



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 Arani¹, Fereshteh Atabi^{*1}, Saeed Hesami Tackallou², Hakimeh Zali³, Minoo Shahani¹

¹Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of advanced Sciences and technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Assistant 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 IC₅₀ 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-231 17% 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:

سننز و تعیین اثر آپوتوتیک نانوفلورید کلسیم بر روی سلول های سرطانی پستان

حانیه مطیع آرانی^۱، فرشته عتابی^{۱*}، سعید حسامی تکلو^{۲*}، حکیمه زالی^۳، مینو شاهانی^۴

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](https://orcid.org/0000-0002-6051-2644)

۲. سعید حسامی تکلو ORCID [0000-0002-9492-3038](https://orcid.org/0000-0002-9492-3038):

۳. حکیمه زالی ORCID [0000-0003-2770-5759](https://orcid.org/0000-0003-2770-5759):

۴. مینو شاهانی ORCID: [0000-0003-1302-8312](https://orcid.org/0000-0003-1302-8312)

۵. حانیه مطیع آرانی ORCID: [0000-0002-7950-3297](https://orcid.org/0000-0002-7950-3297)

چکیده

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

روش بررسی: مخلوط کربنات کلسیم با فلورید هیدروژن سونیکه شد و نانوذره با تکنیک‌های DLS و TEM تایید شد. سپس سلول‌های سرطانی MCF-7، MDA-MB-231، MDA-MB-468، BT-474 و سلول سالم MSC کشت داده شد. همچنین تست MTT برای تعیین IC₅₀ دارو و انجام ادامه تست‌های آپوپتوز، چرخه سلولی، خراشیدگی، اسفیرزایی، تهاجم و کلنی زایی انجام شد.

یافته‌ها: میزان IC₅₀ تیمار نانوفلوریدکلسیم با استفاده از تست MTT برابر ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر گردید اما برای تست‌های آپوپتوز و چرخه سلولی از ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد که میزان آپوپتوز ۲/۸ درصد در سلول‌های MDA-MB-231 و ۱۷ درصد در سلول‌های MCF-7 و ۴ درصد در سلول‌های BT بدون میزان معنادار نشان داد. همچنین چرخه سلولی MDA-MB-231 در مراحل G1 و G2 به ترتیب افزایش ۶/۷ و ۱/۰۱ درصد و در مرحله S کاهش ۵/۷۹ را بدون معناداری را نشان داد. MCF-7 نیز در مراحل G1 و G2 به ترتیب کاهش ۱/۴۶ و ۶/۴۳ درصد، در مرحله S افزایش ۲۲/۵۲ درصد داشت. BT در مراحل G1 و G2 افزایش ۶۴ درصد را نشان می‌دهد.

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 سلول‌های سرطان پستان رده سلولی MDA-MB-231 از خود نشان داد. **کلمات کلیدی:** سرطان پستان، رده سلولی MDA-MB231، نانوفلورید کلسیم

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. تکثیر پایدار ۲. فرار از سرکوب ۳. مقاومت در برابر مرگ سلولی ۴. جاودانگی تکثیر ۵. تخریب ۶. التهاب ترومبوز تومور ۷. فعال شدن تهاجم و متاستاز ۸. القای آنژیوژنز ۹. بی‌ثباتی ژنوم و ۱۰. تغییر متابولیسم، موجب تغییر فیزیولوژی سلول می‌گردد (۲). جمعیت نادر سلول‌های بنیادی سرطان پستان در شروع، تکثیر، تهاجم و عود سرطان نقش مهمی دارند (۳). این امر موجب مرگ و میر حدود ۱ در ۸ (۱۲/۵ درصد) زنان است که همچنان در حال افزایش می‌باشد. 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 می‌باشد. مرحله صفر از تومور موضعی در پستان شروع و تا مرحله اول همچنان ادامه می‌یابد. مرحله دوم به غدد لنفاوی نزدیک پستان رسیده. مرحله سوم به پوست، دیواره یا غدد لنفاوی داخلی گسترش می‌یابد. در مرحله چهارم به عنوان سرطان تهاجمی از پستان به سایر اعضای بدن متاستاز می‌دهد. میزان بقای ۵ ساله کلی فرد در مرحله I و II بیش از ۹۵ درصد، مرحله III به ۷۲ درصد و مرحله چهارم به ۲۲ درصد کاهش می‌یابد. حدود ۹۰ درصد مرگ و میر سرطان پستان همراه با متاستاز است (۱، ۴). در حال حاضر جدیدترین روش درمانی سرطان، نانودارو می‌باشد (۵). اما روش‌های 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 کمک‌کننده یا داروهای شیمی‌درمانی استفاده می‌کنند. به منظور از بین بردن سلول‌های توموری باقی مانده از میکرومتاستاتیک، به طور همزمان از روش درمانی رادیوتراپی و شیمی‌درمانی استفاده می‌گردد (۱، ۶). کانال‌های عمدتاً فعال و بدون ولتاژ کلسیم، در مسیر پیام‌رسانی کلسیم دخیل بوده، موجب افزایش فعالیت تومور می‌شوند (۷). نانودارو با گردش طولانی مدتی که در جریان خون دارد، باعث می‌شود دارو با کارایی بیشتری به بافت هدف برسد (۸). طی بررسی محققان در رابطه با میزان اسیدی بودن درون سلول‌ها به منظور پیدا کردن راهکارهایی به منظور بهبود اثر روش‌های درمانی متداول در سرطان، آنها دریافتند که به طور معمول pH سلول‌های سرطانی پایین‌تر از سلول‌های طبیعی می‌باشد (۹). بدین ترتیب نانوکربنات کلسیم می‌تواند با افزایش pH، باعث تغییر در عملکرد برخی از آنزیم‌ها یا بافت‌های حساس به pH شود که باعث مهار رشد تومور می‌شود (۱۰).

مواد و روش‌ها

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 شده‌اند. همچنین سلول‌های سرطانی از انستیتو پاستور خریداری گردیدند. تمامی این تست‌ها در آزمایشگاه دانشکده علوم و فناوری‌های 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 میلی‌لیتر آب به این مخلوط اضافه شد. بعد از ۲ ساعت سونیکه شدن به نانوفلورید کلسیم تبدیل گردید. سپس با استفاده از محیط کشت نانوفلورید کلسیم با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید و مورد استفاده واقع شد.

¹DLS

پس از سنتز و آماده سازی نمونه نانوفلورید کلسیم از روش غیرمخرب و سریع DLS برای تعیین توزیع ذرات کمتر از 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 Volume، Number، Intensity، پتانسیل زتا بر حسب mV نیز بدست آمد. میزان Z-Average برابر ۱۲۴۹ (d.nm)، اندازه ذرات بر اساس Volume، Number، Intensity برابر ۱۰۰ (d.nm)، پتانسیل زتا برابر ۳/۹۹ بر حسب mV نیز بدست آمد.

TEM²

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 از خشک 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.

