مقاله پژوهشی

بررسی اثر نانوکپسول‌های تاموکسیفن بر بیان ژن های Bax و Bak درده سلولی MCF-7

مریم بی خوف تربتی [۱و۳*]، مسعود شعبانزاده [۲] و مهزاد مطلبی [۳]

۱-گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه شیمی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مریم بی خوف تربتی، دکتری تخصصی زیست شناسی، Maryam.bikhof@gmail.com و bikhof@iausr.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۵/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۸/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۲۴

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: نانو حامل‌های دارویی به دلیل دارا بودن خواص مهمی مانند انتقال هدفمند دارو، افزایش حلالیت داروهای نامحلول و کاهش اثرات سمی داروها بر بافت‌های سالم کاربرد فراوانی در درمان سرطان دارند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات نانوکپسول حاوی تاموکسیفن بر بیان ژن‌های پیش برنده آپوپتوز Bax و Bakدر رده سلولی MCF-7 می‌باشد.

روش مطالعه: در این مطالعه ساختار نانوکپسول توسط طیف سنجی FTIR تائید گردید و اثرات نانوکپسول‌های تاموکسیفن بر فعالیت زیستی سلول‌ها توسط MTT assay در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت سنجیده شد. روش Real time PCR، برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های Bax و Bak مورد استفاده قرار گرفت و تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم افزارSPSS 23.0 انجام گرفت.

نتایج: براساس نتایج روش MTT، غلظت‌های بیشتر نانوکپسول‌های تاموکسیفن بصورت وابسته به غلظت توان زیستی سلول‌ها را کاهش داده و بیشترین میزان سمیت نانوکپسول‌ها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. همچنین بیان ژن‌های Bax و Bak در سلول‌های MCF-7 تیمار شده پس از ۴۸ ساعت نشان دهنده القا آپوپتوز در این سلول‌ها بودد. نتایج حاصل نشان دهنده افزایش ۱/۸ برابری سمیت سلولی نانوکپسول‌های تاموکسیفن در مقایسه با تاموکسیفن آزاد می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به القا آپوپتوز در نتیجه افزایش بیان ژن‌های Bax و Bak و نیز افزایش سمیت سلولی نانوکپسول‌های حامل تاموکسیفن در مقایسه با تاموکسیفن آزاد، این نانو داروها می‌توانند کاندید مناسبی برای درمان سرطان سینه باشند.

واژه‌های کلیدی: تاموکسیفن، نانوکپسول‌ها، Bax، Bak ، سلول‌های MCF-7، سرطان سینه

مقدمه

نانوتکنولوژی و استفاده از نانوحامل‌ها با اندازه‌ای حدود ۱۰۰ نانومتر یا کمتر، از چند دهه گذشته در انتقال بهینه و هدفمند داروها خصوصا در درمان سرطان‌ها جایگاه ویژه‌ای یافته است. این نانوحامل‌ها با اندازه، شکل و خصوصیات سطحی ویژه‌ای ساخته می‌شوند و قادر هستند تا حد زیادی بر محدودیت‌های داروهای رایج ضد سرطان مانند عدم هدف‌گیری اختصاصی سلول، میزان حلالیت کم دارو و سمیت بسیار زیاد آن بر سلول‌ها و بافت‌های سالم غلبه نماید. انواع مهمی از نانو حامل‌ها که امروزه در انتقال داروهای ضد سرطان کاربرد دارند شامل نانوذرات پلیمری (میسل‌ها)، لیپوزوم ها، نانوتیوب‌های با پایه کربن و نانوذرات فلزی و مغناطیسی می‌باشند (Lila *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019; Hekmat and Roshani,

