



Research Article

Evaluation of the Cytotoxic Effects of Concomitant Use of Ag/ZnO Nanoparticles and Curcumin on MCF7 Breast Cancer Cell Line

Kimiya Hadavi¹, Fatemeh Oroojalian^{2*}

¹ Student research committee, School of medicine, North Khorasan university of medical sciences, Bojnord, Iran

² Assistant Professor of Nanobiotechnology, Department of New Technologies, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnord, Iran

***Corresponding author:** Fateme Oroojalian, Department of New Technologies, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnord, Iran. E-mail: oroojalian.f@gmail.com

DOI: [10.32592/nkums.15.2.61](https://doi.org/10.32592/nkums.15.2.61)

How to Cite this Article:

Hadavi K, Oroojalian F. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Concomitant Use of Ag/ZnO Nanoparticles and Curcumin on MCF7 Breast Cancer Cell Line. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(2):61-70. DOI: 10.32592/nkums.15.2.61

Received: 27 February 2022

Accepted: 28 November 2022

Keywords:

Ag/ZnO nanoparticles
Anti-cancer effects
Breast cancer
Curcumin
MCF7

Abstract

Introduction: Cancer is the second cause of death. The use of a new drug delivery system that can deliver the drug to the tumor site and prevent it from entering the body's natural tissues is essential. Metal oxide nanoparticles have been considered one of the effective candidates for cancer treatment. For this reason, our study was conducted to investigate the cytotoxic effect of the simultaneous use of Ag/ZnO nanoparticles and curcumin on the Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7) breast cancer cell line.

Method: The MTT colorimetric method was used to investigate the synergistic effects of zinc oxide silver nanoparticles and curcumin. Cells with different concentrations of zinc oxide silver nanoparticles and curcumin, including 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 micrograms/ml during 24 and 48 h were incubated in triplicate to observe the synergistic effects of each of these concentrations, ratios of 1 to 1, 0.5 to 0.5, 0.25 to 0.75 of zinc oxide silver nanoparticles and curcumin were used. The viability of the cells treated with the drug was determined in the form of the percentage of light absorption of the produced formazan and was shown in a two-dimensional curve.

Results: The effect of Ag/ZnO nanoparticles alone on the survival rate of cancer cells had a significant difference with curcumin. In addition, in the simultaneous examination of Ag/ZnO nanoparticles and curcumin, much more cytotoxicity was observed than in Ag/ZnO alone.

Conclusion: In general, the simultaneous use of chemotherapy drugs and nanoparticles can decrease the concentration of chemotherapy drugs used in cancer treatment.



بررسی اثر سمیت سلولی استفاده هم‌زمان نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین بر رده سلولی سرطان پستان MCF7

کیمیا هادوی^۱، فاطمه عروجعلیان^{۲*}

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۲ استادیار نانوبیوتکنولوژی، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
* نویسنده مسئول: فاطمه عروجعلیان، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد،

ایران. ایمیل: oroojalian.f@gmail.com

DOI: 10.32592/nkums.15.2.61

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸
	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷
مقدمه: سرطان دومین علت مرگ‌ومیر است. استفاده از سیستم دارورسانی نوین با رساندن دارو به محل تومور و جلوگیری از ورود آن به بافت‌های طبیعی بدن از ضروریات به شمار می‌رود. نانوذرات اکسید فلزات به‌عنوان یکی از کاندیدای مؤثر درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت سلولی استفاده هم‌زمان نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین بر رده سلول سرطان پستان (Michigan Cancer Foundation-7: MCF7) انجام شد. روش کار: به‌منظور بررسی اثرات سینرژیستی نانوذرات نقره-اکسید روی و کورکومین از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره-اکسید روی و کورکومین شامل ۰/۳، ۰/۷، ۱/۵، ۳/۱، ۶/۲، ۱۲/۵، ۲۵/۰، ۵۰/۰ و ۱۰۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و با ۳ بار تکرار انکوبه شدند. برای مشاهده اثرات سینرژیستی هرکدام از این غلظت‌ها از نسبت‌های ۱ به ۰/۵، ۱ به ۰/۵ و ۰/۲۵ به ۰/۷۵ نانوذرات نقره-اکسید روی و کورکومین استفاده شد. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با دارو به شکل نسبت درصد جذب نوری فورمازون تولیدی تعیین و در منحنی دوعیدی نشان داده شد. یافته‌ها: تأثیر نانوذره Ag/ZnO به‌تنهایی بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری با کورکومین داشت. همچنین، در بررسی هم‌زمان نانوذره Ag/ZnO و کورکومین سمیت سلولی بسیار بیشتری نسبت به Ag/ZnO به‌صورت تنها دیده شد. نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، استفاده هم‌زمان داروی شیمی‌درمانی و نانوذره منجر به کاهش غلظت داروی شیمی‌درمانی مصرفی می‌شود.	واژگان کلیدی: اثرات ضدسرطانی سرطان پستان کورکومین نانوذرات Ag/ZnO نانوذره MCF7

مقدمه

شیمی‌درمانی، نیازمند بودن به دُزهای زیاد دارو، مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعدد جراحی دارند [۴، ۵]. در این بین جراحی کمتر، ولی شیمی‌درمانی وظیفه‌ای جز هیپوکسیک کردن و احتمالاً مرگ سلولی ندارد [۶]. با این حال، شیمی‌درمانی هنوز هم به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی مؤثر در مبارزه با سلول‌های سرطانی به شمار می‌رود، اما از عوارض مخرب آن از جمله عوارض ناخواسته حاصل از داروهای رایج شیمی‌درمانی نباید چشم‌پوشی کرد [۷]. همچنین، از آنجاکه تومورها شبکه‌های کامل لنفاوی سرتاسری ندارند [۸]، داروهایی که تا بافت میانی این تومورها می‌رسند، مدت اقامت طولانی‌تری خواهند داشت. بنابراین، استفاده از یک سیستم دارورسانی نوین که بتواند با رساندن دارو به محل تومور و جلوگیری از ورود آن به بافت‌های طبیعی بدن که ممکن است سبب تجمع دارو در بافت تومور و افزایش فعالیت ضدتومور شود و از طرف دیگر از عوارض جانبی آن بکاهد، از ضروریات به شمار می‌رود [۹-۱۳].

