

نانوذرات مغناطیسی عاملدار شده با پلیمرهای پرشاخه به منظور انتقال هدفمند و

رهایش درون سلولی سیس پلاتین

سید جمال طباطبائی رضائی^{۱*}، عاصمه مشهدی ملک زاده^۱، لیلا سرباز^۱، حسن نیک نژاد^۲، علی رضائی^۱

^۱آزمایشگاه پژوهشی سامانه های نوین دارورسانی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲دانشکده فارموکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۱

تاریخ تصحیح: ۹۷/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۰۵

چکیده

با توجه به موانع پیش رو در کاربرد کلینیکی سیس پلاتین (*cis-diamminedichloroplatinum (CDDP)*) از قبیل دسترسی زیستی پایین، عوارض جانبی محدود کننده دز کاربردی و ایجاد سریع مقاومت دارویی، یک سیستم دارورسانی پارامغناطیسی و حساس به pH جدید بر پایه نانوذرات Fe_3O_4 اصلاح شده با پلیمر پر شاخه پلی (اتیلن گلاکول-b-سیتریک / سید)، ($Fe_3O_4@PCA-b-PEG$)، به منظور انتقال هدفمند و رهایش درون سلولی آغاز شده با pH سیس پلاتین ارائه شد. نانو ذرات $Fe_3O_4@PCA-CDDP-b-PEG$ پراکندگی بالا در آب، توزیع اندازه مناسب (۴۹/۵ نانومتر) و خاصیت مغناطیسی قوی از خود نشان دادند. تست رهایش دارو در شرایط برون تنی نشان داد حامل حاوی CDDP در شرایط نرمال فیزیولوژیکی ($pH = 7.4, T = 37^\circ C$) نسبتاً پایدار می باشند در حالیکه نسبت به محیط اسیدی ($pH = 5.3, T = 37^\circ C$) حساس بوده و داروی بارگذاری شده با سرعت بالایی آزاد می گردد. مطالعات میکروسکوپ فلوروسانت مشخص کرد نانوذرات حاصل تجمع بالایی در بافت تومور بعد از گذشت چهار ساعت دارند. همچنین در مقایسه با CDDP این نانوذرات سمیت سلولی بالاتری بر روی سلول های سرطان رحم HeLa و سرطان سینه MDA-MB-231 دارند. نتایج بدست آمده نشان می دهد که نانو ذرات سوپر پارامغناطیس تهیه شده می توانند به عنوان کاندید امیدبخشی برای مهار تکثیر سلول های سرطانی در شیمی درمانی به کار روند.

کلمات کلیدی: نانو ذرات مغناطیسی، پلیمرهای پرشاخه، دارورسانی هدفمند، سیس پلاتین، رهایش کنترل شده.

۱- مقدمه

سیس پلاتین از قدیمی ترین داروهای شیمی درمانی است که در درمان بسیاری از سرطان ها مانند سرطان بیضه، مثانه، تخمدان، سر و گردن به کار می رود [۱]. اما به دلیل ایجاد عوارض جانبی متعدد از قبیل آسیب های کلیوی، سیستم عصبی، شنیداری، ریزش مو و بروز حالت تهوع، درمان با این دارو با محدودیت مواجه است [۲]. به همین دلیل در سال های اخیر تحقیقات وسیعی در جهت کاهش این عوارض صورت گرفته است [۳-۷]. با توسعه و رشد دانش نانوبیوتکنولوژی، سیستم های دارورسانی کنترل شده ویژه ای برای درمان های موثرتر و در عین حال ایمن تر سرطان های پیشرفته طراحی شده است [۸-۱۱].

در مقایسه با عوامل شیمی درمانی رایج، سیستم‌های دارورسانی از خواص منحصر به فردی چون سمیت پایین، ماندگاری طولانی در سیستم گردش خون به علت حلالیت بالا در آب، قابلیت پایداری و حفاظت از داروهای حساس به محیط و تسهیل دارورسانی هدفمند برخوردار می‌باشند. توسعه سیستم‌های دارورسانی چند منظوره با قابلیت درمانی و تشخیصی، چشم اندازی از تصویربرداری همزمان تشخیصی سرطان و درمان آن را فراهم می‌کند. طراحی‌های پیشرفته‌ای بر اساس نانو ساختارهای هسته-پوسته از نوع آلی-معدنی پیشنهاد شده است [۱۲،۱۳]. این ساختارها معمولاً از یک پوسته آلی با قابلیت بارگذاری توسط داروها و یا عوامل درمانی، و یک هسته معدنی جامد، مانند اکسید آهن سوپر پارا مغناطیس، نقاط کوانتومی نیمه رسانا و نانوذرات پلاسمونی تشکیل یافته‌اند که منجر به تنوع و کاربرد مضاعف آنها گشته است [۱۴،۱۵].

نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (MNPs)، به ویژه نانوذرات Fe_3O_4 به دلیل داشتن خواصی چون عدم سمیت سلولی، اندازه کوچک و خواص سوپر پارامغناطیسی دارای کاربردهای زیست پزشکی گسترده‌ای مثل تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) برای تشخیص بالینی، هدف‌یابی مغناطیسی دارو و استراتژی ضدسرطان‌ها پیرترمی می‌باشند [۱۵]. با این حال، پوشاندن سطح نانوذرات مغناطیسی به منظور حفاظت از آنها در برابر تراکم هسته‌ای، جلوگیری از اکسایش سطحی آنها، پایداری کلئیدی، زیست‌سازگاری و محدود کردن فعل و انفعالات غیر اختصاصی سلول ضرورت دارد [۱۶،۱۷].

