

The Effect of Nano-Pyrazole Derivative of Thiosemicarbazone Magnetite on BRCA1, p53 and Bcl-2 Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Izadpanah M R¹, Salehzadeh A^{*1}, Zaefizadeh M², Nikpasand M³

1. Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Biology, Ardabil branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

3. Department of Chemistry, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +989126932196, Fax: +984533447060, E-mail: salehzadehmb@yahoo.com

Received: Feb 19, 2019 Accepted: Jun 20, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Breast cancer is one of the most important causes of cancer deaths especially in developing countries. However, some synthetic compounds such as thiosemicarbazone and its metal derivatives can play a very significant role in reducing the death rate from cancer. The aim of this study was to investigate alterations in the expression of BRCA1, p53 and Bcl-2 genes in breast cancer cell line.

Methods: In this study, the effect of pyrazole derivative of thiosemicarbazone (T) as well as T-bound iron oxide magnetite nanoparticles (T/ Fe₃O₄ np) were investigated on expression changes of Bcl-2, BRCA1 and p53 in MCF-7 cells. For this purpose, the toxicity of the compounds was first measured using the MTT reaction for 24 hr. Then, the mRNA expression levels were evaluated using real-time PCR reaction.

Results: The results showed a high toxicity for the nano-pyrazole derivative of thiosemicarbazone magnetite so that; the fatality rate for treated thiosemicarbazone magnetite derivative cells was much higher than the compound without any nanoparticle. Also, real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression indicated a high effect of the derivative on increasing the expression levels of BRCA1 and p53 genes and also decreasing the Bcl-2 gene expression of Bcl-2.

Conclusion: The use of anticancer compounds like thiosemicarbazone which bound to iron oxide nanoparticles would increase the toxicity of the anticancer compounds along with enhancement of delivery of them with high solubility to target tissue.

Keywords: MCF-7 Cells; Thiosemicarbazone; Fe₃O₄ Nanoparticles; Breast Cancer

بررسی تاثیر مشتق نانو پیرازولی تیوسمی کاربازون مگنتیت بر بیان ژن‌های BRCA1، P53 و Bcl-2 در سلول‌های سرطان پستان MCF-7

محمد رضا ایزدپناه^۱، علی صالح زاده^{۱*}، محمد ضعیفی زاده بابلان^۲، محمد نیک پسند^۳

۱. گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲. گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

۳. گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۲ ۶۹۳۲۱۹۶ فاکس: ۰۱۳۳۳۴۴۷۰۶۰ پست الکترونیک: salehzadehmb@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان از مهمترین دلایل مرگ و میر ناشی از سرطان بخصوص در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد. در این میان استفاده از برخی ترکیبات سنتزی نظیر تیوسمی کاربازون و مشتقات فلزی آنها می‌تواند در کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان بسیار حائز اهمیت باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان ژن‌های BRCA1، P53 و Bcl-2 در رده های سلولی سرطان پستان بود.

روش کار: در مطالعه حاضر تاثیر مشتق پیرازولی تیوسمی کاربازون (T) و همچنین نانوذرات مگنتیک اکسید آهن متصل شده به ترکیب T (T/Fe₃O₄ np) بر روی تغییرات بیانی ژن های انکوژن و تومور ساپرسور Bcl-2، BRCA1 و P53 در سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور ابتدا توکسیسیته ترکیبات مورد استفاده، توسط واکنش MTT در مدت زمان ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت و سپس تغییرات بیان حاصله با استفاده از واکنش Real-time PCR ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج حاصله نشان دهنده توکسیسیته بالای مشتق نانو پیرازولی تیوسمی کاربازون مگنتیت بر روی سلول‌های MCF-7 مورد مطالعه بود به طوری که میزان کشندگی در سلول‌های تحت تیمار با مشتق مگنتیک تیوسمی کاربازون به مراتب بیشتر از ترکیب فاقد نانوذره بود. همچنین تغییرات بیان حاصل از واکنش Real-time PCR نشان دهنده تاثیر بالای مشتقات مورد استفاده در افزایش بیان ژن‌های BRCA1 و P53 و همچنین کاهش بیان در ژن Bcl-2 بود.

نتیجه گیری: استفاده از ترکیبات ضد سرطانی نظیر تیوسمی کاربازون در حالت متصل به نانوذرات اکسید آهن علاوه بر افزایش توکسیسیته این ترکیبات، می‌تواند انتقال هدفمند با قدرت حل شونده بالایی ترکیبات ضد سرطانی در بافت مورد نظر را موجب گردد.

واژه های کلیدی: سلول‌های MCF-7، تیوسمی کاربازون، نانوذرات Fe₃O₄، سرطان پستان

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

سرطان است که از بافت پستان آغاز می‌گردد که می‌تواند حالت تهاجمی یا غیرتهاجمی داشته باشد. بروز سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است. عوامل مختلفی نظیر شیوه زندگی

مقدمه

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر به شمار می‌آید و سرطان پستان دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. سرطان پستان نوعی از

