پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال نوزدهم، شماره ۵، پی در پی ۱۰۱، صفحات ۲۵۱ تا ۲۵۸
آذر و دی ۱۳۹۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۷/۲۲

مقایسه‌ی دو روش کونژوگاسیون مستقیم و غیرمستقیم به منظور تولید نانودارویی هدفمند با زیست‌سازگاری، اتصال و جذب سلولی بالاتر در درمان سرطان سینه به روش فوتوترمال‌تراپی

زهرا حیدری[۱]، دکتر ریحانه سریری[۲]، دکتر مجتبی صلوتی[۳]*

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. دانشیار فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر پژوهش‌های بسیاری روی تولید نانوداروهای هدفمند جهت کاربرد آنها در درمان اختصاصی سرطان، انجام می‌گیرد. در این تحقیق، به منظور تولید نانودارویی با زیست سازگاری، اتصال و جذب سلولی بالاتر به عنوان عامل فوتوترمال‌تراپی هدفمند سرطان سینه، دو روش کونژوگاسیون مستقیم و غیرمستقیم، مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: نانومیله‌های طلا با طول موج جذبی ۷۰۰ نانومتر طی دو روش مستقیم و غیر مستقیم به مولکول بومبسین، کونژوگه شدند. در روش مستقیم که روش متداول می‌باشد، پس از اتصال کوالان بومبسین به نانوذرات طلا، نانومیله‌ها پلی‌اتیلن‌گلیکوله گردیدند. در حالی که در روش غیر مستقیم، ابتدا نانومیله‌های طلا توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول روکش شده و سپس مولکول‌های بومبسین توسط پیوند کوالان به نانوذرات متصل گردید. در مرحله‌ی آخر، دو کونژوگه‌ی حاصل از نظر پایداری در خون، زیست سازگاری، اتصال اختصاصی و جذب سلولی با یکدیگر مقایسه گردیدند تا بهترین روش، جهت تولید نانو دارویی با ویژگی‌های بهینه، به دست آید.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد هر دو نانو داروی تولید شده، پایداری بالا و مشابهی در خون دارند ولی نانو داروی تولیدی به روش غیرمستقیم، زیست سازگاری بالاتری از خود نشان داد. به علاوه، نانو داروی تولید شده به روش غیرمستقیم، حدود چهار برابر اتصال و جذب سلولی بالاتری نسبت به کونژوگه‌ی روش مستقیم از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: کونژوگاسیون غیرمستقیم، نانو دارویی با زیست سازگاری، اتصال و جذب سلولی بالاتر تولید کرده و روش مناسب‌تری جهت تولید نانو داروهای هدفمند می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانوداروی هدفمند، کونژوگاسیون مستقیم، کونژوگاسیون غیرمستقیم، زیست سازگاری، جذب سلولی، اتصال سلولی، سرطان سینه

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Heidari Z, Sariri R, Salouti M. Comparison of direct and indirect conjugation methods to produce a targeting nanodrug with more biocompatibility, high cellular uptake and binding for photothermal therapy of breast cancer. Pejouhandeh 2014;19(5):251-258.

مقدمه

با ظهور علم نانوتکنولوژی، دانشمندان تلاش می‌کنند تا از ویژگی‌های بسیار مفید نانوذرات در درمان هدفمند سلول‌های سرطانی استفاده کنند (۱). نکات مهمی که باید در تولید نانوداروهای هدفمند در نظر گرفته شوند این است که نانوداروهای سنتز شده باید تحت شرایط فیزیولوژیکی، پایدار و دارای زیست سازگاری بالا باشند، تمایل بالایی به سلول هدف مربوطه نشان دهند، به میزان بالایی توسط بافت توموری جذب گردند و پس از اتصال به سلول سرطانی، بتوانند وارد سلول شوند (۳،۲). بنابراین دانشمندان در تلاش هستند تا با تغییر و بهینه‌سازی روش کونژوگاسیون، پارامترهای زیست‌سازگاری، پایداری، قدرت اتصال اختصاصی و جذب سلولی نانوداروهای هدفمند را بهبود بخشند. در این راستا،

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مجتبی صلوتی؛ مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران؛ پست الکترونیک: Saloutim@yahoo.com

استفاده از نانوداروهای هدفمند به خصوص نانو ذرات میله‌ای طلا، به علت خصوصیات منحصر به فرد آن و توسعه‌ی روش‌های شیمیایی و فیزیکی سنتز آن افزایش یافته است (۲). مهمترین مزیت نانوذرات میله‌ای این است که جذب نوری ۲۰ برابر یا بیشتر نسبت به سایر اشکال نانوذرات طلا داشته و دارای توانایی دوگانه، جهت استفاده به عنوان عامل متباین‌کننده، هم در تصویربرداری به روش اپتواکوستیک توموگرافی و هم در درمان به روش فوتوترمال‌تراپی می‌باشند (۴،۳). این نانوذرات، علی‌رغم وجود سورفکتانت سمی کاتیونی ستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (Cetyltrimethylammonium bromide- CTAB) در سطح خود، به سهولت توسط روکش‌دهی با پلی‌اتیلن‌گلیگول، زیست‌سازگاری قابل توجهی از خود نشان می‌دهند (۷-۴). نکته‌ی جالب توجه دیگر در مورد نانو ذرات میله‌ای طلا این است که دارای تمایل اتصالی قوی به گروه‌های تیول یا آمین نوع اول می‌باشند که سبب می‌شود این ذرات با کارایی بالا با گروه‌های متعددی از بیوملکول‌ها، کونژوگه شوند (۴،۳). بنابراین، با اتصال نانوذرات میله‌های طلا به مولکول‌های هدف‌یاب سلول‌های سرطانی، می‌توان نانوداروهای هدفمندی تولید کرد که به طور اختصاصی فقط به موقعیت تومور یا سلول‌های سرطانی متصل می‌گردند (۵). با استفاده از نانوداروهای هدفمند، علاوه بر این که میزان نانوذرات طلای مصرفی کاهش می‌یابد، آسیب به بافت‌های سالم کمتر شده و بازده‌ی درمان، بیشتر می‌شود (۶،۵).

