

اثرات نانوکامپوزیت گرافن اکسید کوت شده با ۸-هیدروکسی کینولین بر روی مرگ سلولی و آپوپتوز در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7) و سرطان کولون (SW742)

فیروزه خیل تاش^۱، کاظم پریور^۱، نسیم حیاتی رودباری^۱، علیرضا بدیعی^۲، بهنام صادقی^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. Kazem_parivar@yahoo.com

۲- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- گروه ایمنی درمانی سرطان و پزشکی بازساختی، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان در زنان و سرطان کولورکتال در هر دو جنس جزو شایع ترین و کشنده ترین سرطان ها در سراسر جهان می باشند. با توجه به مقاوم بودن برخی از سرطان ها به درمان های رایج، در این تحقیق اثرات سمیت و القای آپوپتوز نانوکامپوزیت گرافن اکساید کوت شده با ۸-هیدروکسی کینولین بر روی سلول های رده سرطان پستان و کولون سنجیده شد. روش کار: در این مطالعه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)، سرطان کولون (SW-742) و رده سلول نرمال پستان (MCF-10) را با دوزهای مختلف نانوصفحات گرافن اکساید کوت شده با ۸-هیدروکسی کینولین به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار و سمیت این نانوکامپوزیت را با روش MTT و تاثیر ماده فوق الذکر در آپوپتوز سلولی هم از طریق بررسی بیان ژن های پیش برنده و مهار کننده آپوپتوز از جمله P53, P21, Bax و Bcl-2 نیز از طریق تست فلوسایتومتری آپوپتوز سلولی (Annexin-V/PI) صورت گرفته شد. یافته ها: نتایج نشان دادند که نانوکامپوزیت سبب افزایش معنادار مرگ سلولی در رده های سلولی سرطان کولون و پستان به خصوص رده MCF-7 در مقایسه با رده سلول نرمال پستان گردیده است. نتایج بیان ژن نیز حاکی از افزایش بیان ژن های پیش آپوپتوزی P53, p21 و Bax و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 در رده های سلول سرطانی به خصوص رده MCF-7 به نسبت رده سلول نرمال پستان است. نتایج فلوسایتومتری تست Annexin-V/PI نیز در همین راستا القای آپوپتوز در رده های سرطانی بالاخص MCF-7 به نسبت نمونه کنترل را پس از تیمار با نانوکامپوزیت نشان داد. نتیجه گیری: یکی از مکانیسم های القای مرگ سلولی استفاده از نانوکامپوزیت با القای آپوپتوز در آن ها می باشد.

واژه های کلیدی: گرافن اکسید، ۸-هیدروکسی کینولین، سرطان پستان، سرطان کولون، آپوپتوز.

مقدمه

وقوع بالا و هم چنین با میزان مرگ و میر بالا هست که نشان دهنده اهمیت این دو سرطان بوده و بایستی مورد توجه بیشتری در تحقیقات قرار گیرند (۸). روش های درمانی متفاوتی بر اساس نوع سرطان و میزان پیشرفت آن وجود دارد که از آن ها می توان به جراحی و خارج کردن تومور، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و ایمونوتراپی اشاره نمود (۶۳، ۵۸). یکی از مکانیسم های درمان های هدفمند القای آپوپتوز در سلول های سرطانی

سرطان بیماری چند مرحله ای و سیستمیک، یکی از علل عمده مرگ در سراسر جهان است. در گزارش ارایه شده در سال ۲۰۱۸ تعداد ۱۸/۱ میلیون نفر بیمار مبتلا به سرطان و حدود ۹/۶ میلیون مرگ حاصل از سرطان در سال ۲۰۱۸ تخمین زده شده است که حدود ۱۶/۶ درصد از علل مرگ را تشکیل می دهد (۸). سرطان پستان در زنان با سهم بالایی از وقوع و مرگ و میر همراه هست و سرطان کولورکتال در هر دو جنس جزو سرطان های با

پزشکی به عنوان حامل های دارویی روز به روز افزایش یابد (۷۱). در نانو فناوری، ترکیبات کربنی دسته مهم و مشخصی را به خود اختصاص می دهند که با عنوان نانو ساختارهای کربن خوانده می شوند. نانو ساختارهای کربنی خصوصیات فیزیکی- شیمیایی منحصر به فردی دارند و نقش گسترده ای را در زمینه فناوری های نوین به خود اختصاص داده اند (۵۴). گرافن یک ماده مهیج با حالت آزاد کریستال دو بعدی به ضخامت یک اتم است. این ماده شفاف به یکی از داغ ترین موضوعات در زمینه هایی از علم مواد، فیزیک، شیمی و نانو تکنولوژی تبدیل شده است. این آلوتروپ کربن، شامل لایه های حلقه ای شش اتمی، در یک شبکه لانه زنبوری هستند (۲۵). گرافن سخت ترین و نازک ترین ماده ای است که بشر تاکنون به آن دست آورده است. اکسید گرافن از اکسیداسیون کامل و لایه برداری از گرافیت به دست آمده که شامل طیف وسیعی از گروه های عاملی اکسیژن حاوی گروه های اپوکسی، هیدروکسیل و کربونیل و کربوکسیل در سطح آن می باشد. این گروه های عاملی در سطح اکسید گرافن قطبی هستند و آن را آبدوست می کنند و حلالیت آن را افزایش می دهند. هم چنین سبب افزایش میل اتصال به سایر مواد و داروها می- گردد (۷۷، ۷۶، ۵۳، ۱۸). کینولین یک ترکیب نیتروژنی آروماتیک است که به تنهایی کاربرد زیادی ندارد، بلکه دارای مشتقات بسیار زیاد و متنوعی بوده که کاربردهای گسترده ای دارند (۶۷، ۲۴، ۱۱). یکی از این مشتقات، ۸-هیدروکسی کینولین می باشد که دارای توانایی تشکیل کمپلکس با یون های فلزی دو ظرفیتی بوده و همین اثر آن قادر به مداخله در مسیرهای سلولی سلول های سرطانی شده و خصوصیات ضد سرطانی به آن می بخشد (۱). از ۸-هیدروکسی کینولون و مشتقات آن در خواص دارویی مانند ضد سرطان، آنتی اکسیدان، ضد میکروبی، ضد التهاب و فعالیت های عصبی استفاده شده

می باشد. آپوپتوز یکی از مکانیسم های اصلی مقابله با سرطانی شدن سلول ها به شمار رفته و در نقطه مقابل ویژگی اصلی سلول های سرطانی، یعنی تکثیر بی رویه قرار می گیرد. سلول های سرطانی برای رشد و پیشرفت هر چه بیشتر خود، با استفاده از مکانیسم های مختلفی از جمله افزایش پروتئین های ضد آپوپتوزی و کاهش پروتئین های پیش آپوپتوزی این فرآیند را مهار می کنند و باعث می شوند که بقای زیادی پیدا نموده که خود موجب تکثیر و پیشرفت سرطان می گردد. به همین دلیل آپوپتوز در تحقیقات ضد سرطان توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۶۸، ۱۳). خانواده پروتئینی Bcl-2 نقش مهمی در آپوپتوز وابسته به میتوکندری ایفا می کنند (۳۱). اعضای این خانواده به دو گروه اصلی مهار کننده آپوپتوز و پیش برنده آپوپتوز تقسیم می شوند. اعضای گروه فعال کننده آپوپتوز، به خصوص Bax نقش مهمی را در شروع آپوپتوز دارند (۱۹). از طرفی پروتئین P53 یک پروتئین مهم در القای آپوپتوز در سلول های آسیب دیده و یا سرطانی می باشد که با القای آپوپتوز موجب از بین رفتن سلول های دارای جهش و یا سرطانی شده شود. پروتئین P53 فعال شده با اتصال به DNA بیان برخی ژن ها از جمله ژن مربوط به پروتئین P21 را القا می نماید (۲۶). پروتئین P21 بیان شده با اتصال به کمپلکس های چرخه سلولی سبب مهار پیش روی چرخه سلولی و تکثیر سلولی می گردد که از این رو P21 را به عنوان سیگنال توقف در تقسیم سلولی می نامند. در مقابل، اعضای ضد آپوپتوز مانع از شروع فرآیند آپوپتوز می شوند. در موارد افزایش آپوپتوز، انتظار می رود که میزان بیان ژن های P53، P21، و Bax افزایش یافته و بیان ژن Bcl-2 کاهش می یابد (۲۹، ۱۰). ویژگی خاص نانو ذرات که نسبت بالای سطح به حجم آن ها می باشد (حجم کمی دارند اما سطح زیادی را پوشش میدهند)، سبب شده است تا استفاده از آن ها در علوم

این مطالعه به صورت ۸-هیدروکسی کینولین فعال شده و متصل به سیلیکای مزوپوروس SBA-15 طبق پروتکل ارائه شده در مقاله بدیعی و همکاران سنتز و مورد استفاده قرار گرفت (۴). برای اتصال گرافن اکساید به ۸-هیدروکسی کینولین متصل به سیلیکا، ۲۰ میلی گرم اکسید گرافن را در ۵ میلی لیتر حلال دی متیل فرم آمید (DMF) (Merck, Germany) حل گردید و به آن ۵۰ میلی گرم ۴-دی متیل آمینو پیریدین (DMAP) (Merck, Germany) و ۵۰ میلی گرم DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide) (Merck, Germany) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط مخلوط گردید. سپس ۳۰ میلی گرم از ماده ۸-هیدروکسی کینولین متصل به سیلیکای SBA در ۳ میلی لیتر حلال DMF (Merck, Germany) و در حضور ۱ میلی لیتر HCl ۱۰٪ (Merck, Germany) حل و به مخلوط واکنش اضافه و به مدت یک شبانه روز در دمای محیط مخلوط گردید. ماده جامد حاصل با سانتریفیوژ جدا و دو بار با DMF و یک بار با متانول (Merck, Germany) شستشو داده شد، در نهایت رسوب حاصل در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل و به مدت ۳ دقیقه التراسونیک (Elma Ultrasonic, Germany) گردید.

