تهیه نانوالیاف الکتروریسی شده زیست تخریب پذیر بر پایه گلوتن گندم حاوی دوکسوروبیسین به عنوان یک سیستم دارورسانی

فرانک آغاز [۱]، لیلا بهبود [۱]، لیلا حسین زاده [۲]، مریم افضلی [۳]، پوران مرادی پور [۱]، الهام ارکان [۱*]

[۱] مرکز تحقیقات دارورسانی نانو، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۲] مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۳] مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

امروزه دارورسانی نانو بسیاری از داروهای ضد سرطان از طریق پوست برای کاهش عوارض جانبی پیشنهاد می شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوالیاف الکتریسی شده از گلوتن گندم و پلی وینیل الکل لود کننده دوکسوروبیسین بر روی سلول های سرطانی مختلف از جمله بر روی سلول‌های A-2780، PC-3، PC-3 و MCF-7 است. نانوالیاف با میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه، پراش سنجی اشعه ایکس، وزن سنجی گرمایی و آنالیز حرارتی تفاضلی، مشخصه یابی شدند. نتایج این مطالعه قطرهای ۱۴,۱۱ ± ۱۸۰,۱۴ نانومتر برای نانوالیاف گلوتن گندم حاوی دوکسوروبیسین تایید کرد. و همچنین مطالعه حاضر نشان داد که مدل رهاسازی دوکسوروبیسین در نانوالیاف از مدل هیگوچی پیروی کرده و رهایش به صورت آهسته و طولانی مدت را نشان داد. تصاویر SEM نشان داد که افزودن پلی وینیل الکل قطر الیاف را کاهش داد. علاوه بر این، اثر سمیت سلولی عصاره‌ها بر روی سلول‌های A-2780، PC-3، PC-3 و MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج ما اثرات سمیت بر روی رده سلولی MCF-7 را تایید کرد. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، نانوالیاف گلوتن یک سیستم انتقال مناسب برای دارو های شیمی درمانیاز طریق پوست میباشد.

کلیدواژه ها: نانو الیاف گلوتن، سمیت سلولی، سرطان سینه، پلیمرهای زیست سازگار

مقدمه

امروزه سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان و عامل اصلی مرگ و میر زنان در سراسر جهان است(۷و۶و۱). راه های زیادی برای درمان سرطان سینه وجود دارد، از جمله جراحی، رادیوتراپی و هورمون درمانی که هر کدام دارای معایب و عوارض جانبی هستند.

دوکسوروبیسین یک داروی قدرتمند ضد سرطان است که با DNA کلات شده و بیوسنتز ماکرومولکول ها را در سلول های سرطانی مهار می کند. اکثر تومورها از جمله سرطان های سینه، کارسینوم ازوفاژیال، استئوسارکوما، کارسینوم کاپوزی، سارکوم بافت نرم، لنفوم هوچکین و غیر هوچکین اغلب به دوکسوروبیسین هم به صورت تنها و هم در ترکیب با دیگر داروهای ضد سرطانی پاسخ مناسب می دهند. اما عوارض جانبی زیادی دارد از جمله اینکه، تجویز داخل وریدی دارو باعث سمیت قلبی، سرکوب مغز استخوان و موکوزیت می شود(۳). بنابراین نیاز به بررسی سیستم های برای انتقال دارو شیمی درمانی به بافت تومور بدون عوارض وجود دارد. یکی از مهم ترین آنها سیستم های دارورسانی هدفمند مبتنی بر نانوذرات که کاهش عوارض جانبی و غیر تهاجمی بودن را به همراه دارد. یکی از راههای دارورسانی هدفمند برای کاهش عوارض جانبی و تهاجمی نبودن روش درمان، استفاده از پچ های پوستی است. برای مثال می توان از مواد پلیمری از جمله گلوتن برای تشکیل ماتریکسی–زیست تخریب پذیر به عنوان پچ های پوستی در دارورسانی نانو استفاده کرد (۵).

گلوتن ترکیبی از دو گلیکوپروتئین گلیادین و گلوتلین می‌باشد(۱۱و۲) , که پس از ۳۶ روز تخمیر هوازی و پس از ۵۰ روز در خاک بدون انتشار ترکیبات سمی تجزیه می شود (۱۲). بنابراین می توان گفت که گلوتن یک گزینه ایده آل برای توسعه تشکیل ماتریکسی–زیست تخریب پذیر به عنوان پچ های پوستی در دارورسانی نانو استفاده کرد(۱۰). پچ های پوستی باید خاصیت انعطاف پذیری و کشسانی خوبی برای اتصال به پوست داشته باشند. یک راه ساده برای افزایش انعطاف پذیری یک ماده خاص این است که آن را به صورت لایه های فوق نازک یا نانو الیاف آماده کرد.

نانوالیاف نانو موادی تک‌بعدی هستند که به دلیل خواص منحصر به فرد فیزیکی–شیمیایی در بسیاری از کاربردهای صنعتی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵). قطر مقطع عرضی نانوالیاف از ده‌ها تا صدها نانومتر می‌تواند متغیر باشد و به همین دلیل مساحت سطح ویژه و نسبت سطح به حجم بالایی را ایجاد کرده است .نانوالیاف برای ساخت پچ های پوستی بسیار متخلخل گزینه مناسبی هستند. به‌طورکلی چندین روش برای تولید نانوالیاف وجود دارد بهترین آنها، الکتروریسی می‌باشد. فرایند الکتروریسی از لحاظ سرعت تولید، تنوع، پیوستگی، سادگی، هزینه و تجاری‌سازی بر سایر روش ها ارجح‌تر می‌باشد.

بنابراین این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر نانوالیاف الکتریسی شده از گلوتن گندم و پلی وینیل الکل لود کننده دوکسوروبیسین بر روی سلول های سرطانی مختلف از جمله بر روی سلول‌های A-2780، PC-3، PC-3 و MCF-7 میپردازد.

مواد و روش ها

مواد: تمام مواد مورد استفاده در این مقاله از شرکت سیگما تهیه شده است، بجز موادی که در مقابل آنها ذکر شده است.

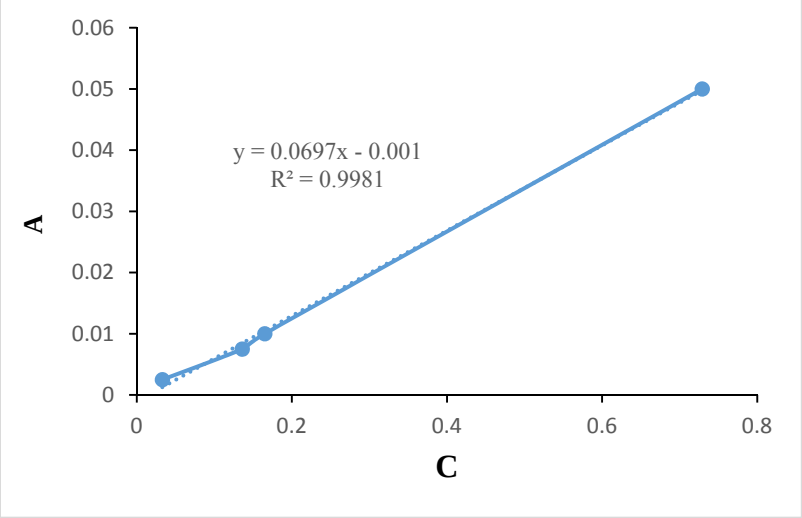
تهیه نانوالیاف گلوتن: به منظور مشخص کردن بهترین محلول قابل الکتروریسی چهار غلظت متفاوت شامل غلظت-های W/W % ۰ و ۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ از پلیمر پلی وینیل الکل ۱۰٪ و گلوتن با مقادیر ۳، ۵ و ۷ گرم از گلوتن در ۴/۱۶ میلی لیتر

حلال تهیه و ارزیابی شدند. به منظور آماده سازی، تمام محلول ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق بر روی استیرر قرار گرفتند تا محلولی یکنواخت حاصل گردد. سپس محلول ها ۱ و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۰۰۰ دور و ۱ دقیقه سونیک شدند تا آماده الکتروریسی شوند. الکتروریسی محلول های فوق انجام شده و بهترین نوع نانوالیاف از محلول بهینه از ۵ گرم گلوتن به همراه ۳/۹۵۲ میلی لیتر اتانل ۵۰٪ و ۰/۲۰۸ میلی لیتر ۲- پروپانول و سپس الکتروریسی تهیه شد. برای تهیه فیبر حاوی دارو، ۰/۰۰۵۳گرم پودر دوکسوروبیسین به ۵ گرم محلول الکتروریسی اضافه شد.

