



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

<https://zisti.iauvaramin.ac.ir>


The effect of iron oxide nanoparticles conjugated with juglone and hyaluronic acid on the induction of apoptosis and increased expression of Caspase 8 gene in gastric cancer cells

Alireza Emamifar¹, Ali Salehzadeh^{1*}, Shahab Shariati², Seyed Ataollah Sadat Shandiz³

¹Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Department of Chemistry, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

³Department of Biology, CT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Received 2025.08.09

Revised 2025.10.19

Accepted 2025.10.20

KeyWords:

Caspase 8

Gastric cancer

Iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄)

Juglone

Hyaluronic acid

Apoptosis

*Corresponding author:

E-mail address:

a.salehzadeh@iaau.ac.ir

Introduction: Gastric cancer remains one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide, characterized by late diagnosis, drug resistance, and limited effectiveness of conventional therapies. Innovative and targeted treatment strategies are urgently needed. Objective: This study aimed to design and evaluate a multifunctional nanoparticle-based delivery system composed of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) conjugated with juglone and hyaluronic acid (Fe₃O₄@Glu-HA-Juglone) to induce apoptosis in gastric cancer cells through the upregulation of caspase 8 expression.

Materials and methods: The synthesized nanoparticles were characterized using FES-EM, FT-IR, and XRD analyses. The cytotoxic effects were assessed using the MTT assay, and caspase-8 gene expression was evaluated in AGS gastric cancer cells line using quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR). Data were analyzed using one-way ANOVA and independent t-tests.

Results: The Fe₃O₄@Glu-HA-Juglone nanoparticles exhibited a nanoscale size (~10 nm), spherical morphology, and good colloidal stability. FT-IR and XRD analyses confirmed successful conjugation and preservation of the crystalline core. The MTT assay revealed a dose-dependent reduction in cell viability (IC₅₀ = 56 µg/mL at 24 h). A significant upregulation of caspase 8 expression ($P < 0.01$) was observed in treated cells, indicating the activation of intrinsic apoptotic pathways.

Conclusion: Fe₃O₄@Glu-HA-Juglone nanoparticles represent a promising nanoplatform for targeted drug delivery in gastric cancer therapy by combining magnetic responsiveness, anti-cancer properties of juglone, and CD44-targeting ability of hyaluronic acid. The observed induction of apoptosis through caspase-8 upregulation highlights their potential for use in future combination therapies. Further preclinical studies are warranted to validate their clinical applicability.

Cite this article: A. Emamifar, A. Salehzadeh, SH. Shariati-feizabadi, SAS. Shandiz. The effect of iron oxide nanoparticles conjugated with juglone and hyaluronic acid on the induction of apoptosis and increased expression of Caspase 8 gene in gastric cancer cells. Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (2): 1-12

 <https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1214388>



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by Islamic Azad University, Varamin.

This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X



تأثیر نانوذرات اکسید آهن کونژوگه با جوگلون و اسید هیالورونیک بر القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ در سلول های سرطان معده

علیرضا امامی فر^۱، علی صالحزاده^{۱*}، شهاب شریعتی^۲، سید عطاءالله سادات شانديز^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۲ گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: سرطان معده به‌عنوان یکی از چالش‌های عمده سلامت جهانی، با نرخ مرگ‌ومیر بالا و پیچیدگی‌های درمانی، نیازمند رویکردهای نوآورانه برای درمان مؤثر است. این مطالعه با هدف توسعه یک سیستم نانوحامل چندمنظوره، اثرات نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) کونژوگه‌شده با جوگلون و اسید هیالورونیک (HA) را بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) بررسی کرده و بر نقش کلیدی افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ در القای آپوپتوز تمرکز دارد.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۵/۱۸

بازنگری ۱۴۰۴/۰۷/۲۷

پذیرش ۱۴۰۴/۰۷/۲۸

مواد و روش‌ها: نانوذرات $Fe_3O_4@Glu-HA-Juglone$ با استفاده از روش هم‌رسوبی سنتز و با تکنیک‌های FESEM، FT-IR، و XRD مشخصه‌یابی شدند. اثر سیتوتوکسیک این نانوذرات با سنجش MTT و تأثیر آن‌ها بر بیان ژن کاسپاز ۸ با Q-RT-PCR در سلول‌های سرطانی معده رده ی AGS ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون t مستقل تحلیل شدند.

کلمات کلیدی

کاسپاز ۸

سرطان معده

نانوذرات اکسید آهن

جوگلون

اسید هیالورونیک

آپوپتوز

یافته‌ها: نانوذرات سنتز شده با اندازه ی نانومقیاس (تقریباً ۱۰ نانومتر)، مورفولوژی کروی، و پایداری کلئیدی بودند. آنالیز FT-IR و XRD کونژوگاسیون موفقیت‌آمیز جوگلون و HA و حفظ ساختار بلوری Fe_3O_4 را تأیید کرد. سنجش MTT کاهش وابسته به دوز زنده مانی سلول‌های سرطانی را نشان داد (IC_{50} : 56 میکروگرم در میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت). در سلول‌های تیمار شده افزایش معنی‌دار بیان کاسپاز ۸ ($P < 0.01$) مشاهده شد.

