

key words

Albumin magnetic
nanoparticles

5-fluorouracil

targeted drug delivery

MCF-7 cell line

The Effect of 5-Fluorouracil Loaded Albumin Magnetic Nanoparticles on Viability and Cell Cycle of Human Breast Cancer MCF-7 Cell Line

Zahra Rajabi¹ , Fatemeh Bagheri^{2*} , Seyed Abbas Shojaosadati^{2*}

1. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Research Subject: Breast cancer is one of the most common cancer in the world with the highest mortality rate in women. Chemotherapy is the typical therapy for the cancer. However, it has side effects due to damage to healthy cells. Targeted drug delivery by nano carriers to the cancerous cells reduces the toxic side effects on normal cells. Serum albumin is a widely used drug carrier because of its availability, ease of preparation, and binding ability to various ligands. Attachment of iron oxide nanoparticles to albumin can control their distribution by applying an external magnetic field.

Research Approach: In this study, 5-fluorouracil (5-FU) loaded albumin magnetic nanoparticles were synthesized using the desolvation technique. The produced nanoparticles were characterized in terms of size, surface charge, and drug entrapment, by dynamic light scattering (DLS) and UV-Vis spectrophotometry. The cytotoxic effects of 5-FU-loaded magnetic albumin nanoparticles and free 5-FU on MCF-7 cells were evaluated with the MTT assay. The internalization of nanoparticles in MCF-7 cells was confirmed by Prussian blue staining. Finally, the effects of nanoparticles on cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry using propidium iodide.

Main Results: The mean particle size and zeta potential of 5-FU loaded albumin nanoparticles and albumin magnetic nanoparticles were 220 nm, -25.8 mV, and 221 nm, -28 mV respectively. Drug entrapment efficiency and drug loading efficiency were also, 20%, 1%, and 15%, and 0.06% for albumin nanoparticles and magnetic albumin nanoparticles in turn. The drug-loaded magnetic albumin nanoparticles showed higher cytotoxicity than the free drug on MCF-7 cells. The cell cycle analysis showed more cytotoxicity of albumin nanoparticles in comparison with other groups. According to these results, it can be said that 5-FU loaded magnetic albumin nanoparticles were more effective and deserve further studies in the cancer treatment.

*To whom correspondence should be addressed:

f.bagheri@modares.ac.ir

shoja_sa@modares.ac.ir

اثر نانوذرات آلومین مغناطیسی بارگذاری شده با ۵-فلوروئوراسیل بر زیستایی و چرخه سلولی سلول‌های سرطان سینه رده‌ی سلولی MCF-7

زهرا رجبی^۱، فاطمه باقری^{۲*}، سید عباس شجاع الساداتی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،

ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

موضوع تحقیق: سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع در بین زنان و با نرخ بالای مرگومیر است. شیمی درمانی یکی از راه‌های معمول برای درمان سرطان است؛ ولیکن با اثرگذاری روی بافت‌های سالم اثرات جانبی فراوانی دارد. رسانش هدفمند داروهای ضدسرطان به سلول‌های سرطانی موجب کاهش اثرات جانبی دارو بر سلول‌های سالم می‌شود. آلومین سرم به خاطر در دسترس بودن، آسانی آماده‌سازی و توانایی اتصال به لیگاندهای مختلف به طور وسیع به عنوان حامل دارو استفاده شده است. با اتصال نانوذرات اکسید آهن به آلومین می‌توان توزیع آن را با استفاده از میدان مغناطیسی خارجی کنترل کرد.

روش تحقیق: در این پژوهش نانوذرات آلومین مغناطیسی حاوی داروی ۵-فلوروئوراسیل با روش انحلال زدایی ساخته شد. اندازه، بار سطحی و بارگذاری دارو در نانوذرات تولید شده با استفاده از دستگاه DLS و طیف سنج مرئی-فرابنفش اندازه‌گیری شد. سمیت نانوذرات آلومین مغناطیسی حاوی دارو و داروی آزاد بر سلول‌های MCF-7 با استفاده از روش MTT بررسی شد. ورود نانوذرات به سلول‌های MCF-7 با رنگ آمیزی پراشن بلو (Prussian blue) تأیید شد. در نهایت، تأثیر نانوذرات بر چرخه سلولی و آپوپتوز سلول‌های سرطانی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری و دید پروپیدیوم بررسی شد. **نتایج اصلی:** اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات آلومین و آلومین مغناطیسی بارگذاری شده با دارو به طور میانگین به ترتیب ۲۲۰ نانومتر، ۲۵/۸- میلی‌ولت و ۲۲۱ نانومتر، ۲۸- میلی‌ولت به دست آمد. بازده بارگذاری دارو در نانوذرات آلومین و آلومین مغناطیسی به ترتیب ۱٪ و ۶٪ و مقدار داروی به دام افتاده به ترتیب برابر با ۲۰٪ و ۱۵٪ بود. نانوذرات آلومین مغناطیسی حاوی دارو در مقایسه با داروی آزاد سمیت بیشتری را در سلول‌های سرطانی نشان داد. نتایج واکاوی چرخه سلولی سمیت بیش‌تر نانوذرات آلومینی حاوی دارو را در مقایسه با گروه‌های دیگر تأیید کرد. با توجه به نتایج، نانوذرات آلومین مغناطیسی حاوی داروی ۵-فلوروئوراسیل در از بین بردن سلول‌های سرطانی موثر هستند و می‌توانند در مطالعات مرتبط با درمان سرطان مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی

نانوذرات آلومین مغناطیسی

داروی ۵-فلوروئوراسیل

دارورسانی هدفمند

رده‌ی سلولی MCF-7

*مسئول مکاتبات:

f.bagheri@modares.ac.ir

shoja_sa@modares.ac.ir

۱ مقدمه

سرطان دومین عامل مرگومیر در جهان است. بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی پیش‌بینی می‌شود که میزان مرگومیر ناشی از سرطان طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۳۰ تا ۴۵٪ افزایش یابد [۱، ۲]. در این بیماری سلول‌های بدن به طور غیرعادی تقسیم و تکثیر یافته و به سمت بافت‌های سالم منتشر می‌شوند. سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیا است و به عنوان مهم‌ترین دلیل مرگ ناشی از سرطان در خانم‌ها مطرح است. از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است، با این حال میزان مرگومیر در این بیماران بالا است که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد [۳]. با توجه به افزایش شیوع سرطان، مرگومیر ناشی از آن و ضعف روش‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در درمان سرطان پیشرفته، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای مقابله با سرطان احساس می‌شود. در حال حاضر عامل محدودکننده در شیمی‌درمانی سرطان، عدم انتخابی بودن داروها در مقابله با سلول‌های سرطانی است. از طرفی در خلال شیمی‌درمانی برخی از سلول‌ها به درمان مقاوم می‌شوند که برای رفع این مشکل لازم است دوز دارو را در حین درمان افزایش داد یا از چند دارو به طور هم‌زمان استفاده کرد. اما با این تدابیر سمیت دارو افزایش می‌یابد. برای کم کردن این عوارض و بهبود عملکرد داروهای موجود، انواع سامانه‌های دارورسانی توسعه یافته‌اند [۴]. در سال‌های اخیر نانوفناوری جدیدترین راهکار در درمان سرطان است [۱]. در حقیقت نانوفناوری امکان رسانش داروها را با حامل‌های در ابعاد نانو فراهم می‌سازد. محققان با استفاده از نانوفناوری، در حال ساخت نانوسامانه‌هایی هستند که علاوه بر اندازه‌ی نانو قدرت تشخیص بافت‌های ناسالم را داشته و به طور اختصاصی روی این بافت‌ها قرار گرفته و مقدار داروی لازم را به آن‌ها می‌رسانند. از جمله ویژگی‌های نانوحامل‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: سهولت تهیه با هزینه پایین، زیست‌تخریب‌پذیری، کوچک بودن ابعاد، قابلیت بارگیری بالا، زمان گردش خون طولانی و توانایی تجمع در محل مورد نظر [۵، ۱].

نانوذرات پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار کاربرد زیادی در سامانه‌های انتقال دارو دارند. در میان این سامانه‌های پلیمری آن‌هایی که بر پایه پروتئین هستند کاربرد بیش‌تری دارند. پروتئین‌ها دسته‌ای از درشت‌مولکول‌های طبیعی هستند که دارای ساختار منحصربه‌فرد بوده و کاربرد بالقوه‌ای در زمینه زیستی دارند. نانومواد به دست‌آمده از پروتئین‌ها، زیست‌تخریب‌پذیر، غیرسمی هستند و سامانه ایمنی را تحریک نمی‌کنند و پایداری بالایی دارند [۶ و ۷].

نانوذرات ساخته شده از آلومین سرم دارای قابلیت بالای بارگذاری دارو و اثرات جانبی بسیار ناچیز بر روی بافت‌های غیرسرطانی هستند. همچنین این نانوذرات زیست‌تخریب‌پذیر هستند و روش تهیه آن‌ها ساده است. آلومین سرم گاوی حامل مناسبی برای دارو است و نانوذرات به‌دست آمده از آن نیز به خوبی با بدن انسان سازگار هستند. با توجه به بار منفی آلومین در pH طبیعی بدن، مشکلاتی از قبیل حذف سریع از جریان خون که در ذرات با بار مثبت دیده می‌شود در مورد آن مطرح نیست. به‌علاوه سطح نانوذرات آلومینی گروه‌های متعدد آمین و کربوکسیل دارد که برای اتصال کوالانسی دارو یا پروتئین مناسب است [۸-۱۰].

استفاده از نانوذرات با خاصیت مغناطیسی مانند اکسید آهن به همراه نانوذرات پروتئینی این امکان را فراهم می‌کند که حرکت نانوذرات در داخل خون توسط میدان مغناطیسی خارجی کنترل شود و به طور هدفمند به بافت هدف سوق داده شود. نانوذرات اکسید آهن کاربرد زیست‌پزشکی گسترده‌ای نسبت به سایر نانوذرات مغناطیسی دارند و برای استفاده بالینی توسط سازمان غذا و دارو تأیید شده است. این ویژگی‌های مطلوب عبارتند از تهیه آسان و تک‌مرحله‌ای، پایداری شیمیایی در شرایط فیزیولوژیکی، امکان اصلاح شیمیایی توسط پوشش هسته اکسید آهن با پوسته‌های مختلف، دارا بودن خواص سوپراپارامغناطیسی و از طرفی دیگر اکسید آهن به صورت مگنتیت (Fe_3O_4) و مگهمیت ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) به طور طبیعی در قلب، طحال و کبد وجود دارد که زیست‌سازگاری و غیر سمی بودن آن‌ها را در شرایط فیزیولوژیکی نشان می‌دهد [۱۱-۱۴].

نانوکره‌های آلومین مغناطیسی حاوی داروی دوکسوروبیسین توسط زیبک و همکاران در سال ۲۰۱۴ با روش انحلال‌زدایی ساخته شد و اثر سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی PC۳ و A۵۴۹ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد که نانوکره‌های آلومین مغناطیسی حاوی دوکسوروبیسین نسبت به داروی آزاد سمیت بیش‌تری بر روی سلول‌های نامبرده دارند و مرگ سلولی بیش‌تری مشاهده می‌شود که نشان از کارآمدی این نانوسامانه‌ها دارد [۱۵].

در این پژوهش چهار نوع نانوذره آلومین (BSA)، آلومین حاوی دارو ۵-فلوروپوراسیل (BSA-۵FU)، آلومین مغناطیسی (M-BSA)، آلومین مغناطیسی حاوی دارو ۵-فلوروپوراسیل (M-BSA-۵FU)، با روش انحلال‌زدایی ساخته شد. دارو ۵-فلوروپوراسیل به طور گسترده‌ای در شیمی‌درمانی سرطان‌هایی مانند سینه، روده و سرطان‌های ناحیه سر و گردن استفاده می‌شود. ساختار ۵-فلوروپوراسیل به باز پیریمیدین شباهت دارد و همین امر باعث می‌شود که سلول‌های سرطانی آن

ساخته شده توسط دستگاه DLS اندازه گیری شد.

