اولین کنگره ملی رویکردهای نوآورانه در سیستم بیولوژی و داروسازی و صنایع غذایی

تهران، دی ۱۴۰۰

Synthesis and determination of apoptotic effect of calcium nanofluoride on breast cancer cells

Haniyeh Motie Arani[۱], Fereshteh Atabi[*1], Saeed Hesami Tackallou[2], Hakimeh Zali[3], Minoo Shahani[1]

[1]*Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of advanced Sciences and technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[2]*Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*
[3]*Assistant Professor School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

Abstract

Background & objectives: Breast cancer is one of the most common diseases in women around the world and has many causes. Calcium regulation plays an essential role in cancer cell tumorigenesis and cell proliferation, migration, metastasis and resistance to apoptosis. Nanocalcium inhibits tumor by changing the pH of cancer cells. In this study, calcium nanofluoride was synthesized and evaluated as one of the treatment candidates and reducing symptoms in breast cancer.

Materials & methods: The mixture of calcium carbonate was sonicated with hydrogen fluoride and the nanoparticles were confirmed by DLS and TEM techniques. MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474 and healthy MSC cancer cells were cultured. MTT test was also performed to determine the IC_{50} of the drug and to perform tests for apoptosis, cell cycle, abrasion, hemorrhage, invasion and colonization.

Results: The IC50 level of calcium nanofluoride treatment was 1.2 mg / ml using MTT test, but 0.6 mg / ml was used for apoptosis and cell cycle tests with an apoptosis rate of 2.8% in MDA cells. MB-23117% in MCF-7 cells and 4% in BT cells showed no significant extent. Also, MDA-MB-231 cell cycle in G1 and G2 stages showed an increase of 6.7% and 1.01%, respectively, and in S stage showed a decrease of 5.79% without significant extent. MCF-7 decreased by 11.46 and 6.43 percent in G1 and G2 stages, respectively, and increased by 22.52 percent in S stage. BT in stages G1 and G2 shows a 64% increase.

Conclusion: Calcium nanofluoride increased cell death by initiating apoptosis, showed good performance in inhibiting and reducing colonization, closure of the scratch site, invasion, sphericity of breast cancer cells of MDA-MB-231 cell line.

Keywords: Breast cancer, MDA-MB231 cell line, Calcium nanofluoride.
Correspondence to: Fereshteh Atabi, Saeed Hesami Tackallou
Tel: +98 912 240 5285, +98 912 3162391
E-mail: f.atabi@iautmu.ac.ir, tackallou@gmail.com

ORCID ID:

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

سنتز و تعیین اثر آپوپتوتیک نانوفلورید کلسیم بر روی سلول های سرطانی پستان

حانیه مطیع آرانی[۱]، فرشته عتابی*[۱]، سعید حسامی تکلو*[۲]،حکیمه زالی[۳]، مینو شاهانی[۱]

۱.گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم و فن آوری نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دپارتمان مهندسی بافت و سلولی کاربردی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

آدرس نویسندگان مسئول:

تهران - خیابان شریعتی - خیابان خاقانی - دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، فرشته عتابی

(**Email:** f.atabi@iautmu.ac.ir)

تهران- بزرگراه اشرفی اصفهانی- بالاتر از میدان پونک- بلوار امام حسن- مجتمع دانشگاهی آیت الله هاشمی رفسنجانی، سعید حسامی

(**Email**: tackallou@gmail.com)

۱. فرشته عتابی **ORCID:** 0000-0002-6051-2644

۲. سعید حسامی تکلو **ORCID** 0000-0002-9492-3038**:**

۳. حکیمه زالی **ORCID** 0000-0003-2770-5759 **:**

۴. مینو شاهانی **ORCID:** 0000-0003-1302-8312

۵. حانیه مطیع آرانی **ORCID:** 0000-0002-7950-3297

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

چکیده

سابقه و اهداف: سرطان پستان از بیماری‌های شایع زنان در سراسر جهان می‌باشد و دارای عوامل متعددی است. تنظیم کلسیم در تومور زایی سلول های سرطانی و تکثیر سلولی، مهاجرت، متاستاز و مقاومت آپوپتوز نقش ضروری دارد. نانوکلسیم با تغییر در PH سلول های سرطانی باعث مهار تومور می گردد.

روش بررسی: مخلوط کربنات کلسیم با فلورید هیدروژن سونیکه شد و نانوذره با تکنیک های DLS و TEM تایید شد. سپس سلول های سرطانی MCF-7، MDA-MB-231، MDA-MB-468، BT-474 و سلول سالم MSC کشت داده شد. همچنین تست MTT برای تعیین IC_{50} دارو و انجام ادامه تست های آپوپتوز، چرخه سلولی، خراشیدگی، اسفیرزایی، تهاجم و کلنی زایی انجام شد.

یافته ها: میزان IC_{50} تیمار نانوفلوریدکلسیم با استفاده از تست MTT برابر ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر گردید اما برای تست های آپوپتوز و چرخه سلولی از ۰/۶میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد که میزان آپوپتوز۲/۸درصد در سلول های-MDA, MB-231۱۷درصد در سلول های MCF-7و۴درصد در سلول هایBT بدون میزان معنادار نشان داد. همچنین چرخه سلولی MDA-MB-231در مراحلG1 و G2 به ترتیب افزایش۶/۷ و۱/۰۱درصد و در مرحله S کاهش۵/۷۹ را بدون میزان معناداری را نشان داد. MCF-7 نیز در مراحلG1 و G2به ترتیب کاهش۱۱/۴۶و۶/۴۳درصد، در مرحلهS افزایش۲۲/۵۲درصد داشت. BT در مراحلG1 و G2 افزایش ۶۴ درصد را نشان می دهد.

نتیجه گیری: نانوفلورید کلسیم با راه اندازی آپوپتوز، موجب افزایش مرگ سلولی گردیده، عملکرد خوبی در مهار و کاهش کلنی زایی، بستن محل خراشیدگی، تهاجم، اسفیرزایی سلول های سرطان پستان رده سلولی MDA-MB-231 از خود نشان داد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، رده سلولی MDA-MB231، نانوفلورید کلسیم

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

مقدمه

سرطان پستان اولین عامل مرگ و میر در جمعیت زنان و دومین عامل مرگ و میر در دنیا پس از سرطان ریه محسوب می‌گردد(۱). مشخصات ده گانه آن شامل ۱.تکثیرپایدار ۲. فرارازسرکوب۳. مقاومت در برابر مرگ سلولی ۴. جاودانگی تکثیر ۵.تخریب ۶.التهاب ترومبوز تومور ۷.فعال شدن تهاجم و متاستاز ۸.القای آنژیوژنز۹.بی‌ثباتی ژنوم و ۱۰.تغییر متابولیسم، موجب تغییر فیزیولوژی سلول می گردد(۲). جمعیت نادر سلول های بنیادی سرطان پستان در شروع، تکثیر، تهاجم و عود سرطان نقش مهمی دارند(۳). این امر موجب مرگ و میر حدود ۱ در ۸ (۱۲/۵درصد) زنان است که همچنان درحال افزایش می باشد. مطابق آمار موجود در سال ۲۰۱۸، حدود ۶۰۰۰۰۰ نفر از ۲ میلیون نفر در اثر ابتلا به سرطان پستان درگذشتند. پیشروی سرطان پستان دارای مراحل چهارگانه می باشد. مرحله صفر از تومور موضعی در پستان شروع و تا مرحله اول همچنان ادامه میابد. مرحله دوم به غدد لنفاوی نزدیک پستان رسیده. مرحله سوم به پوست، دیواره یا غدد لنفاوی داخلی گسترش می یابد. در مرحله چهارم به عنوان سرطان تهاجمی از پستان به سایر اعضای بدن متاستاز می دهد. میزان بقای ۵ ساله کلی فرد در مرحله I و II بیش از۹۵درصد، مرحله III به ۷۲ درصد و مرحله چهارم به ۲۲درصد کاهش می یابد. حدود ۹۰ درصد مرگ و میر سرطان پستان همراه با متاستاز است (۱, ۴). در حال حاضر جدیدترین روش درمانی سرطان، نانودارو می باشد(۵). اما روش های درمانی متفاوتی که تا به امروز استفاده شده است شامل جراحی، رادیوتراپی موضعی و فیزیوتراپی است و اکثر بیماران پس از جراحی و برداشتن تومور، از رادیوتراپی، فیزیوتراپی، هورمون‌های کمک کننده یا داروهای شیمی درمانی استفاده می‌کنند. به منظور از بین بردن سلول‌های توموری باقی مانده از میکرومتاستاتیک، به طور همزمان از روش درمانی رادیوتراپی و شیمی درمانی استفاده می‌گردد(۱, ۶). کانال های عمدتاً فعال و بدون ولتاژ کلسیم، در مسیر پیام رسانی کلسیم دخیل بوده، موجب افزایش فعالیت تومور می شوند(۷). نانودارو با گردش طولانی مدتی که در جریان خون دارد، باعث می شود دارو با کارایی بیشتری به بافت هدف برسد (۸). طی بررسی محققان در رابطه با میزان اسیدی بودن درون سلول ها به منظور پیدا کردن راهکارهایی به منظور بهبود اثر روش های درمانی متداول در سرطان، آنها دریافتند که به طور معمول pH سلول های سرطانی پایین تر از سلول های طبیعی می باشد(۹). بدین ترتیب نانوکربنات کلسیم می تواند با افزایش pH، باعث تغییر در عملکرد برخی از آنزیم ها یا بافت‌های حساس به pH شود که باعث مهار رشد تومور می شود(۱۰).