طی تحقیقات به عمل آمده روی پوست قورباغه‌ی *بومبینا بومبینا* (*Bombina bombina*)، یک نوروپپتید ۱۴ آمینواسیدی به نام بومبسین (bombesin) جداسازی شده است که دارای تمایل بسیار بالایی برای اتصال به رسپتور پپتید آزاد کننده‌ی گاسترین (GRP) می‌باشد (۸،۷). انگیزه‌ی اصلی دانشمندان در طراحی نانوداروی هدفمند با توانایی هدف‌گیری گیرنده‌های بومبسین آن است که رسپتورهای GRP، در تومورهای متعددی از قبیل سینه، پروستات، ریه و پانکراس در انسان، به میزان بالایی بیان می‌شوند، در حالی که این رسپتورها در بافت‌های طبیعی، به میزان اندکی بیان می‌شوند (۹-۷). بنابراین، با اتصال نانومیله‌های طلا به پپتید بومبسین، می‌توان نانودارویی هدفمند جهت درمان سلول‌های سرطانی سینه به روش فوتوترمال‌تراپی تولید کرد.

در این مطالعه، دو نوع روش کونژوگاسیون مستقیم و غیرمستقیم پپتید بومبسین به نانومیله‌های طلا بررسی گردید تا مشخص شود کدامیک از این دو روش، جهت تولید نانودارویی با قدرت اتصال و جذب سلولی بالاتر توسط سلول‌های بیان‌کننده‌ی رسپتور GRP و سمیت اندک، مناسب می‌باشند. تفاوت دو روش کونژوگاسیون مستقیم و غیرمستقیم، در مرحله‌ی اتصال مولکول بیولوژیک و پلی‌اتیلن‌گلیکوله کردن می‌باشد (۱۰). در بیشتر تحقیقاتِ گزارش شده تاکنون، از روش مستقیم استفاده شده است. در این روش، ابتدا نانومیله‌های طلا به مولکول بیولوژیک کونژوگه و سپس با پلی‌اتیلن‌گلیگول پوشیده می‌شوند. در حالی که در روش غیرمستقیم، ابتدا نانومیله‌های طلا با پلی‌اتیلن‌گلیگول روکش شده و سپس به پپتید بومبسین کونژوگه می‌گردند.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز شامل اتیل ۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کاربودی آمید (EDC)، نانوتینک اسید (Nanothink acid)، نمک هیدروکسی ۲و۵-دی‌اکسوپیرولیدین، سولفونیک اسید (sulfo-NHS)، پلی‌اتیلن‌گلیکول تیول‌دار (mPEG-SH)، پلی‌اتیلن‌گلیکول تیول‌دار کربوکسیله (COOH-PEG-SH)، متیل تیازول تترازولیوم (MTT)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، کیت رنگ آمیزی نقره، محیط کشت RPMI1640، تریپسین، استرپتومایسین و پنی‌سیلین، از شرکت سیگما خریداری شدند. نانومیله‌های طلا با پلاسمون رزونانس ۷۰۰ نانومتر از شرکت Nanosc آمریکا خریداری شد. دی تیوتریتول (DTT) از شرکت مرک خریداری شد. رده‌ی سلولی سرطان سینه T47D و رده‌ی سلولی سرطانی پوست (AG01522) E8 از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری گردیدند. پپتید بومبسین با توالی Lys_1 - Gly_2 - Gly_3 - Cys_4 - Asp_5 - Phe_6 - Gln_7 - Trp_8 - Ala_9 - Val_{10} - βAla_{11} - His_{12} - Phe_{13} - NIe_{14} - NH_2 از شرکت GenScript آمریکا تهیه گردید.

برای کونژوگاسیون آنالوگ پپتیدی بومبسین با نانوذرات طلا به روش مستقیم، ۵ میلی‌لیتر از نانومیله‌های طلای روکش‌شده با CTAB با سرعت ۱۰هزار دور در دقیقه، دو بار سانتریفیوژ و رسوب حاصل در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول نانوتینک اسید به محلول فوق اضافه و به منظور جلوگیری از تجمع نانومیله‌ها، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سونیکیت گردید. در حالی که سونیکاسیون برای ۱۲۰ دقیقه‌ی دیگر ادامه داشت، دما به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رسانده شد. در مرحله‌ی بعد، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ و پس از دور ریختن

مایع رویی، رسوب در بافر فسفات سالین حل گردید. اتیل -۳ و ۳- میتل آمینو پروپیل کربودی‌ایمید هیدروکلراید (1- ethyl- 3- (3- dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) با غلظت ۴ میلی‌مولار و NHS- سولفوی با غلظت یک میلی‌مولار، به محلول اضافه و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مخلوط گردید تا نانومیله‌های طلای فعال (نانومیله‌های طلایی که قدرت اتصال به زنجیره‌ی جانبی اسیدآمینه را دارند) تولید گردند. پپتید با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ۵ میلی‌لیتر از نانو میله‌های طلای فعال، افزوده شد و مخلوط حاصل در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت، سونیکیت گردید. پس از حذف پپتید اضافی توسط روش سانتریفیوژ، ۵۰ میکرولیتر از پلی‌اتیلن‌گلیگول تیول‌دار ۱۰ میلی‌مولار با وزن مولکولی ۵۰۰۰ دالتون، به ۵ میلی‌لیتر از پپتید متصل به نانومیله‌های طلا افزوده شد و مخلوط حاصل در دمای اتاق برای ۲ ساعت انکوبه گردید. بعد از اتصال پپتید به نانومیله‌های طلا، محلول دو بار با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردید تا کمپلکس از مواد اضافی پاک و خالص سازی شود. در نهایت، مخلوط نهایی نانومیله‌های طلا- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول، با افزودن بافر فسفات سالین، رقیق گردید تا چگالی نوری یک در طول موج ۷۰۰ نانومتر بدست آید (۱۱).