چندی است که نانوذرات اکسید فلزات به‌عنوان یکی از کاندیدای مؤثر

آمار سرطان با افزایش نرخ رشد و پیری جمعیت به‌طور پیوسته در حال افزایش است. بر اساس آمار رسمی سازمان جهانی بهداشت، سرطان پستان دومین علت مرگ‌ومیر در جهان است [۱]. همچنین، شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان کشورهای درحال توسعه و توسعه‌یافته است [۲]. از هر ۹ زن، یک نفر در طول عمر خود این سرطان را تجربه می‌کند. زنان ایرانی یک دهه زودتر نسبت به میانگین جهانی به سرطان پستان مبتلا می‌شوند [۱]. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است که در اثر تأثیر متقابل عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عوامل خطر بسیاری در طول زندگی تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان پستان قوی‌ترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می‌آید [۳].

امروزه، به‌منظور درمان سرطان معمولاً از سه روش جراحی، رادیودرمانی و شیمی‌درمانی استفاده می‌شود که در این میان شیمی‌درمانی و جراحی محدودیت‌هایی از قبیل هیپوکسی، هدفمند نبودن داروهای

انجام شد.

روش کار

برای انجام این پژوهش، نانوذرات Ag/ZnO، کورکومین (سیگما آلدريج از برند Gipro)، Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) و Fetal Bovine Serum (FBS) برند Gibco، Diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (سیگما آلدريج) تهیه شدند.

رده سلولی

این مطالعه که نوعی مطالعه *In vitro* آزمایشگاهی بود، روی تعدادی از سلول‌های MCF7 و سلول‌های فیبروبلاست L929 انجام شد.

کشت سلول

در این مطالعه اثرات ضدسرطانی نانوذرات Ag/ZnO و اثر هم‌زمان آن با کورکومین روی رده سلول‌های سرطانی پستان MCF7 و سلول نرمال L929 بررسی شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM-LG که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین بود، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب با غلظت ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. به‌منظور بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها از میکروسکوپ اینورت استفاده شد.

زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، به‌وسیله تریپسین ۰/۰۵ درصد از ته فلاسک جدا و با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نتوبار و به‌وسیله میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌هایی با درصد زنده‌مانی بیش از ۹۰ درصد برای انجام آزمایش استفاده شد.

انکوباسیون سلول‌ها به‌همراه نانوذرات اکسید روی و

تعیین غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها

(IC₅₀)

برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰ هزار سلول MCF7 و L929 در هر خانه پلیت ۹۶ قرار داده شد. انکوباسیون غلظت‌های مختلف شامل ۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره-اکسید روی طی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و با ۳ بار تکرار انجام شد. برای مشاهده اثرات سینرژیستی از هر کدام از این غلظت‌ها به نسبت‌های ۱ به ۱، ۱ به ۰/۵، ۰/۵ به ۰/۲۵ و ۰/۲۵ به ۰/۷۵ نانوذرات نقره-اکسید روی و کورکومین استفاده شد. پس از طی زمان مذکور، به هر خانه پلیت ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد که به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. همچنین، یک گروه کنترل منفی بدون تیمار برای محاسبه درصد زنده‌مانی در نظر

درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. از آنجاکه اکسید طبیعی فلزات در مقادیر بسیار زیادی در طبیعت وجود دارد، فرآوری و سنتز این نانوذرات جزء کم‌هزینه‌ترین پروتکل‌های سنتز به شمار می‌رود [۱۴]. با استفاده از نانوذراتی با اندازه خاص که از روزنه‌های اندوتلیوم نشأت‌کننده سرطان عبور کنند و در عین حال وارد بافت‌های طبیعی نشوند، می‌توان غلظت این نانوذرات را در محل تومور افزایش داد [۱۵]. از مهم‌ترین اثرات سمی نانوذرات، اثرات آن بر سلول سرطانی است [۱۶]. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد اثرات توکسیک نانوذرات نقره به اندازه، غلظت، زمان تیمار و عوامل محیطی بستگی دارد. نانوذرات نقره بر پروتئین‌های غشا اثر می‌کنند و ضمن فعال کردن گونه‌های اکسیژن، منجر به آسیب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند که در نهایت به شروع مرگ برنامه‌ریزی‌شده منجر می‌شود [۱۷].

یکی از راهکارهای مورد توجه پژوهشگران به‌منظور کاهش محدودیت‌های استفاده از شیمی‌درمانی، استفاده از ترکیبات سایتوتوکسیک استخراج‌شده از گیاهان به جای داروهای رایج شیمی‌درمانی است تا از این طریق بتوان ضمن کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی، کارایی این درمان آنتی‌نئوپلاستیک را در مبارزه با سلول‌های سرطانی افزایش داد. نانوذرات اکسید روی یکی از انواع جدید ذرات معدنی پرکاربرد هستند که به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته‌اند و در عین حال قدرت جذب بیشتری نسبت به سایر ترکیبات دارند [۱۸]. به‌طور کلی، درمان ترکیبی باعث القای افزایش اثر دارو و جلوگیری از مقاومت سلول‌های سرطانی به آن می‌شود [۱۹، ۲۰]. نانوذرات اکسید آهن نیز به‌عنوان یکی از کاندیدای کارآمد برای تحویل مؤثر دارو و نیز درمان سرطان مطرح شده است. همچنین، خواص سوپر پارامغناطیسی ذاتی آن‌ها، تصویربرداری را ممکن می‌سازد و قابلیت رزونانس مغناطیسی غیرتهاجمی (Magnetic Resonance Imaging: MRI) را فراهم می‌آورد و قابلیت تجزیه زیستی آن‌ها را در محیط کشت *In vitro* ممکن می‌سازد [۲۱].

ماده پیشنهادی ما برای استفاده هم‌زمان با نانوذرات اکسید روی، کورکومین است. کورکومین ماده مؤثره استخراج‌شده از ریشه زردچوبه است و حلالیت آبی کمی دارد [۲۲]. مطالعات نشان داده‌اند القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و مهار تکثیر چرخه سلولی مکانیسم اصلی کورکومین در مرگ سلول‌های سرطانی است که به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی اثرات درمانی خود را در مهار سرطان اعمال می‌کند. همچنین، در دُزهای بیشتر، برای سلول‌های سالم سمیتی به‌همراه ندارد [۲۳]. کورکومین که همراه نانوذرات مغناطیسی به محل تجمع سلول‌های سرطانی انتقال می‌یابد، سبب آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن در محل تومور می‌شود که کشته شدن سلول‌های سرطانی را به‌همراه دارد. از این جهت، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت سلولی استفاده هم‌زمان نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین بر رده سلول سرطان پستان (MCF7-7: Michigan Cancer Foundation)

بهرتر و افزایش کیفیت، آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میزان زنده‌مانی سلولی طبق فرمول گفته‌شده محاسبه شد.