تست MTT^۳ و تعیین IC₅₀⁴

برای ارزیابی میزان مرگ و میر سلول ها تحت تأثیر یک دارو و بدست آوردن IC₅₀ 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 ۷ ستون با ۴ مرتبه تکرار در هر چاهک تعداد ۱۰^۴ سلول سرطانی MDA-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. بر روی سلول ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تأثیر CO₂ ۵ درصد، نانوفلورید کلسیم با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به حجم های (۳۰ و ۶۰ و ۱۲ و ۲۴ و ۵۰ و ۱۰۰ درصد 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. در نهایت درصد زنده مانی سلول ها با استفاده از واکنشگر MTT محاسبه گردید. بدین ترتیب که پس از طی زمان مقرر، به مایع رویی سلول ها ۱۰ میکرو لیتر محلول MTT 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 در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد و درصد بقای سلول با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (۱۵). برای بدست آوردن IC₅₀، از برنامه اکسل استفاده گردید.

رابطه (۱):

¹Dynamic Light Scattering

²Transmission Electron Microscope

³ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

⁴ half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)

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

تست AO/PI

برای تعیین IC₅₀ بر روی سلول های سرطانی MDA-MB-468، BT-474، سلول مزانشیمی MSC و بافت سرطانی Hodgkin، تست AO/PI انجام گردید. روش کار مشابه تست MTT انجام شد. لیکن از رنگ فلورسنت AO/PI استفاده گردید. در نهایت در زیر میکروسکوپ فلورسنت میزان زنده مانی سلول بررسی گردید و تصویربرداری انجام شد (۱۱).

تست آپوپتوز^۵

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 IC₅₀ بدست آمده، اضافه گردید. بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از تریپسین سلول ها جدا سازی گردیدند. سپس سلول ها با ۲ میلی لیتر محلول PBS به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ RPMI سانتریفیوژ گردید تا محیط سلول ها کاملاً حذف گردند و با محلول Binding buffer 1X به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به دلیل همپوشانی دو رنگ FITC و PI، جهت تصحیح همپوشانی، نمونه ها 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 رنگ FITC 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 و PI، ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محیط تاریک انکوبه گردیدند. پس از اتمام انکوباسیون به لوله ها ۱ میلی لیتر از محلول Binding buffer 1X اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ RPMI سانتریفیوژ گشت. به رسوب سلولی بدست آمده ۵۰۰ میکرولیتر از محلول Binding buffer 1X اضافه گردید. در زمانش خوانش به لوله های حاوی رنگ PI و هر دو رنگ FITC و PI، ۳ میلی لیتر رنگ PI اضافه گردید و توسط دستگاه فلوسایتومتری میزان آپوپتوز اندازه گیری گشت (۱۵).

چرخه سلولی^۶

برای انجام آزمایش چرخه سلولی تا مرحله جدا سازی سلول ها، مشابه روش آپوپتوز عمل شد. به سلول های رسوب کرده ته فالكون ۵۰ میکرولیتر PBS سرد اضافه گردید و به آرامی ورتکس گشت. سپس ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به عنوان فیکساتور، به فالكون ها اضافه و ورتکس گردید. فالكون ها به آرامی وبا دقت تکان داده شدند و به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری گردیدند. سپس فالكون ها سانتریفیوژ شده، اتانول موجود در آنها تخلیه گردید. رسوب با ۱ میلی لیتر PBS شستشو داده شد. سپس ۱ میلی لیتر محلول PI MASTER MIX، حاوی ۴۰ میکرولیتر PI، ۱۰ میکرولیتر RNase، ۹۵۰ میکرولیتر PBS به سلول ها اضافه گشت. نسبت نهایی سلول ها به محلول فوق ثابت بوده و غلظت نهایی سلول ها Cell/ml ۵×۱۰^۵ بود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای محیط، سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری خوانش شدند. داده های حاصل با نرم افزار FlowJo آنالیز شدند (۱۵).

⁵ Apoptosis Test

⁶ Cell cycle

تست خراش^۷

برای انجام این تست از سلول MDA-MB231 به دلیل دارا بودن شدت مهاجرت بالا استفاده گردید. برای انجام آزمایش خراش، تعداد ۱۰^۶ سلول MDA-MB231 درون هر خانه از پلیت ۶ خانه ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت مطابق غلظت IC₅₀ بدست آمده در هر دو خانه، ۸۸۰ میکرولیتر محیط کشت، ۱۲۰ میکرولیتر کربنات کلسیم و ۱۲۰ میکرولیتر 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 و ۲۴ ساعت همه خانه ها فیکس و رنگ 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):

$$\text{رابطه (۲):} \quad \text{درصد بسته شدن خراش} = \frac{[At-0h_At-\Delta h]}{At-0h} \times 100$$

تست تهاجم سلولی^۸

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 و ۱۲۰ میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت رویی آن تخلیه و به سلول محیط کشت بدون FBS اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. همزمان با کشت سلول، در ۱۲ تا از خانه های پلیت ۲۴ خانه فیلترهای دارای منافذ ۸ میکرومتری قرار داده شدند. سپس فیلترها با لایه ای از ماتریژل با غلظت ۰/۵ میلی 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 حاوی FBS 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):

$$\text{میانگین تعداد سلول های مهاجم (میانگین تعداد سلول های عبور کرده از فیلترهای پوشیده شده با ماتریژل)} \times 100 = \frac{\text{میانگین تعداد سلول های مهاجر (میانگین تعداد سلول های عبور کرده از فیلترهای بدون ماتریژل)}}{\text{میانگین تعداد سلول های مهاجم (میانگین تعداد سلول های عبور کرده از فیلترهای پوشیده شده با ماتریژل)}} \times 100$$

تست □ فیرونی^۹

پس از اینکه در سه فلاسک سلول های MDA-MB-231 کاملاً رشد داده شدند، محیط روی سلول ها با ۶ میلی لیتر محیط کشت تازه معاوضه گردید. به خانه های مخصوص کنترل، هیچ تیماری اضافه نگردید و به خانه های مخصوص تیمار با دارو، مطابق غلظت IC₅₀ بدست آمده ۹۰ میکرولیتر کربنات کلسیم و ۹۰ میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت خانه ها با PBS شستشو داده شدند و تریپسینه گردیدند. سپس کف چاهک های پلیت ۱۲ خانه با آگار ۱ درصد پوشانیده شد و روی آن ها ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید. به تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک ژل آگار ریخته شد. در آخریلت 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

درصد اسفیرزایی سلولی، محیط حاوی اسفیرها از ظرف کشت به یک لوله استریل منتقل گردید. تجمعات سلولی با پی پتاژ آرام، به طور یکنواخت پراکنده گردیدند و تنها اسفیرها باقی ماندند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی اسفیرها برداشته و در یک ظرف غیر چسبنده قرارداد شد. بعد از سه مرتبه تکرار این مرحله، تعداد اسفیرها با استفاده از یک استریومیکروسکوپ لنز ۴ (بزرگنمایی ۴۰) شمارش گردیدند و میانگین سه بار شمارش بدست آمد. در نهایت با استفاده از رابطه (۴) درصد اسفیرزایی محاسبه گردید (۱۲):

فرمول (۴):

$100 \times (\text{سلول های اولیه کشت داده شده} / \text{تعداد اسفیرهای تشکیل شده}) = \text{درصد اسفیرزایی}$

تست کلونی زایی^{۱۰}

جهت انجام این تست از سلول سرطانی MDA-MB-231 استفاده گردید. درون هر چاهک ۹۶ خانه تعداد 10^4 سلول قرار داده شد و با محیط کشت به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد کامل سلول ها به خانه مخصوص کنترل فقط محیط کشت و به خانه های مربوط به تیمار با دارو بطور جداگانه، ۱۲ میکرولیتر کربنات کلسیم و ۱۲ میکرولیتر نانوفلورید کلسیم اضافه گردید. بعد از ۴۸ ساعت هر کدام از خانه ها با PBS شستشو داده شدند و به کمک تریپسین سلول ها جداسازی و شمارش گردیدند. سپس در هر پلیت مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول حاوی رسوب سلولی و ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباتور نگهداری گردید. خانه ها فیکس و رنگ آمیزی گردیدند. پس از خشک شدن کامل خانه ها، سلول ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ بررسی گردیدند (۱۳).

