

ساخت نانوذرات آلومین بارگذاری شده با مهارکننده $GSK3\beta$ و بررسی اثر آن بر زیستایی

سل لاین سرطان سینه MCF-7

معصومه محمدیان نامقی ^۱M.Sc، آریتا پروانه تفرشی ^۱Ph.D*، شاه صنم عباسی ^۲Ph.D

- ۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، گروه پزشکی مولکولی
- ۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، گروه سلول‌های بنیادی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: tafreshi@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۵

چکیده

هدف: در این مطالعه به سنتز نانوذرات آلومینی به‌عنوان حامل ۷-بروموآندروپیریدین ۳ مونوگزیم (7-BIO) که یک مهارکننده قوی آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ($GSK-3\beta$) و دارای اثرات ضدتوموری است و به‌دلیل حلالیت و جذب پایین و سمیت گوارشی، امکان استفاده بالینی با محدودیت رو به‌رو خواهد بود، مبادرت شد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از غلظت‌های اولیه متفاوت آلومین سنتز نانوذراتی انجام و اندازه آن‌ها با میکروسکوپ الکترونی آزمون شد. پس از بارگذاری ذرات با 7-BIO و تیمار سلول‌های سرطانی، زیستایی و وجود آپوپتوزیس سلولی با استفاده از آزمون MTT و آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید سنجش شدند. اثر بخشی و فعالیت 7-BIO نیز با بررسی میزان فسفریلاسیون $GSK-3\beta$ به‌روش وسترن بلاتینگ آنالیز شد. نتایج آزمایش توسط آنالیز آماری One-Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آزمون سنتز نانوذرات نشان داد که برای سنتز نانوذرات نشان داد که در غلظت اولیه ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلومین، نانوذراتی هموزن با قطر $89/42 \pm 7$ نانومتر به‌دست می‌آیند. آزمون MTT نشان داد که نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO اثر سمیت بیشتری بر سلول‌های رده سرطانی MCF-7 در مقایسه با 7-BIO آزاد اعمال کرده‌اند. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید سلول‌های تیمار شده با 7-BIO نیز حاکی از القای آپوپتوزیس بود. همچنین 7-BIO افزایش قابل‌رویتی در میزان فرم فسفریله $GSK-3\beta$ در سلول‌های سرطان سینه ایجاد می‌کند.

نتیجه‌گیری: به‌این ترتیب نانوذرات آلومین بارگذاری شده با مهارکننده $GSK3\beta$ زیستایی سل‌لاین سرطان سینه MCF-7 را به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌دهند که می‌تواند به‌عنوان یک راه‌کار درمانی در آینده مورد آزمون قرار گیرند.
واژگان کلیدی: نانو ذرات آلومین، 7-BIO، $GSK3\beta$ ، سلول مدل سرطان سینه، آپوپتوزیس

مقدمه

در میان انواع نانوذرات، نانوذراتی که با استفاده از برخی از پروتئین‌ها مثل کارژین، آلبومین و ژلاتین تهیه می‌شوند، دارای ویژگی‌های مناسب از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، غیر آنتی‌ژنیک بودن و نیز سهولت در تهیه هستند. آلبومین از پرکاربردترین پروتئین‌های مورد استفاده در دارورسانی است. همچنین تهیه نانوذرات آلبومینی در حجم‌های بالا برای مصارف تجاری نیز امکان پذیر است. نانوساختارهای آلبومین قادر به حل کردن داروهای نامحلول در آب هستند و سمیت را در سلول‌های سالم کاهش می‌دهند و نوکلئیک اسیدها را از تخریب محافظت می‌کنند. در سیستم دارو رسانی لیگاندهای مختلف می‌توانند به آلبومین متصل شوند تا دارو رسانی هدفمند را برای سلول‌های مشخصی انجام دهند. به دلیل حضور گروه‌های کاربردی آمین و کربوکسیل روی سطح نانوذرات، امکان اتصال پیوند کووالانسی به لیگاندهای مختلف برای هدف قرار دادن سلول‌ها وجود دارد (۱-۳). آلبومین دارای گروه‌های عاملی مختلف و متعددی بوده و بنابراین ظرفیت اتصال به مقادیر قابل توجه دارو را دارد. شناخت کامل از توالی آمینو اسیدی و ساختار آلبومین و گروه‌های باردار متعدد اجازه اتصال انواع دارو به نانوذرات آلبومینی با مکانیسم‌های مختلف شامل جاذبه الکترواستاتیکی با داروهای دارای بار منفی مانند جنسایکلوویر (Ganciclovir) و نیز ترکیبات دوگانه دوست مانند دوکسوروبیسین (Doxorubicin) و آبگریز مانند پکلیتکسل Paclitaxel را می‌دهد (۳). تجویز نانوذرات آلبومین در یک محدوده ی دوز وسیع (۲)، ۲۰ و ۳۹۰ میکروگرم برای هر حیوان) به ریه‌های موش (BALB/C mice) نشان داد که این نانوذرات تنها در دوزهای بالا موجب التهاب خفیف می‌شوند (۴). روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی برای تهیه نانوذرات آلبومین استفاده می‌شود، از روش‌های شیمیایی می‌توان به Self-assembly و Emulsification، Desolvation و

Thermal اشاره کرد و از روش‌های فیزیکی می‌توان Nano spray drying، NAB-technology، gelation را نام برد (۱، ۵).

روش‌های مختلفی نیز برای بارگذاری نانوذرات آلبومین با داروی مورد نظر وجود دارد، مثلاً اتصال کووالانسی، پوشش دهی سطح و جذب الکترواستاتیکی که به علت وجود گروه‌های عملکردی مختلف در ساختار اولیه آلبومین می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲). داروهای آبدوست می‌توانند با روش‌های مختلف بارگذاری شوند. مثلاً، انکوباسیون دارو با پیش ساز نانوذرات آلبومینی. در روش دارو می‌تواند بر سطح نانوذره جذب شود یا داخل نانوذره قرار گیرد. داروی Ganciclovir یک داروی ضد ویروسی که برای درمان عفونت‌های سیتو مگالو ویروس استفاده می‌شود و نیز داروی گاباپنتین Gabapentin که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد با استفاده از این روش‌های دارو رسانی موجب پایداری بیشتر دارو و نیز کاهش اثرات جانبی شده‌اند (۲، ۶، ۷).

روش‌های مختلفی نیز برای بارگذاری داروهای کم و نامحلول در آب در نانوذرات آلبومینی استفاده شده است. اتصال داروها به نانوذرات می‌تواند توسط جذب الکترواستاتیکی یا اتصال کووالانسی بین دارو و ماتریکس آلبومینی نانوذرات باشد. برای این نوع بارگذاری، چندین روش از جمله Nab-technology و Self assembly وجود دارد. برای مثال داروی Paclitaxel که حلالیت پایینی در آب دارد در صورت تجویز با غلظت بالا، واکنش‌های آلرژیک شدیدی را ایجاد می‌کند، ولی پس از بارگذاری شدن با نانوذرات آلبومینی افزایش توجهی در قابلیت حلالیت آن و اثرگذاری‌اش بر سلول‌های رده سرطان پستان حاصل می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر از نانوذرات آلبومینی به منظور حمل وینبلاستین سولفات Vinblastine sulfate (VBLs) استفاده شد که تسهیل در دارو رسانی به محل تومور را موجب شد (۸، ۹). نانوذرات آلبومینی برای بهبود حلالیت و افزایش اثرگذاری

این تحقیق به بارگذاری کردن GSK-3β با نانو ذرات آلبومینی پرداخته شد و زیستایی سل لاین سرطان سینه تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش سنتز نانوذرات آلبومینی: در این تحقیق نانوذرات آلبومینی با روش Desolvation سنتز شدند (۱۷-۱۹). ابتدا غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از محلول BSA با حلال NaCl (۱۰ میلی‌مولار) تهیه شدند. سپس pH این محلول با سود تهیه شده به ۸/۲ رسانده شد. سپس اتانل به صورت قطره قطره با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه اضافه شد. در این شرایط محلول با دور ۵۵۰ تحت هم زدن است. اضافه شدن اتانل تا زمانی ادامه یافت که محلول از حالت شفاف به کدر تغییر کرده و معرف تشکیل نانوذرات بود و سپس گلو تار آلدئید ۴ درصد به منظور ایجاد اتصال متقاطع اضافه شد. به منظور تبخیر اتانل، نانوذرات به مدت ۱۲ ساعت تحت هم زدن قرار گرفتند. پس از تبخیر اتانل، جهت جداسازی نانوذرات ابتدا نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گشت و رسوب حاصل که نانوذرات مورد نظر بود برای آنالیز و آزمون‌های بعدی جدا شد.