DNA و تقسیم سلولی به نام Ribonucleotide Diphosphate Reductase انجام می‌دهند [۹]. یکی از مشکلات کلیدی در درمان تومور، کاهش حساسیت سلول‌های توموری نسبت به داروهای سیتوتوکسیک است. بنابراین بسیاری از نانوذرات به عنوان سیستم‌های تحویل دارو برای افزایش کارایی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند که در این میان می‌توان به تحویل دارو بر اساس هدف قرار دادن مکان‌های خاص بدن اشاره کرد [۱۰]. یکی از امیدوارکننده‌ترین مواد در این زمینه، نانوذرات مغناطیسی هستند. نانوذرات مغناطیسی نظیر Fe_3O_4 بسیار سازگار با محیط زیست و فوق‌العاده پارامغناطیسی با پایداری شیمیایی رضایت بخش و سمیت کم هستند که خواص انتشار بالایی دارند و به‌طور گسترده‌ای به عنوان حامل‌کننده‌های هدفمند مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۱]. همچنین این نانوذرات موجب افزایش حلالیت دارو می‌گردند [۱۲]. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدسرطانی ترکیب سنتز شده ۲ ((پیرازول-۴-ایل) متیلن) هیدرازین کربوتیوآمید (ترکیب T) به صورت مستقل و در حالت متصل به نانوذرات اکسید آهن عامل‌دار شده توسط (۳-کلروپروپیل) تری متوکسی سیلان (ترکیب T/Fe_3O_4 np) به منظور بررسی توکسیسیته و تغییرات بیان ژن‌های *Bcl-2*، *P53*، *BRCA1* و در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان با استفاده از واکنش Real Time-PCR می‌باشد.

روش کار

کشت سلول

در این مطالعه تجربی رده سلولی MCF-7 که از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران (IBRC) خریداری شده بود مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (dacell, South Korea) حاوی ۲/۰ gr $NaHCO_3$ و ۱ ml آنتی بیوتیک pen/strep به ازای هر ۱۰۰ ml محیط کشت و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی

و جهش‌های ژنتیکی در ایجاد سرطان پستان نقش دارند. این سرطان به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان شناخته می‌گردد و ۲۳ درصد از همه انواع سرطان‌ها در جهان را به خود اختصاص داده است. در کشورهای توسعه یافته عمدتاً سرطان پستان در زنان با سن بالاتر از ۶۳ سال دیده می‌شود در حالی که در کشورهای در حال توسعه زنان دارای سرطان پستان عمدتاً جوانتر از ۵۰ سال هستند. بنابراین یافتن اقداماتی در جهت کنترل سرطان بسیار حائز اهمیت است [۱]. مشتقات پیرازول از مهمترین ترکیبات هتروسایکلیک در شیمی دارویی شناخته می‌گردند که اثرات ضدسرطانی و ضد میکروبی این ترکیبات به اثبات رسیده است و استفاده از این ترکیبات به عنوان عوامل ضدسرطانی، روز به روز در حال گسترش است [۲،۳]. این مشتقات تاثیر بالایی در غیرفعال کردن Aurora kinase دارا می‌باشند. همچنین توانایی غیرفعال‌سازی کینازهای وابسته به سایکلین توسط مشتقات پیرازول گزارش شده است [۴]. معمولاً مهار ساختاری که این ترکیبات در کینازها ایجاد می‌کنند از طریق متصل‌شدن به سایت اتصال ATP می‌باشد [۵]. مهار Aurora kinase در سلول‌های سرطانی افزایش آپوپتوز را به دنبال خواهد داشت [۶]. اهمیت قالب‌های مختلف پیرازول در طراحی مهارکننده‌های Aurora kinase به اثبات رسیده است. به عنوان مثال اهمیت Pyrazol-4-yl-urea در مهار AUR A و B که موجب مهار رشد و بقا در سلول‌های سرطانی می‌گردد به اثبات رسیده است [۷،۸]. تیوسمی کاربازون‌ها و کمپلکس‌های فلزی آنها طیف گسترده‌ای از کاربردهای ضدقارچ، ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضدسرطانی را دارا می‌باشند. حضور گروه‌های amide، imine و thione سبب شده که این ترکیبات به عنوان لیگاندهای polydentate شناخته شوند [۸]. عمدتاً کمپلکس‌های فلزی تیوسمی کاربازون عمل مهاری خود را بر روی سرطان‌های مختلف از طریق مهار یک آنزیم حیاتی برای بیوسنتز

و T/Fe_3O_4 np با استفاده از تریپسین جدا شدند. سپس از یک میکروتیوب فاقد RNase به منظور سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲ دقیقه استفاده گردید. سپس رسوب تشکیل شده با استفاده از ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده حل شد و پس از سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه، محلول مورد نظر تحت تاثیر ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ قرار گرفت. پس از اینکه سلول‌ها دو مرتبه تحت تاثیر محلول‌های CB4 و WB4 قرار گرفتند. ۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase به ستون اضافه شد و پس از آنکوباسیون ۱ دقیقه ای، به منظور عبور RNA از داخل ستون، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه انجام پذیرفت.

ارزیابی خلوص RNA استخراج شده

به منظور بررسی خلوص RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (IRTracer-100) استفاده گردید. پس از سنجش جذب نوری RNAهای استخراج شده، نمونه‌هایی که نسبت ۲۶۰/۲۸۰ در آنها بین ۱/۸ الی ۲/۲ بود جهت ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفتند.

تولید DNA مکمل (cDNA)

به منظور سنتز cDNA از کیت Transgen Biotech AE301-02 استفاده گردید. پس از مخلوط ترکیبات موجود در جدول ۱، محلول حاضر در دستگاه ترموسایکلر (TC-96/g/Hcb/C. Hangzhou Bioer Technology) قرار داده شد و سپس برنامه دمایی زمانی ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و ۱۰ ثانیه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد اعمال گردید.

طراحی آغازگرها

در مطالعه حاضر از ژن‌های *Bcl-2* و *P53*، *BRCA1* به عنوان ژن هدف و ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع (خانه دار) استفاده گردید. در ابتدا توالی ژن‌های مورد استفاده از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> انتخاب گردید.