(2020. نانو کپسول‌های پلیمری از نانوحامل‌های بسیار مهمی هستند که با کپسول نمودن داروها خصوصا داروهای نامحلول در آب و کاهش سمیت آنها کاربرد فراوانی در دارورسانی هدفمند در درمان سرطان دارند. سرطان سینه یکی از شایعترین سرطان‌ها در زنان در سراسر دنیا است و به طور کلی دو نوع سرطان سینه وابسته به هورمون و غیر وابسته به هورمون وجود دارند. در یک تقسیم بندی جزئی‌تر براساس بیان گیرنده‌های استروژن و پروژسترون (ER/PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (HER2) سرطان سینه به زیرشاخه‌های دیگری شامل: لومینال A (ER+/PR+/HER2 -)، لومینال B (ER+/PR+/HER2+)، HER2 مثبت (ER-/PR-/HER2 +) و Triple Negative (ER-/PR-/HER2-) تقسیم می‌گردند (Abdel-Hafiz, 2017; Olsen *et al.*, 2017). تاموکسیفن که یک تغییر دهنده انتخابی گیرنده استروژن است، مهم‌ترین دارویی است که با مسدود نمودن عملکرد گیرنده استروژن آلفا (۶۶ kDa) در درمان سرطان‌هایی که بیان رسپتور استروژن در آنها افزایش می‌یابد (ER+)، کاربرد دارد و تا ۳۱٪ میزان مرگ و میر را کاهش می‌دهد. به این صورت که چون تاموکسیفن آنالوگ استروژن است، برای قرار گرفتن برروی گیرنده‌های استروژن با استروژن رقابت می‌کند. با این وجود، تاموکسین دارای حلالیت کمی در آب بوده و مصرف خوراکی آن با طولانی شدن درمان، سبب بروز عوارض جانبی شدیدی مانند ایجاد مقاومت دارویی و سرطان اندومتر می‌شود. بنابراین تشکیل نانوساختارهای تاموکسیفن علاوه بر آنکه حلالیت آن را افزایش می‌دهد، می‌تواند تا حدود زیادی عوارض جانبی را کاهش داده و امکان انتقال هدفمند به سلول سرطانی را میسر نماید (Hultsch *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Nankali *et al.*, 2020).

فرایند آپوپتوز که نقش بسیار مهمی در تکامل بافت‌ها، تنظیم سیستم ایمنی و متعادل ماندن تعداد سلول‌های بدن دارد، از دو مسیر اصلی فعال می‌گردد: مسیر خارجی که با اتصال لیگاند اختصاصی به گیرنده های مرگ آغاز می‌شود و مسیر داخلی که در غشا خارجی میتوکندری و با خروج سیتوکروم C در سیتوزول فعال می‌گردد. هر دو مسیر آپوپتوز پس از آغاز، با فعال شدن کاسپاز ۳ و ۷ و آبشارهای پیام رسانی انجام می‌پذیرند (Saxena *et al.*, 2009). علاوه بر کاسپازها، خانواده پروتئینی Bcl-2 نیز در تنظیم آپوپتوز نقش دارند که دارای حدود ۱۵ عضو ، برخی ضد آپوپتوز و برخی پیش برنده آپوپتوز می‌باشند. Bax یکی از اعضا بسیار مهم پیش برنده آپوپتوز از خانواده Bcl-2 است که خصوصا در تکامل سیستم عصبی اهمیت دارد.

این پروتئین همراه با پروتئین پیش برنده آپوپتوز دیگری به نام Bak از طریق تغییر در نفوذپذیری غشا میتوکندری که منجر به رها شدن مولکول‌های کوچکی مانند سیتوکروم C و Smac/DIABLO می‌گردد در القا آپوپتوز نقش دارند (Kim, 2005; Papaliagkas *et al.*, 2007). با توجه به اهمیت روزافزون نانوداروها در درمان سرطان ها، در این مطالعه به بررسی اثر نانوداروی تاموکسیفن بر تغییر بیان ژن‌های Bax و Bak مسیر آپوپتوز در رده سلولیMCF-7 پرداخته شد.

روش مطالعه

رده سلولی و کشت سلول: در این تحقیق سلول‌های MCF-7 (رده سلولی آدنوکارسینومای سینه انسان- IBRC C10682) از مرکز ذخایر زیستی ایران (IBRC) تهیه شدند. سلول‌های MCF-7 در محیط کشت DMEM با میزان گلوکز زیاد و حاوی ۱۰٪ سرم گوساله غیرفعال شده با حرارت (FBS-Gibco BRL-اسکاتلند)، ۲ میلی مول L-گلوتامین (Gibco BRL-اسکاتلند)، ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ Iu/mL پنی سیلین (Sigma) در°C ۳۷ در فضای مرطوب با ۵٪ CO_2 و در فلاسک‌های کشت بافت cm^2 ۲۵کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده به مدت ۱ دقیقه در دمای°C ۳۷ با محلول تریپسین- EDTA ۲۵ /۰٪ انکوبه و از فلاسک جدا شدند و سپس برای ۵ دقیقه با دور rpm ۱۱۰۰ سانتریفیوژ گردید. سلول‌ها شمرده شده و توان زیستی سلول با روش رنگ آمیزی تریپان بلو و با استفاده از هموسایتومتر و میکروسکوپ نوری تعیین گردید. پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی، سلول‌هایی با توان زیستی بالای ۹۰٪ برای مطالعه انتخاب شدند.