با هدف اجرای الزامات فوق و نیز به عنوان بخشی از طرح تحقیقاتی مان در مورد ساخت سیستم‌های دارورسانی چند منظوره جدید [۶، ۱۸-۲۴]، در اینجا، ما یک نانوحامل دارویی چند منظوره بر پایه نانوذرات Fe_3O_4 اصلاح شده با PCA و PEG به عنوان یک سامانه یکپارچه برای انتقال هدفمند و رهایش کنترل شده درون سلولی داروی سیس پلاتین را طراحی کردیم. گروه‌های کربوکسیل آزاد در PCA نه تنها قادرند از طریق کوئوردیناسیون موقتی با سیس پلاتین، عوارض جانبی آن را کاهش دهند، بلکه حساس به pH نیز می‌باشند. همچنین، زنجیره PEG به عنوان یک لایه بیرونی آبدوست نانو ذرات مغناطیسی مورد استفاده قرار می‌گیرد که باعث محدودیت در جذب و حذف ذرات مغناطیسی کلئیدی توسط سیستم رتیکلواندوتلیال (RES) شده و مدت زمان ماندگاری این حامل‌ها را در سیستم گردش خون افزایش می‌دهد [۱۸]. در این طرح ما به دفعات ظرفیت بارگذاری دارو، رهایش آن در شرایط برون تنی و خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات مغناطیسی را مورد بررسی قرار دادیم. جذب سلولی، امکان پراکندگی در سلول‌ها و قابلیت ضد توموری نانوذرات مغناطیسی مزدوج شده با سیس پلاتین نیز به تفصیل بررسی شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

۴-FeCl₃، دی-متیل آمینو پیریدین (DMAP)، N,N'-دی سیکلو هگزیل کربو دی ایمید (DCC)، سیتریک اسید تک آبه، دی کلرومتان (DCM)، محلول آبی آمونیوم ۲۵٪ (NH₄.OH)، استون و پلی اتیلن گلیکول (PEG) با متوسط وزن مولکولی ۲۰۰۰ از شرکت مواد شیمیایی مرک خریداری شدند. FeSO₄.7H₂O از شرکت Sigma-Aldrich تهیه گردید. کلیه مواد شیمیایی دارای خلوص آزمایشگاهی بوده و بدون خالص سازی استفاده شدند، به غیر از PEG که از طریق تقطیر آزنوتروپ با تولوئن خشک تخلیص شد و دی کلرومتان (DCM) بر روی P₂O₅ خشک و تقطیر گردید. همچنین، حلال DMSO با استفاده از مولکولاریسیو فعال شده و تولوئن به وسیله رفلکس بر روی سدیم، خشک شد و بلافاصله پس از تقطیر مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به وسیله میکروسکوپ الکترونی LEO 912AB انجام پذیرفت. مقدار Pt موجود در ترکیب از طریق طیف سنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-MS, Agilent ICP-MS 7500 Series) و آنالیز وزن سنجی گرمایی (TGA) (دستگاه STA 1500 و سرعت حرارتی 10°C/min در هوا) تعیین شد. طیف IR بر روی دستگاه اسپکتروفتومتر Jasco 6300 FT-IR ثبت گردید. اطلاعات پراش اشعه X بر روی دستگاه پراش سنج XD-3A و با استفاده از پرتوی Cu K α جمع آوری شد. خواص مغناطیسی نمونه ها در دمای اتاق و با استفاده از مگنتومتر نمونه ارتعاشی (VSM) شرکت کویر مغناطیس، کاشان، ایران) محاسبه شد و در دمای اتاق ثبت گردید. طیف UV-vis توسط اسپکتروفوتومتر تجزیه ای Jena-Specord 205 ثبت گردید. حمام اولتراسونیک (EUROSONIC 4D ultrasound cleaner با فرکانس ۵۰ kHz و قدرت ۳۵۰ W) به منظور پراکنده کردن مواد در حلال مورد استفاده قرار گرفت. همه نتایج کمی به صورت میانگین \pm از انحراف استاندارد (SD) بیان شد. از لحاظ آماری *p*-value کمتر از ۰/۰۵ معنا دار در نظر گرفته شد.

۲-۲- روش های آزمایشگاهی

۲-۲-۱- سنتز نانو ذرات Fe₃O₄-(COOH)_n

نانو ذرات مگنتیت Fe₃O₄ طبق روش همرسوبی در محیط قلیایی سنتز گردید. طبق این روش در یک بالن سه دهانه ۵۰۰ mL مجهز به همزن مکانیکی، گاز نیتروژن، قیف ایزوبار و مبرد مخلوطی از ۰/۹ گرم (۳/۲ mmol) آهن (II) سولفات هفت آبه و ۰/۹۸ گرم (۶/۰ mmol) آهن (III) کلراید بدون آب در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد اضافه شد و سپس ۱۲۰ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه گردید و توسط همزن مغناطیسی (۱۲۵۰ rpm) به مدت ۱۵ دقیقه با هم مخلوط شدند. سپس با کنترل pH واکنش (pH=۱۰)، ۱۲۰ میلی لیتر محلول آبی آمونیاک در حضور جو نیتروژن قطره قطره به محیط واکنش اضافه گردید. بعد

از اضافه کردن محلول آمونیاک، مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از محلول آبی سیتریک اسید (۰/۵ g/mL) به مخلوط بالا اضافه گردید و دمای واکنش تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تحت رفلکس قرار داده شد. در نهایت، توسط یک آهن‌ربای خارجی، نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4-(\text{COOH})_n$ که به صورت رسوب سیاه رنگ می‌باشد، از مخلوط واکنش خارج گردید. محصول به دست آمده توسط میدان مغناطیسی خارجی جدا شد و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر و ۲ مرتبه با اتانول شستشو داده شد. نانوذرات به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت تحت خلاء و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید.

۲-۲-۲-۲ سنتز $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA$

۰/۱ گرم نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4-(\text{COOH})_n$ و ۱ گرم سیتریک اسید مونوهیدرات در یک بالن دارای ورودی خلاء بر روی همزن مغناطیسی، اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 120°C قرار داده شد. پس از حذف آب توسط ورودی خلاء، دمای واکنش تا 140°C افزایش یافت و به مدت ۱ ساعت در این دما قرار داده شد. آب تولید شده طی فرآیند پلیمریزاسیون دوباره توسط ورودی خلاء حذف شده و دمای واکنش تا 160°C افزایش یافت. فرآیند پلیمریزاسیون در این دما و تحت شرایط خلاء برای ۱/۵ ساعت ادامه می‌یابد. نانوذرات نهایی ابتدا با تتراهیدروفوران و سپس اتیل استات با استفاده از یک آهن‌ربای خارجی شستشو داده شد و در نهایت تحت خلاء خشک گردید.