(FBS) کشت داده شده و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵٪ نگهداری شدند. پس از طی مدت زمان معین و افزایش تراکم سلولی در حد ۸۰ تا ۹۰ درصد، به کمک ۱ میلی لیتر از محلول تریپسین/EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و پس از کسب اطمینان از تک سلولی شدن سلول‌ها، محیط حاوی FBS ۱۰٪ اضافه گردید و در نهایت پس از حداقل ۵ مرتبه پاساژ سلولی و قرار گرفتن سلول‌ها در فاز رشدی، سلول‌های مورد استفاده با رنگ تریپان بلو رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفتند.

سنجش حیات سلولی از طریق تست MTT

اثر مهار رشد ترکیب T و Fe_3O_4 np با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. سلول‌های MCF-7، در تراکم 1×10^5 ، در پلیت‌های ۹۶ خانه ای و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم مطلوب، ترکیبات مورد استفاده با غلظت‌های (۱/۵۶۲، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ (۱۰۰ μ /well)) جهت سنجش خاصیت سیتوتوکسیتی و IC50 ترکیبات مذکور در ۲۴ ساعت استفاده شدند. سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. سپس محلول MTT اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت آنکوباسیون صورت گرفت. پس از آن محتویات کشت دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کساید (DMSO) به منظور حل کردن کریستال‌های نامحلول فورمازان، به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا (Biotech, USA) خوانده شد.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA از کیت Transgen Biotech ER101-01 استفاده گردید. به همین منظور جهت تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با ترکیب T

Reverse برای ژن‌های مورد استفاده در جدول ۲ قابل مشاهده است.

سپس با استفاده از نرم افزار Primer Express آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد استفاده طراحی گردید. توالی‌های آغازگرهای Forward و

جدول ۱. مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA

| مقدار | ماده |
|------------------------------|------------------------------|
| 4 µl (50 ng-5 µg / 5-500 ng) | Total RNA / Mrna |
| 1 µl | Oligo (dT) Primer |
| 1 µl | Reverse Transcriptase Enzyme |
| 10 µl | 2×Reaction Mix |
| 4 µl | RNase-Free Water |

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده

| نام ژن | توالی پرایمر | طول محصول (bp) |
|--------------------|--|----------------|
| BRCA1 F BRCA1 R | 5'-TGG AAG AAA CCA CCA AGG TC-3' 5'-ATG GAA GCC ATT GTC CTC TG-3' | ۲۴۱ |
| P53 F P53 R | 5'-GGC CCA CTT CAC CGT ACT AA-3' 5'-GTG GTT TCA AGG CCA GAT GT-3' | ۱۵۶ |
| Bcl-2 F Bcl-2 R | 5'-ATG TGT GTG GAG AGC GTC AA-3' 5'-CCC ATG CTG AAA CTC CCT TA-3' | ۱۶۲ |
| GAPDH F GAPDH R | 5'- CGG ATT TGG TCG TAT TG-3' 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT -3' | ۲۰۵ |

محاسبه غلظت CT از تعداد کپی ژن‌ها توسط روش منحنی استاندارد استفاده گردید. سپس نرمالیزاسیون توسط میانگین بیان ژن خانگی *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی انجام پذیرفت. جهت محاسبه بیان ژن‌های هدف در مقایسه با ژن خانگی *GAPDH* از فرمول 2^{-Ct} استفاده شد.

جدول ۳. ترکیبات مورد استفاده جهت انجام واکنش Real-time PCR

| مقدار | ماده |
|----------|----------------------------|
| 10 µl 1x | SinaGreen qPCR Mix 2x |
| 1 µl | Forward Primer |
| 1 µl | Reverse Primer |
| 1.5 µl | cDNA |
| 6.5 µl | PCR H ₂ O grade |

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه بر اساس حداقل دو مرتبه تکرار به دست آمد. میزان تغییرات مورد محاسبه با استفاده از بررسی میزان میانگین و محاسبه

واکنش Real-time PCR

جهت انجام Real-time PCR از یک واکنش زمانی- گرمایی سه مرحله ای استفاده گردید. جهت انجام این تست از دستگاه Real-time PCR (ABI StepOne) استفاده گردید. به منظور واسرشت سازی اولیه از دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. سیکل سه مرحله ای، ۴۵ چرخه در نظر گرفته شد که شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه به منظور واسرشت سازی، دمای اتصال ۵۶، ۵۸ و ۵۸ به ترتیب برای ژن‌های *BRCA1*، *P53* و *Bcl-2* و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. جهت ترسیم منحنی ذوب بازه دمایی ۶۵ الی ۹۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. ترکیبات مورد استفاده جهت انجام واکنش Real-time PCR در جدول ۳ قابل مشاهده است. هر آزمایش حداقل در ۲ مرحله تکرار شد. به منظور

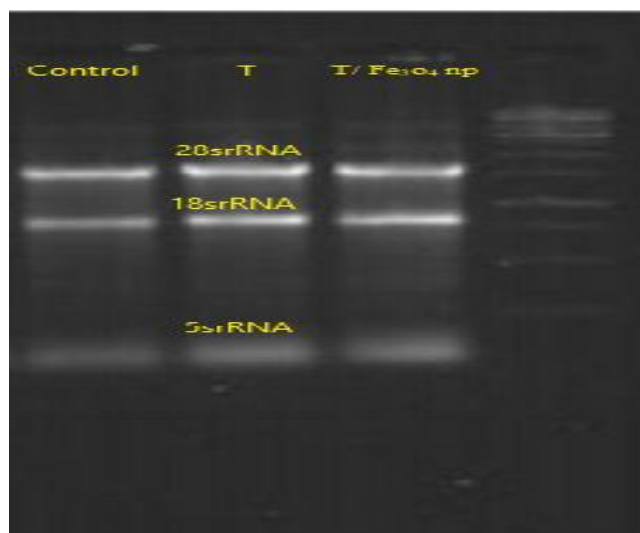
نتایج تست زنده مانی سلول (MTT)

