

تهیه و بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات پلیمری هدفمند حاوی پاکلی تاکسل و siRNA در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

هادی اسکانلو^۱، ندا فرازی^۲، میلاد داننده باقرآباد^۱، بشیر ندایی شکراب^۳ و هاشم یعقوبی^{*۱}

^۱ ایران، اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۳ ایران، اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه فیزیک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۰۵

چکیده

این مطالعه با هدف سنتز نانوذرات مغناطیسی جهت انتقال همزمان داروی پاکلی تاکسل و siRNA طرح ریزی و انجام گرفت. بدین منظور ابتدا کوپلیمر Chitosan-poly lactic acid-(PEG) polyethylene glycol-(FA) Folic acid، سنتز شد سپس از آن جهت انکپسوله سازی نانوذرات اکسید آهن، داروی پاکلی تاکسل و siRNA-FAM استفاده گردید. از میکروسکوپ الکترونی نگاره و میکروسکوپ الکترونی عبوری به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات استفاده گردید. همچنین اندازه و بار سطحی نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX با استفاده از دستگاه DLS ارزیابی گردید. جهت بررسی زیست سازگاری و قابلیت نانوذرات MFMNPs در انتقال دارو و siRNA به ترتیب از تست MTT، میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتومتری استفاده گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX از ساختار کروی و اندازه حدود ۲۵۰ نانومتر برخوردارند و بار سطحی آنها $9 \pm 1/6$ میلی-ولت بود. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد نانوذرات MFMNPs از زیست سازگاری مطلوبی برخوردار بوده و از پتانسیل بالایی در انتقال داروی PTX به سلول های MCF-7 برخوردار هستند. میزان IC_{50} برای نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX و MFMNPs/PTX به ترتیب برابر $76/5$ و $78/3$ نانومولار بود. نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتومتری از سلول های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات MFMNPs بیانگر توانایی بالای این نانوذرات در انتقال siRNA این سلول ها بود به نحوی که میزان انتقال siRNA-FAM توسط نانوذرات MFMNPs به سلول های MCF-7 برابر با $58/63$ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: پاکلی تاکسل، اسیدفولیک، نانوذرات پلیمری، siRNA، سرطان پستان

*نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

مقدمه

اختلالاتی می‌گردند که نتیجه آن ایجاد سرطان است. امروزه سرطان یکی از بیماریهای مهلک است که هر ساله تعداد زیادی از انسان ها را می‌کشد. سرطان پس از بیماری‌های قلبی عروقی دومین علت شایع مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود. ریسک ابتلا به بیماری سرطان علیرغم پیشرفت علم بشر در جنبه‌های بیولوژیکی و

به‌طور عادی، تکثیر و تمایز سلول‌ها توسط یک مکانیسم کاملاً حساب‌شده و در پاسخ به نیازهای مختلف انجام می‌شود. در طول نمو طبیعی، گروه‌های ژنتیکی پیچیده تبادل بین تکثیر و مرگ سلولی را در پاسخ به سیگنال‌های آپتوز کنترل می‌کنند. به‌هرحال در مواردی مشاهده می‌شود که سلول‌ها از بین کنترل منظم و دقیق خارج‌شده و منجر به

ترکیبات آبدوست و آبگریز به سلول‌های سرطانی اهمیت آن‌ها را در سیستم‌های دارورسانی بسیار کرده است. اخیراً نانوناقل‌های کاتیونی مورد استفاده جهت انتقال ژن و دارو با قابلیت ایجاد کمپلکس با گروه‌های منفی موجود در DNA طراحی و ساخته شده‌اند که از قابلیت بالایی جهت انتقال ژن و دارو به سلول‌ها برخوردار هستند. که این خصوصیات آن‌ها سبب شده است تا در صنایع داروسازی بسیار مورد توجه قرار گیرند (۱۷). از جمله مهمترین ناقل‌های مورد استفاده جهت انتقال نوکلئیک اسید به سلول‌های یوکاریوتی می‌توان به پلیمرهای کاتیونی اشاره کرد. این پلیمرها به سادگی با نوکلئیک اسیدهایی از قبیل DNA و RNA برهمکنش می‌دهند. از میان پلیمرهای کاتیونی کیتوسان به خصوص کیتوسان‌هایی که دارای وزن ملکولی بالاتری هستند علاوه بر قابلیت بالا در برهمکنش و فشرده سازی DNA از زیست‌سازگاری مطلوبی نیز برخوردار هستند (۹،۱۴). از دیگر پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست تخریب پذیر که بطور گسترده‌ای در سیستم‌های دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به پلیمرهای پلی اورتان PU (Polyurethane)، PLA (Poly lactic acid) و PCL اشاره کرد. ترکیب این قبیل پلیمرها با پلیمرهای آبدوست از قبیل PEG سبب تولید کوپلیمرهای آمفی‌پاتیکی می‌گردد که از خصوصیات منحصر به فردی از قبیل توانایی در کنترل رهش دارو و همچنین انتقال همزمان داروهای آبدوست و آبگریز به سلول‌ها برخوردار می‌باشند (۱۲،۲۳). نانوذرات مغناطیسی از دیگر نانوذرات مورد علاقه جهت استفاده در سیستم‌های دارورسانی و همچنین ژن‌رسانی هستند. خواص منحصر به فرد این نوع از نانوناقل‌ها شامل سوپر پارامغناطیسی، فوق اشباع و Magnetic susceptibility می‌باشد که از خصوصیات مغناطیسی این نانوذرات می‌گیرد. در این تحقیق نانوذرات جدیدی با اتصال قطعات کیتوزان، پلی‌اتیلن گلیکول PEG، PLA و همچنین نانوذرات اکسید آهن سنتز شد تا علاوه بر زیست‌سازگاری مناسب از توانایی انتقال داروهای آبگریز و نوکلئیک اسیدهایی از

پزشکی، همواره رو به افزون است. با این حال درصد افراد مبتلا به سرطان در قاره آسیا بطور قابل توجهی بالاتر از سایر قاره‌هاست. در اروپا و امریکای شمالی از هر ۴ نفر بر اثر سرطان جان خود را از دست می‌دهند. هدف از تحقیق در زمینه‌ی سرطان توسعه‌ی روش‌های جدید و مؤثر غیر سمی در درمان سرطان است. با توجه به تفاوت مکانیسم‌های مولکولی درگیر در سرطان‌زایی که در هر نوع سلول سرطانی وجود دارد درمان‌های متفاوتی نیز باید به کار گرفته شود (۱۶).

شیمی درمانی در ترکیب با جراحی یکی از مؤثرترین روش‌هاست جهت درمان سرطان است. اگرچه داروهای شیمی درمانی موجود در کنترل سلول‌های سرطانی بسیار کارآمد هستند با این حال این داروها بین سلول‌های سرطانی و طبیعی تمایز قائل نمی‌شوند بنابراین، عوارض جانبی زیادی پس از تجویز دارو رخ می‌دهد که می‌تواند حتی برای افراد آن‌کشنده باشد علاوه بر این، اکثر داروهای شیمی درمانی معمولی نامحلول در آب هستند و نمی‌توان مستقیماً به بدن تزریق شوند. ژن درمانی مجموعه‌ای از روش‌های درمانی است که در آن با رفع عیب ژن‌ها، و یا غیر فعال سازی ژن‌ها مضر بیماری را درمان می‌کنند. در چند دهه گذشته تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است استفاده از رتروویروس‌ها جهت ژندرمانی با وجود بازده بالایی آن‌ها در انتقال ژن به دلایلی از قبیل امکان ایجاد جهش در این ویروس‌ها و همچنین محدودیت در اندازه DNA جهت انتقال به سلول‌ها محدود شده است. با این حال امروزه استفاده از نانوذرات مختلف که از قابلیت انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی برخوردار هستند به عنوان روشی جایگزین مطرح است (۴،۱۸).

با توجه به این محدودیت‌ها در استفاده از داروهای شیمی درمانی، در سال‌های اخیر ظهور نانوذرات نه تنها به عنوان ناقلی قدرتمند برای تحویل انتخابی دارو مد نظر قرار گرفته است بلکه توانایی این نانوذرات در انتقال همزمان

با توجه به آنچه گفته شد جهت طراحی نانوساختارهایی با قابلیت انتقال همزمان داروهای آبگریز و همچنین نوکلئیک اسیدها باید به موارد متعددی توجه داشت که از جمله این موارد وجود ترکیبات کاتیونی جهت برهمکنش با DNA، آبگریز بودن حداقل یکی از قطعات مورد استفاده در ساختار نانوذرات جهت انکپسوله سازی داروهای آبگریز و همچنین وجود لایه قطبی در پوسته خارجی نانوذرات جهت به حداقل رساندن برهمکنش‌های نامطلوب درون سلول اشاره کرد (۷،۱۳). در تحقیق حاضر نانوذرات چند عملکردی با استفاده از کیتوزان، PLA، PEG تهیه شد که وجود بار کاتیونی در کیتوزان امکان برهمکنش با RNA را می‌دهد. همچنین قطعات PLA و PEG در این نانوذرات به ترتیب امکان انکپسوله سازی داروهای آبگریز از قبیل پاکلی تاکسل و همچنین امکان فرار از سیستم ایمنی بدن برای نانوذرات را فراهم می‌کنند. هدف از این تحقیق سنتز نانوذرات مغناطیسی با قابلیت انتقال همزمان siRNA-FAM و پاکلی تاکسل به سلول‌های MCF-7 بود. بررسی زیست سازگاری نانوذرات و توانایی آن در خنثی سازی بار منفی siRNA-FAM از دیگر اهداف این تحقیق بود.