روش آماری

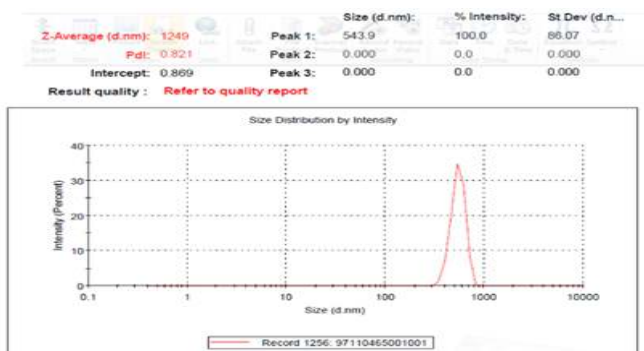
از T-Test برای مقایسه داده های بین دو گروه استفاده شد و میزان معنی داری P کمتر از ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد که به ترتیب با علامت های **، * و *** نشان داده شد.

یافته ها و نتایج

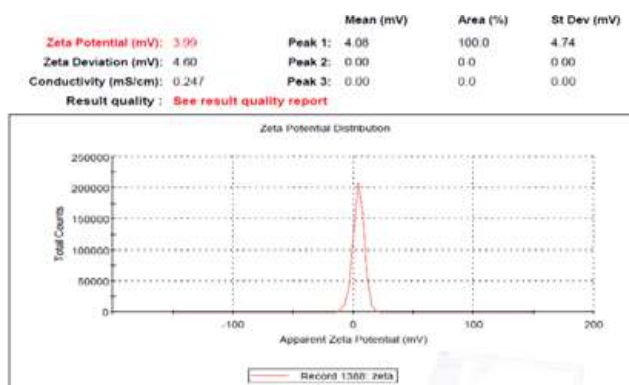
نتایج DLS

در نمودار ۱ اندازه نانوفلورید کلسیم مقدار 543 ± 86 نانومتر نمایش داده شده است. و در نمودار ۲ مقدار پتانسیل زتا $4/0 \pm 4/7$ MV مشاهده می شود.

¹⁰ Colony assay



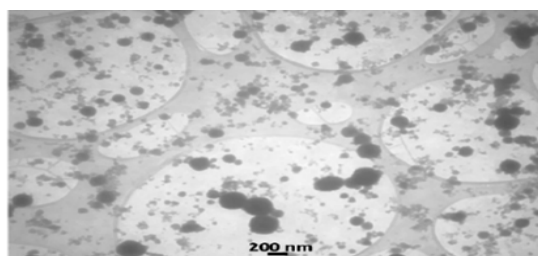
نمودار ۱. اندازه ذرات نانوفلورید کلسیم با استفاده از تکنیک DLS. اندازه نانوذرات فلورید کلسیم 543 ± 86 نانومتر بدست آمد.



نمودار ۲. نمودار توزیع پتانسیل زتا بر اساس نتایج DLS. پتانسیل زتا نانوذرات فلورید کلسیم $4/0 \pm 4/7$ MV بدست آمد.

نتایج TEM

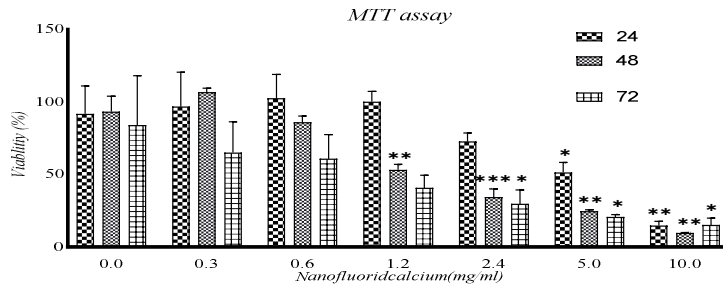
در شکل ۱ نتایج میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می دهد، نانوذرات سنتز شده قطربین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوفلورید کلسیم با بزرگمایی ۲۰۰ نانومتری. 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 (۰/۳ و ۰/۶ و ۱/۲ و ۲/۴ و ۵/۰ و ۱۰/۰ میلی گرم در میلی لیتر) در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳. مقایسه میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در غلظت‌های مختلف نانوفلورید کلسیم. توضیحات در متن آورده شده است.

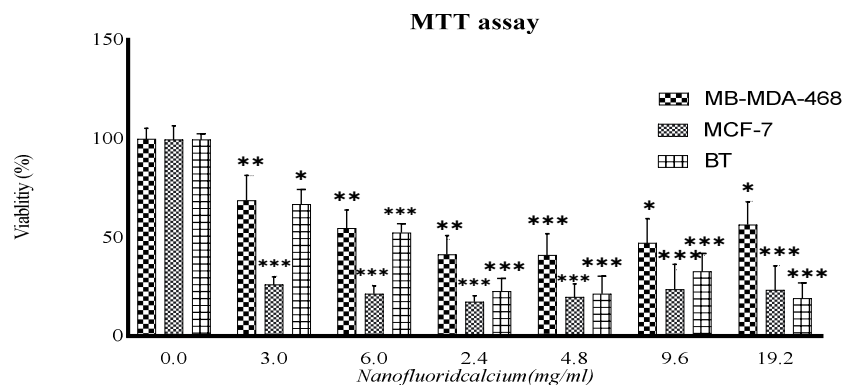
علامت * نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.05$ می باشد.
 علامت ** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.01$ می باشد.
 علامت *** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.001$ می باشد.

از نمودار تست MTT برای محاسبه IC_{50} در سه زمان استفاده شد و نمودار ۳ نشان دهنده IC_{50} به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 می باشد. نتایج آنالیز ۵۰ درصد زنده ماندن در ۲۴ ساعت برابر ۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر بود نتیجه ۵۰ درصد زنده ماندن در ۴۸ ساعت برابر با غلظت ۱/۲ بود و در ۷۲ ساعت برابر ۱/۰۵ بود. مقادیر بدست آمده IC_{50} برای سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 در سه زمان ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت در جدول ۱ مقایسه شده است.

جدول ۱. مقایسه مقادیر بدست آمده IC_{50} برای سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 در سه زمان ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت

زمان (ساعت)	IC_{50} (میلی گرم در میلی لیتر)
۲۴	۴/۸
۴۸	۱/۲
۷۲	۱/۰۵

نتایج تست MTT بر روی رده‌های سلولی MDA-MB-468، BT-474 و MCF-7 در غلظت‌های (۰، ۰/۳ و ۰/۶ و ۱/۲ و ۲/۴ و ۵ و ۹/۶ و ۱۰ و ۱۹/۲ میلی گرم در میلی لیتر) نانوفلورید کلسیم در نمودار ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۴. مقایسه میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی رده های MDA-MB-468، BT-474 و MCF-7

در غلظت های مختلف نانوفلورید کلسیم.