تیمار رده های سلولی سرطان پستان و کولورکتال و سلول نرمال اپیتلیال پستان با نانوکامپوزیت
تعداد ۱۰^۴ از هر کدام از سلول های MCF-7 (رده سلولی سرطان پستان) (ATCC, USA)، SW742 (رده سلولی سرطان کولورکتال) (ATCC, USA) و رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان (MCF-10A) (ATCC, USA) در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco, USA) در ۳ پلیت ۹۶ خانه (SPL, Korea) به صورت مجزا از هر کدام سه چاهک به صورت triplicate کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول ها به پلیت، نانوکامپوزیت در غلظت های

است. خصوصیات ضد سرطانی آن شامل جلوگیری از تکثیر و رگ زایی یا آزیوتوز توسط سلول های سرطانی می شود و موجب القای آپوتوز در آن ها می گردد (۷۹)، (۱). خواص ضد سرطانی ترکیبات مشتق از کینولین هم-چون ۸-هیدروکسی کینولین و از طرفی استفاده روز افزون از نانوکامپوزیت های گرافن اکساید به عنوان حامل های دارویی و خواص ضد سرطانی خود این ماده (۷، ۱۴) دلیل استفاده از آن را در این مطالعه صورت گرفت تا خواص هم افزایی ضد سرطان نانو صفحات گرافن اکساید با ۸-هیدروکسی کینولین، سمیت و توانایی القای آپوتوز این ترکیب را بر روی سلول های رده سرطان پستان و کولون و مقایسه آن ها با تاثیر این دارو بر سلول های نرمال پستان سنجیده شود.

مواد و روش ها

سنتز نانوکامپوزیت

اکسید گرافن از اکسید کردن پودر گرافیت در یک محیط اکسنده مطابق با روش بهبود یافته هامر تهیه گردید (۳۴). به طور خلاصه، پودر گرافیت (Sigma Aldrich, USA) و نیترات سدیم (Sigma Aldrich, USA) به اسید سولفوریک (Merck, Germany) سرد و غلیظ افزوده شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۵۰ rpm مخلوط گردید پس از رسیدن دما به صفر درجه سانتی گراد به کمک حمام یخ، پرمنگنات پتاسیم (Sigma Aldrich, USA) به تدریج در طی ۳۰ دقیقه اضافه شد تا از افزایش دما در اثر انجام واکنش جلوگیری شود. سپس ۳۰ میلی لیتر آب دیونیزه به آرامی به سوسپانسیون اضافه و هیدروژن پراکسید (Merck, Germany) به صورت قطره قطره افزوده شد. سوسپانسیون حاصله برای چندین بار با HCl (Merck, Germany) و اتانول (کیمیا دارو، ایران) شستشو و با دور ۴۱۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محصول تحت خلای خشک شد. ماده ۸ هیدروکسی کینولین مورد استفاده در

تریپسینه (Invitrogen, USA) شدن و شستشو با PBS، سلول ها به میکروتیوب RNase-free منتقل و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی آن ها دور ریخته شد. استخراج Total RNA با استفاده از کیت (RNeasy mini kit Qiagen, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت و میزان خلوص نمونه های RNA توسط اندازه گیری جذب نوری نمونه های RNA در طول موج های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر به کمک پیکودراپ (Spectrometer pico-drop, UK) تعیین شد. به منظور کسب اطمینان از عدم تخریب RNA در طی فرآیند استخراج و هم چنین بررسی میزان خلوص آن، ۲ میکرولیتر از RNA روی ژل آگارز ۱ الکتروفورز گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت (RevertAid first strand cDNA synthesis, Fermentas, Thermo fisher scientific, USA) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. به طور خلاصه، ۹ μ l از RNA استخراج شده به همراه ۱ μ l پرایمر random hexamer، ۴ μ l بافر غلیظ مخصوص واکنش، ۱ μ l مهار کننده آنزیم RNase، ۲ μ l مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۱ μ l آنزیم نسخه بردار معکوس با آب دوبار تقطیر به حجم کلی ۲۰ μ l رسیدند. میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه Thermal cycler (PeQlab, Germany) قرار داده شدند. cDNA حاصل در آب عاری از نوکلئاز حل شده و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. برای واکنش qRT-PCR از ژن actin- به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید و پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است (۵۶).

۰/۰۳۱، ۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به سلول ها اضافه و در چاهک های کنترل ماده ای اضافه نگردید. پلیت ها بسته به این که بررسی ۱۲ یا ۲۴ یا ۴۸ ساعته هستند به همان میزان در انکوباتور نگهداری شدند.

تست MTT و Viability

مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (Invitrogen, USA) با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه گردید. پلیت ها به مدت ۴ ساعت دور از نور و در انکوباتور نگه داری شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و مقدار ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Merck, Germany) صد در صد اضافه گردید تا کریستال های غیر محلول فورمازان را به رنگ محلول تبدیل کند. در عرض کمتر از ۲۰ دقیقه جذب رنگ تولید شده را با استفاده از دستگاه خوانش گرا ایزرا (BioTek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و درصد سلول های زنده محاسبه گردید. به منظور انجام تست زنده مانی (viability)، طبق روش توضیح داده شده در قسمت قبل، نانوکامپوزیت در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به سلول ها اضافه و پلیت مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. سلول های تریپسینه شدند و با رنگ تریپان بلو (Sigma, UK) رنگ آمیزی و توسط لام نئوبار (HBG, Germany) در زیر میکروسکوپ نوری (Zeiss, Germany) درصد سلول های مرده و زنده محاسبه گردید.

بررسی آپوپتوز رده های سلولی تیمار شده با نانوکامپوزیت

بررسی تغییرات بیان ژن های Bax، Bcl-2، P53 و P21 همانند روش توضیح داده شده، سلول ها با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردیدند. پس از

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی 5' 3'	دما	سایز محصول (bp)	منبع
BAX (F)	5-ACCAAG CTGAGCGA GTGTC-3	60°C	293	[۱]
BAX (R)	5-ACAAAGATGGTTCACGGTCTGCC-3	60°C	293	[۱]
Bcl-2 (F)	5-ACCAAG CTGAGCGA GTGTC-3	60°C	415	[۱]
Bcl-2 (R)	5-ACAAAGATGGTTCACGGTCTGCC-3	60°C	415	[۱]
P53 (F)	5-GTTTCCGTCTGGGCTTCTTG-3	64°C	473	[۱]
P53 (R)	5-CCTGGGCATCCTTGAGTTCC-3	64°C	473	[۱]
P21 (F)	5-CTCAGAGGAGGCGCCATG-3	60°C	517	[۱]
P21 (R)	5-GGGCGGATTAGGGCTTCC-3	60°C	517	[۱]
-actin (F)	5-AAACGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTT-3	60°C	350	[۱]
-actin (R)	5-AGCAGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3	60°C	350	[۱]

جدا شدن سلول های آپوپتوتیک اولیه از سلول های نکروتیک از پروپیدیوم یدید (BD, USA) استفاده شد. سلول ها با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردیدند. پس از ترپسینه شدن و دوبار شستشو با PBS سرد، سلول ها به میکروتیوب استریل منتقل شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی آن ها دور ریخته شد. آن گاه در بافر بایندینگ حاوی ۵ میکرولیتر Annexin V کونژوگه با رنگ FITC و ۵ میکرولیتر PI (۲۵۰ μg/ml) حل شدند و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، با دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur, BD, USA) خوانش انجام شد.

آنالیز آماری

تمامی تست ها به صورت triplicate انجام پذیرفت. برای آنالیز و نمایش نتایج فلوسایتومتری از نرم افزار Flowjo (Treestar) استفاده و نیز از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۹ و PRISM ۷ برای تجزیه و تحلیل

۲۸ ng از cDNA سنتز شده به مخلوط حاوی ۴ μl از Quantifast SYBR Green master mix (Qiagen, Europe) و ۰/۵ μM از هر کدام از پرایمرهای forward و reverse اضافه و حجم نهایی با آب عاری از نوکلئاز به ۲۰ μl رسید. سپس نمونه ها به صورت triplicate در دستگاه Rotor gene 6000 real-time rotary analyzer (Corbett life science, Australia) قرار داده شدند و پس از ۱۰ دقیقه دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، با ۴۰ سیکل متوالی که هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه بود تکثیر شدند. پس از انجام qRT-PCR و به دست آوردن Ct های ژن های مد نظر و نرمالیزه کردن آن ها از روش Livak برای آنالیز بیان ژن استفاده گردید (۴۶).

بررسی آپوپتوز با رنگ آمیزی Annexin-V/PI

به منظور کمی کردن میزان فراوانی سلول های آپوپتوتیک از Annexin-V کونژوگه به رنگ فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) (BD, USA) استفاده و به منظور

آماري و مقایسه استفاده گردید و $P\text{-value} < 0/05$ به عنوان تفاوت معنی دار تلقی شد. داده ها با استفاده از جداول و نمودار توصیف و نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار نمایش داده شد. برای مقایسه متغیرهای کمی بین سه گروه از آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید.

نتایج

بررسی سمیت سلولی نانوکامپوزیت با روش MTT و Viability

سلول های MCF-7، MCF-10 و SW742 با غلظت-های مختلف نانوکامپوزیت در سه مدت زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار و پس از اضافه کردن رنگ MTT جذب نوری آن ها در ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری و درصد سلول های زنده محاسبه گردیدند. درصد سلول های زنده هر رده سلولی در هر غلظت تیمار شده با دارو به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، در نمودار ارایه گردیده است. نتایج نشان می دهد که درصد زنده بودن تمامی رده های سلولی اعم از نرمال و سرطانی در تمامی غلظت های تیمار شده (۰/۰۳۱، ۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) با نانوکامپوزیت به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت به نسبت کنترل مربوطه که نانوکامپوزیت دریافت نکرده است به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. کاهش میزان زنده بودن سلول ها به طور وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت نانوکامپوزیت میزان مرگ و میر سلول ها نیز افزایش یافته است که سمیت نانوکامپوزیت را بر رده های سلولی به خوبی نشان می-دهد. با این وجود، نتایج نشان می دهد که بیشترین مرگ و میر سلولی در رده سلول سرطان پستان (MCF-7) اتفاق افتاده است و میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان کولون (SW-742) به استثناء موارد تیمار با غلظت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت، در موارد دیگر اختلاف معناداری با میزان مرگ و میر در رده سلول نرمال و غیر سرطانی پستان (MCF-

