

Evaluation of Cisplatin and Cisplatin-loaded Magnetic Iron Oxide Nanoparticles on *BCL2* and *BAX* genes in the Breast Cancer T47D Cell Line

Mohammad Javad Mokhtari^{1*}, Zhilla Hoseineian², Fatemeh Koohepeima³, Azim Akbarzadeh⁴, Mehrdad Hashemi⁵, Reza Mahdian⁶, Ahmad Reza Kamyab⁷, Hadi Mohammadi⁸

1- Assistant Professor, Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran

2- M.Sc., Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

4- Professor, Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5- Associated Professor, Department of Genetics, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

6- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

7- M.Sc., Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran

8- M.Sc., Young Researchers Club, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 7341617184, Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran
Email: mj_mokhtari@srbiau.ac.ir

Received: 29/Sep/2012, Accepted: 24/Dec/2012

Abstract

Objective: Breast cancer is the second leading cause of cancer death in women. Cisplatin is a traditional cancer drug commonly used in chemotherapy for killing cancer cells. Modulation at the mRNA levels of apoptotic related genes often correlate with the sensitivity of various types of cancer cells to chemotherapeutic agents. Nanoparticulate drug delivery systems are being developed to effectively deliver smaller doses of chemotherapeutic agents and control drug distribution in the body. In this study, we evaluate the expressions of *BCL2* and *BAX* genes in T47D treated with cisplatin and cisplatin nanoparticles, which can result in a new approach to breast cancer therapy.

Methods: In this study, we treated T47D cells with different concentrations of cisplatin and cisplatin nanoparticles at 48 h. The IC50 was determined. We extracted RNA by using RNX solution, after which cDNA was synthesized. The precise primers for the *BCL2*, *BAX* and *TBP* genes were designed by specific software. The quantity of *BCL2* and *BAX* gene expression compared to *TBP* gene (reference gene) was analyzed using real-time PCR.

Results: *BCL2* and *BAX* gene expression levels in T47D cells treated by cisplatin were 0.7 (*BCL2*) and 1.48 (*BAX*); in T47D cells treated with cisplatin-loaded nanoparticles, the gene expressions were 0.03 (*BCL2*) and 2.41 (*BAX*).

Conclusion: In this study, the results have shown that cisplatin-loaded nanoparticles are effective anticancer agents. Cisplatin nanoparticles induce apoptosis in human breast cancer cell lines. We have shown that cisplatin nanoparticles strongly increased cytotoxicity in comparison to the free drug in the T47D cell line.

Keywords: Cisplatin, Nanoparticle, Breast Cancer, Programmed Cell Death Gene

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 75-87

ارزیابی اثر سیس پلاتین و نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با سیس پلاتین روی بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* در رده سلولی T47D سرطان پستان

محمدجواد مختاری^{۱*}، ژیلا حسینیان^۲، فاطمه کوه‌پیما^۳، عظیم اکبرزاده^۴، مهرداد هاشمی^۵، رضا مهدیان^۶، احمدرضا کامیاب^۷، هادی محمدی^۸

- ۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زرقان، زرقان، ایران
- ۲- کارشناس ارشد، بخش پابلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ترمیمی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۴- استادیار، بخش پابلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۶- استادیار، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۷- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زرقان، زرقان، ایران
- ۸- کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، زرقان، کدپستی: ۷۳۴۱۶۱۷۱۸۴، خیابان شهید صادقی، روبروی مجتمع آل‌یاسین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زرقان، گروه زیست‌شناسی
Email: mj_mokhtari@srbiau.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۰۴

دریافت مقاله: ۹۱/۰۷/۰۸

چکیده

هدف: سرطان پستان دومین عامل مرگ و میر سرطان در زنان است. سیس پلاتین یک داروی ضد سرطانی رایج شیمی درمانی است که سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. حساسیت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی درمانی اغلب به خاطر تغییر بیان در سطوح mRNA ژن‌های مرتبط با فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. نانو ساختارهای تحویل دهنده دارو برای انتقال غلظت‌های کمتر و مؤثرتر داروهای شیمی درمانی طراحی شده است. در این مطالعه بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* در سلول‌های T47D تیمار شده با سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین ارزیابی شد که می‌تواند منجر به افقی تازه در درمان سرطان پستان باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های T47D با غلظت‌های متفاوت سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. IC₅₀ تعیین شد. RNA با استفاده از محلول RNX استخراج شد. سپس cDNA ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *BAX*، *BCL2* و *TBP* با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی طراحی شد. میزان بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* نسبت به ژن *TBP* (ژن مرجع) با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

نتایج: بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* در سلول‌های T47D تیمار شده با سیس پلاتین، به ترتیب به میزان ۰/۰۷ و ۱/۴۸ و در سلول‌های T47D تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین، به ترتیب به میزان ۰/۰۳ و ۲/۴۱ تغییر یافت. نتیجه‌گیری: در این بررسی نشان داده شد که نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین یک ترکیب ضد سرطانی مؤثر است. همچنین مشاهده شد که نانوذرات سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطان پستان می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که آثار سمیت سلولی نانوذرات سیس پلاتین بر رده سلولی T47D بیشتر از سیس پلاتین تنهاست.