تهیه نانوداروی تاموکسیفن: در این مطالعه، نانوداروی حامل تاموکسیفن مطابق دستورالعمل موجود در تحقیقات قبلی سنتز شد (Behdarvand *et al.*, 2020). سپس ساختار نانوداروی تهیه شده با استفاده از روش طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) بررسی و تایید گردید.

سنجش سمیت سلولی به روش MTT assay: بررسی اثر سمیت نانوکپسول‌های تاموکسیفن بر رده سلولی MCF-7 توسط آزمون MTT صورت گرفت که در آن، میزان کاهش رنگ زرد تترازولیوم بروماید و تشکیل کریستال‌های فرمازان ارغوانی در نتیجه عمل آنزیم‌های میتوکندریایی بررسی می‌گردد. در این بررسی، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول MCF-7 در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، نانوکپسول‌های تاموکسیفن با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به طور جداگانه به هر چاهک اضافه و مجدداً به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. سپس ۲۰ µL از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شده و نهایتاً کریستال‌های فرمازان ایجاد شده با اضافه نمودن

۱۰۰µL حلال DMSO و تکان دادن آن به مدت ۱۵ دقیقه حل شدند. میزان جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (TECAN-Sunrise- سوئیس) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. کلیه تست‌ها ۳ بار تکرار شده و درصد توان زیستی بر اساس نسبت میانگین جذب در سلول‌های تست شده به میانگین جذب در سلول‌های گروه کنترل بدست آمد و نیز میزان IC50 (Inhibitory Concentration 50) محاسبه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA با استفاده از کیت (CinnaGen- ایران) ابتدا سلول‌ها توسط ترکیب RNX/محلول کلروفورم به نسبت (v/v) 1:0.2 لیز شده و با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز شناور سطحی که حاوی RNA بود، در یک لوله جمع آوری شده، حجمی از ایزوپروپانول اضافه شده و به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ بررسی شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA توسط کیت Revert AidTM First Strand (Fermentas- آلمان) صورت پذیرفت. در حدود ۲-۱ میکروگرم RNA، ۱ میکرولیتر DNAase و ۱ میکرولیتر از بافر۱۰ × آماده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای°C ۳۷ انکوبه گردید. سپس ۱ میکرولیتر EDTA به آن اضافه شده و جهت غیر فعال شدن آنزیم DNAase مجددا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای°C ۶۵ انکوبه گردید. پس از آن، سنتز cDNA با حدود ۱ میکروگرم RNA، ۲ میکرولیتر الیگو (dT)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش Reverse Transcriptase (RT) ۵ ×، ۵./. میکرولیتر مهارکننده RNase، ۲ میکرولیتر مخلوط دئوکسی نوکلئوتید و ۱۰ واحد آنزیم RT با غلظت کلی ۱۲ میکرولیتر صورت پذیرفت. سپس، مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه درون یک دستگاه ترموسایکلر با دمای°C ۴۲و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای°C ۷۰جهت غیر فعال شدن آنزیم RT قرار داده شد. در نهایت cDNA سنتز شده در دمای°C ۲۰- نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل Real-time PCR: ارزیابی SYBR Green RT-qPCR جهت تعیین بیان ژن‌های Bax و Bak در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوکپسول‌های تاموکسیفن بعد از ۴۸ ساعت انجام پذیرفت. برای کنترل داخلی، ژن گلیسر آلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) بکار برده شده و حجم نهایی در هر واکنش ۱۳ میکرولیتر بوده است. کلیه تست‌ها برای هر ژن بطور جداگانه و هرکدام ۳ بار تکرار شدند. جهت تعیین موثر بودن RT-PCR، تشکیل محصولات غیر اختصاصی و دایمرهای پرایمری از ارزیابی منحنی ذوب استفاده گردید. Real-time PCR کمی با استفاده از نرم‌افزار Bioneerexicycler TM 96 و مطابق دستورالعمل حرارتی بصورت دناتوراسیون اولیه در°C ۹۵ برای ۵ دقیقه و طی ۴۰ سیکل، دناتوراسیون در °C ۹۵ برای ۱۰ ثانیه؛ طویل‌سازی در °C ۶۰ برای ۱ دقیقه و طویل سازی در °C ۷۲ برای ۴۰ ثانیه انجام شد. اطلاعات کمی PCR بصورت داده‌های Ct و بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change) توسط نرم افزار REST بدست آمده‌اند و در نهایت نمودار نتایج رسم گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده مطابق جدول ۱ است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