۲-۲-۲-۳ سنتز $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG$

به منظور پوشش دهی نانوذرات تهیه شده با پلی اتیلن گلیکول (PEG)، مقدار ۸/۱ گرم (۴/۵ mmol) ترکیب PEG ۲۰۰۰ و ۰/۶ گرم (۵/۲ mmol) DMAP در حلال دی‌کلرومتان خشک (۳۰ mL) در 0°C حل گردید. سپس ۱ گرم $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA$ (حاوی ۱/۵ mmol گروه‌های اسیدی که از طریق تیتراسیون محاسبه گردید) به مخلوط بالا اضافه شد. مقدار ۰/۹ گرم (۴/۵ mmol) DCC حل شده در ۲۰ mL حلال دی‌کلرومتان خشک قطره قطره در مدت زمان ۳۰ دقیقه تحت شرایط همزدن به مخلوط بالا اضافه گردید. مخلوط واکنش در دمای 0°C برای ۱ ساعت و سپس در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت همزده شد. محصول با استفاده از آهن‌ربا جدا گردید و ابتدا با دی‌کلرومتان و سپس اتانول شستشو داده شد و در نهایت تحت خلاء خشک گردید.

۲-۲-۴ بارگذاری دارو و مطالعه رهایش دارو در شرایط برون تنی

۵۰ میلی‌گرم $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG$ و ۱۰ میلی‌گرم سیس پلاتین در ۲۰ mL آب دیونیزه حل شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت تا مولکول‌های دارو در پوسته PCA نانوکامپوزیت‌های $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG$ کاملاً پخش شوند. مخلوط حاصل با همزن مکانیکی به مدت ۲۴ ساعت به آرامی و در شرایط تاریکی هم زده شد و سپس با استفاده

از غشاء دیالیز (MWCO = 3500 Da) به مدت ۲۴ ساعت در آب دیونیزه خالص سازی گردید. نانوذرات بدست آمده از $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ نامگذاری شد. در یک آزمایش نوعی، وزن مشخصی از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ در یک لوله آزمایش قرار داده شد و سپس ۲ mL نیتریک اسید غلیظ به آن افزوده گردید و تا دمای $90^\circ C$ به مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن نمونه‌ها را با مقدار کافی آب Milli-Q رقیق شد. آنالیز عنصر Pt با استفاده از آنالیز ICP-MS انجام پذیرفت و مقدار داروی پلاتین در نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-$ عنصر PEG بر اساس جرم اتمی آن تعیین شد. نمودار رهائش دارو از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ توسط روش نفوذ غشاء دیالیز 3.5 kDa در pH 5.3 و 7.4 مورد بررسی قرار گرفت. مقدار مشخصی از نانوذرات حاوی دارو در ۴ mL محلول بافر فسفات (PBS) درون کیسه دیالیز قرار گرفت. سپس کیسه دیالیز در حالی که از دو طرف کاملاً بسته شده است، درون ۵۰ mL بافر فسفات (pH = ۷/۴ و ۵/۳) تازه تهیه شده در دمای $37^\circ C$ قرار داده شد. در فواصل زمانی از پیش تعیین شده، ۳ mL نمونه از محیط رهائش برداشته و با همان مقدار PBS تازه جایگزین شد (۳ mL). بافر جمع آوری شده حاوی سیس پلاتین آزاد شده می‌باشد که با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید. سپس مقدار عنصر پلاتین با استفاده از ICP-MS مطابق شیوه شرح داده شده در بالا اندازه گرفته شد. ظرفیت بارگذاری دارو (DL) و قابلیت کیسوله شدن (EE) دارو به صورت زیر محاسبه شدند:

$$DL\% = \left(\frac{\text{Weight of the drug in nanoparticles}}{\text{Weight of the nanoparticles}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$EL\% = \left(\frac{\text{Weight of the drug in nanoparticles}}{\text{Weight of the feeding drugs}} \right) \times 100 \quad (2)$$

۲-۲-۵- کشت سلول

سلول‌های کشت داده شده برای آزمایشات *in-vitro* شامل لاین سلول سرطانی سینه، MDA-MB-231 و سلول سرطان رحم، HeLa می‌باشد. همه لاین‌های سلولی در محیط مرطوب شامل ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO_2 در RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS و نیز ۱٪ پنی‌سیلین / استروپتومایسین در $37^\circ C$ کشت داده شد.

۲-۲-۶- بررسی قابلیت جذب سلولی و سمیت سلولی در شرایط برون تنی

جهت بررسی قابلیت جذب سلولی نانوذرات $Fe_3O_4@PCA-b-PEG$ ، سلول‌های HeLa به یک پلیت ۲۴ خانه (به ازای هر خانه 5×10^4 سلول) انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور، انکوبه گردید. پس از ۴۸ ساعت، نانوذرات بارگیری شده با رنگدانه فلورسئین و نانوذرات فاقد این رنگدانه به سلول‌های HeLa اضافه شد و تحت شرایط دمای $37^\circ C$ و ۵٪ CO_2 به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور، انکوبه گردید. سپس سلول‌ها با بافر فسفات دو مرتبه شستشو داده شد و مخلوط حاصل توسط میکروسکوپ فلورسانس (Nikon, TE 2000-U, Melville, NY) مورد مطالعه قرار گرفت.

سمیت سلولی نانوذرات مغناطیسی حاوی دارو و بدون دارو توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های انسانی مبتلا به سرطان دهانه رحم (HeLa) و پستان (MDA-MB-231) به یک پلیت ۲۴ خانه با ظرفیت 5×10^4 سلول منتقل شدند و به مدت یک شب در انکوباتور (37°C و $5\% \text{CO}_2$) قرار داده شد. سپس سلول‌های HeLa یا MDA-MB-231 با کنترل، سیس پلاتین آزاد، نانوذرات بدون دارو و نانوذرات بارگذاری شده با دارو با غلظت‌های مختلف ($100, 200 \mu\text{g/mL}$)، 50 واکنش داده و تحت شرایط دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور، انکوبه گردید. به منظور بررسی سمیت، حدود $40 \mu\text{L}$ محلول MTT ($5 \mu\text{g/mL}$) به هر خانه اضافه گردید و پلیت به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه گردید. کریستال‌های فرمازون تشکیل شده در $1 \mu\text{L}$ DMSO در دمای محیط حل گردید. نهایتاً جذب UV همه نمونه‌ها در طول موج ماکزیمم 570 nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (CE7500, Cecil, UK) اندازه‌گیری و ثبت گردید. به منظور تعیین درصد سلول‌های زنده از معادله زیر استفاده شد.

$$\text{Viable rate (\%)} = \frac{OD(\text{treated})}{OD(\text{control})} \times 100 \quad (3)$$