* مسئول مکاتبات:

a.salehzadeh@iauu.ac.ir

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که نانوذرات $Fe_3O_4@Glu-HA-Juglone$ با ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پایدار و زیست‌سازگار، قادر به کاهش وابسته به دوز زنده مانی سلول‌های سرطانی معده و افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ هستند. این یافته‌ها نشان‌دهنده نقش بالقوه این نانوسیستم در فعال‌سازی فرآیندهای مرتبط با آپوپتوز است، هرچند مکانیسم دقیق آن نیازمند بررسی‌های بیشتر است. در آینده، مطالعات پیش‌بالینی و بالینی برای روشن شدن مسیرهای دخیل در القای آپوپتوز و ارزیابی اثربخشی این نانوسیستم در شرایط درون‌تنی ضروری خواهد بود.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ع. امامی فر، ع. صالحزاده، ش. شریعتی، فیض آبادی، س. ع. شانديز. تأثیر نانوذرات اکسید آهن کونژوگه با جوگلون و اسید هیالورونیک

بر القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ در سلول های سرطان معده. مجله دانش زیستی ایران. ۲۰۱۴۰۴ (۲): ۱-۱۲

doi: <https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1214388>

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: X ۴۵۹ - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

سرطان معده یک بیماری بدخیم است که از پوشش داخلی معده ایجاد می شود و یک چالش بهداشتی جهانی با نرخ مرگ و میر قابل توجه است. سرطان معده با نرخ های بالاتری در مناطق خاصی مانند شرق آسیا، آمریکای جنوبی و بخش هایی از اروپای شرقی گزارش شده است (۱). عوامل خطر مختلفی در ایجاد آن نقش دارند، از جمله عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری، استعمال دخانیات، عوامل غذایی و استعداد ژنتیکی (۲). پیشرفت در زیست شناسی مولکولی مسیرهای کلیدی درگیر در سرطان زایی معده را کشف کرده است. بی نظمی مسیرهای سیگنالینگ، مانند PI3K-Akt و Wnt، Ras-MAPK، نقش مهمی ایفا می کند (۳). علاوه بر این، تغییرات ژنتیکی، از جمله جهش در ژن های سرکوب کننده تومور (به عنوان مثال، TP53) و انکوژن ها (مانند HER2)، به ایجاد و پیشرفت سرطان معده کمک می کنند (۳). روش های درمان سرطان معده شامل جراحی، شیمی درمانی و درمان های هدفمند است. عمل جراحی با هدف برداشتن تومور و غدد لنفاوی آسیب دیده انجام می شود، در حالی که شیمی درمانی، که اغلب شامل فلوروپیریمیدین ها و ترکیبات پلاتین است، در هر دو بخش نئوادجوانت و کمکی استفاده می شود (۴). درمان های هدفمند، مانند تراستوزوماب برای تومورهای HER2 مثبت، در بهبود نتایج نویدبخش بوده است (۵). نانوذرات اکسید آهن (IONPs) به دلیل خواص فیزیکی شیمیایی منحصر به فرد و زیست سازگاری به عنوان عوامل امیدوارکننده در زمینه درمان سرطان ظهور کرده اند. این نانوذرات خواص مغناطیسی از خود نشان می دهند و امکان تحویل کنترل شده دارو و درمان هدفمند را فراهم می کنند و آنها را به یک نقطه کانونی در تحقیقات نانوپزشکی تبدیل می کند (۶). یکی از مزیت های کلیدی IONP ها در درمان سرطان، توانایی آنها برای عمل همزمان به عنوان عوامل درمانی و تصویربرداری است. با توجه به خواص مغناطیسی خود، IONP ها می توانند با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی، به محل های تومور هدایت و تحویل دارو را تسهیل کنند (۷). علاوه بر این، این نانوذرات می توانند به عنوان عوامل کنتراست در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) عمل کنند و امکان نظارت زنده بر روند درمان و ارزیابی دقیق نتایج درمانی را فراهم کنند (۸، ۹). IONP ها هنگامی که در

معرض یک میدان مغناطیسی متناوب قرار می گیرند، از طریق تلفات هیستریزس، گرما تولید می کنند که منجر به هایپرترمی موضعی در بافت تومور می شود (۱۰). نشان داده شده است که این اثر گرمازا باعث افزایش حساسیت سلول های سرطانی به پرتودرمانی یا شیمی درمانی می شود و در نتیجه کارایی درمانی کلی را بهبود می بخشد (۱۱). مطالعات اخیر پتانسیل IONP ها را در رویکردهای درمان ترکیبی نشان داده است. با بارگذاری IONP ها با داروهای شیمی درمانی یا ژن های درمانی، می توان به یک اثر هم افزایی دست یافت که منجر به افزایش فعالیت ضد سرطانی می شود (۱۲، ۱۳). جوگلون، یک ترکیب طبیعی مشتق شده از درخت گردوی سیاه است و در سال های اخیر به دلیل خواص درمانی بالقوه خود در درمان سرطان، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این ترکیب به دلیل فعالیت های بیولوژیکی متنوع خود از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی شناخته شده است (۱۴). مطالعات متعددی اثرات سیتوتوکسیک جوگلون را بر روی رده های سلولی سرطانی مختلف بررسی کرده اند. تحقیقات نشان می دهد که جوگلون از طریق مکانیسم های متعدد باعث آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول های سرطانی می شود. این شامل تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS)، اختلال در عملکرد میتوکندری و فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی آپوپتوز می شود (۱۴). این یافته ها پتانسیل جوگلون را به عنوان یک عامل جدید در درمان سرطان نشان می دهد. مشخص شده است که جوگلون بیان انکوژن های خاص را کاهش می دهد و مسیرهای سیگنال دهی مرتبط با بقا و تکثیر سلول های سرطانی را مهار می کند (۱۴، ۱۵). اسید هیالورونیک، یک بیوپلیمر طبیعی و یک گلیکوزآمینوگلیکان است که به طور گسترده در ماتریکس خارج سلولی توزیع شده است (۱۶)، اخیراً در تحقیقات هدف گیری و دارو رسانی به سلول های سرطانی، به خصوص سرطان معده مورد توجه قرار گرفته است (۱۷). علت این امر افزایش بیان بیش از حد گیرنده های اسید هیالورونیک مانند CD44 و RHAMM در بافت های سرطان معده است (۱۸). اسید هیالورونیک به طور خاص با گیرنده های CD44 که در سطح بسیاری از سلول های سرطانی معده بیش از حد بیان می شوند، تعامل دارد (۱۹)