10) نداشته است. پس از ۱۲ ساعت تیمار رده های سلولی با غلظت های مختلف نانوکامپوزیت، تنها اختلاف معنادار در میزان مرگ و میر در رده سلولی MCF-7 با میزان مرگ و میر رده سلولی SW-742 مشاهده گردید. در تیمار ۲۴ ساعته رده های سلولی با غلظت های مختلف نانوکامپوزیت، میزان مرگ و میر رده سلولی MCF-7 در غلظت ۰/۲۵ mg/mL با میزان مرگ و میر در هر دو رده سلولی MCF-10 و SW-742 و در غلظت ۰/۵ mg/mL از نانوکامپوزیت با میزان مرگ و میر در رده سلولی MCF-10 اختلاف معنادار نشان می دهد. بیشترین اختلافات در میزان مرگ و میر سلولی پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف نانوکامپوزیت مشاهده می-شود. در غلظت ۰/۰۶۲ mg/mL از نانوکامپوزیت، میزان مرگ و میر در رده سلولی MCF-7 به طور معناداری بیشتر از دو رده سلولی دیگر می باشد. در غلظت ۰/۱۲۵ mg/mL از نانوکامپوزیت، هر دو رده سلول سرطانی پستان و کولورکتال کاهش معناداری در تعداد سلول های زنده در مقایسه با رده سلول نرمال پستان نشان می دهند. میزان مرگ و میر در هر سه رده سلولی در غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ mg/mL از نانوکامپوزیت با یکدیگر اختلاف معنادار دارد که MCF-7 دارای بیشترین مرگ و میر می باشد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی با تریپان بلو به عنوان رنگ حیاتی و محاسبه درصد سلول های زنده بعد از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که درصد زنده بودن تمامی رده های سلولی به نسبت نمونه کنترل خود که نانوکامپوزیت دریافت نکرده است به طور چشم گیر و معناداری کاهش پیدا کرده است. هم چنین مقایسه آماری بین میزان زنده بودن سلول ها پس از این تیمار نشان می دهد که بین هر سه رده سلولی مورد آزمایش اختلاف معنادار وجود دارد و رده سلولی

که در هر دو رده سلول سرطانی مورد آزمایش، بیان ژن P53 به صورت معناداری افزایش یافته است که در این بین بیان این ژن در رده سلولی MCF-7 با اختلاف معناداری بیشتر از بیان این ژن در رده سلول سرطان کولون است. در رده سلولی MCF-7، بیان ژن P21 به طور معناداری بالاتر از رده های سلولی MCF-10 و SW-742 می باشد که در این مورد تفاوت معناداری بین سطح بیان ژن P21 بین رده سلول نرمال پستان و رده سلول سرطان کولون مشاهده نشد. در بررسی میزان بیان ژن Bax، مجدداً مشاهده می شود که تنها رده سلولی MCF-7 افزایش بیان معناداری به نسبت MCF-10 دارد و رده سلول SW-742 تفاوت معناداری با رده های سلولی دیگر ندارد. هر دو رده سلول سرطانی پستان و کولون به طور معناداری به نسبت رده سلول نرمال MCF-10 کاهش بیان ژن Bcl-2 را از خود نشان دادند که میزان کاهش بیان این ژن در این دو رده سلولی تقریباً یکسان بوده است.

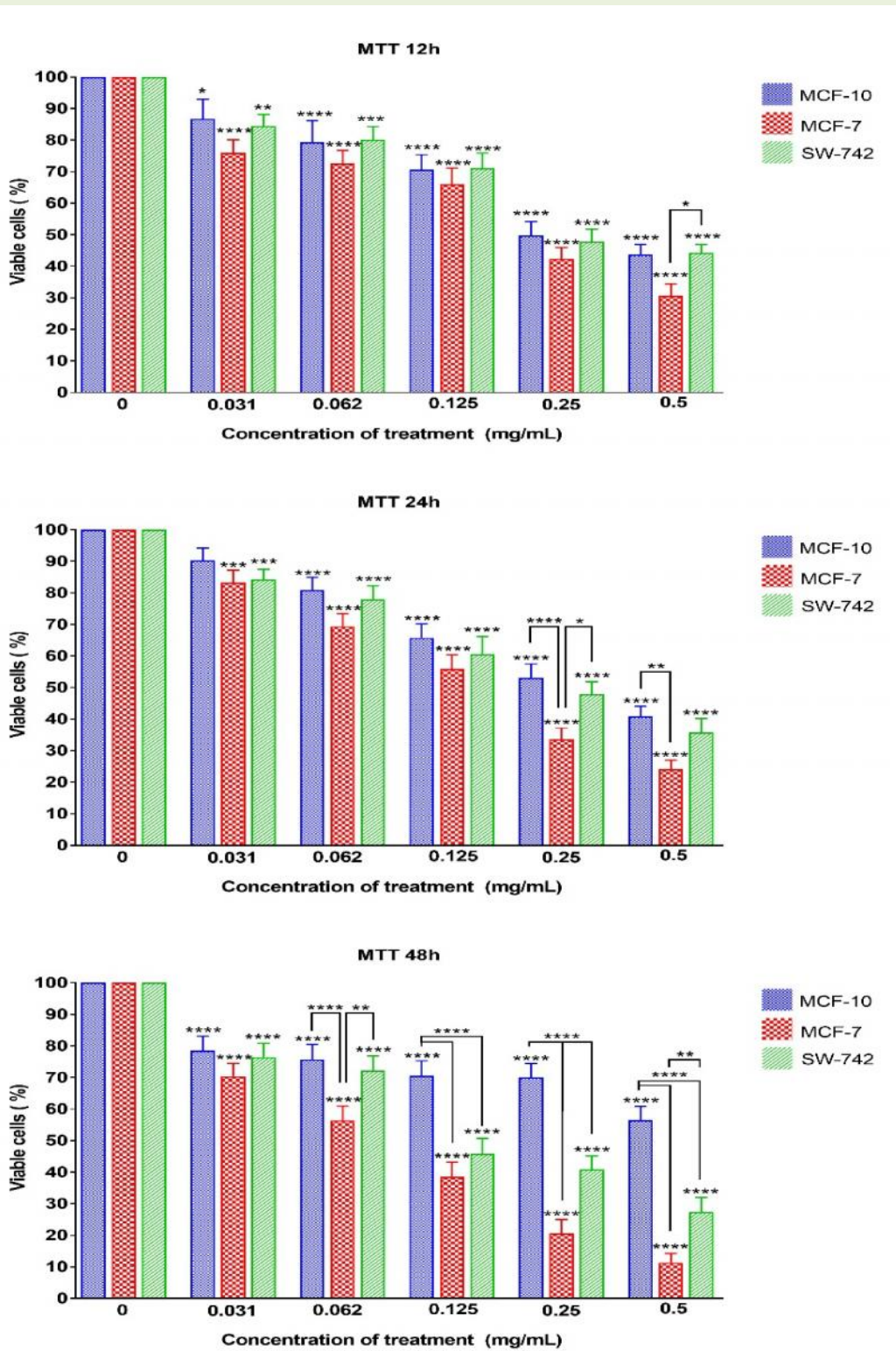
بررسی آپوپتوز با رنگ آمیزی Annexin-V/PI

در ادامه ی روند مطالعه به بررسی اثرات نانو کامپوزیت بر مرگ سلولی رده های سلولی مورد نظر، به منظور بررسی این که آیا کاهش بقای این رده های سلولی متعاقب تیمار سلول ها با نانو کامپوزیت با واسطه آپوپتوز صورت می گیرد، میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول ها و میزان القای پس از گذشت ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر نانو کامپوزیت، توسط رنگ آمیزی Annexin-V-FITC/PI و با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در نمودار ۴ نشان داده شده است.

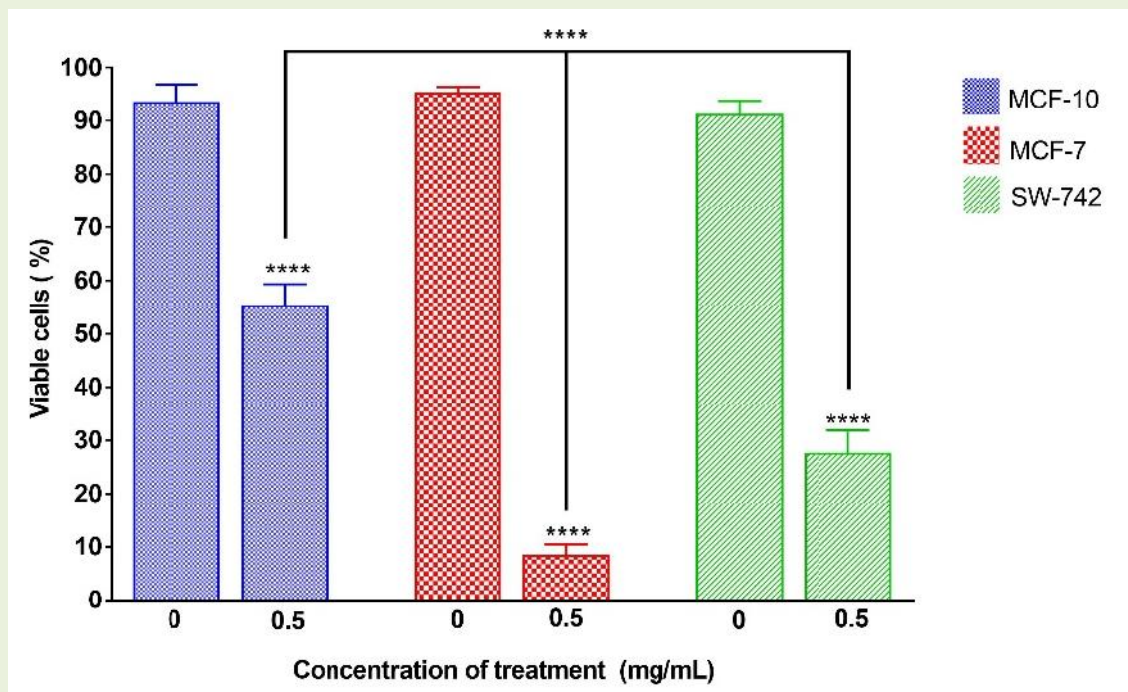
MCF-7 با حدود ۹۲ درصد دارای بیشترین مرگ و میر سلولی و رده سلولی SW-742 با مرگ و میر حدود ۷۲/۵ درصد و رده سلولی نرمال MCF-10 با مرگ و میر حدود ۴۵ درصد در رده های بعدی قرار دارند.