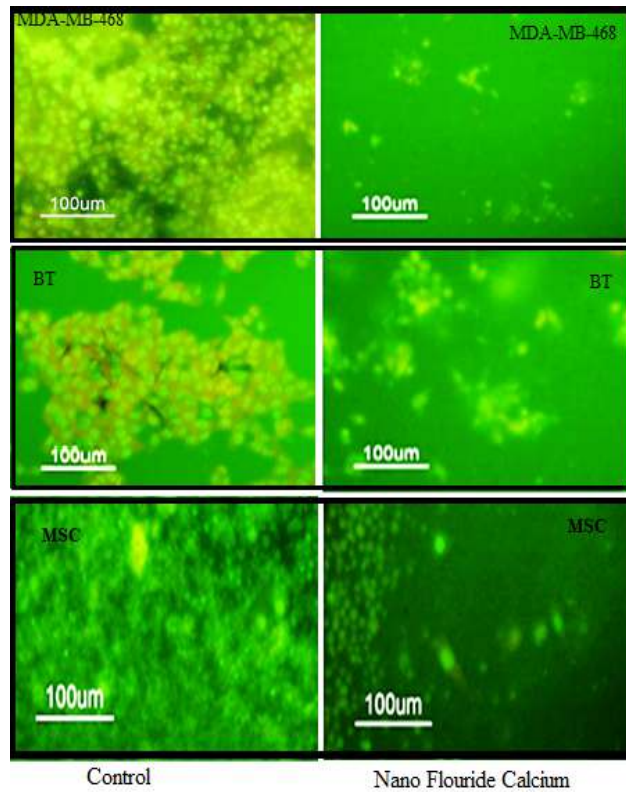
علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.05$ می باشد.

علامت** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.01$ می باشد.

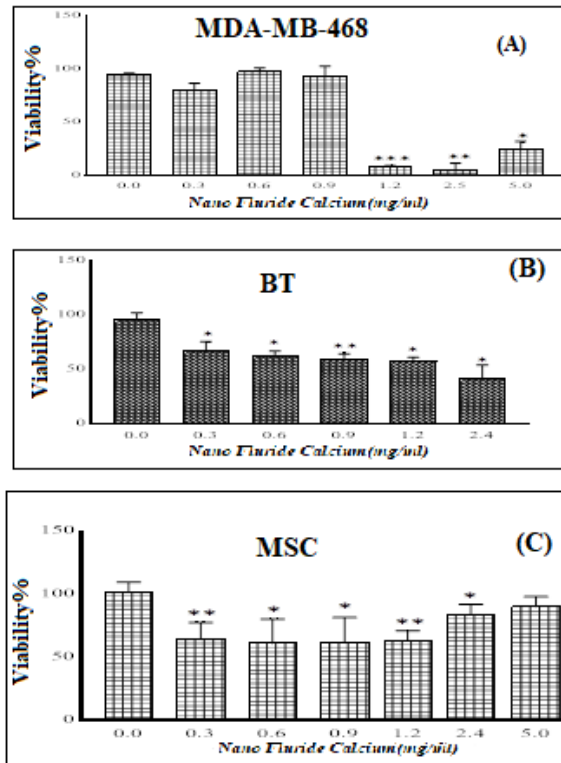
علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $p < 0.001$ می باشد.

نتایج تست AO/PI

در این تست، نتایج عکس برداری با میکروسکوپ فلوئورسنت در شکل ۲ مشاهده می گردد. همچنین داده های مربوطه بر روی نمودار ۵ نشان داده شده است.



شکل ۲. نتایج عکسبرداری از تست AO/PI به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی رده سلولی MDA-MB-468, MSC, BT.

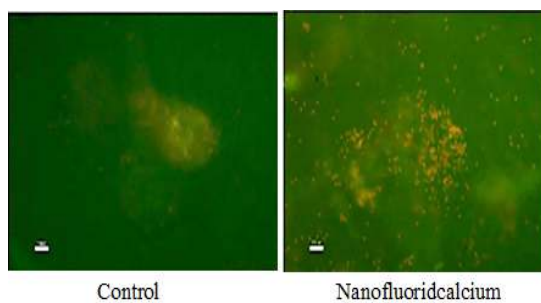


نمودار ۵. نمودار مربوط به تست AO/PI از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول سرطان پستان رده MDA-MB-468, BT, MSC. غلظتی از نانودارو که باعث مرگ ۵۰ درصد سلول های سرطانی شده است، در A. غلظت ۵ mg/ml، در B. ۲/۴ mg/ml بدست آمد. در C. هیچ یک از غلظت ها باعث از بین رفتن ۵۰ درصد سلول های سرطانی نگردید.

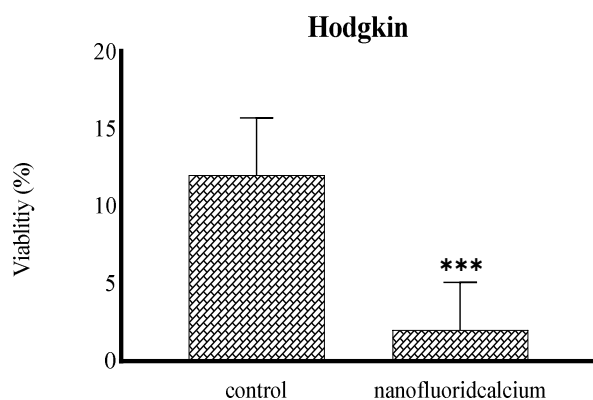
- علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل در سطح $p < 0.05$ می باشد.
- علامت** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل در سطح $p < 0.01$ می باشد.
- علامت*** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با کنترل در سطح $p < 0.001$ می باشد.

نتایج تست AO/PI بافت سرطانی Hodgkin

از رنگ های 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. رنگ های سبز، نارنجی و قرمز به دست آمده به ترتیب نشان دهنده سلول های زنده، آپوپتوز دیررس و سلول های مرده هستند. عکس های حاصل از عکس برداری با میکروسکوپ فلورسنت در شکل ۳ نمایش داده شده است. نتایج در نمودار ۶ نشان داده شده اند.



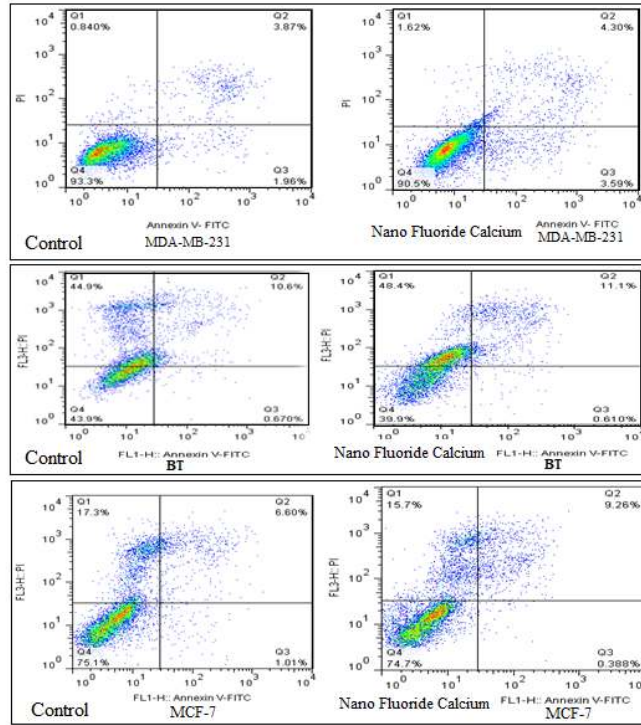
شکل ۳. شکل AO/PI به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی بافت سرطانی Hodgkin. بخش های رنگی نشان دهنده سلول های مرده در اثر تیمار با نانوفلورید کلسیم می باشد.