Bax	Reverse primer	5'-CATCTTCTTCCAGATGGTGA-3'
	Forward primer	5'-GTTTCATCCAGGATCGAGCAG-3'
Bak	Reverse primer	5'-CCCAGGACACAGAGGAGGTC-3'
	Forward primer	5'-GCCCAACAGAACCACACCAAAA-3'
GAPDH	Forward primer	5'-TGCCTCCTGCACCACCAACT-3'
	Reverse primer	5'-CGCCTGCTTCACCACCTT C-3'

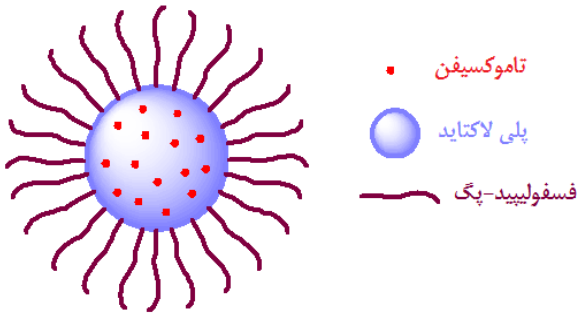
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 23.0 (SPSS Inc -آمریکا)، روش ANOVA یک طرفه و دوطرفه و به دنبال آن آزمون t و آزمون Tukey's HSD post hoc ارزیابی شدند. داده‌ها نیز بصورت mean± standard (SD) نشان داده شده و $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شده است.

نتایج

شناسایی ساختار نانودارو به کمک طیف سنجی FTIR: در طیف FTIR مربوط به نانوکپسول سنتز شده ارتعاش کششی در فرکانس cm^{-1} ۱۷۶۰ مربوط به گروه کربونیل C=O در پلی لاکتاید و فسفولیپید-پگ است که با هم در این ناحیه همپوشانی دارند. ارتعاشات کششی در فرکانس های cm^{-1} ۱۴۵۸، ۱۵۱۱ و ۱۶۰۹ مربوط به پیوندهای C=C آروماتیک و آلکنی دردارو تاموکسیفن است. جذب متوسط در فرکانس cm^{-1} ۱۳۶۱ به ارتعاشات کششی پیوند P=O در فسفولیپید-پگ تعلق دارد. جذب‌های قوی در

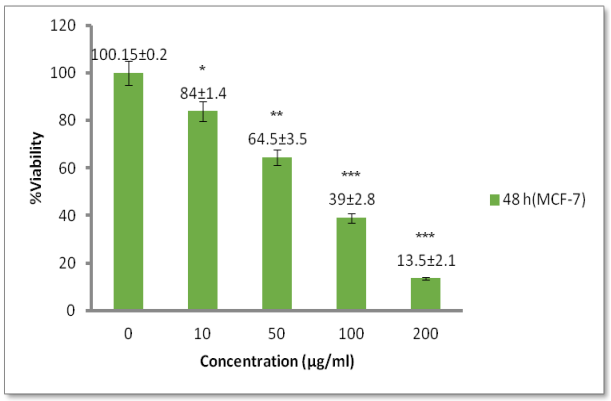
فرکانس‌های cm^{-1} ۱۱۰۸، ۱۱۳۵، ۱۱۸۲ و ۱۲۱۶ مربوط به پیوندهای C-O و پیک جذبی پهن در cm^{-1} ۳۳۸۰ به پیوند O-H در پلی لاکتاید و پگ ارتباط دارد. ارتعاشات کششی پیوندهای C-H آلیفاتیک و آروماتیک تاموکسیفن و پلیمرهای موجود در ساختار نانودارو در cm^{-1} ۲۸۷۴ و ۲۹۹۶ ظاهر شده است. ساختار شماتیک نانودارو به صورت زیر است.

نتایج سنجش سمیت سلولی به روش MTT assay: میزان توان زیستی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن توسط MTT assay بررسی گردید. جهت بررسی اثر ضد سرطانی این نانودارو، سلول‌های کشت داده شده با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوکپسول‌های تاموکسیفن به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. در هر کدام از غلظت های مورد مطالعه، میزان توان زیستی سلول‌های MCF-7 در مدت ۴۸ ساعت کاهش محسوسی داشته است. بیشترین اثر مهاری بر زنده ماندن سلول‌ها در غلظت ۲۰۰µg/mL (درصد توان زیستی: ۲/۱ ± ۱۳/۵) بوده است که نسبت به سایر غلظت ها بیشترین کاهش در توان زنده ماندن سلول‌ها را نشان می‌دهد. می‌توان نتیجه گرفت که اثر سایتوتوکسیک نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن بر سلول‌های MCF-7 وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش غلظت نانودارو، میزان سمیت آن بر سلول‌ها به طور معناداری افزایش پیدا کرده است.