مواد و روشها

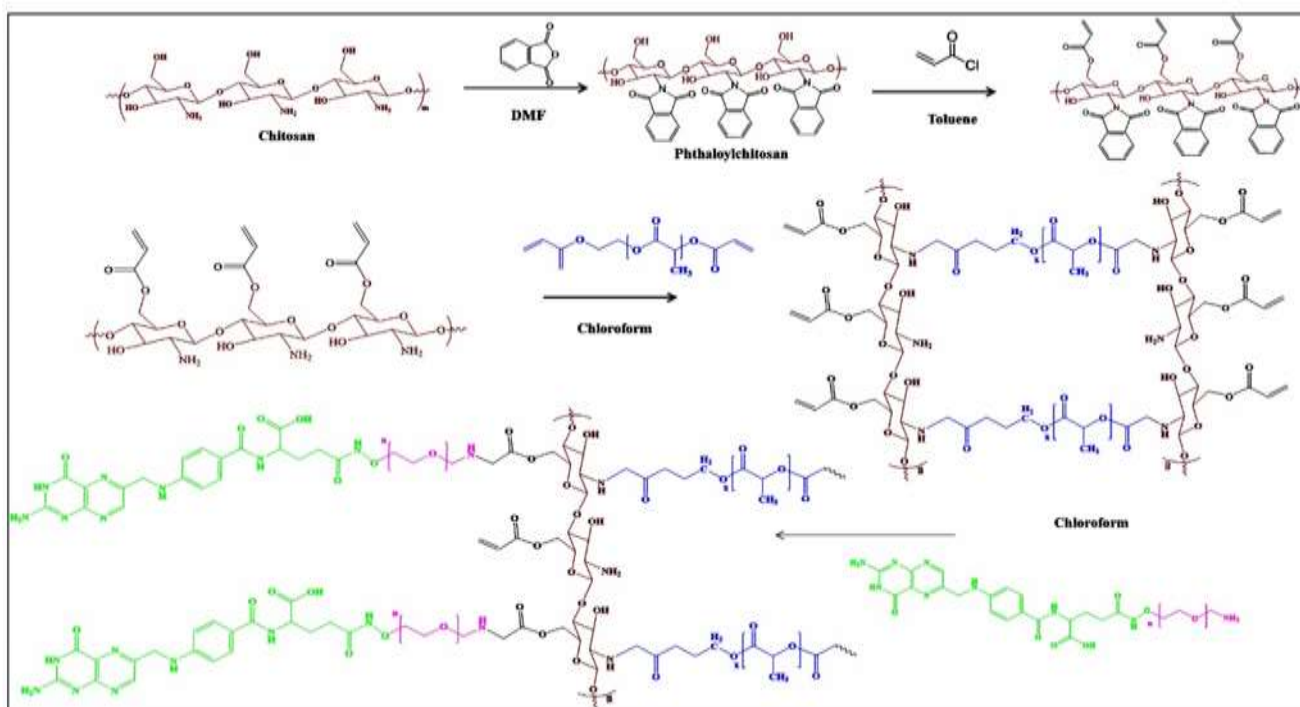
در این مطالعه تجربی رده سلولی MCF-7 از انستیتو پاستور؛ ایران خریداری و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم گاوی و ۲۰٪ پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شد. محلول MTT و FBS از سیگما، محلول‌های تریپسین و پنی سیلین - استرپتومایسین از گیبکو تهیه شدند. اولئیک اسید، پلی اتیلن گلیکول، کیتوزان، پلی لاکتیک اسید، اتانول، هگزان، بافر فسفات، تریپان بلو و نیز پاکلی تاکسل، siRNA- CGGCCTGAAGTCTCTCT- Integrated DNA Technologies 5' FAM 3' توالی از شرکت (IDT) کشور آمریکا تهیه گردید. خلوص این ترکیب بالای ۹۵ درصد بوده و توسط HPLC خالص سازی گردید. از دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره (SU1510 model;)

قبیل RNA به سلول‌های سرطانی بطور همزمان برخورداری باشند. همچنین جهت افزایش جذب سلولی این نانوذرات سطح نانوذرات MFMNPs با استفاده از اسیدفولیک پوشش داده شد تا علاوه بر افزایش بازده انتقال به سلول‌های سرطانی، جذب غیر اختصاصی دارو را به سلول‌های نرمال کاهش دهد.

مقاومت‌های دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها همواره به عنوان یکی از چالش‌های اصلی در درمان بیماری‌ها بوده اند. به گونه‌ای که برخی از دارو خاص درمانی خود را به دلایل متعددی از دست می‌دهند لذا محققان همواره دنبال راهکارهایی جهت ممانعت از مقاومت دارویی و یا استفاده از داروهای متعدد در درمان بیماری‌ها بوده‌اند با این حال خصوصیات متفاوت داروها از قبیل حلالیت متفاوت اثرات سوء سینرژیک داروها بر یکدیگر و غیره امکان استفاده از چندین دارو را در سیستم‌های درمانی محدود کرده‌اند (۱۱،۱۵). امروزه استفاده از نانوذرات با قابلیت انتقال داروهای آبدوست و آبگریز سبب برطرف کردن برخی از چالش‌ها در این زمینه شده اند. انتقال نوکلئیک اسیدها از قبیل DNA و RNA به سلول‌ها نیازمند خنثی سازی بار منفی و همچنین فشرده سازی این ترکیبات است (۱۵،۲۲). از طرف دیگر محافظت از این ماکرومولکول‌ها در برابر شرایط مخرب بدن از دیگر فاکتورهای ضروریست که در طراحی ناقل‌های ژنی باید مد نظر قرار گیرد. پلیمرهای آبگریز جهت انکپسولاسیون داروهای آبگریز از قبیل پاکلی تاکسل همواره مورد توجه بوده‌اند با این حال برهمکنش غیر اختصاصی این قبیل پلیمرها با پروتئین‌های موجود در پلاسما سبب افزایش اندازه در این نانوذرات می‌گردد که این پدیده شناسایی نانوذرات را توسط ماکروفازها افزایش داده و زمینه حذف این نانوذرات را فراهم میکند (۵). لذا اتصال این ترکیبات با ترکیبات آبدوست و زیست‌سازگار از قبیل PEG می‌تواند با تشکیل میسل‌های با سطح آبدوست امکان برهمکنش این نانوذرات را با ترکیبات آبگریز سلول به حداقل برساند. در مجموع و

تهیه کوپلیمر **Chitosan-PLA-Chitosan** : سنتز-PLA
 Chitosan-Spermine در چند مرحله توضیح داده شده در
 زیر انجام شد (شکل ۱).

ساخت ژاپن و همچنین (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
 دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, JEM-)
 ساخت ژاپن، (2100PLUS, JEOL Ltd., Japan
 FTIR (Nicolet 380 FTIR spectrometer; Thermo Fisher
 Scientific) ساخت آمریکا. اندازه نانوذرات توسط دستگاه
 Malvern Panalytical ساخت کشور انگلستان بررسی شد.



شکل ۱. شماتیک نحوه تهیه کوپلیمر PLA-Chitosan-PEI

شرایط خلاء به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. به منظور
 حذف آکریلات- فتالویل از کیتوزان ۳ گرم آکریلات-
 فتالویل کیتوزان در ۲۰ میلی لیتر DMF حل شد و سپس ،
 این محصول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه
 سانتیگراد تحت نیتروژن هم زده شد. هیدرازین منوهیدرات
 به محلول اضافه شد و واکنش به مدت ۶۰ دقیقه ادامه
 یافت. در پایان واکنش، محصول نهایی در دمای اتاق سرد
 شدند. سرانجام محصول نهایی توسط سانتریفیوژ جمع
 آوری شد، و پس از شستشو توسط اتانول با استفاده از
 دستگاه فریزدرایر خشک شد.

اتصال کیتوسان به acrylate-PLA-acrylate : ۲۰ میلی لیتر

تهیه آکریلات کیتوزان: کیتوزان و انیدرید فتالیک در DMF
 خشک شده گرم شدند تا فتالوکیتوزان (PHCS) مطابق
 روشی که قبلاً توسط لیو و همکاران شرح داده شده بود
 سنتز گردد (۱۰). سپس ، ۰/۲ میلی مولار از ترمینال
 هیدروکسیل فتالویلی کیتوزان با ۰/۴ میلی مولول آکرلیل
 کلراید در تولوئن خشک حاوی ۰/۴ میلی مول تری تیل
 آمین مخلوط شد. مخلوط واکنش به مدت ۶ ساعت در
 دمای ۹۰ درجه سانتیگراد همزده شد. سپس، این مخلوط
 در دمای اتاق خنک شد. به منظور حذف هیدروکلراید تری
 اتیل آمین، و سایر ناخالصی‌ها محصول نهایی با استفاده از
 فیلتر، فیلتر شد و چندین مرتبه توسط N-هگزان سرد
 شستشو داده شد. نهایتاً رسوبات جمع آوری و تحت

شد. جهت فورمولاسیون نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX محلول فوق‌الذکر به ۲۵ میلی‌لیتر از ۰/۳ PVA درصد اضافه گردید و به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق مخلوط گردید. حلال‌های موجود در مخلوط واکنش با استفاده از روتاری حذف گردید.

سپس نانوذرات حاصل به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ دور جداسازی شدند. نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX توسط بافر فسفات چندین مرتبه شسته شده و نهایتاً توسط دستگاه فریز درایینگ، خشک شدند (شکل ۲).

بررسی درصد بارگذاری PTX و siRNA توسط نانوذرات MFMNPs: بدین منظور سوپرناتانت رویی سوسپانسیون حاوی نانوذرات MFMNPs بطور جداگانه جمع‌آوری شد و جذب آن به ترتیب در ۲۳۰ (برای داروی PTX) و ۴۹۰ نانومتر (برای siRNA-FAM) توسط اسپکتروفتومتری بررسی شد سپس با عدد جذبی هر کدام از نمونه‌ها با عدد جذبی نمونه‌های مورد استفاده در فرایند تهیه نانوذرات مورد مقایسه قرار گرفت (فرمول ۱).

بررسی خصوصیات نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX: به منظور بررسی خصوصیات مرفولوژیکی نانوذرات حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و همچنین میکروسکوپ الکتروی نگاره (SEM) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا مقدار مناسبی از نانوذرات متفاوت توسط سونیکاتور به مدت ۱۲۰ ثانیه سونیکه شد سپس بمنظور مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی عبور استفاده شدند. جهت بررسی اندازه و همچنین بار سطحی نانوذرات از دستگاه DLS استفاده گردید.