مواد و روش ها

کلیه مواد مورد استفاده مانند محیط کشت DMEM، FBS، Pen/Strep و ... در این تحقیق از نوع مرغوب تهیه شده و اغلب از برند Merck و Sigma Aldrich خریداری شده اند. همچنین سلول های سرطانی از انستیتو پاستور خریداری گردیدند. تمامی این تست ها در آزمایشگاه دانشکده علوم و فناوری های نوین دانشگاه شهید بهشتی پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1398.264 انجام داده شد.

سنتز نانوفلورید کلسیم

برای سنتز ۰/۵ گرم نانوفلورید کلسیم، ۱/۲۵ گرم کربنات کلسیم با ۰/۵ میلی‌لیتر فلورید هیدروژن مخلوط گردید. سپس ۱۵ میلی‌لیترآب به این مخلوط اضافه شد. بعد از۲ ساعت سونیکه شدن به نانوفلوریدکلسیم تبدیل گردید. سپس با استفاده از محیط کشت نانوفلورید کلسیم با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید و مورد استفاده واقع شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

DLS[1]

پس از سنتز و آماده سازی نمونه نانوفلورید کلسیم ازروش غیرمخرب و سریع DLS برای تعیین توزیع ذرات کمتراز نانومتر و بیشتر از میکرون در محلول ها و سوسپانسیون استفاده گردید. با استفاده از این تکنیک اندازه نانوذرات و ضریب توزیع PdI، با استفاده از تکنیک DLS مشخص گردید. همچنین Z-Average، اندازه ذرات بر اساس Number، Volumeو Intensity، پتانسیل زتا بر حسبmV نیز بدست آمد. میزان Z-Average برابر ۱۲۴۹(d.nm)، اندازه ذرات بر اساس Number، VolumeوIntensity برابر ۱۰۰(d.nm)، پتانسیل زتا برابر ۳/۹۹ برحسبmV نیز بدست آمد.

TEM[2]

به منظور بررسی ریخت شناسی و تأیید ساخت نانوذرات، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس ازخشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM تصویر برداری گردید.

کشت سلول سرطانی

ابتدا سلول های سرطانی MCF-7، MDA-MB-231، MDA-MB-468، BT-474 و سلول سالم MSC کشت داده شد. پس از گذشت چندین روز از انجام کشت آن و پر شدن کف پلیت ها از سلول های فوق نیز از آن برای انجام تست ها استفاده گردید.

تستMTT[۳] و تعیین IC_{50}[4]

برای ارزیابی میزان مرگ و میر سلول ها تحت تأثیر یک دارو و بدست آوردن IC_{50} از روش رنگ سنجی MTT استفاده گردید. پس از کشت سلول ها در محیط غنی شده DMEM با FBS ده درصد، درسه پلیت ۹۶ خانه در ۷ستون با ۴ مرتبه تکرار در هر چاهک تعداد $۱۰^۴$سلول سرطانیMDA-MB-231 قرارداده شد. سپس، دارو با غلظت های متفاوت به صورت سریالی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول های سرطانی قرار گرفت. برروی سلول ها۱۰۰میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از ۲۴ساعت درون انکوباتور۳۷درجه سانتیگراد تحت تأثیر CO_2 ۵ درصد، نانوفلورید کلسیم با غلظت۱۰میلی‌گرم در میلی لیتر به حجم های (۰و۳و۶ و۱۲و۲۴ و۵۰ و۱۰۰درصد حجمی(v/v)) در محیط کشت روی سلول ها ریخته شد. بدین ترتیب حجم نهایی مجموع میزان محیط کشت و نانوفلورید کلسیم در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر گردید. درنهایت درصد زنده مانی سلول ها با استفاده از واکنشگرMTT محاسبه گردید. بدین ترتیب که پس از طی زمان مقرر، به مایع رویی سلول ها ۱۰ میکرولیتر محلولMTT اضافه شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، محیط رویی سلول ها کاملاً با احتیاط برداشته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه و پی پتاژ گردید. پس از حل شدن بلورهای فورامازون تشکیل شده در DMSO، محلول بنفش رنگ ایجاد شده درطول موج۵۷۰ نانومتر خوانش شد و درصد بقای سلول با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید(۱۵). برای بدست آوردن IC_{50}، از برنامه اکسل استفاده گردید.

رابطه (۱):

---

[1] *Dynamic Light Scattering*
[2] *Transmission Electron Microscope*
3 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
[4] *half maximal inhibitory concentration (IC50)*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

۱۰۰× (میانگین جذب نمونه های کنترل منفی / میانگین جذب نمونه های تیمارشده)= درصد بقای سلول

تست AO/PI

برای تعیین IC_{50} بر روی سلول های سرطانی MDA-MB-468، BT-474، سلول مزانشیمی MSC و بافت سرطانی Hodgkin، تستAO/PI انجام گردید. روش کار مشابه تست MTT انجام شد. لیکن از رنگ فلورسنت AO/PI استفاده گردید. درنهایت در زیر میکروسکوپ فلورسنت میزان زنده مانی سلول بررسی گردید و تصویربرداری انجام شد(۱۱).

تست آپوپتوز[5]

تست آپوپتوز بر روی سلول های MDA-MB-231، MCF-7 و BT-474 انجام شد. به خانه های مخصوص کنترل فقط محیط کشت و به خانه های مخصوص تیمار با دارو، نانوفلورید کلسیم مطابق IC_{50} بدست آمده، اضافه گردید. بعد از۴۸ساعت با استفاده از تریپسین سلول‌ها جداسازی گردیدند. سپس سلول ها با ۲ میلی‌لیتر محلولPBS به مدت۵ دقیقه با سرعت RPMI۱۵۰۰سانتریفیوژ گردید تا محیط سلول‌ها کاملاً حذف گردند و با محلول Binding buffer 1X به حجم۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به دلیل همپوشانی دو رنگ FITC و PI، جهت تصحیح همپوشانی، نمونه‌ها در چهار لوله آزمایش تقسیم گردیدند: یک لوله بدون رنگ، یک لوله حاوی رنگ Annexin V-FITC، یک لوله حاوی رنگ PI و لوله آخر حاوی هر دو رنگFITC و PI قرار داده شد. سپس لوله بدون رنگ و لوله حاوی رنگ PI در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. همچنین به لوله های حاوی رنگ Annexin V-FITC و لوله حاوی هر دو رنگ FITC وPI، ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه دردمای۴ درجه سانتیگراد درمحیط تاریک انکوبه گردیدند. پس از اتمام انکوباسیون به لوله ها ۱ میلی‌لیتر از محلولBinding buffer 1X اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با سرعتRPMI ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گشت. به رسوب سلولی بدست آمده ۵۰۰ میکرولیتر از محلولBinding buffer 1X اضافه گردید. در زمانش خوانش به لوله های حاوی رنگ PI و هر دو رنگ FITCو PI، ۳ میلی لیتر رنگ PI اضافه گردید و توسط دستگاه فلوسایتومتری میزان آپوپتوز اندازه گیری گشت(۱۵).

چرخه سلولی[6]

برای انجام آزمایش چرخه سلولی تا مرحله جداسازی سلول ها، مشابه روش آپوپتوز عمل شد. به سلول‌های رسوب کرده ته فالکون ۵۰ میکرولیترPBS سرد اضافه گردید و به آرامی ورتکس گشت. سپس۱میلی لیتر اتانول۷۰ درصد سرد به عنوان فیکساتور، به فالکون ها اضافه و ورتکس گردید. فالکون‌ها به آرامی وبا دقت تکان داده شدند و به مدت۲ ساعت در یخچال نگهداری گردیدند. سپس فالکون ها سانتریفیوژ شده، اتانول موجود در آنها تخلیه گردید. رسوب با ۱میلی لیترPBS شستشو داده شد. سپس ۱ میلی لیترمحلول PI MASTER MIX، حاوی ۴۰ میکرولیترPI، ۱۰ میکرولیترRNase، ۹۵۰ میکرولیترPBS به سلول‌ها اضافه گشت. نسبت نهایی سلول ها به محلول فوق ثابت بوده و غلظت نهایی سلول ها Cell/ml 5×10^5 بود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای محیط، سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری خوانش شدند. داده‌های حاصل با نرم افزار FlowJo آنالیز شدند (۱۵).

[5] *Apoptosis Test*
[6] Cell cycle

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

تست خراش[7]

برای انجام این تست از سلول MDA- MB231 به دلیل دارا بودن شدت مهاجرت بالا استفاده گردید. برای انجام آزمایش خراش، تعداد 10^6سلول MDA-MB231 درون هر خانه از پلیت ۶ خانه ریخته شد. پس از۲۴ساعت مطابق غلظت IC_{50} بدست آمده در هردو خانه، ۸۸۰ میکرولیتر محیط کشت ، ۱۲۰میکرولیترکربنات کلسیم و ۱۲۰میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت با نوک تیپ کریستالی در وسط هر خانه خراشی به صورت قطری ایجاد گردید. سپس در زمان ۰ و۲۴ ساعت همه خانه ها فیکس ورنگ آمیزی گردیدند و میزان مهاجرت سلول ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و عکس برداری گردید. در تست خراش از رابطه (۲) استفاده گردید(۱۵):

رابطه (۲): درصد بسته شدن خراش =[At-0h_At-Δh)/ At-0h] ×100

تست تهاجم سلولی[8]

برای انجام این تست، سلول های MDA-MB-231 در یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. سپس به خانه های مخصوص کنترل، فقط محیط کشت DMEM و به خانه های مربوط به تیمار با دارو، ۱۲۰ میکرولیتر کربنات کلسیم و۱۲۰ میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت رویی آن تخلیه و به سلول محیط کشت بدونFBS اضافه گردید و به مدت۱۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. همزمان با کشت سلول، در ۱۲تا از خانه های پلیت ۲۴ خانه فیلترهای دارای منافذ ۸ میکرومتری قرار داده شدند. سپس فیلترها با لایه ای از ماتریژل با غلظت ۰/۵میلی گرم بر میلی لیتر پوشانیده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت درون فیلترها سلول ها کشت داده شده در محیط کشت بدون FBS به مقدار ۲۵۰۰۰ سلول از هر سه گروه کنترل، نانوفلورید کلسیم و کربنات کلسیم ریخته شد. در قسمت زیرین فیلترها محیط کشت حاویFBS ریخته شد و در قسمت رویی فیلترها محیط کشت فاقد FBS ریخته شد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت سلول ها هر دو چاهک با و بدون ماتریژل با سوآپ از کف فیلتر جدا شده و سلول های باقیمانده فیکس و رنگ آمیزی گردیدند. درصد تهاجم سلولی به کمک رابطه (۳) محاسبه گردید(۱۵).