این قابلیت هدف‌گیری منحصر به فرد، محققان را برانگیخته است تا از اسید هیالورونیک به عنوان لیگاند برای سیستم‌های دارورسانی استفاده کنند و تحویل دقیق و انتخابی عوامل درمانی را به سلول‌های سرطانی ممکن می‌سازد. خاصیت چسبندگی مخاط اسید هیالورونیک باعث افزایش احتباس دارو در دستگاه گوارش می‌شود و به بهبود فراهمی زیستی دارو کمک می‌کند (۲۰). این امر به ویژه برای دارورسانی خوراکی مفید است، راهی رایج در درمان سرطان معده، که تضمین کننده انتشار پایدار و هدفمند عوامل درمانی است. مقاومت دارویی همچنان یک چالش در درمان سرطان معده است. تحویل دارو با واسطه اسید هیالورونیک به طور بالقوه می‌تواند با افزایش جذب دارو در سلول‌های سرطانی و افزایش غلظت داروی درون سلولی، بر مکانیسم‌های مقاومت غلبه کند (۲۱). این رویکرد یک استراتژی امیدوار

کننده برای مبارزه با مقاومت و در نتیجه، بهبود نتایج درمان ارائه می‌دهد. کاسپاز ۸ نقش مهمی در تنظیم مرگ برنامه ریزی شده سلولی، به ویژه آپوپتوز دارد (۲۲)، کاسپاز ۸ یک کاسپاز آغازگر است، به این معنی که در خط مقدم مسیر آپوپتوز قرار دارد، کاسپازهای دیگر را فعال می‌کند و آبشاری را ایجاد می‌کند که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲۲-۲۴).

جنبه نوآوری این تحقیق از این حیث است که اثرات خاص IONP های کونژوگه با جوگلون و اسید هیالورونیک بر بیان ژن های کاسپاز ۸ در سلول های سرطان معده به عنوان یک استراتژی درمانی چندبعدی بررسی نشده است. این یافته ها راه را برای توسعه استراتژی های درمانی هدفمند و موثر برای درمان سرطان معده هموار می‌کند

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات

نانوذرات اکسید آهن کونژوگه با جوگلون و اسید هیالورونیک ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$) با استفاده از روش هم‌رسوبی تهیه شدند. ابتدا نانوذرات Fe_3O_4 با گلوکز عامل‌دار گردید و پس از پراکنش در حمام اولتراسونیک، تیمار در اتوکلاو و مراحل خالص‌سازی، خشک شد (۲۵). در مرحله بعد، نانوذرات عامل‌دار با جوگلون و اسید هیالورونیک کونژوگه شده و پس از اعمال فرآیند فراصوت و انکوباسیون طولانی‌مدت، محصول نهایی به‌وسیله سانتریفیوژ و شستشو جداسازی و در نهایت با استفاده از فریزدرایر خشک گردید

تأیید نانوذرات

برای ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ از روش‌های مختلف استفاده شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی به منظور بررسی مورفولوژی، اندازه و یکنواختی ذرات ثبت گردید. طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نیز جهت شناسایی گروه‌های عاملی و تأیید کونژوگاسیون جوگلون و اسید هیالورونیک بر سطح نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون‌ها به‌طور کلی سنتز موفقیت‌آمیز و یکپارچگی ساختاری نانوذرات را تأیید کردند

ارزیابی زنده مانی سلول‌ها با روش MTT

سلول‌های سرطانی رده معده انسان (AGS) از انسیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. برای سنجش MTT، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم 5×10^4 سلول در هر چاهک کاشته شدند و به مدت یک شب به آنها اجازه چسبیدن داده شد. روز بعد، سلول‌ها با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ در غلظت‌های ۹/۳، ۸/۷، ۶/۱۵، ۲/۳۱، ۵/۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار شدند. چاهک‌های کنترل بدون تیمار، حجم مساوی از محیط کشت را دریافت کردند. زنده مانی سلول‌ها با استفاده از سنجش ۳-(۴،۵-دی‌متیل‌تيازول-۲-یل)-۲،۵-دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید (MTT) ارزیابی شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار، ۰.۲ میلی‌لیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند

سپس کریستال‌های فورمازان حاصل با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) در هر چاهک حل شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی تکان داده شدند. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت ELISA اندازه‌گیری شد. زنده مانی سلول‌ها به شرح زیر محاسبه شد

$$\text{درصد زنده مانی سلول (\%)} =$$

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده} / \text{جذب نوری سلول‌های کنترل})$$

هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) بیان شدند.