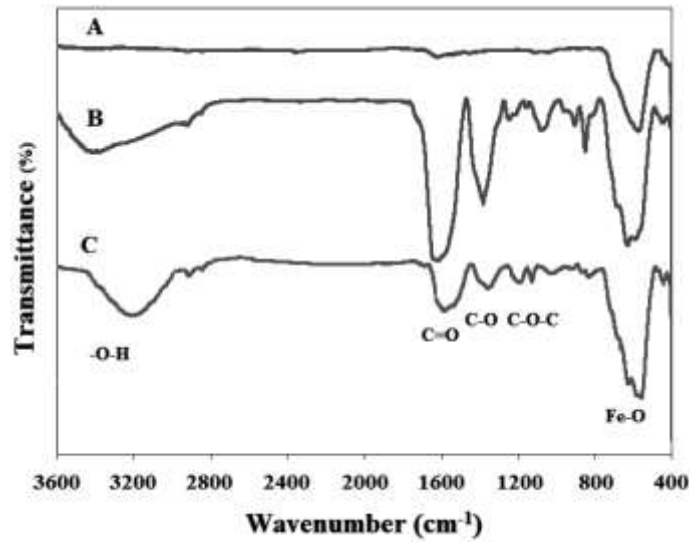
۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنتز و شناسایی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$

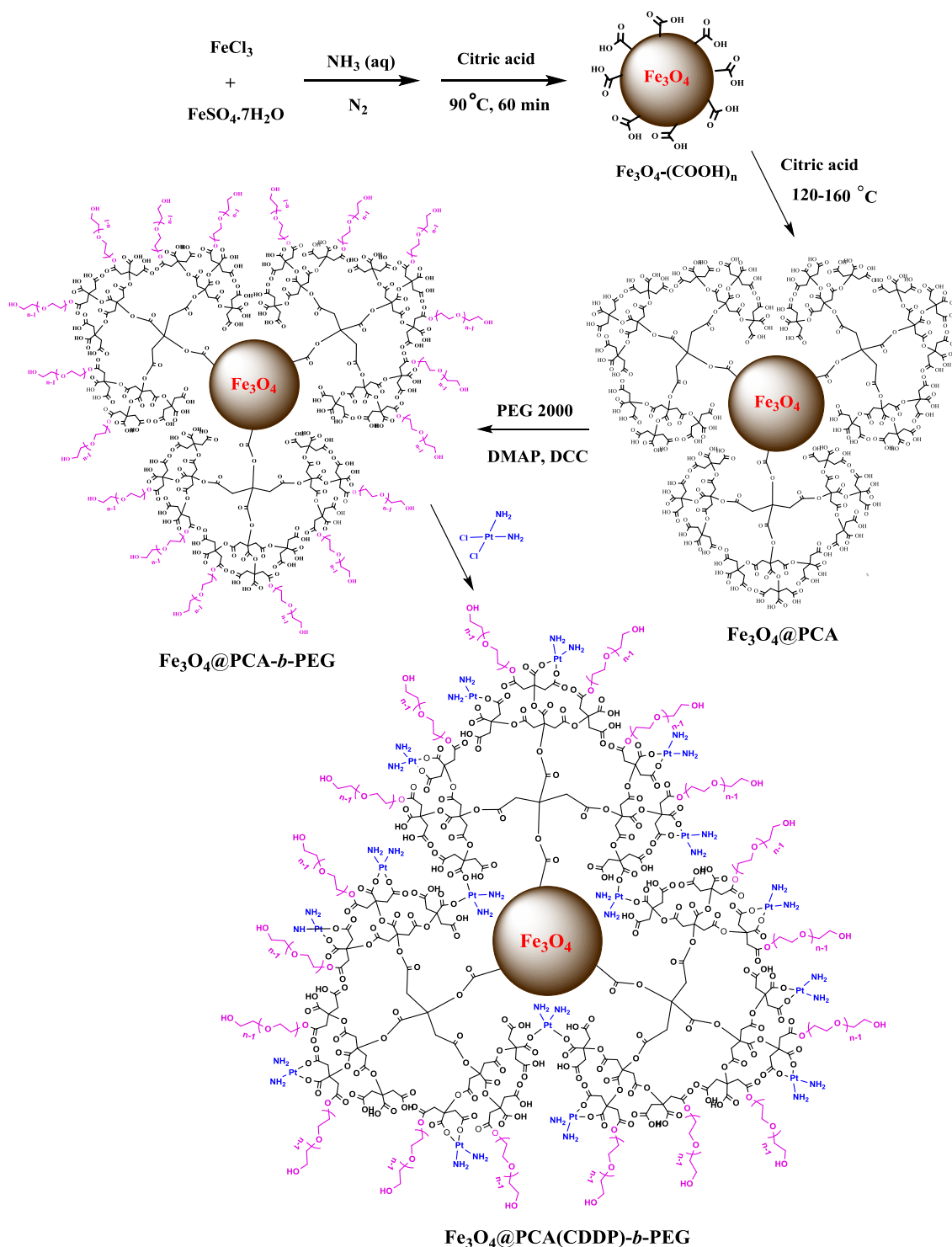
همانطور که طرح ۱ نشان داده شده است، برای سنتز نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$ ابتدا نانوذرات Fe_3O_4 مطابق روش کلاسیک هم‌رسوبی شیمیایی در شرایط بازی تهیه گردید [۲۴]. سپس سطح نانوذرات Fe_3O_4 با استفاده از سیتریک اسید در دمای 90°C با گروه‌های اسیدی COOH عاملدار شد. از آنجا که هم نانوذرات عامل‌دار شده Fe_3O_4 - $(\text{COOH})_n$ و هم سیتریک اسید دارای گروه‌های الکلی و هیدروکسیل اسیدی می‌باشند، از این رو سیتریک اسید می‌تواند درون نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار از طریق فرآیند پلیمریزاسیون تراکمی، پلیمریزه گردد [۲۵]. در این مرحله، پلی‌سیتریک اسید بر روی سطح نانوذرات Fe_3O_4 متصل می‌گردد. به منظور افزایش حلالیت و زیست تخریب‌پذیری نانوذرات مغناطیسی، سطح نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA$ با استفاده از PEG اصلاح گردید. PEG پلیمری غیر یونی و آبدوست می‌باشد که به طور گسترده به عنوان یک پلیمر آبدوست برای ممانعت از جذب و از بین رفتن ذرات کلونیدی توسط RES استفاده می‌شود و همچنین زمان حضور نانوحامل‌های دارویی را در سیستم گردش خون افزایش می‌دهد [۱۸]. (طرح ۱).