بارگذاری 7-BIO در نانوذرات آلبومینی: در این روش که از گلو تار آلدئید ۴ درصد به منظور ایجاد اتصال متقاطع استفاده شد (۳). مقدار ۱۰۰ میکروگرم 7-BIO حل شده در DMSO (۲۸ میکرولیتر)، در یک میلی‌لیتر اتانل حل شد و به صورت قطره‌های به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول آلبومین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با pH ۸/۲ تحت شرایط هم زدن با دور rpm ۵۵۰ اضافه گشت. پس از ایجاد کدورت و تشکیل، گلو تار آلدئید ۴ درصد به منظور ایجاد اتصال متقاطع اضافه شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت و تبخیر اتانل، نانوذرات آلبومینی که دارای داروی جذب شده بودند با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا نانوذرات بزرگ‌تر جدا شده و محلول رویی که

داروهای دیگری نیز استفاده شده‌اند که می‌توان به مواردی مانند دیکلوفناک، متو تروکسات، آسپیرین، دی متان سولفونات، تروکلیموس زیر اشاره کرد (۲، ۱۰، ۱۱). یافته‌های متعددی نشان می‌دهند که ایندیروبین و مشتقات آن هم می‌توانند کاندید مناسبی برای درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان باشند. تحقیقات Marko و همکارانش نشان داد که ایندیروبین دارای اثر مهار روی CDKs (Cyclin Dependent Kinases) و GSK-3β است و از این طریق اثرات ضد تکثیری خود را اعمال می‌کند (۱۲).

Wei و همکاران (۱۳) اثر ایندیروبین را بر سلول‌های PC-3 سرطان پروستات مورد بررسی قرار دادند. تیمار سلول‌ها با ایندیروبین موجب مهار چرخه سلولی و کاهش ۵۲/۲ درصد زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۵ میکرومولار، مهار بیان سیکلین D1 و c-myc در مسیر پیام‌رسان Wnt شد که حاکی از سرکوب تکثیر سلول‌های PC-3 توسط ایندیروبین با اثر روی چرخه سلولی و مسیر پیام‌رسان Wnt است.

ایندیروبین در سه نوع سلول سرطانی نیز مورد آزمایش قرار گرفته است. Shi و همکارانش (۱۴) سلول‌های هلا (سرطان دهانه ی رحم)، سلول‌های رده HepG2 (سرطان کبد) و سلول‌های رده HCT116 (سرطان کلون) را با ایندیروبین تیمار و نشان دادند که موجب القای آپوپتوزیس خارجی وابسته به دوز مصرفی و زمان می‌شود. Lee و همکاران (۱۵) نیز نشان دادند ایندیروبین باعث ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی ریه انسان از طریق p53 و مسیر وابسته به میتوکندری می‌شود.

گزارش‌هایی از این دست در دیگر سرطان‌ها نیز ارائه شده است. از آنجایی که ایندیروبین ماده‌های آبگریز، با حلالیت پایین در محلول‌های آبی و سمی است، به منظور افزایش قابلیت استفاده از آن در سلول‌های مختلف به سنتز مشتقات مختلفی از جمله 7-BIO مبادرت شده است (۱۶). همچنین از نانو ذرات آلبومینی می‌توان برای افزایش اثر بخشی و کاهش سمیت آن استفاده کرد که در

بررسی رهایش *BIO-7* از نانوذرات آلبومینی: در این تحقیق با الهام گیری از روش سایر محققین نظیر (۱۹-۲۳) به منظور تاثیر مقادیر مختلف گلو تار آلدیئید بر میزان رهایش دارو، نانوذرات با محلول‌های گلو تار آلدیئید ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۸ درصد، سنتزو رهایش دارو از آن‌ها در ساعات ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ در دو نوع محیط رهایش بررسی شد. محیط رهایش اول PBS با pH ۷/۴ و محیط رهایش دوم PBS با pH ۷/۴ به همراه ۰/۵ درصد SDS بود. محیط مورد آزمون نهایی اتانول به تنهایی بود.

علی‌رغم آن‌که در محیط‌های تحت آزمون فوق انکوباسیون با مدت‌های ذکر شده انجام شد، با در معرض قرار گیری اتانول این رهایش به‌طور فوری و با سرعتی صورت گرفت که نیازی به انکوباسیون نشد. مقدار نانوذرات حاوی دارو ۱ میلی‌گرم در ۰/۵ میلی‌لیتر محیط رهایش بود. نمونه‌های تهیه شده در PBS و SDS در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۰۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اتمام ساعات ذکر شده، به مدت ۲۰ دقیقه و دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و OD محلول رویی در طول موج ۲۹۰ خوانده شد و با استفاده از نمودار منحنی استاندارد غلظت *BIO-7*، میزان داروی رها شده محاسبه شد.

کشت و نگهداری سل لاین سرطانی سینه رده‌ی MCF-7 سل لاین ذکر شده در فلاسک T25 با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به مقدار کلی ۵ میلی‌لیتر کشت داده شد و در انکوباتور قرار گرفتند. محیط کشت این سلول‌ها هر سه روز یک‌بار تعویض شد. سلول‌ها پس از حدود ۵ تا ۷ روز کف فلاسک را پر کرده و آماده‌ی پاساژ بودند. برای نگهداری طولانی مدت سلول‌ها، بعد از تریپسینه کردن سلول‌ها، به رسوب سلولی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO و ۹۰۰ میکرولیتر FBS اضافه و به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا تانک ازل منتقل شد.

روش آزمون *MTT* و رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیديوم بروماید: سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ در هر خانه از

حاوی نانوذرات با سایز مورد نظر بود با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. نانوذرات بارگذاری شده پس از سنتز، به‌منظور حذف داروی بارگذاری نشده، دو بار با آب دیونیزه شسته شدند.

تهیه منحنی استاندارد غلظت *BIO-7* در اتانول: به‌منظور تعیین و بررسی میزان بارگذاری *BIO-7* در نانوذرات آلبومینی، منحنی استاندارد غلظت رسم شد. بدین‌منظور ابتدا طول موج مناسب با اسکن کردن *BIO-7* در اتانول (با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با دستگاه اسپکتروفوتومتری یافت شد. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و OD آن‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری خوانده شد. سپس، نمودار OD بر حسب غلظت رسم و معادله‌ی خط به‌دست آمد.

بررسی میزان بارگذاری *BIO-7* در نانوذرات آلبومینی: به‌منظور بررسی مقدار داروی بارگذاری شده در نانوذرات آلبومینی، پس از سنتز نانوذرات بارگذاری شده با دارو و دو بار شستشو با آب دیونیزه، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول به نانوذرات اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دستگاه حمام التراسونیک قرار گرفت. با این روش، اتانول نانوذرات را تخریب کرده و دارو رها شده و وارد محیط اتانول می‌شود. سپس، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و OD محلول رویی در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. غلظت داروی موجود در ۳۰۰ میکرولیتر با استفاده از منحنی استاندارد *BIO-7* محاسبه شد. ظرفیت بارگذاری و بازدهی بارگذاری با استفاده از معادله‌های ۱ و ۲ نیز محاسبه شد (۲۰).

$$\text{معادله ۱: } \frac{\text{میزان داروی جذب شده در نانوذرات (میکروگرم)}}{\text{مقدار نانوذرات (میلی‌گرم)}} = \text{ظرفیت بارگذاری}$$

$$\text{معادله ۲: } 100 \times \frac{\text{میزان داروی جذب شده}}{\text{میزان داروی اضافه شده (اولیه)}} = \text{بازدهی بارگذاری \%}$$

استفاده قرار گرفت. به رسوب سلولی ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز سلولی کامل (حاوی سدیم فلوراید و سدیم اورتووانادات و مهارکننده‌های پروتئازها) اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت به طوری که هر ۵ دقیقه پیپتاژ شد تا لیز سلولی به صورت کامل انجام شود. پس از آن برای جدا کردن مواد زائد و ضایعات سلولی از پروتئین‌ها، سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی یا مستقیماً برای استخراج پروتئین مورد استفاده قرار گرفت و یا برای نگهداری طولانی در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش بردفورد:

با استفاده از روش ابداعی (۱۹۶۶) Bradford سنجش غلظت پروتئین انجام شد (۲۵).