کلیدواژگان: سیس پلاتین، نانوذره، سرطان پستان، ژن‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۷۵-۸۷

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن به طور غیرعادی تقسیم و تکثیر شده و به بافت‌های سالم منتشر می‌شوند. سرطان پستان بیماری چند عاملی و پیچیده‌ای است که عوامل ژنتیکی و محیطی زیادی در آن دخالت دارد. شانس ابتلا به سرطان پستان با افزایش سن بالا می‌رود. علاوه بر این زن بودن عامل خطر اصلی برای ابتلا به سرطان پستان است. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان بعد از سرطان غیرملانوم پوست (Nonmelanoma Skin Cancer) و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان پس از سرطان ریه است. این بیماری مختص زنان است اما مردان نیز ممکن است به آن مبتلا شوند. احتمال ابتلای زنان به سرطان مهاجم پستان طی زندگی شان ۱ به ۸ (۱۳ درصد زنان) است. در ایران سن ابتلا به این سرطان ۵ تا ۱۰ سال کمتر از کشورهای دیگر است. سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان ایرانی است [۱]. حدود ۵ تا ۱۰ درصد از موارد سرطان پستان زمینه ارثی دارد. شایع‌ترین ژن‌های معیوب در این زمینه دو ژن BRCA1 و BRCA2 است [۲]. شیمی‌درمانی یکی از روش‌های درمان سرطان یا تخفیف موقت آن با استفاده از برخی داروهای خاص است که در اصطلاح پزشکی به آن‌ها شیمی‌درمانی گفته می‌شود. بیشتر داروهای ضد سرطان به‌کار رفته در شیمی‌درمانی به‌صورت گزینشی نمی‌تواند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد و متأسفانه به بافت‌های سالم اطراف آن نیز آسیب جدی وارد می‌کند. آثار جانبی ناشی از شیمی‌درمانی به مقدار دوز مصرفی داروی به‌کار رفته بستگی دارد، همچنین این آثار می‌تواند منجر به بازگشت تومور و اغلب موارد مقاومت نسبت به دارو شود [۳، ۴]. سیس دی آمینو دی کلروپلاتینوم (Cis-Diamminedichloroplatinum) (سیس‌پلاتین: Cisplatin) یک کمپلکس معدنی آسیب‌رسان به DNA است که اغلب در شیمی‌درمانی سرطان به‌کار می‌رود. بزرگ‌ترین کاربرد کمپلکس‌های فلزی پلاتین در درمان سرطان است، که کمپلکس سیس‌پلاتین نمونه‌ای است که در آن با استفاده از ترکیب فلز پلاتین

اثرات ضدسرطانی نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین

و لیگاندهای آمین و کلر به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی استفاده می‌شود. این دارو به طور معمول برای درمان سرطان پستان نمی‌شود اما مشاهده شده که در فرم‌های پیشرفته سرطان پستان درمان ترکیبی این دارو با اتوپوزاید (Etoposide) تأثیرات بالینی مفیدی دارد. فعالیت زیستی سیس‌پلاتین به‌طور غیر منتظره‌ای در ۱۲۵ سال پیش، بعد از یک گزارش اولیه از ساخته شدن و بررسی خصوصیات آن کشف شد. هرچند ساخت و شناخت سیس‌پلاتین برای اولین بار توسط میشل پیرون در سال ۱۸۴۵ گزارش شد [۵]، اتصال سیس‌پلاتین به DNA ژنومی در هسته سلول، رخداد اصلی است که پاسخ‌گوی خصوصیات ضد سرطانی سیس‌پلاتین است. بنابراین آسیب ایجاد شده بر اثر اتصال سیس‌پلاتین به DNA ژنومی ممکن است مکانیسم‌های رونویسی و همانندسازی DNA را مهار کند. متعاقب آن، این تغییرات در پردازش DNA باعث فرآیند سمیت سلولی می‌شود که سلول‌های سرطانی را به سمت مرگ سلولی هدایت می‌کند [۶]. با توجه به افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان‌های مختلف و نقصان روش‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای درمان سرطان احساس می‌شود. نانوفناوری جدیدترین گرایش در درمان سرطان است. در حقیقت نانوفناوری برای تغییر مقیاس در روش‌های انتقال دارو ایجاد شده است. محققان با استفاده از نانوفناوری، در حال ساخت کپسول‌هایی با ابعاد نانومتری هستند که علاوه بر اندازه غیر قابل تصورشان قدرت تشخیص بافت‌های بیمار را داشته، دقیقاً روی این بافت‌ها قرار گرفته و مقدار داروی لازم را به آن‌ها می‌رساند، این پدیده را دارورسانی هدفمند می‌گویند [۷]. استفاده از نانوذره‌هایی که دارای خاصیت مغناطیسی بالایی است مانند نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن این امکان را فراهم می‌کند که حرکت آن‌ها را در خون توسط میدان مغناطیسی خارجی کنترل شود و فقط آن ذرات به بافت هدف سوق داده شود. علاوه بر این ثابت شده که نانوذره‌های سوپراپارامغناطیس بسته به فرکانس و دامنه میدان مغناطیسی متناوب اعمالی قادر است گرما تولید کند. به این صورت که سوسپانسیون نانوذره‌های سوپراپارامغناطیس اکسید آهن، انرژی یک میدان مغناطیسی نوسانی را جذب می‌کند که از این ویژگی می‌توان