برای کونژوگاسیون آنالوگ پپتیدی بومبسین با نانو ذرات طلا به روش غیرمستقیم، ۵ میلی‌لیتر از نانومیله‌های طلای روکش شده با CTAB با سرعت ۱۰هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، دو بار سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه، حل گردید (۱۲). مخلوطی از پلی‌اتیلن‌گلیکول تیول‌دار کربوکسیله و دی‌تیوتریتول با نسبت مولار یک به یک، تهیه و به محلول نانومیله‌های طلا اضافه شد (۱۶،۱۵). مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. جهت حذف پلی‌اتیلن‌گلیکول‌های متصل نشده، محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۳،۱۲). در مرحله‌ی بعد، مولکول‌های بومبسین به صورت کوالان به سطح نانومیله‌های پلی‌اتیلن‌گلیکول شده، متصل گردید. ابتدا اتیل-۳و۳-متیل آمینوپروپیل کربودی‌ایمید هیدروکلراید ۴ میلی‌مولار و NHS- سولفوی ۱ میلی‌مولار به محلول اضافه شده و محلول به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مخلوط گردید تا نانومیله‌های طلای فعال (نانومیله‌های طلایی که قدرت اتصال به زنجیره‌ی جانبی اسیدآمینه را دارند) تولید گردد (۱۱). پپتید با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ۵ میلی‌لیتر از نانومیله‌های طلای فعال، افزوده و مخلوط حاصل در دمای اتاق برای مدت ۲ ساعت، سونیکیت گردید. بعد از اتصال موفق بومبسین به نانوذرات طلا، پپتیدهای متصل نشده به وسیله‌ی سانتریفیوژ کردن با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، حذف گردیدند. در نهایت، مخلوط نانومیله‌های طلا - پلی‌اتیلن‌گلیکول – بومبسین، با افزودن بافر فسفات سالین، رقیق گردید تا چگالی نوری یک، در طول موج ۷۰۰ نانومتر، به دست آید (۱۳-۱۱).

اسپکتروسکوپی جذبی یکی از تکنیک‌های رایج و متداول، جهت تأیید اتصال نانوذرات به مولکول‌های بیولوژیک و پلی‌اتیلن‌گلیکوله کردن می‌باشد (۱۵،۱۴). پس از هر مرحله از کونژوگاسیون، جهت تأیید اتصال نانومیله‌های طلا و بومبسین، از محلول حاصل، طیف جذبی در محدوده‌ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV/vis (ساخت شرکت International MAX آمریکا، مدل GENESYSE 5) گرفته شد. در صورت اتصال موفق در هر مرحله، پیک‌های جذبی در طیف جذبی به طول موج‌های بالاتر شیفت خواهند یافت (۱۶-۱۴).

در خون عوامل مختلفی از قبیل Ca^{2+}، H^{+}، Na^{+}، Cl^{-} و لیپیدها می‌توانند روی پایداری و عملکرد کمپلکس تولید شده تأثیر بگذارند. به همین علت، جهت ارزیابی و مقایسه‌ی پایداری نانوداروهای تولید شده توسط دو روش، به هر میلی‌لیتر از سرم خون، ۱۰۰ میکرولیتر نانوکونژوگه اضافه شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، طیف جذبی نمونه‌ها در محدوده‌ی ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر، مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانچه نانوکونژوگه‌ها از پایداری مناسبی برخوردار باشند، هیچ‌گونه پهن‌شدگی یا کاهش در پیک‌های جذبی محلول نمونه‌ها، مشاهده نخواهد شد (۱۱).

زیست سازگاری نانوداروهای تولید شده به روش MTT، روی رده‌ی سلولی T47D (سلول‌های سرطانی سینه بیان‌کننده‌ی **رسپتور** GRP) ارزیابی و مقایسه گردیدند (۱۷). سلول‌ها در چاهک‌های پلیت‌های استریل ۹۶ خانه، با تراکم سلولی ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک، تقسیم و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، چاهک‌ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند تا سلول‌های متصل نشده و مرده، حذف گردند (۱۸،۱۷). سپس به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانومیله- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول و یا نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، اضافه و در زمان‌های انکوباسیون مختلف (۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، بقای سلولی بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل متیل‌تیازول‌تترازولیوم به

کریستال‌های فورمازان با استفاده از تست MTT، ارزیابی گردید (۱۷). برای این منظور، MTT (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در زمان‌های مورد نظر، به هر چاهک حاوی سلول، اضافه و پس از ۴ ساعت، رسوب سلولی حاصل در دی‌متیل‌سولفوکساید حل و جذب نوری بلورهای فورمازان تشکیل شده، توسط دستگاه الایزا ریدر (ساخت کمپانی آویرنس، مدل ۳۲۰۰) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد بقای سلولی هر نمونه، در مقایسه با گروه کنترل، محاسبه گردید (۱۸،۱۷). تمامی آزمایشات سه بار تکرار گردیدند.

