

## اثر ترکیب توپوتکان و نانوذرات اکسید روی بر سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان MCF-7

علیرضا شریفیان<sup>۱</sup> (M.Sc.)، فهیمه باغبانی آرانی<sup>۱\*</sup> (Ph.D.)، حسن صاحب جمعی<sup>۲</sup> (Ph.D.)

۱- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱

fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۳۶۷۲۵۰۱۱

### چکیده

هدف: سرطان پستان فراوان‌ترین نوع بدخیمی در میان زنان می‌باشد. امروزه، استفاده از نانوذرات به عنوان یکی از امیدهای موفق در درمان و تشخیص بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان مطرح است. هدف این مطالعه، بررسی اثرات داروی ضد سرطان توپوتکان و نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) به طور ترکیبی بر روی سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه غلظت‌های مختلف داروی توپوتکان و نانوذرات اکسید روی به صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر بر روی سلول‌های سرطانی MCF7 تیمار گردید. سپس درصد زنده ماندن سلول‌ها به روش MTT مورد سنجش قرار گرفت. پس از استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و ساخت cDNA، میزان بیان ژن P53 به روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج MTT اثر سمی ZnONPs و داروی توپوتکان بر علیه سلول‌های MCF7 وابسته به دوز می‌باشد و میزان بقا سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. هم‌چنین ترکیب غلظت ۴۵ میکروگرم ZnONPs با تمامی غلظت‌های توپوتکان در رده سلولی MCF-7 موجب افزایش اثرات توکسیک دارو گردید. نتایج بیان ژنی اثرات ترکیبی نانوذرات و داروی توپوتکان نشان داد که در رده سلولی تحت تیمار، بیان ژنی P53 به میزان ۱/۳ برابر افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان به صورت ترکیبی اثرات ضد سرطانی سینرژیک را بر روی رده سلولی سرطان پستان نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، توپوتکان، نانوذرات اکسید روی، P53

### مقدمه

و ژن P53 در این راستا نقش اصلی دارد [۲-۵]. هم‌چنین مشخص شده است که P53 می‌تواند در رگ‌زایی و بیان سرکوب‌کننده‌های دیگر تومور و متاستاز نقش داشته باشد. از آنجایی که اکثر جهش‌ها در ژن P53 منجر به تغییر در پایداری پروتئین می‌شود، افزایش بیان ژن P53 می‌تواند جان‌سپین برای اختلالات عملکردی این ژن باشد [۶،۷]. امروزه فناوری نانو در تولید بسیاری از داروهای پیشگام بوده است و سنتز نانوذرات کاربردهای فراوانی در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان دارد. نانوذرات اکسید فلزات چندی است که به‌عنوان یکی از کاندیداهای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸]. از خواص ویژه نانوذرات اکسید روی می‌توان به پایداری شیمیایی بالا، ثابت دی‌الکتریک پایین، فعالیت

سرطان پستان حدود ۲۵ درصد از کل موارد سرطان در زنان را تشکیل می‌دهد و سالیانه تعداد قابل توجهی بر اثر این بیماری از دنیا می‌روند. تشخیص و درمان به موقع سرطان پستان یکی از مهم‌ترین چالش‌های محققین علوم پایه و پزشکی به شمار می‌رود [۱]. به طور کلی سرطان پستان همانند دیگر سرطان‌ها به علت جهش‌های ژنتیکی ایجاد می‌شود. که در این میان، تعدادی از ژن‌های سرکوب‌کننده تومور دچار جهش می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ژن P53 است. جهش‌های این ژن با افزایش آنژیوژنز، تسریع در رشد تومور، اختلال در روند آپوپتوز و مقاومت درمانی همراه است. اکثر داروهای طریق تحریک آپوپتوز باعث حذف سلول‌های سرطانی می‌شوند

جهت تهیه استوک در محیط کشت استریل حل شد تا غلظت آن به ۰/۵ mg/ml برسد. سپس در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. همچنین، نانوذرات اکسید روی به صورت پودر از شرکت US RESEARCH NANOMATERIAL, INC با اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر تهیه گردید.