۲-۲-۲ تهیه نانوذرات آلبومین مغناطیسی و نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو

نانوذرات آلبومین مغناطیسی مطابق روش مورد استفاده برای سنتز نانوذرات آلبومین تهیه شد با این تفاوت که قبل از قرار دادن بر روی همزن تعلیق نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با غلظت $2/79 \text{ mg/mL}$ به محلول افزوده و فرا آواهی شد. روش تولید نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو نیز مانند حالت قبل است. در نهایت سانتریفیوژ با دور $2500 \times g$ و به مدت ۲۰ دقیقه برای جدا سازی ذرات انجام گرفت. اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده توسط دستگاه DLS اندازه گیری شد.

۲-۲-۳ بررسی بازده بارگذاری و به دام افتادن دارو در داخل نانوذرات

به منظور محاسبه میزان بارگذاری و درصد به دام افتادگی دارو، بعد از تشکیل ذرات توسط سانتریفیوژ جدا شده و رومانید برای جداسازی ذرات اکسید آهن به جا مانده دوباره سانتریفیوژ شد. سپس جذب رومانید در ۲۶۶ نانومتر برای تعیین داروی وارد نشده در نانوذرات با استفاده از طیفسنج نوری خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد دارو، میزان دارو آزاد محاسبه شد. شایان گفتن است که آلبومین در طول موج ۲۸۰ نانومتر در دستگاه UV-Vis قله دارد و هیچ تداخل قله ای با داروی ۵-فلوروپوراسیل ندارد [۱۸].

بازدهی بارگذاری دارو و بازدهی به دام افتادگی دارو به ترتیب با استفاده از روابط (۱) و (۲) تعیین شد.

$$(1) \quad \text{وزن داروی موجود در نانوذرات} \times 100 = \frac{\text{بازدهی به دام افتادگی دارو}}{\text{وزن اولیه دارو}}$$

$$(2) \quad \text{وزن داروی موجود در نانوذرات} \times 100 = \frac{\text{بازدهی بارگذاری دارو}}{\text{وزن نانوذرات}}$$

۲-۲-۴ بررسی سمیت نانوذرات بر سلول های سرطان سینه رده MCF-۷ با استفاده از تست MTT

در این مرحله از سلول های سرطان سینه، رده ی سلولی MCF-۷ استفاده شد که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS برای رشد و تکثیر سلولی استفاده شد. به منظور بررسی اثر نانوذرات بر میزان مرگومیر سلولی، سلول ها پس از جدا شدن از کف ظرف داخل ظروف ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند. ابتدا غلظت IC_{50} دارو با استفاده از MTT بدست

را در روند تکثیر خود راه دهند و به موجب آن توقف تکثیر سلولی و در نهایت مرگ سلولی رخ می دهد [۱۶]. نانوذرات ساخته شده از نظر میانگین اندازه، پتانسیل زتا، بازدهی بارگذاری دارو و بازدهی به دام افتادگی دارو بررسی شدند و سپس تأثیر این نانوسامانه ها بر مرگ سلول های سرطانی سینه رده ی MCF-۷ و چرخه سلولی بررسی شد و آزمون پراشن بلو برای بررسی نفوذ ذرات آهن به درون سلول نیز انجام گرفت.

۲- تجربی

۲-۱ مواد

پودر آلبومین سرم گاوی جزء V با درصد خلوص ۹۸٪، محلول آبی گلو تار آلدهید، داروی ۵-فلوروپوراسیل، پودر MTT، محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO)، پتاسیم فروسیناید، دیدید پروپیدوم برای واکاوی چرخه سلولی از سیگما آلد ریچ خریداری شدند. نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن از پلاسما کم و رده ی سلولی سرطان سینه MCF-۷ از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. محیط کشت اختصاصی DMEM، و سرم جنین گاوی (FBS) از گیبکو خریداری شد.

۲-۲ دستگاه ها و روش ها

۲-۲-۱ تهیه نانوذرات آلبومین و نانوذرات آلبومین حاوی دارو

نانوذرات آلبومین با استفاده از روش انحلال زدایی ساخته شد [۱۷]. در ابتدا محلول آلبومین به غلظت mg/mL ۱۰۰ در محلول سدیم کلرید ۱۰ میلی مولار تهیه شد و pH آن با استفاده از سدیم هیدروکسید تا ۸/۲ تنظیم شد. محلول بر روی همزن مغناطیسی با دور ۵۵۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. برای تشکیل نانوذرات، اتانول (به عنوان عامل انحلال زدا) با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه توسط پمپ سرنگی به محلول فوق افزوده شد. این افزودن تا جایی ادامه یافت که رنگ محلول از شفاف به کدر تغییر کند که نشانه ای از تشکیل نانوذرات پروتئینی است. برای پایدار کردن نانوذرات تشکیل شده، ۰/۵ میکرو لیتر گلو تار آلدهید ۸٪ به ازای هر میلی گرم از پروتئین موجود، به محلول افزوده شد. محلول حاصل برای تکمیل واکنش پایداری به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق و دور ۵۵۰ دور بر دقیقه نگه داشته شد.

روند تولید نانوذرات حاوی دارو همانند روش به کار گرفته شده در تولید نانوذرات آلبومین است. با این تفاوت که دارو با غلظت 2 mg/mL به محلول آلبومین اضافه و محلول حاصل برای انجام فعل و انفعال بین دارو و پروتئین مدتی در دمای اتاق نگه داری شد. در نهایت پودر نانوذرات طی فرایند خشک کردن با خشک کن انجمادی به دست آمد. اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات

چاهک اضافه شد تا سلول‌ها تثبیت شوند (برای تهیه فرمالین ۱۰٪ از بافر فسفات استفاده شد). پس از ۲۰ دقیقه، فرمالین از روی سلول‌ها برداشته و یک میلی‌لیتر از محلول پراشن بلو که شامل پتاسیم فروسیانید ۵٪ و هیدروکلریدریک اسید ۵٪ است به چاهک‌ها اضافه شد و برای چند دقیقه در زیر هود قرار گرفت تا نقاط آبی رنگ در چاهک‌ها پدیدار شود. سلول‌ها دو بار با PBS شستشو داده شد و سپس توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد.

