ORIGINAL ARTICLE

Synthesis and Characterization of Deferasirox PLGA Nanoparticles and Investigation of Toxicity in Cell Model

Hamidreza Mohammadi[1],
Javad Akhtari[2],
Sara Assadpour[3],
Mitra Kamali[4],
Pedram Ebrahimnejad[5]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Immunogenetics Research Center, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5]Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 25, 2021 ; Accepted October 9, 2022)

Abstract

Background and purpose: Cancer is one of the causes of mortality worldwide. Evidence suggests that iron depletion by a chelator agent suppresses the development of some cancer cells. Deferasirox is shown to have anticancer properties. This research aims to synthesize and evaluate the effects of deferasirox nanoparticles on human breast cancer cells (SKBR3) and mouse breast cancer cells (4T1) compared with the drug form.

Materials and methods: Deferasirox nanoparticles were synthesized by Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) moiety with emulsion formation and solvent evaporation. Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay and their 50% inhibitory concentration (IC50) were assessed in SKBR3 and 4T1.

Results: Findings showed that IC50 of nano-deferasirox for SKBR3 and 4T1 were 9.09±0.011 µg/ml and 6.6±0.032 µg/ml, respectively and the IC50 of the deferasirox drug form for SKBR3 and 4T1 IC50 were 21.07±0.003 µg/ml and 11.08±0.013 µg/ml, respectively.

Conclusion: The anticancer effects of deferasirox were confirmed on the cell lines, and the improved properties and efficacy were also confirmed on two cancer cell lines. Nanoparticle delivery systems improve absorption and drug properties and increase the effectiveness of the drug.

Keywords: cancer cell, deferasirox nanoparticles, cytotoxicity, MTT

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 65-76 (Persian).

Corresponding Author: Pedram Ebrahimnejad - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: pebrahimnejad@mazums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 214 آبان سال 1401 (76-65)

سنتز و تعیین مشخصات نانوذرات PLGA حاوی دفرازیروکس و بررسی سمیت در مدل سلولی

حمیدرضا محمدی[1]
جواد اختری[2]
سارا اسدپور[3]
میتراکمالی[4]
پدرام ابراهیم نژاد[5]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یکی از علت‌های رایج مرگ و میر در دنیاست. حذف آهن توسط یک شلات کننده سبب مهار تکثیر برخی از سلول‌های سرطانی می‌شود. از داروی دفرازیروکس اثرات ضدسرطانی گزارش شده است. هدف از این مطالعه سنتز و بررسی تاثیر نانوذره دفرازیروکس بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان انسان (SKBR3) و سلول‌های سرطانی پستان موش (4T1) و مقایسه آن با فرم غیرنانو دفرازیروکس است.

مواد و روش‌ها: نانوذرات دفرازیروکس با استفاده از PLGA (Poly lactic-co-glycolic acid)، به روش تشکیل امولسیون و تبخیر حلال تهیه شدند. سمیت سلولی آن‌ها با استفاده از روش MTT Assay مورد بررسی قرار گرفت و میزان غلظت مهاری 50 درصد (IC50) رده های سلولیSKBR3و 4T1 با هم مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که IC50 برای فرم نانوی سلول‌های SKBR3 و 4T1 به ترتیب معادل 0/011± 9/09 و 0/032± 6/6 میکروگرم در میلی‌لیتر و IC50 برای فرم غیر نانوی سلول‌های SKBR3 و 4T1 به‌ترتیب معادل 0/003±21/07 و 0/013 ± 11/08 میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

استنتاج: در مورد داروی مورد مطالعه اثرات ضدسرطانی آن بر روی رده‌های سلولی تایید و بهبود خصوصیات و اثربخشی در دو رده سلول سرطانی نیز تایید شد. استفاده از سامانه‌های دلیوری نانوذره‌ای سبب بهبود جذب، افزایش اثربخشی و بهبود خصوصیات دارو می‌شود.

واژه های کلیدی: سلول‌های سرطانی، نانوذرات دفرازیروکس، سمیت سلولی، MTT assay

مقدمه

سرطان یکی از بارزترین علل مرگ و میر در دنیای امروز است و جمعیتی میلیونی را تحت تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم خود قرار می‌دهد. جستجو برای یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان ادامه دارد، استفاده از شلات‌کننده‌های آهن در درمان سرطان رو به گسترش است. به عنوان مثال دسفرال، داروی انتخابی در درمان وضعیت ازدیاد آهن، به تنهایی و هم‌چنین ترکیبی در درمان لوکمی و نوروبلاستوما به کار گرفته شده است(1).

مولف مسئول: پدرام ابراهیم نژاد- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم داروئی E-mail: pebrahimnejad@mazums.ac.ir
1. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشیار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک،گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دکتری پژوهشی علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1401/5/3 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/5/12 تاریخ تصویب : 1401/7/17

