

## مقاله پژوهشی

## آماده سازی و بررسی خصوصیات نانوذرات مگنتیک - زیست تخریب پذیر مبتنی بر پلی اورتان جهت انتقال ژن به سلول های MCF-7

ژاله علی رضازاد<sup>۱</sup>، هاشم یعقوبی<sup>۱\*</sup>، زهرا عجم<sup>۱</sup>، سمیه جاوید<sup>۱</sup>

۱ گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

\* Email: : yaghoubi\_h@iauardabil.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۵

## چکیده

باتوجه به اینکه در بسیاری از سلول های سرطانی گیرنده های فولیک اسید به مقدار زیادی بیان می گردد، بنابراین این ملکول کاندیدای مناسبی جهت هدفمندسازی نانوذرات به منظور انتقال هدفمند ژن به سلول ها سرطانی است. در این مطالعه نانوذرات دوگانه دوست  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA طراحی شدند. سپس خصوصیات نانوذرات حاصل با استفاده از طیف سنج مادون قرمز (FTIR)، دستگاه اندازه گیری خواص مغناطیسی (VSM) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج FTIR و VSM به ترتیب نشان دادند که سنتز نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA با موفقیت انجام شده و نانوذرات حاصل از خاصیت مغناطیسی مناسبی برخوردارند. از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات حاصل استفاده گردید که تصاویر حاصل، نشان داد نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA دارای ساختار کروی می باشند. بررسی زیست سازگاری و همچنین بررسی توانایی نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA در انتقال DNA به سلول های MCF-7 از دیگر فاکتورهای مورد بررسی در این تحقیق بود که به ترتیب توسط تست MTT و دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA از سمیت پایین و بازده انتقال ژن بالاتری در مقایسه با پلیمر PEI برخوردار بودند.

**کلیدواژه ها:** هدفمند سازی نانوذرات، انتقال ژن، نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA.

## مقدمه

این پلیمر در ایجاد اثر اسفنچ پروتون اشاره کرد. اثر اسفنچ پروتون پدیده ای است که در آن به دلیل وجود اختلاف یونی و همچنین اسمزی بین سیتوپلاسم و آندولیزوزوم، جذب آب و یون توسط آندولیزوزوم صورت گرفته و نهایتاً آندوزوم متلاشی شده و دارو

پلی اتیلن ایمین یکی از موفق ترین پلیمرهای کاتیونی جهت انتقال ژن و RNA به سلول های یوکاریوتی می باشند، از جمله مهمترین مزایای استفاده از این پلیمر در دارورسانی می توان به توانایی

تمایل برهمکنش هیدروفوبیک بین پروتئین‌های پلازما با این پلیمرها، که سبب شناسایی و حذف ذرات توسط سیستم رتیکولاندوتلیال می‌گردد، از جمله موانع کاربرد این پلیمرها در ژن و دارو رسانی هستند [۲۴، ۳۸].

اصلاح سطحی پلیمرهای آبگریز از قبیل PLA و PCL، توسط پلیمرهای آبدوستی از قبیل پلی‌اتیلن-گلیکول و تولید پلیمر دوگانه دوست، به دلیل افزایش آبدوستی، انکپسولاسیون دارو و زمان گردش در خون را افزایش می‌دهد [۳۲، ۵]، همچنین پوشش کمپلکس پلی‌کاتیون/DNA توسط پلیمرهای دوگانه دوست، علاوه بر افزایش طول عمر کمپلکس پلی‌کاتیون DNA/، با تشکیل یک هسته آبگریز نفوذ ناپذیر، مانع از نفوذ پلی‌آنیون به کمپلکس پلی‌کاتیون/DNA شده و علاوه بر افزایش پایداری کمپلکس تاثیر سمیت پلی‌کاتیون را نیز کاهش می‌دهد [۱].

نانوذرات مغناطیسی از جمله دیگر نانوناقل‌های مورد علاقه جهت استفاده در سیستم‌های دارورسانی هستند خواص منحصر به فرد این نوع از نانوذرات شامل سوپر پارامغناطیسی، فوق اشباعیت و پذیرفتاری مغناطیسی می‌باشد که از خصوصیات مغناطیسی ذاتی آنها منشا می‌گیرد. از سویی دیگر با استفاده از پوشش‌های سطحی مختلف می‌توان خواص زیست - پزشکی مطلوب و پایداری را برای این ذرات ایجاد کرد و از اثرات پارتیکولنتیک و سمیت نانوذرات مغناطیسی ناشی از برهم کنش‌های آنها با سلول یا پروتئین‌های بیولوژیکی ممانعت کرد [۲۹].