بررسی میزان سمیت نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان و ترکیب آن‌ها بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که به منظور ارزیابی میزان تاثیر سلول‌کشی یک دارو بر روی سلول‌ها، انجام می‌گیرد. به منظور انجام این تست، در ابتدا سلول‌ها در پلیت ۹۶ تایی در حجم ۱۰۰ لاندا (۱۰ هزار سلول در هر چاهک) کاشته و جهت رشد و تکثیر، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه شدند. بعد از رشد سلول‌ها، به همین منظور ابتدا غلظت‌های مختلفی از نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان تهیه شد. پس از تاثیر نانوذرات و داروی توپوتکان بر روی سلول‌ها، در مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه، زنده ماندن سلول‌ها توسط رنگ MTT (Sigma Aldrich, آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت این مدت، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml تهیه و با محیط رویی چاهک‌ها تعویض شد. پلیت سلولی به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO به چاهک‌ها اضافه شد که این امر موجب تبدیل کریستال‌های فورامازان به رنگ بنفش می‌شود. نهایتاً، میزان رنگ آزاد شده توسط سلول‌های زنده و جذب نوری پلیت، توسط دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر ارزیابی شد و میزان کشتندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

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

در همه تست‌ها کنترل مثبت و منفی لحاظ شده و تست‌ها با سه بار تکرار انجام شد. همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشتندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد [۱۴]. لازم به ذکر است که در نهایت اثر ترکیبی غلظت‌های مختلف دارو و کم‌ترین دوز موثر نانوذره بر روی سمیت سلولی نیز با روش MTT بررسی گردید.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از کشت سلول‌ها در پلیت ۶ خانه‌ای (۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه) به مدت یک شبانه روز، داروی توپوتکان، نانوذرات اکسید روی و ترکیب آن‌ها تیمار شد و جهت بررسی تاثیر نمونه‌ها، انکوباسیون مجدد در مدت زمان ۲۴ ساعت

کاتالیزوری بالا، جذب نور فرو سرخ و فرابنفش و از همه مهم‌تر خاصیت ضد باکتری آن اشاره نمود. چنانچه اثر درمانی و ضد توموری این ترکیبات مورد تایید قرار گیرد، این مساله می‌تواند قدم به سزایی در پیشبرد روش‌های درمانی در سرطان با شد. همچنین یکی از رویکردهای جدید در درمان سرطان استفاده از ترکیب دارویی و نانوذرات فلزی می‌تواند باشد. در این میان، توپوتکان یک داروی ضد سرطان است که مشتقی از Compothecin بوده و برای درمان سرطان‌های نخمدان، گردن رحم پیشرفته، سرطان سلول‌های کوچک ریه، مورد استفاده و از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) مورد تأیید قرار گرفته است [۹]. توپوتکان پس از عبور از پمپ‌های گلیکوپروتئین P (P-GP) و تأثیر بر آنزیم توپوایزومراز I موجب تجمع شکست‌های تک رشته‌ای DNA در طی فاز S چرخه‌ی سلولی می‌شود [۱۰،۱۱]. مکانیزم اثر این دارو به صورتی است که با اتصال به کمپلکس توپوایزومراز DNA-I، مانع اتصال دوباره شکست‌های تک زنجیره‌ای می‌شود [۹]. بنابراین، سمیت سلولی این دارو نیز به واسطه آسیب‌های دو رشته‌ای DNA حین سنتز DNA صورت می‌گیرد [۱۲،۱۳]. با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر توپوتکان و نانوذره روی نپرداخته است پژوهش حاضر به دنبال پاسخ علمی به این سوال که ترکیب داروی توپوتکان و نانوذرات روی (Zn oxide nanoparticles) به طور ترکیبی چه اثراتی بر روی سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌گذارد، هدف‌گذاری شده است.

#### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده و دارای کد اخلاق (IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.023) از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین می‌باشد.