۲-۲-۷ واکاوی چرخه سلولی

ابتدا حدود ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک ظرف ۶ خانه‌ای کشت داده شد و سپس برای چسبیدن سلول‌ها و پایدار شدن آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، رومانند سلول‌ها تخلیه و سلول‌ها با گروه‌های مختلفی از نانوذرات مانند نانوذرات آلبومین، نانوذرات آلبومین حاوی دارو، نانوذرات آلبومین مغناطیسی و نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو و نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن و دارو تیمار شد و مجدداً ظروف حاوی نانوذرات به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از جداسازی سلول‌ها از کف ظرف و سانتریفیوژ کردن سلول‌ها، ۴ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ برای تثبیت سلول‌ها به فالكون حاوی سلول‌ها اضافه شد و برای مدت ۱۲ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد از آن فالكون حاوی سلول و اتانول را به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و پس از خالی کردن محیط رویی، حدود ۵۰۰ میکرولیتر محلول حاوی یدید پروپیدیوم (PI) با غلظت ۱۰ μg/ml و RNase با غلظت ۱۰۰ μg/ml را به سلول‌ها اضافه کرده و توسط دستگاه فلوسایتمتری واکاوی صورت گرفت و سپس با استفاده از نرم‌افزار Flowing Software، درصد جمعیت سلولی در فازهای مختلف چرخه سلولی محاسبه شد [۱۹].

۲-۲-۸ تحلیل آماری

آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. معناداری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-۱۳ و روش One-Way ANOVA و Post-hoc بررسی و مقدار $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ مشخصه‌یابی نانوذرات

اندازه و بار سطحی نانوذرات سنتز شده توسط دستگاه واکاوی اندازه ذرات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که مشاهده

آمد. برای بررسی اثر نانوذرات بر زیستایی، سلول‌ها مطابق روش بالا در ظروف کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، محیط با محیط حاوی نانوذرات اشاره شده جایگزین شد. دارو آزاد و نانوذرات با غلظت IC₅₀ دارو به هر چاهک اضافه شد. گروه کنترل، محیط کشت پایه حاوی ۱۰ درصد FBS را دریافت کرد. سپس ظروف کشت در انکوباتور CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. به منظور بررسی تأثیر زمان در معرض بودن نانوذرات در میزان مرگ سلولی، نانوذرات در زمان‌های متفاوت از روی سلول‌ها برداشته شدند. بدین ترتیب بعد از یک، پنج و ۴۸ ساعت محیط حاوی نانوذرات و دارو از روی سلول‌ها خارج شدند و محیط تازه جایگزین شد و سپس بررسی زنده‌مانی در هر کدام از گروه‌ها ۴۸ ساعت بعد از تیمار انجام گرفت. بدین منظور بعد از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت رویی همه‌ی چاهک‌ها تخلیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml به همراه محیط کشت با نسبت ۱ به ۵ به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس محیط خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO برای حل کردن بلورهای آبی فورمازون تشکیل شده اضافه شد. پس از ۵ دقیقه ظروف حاوی نمونه‌ها در دستگاه الایزا ریدر قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد سلول‌های زنده در هر گروه نسبت به گروه کنترل محاسبه شد.

۲-۲-۵ عکس‌برداری سلول‌های تیمار شده با نانوذرات توسط میکروسکوپ نوری

در این مرحله پس از کشت سلولی درون ظروف ۱۲ خانه و اضافه کردن نانوذرات به سلول‌ها، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان اثرگذاری نانوذرات و دارو، از سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد.

۲-۲-۶ آزمون رنگ‌آمیزی پراشن بلو برای بررسی ورود نانوذرات

برای انجام این آزمون، ۵۰۰۰ سلول به همراه یک میلی‌لیتر محیط کشت درون هر چاهک ظروف ۱۲ خانه ریخته شد. پس از آن ظروف به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به کف ظرف بچسبند. پس از آن رومانند هر کدام از چاهک‌ها برداشته شده و برطبق گروه‌های مورد نظر تیمار در هر یک از چاهک‌ها انجام شد. ظروف به مدت ۵ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۵ ساعت از تیمار سلول‌ها توسط نانوذرات، محیط کشت سلولی با دقت و به آرامی از روی سلول‌ها برداشته شد. سپس یک میلی‌لیتر فرمالین ۱۰٪ حجمی به هر

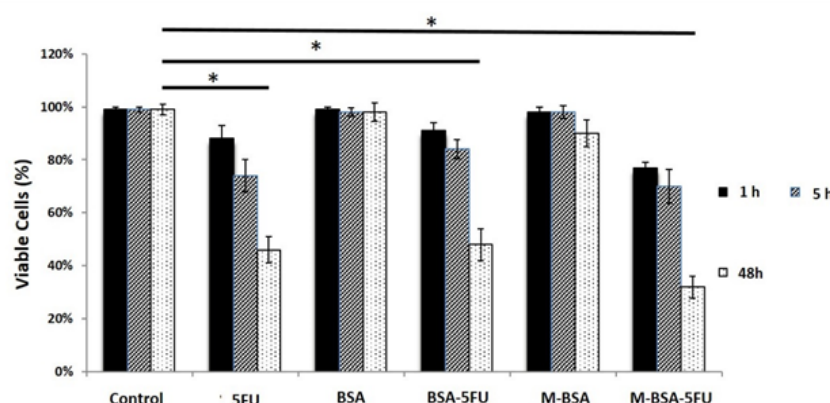
جدول ۱ قطر، پتانسیل زتا و ضریب پراکندگی نانوذرات
Table 1 The diameter, zeta potential and polydispersity index of nanoparticles