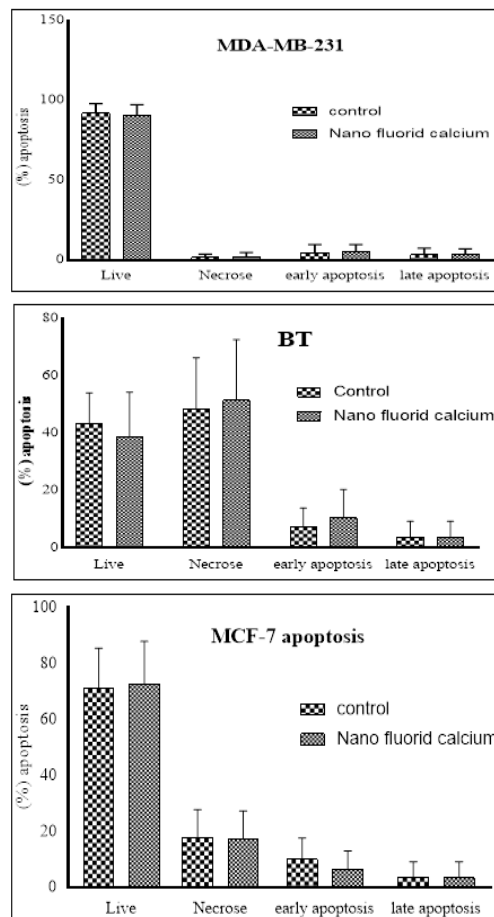
نمودار ۶. نمودار AO/PI به دست آمده از اثر نانوفلورید کلسیم بر روی بافت سرطانی Hodgkin. نانوفلورید کلسیم موجب کاهش زنده مانی سلول های بافت سرطانی شده است. علامت *** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده سلول تیمار شده با کنترل در سطح $p < 0.001$ می باشد.

نتایج تست آپوپتوز

از آنجا که استفاده از غلظت IC_{50} نانوفلورید کلسیم باعث از بین رفتن نصف سلول ها می گردید برای تست آپوپتوز از غلظت ملایم تر 0.6 میلی گرم در میلی لیتر استفاده گردید. نتایج آپوپتوز در شکل ۴ و درصد آپوپتوز و نکروز در نمودار ۷ نمایش داده شده اند.



شکل ۴. نمایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231, BT, MCF-7 در تماس با نانوفلورید کلسیم با غلظت ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر. Q1 نشان دهنده درصد نکروز، Q2 نشان دهنده درصد آپوپتوز اولیه، Q3 نشان دهنده درصد آپوپتوز نهایی، Q4 نشان دهنده درصد زنده مانده می باشد.

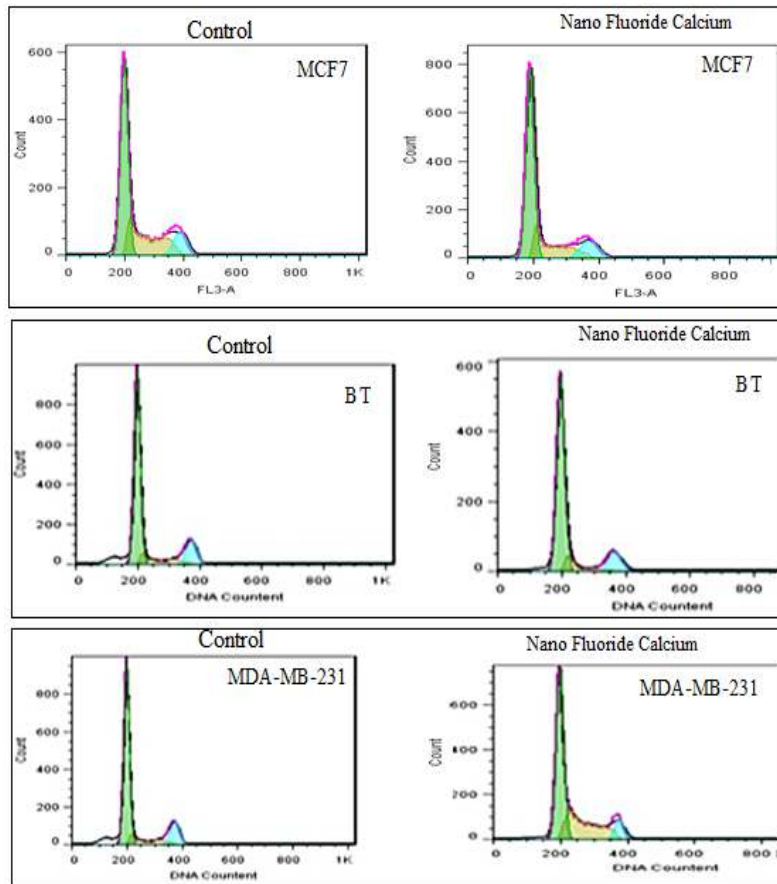


نمودار ۷. نمایش درصد زنده مانی در سلول های سرطان پستان رده های MDA-MB-231، MCF-7

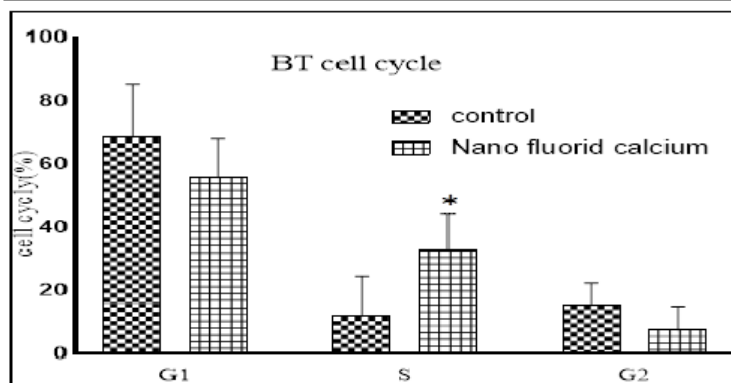
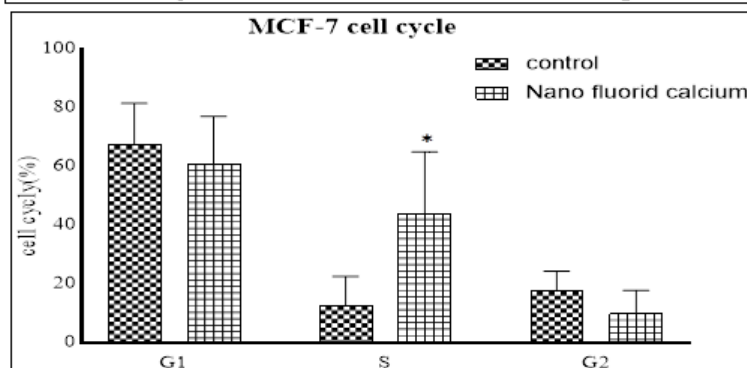
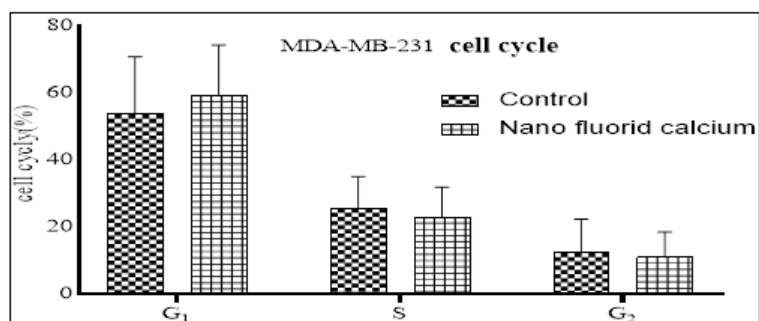
و BT. سلول ها تحت تیمار با نانوفلورید کلسیم با غلظت ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر قرار گرفتند.