میزان زنده‌مانی سلولی: (جذب نوری کنترل/جذب نوری تست) $\times 100$

تحلیل آماری

باتوجه به بررسی اثرات ساده و متقابل عوامل بررسی‌شده، این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و سپس میانگین داده‌ها محاسبه شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس آنووا استفاده و اختلاف بین گروه‌ها با آزمون توکی بررسی شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه و $P \leq 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism نسخه ۷ برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

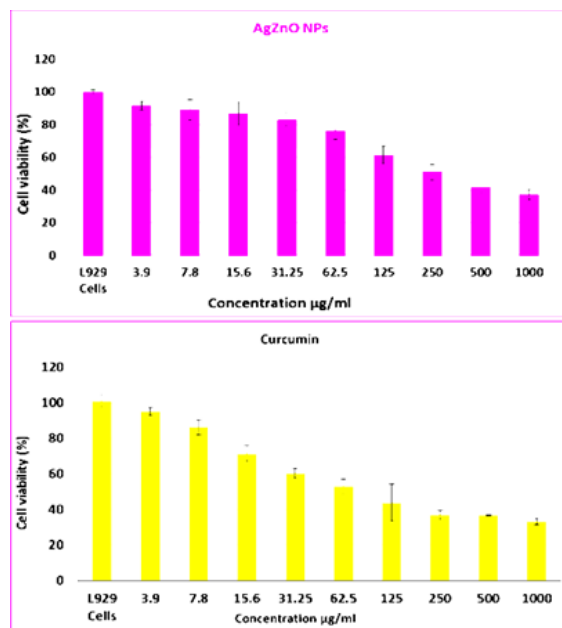
یافته‌ها

در این مطالعه اثرات ضدسرطانی نانوذرات Ag/ZnO سنتز شده در مطالعات قبلی به‌تنهایی و همراه با ترکیب طبیعی کورکومین بر سلول‌های MCF7 و سلول‌های فیبروبلاست L929 انجام شد که این سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب با غلظت ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. طبق بررسی‌ها، تأثیر نانوذره Ag/ZnO به‌تنهایی اختلاف معنی‌داری با کورکومین و اثر ضدسرطانی بهتری داشت ($P \leq 0.05$). همچنین، در بررسی هم‌زمان نانوذره Ag/ZnO و کورکومین (با نسبت ۰/۵ به ۰/۵) تأثیر بسیار بیشتری نسبت به Ag/ZnO به‌صورت تنها رؤیت شد که می‌توان نتیجه گرفت استفاده هم‌زمان Ag/ZnO و کورکومین پتانسیل ضدسرطانی بسزایی بر رده MCF7 دارد.

گرفته شد. پس از طی زمان تیمار، به محیط کشت حاوی گروه‌های تیماری، ۲۰ میکرولیتر معرف MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل‌شده در بافر PBS به هر چاهک اضافه شد. پلیت ۹۶ خانه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن ۵ درصد به مدت ۴ ساعت نگهداری شد، چاهک‌ها تخلیه شدند و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. به‌منظور بررسی اثر سینرژیستی نانوذرات نقره-اکسید روی بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نرمال از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد.

تعیین سمیت سلولی

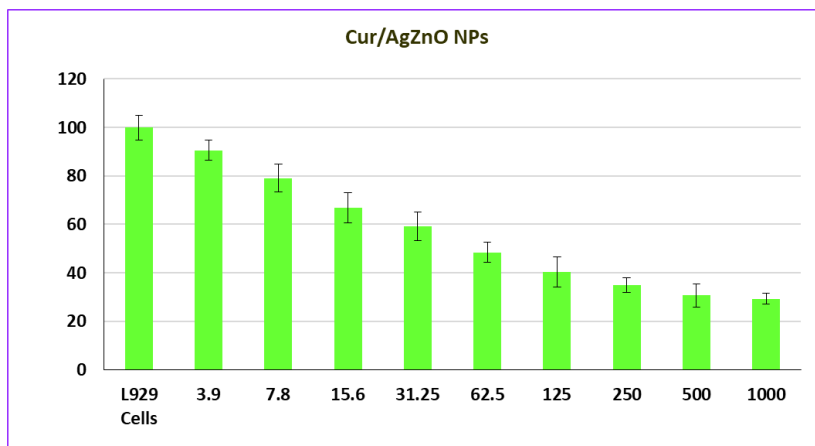
آزمایش MTT یکی از روش‌های رنگ‌سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مسئله با سنجش قدرت احیای رنگ تترازولیوم به‌وسیله آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازون با رنگ بنفش بررسی شد. در نتیجه فرایند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازون تشکیل شد. پس از حل شدن این بلورها در حلال مناسب، به‌وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری مقدارسنجی شدند. توجه شود که مقدار بلور فورمازون ایجادشده نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده است [۷]. اندازه‌گیری جذب سلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر (با طول موج رفرنس ۶۹۰ نانومتر) با دستگاه الیزا مدل CROCODILE 5 in-one Germany انجام شد و توان زیستی سلول‌های تیمار شده با دارو (در هر غلظت از دارو) به شکل نسبت درصد جذب نوری فورمازون تولیدی در نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازون تولیدی در شاهد منفی (سلول‌های بدون تیمار) تعیین و در منحنی دویعدی (درصد توان زیستی یا زنده‌مانی سلول‌ها در مقابل غلظت دارو) نشان داده شد که با استفاده از این منحنی بستر محاسبه و تعیین IC_{50} (the half maximal inhibitory concentration) برای نانوذرات فراهم شد. برای گرفتن نتیجه



