

## سنتز نانوکامپوزیت AuNPs/RGO و بررسی خواص آن با تکنیک‌های مختلف آنالیزی

### و تاثیر آن به عنوان حامل داروی Mitoxntrone در دارورسانی موضعی در درمان

#### سرطان سینه

عباس جعفری‌زاد\*<sup>۱</sup>، سورنا قریب‌بیان<sup>۱</sup>، ایوب آقازاد<sup>۲</sup>، آیدا اعظمی<sup>۳</sup>، یدالله امید<sup>۲</sup>

۱- دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند تبریز، ایران

۲- مرکز تحقیقات ریز فناوری نانو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

۳- مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۱

تاریخ تصحیح: ۹۵/۰۷/۰۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۱۴

#### چکیده

در این کار تحقیقاتی، ابتدا لینکر مرکاپتوپروپیونیک اسید به کمک معرف‌های N-هیدروکسی‌سوکسینیمید و DCC عامل دار گردید و سپس حد واسط حاصل با داروی MTX مزدوج و مجموعه‌ی حاصل با نانوذرات طلا با اندازه‌ی نانو متر گونژوگه شدند و در نهایت، با گرافن اکسید احیا شده تبدیل به نانوکامپوزیت AuSMTX/RGO شدند. نانوذرات و نانوکامپوزیت‌های حاصل با استفاده از XRD، TEM، TGA آنالیز شدند و در نهایت آزمایشات in-Vitro در حضور رده‌ی سلولی MCF7 با انجام آزمایشات مختلفی از جمله، MTT assay و Flow cytometry و DAPI Staining و Real time PCR تاثیر این نانوکامپوزیت بر روی مرگ سلول‌های سرطانی مشخص شد.

واژگان کلیدی: نانوذرات طلا، MTX، سرطان سینه، گرافن اکسید احیا شده، دارورسانی موضعی

#### ۱- مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در زنان در سراسر دنیاست که ۲۳٪ از مجموع سرطان را به خود اختصاص داده‌است [۱]. [۳]، که به دلیل محدودیت‌ها و نواقص موجود در روش‌های درمانی موجود از جمله جراحی، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و ... منجر به مرگ و میر زنان در سراسر دنیا می‌شود. [۵ و ۴]. داروهای هوشمند می‌توانند با دقت بیشتری سلول‌های سرطانی را هدف قرار دهند که در کل تاثیرات سمیت دارو کاهش یافته و ایمنی بیشتر را از لحاظ زیست تخریب پذیری برای بیماران فراهم می‌کند [۶].

از میان چندین نوع حامل دارو، نانوذرات طلا (AuNPs) با داشتن خواص منحصر به فردی از جمله خواص شیمی‌فیزیکی، نوری، الکتریکی و مغناطیسی [۷] به صورت موفقیت آمیزی در درمان سرطان‌های پانکراس [۸]، سینه [۹]، مغز [۱۰] و ... مورد تحقیق قرار گرفته‌است. میتوزانترون (MTX) یکی از داروهای شیمیایی است که می‌توان از آن در درمان سرطان‌های سینه و مغز

[۱۲ و ۱۱] بهره برد. به طور کلی، این دارو از رشد سلولی با منع topoisomerase II و به هم ریختن ساختار DNA و ترمیم و تشکیل آن جلوگیری می‌کند و باعث مرگ Apoptosis سلول می‌شود [۳-۵].