رابطه (۳):

$$\text{درصد تهاجم} = \frac{\text{میانگین تعداد سلول های مهاجم(میانگین تعداد سلول های عبورکرده ازفیلترهای پوشیده شده باماتریژل)}}{\text{میانگین تعداد سلول های مهاجر(میانگین تعداد سلول های عبورکرده ازفیلترهای بدون ماتریژل)}} \times 100$$

تست اسفیروئید[9]

پس از اینکه در سه فلاسک سلول های MDA-MB-231 کاملاً رشد داده شدند، محیط روی سلول ها با ۶ میلی لیترمحیط کشت تازه معاوضه گردید. به خانه های مخصوص کنترل، هیچ تیماری اضافه نگردید و به خانه های مخصوص تیمار با دارو، مطابق غلظت IC_{50} بدست آمده ۹۰میکرولیتر کربنات کلسیم و۹۰میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت خانه ها با PBS شستشو داده شدند و تریپسینه گردیدند. سپس کف چاهک های پلیت ۱۲خانه با آگار ۱درصد پوشانیده شد و روی آن ها۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید. به تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک ژل آگار ریخته شد. در آخرپلیت به مدت چند روز برای بررسی روند اسفیر زایی از نظر تعداد و اندازه درون انکوباتور قرار داده شد. جهت محاسبه

[7] Scratch assay
[8] Invasion assay
[9] Sphere Formation Assay

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

درصداسفیرزایی سلولی، محیط حاوی اسفیرها ازظرف کشت به یک لوله استریل منتقل گردید. تجمعات سلولی با پی پتاژ آرام، به طور یکنواخت پراکنده گردیدند وتنها اسفیرها باقی ماندند. مقدار۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی اسفیرها برداشته و در یک ظرف غیر چسبنده قرارداده شد. بعد از سه مرتبه تکرار این مرحله، تعداد اسفیرها با استفاده از یک استریومیکروسکوپ لنز۴ (بزرگنمایی۴۰) شمارش گردیدند و میانگین سه بار شمارش بدست آمد. درنهایت با استفاده از رابطه (۴)درصد اسفیرزایی محاسبه گردید(۱۲):

فرمول (۴):

درصد اسفیرزایی = (تعداد اسفیرهای تشکیل شده/سلول های اولیه کشت داده شده)×۱۰۰

تست کلونی زایی[10]

جهت انجام این تست از سلول سرطانی MDA-MB-231 استفاده گردید. درون هرچاهک۹۶ خانه تعداد $۱۰^۴$ سلول قرار داده شد و با محیط کشت به حجم۱۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. پس از گذشت ۲۴ساعت و رشد کامل سلول ها به خانه مخصوص کنترل فقط محیط کشت و به خانه های مربوط به تیمار با دارو بطور جداگانه، ۱۲میکرولیتر کربنات کلسیم و ۱۲میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. بعداز۴۸ ساعت هرکدام ازخانه‌ها با PBS شستشو داده شدند و به کمک تریپسین سلول ها جداسازی و شمارش گردیدند. سپس در هر پلیت مقدار ۲۰ میکرولیترمحلول حاوی رسوب سلولی و ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباتورنگهداری گردید. خانه‌ها فیکس و رنگ آمیزی گردیدند. پس از خشک شدن کامل خانه ها، سلول ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی۴۰بررسی گردیدند(۱۳).

روش آماری

از T-Test برای مقایسه داده های بین دوگروه استفاده شد و میزان معنی داری P کمتر از ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شدکه به ترتیب با علامت های*، ** و *** نشان داده شد.

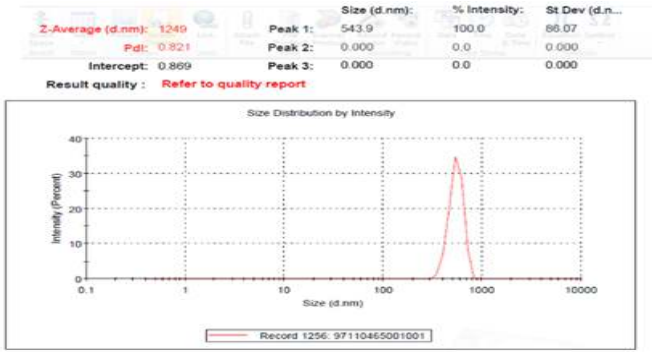
یافته ها و نتایج

نتایج DLS

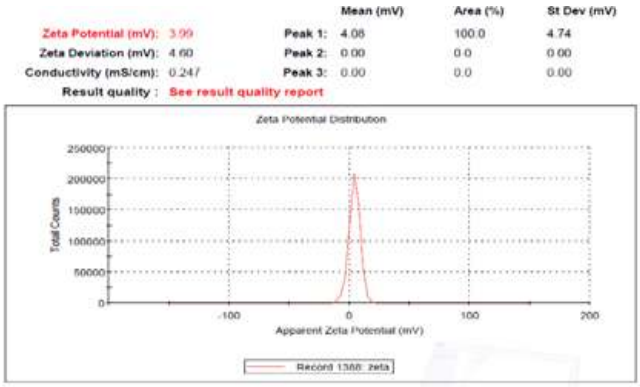
در نمودار۱ اندازه نانوفلورید کلسیم مقدار۸۶± ۵۴۳ نانومتر نمایش داده شده است. و در نمودار۲ مقدار پتانسیل زتا ۴/۷ MV ±۴/۰ مشاهده می شود.

[10] Colony assay

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



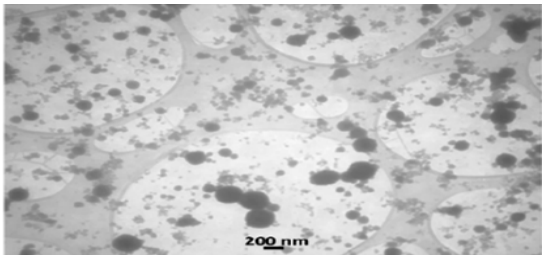
نمودار ۱. اندازه ذرات نانوفلوریدکلسیم با استفاده ازتکنیک DLS. اندازه نانوذرات فلورید کلسیم ۸۶±۵۴۳ نانومتر بدست آمد.



نمودار۲. نمودار توزیع پتانسیل زتا بر اساس نتایج DLS. پتانسیل زتا نانوذرات فلورید کلسیم MV ۴/۷±۴/۰ بدست آمد.

نتایج TEM

در شکل۱ نتایج میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می دهد، نانوذرات سنتز شده قطربین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند.

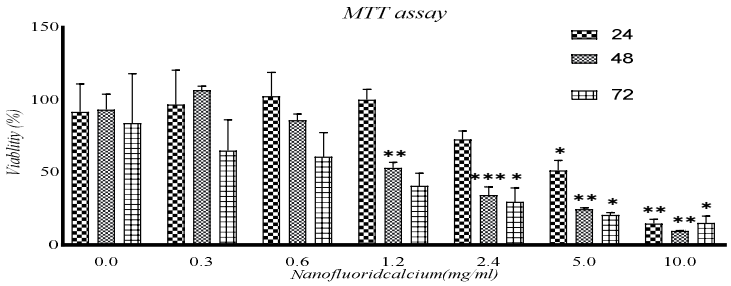


شکل۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوفلورید کلسیم با بزرگنمایی ۲۰۰نانومتر. قطر نانوذرات سنتز شده بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر نشان داده شده است.

نتایج تست MTT

نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول MDA-MB-231 در تیمار با نانوفلورید کلسیم در غلظت های (۰و۰/۳و ۰/۶ و۱/۲ و۲/۴ و۵/۰ و۱۰/۰ میلی گرم در میلی لیتر) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت درنمودار۳ نشان داده شده است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



نمودار۳. مقایسه میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231درغلظت‌های مختلف نانوفلورید کلسیم. توضیحات در متن آورده شده است.

علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۵$ می باشد.

علامت** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۱$ می باشد.

علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۰۱$ می باشد.