جدول ۱. پارامترهای الکتریکی (الف) انتخاب شده (ب) بهینه شده در دستگاه الکتروریسی

پارامتر	جزئیات
ولتاژهای اعمال شده (کیلو ولت)	۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰
فاصله نازل تا جمع کننده (سانتی متر)	۷ ، ۱۲ ، ۲۰
نرخ پمپاز (میلی لیتر بر ساعت)	۰/۳ ، ۰/۴ ، ۰/۵ ،۰/۷
سرعت جمع کننده (دور بر ثانیه)	۱

مؤلفه	مقدار بهینه
ولتاژ	۱۶ کیلوولت
سرعت تزریق	۰/۵ میلی لیتر/ساعت
فاصله نازل تا جمع کننده	۱۲ سانتی متر



شکل ۱. نمودار کالیبراسیون پودر دوکسوروبیسین

اتصال عرضی نانوالیاف جهت پایداری در محیط های آبی: پس از الکتروریسی و تهیه نانوالیاف به منظور پایدار سازی در محیط آبی، نانوالیاف تولید شده در دسیکاتور محتوی ۱۰ میلی لیتر محلول ۵۰ درصد وزنی گلوترآلدئید به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس نانوالیاف در آون خلا به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا بخارات اضافی گلوترآلدئید حذف شود.

اندازه گیری میزان داروی بارگذاری شده در نانوالیاف: ۵ میلی گرم از نانوالیاف حاوی دارو را به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده و با اسپاتول مخلوط کرده و به مدت یک ساعت روی استیرر قرار داده و ۱ دقیقه در حمام سونیک قرار داده شد و به منظور جداسازی ذرات درشت از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس محلول‌های حاصل با اسپکتروفوتومتر **UV-*Vis*** در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و با کمک منحنی استاندارد تعیین مقدار شد.

اندازه‌گیری رهایش دارو از نانوالیاف: رهایش داروی DOX از نانوالیاف تهیه شده با استفاده از محیط بافر فسفات توسط روش اسپکتروسکوپی **uv-vis** بررسی شد. رهایش در دمای اتاق و با حفظ شرایط سینک انجام شد.

اندازه گیری میزان تورم پذیری آب در نانوالیاف: این تست میزان جذب آب، تورم پذیری و تمایل به آب نانوالیاف را نشان می دهد. به این صورت که وزن های ۱۰ میلی گرمی از الیاف را برداشته و به آرامی به آن آب می افزاییم و ۱۰ دقیقه زمان می دهیم، مادامی که فیبر نتواند آب جذب کند و آب در شرف سرازیر شدن از نمونه باشد. وزن آب جذب شده توسط نانوفیبرها اندازه گیری می شود. برای هر نمونه ۵ بار تست تکرار شده و میانگین اعداد محاسبه و درصد تورم برای هر نمونه محاسبه می شود.

$$\text{Inflation Rate} = [(Wt - W0) / W0] \times 100$$

W0= وزن اولیه فیبر

Wt= وزن نهایی فیبر پس از جذب آب

روش گرماسنجی افتراقی (DSC): روش گرماسنجی افتراقی روشی است که می تواند برای اندازه‌گیری خواص نانومواد استفاده می شود. با این تکنیک می توان ویژگی های ذوب و کریستاله شدن پلیمرها را اندازه گیری کرد. با افزایش دما نمونه به دمای ذوب خود می رسد. فرایند ذوب با ظهور یک پیک گرماگیر در نمودار DSC قابل مشاهده است. تغییرات دمای کریستالیزاسیون از جامد آمورف به جامد کریستالی فرایندی گرمازا است و به صورت یک پیک گرما زا در نمودار DSC قابل مشاهده است.

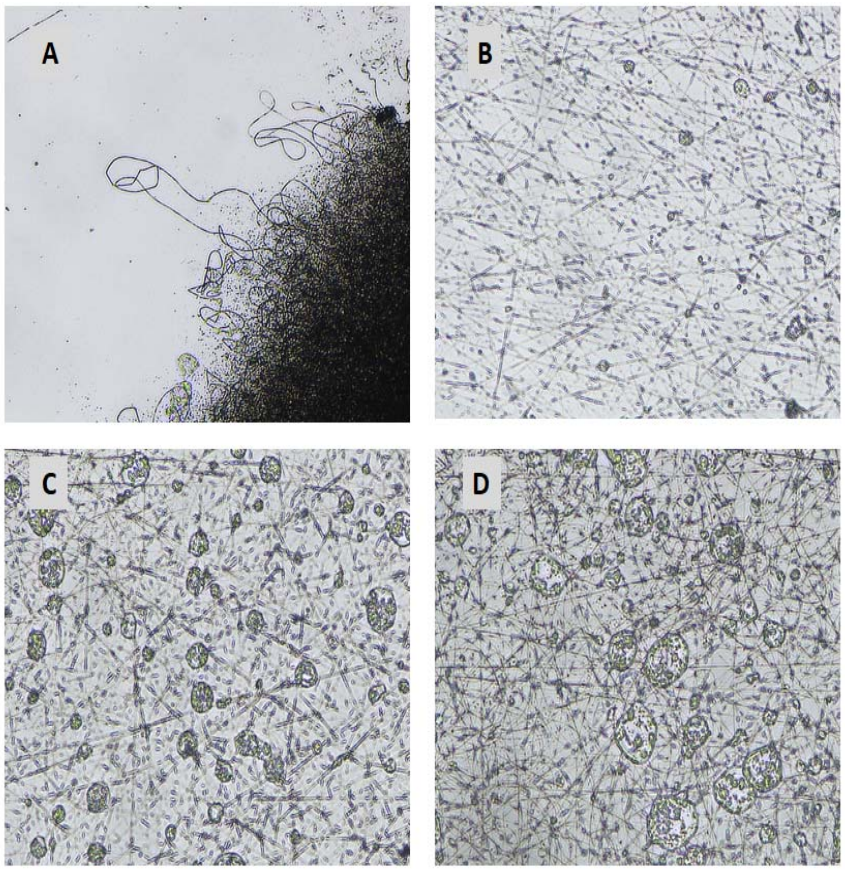
پراش اشعه ایکس (XRD): دستگاه XRD به طور گسترده در شناسایی نمونه های مجهول جامد کریستالی مورد استفاده قرار می گیرد. نمونه آنالیز XRD معمولاً به صورت پودری و در حدود ۳-۵ گرم می باشد. دستگاه XRD دارای یک دایره فلزی می باشد که منبع پرتو X و دتکتور روی جداره داخلی آن و نمونه در مرکز آن قرار می گیرد. عملکرد دستگاه XRD بدین صورت است که پرتو X در زوایای مختلف(θ) به بلور کریستال تابیده می شود. در اثر این تابش و برخورد پرتو به اتم ها، اشعه بازتابیده می شود و یا اصطلاحاً پراش می یابد. دستگاه XRD مورد استفاده در این بررسی ، ساخت شرکت آلمانی Seifert مدل 3003 pts بود.

تهیه محیط کشت کامل و بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT: محیط کامل متشکل از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، نمک‌ها، گلوکز، مکمل‌های آلی، هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. برای تهیه محیط کشت کامل برای رشد و نگهداری سلول‌ها از محیطی با اجزاء زیر استفاده شد: ۸۹ میلی لیتر **DMEM/F12 medium** با ۱۰ میلی لیتر **FBS Serum** و۱ میلی لیتر پنی سیلین استرپتومایسین (100 x) به دقت توزین و با هم مخلوط شد. در این تحقیق سمیت

نانوالیاف تهیه شده حاوی دارو با استفاده از روش MTT بر روی چهار رده سلولی سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.. اساس این سنجش توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول بنا شده است. این روش برای کشت های سوسپانسیونی بسیار مفیدتر است.