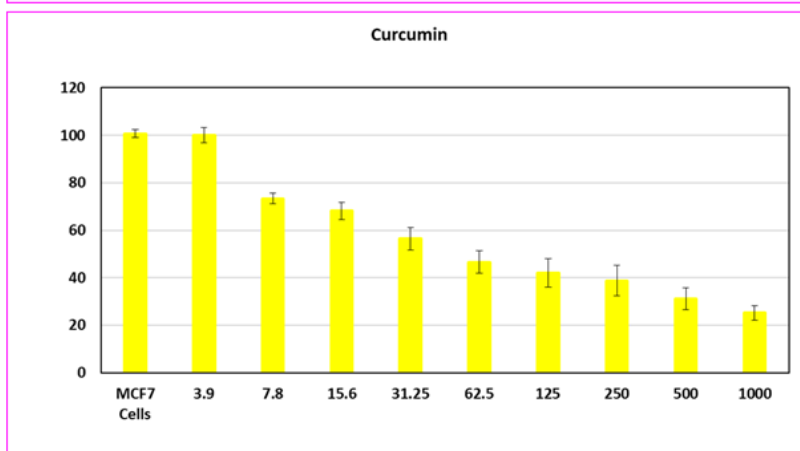
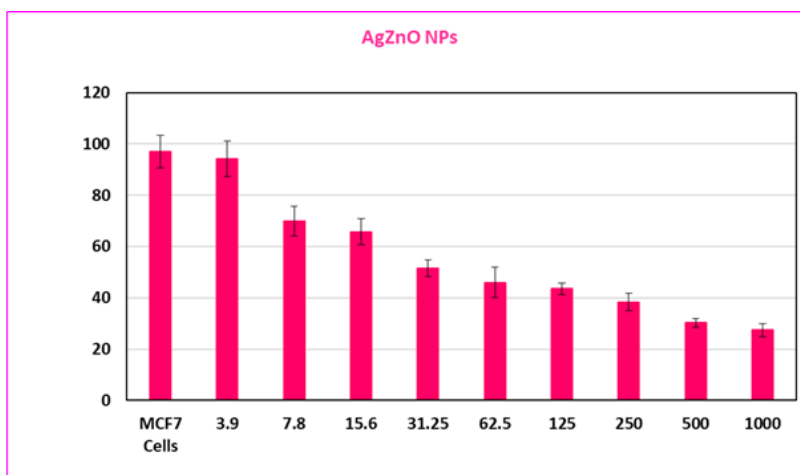
شکل ۱. اثر کورکومین و نانوذرات AgZnO به‌تنهایی در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های نرمال L929 داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار است.

سلول‌های این رده در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. همچنین، درصد زنده‌مانی سلول‌های L929 و سلول‌های رده سرطانی MCF7 در برابر کورکومین و نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم‌زمان آن‌ها به ترتیب در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است.

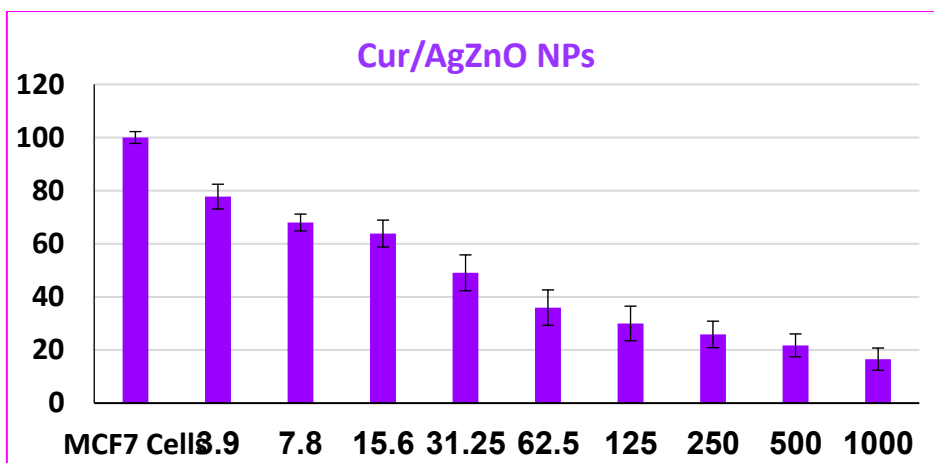
اثر نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های نرمال L929 و همچنین استفاده هم‌زمان آن‌ها بر سلول‌های نرمال L929 در شکل‌های ۱ و ۲ و اثر نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های رده سرطانی MCF7 و نیز اثر هم‌زمان این مواد بر



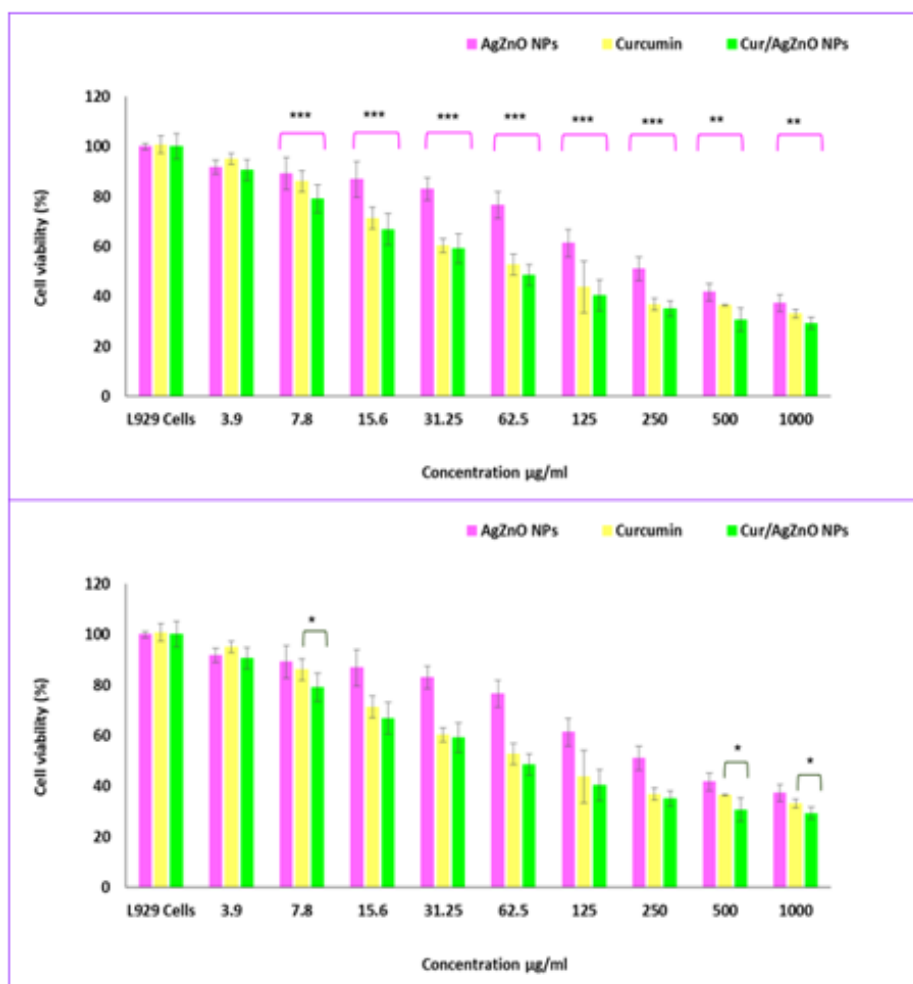
شکل ۲. اثر نانوذرات AgZnO و کورکومین به‌صورت هم‌زمان با نسبت ۰/۵ به ۰/۵ در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های نرمال L929 داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار است.