به این ترتیب که به منظور بارگذاری مقادیر مساوی از نمونه‌های پروتئینی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، ابتدا غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش بردفورد تعیین شد. محلول بردفورد دارای رنگ کوماسی‌بلو است که به گروه‌های آمین موجود در اسیدهای آمینه متصل می‌شود و رنگ آبی ایجاد می‌کند. بنابراین، میزان رنگ آبی ایجاد شده با مقدار اسیدهای آمینه و در نتیجه غلظت پروتئینی رابطه مستقیمی دارد. در این روش، غلظت‌های متوالی از BSA تهیه و پس از اضافه نمودن محلول بردفورد، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ خوانده شد. بر اساس جذب‌های به دست آمده و غلظت استانداردها، منحنی استاندارد غلظت رسم شد. ۶۰ میکروگرم از نمونه‌ی پروتئینی با ۳۰ میکرولیتر از Sample buffer (2X) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. ژل پیش از قرارگیری پروتئین‌ها در آن، ۱۵ دقیقه در جریان برق (۱۳۰ ولت) قرار گرفت. سپس جریان برق قطع شد و نمونه‌ها توسط سمپلر در چاهک‌های ژل ریخته شدند. ۱۰ میکرولیتر از نشانگر پروتئینی نیز در یکی از چاهک‌ها ریخته شد تا بر اساس

پلیت ۹۶ خانه کشت داده و تیمار شدند. محلول MTT به نسبت ۱:۱۰ با محیط کشت رقیق شد. محیط کشت از پلیت ۹۶ خانه کشت داده و تیمار شدند. محلول MTT به نسبت ۱:۱۰ با محیط کشت رقیق شد. محیط کشت سلول‌ها خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT رقیق شده اضافه شد و سلول‌ها برای ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از آن محیط سلول‌ها خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۸۰ و ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه Microplate Reader خوانده شد و نتایج با استفاده از نرم افزار Graph pad prism مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. پس از اتمام زمان تیمار، محیط کشت سلول‌ها خارج شد. سلول‌ها یک مرتبه با PBS شسته شدند و مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید به آن‌ها اضافه شد. برای مشاهده سلول‌های زنده و آپوپتوتیک از میکروسکوپ فلورسنس در اتاق تاریک استفاده شد.

استخراج پروتئین کل سلول: با استفاده از روش ابداعی

Edwin Joseph Cohn (۱۹۶۶) پروتئین کل سلولی استخراج شد (۲۴). به این ترتیب که پس از اتمام زمان تیمار، محیط سلول‌ها خارج و فلاسک دو بار با PBS سرد شستشو داده شد. سپس به هر فلاسک T25، ۳۰۰ میکرولیتر تریپسین اضافه و فلاسک برای ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه و اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، PBS دارای ۱۰ درصد، FBS به سلول‌ها اضافه شد و سپس به تیوپ ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر PBS تعلیق شد و به یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. این بار با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی یا برای نگهداری طولانی در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد یا مستقیماً برای استخراج پروتئین مورد

شد، بدین ترتیب که بلات در محلول بلوک کننده حاوی شیر خشک و سپس روی شیکر به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت.

آبکشی سریع توسط TBST و اضافه نمودن آنتی

بادی اولیه: ۱- آنتی بادی pGSK3: رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰ در TBST، ۱ شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر

۲- آنتی بادی GSK3: رقیق شده با نسبت ۱:۲۰۰۰ در TBST، یک ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۳- جمع آوری آنتی بادی اولیه و ۴ شستشوی ۱۵ دقیق‌های با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۴- اضافه نمودن آنتی بادی ثانویه (از این مرحله به بعد نباید در معرض نور مستقیم قرار داشته باشد). Anti rabbit IgG, HRP-Conjugated رقیق شده با نسبت ۱:۲۰۰۰ در TBST، یک ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۵- جمع آوری آنتی بادی ثانویه و ۴ شستشوی ۱۵ دقیق‌های با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

با توجه به روش ابداعی Chemiluminescence توسط Eilhard Wiedemann (۱۹۸۸) (۲۷) بلات درون یک نایلون و سپس در کاست عکاسی قرار گرفت. محلول ECL (enhanced Chemiluminescence) بر روی بلات به حدی که سطح را بپوشاند اضافه شد. در اتاق تاریک فیلم X-ray، بسته به شدت نور، برای مدت زمان ۱ تا ۱۰ دقیقه روی بلات قرار گرفت. سپس فیلم درون داروی ظهور انداخته شد. پس از ۵ دقیقه شستشو با آب مقطر، فیلم در داروی ثبوت قرار داده و پس از آن با آب شسته شد.

پاک‌سازی (Stripping): با توجه به روش اشاره شده توسط بسیاری از شرکتهای تجاری نظیر Abcam و BioRad، کاغذ PVDF قابلیت دوباره بلات شدن با آنتی بادی‌های جدید را داشته و لذا با پاکسازی آنتی بادی‌های اتصال یافته میتوان غشاها را مجدداً مورد

آن جایگاه پروتئین مورد نظر مشخص شد. سپس جریان دوباره برقرار گشت (۱۱۰ ولت و ۱۵ میلی‌آمپر) تا پروتئین‌ها از بالا (قطب منفی) به سمت پایین (قطب مثبت) حرکت کنند. ژل جمع کننده، پروتئین‌ها را در مرز ژل جدا کننده جمع می‌کند تا با هم وارد ژل پایین شوند. در ژل پایین، پروتئین‌ها بر اساس جرم مولکولی (پروتئین‌های سنگین تر در بالا و پروتئین‌های سبک تر در پایین) از هم جدا می‌شوند. پس از اینکه پروتئین‌ها به میزان دلخواه روی ژل حرکت کردند و از هم جدا شدند، جریان برق قطع شد تا ژل برای ترانسفر آماده شد.

انتقال پروتئین‌ها بر روی کاغذ PVDF و سترن

بلا تینگ با روش ابداعی Towbin و همکارانش انجام شد (۲۶). به منظور انتقال پروتئین‌ها از ژل بر روی کاغذ PVDF از روش خیس استفاده شد. ابتدا کاغذ PVDF به اندازه ژل برش خورد و سپس از روی آن ۴ تکه به همان اندازه از کاغذ صافی تهیه شد.

PVDF ابتدا به منظور فعال شدن ۳۰ ثانیه با متانول آغشته و مرطوب گردید و پس از آن در بافر ترانسفر قرار گرفت. سپس، کاغذ صافی، کاغذ PVDF، ژل و دوباره کاغذ صافی به ترتیب بر روی هم گذاشته شدند.

این مجموعه از کاغذها و ژل درون تانک ترانسفر گذاشته شدند به طوری که کاغذ PVDF به سمت قطب مثبت قرار گرفت. باید دقت کرد که هیچ‌گونه حبابی میان لایه‌ها نباشد، چرا که از برقراری جریان و در نتیجه انتقال پروتئین در آن نقطه جلوگیری می‌کند. جریان ۳۵۰ تا ۴۰۰ میلی‌آمپر می‌تواند عمل انتقال پروتئین‌ها را طی زمان ۲ ساعت انجام دهد. البته انتقال می‌بایست در اتاق ۴ درجه سانتیگراد انجام شود، زیرا که جریان بالا سبب گرم شدن بافر و از بین رفتن پروتئین‌ها می‌شود. انتقال تمام باندهای نشانگر رنگی بر روی PVDF بهترین موید جهت انجام کامل انتقال پروتئین‌ها می‌باشد.

ایمونوبلا تینگ Immunoblotting پس از انتقال

پروتئین‌ها بر روی PVDF، مراحل ایمونوبلا تینگ انجام

و بررسی میزان فسفریلاسیون آنزیم GSK3β با استفاده از روش وسترن بلاتینگ

آنالیز آماری

نتایج آزمایش به صورت $\text{Mean} \pm \text{SE}$ بیان شده اند، توسط آنالیز آماری One-way ANOVA مورد بررسی واقع و $p \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی اندازه و شکل نانوذرات آلومینی سنتز شده:

بررسی اندازه و شکل ذرات سنتز شده به کمک تصاویر SEM صورت گرفت. متوسط قطر نانوذرات و همچنین توزیع اندازه آن‌ها با اندازه‌گیری نانوذرات در هر تصویر به کمک نرم افزار Image J به دست آمد. تصاویر SEM (شکل ۱) نشان می‌دهند که نانوذرات تهیه شده کروی هستند.