نتایج چرخه سلولی

از آنجا که استفاده از غلظت IC_{50} نانوفلورید کلسیم باعث از بین رفتن نصف سلول ها می گردید 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.



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.



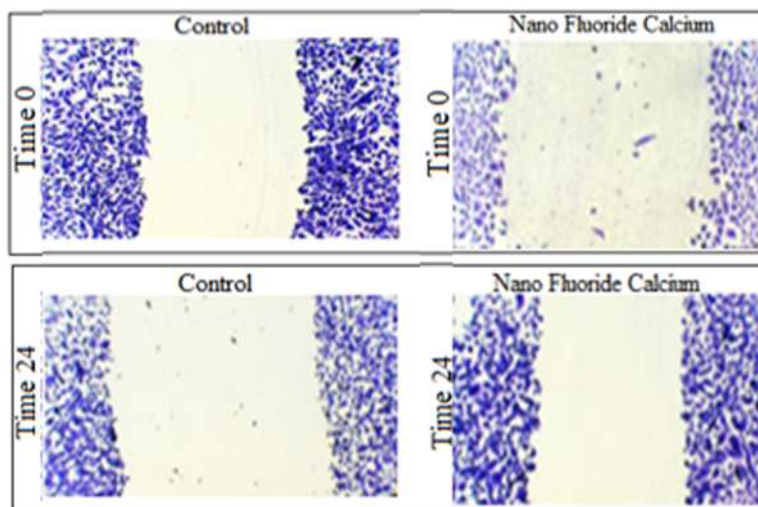
نمودار ۹. ارزیابی تأثیر تیمار نانوفلورید کلسیم بر چرخه سلولی سرطان پستان.

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

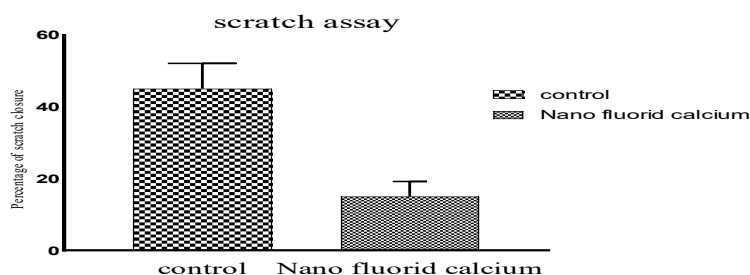
علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه انجام شده هر گروه با گروه کنترل همان گروه در سطح $p < 0.05$ می باشد.

نتایج تست خراش

در تست خراش جهت بررسی میزان مهاجرت سلول های MDA-MB-231 پس از تیمار با نانوفلورید کلسیم مطابق IC_{50} (۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر) نتایج بدست آمده، انجام شد. همانطور که در نمودار ۱۰ نشان داده شده است، مهاجرت سلول ها در تیمار با نانوفلورید کلسیم نسبت به کنترل ۲۱/۴ درصد کاهش یافت.



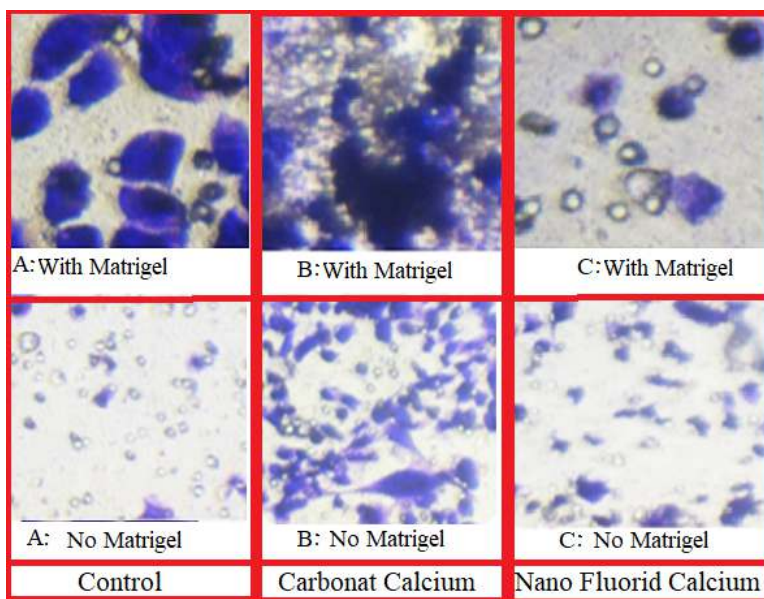
شکل ۵. اثر نانوفلورید کلسیم بر سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231. نانوفلورید کلسیم موجب مهاجرت سلول‌های سرطانی و بسته شدن خراش می‌شود.



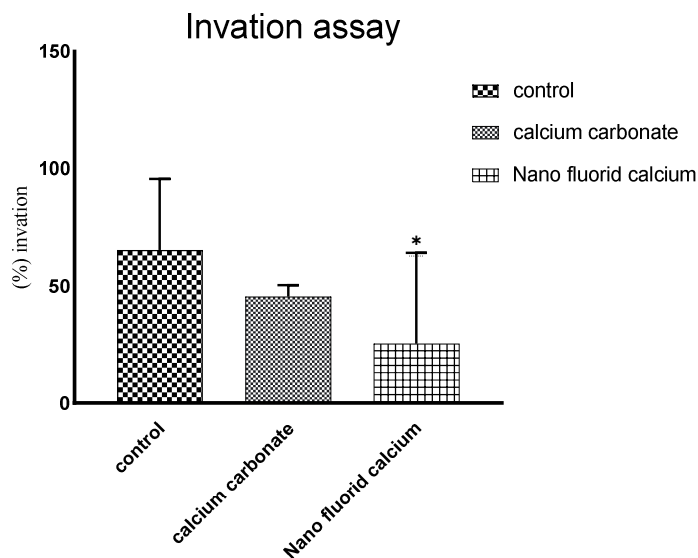
نمودار ۱۰. نمودار میزان مهاجرت سلول‌های سرطان پستان رده MDA-MB-231 با نانوفلورید کلسیم

نتایج تهاجم سلولی

تهاجم سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در محیط بدون FBS بررسی گردید. پس از گذشت انکوباسیون ۴۸ ساعته، سلول‌ها با نانوفلورید کلسیم وارد فیلترهای ترانس ول شدند. بعد از گذشت ۱۰ ساعت سلول‌ها فیکس، رنگ آمیزی و عکس برداری گردیدند (شکل ۶). همچنین میزان مهاجرت سلولی با استفاده از رابطه (۳) محاسبه گردید. نتایج در نمودار ۱۱ حاکی از آن است که کربنات کلسیم ۱۴ درصد و نانوفلورید کلسیم ۲۳ درصد تهاجم سلولی را کاهش داده اند.