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

شلات‌کننده‌های آهن موجب کاهش ساخت DNA، توقف تکثیر سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول می‌شوند(2). در حال حاضر سه داروی تایید شده جهت درمان وضعیت ازدیاد آهن در بدن وجود دارد. دسفرال، دفرازیروکس و فریپروکس، مورد مصرف اصلی این داروها برای شلاته کردن آهن اضافی در بیماران دچار تالاسمی ماژور است که به‌طور مکرر خون دریافت می‌کنند(4،3) دفرازیروکس به علت دوز درمانی پایین تر نسبت به فریپروکس بهتر توسط بیماران تحمل می‌شود(1). تمایل اتصال دفرازیروکس به آهن (pFe^{3+}=22/5) بین فریپروکس (pFe^{3+}=19/4) و دسفرال (pFe^{3+}=24) است در حالی که بین این سه داروی شلات‌کننده آهن طولانی‌ترین نیمه عمر (8 تا 16 ساعت) را دارد. میزان دوز تجویزی این دارو 20-30 mg/kg/day می‌باشد. با وجود گزارش اثرات ضد سرطانی دفرازیروکس در مقالات اخیر، مکانیسم اثر ضد تکثیر سلولی آن هنوز در حال بررسی است. طبق مطالعه انجام شده توسط Chantrel-Groussard و همکاران، اثرات ضد تکثیر سلولی دفرازیروکس در کارسینومای کبد به علت کاهش فعالیت اورنیتین دکربوکسیلاز و اسپرمیدین 1N-استیل‌ترانسفراز می‌باشد. هم‌چنین گزارش‌هایی از اثر مهارکنندگی NF-κB توسط دفرازیروکس در سندرم میلودیسپلاستیک موجود است. Ohyashiki و همکاران اثر ضد سرطانی دفرازیروکس در سلول‌های لوکمی حاد میلوئیدی را به کاهش فسفریلاسیون mTor و کاهش فسفریلاسیون p70S6 کیناز و پروتئین ریبوزومی S6 نسبت داده‌اند. هم‌چنین اثرات ضد تکثیر سلولی دفرازیروکس در سلول‌های لنفوئیدی بدخیم به افزایش بیان P53 و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از طریق Bcl2-Bax ارتباط دارد(6،5). نسل امروزه دارو بر پایه مولکول‌هایی با جرم 1000 دالتون و یا کم‌تر می‌باشد که در کل بدن پخش می‌شوند. توزیع این داروها سبب سمیت در بافت‌های غیر هدف و ایجاد اشکال در نگه داشتن غلظت دارو در بازه درمانی و در نتیجه کاهش اثر بخشی می‌شود. سیستم‌های دارورسانی ایجاد شده بر پایه نانو سبب کاهش این مشکلات می‌شوند(7). نانوذرات پلیمری ساخته شده از پلیمرهای طبیعی و سنتزی به علت پایداری و سهولت ایجاد تغییر در سطح آن‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این ذرات می‌توانند با تغییر خصوصیات پلیمر و شیمی سطح جهت دست‌یابی به آزادسازی کنترل شده دارو و تجمع در محل ایجاد بیماری به نحو مطلوب ساخته شوند(8). رایج‌ترین راه اصلاح خصوصیات سطحی نانوذرات، استفاده از پلیمرهای هیدروفیل مانند پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) می‌باشد. به عنوان مثال اتصال زنجیره‌هایPEG به پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر پلی‌لاکتیک اسید(PLA) با کنترل فرایند اپسونیزاسیون به بهبود خصوصیات سطحی نانوذرات کمک می‌کند(9). بنابراین ویژگی‌های پلیمرهای به‌کار رفته در تهیه نانوذرات پلیمری (شامل هیدروفوب بودن، بار سطحی و زیست تخریب‌پذیری) از یک سو و خصوصیات فیزیکوشیمیایی دارو (نظیر وزن مولکولی، بار الکتریکی و ...) از سوی دیگر تاثیر زیادی بر جذب، توزیع زیستی و حذف دارو از بدن دارد(12-10). پلی استر PLGA کوپلیمر پلی لاکتیک اسید (PLA) و پلی گلایکولیک اسید(PGA) است و یکی از بهترین زیست مواد موجود برای دارورسانی با توجه به طراحی و کاربرد می‌باشد. اشکال انانتیومری PLA به صورت‌های پلی D-لاکتیک اسید (PDLA) و پلی L-لاکتیک اسید (PLLA) هستند. PLGA یک پلی D، L-لاکتیک-*co*-گلایکولیک اسید است که میزان اشکال D و L لاکتیک اسید در آن برابر است. این پلیمر در بدن با هیدرولیز پیوند استری لاکتیک اسید و گلایکولیک اسید با سرعت خیلی پایین تخریب می‌شود(13). این پلیمر به عنوان یکی از مطلوب‌ترین پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر در توسعه نانوتکنولوژی در علوم دارویی می‌باشد، زیرا طی روندی ساده در بدن هیدرولیز شده و به مونومرهای زیست سازگاری با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

حداقل میزان سمیت تبدیل می‌شود(14). ماکرو مولکول‌های دارویی مثل پروتئین‌ها، پپتیدها، واکسن‌های ژنی و فاکتور رشد انسانی به‌طور موفقیت‌آمیزی روی PLGA یا نانوذرات با پایه PLGA بارگذاری شده‌اند(15). تفکر عمده این است که نانو ذرات PLGA از طریق اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند و سپس داروی مورد نظر را آزاد می‌کنند. بسیاری از مطالعات برداشت سریع و کارآمد این ذرات توسط سلول‌ها را نشان می‌دهد(16). باتوجه به مطالب گفته شده اثرات ضد سرطانی دفرازیروکس مشخص است، با این وجود استفاده از نانوذرات با تغییر در کینتیک توزیع دارو سبب کاهش دوز مصرفی و کاهش سمیت احتمالی می‌شود، از این‌رو طراحی یک سامانه نانوذره‌ای پلیمری از هر داروی ضدسرطان از جمله دفرازیروکس و مطالعه آن در مدل سلولی می‌تواند مفید باشد و علاوه بر کسب دانش فنی توسعه نانودارو به مستندسازی اثرات بیولوژیک آن نیز می‌تواند کمک کند. در مطالعه حاضر نانوذرات PLGA حاوی دفرازیروکس مطابق مطالعات قبلی ساخته شد و پس از تعیین مشخصات اولیه آن‌ها، به بررسی اثرات سمیت نانوذرات و داروی اصلی دفرازیروکس بر روی رده‌های سلولی سرطانی سینه SKBR3 و 4T1 استخراج شده از سلول‌های سرطانی پستان موش پرداخته شد. دو رده سلولی گوناگون سرطانی انتخاب شده و با نانوذرات و داروی اصلی دفرازیروکس مواجه شدند. در این مطالعه با استفاده ازPLGA، ترکیب شلات‌کننده آهن (دفرازیروکس) به فرم نانوذرات درآمد و پارامترهای اساسی آن مانند سایز، پتانسیل زتا و درصد کپسوله‌سازی تعیین شد و در ادامه جهت بررسی اثرات مهار رشد آن بر روی سلول‌های سرطانی از دو رده سلولی SKBR3 و 4T1 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

الف - مواد شیمیایی

مواد مورد استفاده در مطالعه تجربی حاضر شامل پلیمر PLGA از شرکت Boehringer Ingelheim آلمان، vitamin E TPGS از شرکت Curtec هلند، deferasirox از شرکت اسوه ایران، نمک MTT (از شرکت Sigma-aldrich)، (DCM) از شرکت Merck آلمان بود.