#### کشت رده‌های سلولی

به منظور کشت سلولی، رده سلولی پستان MCF-7 از انستیتوی پاستور ایران تهیه شد و در محیط DMEM high glucose غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco, Scotland) در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تهیه و آماده‌سازی داروی توپوتکان و نانوذرات اکسید روی

در این مطالعه تجربی، داروی توپوتکان (هایکامتین) به صورت پودر از شرکت آمریکایی سیگما آلدردیج خریداری و

۲۰۰ نانومولار)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبر گرین Real Time PCR و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط گردید و طبق برنامه زمانی- گرمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای مرحله اول، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله پایانی برای رسم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت آنالیز نتایج Real Time PCR با استفاده از روش  $\Delta\Delta Ct$  طبق فرمول‌های زیر صورت گرفت:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

در این فرمول  $\Delta Ct$  اختلاف بین سیکل‌های آستانه  $\Delta Ct$  هدف و کنترل داخلی در نمونه مورد آزمون و  $\Delta Ct$  نیز اختلاف میان سیکل‌های آستانه  $\Delta Ct$  هدف و کنترل داخلی در نمونه کنترل می‌باشد [۱۵].

#### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی نتایج به دست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه تکرار استوار می‌باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه P با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. هم‌چنین، مقدار  $P < 0.05$  در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

نتایج اثر غلظت‌های متفاوت توپوتکان و نانوذره اکسید

### روی بر سمیت سلولی رده MCF-7

تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از داروی توپوتکان با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت میزان درصد بقای سلول‌های تحت تیمار با دارو در شکل ۱ (A) نشان داده شده است. در مجموع نتایج MTT نشان داد که تمامی غلظت‌های داروی توپوتکان اثر کشندگی روی سلول‌ها دارد به طوری که در بالاترین غلظت یعنی ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان بقای سلول MCF-7، ۷۰ درصد کاهش می‌یابد ( $P < 0.001$ ).

هم‌چنین سلول‌های سرطانی MCF-7 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف (۴/۵، ۴۵، ۴۵۰ و ۴۵۰۰ میکروگرم در

صورت گرفت. سپس کل RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل آن استخراج شده و خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH، آلمان) سنجیده شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل (cDNA) بر طبق دستورالعمل کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase, USA) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۲۰ میکرولیتر که شامل یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو dT، پنج میکرولیتر بافر x5، دو میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آنزیم رونویس‌تبردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بوده و واکنش با برنامه دمایی ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در انتها با انجام واکنش PCR و مشاهده تک باند، ساخت و کیفیت cDNA و پرایمر تایید شد. cDNA ساخته شده به عنوان الگو جهت انجام تست Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

### Real Time PCR

در این مطالعه پرایمرهای مورد استفاده برای ژن هدف P53 و ژن مرجع GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase) با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردید و در مرحله بعدی با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنالیز BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) صحت پرایمرها تایید شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای دو ژن هدف P53 و مرجع GAPDH نشان داده شده است.

جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن هدف و مرجع

اندازه محصول	پرایمرها	نام ژن
۱۹۴bp	forward: 5'-CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT-3' reverse: 5'-CAACCTCAGCGGCTCATAG-3'	P53
۷۴bp	forward: 5'-CCCACTCTCCACCTTTGAC-3' reverse: 5'-TACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'	GAPDH

تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت. هم‌چنین برای انجام تست Real Time PCR از کیت سایبر گرین شرکت تاکارا (PrimeScript™ RT Reagent Kit) و کپ استریپ شرکت ABI تولید کشور آمریکا استفاده شد. مواد لازم جهت انجام واکنش ریل تایم شامل ۱ میکرولیتر cDNA (۵۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر پرایمرهای جلوبر و برگ‌گشتی

نانوذرات اکسید روی و تمامی غلظت‌های توپوتکان در رده سلولی MCF-7 موجب تفاوت معنادار در بقای سلول می‌گردد ( $P < 0.001$ ).