باتوجه به آنچه گفته شد، در این تحقیق پلیمرهای PEI، PEG، نانوذرات آهن، PU و همچنین فولیک اسید به یکدیگر اتصال یافتند و نانوذرات چند کاره‌ای

از محیط مخرب آندوزوم به محیط سیتوسول منتقل می‌گردد [۲۰، ۳۰]. پلیمر PEI باوجود بازده ترانسفکشن بالا و همچنین توانایی در ایجاد اثر اسفنج پروتون، به دلیل زیست سازگار و همچنین زیست تخریب پذیر نبودن در شرایط بالینی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. به همین دلیل در سال‌های گذشته تلاش زیادی به منظور کاهش سمیت این پلیمر از روش‌های مختلفی صورت گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به اتصال این پلیمر به پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیری از قبیل پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و غیره اشاره کرد [۲۳].

مطالعات گذشته نشان داده است که گیرنده‌های فولات در سطح سلول‌های سرطانی به میزان بسیار زیادی در مقایسه با سلول‌های طبیعی بیان می‌گردد [۱۹]. فولیک اسید نوعی ویتامین B9 می‌باشد که از طریق اتصال به گیرنده‌های فولیک اسید موجود در سطح سلول، و از طریق پدیده آندوسیتوز به سلول نفوذ می‌کند. در سال‌های گذشته محققان از این خصوصیت فولیک اسید به منظور هدفمندسازی نانوذرات لیپیدی و پلیمری جهت انتقال هدفند دارو به سلول‌های سرطانی استفاده کرده‌اند [۱۷].

استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر از قبیل پلی‌اورتان، پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLA، PLGA و PCL) به دلیل تخریب زیستی و حذف محصول حاصل در چرخه اسید سیتریک، دارای زیست سازگاری مناسبی می‌باشند [۳]. اگرچه زیست‌سازگاری و زیست تخریب پذیر بودن پلیمرهای PLA و PCL به استفاده از آن‌ها در ژن رسانی جذابیت ویژه‌ای بخشیده است، با این حال، اندازه بزرگ ذرات حاصل، بازده کم انکپسولاسیون DNA و

اتاق، انجام گرفت. نانوذرات حاصل توسط اتانل و آب دی استریل شسته شدند و در حضور خلاء و در دمای اتاق خشک گردیدند.

#### سنتز نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2-SS-PEI-PU-PEG-FA$

بدین منظور ابتدا نانوذرات ONC-PU-CNO با استفاده از روش ارائه شده توسط Yu و همکاران در سال ۲۰۱۳ سنتز شد [۳۴]. به طور کلی bis-1,4-bis(2-hydroxyethyl)disulfide (2-HDS) و dibutyltin (hydroxyethyl)piperazine (HEP) و dilaurate (DBTDL) به طور کامل در  $(CH_2)_2Cl_2$  و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و تحت گاز نیتروژن حل شدند. مقدار مناسبی از hexamethylene diisocyanate (HDI) به محلول حاصل اضافه شد و محلول تحت شرایط شیک قرار گرفت سپس پلیمریزاسیون به مدت نیم ساعت و در دمای ۷۵ درجه انجام گرفت. همچنین به منظور سنتز نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-PEI-PU-NCO$  از ۱۴ گرم  $Fe_3O_4@SiO_2-PU-CNO$  به ۱۴ گرم از نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-PEI$  حل شده در ۵۰ میلی‌لیتر anhydrous acetonitrile اضافه شد سپس به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مخلوط گردید. نهایتاً نانوذرات حاصل توسط مگنت جمع‌آوری شدند و پس از شستشو تحت خلاء خشک گردیدند.