آنالیز بیان ژن با استفاده از روش کمی Q-RT-PCR

mRNA تام از سلول‌ها استخراج و به ترتیب با استفاده از کیت جداسازی RNA (Qiagen، RNeasy Plus Mini Kit 50، Valencia، CA و کیت سنتز cDNA رشته اول PrimeScript™ (تاکارا، توکیو، ژاپن) به DNA مکمل تبدیل شد. qRT-PCR با شرایط دنا تورا سیون در دمای ۹۵

درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. تقویت با یک مرحله ذوب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه دنبال شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ نسبت به GAPDH محاسبه و نرمال شد، که در آن $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ و محاسبه $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}$ بود. سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد

بررسی بیان ژن کاسپاز ۸

واکنش‌های Q-RT-PCR با استفاده از سیستم Bio-Rad CFX96 انجام شد. شرایط چرخه دمایی شامل: دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل دنا تورا سیون در ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ به مدت ۱ دقیقه بود. در پایان، منحنی ذوب در بازه دمایی ۶۵ تا ۹۵ با افزایش تدریجی دما ثبت گردید. جدول ۱ توالی‌های آغازگر استفاده شده را نشان می‌دهد

جدول ۱. توالی‌های آغازگر برای ژن‌های استفاده شده (۲۶).

ژن	توالی آغازگر (5'→3')	توالی آغازگر (5'→3')	اندازه محصول (bp)
Caspase-8	GACTGGATTGCTGATTACCTACCTAA	CCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT	143
GAPDH (ژن خانه دار)	CCCACTCCTCCACCTTTGAC	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	74

آنالیز آماری

یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون t مستقل با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۷،۰) انجام شد. سطح معنی‌داری برای تمامی آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

داده‌های به دست آمده از سه تکرار مستقل آزمایش‌ها جمع‌آوری و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) گزارش شدند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس

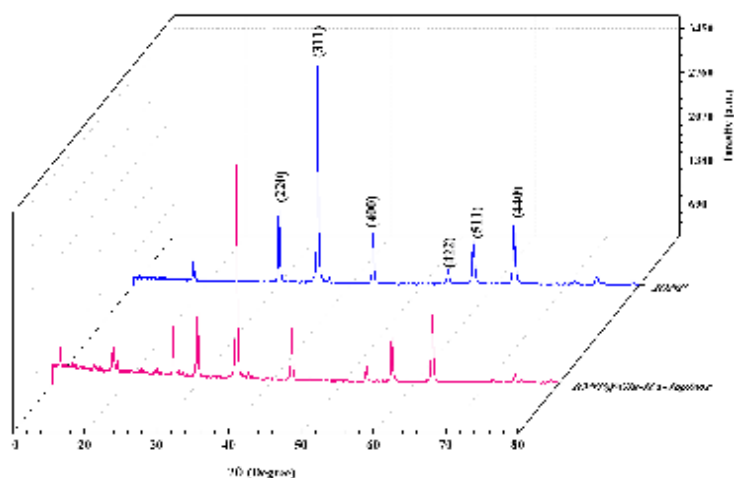
نتایج

مشخصه یابی

نتایج آنالیز XRD

الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات Fe_3O_4 قله‌های مشخصه‌ای متناظر با صفحات (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) نشان داد که با ساختار اسپینل مکعبی استاندارد مگنتیت (JCPDS 19-0629) مطابقت داشت. قله قوی در 35.4° درجه (صفحه ۳۱۱) بلورینگی و خلوص بالای نانوذرات را تأیید کرد. پس از کونژوگاسیون با

جوگلون و اسید هیالورونیک، قله‌های اصلی Fe_3O_4 حفظ شدند و تنها کاهش جزئی در شدت آنها مشاهده گردید که بیانگر پوشش سطحی و برهم‌کنش با بیومولکول‌ها است، بدون ایجاد قله‌های جدید مربوط به جوگلون یا HA. این نتایج نشان می‌دهد که ساختار بلوری Fe_3O_4 پس از عامل‌دار شدن دست‌نخورده باقی مانده و اصلاح سطح موفقیت‌آمیز بوده است (شکل ۱)

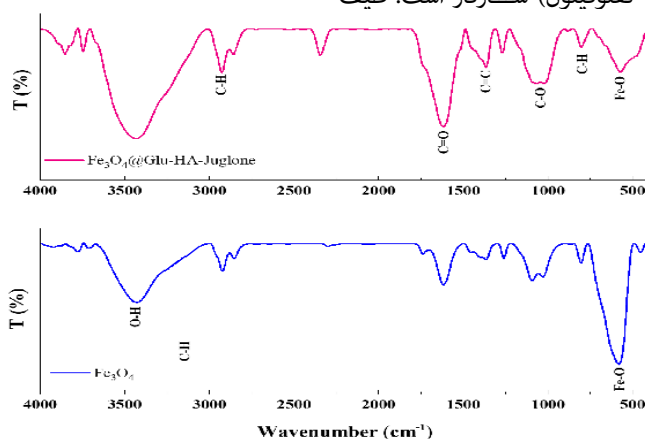


شکل ۱. الگوهای پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات Fe_3O_4 (آبی) و $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ (صورتی)