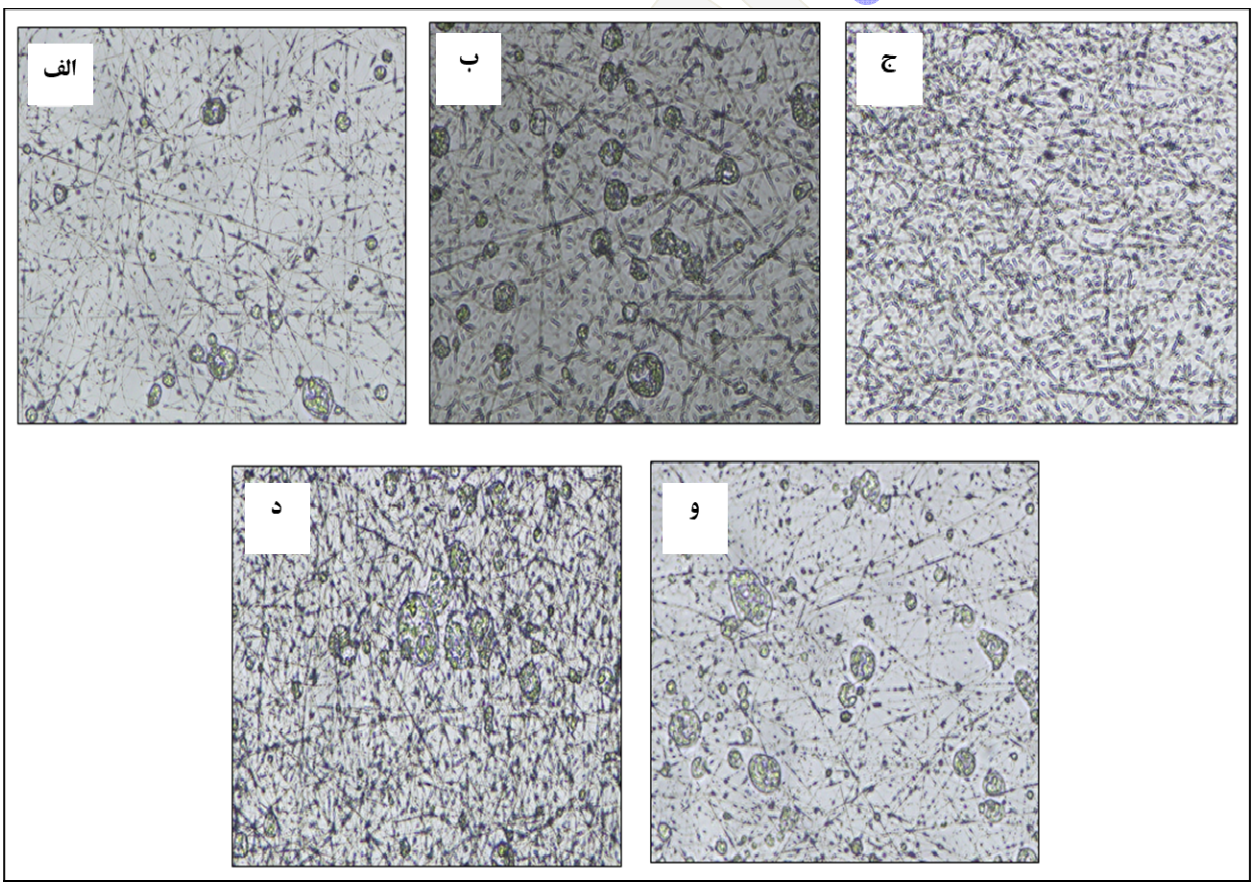
یافته ها

مروری بر مورفولوژی نانوالیاف با میکروسکوپ نوری: شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X۴۰۰ نانوالیاف با ترکیب متفاوت از پلی وینیل الکل و گلوتن را نشان می‌دهد. در تصویر شکل (الف) نانوالیاف بدست آمده از محلول گلوتن به تنهایی می باشد. این ساختار توده ای بسیار شکننده است و ناشی از الیاف بسیار ظریف از جنس گلوتن می باشد. با افزودن محلول PVA به محلول گلوتن به نسبت ۱ به ۸ (۱۲/۵ درصد حجمی–حجمی) الیاف به صورت تصویر ب حاصل شدند. بر اساس شکل(ب)، الیافی مطلوب اما ساختار توده ای آن همچنان شکننده بود و برای استفاده به عنوان پچ پوستی مطلوب نبود. تصویر شکل (ج) الیاف با نسبت ۱ به ۴ (۲۵ درصد) به گلوتن را نشان می دهد که از ساختار مطلوب و منعطفبرخوردار بودند. با افزایش میزان PVA (نسبت ۱ به ۲) در شکل (ج) گره ها و بیدهای ناشی از حضور گلوتن کاهش می یابد اما به دلیل افزایش خاصیت آبدوستی و حل شدن سریعتر در محیط آبی مطلوب نبود. لذا با توجه به خصوصیات کیفی، الیاف دارای ۲۵ درصد PVA به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی از نانو الیاف با ترکیب درصد مختلف کوپلیمر الف) ۰٪ PVA، ب) ۱۲,۵٪ PVA، ج) ۲۵٪ PVA، د) ۵۰٪ PVA

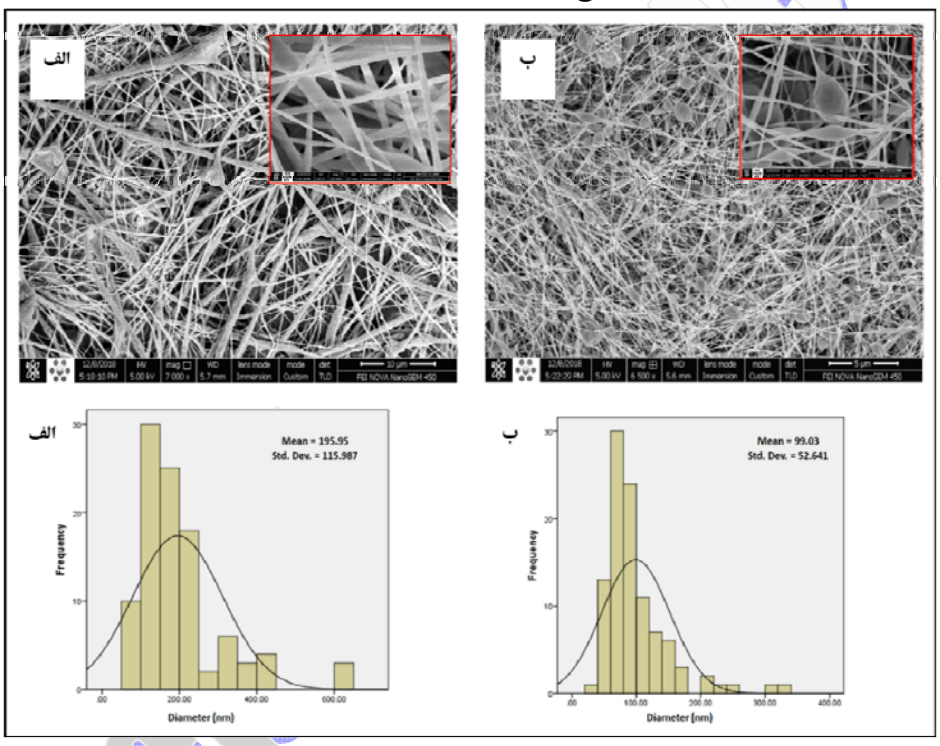
شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر از نانو الیاف شامل گلوتن و PVA با غلظت ۲۵ درصد حجمی–حجمی را در ولتاژ های اعمالی مختلف نشان می دهد. با افزایش ولتاژ از ۱۲ کیلو ولت به ۱۴ و ۱۶ کیلو ولت شاهد کاهش تعداد دانه ها و گره های ایجاد شده هستیم. در ولتاژ ۲۰ کیلو ولت الیاف بسیار ظریف شده به طوری بر خواص توده ای آن نیز تاثیر گذاشت و آن را شکننده نمود. بنابراین ولتاژ ۱۶ کیلو ولت که کمترین دانه در الیاف مشاهده می شد و الیاف به نظر یکنواخت تر بودند به عنوان ولتاژ بهینه انتخاب گردید. لذا بررسی های بعدی بر روی این الیاف و در شرایط الکتروریسی مذکور انجام شد.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ نوری از نانوالیاف گلوتن – پلی وینیل الکل بهینه در ولتاژهای مختلف: الف) ۱۲ کیلو ولت، ب) ۱۴ کیلو ولت، ج) ۱۶ کیلوولت، د) ۱۸ کیلو ولت، و) ۲۰ کیلو ولت

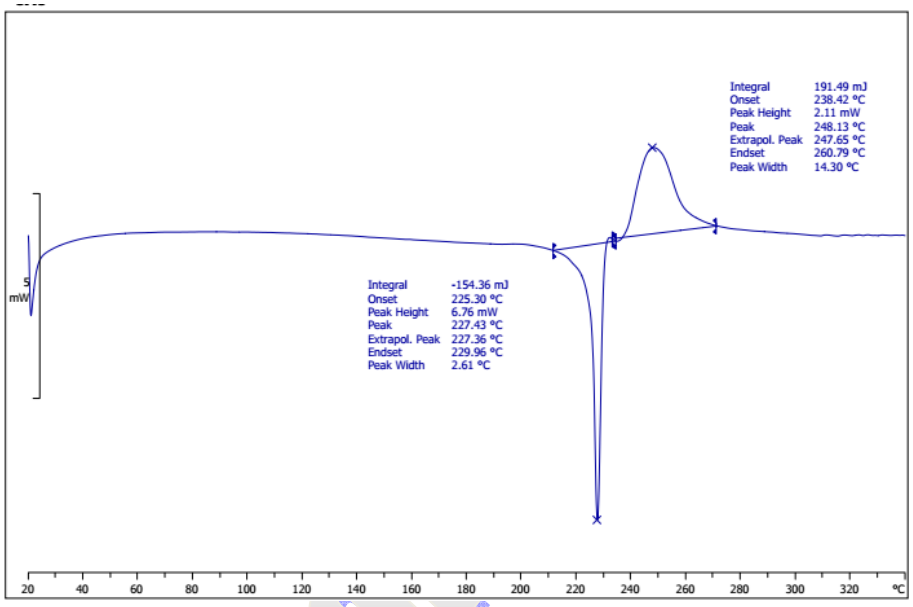
مروری بر مورفولوژی نانوالیاف با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف گلوتن/PVA را بدون حضور دارو (الف) و در حضور دارو (ب) نشان می دهد. میانگین قطر الیاف بدون دارو ۱۹۶ نانومتر است. الیاف ظاهری یکنواخت دارند. انحراف استاندارد داده ها از مقدار میانگین برابر ۱۱۶ است که نشان از پراکندگی بالای قطر الیاف و عدم یکنواختی قطر الیاف است به طوری که الیافی با قطر در محدوده ۸۰ تا ۶۰۰ نانومتر مشاهده می شوند. توجیه ایجاد چنین ساختاری با توجه به تفاوت ساختارهای شیمیایی پلیمر پلی وینیل الکل و پروتئین گلوتن امکان پذیراست. شکل ب مربوط به نانوالیاف حاوی دارو است،

میانگین قطر الیاف کاهش نسبتاً کمی را نشان می دهد و به مقدار ۹۹ رسیده است. علیرغم افزایش تعداد بید ها انحراف از استاندارد داده ها نیز کاهش یافته است و برابر ۵۲/۶ شده است به این معنی که الیافی با قطر مشابه و بیدهایی با اندازه های نبستا یکسان حاصل شده اند. پدیده تشکیل بید پس از افزودن دوکسوروبیسین به وضوح قابل مشاهده است که بدلیل ساختار شیمیایی دوکسوروبیسین می باشد.