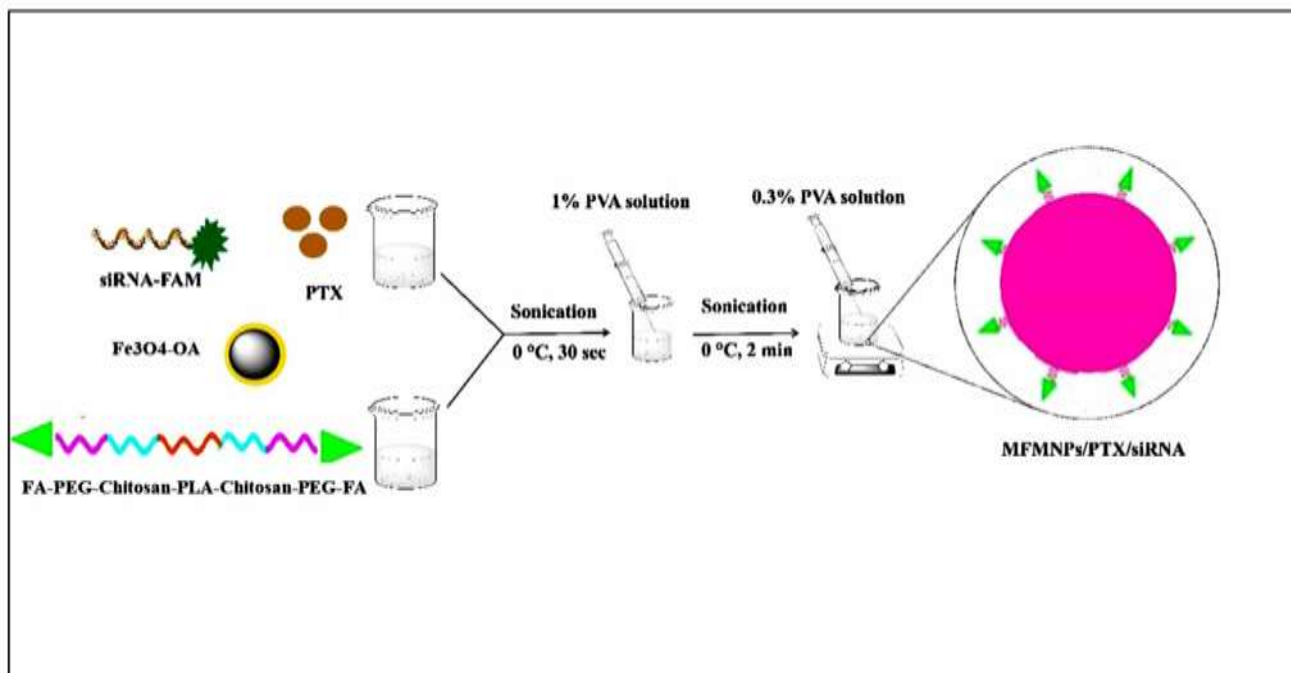
از acrylate-Chitosan به صورت قطره قطره به مقدار برابری از محلول به acrylate-PLA-acrylate اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. نهایتاً محصول حاصل با استفاده از مخلوط اتانول و آب و در حضور غشاء دیالیز ۱۰۰۰۰ دالتون برای ۲ روز و در ۴ درجه خالص سازی گردید.

اتصال NH₂-PEG-FA به chitosan-PLA-chitosan: به منظور اتصال NH₂-PEG-FA به chitosan-PLA-chitosan از روش اتصال کیتوسان به acrylate-PLA-acrylate استفاده گردید بدین منظور میزان یک گرم از NH₂-PEG-FA و ۲ گرم از chitosan-PLA-chitosan در ۲۰ میلی‌لیتر از کلروفورم حل شد سپس محلول NH₂-PEG-FA به صورت قطره قطره به محلول chitosan-PLA-chitosan اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط داده شدند سپس با استفاده از غشاء دیالیز ۱۰۰۰۰ دالتون و در حصول آب و متانول خالص سازی شدند (شکل ۱).

آماده سازی و بررسی خصوصیات نانوذرات FA-PEG-Chitosan-PLA-Chitosan-PEG-FA/siRNA/PTX (MFMNPs/siRNA/PTX): تهیه نانوذرات FA-PEG-Chitosan-PLA-Chitosan-PEG-FA/siRNA/PTX با تکنیک انتشار حلال انجام گردید (۱۲). به طور خلاصه مقدار متفاوتی از MFMNPs با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میلی‌گرم به ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات pH ۷,۴ حاوی ۲۵۰ میکروگرم siRNA-FAM، ۲ میلی‌گرم از نانوذرات Fe₃O₄-OA (پوشش داده شده توسط اولوئیک اسید) ۲ میلی‌گرم پاکلی تاکسل اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه سونیکه شد. مخلوط حاصل با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول PVA یک درصد ترکیب و به مدت ۲ دقیقه روی یخ سونیکه

$$\text{جذب سوپرناتانت هر کدام از نمونه‌ها در طول موج مربوطه} - \text{جذب داروی مورد استفاده در فرآیند تهیه نانوذرات} = \text{فرمول ۱}$$

جذب داروی مورد استفاده در فرآیند تهیه نانوذرات



شکل ۲. شماتیک تکنیک انتشار حلال جهت تهیه نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX

شده توسط ژل آگارز و در کنار siRNA کنترل الکتروفورز گردید همچنین مقدار یک میلی‌گرم از نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX به همراه نمونه‌های فوق‌الذکر و به منظور بررسی توانایی نانوذرات در خنثی‌سازی بار منفی DNA استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در ژل آگارز ۲/۵ درصد و در ۸۰۷ الکتروفورز گردیدند.

بررسی اثر سایتوتوکسیستی نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX بر رده سلولی MCF-7 با استفاده از تست MTT : جهت بررسی تاثیر نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX بر توانایی زیستی سلول و همچنین میزان سایتوتوکسیستی آنها بعد از تریپسینه کردن و تهیه سوسپانسیون سلولی MCF-7 و سپس شمارش سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو میزان ۷۵۰۰ سلول به هر کدام از چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال یافت. همچنین جهت یکسان شدن تعداد سلول‌ها در هر چاهک قبل از انتقال آن‌ها به آرامی با استفاده از ورتکس مخلوط گردیدند. پس از انتقال سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه، به مدت ۲۴ ساعت در

همچنین به منظور بررسی خصوصیات مغنتیک نانوذرات از دستگاه Vibrating-sample magnetometer (VSM) استفاده شد. محدوده مغنتیک هریک از نانوذرات در محدود ۱۰۰۰۰- تا ۱۰۰۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی پایداری siRNA در نانوذرات MFMNPs و توانایی نانوذرات در خنثی‌سازی بار منفی siRNA توسط ژل آگارز: به منظور بررسی پایداری siRNA و انکپسولاسیون سالم آن توسط نانوذرات MFMNPs، siRNA از نانوذرات MFMNPs جداسازی شد و توسط ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک میلی‌گرم از نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX با بافر فسفات حاوی هپارین ۱ درصد به مدت ۴ ساعت بر روی انکوباتور شیکردار با دمای ۴۵ درجه و دور ۱۲۰ rpm، نگهداری شدند. سپس siRNA جداسازی شده توسط اتانول و به وسیله سانتریفیوژ رسوب و شستشو داده شد سپس توسط دستگاه فریزدرایینگ تغلیظ شد. نهایتاً جهت بررسی پایداری siRNA در نانوذرات MFMNPs، siRNA تخلیص

نانوذرات مورد نیاز برای هر کدام از تیمارها به گونه‌ای محاسبه شد که در تمامی تیمارها مقدار دارو برابر با میزان PTX استفاده در گروه کنترل باشد (بدین منظور درصد بارگذاری دارو نیز در نظر گرفته شد). پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX و MFMNPs/PTX، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد، نگهداری شدند. سپس زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT و فرمول ارائه شده فوق‌الذکر محاسبه شدند.

انتقال siRNA به سلول‌های MCF-7 با استفاده از نانوذرات MFMNPs/siRNA: سلول‌های MCF-7 با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر به ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰ درصد به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه ای انتقال یافتند سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از آنکه سلول‌ها با فاز رشدی مناسبی رسیدند به هرچاهک به طور جداگانه نانوذرات MFMNPs/siRNA و در سه تکرار اضافه شد. از siRNA فاقد پوشش به عنوان کنترل منفی در این تحقیق استفاده شد. پس از نگهداری سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت ۷ ساعت، سلول‌ها با استفاده از بافر فسفات مورد شستشو قرار گرفتند و نهایتاً از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلورسایتمتری به منظور بررسی بازده انتقال siRNA به سلول‌های MCF-7 استفاده گردید.

تجزیه تحلیل آماری: تمامی فاکتورهای کمی مورد ارزیابی در این تحقیق در حداقل ۳ تکرار انجام شدند. تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ و از طریق تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) صورت گرفت. آزمون چندمرحله‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد به منظور بررسی مقایسه میانگین داده‌های حاصل از این تحقیق استفاده شد سپس میانگین هر یک از تیمارها به همراه انحراف معیار ($Mean \pm SE$) بیان گردید.

انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. تا سلول‌ها به فاز رشد مناسبی برسند، بعد از گذشت این مدت، محیط کشت رویی خارج شد و محیط کشت جدید همراه با غلظت‌های مختلف نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX با سلول‌ها تیمار شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و همچنین CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند سپس زیستایی سلول‌های MCF-7 با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت.