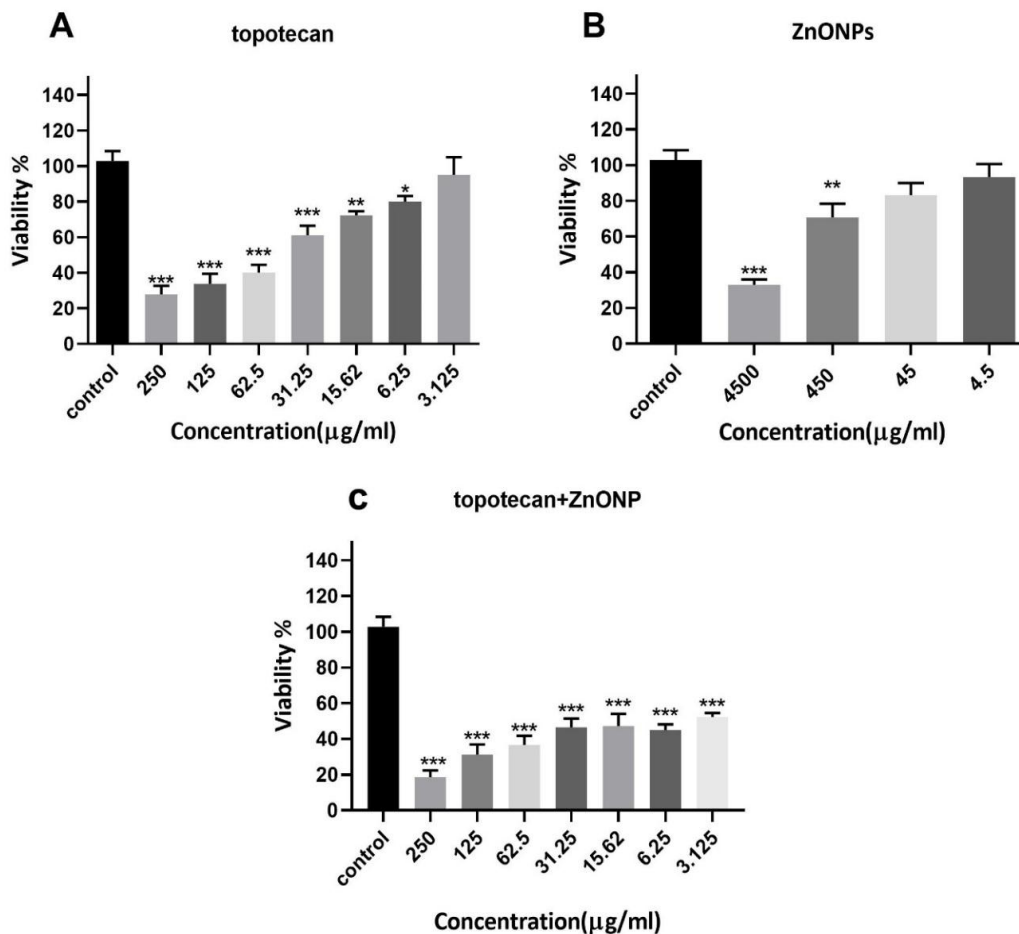
نتایج بررسی بیان ژن P53 با روش Real Time PCR بررسی بیان ژن P53 در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 پس از تیمار با داروی توپوتکان (دوز  $IC_{50} = 704.6 \mu M$ )، نانوذره اکسید روی و ترکیب آن‌ها با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام گرفت.

۴۸ نتایج نشان‌دهنده کاهش ۰/۷ برابری بیان ژن P53 در سلول‌های تحت تیمار با توپوتکان بودند ( $P < 0.001$ ). در حالی که، افزایش ۱/۵ برابری ( $P < 0.05$ ). بیان ژن P53 در سلول‌های تحت تیمار با ۴۵۰ میکروگرم نانوذرات اکسید روی مشاهده گردید (شکل ۲). زمانی که سلول‌های سرطانی با ترکیب دارو و نانوذره تیمار شدند بیان ژن P53 افزایش ۱/۳ برابری را نشان داد که از نظر آماری معنادار بود ( $P < 0.05$ ).

میلی‌لیتر) نانوذرات اکسید روی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. طبق شکل ۱ (B) مشاهده شد که غلظت‌های ۴/۵ و ۴۵ میکروگرم از نانوذرات اکسید روی تأثیری بر بقای سلول‌ها نداشت ( $P > 0.05$ ). در حالی که غلظت ۴۵۰ میکروگرم باعث مرگ ۳۰ درصدی سلول‌ها شده ( $P < 0.001$ ) و غلظت ۴۵۰۰ میکروگرم نیز باعث مرگ تقریباً ۷۰ درصدی سلول‌های MCF-7 می‌گردد ( $P < 0.001$ ).

