were investigated by MTT assay for 24 and 48 hours and flow cytometry analysis was used to determine the frequency of apoptotic/necrotic cells.

Results: According to the results, iron oxide nanoparticles were synthesized correctly and conjugated with hyaluronic acid and coumarin. The particles had a spherical shape with a size of 10-60 nm and a surface charge of -11mV. Fe₃O₄@Glu-CO-HA nanoparticles exhibited concentration- and time-dependent inhibitory effects on cancer cells, and the 24- and 48-hour 50% inhibitory concentration were 111 and 63µg/mL, respectively. Treatment of MCF-7 cells with Fe₃O₄@Glu-CO-HA nanoparticles caused a sharp increase in the percentage of apoptotic and necrotic cells.

Conclusion: This study showed significant anticancer effects of Fe₃O₄@Glu-CO-HA nanoparticles on the breast cancer cell line. The observed anticancer effects can be attributed to the targeting of cancer cells due to the presence of hyaluronic acid on the nanoparticle surface as well as the anticancer effects of coumarin.

Cite this article: J Solati, A Salehzadeh. Investigation of the anticancer properties of iron oxide nanoparticles conjugated with coumarin and hyaluronic acid in breast cancer cell line (MCF-7). Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (1): 35-45



<https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1215412>

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی نانوذره اکسید آهن کنژوگه شده با کومارین و اسید هیالورونیک در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)

جواد صولتی^۱، علی صالح‌زاده*

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

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۵/۰۶
بازنگری ۱۴۰۴/۰۵/۲۷
پذیرش ۱۴۰۴/۰۵/۲۸

کلمات کلیدی

آپوپتوز
سرطان پستان
کومارین
هیالورونیک اسید

* مسئول مکاتبات:

a.salehzadeh@iaub.ac.ir

مقدمه: درمان سرطان پستان با توجه به وجود انواع متنوع آن و مقاومت به داروها به راحتی امکان‌پذیر نیست. داروهای جدید بر هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی به منظور بهبود اثربخشی شیمی درمانی متمرکز شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضدسرطانی نانوذره اکسید آهن کنژوگه با کومارین و اسید هیالورونیک ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$) بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) انجام شد.

مواد و روش: نانوذره Fe_3O_4 به روش شیمیایی سنتز شد و با هیالورونیک اسید و کومارین کنژوگه شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات با آزمایش‌های XRD، FT-IR، پتانسیل زتا و تصویربرداری SEM و TEM ارزیابی شد. اثرات مهارتی نانوذرات بر سلول‌های سرطانی با آزمایش MTT در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد و از آنالیز فلوسایتومتری جهت تعیین فراوانی سلول‌های آپوپتوزی/نکروزی استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، نانوذره اکسید آهن به خوبی سنتز شده و با اسید هیالورونیک و کومارین کنژوگه شد. ذرات دارای شکل کروی با اندازه ۱۰ - ۶۰ نانومتر و بار سطحی ۱۱- میلی ولت بودند. نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ دارای اثرات مهارتی وابسته به غلظت و زمان بر سلول‌های سرطانی بود و غلظت نیمه مهارتی آن در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۱۱ و ۶۳ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. تیمار سلول‌های MCF-7 با نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ سبب افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اثرات ضدسرطانی قابل توجه نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ بر سلول‌های رده سرطان پستان را نشان داد. اثرات ضد سرطانی مشاهده شده را می‌توان به هدف‌گیری سلول‌های سرطانی به دلیل وجود اسید هیالورونیک بر سطح نانوذره و همچنین اثرات ضدسرطانی کومارین مرتبط دانست.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ج صولتی، ع صالح‌زاده. بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی نانوذره اکسید آهن کنژوگه شده با کومارین و اسید هیالورونیک در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7). مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۴؛ ۲۰(۱): ۳۵-۴۵

doi: https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1215412

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: X ۴۵۹ - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