بر اساس نتایج تست MTT، میزان IC_{50} برای ترکیبات T و T/Fe_3O_4 np در مدت زمان ۲۴ ساعت در سلول‌های MCF-7 به ترتیب ۱۵/۷۸۰ و ۱۳/۱۸۴ ($100 \mu g/well$) برآورد شد. نتایج زنده مانی سلول‌ها بر اساس تست MTT برای سلول‌های تیمار شده با ترکیبات T و T/Fe_3O_4 np به ترتیب در نمودار ۱ و ۲ آمده است. میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی در هر ۲ ترکیب وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت T و T/Fe_3O_4 np میزان مهار رشد به طور معنی‌داری بیشتر شده است ($p < 0.05$).

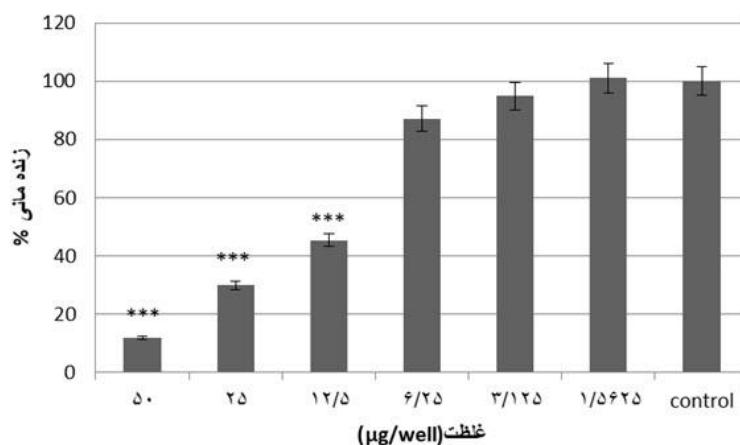
انحراف معیار تعیین گردید. آزمون مقایسه ای مورد استفاده در این مطالعه ANOVA Test بود، به همین منظور از نرم افزار SPSS-16 و GraphPad استفاده گردید و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها**بررسی کیفی استخراج RNA**

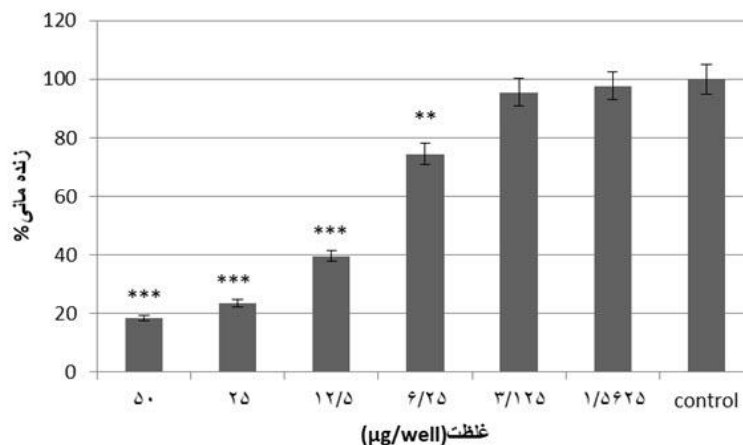
نتایج حاصل از بررسی کیفی RNA استخراج شده سلول‌های کنترل و سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترکیب T و T/Fe_3O_4 np توسط الکتروفورز ژل آگارز در شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱. بررسی کیفی RNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز



نمودار ۱. نتایج تست حیات سلولی، تحت تیمار ۲۴ ساعته سلول‌های MCF-7 با ترکیب T. میزان IC_{50} برای سلول‌های تحت تیمار با ترکیب T حدود $15/780 \mu g/well$ محاسبه شد. $p < 0.05$



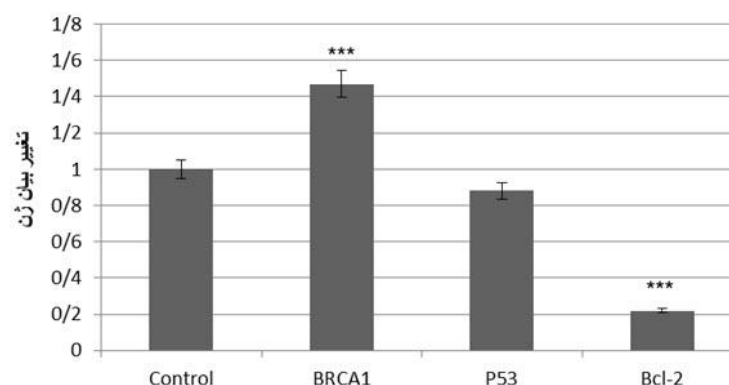
نمودار ۲. نتایج تست حیات سلولی، تحت تیمار ۲۴ ساعته سلول‌های MCF-7 با ترکیب T/Fe₃O₄ np. میزان IC₅₀ برای سلول‌های تحت تیمار با ترکیب T/Fe₃O₄ np حدود ۱۳/۱۸۴ µg/well محاسبه شد. $p < 0.05$

سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترکیب T تغییر معنی‌داری در سطح بیان mRNA ژن P53 مشاهده نگردید. نتایج حاصل از تغییرات بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده با هر دو ترکیب T و T/Fe₃O₄ np به صورت کاهشی و معنادار بود که این تغییر کاهشی در سطح بیان ژن Bcl-2 برای سلول‌های تحت تیمار ترکیب T و T/Fe₃O₄ np به ترتیب برابر ۰/۲۲ و ۰/۶۷ بود که در مورد سلول‌های تیمار شده با ترکیب T این تغییر کاهشی محسوس‌تر بود. نتایج حاصل از تغییرات بیان ژن‌های BRCA1، P53 و Bcl-2 در نمودار ۳ و ۴ قابل مشاهده است. همچنین Melting Curve حاصل از واکنش Real-time PCR در شکل ۲ قابل مشاهده است.