نتایج اثرات سمیت غلظت‌های متفاوت توپوتکان در ترکیب با نانوذرات اکسید روی

در این مطالعه علاوه بر بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و توپوتکان به صورت تکی بر رده‌های سلولی MCF-7 اثرات ترکیبی این دو نیز بررسی شد. به همین منظور تک غلظت ۴۵۰ میکروگرم نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های مختلف از توپوتکان (۱۲۵، ۶۲/۵۰، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵) و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با هم ترکیب شد و به مدت ۲۴ ساعت رده سلولی MCF-7 تحت تیمار قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱(C) نشان داده شده ترکیبی از غلظت ۴۵۰ میکروگرم

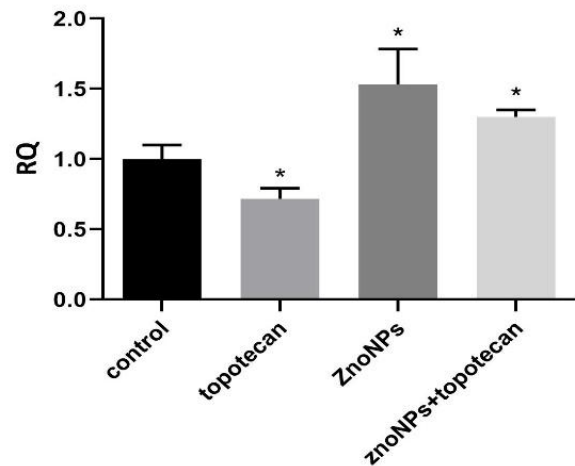


شکل ۱. بررسی اثرات داروی توپوتکان (A)، نانوذرات اکسید روی (B) و ترکیب غلظت ۴۵۰ میکروگرم نانوذره و غلظت‌های مختلف توپوتکان بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه کنترل و به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است. ( $P < 0.05$ )\*، ( $P < 0.01$ )\*\*، ( $P < 0.001$ \*\*\*). (n=3)

می‌تواند به میزان بهتری اثر سمیت آن‌ها را بر روی سلول‌های سرطانی افزایش دهد هر چند این تأثیر چشمگیر نبود. که می‌تواند به دلیل تداخل مکانیسم‌های اثر آن‌ها باشد. در حالی که انتظار می‌رفت با ترکیب کردن این دو ماده با هم اثرات شدیدتر و در دوزهای پایین‌تر دیده شود. برای یافتن علت این موضوع نیاز به دانستن مکانیسم‌های دقیق اثر این دو ترکیب دارویی می‌باشد.

یکی از راه‌های تأثیر داروها، تغییر و تنظیم بیان ژن‌های کلیدی است که می‌توانند آب‌شاری از فرآیندهای مولکولی ایجاد کنند. بنابراین می‌توان با ارزیابی میزان تغییر بیان این ژن‌ها به مکانیسم عمل داروها پی برد. یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر محافظت سلول‌ها از سرطانی شدن ژن p53 است. لذا برای بررسی این‌که آیا مکانیسم اثر توپوتکان با مکانیسم‌های مولکولی p53 ارتباط دارد یا خیر، میزان بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با توپوتکان و سلول‌های تیمار نشده اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج بیان ژن p53 در سلول‌های MCF-7 تحت تیمار نسبت به سلول‌های تیمار نشده کاهش بیان ۰/۷ برابری را نشان داد. بیان کاهش یافته ژن p53 در سلول‌های تیمار شده بیانگر این است که مکانیسم عمل داروی توپوتکان بر مرگ سلول‌های سرطانی از طریق القای بیان ژن P53 نمی‌باشد. همچنین، با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیقات، میزان بیان ژن P53 در سلول‌های توموری تیمار شده با نانوذرات اکسید روی با افزایش بیان ۱/۵ برابر رو به رو شد. این در صورتی است که کاهش در میزان بیان ژن P53 در سلول‌های توموری تیمار شده با توپوتکان آزاد رخ داد که این کاهش بیان را می‌توان به دنبال مسیر آپوپتوزی غیر وابسته به P53 قلمداد کرد. در حالی که به نظر می‌رسد نانوذره مورد نظر با تحریک ژن P53 از طریق آپاپتوز مرگ سلولی را پیش می‌برد. همچنین، میزان بیان این ژن در سلول‌های توموری تیمار شده توسط ترکیب نانوذرات و توپوتکان بررسی شد. اگر چه نتایج بیانگر افزایش معناداری بیان ژن P53 (به میزان ۱/۳ برابر) داشت؛ اما میزان تحریک ژن نسبت به نانوذره به تنهایی کم‌تر ولی نسبت به دارو بیشتر می‌باشد. این مشاهده بیانگر آن است که نانوذره اکسید روی می‌تواند در ترکیب با داروی توپوتکان نوع مرگ سلولی ایجاد شده با توپوتکان را به سمت مسیری‌های با دخالت P53 مانند آپاپتوز تغییر جهت دهد. برای تایید این ادعا و در تکمیل مطالعه حاضر لازم است تست‌های بررسی آپاپتوز نیز انجام شود.