جهت بررسی و مقایسه‌ی اتصال اختصاصی نانوداروهای تولید شده به سلول‌های سرطانی سینه، از دو رده‌ی سلولی سرطانی سینه T47D که واجد رسپتور GRP هستند و رده‌ی سلولی فیبروبلاست پوست (AG01522) E8 که سلول‌های سرطانی فاقد رسپتور GRP هستند، استفاده گردید. این سلول‌ها، روی پلیت ۱۲ خانه با محیط کشت RPM1-1640، کشت داده شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانومیله-بومبسین-پلی‌اتیلن‌گلیکول و یا نانومیله-پلی‌اتیلن‌گلیکول-بومبسین به آنها اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه (در این زمان نانو میله‌ها قادرند به رسپتور خود متصل شوند)، سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند تا نانو میله‌های متصل نشده، حذف گردند (۱۱). در مرحله‌ی آخر، رنگ‌آمیزی توسط کیت نقره انجام و نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با زمینه‌ی روشن، مدل میکروس IX70 مجهز به دوربین دیجیتال لومنرا، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

برای بررسی جذب سلولی نانوداروها به درون سلول‌های T47D، این سلول‌ها به تعداد 10^6 سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI در چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، رشد داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانومیله-بومبسین-پلی‌اتیلن‌گلیکول و یا نانومیله-پلی‌اتیلن گلیکول-بومبسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزوده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، انکوبه شدند. در زمان‌های مختلف (۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، محیط RPMI موجود در چاهک‌ها برداشته و چندین بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد تا نانوداروهای متصل نشده، از چاهک‌ها حذف گردند. در مرحله‌ی بعد، با افزودن تریپسین، سلول‌ها را از چاهک جدا کرده و غلظت نانوداروهای جذب شده توسط سلول، به روش اسپکتروفوتومتر جذب اتمی (ساخت شرکت VARIAN، مدل AA240FS) اندازه‌گیری و مقایسه گردید (۱۸،۱۷).

نتایج حاصل از این مطالعه با نرم افزار آماری SPSS 18، آزمون آماری one-way ANOVA و آزمون تعقیبی دانکن (Duncan)، مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار گرفت. در این مطالعه، $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار، در نظر گرفته شد.

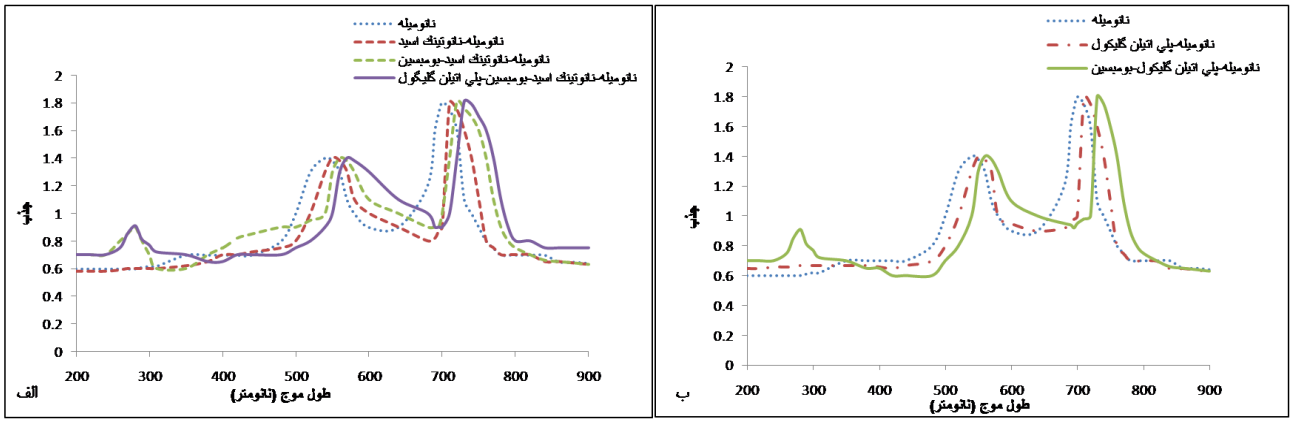
یافته‌ها

جهت بررسی موفقیت در مراحل کونژوگاسیون، از طیف‌سنجی جذبی مرئی- فرابنفش استفاده شد. در هر دو روش کونژوگاسیون، پس از هر مرحله، پیک‌های جذبی به سمت طول موج‌های بالاتر شیفت پیدا کردند که این پدیده، اتصال موفق بیومولکول‌ها به نانوذرات را تأیید می‌کند (شکل ۱). علت شیفت مشاهده شده، تغییر ضریب انکسار محیط موضعی نانوذرات طلا به علت اتصال مولکول‌های زیستی به سطح آن می‌باشد. عدم پهن‌شدگی در پیک‌ها پس از هر مرحله‌ی اتصال، حاکی از آن است که نانومیله‌ها طی مراحل کونژوگاسیون، شکل خود را حفظ کرده و دچار تجمع نشده‌اند. علاوه بر این، در طیف جذبی هر دو کونژوگه، یک پیک کوچک در طول موج ۲۸۰ نانومتر وجود دارد که مربوط به اسیدآمینه‌های فنیل‌آلانین و تیروزین موجود در ساختار پپتید بومبسین است. وجود این پیک، دلیل دیگری بر اتصال موفق پپتید به نانومیله‌های طلا می‌باشد.