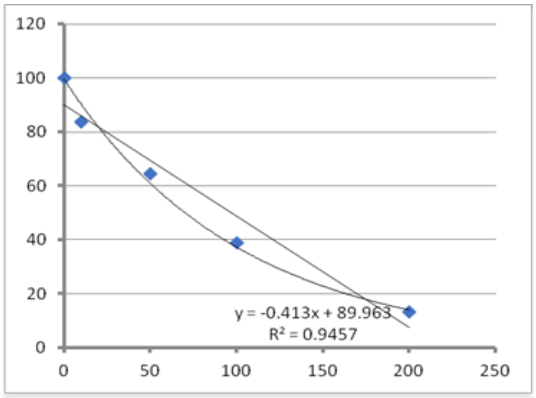
شکل ۱– ساختار نانوکپسول حامل تاموکسیفن

غلظت IC50 نانوکپسول تاموکسیفن در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، ۹۶/۷ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. همچنین درصد بارگذاری تاموکسیفن در ساختار نانوکپسول مطابق دستورالعمل سنتز، ۷/۸٪ می‌باشد. بنابراین مقدار تاموکسیفن موثر بارگذاری شده در غلظت IC50 نانوکپسول ، ۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر(۹۶/۷×۷/۸) محاسبه گردید.



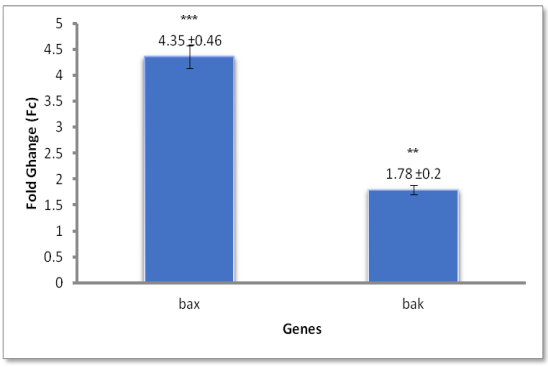
نمودار ۱– نتایج سنجش سمیت سلولی با روش MTT. داده‌ها به صورت میانگین درصد زیستایی± انحراف معیار بیان شده است (n = 3). $***P \leq 0.001$ $*P \leq 0.05$, $** P \leq 0.01$

غلظت IC50 نانوکپسول تاموکسیفن در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، ۹۶/۷ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. همچنین درصد بارگذاری تاموکسیفن در ساختار نانوکپسول مطابق دستورالعمل سنتز، ۷/۸٪ می‌باشد. بنابراین مقدار تاموکسیفن موثر بارگذاری شده در غلظت IC50 نانوکپسول، ۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر (۹۶/۷×۷/۸) محاسبه گردید.



نمودار ۲– مقدار IC50 بدست آمده

بررسی بیان ژن‌های Bax و Bak در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن: میزان بیان ژن‌های Bax و Bak در سلول‌های MCF-7 انکوبه شده به مدت ۴۸ ساعت با نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن، توسط واکنش RT-qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این نانوکپسول‌ها موجب افزایش بیان هر دو ژن پرو آپوپتوتیک Bax و Bak در سلول‌های MCF-7 تیمار شده گردید. بطوریکه بیان در سطح mRNA ژن Bax بیشتر از ژن Bak و به ترتیب معادل ۴/۳۵±۰/۴۶ و ۱/۷۸±۰/۲ برابر نسبت به گروه کنترل بدست آمد.