در این مطالعه برای اولین بار به بررسی سمیت داروی توپوتکان و نانوذره اکسید روی رده سلولی سرطانی پستان پرداخته شد و مشخص شد که اثر سمی ZnONPs و داروی



شکل ۲. تغییر بیان ژن P53 در رده‌های سلولی MCF-7 تحت تیمار با داروی توپوتکان، نانوذره اکسید روی و ترکیب دارو و نانوذره (\* $P < 0.05$ )

### بحث و نتیجه‌گیری

برای بررسی اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی بر رده‌های سلولی MCF-7، این رده سلولی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف این نانوذرات قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده خاصیت سمیت وابسته به دوز نانو ذرات اکسید روی بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) است. در سال ۲۰۱۵ D. Selvakumari و همکارانش روی اثر ضد توموری نانو ذرات اکسید روی مطالعه‌ای انجام دادند. در بخشی از این بررسی روی رده سلولی MCF-7 به‌عنوان یک مدل سلولی سرطان پستان مطالعه‌ای انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد به‌کارگیری ۱۳/۲ میکروگرم از این نانوذره باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های توموری شده است [۱۶]. در مطالعه‌ی دیگری توسط Wahab R و همکاران، روی اثرات ZnO-NPها بر روی رده‌های سلولی MCF-7 به‌عنوان رده سلولی سرطان پستان و رده سلولی HepG2 به‌عنوان رده سلولی کار سینوم کبد انجام شد. نتایج نشان داد غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نانو ذرات باعث القای مرگ سلولی می‌شود و در صد سلول‌های زنده تا کم‌تر از ۱۰ درصد کاهش می‌یابد [۱۷]. بنابراین نتایج پژوهش حاضر و مطالعات دیگر تأییدکننده اثرات سمی و کشنده نانو ذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطانی به‌ویژه سرطان پستان می‌باشند. هر چند اختلافاتی در میزان دوز کشنده در این مطالعات وجود دارد که با توجه به متفاوت بودن اندازه نانوذرات قابل توجیه است. علاوه بر بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان به صورت جدا، مطالعه ترکیبی این نانوذرات و دارو بر رده سلولی MCF-7 نیز بررسی شد. با مقایسه نتایج حاصل از تیمار رده‌های سلولی سرطانی به‌وسیله ترکیب دو ماده نسبت به حالت تیمار با یکی از دو ماده به‌صورت جداگانه می‌توان نتیجه گرفت ترکیب این دو ماده نسبت به حالت تیمار جداگانه