	Particles diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Polydispersity index
BSA	140	-22	0.099
BSA-5FU	220	-25.8	0.18
M-BSA	189	-24	0.127
M-BSA-5FU	221	-28	0.185

در این بخش تأثیر زمان در از بین بردن سلول‌ها با سامانه‌های مورد بررسی در زنده‌مانی سلول‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت، به این صورت که محیط تیمار بعد از یک ساعت، ۵ ساعت و ۴۸ ساعت از روی سلول‌ها خارج شد و محیط، جایگزین آن‌ها شد و سپس آزمون MTT بعد از ۴۸ ساعت برای آن‌ها انجام گرفت.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در گروه‌های نانوذرات آلومین و نانوذرات آلومین مغناطیسی به طور تقریبی همه سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات در زمان‌های مختلف زنده هستند که نشان‌دهنده‌ی

می‌شود میانگین اندازه به‌دست آمده در گستره مناسب برای دارورسانی قرار دارد و همچنین بار سطحی ذرات نیز منفی است که آن‌ها را قادر به دور ماندن از سامانه ایمنی بدن می‌سازد [۲۰]. ضریب پراکندگی اندازه نانوذرات در گستره قابل قبول (۰/۰۹-۰/۱۸) قرار دارد که خود نشان‌دهنده توزیع مناسب اندازه‌ی ذرات است [۲۱]. با استفاده از منحنی استاندارد داروی ۵-فلوروپوراسیل و روابط (۱) و (۲) درصد داروی بارگذاری شده و داروی به دام افتاده تعیین شد. بازدهی بارگذاری دارو در نانوذرات آلومین حاوی دارو ۱٪ و بازدهی به دام افتادگی دارو ۲۰٪ و در نانوذرات آلومین مغناطیسی



شکل ۱ درصد زنده‌مانی سلول‌های MCF-۷ در مواجهه با نانوذرات در زمان‌های مختلف (۱، ۵ و ۴۸ ساعت). علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنادار از نظر آماری بین گروه‌های مشخص شده و کنترل در ۴۸ ساعت است ($P < 0.05$).

Fig. 1 The viability percentage of MCF-7 cells exposed to nanoparticles in different time-points (5, 1 and 48 h). * ($P < 0.05$) shows there is a statistically significant difference between the marked groups.

عدم سمیت این گروه از نانوذرات بر روی سلول است. در گروه‌های نانوذرات آلومین حاوی دارو، نانوذرات آلومین مغناطیسی حاوی دارو و داروی آزاد به ترتیب در زمان یک ساعت ۹٪، ۲۳٪ و ۱۲٪ مرگ سلولی مشاهده می‌شود و می‌توان به این نتیجه رسید که نانوذرات آلومین حاوی دارو در از بین بردن سلول‌های سرطانی کارآمدتر از گروه‌های دیگر است. تحت شرایط استرس سلولی مثلاً رشد سریع سلول‌های توموری، آلومین به‌عنوان منبع اسیدآمین و آرد سلول می‌شود. برخی

حاوی دارو به ترتیب ۰/۶٪ و ۱۵٪ به‌دست آمد.

۲-۳ بررسی سمیت سلولی

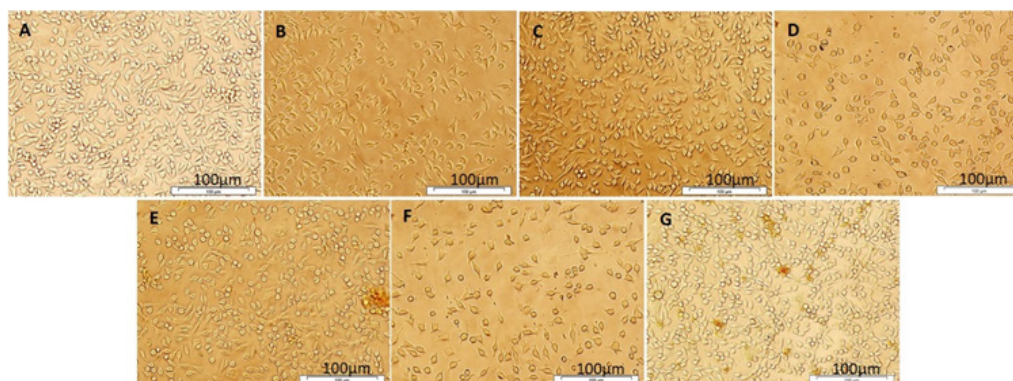
با استفاده از تست MTT مقدار IC_{50} داروی ۵-فلوروپوراسیل بعد از ۴۸ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی MCF-۷ تقریباً برابر با ۱۰۰ میکرومولار به‌دست آمد. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده، سامانه‌های مختلف حاوی دارو با مقدار داروی معادل ۱۰۰ میکرومولار برای بررسی سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

به گروه‌های دیگر داشته است. از آن‌جا که رهایش دارو از نانوحامل‌ها، رهایشی آرام و قابل کنترل است با مقایسه نمودارها در سه بازه‌ی زمانی یک، پنج و ۴۸ ساعت تیمار مشخص است که با گذشت زمان میزان داروی بیش‌تری از نانوحامل‌ها در محیط آزاد شده است که به مرور زمان مرگ سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد. این نکته ویژگی مثبتی برای نانوحامل طراحی شده محسوب می‌شود. بنابراین، می‌توان انتظار داشت که پس از تزریق نانوحامل‌ها به سامانه گردش خون، رهایش انفجاری که منجر به سمیت بالا برای سایر سلول‌های سالم شود، رخ ندهد و پس از هدایت نانوذرات مغناطیسی حاوی دارو توسط میدان مغناطیسی خارجی به سطح سلول‌های سرطانی رهایش دارو به تدریج ادامه یابد.