نتیجه طیف سنجی FT-IR

FT-IR برای تأیید اتصال ترکیبات شیمیایی به سطح نانوذرات اکسید آهن و تغییرات سطحی نانوذرات سنتز شده انجام شد. طیف های Fe_3O_4 ، جوگلون و نانومزدوج نهایی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ ثبت و تجزیه و تحلیل شدند (شکل ۲). طیف FT-IR نانوذرات Fe_3O_4 خالص یک باند جذب قوی مشخص در حدود 580 cm^{-1} نشان داد که به ارتعاشات کششی Fe-O مگنتیت نسبت داده می شود و سنتز موفقیت آمیز نانوذرات اکسید آهن را تأیید می کند. هیچ گونه جذب گروه عاملی آلی قابل توجهی مشاهده نشد که با ماهیت معدنی Fe_3O_4 سازگار است. طیف جوگلون نوارهای جذبی برجسته ای را در ناحیه $1650-1700\text{ cm}^{-1}$ نشان داد که مربوط به ارتعاشات کششی C=O گروه های کینون به همراه قله هایی در محدوده $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ است که نشان دهنده کشش C=C آروماتیک است. این یافته ها با ساختار شناخته شده جوگلون (5-هیدروکسی-۱،۴-نفتوکینون) سازگار است. طیف

FT-IR نانوکامپوزیت نهایی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ عملکرد و کونژوگاسیون موفقیت آمیز سطح را نشان داد. علاوه بر باند کششی Fe-O هسته Fe_3O_4 چندین ویژگی جذب جدید مشاهده شد: یک نوار پهن و شدید در حدود $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی O-H و N-H، که نشان دهنده وجود گروه های هیدروکسیل و آمید از اسید هیالورونیک است. علاوه بر این، ارتعاشات کششی کربونیل (C=O) از جوگلون در حدود 1650 cm^{-1} باقی ماند، البته با تغییرات جزئی و گسترش، که نشان دهنده برهمکنش بین جوگلون و سطح نانوذره است. ناحیه حدود $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ قله های متعددی را نشان می دهد که می توان آن را به حالت های کششی C-O-C و C-O از اسید هیالورونیک و جوگلون نسبت داد و تأییدی بر کونژوگاسیون موفق است. در مجموع، تجزیه و تحلیل FT-IR وجود Fe_3O_4 ، جوگلون و اسید هیالورونیک را در سیستم نهایی نانوذرات تأیید کرد

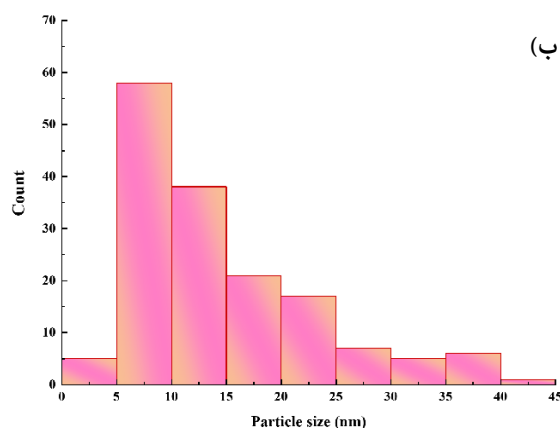
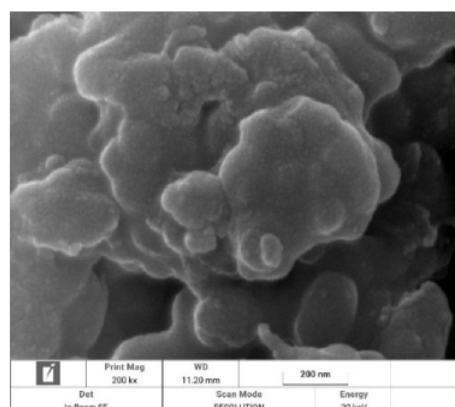
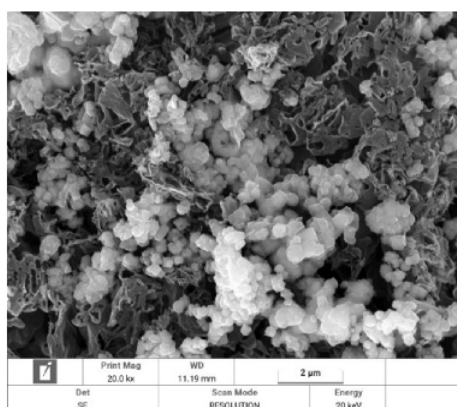


شکل ۲. طیف های FT-IR نانوذرات Fe_3O_4 (آبی) و نانوکونژوگه $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ (صورتی)

نتیجه FE-SEM

برای مشخص شدن ریخت شناسی ذرات از تصاویر FE-SEM استفاده شده است. در شکل (۳ الف)، تصویر کامپوزیت $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ با بزرگنمایی ۲ میکرومتر و ۲۰۰ نانومتر نشان داده شده است. با توجه به شکل نانوذرات عمدتاً کروی و توزیع اندازه یکنواخت آنها را نشان می دهد. نانوذرات به خوبی پراکنده شده

(الف)