سرطان پستان به عنوان شایع ترین و فراوان ترین نوع سرطان در دنیا شناخته می شود. بر اساس آخرین آمارها، شیوع این بیماری شامل بیش از ۲/۲ میلیون مورد جدید در سال است که منجر به مرگ حدود ۷۰۰ هزار بیمار در هر سال می شود. این بیماری علاوه بر نرخ شیوع بالا، یکی از کشنده ترین انواع سرطان نیز محسوب می شود، به طوری که چهارمین عامل رایج مرگ و میر ناشی از سرطان در نظر گرفته می شود (۱). میزان بالای تلفات ناشی از این بیماری ممکن است با تشخیص دیر هنگام این بیماری مرتبط باشد. با این حال، کارایی ناکافی روش های درمانی کنونی به ویژه روش های شیمی درمانی را می توان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر بالای سرطان پستان در نظر گرفت (۲). تا کنون انواع متعددی از سرطان پستان شناخته شده اند که الگوی تکثیر، تهاجم بافتی، متاستاز و پاسخ به دارو در آنان متفاوت است و این امر یکی از چالش های اصلی در شیمی درمانی سرطان پستان محسوب می شود. علاوه بر این، برخی از انواع تومورهای پستان دارای الگوی تهاجمی و قابلیت مقاومت دارویی بالایی بوده، به طوری که با سرعت بالایی در بدن بیمار گسترش یافته و در برابر رژیم های شیمی درمانی استاندارد مقاومت از خود نشان می دهند (۳). با در نظر گرفتن این ویژگی ها، یافتن داروهای مؤثر و کارآمد به منظور کنترل تکثیر و گسترش تومورهای پستان از اولویت های تحقیقاتی محققین به شمار می آید. استفاده از فناوری نانو در زمینه تشخیص و درمان سرطان یک رویکرد جدید و آینده دار به شمار می آید. ذرات نانو به دلیل اندازه کوچک و سطح وسیعشان می توانند به عنوان حامل ترکیبات دارویی و دارو رسانی به بافت های سرطانی مورد توجه قرار گیرند. این رویکرد نه تنها می تواند در بهبود دارو رسانی نقش داشته باشد، همچنین می تواند سبب افزایش پایداری دارو در بدن و آزاد سازی کنترل شده آنان شده و به این ترتیب باعث ارتقای اثربخشی داروهای ضد سرطانی شوند (۴). در این زمینه نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. این ذرات به طور ذاتی از سمیت نسبتاً پایین و زیست سازگاری مناسبی برخوردارند، سنتز آنان آسان و ارزان است و پایداری خوبی در شرایط درون تنی دارند (۵). همچنین، به دلیل دارا بودن ویژگی های مغناطیسی، نانوذرات اکسید آهن می توانند به عنوان حاملین دارویی هدایت پذیر مورد استفاده قرار گرفته

شوند. در این فرایند، تحت تأثیر نیروی مغناطیسی بیرونی، ترکیبات دارویی به صورت هدفمند به سوی بافت های سرطانی هدایت شده و به این ترتیب کارایی و اثربخشی شیمی درمانی افزایش یافته و عوارض سمیتی ناشی از توزیع غیراختصاصی دارو در بدن کاهش می یابد (۵). هدف گیری اختصاصی سلول های سرطانی می تواند نقش کلیدی در افزایش موفقیت شیمی درمانی و پیامدهای بیماران داشته باشد. استفاده از لیگاندهای مولکولی در هدف گیری اختصاصی سلول های سرطانی به عنوان رویکردی نوین در این زمینه شناخته می شود. به عنوان یکی از انواع پلی ساکاریدهای برون سلولی، اسید هیالورونیک یک جزء اصلی بافت همبند در جانوران به شمار می آید. این ماده یک پلیمر قندی متشکل د-گلوکورونیک اسید و ان-استیل گلوکز آمین است که علاوه بر دخالت در اتصالات سلولی، با تعدادی از فرایندهای سلولی مانند حرکت سلولی، اتصال سلولی، تکثیر و مهاجرت سلولی مرتبط است. همچنین، این ماده یک لیگاند کلیدی برای فرایندهای سیگنالی مرتبط با زندهمانی و آپوپتوز سلولی است (۶-۷). مطالعات پیشین نشان می دهند که سلول های سرطانی سطوح بالاتری از گیرنده های هیالورونیک اسید را در مقایسه با سلول های طبیعی بیان می کنند. این یافته ها نشان می دهند که هیالورونیک اسید یک عامل کلیدی در تکثیر، گسترش و متاستاز سرطان است (۷-۸). به همین دلیل، هدف گیری سلول های سرطانی با استفاده از گیرنده های هیالورونیک می تواند در طراحی داروهای ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد. کومارین یک ترکیب فنلی دو حلقه ای است که به عنوان یک متابولیت ثانویه در گونه های مختلف گیاهی است. کومارین دارای ویژگی های بیولوژیک متعددی مانند اثرات ضد اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی است. این ماده اثرات ضد سرطانی خود را از طریق توقف پیشروی چرخه سلولی و القای آپوپتوز اعمال می کند (۹). مطالعات پیشین اثرات سمیتی کمپلکس های فلزی کومارین و مشتقات آن را بر روی انواع مختلف رده های سرطانی نشان داده اند. با این حال، حلالیت محدود این ماده در آب سبب کاهش دسترسی زیستی و اثربخشی درون تنی آن شده و به همین دلیل کاربردهای دارویی کومارین را با محدودیت مواجه ساخته است (۱۰)

ویژگی‌های ضدسرطانی آن در رده سلولی سرطان مورد مطالعه قرار گرفت. این مطالعه می‌تواند در دستیابی به نانوداروهای کمپلکس به منظور هدف‌گیری هدفمند سلول‌های سرطانی کمک کننده باشد