ب - تهیه نانوذرات داروی دفرازیروکس

دراین مطالعه، با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1394.1510 اصول اخلاقی طبق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری رعایت شد. ساخت نانوذرات با روش تشکیل امولسیون و تبخیر حلال انجام شد. مقدار10 میلی‌گرم داروی دفرازیروکس و 15 میلی‌گرم پلیمر PLGA جهت تشکیل فاز آلی در 6 میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و 4 میلی‌لیتر استون حل شد. با استفاده از سرنگ انسولین این محلول به 50 میلی‌لیتر محلول آب دیونیزه دارای 2/5 گرم از امولسیفایر Vit E TPGS اضافه شد و سپس تحت عمل سونیکاسیون به مدت 1دقیقه قرار گرفت. امولسیون روغن در آب حاصل برای 4 ساعت تحت هم‌زدن مداوم با سرعت 500rpm در دمای اتاق قرار گرفت تا فاز آلی آن تبخیر شود. برای جداسازی نانوذرات از دستگاه اولتراسانتریفوژ (14000rpm، دمای 6 درجه سانتی‌گراد، مدت زمان 20دقیقه) استفاده شد. ذرات 3 بار با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند و مجددا سانتریفوژ شدند تا مقدار اضافی دارو، پلیمر و یا امولسیفایر دور ریخته شوند. نانوذرات حاصل فریز شده و سپس تحت خلا کاملا خشک شدند.

ج - مشخصه یابی نانوذرات PLGA

- اندازه‌گیری سایز، پتانسیل زتا و درصد داروی بارگیری شده

مطابق روش قبلی مورد استفاده، برای مشخصه یابی از دستگاه زتاسایزر (مالورن UK) استفاده شد. نانوذرات در کووت مخصوص قرار گرفته و تحت دمای ثابت، آنالیز شدند. سایز ذرات توسط دستگاه اندازه‌گیری شد و پتانسیل زتای نانوذرات هم در فرایند مشابه با همین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

دستگاه اندازه‌گیری شد و شاخص پراکندگی نیز تعیین شد. این فرایند 3 بار به صورت مستقل تکرار شد و میانگین گرفته شد(19-17) درصد داروی بارگیری شده با روش HPLC انجام شد و معتبرسازی روش آنالیز نیز به‌طور کامل صورت پذیرفت(20).

د-کشت سلولی

سلول‌های به‌کار رفته در این آزمایش شامل سلول‌های سرطانی سینه SKBR3 و 4T1 استخراج شده از سلول‌های سرطانی پستان موش از انستیتو پاستور و دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند. SKBR3 در سال 1970 با منشا آدنوکارسینومای پستان از یک فرد 43 ساله به دست آمده است. این رده سلولی بیان بالایی از گیرنده فاکتور رشد انسانی HER-2 را در سطح خود دارد. سلول‌های سرطانی پستانی 4T1 یک رده سلولی توموری قابل پیوند است که بسیار تومورزا و تهاجمی است. هنگام کار سلول‌ها در فلاسک‌هاکشت داده شدند. سلول‌ها برای رشد در محیط کشت RPMI حاوی 10 درصد FBS قرار گرفته و در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد حاوی CO2 5درصد، نگهداری شدند. برای پاساژ از محلول Trypsin-EDTA استفاده شد.

ه- بررسی تست سمیت سلولی (MTT Assay)

پودر MTT به صورت 5 میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد واز فیلتر سرسرنگی عبور داده شد. سپس به هر یک از چاهک‌های پلیت 96 خانه، 100 µl از سوسپانسیون سلولی حاوی 1.0×10^4 از هر سلول در هر مرحله از آزمایش اضافه شد. حدود 24 ساعت، پلیت‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سلول‌ها با محیط تطبیق یابند و به کف چاهک‌ها بچسبند. سپس سلول‌ها هر روز از لحاظ تراکم در هر چاهک بررسی شدند و سپس تحت آزمایش قرار گرفتند. سپس رقت‌های سریالی از دفرازیروکس در میکروتیوب‌های 2 میلی‌لیتری استریل تهیه شد و با تکرارهای چهارتایی به چاهک‌های پلیت 96 خانه که حاوی سلول بود اضافه شد.