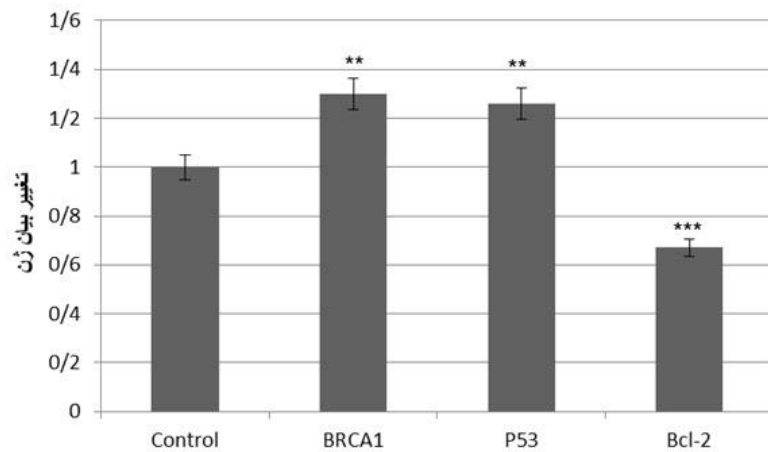
نتایج بیان نسبی ژن‌ها تحت تاثیر تیمار به روش

Real-time PCR

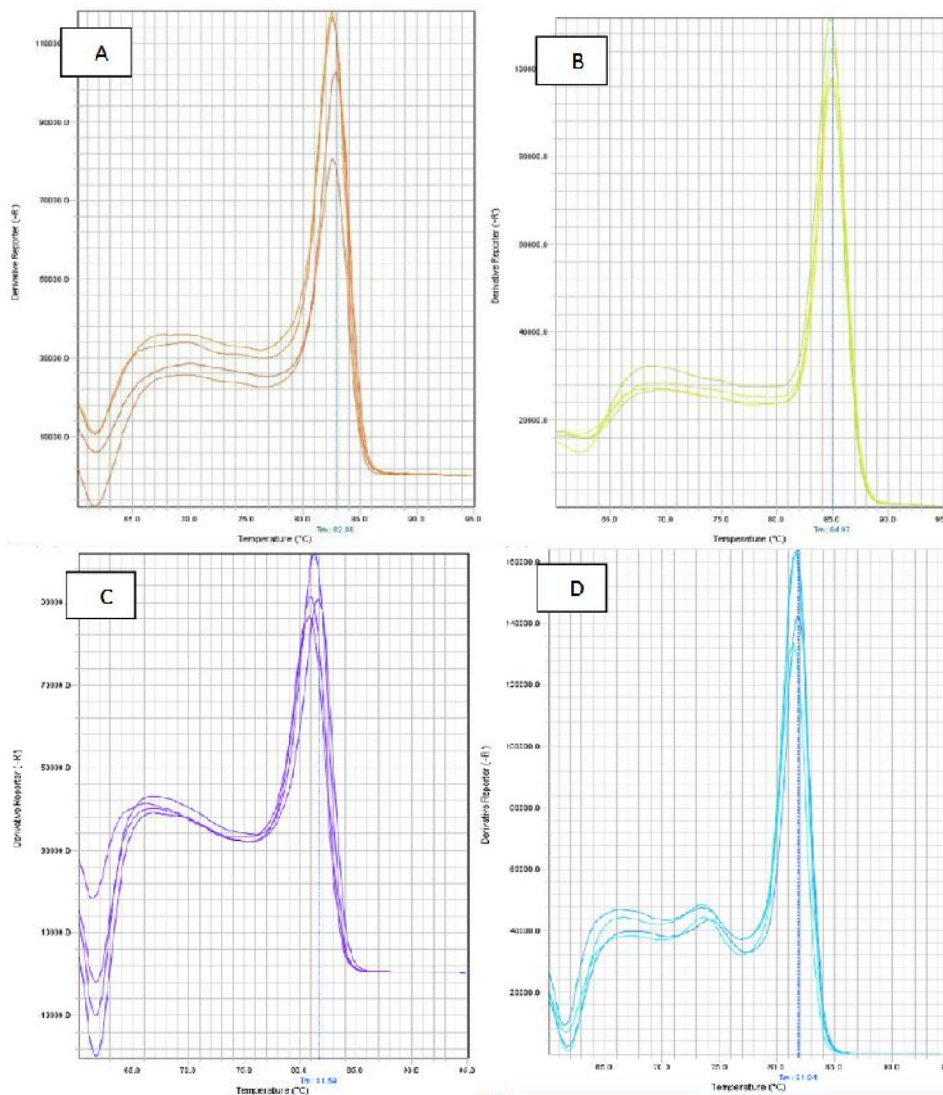
جهت آنالیز سطح mRNA ژن‌های BRCA1، P53 و Bcl-2 واکنش Real-time PCR انجام شد. در مورد ژن BRCA1، نتایج حاصله نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سطح بیان این ژن در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با هر دو ترکیب T و T/Fe₃O₄ np بود ($p < 0.05$). به طوری که این افزایش بیان در مورد سلول‌های تیمار شده با ترکیب T برابر با ۱/۴۷ و در سلول‌های تیمار شده با ترکیب T/Fe₃O₄ np برابر با ۱/۳۰ بود. در مورد ژن P53 نیز شاهد افزایش معنی‌دار سطح بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با ترکیب T/Fe₃O₄ np بودیم که این افزایش برابر با ۱/۲۶ برابر حالت کنترل بود. در حالی که در