تست MTT: MTT نمک زرد و حلال در آب است که به کمک آن می‌توان قابلیت زیستی سلول‌های مختلف را مورد ارزیابی قرار داد. جهت انجام آزمون MTT محیط رویی سلول‌ها MCF-7 دور ریخته شد، و بعد از شست‌وشو توسط بافر PBS، محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد MTT اضافه شد، سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و در شرایط تاریکی نگهداری شد. به منظور بررسی میزان واکنش، ابتدا کریستال‌های نامحلول آبی رنگ با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO به هر چاهک، حل شدند سپس محلول ارغوانی حاصل با استفاده از دستگاه الیزا ریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{میانگین جذب نوری سلول‌های شاهد} / \text{جذب نوری هر یک از سلول‌های تیمار شده}) = \text{درصد زنده‌مانی سلول‌ها}$$

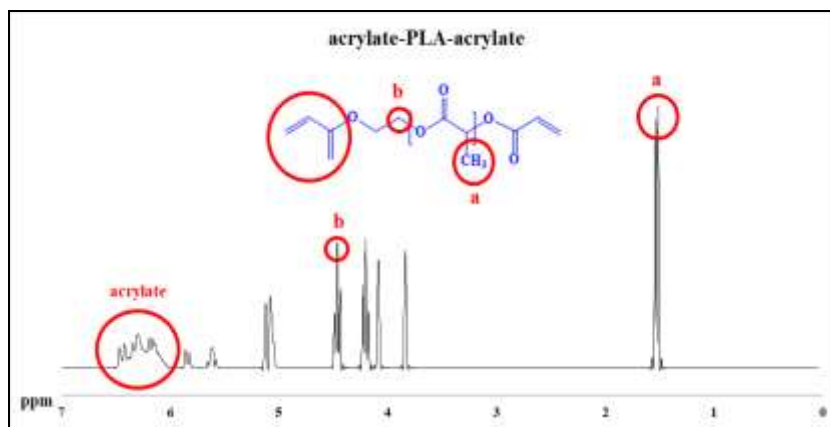
بررسی تاثیر نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX و MFMNPs/PTX بر بازده کشندگی رده سلولی MCF-7: جهت بررسی تاثیر نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX و MFMNPs/PTX بر بازده کشندگی رده سلولی MCF-7 توسط PTX ابتدا میزان IC_{50} داروی PTX محاسبه گردید سپس نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX و MFMNPs/PTX حاوی مقدار ثابتی از داروی PTX به طور جداگانه با سلول‌های MCF-7 اضافه شدند (جهت محاسبه دقیق تاثیر نسبت‌های متفاوت نانوذرات بر بازده کشندگی PTX میزان

نتایج

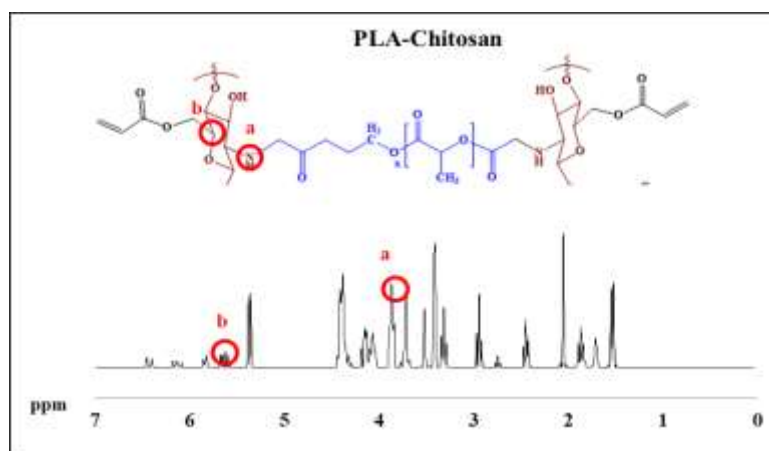
PLA-acrylate می‌باشد. پس از اتصال PLA به کیتوسان پیک‌های جدیدی در منطقه ۳/۹ و ۵/۷ مشاهده شد که مربوط به هیدروژن‌های گروه a و b کیتوسان بودند. پس از اتصال PEG-FA به کوپلیمر PLA-chitosan پیک‌های چندگانه جدیدی در منطقه ۳/۵ مشاهده شد که مربوط به هیدروژن‌های PEG بودند همچنین پیک‌های ضعیف مشاهده شده در منطقه ۷ الی ۸/۵ مربوط به هیدروژن‌های گروه فولیک اسید بودند.

NMR از پلیمرهای acrylate-PLA-acrylate،

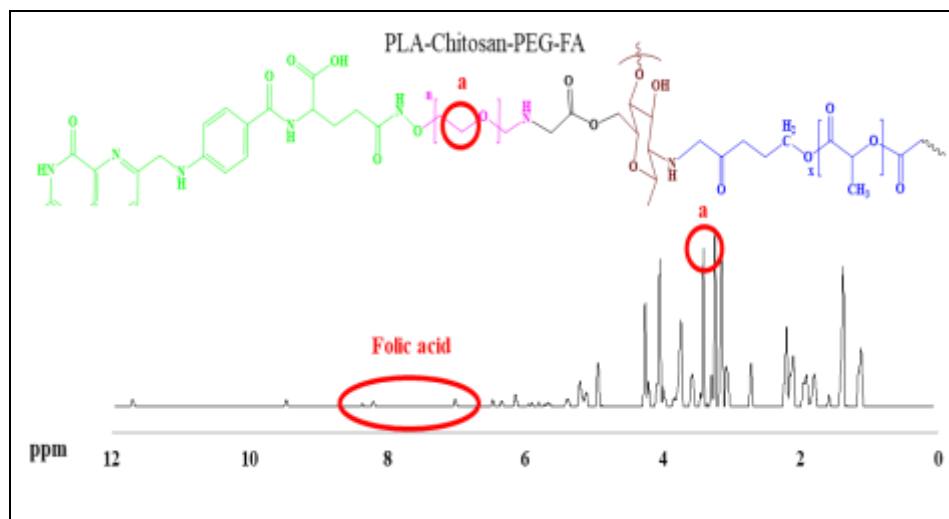
chitosan و PLA-chitosan-PEG-FA : جهت بررسی ساختار کوپلیمرهای سنتز شده از طیف سنجی HNMR استفاده گردید همان‌طور که در شکل‌های ۳-۵ قابل مشاهده است پیک‌های مشاهده شده در منطقه ۱/۶۳ و ۴/۴۵ به ترتیب مربوط به هیدروژن‌های شماره a و b در PLA می‌باشند همچنین پیک‌های مشاهده شده در منطقه ۶ الی ۶/۵ مرتبط با هیدروژن‌های گروه آکریلات در پلیمر acrylate-



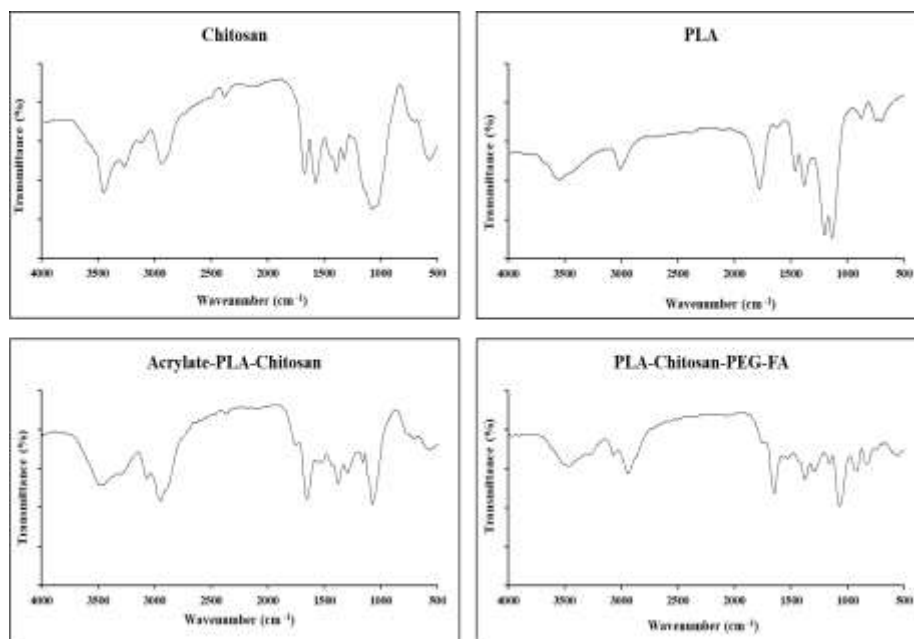
شکل ۳. طیف سنجی HNMR از کیتوسان



شکل ۴. طیف سنجی HNMR از کوپلیمر PLA-chitosan



شکل ۵. طیف سنجی HNMR از کوپلیمر PLA-chitosan-PEI

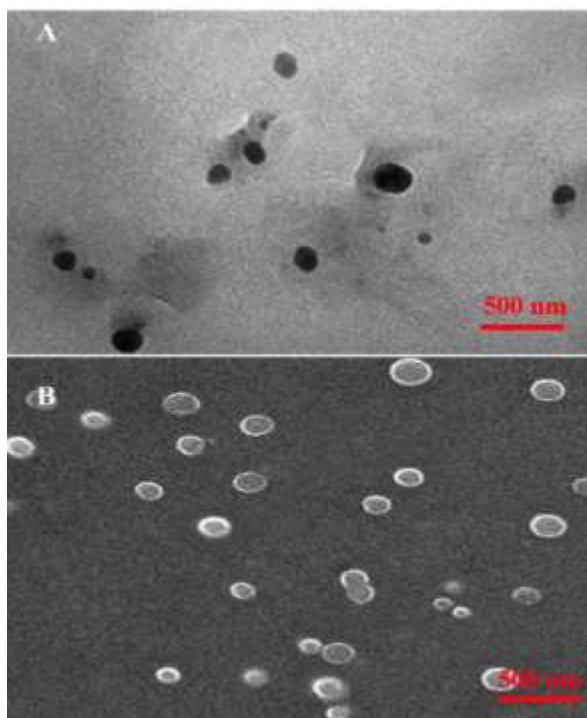


شکل ۶. تصویر طیف سنجی FTIR از پلیمرهای مختلف

آمین نوع دوم بود. اتصال PEG-FA به کوپلیمر PLA-chitosan سبب شد تا پیک مربوط به پیوند C-CH₂ در محدوده ۹۵۰ الی ۱۰۵۰ قابل مشاهده باشد (شکل ۶).