در این کار تحقیقاتی ابتدا نانوذرات طلا سنتز، سپس با لینکر مشخص داروها به نانوذرات Load شده و سپس به دلیل ارائه‌ی نسبت سطح به حجم بالای گرافن اکسید احیا شده از آن برای Load بیشتر دارو استفاده شد. خواص نانوذرات مزدوج شده با دارو و همچنین نانوکامپوزیت به روش‌های مختلف بررسی شدند و در آخر سمیت این گونه‌ها سنجیده شد.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد

۳- مرکاپتوپروپیونیک‌اسید و N-هیدروکسی‌سوکسینیمید و N-دی‌سیکلوهگزیل‌کاربونومید و گرافیت از Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شدند و داروی میتوزانترون از Ebewe Pharma GmbH (اتریش) خریداری شدند. سرم RPMI 1640 and fetal (انگلیز) از bovine Invitrogen-Gibco (انگلستان) تهیه شد. مواد اولیه‌ی Real time PCR (18srRNA, AKt, Caspase9, and Bax) از Eurofins MWG Operon (آلمان) خریداری شد. سایر مواد و وسایل از جمله Annexin V-FITC apoptosis detection kit (EMD Chemicals - آمریکا) و The SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems - آمریکا) و سلول‌های سرطانی MCF-7 از (Pasteur Institute - ایران) تهیه شدند.

### ۲-۲- روش‌های سنتز

#### ۲-۲-۱- مزدوج ساختن نانوذرات طلا با داروی MTX

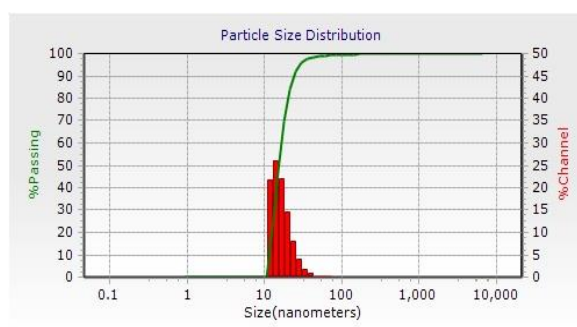
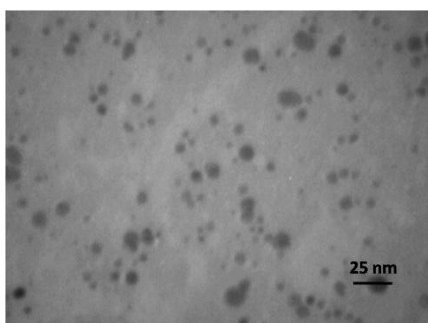
برای بدست آوردن رسوب AuSMTX مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نرمال‌هگزان به محلول شامل مقدار مشخصی از داروی MTX و نانوذرات طلا با اندازه‌ی ۱ میلی‌لیتر افزوده شد و با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر دیگر از نرمال‌هگزان به جامدات جدا شده اضافه شد و دوباره سانتریفیوژ شد. در آخر نانوذرات بدست آمده‌ی AuSMTX با سیستم نرمال‌هگزان و کلروفرم به عنوان حلال سه بار شست‌وشو داده شدند.

#### ۲-۲-۲- سنتز نانوکامپوزیت AuSMTX/RGO

۵ گرم گرافن اکسید احیا شده سنتز شده در ۱،۵ میلی‌لیتر حلال DMF حل و به مدت ۲ ساعت سونیکیت شد و سپس دارو و نانوذرات با شکل AuSMTX به محلول اضافه و به مدت ۳ ساعت دیگر سونیکیت شد. سپس، محلول حاصل به لوله‌ی فالكون منتقل و با ۱۵ هزار دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل نانوکامپوزیت AuSMTX/RGO بود.