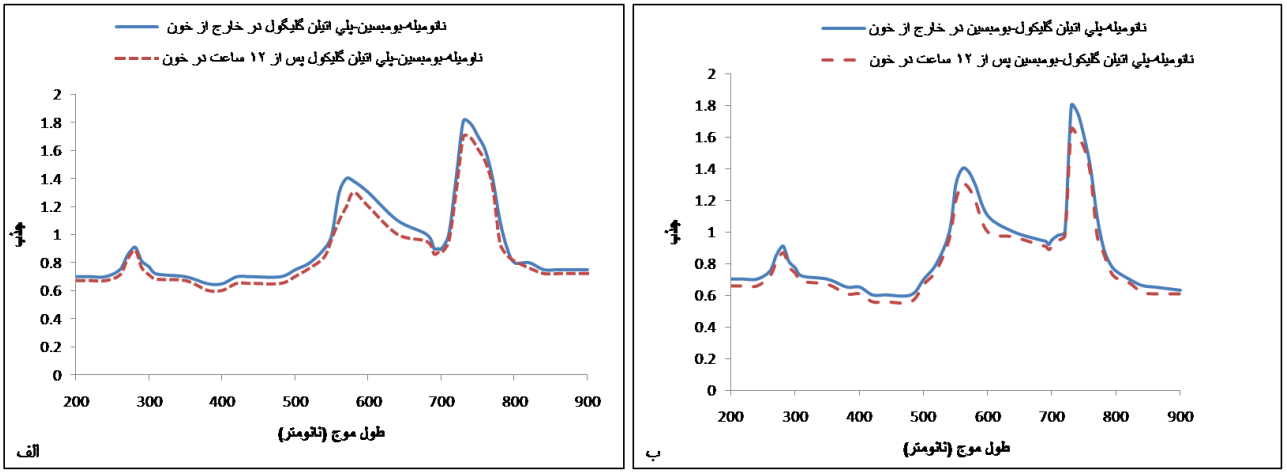
شکل ۲، طیف جذبی نانوداروها را پس از ۴ ساعت انکوباسیون با سرم خون انسان نشان می‌دهد. عدم پهن شدگی در طیف جذبی هر یک از نانوداروها حاکی از آن است که نانوداروهای تولید شده، دارای پایداری مناسبی در سرم خون انسان می‌باشند. علاوه بر این، عدم کاهش جذب در طیف جذبی، حاکی از آن است که مولکول‌های پلی‌اتیلن‌گلیگول موجود بر سطح نانوذرات طلا، مانع از واکنش و اتصال پروتئین‌های سرم به نانوذرات طلا شده است. همان‌طور که از مقایسه‌ی نتایج دو نمودار مشهود است، هر دو نانوداروی تولیدی (نانومیله-پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین و نانومیله-بومبسین-پلی‌اتیلن‌گلیکول) به علت اتصال کوالان پپتید بومبسین به نانوذرات طلا و روکش‌دهی با پلی‌اتیلن‌گلیکول، از پایداری بالا و تقریباً مساوی برخوردار می‌باشند.

بقای سلول‌های سرطانی سینه T47D انکوبه شده با نانوداروها با تست سمیت MTT سنجیده شد (نمودار ۱). هر دو نانودارو در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زیست‌سازگاری بالایی دارند. میزان زیست‌سازگاری نانوداروی نانومیله-پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین پس از ۲۴ ساعت

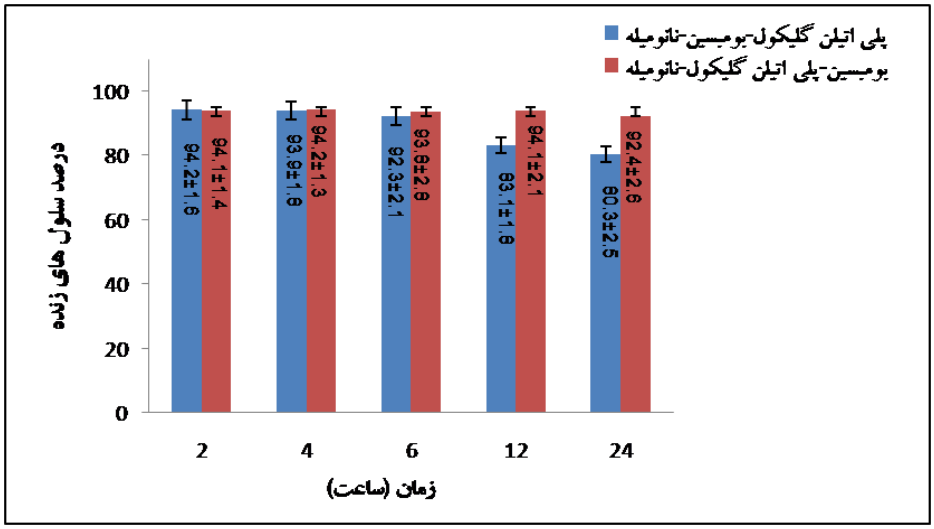
انکوباسیون، ۹۲/۴±۲/۶ درصد و نانوداروی نانومیله- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول ۸۰/۳±۲/۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوداروی نانومیله- پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین که به روش کونژوگاسیون غیرمستقیم تولید شده است، زیست‌پذیری بهتری از خود نشان می‌دهد.



شکل ۱. طیف جذبی (الف) نانوداروی نانومیله - بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول و (ب) نانوداروی نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین. در هر دو نمودار پس از هر مرحله، شیفت پیک‌های اصلی به طول موج‌های بالاتر مشاهده می‌گردد که حاکی از موفقیت روش کونژوگاسیون می‌باشد.



شکل ۲. پایداری نانوداروهای تولید شده در سرم خون انسان، (الف) کونژوگه‌ی حاصل از کونژوگاسیون مستقیم (نانومیله - بومبسین - پلی‌اتیلن‌گلیکول) و (ب) کونژوگه‌ی حاصل از کونژوگاسیون غیرمستقیم (نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین).