در این آزمایش بسته به مشخص نبودن دامنه سمیت آن بر روی سلول‌ها در یک مرحله به صورت پایلوت و تکرارهای کم، سمیت نسبی تعیین شد. سپس غلظت‌های 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. رقیق‌سازی در محیط کشت بدون FBS صورت گرفت. بعد از این مرحله پلیت‌ها که حاوی سلول‌های چسبیده شده به کف فلاسک بود از انکوباتور خارج شد و محیط رویی آنها تخلیه شد. سپس 100-200 میکرولیتر بسته به آزمایش به آن‌ها محیط کشت حاوی FBS افزوده شد. رقت‌های سریالی از دفرازیروکس با تکرارهای چهارتایی به سلول‌ها اضافه شد. کنترل منفی شامل سلول‌های مدنظر در محیط کشت حاوی FBS و بدون هیچ دارویی می‌باشد. از سلول‌هایی که فقط هم حجم محلول دارو محیط کشت بدون FBS به آن‌ها اضافه می‌شود استفاده شد. برای شکل نانوی دارو هم از همان رقت‌ها به صورت سریالی استفاده شد. پس از مدت زمان انکوباسیون دارو و سلول‌ها، پلیت‌های 96 خانه از انکوباتور خارج شد و مجدداً محلول رویی جدا شد. به چاهک‌های پلیت 100 میکرولیتر محیط کشت بدون FBS که حاوی محلول MTT می‌باشد اضافه شد. برای این کار و یکسان بودن محلول‌ها در هر چاهک و رعایت غلظت‌ها، از قبل، محیط کشت بدون FBS با MTT با نسبت 9 به 1 تهیه شد و در قایقک مخصوص کشت سلولی قرار داده شد. سپس با سمپلر 8 کاناله مقادیر 100 میکرولیتر به چاهک‌های سلولی و کنترل اضافه شد. پلیت‌ها به مدت 4 ساعت در انکوباتور 37 درجه قرار داده شدند. بعد از گذشت 4 ساعت پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده و 100-200 میکرولیتر DMSO (بسته به شدت رنگ بلورها) اضافه شد و بر روی شیکر به مدت 15 دقیقه قرار گرفت. شدت رنگ حل شده در DMSO بررسی شد و از حل شدن بلورها اطمینان حاصل شد. سپس پلیت‌های 96 خانه در دستگاه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

ELISA reader قرار داده شدند و جذب محتویات چاهک‌ها در طول موج 570nm خوانده شد. طول موج 630 نانومتر به عنوان طول موج رفرانس انتخاب شد. در نهایت مقادیر IC50 توسط نرم‌افزار Calcusyn بر اساس منحنی دوز- پاسخ محاسبه شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و T-test انجام شد.

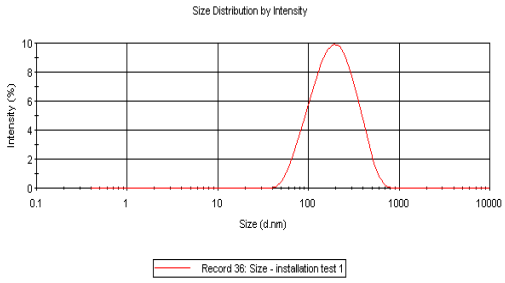
یافته‌ها

ویژگی‌های نانوذرات

برای مشخصه یابی از دستگاه زتاسایزر (مالورن UK) استفاده شد. نانوذرات در کووت مخصوص قرار گرفته و تحت دمای ثابت، آنالیز شدند. همان‌طورکه در جدول شماره 1 مشاهده می‌کنید، سایز ذرات به دست آمده از بهترین فرمولاسیون در محدوده 165/2±5nm بود(نمودار شماره 1) و پتانسیل زتای نانوذرات هم در فرایند مشابه توسط همین دستگاه اندازه‌گیری شد که 12/6 ± 2/2 mv- و شاخص پراکندگی 0/28 بود.

جدول شماره 1: اندازه ذرات و توزیع پراکندگی ذرات نانوذرات دفرازیروکس

شاخص‌ها	اندازه ذرات(nm)	پتانسیل زتا(mV)	PDI
نانوداروی دفرازیروکس	165.2±5	-12.6±2.2	0.28

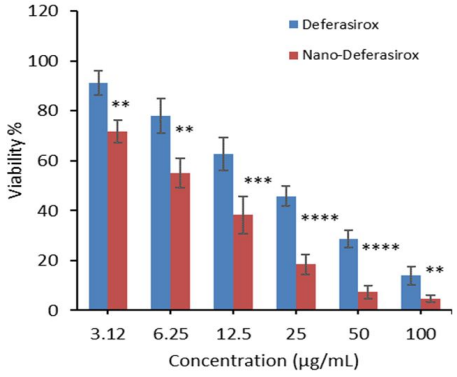


نمودار شماره 1: اندازه گیری اندازه ذرات نانودارو با استفاده از دستگاه زتاسایزر

سمیت سلولی

بر اساس نتایج به دست آمده از تست سمیت سلولی، به‌صورت وابسته به غلظت، میزان زنده مانی سلول‌ها در نمودارهای ستونی رسم شد.

همان‌طورکه در نمودار شماره 2 مشاهده می‌شود داروی اصلی و فرم نانوی دفرازیروکس در 48 ساعت انکوباسیون، اثرات مهار رشد بر روی این رده سلول سرطانی داشته است و با افزایش دوز دارو این اثر مهاری به صورت منظم افزایش یافته است. پس اثر مهاری وابسته به دوز می‌باشد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود در غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر اثر مهاری بسیار افزایش یافته به همین دلیل بالاتر از این غلظت در مطالعه وارد نشده است.



نمودار شماره 2: درصد زنده مانی رده SKBR3 در مواجهه با غلظت‌های 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100 میکروگرم در میلی‌لیتر از نانودارو و داروی اصلی دفرازیروکس طی زمان انکوباسیون 48 ساعته به صورت سه بار تکرار با سطح معنی داری کم تر از P≤0/05

*: (P≤0/05)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

**: (P≤0/01)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

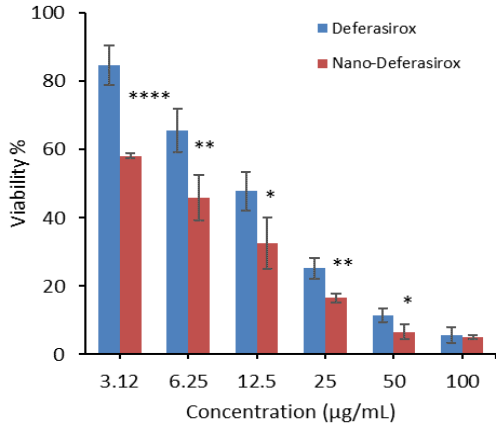
***: (P≤0/001)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