جهت نشان دادن سنتز موفقیت آمیز نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$ ، نانوذرات بدست آمده توسط روش‌های FTIR، XRD، TEM، DLS، TGA و VSM مورد شناسایی قرار گرفت. شکل ۱ طیف FTIR نانوذرات Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b\text{-PEG}$ را نشان می‌دهد. در همه طیف‌ها، باند جذبی مشخصه Fe_3O_4 در ناحیه cm^{-1} $585-565$ ظاهر می‌شود [۲۴]. در شکل B و ۱C، پیک پهن در ناحیه cm^{-1} $3050-3630$ مربوط به گروه‌های اسیدی

PCA متصل شده به سطح Fe_3O_4 متصل شده به سطح می‌باشد. در این طیف، باند جذبی گروه‌های کربونیل پلی سیتریک اسید در ناحیه $1722-1502 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر می‌شود و پیک در ناحیه $1443-1255 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-O می‌باشد [۲۵]. همچنین، پیک‌های جدیدی در ناحیه $1150-1075 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-O-C ظاهر می‌گردد، که به واحدهای اتری PEG افزوده شده مربوط می‌شود.



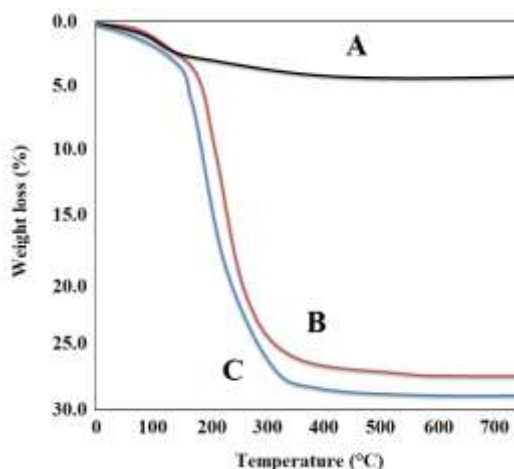
شکل ۱- طیف FTIR ترکیبات Fe_3O_4 (A)، $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA$ (B) و $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG$ (C)



طرح ۱- مسیر سنتزی بکار گرفته شده برای تهیه نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$

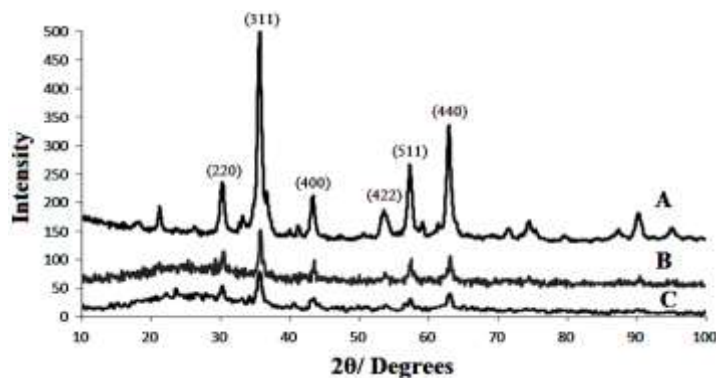
مقدار پلیمر متصل شده بر روی سطح نانوذرات مغناطیسی را می‌توان با استفاده از روش وزن سنجی گرمایی (TGA) و از طریق کاهش وزن مابین دمای $20-800^\circ\text{C}$ محاسبه کرد (شکل ۲). شکل ۲ (A) نشان می‌دهد که کاهش وزن نانوذرات مغناطیسی بدون پوشش حدود ۴/۴٪ بوده که مربوط به آب باقیمانده در نمونه می‌باشد. در ترکیب $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA$ کاهش

وزن حدود ۲۰/۹٪ مربوط به مقدار PCA متصل شده به سطح نانوذرات می‌باشد. محاسبات نشان می‌دهد مقدار PEG متصل شده به سطح نانوذرات مغناطیسی حدود ۲/۲۹٪ می‌باشد.



شکل ۲- نمودار TGA ترکیبات Fe_3O_4 (A)، $Fe_3O_4@PCA$ (B) و $Fe_3O_4@PCA-b-PEG$ (C)

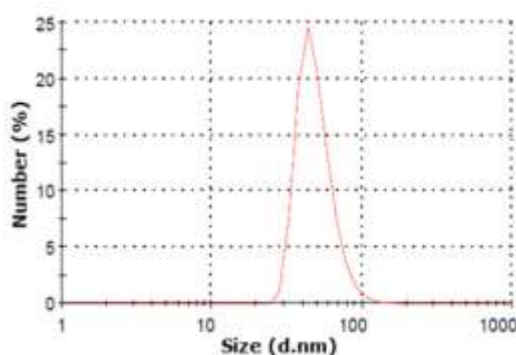
اندازه‌گیری XRD بر روی نمونه‌های پودری خشک جهت تعیین فازهای کریستالی موجود در نمونه انجام پذیرفت. شکل ۳ الگوی XRD نمونه پوشش داده نشده (Fe_3O_4) و نمونه‌های پوشش داده شده ($Fe_3O_4@PCA$ و $Fe_3O_4@PCA-b-$ PEG) را نشان می‌دهد. الگوی XRD نمونه‌های $Fe_3O_4@PCA$ و $Fe_3O_4@PCA-b-PEG$ (شکل ۳ (B) و (C)) همه پیک‌های اصلی مربوط به Fe_3O_4 را نشان می‌دهد. پیک‌های خاص در $2\theta = 30.1^\circ$ ، 35.6° ، 43.1° ، 53.2° ، 57.2° ، 62.9° مربوط به صفحات (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) می‌باشد. این نتایج تأییدی بر اصلاح موفقیت‌آمیز سطح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می‌باشد.