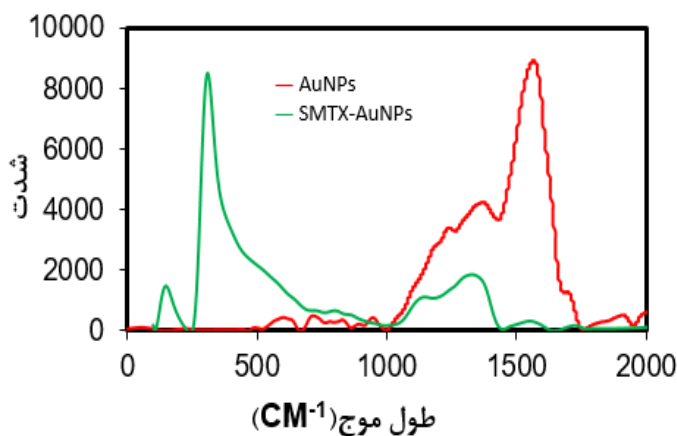
## ۲-۳- آنالیزها و دستگاهها

جهت بررسی طیف UV-vis از UV-vis spectrophotometer (Jenway , United Kingdom), برای بررسی سایز ذرات از دستگاه DLS با مشخصات Nanotracs Wave™ Microtracs, (San Diego, CA, USA) و بررسی کریستال سایز از D5000 X-Ray Diffractometer (Siemens, Munich, Germany) و بررسی طیف رامان توسط Bruker Dispersive Raman Spectrometer. برای بررسی مورفولوژی از Vega Tescan SEM analyzer (Czech republic) استفاده شد. همچنین برای مشخص ساختن سمیت گونه‌های سنتز شده و مقاومت سلول‌ها در برابر آن‌ها از تست MTT، تعیین نوع مرگ سلولی Apoptosis از Flow cytometry، تشخیص مورفولوژی مرگ سلولی از نوع از DAPI staining استفاده شد.

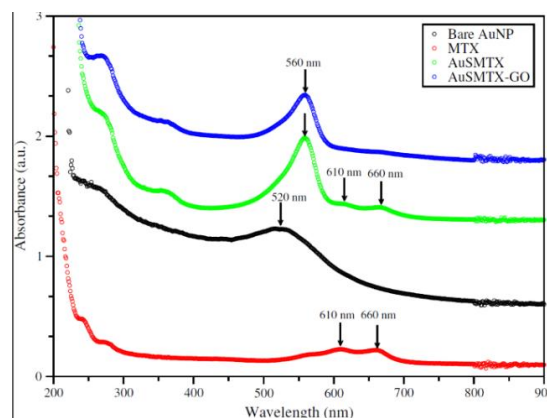


شکل (۱.ا) تصویر FESEM مربوط به نانوذرات مزدوج شده با داروی MTX و شکل غالب کروی برای ذرات