بررسی آپوپتوز رده های سلولی تیمار شده با نانو کامپوزیت

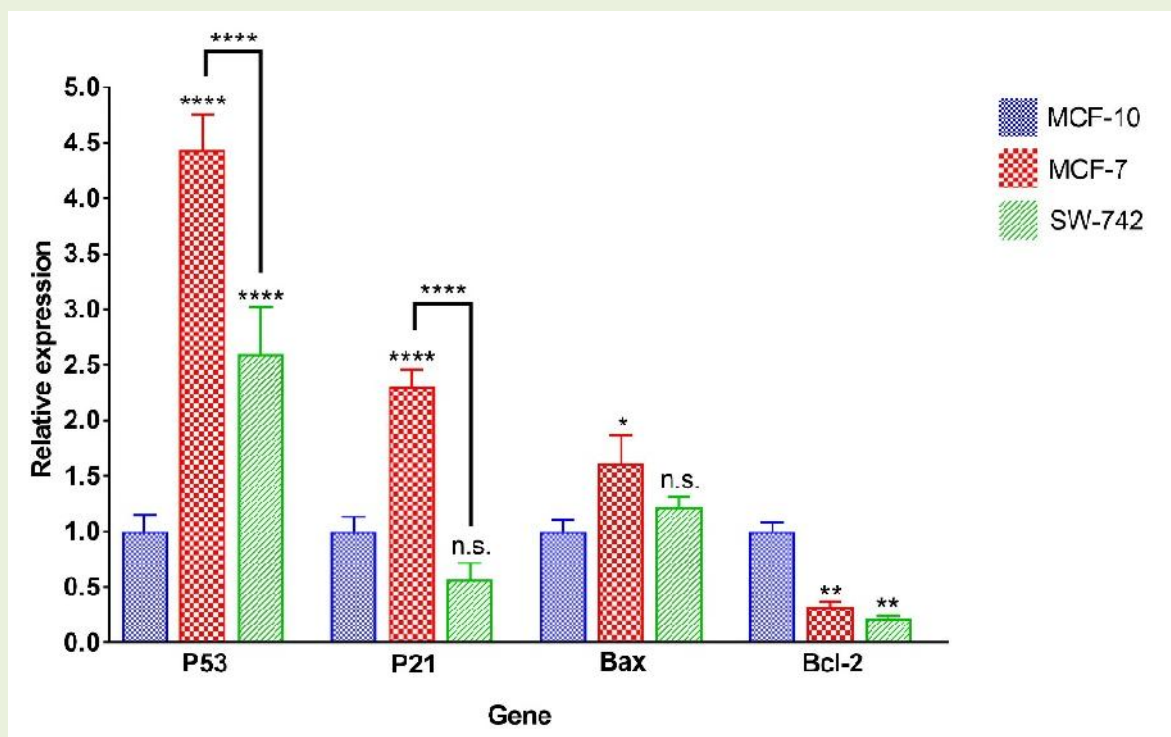
بررسی تغییرات بیان ژن های Bax، Bcl-2، P53 و P21 پس از استخراج RNA از سلول ها، غلظت و میزان خلوص نمونه های RNA توسط پیکودراپ تعیین گردید. بدین منظور جذب نوری نمونه های RNA در طول موج های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین و نسبت های بین ۱/۸ تا ۲ که نمونه های مناسب می باشند و انتخاب گردیدند. به منظور کسب اطمینان از عدم تخریب RNA در طی فرآیند استخراج و هم چنین بررسی میزان خلوص آن، ۲ میکرولیتر از RNA روی ژل آگارز ۱ الکتروفورز گردید. مشاهده باندهای 18S و 28S و نسبت دو برابری باند 28S به نسبت 18S و هم چنین عدم وجود اسمیر شدید نشان گر خلوص و یک پارچگی RNA استخراج شده بود. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، از روی RNA ها cDNA ساخته شد. پس از حصول اطمینان از صحت سنتز cDNA، بیان ژن های Bax، P21، P53 و Bcl-2 با روش Realtime-PCR سنجیده و از ژن actin- به عنوان ژن رفرنس یا housekeeping استفاده شد. آزمایشات به صورت triplicate انجام و نتایج حاصل توسط فرمول Livak آنالیز گردید. سطح بیان ژن های مد نظر در سلول های MCF-10 که سلول نرمال می باشد به عنوان بیان ژن معیار قرار گرفت و بیان ژن های مد نظر در رده های سلولی سرطانی به نسبت آن آنالیز و در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج بیان ژن P53 نشان می دهد



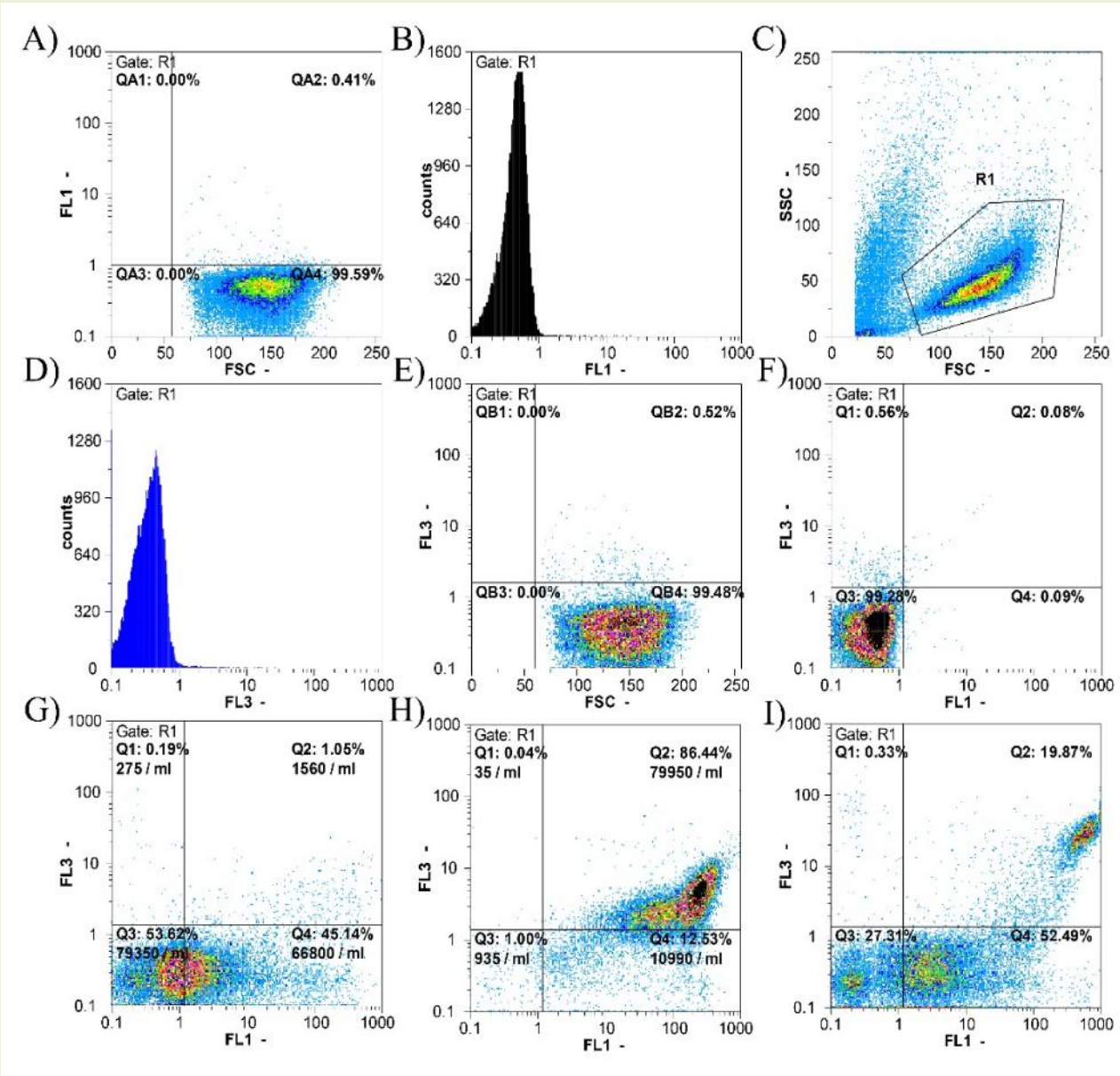
نمودار ۱- درصد زنده بودن رده های سلولی پس از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجهه با نانوکامپوزیت در پنج غلظت مختلف در مقایسه با نمونه کنترل (غلظت صفر).



نمودار ۲- درصد زنده بودن رده های سلولی پس از ۴۸ ساعت مواجهه با نانو کامپوزیت در غلظت 5 mg/mL در مقایسه با نمونه کنترل (غلظت صفر) و در مقایسه با رده های سلولی دیگر.



نمودار ۳- بیان نسبی ژن های P53, P21, Bax و Bcl-2 در رده های سلولی MCF-10, MCF-7 و SW-742.



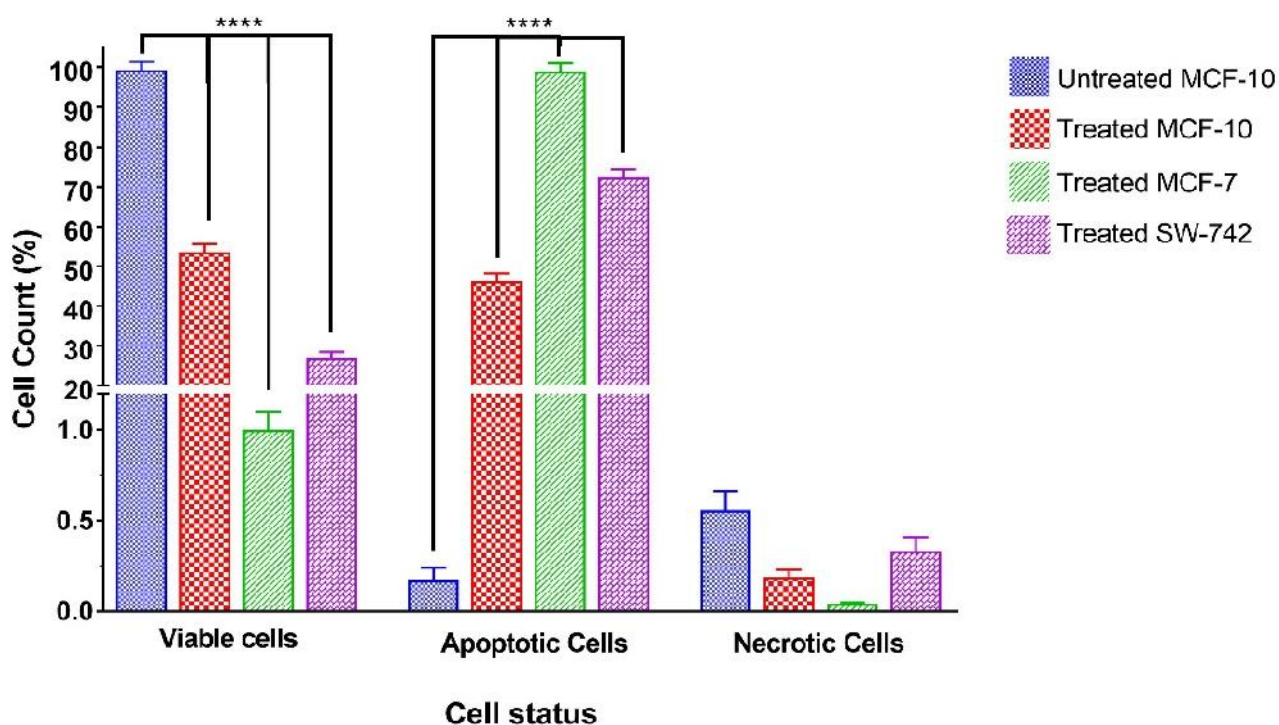
نمودار ۴- نتایج فلوسایتومتری بررسی آپوپتوز در رده های سلولی MCF-7، MCF-10 و SW-742 تیمار شده با غلظت ۰.۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت به مدت ۴۸ ساعت با تست Annexin V-FITC/PI.