نمودار ۳. بیان mRNA ژن‌های BRCA1، P53 و Bcl-2 در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت IC₅₀ از ترکیب T ($p < 0.05$ در مقابل گروه کنترل)



نمودار ۴. بیان mRNA های *BRCA1*, *P53* و *Bcl-2* در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت IC50 از ترکیب T/Fe_3O_4 np در مقابل گروه کنترل ($p < 0.05$)



شکل ۲. نمودار ذوب حاصل از واکنش Real-time PCR (A) ژن *Bcl-2*, (B) ژن *P53*, (C) ژن *BRCA1*, (D) ژن *GAPDH*

بحث

استفاده از مشتقات پیرازول به عنوان ترکیبات هتروسایکلیک دارای خاصیت ضدسرطانی بسیار گسترش یافته است [۲،۳]. تاثیر بالای ترکیبات پیرازول در غیرفعال سازی کینازهای وابسته به سایکلین و Aurora Kinase ها از طریق ممانعت ساختاری در سایت اتصال ATP به اثبات رسیده است [۴،۱۳]. اختلال در مسیر سیگنالینگ سلولی در جریان سرطان زایی و افزایش آپوپتوز سلولی توسط این مشتقات فلزی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۵،۶]. تیوسمی کاربازون ها دارای طیف وسیع کاربردهای ضدسرطانی و ضد میکروبی هستند [۶]. اتصال مشتقات پیرازولی با تیوسمی کاربازون ها به منظور تولید مشتقات دارویی ضدسرطان می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. تیوسمی کاربازون ها عملکرد ضدسرطانی خود را از طریق غیرفعال سازی آنزیم ریبونوکلئوتید دی فسفات ردوکتاز به انجام می رسانند که از این طریق مانع از یوستنز DNA و همچنین تقسیم سلولی در سلول های سرطانی می شوند [۱۴]. در کنار خاصیت ضدسرطانی مشتقات پیرازولی تیوسمی کاربازون، استفاده از نانوذرات مگنتیک اکسید آهن به منظور افزایش حلالیت ترکیبات فوق و انتقال هدفمند این ترکیبات بسیار حائز اهمیت است. همچنین خاصیت ضدسرطانی نانوذرات اکسید آهن از طریق تولید گونه های اسیژن فعال، در افزایش خاصیت ضدسرطانی مشتق پیرازولی تیوسمی کاربازون می تواند بسیار حائز اهمیت باشد [۱۰،۱۵،۱۶]. در مطالعه ای که نیتولسکو^۱ و همکاران انجام دادند تغییرات بیان ژن های *cyclinA*، *cdc20*، *cyclinB* و *cdk1* را در سلول های HT29 تحت تاثیر ۸ مشتق مختلف پیرازول مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل نشان دهنده الگوی بیانی نامتقارن افزایشی و کاهشی در ژن های مورد مطالعه بود که نتایج مطالعه مذکور با نتایج حاصل از مطالعه

حاضر که افزایش بیان در ژن های تومور ساپرسور BRCA1 و P53 و کاهش بیان در ژن انکوژن Bcl-2 مشاهده گردید. همخوانی نداشت [۱۷]. همچنین در مطالعه ای که توسط ردی^۲ و همکاران انجام پذیرفت، تغییرات بیانی ۳ ژن *Bcl-2*، *Bax* و *Caspase3* در سلول های MCF-7 تیمار شده با ۳ مشتق مختلف از پیرازول مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله نشان دهنده افزایش سطح mRNA ژن های *Bax* و *Caspase3* و کاهش سطح mRNA ژن *Bcl-2* در سلول های مورد مطالعه بود [۸]. نتایج حاصله از مطالعه ردی و همکاران با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر که افزایش در بیان ژن های تومور ساپرسور BRCA1 و P53 و کاهش در بیان انکوژن Bcl-2 مشاهده گردید، همخوانی داشت. همچنین در مطالعه ای که رن^۳ و همکاران انجام دادند تغییرات بیان ژن های *Caspase3*، *Bax* و *Bcl-2* تحت تاثیر نانوذرات مگنتیک Fe_3O_4 در اتصال با چندین ترکیب شیمی درمانی مختلف را مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصله نشان دهنده افزایش سطح mRNA ژن های *Bax* و *Caspase3* و کاهش سطح mRNA در ژن *Bcl-2* بود [۱۶] که نتایج حاصل از مطالعه رن و همکاران نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. از جمله ژن هایی که در مطالعه حاضر سطح mRNA آن مورد سنجش قرار گرفت BRCA1 بود که میزان بیان این ژن در سلول های MCF-7 تیمار شده با ترکیب T و T/Fe_3O_4 np به ترتیب ۱/۴۷ و ۱/۳۰ برابر حالت کنترل بود. BRCA1 به عنوان یک ژن تومور ساپرسور دارای پتانسیل آپوپتوزی بالا شناخته می شود که افزایش در بیان این ژن منجر به افزایش مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز شامل C-Jun N-terminal Kinase می گردد و کاهش میزان BRCA1 از دست دادن پتانسیل آپوپتوزی و رشد تومور را در