FBS تهیه شد. به منظور بررسی اثر سمیت سلولی این ترکیبات از روش سنجش MTT (-[4,5-Dimethylthiazol-2-YI]-3-(2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) استفاده شد. این روش براساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم (Tetrazolium) محلول به فورمازان (Formazan) نامحلول است. ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰۰۰۰ سلول در محیط کشت ریخته شد. پس از ۸ ساعت محیط کشت رویی برداشته شد و دارو اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO₂ انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline)) به هر چاهک اضافه شده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان ایجاد شد. برای حل کردن فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Isopropanol) به هر چاهک افزوده شد. سپس شدت رنگ توسط دستگاه قرائت گر الیزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند) در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت شد. شش چاهک حاوی سلول‌های T47D بدون تیمار به عنوان کنترل منفی انتخاب شد. برای تعیین دوز ۵۰ درصد کشندگی مواد سمی روی رده سلولی T47D، تمامی اطلاعات به‌دست آمده (درصد سمیت) از نمونه‌ها و کنترل با استفاده از نرم‌افزار statistical package Pharm-PCS بررسی شد و میزان دقیق IC₅₀ مربوط تعیین شد [۱۱].

استخراج RNA

ابتدا ۲×۱۰^۶ سلول در فلاسک‌های T-25 ریخته شد و بعد از یک شب با سیس‌پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس‌پلاتین تیمار شد و پس از مدت زمان ۴۸ ساعت استخراج RNA انجام شد. برای جداسازی سلول‌ها از ته فلاسک، سلول‌ها با تریپسین جدا و با سرعت ۱۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس دو مرتبه با PBS شست و شو شدند. سپس

برای کاربرد در داخل بدن استفاده کرد تا دمای بافت تومور را افزایش داده و سلول‌های بیمار به این طریق تخریب شوند، زیرا سلول‌های تومور نسبت به سلول‌های سالم به افزایش دما حساس‌تر هستند [۸].

گسترش روز افزون بیماری سرطان و مشکلات فراوان ناشی از آن از یک سو و عدم موفقیت کافی روش‌های درمانی رایج و سنتی در مبارزه اختصاصی با آن موجب توجه ویژه محققین نسبت به روش‌های درمانی هدفمند گشته است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر سیس‌پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس‌پلاتین که در مطالعه گذشته ساخته شده بود [۹]، بر قدرت بقای سلول‌های T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) از طریق تنظیم بیان ژن‌های BCL2 (B-Cell Lymphoma 2) و BAX (Bcl-2-Associated X Protein) است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

رده سلولی T47D از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد (NCBI C203). این سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، دو میلی‌مولار گلوتامین، دو گرم در لیتر بی‌کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO₂ کشت شدند [۱۰].

انکوباسیون سلول‌ها با سیس‌پلاتین و نانوذرات

مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با سیس‌پلاتین

غلظت‌های مختلفی از سیس‌پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس‌پلاتین (۰، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد

اثرات ضدسرطانی نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین

مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهار کننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuV و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. سپس برنامه دمایی - زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad، آمریکا) صورت گرفت.

طراحی آغازگرها

در این مطالعه ژنهای *BCL2* واقع بر کروموزوم ۱۸ (۱۹۸۲۱،۳) و *BAX* واقع بر کروموزوم ۱۹ (۱۹۱۳،۴-۱۹۱۳،۳) به عنوان ژنهای هدف و ژن *TBP* واقع بر کروموزوم ۶ (۶۱۲۷) به عنوان ژن مرجع انتخاب شد. سپس توالی ژن‌ها از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> گرفته شد، با نرم افزار Primer Express نسخه ۳/۰ (Applied Biosystems، آمریکا) برای ژنهای مورد مطالعه آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف *BCL2* به صورت 5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3' و 5'-CAGCCAGGA -3' برای ژن مرجع *BAX* به صورت 5'-TTGCTT CAGGGTTTCATCCAG-3' - جلویی، دمای ۶۱/۸۴ درجه سانتی گراد و 5'-AGCTTCTGGTGGACGCATC-3' و 5'-AGTCTGGAC -3' برگشتی، دمای ۶۰/۲۶ درجه سانتی گراد و 5'-AAATCATGAGGATAAGAGAGCCACG-3' برگشتی، دمای ۵۹/۵۶ درجه سانتی گراد، برای ژن مرجع *TBP* به صورت 5'-AGTCTGGAC -3' برگشتی، دمای ۶۲/۱۹ درجه سانتی گراد است. برای درستی توالی آغازگرها و اطمینان از

برای لیز کردن سلول‌ها به آن‌ها یک میلی لیتر محلول استخراج RNX (سیناژن، ایران) سرد اضافه شد. سپس محتویات هر فالتون در میکروتیوب‌های فاقد RNase ریخته شد. نمونه‌های همگن به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر نمونه افزوده شد و پس از تکان دادن شدید به مدت ۱۵ ثانیه و پنج دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ (Eppendorf 5804R، آلمان) شدند. فاز آبی بالایی با حجم برابری از ایزوپروپانول مخلوط شد و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد. در ادامه سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت تا RNA شسته شود. در مرحله آخر RNA در آب مقطر دو بار تقطیر حل و در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارزیابی خلوص و کیفیت RNA استخراج شده

در این مرحله مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH، آلمان) تعیین شد. نسبت جذب نوری RNA در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر سنجش شد. از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر میان ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ میان ۱/۷ تا ۱/۹ داشتند برای ساخته شدن cDNA استفاده شد.