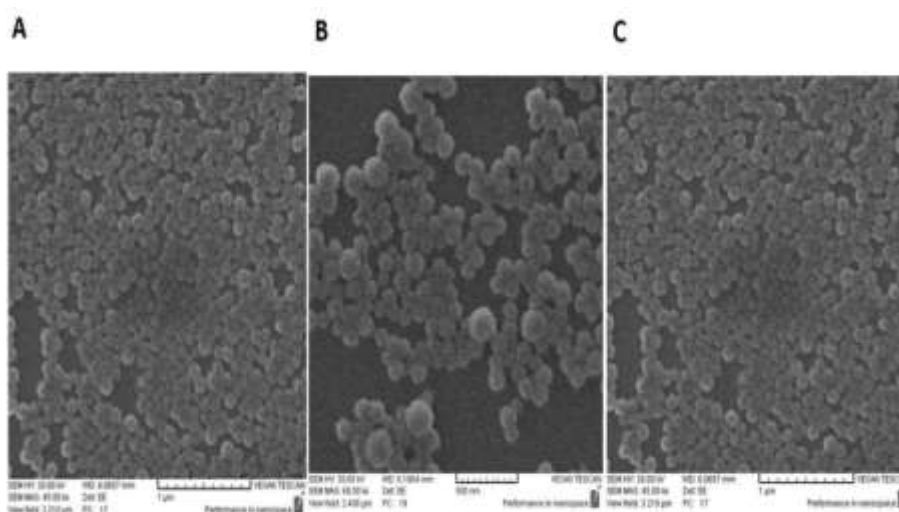
استفاده قرار داد. در مطالعه‌ی حاضر، به دلیل همسانی محل باند پروتئینهای pGSK-3 و GSK-3 ابتدا بلات برای pGSK-3 انکوبه شد و پس از پاک شدن برای GSK-3 انکوبه شد. مراحل پاک‌سازی به صورت زیر انجام شد:

- ۱- قرار دادن بلات در بافر استریپ، ۲ بار و هر بار بمدت ۱۲ دقیقه روی شیکر در دمای آزمایشگاه
- ۲- قرار دادن بلات در PBS، ۲ بار و هر بار بمدت ۱۰ دقیقه روی شیکر در دمای آزمایشگاه
- ۳- قرار دادن بلات در TBST، ۲ بار و هر بار بمدت ۵ دقیقه روی شیکر در دمای آزمایشگاه

گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه عبارت بودند از: ۱-

آزمون غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات آلومینی بر سلول‌های MCF-7 و بررسی زنده‌مانی سلولها با MTT

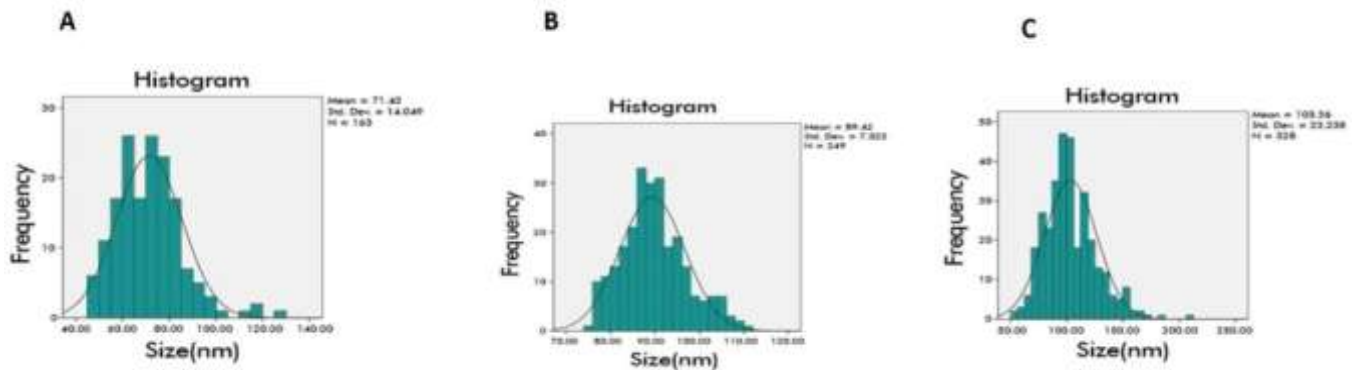
- ۲- آزمون غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار 7-BIO و نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO بر سلول‌های MCF-7 و بررسی زنده‌مانی سلولها با MTT-۳- انتخاب غلظت ۱۵ میکرومولار 7-BIO برای سلول‌های MCF-7



شکل ۱: تصویر SEM نانوذرات سنتز شده با غلظت‌های متفاوت آلومین. (A) ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (B) ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (C) ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

نانومتر، با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین (نمودار ۱)، متوسط قطر نانوذرات سنتز شده با غلظت اولیه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، $71/42 \pm 14$ نانومتر و با غلظت اولیه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، $89/42 \pm 7$ نانومتر تعیین شد.

همان طور که در نمودارهای توزیع اندازه مشاهده می شود (نمودار ۱)، متوسط قطر نانوذرات سنتز شده با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، $103/26 \pm 23$ نانومتر و با غلظت اولیه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، $89/42 \pm 14$ نانومتر و با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، $71/42 \pm 14$ نانومتر تعیین شد.



نمودار ۱: نمودارهای توزیع اندازه نانوذرات آلبومین سنتز شده با غلظت‌های متفاوت آلبومین (A) ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر (B) ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر (C) ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر

نانوذرات (۲ میلی گرم) و میزان داروی اولیه (۱۰۰ میکروگرم)، بازدهی بارگذاری و ظرفیت بارگذاری با استفاده از معادله های ۱ و ۲ (در بخش روش‌ها ذکر شده است) محاسبه شد. بدین ترتیب بازدهی بارگذاری ۳۳ درصد و ظرفیت بارگذاری ۱۶/۵ میکروگرم 7-BIO در میلی گرم نانوذره به دست آمد.

با توجه به انحراف معیارهای به دست آمده، غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین، همگن ترین نانوذرات را از نظر قطر متوسط به دست داد.

بررسی بارگذاری و رهایش 7-BIO از نانوذرات آلبومینی

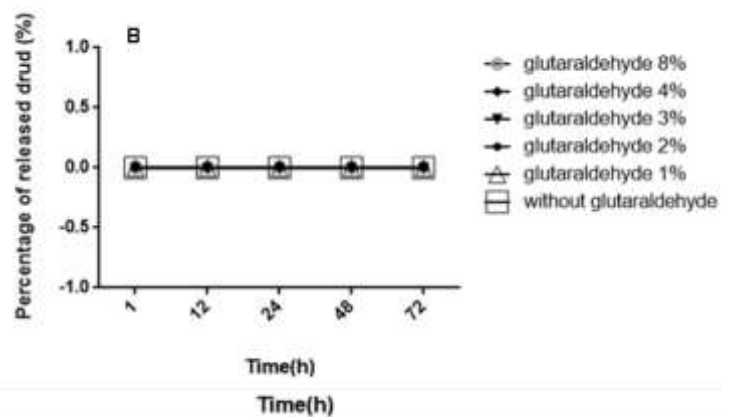
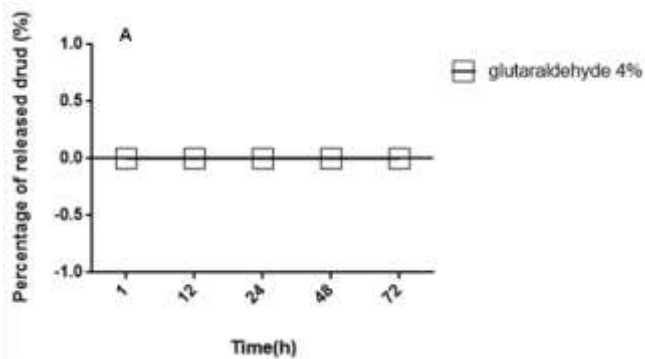
بارگذاری 7-BIO بر نانوذرات آلبومینی

به منظور بررسی میزان 7-BIO بارگذاری شده بر نانوذرات آلبومینی، ۱۰۰ میکروگرم 7-BIO همراه با ۵ میلی گرم آلبومین و گلوپتارآلدئید ۴ درصد سنتز شد. با توجه به اندازه مناسب و انحراف معیار پایین تر نانوذرات آلبومینی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر، این غلظت جهت بارگذاری ترکیب 7-BIO انتخاب شد. با توجه به اینکه نانوذرات در حضور اتانل و امواج اولتراسونیک، تخریب شده و داروی موجود در آن‌ها خارج می شود، پس از سانتریفیوژ کردن نمونه، با اندازه گیری OD محلول رویی و استفاده از منحنی استاندارد غلظت دارو در اتانل، مقدار داروی موجود در نانوذرات سنتز شده به دست آمد. با توجه به مقدار

معمولا از ایجاد اتصال عرضی با استفاده از گلوپتارآلدئید کمک گرفته می شود و این امر بر رهایش ترکیبات بارگذاری شده با درون نانوذرات تاثیر گذار است، در این تحقیق، نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO با مقادیر مختلفی از گلوپتارآلدئید (۱ تا ۸ درصد) تیمار شدند و میزان رهایش دارو برای همه نمونه‌ها در محیط PBS طی ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد (نمودار ۲A)، رهایش 7-BIO از نانوذرات آلبومینی حتی پس از سه روز

ترکیب قرار گرفته‌ی درون نانوذرات می‌تواند بر رهائش ترکیب موثر باشد (۲۸). اما در این تحقیق، اضافه کردن SDS باعث رهائش 7-BIO نشد (نمودار ۲B).