² Reddy³ Ren¹ Nitulescu

پایه دارد. این پروتئین در طیف گسترده ای از اعمال بیولوژیک شامل سرکوب رشد، القای آپوپتوز، تنظیم چرخه سلولی و پاسخ به آسیب DNA نقش دارد [۱۸]. با توجه به اینکه افزایش فعالیت Aurora kinase موجب فسفریلاسیون و غیرفعال سازی BRCA1 می‌گردد [۱۹]، می‌توان نتیجه گرفت که مشتقات پیرازولی T و T/Fe_3O_4 np احتمالاً با اتصال به سایت فسفریلاسیون Aurora kinase و غیرفعال سازی این پروتئین نقش ضدتوموری خود را در افزایش بیان BRCA1 ایفا می‌کنند [۷].

$P53$ یک ژن تومور ساپرسور است که در غلظت‌های کم درون سیتوزول قرار دارد که در اثر برخی استرس‌های سلولی نظیر آسیب DNA و استرس اکسیداتیو افزایش پیدا می‌کند [۲۰]. میزان تغییرات بیان ژن $P53$ در سلول‌های تیمارشده با ترکیب T و T/Fe_3O_4 np به ترتیب ۰/۸۸ و ۱/۲۶ بود که این تغییر در مورد سلول‌های MCF-7 تیمارشده با ترکیب T/Fe_3O_4 np معنادار بود ($p < 0/05$). تعدادی از ژن‌هایی که در سرکوب تومور نقش دارند در سرطان پستان دچار جهش می‌گردند که از مهمترین این ژن‌ها می‌توان به $P53$ اشاره کرد که نتیجه این جهش، اختلال در روند آپوپتوز و رشد سریع تومور می‌باشد [۲۱]. افزایش بیان ژن $P53$ که در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید می‌تواند از طریق فرایند آپوپتوز نقش محافظتی خود در تشکیل تومور را ایفا نماید [۲۲]. احتمالاً این افزایش بیان در اثر غیرفعال سازی Aurora kinase توسط ترکیبات T و T/Fe_3O_4 np مورد استفاده، رخ داده است. چرا که Aurora kinase ها با فسفریلاسیون سرین ۳۱۵ از $P53$ زمینه فعال سازی پروتئین $Mdm2$ را فراهم می‌سازند. پروتئین $Mdm2$ به‌عنوان مهارکننده رونویسی ژن $P53$ عمل می‌کند [۲۳].

نتیجه گیری

مطالعه حاضر برای اولین بار توکسیسیته بالای مشتق پیرازولی تیوسمی کاربازون به تنهایی و در حالت متصل به نانوذرات اکسید آهن را در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان نشان داد. نتایج حاصله تاثیر نانوذرات اکسید آهن در افزایش میزان آپوپتوز و توکسیسیته سلولی مشتق پیرازولی تیوسمی کاربازون را در سلول‌های سرطانی MCF-7 نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل قدرت نفوذ بالای نانوذرات اکسید آهن و همچنین تولید گونه‌های اکسیژن فعال توسط نانوذرات اکسید آهن استفاده شده در ترکیب مدنظر باشد.

خانواده $Bcl-2$ نقش مهمی را در تنظیم آپوپتوز ایفا می‌کنند. در این میان برخی از اعضای خانواده نظیر Bax نقش پرو آپوپتوزی و برخی نظیر $Bcl-2$ نقش

پی دارد. این پروتئین در طیف گسترده ای از اعمال بیولوژیک شامل سرکوب رشد، القای آپوپتوز، تنظیم چرخه سلولی و پاسخ به آسیب DNA نقش دارد [۱۸]. با توجه به اینکه افزایش فعالیت Aurora kinase موجب فسفریلاسیون و غیرفعال سازی BRCA1 می‌گردد [۱۹]، می‌توان نتیجه گرفت که مشتقات پیرازولی T و T/Fe_3O_4 np احتمالاً با اتصال به سایت فسفریلاسیون Aurora kinase و غیرفعال سازی این پروتئین نقش ضدتوموری خود را در افزایش بیان BRCA1 ایفا می‌کنند [۷].

$P53$ یک ژن تومور ساپرسور است که در غلظت‌های کم درون سیتوزول قرار دارد که در اثر برخی استرس‌های سلولی نظیر آسیب DNA و استرس اکسیداتیو افزایش پیدا می‌کند [۲۰]. میزان تغییرات بیان ژن $P53$ در سلول‌های تیمارشده با ترکیب T و T/Fe_3O_4 np به ترتیب ۰/۸۸ و ۱/۲۶ بود که این تغییر در مورد سلول‌های MCF-7 تیمارشده با ترکیب T/Fe_3O_4 np معنادار بود ($p < 0/05$). تعدادی از ژن‌هایی که در سرکوب تومور نقش دارند در سرطان پستان دچار جهش می‌گردند که از مهمترین این ژن‌ها می‌توان به $P53$ اشاره کرد که نتیجه این جهش، اختلال در روند آپوپتوز و رشد سریع تومور می‌باشد [۲۱]. افزایش بیان ژن $P53$ که در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید می‌تواند از طریق فرایند آپوپتوز نقش محافظتی خود در تشکیل تومور را ایفا نماید [۲۲]. احتمالاً این افزایش بیان در اثر غیرفعال سازی Aurora kinase توسط ترکیبات T و T/Fe_3O_4 np مورد استفاده، رخ داده است. چرا که Aurora kinase ها با فسفریلاسیون سرین ۳۱۵ از $P53$ زمینه فعال سازی پروتئین $Mdm2$ را فراهم می‌سازند. پروتئین $Mdm2$ به‌عنوان مهارکننده رونویسی ژن $P53$ عمل می‌کند [۲۳].