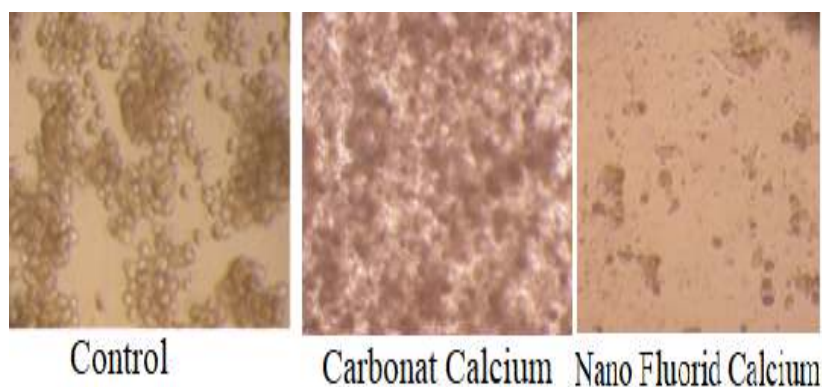
شکل ۶: نمایش مهاجم سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231. اثر A. کربنات کلسیم و B. نانوفلورید کلسیم بر سلول‌های سرطانی در حضور و عدم حضور Matrigel در قیاس با کنترل نشان داده شده است. کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم موجب کاهش مهاجم سلول‌های سرطانی گردیدند.



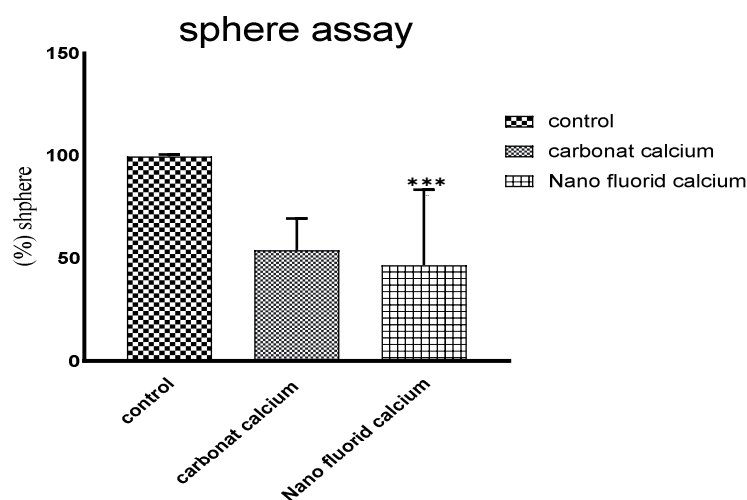
نمودار ۱۱: بررسی میزان مهاجم سلول‌های سرطان پستان رده MDA-MB-231 با کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم. کربنات کلسیم با ۱۴ درصد و نانوفلورید کلسیم با ۲۳ درصد در سطح $p < 0.05$ که نتیجه مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل می باشد، نشان دهنده تأثیر معناداری در کاهش مهاجم سلول سرطان پستان است.

نتایج تست اسفیروئید

در تست اسفیروئید توانایی تشکیل اسفیر در محیط غیر چسبنده بررسی گردید (شکل ۷). در این بررسی، تعداد و اندازه اسفیرهای تولید شده در چند روز متوالی در تیمار با کربنات کلسیم ۵۶ درصد و در تیمار با نانوفلورید کلسیم ۶۷ درصد کاهش نشان داد (نمودار ۱۲).



شکل ۷. نمایش اسفیرزایی کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم بر روی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231. کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم موجب کاهش اسفیرزایی گردیدند.

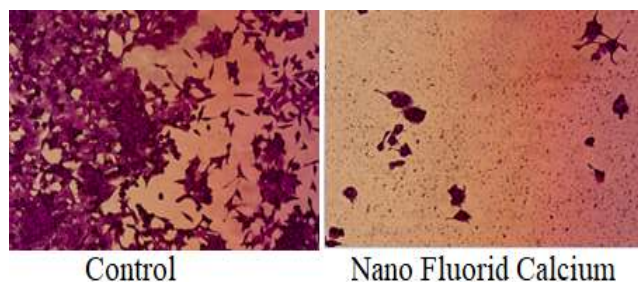


نمودار ۱۲. ارزیابی مقدار اسفیرزایی سلول سرطان پستان رده MDA-MB-231 تیمار شده با کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم. ، تعداد و اندازه اسفیرهای تولید شده در چند روز متوالی در تیمار با کربنات کلسیم ۵۶ درصد و در تیمار با نانوفلورید کلسیم ۶۷ درصد کاهش نشان داد

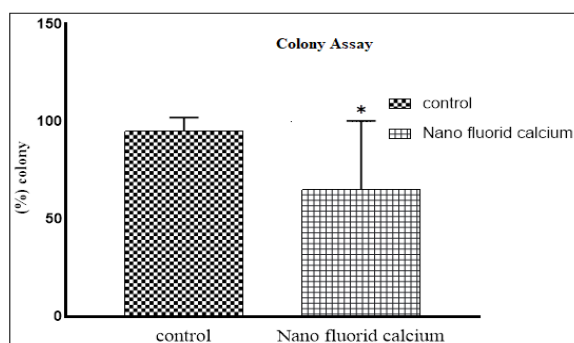
علامت *** نشان دهنده معنادار بودن مقایسه نانوفلورید کلسیم با کنترل در سطح $P < 0.001$ می باشد.

نتایج سنجش قدرت کلنی زایی

نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در تیمار با نانوفلورید کلسیم با غلظت IC50 ، ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر، مطابق شکل ۸ و نمودار ۱۳ حاکی از کاهش ۳۱ درصدی کلنی‌ها است.



شکل ۸. نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231. تیمار با نانوفلورید کلسیم موجب کاهش کلنی زایی شده است.



نمودار ۱۳. نمودار نتایج سنجش قدرت کلنی زایی سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در تیمار با نانوفلورید کلسیم. مطابق نمودار، تیمار با نانوفلورید کلسیم موجب کاهش ۳۱ درصدی کلنی زایی شده است. علامت* نشان دهنده معنادار بودن مقایسه سلول تیمار شده با نانوفلورید کلسیم و کنترل در سطح $p < 0.05$ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در این پروژه سنتز نانوفلورید کلسیم با استفاده از کربنات کلسیم، فلئور و فلورید هیدروژن انجام شد اما در مطالعه مشابهی که توسط نخعی و همکاران بر روی سنتز نانوکلسیم انجام شد، سنتز نانوفلورید کلسیم به روش هیدروترمال که یک روش شیمیایی می باشد، با ترکیب کلسیم کلرید و فلئورید 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 سلول‌های سرطانی دارند (۱۵). برای درمان سرطان پستان از داروهای متفاوتی در ایران استفاده می شود که یکی از داروها تاموکسیفن می باشد. که یکی از مهم ترین تأثیراتی که مصرف طولانی مدت تاموکسیفن بر جای می گذارد، مقاومت ایجاد شده در سلول‌های سرطان پستان حتی در حضور تاموکسیفن است که باعث می شود 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 می کند. لیکن سلول‌های سرطانی در مقابل آن مقاومت نشان می دهند (۱۷). بطور کلی نانو ذرات دارای دو خصوصیت مهم هستند که به آن‌ها جذابیت ویژه‌ای داده است. از طرفی به دلیل اندازه کوچک آن‌ها سطح وسیع تری 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 سال ۲۰۱۹، به طور کلی، جذب نانوذرات توسط سلول‌ها سریع است و در سلول‌های سرطانی سرعت جذب بیشتر نیز می شود (۱۹). نانوتکنولوژی باعث افزایش سمیت سلولی در بافت تومور شده

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 ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر و با تست DLS اندازه ذرات 543 ± 86 نانومتر و پتانسیل زتای برابر $4/0 \pm 4/7$ بدست آمد.