جهت اتصال PEG به نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2-PEG-SS-PEI-PU-NCO$  مقدار مناسبی از  $NH_2$  با ۱۵ گرم از نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-PEI-PU-NCO$  طبق شرایط فوق الذکر واکنش داده شدند سپس نانوذرات پس از شستشو توسط متانول تحت خلاء خشک گردیدند. و نهایتاً از روش Yoo و همکاران در سال ۲۰۱۲ به منظور سنتز نانوذرات

ایجاد شد که نه تنها حاوی مزایایی هر یک از این پلیمرها بودند بلکه برخی از معایب یکدیگر را نیز پوشش دادند.

#### مواد و روش‌ها

##### سنتز نانوذرات مگنتیک $Fe_3O_4@SiO_2-SS-PEI$

بدین منظور ابتدا نانوذرات  $Fe_3O_4$  با اندازه کوچک با ترکیب ferric و ferrous salts در محلول آلکالین و با اضافه کردن سیترات سدیم تهیه شد [۲۵]، سپس sulfhydrylation نانوذرات آهن حاصل، بر اساس روش گزارش شده توسط Zhang انجام گرفت [۳۵]. ۱۰۰ میلی‌گرم از Sulfhydrylated  $Fe_3O_4$  درون ۶ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم carboxyethyl 2-pyridyl disulfide به منظور تغییر disulfide-thiol به آن اضافه گردید. پس از واکنش به مدت ۳۶ ساعت، نانوذرات توسط اتانل و آب دوبار استریل، ۵ مرتبه شستشو داده شدند. سپس توسط خلاء و در دمای اتاق خشک گردیدند. سپس مجدداً ۱۰۰ میلی‌گرم از نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-COOH$  درون ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات با  $pH=7/4$  اضافه شد و جهت فعال‌سازی گروه کربوکسیل به نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-COOH$  میزان مناسبی از EDC (1-(3-ethyl-3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) و N-hydroxysuccinimide) اضافه گردید و واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گرفت نهایتاً اتصال پلیمر branched PEI (25 kDa) به انتهای نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-COOH$  با ترکیب ۲ میلی‌لیتر بافر PBS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پلیمر branched PEI به نانوذرات  $Fe_3O_4@SiO_2-SS-COOH$  و انجام واکنش به مدت ۴۸ ساعت در دمای

کیت استخراج پلاسمید شرکت vivantis و بر اساس پروتوکل شرکت سازده کیت مورد تخلیص قرار گرفت.

#### آماده سازی کمپلکس PEI-DNA

ابتدا یک میلی گرم از پلیمر PEI (۲۵ کیلودالتون) در یک میلی لیتر بافر فسفات (۷۲ میلی مولار  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۲۸ میلی مولار  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  با  $\text{pH}=7/4$ ) حل گردید و به منظور همگن شدن ذرات به مدت پنج دقیقه سونیکه شد. کمپلکس PEI-DNA با ترکیب پنج میکروگرم پلاسمید pEGFP-N1 در نسبت های آمین به فسفات (N/P) (تعداد گروه های آمین در سطح پلیمر به تعداد گروه فسفات در DNA) برابر با ۵ و ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه تهیه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. جهت محاسبه نسبت N/P از فرمول ۱ استفاده شد.

تعداد آمین های سطحی هر ملکول PEI × مولارته PEI

N/P=

تعداد فسفات هر ملکول DNA × مولارته DNA

فرمول ۱

#### آماده سازی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA/DNA

به منظور تهیه نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA/DNA از تکنیک انتشار حلال استفاده گردید [۲۴]. به طور خلاصه ۰/۵ میلی لیتر بافر TE (Tris-EDTA buffer) حاوی ۲۵۰ میکروگرم DNA به ۴ میلی لیتر محلول کلروفورم حاوی مقدار متفاوتی از نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی گرم)، تحت شرایط سونیکاسیون اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل با ۶ میلی لیتر محلول پلی وینیل الکل (PVA) (۱ درصد

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -SS-PEI-PU-PEG-FA استفاده گردید [۳۳]. بدین منظور ابتدا فولیک اسید در حلال DMSO و توسط DCC و NHS فعال شد (واکنش در دمای اتاق و به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت). محلول حاصل به ۱۰ گرم از نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$ -SS-PEI-PU-PEG-NH<sub>2</sub> حل شده در DMSO اضافه گردید سپس واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق و در حضور پیریمیدن انجام گرفت نهایتا طبق شرایط فوق الذکر شستشو و خشک گردید.