شکل ۳- الگوی XRD Fe_3O_4 (A)، $Fe_3O_4@PCA$ (B) و $Fe_3O_4@PCA-b-PEG$ (C)

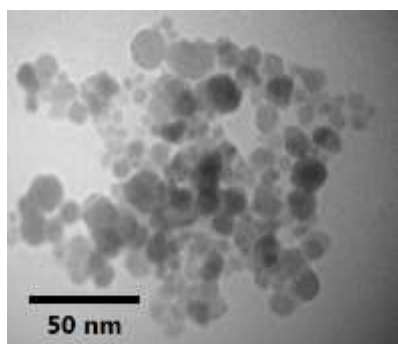
آزمایش تفرق دینامیکی نور (DLS) یک تکنولوژی متداول می‌باشد که برای بدست آوردن اندازه نانوذرات، کلئیدها و مولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اندازه نانوذرات $Fe_3O_4@PCA-b-PEG-FA$ با استفاده از DLS محاسبه شد. همانطور که در

شکل ۴ نشان داده شده است، نمودار توزیع اندازه ذرات در محلول آبی یک توزیع یکنواخت با متوسط قطر هیدرودینامیک ۴۹/۵ (PDI = 0.112) را نشان می‌دهد.



شکل ۴- نمودار DLS ترکیب $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG-FA$ در محلول آبی

مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی توسط پارامترهای مختلفی از جمله شرایط واکنش و مواد شیمیایی درگیر در واکنش تحت تأثیر قرار می‌گیرد. مطالعات نشان داده‌اند که ذرات با اندازه کوچکتر و شکل کروی انتشار بیشتری دارند که موجب افزایش غلظت نانوذره در مرکز رگ خونی می‌شود و با کاهش برهمکنش با سلول‌های اندوتلیال باعث افزایش طول عمر نانوذره در خون می‌گردد. شکل ۵ تصویر TEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG-FA$ را نشان می‌دهد و به وضوح می‌توان مشاهده کرد که همه نانوذرات دارای شکل کروی با یک متوسط قطر ۱۵-۱۰ nm می‌باشند. همچنین نتایج TEM رشد اندکی برای اندازه نانو ذرات عامل دار شده، $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG-FA$ ، نسبت به نانو ذرات Fe_3O_4 بدون پوشش (10 nm) را نشان می‌دهد که این افزایش مختصر در اندازه نانو ذرات عامل دار شده خود اثباتی بر موفقیت این مرحله می‌باشد. متوسط اندازه ذرات تعیین شده با تکنیک DLS بزرگتر از مقادیر بدست آمده از تکنیک TEM می‌باشد. این اختلاف در اندازه به تفاوت روش اندازه‌گیری در این دو تکنیک بر می‌گردد، بدین صورت که در روش DLS اندازه ذرات از روی شعاع هیدرودینامیک نانوذرات در محلول آبی بدست می‌آید در حالیکه در روش TEM اندازه ذرات مربوط به حالت جامد نانو ذرات خشک شده می‌باشد.

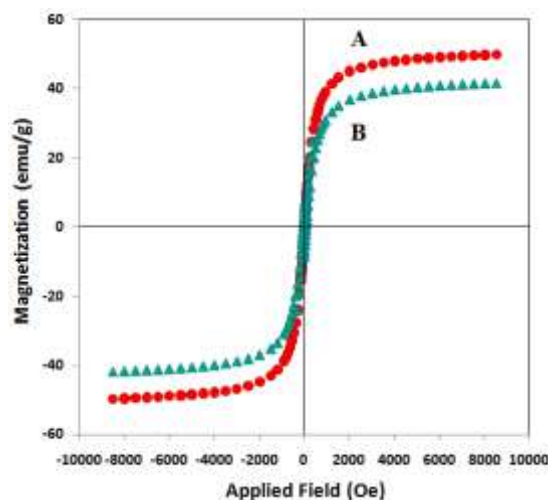


شکل ۵- تصویر TEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b-PEG-FA$

نانوذرات تهیه شده سوپرپارامغناطیس هستند که یک پارمتر مهمی در سیستم انتقال دارو می باشد، به همین علت نانوذرات می توانند مولکول های دارو را به محل مورد نظر در بدن از طریق یک میدان مغناطیسی خارجی هدایت کنند. زمانیکه میدان مغناطیسی خارجی حذف می گردد، نانوذرات خاصیت مغناطیسی خود را از دست داده و از این رو تمایلی به تجمع شدن ندارند و این امر سبب افزایش نیمه عمر نانوذرات در سیستم گردش خون می گردد.

مطالعه تغییر مغناطیسی شدگی با میدان مغناطیسی اعمال شده اطلاعات مفیدی را در مورد خواص مغناطیسی ذرات مغناطیسی در اختیار قرار می دهد. برای توصیف ویژگی هر ماده مغناطیسی از منحنی حلقه پسماند استفاده می گردد. متداولترین روش اندازه گیری منحنی حلقه پسماند در دمای محیط استفاده از دستگاه مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM) می باشد.

منحنی حلقه پسماند برای نانوذرات مغناطیسی و نانوذرات مغناطیسی اصلاح یافته در شکل ۶ نشان داده است. مقدار مغناطیس اشباع برای نانوذرات Fe_3O_4 و $Fe_3O_4@PCA-b-PEG-FA$ به ترتیب $52/8$ و $48/7$ emu/g می باشد. کاهش در مغناطیس اشباع نانوذرات اصلاح یافته $Fe_3O_4@PCA-b-PEG-FA$ مربوط به تأثیر چگالی پلیمر بر روی سطح نانوذرات Fe_3O_4 می باشد. زنجیره پلیمری یک لایه مرده مغناطیسی بر روی سطح نانوذرات Fe_3O_4 ایجاد می کند که سبب کاهش گشتاورهای مغناطیسی سطحی می گردد. همچنین افزایش اندازه نانوذرات عامل دار شده نیز در این کاهش موثر می باشد.

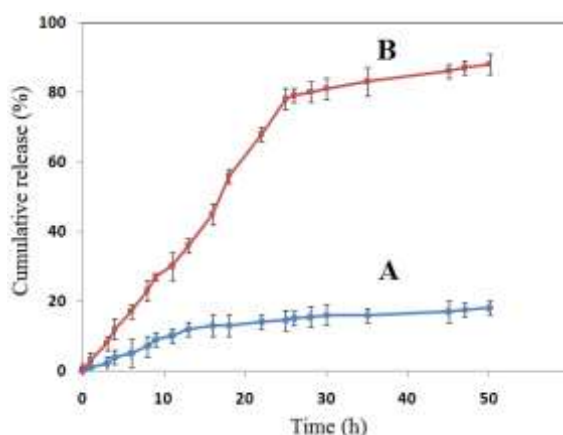


شکل ۶- منحنی حلقه پسماند نانوذرات Fe_3O_4 (A) و $Fe_3O_4@PCA-b-PEG-FA$ (B) در $25^\circ C$