****: (P≤0/0001)، معنی‌داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

همان‌طور که در نمودار شماره3 مشاهده می‌شود داروی اصلی و فرم نانوی دفرازیروکس در 48 ساعت انکوباسیون، اثرات مهار رشد بر روی این رده سلول سرطانی داشته است و با افزایش دوز دارو این اثر مهاری به صورت منظم افزایش یافته است. پس اثر مهاری وابسته به دوز می‌باشد. این نتایج در ادامه توسط نرم افزارCalcusyn آنالیز شد تا IC50 به‌دست آید. مقدار (IC50 برای سلول‌های 4T1) داروی اصلی معادل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

11/08 میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فرم نانوی آن معادل 6/6 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. مقدار IC50 برای سلول‌های SKBR3) داروی اصلی معادل 21/07 میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فرم نانوی آن معادل 9/09 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. (IC50 میزان غلظت مورد نیاز برای مهار 50 درصدی رشد و تکثیر می‌باشد و به عنوان شاخص سمیت سلولی در نظر گرفته می‌شود).



نمودار شماره 3: درصد زنده مانی رده 4T1 در مواجهه با غلظت‌های 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100 میکروگرم در میلی‌لیتر از نانودارو و داروی اصلی دفرازیروکس طی زمان انکوباسیون 48 ساعته به صورت سه بار تکرار با سطح معنی‌داری کم‌تر از P≤0/05

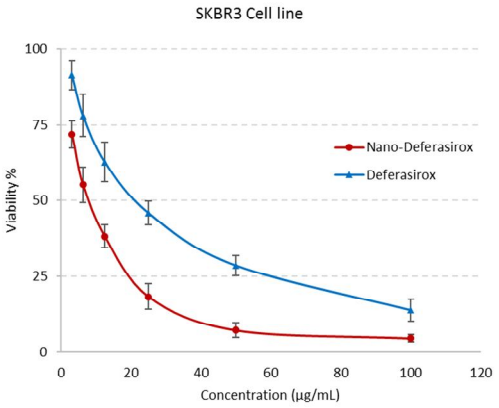
*: (P≤0/05)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

**: (P≤0/01)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

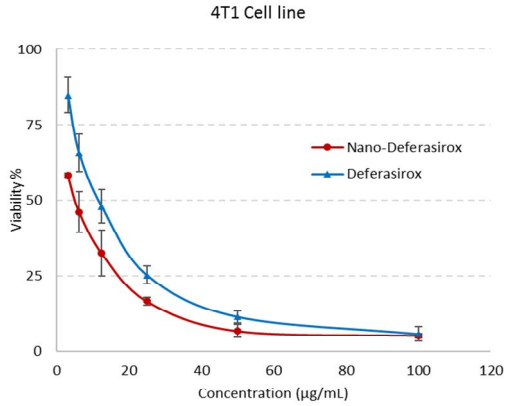
***: (P≤0/001)، معنی داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

****: (P≤0/0001)، معنی‌داری نسبت به گروه غیر نانو دفرازیروکس

همان‌طور که در در نمودارهای شماره‌ی 4و5 مشاهده شد با مقایسه اثر مهار رشد فرم نانوی داروی دفرازیروکس بر روی دو رده سلولی SKBR3 و4T1، مشخص شد که در غلظت مشابه از نانودارو بر روی هر دو رده سلولی، درصد بقای سلولی در مورد رده سلولی 4T1 کم‌تر از رده سلولی SKBR3 است، یعنی فرم نانوی دارو بر روی رده سلولی 4T1 موثرتر از رده سلولی SKBR3 عمل کرده است.



نمودار شماره 4: میزان IC50 نانودارو معادل 9/09 میکروگرم در میلی‌لیتر و داروی اصلی دفرازیروکس معادل 21/07 میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رده سلولی سرطانی SKBR3 پس از زمان انکوباسیون 48 ساعته



نمودار شماره 5: میزانIC50 نانودارو معادل 6.6 میکروگرم در میلی لیتر و داروی اصلی دفرازیروکس معادل 11.08 میکروگرم در میلی لیتر بر روی رده سلولی سرطانی 4T1 پس از زمان انکوباسیون 48 ساعته

بحث

کشت سلولی یکی از روش های بررسی سریع تأثیر داروهای مختلف بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال می‌باشد. در این مطالعه تاثیر نانوذره دفرازیروکس بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان انسان (SKBR3) و سلول‌های سرطانی پستان موش (4T1) و مقایسه آن با فرم غیرنانو دفرازیروکس بررسی شد. روش کشت سلولی می‌تواند به شناسایی دقیق‌تر مکانیسم‌ها و اثرات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

بیولوژیکی ترکیبات مختلف و همچنین اثرات آن‌ها بر فاکتورهای متفاوت داخل سلولی کمک نماید این امکان شناسایی هر چه بهتر فرایندها و فعل و انفعالات داخل سلولی طی دوره دارو درمانی سرطان را ممکن می‌سازد که می‌تواند به ارتقاء روش‌های درمانی منجر شود(21). به هرحال یکی از مهم‌ترین کاندیدای سنتز داروهای ضد سرطان به منظور مصرف در شیمی درمانی سرطان‌ها، ترکیبات دارای اثرات سمی و خصوصاً سمیت سلولی هستند که امروزه سمیت سلولی آن‌ها با استفاده از روش‌های سنجش سمیت بر روی کشت سلولی و بافتی قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