- [7] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, Connell T, Saito S, Moul JW et al. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem* 2000; 275: 6051-6054.
- [8] Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol* 2015; 34: 1318-1321.
- [9] Souza LG, Silva EJ, Martins AL, Mota MF, Braga RC, Lima EM, et al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 79: 189-196.
- [10] Shen B, Zhao K, Ma S, Yuan D, Bai Y. Topotecan-loaded mesoporous silica nanoparticles for reversing multi-drug resistance by synergetic chemoradiotherapy. *Chem Asian J* 2015; 10: 344-348.
- [11] Nguyen D, Zajac-Kaye M, Rubinstein L, Voeller D, Tomaszewski JE, Kummer S, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition enhances p53-dependent and independent DNA damage responses induced by DNA damaging agent. *Cell Cycle* 2011; 10: 4074-4082.
- [12] Patankar NA, Waterhouse D, Strutt D, Anantha M, Bally MB. topophore C: a liposomal nanoparticle formulation of topotecan for treatment of ovarian cancer. *Invest New Drugs* 2013; 31: 46-58.
- [13] Mira K, Kwangsu O, Keunchang Ch, Sang-Woo J, So YL. Live-cell monitoring of the glutathione-triggered release of the anticancer drug topotecan on gold nanoparticles in serum-containing media. *Chem Commun* 2012; 48: 4205-4207.
- [14] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014; 5: 927-946.
- [15] Shandiz SA, Farasati S, Saeedi B, Baghbani-Arani F, Akbari Asl E, Keshavarz-Pakseresht B, et al. Up regulation of KAI1 gene expression and apoptosis effect of imatinib mesylate in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; 6: 120-125.
- [16] Santini D, Stumbo L, Spoto C, D'Onofrio L, Pantano F, Iuliani M, et al. Bisphosphonates as anticancer agents in early breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 121.
- [17] Wahab R, Dwivedi S, Umar A, Singh S, Hwang IH, Shin HS, et al. ZnO nanoparticles induce oxidative stress in Cloudman S91 melanoma cancer cells. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9: 441-449.

توپوتکان بر علیه سلول‌های MCF7 وابسته به دوز می‌باشد و میزان بقای سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. همچنین نتایج بیان ژن پیشنهاد می‌کند که نانوذره اکسید روی می‌تواند در ترکیب با داروی توپوتکان نوع مرگ سلولی ایجاد شده با توپوتکان را به سمت مسیرهای با دخالت P53 مانند آپاتوز تغییر جهت دهد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از کمک‌های کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک به خصوص جناب آقای دکتر عسگری و خانم بیگدلی سپاس‌گذاری می‌نمایند.

### منابع

- [1] DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 52-62.
- [2] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- [3] Menendez JA, Lupu R. RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells. *Int J Mol Med* 2005; 15: 33-40.
- [4] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
- [5] Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA. The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345: 277-280.
- [6] Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeier PJ, et al. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11307-11311.



## Effect of topotecan and zinc oxide nanoparticles combination on cytotoxicity and P53 gene expression against breast cancer (MCF-7) cell line

Alireza sharifian (M.Sc)<sup>1</sup>, Fahimeh Baghbani-Arani (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Hasan Sahebjam (Ph.D)<sup>2</sup>

1 - Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

2 - Department of Biophysics, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

\* Corresponding author. +98 2136725011 fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Received: 31 Mar 2019; Accepted: 2 Jul 2019

**Introduction:** Breast cancer is one of the most common malignancies in women worldwide. Today, nanoparticles are one of the hopes of treatment and diagnosis of many diseases, including cancer. The present study aimed to explore the effect of topotecan and zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) combination on cytotoxicity and P53 gene expression in MCF7 breast cancer cells.

**Materials and Methods:** Cancerous MCF7 cell line were treated with different concentrations of ZnONPs and topotecan as an anti-cancer drug, separately, as well as combined formulation. Then, the cell viability was evaluated using MTT assay. The expression level of P53 gene was evaluated in treated cells via real time PCR after RNA extraction and cDNA synthesis.

**Results:** According to MTT results, the ZnONPs and topotecan significantly decreased the viability of MCF7 cells in a dose-dependent manner. Also, the combined effect of ZnONPS and topotecan on the MCF7 cell line at concentrations of 45 mol/ml of zinc and different concentrations of topotecan had an additional toxic effect. Our data revealed that mRNA level of P53 was up regulated (1.3-fold) in cells treated with topotecan combined with ZnONPs.

**Conclusion:** Our results demonstrated that combination of the topotecan and ZnONPs could have a powerful synergistic cytotoxic effect on breast cancer cell line.

**Keywords:** Breast Cancer, Zinc Oxide Nanoparticles, P53 gene, Topotecan.