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، اندازه و بار سطحی نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX : نتایج حاصل از بررسی ساختار مورفولوژیکی نانوذرات MFMNPs/

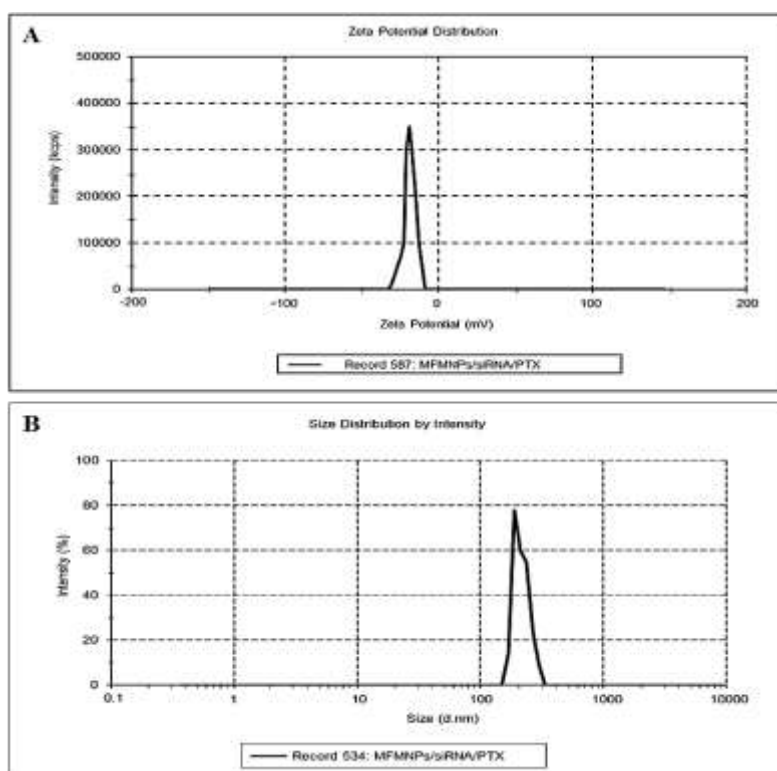
نتایج حاصل از طیف سنجی FTIR از کیتوسان نشان داد پیک‌های مشاهده شده در محدوده ۱۶۳۸ مربوط به گروه‌های C=O می‌باشند همچنین پیک مشاهده شده در محدوده ۱۵۵۷ مربوط به پیوند N-H و پیک مشاهده شده در محدوده ۳۳۳۸ و ۱۰۸۲ به ترتیب مربوط به گروه OH و پیوند C-O در کیتوسان بود. پس از اتصال PLA به کیتوسان پیک جدیدی در محدوده ۱۵۶۱ مشاهده شد که مرتبط با



شکل ۷. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (A) و میکروسکوپ الکترونی نگاره (B) از نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX

siRNA/PTX نشان داد، این نانوذرات دارای ساختار کروی بوده و از میزان خودتجمعی کمی برخوردار بودند علاوه بر این نتایج نشان داد نانوذرات حاصل از سطوح صاف و اندازه نسبتاً یکسانی برخوردار بودند (شکل ۷). نتایج حاصل از بررسی اندازه نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX نشان داد اندازه و پتانسیل زتای این نانوذرات به ترتیب در محدوده 26 ± 256 و بار سطحی $9 \pm 1/6$ میلی‌ولت بود (شکل ۸).

بررسی توانایی کوپلیمر PLA-Chitosan-PEI در خنثی سازی بار منفی DNA: برهمکنش الکترواستاتیک بین پلیمرهای کاتیونی و بار منفی حاصل از گروه فسفات در RNA از جمله شرایط مهم جهت ایجاد کمپلکس بین نانوذرات و RNA می‌باشد. با توجه به وجود بار منفی در RNA حرکت RNA در دستگاه الکتروفورز به سمت قطب مثبت می‌باشد. کاهش بار منفی RNA توسط نانوذرات MFMNPs سبب توقف در حرکت RNA به سمت قطب مثبت دستگاه می‌گردد.



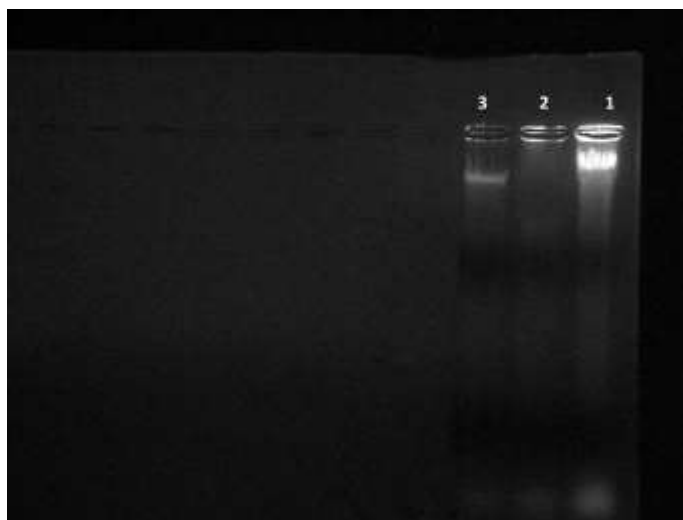
شکل ۸. بار سطحی نانوذرات (A) و اندازه (B) نانوذرات MFMNPs/siRNA/PTX

بررسی تاثیر نانوذرات MFMNPs بر افزایش کارایی داروی پاکلی‌تاکسل: نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی سمیت نانوذرات MFMNPs نشان داد این نانوذرات تاثیر معنی‌داری بر کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها نداشتند. این نتایج نشان داد این نانوذرات از سازگاری زیستی مناسبی جهت استفاده در سیستم‌های دارورسانی برخوردار هستند (شکل ۱۱).

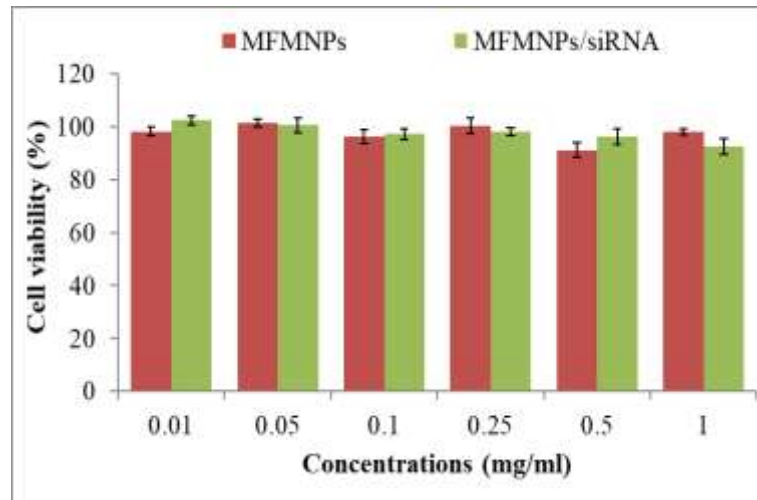
باتوجه به اینکه این نانوذرات از اثر سمیت بر سلول‌های MCF-7 برخوردار نیستند لذا افزایش درصد کشندگی سلول‌ها پس از انکپسولاسیون داروی پاکلی‌تاکسل درون این نانوذرات به دلیل اثر داروی انکپسوله شده در این نانوذرات می‌باشد نتایج مقایسه میانگین نشان داد داروی PTX فاقد پوشش از قابلیت بیشتری در مقایسه با نانوذرات MFMNPs/PTX و MFMNPs/siRNA/PTX بر کشندگی سلول‌های MCF-7 برخوردار هستند. به نظر می‌رسد اندازه کوچک دارو در مقایسه با نانوذرات و انتشار سریع آن به سلول‌های سرطانی یکی از دلایل افزایش تاثیر این دارو در مقایسه با نانوذرات حاوی دارو باشد.

تصویر ژل آگارز نشان داد زمانی که RNA با نانوذرات MFMNPs برهمکنش داده شد بار آن خنثی شد و در نتیجه حرکت آن به سمت قطب مثبت دستگاه متوقف شد. همچنین این نتایج نشان داد ساختار RNA پس از انکپسوله شدن در نانوذرات MFMNPs تغییر معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشته است (شکل ۹).

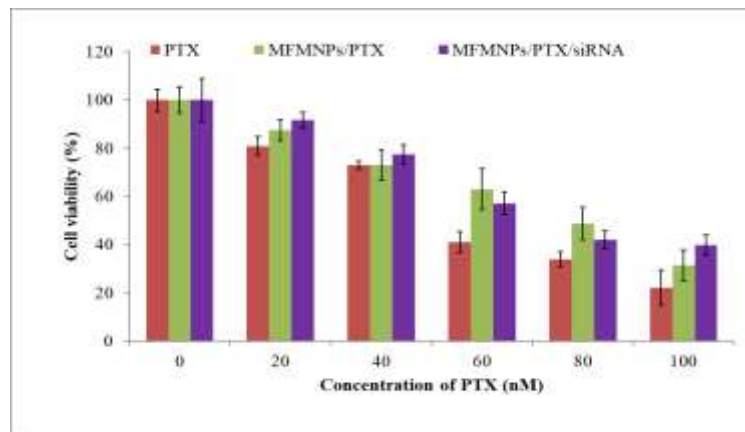
بررسی سمیت نانوذرات MFMNPs: در این تحقیق از قطعات زیست‌سازگار جهت سنتز نانوذرات استفاده شد. لذا انتظار بر این بود که نانوذرات حاصل فاقد اثر سمیت بر سلول‌ها باشند نتایج حاصل از تست MTT با نتایج مورد انتظار در تطابق کامل بود به نحوی که تا غلظت مورد استفاده یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات MFMNPs اثر سمیت قابل ملاحظه‌ای از نانوذرات MFMNPs بر سلول‌های MCF-7 مشاهده نشد همچنین این نتایج نشان داد انکپسولاسیون RNA درون نانوذرات MFMNPs تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر سمیت این نانوذرات ندارد. کمترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های متفاوت نانوذرات MFMNPs و MFMNPs/siRNA تنها حدود ۸۶ درصد بود که در سلول‌های تیمار شده با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات MFMNPs مشاهده شد (شکل ۱۰).