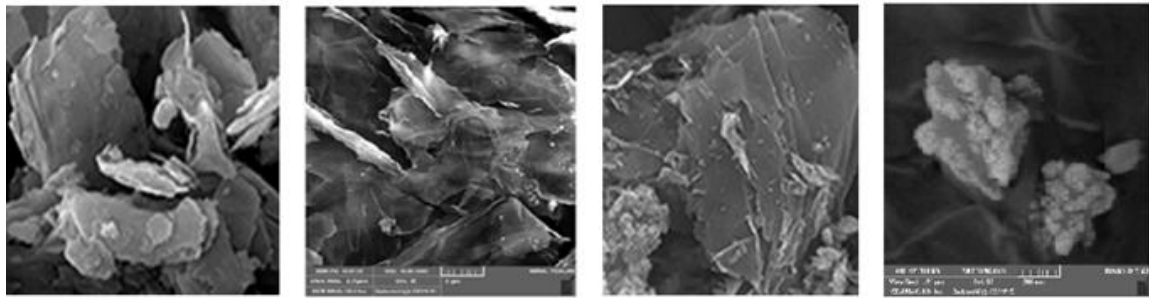
و (ب) نمودار توزیع اندازه ذرات AuSMTX



شکل ۳. طیف رامان مربوط به AuNPs و AuSMTX



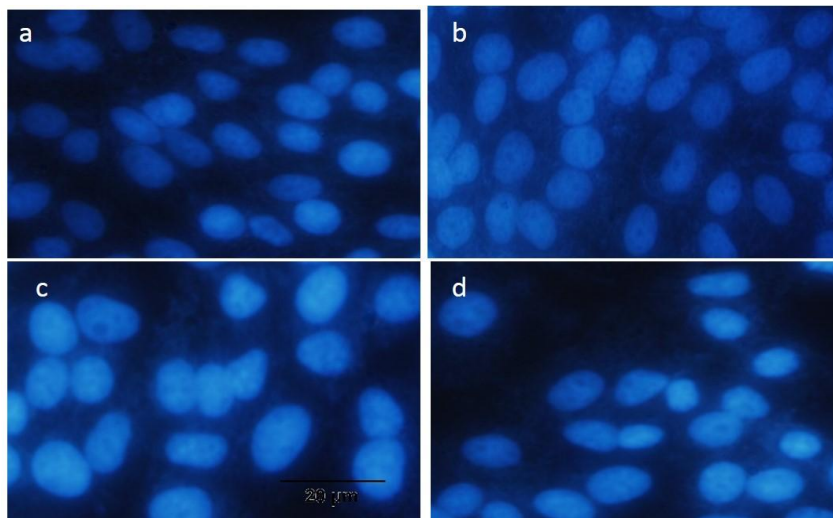
شکل ۲. طیف UV-vis گروه‌های نانوذرات و نانوکامپوزیت‌های ذکر شده



Graphite GO RGO AuSMTX/GO  
 شکل ۴. تصاویر FESEM مربوط به گرافیت، گرافیت اکسید و گرافیت اکسید احیا شده و نانوکامپوزیت AuSMTX/GO

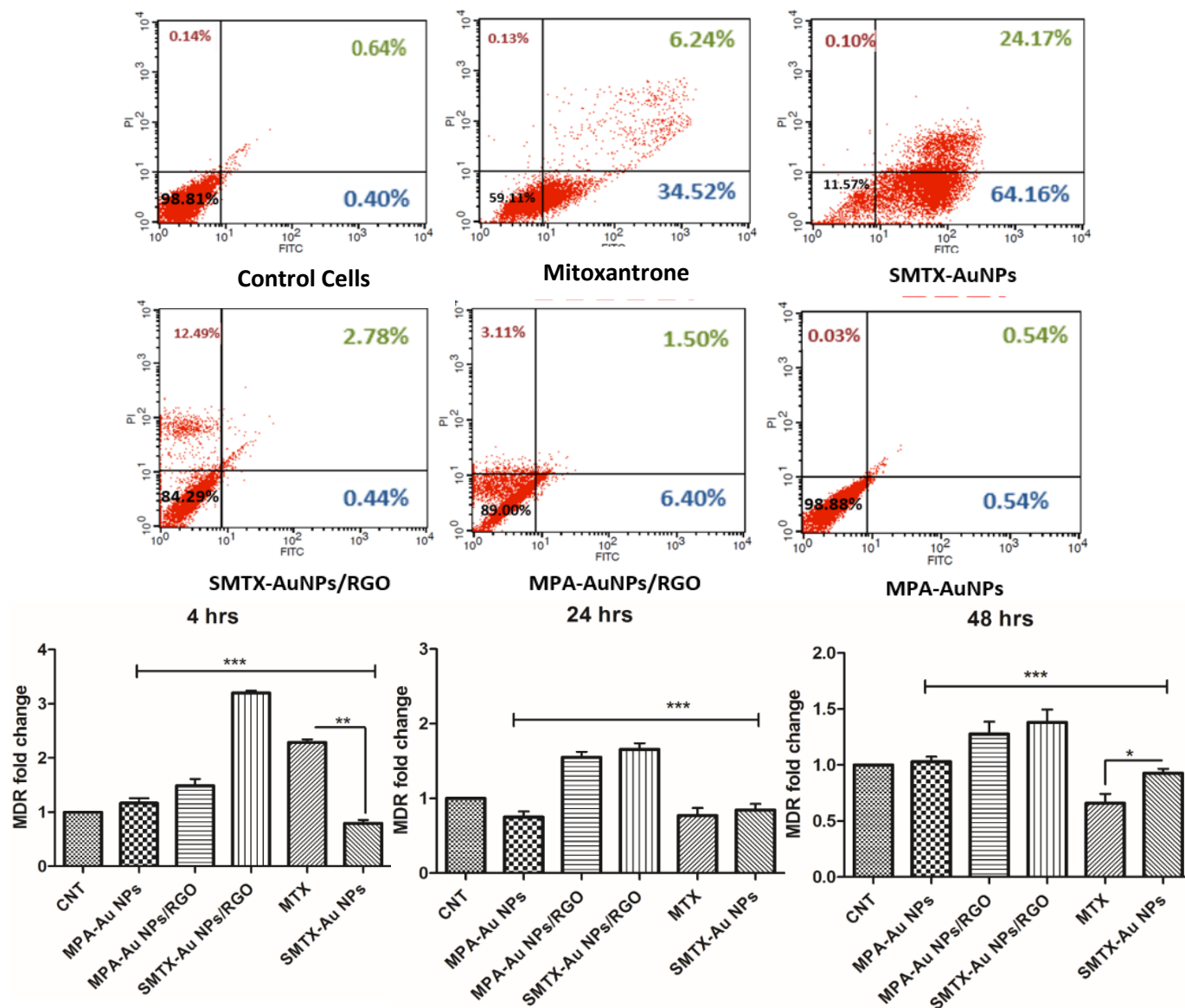
جدول ۱. اطلاعات خلاصه شده از طیف رامان گرافیت، گرافیت اکسید و گرافیت اکسید احیا شده