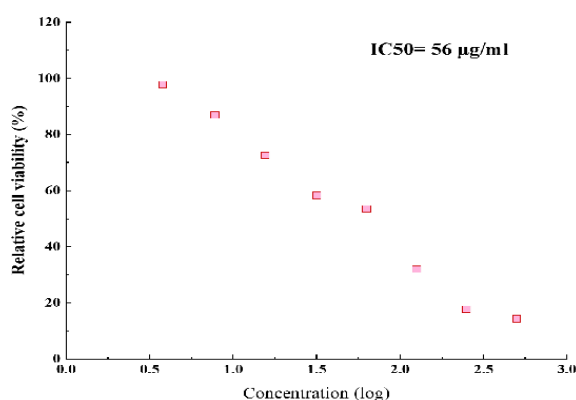
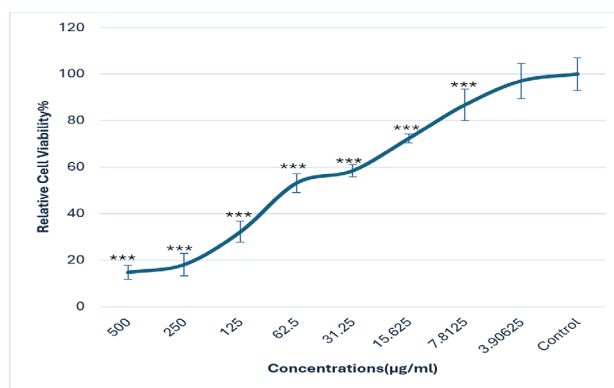
(ب)

شکل ۳. الف) تصویر SEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ و ب) نتایج توزیع اندازه ذرات

می کند. حتی در غلظت های پایین تر (۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۵/۶۲۵ میکروگرم در میلی لیتر)، کاهش قابل توجهی در زنده مانی سلول ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که نشان دهنده اثربخشی این سیستم دارورسانی هدمند است. شکل ۴ نتایج سنجش MTT را برای تیمار سلول های سرطانی ۲۴ ساعته نشان می دهند

نتایج سنجش MTT

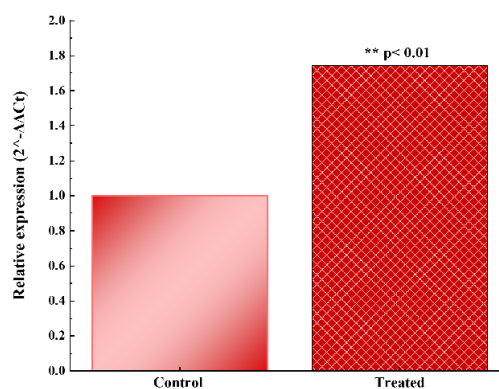
در سلول های سرطانی (شکل ۴)، سنجش MTT کاهش وابسته به دوز در زنده مانی پس از تیمار با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ را نشان داد. در بالاترین غلظت ها (۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر)، زنده مانی سلول ها به طور قابل توجهی کاهش یافت ($p < 0.05$)، که اثر سیتوتوکسیک قوی نانوکونژوگه بر سلول های سرطان معده را تأیید



شکل ۴. نتایج آزمون MTT نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ در زنده‌مانی سلول‌های سرطان معده (AGS) پس از ۲۴ ساعت

به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (حدود ۱/۷ برابر نسبت به کنترل، $P < 0.01$) (شکل ۵)

تغییرات بیان ژن کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطان معده تحلیل Q-RT-PCR نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۸ در سلول‌های تیمار شده با $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$



شکل ۵. بیان نسبی ژن کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطان معده (AGS) پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از سه آزمایش مستقل ارائه شده‌اند ($P < 0.01^{**}$).

بحث

سرطان معده به عنوان یکی از مرگبارترین انواع سرطان‌های دستگاه گوارش، همچنان یکی از چالش‌های عمده سلامت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود و سالانه صدها هزار نفر را به کام مرگ می‌کشد. نرخ بالای مرگومیر، مقاومت دارویی، و بروز عوارض جانبی در روش‌های درمانی متداول مانند شیمی‌درمانی، ضرورت دستیابی به راهکارهای نوین و هدفمند را دوچندان کرده است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید آهن کونژوگه‌شده با جوگلون و اسید هیالورونیک ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$) با اندازه‌ای نانومقیاس، مورفولوژی کروی و پایداری مناسب، اثرات سیتوتوکسیک قابل‌توجهی بر سلول‌های سرطان معده (AGS) دارند و به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ می‌شوند. این افزایش بیان نشان‌دهنده‌ی فعال شدن مسیرهای آپوپتوز وابسته به گیرنده‌های مرگ است و اهمیت ویژه‌ای در درک مکانیسم‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های توموری دارد. یافته‌های حاضر با نتایج مطالعات پیشین همخوانی قابل‌توجهی دارد. به عنوان نمونه، مطالعه‌ی Catanzaro و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که جوگلون، ترکیبی طبیعی مشتق‌شده از گردو، قادر است از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مهار مسیر PI3K/Akt موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود (۱۴). این مکانیسم، که به فعال‌سازی کاسپازهای آغازگر از جمله کاسپاز ۸ منجر می‌شود، هم‌راستا با نتایج حاضر است که افزایش قابل‌توجه بیان این ژن را گزارش کرده‌اند. همچنین، پژوهش Zhong و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که جوگلون از طریق مسیر ROS-PI3K/Akt در سلول‌های سرطان ریه غیرکوچک موجب القای مرگ سلولی می‌شود، که بیانگر نقشی مشابه برای این ترکیب در القای آپوپتوز در انواع مختلف سلول‌های توموری است (۲۷). از سوی دیگر، Zou و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که جوگلون با مهار فرایند گذار اپیتلیال به مزانشیمی (EMT) و تضعیف ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی، توان مهاجرت و متاستاز سلول‌ها را کاهش می‌دهد (۲۸). این یافته‌ها مکمل نتایج مطالعه‌ی حاضر هستند و نشان می‌دهند که جوگلون نه تنها در القای مرگ سلولی، بلکه در مهار تهاجم و پیشرفت تومور نیز نقش دارد. علاوه بر نقش جوگلون، بخش دیگری از اثرگذاری نانوساختار سنتز شده به وجود اسید هیالورونیک در سطح نانوذرات بازمی‌گردد. بر اساس گزارش Amorim و همکاران (۲۰۱۸)، اسید هیالورونیک با گیرنده‌های CD۴۴ که به