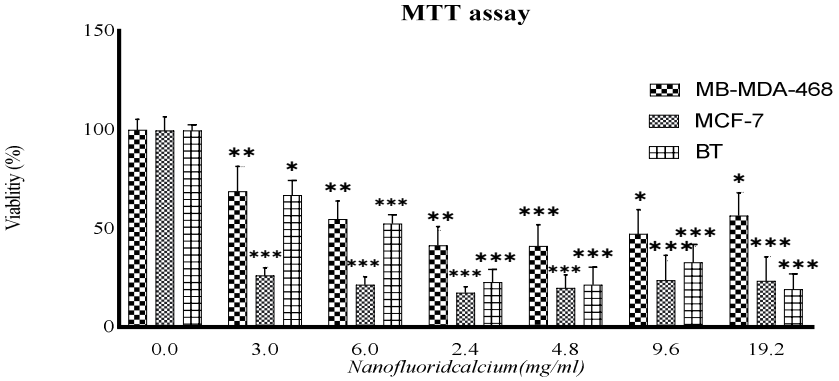
از نمودار تست MTT برای محاسبه IC_{50} در سه زمان استفاده شد و نمودار۳ نشان‌دهنده IC_{50} به دست‌آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 می‌باشد. نتایج آنالیز ۵۰ درصد زنده مانی در ۲۴ ساعت برابر ۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر بود نتیجه ۵۰ درصد زنده مانی در ۴۸ ساعت برابر با غلظت ۱/۲ بود و در۷۲ ساعت برابر ۱/۰۵ بود.

مقادیر بدست آمده IC_{50} برای سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول۱ مقایسه شده است.

جدول۱. مقایسه مقادیر بدست آمده IC50 برای سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

زمان (ساعت)	IC50 (میلی گرم درمیلی لیتر)
۲۴	۴/۸
۴۸	۱/۲
۷۲	۱/۰۵

نتایج تست MTT برروی رده‌های سلولی MDA-MB-468، BT-474 وMCF-7 در غلظت های(۰و ۰/۳و ۰/۶ و ۱/۲ و۲/۴و ۲/۵و۴/۸ و ۵ و۹/۶و ۱۰ و۱۹/۲میلی‌گرم در میلی لیتر) نانوفلورید کلسیم در نمودار۴ نشان داده شده است.



نمودار۴. مقایسه میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی رده های MDA-MB-468، BT-474 وMCF-7

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

در غلظت های مختلف نانوفلورید کلسیم.

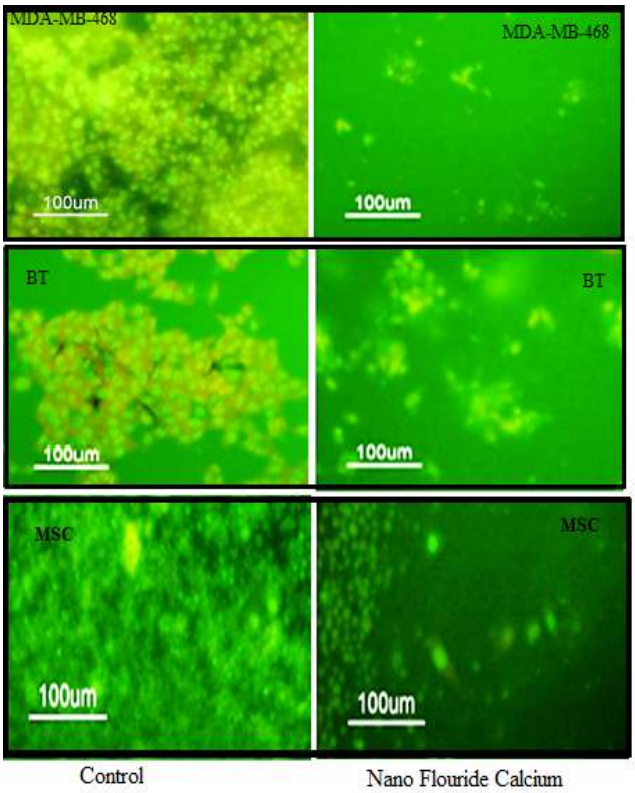
علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۵$ می باشد.

علامت** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۱$ می باشد.

علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح$p<۰/۰۰۱$ می باشد.

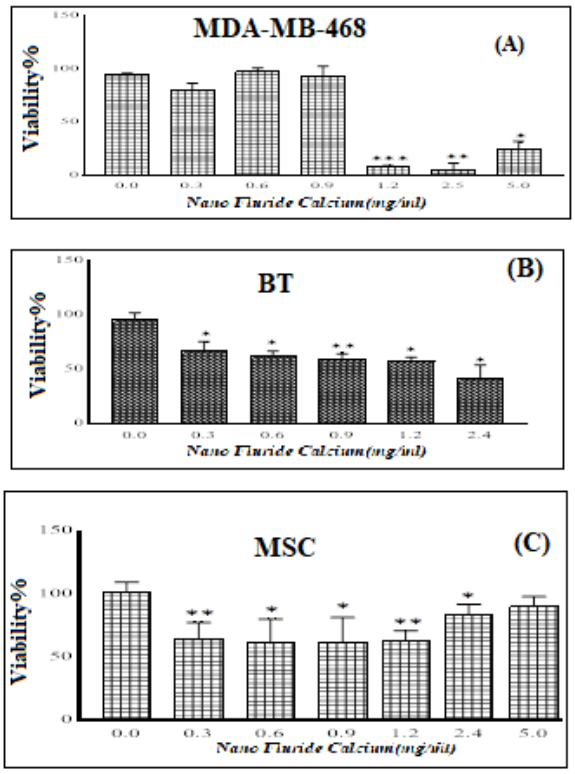
نتایج تستAO/PI

در این تست، نتایج عکس برداری با میکروسکوپ فلوئورسنت در شکل ۲ مشاهده می گردد. همچنین داده های مربوطه بر روی نمودار۵ نشان داده شده است.



شکل۲. **نتایج عکسبرداری از تست AO/PI** به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی رده سلولی MDA-MB-468, MSC, BT.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



نمودار۵. نمودار مربوط به تست AO/PI از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول سرطان پستان رده MSC, BT, MDA-MB-468 . غلظتی از نانودارو که باعث مرگ ۵۰ درصد سلول های سرطانی شده است، در A . غلظت ۵ mg/ml ، در B. ۲/۴ mg/ml بدست آمد. در C. هیچ یک از غلظت ها باعث از بین رفتن ۵۰ درصد سلول های سرطانی نگردید.

علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل درسطح$p<۰/۰۵$ می باشد.

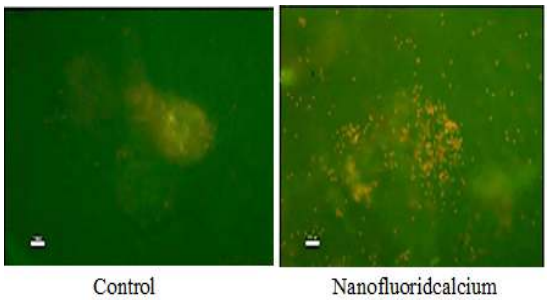
علامت** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل درسطح$p<۰/۰۱$ می باشد.

علامت*** نشان دهنده معناداربودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل درسطح$p<۰/۰۰۱$ می باشد.

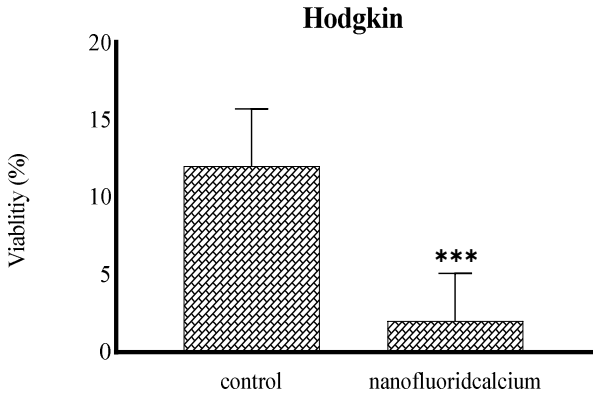
نتایج تست AO/PI بافت سرطانی Hodgkin

از رنگ‌های فلورسنت آکریدین نارنجی و پروپیدیوم یدید (AO/PI) برای آزمایش مورفولوژی میکروسکوپی و تغییرات بافت سرطانی Hodgkin پس از تیمار با نانوفلورید کلسیم استفاده شد. بافت سرطانی به مدت ۴۸ ساعت مطابق با IC_{50} تحت درمان نانوفلورید کلسیم قرار گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط AO/PI برای رنگ آمیزی بافت سلولی استفاده گشت. تغییرات مورفولوژیکی در سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت شناسایی شد. رنگ‌های سبز، نارنجی و قرمز به‌دست‌آمده به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های زنده، آپوپتوز دیررس و سلول‌های مرده هستند. عکس های حاصل از عکس برداری با میکروسکوپ فلوئورسنت در شکل ۳ نمایش داده شده است. نتایج درنمودار۶ نشان داده شده اند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل ۳. شکلAO/PI به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی بافت سرطانی Hodgkin.
بخش های رنگی نشان دهنده سلول های مرده در اثر تیمار با نانوفلورید کلسیم می باشد.