ساخت DNA مکمل (cDNA)

مولکول‌های DNA مکمل با کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، آمریکا) ساخته شد. مخلوط واکنش شامل یک میکروگرم RNA، ۵ میکرولیتر بافر واکنش 5x، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (dT) Oligo، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، دو میکرولیتر

$$[10^{-(1/SLPOE)} - 1] \times 100 = \text{درصد کارایی واکنش تکثیری}$$

(Slope): شیب منحنی استاندارد)

سپس برای هر واکنش PCR یک منحنی تکثیر (Amplification curve) رسم شد. در این تحقیق از روش کمیت سنجی نسبی برای بررسی تغییرات بیان ژن استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با دارو) و با نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد [۱۰].

تجزیه و تحلیل‌های آماری

نتایج به دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. آزمون مقایسه‌ای مورد استفاده Student's t-test بود و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تیمار سلول‌های T47D با سیس پلاتین و نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده

با سیس پلاتین

تیمار سلول‌های T47D با غلظت‌های مختلف نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در مدت ۴۸ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها ($P > 0.05$) $93/51 \pm 13/47$ ($P < 0.05$) $84/12 \pm 4/03$ ($P < 0.01$) $65/34 \pm 12/72$ ($P < 0.01$) $50/33 \pm 18/05$ ($P < 0.01$) $22/11 \pm 2/16$ ($P < 0.001$) $20/53 \pm 0/95$ ($P < 0.001$) می‌شود. تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین براساس سیس پلاتین ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰

عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیر اختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) شدند.

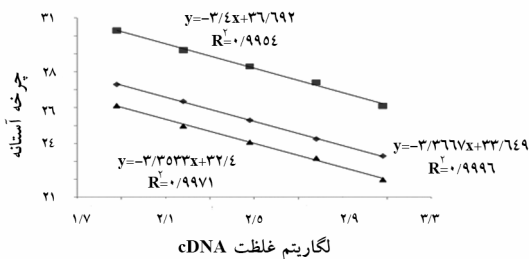
Real-time RT-PCR

در این مطالعه از دستگاه Real-time PCR مدل Rotor-Gene 6000 (Corbett Research، استرالیا) استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به واسرشت شدن مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌شود به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله نهایی برای ترسیم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت تکرار سه‌تایی انجام شد. در هر واکنش ۱۰ میکرولیتر Applied Biosystems) SYBR-Green PCR Master Mix (آمریکا)، یک میکرولیتر (۴۰۰ نانومولار) از آغازگرهای جلویی و برگشتی اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر cDNA (۳۰۰ نانوگرم) و مابقی آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید.

برای ترسیم منحنی استاندارد (Standard Curve) از رقت‌های متوالی cDNA استاندارد به صورت غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و چرخه آستانه یا (Ct) محور عمودی برای هر ژن ترسیم شد. از منحنی استاندارد دامنه غلظت بهینه cDNA الگو و میزان بازده PCR (PCR efficiency) برای هر ژن تعیین شد. واکنش‌های رقت‌های متوالی برای آغازگرها و DNA استاندارد به همراه واکنش فاقد cDNA الگو (No template control) برای هر ژن انجام شد.

اثرات ضدسرطانی نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین

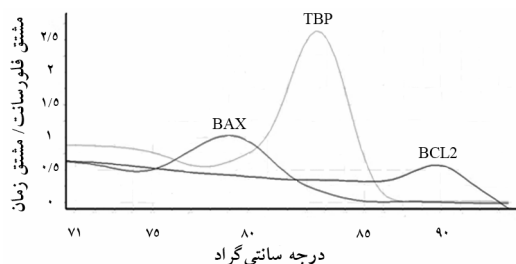
BAX و *BCL2* (شکل ۲)، به ترتیب $-3/36$ ، $-3/42$ و $-3/35$ محاسبه شد. میزان کارآیی واکنش تکثیر با استفاده از شیبه منحنی استاندارد برای ژن‌های *TBP*، *BCL2* و *BAX* به ترتیب $98/15$ ، $95/83$ و $86/63$ درصد به دست آمد.



شکل ۲ نمودار منحنی استاندارد ژن‌های *TBP*، *BCL2* و *BAX* که به ترتیب از بالا به پایین منحنی استاندارد ژن‌های *TBP* و *BAX*، *BCL2* است. این منحنی استاندارد براساس رقت‌های 75 ، 150 ، 300 ، 600 و 1200 نانوگرم در میکرولیتر cDNA الگو ترسیم شده است.

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب

تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد (شکل ۳).



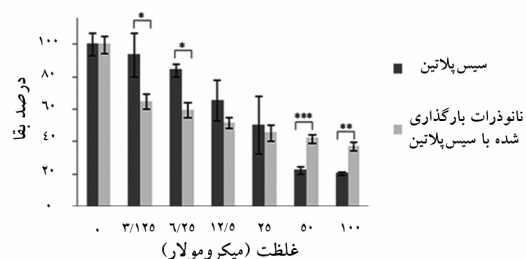
شکل ۳ منحنی ذوب ژن‌های *TBP*، *BCL2* و *BAX*. محور عمودی نشان دهنده مشتق فلورسانت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده درجه سانتی‌گراد است.

تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR با

استفاده از منحنی‌های تکثیری

در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با غلظت‌های متفاوت

و 100 میکرومولار به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها ($P < 0/01$) $64/83 \pm 4/53$ ($P < 0/001$)، $59/33 \pm 4/72$ ($P < 0/001$)، $51/5 \pm 3/27$ ($P < 0/001$)، $45/33 \pm 5/03$ ($P < 0/001$)، $42 \pm 2/64$ ($P < 0/001$)، $37/1 \pm 2/59$ می‌شود. این نتایج در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱ درصد بقای سلول‌های T47D در برابر غلظت‌های مختلف سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین در مدت زمان 48 ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است ($P < 0/05$: *، $P < 0/01$: **، $P < 0/001$: ***).

محاسبه IC_{50} سیس پلاتین و نانوذرات

مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با

سیس پلاتین روی سلول‌های T47D در زمان

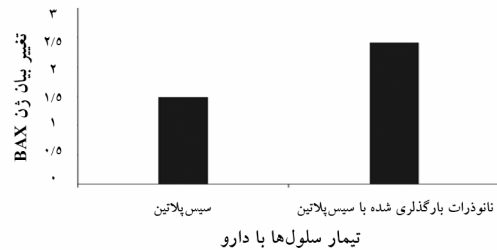
ساعت

پس از تیمار سلول‌های T47D با غلظت‌های متفاوت سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین در زمان 48 ساعت با استفاده از نرم‌افزار *pharm* میزان IC_{50} محاسبه شد. میزان IC_{50} برای سیس پلاتین $28/395$ میکرومولار و برای نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین $17/186$ میکرومولار محاسبه شد.

رسم منحنی استاندارد و محاسبه کارآیی PCR

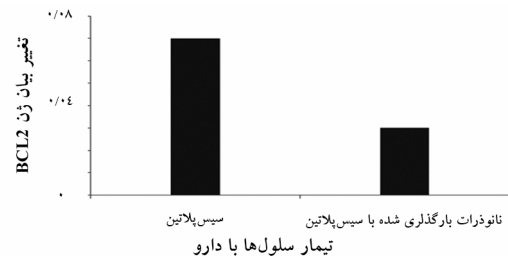
پس از ترسیم منحنی استاندارد برای ژن‌های *TBP*، *BCL2* و *BAX* دامنه مقدار مناسب cDNA الگو 75 تا 600 نانوگرم به دست آمد. شیبه منحنی استاندارد برای ژن‌های *TBP*

شرایط مختلف متفاوت بود که بیانگر تغییر در میزان بیان این ژن‌ها است.



شکل ۵ منحنی تغییر بیان ژن *BAX* در سلول‌های T47D تیمار شده با سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین؛ در غلظت ۲۸/۳۹۵ میکرومولار سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین میزان بیان ژن *BAX* به میزان ۱/۴۸ و ۲/۴۱ تغییر یافت.

دارو چرخه آستانه ژن مرجع جابه‌جایی بسیار ناچیز و نامحسوسی داشت اما چرخه آستانه ژن‌های *BCL2* و *BAX* در



شکل ۴ منحنی تغییر بیان ژن *BCL2* در سلول‌های T47D تیمار شده با سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین؛ در غلظت ۲۸/۳۹۵ میکرومولار سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین میزان بیان ژن *BCL2* به میزان ۰/۰۷ و ۰/۰۳ تغییر یافت.

است. شناسایی مکانیسم‌های سیس پلاتین بینش مهمی را در زمینه داروهای حاوی پلاتین فراهم می‌آورد.

برای کاهش آثار جانبی و افزایش کارایی سیس پلاتین محققان مختلف از نانو حامل‌های گوناگون برای انتقال سیس پلاتین استفاده کرده‌اند. بیشتر عوامل ضد سرطانی آثار درمانی خودشان را با القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) اعمال می‌کند. القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یکی از مهم‌ترین روش‌ها در از بین بردن بدون عارضه سلول‌های سرطانی است. در این تحقیق داروی سیس پلاتین استفاده شد، زیرا این دارو به صورت یک نمک معدنی با ساختار مولکولی بسیار کوچک و در دسترس است که در درمان بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارد. سیس پلاتین یک ترکیب آلکیله کننده ضد سرطانی است که برای درمان بسیاری از سرطان‌ها استفاده می‌شود. آثار سلول‌کشی این دارو به اثبات رسیده است. تحقیقات صورت گرفته بر روی بیان ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی تخمدان تیمار شده با سیس پلاتین نشان داد که بیان ژن‌های *BCL2*, *BCL-XL*, *BAD* و *BAX* به صورت کاملاً گوناگون در اثر تیمار با سیس پلاتین تغییر می‌کند. همچنین میزان بیان ژن‌های *BCL2*, *BAD* و *BAX*

پروفایل (mRNA) بیانی ژن‌های *BCL2* و *BAX* در سلول‌های T47D تیمار شده سیس پلاتین و نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با سیس پلاتین