بررسی رهایش دارو از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ در شرایط برون تنی

به منظور بررسی امکان استفاده از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ به عنوان یک حامل موثر برای انتقال هدفمند داروهای ضد سرطان، نمودار رهایش دارو در شرایط برون تنی در محلول بافر PBS در دو pH مختلف ($5/3$ و $7/4$) در $37^\circ C$ مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۷). ظرفیت بارگذاری داروی (DL) و قابلیت کپسوله شدن (EE) سیس پلاتین (CDDP) در نانوذرات به ترتیب $8/3$ و $38/5$ ٪ محاسبه گردید. رهایش CDDP تحت شرایط نرمال فیزیولوژیکی ($37^\circ C$ ، $pH 7/4$) در

مدت زمان ۵۰ ساعت، ۱۸٪ است که نشان می‌دهد سرعت رهایش CDDP از نانوذرات در این شرایط آهسته می‌باشد. برخلاف رهایش آهسته CDDP در pH=۷/۴، رهایش سریع‌تری از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ در pHهای اسیدی (۵/۳) مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۷B مشاهده می‌شود سرعت رهایش دارو در ۲۵ ساعت اول تا ۷۸٪ بهبود یافته است. نتایج نشان می‌دهد که در شرایط فیزیولوژیکی (pH ۷/۴)، به علت تشکیل برهمکنش‌های قوی میان حامل و دارو، رهایش مشاهده شده بسیار ناچیز می‌باشد. حال آنکه پروتونه شدن گروه‌های کربوکسیل در شرایط اسیدی ملایم منجر به گسستگی سریع‌تر کمپلکس PCA و CDDP گشته و این امر سبب رهایش سریع‌تر دارو در شرایط ملایم اسیدی (pH ۵/۳) می‌گردد. نتایج رهایش *in vitro* حاکی از آن است که نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ تهیه شده یک وسیله مناسب برای رهایش حساس به pH داروهای ضد سرطان می‌باشد.



شکل ۷- نمودارهای رهایش دارو در شرایط برون تنی از نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ در مقادیر pH مختلف: (A) pH = ۷/۴ و (B) pH = ۵/۳، $T = ۳۷^{\circ}C$

مطالعه جذب و سمیت سلولی در شرایط برون تنی

یکی از فاکتورهای اساسی برای ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی، جذب و تجمع نانومواد در سلول‌ها می‌باشد. برای تعیین میزان جذب نانوحامل تهیه شده توسط سلول‌های سرطانی، نانوذرات $Fe_3O_4@PCA(CDDP)-b-PEG$ به منظور نشان‌دار کردن با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) انکوبه شد و میزان جذب سلولی آن توسط دستگاه میکروسکوپ فلورسانت تعیین گردید. همان‌طور که در شکل ۸ نشان داده شده است، نانوذرات نشان‌دار شده با فلورسئین توسط سلول‌های سرطانی HeLa جذب شده و سپس می‌توانند در سیتوزول تجمع یابند، جایی که داروی سیس پلاتین می‌تواند از حامل آزاد شده و به هسته سلول نفوذ کرده و از طریق اتصال به DNA سبب آپتوزیس در سلول‌های سرطانی گردد.

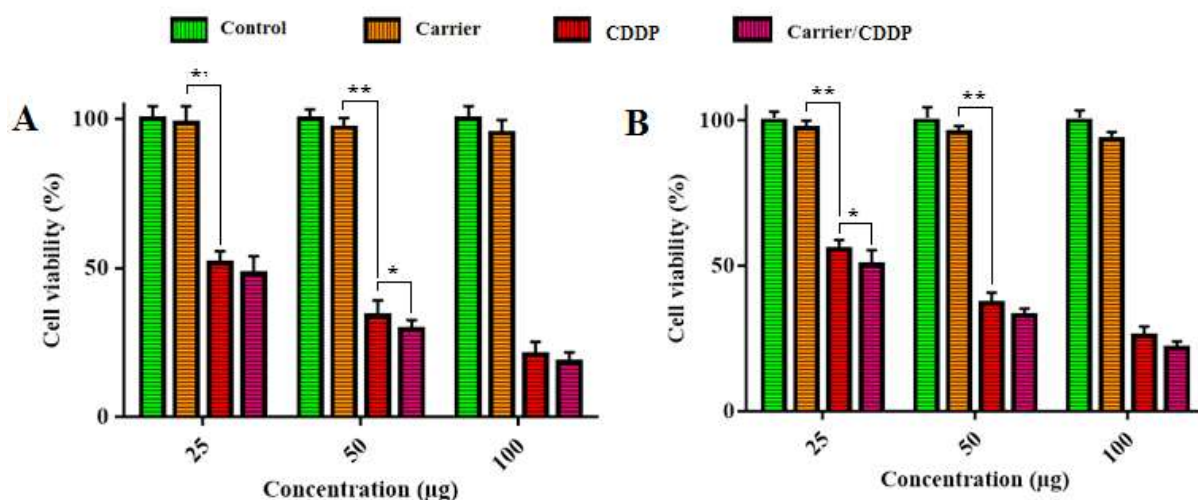


شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ فلورسانس سلول‌های HeLa انکوبه شده با نانوذرات نشان دار شده با فلورسئین برای ۴ ساعت در دمای 37°C (تصاویر سمت راست: زمینه فلورسانت و تصاویر سمت چپ: زمینه روشن)

زیست‌سازگاری یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مورد نیاز به منظور امکان کاربرد بیومواد در بدن انسان می‌باشد. تست سمیت سلولی (تست MTT) برای تشخیص زیست‌سازگاری بیومواد و تعیین سمیت سلولی آنها در شرایط برون‌تنی بکار برده می‌شود. در این مطالعه به منظور ارزیابی میزان سازگاری نانوذرات سنتز شده از تست MTT استفاده شد. بدین منظور، سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 در محیط RPMI-1640 رشد داده شدند. جهت مطالعه بازداري سرعت رشد سلولی، نمونه‌های کنترل، حامل، سیس پلاتین آزاد، و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین به این سلول‌ها اضافه شد و تحت شرایط دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور، انکوبه گردید.