سرطان بیماری مهلکی است که شیوع آن روز به روز در حال افزایش است. جستجو برای یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان ادامه دارد و یکی از روش‌ها بررسی اثر ضد سرطانی داروهای با کاربرد متفاوت است که دارای تاییدیه FDA می‌باشند (Repurposed drugs). دفرازیروکس یک شلاته‌کننده آهن است که در بیماران تالاسمی ماژور استفاده می‌شود. در مطالعات زیادی اثر ضدسرطانی این دارو بر روی رده سلولی و مدل حیوانی مطالعه شده است(22). نانوذرات مخصوصا نانوذرات پلیمری به عنوان حامل های داروها کاربرد زیادی دارند و با نگهداری از دارو در ساختار خود و تغییر کینتیک داروها در شرایط درون تنی سبب افزایش اثربخشی آن‌ها می‌شوند(23) در این مطالعه نانوذرات داروی دفرازیروکس با پلیمر PLGA تهیه شد. نانوذرات داروی فوق دارای اندازه مناسب می‌باشند که منجر به کاهش جذب سطحی به پروتئین‌های پلاسما و همچنین فیلتراسیون کبدی می‌شود. هم‌چنین به علت داشتن اندازه ذره‌ای 165 نانومتر و با خصوصیات سطحی‌هیدرفیل، متحمل اپسونیزاسیون و کلیرانس کم‌تری می‌شوند. در مطالعات درون‌تنی این امر موجب افزایش مدت گردش خونی این مواد و بنابراین منجر به بهبود هدفمندی به سوی بافت هدف می‌شود. از طرفی نانوذرات PLGA برای دارورسانی هدفمند به بافت توموری با توجه به اثر افزایش نفوذپذیری و ماندگاری، مناسب می‌باشند، هم‌چنین PLGA در سال 1999 برای استفاده در موارد مختلف دارویی و تغذیه‌ای از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) مجوز کسب کرده است. در این مطالعه اثر نانوذرات بر روی دو رده سلول سرطانی بررسی شد و نتایج حاکی از سمیت بالاتر نانوذرات روی هر دو رده سلولی در فرم نانو بود. اختلاف بین سمیت سلولی نانوذره دفرازیروکس و دفرازیروکس تقریبا در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار می‌باشد($P < 0/05$). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد در مورد سلول‌های SKBR3 در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر، تفاوت بین اثر مهاری دارو و نانودارو معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0/05$). به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که غلظت قبل از آن یعنی 50 میکروگرم بر میلی لیتر غلظت مناسبی برای ماکزیمم اثر مهاری نانوذره می‌باشد و در غلظت بالاتر از آن، دارو هم دارای اثر مهاری کافی و غیر قابل تمایز می‌باشد. هر چه از غلظت کاسته می‌شود تفاوت اثر مهاری نانودارو و دارو بیش‌تر می‌شود که حاکی از اثر افزایش یافته نانودارو و تاثیر فرم نانوذره‌ای بر جذب بهتر و اثر مهاری بالاتر نانودفرازیروکس می‌باشد و این قضیه نشان دهنده امکان استفاده از دوزهای کم‌تر دارو با حفظ خصوصیات مهاری در مدل‌های سرطانی می‌باشد. برای رده سلولی 4T1 همان‌طورکه مشاهده شد درصد سمیت سلولی بیش‌تر از رده سلولی SKBR3 است. یعنی فرم نانوی دفرازیروکس بر روی رده سلولی 4T1 اثربخشی بیش‌تری در مقایسه با رده سلولیSKBR3 داشته است. مطالعات نشان می‌دهند که وقتی ذرات به 500 نانومتر می‌رسند میزان جذب از موکوس روده کاهش می‌یابد. میزان پتانسیل زتای ذرات در این فرمولاسیون 14/2- میلی‌ولت بوده است. پتانسیل زتا عامل مهمی در میزان پایداری سوسپانسیون نانوذرات می‌باشد و میزان بالای آن سبب بالا بودن بار الکتریکی سطح نانوذرات و در نتیجه افزایش نیروی دافعه بین ذرات و هم‌چنین جلوگیری از تجمع ذرات می‌شود(25،24). این عامل بر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

تعیین نحوه تداخل نانوذره با غشای سلولی که معمولا بار منفی دارد تاثیر دارد. در مطالعات قبلی ما(24)، گزارش شد که هم مقادیر بالای پتانسیل زتا مطلق و هم بارهای سطحی منفی عوامل بسیار مهمی برای نشان دادن پراکندگی کلوئیدی پایدار نانوذرات هستند. پتانسیل زتا می‌تواند بر پایداری ذرات در سیستم‌های پراکندگی تأثیر بگزارد.به دلیل قدرت زیاد نیروهای دافع بین ذرات و بار الکتریکی زیاد روی سطح، می‌تواند از تجمع در رسانه‌ها جلوگیری کند. علاوه بر این مطالعات in vivo نشان داد که پتانسیل زتا نقش کلیدی در تعیین برهمکنش ذرات با غشای سلولی دارد. هم‌چنین، اندازه‌گیری پتانسیل زتا می‌تواند به تعیین عنصر غالب در سطح ذرات کمک کند. بارهای سطحی منفی نانوذرات به دلیل افزایش مقدار PLGA افزایش یافت. اگرچه دفرازیروکس یک ترکیب شلاته‌کننده آهن است اما محققان زیادی اثرات ضدسرطانی آن را نیز بررسی کرده‌اند.

Samie Salehi و همکاران در مطالعه‌ای که در سال 2016 منتشر کرده‌اند با استفاده از MTT assay و فلوسیتومتری اثرات این دارو را بر روی سلول‌های HT29 و MDA-MB-231 بررسی کردندو نتایج آن‌ها نشان داد که دفرازیروکس و دو مشتق آمینواسیدی آن عوامل ضدسرطان کارآمدی هستند(26).