شکل ۳. میکروگراف های SEM: الف) نانوالیاف بدون دارو، ب) نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین

روش گرماسنجی افتراقی (DSC): بر اساس تکنیک گرماسنجی افتراقی می توان ویژگی های ذوب و کریستاله شدن پلیمرها را اندازه گیری کرد. همان طور که در نمودار شکل ۴ مشاهده میشود، نانو الیاف حاوی دارو پیک گرمازا مربوط به ذوب و تخریب الیاف در ۲۲۷ درجه سانتیگراد مشاهده می شود که نزدیک دمای ذوب PVA است و تخریب و ذوب دوکسوروبیسین و گلوتن پیش از این دما اتفاق افتاده است. زیرا دمای ذوب این مواد در حدود ۸۰ درجه سانتیگراد است. اما به دلیل بالا بودن نرخ حرارت دهی در این نمودار قابل مشاهده نیست. (نرخ حرارت دهی ۱۰ درجه بر دقیقه است) بنابراین تخریب و ذوب همزمان ایجاد می شود. در پلیمرهایی طبیعی مانند گلوتن این رفتار معمول است [۱۲].

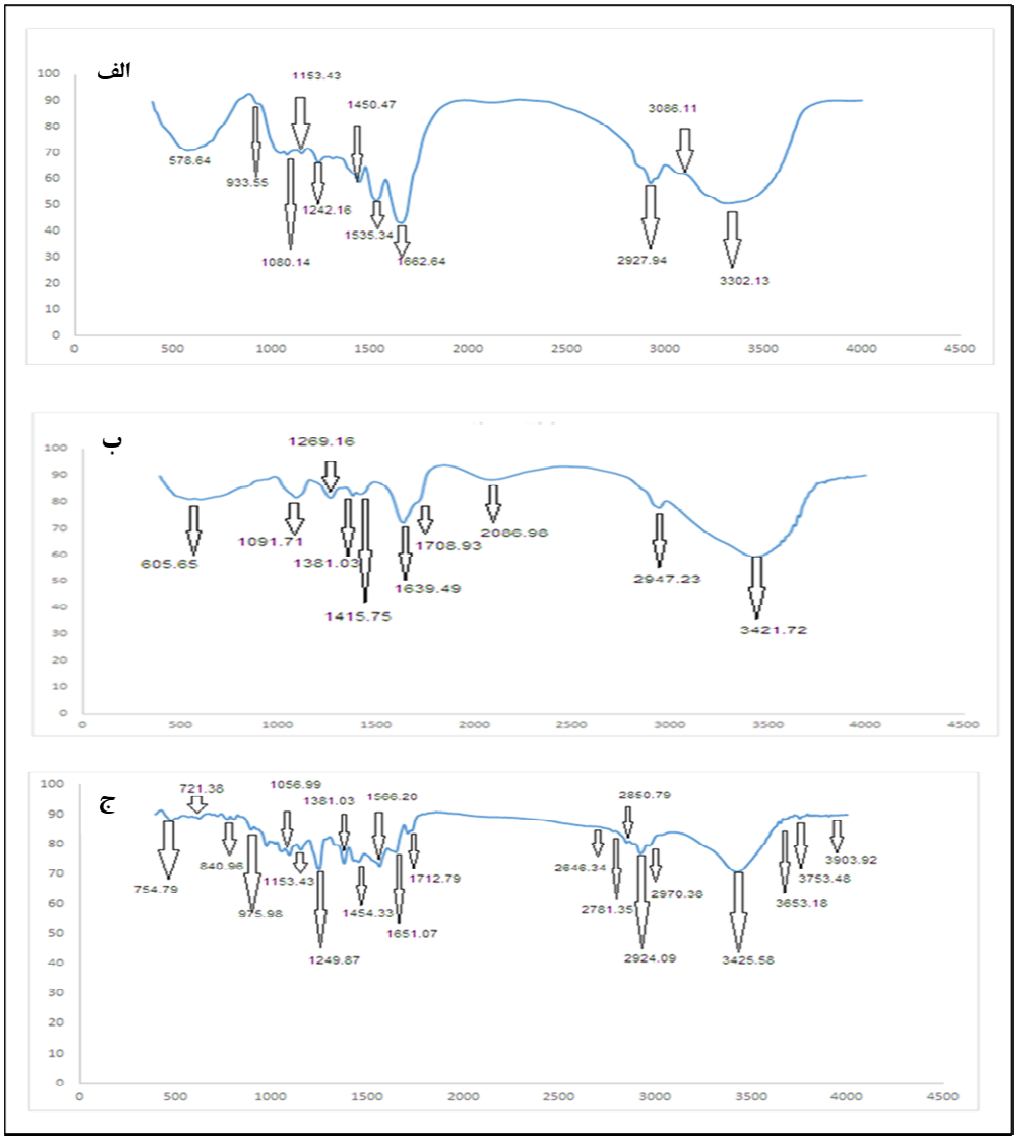


شکل ۴. نمودار کالریمتری تفاضلی نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین

طیف سنجی تبدیل فوریه (FT-IR): طیف های FTIR گلوتن (A)، پلیمر PVA (B) و دوکسوروبیسین (C) در شکل ۵ نمایش داده شده است. در طیف مربوط به زنجیره های پلی پپتیدی گلوتن پیک جذبی قوی در ۱۶۵۱ مربوط به آمید نوع I (CN=O) و پیک ۱۵۳۳ مربوط به آمید نوع دوم (NH-) مشاهده می شود . همچنین در محدوده ۳۱۰۰–۳۵۰۰ پیک پهن دیده شده مربوط به پیوندهای هیدروژنی NH است که مشخصه اصلی پروتئین ها محسوب می شود. پیک های ضعیف در محدوده ۱۰۰–۱۳۰۰ می تواند مربوط به عامل های استری باشد. طیف شکل ب مربوط به PVA خالص پیک های جذبی برای گروه هیدروکسیل (OH–) در cm^{-1} ۳۴۲۱، پیک مربوط به گروه استری (-C-O-C-) در cm^{-1} ۱۰۹۱ و پیک مربوط به گروه کربونیل (-C=O) در عدد موج ۱۶۳۹ دیده می شوند .

شکل ج طیف مربوط به دوکسوروبیسین را نشان می دهد. پیک های مشاهده شده در محدوده ۲۴۰۰–۳۴۰۰ و به طور ویژه در ۳۴۲۵ و ۲۹۴۱ مربوط به گروه های هیدرکسیل می باشد که اکثر گروههای عاملی دوکسوروبیسین را تشکیل می دهند. پیک مشاهده شده در ۱۶۵۱ مربوط به پیوندهای کربونیلی و پیک های کوچک در ۱۴۵۴، ۱۲۴۹ مربوط به گروه استری است.