استفاده از نانوکژوگه های فلزی یکی از راهکارهای مورد استفاده به منظور بهبود دسترسی زیستی چنین موادی در نظر گرفته می‌شود. بر این اساس، در مطالعه حاضر نانوذره اکسید آهن مگنتیک عامل دار شده با گلوکز و کژوگه شده با اسید هیالورونیک و کومارین سنتز شد و

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات

در ابتدا نانوذره اکسید آهن مگنتیک طبق روش زیر سنتز شدند. در ابتدا ۷/۵V گرم $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ و ۳/۱۷ گرم $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند و مخلوط واکنش در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شدند. سپس، محلول آمونیاک یک نرمال قطره قطره به مخلوط واکنش افزوده شد و مخلوط واکنش به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دهی شد تا نانوذره Fe_3O_4 تشکیل شود. مخلوط واکنش سانتریفوژ شد و نانوذره اکسید آهن جمع آوری شد و با آب مقطر شسته و سپس در آون خشک شد. در ادامه، نانوذرات سنتز شده با استفاده از گلوکز عامل دار شدند. این کار با هدف افزایش قابلیت اتصال آنان به اسید هیالورونیک و کومارین انجام شد. برای عامل‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن، یک گرم Fe_3O_4 و ۰/۵ گرم D-گلوکز به ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا نانوذرات با استفاده از گلوکز عامل دار شوند. سپس، نانوذرات عامل‌دار شده جداسازی شدند، و با آب مقطر و اتانول شسته شدند و در نهایت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (۱۱). به منظور کژوگه کردن نانوذره $\text{Glu} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ ، یک گرم از نانوذره و نیم گرم کومارین و نیم گرم اسید هیالورونیک به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شدند، به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفتند و سپس مخلوط واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. در پایان، نانوذرات $\text{Glu} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ با استفاده از سانتریفوژ جمع آوری شده و با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

تعیین ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانوذرات

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR) برای بررسی حضور گروه‌های عاملی مختلف در نانوذره

$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر شرکت (Perkin Elmer Spectrum ۱۰۰) و در محدوده جذبی 500 cm^{-1} تا ۴۰۰۰ انجام شد. برای بررسی و تشخیص ساختار کریستال نمونه‌های سنتز شده $\text{Glu} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ از دستگاه پراش اشعه ایکس (PW۱۷۳۰)، فیلپس (هلند) با طول موج $1.54056 \text{ \AA}$ انگستروم ($\text{Cu-K}\alpha$ tube) استفاده شد. آنالیز تعیین پتانسیل زتا برای ارزیابی پایداری و اندازه نانوذره $\text{Glu} @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ هیدراته شده با آب با استفاده از دستگاه SZ-۱۰۰ شرکت HORIBA (ژاپن) انجام شدند. برای بررسی سطح و اندازه نانوذره سنتز شده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) شرکت TESCAN مدل MIRA3 و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) شرکت Zeiss آلمان مدل Zeiss-EM900 استفاده شد

کشت سلولی و آزمون زنده‌مانی

سلول مورد استفاده در این مطالعه رده سلولی سرطان پستان MCF-7 بود که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها ابتدا در محیط کشت 1640 RPMI و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 تکثیر داده شدند و سپس به منظور انجام مطالعات سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌ها در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ از آزمایش MTT استفاده شد. به طور خلاصه، در ابتدا سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی با تراکم 1×10^4 سلول در هر چاهک تقسیم شدند. سپس غلظت‌های مختلف از نانوذرات از ۱/۱۵ تا ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک‌هایی هم بدون اضافه شدن نانوذرات به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول MTT ۵/۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده

شدند. در ادامه، مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق شیک شد. در مرحله آخر، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه خوانشگر پلیت اندازه‌گیری شد و تعیین درصد مهار زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱۲)

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

تعیین میزان آپوپتوز و نکروز سلولی

به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در جمعیت سلولی تیمار شده با نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ ، حدود 5×10^5 سلول تیمار شده با غلظت نیمه مهاری نانوذره (IC_{50}) و جمعیت سلولی گروه شاهد، رنگ آمیزی

سلول‌ها با دو رنگ Annexin-V و پروپیدیوم یدید (PI) بر اساس دستورالعمل کیت (Apoptosis detection kit, Roch, Germany) انجام گرفت. به طور خلاصه، بعد از تیمار کردن سلول‌ها با نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌های رده پستان تریپسینه شده و با استفاده از سانتریفوژ جداسازی شدند. به سلول‌های سانتریفوژ شده، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه گردید. سپس، ۱۰ میکرو لیتر از رنگ پروپیدیوم یدید و ۵ میکرولیتر از رنگ Annexin-V نیز به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شد. تمامی محتویات میکروتیوب به آرامی با یکدیگر مخلوط شدند و نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت زمان ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. در مرحله آخر، آنالیز سلولی توسط دستگاه فلو سایتومتری انجام گرفت

آنالیز آماری

سلول‌ها استفاده شد. انجام آزمون آماری با استفاده از نرم افزار *GraphPad Prism* نسخه ۹/۰ انجام پذیرفت.