شکل ۳. اثر نانوذرات AgZnO و کورکومین به‌تنهایی در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های رده MCF7 داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار است.



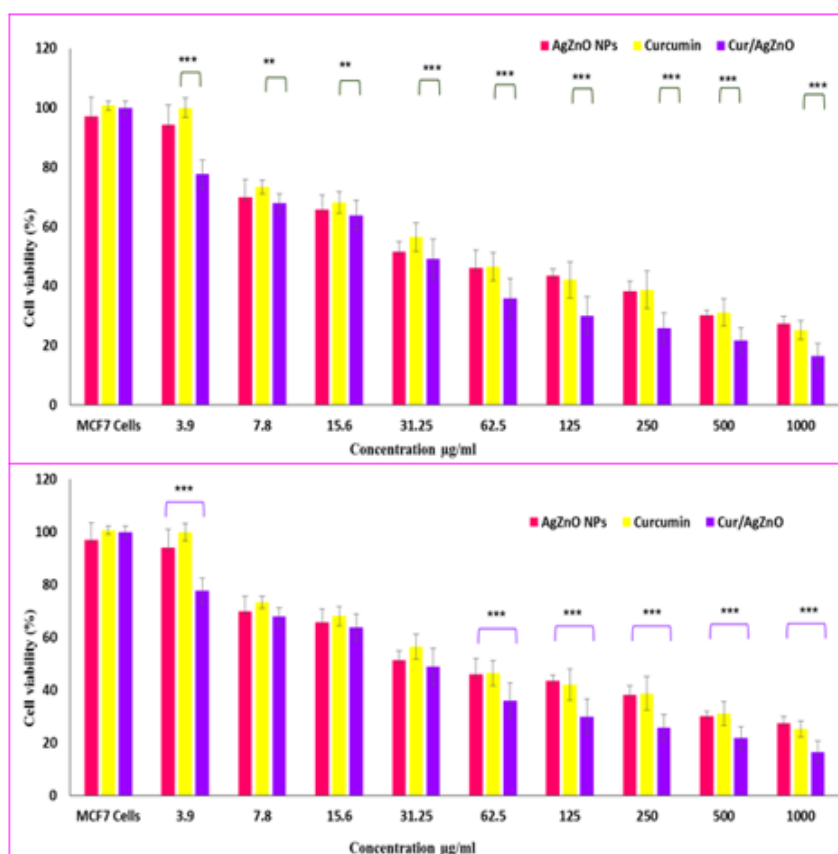
شکل ۴. اثر نانوذرات AgZnO و کورکومین به صورت هم زمان با نسبت ۰/۵ به ۰/۵ در غلظت های مختلف بر سلول های سرطانی MCF7 داده های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده ها در سطح احتمال ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار است.



شکل ۵.

الف: درصد زنده مانی سلول های L929 در برابر نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO (با نسبت ۰/۵ به ۰/۵) که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده ها در سطح احتمال ۰/۰۱؛ **: اختلاف داده ها در سطح احتمال ۰/۰۰۱؛ ***: اختلاف داده ها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ از نظر آماری معنی دار است. داده های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است.

ب: درصد زنده مانی سلول های L929 در برابر کورکومین در مقایسه با ترکیب هم زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO (با نسبت ۰/۵ به ۰/۵) که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است. *: اختلاف داده ها در سطح احتمال ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار است. داده های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است.



شکل ۶.

الف: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF7 در برابر نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO با نسبت (۰/۵ به ۰/۵) که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است.

: اختلاف داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۱؛ *: داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۱ از نظر آماری معنی‌دار است.

داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است.

ب: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF7 در برابر کورکومین در مقایسه با ترکیب هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO با نسبت (۰/۵ به ۰/۵) که در ۴۸ ساعت بعد قرائت شده است.

: اختلاف داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۱؛ *: داده‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۱ از نظر آماری معنی‌دار است.

داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار است.

IC₅₀ (µg/ml) کورکومین، نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO نیز در جداول ۱ و ۲ هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO بر سلول‌های L929 آمده است.

جدول ۱. IC₅₀ (میکروگرم بر میلی‌گرم) کورکومین، نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO بر سلول‌های L929 پس از ۴۸ ساعت

مواد	IC ₅₀ (µg/ml) $\pm$ SD ^a سلول‌های رده L929
کورکومین	۱۱۶/۹۵۵ $\pm$ ۲/۴
نانوذرات AgZnO	۳۴۸/۷۶ $\pm$ ۲/۳۳
نانوذرات Cur/AgZnO	۸۳/۳۵۵ $\pm$ ۳/۱

جدول ۲. IC₅₀ (میکروگرم بر میلی‌گرم) کورکومین، نانوذرات AgZnO در مقایسه با ترکیب هم‌زمان کورکومین و نانوذرات AgZnO بر سلول‌های MCF7 پس از ۴۸ ساعت