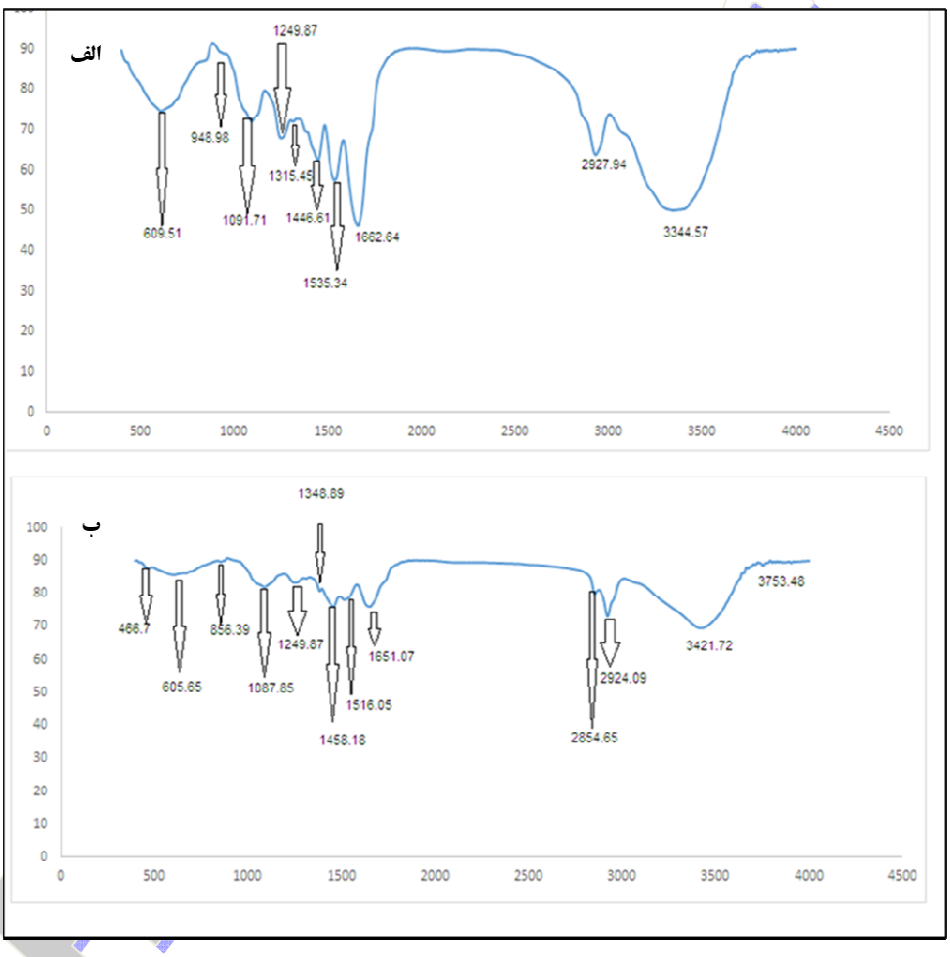
Preproof



شکل ۵. طیف FT-IR الف) گلوتن خالص ب) محلول PVA ج) پودر دوکسوروبیسین

شکل ۶ طیف FTIR نانوالیاف با دارو و بدون دارو را در کنار همدیگر نشان می دهد. همانطور که در طیف مربوط به الیاف بدون دارو می توان دید (شکلA) پیک های شاخص مربوط به پلی وینیل الکل و گلوتن به ترتیب در۳۴۲۱ (هیدروکسیل)، ۱۵۳۴ (آمید نوع دوم)، ۱۶۶۲ (آمید نوع اول) مشاهده می شوند. مشاهده این پیک های شاخص نشان از عدم ایجاد پیوند شیمیایی و پخش گلوتن در الیاف PVA باشد. در طیف نانوالیاف هیبریدی از گلوتن و پلی وینیل الکل به همراه دارو که در شکل ۶-ب نشان داده شده است، علاوه بر پیک های شاخص مربوط به گلوتن و PVA پیک های مربوط به داروی دوکسوروبیسین هم قابل مشاهده است. تغییرات اندکی در مکان این پیک ها مشاهده می شود به طوری که پیک ۱۶۶۲ در فیبر بدون دارو به پیک ۱۶۵۱ تغییر یافته که به دلیل کثرت پیوندهای کربونیلی در دوکسوروبیسین است. تغییری که بیشتر محسوس است مربوط به تغییر پیک در عدد موج ۱۵۳۵ در فیبر بدون دارو به ۱۵۱۶ در فیبر حاوی دارو است که با توجه به طیف دوکسوروبیسین می تواند نشان از

تغییر کشش در آمید نوع دو گلوتن باشد. به عبارت دیگر گلوتن با ساختار پلی پپتیدی خود ماهیتی کاتیونی داشته که برای مولکولی الکترون دهنده مانند دوکسوربیسین از نظر تشکیل پیوندهای هیدروژنی مطلوب است.

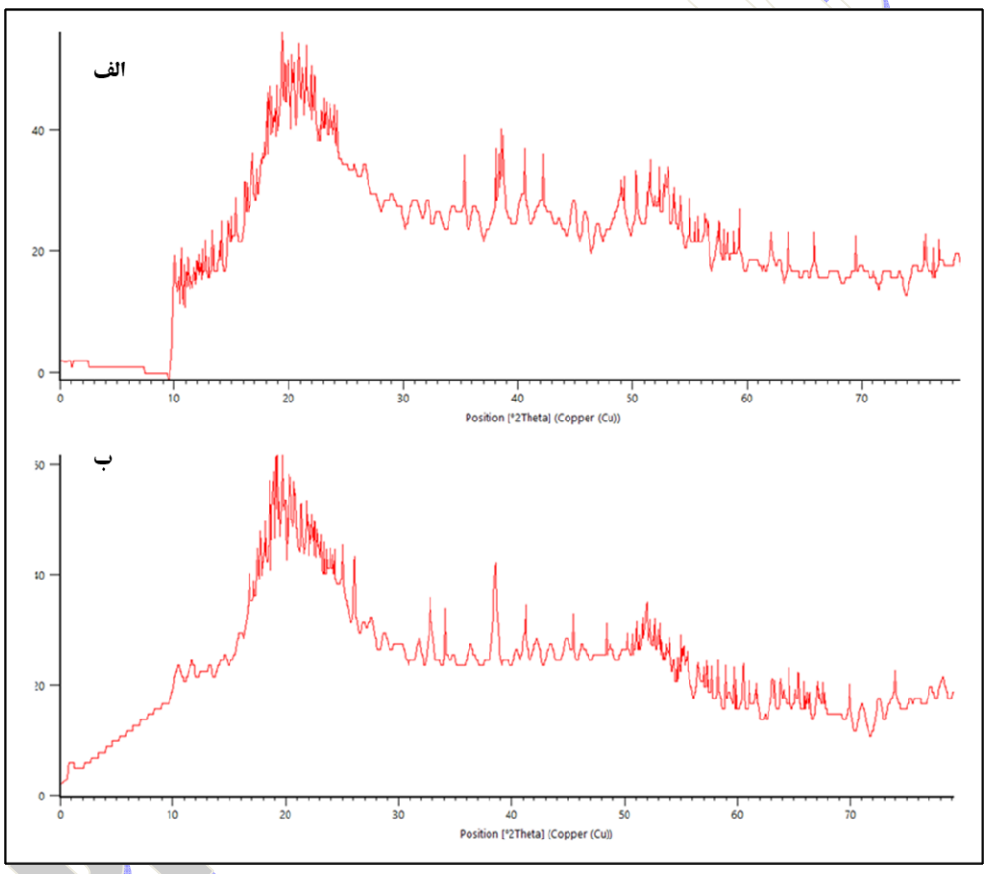


شکل ۶. طیف FT-IR: الف) نانوالیاف دارویی هیبریدی بدون دارو ب) نانوالیاف حاوی دارو

درصد تورم پذیری نانو الیاف گلوتن گندم: درصد تورم برای نانوفیبر حاوی دارو و نانوفیبر بدون دارو طبق روش ذکر شده در بخش پیشین اندازه گیری شد. تورم پذیری فیبر بدون دارو ٪ ۲۰۰۰ و تورم پذیری فیبر با دارو ٪۳۶۰۰ مبی باشد.اعداد درصدهای تورم پذیری نشان می دهد که نانوفیبر بدون دارو جذب آب و تورم پذیری بالایی دارد که با توجه به ماهیت پودر گلوتن و PVA که بسیار آبدوست هستند قابل توجیه است. همچنین اعداد بالا بیانگر این است که دارو باعث افزایش تورم پذیری و افزایش جذب آب شده است که بیانگر ساختار آبدوست و هیدروفیل داروی دوکسوروبیسین می باشد که با توجه به ساختار و ماهیت داروی دوکسوروبیسین مورد قبول است.

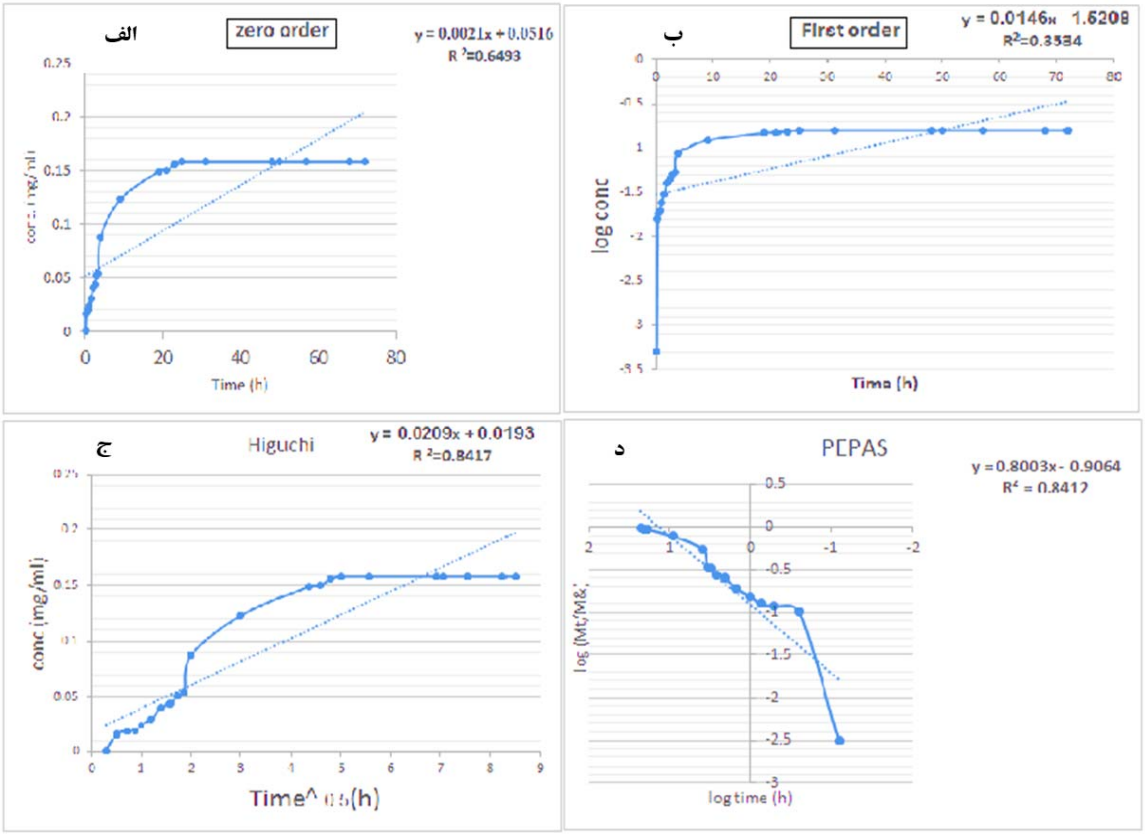
مروری بر نتایج تست پراش اشعه ایکس (XRD) نانو الیاف گلوتن گندم: شکل ۷ تصویر مربوط به طیف های XRD را در نانوالیاف هیبریدی گلوتن و PVA بدون دارو (A) و در حضور دارو (B) نشان می دهد. مشاهده پیک پهن در محدوده ۲۲° =۲ θ مربوط به ساختار آمورف پلیمرها مخصوصا گلوتن است. پس از افزودن دارو به بافت الیاف، تغییرات جزیی دیده می شود که می توان به کاهش نوسانات در محدوده ۲۰°-۱۰ =۲ θ اشاره کرد که می تواند مربوط به ایجاد اتصالات هیدروژنی اندک بین دارو و بخش آمیدی پلی پپتید گلوتن باشد. در طیف B در محدوده ۲۵°-۲۱ =۲ θ نوسانات افزیش می یابد و پیک شلوغ تر می شود که نشان از حضور دارو است و به