سلول ها در آپوپتوز اولیه و ۱/۰۵ درصد از سلول ها در مرحله آپوپتوز نهایی قرار داشتند که جمعاً ۴۶/۱۹ درصد از جمعیت سلولی مورد مطالعه آپپتوتیک بودند. نتایج تیمار رده سلولی MCF-7 با غلظت ۰/۵ mg/mL از نانوکامپوزیت به مدت ۴۸ ساعت نشان می دهد که تنها ۱ درصد از سلول ها زنده و تنها ۰/۰۴ درصد از سلول ها نکروز بودند. این در حالی است که ۱۲/۵۳ درصد از سلول ها در آپوپتوز اولیه و ۸۶/۴۴ درصد از سلول ها در مرحله آپوپتوز نهایی قرار داشتند که جمعاً ۹۸/۹۷ درصد از جمعیت سلولی مورد مطالعه آپپتوتیک بودند. این

همان طور که مشاهده می گردد، ۹۹/۲۸ درصد از سلول های رده MCF-10 که با نانوکامپوزیت تیمار نگردیده اند زنده هستند و تنها ۰/۵۶ درصد از سلول ها نکروز، ۰/۰۹ درصد از سلول ها در آپوپتوز اولیه و ۰/۰۸ درصد از سلول ها در مرحله آپوپتوز نهایی قرار دارند که جمعاً ۰/۱۷ درصد از جمعیت سلولی مورد مطالعه آپپتوتیک می باشند. پس از تیمار سلول های MCF-10 با غلظت ۰/۵ mg/mL از نانوکامپوزیت به مدت ۴۸ ساعت، ۵۳/۶۲ درصد از سلول ها زنده بودند و تنها ۰/۱۹ درصد از سلول ها نکروز بودند. در حالی که ۴۵/۱۴ درصد از

سلول زنده دارای بیشترین سلول زنده می باشد. از بین رده های سلولی تیمار شده، رده MCF-10 با ۵۳/۶۲ درصد دارای بیشترین درصد سلول زنده و رده MCF-7 با تنها ۱ درصد سلول زنده دارای کمترین میزان سلول زنده می باشد و رده SW-742 با ۲۶/۹۷ درصد در بین این دو قرار دارد. هم چنین درصد سلول های آپوپتوز شده بین تمامی رده های سلولی تیمار شده با هم و هم چنین با رده MCF-10 تیمار نشده اختلاف معنادار دارد. رده سلولی MCF-10 تیمار نشده تنها با ۰/۱۷ درصد سلول آپوپتوتیک دارای کمترین میزان آپوپتوز می باشد. از بین رده های سلولی تیمار شده، رده MCF-10 با ۴۶/۱۹ درصد دارای کمترین میزان آپوپتوز و رده MCF-7 با ۹۸/۹۷ درصد سلول آپوپتوتیک دارای بیشترین میزان آپوپتوز می باشد و رده SW-742 با ۷۲/۳۶ درصد در بین این دو قرار دارد. در نتایج درصد سلول-های نکروز شده بین چهار گروه مورد مطالعه تفاوت معناداری مشاهده نشد.

نتایج به خوبی تاثیر نانوکامپوزیت را بر القای آپوپتوز در رده سلول سرطان پستان نشان می دهد. رده سلولی SW-742 نیز پس از تیمار با نانوکامپوزیت دارای ۲۷/۳۱ درصد سلول زنده، ۰/۳۳ درصد از سلول ها نکروز بود. این در حالی است که ۵۲/۴۹ درصد از سلول ها در آپوپتوز اولیه و ۱۹/۸۷ درصد از سلول ها در مرحله آپوپتوز نهایی قرار داشتند که جمعاً ۷۲/۳۶ درصد از جمعیت سلولی مورد مطالعه آپوپتوتیک بودند. این نتایج به خوبی تاثیر نانوکامپوزیت را بر القای آپوپتوز در رده سلول سرطان کولون نشان می دهد. مقایسه میزان سلول-های آپوپتوتیک، نکروتیک و سالم رده های سلولی که تحت تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت قرار گرفته بودند در نمودار ۵ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود درصد سلول های زنده بین تمامی رده های سلولی تیمار شده با هم و هم چنین با رده MCF-10 تیمار نشده اختلاف معنادار دارد. رده سلولی MCF-10 تیمار نشده با ۹۹/۲۸ درصد



نمودار ۵- مقایسه درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک در رده های سلولی تحت تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت.

بحث و نتیجه گیری

افزایش ادامه دار میزان ابتلا و مرگ و میر سرطان نیازمند استراتژی های موثر برای کنترل آن می باشد. یکی از روش های نوینی که امروزه به کمک تمامی روش های مرسوم درمانی و تشخیصی در سرطان بسیاری از بیماری-های دیگر آمده است، استفاده از نانوذرات به عنوان حامل و محافظ داروهای بیولوژیک می باشد که حوزه نانو فناوری را با انقلابی روبرو کرده است (۶). نانومتريال-های بر پایه گرافن، به خصوص اکسید گرافن (GO) به علت خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد آن ها از جمله سطح گسترده آن ها، وجود گروه های فعال قابل دست و ورزی، و زیست تطابق پذیری (Biocompatibility) بالا، یک پتانسیل عالی به عنوان حامل داروها و عوامل فعال برای درمان شیمی درمانی اختصاصی در سرطان به شمار می روند (۵۴). خواص ضد سرطانی ترکیبات مشتق از کینولین هم چون ۸-هیدروکسی (۷۹، ۱) و از طرفی استفاده روز افزون از نانوکامپوزیت های گرافن اکساید به عنوان حامل های دارویی و خواص ضد سرطانی خود این ماده (۱۴) دلیل بر آن شد تا در این مطالعه از صفحات گرافن اکساید به عنوان حامل های ترکیب ۸-هیدروکسی کینولین استفاده نموده تا با فرض بر خواص هم افزایی ضد سرطان نانو صفحات گرافن اکساید با ۸-هیدروکسی کینولین، اثرات این ترکیب را در کشندگی سلول از طریق القای آپوپتوز در سلول های رده سرطان پستان و کولون سنجیده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت مورد استفاده دارای سمیت بالا برای رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7) و سرطان کولورکتال (SW-742) می-باشد در حالی که برای رده سلولی نرمال پستان (MCF-10) سمیت بسیار کمتری دارد که تا حدی نشان دهنده اختصاصیت نسبی به رده های سلولی سرطانی است. از بین دو رده سلولی سرطانی مورد مطالعه، MCF-7 به

نانوکامپوزیت حساس تر بوده و میزان کشندگی نانوکامپوزیت بر آن بیشتر بوده است. هم چنین مشاهده گردید که اثرات سمیت نانوکامپوزیت به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان می باشد. مطالعات مختلفی نشان دادند که اتصال GO به نانوپارتیکل های دیگر یا مواد شیمیایی دیگر موجب افزایش کارایی آن می گردد. به عنوان مثال، اتصال داروی غیر محلول SN38 به پلی اتیلن گلیکول (PEG) متصل به GO (۴۵) و اتصال داروی دوکسوروبیسین (DOX) به GO فعال شده با کیتوزان و سدیم آلژینات (۴۰) سبب افزایش حلالیت، biocompatibility، توزیع در بافت تومور و اثرات ضد سرطانی این داروها شده است. هم چنین یکی از بزرگ-ترین معضلات استفاده از GO که اگرگاسیون آن در محلول های فیزیولوژیک می باشد، از طریق اتصال به نانومتريال های دیگر از بین می رود (۸۰). به همین علت در این مطالعه ماده ۸-هیدروکسی کینولین با یکی از انواع نانوذرات سیلیکایی به نام SBA-15 به صورت کووالانسی پوشانده و سپس به گرافن اکساید متصل گردید. مطالعات زیادی سمیت نانو ساختارهای کربن مثل گرافن و گرافن اکساید و نانوتیوب های کربنی را بر رده های مختلف سلول های سرطانی و نرمال گزارش کرده اند (۶۱، ۱۴). این مطالعات نقش شکل و ساختار نانوپارتیکل های گرافن و گرافن اکسید و انواع مختلف دیگر نانوپارتیکل های کربن را در سمیت آن ها مهم می دانند (۷). با بررسی بر روی سلول های نوروبلاستوما و کارسینومای اپی تلیال، مشخص گردید که GO نسبت به نانوتیوب های کربنی چند دیواره (MWNTs) سمیت بسیار کمتری برای سلول ها دارد و مهار کمی بر رشد سلول دارد و اثر زیادی بر آپوپتوز ندارد که این تفاوت به علت تفاوت در ساختار بین این دو نانومتريال است (۱۶). هم چنین مطالعات به اثرات سینرژی گرافن اکساید با سایر داروهای ضد سرطانی نیز اشاره کرده اند که یکی از