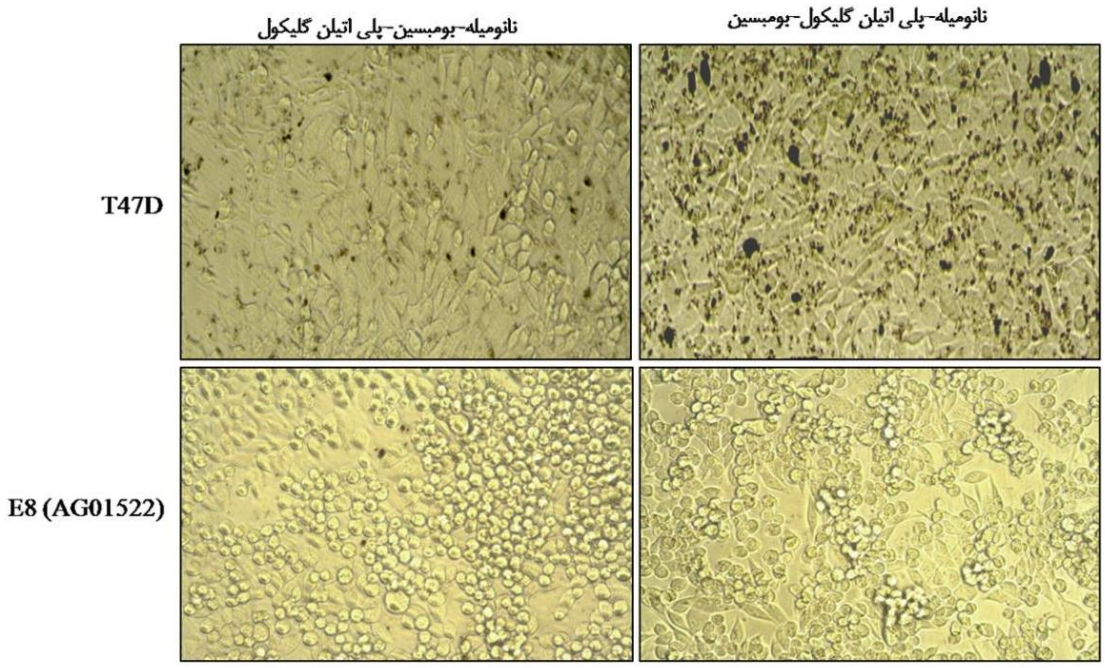
نمودار ۱. درصد بقای سلول‌های سرطانی سینه T47D انکوبه شده با نانوداروهای تولید شده به دو روش کونژوگاسیون مستقیم (نانومیله – بومبسین – پلی‌اتیلن‌گلیکول) و غیرمستقیم (نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین).

نتایج بررسی اتصال اختصاصی نانوداروها به سلول‌های سرطانی سینه در شکل ۳ نشان داده شده است. در تصاویر میکروسکوب نوری زمینه سفید، در سطح سلول‌های T47D، در نتیجه‌ی اتصال اختصاصی نانوداروها و رسپتورهای GRP، نقاط سیاه رنگی که همان نانوذرات طلا می‌باشند، مشاهده گردید. این در حالی است که این نقاط سیاه رنگ، در سطح سلول‌های E8 (AG01522) فاقد رسپتور GRP، مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی عدم اتصال نانوداروها به این رده‌ی سلولی می‌باشد (زیرا اتصال اختصاصی به علت عدم وجود رسپتور در سطح سلول صورت نگرفته است). با مقایسه‌ی تصاویر گرفته شده از سلول های T47D انکوبه شده با نانوداروها، مشاهده گردید که سطح سلول‌های T47D انکوبه شده با نانوداروی نانومیله- پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین در مقایسه با نانوداروی نانومیله- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول، نقاط سیاه بیشتری دارند که نشان‌دهنده‌ی اتصال بیشتر این نانودارو به رسپتورهای GRP سطح سلول می‌باشد. بنابراین، نانوداروی تولید شده توسط روش کونژوگاسیون غیرمستقیم (نانومیله-پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین)، قدرت اتصال اختصاصی بالاتری به سلول‌های سرطانی سینه در مقایسه با نانوداروی تولید شده به روش کونژوگاسیون مستقیم (نانومیله-بومبسین-پلی‌اتیلن‌گلیکول) دارد.

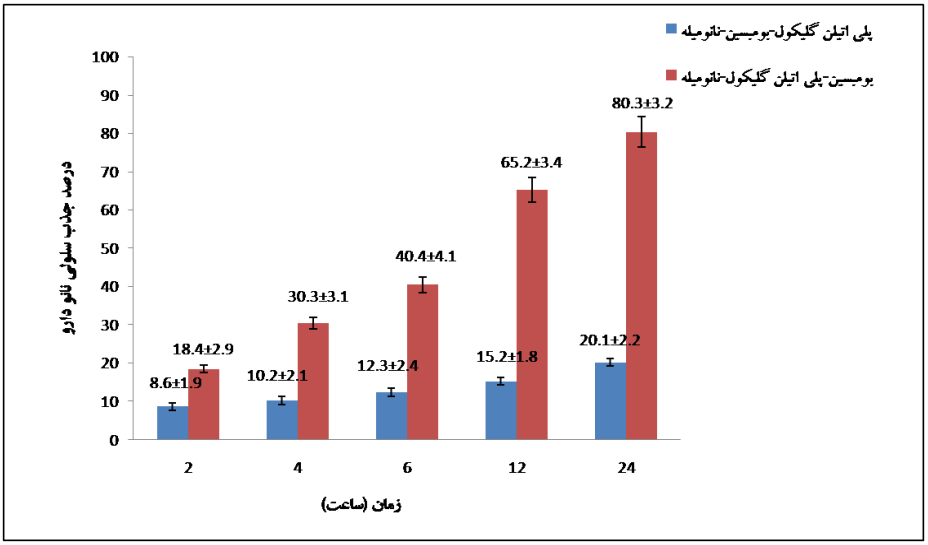
جذب سلولی نانوداروها به وسیله‌ی اندازه‌گیری غلظت نانوذرات طلای درون سلول‌های سرطانی سینه T47D به روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی، تعیین و مقایسه گردید. طبق نمودار ۲، جذب نانوداروها به درون سلول، وابسته به زمان بوده و با گذشت زمان میزان نانوداروی جذب شده توسط سلول، افزایش می‌یابد. با مقایسه‌ی جذب سلولی دو نانودارو، کاملاً مشخص است که میزان جذب نانوداروی حاصل از کونژوگاسیون غیر مستقیم (۳/۲±۸۰/۳ درصد در ۲۴ ساعت) در مقایسه با نانوداروی حاصل از کونژوگاسیون مستقیم (۲/۲±۲۰/۱ درصد در ۲۴ ساعت) توسط سلول، بالاتر (حدود ۴ برابر) می‌باشد ($P<0/05$).