میزان زیادی در سلول‌های سرطان معده بیان می‌شوند، پیوند اختصاصی برقرار می‌کند و از این طریق موجب هدف‌گیری دقیق سلول‌های توموری می‌شود (۱۷). حضور این بیوپلیمر در ساختار نانوذره‌ی مورد استفاده در پژوهش حاضر احتمالاً باعث افزایش جذب سلولی و تقویت اثرات ضدسرطانی شده است. یافته‌های مشابهی نیز توسط Luo و همکاران (۲۰۱۹) گزارش شده است؛ آنها نشان دادند که سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر اسید هیالورونیک قادرند تجمع دارو در بافت تومور را به‌طور چشمگیری افزایش دهند و بدین ترتیب کارایی درمان را بهبود بخشند (۲۹). از منظر دیگر، استفاده از نانوذرات اکسید آهن در این سامانه به افزایش اثربخشی درمانی کمک کرده است. مطالعات متعددی، از جمله کار فکری کهن و همکاران (۲۰۲۳)، نشان داده‌اند که نانوذرات Fe_3O_4 کونژوگه‌شده با ترکیبات طبیعی مانند تیمول، علاوه بر افزایش اثرات ضدتکثیری، موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز از جمله Caspase-۸ و Bax در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۵). این نتایج با داده‌های حاصل از پژوهش حاضر مطابقت کامل دارد و نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید آهن می‌توانند نقش مؤثری در تقویت اثرات آپوپتوزی ترکیبات طبیعی ایفا کنند

در سطحی کلان‌تر، یافته‌های این پژوهش با دیدگاه‌های جدید درباره‌ی نقش نانوداروها در درمان هدفمند سرطان معده هم‌سو است. بصیری نیا و همکاران (۲۰۲۴) در بررسی خود بر پتانسیل ساختارهای درمانی-تصویربرداری (Theranostic) تأکید کردند که ترکیب ویژگی‌های مغناطیسی با قابلیت‌های هدف‌گیری مولکولی می‌تواند اثربخشی درمان‌های ضدسرطان را به‌طور چشمگیری افزایش دهد (۳۰). همچنین، Kesharwani و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای دیگر طراحی نانوحامل‌های هدفمند بر پایه‌ی گیرنده‌ی CD44 را یکی از موفق‌ترین رویکردها در دارورسانی توموری معرفی کردند (۳۱). در این چارچوب، سیستم $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$ ارائه‌شده در پژوهش حاضر را می‌توان به عنوان یک نمونه‌ی پیشرفته از نانوپلتفرم‌های چندمنظوره دانست که با ترکیب ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوب، خاصیت مغناطیسی، قابلیت هدف‌گیری و اثرات آنتی‌اکسیدانی، کارایی ضدتوموری را بهینه کرده است

نتیجه گیری

و توان القای آپوپتوز جوگلون، پتانسیل بالایی در درمان هدفمند سرطان معده دارد. با این حال، نتایج به دست آمده محدود به محیط آزمایشگاهی است و برای تأیید اثربخشی و ایمنی در شرایط زیستی واقعی، انجام مطالعات درون تن ضروری است. در پژوهش‌های آینده، بررسی پایداری زیستی، سمیت سیستمیک و مسیرهای مولکولی درگیر در فعال‌سازی کاسپازها می‌تواند به توسعه کاربردی بالینی این نانوساختار کمک کند.

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید آهن کونژوگه شده با جوگلون و اسید هیالورونیک ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu-HA-Juglone}$) با ویژگی‌های ساختاری پایدار و زیست‌سازگار، توانستند زنده‌مانی سلول‌های سرطان معده را به صورت وابسته به دوز کاهش داده و بیان ژن کاسپاز ۸ را به طور معنی‌داری افزایش دهند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوساختار طراحی شده با ترکیب قابلیت هدف‌گیری اسید هیالورونیک، خاصیت مغناطیسی Fe_3O_4