نشان داده شده است. در بسیاری از این مطالعات تاثیرات GO بر سلول های نرمال بسیار کم گزارش شده است که نشان دهنده اختصاصیت نسبی و تاثیر بیشتر این ماده بر سلول های سرطانی می باشد که البته هنوز مکانیسم دقیق این تفاوت اثر مشخص نمی باشد (۷). Fiorillo و همکاران خود (۲۸) نشان دادند که GO به طور اختصاصی گسترش و تکثیر سلول های بنیادی سرطان (cancer stem cells, CSCs) را در سرطان های مختلف مهار می کند. آن ها نشان دادند که GO به طور موثری از شکل گیری tumor-sphere ها در رده های مختلف سرطان های پستان (MCF-7)، تخمدان (SKOV-3)، پروستات (PC3)، ریه (A549)، پانکراس (MIA-PaCa-2) و گلیوبلاستوما (U87MG) جلوگیری می کند (۲۸). در مقابل، این مطالعه و مطالعات دیگر نشان دادند که GO برای سلول های بنیادی طبیعی سمی نیست و موجب القای تمایز در آن ها می گردد (۸۳، ۲۸، ۹). کشت دادن سلول های بنیادی پرتوان (Pluripotent) با GO موجب تمایز انتهایی آن ها به رده های سلولی مختلف مثل نوروها، کندروسیت ها و آدیپوسیت ها می گردد (۸۱، ۳۹، ۹). به دلیل این که رده های استفاده شده در این مطالعه سلول های بنیادی سرطانی (CSC) بودند علت سمیت بالای نانوکامپوزیت می تواند القای تمایز و تاحدی مرگ سلولی پس از گذشت زمان در این رده های سلولی باشد. گرافن تاثیر بسیار کمی بر همولیز سلول های RBC دارد و هم چنین بر مسیر انعقادی تاثیر ندارد. بنابراین ریسک ترومبوز را در تزریق های وریدی کاهش می دهد (۶۲). در مطالعات *in vivo* استفاده از GO سبب تجمع پلاکتی و ترمبوآمبولی ریوی (۶۶، ۶۵) و ایجاد گرانولوماتوز و ادم ریوی در موش گردید (۸۶، ۷۴). در کل، سمیت ریوی مهم ترین نگرانی استفاده از نانومتریال هاست که ممکن است به علت توزیع بار بر سطح آن ها و تجمع آن ها گردد که بایستی به

پیش فرض های ما نیز ایجاد همین سینرژی در اتصال ۸- هیدروکسی کینولین به گرافن اکساید بوده است (۶۹، ۴۹، ۴۴، ۳۵، ۳). البته یکی از خلاء هایی که در مطالعه ما به چشم می خورد عدم بررسی اثرات گرافن اکساید به تنهایی و ۸-هیدروکسی کینولین به تنهایی و مقایسه آن با نانوکامپوزیت حاوی هردو ماده است. در این صورت به خوبی می توان اثرات هر کدام به تنهایی و اثرات سینرژیستی هردو باهم را نشان داد. برخی مطالعات اذعان داشته اند که GO، وارد سلول نشده و اثرات خود را از طریق تماس با سطح سلول و القای سیگنال ها از رسپتورهای سطح سلولی می گذارد (۲۸، ۱۷). در حالی که در مطالعه ای دیگر عنوان شده است که نانو ذرات گرافن قابلیت داخل شدن (internalize) به درون سلول و فرار به سیتوپلاسم و حتی به هسته را دارند (۷). علت احتمالی این تناقضات، تفاوت در سایز نانوذرات گرافن مورد استفاده می باشد. تاکنون نانومتریال های مختلفی از جمله نانوپارتیکل های طلا (۵۱، ۲۳)، سلنیوم (۴۱)، آهن (۷۲) به عنوان حامل های داروهای ضد سرطان به کار گرفته شدند که GO دارای مزیت های بیشتری در بارگزاری یا لود کردن دارو و تغییرات شیمیایی است که موجب شده داروهای مختلفی از جمله دوکسوروبیسین (۸۸، ۵۹، ۴۸)، کورکومین (۳۳، ۳)، پاکلیتاکسل (۴۴، ۳۵)، متوتروکسات (۷۰، ۴۹، ۳۶) و سایر داروها (۴۲، ۲۲) در سرطان ها و رده های مختلف سرطانی هم چون سرطان کولون، پستان، ریه، کارسینومای کبد و غیره مورد استفاده قرار گیرند. هم چنین اختصاصیت و سایتوتوکسیسیته افزایش یافته دوکسوروبیسین متصل به GO به نسبت دوکسوروبیسین تنها توسط روش MTT و روش های مشابه بر روی سلول های HeLa (۸۲، ۲۷)، SMM-7721 (۴۸)، رده های سلولی سرطان پستان دارای HER2 و بدون HER2 هم چون MCF7، 4T1 و MDA-MB-231 (۳) و بر روی سلول های HepG2 (۷۵)

این موضوع توجه کرد و از طرق مختلفی از جمله اتصال به مواد دیگر و فعال سازی آن‌ها از احتمال تجمع آن‌ها کاست (۶۰). در این مطالعه از ماده ۸-هیدروکسی کینولین (8HQ) که یکی از مشتقات پر کاربرد کینولین‌ها می باشد و از سیلیکای مزوپوروس برای اتصال ۸-هیدروکسی کینولین به گرافن اکساید استفاده گردید که طبق مطالعه بدیعی صورت پذیرفت (۴). برخی از مشتقات کینولین‌ها دارای خصوصیات ضد سرطانی هستند که به طور کامل مورد آزمایش قرار گرفته اند، زیرا آن‌ها قادر به شلاته کردن یون های فلزی مورد نیاز برای رشد سرطان هستند (۸۴، ۶۴، ۳۷، ۲۱). 8HQ دارای دو سایت مهم پروتوناسیون است که اتم نیتروژن حلقه پیریدون و اتم اکسیژن حلقه فنل می باشد. بنابراین از این طریق با یون های دو ظرفیتی هم چون Mn^{2+} ، Cu^{2+} ، Zn^{2+} ، Co^{2+} ، Ni^{2+} و Fe^{2+} کمپلکس برقرار می کند. توانایی 8HQ در شلاته کردن فلزات یک استراتژی درمانی امیدبخش در کلینیک است (۵۵، ۳۲، ۳۰، ۲۲، ۵). داربست های 8HQ در بیماری های مختلفی از جمله بیماری های neurodegenerative (۵۰) و سرطان کار برد دارند (۴۷). اخیراً انواع مختلفی از مشتقات 8HQ با خصوصیات ضد سرطانی خوب معرفی شده اند که اثرات سمیت آن بر رده های سلولی سرطان های انسانی از جمله رده های سلولی KB, CNE2, MGC-803, GLC-82, MDA-MB-453 و MCF-7 نشان داده شده است (۸۵، ۴۳، ۲). مطالعات انجام شده بر روی HCT116 و MCF-7 اطلاعاتی در مورد اختصاصی عمل کردن مشتقات کینولین علیه هر دو رده سلولی نشان دهنده آن است که سلول های سرطان کولون و پستان در تست MTT به این ترکیبات حساس هستند (۷۸، ۷۳). در مطالعه حاضر نیز حساسیت رده های سلول سرطان کولون و پستان به نانوکامپوزیت حاوی 8HQ به خوبی نشان داده شده است. البته در مطالعه حاضر رده سلول سرطان پستان

MCF-7 بوده که مشابه مطالعه فوق الذکر می باشد اما رده سلولی سرطان کولون از نوع دیگری بوده که نشان-گر تکرارپذیری و سمیت 8HQ در هر دو رده سلول سرطان کولون (HCT116 و SW-742) می باشد. در مطالعه حاضر مشاهده شد که بیان ژن های پروآپوپتوتیک P53 و P21 و Bax در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با نانوکامپوزیت بیشترین افزایش را نسبت به کنترل (رده سلولی MCF-10) داشت که نشان دهنده تاثیرات نانوکامپوزیت بر القای آپوپتوز در این رده سلول سرطانی می باشد. رده سلولی SW-742 نیز دارای افزایش بیان معنادار ژن P53 به نسبت کنترل بود که حاکی از تاثیرات پروآپوپتوتیک نانوکامپوزیت مورد استفاده بر این رده سلولی است؛ هرچند بیان ژن های P21 و Bax در این رده سلولی به نسبت کنترل تفاوت معناداری را نشان نمی-دهد که این یافته حساسیت بالای رده سلولی MCF-7 را به نسبت این رده سلولی به نانوکامپوزیت استفاده شده نشان می دهد. همان طور که اشاره گردید، P21 یکی از ژن های مهم در القای توقف در چرخه سلولی است (۱۰) که با افزایش بیان آن در رده سلول های سرطانی به نسبت کنترل می توان احتمال توقف چرخه سلولی حاصل از تیمار رده های سلول سرطانی با نانوکامپوزیت را مطرح نمود که البته نیازمند تست های تاییدی بیشتری برای اثبات این احتمال می باشد. نکته حائز اهمیت دیگر در بررسی بیان ژن های دخیل در آپوپتوز و یا ضد آپوپتوز، بررسی بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 می باشد که همان-طور که مشاهده می گردد بیان این ژن در هر دو رده سلول سرطانی به نسبت کنترل دچار کاهش بیان معنادار گردیده است که نشان دهنده کاهش سیگنال های بقای در این رده های سلولی می باشد. نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز توسط تکنیک Annexin-V/PI نیز نشان داد که در رده های سلولی سرطان پستان و کولون متعاقب تیمار با نانوکامپوزیت، آپوپتوز شدید القای گردیده است که

که از این مطالعه به دست می آید عبارتست از این که نانوکامپوزیت گرافن اکساید کوت شده با ۸- هیدروکسی کینولین دارای سمیت نسبتاً اختصاصی به رده‌های سلولی سرطان پستان (MCF-7) و سرطان کولورکتال (SW-742) می باشد در حالی که سمیت بسیار کمتری بر روی رده سلولی نرمال پستان دارد. یکی از مکانیسم‌های اصلی این سمیت سلولی القای آپوپتوز در این سلول‌ها می باشد به طوری که نانوکامپوزیت سبب القای آپوپتوز مولکولی و سلولی در رده‌های سرطانی گردید و در سلول‌های نرمال آپوپتوز بسیار ناچیزی القای کرد که نشان دهنده اختصاصیت عملکرد نانوکامپوزیت می باشد. پیشنهاد می گردد که مکانیسم‌های بیشتر مولکولی و سلولی مرتبط با توکسیسیته نانوکامپوزیت بر رده‌های سلولی سرطانی از جمله بررسی تکثیر سلولی، چرخه سلولی، مهاجرت، تهاجم، متاستاز و آژیوزنز متعاقب تیمار با نانوکامپوزیت بر روی این رده‌های سلولی و سایر سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال به منظور اثبات اختصاصیت عملکرد نانوکامپوزیت بررسی گردد. نکته ای که نباید از آن غافل گردید این است که تمامی این نتایج در تست‌های آزمایشگاهی و بر روی رده‌های سلولی صورت پذیرفته است و بررسی اثرات ضد توموری این نانوکامپوزیت هم چون تمامی داروهای ضد سرطان بایستی در *in vivo* نیز بررسی گردد. به عنوان مثال، خصوصیات ضد توموری ماده 8HQ-2-quinoline carbaldehyde در *in vivo* بر روی موش‌های نژاد *nude* مبتلا به تومور *xenograft* کارسینومای هیپاتوسلولار انسانی (Hep3B) مطالعه گردید و نشان داده شد که ۹ روز تزریق روزانه داخل صفاقی این ماده به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش به طور کامل رشد تومور را متوقف کرده و آسیب بافتی خاصی نیز بر ارگان‌های حیاتی موش نگذاشته است (۱۲). در انتها نیز پیشنهاد می گردد که تاثیر