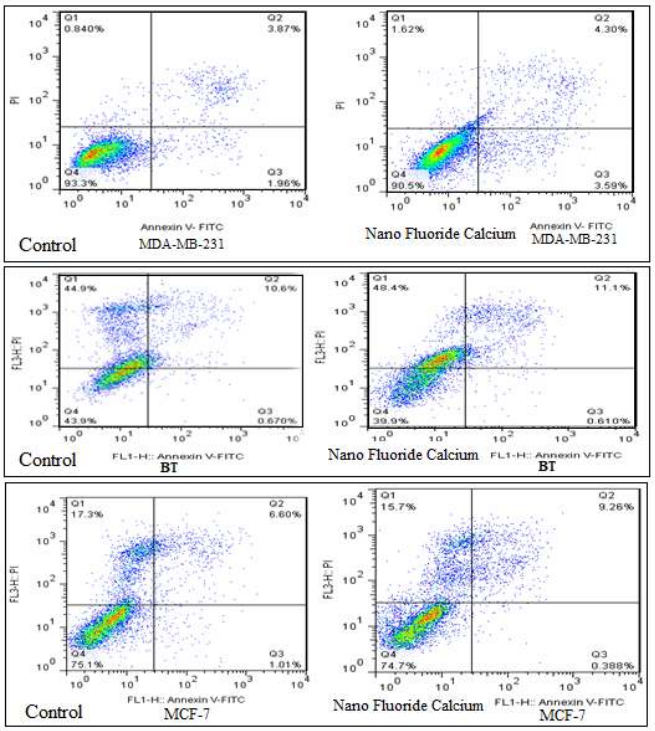


نمودار۶. نمودار AO/PI به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی بافت سرطانیHodgkin
نانوفلورید کلسیم موجب کاهش زنده مانی سلول های بافت سرطانی شده است.
علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده سلول تیمار شده با کنترل در سطح p<۰/۰۰۱ می باشد.

نتایج تست آپوپتوز

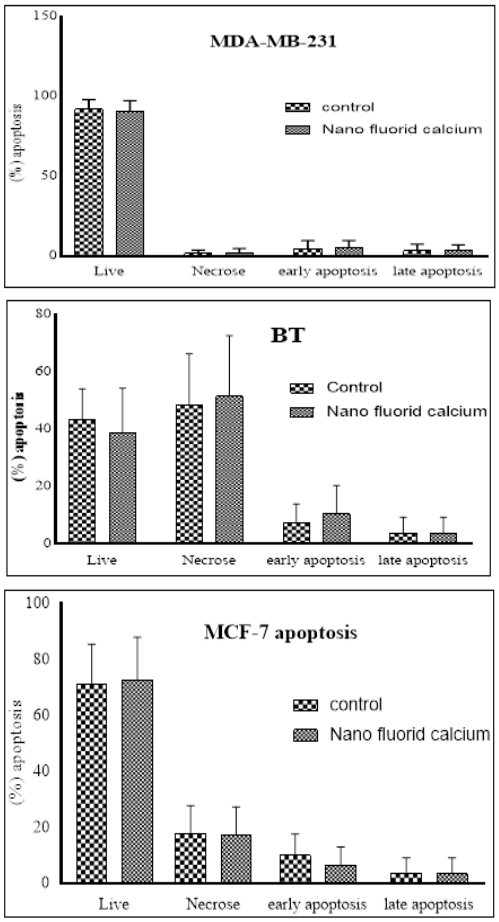
از آنجا که استفاده از غلظت IC_{50} نانوفلورید کلسیم باعث از بین رفتن نصف سلول‌ها می‌گردید برای تست آپوپتوز از غلظت ملایم تر ۰/۶میلی‌گرم در میلی لیتر استفاده گردید. نتایج آپوپتوز در شکل ۴ و درصد آپوپتوز و نکروز در نمودار ۷ نمایش داده شده اند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل ۴. نمایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231, BT , MCF-7 در تماس با نانوفلورید کلسیم با غلظت ۰/۶میلی گرم در میلی لیتر. Q1نشان دهنده درصد نکروز، Q2 نشان دهنده درصد آپوپتوز اولیه ، Q3 نشان دهنده درصد آپوپتوز نهایی، Q4 نشان دهنده درصد زنده مانی می باشد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

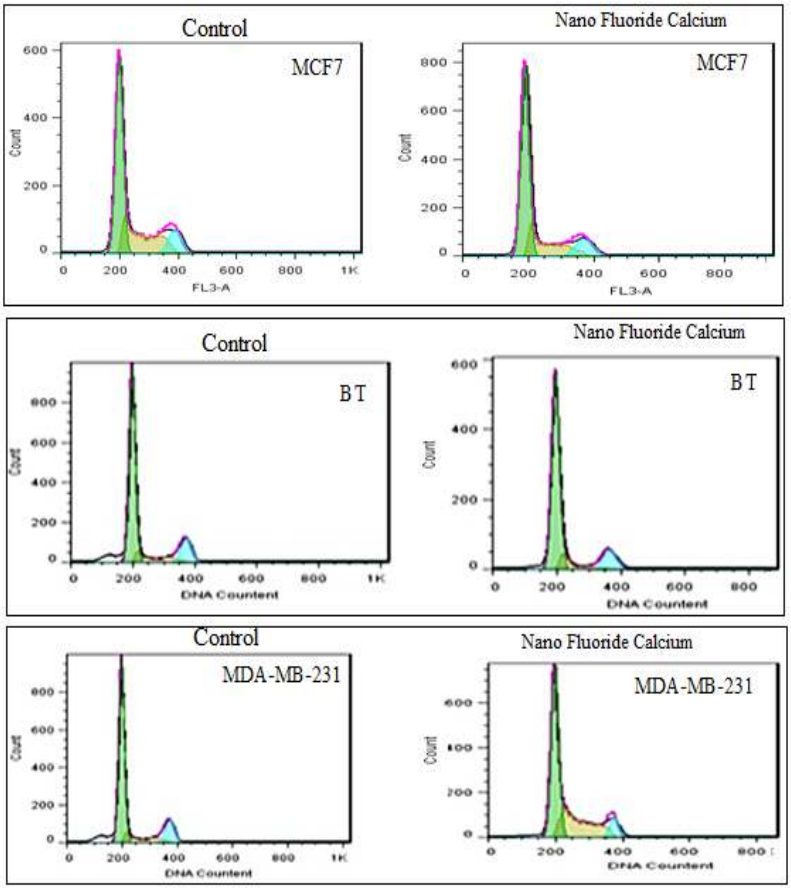


نمودار۷. نمایش درصد زنده مانی در سلول های سرطان پستان رده های MCF-7، MDA-MB-231 وBT . سلول ها تحت تیمار با نانوفلورید کلسیم با غلظت ۰/۶میلی‌گرم در میلی لیتر قرار گرفتند.

نتایج چرخه سلولی

از آنجا که استفاده از غلظت IC_{50} نانوفلورید کلسیم باعث از بین رفتن نصف سلول‌ها می‌گردید برای چرخه سلولی از غلظت ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر نانوفلورید کلسیم استفاده شد. نتایج در نمودار ۸ نشان داده شده اند. غلظت مورد استفاده موجب تغییر در چرخه سلولی شده است. با توجه به نمودار ستونی ۹، نانوفلورید کلسیم موجب افزایش مرحله S و کاهش مراحل G1 و G2 شده است.

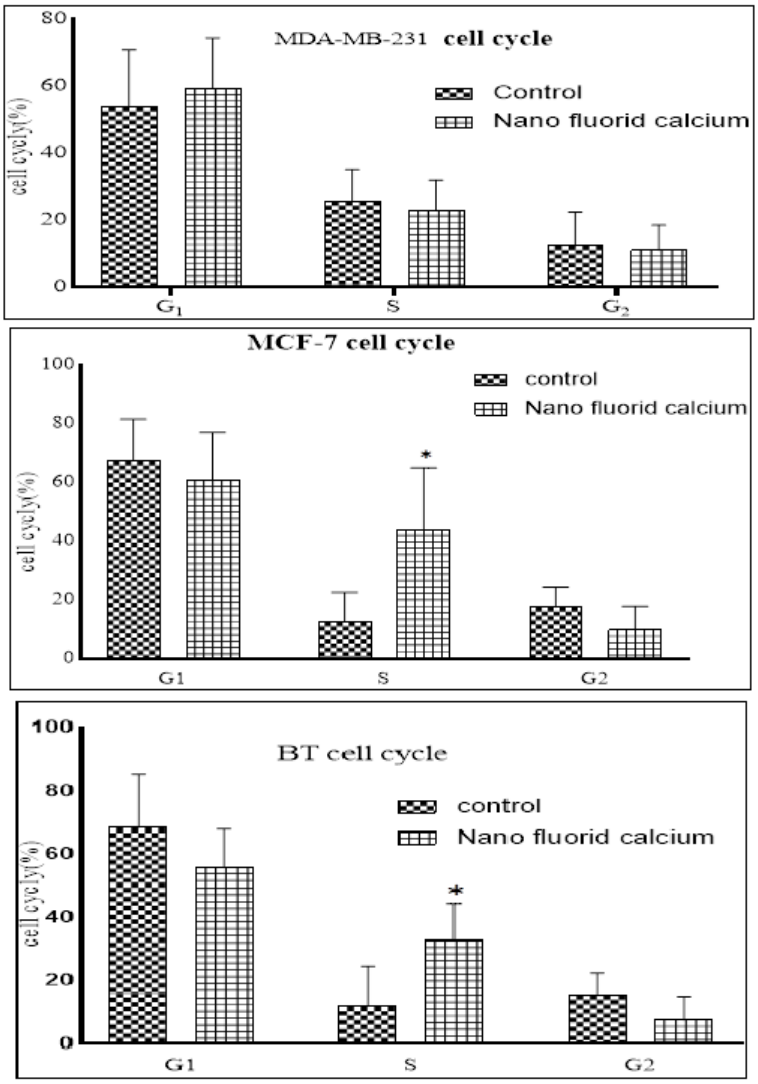
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



نمودار ۸. **چرخه سلولی تحت تیمار با غلظت ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر نانوفلورید کلسیم.**

این غلظت از نانودارو تغییراتی در چرخه سلولی، سلول های سرطانی MDA-MB-231 ایجاد کرده است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



نمودار۹. ارزیابی تأثیر تیمار نانوفلورید کلسیم بر چرخه سلولی سرطان پستان.