نمودار ۳- نتایج بررسی بیان ژن‌های Bax و Bak.
[$P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.01$:**] (n = 3)

بحث

نانودارو رسانی در درمان سرطان‌ها از چندین دهه گذشته به دلیل نقش بسیار موثری که در انتقال هدفمند و اختصاصی دارو به بافت تومور، کاهش سمیت دارو بر بافت‌ها و سلول‌های سالم و افزایش حلالیت داروها خصوصا داروهای نامحلول از خود نشان داده‌اند مورد توجه قرار گرفته است. تا امروز انواع مختلفی از نانو حامل‌ها مانند لیپوزوم‌ها، میسل‌ها و نانو کپسول‌ها با فرمول‌های مناسب ساخته شده‌اند. نانوکپسول‌ها سیستم های انتقالی وزیکولاری هستند که دارو در قسمت داخلی آنها لود شده و توسط یک غشا پلیمری احاطه می‌گردد. این نانو حامل‌ها به دلیل دارابودن ویژگی‌هایی مانند انتقال انتخابی و رهایش مداوم دارو در درمان انواع سرطان‌ها کاربرد فراوان دارند (Kathle *et al.*, 2018; Hekmat *et al.*, 2020). تاکنون از نانوکپسول‌ها جهت انتقال داروهای ضد سرطان بسیاری از جمله Cisplatin، Docetaxel و Methotrexate استفاده شده است و نتایج حاصل نشان داده اند که نانوکپسول‌ها حامل‌های بسیار مناسبی جهت انتقال هدفمند داروها به بافت تومور بوده و موجب بهبود کیفیت انتقال و کاهش سمیت داروها در بافت‌های سالم می‌گردند (Guven *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.*, 2018). تاموکسیفن دارویی بسیار مهم است که از حدود ۲۰ سال پیش جهت درمان ضد استروژنی در سرطان‌های پیشرفته و متاستاتیک سینه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو بسیار چربی دوست بوده و از طریق مهار نمودن اتصال استروژن به رسپتور خود در درمان سرطان سینه به کاربرده می‌شود. تاموکسیفن در درمان مراحل اولیه سرطان سینه یا سرطان سینه پس از یائسگی نیز بصورت درمان ادجوانت کاربرد دارد (Kathle *et al.*, 2018). در این تحقیق به بررسی اثر تاموکسیفن بارگذاری شده در نانوکپسولی که مطابق دستورالعمل (Behdarvand *et al.*, 2020) سنتز شده بود بر بیان ژن‌های پیش برنده آپوپتوز Bax و Bak در رده سلولی MCF-7 پرداخته شد. نتایج حاصل از بررسی میزان سمیت نانوکپسول در ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها به روش MTT نشان داد که سمیت آنها بر روی سلول‌ها با افزایش غلظت نانو دارو بطور معناداری افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان سمیت در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. این مقدار مهار رشد سلولی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانودارو در حدود ۶/۵ برابرسمیت در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲/۸ برابر سمیت در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو کپسول‌ها بوده است که نشان دهنده اثر سایتوتوکسیک وابسته به غلظت آنها می‌باشد. در این مطالعه میزان بیان ژن های Bax و Bak نیز تحت تاثیر نانوکپسول‌های تاموکسیفن مورد بررسی قرار گرفتند. Bax و Bak از پروتئین های بسیار مهم پیش برنده آپوپتوز هستند که علاوه بر نقش مهمی که در تکامل طبیعی بافت‌ها دارند، همکاری و عملکرد آنها در فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز از طریق افزایش نفوذ پذیری غشا خارجی میتوکندری، خروج سیتوکروم C، تشکیل آپوزوم‌ها و راه‌اندازی آبشار پیام رسانی ضروری است (Lindsten *et al.*, 2000; Papaliagkas *et al.*, 2007). در تایید نتایج حاصل از این تحقیق، بررسی‌های متعددی نشان داده‌اند که داروی تاموکسیفن از طریق افزایش بیان ژن‌های Bax و Bak نقش مهمی در القا فرایند آپوپتوز ایفا می کند و ترکیب آن با عوامل دارویی طبیعی مانند Carnosic acid که نوعی فنل است و نیز آنزیم هیستون داستیلاز که تنظیم‌کننده مهم پیام‌رسانی سلولی به واسطه گیرنده هورمونی استروئیدی است با افزایش بیان این ژن‌ها همراه می‌باشد (Thomas *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2017). حضور یک فعال کننده Gap Junction به نام PQ1 در کنار تاموکسیفن نیز با افزایش قابل توجه بیان Bax و فعالیت کاسپاز-۳ در سلول‌های سرطان سینه همراه است (Gakhar *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر، افزایش بیان هر دو ژن Bax و Bak مشاهده شد بطوریکه میزان بیان ژن Bax ۲/۵ برابر ژن Bak بوده و احتمالاً نانوکپسول تاموکسیفن با افزایش بیان این ژن‌ها و القا آپوپتوز سبب مرگ و میر سلول‌های MCF-7 گردیده است. همچنین IC50 بدست آمده در ۴۸ ساعت، ۹۶/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. با توجه به اینکه درصد داروی خام بارگذاری شده در این نانو کپسول، طبق محاسبات صورت گرفته در مطالعه اخیر (Behdarvand *et al.*, 2020) ۷٪/۸ می‌باشد پس مقدار موثر تاموکسیفن موجود در غلظت IC50، ۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست خواهد آمد که نشان دهنده افزایش سمیت نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن در مقایسه با تاموکسیفن آزاد بر روی سلول‌های MCF-7 (IC50 ، ۱۳/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به میزان ۱/۸ برابر می‌باشد. این مقدار افزایش سمیت در ۴۸ ساعت می‌تواند ناشی از القا آپوپتوز پس از افزایش بیان ژن‌های Bax و Bak باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان دادند که نانوکپسول‌های حاوی تاموکسیفن با افزایش بیان ژن‌های Bax و Bak در سلول‌های رده MCF-7 و احتمالا با القا آپوپتوز، موجب افزایش سمیت در این سلول‌ها شده و توان زیستی سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. در نتیجه استفاده از این نانو کپسول‌ها جهت دارورسانی موثرتر و با کاهش عوارض جانبی بر بافت‌های سالم، می‌تواند در درمان سرطان سینه (ER+) مفید باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) جهت حمایت اجرایی در انجام این تحقیق تقدیر و تشکر می‌کنند.