تغییر در بیان ژن‌ها در سلول‌های T47D تیمار شده با غلظت ۲۸/۳۹۵ میکرومولار سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بعد از ۴۸ ساعت ارزیابی شد. بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* در سلول‌های T47D تیمار شده با سیس پلاتین به ترتیب به میزان ۰/۰۷ و ۱/۴۸ و در سلول‌های T47D تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین به ترتیب به میزان ۰/۰۳ و ۲/۴۱ تغییر یافت که در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

بحث

از زمان کشف سیس پلاتین در سال ۱۹۶۵ توسط دکتر رزنبرگ (Rosenberg) [۱۲] و استفاده بالینی از آن در سال ۱۹۷۰ [۱۳] تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی مکانیسم عملکرد سیس پلاتین روی سلول‌های سرطانی در حال انجام

اثرات ضدسرطانی نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین

قرار می‌گیرد ناسازگار باشد و باعث اختلال شود. بنابراین انتقال دارو به ناحیه ویژه می‌تواند عوارض جانبی را حذف کند و همچنین میزان داروی مورد نیاز را کاهش دهد. برای درمان با استفاده از نانوذرات، راه‌کارهای هدف‌گیری فعال و غیرفعال به‌کار گرفته می‌شود. در هدف‌گیری فعال اتصال نانوذره به یک لیگاند خاص سبب می‌شود تا نانوذره توسط سلول‌های خاص تشخیص داده شود [۱۷]. علاوه بر این؛ یک راه برای بهبود رهایش هدفمند دارو در زمان استفاده از نانوذرات مغناطیسی به‌کارگیری یک میدان مغناطیسی خارجی برای هدایت دارو به محل مورد نظر است. در این روش باید دارو به نانوذره‌های مغناطیسی با پوشش مناسب، متصل شود و سپس به سیستم گردش خون تزریق شود. سپس یک میدان مغناطیسی به ناحیه مورد نظر اعمال می‌شود تا حامل‌های مغناطیسی به طور گزینشی در این محل جمع شوند [۱۸].

هدف‌گیری غیرفعال براساس ویژگی‌های سیستم انتقالی و پاتولوژی بیماری به منظور انباشته شدن دارو در محل مورد علاقه و اجتناب از توزیع غیر اختصاصی تکیه می‌نماید. در تومورهای جامد در مدل موشی تسهیل نفوذپذیری و احتباس (Enhanced Permeability and Retention: EPR) افزایش می‌یابد [۱۹]. وقتی ترکیبات دارو- نانوذرات به‌کار گرفته می‌شوند غلظت‌ها ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر می‌تواند به تومورها برسد و این به خاطر تسهیل نفوذپذیری و نگهداری در مقایسه با استفاده از داروی آزاد است [۲۰].

در سال‌های اخیر استفاده از نانوحامل‌ها سبب کاهش آثار جانبی سیس‌پلاتین شده و تجمع و بقای سیس‌پلاتین را در بافت‌های توموری افزایش داده است. در حال حاضر دو راه‌کار برای قرارگیری سیس‌پلاتین در نانوذرات وجود دارد، (۱) به دام انداختن فیزیکی سیس‌پلاتین در نانوذرات و (۲) اتصال شیمیایی سیس‌پلاتین به نانوذرات. محققان روش جدیدی در ساخت سیس‌پلاتین ایمن ایجاد کردند. از آن‌جا که کلیه‌ها قادر به جذب ذراتی با قطر بیش از ۵ نانومتر نیستند، نانوذراتی ساخته شدند که توسط کلیه‌ها قابل جذب نبودند [۲۱].

در سلول‌های تیمار شده با سیس‌پلاتین به ترتیب به میزان ۰/۹، ۱/۵ و ۱/۲ برابر به نسبت سلول‌های کنترل و تیمار نشده با دارو تغییر می‌کند [۱۴]. در مطالعه قبلی محققان حاضر مشخص شد که تیمار سلول‌های T47D با غلظت ۴۴ میکرومولار سیس‌پلاتین به مدت ۲۴ ساعت سبب کاهش بیان ژن *BCL2* می‌شود [۱۰].

سطوح بیانی mRNA ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در پاسخ به تیمار با سیس‌پلاتین، کربوپلاتین (Carboplatin) و دوکسوروبیوسین (Doxorubicin) در رده سلولی MCF-7 نشان داد که غلظت ۳/۳ میکرومولار از سیس‌پلاتین سبب کاهش بیان در سطح mRNA ژن‌های *BCL2*، *BCL2L12* و *CASP9* می‌شود؛ در حالی که تغییری در بیان ژن‌های *BAX* و *FAS* صورت نمی‌گیرد [۱۵]. پروفایل بیانی mRNA هرکدام از ژن‌های مذکور بسته به نوع درمان صورت گرفته و زمان پس از درمان متفاوت بود. این بررسی با روش RT-PCR و با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *BAX*، *FAS*، *CASP9*، *BCL2* و *BCL2L12* انجام گرفت که در پاسخ به سیس‌پلاتین سطح بیان *CASP9*، *BCL2* و *BCL2L12* افت کرد اما سطح *BAX* و *FAS* تغییری نکرد [۱۵]. محققان دریافتند که غلظت ۵۰ میکرومولار از سیس‌پلاتین به طور واضحی سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های CH27 و A549 می‌شود. در این مطالعه سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار از سیس‌پلاتین برای زمان‌های مختلف تیمار شدند. در این مطالعه مشخص شد که خاصیت سیتوتوکسیک سیس‌پلاتین وابسته به غلظت و زمان است. همچنین مشخص شد که غلظت ۰/۱ میکرومولار از سیس‌پلاتین هیچ اثر سیتوتوکسیسیته بر این سلول‌ها ندارد [۱۶].

داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده به طور معمول غیراختصاصی هستند و پس از خوردن یا تزریق، دارو به طور تصادفی از طریق گردش خون در بدن انتشار یافته که می‌تواند باعث ایجاد عوارض جانبی در سلول‌های سالم شود یا این که با داروهای دیگری که برای بیماری‌های مختلف مورد استفاده

در مطالعات دیگر نانو ذرات PLGA-mPEG [Poly(lactide-co-glycolide)-methoxy-poly(ethylene glycol)] حاوی داروی سیس پلاتین تهیه و پایداری دارو در گردش خون بررسی شد. مشخص شد که این نانو ذرات می تواند نیمه عمر سیس پلاتین را در جریان خون افزایش دهد [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر اثر نانو ذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بر سلول‌های سرطانی بررسی شد. در این مطالعه نانو ذرات ساخته شده کروی شکل با میانگین اندازه ۱۰۰ نانومتر بود. در این تحقیق اثر نانو ذرات حاوی سیس پلاتین مشابه اثر سیس پلاتین بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت بود [۲۳]. محققان از نانو ذرات توخالی Fe_3O_4 برای درمان هدفمند سرطان پستان استفاده کردند. در این مطالعه مشخص شد که آثار سمیت سلولی نانو ذرات بر سلول‌های سرطان پستان وابسته به غلظت است. همچنین مشاهده شد که آثار نانو ذرات کمی کمتر از سیس پلاتین تنها بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت بود. این اثر کمتر به خاطر این است که سیس پلاتین تنها از طریق فرآیند انتشار به سیتوپلاسم سلول وارد و سپس به هسته منتقل می شود. در حالی که نانو ذره حاوی سیس پلاتین از طریق اندوسیتوز به سلول وارد شده و ممکن است مقداری از سیس پلاتین در اجزای اندوزومی باقی بماند. اما در زمان ۴۸ ساعت خاصیت سمیت سلولی نانو ذره حاوی سیس پلاتین بیشتر از سیس پلاتین تنها بود [۲۴]. در این مطالعه IC_{50} نانو ذره حاوی سیس پلاتین ۲/۹ میکرومولار بود در حالی که IC_{50} سیس پلاتین تنها ۶/۸ میکرومولار محاسبه شد [۲۴]. محققان یک نانو ذره دوقلو حاوی طلا و اکسید آهن ساختند. در آزمون‌های آزمایشگاهی مشخص شد که این نانو ذرات می تواند به طور موفقیت آمیزی سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار دهد و سیس پلاتین را به داخل سلول‌ها رها کند. همچنین مشاهده شد که این نانو ذرات قادر است تا ۸۰ درصد سلول‌های سرطانی را از بین ببرد [۲۵].

مطالعه حاضر روی سلول‌های T47D انجام گرفت و مشاهده شد که آثار سمیت سیس پلاتین و نانو ذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین با افزایش غلظت افزایش می یابد. علاوه بر

این مشخص شد که اثر سمیت نانو ذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بر سلول‌های T47D در غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکرومولار بیشتر از سیس پلاتین تنها است. اما مکانیسم نانو ذرات اکسید آهن در افزایش غلظت داخل سلولی سیس پلاتین ناشناخته است.

به نظر می رسد ژن *BCL2* نقش مهمی را در پیشرفت سرطان پستان بازی می کند. مشاهده شده که در ۷۰ درصد افراد مبتلا به سرطان پستان بیان ژن *BCL2* افزایش می یابد [۲۶]. محصول ژن *BCL2* در تحریک رشد و بقا و مهار مرگ سلولی برنامه ریزی شده نقش ایفا می کند. در حالی که پروتئین BAX سبب القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول‌ها شده و عملکردی برخلاف پروتئین *BCL2* دارد. پروتئین‌های *BCL2* و BAX ساختارهای همودایمر و هتروداایمر را تشکیل می دهند. این دو پروتئین فاکتورهای مرتبطی با هم هستند که فرآیند مرگ سلولی برنامه ریزی شده را تنظیم می کنند [۲۷].

در سال ۲۰۰۹ گروهی از محققین مشاهده کردند که نانو ذرات Fe_3O_4 به همراه سیس پلاتین به شدت بیان mRNA ژن *BCL2* را در سلول‌های SKOV3 کاهش می دهد. این محققین پیشنهاد کردند که نانو ذرات اکسید آهن می تواند سبب افزایش عملکرد سیس پلاتین در کاهش بیان ژن *BCL2* در سلول‌های SKOV3 شود [۲۸]. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر سیس پلاتین و نانو ذرات Fe_3O_4 بارگذاری شده سیس پلاتین در مدت زمان ۴۸ ساعت روی سلول‌های T47D سرطان پستان صورت نگرفته است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که اثر نانو ذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بعد از ۴۸ ساعت بیشتر از سیس پلاتین تنها است که با نتایج به دست آمده در مطالعات گذشته هم خوانی دارد. همچنین مشخص شد که نانو ذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین می تواند سبب کاهش بیان ژن *BCL2* در سلول‌های T47D بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت شود. در مورد سیس پلاتین هم کاهش بیان *BCL2* بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد. همچنین سلول‌های

این مطالعه نسبت به مطالعات قبلی است.