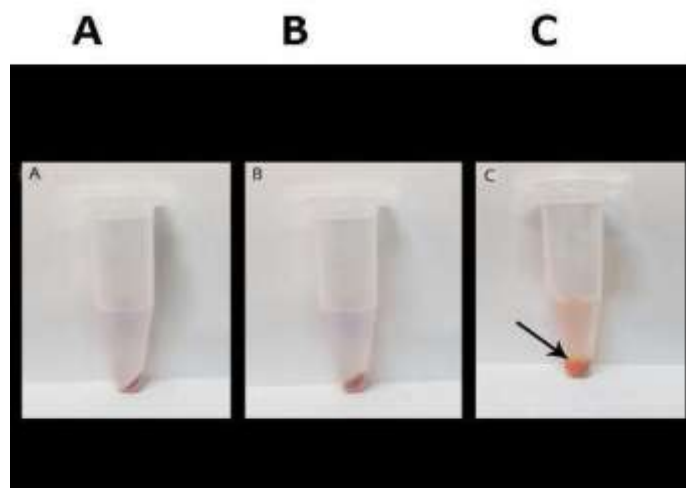
نیز صورت نمی‌گیرد. همچنین، اضافه کردن مقادیر مختلف گلوتارآلدئید بر میزان رهائش دارو تاثیر نداشت. با توجه به اطلاعات سایر محققین، افزودن SDS به دلیل برهمکنش با مولکول‌های آلبومین و همچنین مولکول‌های



نمودار ۲: بررسی رهائش 7-BIO از نانوذرات آلبومینی. (A) رهائش 7-BIO از نانوذرات تیمار شده با مقادیر مختلف گلوتارآلدئید در محیط PBS (pH ۷/۴) (B) رهائش 7-BIO از نانوذرات تیمار شده با گلوتارآلدئید ۴ درصد در محیط PBS حاوی SDS (۰/۵ درصد وزنی حجمی)

بهمحض قرار گرفتن در معرض اتانل رها می‌شود، در صورتیکه رهائش آن در PBS و نیز PBS حاوی SDS طی مدت ۷۲ ساعت انجام نشد.

در نهایت با استفاده از اتانول 7-BIO به سرعت از نانوذرات رها شد که در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است. شکل ۲ نشان می‌دهد که 7-BIO موجود در نانوذرات آلبومینی

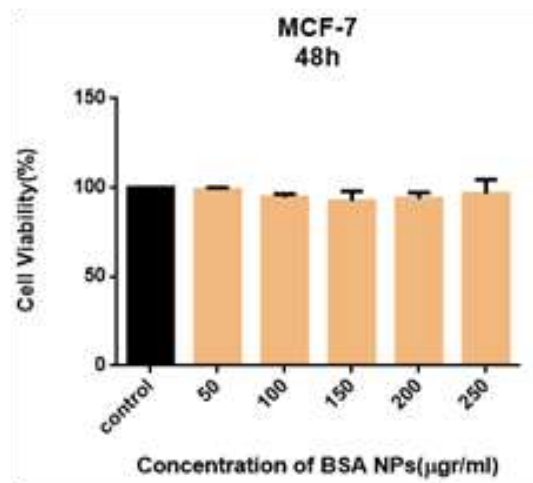


شکل ۲: پایداری و یا رهائش 7-BIO از نانوذرات آلبومینی در محیط‌های مختلف (A) PBS (B) PBS به همراه SDS (C) اتانل

میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با آزمون MTT سنجش شد. نتایج نشان داد که نانوذرات آلبومینی در هیچ یک از غلظت‌ها اثر سمیت بر رده‌ی سلولی آزمایش شده ندارند (نمودار ۳).

بررسی سمیت سلولی نانوذرات بارگذاری نشده

به‌منظور سنجش سمیت نانوذرات آلبومینی بر سل لاین سرطان سینه، پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات (صفر تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۴۸ ساعت انجام شد.



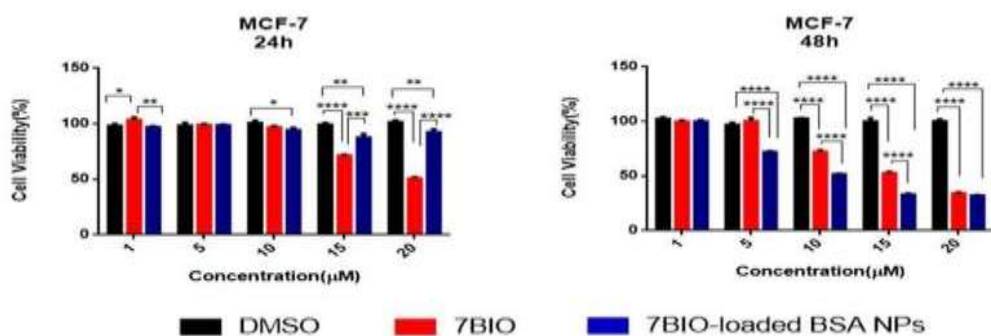
نمودار ۳: بررسی اثر سمیت نانوذرات آلبومینی در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های MCF-7 با استفاده از آزمون MTT (n=۳).

نمودار ۴ (A و B) میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده را نشان می‌دهد. در تیمار ۲۴ ساعته، غلظت IC50 برای 7-BIO آزاد ۲۰ میکرومولار مشخص شد. در این بازه زمانی، اثرگذاری 7-BIO آزاد در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میکرومولار به‌طور معنی داری بیشتر از 7-BIO بارگذاری شده بود. اما با گذشت ۴۸ ساعت، اثرگذاری 7-BIO بارگذاری شده بیشتر از 7-BIO آزاد شد. غلظت IC50 در ۴۸ ساعت، برای 7-BIO آزاد و 7-BIO بارگذاری شده به‌ترتیب ۱۵ و ۱۰ میکرومولار مشخص شد.

بررسی میزان بقای سل لاین سرطان سینه تیمار

شده با 7-BIO به روش MTT

به‌منظور سنجش تاثیر تیمارها بر میزان بقای سلولی از آزمون MTT استفاده شد. پس از کشت سلول‌های MCF-7 در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، ۲۴ ساعت بعد تیمار با غلظت‌های مختلف انجام شد. سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار 7-BIO آزاد و همچنین نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. نتایج آزمایش توسط آنالیز آماری One-Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.



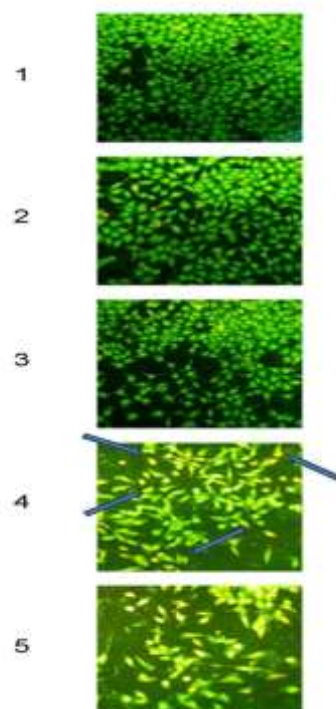
نمودار ۴: بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با 7-BIO آزاد و همچنین 7-BIO بارگذاری شده بر نانوذرات آلبومینی به مدت ۲۴ ساعت (A) و ۴۸ ساعت (B) با استفاده از آزمون MTT (n=۳, p ≤ 0.0001). از حلال DMSO به‌میزان متناظر با نمونه‌های حاوی دارو و به‌عنوان کنترل استفاده شد.

سلول‌های MCF-7 با غلظت ۱۵ میکرومولار 7-BIO آزاد و همچنین نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند.

پس از رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم بروماید سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس تصویربرداری شدند. در شکل ۳ سلول‌های نارنجی-قهوه‌ای معرف آپوپتوزیس هستند که با فلش آبی مشخص شده‌اند. نتایج نشان دادند که در سلول‌های تیمار شده با 7-BIO و نانوذرات بارگذاری شده میزان سلول‌های دچار آپوپتوزیس بیشتر از سلول‌های تیمار نشده مشاهده می‌شوند.

بررسی آپوپتوزیس سل‌لاین سرطان سینه با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم-بروماید

به‌منظور بررسی مرگ سلول‌های تیمار شده بر اثر آپوپتوزیس، از رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد. رنگ آکریدین‌اورنج با برهمکنش با DNA سلول زنده ایجاد رنگ سبز فلورسنس می‌کند. این در حالی است که اتیدیوم بروماید تنها از غشاهای آسیب دیده عبور می‌کند و وارد DNA سلول‌های آپوپتوزیس شده و آن‌ها را به رنگ نارنجی در می‌آورد (۲۹).