بحث

چالش عمده در درمان سرطان، هدف‌گیری و از بین بردن سلول‌های سرطانی است به طوری که تا حد امکان، کمترین تأثیر را بر سلول‌های سالم داشته باشد (۲۰،۱۹). در سال‌های اخیر، نانوتکنولوژی، انقلابی عظیم در تشخیص و درمان سرطان ایجاد کرده است و در این راستا، نانوداروهای هدفمند، بسیار مورد توجه می‌باشند (۳). هدف از توسعه‌ی این نانوداروها که عموماً متشکل از نانودارو و لیگاندهای هدف‌یابی می‌باشند، انتقال اختصاصی دارو به بافت هدف و به حداقل رساندن عوارض داروها می‌باشد (۵).



شکل ۳. اتصال اختصاصی نانوداروهای تولید شده به روش کونژوگاسیون مستقیم (نانومیله - بومبسین - پلی‌اتیلن‌گلیکول) و غیر مستقیم (نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین)



نمودار ۲. جذب سلولی نانوداروهای تولید شده به روش کونژوگاسیون مستقیم (نانومیله – بومبسین - پلی‌اتیلن‌گلیکول) و غیر مستقیم (نانومیله - پلی‌اتیلن‌گلیکول - بومبسین).

از پارامترهای مهمی که در طراحی نانوداروهای هدفمند باید مورد توجه قرار گیرند، می‌توان به پایداری بالا در خون، زیست‌سازگاری، قدرت اتصال اختصاصی و جذب سلولی بالا در سلول‌های سرطانی، اشاره کرد. در این تحقیق سعی گردید با مقایسه‌ی دو روش کونژوگاسیون مستقیم و غیرمستقیم، روشی را که سبب افزایش پایداری نانودارو، زیست سازگاری، میزان اتصال اختصاصی و جذب سلولی نانودارو در سلول‌های سرطانی می‌گردد، مشخص نمود.

در بیشتر مطالعات انجام شده جهت تولید نانوداروی هدفمند، از روش کونژوگاسیون مستقیم استفاده شده است. در این روش ابتدا مولکول هدفمند به نانوذرات، متصل شده و سپس به منظور سمیت‌زدایی نانوذرات، پلی‌اتیلن‌گلیکوله گردیده‌اند (۱۱). این در حالی است که اگر مولکول هدف در سطح قرار داشته و بیشتر در دسترس باشد، قدرت اتصال و جذب سلولی بیشتری خواهد داشت (۱۰). با توجه به این فرض، در این تحقیق، روش کونژوگاسیون غیرمستقیم مد نظر قرار گرفت تا نانوداروهای حاصل از این روش با نانوداروی حاصل از روش متداول کونژوگاسیون مستقیم، مقایسه گردد. به این ترتیب که ابتدا جهت سمیت‌زدایی نانوذرات، نانومیله‌ها با پلی‌اتیلن‌گلیکول، روکش شده و سپس مولکول‌های بومبسین به آن متصل گردیدند. از آن جا که در این تحقیق، اتصالات کوالان مد نظر بوده است، از پلی‌اتیلن‌گلیکولی با دو گروه عاملی کربوکسیل و تیول استفاده گردید. مزیت استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول دو عاملی این است که گروه‌های تیولی، تمایل بالایی به نانوذرات طلا داشته و قادرند پیوندهای کوالان بسیار قوی با آن تشکیل دهند. در نتیجه، نانوذرات میله‌ای طلا، توسط اتصالات پایدار کوالان با پلی‌اتیلن‌گلیکول روکش می‌شوند. از طرف دیگر، گروه کربوکسیل انتهایی را می‌توان با استفاده از عوامل فعال‌کننده‌ی گروه کربوکسیل (EDC و sulfo-NHS) با گروه آمین اسیدآمینه‌ی لیزین انتهایی بومبسین، وارد واکنش کرده و یک پیوند کوالان آمیدی بین آنها برقرار کرد. با توجه به تغییرات انجام شده در روش کونژوگاسیون، انتظار می‌رود که نانوداروی تولید شده، دارای سمیت ناچیز، پایداری بالا در خون و قدرت اتصال و جذب سلولی بالاتر باشد.