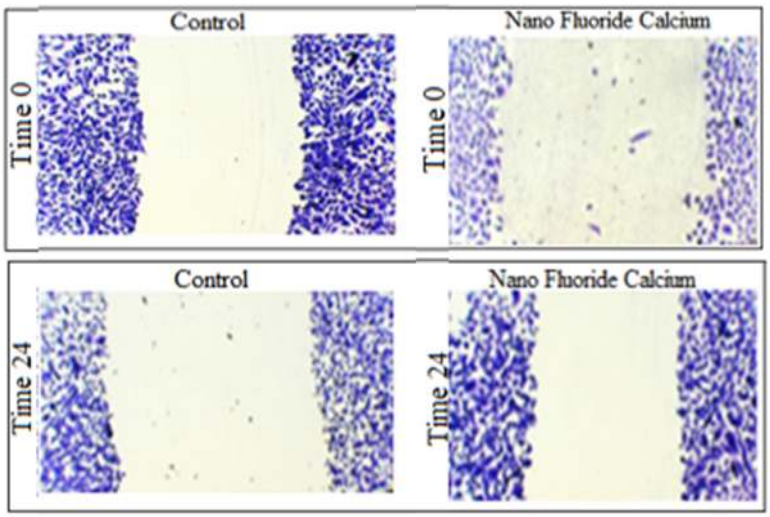
این ارزیابی کمی بر روی رده های MCF-7، MDA-MB-231 وBT انجام شد.

علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده هر گروه با گروه کنترل همان گروه درسطح$p<۰/۰۵$ می باشد.

نتایج تست خراش

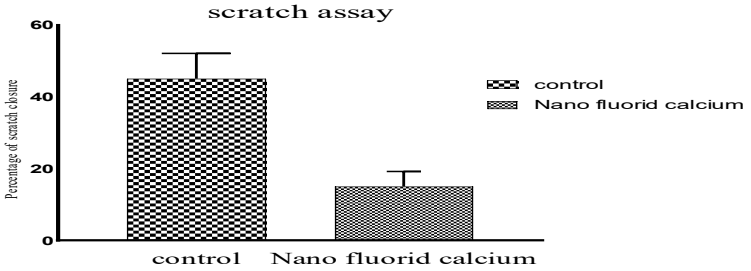
درتست خراش جهت بررسی میزان مهاجرت سلول‌هایMDA-MB-231 پس از تیمار با نانوفلورید کلسیم مطابق IC_{50} (۱/۲میلی گرم در میلی لیتر) نتایج بدست آمده، انجام شد. همانطور که در نمودار۱۰ نشان داده شده است، مهاجرت سلول‌ها در تیمار با نانوفلورید کلسیم نسبت به کنترل۲۱/۴درصد کاهش یافت.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل ۵. اثر نانوفلورید کلسیم بر سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231.

نانوفلورید کلسیم موجب مهاجرت سلول های سرطانی و بسته شدن خراش می‌شود.

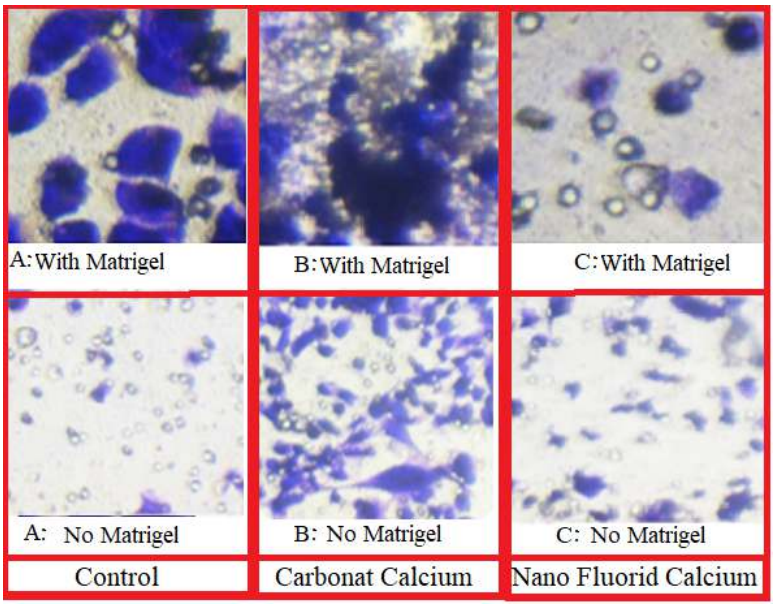


نمودار۱۰. نمودارمیزان مهاجرت سلول های سرطان پستان رده MDA-MB-231 با نانوفلورید کلسیم

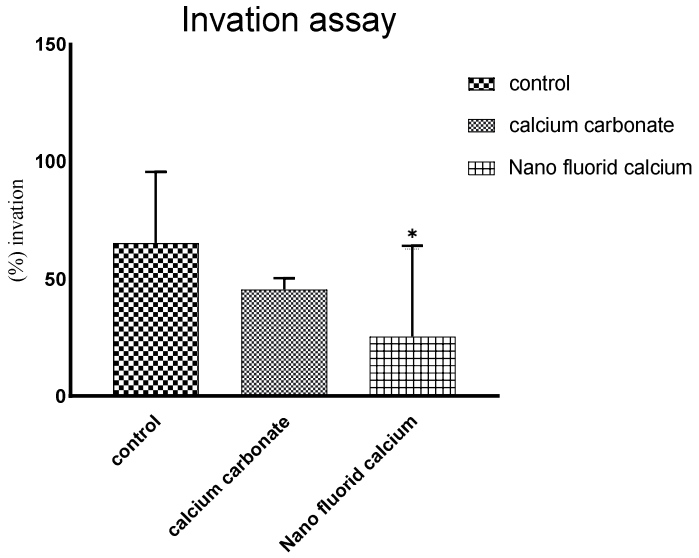
نتایج تهاجم سلولی

تهاجم سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در محیط بدون FBS بررسی گردید. پس ازگذشت انکوباسیون ۴۸ ساعته، سلول ها با نانوفلورید کلسیم وارد فیلترهای ترانس ول شدند. بعد از گذشت۱۰ساعت سلول ها فیکس، رنگ آمیزی و عکس برداری گردیدند (شکل۶). همچنین میزان مهاجرت سلولی با استفاده از رابطه (۳) محاسبه گردید. نتایج در نمودار۱۱ حاکی از آن است که کربنات کلسیم ۱۴درصد و نانوفلورید کلسیم۲۳درصد تهاجم سلولی را کاهش داده اند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل۶: نمایش تهاجم سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231. اثر A. کربنات کلسیم و B. نانوفلورید کلسیم بر سلول‌های سرطانی در حضور و عدم حضور Matrigel در قیاس با کنترل نشان داده شده است. کربنات کلسیم ونانوفلورید کلسیم موجب کاهش تهاجم سلول‌های سرطانی گردیدند.

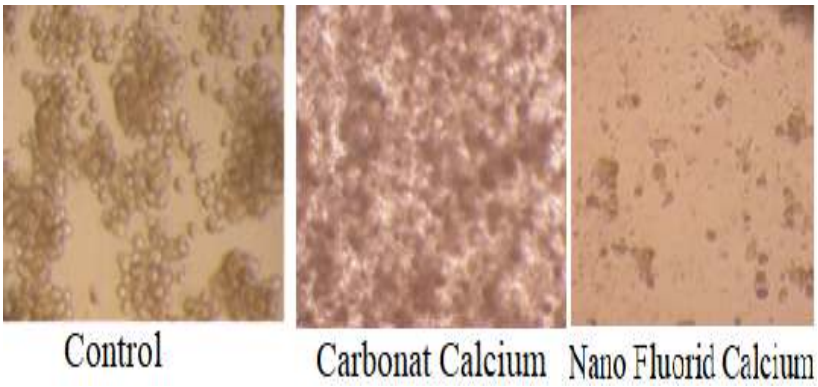


نمودار۱۱: بررسی میزان تهاجم سلول‌های سرطان پستان رده MDA-MB-231 با کربنات کلسیم ونانوفلورید کلسیم.
کربنات کلسیم با ۱۴درصد ونانوفلورید کلسیم با ۲۳ درصد در سطح $p<۰/۰۵$ که نتیجه مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل می باشد، نشان دهنده تأثیر معناداری در کاهش تهاجم سلول سرطان پستان است.

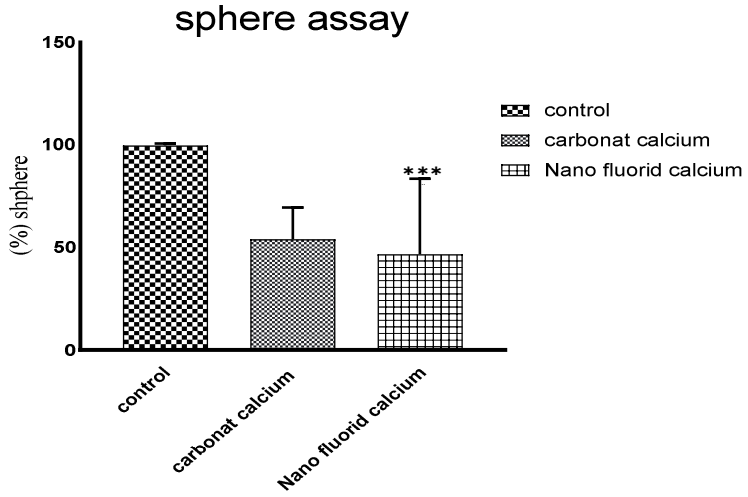
نتایج تست اسفیروئید

در تست اسفیروئید توانایی تشکیل اسفیر در محیط غیر چسبنده بررسی گردید (شکل۷). در این بررسی، تعداد و اندازه اسفیرهای تولید شده در چند روز متوالی در تیمار با کربنات کلسیم۵۶درصد و در تیمار با نانوفلورید کلسیم ۶۷درصد کاهش نشان داد (نمودار۱۲).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل۷. نمایش اسفیرزایی کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم بر روی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 . کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم موجب کاهش اسفیرزایی گردیدند.