عبارتی بخشی از دارو نیز به صورت مولکولی در بافت الیاف پخش شده است که می تواند به داروی قرار گرفته در بخش پلی وینیل الکل فیبر مربوط باشد [۸۱].



شکل ۸. طیف XRD : الف) نانوالیاف بدون دارو، ب) نانوالیاف حاوی دارو

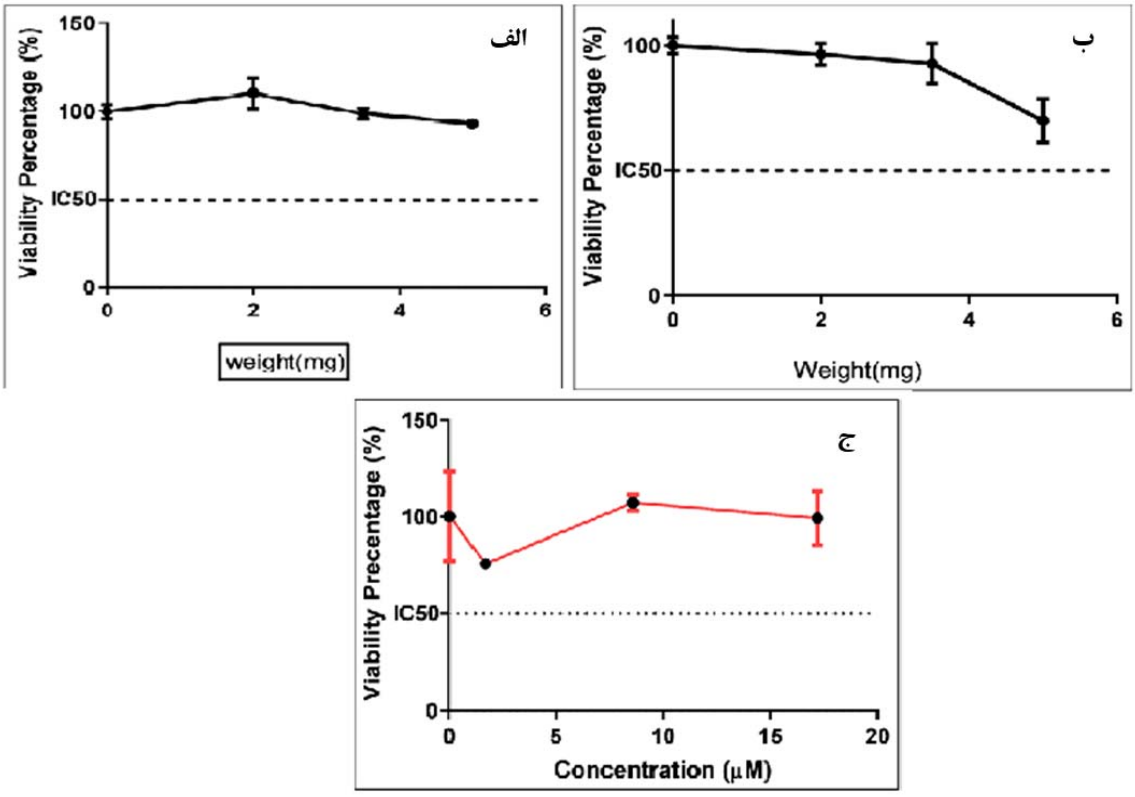
رهایش داروی دوکسوروبیسین از نانوالیاف گلوتن: در میان مدل‌های مختلف مورد بررسی شامل مدل درجه صفر، مدل درجه یک، مدل هیگوچی و مدل کرامسر- پپاس بالاترین میزان رگرسیون مربوط به مدل هیگوچی ($R^2 = 0.8417$) است داده ها نشان می‌دهند که در مدت ۹ ساعت حدود ۷۰ درصد از داروی بارگذاری از درون بافت الیاف آزاد شده است. رهایش دارو تند است و در زمان کوتاهی انجام می‌شود. مدل هیگوچی برای رهایش داروهای محلول درآب مفید است. این مدل برای توصیف رهایش دارو با حلالیت بالا در آب از پچ های پوستی مناسب است و مدلی بسیار مناسب برای بیان سینتیک رهایش دارو از این سیستم است. همچنین رهایش دارو از مدل رهایش کرامسر-پپاس ($R^2 = 0.8412$) تبعیت میکند.



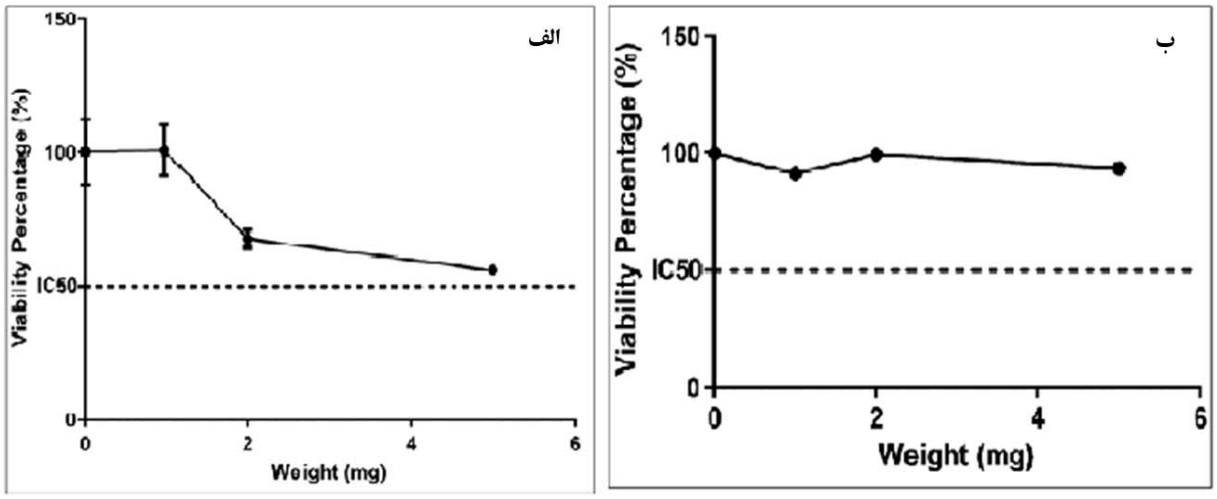
شکل ۹ – نمودارهای آزادسازی دارو بر اساس: الف)Zero Order ، ب) Flret Order، ج) Higuchi، د) Pepas