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تأمین شده است که بدین وسیله از زحمات و مساعدت‌های انجام شده سپاسگزار می‌شود.

T47D تیمار شده با سیس پلاتین بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت افزایش بیان mRNA ژن *BAX* را نشان دادند. افزایش بیان ژن *BAX* نیز در سلول‌های T47D تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین مشاهده شد. تغییرات بیانی ژن‌های *BAX* و *BCL2* در سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بیشتر از تغییرات بیانی این ژن‌ها در مطالعات گذشته است که این نتایج نشان دهنده مؤثرتر بودن نانوذرات ساخته شده در

منابع

- [1] Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8): 564-71.
- [2] Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011; 12(1): 68-78.
- [3] Hale PS, Maddox LM, Shapter JG, voelker NH, Ford MJ, Waclawik ER. Growth Kinetics and Modeling of ZnO Nanoparticles. *J Chem Educ* 2005; 82(5): 775-8.
- [4] Juzenas P, Chen W, Sun YP, Coelho MA, Generalov R, Generalova N, Christensen IL. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(15): 1600-14.
- [5] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7(1): 3-18.
- [6] Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59(4): 657-63.
- [7] Poole Jr, Charles P, Owens FJ. Introduction to Nanotechnology. USA: A Wiley- inter science publication, 2003; 400.
- [8] Daou TJ, Grenèche JM, Pourroy G, Buathong S, Derory A, Ulhaq-Bouillet C, Donnio B, Guillon D, Begin-Colin S. Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem Mater* 2008; 20(18): 5869-75.
- [9] Mokhtari MJ, Arabi H, Akbarzadeh A. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of cisplatin loaded Fe₃O₄ nanoparticles. 2013; *Molecules*.(In Press)
- [10] Mokhtari MJ, Akbarzadeh A, Hashemi M, Javadi GR, Mahdian R, Merabi MR, Farhangi A, Mohammadi H. Cisplatin Induces Down Regulation of *BCL2* in T47D Breast Cancer Cell Line. *Adv Stud Biol* 2012; 4(1): 19-25.
- [11] Mokhtari MJ, Motamed N, Shokrgozar MA. Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell Biol Int* 2008; 32(8): 888-92.

- [12] Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205: 698-9.
- [13] Rantanen V, Grénman S, Kulmala J, Grénman R. Comparative evaluation of cisplatin and carboplatin sensitivity in endometrial adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1994; 69(3): 482-6.
- [14] Siervo-Sassi RR, Marrangoni AM, Feng X, Naoumova N, Winans M, Edwards RP, Lokshin A. Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2003; 190(1): 61-72.
- [15] Thomadaki H, Scorilas A. Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, *BCL2L12*. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095: 35-44.
- [16] Cheng YJ, Jiang HS, Hsu SL, Lin LC, Wu CL, Ghanta VK, Hsueh CM. XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin. *Eur J Pharmacol* 2010; 627(1-3): 75-84.
- [17] Cegnar M, Kristl J, Kos J. Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumours. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(12): 1557-69.
- [18] Yu MK, Jeong YY, Park J, Park S, Kim JW, Min JJ, Kim K, Jon S. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008; 47(29): 5362-5.
- [19] Maeda H, Matsumura Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1989; 6(3): 193-210.
- [20] Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. Poly (ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations. *Mol Pharm* 2005; 2(5): 357-66.
- [21] Segota E, Bukowski RM. The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific. *Cleve Clin J Med* 2004; 71(7): 551-60.
- [22] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Karydas AG, Ithakissios DS. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release* 2002; 79(1-3): 123-35.
- [23] Ding D, Li K, Zhu Z, Pu KY, Hu Y, Jiang X, Liu B. Conjugated polyelectrolyte-cisplatin complex nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and drug tracking. *Nanoscale* 2011; 3(5): 1997-2002.
- [24] Cheng K, Peng S, Xu C, Sun S. Porous Hollow Fe₃O₄ Nanoparticles for Targeted Delivery and Controlled Release of Cisplatin. *J Am Chem Soc* 2009; 131(30): 10637-44.
- [25] Lee Y, Garcia MA, Frey Huls NA, Sun S. Synthetic Tuning of the Catalytic Properties of Au-Fe₃O₄ Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2010; 49: 1271-4.
- [26] Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Tsujimoto H, Imanishi T, Ogaki M, Ohyama T, Yamazaki J,

- Hagiwara A, Yamaguchi T, Sawai K, Takahashi T. Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surg Today* 1997; 27(7): 676-9.
- [27] Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, Andrews DW, Lin J. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* 2006; 281(21): 14764-75.
- [28] Jiang Z, Chen BA, Xia GH, Wu Q, Zhang Y, Hong TY, Zhang W, Cheng J, Gao F, Liu LJ, Li XM, Wang XM. The reversal effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles loaded with cisplatin on SKOV3/DDP ovarian carcinoma cells. *Int J Nanomedicine* 2009; 4: 107-14.