References

- 1- Kavithaa K, Paulpandi M, Ponraj T, Murugan K, Sumathi S. Induction of intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer (MCF-7) cells through facile biosynthesized zinc oxide nanorods. *Karbala Int J Mod. Science*. 2016 Mar ;2(1):46-55.
- 2- Keter FK, Darkwa J. Perspective potential of pyrazole-based compounds in medicine. *Biometals*. 2012 Feb ;25(1):9-21.
- 3- Çalı kan B, Yılmaz A, Evren , Menev e S, Uludag O, Banoglu E. Synthesis and evaluation of analgesic, anti-inflammatory, and anticancer activities of new pyrazole-3 (5)- carboxylic acid derivatives. *Med Chem Res*.2013 Feb; 22(2):782-793.
- 4- Pevarello P, Brasca MG, Orsini P, Traquandi G, Longo A, Nesi M, et al. 3-Aminopyrazole inhibitors of CDK2/cyclin A as antitumor agents. 2. Lead optimization. *J Med Chem*. 2005 Mar ;48(8):2944-56.
- 5-Chahrouf O, Cairns D, Omran Z. Small molecule kinase inhibitors as anti-cancer therapeutics. *J Mini Rev Med Chem*. 2012 May;12(5):399-411.
- 6- Bebbington D, Binch H, Charrier J-D, Everitt S, Fraysse D, Golec J, et al. The discovery of the potent aurora inhibitor MK-0457 (VX-680). *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Jul;19(13):3586-92.
- 7- Czarnomysy R, Sura y ski A, Muszynska A, Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, et al. A novel series of pyrazole-platinum (II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*.2018 Dec; 33(1):1006-1023.
- 8- Reddy TS, Kulhari H, Reddy VG, Bansal V, Kamal A, Shukla R. Design, synthesis and biological evaluation of 1, 3-diphenyl-1H-pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. *Eur J Med Chem*. 2015 Aug;101:790-805.
- 9- Abou-Hussen A, El-Metwally N, Saad E, El-Asmy A. Spectral, magnetic, thermal and electrochemical studies on phthaloyl bis (thiosemicarbazide) complexes. *J Coord Chem*. 2005 Aug;58(18):1735-49.
- 10- Gokhale N, Padhye S, Newton C, Pritchard R. Hydroxynaphthoquinone metal complexes as antitumor agents x: synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of 3-methyl-phenylazo lawsone derivatives and their metal complexes against human breast cancer cell line mcf-7. *Met Based Drugs*.2000;7(3):121-8.
- 11- Kouassi GK, Irudayaraj J. A nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study. *J Nanobiotechnology*. 2006 Aug;4:8.
- 12- Lin BL, Shen XD, Cui S. Application of nanosized Fe₃O₄ in anticancer drug carriers with target-orientation and sustained-release properties. *Biomed Mater*. 2007 Jun;2(2):132–134.
- 13- Pfeffer C, Singh A. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*.2018 Feb;19(2):448.
- 14- Howard S, Berdini V, Boulstridge JA, Carr MG, Cross DM, Curry J, et al. Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent aurora kinase activity. *J Med Chem*. 2009 Jan;52(2):379-82..
- 15- Vinardell M, Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials*. 2015 Jun ;5(2):1004-21.
- 16- Ren Y, Zhang H, Chen B, Cheng J, Cai X, Liu R, et al. Multifunctional magnetic Fe₃O₄ nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *Int J Nanomedicine*. 2012 May;7:2261-2269.
- 17- Nitulescu GM, Matei L, Aldea IM, Draghici C, Olaru OT, Bleotu C. Ultrasound-assisted synthesis and anticancer evaluation of new pyrazole derivatives as cell cycle inhibitors. *Arabian J Chem*.2019 Sep;12(6):816-824.
- 18- Thangaraju M, Kaufmann SH, Couch F. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2000 Oct. 27;275(43):33487-96.
- 19- Ertych N, Stolz A, Valerius O, Braus GH, Bastians H. CHK2–BRCA1 tumor-suppressor axis restrains oncogenic Aurora-A kinase to ensure proper mitotic microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Feb ; 113(7):1817–22.
- 20- Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, Ichihara S, Ichihara G, Nagata K, et al. Serial alterations of -Adrenergic signaling in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circ J*. 2004 Nov;68:1051-60.

- 21- Liang Y, Besch-Williford C, Benakanakere I, Thorpe PE, Hyder S. Targeting mutant p53 protein and the tumor vasculature: an effective combination therapy for advanced breast tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan;125(2):407-420.
- 22- Ryan KM, Phillips AC, Vousden K. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Jun; 13(3): 332-7.
- 23- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan Z-M, Bondaruk J, Suzuki F, et al. Phosphorylation aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):55-62.
- 24- Toyoda Y, Shida T, Wakita N, Ozaki N, Takahashi R, Okada M. Evidence of apoptosis induced by myocardial ischemia: a case of ventricular septal rupture following acute myocardial infarction. *Cardiology.* 1998 Oct;90:149-51.
- 25- Walsh TN, Grannell M, Mansoor S. hepatology. Predictive factors for success of neo-adjuvant therapy in upper gastrointestinal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Feb;17 Suppl:S172-5.
- 26- Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet oncol.* 2001 Feb;2(1):33-42.