#### بررسی خصوصیات نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA

به منظور بررسی خصوصیات مرفولوژیکی و خصوصیات مگنتیک نانوذرات حاصل به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی عبوری و دستگاه اندازه گیری خواص مغناطیسی (VSM) استفاده گردید. همچنین جهت بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) استفاده گردید.

#### تکثیر و خالص سازی پلاسمید pEGFP-N1(Naked DNA) جهت انتقال به سلول های MCF-7

در این تحقیق برای ردیابی انتقال و بیان ژن از ژن گزارشگر pEGFP-N1 استفاده گردید جهت تکثیر پلاسمید مورد نظر از استرین DH5- $\alpha$  باکتری E.coli استفاده شد. از روش کلرید کلسیم به منظور ترانسفورماسیون پلاسمید pEGFP-N1 به باکتری E.coli استفاده گردید [۲۸].

پس از ترانسفورماسیون پلاسمید pEGFP-N1 تکثیر باکتری E.coli حاوی پلاسمید pEGFP-N1 روی محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آمپی سیلین انجام گرفت سپس پلاسمید مذکور توسط

استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت.

ترانسفکشن سلول‌های MCF-7 با استفاده از نانوذرات

$Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA/DNA

از نسبت‌های ۱:۱۰، ۱:۳۰ و ۱:۵۰ از  $Fe_3O_4$ -PEI-

DNA: PU-PEG-FA به منظور ترانسفکشن

سلول‌های MCF-7 استفاده گردید. بدین

منظور سلول‌های MCF-7 با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در

میلی‌لیتر محیط‌کشت RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰

درصد به هریک از چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه ای

منتقل شدند سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷

درجه سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵ درصد نگهداری شدند.

پس از ۲۴ ساعت به هرچاهک به طور جداگانه

نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA/DNA در

نسبت‌های وزنی/ وزنی (w/w %) ۱:۱۰، ۱:۳۰ و

۱:۵۰ از  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA DNA: و در سه

تکرار اضافه گردید در این تحقیق از DNA فاقد

پوشش pEGFP-N1 (Naked DNA) به عنوان کنترل

منفی و از کمپلکس PEI/DNA (N/P= ۵) به عنوان

کنترل مثبت استفاده شد. پس از نگهداری سلول‌ها به

مدت ۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $CO_2$

۵ درصد، محیط رویی سلول‌ها با محیط جدید

RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰ درصد جایگزین شد و

به مدت ۴۸ ساعت در شرایط فوق‌الذکر نگهداری

شد. از میکروسکوپ فلورسانس به منظور مشاهده

توانایی نانوذرات نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-

FA/DNA در انتقال ژن pEGFP-N1 به سلول‌های

MCF-7 استفاده گردید سپس بمنظور کمی سازی

بازده انتقال ژن توسط نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-

PEG-FA/DNA و مقایسه آن با کمپلکس

PEI/DNA و Naked DNA از دستگاه فلوسایتومتری

اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه دیگر سونیکه شد.

سپس به ۳۰ میلی‌لیتر محلول PVP ۰/۳ درصد اضافه

گردید پس از ۵ ساعت کلروفرم توسط روتاری

حذف گردید. و نانوذرات حاصل با استفاده از

سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه

جمع آوری شدند و نهایتاً توسط فریزدرایر خشک

شده و جهت استفاده در آزمون‌های متفاوت در

فریزر ۲۰- نگهداری شدند.

درصد بارگذاری DNA توسط نانوذرات  $Fe_3O_4$ -

PEI-PU-PEG-FA از مقایسه جذب سوپرناتانت

رویی حاوی نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-

FA/DNA با جذب DNA مورد استفاده در فرایند

بارگذاری در ۲۶۰ نانومتر، محاسبه گردید (فرمول ۲).