مواد	IC ₅₀ (µg/ml) $\pm$ SD ^a سلول‌های رده MCF 7
کورکومین	۶۷/۷۸ $\pm$ ۴/۲
نانوذرات AgZnO	۸۳/۸۶ $\pm$ ۴/۵
نانوذرات Cur/AgZnO	۳۴/۵۷ $\pm$ ۳/۸

زنان جهان است، محدودیت‌هایی دارد [۱]. برای غلبه بر این

محدودیت‌ها بخش جدیدی از نانو تکنولوژی به نام نانوپزشکی راهکار

بحث

درمان دارویی فعلی سرطان که جزء شایع‌ترین بیماری‌ها در مردان و

جایگزینی برای درمان سرطان پیشنهاد می‌دهد. در حال حاضر، نانوداروهای محدودی برای مصارف بالینی وجود دارند که گران‌تر از داروهای ضدسرطانی در دسترس است. همچنین، هزینه این نانوداروهای ترکیبی بسیار بیشتر از هزینه نانوذره و دارو به‌تنهایی است [۲۴، ۲۵]. در درمان سرطان پستان با توجه به شرایط بیمار، از روش‌های مختلفی همچون جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود. با توجه به عوارض روش‌های درمانی مذکور و میزان تأثیر این روش‌ها بر درمان بیماران و از طرف دیگر، هزینه زیاد این روش‌ها، نیاز مبرمی به استفاده از فناوری‌های نوین برای یافتن روش‌های جدید و پربازده با عوارض جانبی و هزینه کمتر برای درمان احساس می‌شود [۱۴].

نانوذرات اکسید روی یکی از انواع جدید ذرات معدنی پرکاربرد است که به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. قدرت جذب بیشتر این ترکیب آن را از سایر ترکیبات روی متمایز می‌کند [۲۶]. اکسید روی توسط وزارت غذا و داروی آمریکا به‌عنوان یک ماده بدون خطر شناخته شده است. نانوذرات اکسید روی یک نانوذره زیست سازگار و غیرسمی است که به‌عنوان مواد پرکننده پزشکی، مواد آرایشی و حمل‌کننده مواد دارویی نیز استفاده شده است. از جمله خواص ویژه آن می‌توان به پایداری زیاد، آن، ثابت دی‌الکتریک کم، فعالیت کاتالیزوری زیاد، جذب نور فروسرخ و فرابنفش و از همه مهم‌تر، خاصیت آنتی‌باکتریال آن اشاره کرد [۱۹، ۱۸]. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده هم‌زمان نانوذره Ag/ZnO و کورکومین سمیت سلولی بسیار بیشتری نسبت به Ag/ZnO به‌صورت تنها دارد. در تحقیقی که قدرت پور و همکاران [۲۷] در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، اثرات سمیت نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطانی پستان رده T47D در کنار اثر این نانوذرات بر بیان ژن NM23 در رده سلولی مذکور، بررسی شد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که نانوذرات اکسید روی باعث مرگ سلول‌های نرمال HEK293 نمی‌شود و از آنجاکه نانوذرات اکسید روی بر مرگ رده سلولی نرمال HEK293 تأثیر نداشته است، می‌توان بیان کرد که اثرات جانبی آن بسیار کم است. از طرف دیگر، با اثر مثبت روی بیان ژن دخیل در متاستاز در رده سلول سرطان پستان، این نانوذره می‌تواند در طراحی داروهای کنترل تهاجم نیز مورد توجه قرار گیرد که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مقایسه با این مطالعه، نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد استفاده هم‌زمان Ag/ZnO و کورکومین بسیار مؤثرتر خواهد بود. تاکنون گزارش‌های مختلفی اثرات نانوذرات اکسید روی را بر رده‌های سلولی مختلف بررسی کرده‌اند و نتایج مطالعه حاضر تا حد زیادی با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. Selvakumari و همکاران [۲۸] در سال ۲۰۱۵ اثر ضدتوموری نانوذرات اکسید روی را در رده سلولی MCF7 به‌عنوان یک مدل سلولی سرطان پستان بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد به‌کارگیری غلظت ۱۰

میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی باعث کاهش بقای حدود ۳۰ درصد از سلول‌های رده T47D شد، غلظت ۱۰۰ میکروگرم باعث کاهش بقای ۶۰ درصدی و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم باعث کاهش بقای ۸۰ درصدی این رده سلولی شد که مشابه نتایج تحقیق حاضر است. با در نظر گرفتن این موضوع که درمان ترکیبی سرطان مؤثرتر از استفاده از یک دارو به‌تنهایی است و طبق مطالعه مهسا بایمانی و همکاران [۲۹] در سال ۲۰۲۰ در شیراز که اثرات ضدسرطانی دوکسوروبیسین و دوکسوروبیسین را در ترکیب با نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های MCF7 ارزیابی کردند، طبق این مطالعه [۲۹]، با افزایش غلظت نانوذره، کاهش قدرت بقای سلول‌های MCF7 مشاهده شد. یون روی در غلظت‌های کم برای متابولیسم سلولی ضروری است، ولی در غلظت‌های زیاد برای سلول سمی است. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهد تفاوت قابل توجهی بین استفاده از دوکسوروبیسین و اکسید روی به‌تنهایی و به‌صورت هم‌زمان وجود دارد که با نتایج مطالعه ما در استفاده هم‌زمان Ag/ZnO و کورکومین مشهود است و تأییدکننده تأثیر بیشتر استفاده هم‌زمان آن‌ها نسبت به استفاده به‌صورت مجزا است. در مطالعه Kao و همکاران مشخص شد خاصیت سیتوتوکسیک نانوذرات روی از طریق القای مسیر داخل سلول آپوپتوز است [۳۰]. تحقیقات نشان داده است نانوذرات Ag/ZnO تحت اشعه ماورابنفش نیز در درمان سرطان پستان انسان به‌عنوان نانوکامپوزیت جدید که ساختار آن باعث بهبود عکس‌العمل مشخصه نانوذرات ZnO می‌شود، مؤثر خواهد بود. علاوه‌براین، افزایش تولید ROS (Reactive Oxygen Species) و فعالیت فوتوکاتالیستی Ag/ZnO باعث ایجاد مسیر مرتبط با آپوپتوز در پستان می‌شود. این نتایج در مطالعه قائمی و شعبانی در تهران بررسی شد [۳۱]. همچنین، افزایش نسبت Bax/Bcl2 نشان می‌دهد نانوذرات Ag/ZnO آپوپتوز سریع را از طریق مسیر میتوکندری فعال می‌کنند. همچنین، این نانوذره توانایی تشخیص چندحالتی با تصویربرداری CT (Computerized Tomography) نوری را از خود نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج، این نانوذرات به‌طور بالقوه قابل استفاده در تصویربرداری و درمان هم‌زمان درمان فتودینامیکی هستند. از آنجاکه، سمیت سلولی کم نانوذرات بر سلول‌های سالم شرط اصلی زیست پزشکی آن‌هاست، نتایج MTT در شرایط تاریک، سمیت سلولی وابسته به دُز را برای انواع نانوذرات نشان داد. با این حال، سمیت سلولی نانوذرات نقره به‌طور قابل توجهی بیشتر از دو گروه دیگر بود. رده‌های سلولی تحت درمان با نانوذرات ZnO و Ag/ZnO در شرایط تاریک، بیش از ۷۰ درصد زنده باقی ماندند. یافته‌ها نشان داد نانوذرات ZnO و Ag/ZnO هیچ سمیت سلولی قابل توجهی در رده‌های سلولی سرطانی و سالم نداشتند [۳۱، ۱۷]. در این مطالعه تأثیر بسزای نانوذرات Ag/ZnO تأیید شد که در مقایسه با مطالعه حاضر مبنی بر تأثیر هم‌زمان نانوذرات Ag/ZnO و کورکومین نسبت به نانوذرات Ag/ZnO به‌تنهایی تفاوت معناداری داشت [۳۱].