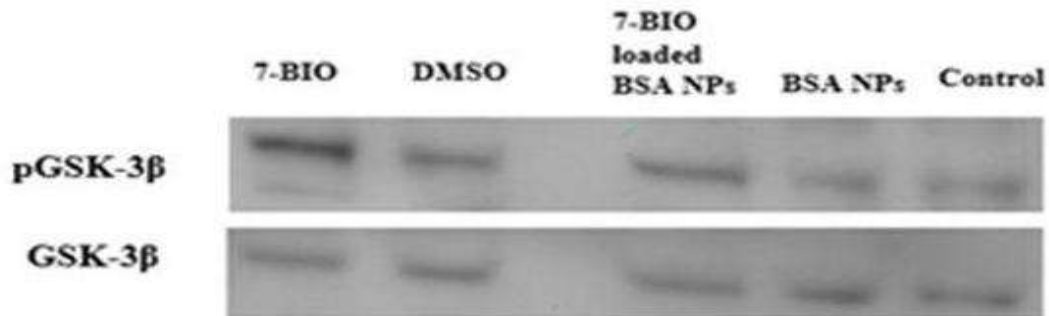


شکل ۳: نمونه‌هایی از تصاویر میکروسکوپ فلورسنس حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم بروماید MCF-7 تیمار شده با: (۱) نمونه کنترل (۲) DMSO (۳) نانوذرات آلبومینی (۴) 7-BIO (۵) نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با 7-BIO به مدت (۴۸ ساعت). سلول‌های آپوپتوزیس شده در شکل با فلش مشخص شده‌اند.

بلاستینگ بررسی شد. پس از تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با غلظت ۳ میکرومولار 7-BIO آزاد و نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO به مدت ۲۴ ساعت و استخراج پروتئین سلولی، ایمونوبلاستینگ انجام شد (شکل ۴).

بررسی فعالیت آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا در سلول‌های تیمار شده

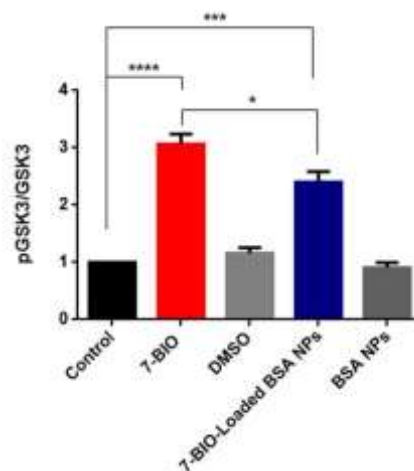
با توجه به نقش مهارکنندگی ایندیروبین‌ها بر فعالیت آنزیم GSK-3β از طریق فسفریلاسیون آن، اثر نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با 7-BIO بر میزان فسفریلاسیون GSK-3β (شکل غیر فعال این آنزیم) با روش وسترن



شکل ۴: وسترن بلاستینگ برای نمایاندن بیان آنزیم فسفریله (pGSK-3β, 47 KDa) و آنزیم کل (GSK-3β, 47 KDa) پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO در مقایسه با 7-BIO آزاد

سنجیده شد. نتایج نهایی نشان داد که میزان فسفریلاسیون GSK-3β پس از تیمار با 7-BIO آزاد، ۳/۰۶ برابر و پس از تیمار با نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO، ۲/۴ برابر افزایش می‌یابد (نمودار ۵).

با استفاده از نرم افزار Quantity One میزان شدت باندها محاسبه شد. نسبت آنزیم فسفریله به آنزیم کل در نمونه ی کنترل ۱ در نظر گرفته شد و تغییرات مشاهده شده در این نسبت در نمونه‌های تیمار شده با کنترل



نمودار ۵: بررسی میزان بیان آنزیم فسفریله (pGSK-3β) به آنزیم کل (GSK-3β) در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO و 7-BIO آزاد (n=2), * p≤0.05, *** p≤0.001, **** p≤0.0001.

با توجه به یافته‌هایی که اشاره شدند در این تحقیق نیز مبادرت به سنتز نانوذرات با اندازه‌ی کمتر از ۲۰۰ نانومتر شد و با آزمون غلظت‌های متفاوتی از آلبومین، دریافت شد که غلظت اولیه ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین ذراتی که با متوسط قطر $7 \pm 89/42$ نانومتر بدست می‌دهند که به این ترتیب این نانوذرات به دلیل همگنی بیشتر و همچنین استفاده کمتر آلبومین برای حمل دارو، یعنی بارگذاری 7-BIO مورد استفاده قرار گرفتند.

آیا نانوذرات آلبومینی می‌توانند به‌عنوان حامل 7-BIO محسوب شوند؟

در گزارش‌های متعدد و شرایط مختلف، میزان بارگذاری داروهای مختلف در نانوذرات آلبومینی متغیر است. به‌طور مثال، بازدهی بارگذاری 5-Fluorocytosine، از ۱۲/۴ درصد تا ۶۵ درصد در نانوذرات آلبومینی گزارش شده است. در تحقیقی مشابه، حداکثر بازدهی بارگذاری داروی Metformin، ۹۲ درصد بوده است (۳).

در این تحقیق نیز با بهینه‌سازی شرایط لازم برای بارگذاری 7-BIO در نانوذرات آلبومینی به بازدهی و ظرفیت بارگذاری به ترتیب $31/53 \pm 1/9$ و $15/76 \pm 0/97$ درصد میکروگرم 7-BIO بر میلی‌گرم نانوذرات انتخاب شدند.

بعد از بارگذاری دارو، بررسی رهایش آن از نانوذرات در شرایط مختلف، حائز اهمیت است. محیط PBS قادر به القای رهایش 7-BIO از نانوذرات آلبومینی حتی پس از سه روز هم نبود. همچنین، اضافه کردن مقادیر مختلف گلوکارآلدئید بر میزان رهایش دارو تاثیر نداشت. اضافه کردن SDS معمولاً به دلیل برهم‌کنش‌های آن با مولکول‌های آلبومین و همچنین داروی قرار گرفته درون نانوذرات می‌تواند بر رهایش ترکیب موثر باشد (۲۸).

نتایج ما نشان داد که اضافه کردن SDS نیز باعث رهایش 7-BIO نمی‌شود. شاید این امر به دلیل ویژگی‌های آبرگریزی شدید 7-BIO باشد، که با یکدیگر و همچنین با بخش‌هایی از ساختار آلبومین حاوی خواص آبرگریزی، برهم‌کنش‌های جذبی پایداری را برقرار کرده و لذا درون

آنالیزهای آماری نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین حالت کنترل با حالت‌های تیمار شده با 7-BIO آزاد و نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با 7-BIO است. میزان فسفریلاسیون GSK-3β در سلول‌های تیمار شده با 7-BIO آزاد بیشتر از سلول‌های تیمار شده با نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با 7-BIO است ($p \leq 0.05$).

نتایج نهایی مربوط به سلول‌های MCF-7 نشان داد که میزان فسفریلاسیون GSK-3β پس از تیمار با 7-BIO آزاد و نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO، ۲/۲ برابر افزایش یافت (شکل ۴). آنالیزهای آماری نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین حالت کنترل با حالت‌های تیمار شده با ترکیب 7-BIO آزاد و نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با 7-BIO است.

بحث

هدف از انجام این تحقیق، طراحی یک سامانه دارو رسانی با استفاده از نانوذرات آلبومینی، به‌منظور بهبود اثرگذاری 7-BIO بر سلول‌های سرطانی سینه بود و در طی آن با پاسخ به سؤالات زیر در این راستا گام برداشته شد:

چگونه می‌توان نانوذرات آلبومینی با متوسط قطر مناسب و همگن به دست آورد؟

نانوذرات و متوسط قطر آن‌ها در حمل داروها نقش اساسی دارد، یکی از راه‌های دستیابی به این هدف استفاده از غلظت‌های مناسب ماده‌ی اولیه برای سنتز نانوذرات است. نانوذرات کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر، ورود آسان‌تری به منطقه توموری را دارند (۱).

Desai و همکاران (۳۰) نشان دادند که ورود نانوذرات با اندازه ۱۰۰ نانومتر به سلول‌های سرطانی روده (-Caco) (2)، ۲/۵ برابر نانوذرات با اندازه ۱۰۰۰ نانومتر است. در مطالعه انجام شده توسط Jose و همکاران در سال ۲۰۱۵، میانگین اندازه نانوذرات آلبومین سنتز شده به‌منظور بارگذاری متفورمین Metformin، ۹۷ نانومتر بوده است (۳، ۲۲).

که این نانوذرات تنها در دوزهای بالا موجب التهاب خفیف می‌شود (۴).

نتایج به‌دست آمده‌ی ما نیز نشان داد که استفاده از نانوذرات سنتز شده به‌تنهایی بر بقای سلول‌ها تأثیر نمی‌گذارد. به‌این‌ترتیب هرگونه آثار مشاهده شده بر بقای سلولی را می‌توان منتسب به 7-BIO دانست.