در این تحقیق، از تست MTT مقدار IC_{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 سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گردید به ترتیب ۴/۸، ۱/۲ و ۱۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. Vergaro V و همکاران آزمایش MTT را در فواصل زمانی مشابه، در غلظت‌های پایین (از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کربنات کلسیم خالص بر سلول‌های 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 نمی‌گذارد (۲۰). در آزمایشی Jabbari N و همکاران در سال ۲۰۱۸ تست MTT را با تأثیر غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیمار نانوکربنات کلسیم بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 فقط در زمان ۲۴ ساعت انجام دادند. OD بدست آمده از این آزمایش در سه غلظت ترتیب برابر $0/273 \pm 0/013$ ، $0/228 \pm 0/025$ و $0/187 \pm 0/025$ است. OD نشان دهنده تأثیر نانوکربنات کلسیم بر سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌باشد (۲۱).

در تحقیق حاضر، نتایج اثر داروی نانوفلورید کلسیم روی سلول‌های میکروتومورهای مشتق از بافت تومور بیمار هاچکین نیز نشان داد که میزان بقای سلول‌ها در گروه تحت تأثیر دارو به طور معنی‌داری کاهش داشته است و میزان سلول‌های مرده افزایش نشان داد. همچنین در مدت زمان ۴۸ ساعت نتایج اثر ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوفلورید کلسیم بر روی سلول‌های MDA-MB-231 در مرحله آپوپتوز، نکروز و زنده مانی به ترتیب در کنترل ۵/۸۳، ۰/۸۴، ۹۳/۳ و در تیمار دارو به ترتیب ۷/۸۹، ۱/۶۲ و ۹۰/۵ می‌باشد. تیمار نانوفلورید کلسیم موجب شد تا مراحل آپوپتوز و نکروز اندکی افزایش یابد. Jabbari N و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر سلول‌های سرطان پستان MCF-7 در مدت زمان ۲۴ ساعت با تیمار نانو کربنات کلسیم آزمایشی مربوط به آپوپتوز انجام دادند. در این آزمایش از نانو کربنات کلسیم با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده کردند. درصد آپوپتوزهای بدست آمده به ترتیب بر اساس غلظت‌ها برابر است با $25/75 \pm 1/75$ ، $22/64 \pm 2/50$ و $34/50 \pm 1/73$ می‌باشد که نشان دهنده افزایش میزان آپوپتوز با افزایش غلظت می‌باشد (۲۱).

برای انجام این پروژه در چرخه سلولی نیز بیشترین توجه بر زمان ۴۸ ساعت صورت گرفت. میزان مراحل G_1 ، S ، G_2 در کنترل $51/63$ ، $29/69$ و $11/7$ درصد و در حضور نانوفلورید کلسیم $58/33$ ، $23/9$ و $12/71$ درصد بدست آمد. این امر موجب افزایش مراحل G_1 و G_2 و کاهش مرحله S گردید. در آزمایشی Sun D و همکاران در سال ۲۰۱۵ با اثر نانوکربنات کلسیم بر روی سلول‌های SGC-7901، به مدت ۲۴ ساعت انجام دادند، G_1 ، S ، G_2 به ترتیب در گروه کنترل برابر $58/83$ ، $27/61$ و $12/24$ درصد و بعد از تأثیر نانوکربنات کلسیم برابر $53/97$ ، $30/51$ و $13/67$ درصد بدست آمد. این به این معنی می‌باشد 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 سلول‌ها که عامل متاستاز است، انجام می‌شود. تست خراش نماینده میزان حرکت بین سلول‌ها، همچنین میزان حرکت بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی طی پدیده مهاجرت سلول‌های توموری می‌باشد. از

آنجایی که این سلول جزو دسته سلول‌های سه بار منفی¹¹ TNBC است که بیش از ۹۰ درصد خواص سلول‌های بنیادی سرطان را دارا می‌باشد و قدرت مهاجم 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 غلظت‌های مختلف ۱/۸، ۵ و ۱۰ میلی مولار بر روی سلول سرطانی 4TI در ۳ زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت تأثیر دادند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان و افزایش میزان کلسیم مهاجرت نیز افزایش می‌یابد (۲۳).

در این پروژه از تست مهاجم سلولی جهت مطالعه فعل و انفعالات بین سلول‌های توموری و ماتریکس خارج سلولی استفاده گردید. به منظور افزایش قدرت مهاجم رده سلولی MDA-MB-231، به مدت ۲۴ ساعت در محیط بدون FBS در حالت گرسنه قرار داده شدند. بعد از تیمار کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم مشاهده گردید که میزان مهاجم 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 مهاجم گردیدند. جهت انجام این تست از رده MDA-MB-231 استفاده گردید که این رده سلول سرطانی را تحت تیمار کربنات کلسیم و نانوفلورید کلسیم قرار داده شد که تعداد و اندازه‌های اسفیرهایی که تحت تیمار کربنات کلسیم قرار گرفته بودند به نسبت کنترل کاهش یافتند. سلولی که تحت تیمار نانوفلورید کلسیم قرار گرفت هم از آن 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 کلسیم ۴۸ درصد کاهش اسفیرزایی داشته است.

در این پروژه از تست کلنی‌زایی برای بررسی میزان قدرت اجتماع سلول‌های MCF7 در کنار 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 می‌باشد 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. در نهایت تحت تیمار با نانوفلورید کلسیم نشان داده شد که نانوفلورید کلسیم موجب کاهش ۳۱ درصدی کلنی‌زایی سلول سرطان پستان می‌شود.

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)

- .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 .کنفرانس فیزیک ایران ۱۳۹۰؛ ۲۰۱۱. Structural and luminescence properties of CaF₂ nanoparticle synthesis by hydrothermal method, and synthesis polymer-nanoparticle composite.
- .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 . و کورکومین، رویکردی جدید به منظور غلبه بر مقاومت Diblock حاجی غلامی، شاهی وم، زیبا. نانو حامل پلیمری 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;1۰(۱):۳۲-۱۰
- ۱۸ . بندری حش. کاربردهای نانو تکنولوژی در تصفیه آب های سطحی، زیرزمینی و پساب ها. انسان و محیط زیست. ۲۰۱۲؛ ۲۷-۳۲:۱۰.
- .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.

- .۲۱ Jabbari N, Zarei L, Esmaceli 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 CaCO₃ 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.