کورکومین از رشد رده‌های سلولی سرطان پستان در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند؛ از جمله HL60، k562، MCF7 و سلول‌های هلا.

تا به امروز هیچ سمیتی مرتبط با کورکومین در حیوانات آزمایشی یا انسان، حتی در دُزهای بسیار زیاد مشاهده نشده است. داده‌های ما با مطالعات قبلی مطابقت دارد که کورکومین از طریق مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان اثرات ضدسرطانی خود را اعمال می‌کند [۳۵، ۳۶]. در مطالعه‌ای تأثیر دُزهای مختلف کورکومین (۱۰۰-۰ میکرومول) بر مورفولوژی سلول MCF7 بررسی شد. پس از یک دوره ۲۴ ساعته، درمان کورکومین باعث انقباض، گرد شدن و جدا شدن جزئی سلول MCF7 شد که نشان‌دهنده اثرات سمیت سلولی کورکومین بر سلول‌های MCF7 بود [۳۳]. یافته‌های ما نشان می‌دهد کورکومین با ایجاد آپوپتوز به‌صورت وابسته به دُز و زمان، همراه با کاهش دوام سلول MCF7، رشد سلول سرطانی پستان انسان را به‌طور قابل توجهی مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد Ag/ZnO سمیت سلولی قابل توجهی بر سرطان پستان MCF7 دارد، اما ترکیب آن با کورکومین سبب افزایش تأثیر سمیت آن بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF7 شد. به‌طور کلی، استفاده هم‌زمان داروی شیمی‌درمانی و نانوذره منجر به کاهش غلظت داروی شیمی‌درمانی مصرفی می‌شود و به‌دنبال آن سبب کاهش عوارض جانبی این داروها و از بین بردن مقاومت در برابر دارو می‌شود. بنابراین، امید است در آینده محصولات بیشتری با کارایی زیاد و عوارض جانبی کمتر در عرصه بالینی برای درمان سرطان وارد شود.

سپاسگزاری

این طرح با کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1400.081 از سوی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی حمایت مالی شده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

نتایج مطالعه ما با نتایج مطالعه‌ای در کشور جمهوری چک مطابقت دارد که Stepankova و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام دادند [۳۲]. این مطالعه روی خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات اکسید روی متمرکز بود. نانوذرات مذکور الگوی اکسیدکننده عکس و فوتوکاتالیستی متفاوتی را ارائه می‌دهند و جذب نور ماورابنفش دارند. همچنین، باعث مهار انتخابی سلول‌های سرطانی می‌شوند. در این مطالعه، القای آپوپتوز با نانوذرات ZnO در سلول‌های سرطان پستان مشاهده شد. به‌طور کلی، یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت سلولی نانوذرات، تأثیر آن‌ها بر هموستاز ردوکس است که منجر به آسیب قسمت‌های مختلف سلولی و درنهایت القای آپوپتوز می‌شود [۳۲]. در مطالعه حاضر نیز به تأثیر سمیت سلولی چشمگیر Ag/ZnO در سرطان پستان رده MCF7 پی برده شد، اما ترکیب هم‌زمان آن با کورکومین سبب افزایش تأثیر بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF7 شد.

کورکومین یا دیفرولونیل متان مهم‌ترین رنگدانه زرد استخراج‌شده از زردچوبه (*Curcuma longa*) است [۳۳]. مطالعات اخیر نشان داده است کورکومین به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضدسرطان، به‌طور مؤثر آپوپتوز را القا می‌کند. در مطالعه خزاعی و همکارش در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد کورکومین تکثیر سلول‌های MCF7 را به‌طور قابل توجهی به روش وابسته به غلظت طی ۴۸ ساعت مهار می‌کند ($P < 0.01$). غلظت‌های مختلف کورکومین در ۴۸ ساعت اثرات سمیت سلولی متفاوتی بر رده سلول MCF7 داشت. همان‌طور که کورکومین فعالیت‌های ضد اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میتوزی و ضد متاستاتیک در شرایط آزمایشگاهی و آزمایشات حیوانی دارد، بنابراین، ممکن است یک مولکول امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان سرطان در انسان باشد. کورکومین در انواع مختلف رده‌های سلولی در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضد تکثیری دارد. یکی از توصیفات اولیه سمیت سلولی کورکومین در سلول‌های آسیت لنفوم دالتون نشان داده شده است که در آن کورکومین با غلظت ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به سمیت سلولی ۵۰ درصد می‌شود [۳۳]. همچنین، کورکومین در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مهار رشد ۵۰ درصدی سلول سرطان خون میلوژن مزمن انسانی K-562 شد [۳۴]. همچنین، نشان داده شده است که