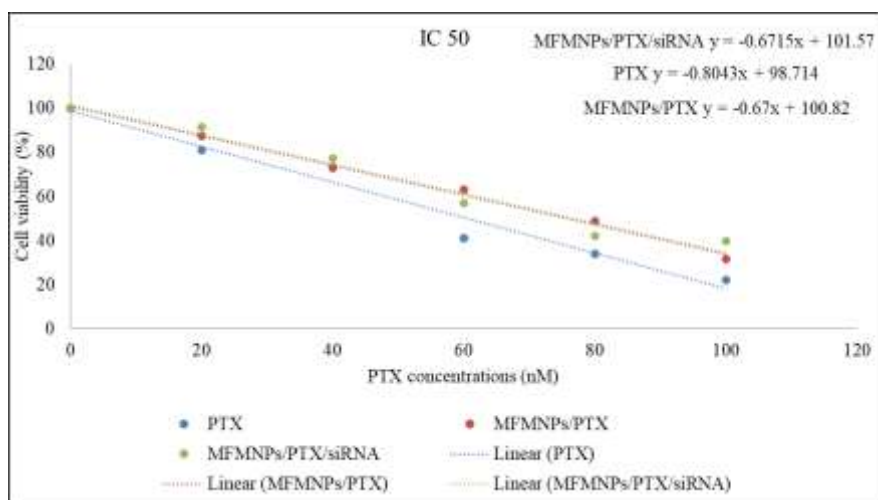
شکل ۹. تصویر ژل آگارز از RNA شاهد (چاهک اول) RNA برهکنش داده شده با نانوذرات MFMNPs/RNA/PTX (چاهک دوم) و RNA استخراج شده از نانوذرات MFMNPs (چاهک



شکل ۱۰. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی سلول در غلظت‌های مختلف از نانوذرات MFMNPs و MFMNPs/siRNA

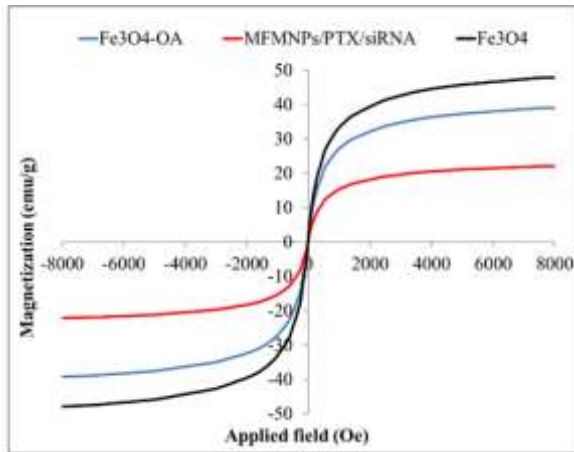


شکل ۱۱. نمودار مقایسه میانگین بررسی تاثیر نانوذرات MFMNPs بر افزایش بازده داروی پاکلی تاکسل

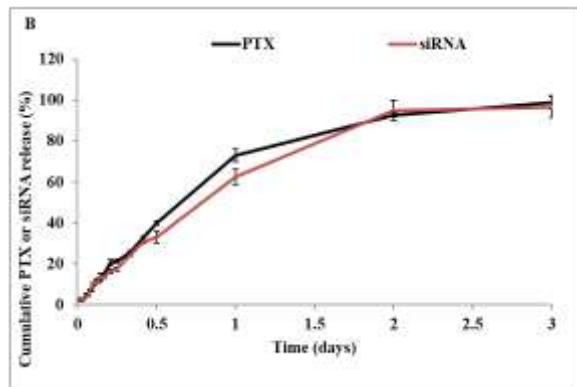
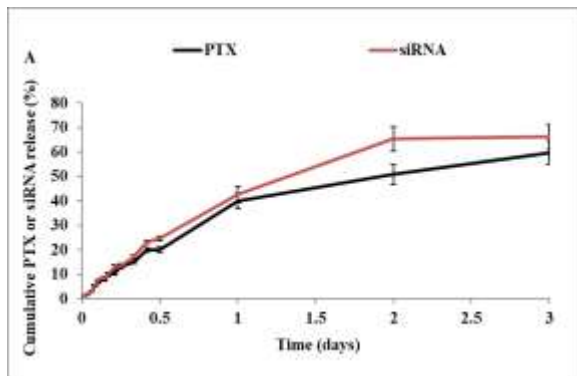


شکل ۱۲. نمودار IC50 از PTX و نانوذرات MFMNPs/PTX و MFMNPs/PTX/siRNA

اسیدی به طور قابل توجهی افزایش یافت به طور مثال مجموع میزان رهش PTX پس از سه روز ۵۹ درصد بود



شکل ۱۳. Fe_3O_4 ، Fe_3O_4 -OA و MFMNPs/PTX/siRNA



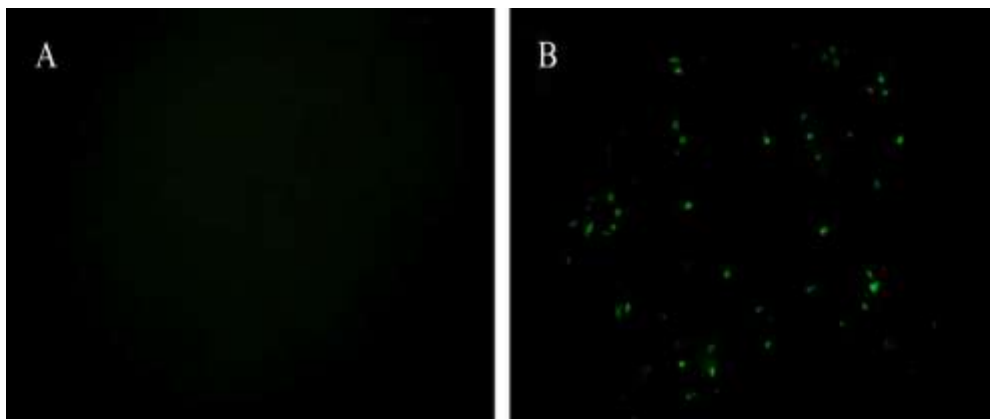
شکل ۱۴. بررسی الگوی رهش siRNA و PTX از نانوذرات MFMNPs/PTX/siRNA در بافر PBS با pH ۷/۴ (A) و ۶ (B).

میزان IC_{50} برای داروی پاکلی تاکسل ۶۰/۳ نانومولار بود در حالی که این میزان برای نانوذرات MFMNPs/PTX و MFMNPs/siRNA/PTX به ترتیب برابر ۷۶/۵ و ۷۸/۳ نانومولار بود (شکل ۱۲).

بررسی خصوصیات مغناطیسی نانوذرات MFMNPs/PTX/siRNA

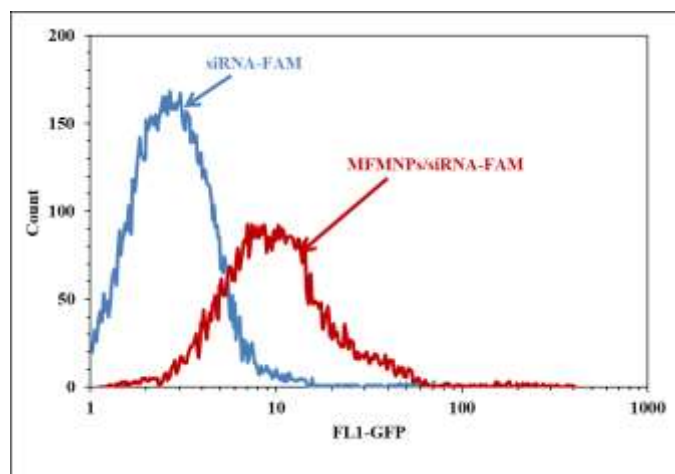
خصوصیات مگنتیک نانوذرات با استفاده از VSM و در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱۳، نمودار هیستریزاس لوب (Hysteresis loop) را برای نانوذرات Fe_3O_4 ، Fe_3O_4 -OA و MFMNPs/PTX/siRNA نشان می‌دهد. سطوح مغناطیسی برای نانوذرات Fe_3O_4 ، Fe_3O_4 -OA و MFMNPs/PTX/siRNA به ترتیب برابر با ۴۶، ۳۷ و ۱۸ (emu/g) بود. این نتایج نشان داد، پوشش نانوذرات اکسید آهن توسط ترکیبات غیرمغناطیسی از قبیل اولوئیک اسید، PLA، کیتوزان و PEG سبب کاهش خواص مغناطیسی این نانوذرات می‌گردد. نتایج حاصل از انکپسوله سازی siRNA و پاکلی تاکسل توسط نانوذرات MFMNPs نشان داد بین درصد بارگذاری دارو و siRNA در نانوذرات MFMNPs تفاوت معنی داری وجود درصد بارگذاری در siRNA بطور معنی داری بالاتر از PTX بود به طوری که میزان بارگذاری siRNA توسط نانوذرات MFMNPs ۵۳ درصد بود در حالی بود که این مقدار برای داروی PTX ۳۲ درصد بود به نظر می‌رسد افزایش اندازه siRNA و همچنین برهکنش آن با بار مثبت کیتوزان دلیل افزایش درصد بارگذاری آن در مقایسه با PTX باشد. نتایج حاصل از بررسی الگوی رهش PTX و siRNA در شکل ۱۴ نشان داده شده است.