	D band (cm <sup>-1</sup> )	G band (cm <sup>-1</sup> )	2D (cm <sup>-1</sup> )	I <sub>D</sub> /I <sub>G</sub>	I <sub>2D</sub> /I <sub>G</sub>	L <sub>a</sub> (nm)
Graphite	1312	1577	2639	0.32	0.1	287.2
GO	1303	1582	2614	1.53	0.05	59.6
RGO	1304	1577	2675	0.92	0.08	99.9



شکل ۵. عکس‌های حاصل از DAPI staining سلول‌های MCF-7 در مجاورت:

a: Control Cells b; SMTX-AuNPs/RGO c; SMTX-AuNPs and d: MTX.



شکل ۷. میزان سطح ژن MDR سلول های MCF در زمان های ۴ و ۲۴ و ۴۸ ساعت. \*\*\*:  $p < 0.001$  \*\*:  $p < 0.01$  \*:  $p < 0.05$

### ۳- نتیجه گیری

با ترکیب نانوذرات طلا با داروی MTX و پس از مشاهدهی نتایج حاصل در بخش In-vitro (تجربی) می توان گفت که:

۱- سمیت سلولی افزایش یافته است.

۲- هدف گیری گستردهی سلول های سرطانی ممکن خواهد بود که می تواند خواص ضد سرطانی آن را در کارهای تجربی (in-vitro) تحت تاثیر قرار دهد.

با اینکار نرخ نفوذ دارو به درون سلول ها افزایش یافته است.

## ۴- منابع

- [1]Elstner, E., et al., Novel therapeutic approach: ligands for PPAR $\gamma$  and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 2002. 74(2): p. 155-165.
- [2]Kaabinejadian, S., et al., p53 expression in MCF7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. 2008.
- [3]Loh, S.Y. and S. Chew, Awareness and practice of breast self examination among Malaysian women with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011. 12(1): p. 199-202.
- [4]Di Leo, A., et al., New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *The Breast*, 2015.
- [5]Jemal, A., et al., Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011. 61(2): p. 69-90.
- [6]Dreaden, E.C., et al., Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic delivery*, 2012. 3(4): p. 457-478.
- [7]De Jong, W.H. and P.J. Borm, Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine*, 2008. 3(2): p. 133.
- [8]Torchilin, V., Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 2011. 63(3): p. 131-135.
- [9]Cabral, H., et al., Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature nanotechnology*, 2011. 6(12): p. 815-823.
- [10]Patra, C.R., et al., Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 2010. 62(3): p. 346-361.
- [11]Lee, J., et al., Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer letters*, 2014. 347(1): p. 46-53.
- [12]Hainfeld, J.F., et al., Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine*, 2013. 8(10): p. 1601-1609.