References

1. WHO. International agency for research on cancer. World Cancer report; 2008.
2. Taleghani F, Kianpour M, Tabatabaieyan M. Barriers to breast self-examination among Iranian women. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2019;24(2):108-112. DOI: 10.4103/ijnmr.IJNMR_94_18 PMID: 30820221
3. Martirosyan A, Bazes A, Schneider YJ. In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds—preventive agents against the harmful effect? *Nanotoxicology*. 2014;8(5):573-382. DOI: 10.3109/17435390.2013.812258
4. Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):1007-1019. DOI: 10.1289/ehp.6310 PMID: 12826474
5. Kissane D, White K, Cooper K, Vitetta L. Psychosocial impact in the areas of body image and sexuality for women with breast cancer. *NBCC*; 2004.
6. Zeichner SB, Ambros T, Zaravinos J, Montero AJ, Mahtani RL, Ahn ER, et al. Defining the survival benchmark for breast cancer patients with systemic relapse. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9:9-17. DOI: 10.4137/BCBCR.S23794 PMID: 25922577
7. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):750-763. DOI: 10.1038/nrc903 PMID: 12360278
8. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell trans-plantation therapy for stroke. *Stroke*. 2007;38(2):817-826. DOI: 10.1161/01.STR.0000247888.25985.62 PMID: 17261746
9. Schouten JW, Fulp CT, Royo NC, Saatman KE, Watson DJ, Snyder EY, et al. A review and rationale for the use of cellular

- transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004;**21**(11):1501-1538. DOI: 10.1089/neu.2004.21.1501 PMID: 15684646
10. Harris DT. Cord blood stem cells: A review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev*. 2008;**4**(4):269-274. DOI: 10.1007/s12015-008-9039-8 PMID: 18679834
 11. Baban DF, Seymour LW. Control of tumor vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;**34**(1):109-119. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00003-9 PMID: 10837673
 12. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;**95**(8):4607-4612. DOI: 10.1073/pnas.95.8.4607 PMID: 9539785
 13. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*. 2001;**41**:189-207. DOI: 10.1016/S0065-2571(00)00013-3 PMID: 11384745
 14. Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol*. 2015;**34**(12):1318-1321. DOI: 10.1177/0960327115603588 PMID: 26614822
 15. Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocytic system. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995;**17**(1):31-48. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00039-A
 16. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro Toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to hepg2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*. 2009;**43**(5):6046-6051. DOI: 10.1021/es900754q PMID: 19731716
 17. Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *Physiology*. 2001;**16**(3):126-130. DOI: 10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126 PMID: 11443232
 18. Buxton ILO, Yokdang N. Extracellular NM23 signaling in breast cancer: Incommodus Verum. *Cancers*. 2011;**3**(3):2844-2857. DOI: 10.3390/cancers3032844 PMID: 22091350
 19. Duan S, Nordmeier S, Buxton IL. Exploring the metastatic potential of exosomal NM23 signaling using a triple negative breast cancer model in mice. *Cancer Res*. 2016;**76**(14):4275. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-4275
 20. Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, Kim JH. Nanoparticle-mediated combination therapy: Two-in-one approach for cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;**19**(10):3264. DOI: 10.3390/ijms19103264 PMID: 30347840
 21. Torchilin VP. Nanoparticulates as drug carriers. Imperial College Press; 2006.
 22. Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. *J Breast Cancer*. 2013;**16**(2):133-137. DOI: 10.4048/jbc.2013.16.2.133 PMID: 23843843
 23. Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, Yu A, et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine*. 2012;**7**(7):1085-1100. DOI: 10.2217/nnm.12.80 PMID: 22846093
 24. Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer*. 2010;**62**(7):919-930. DOI: 10.1080/01635581.2010.509835 PMID: 20924967
 25. Huseini HF, Zahmatkash M, Haghighi MA. A review on pharmacological effects of Curcuma longa L.(turmeric). *J Med Plants*. 2010;**9**(33):1-15.
 26. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;**75**(1):56-63. PMID: 17225705
 27. Ghodrattpour F, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Cytotoxic effects of Zn oxide nanoparticles against breast cancer T47D cells and NM23 gene expression. *Feyz*. 2018;**22**(6):589-594.
 28. Selvakumari D, Deepa R, Mahalakshmi V, Subhashini P, Lakshminarayan N. Anti cancer activity of ZnO nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell). *J EAS*. 2015;**10**(12):5418-5421.
 29. Baimani M, Mokhtari M. Investigation of combination effect of Doxorubicin and Zinc Oxide Nanoparticles on the expression of Long Non-Coding RNA INXS in MCF7 Breast Cancer Cells. pathobiology research. *MJMS*. 2019;**22**(4):203-210.
 30. Kao YY, Chen YC, Cheng TJ, Chiung YM, Liu PS. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci*. 2012;**125**(2):462-472. DOI: 10.1093/toxsci/kfr319 PMID: 22112499
 31. Ghaemi B, Shaabani E, Najafi-Taher R, Jafari Nodoshan S, Sadeghpour A, Kharrazi S, et al. Intracellular ROS induction by Ag@ ZnO core-shell nanoparticles: frontiers of permanent optically active holes in breast cancer theranostic. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;**10**(29):24370-24381. DOI: 10.1021/acsami.8b03822 PMID: 29932633
 32. Stepankova H, Swiatkowski M, Kruszynski R, Svec P, Michalkova H, Smolikova V, et al. The anti-proliferative activity of coordination compound-based ZnO nano-particles as a promising agent against triple negative breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2021;**16**:4431-4449. DOI: 10.2147/IJN.S304902 PMID: 34234435
 33. Zeinab Khazaei K, Maliheh E, Abolfazl M, Mehrdad H. Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: role of Mcl-1 gene. *Iran J Cancer Prev*. 2015;**8**(3):e2331. DOI: 10.17795/ijcp.2331 PMID: 26413251
 34. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res*. 2006;**29**(1):80-87. DOI: 10.1007/BF02977473 PMID: 16491848
 35. Hashemi M. The study of pentoxifylline drug effects on renal apoptosis and bcl-2 gene expression changes following ischemic reperfusion injury in rat. *Iran J Pharm Res*. 2014;**13**(1):181-189. PMID: 24734070
 36. Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. *Biofactors*. 2013;**39**(1):56-68. DOI: 10.1002/biof.1068 PMID: 23303705