با توجه به تفاوت بافت سرطانی در مقایسه با بافت نرم از لحاظ pH، الگوی رهش siRNA و PTX در دو محیط با اسیدیته متفاوت (۶ و ۷/۴) مورد ارزیابی قرار گرفت این نتایج نشان داد الگوی رهش siRNA از نانوذرات MFMNPs کمی بیشتر از داروی PTX بود با این حال این اختلاف قابل ملاحظه نبود. سرعت رهش PTX و siRNA در محیط



شکل ۱۵. تصویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های (A) تیمار شده با siRNA-FAM و (B) ترانسفکت شده با نانورات

MFMNPs/siRNA-FAM



شکل ۱۶. نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتمتری از سلول‌های ترانسفکت شده توسط siRNA-FAM و MFMNPs/siRNA-FAM

سلول در اثر برخورد نور UV به FAM ساطع می‌گردد که نشان دهنده انتقال siRNA-FAM به سلول‌های MCF-7 می‌باشد. نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسانس نشان نانوذرات MFMNPs از توانایی بالایی در انتقال ژن به سلول‌های MCF-7 برخوردار هستند. بر اساس نتایج فلورسایتمتری میزان انتقال siRNA توسط نانوذرات MFMNPs برابر با ۵۸/۶۳ درصد بود این در حالی بود که این نتایج نشان داد siRNA-FAM فاقد پوشش (کنترل) از قابلیت انتقال به سلول‌های MCF-7 برخوردار نبود. (شکل ۱۵ و ۱۶).

این در حالی بود که این میزان در مدت زمان مشابه در محیط اسیدی تا ۹۶ درصد افزایش یافت. همچنین روند مشابهی برای siRNA مشاهده شد (شکل ۱۴).

بررسی توانایی نانوذرات MFMNPs در انتقال siRNA به سلول‌های MCF-7: توانایی نانوذرات MFMNPs در انتقال siRNA به سلول‌های MCF-7 با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتمتری مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق از siRNA نشاندار شده توسط FAM به عنوان ژن گزارشگر به منظور تایید توانایی نانوذرات در انتقال siRNA مورد استفاده قرار گرفت. در صورت انتقال siRNA-FAM به سلول‌های MCF-7، نشر سبز رنگی درون

بحث و نتیجه گیری

همچنین روند مشابهی برای siRNA مشاهده شد. بررسی سمیت نانوذرات با استفاده از تست MTT در این تحقیق نشان داد نانوذرات PSPGP از زیست‌سازگاری مناسبی برخوردار بودند به طوری که کمترین درصد زنده‌مانی پس از تیمار با نانوذرات PSPGP ۸۳ درصد بود با این حال انکپسولاسیون داروی پاکلی‌تاکسل در این نانوذرات درصد زنده‌مانی سلول‌ها را تا کمتر از ۱۰ درصد کاهش داد، که با نتایج مطالعه ما مطابقت داشت؛ نانوذرات تاثیر معنی‌داری بر کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها نداشتند. افزایش درصد کشندگی سلول‌ها پس از انکپسولاسیون داروی پاکلی‌تاکسل درون این نانوذرات به دلیل اثر داروی انکپسوله شده در این نانوذرات بود. همچنین توانایی این نانوذرات در انتقال siRNA با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفت این نتایج نشان دهنده توانایی بالای نانوذرات PSPGP در انتقال همزمان داروی پاکلی-تاکسل و siRNA به سلول‌های Panc-1 بود (۱۲ و ۱) که مشابه با نتایج مطالعه ما بود که نانوذرات MFMNPs از توانایی بالایی در انتقال پاکلی‌تاکسل و siRNA به سلول‌های MCF-7 برخوردارند.

در مطالعه Abebe و همکارانش گزارش شد این ترکیب از خصوصیات منحصر به فردی در رهش دارو در محیط‌هایی با اسیدیته متفاوت برخوردار است (۳) آنها گزارش کردند وجود قطعات PLA در کopolymerهای آمفی‌پتیک سبب محافظت از DNA از عوامل مخرب زا در شرایط فیزیولوژیک می‌گردد این در حالی بود که شرایط اسیدی مانع رهش DNA نمی‌گردد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج بدست آمده توسط Abebe و همکارانش مطابقت داشت به نحوی که با کاهش اسیدیته محیط از ۷/۴ به ۶ سرعت رهش siRNA و همچنین دارو PTX به طور قابل توجهی افزایش یافت. باتوجه به اینکه محیط تومور در مقایسه با بافت نرمال از اسیدیته پایین‌تری برخوردار است بنظر می‌رسد استفاده از PLA به عنوان بخش آبریز در طراحی نانوکوتورها جهت انتقال دارو و ژن، رهش زودهنگام دارو

در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات MFMNPs در انتقال پاکلی‌تاکسل و siRNA به سلول‌های MCF-7 از توانایی بالایی برخوردار هستند. یانگ و همکارانش از نانوذرات دندریمری هدفمند شده با پپتید PTP جهت انتقال همزمان داروی پاکلی‌تاکسل و همچنین siRNA به سلول‌های Panc-1 استفاده کردند. در این تحقیق ابتدا نانوذرات PSPGP سنتز شد سپس جهت تایید صحت سنتز نانوذرات از طیف سنجی NMR استفاده گردید نتایج تحقیقات ایشان نشان داد نانوذرات حاصل از ساختار کروی و اندازه‌ای در حدود ۵۰۰ الی ۱۵۰ نانومتر برخوردار بودند، در مطالعه ما نیز نانوذرات دارای ساختار کروی و از میزان خودتجمعی کمی برخوردار بودند و اندازه نانوذرات هم در حدود 256 ± 26 نانومتر بود. همچنین الگوی رهش دارو از این نانوذرات در دو مرحله رهش انفجاری و رهش پیوسته صورت گرفت به نحوی که بیشتر از ۵۰ درصد از مجموع داروی رهاسازی شده تنها پس از چهار ساعت انکوباسیون کمپلکس PSPGP/siRNA/PTX با بافر فسفات رهاسازی شد. انکپسولاسیون GSH بطور قابل توجهی سرعت رهش دارو را افزایش داد. بطوریکه مجموع دارو پاکلی‌تاکسل رهاسازی شده از نانوذرات PSPGP در مدت زمان ۲۸ ساعت پس از انکوباسیون با بافر فسفات ۳۰ درصد بود درحالیکه انکپسولاسیون GSH در این نانوذرات این مقدار را تا بیش از ۹۰ درصد در مدت زمان مشابه پس از انکوباسیون افزایش داد، در مطالعه ما نیز دارو و siRNA در نانوذرات طی دو مرحله رهش انفجاری و رهش پیوسته انجام گرفت، رهش دارو و siRNA در محیط اسیدی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. سرعت رهش PTX و siRNA در محیط اسیدی به طور قابل توجهی افزایش یافت بطور مثال مجموع میزان رهش PTX پس از سه روز ۵۹ درصد بود این در حالی بود که این میزان در مدت زمان مشابه در محیط اسیدی تا ۹۶ درصد افزایش یافت.

در تحقیق دیگر یووانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ از نانوذرات لیپیدی کاتیونی PcSLN جهت انتقال همزمان پاکلی‌تاکسل و siRNA به سلول‌های KB استفاده کردند. در این تحقیق نانوذرات PcSLN با استفاده از تکنیک انتشار حال تهیه شد. به منظور توانایی این نانوذرات در خشتی-سازی بار منفی siRNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلورسایتمتری جهت بررسی بازده انتقال siRNA استفاده شد. نهایتاً قابلیت نانوذرات بر افزایش کارایی داروی پاکلی‌تاکسل و siRNA بر کشتندگی سلول‌های KB توسط تست MTT مورد آزمون قرار گرفت. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد نانوذرات PcSLN از توانایی خشتی‌سازی بار منفی siRNA برخوردار بودند و در مطالعه ما نیز تصویر ژل آگارز نشان داد زمانی که RNA با نانوذرات MFMNPs برهمکنش داده شد بار آن خشتی شد و در نتیجه حرکت آن به سمت قطب مثبت دستگاه متوقف شد. نتایج دستگاه فلورسایتمتری نشان داد شدت فلورسانس به دلیل غیر فعال سازی ژن GFP توسط siRNA در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات PcSLN بطور قابل توجهی در مقایسه با شاهد کاهش یافت که مشابه با مطالعه ما بود که در آن میزان انتقال siRNA توسط نانوذرات MFMNPs برابر با ۵۸/۶۳ درصد بود و siRNA-FAM فاقد پوشش (کنترل) از قابلیت انتقال به سلول‌های MCF-7 برخوردار نبود. همچنین روند مشابهی در زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با نانوذرات PcSLN حاوی داروی پاکلی‌تاکسل مشاهده شد. به طوریکه میزان زنده‌مانی در سلول‌های تیمار شده با PcSLN در مقایسه با داروی پاکلی‌تاکسل فاقد پوشش به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۰۲۱).

علاوه بر آنچه در بالا ذکر شد تحقیقات مشابه متعددی کارایی انتقال همزمان دارو و siRNA را در اثر بخشی موثرتر دارو به اثبات رسانده‌اند که از جمله این تحقیقات می‌توان به تحقیقات انجام شده توسط ویو و همکارانش در

در بافت طبیعی را به حداقل برساند در حالی که رهش دارو در بافت سرطانی را تسهیل ببخشد. استراتژی انتقال همزمان نوکلئیک اسید و دارو به ویژه به عنوان یک روش درمانی برای سرطان امیدوار کننده است زیرا علائم مختلف بیماری از جمله MDR، مهاجم / متاستاز و مقاومت در برابر آپوپتوز، می‌تواند به یکباره از طریق چنین مکانیسم‌ها مورد هدف قرار گیرد (۶). استفاده همزمان از نوکلئیک اسید و دارو با ایجاد تأثیرات هم‌افزایی سبب بهبود درمان و همچنین کاهش عوارض جانبی دارو می‌گردد. در این استراتژی از هرکدام از نوکلئیک اسید و دارو نیاز به دوز کمتری در مقایسه با زمانی است که تنها از یکی از آنها جهت درمان استفاده می‌گردد. هدف از این عمل، استفاده از نوکلئیک اسید جهت تنظیم سیستم تکثیر سلولی مد نظر است. در این روش سعی بر آن است تا با تنظیم سیستم رونویسی سلول سلول‌های بدخیم را از بین ببرند. در مورد خاص از siRNA، جهت جلوگیری از تولید پروتئین‌های خاص که توسط سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند استفاده می‌گردد. قابلیت نانوذرات MFMNPs در انکسپوله‌سازی و انتقال دارو و siRNA در این تحقیق از روش‌های متعددی از جمله تست MTT، میکروسکوپ فلورسانس و همچنین دستگاه فلورسایتمتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده توانایی بالای این نانوذرات در انتقال همزمان دارو و siRNA به سلول‌های MCF-7 بودند که در مطالعه ما نیز نانوذرات MFMNPs از توانایی بالایی در انتقال پاکلی‌تاکسل و siRNA به سلول‌های MCF-7 برخوردار بودند. همچنین توانایی این نانوذرات در انکسپوله‌سازی نانوذرات مغناطیسی از دیگر موارد مورد ارزیابی در تحقیق حاضر بود. که نتایج حاصل از دستگاه VSM بیانگر الفاء خواص مغنیتیک نانوذرات اکسید آهن به نانوذرات MFMNPs بود که با نتایج مطالعه ما که در آن پوشش نانوذرات اکسید آهن توسط ترکیبات غیرمغناطیسی از قبیل اولوئیک اسید، PLA، کیتوزان و PEG سبب کاهش خواص مغناطیسی این نانوذرات می‌گردد، مشابه بود.