میزان آن به مراتب بیشتر از میزان آپوپتوز در رده سلولی کنترل (MCF-10) بود. در این بین مجدداً مشاهده می-گردد که رده سلولی MCF-7 بیشترین حساسیت را به نانوکامپوزیت نشان داد. مطالعات مختلف اذعان داشتند که یکی از راه‌های سلول کشی GO و هم چنین مشتقات کینولین از توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز می باشد (۸۷، ۶۱، ۱۵، ۷). مشتقات کینولین با مهار مسیر سیگنالینگ mTOR-Akt-PI3K موجب توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 و HCT116 می شود که حساسیت MCF-7 در این زمینه بیشتر از HCT116 است (۷۸). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که سلول‌های MCF-7 به نسبت سلول‌های SW-742 که رده سلولی سرطان کولون می باشد به نانوکامپوزیت حاوی 8HQ حساس تر هستند و میزان مرگ و میر بیشتری در آن‌ها شاهد بوده و ممکن است نشان‌گر حساسیت بیشتر سرطان پستان به نسبت سرطان کولون به نانوکامپوزیت‌های حاوی 8HQ باشد. سلول‌های سرطان سینه به خصوص MCF-7 یکی از سلول‌های بسیار مستعد و آسیب پذیر نسبت به مشتقات کینولین هستند اما رده‌های Hela و HCT116 نیز نسبت به مشتقات 8HQ آسیب پذیر می باشند (۳۸). در مطالعه حاضر مشاهده شد که نانوکامپوزیت حاوی 8HQ بر روی رده سلول‌های نرمال پستان سمیت بسیار کمتری به نسبت سلول‌های سرطانی دارد. در مطالعات مشابه نیز کمپلکس‌های تیتانیوم با 8HQ در تست MTT سرطان HepG2، BEL-7404، NCI-H460، T-24 و A549 از خود نشان دادند، در حالی که سمیت کمی بر روی رده سلول نرمال کبد HL-7702 داشتند (۵۷). هم چنین اشاره شده است که این کمپلکس‌ها موجب توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز میتوکندریایی بر روی رده سلولی BEL-7404 می گردد (۵۷). به طور کلی نتایجی

سرطان چه در *in vitro* و چه در *in vivo* بررسی گردد.

نانوکامپوزیت بر مکانیسم های ایمنولوژیک دخیل در

منابع

1. Afzal, O., Kumar, S., Haider, MR., Ali, MR., Kumar, R., Jaggi, M. (2015). A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97; 871-910.
2. Ai, Y., Liang, Y-J., Liu, J-C., He, H-W., Chen, Y., Tang, C. (2012). Synthesis and *in vitro* antiproliferative evaluation of pyrimido [5, 4-c] quinoline-4-(3H)-one derivatives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 47;206-13.
3. Alibolandi, M., Mohammadi, M., Taghdisi, SM., Ramezani, M., Abnous, K. (2017). Fabrication of aptamer decorated dextran coated nano-graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 155; 218-29.
4. Badieli, A., Goldooz, H., Ziarani, GM. (2011). A novel method for preparation of 8-hydroxyquinoline functionalized mesoporous silica: Aluminum complexes and photoluminescence studies. *Applied Surface Science*, 257(11); 4912-8.
5. Barilli, A., Atzeri, C., Bassanetti, I., Ingoglia, F., Dall'Asta, V., Bussolati, O. (2014). Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 11(4); 1151-63.
6. Bhushan, B. (2017). Springer handbook of nanotechnology: Springer.
7. Bianco, A. (1997). Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. *Angewandte Chemie International Edition*, 19;52-97.
8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, RL., Torre, LA., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 68(6);424-394.
9. Bressan, E., Ferroni, L., Gardin, C., Sbricoli, L., Gobbato, L., (2014). Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. *Journal of Translational Medicine*, 12(1); 296.
10. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393); 1497-501.
11. Canel, C., Moraes, R., Dayan, F., Ferreira, D. (2000). Molecules of interest: podophyllotoxin, *Phytochem*, 54: 115-120.
12. Chan, SH., Chui, CH., Chan, SW., Kok, SHL., Chan, D.(2012). Synthesis of 8-hydroxyquinoline derivatives as novel antitumor agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(2);170-4.
13. Chandler, D., El-Naggar, AK., Brisbay, S., Redline, RW., McDonnell, TJ. (1994). Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Human Pathology*, 25(8); 789-96.
14. Chang, Y., Yang, S-T., Liu, J-H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A. (2011). *In vitro* toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters*, 200(3);201-10.
15. Chen, C., Hou, X., Wang, G., Pan, W., Yang, X., Zhang, Y. (2017). Design, synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as HDAC class I inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 133; 11-23.
16. Chen, L., Hu, P., Zhang, L., Huang, S., Luo, L., Huang, C. (2012). Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Science China Chemistry*, 55(10);22.
17. Chowdhury, SM., Lalwani, G., Zhang, K., Yang, JY., Neville, K., Sitharaman, B. (2013). Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*, 34(1); 283-93.
18. Chua, CK., Pumera, M. (2014). Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. *Chemical Society Reviews*, 43(1); 291-312.
19. Dakubo, GD. (2010). Mitochondrial genetics and cancer: Springer Science & Business Media, 20-10.
20. Deb, A., Vimala, R. (2018). Camptothec in loaded graphene oxide nanoparticle functionalized with polyethylene glycol and folic acid for anticancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43; 333-42.
21. Ding, W-Q., Liu, B., Vaught, JL., Yamauchi, H., Lind, SE. (2005). Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Research*, 65(8); 3389-95.
22. Ding, WQ., Lind, SE. (2009). Metal ionophores—an emerging class of anticancer drugs. *IUBMB Life*, 61(11); 1013-8.
23. Dreaden, EC., Alkilany, AM., Huang, X., Murphy, CJ., El-Sayed, MA. (2012). The golden

- age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 79; 27-40.
- 24.** Du, W. (2003). Towards new anticancer drugs: a decade of advances in synthesis of camptothecins and related alkaloids. *Tetrahedron*, 59(44); 8649-87.
- 25.** Du, W., Jiang, X., Zhu, L. (2013). From graphite to graphene: direct liquid-phase exfoliation of graphite to produce single- and few-layered pristine graphene. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(36); 10592-606.
- 26.** El-Deiry, WS., Tokino, T., Velculescu, VE., Levy, DB., Parsons, R., Trent, JM. (1998). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 3(4); 25-17.
- 27.** Fan, L., Ge, H., Zou, S., Xiao, Y., Wen, H., Li, Y. (2016). Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93; 582-90.
- 28.** Fiorillo, M., Verre, AF., Iliut, M., Peiris-Pagés, M., Ozsvári, B., Gandara, R. (2015). Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: implications for non-toxic cancer treatment, via "differentiation-based nano-therapy". *Oncotarget*, 6(6); 3553.
- 29.** Fulda, S., Debatin, K-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34); 4798.
- 30.** Gupte, A., Mumper, RJ. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1); 32-46.
- 31.** Hanahan, D., Weinberg, RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1); 57-70.
- 32.** Helsel, ME., Franz, KJ. (2015). Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability. *Dalton Transactions*, 44(19); 8760-70.
- 33.** Hou, L., Shi, Y., Jiang, G., Liu, W., Han, H., Feng, Q. (2016). Smart nanocomposite hydrogels based on azo crosslinked graphene oxide for oral colon-specific drug delivery. *Nanotechnology*, 27(31); 315105.
- 34.** Hummers, Jr WS., Offeman, RE. (1985). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6); 1339.
- 35.** Hussien, NA., Iklán, N., Türk, M. (2018). Aptamer-functionalized magnetic graphene oxide nanocarrier for targeted drug delivery of paclitaxel. *Materials Chemistry and Physics*, 211; 479-88.
- 36.** Jafarizad, A., Aghanejad, A., Sevim, M., Metin, Ö., Barar, J., Omid, Y. (2017). Gold Nanoparticles and reduced graphene oxide - gold nanoparticle composite materials as covalent drug delivery systems for breast cancer treatment. *Chemistry Select*, 2(23); 6663-72.
- 37.** Jiang, H., Taggart, JE., Zhang, X., Benbrook, DM., Lind, SE., Ding, W-Q. (2011). Nitroxoline(8-hydroxy-5-nitroquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline). *Cancer Letters*, 312(1); 11-7.
- 38.** Krawczyk, M., Pastuch-Gawolek, G., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Kuczak, M., Skonieczna, M., Musiol, R. (2019). Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their 1, 4-GalT inhibitory and anti-cancer properties. *Bioorganic Chemistry*, 84; 326-38.
- 39.** Ku, SH., Park, CB. (2013). Myoblast differentiation on graphene oxide. *Biomaterials*, 34(8); 2017-23.
- 40.** Lei, H., Xie, M., Zhao, Y., Zhang, F., Xu, Y., Xie, J. (2016). Chitosan/sodium alginate modified graphene oxide-based nanocomposite as a carrier for drug delivery. *Ceramics International*, 42(15); 1779.
- 41.** Liu, W., Li, X., Wong, Y-S., Zheng, W., Zhang, Y., Cao, W. (2012). Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism. *ACS Nano*, 6(8); 6578-91.
- 42.** Liu X, Cheng X, Wang F, Feng L, Wang Y, Zheng Y, et al. Targeted delivery of SNX-2112 by polysaccharide-modified graphene oxide nanocomposites for treatment of lung cancer. *Carbohydrate Polymers*, 185; 85-95.
- 43.** Liu, Y-C., Chen, Z-F., Song, X-Y., Peng, Y., Qin, Q-P., Liang, H. (2013). Synthesis, crystal structure, cytotoxicity and DNA interaction of 5, 7-dibromo-8-quinolinolato-lanthanides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59; 168-75.
- 44.** Liu, Y., Zhong, H., Qin, Y., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, T. (2016). Non-covalent hydrophilization of reduced graphene oxide used as a paclitaxel vehicle. *RSC Advances*, 6(36); 30184-93.
- 45.** Liu, Z., Robinson, JT., Sun, X., Dai, H. (2008). Pegylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 130(33); 10876-7.
- 46.** Livak, KJ., Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT method. *Methods*, 25(4); 402-8.