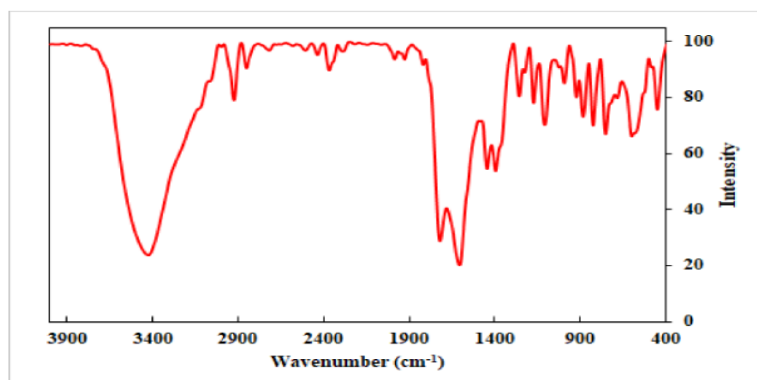
آزمایش‌های MTT در سه تکرار انجام شد و از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با سطح معنی‌داری $p < 0/05$ جهت بررسی تفاوت معنی‌دار زنده‌مانی

نتایج

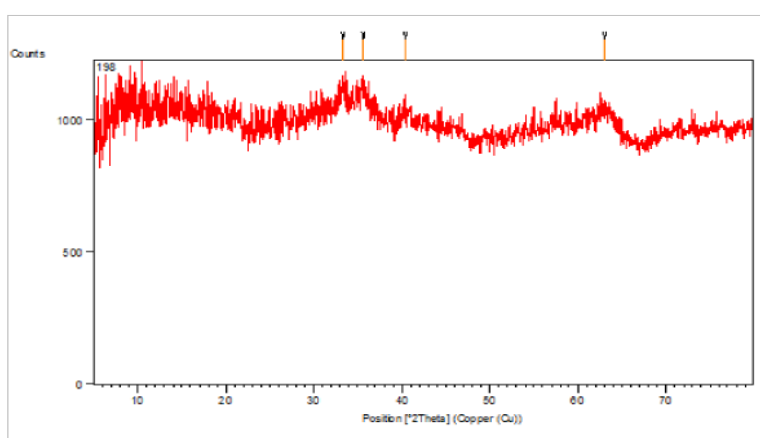
ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده

بررسی گروه‌های عاملی نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ با آزمایش FT-IR نشان دهنده پیک‌های جذبی در cm^{-1} ۵۸۱، ۴۲۱ و ۶۲۵ به ترتیب ناشی از پیوندهای Fe-O مربوط به یونهای Fe^{2+} واقع در جایگاه‌های هشت‌وجهی و یون Fe^{3+} واقع در جایگاه چهاروجهی است. این حالت نشانه‌ی شکل‌گیری ساختار اکسید آهن می‌باشد. پیک‌های قابل مشاهده در cm^{-1} ۸۹۶، ۷۹۲، ۵۸۲ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-C، C-H، =CH می‌باشند. همچنین پیک جذبی در cm^{-1} ۱۴۰۹ مربوط به پیوند C-C در حلقه‌ی بنزنی موجود در ساختار است. طول موج‌های cm^{-1} ۱۶۲۵ و ۱۷۴۹ و ۳۴۵۳ نیز مربوط به پیوندهای C=C، C=O و OH می‌باشد. با توجه به وجود پیک‌های مشاهده شده در ساختار نانوذره، می‌توان نتیجه گرفت

که نانوذره به درستی سنتز شده است (شکل ۱). بررسی ساختار کریستالی نانوذرات با استفاده از آزمایش XRD نشان دهنده پیک‌هایی در مقادیر 2θ برابر ۳۰ و ۴۴ و ۶۵ درجه هستند که مربوط به نانوذرات آهن اکسید بوده و مطابق با شماره کارت ۰۸۶۳-۰۳ می‌باشد. همچنین، پیک‌های جزئی قابل مشاهده در 2θ بین ۱۰ تا ۳۰ درجه نشان دهنده ساختار آمورف کومارین است (شکل ۲)