۳-۳ تصاویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با نانوذرات

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در گروه کنترل (A) تعداد سلول‌ها بسیار زیاد و مورفولوژی سلول‌ها تقریباً به صورت کشیده است. در گروه‌های نانوذرات آلبومین (C)، نانوذرات آلبومین مغناطیسی (E) و نانوذرات مغناطیسی (G) به طور تقریبی تعداد سلول‌ها و همچنین مورفولوژی آن‌ها مشابه گروه کنترل است که نشان‌دهنده این است که نانوذرات به تنهایی سمیتی بر روی سلول‌ها ندارند و زیست‌سازگار هستند. در گروه‌های داروی آزاد (B)، نانوذرات آلبومین

تحقیقات نشان داده‌اند آلبومین از طریق اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند. سازوکار دقیق و گیرنده‌ای که در این فرایند دخیل هست هنوز به طور دقیق شناسایی نشده است. ورود نانوذرات آلبومین به سلول‌های سرطانی از طریق اتصال آلبومین به پروتئین‌های آلبونیدین ۱ و SPARK2 تسهیل می‌شود. آلبونیدین گلیکوپروتئین غشایی با وزن مولکولی ۶۰ کیلودالتون است که با نام gp۶۰ نیز شناخته می‌شود و تمایل زیادی برای اتصال به آلبومین دارد. این گیرنده روی سلول‌های اندوتلیال رگ‌های توموری قرار دارد و اجازه می‌دهد آلبومین از اندوتلیوم پیوسته از طریق ترانسیتوز عبور کند. SPARK یک گلیکوپروتئین ترشحی اسیدی و غنی از سیستئین، با وزن مولکولی ۴۳ کیلودالتون است. بیان بیش از حد آن در سلول‌های توموری موجب تجمع آلبومین در فضای توموری می‌شود [۲۲، ۲۳]. در بازه زمانی ۵ ساعت، همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، به دلیل این که زمان قرار گرفتن نانوذرات و دارو در مجاورت سلول‌های سرطانی افزایش یافته، میزان مرگ سلولی برای هر سه گروه نانوذرات آلبومین حاوی دارو، نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو و داروی آزاد بیش از حالت قبل است که به ترتیب برابر با ۱۶٪، ۳۰٪، ۲۶٪ است. در گروه آخر نانوذراتی که به سلول‌ها اضافه شده بود بعد از ۴۸ ساعت از روی سلول‌ها برداشته شده و سپس آزمون MTT انجام شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود میزان مرگ سلولی در گروه‌های آلبومین حاوی دارو، آلبومین مغناطیسی

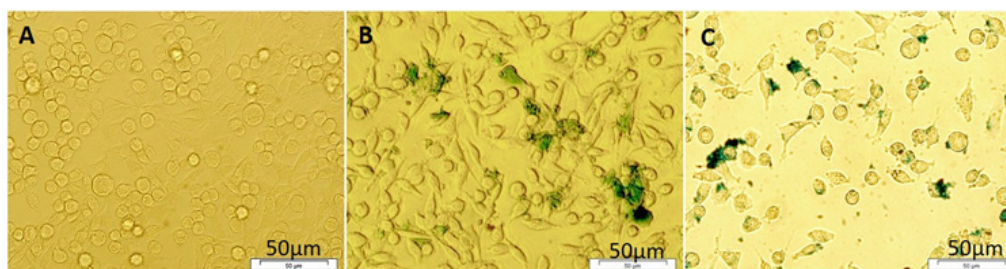


شکل ۲ تصاویر میکروسکوپی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات بعد از ۴۸ ساعت. (A) کنترل (B) داروی ۵-FU، (C) نانوذرات آلبومین، (D) نانوذرات آلبومین حاوی دارو، (E) نانوذرات آلبومین مغناطیسی، (F) نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو و (G) نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن

Fig. 2 Microscopy images of MCF-7 cells treated with nanoparticles after 48h. A) Control, B) 5-FU, C) BSA, D) BSA-5FU, E) M-BSA, F) M-BSA-5FU, and G) M

حاوی داروی ۵-فلوروپوراسیل (D) و نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی داروی ۵-فلوروپوراسیل (F) همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد سلول‌ها کاهش یافته و مورفولوژی برخی سلول‌ها به حالت کروی درآمده است و در حال جدا شدن از سطح هستند که نشان-

حاوی دارو و داروی آزاد بعد از گذشت ۴۸ ساعت از مجاورت نانوذرات با سلول‌ها به شدت افزایش یافته است که به ترتیب برابر با ۵۲٪، ۶۸٪ و ۵۴٪ است و در این قسمت هم نانوسامانه آلبومین مغناطیسی حاوی دارو به طور معناداری بیش‌ترین مرگ سلولی را نسبت



شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی از سلول‌ها بعد از رنگ آمیزی پراشن بلو، (A) گروه کنترل، (B) گروه نانوذرات آلبومین مغناطیسی و (C) گروه نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو

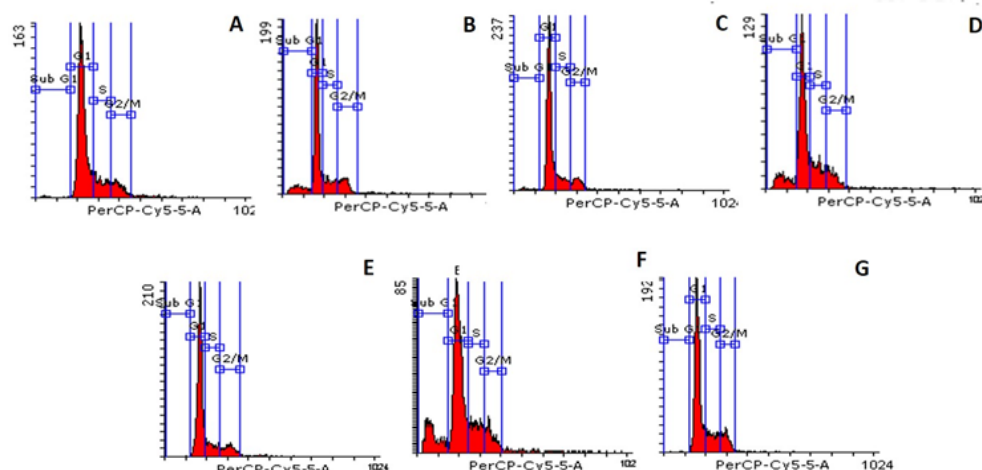
Fig. 3 the Microscopic images of cells after Prussian blue staining. A) Control, B) M-BSA, and C) M-BSA-5FU