نرخ بقای سلولی با غلظت‌های مختلف دارو ($25, 50, 100 \mu\text{g/mL}$) برای سلول‌های HeLa و MDA-MB-231 پس از ۲۴ ساعت به ترتیب در شکل ۹A و ۹B نشان داده شده است. همانطور که در تصاویر ۹A و ۹B مشاهده می‌شود، نرخ بقای سلولی برای نانوذرات فاقد دارو ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PCA}-b\text{-PEG}$) پس از ۲۴ در مقایسه با سلول‌های کنترل به ترتیب 95% و 96% می‌باشد. این نتیجه بوضوح نشان می‌دهد که نانوحامل مغناطیسی سنتز شده دارای زیست‌سازگاری خوبی می‌باشد.

همچنین اثر نانوذرات بارگذاری شده با دارو ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PCA}(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$) با استفاده از آزمون سمیت سلولی بر روی هر دو لاین سلول سرطانی HeLa و MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PCA}(\text{CDDP})-b\text{-PEG}$ رشد سلول‌های HeLa و MDA-MB-231 را بیش از سیس پلاتین آزاد پس از ۲۴ کاهش می‌دهند. بنابراین، نانوذرات سنتز شده می‌توانند به عنوان حامل‌های هوشمند برای رساندن دارو به بافت‌های تومور مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ۹- نرخ بقای سلول‌های HeLa (A) و سلول‌های MDA (B) انکوبه شده با نانوذرات مغناطیسی سنتز شده و داروی آزاد برای ۲۴ ساعت در 37°C ($*p < 0.05$ و $**p < 0.01$)

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه ما نانوذرات مغناطیسی چند عاملی جدید جهت مهار سلول‌های سرطانی تهیه کردیم. نانوحامل‌های ساخته شده، با اثر هدف‌یابی مغناطیسی، می‌توانند به طور گزینشی توسط سلول‌های تومور جذب شده و موجب بهبود رهایش درون سلولی دارو و افزایش قابلیت ضد توموری گردند. علاوه بر آن، مطالعات سمیت سلولی به وضوح نشان داد که نانوحامل بارگذاری شده با سیس پلاتین سمیت بالایی بر روی هر دو سلول HeLa و MDA-MB-231 دارد، حال آنکه نانوحامل فاقد دارو سمیت چشمگیری بر سلول‌های سرطانی نشان نداد. این مشاهدات ما را بر این باور می‌رساند که نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCA-b\text{-PEG}$ دارای ارزش بالقوه برای دارورسانی هدفمند در آینده نانوپزشکی برای معالجه سرطان و سایر بیماری‌ها می‌باشد.

۵- مراجع

- [1] K. Irena, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **1** (2006) 1.
- [2] S.W. Thompson, L.E. Davis, M. Kornfeld, R.D. Hilgers and J.C. Standefer, *Cancer*, **54** (1984) 1269.
- [3] V.T. Huynh, J.Y. Quek, P.L. de Souza and M.H. Stenzel, *Biomacromolecules*, **13** (2012) 1010.
- [4] Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M.R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama and K. Kataoka, *ACS Nano*, **7** (2013) 8583.
- [5] V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter, O. Domotor, E.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Kollensperger, M. Galanksi, W. Berger, B.K. Keppler and C.R. Kowol, *Chemical Communications*, **49** (2013) 2249.
- [6] S.J. Tabatabaei Rezaei, V. Amani, M.R. Nabid, N. Safari and H. Niknejad, *Polymer Chemistry*, **6** (2015) 2844.
- [7] C.F. Chin, S.Q. Yap, J. Li, G. Pastorin and W.H. Ang, *Chemical Science*, **5** (2014) 2265.

- [8] X. Mou, Z. Ali, S. Li and N. He, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **15** (2015) 54.
- [9] P. Kesharwani and A.K. Iyer, *Drug Discovery Today*, **20** (2015) 536.
- [10] J. Li, Y. Wang, R. Liang, X. An, K. Wang, G. Shen, Y. Tu, J. Zhu and J. Tao, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **11** (2015) 769.
- [11] K. Yang, L. Feng and Z. Liu, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **12** (2015) 601.
- [12] L. Sun, T. Liu, H. Li, L. Yang, L. Meng, Q. Lu and J. Long, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7** (2015) 4990.
- [13] H.-W. Ko, M.-H. Chi, C.-W. Chang, C.-W. Chu, K.-H. Luo and J.-T. Chen, *ACS Macro Letters*, **4** (2015) 717.
- [14] J. Estelrich, E. Escribano, J. Queralt and M. Busquets, *International Journal of Molecular Sciences*, **16** (2015) 8070.
- [15] K. Ulbrich, K. Holá, V. Šubr, A. Bakandritsos, J. Tuček and R. Zbořil, *Chemical Reviews*, **116** (2016) 5338.
- [16] H.-S. Cho, Z. Dong, G.M. Pauletti, J. Zhang, H. Xu, H. Gu, L. Wang, R.C. Ewing, C. Huth, F. Wang and D. Shi, *ACS Nano*, **4** (2010) 5398.
- [17] Y. Wu, Y. Wang, G. Luo and Y. Dai, *Bioresource Technology*, **100** (2009) 3459.
- [18] M.R. Nabid, S.J. Tabatabaei Rezaei, R. Sedghi, H. Niknejad, A.A. Entezami, H.A. Oskooie and M.M. Heravi, *Polymer*, **52** (2011) 2799.
- [19] S.J.T. Rezaei, M.R. Nabid, H. Niknejad and A.A. Entezami, *International Journal of Pharmaceutics*, **437** (2012) 70.
- [20] S.J. Tabatabaei Rezaei, M.R. Nabid, H. Niknejad and A.A. Entezami, *Polymer*, **53** (2012) 3485.
- [21] H.S. Abandansari, M.R. Nabid, S.J.T. Rezaei and H. Niknejad, *Polymer*, **55** (2014) 3579.
- [22] S.J. Tabatabaei Rezaei, L. Sarbaz and H. Niknejad, *RSC Advances*, **6** (2016) 62630.
- [23] S.J. Tabatabaei Rezaei, H.S. Abandansari, M.R. Nabid and H. Niknejad, *Journal of Colloid and Interface Science*, **425** (2014) 27.
- [24] M.R. Nabid, Y. Bide, E. Aghaghafari and S.J.T. Rezaei, *Catalysis Letters*, **144** (2014) 355.
- [25] M. Adeli, B. Rasoulilian, F. Saadatmehr and F. Zabihi, *Journal of Applied Polymer Science*, **129** (2013) 3665.