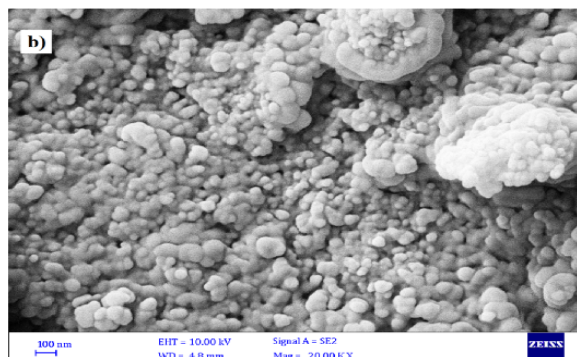
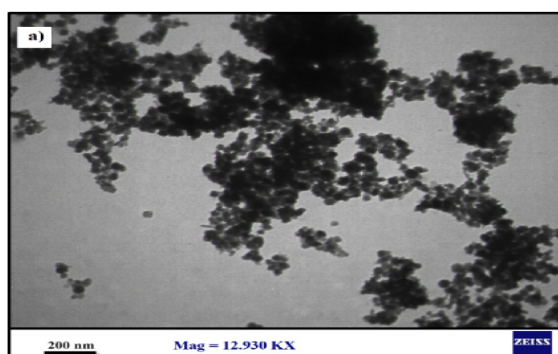
شکل ۱. طیف FT-IR نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ سنتز شده در این مطالعه



شکل ۲. آنالیز XRD نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$

برای ارزیابی کمی میزان بار الکتریکی و پایداری نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ انجام گرفت. بر اساس نتایج میانگین پتانسیل زتا برای نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ مقدار ۱۱- میلی ولت بود (شکل ۴)

بررسی ریخت شناسی و اندازه نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ با استفاده از تصاویر میکروسکوپ‌های الکترونی نشان داد که ذرات سنتز شده دارای شکل کروی و اندازه بین ۱۰ تا ۷۰ نانومتر هستند (شکل ۳). آنالیز پتانسیل زتا

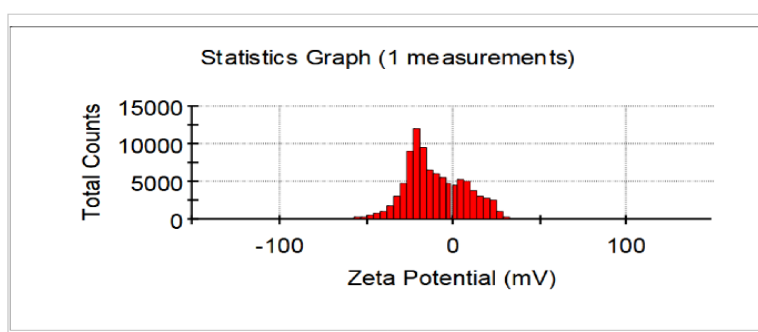


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (a) و نگاره (b) نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$. ذرات دارای شکل کروی و اندازه بین ۱۰ تا ۶۰ نانومتر هستند.

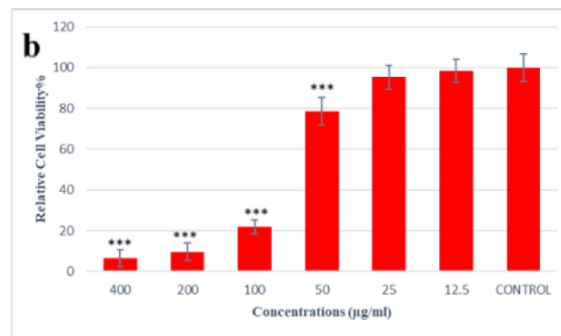
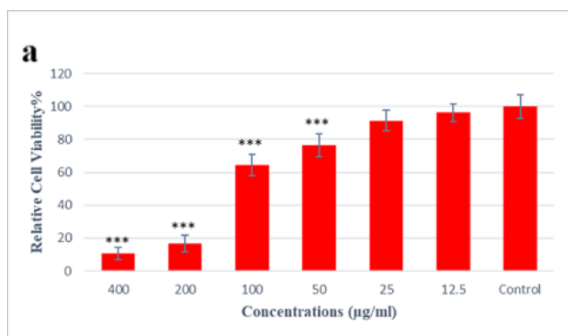
بررسی زنده‌مانی سلول‌ها

از آزمایش MTT به منظور ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان پستان تیمار شده با نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌ها در اثر تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ دچار کاهش جزئی شد، اما با افزایش غلظت نانوذره، در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در میزان زنده‌مانی سلول‌های مذکور

مشاهده شد. همچنین، غلظت نیمه مهاری این نانوذره در رده سلول سرطان پستان ۷-MCF مقدار ۱۱۱ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه گردید. ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار ۴۸ ساعته با نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ نتایج مشابهی را نشان داد با این تفاوت که غلظت نیمه مهاری نانوذره ۶۳ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج در شکل ۵ نمایش داده شده است



شکل ۴. تعیین میزان پتانسیل زتا (نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ . نانوذره سنتز شده دارای بار سطحی معادل ۱۱- میلی ولت است.