که رهش دارو و siRNA در شرایط اسیدی به طور قابل مشاهده ای در مقایسه با شرایط فیزیولوژیکی بالا بود. باتوجه به اسیدی بودن بافت تومور به نظر می‌رسد این خصوصیت نانوذرات MFMNPs در درمان سرطان مفید واقع گردد اگرچه نتیجه گیری نهایی در این رابطه نیازمند به انجام تحقیقات وسیعی در شرایط In-vivo و بالینی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت های دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل و همچنین از زحمات همکاران مرکز تحقیقات سلول های بنیادی دانشگاه جهت همکاری در این تحقیق، تقدیر و تشکر می‌گردد.

سال ۲۰۱۳، یان و همکارانش در سال ۲۰۱۵، هیو و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد (۶، ۱۹ و ۲۰)

هدفمندی روش های درمانی به سلولهای سرطانی دارای پتانسیل فوق العاده ای است که می تواند در بقای بیمار و کیفیت زندگی تأثیر مثبت داشته باشد. بر اساس گزارشات قبلی استفاده همزمان از داروهای نوکلئیک اسید و همچنین داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی از قابلیت بالایی در کنترل تومور برخوردار هستند. در این تحقیق از قطعات زیست سازگار از قبیل کیتوزان، پلی لاکتیک اسید و پلی اتیلن گلیکول نانوذراتی تهیه شدند که بر اساس نتایج مشاهده شده در این تحقیق از قابلیت انتقال همزمان دارو پاکلی تاکسل و همچنین siRNA برخوردار بودند. الگوی رهش siRNA و پاکلی تاکسل از نانوذرات MFMNPs به شدت وابسته به اسیدیته محیط بود به گونه‌ای

منابع

۱. زارعی‌پور، رفیعی نیام، ضرابی ع و صالحی ح، ۱۳۹۵، طراحی، ساخت، مشخصه یابی و ارزیابی زیستی نانوذرات اکسید آهن پوشش داده شده با پلیمر پرشاخه پلی گلیسرول، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی دوره ۲۹، شماره ۱، ۸۰-۹۱
۲. خادمی س، شکراللهی پ، زندی م، ایرانی ش، ۱۳۹۴، پوشش‌دهی ژلاتین-کیتوسان روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی و بررسی تاثیر آن بر رفتار سلول‌های فیبروبلاست موشی مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی دوره ۲۸، شماره ۴، ۵۱۲-۵۰۰
3. Abebe D G, Kandil R, Kraus T, Elsayed M, Merkel O M, Fujiwara T, 2015, Three-layered biodegradable micelles prepared by two-step self-assembly of PLA-PEI-PLA and PLA-PEG-PLA triblock copolymers as efficient gene delivery system, *Macromolecular Bioscience*, 15(5), 698-711.
4. Gholamin M, Moaven O, Farshchian M, Rajabi-Mashhadi M T, Mahmoudi M, Sankian M, Sazegarnia A, Ghahraman M, Abbaszadegan M R, 2010, Highly efficient transfection of dendritic cells derived from esophageal squamous cell carcinoma patient: Optimization with green fluorescent protein and validation with tumor RNA as a tool for immuno-genetherapy, *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(2), 121-126.
5. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim, L Y, 2002, Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells, *Pharmaceutical Research*, 19(10), 1488-1494.
6. Hu Q, Li W, Hu X, Hu Q, Shen J, Jin X, Zhou, J, Tang G, Chu P K, 2012, Synergistic treatment of ovarian cancer by co-delivery of survivin shRNA and paclitaxel via supramolecular micellar assembly, *Biomaterials*, 33(27), 6580-6591.
7. Ji M, Li P, Sheng N, Liu L, Pan H, Wang C, Cai L, Ma Y, 2016, Sialic Acid-Targeted Nanovectors with Phenylboronic Acid-Grafted Polyethylenimine Robustly Enhance siRNA-Based Cancer Therapy, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(15), 9565-9576.
8. Kapse-Mistry, S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. 2014, Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells, *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1-31.
9. Liao K H, Lin Y S, MacOsco C W, Haynes C L, 2011, Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 3(7), 2607-2615.
10. Liu L, Li Y, Liu H, Fang Y, 2004, Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers, *European Polymer Journal*, 40(12), 2739-2744.

11. Martin-Ortigosa S, Valenstein J S, Lin V S Y, Trewyn B G, Wang K, 2012, Gold functionalized mesoporous silica nanoparticle mediated protein and DNA codelivery to plant cells via the biolistic method, *Advanced Functional Materials*, 22(17), 3576–3582.
12. Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso M J, 2001a, Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, 75(1–2), 211–224.
13. Press D, 2012, Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin- loaded Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers, 511–526.
14. Sawdon A J, Peng C A, 2015, Ring-opening polymerization of ε-caprolactone initiated by ganciclovir (GCV) for the preparation of GCV-tagged polymeric micelles, *Molecules*, 20(2), 2857–2867.
15. Shi S, Zhu X, Guo Q F, Wang Y, Zuo T, Luo F, Qian Z, 2012, Self-assembled mPEG-PCL-g-PEI micelles for simultaneous codelivery of chemotherapeutic drugs and DNA: Synthesis and characterization in vitro, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1749–1759.
16. Sim T, Park G, Min H, Kang S, Lim C, Bae S, Lee E S, Youn Y S, Oh K T, 2017, Development of a gene carrier using a triblock copolyelectrolyte with poly(ethylene imine)-poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol), *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 32(3), 280–292.
17. Wang J, Xu C F, Liu A, Sun C Y, Yang X Z, 2016, Delivery of siRNA with nanoparticles based on PEG--PLA block polymer for cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(12), 464.
18. Wang W, Balk M, Deng Z, Wischke C, Gossen M, Behl M, Ma N, Lendlein A, 2016, Engineering biodegradable micelles of polyethylenimine-based amphiphilic block copolymers for efficient DNA and siRNA delivery, *Journal of Controlled Release*, 242, 71–79.
19. Wei W, Lv P P, Chen X M, Yue Z G, Fu Q, Liu S Y, Yue H, Ma G H, 2013, Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression, *Biomaterials*, 34(15), 3912–3923.
20. Yin T, Wang L, Yin L, Zhou J, Huo M, 2015, Co-delivery of hydrophobic paclitaxel and hydrophilic AURKA specific siRNA by redox-sensitive micelles for effective treatment of breast cancer, *Biomaterials*, 61, 10–25.
21. Yu Y H, Kim E, Park D E, Shim G, Lee S, Kim Y B, Kim C W, Oh Y K, 2012, Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 268–273.
22. Zou S, Cao N, Cheng D, Zheng R, Wang J, Zhu K, Shuai X, 2012, Enhanced apoptosis of ovarian cancer cells via nanocarrier-mediated codelivery of siRNA and doxorubicin, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3823–3835.
23. Zou W, Liu C, Chen Z, Zhang N, 2009, Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA, *Nanoscale Research Letters*, 4(9), 982–992.

Preparation and evaluation of anti-cancer effects of targeted polymer nanoparticles containing paclitaxel and siRNA in MCF-7 breast cancer cell line

Eskanlou H.¹, Farazi N.², Danandeh Baghrabad M.¹, Nedae Shakarab B.³ and Yaghoubi H.¹

¹Dept. of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R. of Iran.

² Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

³ Dept. of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R. of Iran.

Abstract

This study aimed to design and synthesize a magnetic nanoparticle with a high ability to deliver both paclitaxel and siRNA to MCF-7 cells. For this purpose, Chitosan-poly lactic acid-(PEG) polyethylene glycol-(FA) Folic acid copolymer was first synthesized, then it was used to encapsulate iron oxide nanoparticles, paclitaxel, and siRNA-FAM. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were used to investigate the morphology of nanoparticles. Particle size and zeta potential of MFMNPs/siRNA/PTX nanoparticles were also evaluated using dynamic light scattering (DLS). To investigate the biocompatibility of MFMNPs nanoparticles and their ability to co-deliver paclitaxel and siRNA to MCF-7 cells, MTT assay, fluorescence microscope, and flow cytometry were used, respectively. The results of the present research showed that MFMNPs/siRNA/PTX nanoparticles have a spherical structure with particle size and zeta potential of about 250 nm and -9 ± 1.6 mV, respectively. The results of the MTT assay showed that MFMNPs have good biocompatibility and a high potential to deliver paclitaxel to MCF-7 cells. The IC₅₀ values for MFMNPs/PTX and MFMNPs/siRNA/PTX nanoparticles were 76.5 and 78.3 nM, respectively. The results of fluorescence microscopy and flow cytometry of MCF-7 cells treated with MFMNPs showed that the MFMNPs have a high ability to transfer siRNA to MCF-7 cells. These results showed that the amount of siRNA-FAM transfer by MFMNPs nanoparticles to the MCF-7 cells was 58.63%.

Keywords: Paclitaxel, Folic acid, Polymer nanoparticles, siRNA