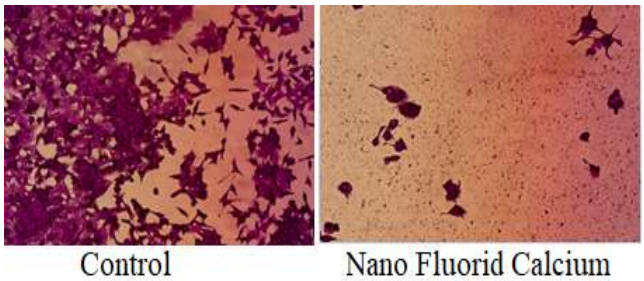
نمودار۱۲. ارزیابی مقدار اسفیرزایی سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 تیمار شده با کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم. ، تعداد و اندازه اسفیرهای تولید شده در چند روز متوالی در تیمار با کربنات کلسیم۵۶درصد و در تیمار با نانوفلورید کلسیم ۶۷درصد کاهش نشان داد

علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل درسطح P<۰/۰۰۱ می باشد.

نتایج سنجش قدرت کلنی زایی

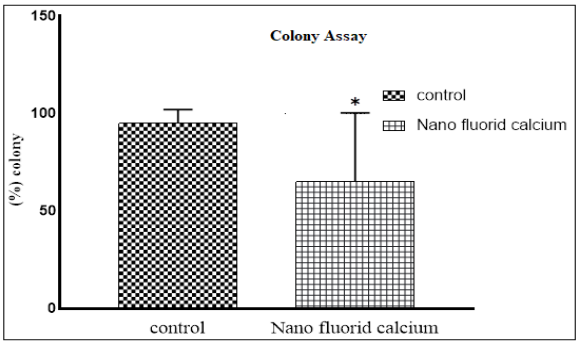
نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در تیمار با نانوفلورید کلسیم با غلظت IC50 ، ۱/۲میلی گرم بر میلی لیتر، مطابق شکل۸ و نمودار۱۳ حاکی از کاهش ۳۱درصدی کلنی ها است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]



شکل۸. **نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231.**

تیمار با نانوفلورید کلسیم موجب کاهش کلنی زایی شده است.



نمودار۱۳. **نمودار نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در تیمار با نانوفلورید کلسیم.**

مطابق نمودار، تیمار با نانوفلورید کلسیم موجب کاهش۳۱درصدی کلنی زایی شده است.

علامت* نشان دهنده معناداربودن مقایسه سلول تیمار شده با نانوفلورید کلسیم و کنترل درسطح$p<۰/۰۵$ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در این پروژه سنتز نانوفلورید کلسیم با استفاده از کربنات کلسیم، فلوئور و فلورید هیدروژن انجام شد اما در مطالعه مشابهی که توسط نخعی وهمکاران بر روی سنتز نانوکلسیم انجام شد، سنتز نانوفلورید کلسیم به روش هیدروترمال که یک روش شیمیایی می باشد، با ترکیب کلسیم کلرید و فلوئورید آمونیوم صورت گرفت (۱۴). در آزمایشی Ibiyeye KM و همکاران نشان دادند که سنتز نانو کربنات کلسیم نیز باعث تولید ذراتی می شود که قابلیت جذب بالاتری نسبت به کلسیم در سلول های سرطانی دارند(۱۵). برای درمان سرطان پستان ازداروهای متفاوتی در ایران استفاده می شود که یکی از داروها تاموکسیفن می‌باشد. که یکی ازمهم‌ترین تأثیراتی که مصرف طولانی مدت تاموکسیفن برجای می‌گذارد، مقاومت ایجاد شده در سلول‌های سرطان پستان حتی در حضور تاموکسیفن است که باعث می‌شود این سلول‌ها به رشدشان ادامه دهند (۱۶). دوکسوروبیسین داروی دیگر ضد سرطان است که به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو در تعامل با DNA، سنتز آن را مهار می‌کند. لیکن سلول‌های سرطانی در مقابل آن مقاومت نشان می دهند(۱۷). بطورکلی نانو ذرات دارای دو خصوصیت مهم هستند که به آن‌ها جذابیت ویژه‌ای داده است. از طرفی به دلیل اندازه کوچک آن ها سطح وسیع‌تری نسبت به ذرات بزرگ و حجیم دارند و از طرفی دیگر با استفاده از گروه‌های شیمیایی مختلف امکان ترکیب نانوذرات با ترکیبات هدفمند مثل آنتی بادی‌ها را ایجاد می کنند(۱۸). بر اساس نتایج بدست آمده توسط Rahimnia R و همکاران در سال۲۰۱۹، به طور کلی، جذب نانوذرات توسط سلول‌ها سریع است و درسلول‌های سرطانی سرعت جذب بیشتر نیز می‌شود(۱۹). نانوتکنولوژی باعث افزایش سمیت سلولی در بافت تومورشده

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

و همچنین دارای ویژگی‌هایی در هدف‌گیری تومور، کاهش اثرات جانبی سمیت سلولی بر روی سلول‌های طبیعی، کاهش عوارض جانبی سیستمیک، افزایش حلالیت دارو و افزایش حداکثر دوز تحمل می‌باشد. نانودارو مزیت زیادی در تحویل دارو برای درمان سرطان نشان داده است (۱۵).

در این تحقیق، اندازه ذرات نانوفلورید کلسیم با تکنیک TEM بین ۱۰۰تا۲۰۰نانومتر و با تست DLS اندازه ذرات ۸۶±۵۴۳ نانومتر و پتانسیل زتای برابر۴/۷±۴/۰ بدست آمد.

در این تحقیق، ازتستMTT مقدارIC_{50} برای تیمار جهت اثر بر سلول‌های سرطانی مشخص گردید. مقدار بدست آمده IC_{50} در تیمار با نانوفلورید کلسیم که موجب از بین رفتن نیمی از سلول های سرطانی رده MDA-MB- 231در طی زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گردید به ترتیب ۴/۸، ۱/۲ و ۱۰/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بدست آمد.Vergaro V و همکاران آزمایش MTTرا در فواصل زمانی مشابه، در غلظت های پایین (از۱ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۱ میلی گرم در میلی لیتر) کربنات کلسیم خالص بر سلول های سرطانی HeLa به عنوان الگو تأثیر دادند. نشان دادند که زنده ماندن سلول در ۱۰۰ درصد حجمی حفظ شده و زیست سازگاری مواد را تأیید کرد. نتایج نشان داد که کربنات کلسیم خالص پس از مدت زمان طولانی بر زنده مانی سلول تأثیر نمی گذارد(۲۰). در آزمایشیJabbari N و همکاران در سال ۲۰۱۸تست MTT را با تأثیر غلظت های مختلف ۵۰،۱۰۰و۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تیمار نانوکربنات کلسیم بر روی سلول های سرطانی MCF-7 فقط در زمان ۲۴ ساعت انجام دادند. OD بدست آمده از این آزمایش در سه غلظت ترتیب برابر۰/۰۱۳±۰/۲۷۳، ۰/۰۲۵±۰/۲۲۸و ۰/۰۲۵±۰/۱۸۷ است. OD نشان دهنده تأثیر نانوکربنات کلسیم بر سلول های سرطانیMCF-7 می باشد (۲۱).

در تحقیق حاضر، نتایج اثر داروی نانوفلورید کلسیم روی سلول های میکروتومورهای مشتق از بافت تومور بیمار هاچکین نیز نشان داد که میزان بقای سلول ها در گروه تحت تأثیر دارو به طور معنی داری کاهش داشته است و میزان سلول های مرده افزایش نشان داد. همچنین در مدت زمان ۴۸ ساعت نتایج اثر ۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول های MDA-MB-231 در مرحله آپوپتوز، نکروز و زنده مانی به ترتیب درکنترل ۵/۸۳، ۰/۸۴، ۹۳/۳ و در تیمار دارو به ترتیب۷/۸۹، ۱/۶۲و ۹۰/۵ می باشد. تیمار نانوفلورید کلسیم موجب شد تا مراحل آپوپتوز و نکروز اندکی افزایش یابد. Jabbari N و همکاران درسال۲۰۱۸ برسلول‌های سرطان پستان MCF-7در مدت زمان ۲۴ ساعت با تیمار نانو کربنات کلسیم آزمایشی مربوط به آپوپتوز انجام دادند. در این آزمایش از نانو کربنات کلسیم باغلظت های ۵۰،۱۰۰و۱۵۰ میکروگرم درمیلی لیتر استفاده کردند. درصد آپوپتوزهای بدست آمده به ترتیب بر اساس غلظت ها برابر است با۱/۷۵±۲۵/۷۵، ۲/۶۴±۲۹/۵۰و۱/۷۳±۳۴/۵۰ می باشد که نشان دهنده افزایش میزان آپوپتوز با افزایش غلظت می باشد(۲۱).