47. Luiza, BdO., Borgati, TF., de Freitas, RP., Ruiz, AL., Marchetti, GM., de Carvalho, JE. (2014). Synthesis and antiproliferative activity of 8-hydroxyquinoline derivatives containing a 1, 2, 3-triazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84; 595-604.
48. Lv, Y., Tao, L., Bligh, SA., Yang, H., Pan, Q., Zhu, L. (2016). Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide. *Materials Science and Engineering: C*, 59; 652-60.
49. Masoudipour, E., Kashanian, S., Maleki, N. (2017). A targeted drug delivery system based on dopamine functionalized nano graphene oxide. *Chemical Physics Letters*, 668; 56-63.
50. Matlack, KE., Tardiff, DF., Narayan, P., Hamamichi, S., Caldwell, KA., Caldwell, GA. (2014). Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- (A) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201(40); 22-28.
51. Mazur, J., Roy, K., Kanwar, JR. (2018). Recent advances in nanomedicine and survivin targeting in brain cancers. *Nanomedicine*, 13(1); 105-37.
52. Milacic, V., Jiao, P., Zhang, B., Yan, B., Dou, QP. (2009). Novel 8-hydroxylquinoline analogs induce copper-dependent proteasome inhibition and cell death in human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 35(6); 1481-91.
53. Paulchamy, B., Arthi, G., Lignesh, B. (2015). A simple approach to stepwise synthesis of graphene oxide nanomaterial. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(1); 1.
54. Pierson, HO. (2012). Handbook of carbon, graphite, diamonds and fullerenes: processing, properties and applications: William Andrew,
55. Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V. (2013). 8-hydroxy quinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 7; 1157.
56. Priyadarsini, RV., Murugan, RS., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer(HeLa) cells through p53 induction and NF- B inhibition. *European Journal of Pharmacology*. 649(1-3); 84-91.
57. Qin, Q-P., Chen, Z-F., Qin, J-L., He, X-J., Li, Y-L., Liu, Y-C. (2015). Studies on antitumor mechanism of two planar platinum(II) complexes with 8-hydroxyquinoline: synthesis, characterization, cytotoxicity, cell cycle and apoptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92; 302-13.
58. Rajpal, S., Venook, A. (2004). Targeted therapy in colorectal cancer. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*, 4(2); 124-32.
59. Rao, Z., Ge, H., Liu, L., Zhu, C., Min, L., Liu, M. (2018). Carboxymethyl cellulose modified graphene oxide as pH-sensitive drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107; 1184-92.
60. Sahu, A., Choi, WI., Tae, G. (2012). A stimuli-sensitive injectable graphene oxide composite hydrogel. *Chemical Communications*, 48(47); 5820-2.
61. Sasidharan, A., Panchakarla, L., Chandran, P., Menon, D., Nair, S., Rao, C. (2011). Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale*, 3(6); 2461-4.
62. Sasidharan, A., Panchakarla, LS., Sadanandan, AR., Ashokan, A., Chandran, P., Girish, CM. (2012). Hemo compatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small*, 8(8); 1251-63.
63. Sharma, GN., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1; 109-112.
64. Shen, Ay., Wu, Sn., Chiu, Ct. (1999). Synthesis and cytotoxicity evaluation of some 8-hydroxyquinoline derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5); 543-8.
65. Singh, SK., Singh, MK., Kulkarni, PP., Sonkar, VK., Grácio, JJ., Dash, D. (2012). Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS Nano*, 6(3); 2731-40.
66. Singh, SK., Singh, MK., Nayak, MK., Kumari, S., Shrivastava, S., Grácio, JJ. (2011). Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. *Acs Nano*, 5(6); 4987-96.
67. Srivastava, V., Negi, AS., Kumar, J., Gupta, M., Khanuja, SP. (2005). Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(21); 5892-908.
68. Stewart, BW. (1994). Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical,

and cellular indicators. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 86(17); 1286-96.

69. Tan, J., Meng, N., Fan, Y., Su, Y., Zhang, M., Xiao, Y. (2016). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-graphene oxide conjugates: Carriers for anti-cancer drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 61; 681-7.

70. Thapa, R.K., Kim, J.H., Jeong, J.-H., Shin, B.S., Choi, H.-G., Yong, C.S. (2017). Silver nanoparticle-embedded graphene oxide-methotrexate for targeted cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153; 95-103.

71. Vajtai, R. (2013). *Springer handbook of nanomaterials*: Springer Science & Business Media,

72. Wang, C., Xu, H., Liang, C., Liu, Y., Li, Z., Yang, G. (2013). Iron oxide polypyrrole nanoparticles as a multifunctional drug carrier for remotely controlled cancer therapy with synergistic antitumor effect. *ACS Nano*, 7(8); 6782-95.

73. Wang, N., Witalaska, M., Wu, M.-Y., Imai, K., Ngoc, T.A., Pang, C.-Q. (2014). Synthesis and in vitro cytotoxic effect of 6-amino-substituted 11H-and 11Me-indolo [3, 2-c] quinolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 78; 314-23.

74. Wang, Y., Liu, J., Liu, L., Sun, D.D. (2011). High-quality reduced graphene oxide-nanocrystalline platinum hybrid materials prepared by simultaneous co-reduction of graphene oxide and chloroplatinic acid. *Nanoscale Research Letters*, 6(1); 241.

75. Wei, G., Dong, R., Wang, D., Feng, L., Dong, S., Song, A. (2014). Functional materials from the covalent modification of reduced graphene oxide and β -cyclodextrin as a drug delivery carrier. *New Journal of Chemistry*, 38(1); 140-5.

76. Wei, J., Vo, T., Inam, F. (2015). Epoxy/graphene nanocomposites-processing and properties: a review. *RSC Advances*, 5(90); 73510-24.

77. Wolf, E.L. (2014). *Applications of graphene: an overview*: Springer,

78. Xiao, Z., Lei, F., Chen, X., Wang, X., Cao, L., Ye, K. Design, synthesis, and antitumor evaluation of quinoline-imidazole derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 351(6); 1700407.

79. Xu, H., Chen, W., Zhan, P., Liu, X. (2015). 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with

a broad-ranging pharmacological potential. *MedChemComm*, 6(1); 61-74.

80. Yadav, N., Kumar, N., Prasad, P., Shirbhate, S., Sehrawat, S., Lochab, B. (2018). Stable dispersions of covalently tethered polymer improved graphene oxide nanoconjugates as an effective vector for siRNA delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(17); 14577-93.

81. Yang, D., Li, T., Xu, M., Gao, F., Yang, J., Yang, Z. (2014). Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Nanomedicine*, 9(16); 2445-55.

82. Yang, H., Bremner, D.H., Tao, L., Li, H., Hu, J., Zhu, L. (2016). Carboxymethyl chitosan-mediated synthesis of hyaluronic acid-targeted graphene oxide for cancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 135; 72-8.

83. Yoon, H.H., Bhang, S.H., Kim, T., Yu, T., Hyeon, T., Kim, B.S. (2014). Dual Roles of Graphene oxide in chondrogenic differentiation of adult stem cells: cell - adhesion substrate and growth factor - delivery carrier. *Advanced Functional Materials*, 24(41); 6455-64.

84. Zhai, S., Yang, L., Cui, Q.C., Sun, Y., Dou, Q.P., Yan, B. (2010). Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(2); 259-69.

85. Zhang, S.L., Zhai, X., Zhang, S.J., Yu, H.H., Gong, P. (2010). Synthesis and cytotoxicity studies of quinoline-3-carbonitrile derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 21(8); 939-42.

86. Zhang, X., Yin, J., Peng, C., Hu, W., Zhu, Z., Li, W. (2011). Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*, 49(3); 986-95.

87. Zhang, Y., Ali, S.F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, 4(6); 3181-6.

88. Zheng, X.T., Ma, X.Q., Li, C.M. (2016). Highly efficient nuclear delivery of anti-cancer drugs using a bio-functionalized reduced graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 467; 35-42.



The Effects of 8-Hydroxyquinoline-Coated Graphene Oxide on Cell Death and Apoptosis in Breast(MCF-7) and Colorectal(SW742) Cancer Cell Lines

F. Kheiltash¹, **K. Parivar**¹, N. Hayati Roodbari¹, A. Badiei,² B. Sadeghi³

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Kazem_parivar@yahoo.com

2. School of Chemistry, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. Cancer Immunotherapy and Regenerative Medicine, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran.

Received:2019.20.2

Accepted: 2019.10.3

Abstract

Introduction & Objective: Breast and colorectal cancers are of the major causes of cancer-related death worldwide. The anticancer properties of 8-hydroxyquinoline (8HQ), and the increasing use of graphene oxide (GO) as a drug delivery system with anti-cancerous properties, led us to investigate toxicity and apoptosis-induction capability of 8HQ-coated GO on breast and colorectal cancer cells compared to normal breast cells.

Material and Method: The breast cancer (MCF-7), colorectal cancer (SW-742) and normal breast (MCF-10) cell lines were treated with several doses of 8-HQ-coated GO for 12, 24, and 48 hours. The toxicity of nanocomposite was measured using MTT assay and the effect of nanocomposite on cell apoptosis were determined by examining the expression of P53, P21, Bax and Bcl-2 genes, as well as Annexin-V /PI apoptosis assay.

Results: There were significantly increased cell death in nanocomposite-treated colorectal and breast cancer cells, especially MCF-7, compared to treated normal breast cells. A significant increased expression of P53, P21 and Bax genes and reduced expression of Bcl-2 gene were found in both treated cancer cell lines compared to the normal breast cell line. Annexin-V/PI assay also illustrated a significant induction of apoptosis in the cancerous cell lines, especially MCF-7, following nanocomposite treatment.

Conclusion: Overall, 8HQ-coated GO has toxicity for breast and colorectal cancer cell lines, and one of the mechanisms through which this nanocomposite can induce cell death is induction of apoptosis. With complementary and in vivo studies, this nanocomposite can be suggested as a nano-drug with anti-cancer properties.

Keywords: Graphene Oxide, 8-Hydroxyquinoline, Breast Cancer, Colorectal Cancer, Apoptosis.