نتایج سمیت سلولی نانو الیاف گلوتن گندم: در این مطالعه سمیت سلولی نانو الیاف گلوتن گندم حاوی داروی دوکسوروبیسین بر روی رده های سلولی A2780 و MCF7و PC3 وPC12 مورد بررسی قرار گرفت شکل های(۱۰–۱۳) . در این مطالعه سلول های PC12 به عنوان سلول های نرمال بدن مورد بررسی قرار گرفتند. (شکل ۱۰) مشاهده شد که پودر داروی دوکسوروبیسین و نانوفیبر حاوی داروی دوکسوروبیسین اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر سلول های PC12 نداشته است. در سلول A2780 نیز (شکل ۱۱) ۲۴ ساعت تماس با غلظت mg/ml ۵ از نانوالیاف گلوتن گندم توانسته بود که میزان زنده مانی سلول ها را به میزان ۴۰ ٪ کاهش دهد و این در حالی است که ۴۸ ساعت مواجه نانوالیاف گلوتن گندم حاوی دارو در این غلظت تغییر معنی داری در تعداد سلول ها ایجاد نکرده است. همچنین نتایج حاصله نشان داد (شکل ۱۲) که مواجه ۲۴ و ۴۸ ساعت نانوالیاف گلوتن گندم حاوی دارو، سمیت سلولی قابل توجهی بر روی رده سلولی PC3 ندارد. تماس سلول های سرطانی سینه (MCF7) (شکل ۱۳) به مدت ۲۴ ساعت توانست در غلظت ۹,۱ میکرومولار رشد ۵۰ ٪ از سلول های سرطانی را کاهش دهد و در مواجه ۴۸ ساعته با نانوالیاف گلوتن گندم حاوی دارو تغییر عمده ای در شدت سمیت دوکسوروبیسین نسبت به ۲۴ ساعت مشاهده نگردید. با توجه به اینکه نانوالیاف گلوتن گندم حاوی داروی دوکسوروبیسین در سلول های MCF7 نسبت به سایر سلول ها توانسته بود رشد سلول های سرطانی را به مقدار قابل توجهی مهار کند، در مرحله بعد جهت مقایسه سمیت ناشی از نانوفیبرهای حاوی داروی دوکسوروبیسین و داروی آزاد، سمیت سلولی غلظت های متفاوتی از داروی آزاد دوکسوروبیسین بر سلول های MCF7 مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد که داروی آزاد در غلظت ۱۳ میکرومولار توانسته است رشد سلول های سرطانی را به میزان ۵۰٪ مهار کند که بیانگر این موضوع است که نانوفیبرهای حاوی دارو سمیت شدیدتری را در مقایسه با داروی آزاد در سلول های MCF7 ایجاد میکند. نگاهی به مطالعات قبلی نشان می دهد که ریلیز آهسته نانوفیبرها در مدت طولانی

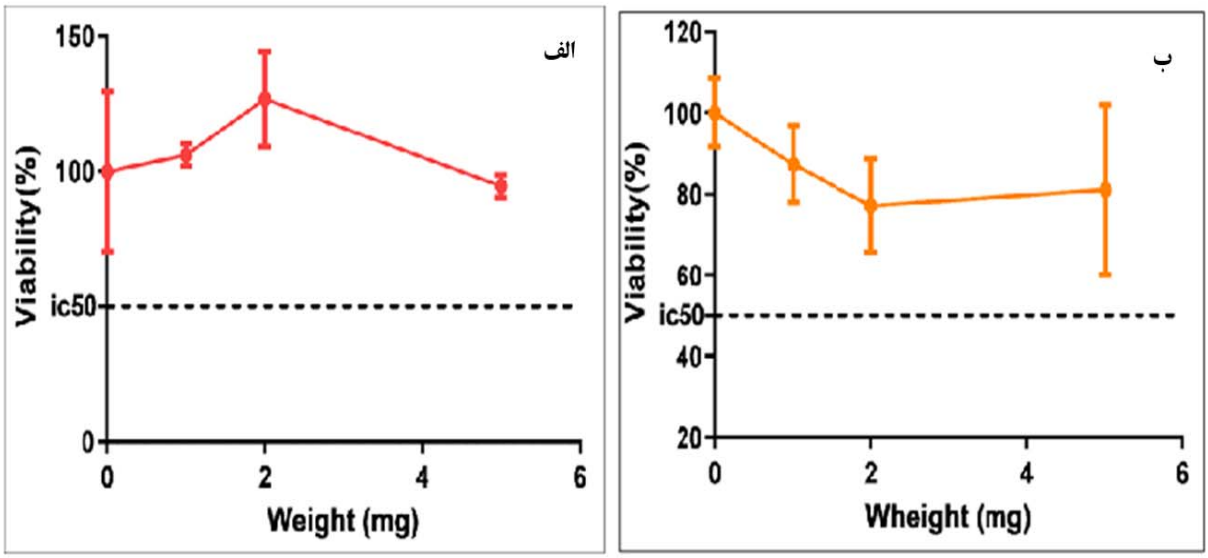
باعث القاء سمیت سلولی شدیدتر میگردد، به علت اینکه سلولها به مدت بیشتری در مواجه با داروی دوکسوروبیسین قرار میگیرند. داروی آزاد به سرعت وارد سلول می شود در حالیکه نانوفیبرهای حاوی دارو رهایش آهسته تر و بلند تری را دارند و نانوفیبر حاوی دارو با وجود اینکه باعث افزایش سمیت در رده MCF7 شد ولی بر روی سلول های عصبی نرمال PC12 تغییر چندانی نسبت به خود داروی دوکسوروبیسین نداشت



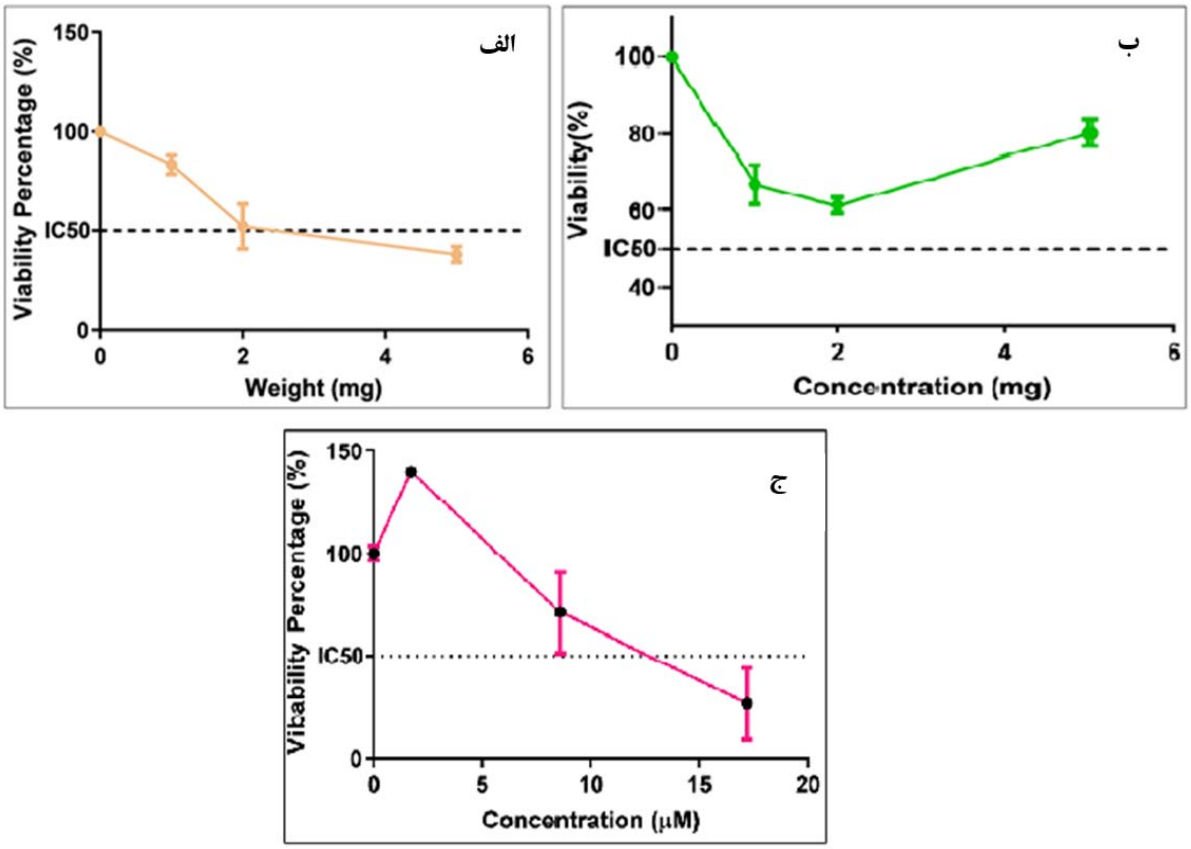
شکل ۱۰: آنالیز سمیت سلولی نانو الیاف حاوی دوکسوروبیسین با استفاده از MTT در رده سلولی PC-12: الف) پس از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۴۸ ساعت



شکل ۱۱. آنالیز سمیت سلولی نانو الیاف حاوی دوکسوروبیسین با استفاده از MTT در رده سلولی A-2780 : الف) پس از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۴۸ ساعت



شکل ۱۲: آنالیز سمیت سلولی نانو الیاف حاوی دوکسوروبیسین با استفاده از MTT در رده سلولی PC-3 : الف) پس از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۴۸ ساعت



شکل ۱۳. آنالیز سمیت سلولی نانو الیاف حاوی دوکسوروبیسین با استفاده از MTT در رده سلولی MCF-7 : الف) پس از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۴۸ ساعت

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه ثابت کرد، که نانوالیاف سنتز شده از گلوتن گندم دارای مشخصه یابی فیزیکی-شیمیایی، بسیار مناسب به عنوان سیستم انتقال داروی شیمی درمانی است. هم چنین مطالعه ما ثابت کرد که، با توجه به مدل رهایش دارو از نانوالیاف گلوتن گندم لود کننده دوکسوروبیسین، که از مدل هیگوچی پیروی می کند و نظر به اینکه هیگوچی مدل مناسبی برای رهایش پچ های پوستی می باشد (۱۳).این نانو الیاف میتواند به عنوان پچ پوستی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه نتایج حاصل از سمیت سلولی بر روی رده سلولی MCF7 که مربوط به سرطان سینه است، خود داروی دوکسوروبیسین به تنهایی و نانوالیاف گلوتن الکتروریسی شده حاوی داروی دوکسوروبیسین توانستند رشد سلول های سرطانی را به مقدار قابل توجهی مهار کنند، پس می توان از نانوالیاف گلوتن حاوی داروی دوکسوروبیسین به عنوان پچ پوستی در درمان سرطان سینه بهره گرفت. و در این مطالعه، سمیت سلولی نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین بر روی رده های سلولی A2780، MCF7، PC3 و PC12 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد (شکل ۱۰-۱۲) قرار گرفتن در معرض نانوالیاف گلوتن حاوی دارو، طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، سمیت سلولی قابل توجهی بر روی رده سلولی PC3 ندارد. در سلول A2780 (شکل ۱۱)، تماس ۲۴ ساعته با غلظت ۵ mg/ml نانوالیاف، زنده ماندن سلول را تا ۴۰

درصد کاهش داد، اما ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض نانوالیاف گلوتن حاوی دارو در این غلظت، تغییر قابل توجهی در تعداد سلول ها ایجاد نکرد. که نتایج این مطالعه در راستای مطالعه و Azad وهمکاران در سال ۲۰۰۶بود (۴).