در دسترس بودن

داده‌های به کاررفته در این پژوهش در حال حاضر به صورت عمومی در دسترس نیستند، اما در صورت درخواست معقول، از طریق نویسنده مسئول قابل دریافت می‌باشند.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع شخصی یا سازمانی در انجام این پژوهش وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از سوی نهادهای دولتی، خصوصی یا دانشگاهی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه و نظارت و هدایت پژوهش توسط نویسنده مسئول انجام شده و سایر نویسندگان در جمع آوری داده‌ها، آنالیز نتایج و بازبینی نهایی مقاله مشارکت داشته‌اند.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
2. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2015;136(2):487-90. doi:10.1002/ijc.28999.
3. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9. doi:10.1038/nature13480.
4. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;8(8):CD004064. doi:10.1002/14651858.CD004064.pub4.
5. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9742):687-97. doi:10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
6. Wang Y, Xie Y, Kilchrist KV, Li J, Duvall CL, Oupický D. Endosomolytic and tumor-penetrating mesoporous silica nanoparticles for siRNA/miRNA combination cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(4):4308-22. doi:10.1021/acsami.9b21214.
7. Laurent S, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011;2(4):367-90.
8. Maity D, Sahoo SR, Tiwari A, Ajith S, Saha S. Theranostic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment. In: *Nanomaterials for cancer detection using imaging techniques and their clinical applications*. Springer; 2022. p. 179-223. doi:10.1007/978-3-030-97222-7_6.

9. Mokhosi SR, Mdlalose W, Nhlapo A, Singh M. Advances in the synthesis and application of magnetic ferrite nanoparticles for cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(5):937. doi:10.3390/pharmaceutics14050937.
10. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater Des*. 2017;123:174-96. doi:10.1016/j.matdes.2017.03.036.
11. Singh R, Lillard Jr JW, Singh S. Chemokines: key players in cancer progression and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3:1569-82. doi:10.2741/257.
12. Talluri S, Malla RR. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for diagnosis and treatment of breast, ovarian and cervical cancers. *Curr Drug Metab*. 2019;20(12):942-5. doi:10.2174/1389200220666191022105044.
13. Taylor EN, Kummer KM, Durmus NG, Leuba K, Tarquinio KM, Webster TJ. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) for the treatment of antibiotic-resistant biofilms. *Small*. 2012;8(19):3016-27. doi:10.1002/sml.201200575.
14. Catanzaro E, Greco G, Potenza L, Calcabrini C, Fimognari C. Natural products to fight cancer: A focus on *Juglans regia*. *Toxins (Basel)*. 2018;10(11):469. doi:10.3390/toxins10110469.
15. Salimi M, Ardestaniyan MH, Mostafapour Kandelous H, Saeidnia S, Gohari AR, Amanzadeh A, et al. Anti-proliferative and apoptotic activities of constituents of chloroform extract of *Juglans regia* leaves. *Cell Prolif*. 2014;47(2):172-9. doi:10.1111/cpr.12093.
16. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-39. doi:10.1038/nrc1391.
17. Amorim S, da Costa DS, Freitas D, Reis CA, Reis RL, Pashkuleva I, et al. Molecular weight of surface immobilized hyaluronic acid influences CD44-mediated binding of gastric cancer cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):16058. doi:10.1038/s41598-018-34445-0.
18. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7327-36. doi:10.1074/jbc.M006498200.
19. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. *Front Immunol*. 2015;6:201. doi:10.3389/fimmu.2015.00201.
20. Gómez-Guillén MC, Montero MP. Enhancement of oral bioavailability of natural compounds and probiotics by mucoadhesive tailored biopolymer-based nanoparticles: A review. *Food Hydrocoll*. 2021;118:106772. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106772.
21. Wang X, Guo Z. Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem Soc Rev*. 2013;42(1):202-24. doi:10.1039/c2cs35259a.
22. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*. 2001;155(3):459-70. doi:10.1083/jcb.200103096.
23. Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(3):351-9. doi:10.15171/apb.2015.049.
24. Tardito S, Bassanetti I, Bignardi C, Elviri L, Tegoni M, Mucchino C, et al. Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2011;133(16):6235-42. doi:10.1021/ja109413c.
25. 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. *Biometals*. 2023;36(6):1273-84. doi:10.1007/s10534-023-00517-6.
26. 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(1):1603-9. doi:10.1080/21691401.2019.1604535.
27. Zhong J, Hua Y, Zou S, Wang B. Juglone triggers apoptosis of non-small cell lung cancer through the reactive oxygen species-mediated PI3K/Akt pathway. *PLoS One*. 2024;19(5):e0299921. doi:10.1371/journal.pone.0299921.
28. Zou C, Yu Y, Wang H, Matunda C, Ding S, Wang L, et al. Juglone inhibits tumor metastasis by regulating stemness characteristics and the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer cells both in vitro and in vivo. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023;28(2):26. doi:10.31083/j.fbl2802026.

29.Luo Z, Dai Y, Gao H. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery. *Acta Pharm Sin B*. 2019;9(6):1099-112. doi:10.1016/j.apsb.2019.06.004.

30.Basirinia G, Ali M, Comelli A, Sperandeo A, Piana S, Alongi P, et al. Theranostic approaches for gastric cancer: an overview of in vitro and in vivo investigations. *Cancers (Basel)*. 2024;16(19):3323. doi:10.3390/cancers16193323.

31.Kesharwani P, Chadar R, Sheikh A, Rizg WY, Safhi AY. CD44-targeted nanocarrier for cancer therapy. *Front Pharmacol*. 2022;12:800481. doi:10.3389/fphar.2021.800481.