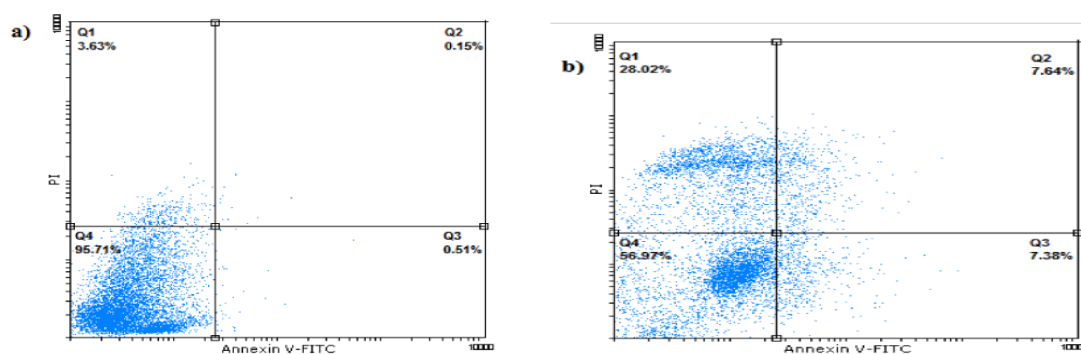


شکل ۵. درصد زنده‌مانی سلول‌های رده سرطانی پستان تحت تاثیر نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ در زمان (a) ۲۴ و (b) ۴۸ ساعت (نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه شاهد گزارش شده است. ($P < 0.01$)).

ترتیب ۶۳/۳ و ۰۲/۲۶٪ بود. میزان آپوپتوز اولیه و تأخیری در سلول‌های شاهد به ترتیب ۵۱/۰ و ۱۵/۰ درصد بود که پس از تیمار با نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ به ۳۸/۰۷ و ۶۴/۷ درصد افزایش یافتند. نتایج در شکل ۶ نمایش داده شده اند

آپوپتوز و نکروز سلولی

بررسی میزان آپوپتوز و نکروز سلولی با استفاده از آزمایش فلو سایتومتری نشان داد که در اثر تیمار سلول‌های رده سرطان پستان با نانوذره Glu-CO-HA@Fe₃O₄ میزان آپوپتوز و نکروز سلولی افزایش می‌یابد. میزان نکروز سلولی در سلول‌های گروه شاهد و تیمار شده به



شکل ۶. آنالیز فلوسایتمتری سلول‌های رده سرطان پستان تحت تاثیر نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ به مدت ۲۴ ساعت. (a): نمونه شاهد، (b): نمونه تیمار شده با نانوذره. نتایج نشان می‌دهند که تیمار سلول‌ها با نانوذره باعث افزایش شدید درصد سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی شده است. Q۱: نکروز سلولی، Q۲: آپوپتوز تاخیری، Q۳: آپوپتوز اولیه، Q۴: سلول‌های سالم.

بحث

وابسته به زمان بر روی سلول‌های سرطان پستان هستند، به طوری که با افزایش غلظت سبب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شدند. همچنین، مقایسه شاخص غلظت نیمه‌مهار در تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته نشان داد که نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ دارای اثرات ضدسرطانی وابسته به زمان بر سلول‌های MCF-7 هستند. اثرات ضد سرطانی نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Glu-CO-HA}$ بر سلول‌های رده سرطان پستان را می‌توان با هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی به واسطه اصلاح نانوذرات اکسید آهن با هیالورونیک اسید و همچنین اثرات ضدتکثیری کومارین بر این سلول‌ها مرتبط دانست. همسو با نتایج این پژوهش، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کومارین دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده‌های متعدد سلول‌های سرطان از جمله سلول‌های رده سرطان پستان از طریق مهار چرخه سلولی و القای آپوپتوز است. مشاهده شده است که مشتقات کومارین می‌توانند اثرات مهار بر مهارکننده P53 اعمال کند. پروتئین P53 یک مهارکننده تومور است که با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی آپوپتوز به ویژه از طریق مسیر داخلی، سبب القای آپوپتوز سلولی شده و به این ترتیب از رشد بی‌رویه سلول‌ها جلوگیری می‌کند. مهار بیان و فعالیت این پروتئین در انواع متعدد سرطان تاکنون گزارش شده است (۱۵)

سرطان پستان یکی از کشنده‌ترین و فراوان‌ترین انواع سرطان به شمار می‌آید. این بیماری دارای انواع مختلفی است که از رفتار تهاجمی، سرعت توسعه و پاسخ به درمان متفاوتی برخوردار هستند. به همین دلیل، درمان این بیماری با استفاده از داروهای رایج شیمی درمانی فاقد کارایی لازم هستند. همچنین، با توجه به اینکه بسیاری از داروهای ضد سرطان فاقد عملکردهای سیتوتوکسیک اختصاصی بر سلول‌های سرطانی هستند، اغلب با عوارض جانبی بر سلول‌ها و بافت‌های غیر هدف همراه هستند. هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی با استفاده از لیگاندهای اختصاصی می‌تواند سبب افزایش اثربخشی و کاهش عوارض داروهای ضدسرطانی شود (۱۳). بر این اساس، این مطالعه با هدف سنتز نانوذره Glu-CO-HA @ Fe_3O_4 و بررسی اثر ضدسرطانی آن بر سلول‌های رده سرطان پستان انجام شد.

بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذره Glu-CO-HA @ Fe_3O_4 نشان داد که ذرات سنتز شده دارای اندازه در مقیاس نانو و شکل کروی هستند. اندازه کوچک این ذرات امکان نفوذ بافتی مؤثر به بافت‌های توموری و رسیدن به سلول‌های سرطانی را فراهم می‌کند. همچنین، شکل کروی ذرات سبب می‌شود که ذرات بتوانند به سلول‌های سرطانی نفوذ کنند و اثرات ضد سرطانی خود را اعمال نمایند (۱۴). آزمایش MTT نشان داد که نانوذره Glu-CO-HA @ Fe_3O_4 دارای اثرات ضد تکثیری وابسته به غلظت و

دیده شده است که کومارین می‌تواند پروتئین مهارکننده اختصاصی پروتئین P53 را مهار کند. این فرایند می‌تواند سبب افزایش فعالیت P53 و در نتیجه شروع و پیشروی مسیرهای آپوپتوز شود (۱۶). همچنین، گزارش شده است که کومارین می‌تواند سبب مهار پیشروی چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی شود، رویدادی که یک سیگنال جهت فعال‌سازی آپوپتوز سلولی است. گزارش شده است که مشتقات کومارین می‌توانند سبب فعال‌سازی پروتئین‌های کیناز وابسته به سیکلین و اختلال در چرخه سلولی شوند. این فرایند می‌تواند در ادامه سبب فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی و مرگ سلول‌های سرطانی شود (۱۷-۱۸).

همسو با این نتایج، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کومارین و مشتقات آن می‌توانند سبب افزایش بیان و یا فعالیت کاسپازها در سلول‌های سرطانی شوند. کاسپازها گروهی از پروتئین‌ها با فعالیت پروتئاز هستند که در پاسخ به محرک‌های درونی و بیرونی فعال شده و با هضم انزیمی پروتئین‌های هدف سبب مرگ سلولی می‌شوند (۱۹). همچنین، القای آپوپتوز ناشی از فعال‌سازی کاسپازهای ۷ و ۹ در سلول‌های رده MCF-7 تیمار شده با مشتقات کومارین توسط Mohamed و همکاران (۲۰) گزارش شده است، که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. علاوه بر این، اثرات مهاری کومارین و مشتقات آن مثل Styrene substituted

biscoumarin بر پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی قبلاً گزارش شده است (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Li و همکاران انجام شد، آنان دریافتند که کمپلکس هیدروکسی-پلاتینیوم می‌تواند سبب افزایش قابل توجه کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ و افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی رده SKOV-3 شوند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۲۲). مداخله با مسیر سیگنالی PI3K/Akt/mTOR نیز می‌تواند یکی دیگر از مکانیسم‌های ضد سرطانی نانوذره Fe₃O₄@Glu-CO-HA باشد. این مسیر سیگنالی در بسیاری از فرایندها از جمله زنده‌مانی، تکثیر، اتصال و حرکت سلول‌های جانوری نقش ایفا می‌کند. برخی مطالعات پیشین به وضوح نشان دادند که مشتقات کومارین می‌توانند از طریق تداخل با مسیر سیگنالی مذکور سبب افزایش اتوفاژی، القای آپوپتوز و مهار چرخه سلولی در رده‌های متعدد سلول‌های سرطانی شوند (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Ramdani و همکاران انجام شد، آنان نشان دادند که ۴-هیدروکسی کومارین سبب مهار وابسته به غلظت سلول‌های رده سرطان پستان MCF-7 از طریق توقف چرخه سلولی در مرحله M/G2، کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax شود، که تأیید کننده اثرات تحریک آپوپتوز ناشی از کومارین در این سلول‌ها است (۲۴).

نتیجه گیری

ضد سرطانی مشاهده شده را می‌توان به هدف‌گیری سلول‌های سرطانی به دلیل وجود اسید هیالورونیک بر سطح نانوذره و همچنین اثرات ضد سرطانی کومارین مرتبط دانست. نتایج این مطالعه می‌تواند در توسعه نانوداروهای هوشمند به منظور هدف‌گیری و مهار اختصاصی سلول‌های سرطان پستان کمک کننده باشد

این مطالعه با هدف سنتز نانوذره Fe₃O₄@Glu-CO-HA و ارزیابی اثرات آن بر زنده‌مانی و آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان پستان MCF-7 انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذره سنتز شده می‌تواند در یک روند وابسته به غلظت سبب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شده و اثرات مهاری خود را با افزایش میزان نکروز و آپوپتوز در این سلول‌ها اعمال کند. اثرات

تقدیر و تشکر

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد رشت تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسنده گان هیچ تعارض منافی ندارند.