از آن جا که هدف نهایی از تولید نانوداروی هدفمند، استفاده از آن به عنوان یک عامل هدفمند درمانی در شرایط درون تنی است، بنابراین اولین پارامتر در نظر گرفته شده، پایداری نانو دارو در خون می‌باشد. طبق نتایج گزارش شده در این تحقیق، هر دو کونژوگه‌ی حاصل، دارای پایداری تقریباً یکسانی در خون بودند که این نتیجه را می‌توان به پلی‌اتیلن‌گلیکوله کردن نانومیله‌های طلا و استفاده از پیوند کوالان در هر دو کونژوگه، مرتبط دانست (۱۱). از طرف دیگر، کونژوگه‌ی نانومیله-پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین، زیست‌سازگاری بیشتری نسبت به نانومیله- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول از خود نشان داد که علت آن را می‌توان روکش‌کردن نانومیله‌های طلا با پلی‌اتیلن‌گلیکول در مرحله‌ی اول روش کونژوگاسیون غیرمستقیم دانست. در سال ۲۰۱۱ نیز Green و همکارانش ثابت کردند که کارایی اتصال آنتی‌بادی کونژوگه شده با نانومیله‌های طلای روکش شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول (کونژوگه‌ی

غیرمستقیم) به سلول‌های سرطانی سینه، ۳۳/۹ درصد بهتر از کونژوگه‌ی آنتی‌بادی- نانومیله‌ی طلای پلی‌اتیلن‌گلیکوله (کونژوگه‌ی مستقیم) می‌باشد (۱۰). در تحقیق حاضر نیز، کونژوگه‌ی نانومیله- پلی‌اتیلن‌گلیکول- بومبسین، قدرت اتصال و جذب سلولی بالاتری (حدود ۴ برابر) نسبت به کونژوگه‌ی نانومیله- بومبسین- پلی‌اتیلن‌گلیکول از خود نشان داد که علت آن در دسترس بودن بیشتر مولکول‌های بومبسین جهت اتصال به رسپتورهای GRP می‌باشد. از دیگر مزایای روش کونژوگاسیون غیرمستقیم آن است که کونژوگاسیون در زمان کوتاهتری صورت گرفته و نیازی به لینکر و مراحل اضافی نمی‌باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت جهت تولید نانوداروی هدفمند با جذب و اتصال سلولی بالاتر و سمیت کمتر، روش کونژوگاسیون غیر مستقیم مناسب‌تر می‌باشد.

REFERENCES

1. Hu M, Chen JY, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li XD, *et al*. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical application. Chem Soc Rev 2006; 35(11): 1084-94.

2. Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. Nat Biotechnol 2005; 23(11): 1418-23.

3. Lowery AR, Gobin AM, Day ES, Halas NJ, West JL. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. Int J Nanomedicine 2006; 1(2): 149.

4. Chanda N, Shukla R, Katti KV, Kannan R. Gastrin releasing protein receptor specific gold nanorods: breast and prostate tumor avid nanovectors for molecular imaging. Nano Lett 2009; 9(5): 1798-805.

5. Ferro-Flores G, Ramírez F de M, Meléndez-Alafort L, Santos-Cuevas CL. Peptides for in vivo target-specific cancer imaging. Mini Rev Med Chem 2010; 10(1): 87-97.

6. Buchner DS, Lewandrowski KB. Tumor markers associated with breast cancer. Clin Lab Rev 2000; 8(3): 85-92.

7. Jean C R, Sandra W, Jacqueline SM. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand 125I-[D-TYR6, β-ALA11, PHE13, NLE14] bombesin (6–14). Clin Cancer Res 2002; 8: 1139-46.

8. Okarvi SM, Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potential tools against cancer. Cancer Treat Rev 2008; 34: 13-26.

9. Okarvi SM, Ibrahim AJ. Synthesis and evaluation of a technetium-99m labeled cytotoxic bombesin peptide conjugate for targeting bombesin receptor-expressing tumors. Nucl Med Biol 2010; 37(3): 277-88.

10. Green HN, Martyshkin DV, Rodenburg CM, Rosenthal EL, Mirov SB. Gold nanorod bioconjugates for active tumor targeting and photothermal therapy. Nanotechnology 2011; 2011. Doi: 10.1155/2011/631753.

11. Eghtedari M, Anton VL, John AC, Alexander AO, Motamedi M. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. Nano Lett 2009; 9: 287-91.

12. Rostro-Kohanloo BC, Bickford LR, Payne C, Day ES, Anderson LJE. The stabilization and targeting of surfactant-synthesized gold nanorods. Nanotechnology 2009; 20(43): 434005. doi: 10.1088/0957-4484/20/43/434005.

13. Nghiem THL, Nguyen TT, Fort E, Nguyen TP. Capping and in vivo toxicity studies of gold nanoparticles. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol 2012; 3(1): 015002. doi: 10.1088/2043-6262/3/1/015002.

14. Hosta-Rigau L, Olmedo I, Arbio J, Cruz LJ, Kogan MJ, Albericio F. Multifunctionalized gold nanoparticles with peptides targeted to gastrin-releasing peptide receptor of a tumor cell line. Bioconjugate Chem 2010; 21: 1070-8.

15. Huang X, El-Sayed IH, Wei Q, El-Sayed M. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. J Am Chem Soc 2006; 128: 2115-20.

16. EI- Sayed IH, Huang X, EI-Sayed M. Selective laser photo-thermal therapy of carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. Cancer Lett 2006; 239(1): 129-35.

17. Qian X, Peng XH, Ansari DO, Yin-Goen Q, Chen GZ, Shin DM, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. Nat Biotechnol 2008; 26(1): 83-90.

18. Niidome TM, Yamagata Y, Okamoto Y, Akiyama H, Takahashi T, Kawano Y, *et al*. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. J Controlled Release 2006; 114: 343-7.

19. Boughey JC, Gonzalez RJ, Bonner E, Kurere HM. Current treatment and clinical trial development for ductal carcinoma in situ of the breast. Oncologist 2007; 12: 1276-87.

20. Chanda N, Kattumuri V, Shukla V, Zambre A, Katti K, Upendran A, *et al*. Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. Proc Natl Acad Sci 2010; 107: 8760-5.