نمودارها در شکل ۴ درصد جمعیت سلولی در فازهای مختلف چرخه سلولی را در اثر تیمار با نانوذرات مختلف و داروی آزاد نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، تغییرات مشخص و محسوسی در جابجایی پراکنش سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی در مقایسه با چرخه سلولی گروه کنترل (A) مشاهده نمی‌شود و البته در گروه‌های داروی آزاد (B)، نانوذرات آلبومین حاوی دارو (D) و نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو (F) فاز Sub G1 مشاهده می‌شود که بیانگر مرگ سلولی در این گروه‌ها است. در طی آپوپتوز DNA کروموزومی توسط آنزیم اندونوکلاز

دهنده مرگ سلولی است. از طرفی تصاویر گویای آن است که در گروه نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو مرگ سلولی بیش‌تری دیده می‌شود که نشان از کارآمدی این نانو سامانه نسبت به داروی آزاد است.

۳-۴ نتایج رنگ آمیزی پراشن بلو

در این بخش به بررسی ورود (اندوسیتوز) نانوذرات مغناطیسی به سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی پراشن بلو پرداخته شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در گروه کنترل (A) هیچ رنگ آبی دیده نمی‌شود اما در قسمت‌های B و C که گروه-



شکل ۴ نمودارهای چرخه سلولی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات بعد از ۴۸ ساعت. (A) کنترل، (B) داروی ۵-FU، (C) نانوذرات آلبومین، (D) نانوذرات آلبومین حاوی دارو (E) نانوذرات آلبومین مغناطیسی، (F) نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو (G) نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن
Fig. 4 Cell cycle graphs of MCF-7 treated with nanoparticles after 48h. A) Control, B) 5FU, C) BSA, D) BSA-5FU, E) M-BSA, F) M-BSA-5FU, and G) M

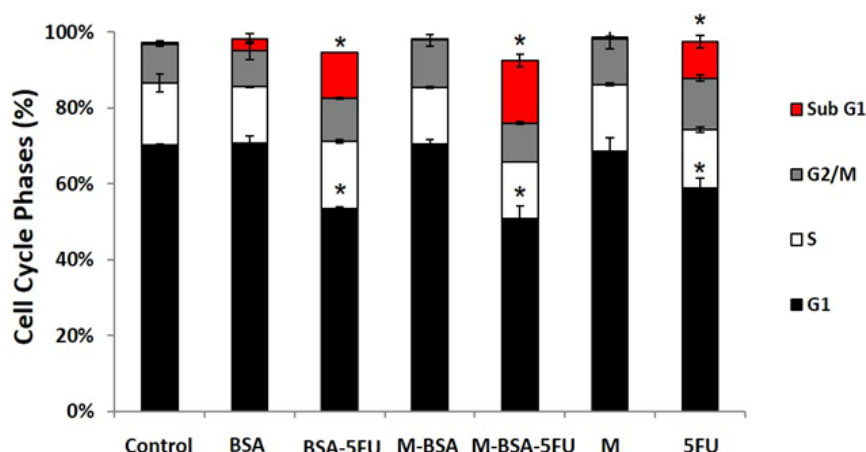
به قطعات نوکلئوزومی شکسته می‌شود که معمولاً با فاز Sub G1 در چرخه سلولی مشخص می‌شود و نشان‌دهنده مرگ سلولی است [۲۴].

همچنین با مقایسه نمودارهای مختلف در شکل ۵ مشخص است که درصد مرگ سلولی در گروه نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو بیش از بقیه گروه‌ها است که خود تأییدی بر نتایج قبلی این پژوهش است. صالح و همکاران تأثیر داروی ۵-فلوروپوراسیل آزاد بر روی چرخه سلولی چند رده‌ی سلولی از جمله MCF-7 مورد بررسی قرار دادند و تغییر زیادی در توزیع فازها

های نانوذرات آلبومین مغناطیسی و نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو هست ورود این نانوذرات به درون سلول کاملاً مشهود است که این نشان‌دهنده این است که این نانوذرات می‌توانند وارد سلول‌ها شوند.

۳-۵ واکاوی چرخه سلولی

برای تحقیق در مورد بررسی تأثیر نانوذرات آلبومین به همراه دارو بر پیشرفت چرخه سلولی و همچنین آپوپتوز، تأثیر آن‌ها بر توزیع چرخه سلولی با استفاده از PI و دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۵ درصد فازهای چرخه سلولی سلول‌های MCF-7 در مواجهه با نانوذرات بعد از ۴۸ ساعت. علامت * نشان دهنده تفاوت معنادار از نظر آماری بین گروه‌های مشخص شده و کنترل است ($P < 0.05$).

Fig. 5 The phase composition percentage of MCF-7 cells treated with nanoparticles after 48h. * ($P < 0.05$) shows there is a statistically significant difference between the marked groups and control.

شده محسوب می‌شود که رهایش آرام و تدریجی دارو از نانوذرات را نشان می‌دهد که نتایج حاصل از پژوهش کوچک‌زاده و همکاران را تأیید می‌کند [۱۰]. در آزمون پراشن بلو ورود نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو به درون سلول سرطانی تأیید شد. واکاوی چرخه سلولی، سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نشان می‌دهد که تغییرات مشخص و محسوس در جابجایی پراکنش سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی مشاهده نمی‌شود. البته برای نانوذرات آلبومین حاوی دارو، نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو و داروی آزاد، فاز Sub G1 مشاهده می‌شود که بیانگر مرگ سلولی در این گروه‌ها است و درصد فاز Sub G1 در نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو بیش از گروه‌های دیگر است. با توجه به نتایج حاصل شده نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو توانایی بالقوه‌ای در دارورسانی هدفمند مغناطیسی در درمان سرطان دارند.

مشاهده نکردند [۲۵].