چه تفاوتی میان میزان غلظت‌های استفاده شده از 7-BIO بارگذاری شده در نانوذرات در مقایسه با 7-BIO آزاد در ایجاد آپوپتوزیس در سلول سرطان سینه وجود دارد؟

نتایج به‌دست آمده‌ی ما از سنجش زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده نشان می‌دهد که 7-BIO آزاد، زنده‌مانی سلول‌ها را طی مدت ۲۴ ساعت بسیار بیشتر از 7-BIO بارگذاری شده در نانوذرات آلبومینی کاهش می‌دهد. این امر می‌تواند به‌دلیل آزاد نشدن 7-BIO از نانوذرات طی ۲۴ ساعت اول باشد. اما با گذشت ۴۸ ساعت، 7-BIO بارگذاری شده به‌میزان قابل توجهی بیش از 7-BIO آزاد زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. با توجه به خاصیت شدید آبرگریزی 7-BIO آزاد، میزان کمتری از آن به درون سلول وارد می‌شود، در حالیکه پس از بارگذاری آن در نانوذرات آلبومینی این خاصیت آبرگریزی به حداقل می‌رسد. لذا پس از ۴۸ ساعت که نانوذرات زمان کافی برای ورود به سلول را دارند و به‌دلیل عوامل موجود در سلول از جمله مکانیسم فعال در لیزوزوم‌ها و یا آنزیم‌های درون سلولی، نانوذرات تخریب شده و رها سازی دارو انجام می‌شود و میزان زنده‌مانی سلول‌ها به شدت کاهش می‌یابد. این امر، برای 7-BIO آزاد برعکس است به‌عبارتی دیگر، اثر کوتاه مدت آن زیاد و اثر طولانی مدت آن به‌دلیل عدم ماندگاری در محیط پایین است.

به‌طورکلی، استفاده از سامانه دارو رسانی مبتنی بر نانوذرات آلبومینی، حلالیت داروهای آبرگریز متصل به نانوذرات را در پلاسما افزایش می‌دهد و ویژگی‌های فارماکوکینتیک مولکول‌های دارو را در محیط زیستی

ساختار نانوذرات آلبومینی باقی مانده و رها نمی‌شوند. در تحقیقات مشابهی که توسط محققین دیگر در زمینه رهایش داروهای آبرگریز از نانوذرات آلبومینی انجام شده است نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. به‌طور مثال، بیش از ۹۰ درصد داروی Paclitaxel، طی مدت ۲۰ ساعت از نانوذرات آلبومینی رها شد (۲۳). در مطالعه دیگر، ۵۰ درصد از رهایش داروی آبرگریز Metformin طی ۲۴ ساعت و ۴۰ درصد دیگر تا ۷۲ ساعت انجام شد (۲۲).

همانطور که ذکر شد، تفاوت مشاهده شده میان نتایج این تحقیق و تحقیقات دیگران، می‌تواند به‌دلیل خاصیت آبرگریزی بیشتر 7-BIO در مقایسه با دیگر ترکیبات مورد استفاده در سایر گزارش‌ها باشد. از آنجایی‌که حلال‌های قطبی با اثر گذاشتن بر اتصالات الکترواستاتیکی، باندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های آبرگریز بین مولکولی باعث تغییر شکل فضایی پروتئین‌ها و ناپایداری آن‌ها می‌شود، برای اثبات وجود دارو در نانوذرات می‌توان از این حلال‌ها مانند اتانل یا استونیتریل برای تخریب نانوذرات پروتئینی و خارج کردن دارو استفاده کرد (۱۹، ۲۱). در این تحقیق، با اضافه کردن اتانل، خروج 7-BIO از نانوذرات تخریب شده مشاهده شد که بیانگر حمل 7-BIO توسط نانوذرات آلبومینی می‌باشد.

آیا نانوذرات آلبومینی سنتز شده به‌تنهایی برای سلول‌های MCF-7، سمی هستند؟

یکی از شرایط لازم و ضروری نانو حامل‌های مورد استفاده در دارو رسانی، غیر سمی بودن آن است. تاکنون بررسی‌های سایر محققین نشان داده است که نانوذرات آلبومینی به‌تنهایی سمی نیستند. به‌طور مثال Tirkey و همکاران (۳) با بررسی اثر سمیت نانوذرات آلبومینی (با متوسط قطر ۲۱۲/۶ نانومتر) بر سلول‌های ریه رده L132، غیر سمی بودن این نانوذرات را نشان دادند. علاوه بر آن، تجویز (به‌صورت استنشاقی) نانوذرات آلبومینی در یک محدوده‌ی دوز وسیع (۲، ۲۰ و ۳۹۰ میکروگرم برای هر حیوان) به ریه‌های موش (BALB/C mice) نشان داد

می‌کنند. به‌طور مثال، در سال ۲۰۱۰ گزارش شد که ۴۷/۲٪ از بیماران مورد مطالعه‌ی مبتلا به سرطان سینه، دارای سطح بالای از GSK-3β فسفریله بودند (۳۶).

در مطالعه مشابه دیگری، کاهش سطح بیان GSK-3β در سلول‌های سرطان پوست مشاهده شد. احتمالاً در این موارد، GSK-3β فعال از طریق مسیر Wnt/β-catenin موجب ارتقا و توسعه تومور می‌شود (۳۷، ۳۸). مطالعات متضادی نیز اشاره به نقش GSK-3β در پیشرفت تومور و تکثیر سلول‌های سرطانی داشته‌اند.

این مطالعات، پیشنهاد می‌کنند که مهار فعالیت این آنزیم به کاهش بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی کمک می‌کند. همچنین در راستای این فرضیه، آزمایشات این محققین نشان داد که فعالیت و سطح بیان GSK-3β در سلول‌های سرطانی کلون و کولورکتال بیشتر از حالت طبیعی است. مطالعات مشابه نیز موید اهمیت مهار این آنزیم در سرکوب تومور انجام شد.

به‌طور مثال، مهار این آنزیم با استفاده از دارو یا RNAهای تداخلی، در کاهش بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی کلون در محیط آزمایشگاه و در موجود زنده بودند (۳۶، ۳۷، ۳۹). در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که مهار GSK-3β توسط 7-BIO با کاهش زنده‌مانی سلول‌ها همراه است که همسو با گزارش‌های قبلی بیان‌کننده اهمیت مهار GSK-3β برای درمان سرطان است. همچنین، مطالعه ما نشان داد که 7-BIO بارگذاری شده در نانوذرات آلبومینی مشابه 7-BIO، توانایی مهار این آنزیم را دارد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، از نانوذرات آلبومینی برای حمل 7-BIO، به‌منظور بهبود اثرگذاری بر سلول سرطانی سینه MCF-7 استفاده شد. تهیه نانوذرات آلبومینی با اندازه مناسب و بارگذاری 7-BIO بر این نانوذرات صورت گرفت. نانوذرات بارگذاری شده با 7-BIO قابلیت بیشتری در ایجاد سمیت در غلظت‌های کمتر نسبت به 7-BIO آزاد دارد و

بهبود می‌بخشد. Singh و همکاران (۳۱) نشان دادند داروی ضد توموری و آگریز Ginsenoside بارگذاری شده در نانوذرات آلبومینی نسبت به داروی آزاد کاهش معنی‌داری را در میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ریه، کولون و کبد ایجاد می‌کند.

همچنین Zhao و همکارانش (۲۳) افزایش اثرگذاری داروی آگریز Paclitaxel در سلول سرطانی سینه رده MCF-7 با استفاده از نانوذرات آلبومین در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند. کاهش حجم و وزن تومور در اثر تیمار با نانوذرات آلبومینی بارگذاری شده با داروهای Disulfiram و Regorafenib در مطالعات *in vivo* نیز بهبود اثر گذاری داروهای بارگذاری شده در نانوذرات را تأیید می‌کند (۲۸). بدین ترتیب امروزه استفاده از این نانوذرات برای بهبود اثر گذاری و کاهش دوز داروها گزینه جذابی می‌باشد.

آیا 7-BIO بارگذاری شده در نانوذرات آلبومینی قادر به ایفای نقش بیولوژیکی خود یعنی مهار آنزیم GSK-3β است؟ نتایج نهایی ما پس از تیمار با 7-BIO آزاد و 7-BIO بارگذاری شده بر نانوذرات نشان داد که میزان فسفریلاسیون GSK-3β (شکل غیر فعال این آنزیم) به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. این یافته‌ها حاکی از آن است که 7-BIO بارگذاری شده مشابه 7-BIO آزاد قادر به مهار GSK-3β است.

بر اساس مطالعات متعدد گذشته‌ی سایر محققین، مهار GSK-3β توسط ایندیروبین‌ها (به‌صورت داروی آزاد) صورت می‌گیرد. قدرت ایندیروبین‌ها در مهار GSK-3β با روش‌های مختلفی از جمله بررسی فسفریلاسیون سوبستراهای GSK-3β و یا اندازه‌گیری فعالیت کینازی آن بررسی شده است (۳۲-۳۴).

اگرچه نقش و فعالیت GSK-3β در پیشرفت یا سرکوب تومور همچنان مورد بحث است. شواهد متضادی در ارتباط با فعال یا غیرفعال بودن GSK-3β در سرطان‌های مختلف گزارش شده است (۳۵). بعضی از این مطالعات به نقش ضد توموری GSK-3β در حالت فعال اشاره

Nanoparticles for the Intravitreal Delivery of Anticytomegaloviral Drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2005; 5(3): 293-305.