مراجع

Abdel-Hafiz, H.A. 2017. Epigenetic mechanisms of tamoxifen resistance in luminal breast cancer. Diseases, 5(3): 16.

Behdarvand, N., Torbati, M.B. and Shaabanzadeh, M. 2020. Tamoxifen-loaded pla/dppe-peg lipid-polymeric nanocapsules for inhibiting the growth of estrogen-positive human breast cancer cells through cell cycle arrest. Journal of Nanoparticle Research, 22(9): 1-15.

De Oliveira, C.P., Büttenbender, S.L., Prado, W.A., Beckenkamp, A., Asbahr, A.C., Buffon, A., Guterres, S.S. and Pohlmann, A.R. 2018. Enhanced and selective antiproliferative activity of methotrexate-functionalized-nanocapsules to human breast cancer cells (mcf-7). Nanomaterials, 8(1): 24.

Dong, P., Rakesh, K., Manukumar, H., Mohammed, Y.H.E., Karthik, C., Sumathi, S., Mallu, P. and Qin, H.-L. 2019. Innovative nano-carriers in anticancer drug delivery-a comprehensive review. Bioorganic chemistry, 85: 325-336.

Gakhar, G., Hua, D.H. and Nguyen, T.A. 2010. Combinational treatment of gap junctional activator and tamoxifen in breast cancer cells. Anti-cancer drugs, 21(1): 77.

Guven, A., Rusakova, I.A., Lewis, M.T. and Wilson, L.J. 2012. Cisplatin@ us-tube carbon nanocapsules for enhanced chemotherapeutic delivery. Biomaterials, 33(5): 1455-1461.

Han, N.-n., Zhou, Q., Huang, Q. and Liu, K.-j. 2017. Carnosic acid cooperates with tamoxifen to induce apoptosis associated with caspase-3 activation in breast cancer cells in vitro and in vivo. Biomedicine & Pharmacotherapy, 89: 827-837.

Hekmat, A., Afrough, M., Hesami Tackallou, S. and Ahmad, F. 2020. Synergistic effects of titanium dioxide nanoparticles and paclitaxel combination on the DNA structure and their antiproliferative role on mda-mb-231cells. Journal of Nanoanalysis: -. DOI 10.22034/jna.2020.1869287.1141.

Hekmat, A. and Roshani, Z. 2020. The effects of silver nanoparticles coatings in effective drug delivery: Human serum albumin interaction. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 10(2): 2294-2307.

Hultsch, S., Kankainen, M., Paavolainen, L., Kovanen, R.-M., Ikonen, E., Kangaspeska, S., Pietiäinen, V. and Kallioniemi, O. 2018. Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. BMC cancer, 18(1): 1-14.

Kathle, P.K., Gautam, N. and Kesavan, K. 2018. Tamoxifen citrate loaded chitosan-gellan nanocapsules for breast cancer therapy: Development, characterisation and in-vitro cell viability study. Journal of microencapsulation, 35(3): 292-300.

Kim, R. 2005. Unknotting the roles of bcl-2 and bcl-xl in cell death. Biochemical and biophysical research communications, 333(2): 336-343.

Kumari, P., Ghosh, B. and Biswas, S. 2016. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. Journal of drug targeting, 24(3): 179-191.