۴ نتیجه‌گیری

نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی داروی ۵-فلوروئوراسیل که در این پژوهش ساخته شد رویکرد جدیدی را در درمان سرطان باز می‌کند. اندازه میانگین نانوذرات تولید شده در محدوده ۱۴۰ تا ۲۲۱ نانومتر به دست آمد که مناسب برای هدفمندسازی است و پتانسیل زتای نانوذرات در محدوده ۲۲- تا ۲۸- میلی‌ولت است که بار منفی سطحی نانوذرات، به دور ماندن آن‌ها از سامانه ایمنی بدن کمک می‌کند. نتایج آزمایش‌های سمیت سلولی، مرگ سلولی بیش‌تری را برای نانوذرات آلبومین مغناطیسی حاوی دارو نسبت به داروی تنها و نانوذرات ساخته شده دیگر با غلظت یکسان دارو نشان داد. با گذشت زمان میزان داروی بیش‌تری از نانوحامل‌ها در محیط آزاد می‌شود که به مرور زمان مرگ سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد که همین نکته، ویژگی مثبتی برای نانوحامل طراحی

مراجع

- [1] Hossen S., Hossain M.K., Basher M., Mia M., Rahman M., Uddin M.J. Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review. *Journal of Advanced Research* 2019 ,18-15:1
- [2] Ak G., Yilmaz H., Sanlier S.H. Preparation of Magnetically Responsive Albumin Nanospheres and in vitro Drug Release Studies. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2014 ,26-42:18
- [3] Armstrong K., Eisen A., Weber B. Assessing the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2000 ,71-342:564
- [4] Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003 ,47-55:329
- [5] Singhvi G., Rapalli V.K., Nagpal S., Dubey S.K., Saha R.N. Nanocarriers as Potential Targeted Drug Delivery for Cancer Therapy. *Nanoscience in Medicine* 2020 ,88-51 ,88-1:51
- [6] Lohcharoenkal W., Wang L., Chen Y.C., Rojanasakul Y. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International* , 2014 ,12-1
- [7] Martínez-López A.L., Pangua C., Reboredo C., Campión R., Morales-Gracia J., Irache J.M. Protein-Based Nanoparticles for Drug Delivery Purposes. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020 ,119289 :581
- [8] Karami E., Behdani M., Kazemi-Lomedasht F. Albumin Nanoparticles as Nanocarriers for Drug Delivery: Focusing on Antibody and Nanobody Delivery and Albumin-Based Drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2020 ,55:101471
- [9] Ulbrich K., Michaelis M., Rothweiler F., Knobloch T., Sithisarn P. Interaction of Folate-Conjugated Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles with Tumour Cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2011 ,34-406:128
- [10] Kouchakzadeh H., Hoseini M.S., Shojaosadati S. Simultaneous Loading of -5Fluorouracil and SPIONs in HSA Nanoparticles: Optimization of Preparation, Characterization and in vitro Drug Release Study. *Nanomedicine Journal* 2016 ,42-35 :(1)3
- [11] Andrade Â., Ferreira R., Fabris J., Domingues R. Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. *Biomedical Engineering—Frontiers and Challenges*, 2011
- [12] Estelrich J., Escribano E., Queralt J., Busquets M.A. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* 2015 ,101-16:8070
- [13] Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005 ,11-100:1
- [14] Avval Z.M., Malekpour L., Raeisi F., Babapoor A., Mousavi S.M. Introduction of Magnetic and Supermagnetic Nanoparticles in New Approach of Targeting Drug Delivery and Cancer Therapy Application. *Drug Metabolism Reviews* 2020 ,84-52:157
- [15] Zeybek A., Şanlı-Mohamed G., Ak G., Yilmaz H., Şanlı Ş.H. In vitro Evaluation of Doxorubicin-Incorporated Magnetic Albumin Nanospheres. *Chemical Biology & Drug Design* 2014 ,15-84:108
- [16] Asara Y., Marchal J.A., Carrasco E., Boulaiz H., Solinas G. Cadmium Modifies the Cell Cycle and Apoptotic Profiles of Human Breast Cancer Cells Treated with -5Fluorouracil. *International Journal of Molecular Sciences* 2013 ,16-14:16600
- [17] Maghsoudi A., Shojaosadati S.A., Farahani E.V. -5Fluorouracil-Loaded BSA Nanoparticles: Formulation Optimization and in vitro Release Study. *Aaps Pharmscitech* 2008 ,6-9:1092
- [18] Huang P., Li Z., Hu H., Cui D. Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Conjugated Copper Sulfide Nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2010
- [19] Bagheri F., Safarian S., Eslaminejad M.B., Sheibani N. siRNA-Mediated Knock-Down of DFF45 Amplifies Doxorubicin Therapeutic Effects in Breast Cancer Cells. *Cellular Oncology* 2013 ,26-36:515
- [20] Zolnik B.S., González-Fernández Á., Sadrieh N., Dobrovolskaia M.A. Mini review: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology*. 2010 ,65-458:(2)151
- [21] Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Hasanzadeh Davarani F., Javanmard R., Dokhani A., Khorasani S., Mozafari M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018 ,57:(2)10
- [22] Frei E. Albumin Binding Ligands and

Albumin Conjugate Uptake by Cancer Cells. Diabetology & Metabolic Syndrome. 4-1:(1)3 2011

[23] Kratz F, Elsadek B. Clinical Impact of Serum Proteins on Drug Delivery. Journal of Controlled Release, 2012 ,45-429:(2)161

[24] Setayesh A., Bagheri F., Boddohi S. Self-Assembled Formation of Chondroitin Sulfate-Based Micellar Nanogel for Curcumin Delivery to Breast Cancer Cells. International Journal of Biological Macromolecule , 2020 ,778-161:771

[25] Saleh E., El-Awady R., Anis N. Predictive Markers for the Response to -5Fluorouracil Therapy in Cancer Cells: Constant-Field Gel Electrophoresis as a Tool for Prediction of Response to -5Fluorouracil-Based Chemotherapy. Oncology Letters 2013 ,7-5:321