تماس سلول های سرطانی پستان (MCF7) (شکل ۱۳) به مدت ۲۴ ساعت با نانوالیاف گلوتن حاوی دکسوروبیسن باعث کاهش رشد سلول های سرطانی در غلظت ۹,۱ میکرومولار شد. در درمان ۴۸ ساعته با نانوالیاف گلوتن حاوی دارو، تغییر معناداری در سمیت دوکسوروبیسین نسبت به ۲۴ ساعت مشاهده نشد. با توجه به اینکه نانوالیاف گلوتن حاوی دوکسوروبیسین در سلول های MCF7 توانسته اند رشد سلول های سرطانی را در مقایسه با سایر سلول ها به طور قابل توجهی مهار کنند، در مرحله بعد، برای مقایسه سمیت نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین و داروی آزاد، سمیت سلولی غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین آزاد بر روی سلول‌های MCF7 مورد بررسی قرار گرفت. که نتایج این مطالعه در راستای مطالعه و Sunوهمکاران در سال ۲۰۱۱بود(۱۴).

نتایج نشان داد که داروی آزاد در غلظت ۱۳ میکرومولار می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را تا ۵۰ درصد مهار کند. این موضوع نشان می‌دهد نانوالیاف حاوی دارو سمیت شدیدتری نسبت به داروی آزاد در سلول‌های MCF7 ایجاد می‌کنند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که آزادسازی کند نانوالیاف در دراز مدت باعث ایجاد سمیت سلولی شدیدتر می شود، زیرا سلول ها بیشتر در معرض دوکسوروبیسین قرار می گیرند که این نتایج در راستای مطالعه دهقانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Danmaigoro و همکاران درسال ۲۰۱۷بود(۹و۸) . داروی آزاد به سرعت وارد سلول می شود در حالی که نانوالیاف حاوی دارو، دارو را کندتر و در مدت طولانی تری آزاد می کند. در این مطالعه، سلول‌های PC12 به عنوان سلول‌های طبیعی بدن مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱۳) و مشاهده شد که دوکسوروبیسین و نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین اثر سیتوتوکسیک قابل‌توجهی بر روی سلول‌های PC12 و نانوالیاف حاوی دارو نداشتند، اگرچه باعث افزایش سمیت در کلاس MCF7 شدند، اما در سلول‌های PC12 طبیعی در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین آزاد تغییر چندانی ایجاد نکرد.

محدودیت مطالعه حاضر عدم وجود امکانات انجام تست های حیوانی می باشد . برای تایید اثر نانو الیاف های مبتنی بر گلوتن گندم، باید مطالعات بیشتری انجام گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج سمیت سلولی روی رده سلولی MCF7 که مربوط به سرطان سینه است، دوکسوروبیسین به تنهایی و الکتروپوراسیون نانوالیاف گلوتن حاوی دوکسوروبیسین می تواند به طور قابل توجهی از رشد سلول های سرطانی جلوگیری کند. نتایج آزمایش های مشخصه یابی نشان داد که نانوالیاف گلوتن سنتز شده دارای خواص مناسب برای استفاده به عنوان پچ های پوستی هستند. در بررسی مدل رهاسازی دارو، اثبات شد که نانوالیاف حاوی دارو از مدل هیگوچی پیروی می کنند. با توجه به اینکه هیگوچی مدل خوبی برای رهاسازی لکه های پوستی است، بنابراین می توان از نانوالیاف سنتز شده حاوی دوکسوروبیسین به عنوان پچ پوستی برای درمان سرطان سینه استفاده کرد.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه برای حمایت مالی از این طرح تشکر و قدرانی میکنند.

منابع

1. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharmaceutical Research. 2008; 25(9): 2097-116.

2. Azizi, K., A. Chehregani Rad and J. Soltani (2022). "Novel Cytological Findings on Gametophyte Development and Embryogenesis in Wheat (Triticum aestivum L.)." Journal of Genetic Resources **8**(2): 218-235

3. Abbasalipourkabir R Salehzadeh, A Abdullah, R Cytotoxicity. Effect of solid lipid nanoparticles on human breast cancer cell lines Biotechnology. Biotechnology. 2011; 6(10):533-528).

4. Azad A-M., Fabrication of transparent alumina (Al_2O_3) nanofibers by electrospinning.Materials Science and Engineering , 2006;435(5):468–473.

5. Bhatnagar S, Bankar NG, Kulkarni MV, Venuganti VVK. Dissolvable microneedle patch containing doxorubicin and docetaxel is effective in 4T1 xenografted breast cancer mouse model. International Journal of Pharmaceutics. 2019;556 (10):263-275.

6.Danhier F, Feron O, and Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. Journal of Control Release. 2010; 148(2): 135-146.

7. DeSantis CE, Miller KD, Goding Sauer A, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for African Americans, 2019. CA Cancer J Clin. 2019; 63(3): 211-233.

8. Dhandayuthapani B., R. Mallampati, D. Sriramulu, R.Fredrick Dsouza, and S.Valiyaveettil. PVA/Gluten Hybrid Nanofibers for Removal of Nanoparticles from Water. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2014; 2(4):1014–1021.

9. Danmaigoro A, GT Selvarajah. Development of Cockleshell (Anadara granosa) Derived $CaCO_3$ Nanoparticle for Doxorubicin Delivery.2017; 14(10):5074–5086.

10.Ghanbarzadeh,B., Orumiehie, A.R., Musavi, M., Emam D-Jomeh, Z., Razmi Rad, E. and Milani, J., Effect of Plasticizing Sugars on Rheological and Thermal Properties of Zein Resins and Mechanical Properties of Zein Films. *Food Research International*, 2006;**39(8):**882-890.

11.Guilbert, S., Technology and Application of Edible Protective Films. In Food Packaging and Preservation. Elsevier Applied Science Publishing Co. 1986;**26(1):**371-385.

12. Herald, T.J., Gnanasambandam, R., Mcguire, B.H. and Hachmerster, K.A., Degradable wheat Gluten Films: Preparation, Properties and Applications, J. Food Science. 1995;60(5):885-1147.

13. Panda K. , S. Ramakrishna, Electrospinning of alumina nanofibers using different precursors .Journal of Materials Science. 2007; 42(3): 2189-2193.

Preprint Article

14. Sun CZ, CT Lu, YZ Zhao, P Guo, JL Tian, L Zhang. Characterization of the Doxorubicin-Pluronic F68 Conjugate Micelles and Their Effect on Doxorubicin Resistant Human Erythroleukemic Cancer Cells. Journal of Nanomed Nanotechnology.2011; 35(6):408–413.

15. Zhu Y, Zhang JC, Zhai J, Zheng YM, Feng L, Jiang L. Multifunctional carbon nanofibers with conductive, magnetic and superhydrophobic properties. ChemPhysChem, 2006;7(2):336-341.

Proof Article

چکیده انگلیسی:

Dermatological treatment of many anticancer drugs using wheat gluten nanofibers as a delivery system for doxorubicin is prepared by electrospinning. Doxorubicin drug delivery through the skin is suggested to reduce side effects. Nanofibers were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared testing, X-ray diffractometry, thermal gravimetry, and differential thermal analysis. SEM images showed that the addition of polyvinyl alcohol decreased the fiber diameter. Diameters of 180.14 ± 14.11 nm were obtained for wheat gluten nanofibers containing doxorubicin. In addition, the cytotoxic effect of extracts on 2780A, 12PC, 3PC, and MCF-7 cells is evaluated, which confirmed our results on the MCF-7 cell line. Diameters of 180.14 ± 14.11 nm were obtained for wheat gluten nanofibers containing doxorubicin. In addition, the cytotoxic effect of extracts on 2780A, 12PC, 3PC, and MCF-7 cells is evaluated, which confirmed our results on the MCF-7 cell line.

Keywords: Gluten-Nanofiber, Cytotoxicity, Cancer, Biocompatible polymers