Goldie و همکاران در مطالعه‌ای که در سال 2012 در نشریه Molecular Pharmacology منتشر کردند از ترکیب دفرازیروکس برای درمان سرطان استفاده کردند و در مدل توموری زنوگرافت ریه انسان در جستجوی مکانیسم مولکولی عملکرد دفرازیروکس بودند، در این مطالعه نشان دادند که دفرازیروکس یک عامل ضد سرطانی موثر علیه تومورهای جامد است(27).

مطالعات اخیر مزایای فرمولاسیون‌های نانو ذرات در افزایش نفوذپذیری دارو به تومور و بالطبع کاهش عوارض دارویی آن و توجه بیش‌تر به این نوع فرمولاسیون را نشان می‌دهند. در مطالعه‌ای که در سال 2013 توسط Lui و همکارانش انجام شد نشان دادند که آهن در اتیولوژی سرطان گوارشی نقش دارد. هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهد که شلات‌کننده‌های آهن فعالیت آنتی‌تومور قوی دارند(27).

در بسیاری از مطالعات بر روی رده‌های سلولی مختلف از اثرات ضد سرطانی دفرازیروکس استفاده شده است. بررسی ها در تعدادی از این مطالعات در حد سمیت سلولی بوده است وبرخی به مطالعه مکانیسمی پرداخته اند. مثلا در یک مطالعه روی رشد سلول‌های سرطانی مری (KYSE-30) به صورت برون تنی و مطالعات حیوانی پرداخته شده است(28). اثر بر لنفوم سلول‌های سرطانی ریه و عبور از سد خونی - مغزی برای رسیدن به تومورهای مغزی و اثر بر سرطان پستان از جمله سایر مطالعات ضد سرطانی این دارو بوده است(29،31). در مطالعه‌ای که در سال 2014 توسط Zhang و همکارانش انجام شد نشان داد که اختلال در متابولیسم آهن (مانند بار آهن اضافی) به عنوان یک عامل خطر برای انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله سرطان شناخته شده است، شواهد روبه‌رشد نشان می‌دهد که سیگنالینگ مرکزی هموستاز آهن، محور هپسیدین - فروپورتین، در سرطان بی‌نظم شده است و با اختلال در این محور رشد سرطان پستان افزایش می‌یابد(32).

از نانوذرات PLGA برای کپسولاسیون SN-38 هم استفاده شده است که قطر ذره ای میانگین ذرات 300-200 نانومتر با کیفیت انکپسولاسیون 80 درصد حاصل شد. بار الکتریکی سطح ذرات منفی بود و آزادسازی انفجاری اولیه‌ای حدود 10-15درصد (وزنی - وزنی) به‌دنبال الگوی آزادسازی آهسته رهش مشاهده شد. ضمن آن‌که نانوذرات سمیت سلولی بالاتری نسبت به داروی آزاد در سلول‌های سرطانی کولون(HT-29) نشان دادند، هم‌چنین توزیع بافتی دارو در نانوذرات در مقایسه با داروی آزاد تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان داد(33).

در مجموع، بیان می‌شود که deferasirox یک عامل ضد تومور به صورت خوراکی موثر در برابر تومورهای جامد است(26).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

Choi درمقاله‌ای در سال 2016، پتانسیل دفرازیروکس را به عنوان روش درمانی جدید برای درمان سرطان معده بررسی کردند، در این مطالعه چهار رده سلولی از سرطان معده (AGS, MKN-28,SNU-484,SNU-638) با غلظت‌های متفاوتی از دفرازیروکس درمان شد تا IC50 برای هر رده سلولی مشخص شود. اثرات دفرازیروکس روی چرخه سلولی با فلوسیتومتری بررسی شد و اثرات دفرازیروکس روی متابولیسم آهن و چرخه سلولی نیز ارزیابی شد(5).

در پایان میتوان نتیجه‌گیری کرد که این مطالعه نشان داد که در غلظت‌های مشابه 3/12، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 میکروگرم در میلی‌لیتر از نانودارو و داروی اصلی دفرازیروکس، فرم نانوی دفرازیروکس اثر ضد سرطانی بهتری داشت، همچنین نتایج آنالیز IC50 و مقایسه آن‌ها با هم نیز نشان داد که در تمام تکرارهای آزمایش، نانودارو موثرتر از داروی آزاد عمل کرده است که این امر به علت تسهیل ورود نانوذره دفرازیروکس به سلولها بوده و همچنین تجمع نانوذرات دارویی در سلول‌ها در اثر بهبود خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها و هم‌چنین بروز خواص ویژه در سایز نانو می‌باشد، بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر، داروی deferasirox با تاکید بر فرمولاسیون نانو می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد سرطان در کاربردهای بالینی استفاده شود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان نامه دکترای داروسازی خانم میترا کمالی دانشجوی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و نتیجه طرح پژوهشی مصوب با کد 1510 می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌شود.

References

1. Zhao R, Planalp RP, Ma R, Greene BT, Jones BT, Brechbiel MW, et al. Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. Biochem Pharmacol 2004; 67(9): 1677-1688.
2. Lescoat G, Léonce S, Pierré A, Gouffier L, Gaboriau F. Antiproliferative and iron chelating efficiency of the new bis-8-hydroxyquinoline benzylamine chelator S1 in hepatocyte cultures. Chem Biol Interact 2012; 195(2): 165-172.
3. Heli H, Mirtorabi S, Karimian K. Advances in iron chelation: an update. Expert Opin Ther Pat 2011; 21(6): 819-856.
4. Tavakoli S, Ebrahimzadeh MA, Sameni F, Biparva P, Mohammadi H, Ziar A, et al. Excess iron ion reduction in a thalassemia model using silver nanoparticles modified by the tannin fraction of Myrtus communis extact. Nanomed Res J 2020; 5(4): 355-363.
5. Choi JG, Kim J-L, Park J, Lee S, Park SJ, Kim JS, et al. Effects of oral iron chelator deferasirox on human malignant lymphoma cells. Korean J Hematol 2012; 47(3): 194-201.
6. Taleghani AS, Ebrahimnejad P, Heydarinasab A, Akbarzadeh A. Adsorption and controlled release of iron-chelating drug from the amino-terminated PAMAM/ordered mesoporous silica hybrid materials. J Drug Deliv Sci Technol 2020; 56: 101579.
7. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm Res 2006;23(7):1417-1450.
8. Assadpour S, Shiran MR, Akhtari J. Chitosan coating of anionic liposomes containing sumatriptan succinate: a candidate for nasal administration. Nanomed J 2021; 8(2): 132-139.
9. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