7. Wilson B, Lavanya Y, Priyadarshini SR, Ramasamy M, et al. Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: preparation, characterization and pharmacodynamic studies. *Int J Pharm* 2014; 473: 73-79.

8. Zhao D, Zhao X, Zu Y, Li J, et al. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5: 669-677.

9. Zu Y, Zhang Y, Zhao X, Zhang Q, et al. Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBL)-loaded folate-conjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles for tumor-targeted drug delivery using response surface methodology (RSM). *Int J Nanomedicine* 2009; 4: 321-333.

10. Dadparvar M, Wagner S, Wien S, Kufleitner J, et al. HI 6 human serum albumin nanoparticles--development and transport over an in vitro blood-brain barrier model. *Toxicol Lett* 2011; 206(1): 60-66.

11. Das S, Bellare JR, Banerjee R. Protein based nanoparticles as platforms for aspirin delivery for ophthalmologic applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 93: 161-168.

12. Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br J Cancer* 2001; 84(2): 283-289.

13. Wei YF, Su J, Deng ZL, Zhu C, et al. [Indirubin inhibits the proliferation of prostate cancer PC-3 cells]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2015; 21(9): 788-791.

14. Shi J, Shen HM. Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(9): 1729-1742.

قادر به مهار آنزیم GSK-3β هستند، پس، می‌توان ادعا کرد که نانوذرات آلبومینی گزینه مناسبی برای حمل 7-BIO به منظور افزایش اثرگذاری آن بر سلول‌های سرطانی سینه هستند.

تشکر و قدردانی

این پروژه در قالب قرار داد شماره ی ۶۴۰-I-۶۰۱-۵۱۱ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است. ساخت و بارگذاری کردن نانو ذرات با 7-BIO با راهنمایی های جناب آقای دکتر آرپنایی عضو هیات علمی پژوهشکده ی صنعت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است که از ایشان تشکر و قدردانی ویژه می‌شود.

منابع

1. Kouchakzadeh H, Safavi MS, Shojaosadati SA. Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015; 98: 121-143.
2. Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, Zangabad PS, et al. Albumin nanostructures as advanced drugdelivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 13(11): 1609-1623.
3. Tirkey B, Bhushan B, Uday Kumar S, Gopinath P. Prodrug encapsulated albumin nanoparticles as an alternative approach to manifest anti-proliferative effects of suicide gene therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 73: 507-515.
4. Woods A, Patel A, Spina D, Riffio-Vasquez Y, et al. In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery. *J Control Release* 2015; 210: 1-9.
5. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 2012; 157(2): 168-182.
6. Irache JM, Merodio M, Arnedo A, Camapanero MA, et al. Albumin

15. Lee JW, Moon MJ, Min HY, Chung HJ, et al. Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3'-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 3948-3952.
16. Blažević T, Heiss EH, Atanasov AG, Breuss JM, et al. Indirubin and Indirubin Derivatives for Counteracting Proliferative Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 2015:654098. 1-12.
17. Mohammad-Beigi H, Shojaosadati SA, Morshedi D, Mirzazadeh N, et al. The Effects of Organic Solvents on the Physicochemical Properties of Human Serum Albumin Nanoparticles. *Iran J Biotechnol*. 2016; 14(1): 45-50.
18. Tarhini M, Benlyamani I, Hamdani S, Agusti G, et al. Protein-Based Nanoparticle Preparation via Nanoprecipitation Method. 2018; 11(3): E394.
19. Liu R, Qin P, Wang L, Zhao X, et al. Toxic effects of ethanol on bovine serum albumin. *J Biochem Mol Toxicol* 2010; 24(1): 66-71.
20. Zhao P, Yin W, Wu A, Tang Y, et al. Dual-Targeting to Cancer Cells and M2 Macrophages via Biomimetic Delivery of Mannosylated Albumin Nanoparticles for Drug-Resistant Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials* 2017; 27: 1700403.
21. Qi L, Guo Y, Luan J, Zhang D, et al. Folate-modified bexarotene-loaded bovine serum albumin nanoparticles as a promising tumor-targeting delivery system. *Journal of Materials Chemistry B* 2014; 2: 8361-8371.
22. Jose P, Sundar K, Anjali CH, Ravindran A. Metformin-loaded BSA nanoparticles in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug. *Cell Biochem Biophys* 2015; 71(2): 627-636.
23. Zhao L, Zhou Y, Gao Y, Ma S, et al. Bovine serum albumin nanoparticles for delivery of tacrolimus to reduce its kidney induced apoptosis in human cancer cells. uptake and functional nephrotoxicity. *Int J Pharm* 2015; 483 (1-2): 180-187.
24. Edsall JT. Edwin Joseph Cohn (1892–1953). *Biographical Memoirs* 1961; 35: 47-83.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1-2): 248-254.
26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992; 24: 145-149.
27. Wiedemann E. Ueber Fluorescenz und Phosphorescenz I. *Abhandlung. Annalen der Physik* 1888; 270(7): 446-463.
28. Zhao P, Wang Y, Kang X, Wu A, et al. Dual-targeting biomimetic delivery for anti-glioma activity via remodeling the tumor microenvironment and directing macrophage-mediated immunotherapy. 2018; 9(10): 2674-2689.
29. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*. 2005; 5: 12.
30. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, et al. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14(11): 1568-1573.
31. Singh P, Singh H, Castro-Aceituno V, Ahn S, et al. Bovine serum albumin as a nanocarrier for the efficient delivery of ginsenoside compound K: preparation, physicochemical characterizations and in vitro biological studies. *RSC Advances* 2017; 7: 15397-15407.
32. Meijer L, Skaltsounis A-L, Magiatis P, Polychronopoulos P, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology* 2003; 10(12): 1255-1266.
33. Vougianniopoulou K, Skaltsounis A-L. From Tyrian Purple to Kinase Modulators: Naturally Halogenated

- Indirubins and Synthetic Analogues. *Planta Medica* 2012; 78(14): 1515-1528.
34. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem* 2001; 276(1): 251-260.
35. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *2014;5(10): 2881-911*
36. Armanious H, Deschenes J, Gelebart P, Ghosh S, et al. Clinical and biological significance of GSK-3beta inactivation in breast cancer-an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 2010; 41(12): 1657-1663.
37. Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 2009; 273(2): 194-200.
38. Ma C, Wang J, Gao Y, Gao T-W, et al. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3β in the Transformation of Epidermal Cells. *Cancer Research* 2007; 67: 7756-7764.
39. Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, et al. Deregulated GSK3β activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 334(4): 1365-1373.

The synthesis of albumin nanocarriers conjugated with a GSK3 β inhibitor to investigate its effect on survival of breast cancer cell line MCF-7

Mohamadian Namaqi M, MS.c.¹, Parvaneh Tafreshi A, Ph.D.^{1*}, Abbasi Sh, Ph.D.²

1. National Institute of Genetics and Biotechnology, Medical Biotechnology Research Institute, Department of Molecular Medicine.
2. National Institute of Genetics and Biotechnology, Medical Biotechnology Research Institute, Stem Cell Group.

* Email corresponding author: tafreshi@nigeb.ac.ir

Received: 27 sep. 2018

Accepted: 4 Dec. 2018

Abstract

Aim: 7-bromoindirubin-3'-oxime (7-BIO) is a well-known glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibitor with anticancer effects on different cancer cell lines. However, due to its low water solubility, absorption and high gastrointestinal toxicity, it has been inapplicable in clinics so far. In the present study, bovine serum albumin nanoparticles (BSA NPs) were prepared as drug carriers.

Material and methods: to be conjugated with 7-BIO to increase the effectiveness and reduce the toxicity. The nanoparticles were synthesized and conjugated with 7-BIO and their sizes were analysed by using scanning electron microscopy. Also, the viability and apoptosis in the cells treated with 7-BIO conjugated nanoparticles were examined by MTT assay and acridine orange/ethidium bromide staining (AO/EB), respectively. The significance of the data variation was evaluated by using ANOVA test.

Results: 10 mg/ml albumin led to spherical nanoparticles (NPs) of 89.42 ± 7 nm in diameter with mono dispersity. MTT assay showed that 7Bio-loaded BSA NPs had a higher toxic effect on MCF-7 cell line compared to the free 7-BIO. Also, AO/EB staining showed that the apoptosis was induced by 7-BIO treatments. 7-BIO is known to specifically inhibit GSK3 β phosphorylate GSK3 β , which was also evident in our treated breast cancer cell line MCF-7 both with free and loaded BSA NPs 7Bio.

Conclusion: The albumin nanoparticles conjugated with the GSK3 inhibitor effectively decreased the viability of the proliferating breast cancer cell line MCF-7, pointing at its possible clinical impact in future.

Key words: Nanoparticles, 7-bromoindirubin-3'-oxime, Bovine serum Albumin nanoparticles, Breast Cancer cell line, GSK3- β , apoptosis