برای انجام این پروژه در چرخه سلولی نیز بیشترین توجه بر زمان ۴۸ ساعت صورت گرفت. میزان مراحلG_1،S، G_2 در کنترل ۵۱/۶۳، ۲۹/۶۹و ۱۱/۷درصد و در حضور نانوفلورید کلسیم ۵۸/۳۳، ۲۳/۹و۱۲/۷۱درصد بدست آمد. این امر موجب افزایش مراحلG_1 وG_2 و کاهش مرحلهS گردید. در آزمایشی Sun D و همکاران در سال ۲۰۱۵ با اثر نانوکربنات کلسیم بر روی سلول هایSGC-7901، به مدت ۲۴ساعت انجام دادند،G_1، S، G_2 به ترتیب در گروه کنترل برابر۵۸/۸۳، ۲۷/۶۱و۱۲/۲۴درصد و بعد از تأثیر نانوکربنات کلسیم برابر ۵۳/۹۷، ۳۰/۵۱و۱۳/۶۷ درصد بدست آمد. این به این معنی می باشد که نانوکربنات کلسیم باعث افزایش مرحله G_1 و G_2 شده و همچنین مرحله S را کاهش داده است (۲۲).

تست خراش جهت بررسی میزان مهاجرت سلول ها که عامل متاستاز است، انجام می شود. تست خراش نماینده میزان حرکت بین سلول‌ها، همچنین میزان حرکت بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی طی پدیده مهاجرت سلول‌های توموری می باشد. از

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

آنجایی که این سلول جزو دسته سلول‌های سه بار منفی TNBC[11] است که بیش از ۹۰درصد خواص سلول‌های بنیادی سرطان را دارا می‌باشد و قدرت تهاجم و مهاجرت زیادی دارد، برای آن که میزان مهاجرت مشهود باشد از این رده سلولی استفاده گردید. در نهایت نانوفلورید کلسیم موجب کاهش ۲۱/۴ درصدی سلول سرطانی شد. در آزمایشی Cox RF و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند کلسیم را با غلظت های مختلف۱/۸، ۵ و ۱۰میلی مولار بر روی سلول سرطانی 4TI در ۳ زمان ۰، ۲۴ و۴۸ ساعت تأثیر دادند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان و افزایش میزان کلسیم مهاجرت نیز افزایش می یابد(۲۳).

در این پروژه از تست تهاجم سلولی جهت مطالعه فعل و انفعالات بین سلول‌های توموری و ماتریکس خارج سلولی استفاده گردید. به منظور افزایش قدرت تهاجم رده سلولیMDA-MB-231 ، به مدت ۲۴ساعت در محیط بدون FBS در حالت گرسنه قرار داده شدند. بعد از تیمار کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم مشاهده گردید که میزان تهاجم توسط کربنات کلسیم ۱۴ درصد و توسط نانوفلورید کلسیم ۲۳ درصد کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده در این تست کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم موجب کاهش تهاجم گردیدند. جهت انجام این تست از ردهMDA-MB-231 استفاده گردید که این رده سلول سرطانی را تحت تیمارکربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم قرارداده شد که تعداد و اندازه های اسفیرهایی که تحت تیمارکربنات کلسیم قرارگرفته بودند به نسبت کنترل کاهش یافتند. سلولی که تحت تیمارنانوفلورید کلسیم قرارگرفت هم ازآن سلولی که تحت تیمار کربنات کلسیم قرار گرفت تعداد اسفیرهای تشکیل شده کاهش پیدا کرده به این شکل که تیمار با کلسیم ۵۵/۵ درصد و نانوفلورید کلسیم۴۸ درصد کاهش اسفیرزایی داشته است.

در این پروژه ازتست کلنی‌زایی برای بررسی میزان قدرت اجتماع سلول هایMCF7 درکنار یکدیگر تحت تأثیر تیمار با نانوفلورید کلسیم استفاده شد. توانایی تشکیل کلونی سلول‌های سرطانی با ظرفیت سلول بنیادی اش در ارتباط است. اساس تست کلنی‌زایی نانوفلورید کلسیم به این شکل می باشد که تنها یک سلول در زمان کشت و در حضور محیط حاوی سرم توانایی تشکیل مجموعه‌ای از سلول که بیش از ۵۰ سلول باشد را دارد. این تست جهت تعیین توانایی خود نوزایی سلول سرطان انجام شده است. درنهایت تحت تیمار با نانوفلورید کلسیم نشان داده شد که نانوفلورید کلسیم موجب کاهش ۳۱ درصدی کلنی زایی سلول سرطان پستان می شود.

منابع(References)

.۱ Mohamed MI, El Azzab SESH, Osman AS. Counseling psycho-motor program to life adaptation for breast cancer women" before and after mastectomy. International Journal of Science and Research (IJSR). 2015;4(10):871-7.

.۲ Anwar MM, El-Karim A, Somaia S, Mahmoud AH, Amr AE-GE, Al-Omar MA. A Comparative Study of the Anticancer Activity and PARP-1 Inhibiting Effect of Benzofuran–Pyrazole Scaffold and Its Nano-Sized Particles in Human Breast Cancer Cells. Molecules. 2019;24(13):2413.

.۳ Zhang F, Liu S. Mechanistic insights of adipocyte metabolism in regulating breast cancer progression. Pharmacological Research. 2020:104741.

.۴ Makena MR, Rao R. Subtype specific targeting of calcium signaling in breast cancer. Cell Calcium. 2020;85:102109.

[11] Three Negative Breast Cancer (TNBC)

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

.۵ Wiwanitkit V. Cancer nanotherapy: Concept for design of new drug. Journal of Medical Hypotheses and Ideas. 2013;7(1):3-4.

.۶ Arenas M, Rodríguez E, García-Heredia A, Fernández-Arroyo S, Sabater S, Robaina R, et al. Metabolite normalization with local radiotherapy following breast tumor resection. PloS one. 2018;13(11):e0207474.

.۷ Déliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2015;1848(.۲۵۱۲-۲۲:(۱۰

.۸ Khanbabaie R, Jahanshahi M. Revolutionary impact of nanodrug delivery on neuroscience. Current neuropharmacology. 2012;10(4):370-92.

.۹ Sanders JA. Magnetic resonance spectroscopy. Functional brain imaging. 1995:419-67.

.۱۰ Mu Q, Yan B. Nanoparticles in Cancer Therapy-Novel Concepts, Mechanisms and Applications. Frontiers in Pharmacology. 2018;9:1552.

.۱۱ Abu N, Akhtar MN, Yeap SK, Lim KL, Ho WY, Zulfadli AJ, et al. Flavokawain A induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. PLoS One. 2014;9(10).

.۱۲ Charoen KM, Fallica B, Colson YL, Zaman MH, Grinstaff MW. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. Biomaterials. 2014;35(7):2264.۷۱-

.۱۳ Niazvand F, Orazizadeh M, Khorsandi L, Abbaspour M, Mansouri E, Khodadadi A. Effects of Quercetin-Loaded Nanoparticles on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Medicina. 2019;55(4):114.

۱۴۰ نخعی, الفجر ا, طهماسبی ش, ناصر, آبادی رر, محمود, editors. Structural and luminescence properties of CaF2 nanoparticle synthesis by hydrothermal method, and synthesis polymer-nanoparticle composite. کنفرانس فیزیک ایران۱۳۹۰; ۲۰۱۱.

.۱۵ Ibiyeye KM, Zuki ABZ, Nordin N, Ajat M. Ultrastructural Changes and Antitumor Effects of Doxorubicin/Thymoquinone-Loaded CaCO3 Nanoparticles on Breast Cancer Cell Line. Frontiers in Oncology. 2019;9:599.

۱۶ . حاجی‌غلامی, شاهی وم, زیبا. نانو حامل پلیمری Diblock و کورکومین، رویکردی جدید به منظور غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان سینه. دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، طب جنوب. ۲۰۱۷;۱۹(۶):۹۵۱-۶۱.

.۱۷ Mehbuba Hossain S, Chowdhury E. Citrate-and Succinate-Modified Carbonate Apatite Nanoparticles with Loaded Doxorubicin Exhibit Potent Anticancer Activity against Breast Cancer Cells. Pharmaceutics. 2018;1.۳۲:(۱)۰

۱۸ . بندری حش. کاربردهای نانوتکنولوژی در تصفیه آب های سطحی، زیرزمینی و پساب ها. انسان و محیط زیست. ۲۰۱۲;۳۲-۲۷:۱۰.

.۱۹ Rahimnia R, Salehi Z, Ardestani MS, Doosthoseini H. SPION Conjugated Curcumin Nano-Imaging Probe: Synthesis and Bio-Physical Evaluation. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2019;18(1):183.

.۲۰ Vergaro V, Carata E, Panzarini E, Baldassare F, Dini L, Ciccarella G, editors. Synthesis of calcium carbonate nanocrystals and their potential application as vessels for drug delivery. AIP Conference Proceedings; 2015: AIP Publishing LLC.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]

.۲۱ Jabbari N, Zarei L, Esmaeili Govarchin Galeh H, Mansori Motlagh B. Assessment of synergistic effect of combining hyperthermia with irradiation and calcium carbonate nanoparticles on proliferation of human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7 cells). Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2018;46(sup2):364-72.
.۲۲ Sun D, Peng H, Wang S, Zhu D. Synthesis of CaCO 3 Nanobelts for Drug Delivery in Cancer Therapy. Nanoscale research letters. 2015;10(1):239.
.۲۳ Cox RF, Hernandez-Santana A, Ramdass S, McMahon G, Harmey JH, Morgan MP. Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralisation. British journal of cancer. 2012;106(3):525-37.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-10-19]