nanoparticles as drug delivery devices. J Control Release 2001; 70(1-2): 1-20

10. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine 2006; 2(1): 8-21.
11. Jafari M, Heidari D, Ebrahimnejad P. Synthesizing and characterizing functionalized short multiwall carbon nanotubes with folate, magnetite and polyethylene glycol as multi-targeted nanocarrier of anti-cancer drugs. Iran J Pharm Res 2016; 15(2): 449-456.
12. Sadeghi-Ghadi Z, Vaezi A, Ahangarkani F, Ilkit M, Ebrahimnejad P, Badali H. Potent in vitro activity of curcumin and quercetin co-encapsulated in nanovesicles without hyaluronan against Aspergillus and Candida isolates. J Mycol Med 2020; 30(4): 101014.
13. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56(11): 1649-1659.
14. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release 2008; 125(3): 193-209.
15. Akhtari J, Ebrahimnejad P, Rafiei A. A review on the use of nanoparticles in the release of growth factors. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(122): 424-439 (Persian).
16. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63(3): 170-183.
17. Mir M, Ebrahimnejad P. Preparation and characterization of bifunctional nanoparticles of vitamin E TPGS-emulsified PLGA-PEG-FOL containing deferasirox. Nanosci. Nanotechnol-Asia 2014; 4(2): 80-87.
18. Mohammadi H, Nekobahr E, Akhtari J, Saeedi M, Akbari J, Fathi F. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles by co-precipitation method coated with biocompatible compounds and evaluation of in-vitro cytotoxicity. Toxicol Rep 2021; 8: 331-336.
19. Sharifi F, Jahangiri M, Nazir I, Asim MH, Ebrahimnejad P, Hupfauf A, et al. Zeta potential changing nanoemulsions based on a simple zwitterion. J Colloid Interface Sci 2021; 585: 126-137.
20. Ebrahimnejad P, Dinarvand R, Sajadi A. Development and validation of an ion-pair HPLC chromatography for simultaneous determination of lactone and carboxylate forms of SN-38 in nanoparticles. J Food Drug Anal 2009; 17(4): 246-256.
21. Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi E, Zalzar Z. Cytotoxic Effects of Lagenaria siceraria Standl .Extract on Cancer Cell Lin. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 22(97): 225-230 (Persian).
22. Shinoda S, Kaino S, Amano S, Harima H, Matsumoto T, Fujisawa K, et al. Deferasirox, an oral iron chelator, with gemcitabine synergistically inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncotarget 2018; 9(47): 28434-28444.
23. Mehravaran A, Nasab MR, Mirahmadi H, Sharifi I, Alijani E, Nikpoor AR, et al. Protection induced by Leishmania Major antigens and the imiquimod adjuvant encapsulated on liposomes in experimental cutaneous leishmaniasis. Infect Genet Evol 2019; 70: 27-35.
24. Taleghani AS, Nakhjiri AT, Khakzad MJ, Rezayat SM, Ebrahimnejad P, Heydarinasab A, et al. Mesoporous silica nanoparticles as a versatile nanocarrier for cancer treatment: A

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]

review. J Mol Liq 2021; 328: 115417.

25. Ahmadi F, Sodagar-Taleghani A, Ebrahimnejad P, Moghaddam SPH, Ebrahimnejad F, Asare-Addo K, et al. A review on the latest developments of mesoporous silica nanoparticles as a promising platform for diagnosis and treatment of cancer. Int J Pharm 2022; 625: 122099.
26. Salehi S, Saljooghi AS, Shiri A. Synthesis, characterization and in vitro anticancer evaluations of two novel derivatives of deferasirox iron chelator. Eur J Pharmacol 2016; 781: 209-217.
27. Lui GY, Obeidy P, Ford SJ, Tselepis C, Sharp DM, Jansson PJ, et al. The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. Mol Pharmacol 2013; 83(1): 179-190.
28. Mu L, Feng S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. J Control Release 2003; 86(1): 33-48.
29. Onishi H, Machida Y, Machida Y. Antitumor properties of irinotecan-containing nanoparticles prepared using poly (DL-lactic acid) and poly (ethylene glycol)-block-poly (propylene glycol)-block-poly (ethylene glycol). Biol Pharm Bull 2003; 26(1): 116-119.
30. Sharifi F, Jahangiri M, Ebrahimnejad P. Synthesis of novel polymeric nanoparticles (methoxy-polyethylene glycol-chitosan/hyaluronic acid) containing 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin for colon cancer therapy: in vitro, ex vivo and in vivo investigation. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2021; 49(1): 367-380.
31. Williams J, Lansdown R, Sweitzer R, Romanowski M, LaBell R, Ramaswami R, et al. Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. J Control Release 2003; 91(1-2): 167-172.
32. Zhang S, Chen Y, Guo W, Yuan L, Zhang D, Xu Y, et al. Disordered hepcidin–ferroportin signaling promotes breast cancer growth. Cell Signal 2014; 26(11): 2539-2550.
33. Choi JH, Kim JS, Won YW, Uhm J, Park BB, Lee YY. The potential of deferasirox as a novel therapeutic modality in gastric cancer. World J Surg Oncol 2016; 14(1): 1-7.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-08]