Lila, A.S.A., Kiwada, H. and Ishida, T. 2014. Selective delivery of oxaliplatin to tumor tissue by nanocarrier system enhances overall therapeutic efficacy of the encapsulated oxaliplatin. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 37(2): 206-211.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.-X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P. and Frauwirth, K. 2000. The combined functions of proapoptotic bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of

multiple tissues. Molecular cell, 6(6): 1389-1399.

Nankali, E., Shaabanzadeh, M. and Torbati, M.B. 2020. Fluorescent tamoxifen-encapsulated nanocapsules functionalized with folic acid for enhanced drug delivery toward breast cancer cell line mcf-7 and cancer cell imaging. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 393(7): 1211-1219.

Olsen, S.N., Wronski, A., Castaño, Z., Dake, B., Malone, C., De Raedt, T., Enos, M., DeRose, Y.S., Zhou, W. and Guerra, S. 2017. Loss of rasgap tumor suppressors underlies the aggressive nature of luminal b breast cancers. Cancer discovery, 7(2): 202-217.

Papaliagkas, V., Anogianaki, A., Anogianakis, G. and Ilonidis, G. 2007. The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. Hippokratia, 11(3): 108.

Saxena, M., Kryworuchko, M. and Kumar, A. 2009. Anti-apoptotic genes in the survival of monocytic cells during infection. Current genomics, 10(5): 306-317.

Singh, S.K., Banala, V.T., Gupta, G.K., Verma, A., Shukla, R., Pawar, V.K., Tripathi, P. and Mishra, P.R. 2015. Development of docetaxel nanocapsules for improving in vitro cytotoxicity and cellular uptake in mcf-7 cells. Drug development and industrial pharmacy, 41(11): 1759-1768.

Thomas, S., Thurn, K.T., Biçaku, E., Marchion, D.C. and Münster, P.N. 2011. Addition of a histone deacetylase inhibitor redirects tamoxifen-treated breast cancer cells into apoptosis, which is opposed by the induction of autophagy. Breast cancer research and treatment, 130(2): 437-447.

Wang, Q., Jiang, J., Ying, G., Xie, X.-Q., Zhang, X., Xu, W., Zhang, X., Song, E., Bu, H. and Ping, Y.-F. 2018. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of erα36+ breast cancer by upregulating aldh1a1 in cancer cells. Cell research, 28(3): 336-358.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 3, 2021 Pages 1-7

Research Article

The effect of tamoxifen nanocapsules on the expression of Bax and Bak genes in MCF-7 cell line

Maryam Bikhof Torbati [1,3*], Masoud Shaabanzadeh[2] and Mahzad Motallebi[3]

[1] Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2] Department of Chemistry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

[3] Young Researchers and Elite Club, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence to Maryam Bikhof Torbati, Ph.D., Maryam.bikhof@gmail.com, bikhof@iausr.ac.ir

Received 8th August 2020 Revised 15th November 2020 Accepted 12th February 2021

Abstract

Introduction and Aim: Drug nanocarriers have been used extensively in cancer therapy due to their features like the ability to targeting drug transmission, increasing drug solubility, and reducing the drug cytotoxic effects on healthy tissues. The purpose of this study was to investigate the effects of Tamoxifen nanocapsules on the expression of Bax and Bak genes in MCF-7 cell lines.

Methods: In this study, the nanocapsule structure was confirmed by FTIR spectroscopy and the effects of Tamoxifen nanocapsules on cell bioactivity were evaluated by MTT assay at concentrations of 10, 50, 100, and 200 µg/mL after 48 hours. Real-time PCR was used to analyze the expression of Bax and Bak genes and data were analyzed using SPSS (23.0) software.

Results: According to the MTT assay, higher concentrations of Tamoxifen nanocapsules decreased cell bioactivity in a dose-dependent manner and the highest toxicity of nanocapsules was at the concentration of 200 µg/mL. The expression level of Bax and Bak genes in MCF-7 treated cells after 48 hours indicated the induction of apoptosis in cells. The results revealed a 1.8-fold increase in cytotoxicity of Tamoxifen nanocapsules compared to free Tamoxifen.

Conclusion: The apoptosis induction as a result of increased expression of Bax and Bak genes and enhanced cytotoxicity, makes Tamoxifen nanocapsules a promising treatment for breast cancer therapy compared to free Tamoxifen.

***Keywords*:** Tamoxifen, Nanocapsules, Bax, Bak, MCF-7 cells, Breast Cancer