References

1. 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 May;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Wang J, Wu SG. Breast cancer: an overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2023;15:721-30.
3. Ensenyat-Mendez M, Llinàs-Arias P, Orozco JI, Íñiguez-Muñoz S, Salomon MP, Sesé B, et al. Current triple-negative breast cancer subtypes: dissecting the most aggressive form of breast cancer. *Front Oncol*. 2021;11:681476. doi: 10.3389/fonc.2021.681476.
4. Bansal V, Katiyar SS, Dora CP. Toxicity aspects: Crucial obstacles to clinical translation of nanomedicines. In: *Direct Nose-to-Brain Drug Delivery*. 2021. p. 485-94. doi: 10.1016/B978-0-12-822522-6.00022-9.
5. Sangaiya P, Jayaprakash R. A review on iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *J Supercond Nov Magn*. 2018;31(11):3397-413. doi: 10.1007/s10948-018-4841-2.
6. Michalczyk M, Humeniuk E, Adamczuk G, Korga-Plewko A. Hyaluronic acid as a modern approach in anticancer therapy-review. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):103. doi: 10.3390/ijms24010103.
7. Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:204-36. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.011.
8. Zhong Y, Goltsche K, Cheng L, Xie F, Meng F, Deng C, et al. Hyaluronic acid-shelled acid-activatable paclitaxel prodrug micelles effectively target and treat CD44-overexpressing human breast tumor xenografts in vivo. *Biomaterials*. 2016;84:250-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.049.
9. Saidu NE, Valente S, Bana E, Kirsch G, Bagrel D, Montenarh M. Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(4):1584-93. doi: 10.1016/j.bmc.2011.12.032.
10. Emami S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*. 2015;102:611-30. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.033.
11. Fekri Kohan S, Zamani H, Salehzadeh A. Antibacterial potential and cytotoxic activity of iron oxide nanoparticles conjugated with thymol (Fe₃O₄@Glu-Thymol) on breast cancer cells and investigating the expression of BAX, CASP8, and BCL-2 genes. *Biomaterials*. 2023;36(6):1273-84. doi: 10.1007/s10534-023-00516-7.
12. 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. *J Biol Inorg Chem*. 2020;25(1):23-37. doi: 10.1007/s00775-019-01729-3.
13. Raj S, Khurana S, Choudhari R, Kesari KK, Kamal MA, Garg N, et al. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2021;69:166-77.
14. Chamseddine IM, Kokkolaras M. Nanoparticle optimization for enhanced targeted anticancer drug delivery. *J Biomech Eng*. 2018;140(4):041002.
15. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40. doi: 10.1038/sj.onc.1207116.
16. Ashraf R, Hamidullah, Hasanain M, Pandey P, Maheshwari M, Singh LR, et al. Coumarin-chalcone hybrid instigates DNA damage by minor groove binding and stabilizes p53 through post translational modifications. *Sci Rep*. 2017;7:45287.
17. Weber US, Steffen B, Siegers CP. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1998;99(2):193-206.
18. Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, Ramos AA. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochem Lett*. 2015;14:91-8. doi: 10.1016/j.phytol.2015.09.007.
19. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):897-907. doi: 10.1038/nrm1496.

20. Mohamed TK, Batran RZ, Elseginy SA, Ali MM, Mahmoud AE. Synthesis, anticancer effect and molecular modeling of new thiazolypyrazolyl coumarin derivatives targeting VEGFR-2 kinase and inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Bioorg Chem.* 2019;85:253-73. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.12.040.
21. Perumalsamy H, Sankarapandian K, Veerappan K, Natarajan S, Kandaswamy N, Thangavelu L, et al. In silico and in vitro analysis of coumarin derivative induced anticancer effects by undergoing intrinsic pathway mediated apoptosis in human stomach cancer. *Phytomedicine.* 2018;46:119-30. doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.021.
22. Li G, Zhang J, Liu Z, Wang Q, Chen Y, Liu M, et al. Development of a series of 4-hydroxycoumarin platinum (IV) hybrids as antitumor agents: synthesis, biological evaluation and action mechanism investigation. *J Inorg Biochem.* 2019;194:34-43. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.02.011.
23. Dong M, Ye T, Bi Y, Wang Q, Kuerban K, Li J, et al. A novel hybrid of 3-benzyl coumarin seco-B-ring derivative and phenylsulfonylfuroxan induces apoptosis and autophagy in non-small-cell lung cancer. *Phytomedicine.* 2019;52:79-88. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.216.
24. Ramdani LH, Talhi O, Decombat C, Vermerie M, Berry A, Silva A, et al. Bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one) coumarin induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells through aromatase inhibition. *Anticancer Res.* 2019;39(11):6107-14. doi: 10.21873/anticancer.13818.