جذب سوپرناتانت هر کدام از نمونه‌ها در طول موج مربوطه - جذب داروی مورد استفاده در فرایند تهیه نانوذرات

جذب داروی مورد استفاده در فرایند تهیه نانوذرات

فرمول ۲

بررسی اثر سایتوتوکسیتی نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-

PEG-FA بر رده سلولی MCF-7 با استفاده از تست

MTT

جهت بررسی تاثیر زیست‌سازگاری نانوذرات

$Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA از سلول‌های MCF-7

استفاده گردید. بدین‌منظور سلول‌های MCF-7 با

تراکم ۷۵۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال

یافت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت ۹۶ خانه

حاوی سلول‌های MCF-7 در دمای ۳۷ درجه

سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵ درصد، محیط‌کشت رویی

سلول‌ها خارج شد سپس محیط‌کشت جدید همراه

با غلظت‌های مختلف نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-

PEG-FA (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر

میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق‌الذکر با

سلول‌ها تیمار شدند نهایتاً زنده‌مانی سلول‌ها با

استفاده گردید بدین منظور پس ترانسفکشن سلول‌های MCF-7، سلول‌ها با استفاده از تریپسین جداسازی شدند سپس توسط بافر PBS (pH=۷/۴) مورد شستشو قرار گرفتند. نهایتاً سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مدل ( CyFlow Space, Germany ) و در محدوده جذبی 520 nm مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز داده‌های حاصل از دستگاه توسط نرم‌افزار FloMax انجام پذیرفت.

### تجزیه تحلیل آماری

تمامی نتایج کمی انجام گرفته در این تحقیق در حداقل سه تکرار انجام گرفت. احتمال معنی‌داری نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲ و از روش One way ANOVA انجام گرفت. همچنین به منظور محاسبه مقایسه میانگین از روش دانکن استفاده گردید.

### نتایج

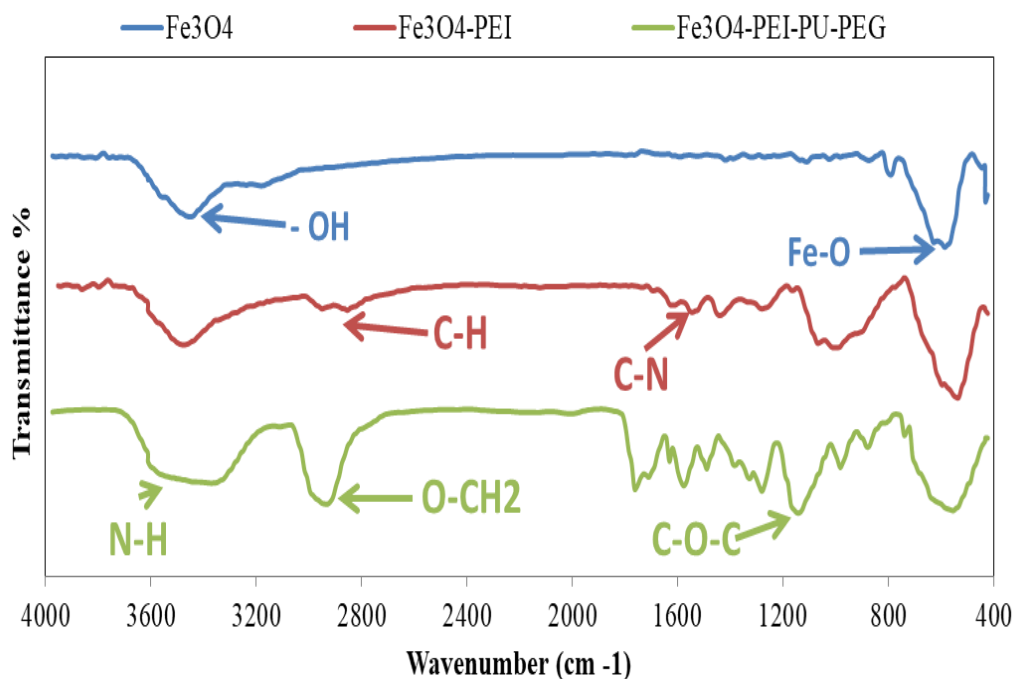
نتایج حاصل از طیف‌سنجی FTIR از نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA

به منظور تایید سنتز نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA از طیف سنج مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید. نتایج حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک مشاهده شده در محدوده ۵۷۰ نانومتر مرتبط پیوند Fe-O در نانوذرات آهن می‌باشد [ ۳۲]. پس از اتصال PEI به  $Fe_3O_4$  پیک‌های بیشتری در محدوده ۱۳۰۰، ۱۴۵۰ و ۱۵۵۰ مشاهده شد که به ترتیب نشان دهنده گروه‌های C-N، CH<sub>2</sub> و NH بودند همچنین پیک مشاهده شده در منطقه ۲۸۰۰ الی ۲۹۰۰ نشان دهنده گروه C-H می‌باشد که بیانگر تایید اتصال PEI به  $Fe_3O_4$  می‌باشند [ ۸، ۱۳]. با اتصال PU-PEG

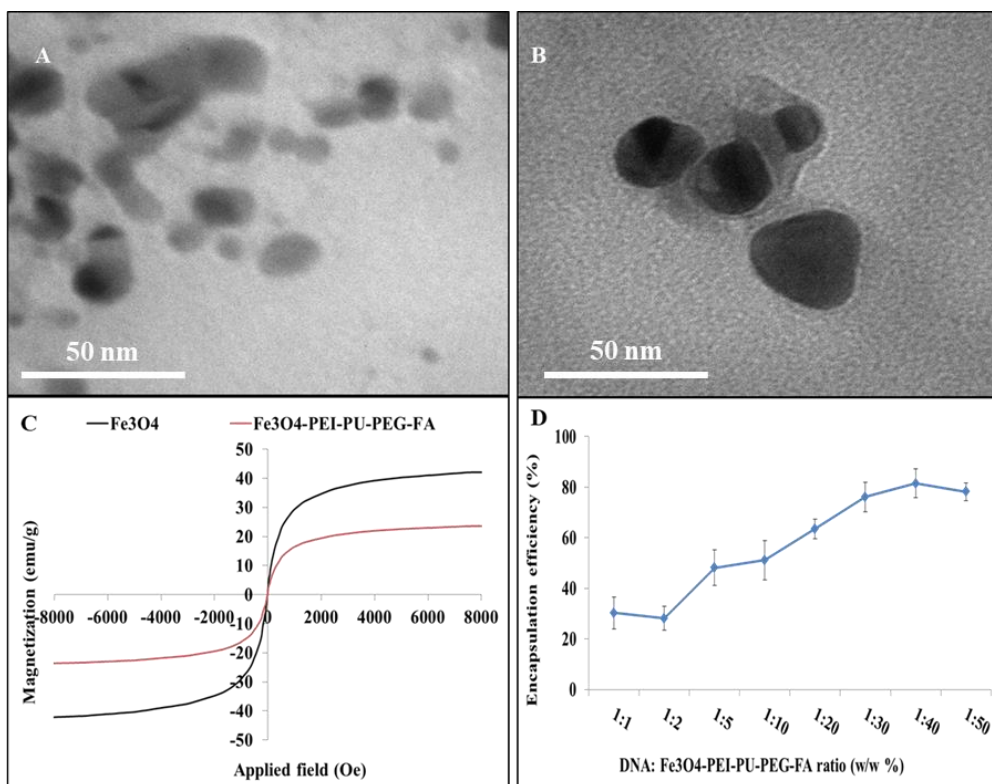
بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد، نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA دارای ساختار کروی و چندوجهی می‌باشند همچنین این نتایج نشان داد تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین مرفولوژی نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA وجود ندارد (شکل ۲ A و B). همچنین نمودار هیستریزس لوپ (Hysteresis loop) نشان داد. سطح مغناطیسی نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA به ترتیب برابر با ۴۲/۴۱ و ۱۸/۱۳ emu/g بود. این نتایج نشان داد پوشش نانوذرات  $Fe_3O_4$  توسط پلیمرهای PU، PEI و PEG میزان سطح مغناطیسی را به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲ C)

نتایج مقایسه میانگین بازده انکپسوله‌سازی DNA توسط نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA، نشان داد به طور کلی با افزایش نسبت نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA در مقایسه با DNA درصد بارگذاری افزایش یافت به طوری که بیشترین بازده انکپسولاسیون DNA در نسبت ۱:۴۰ از  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA DNA مشاهده شد (۸۱ درصد) (شکل ۲ D).



شکل ۱- تصویر طیف سنجی FTIR از نانوذرات  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4$ -PEI,  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG



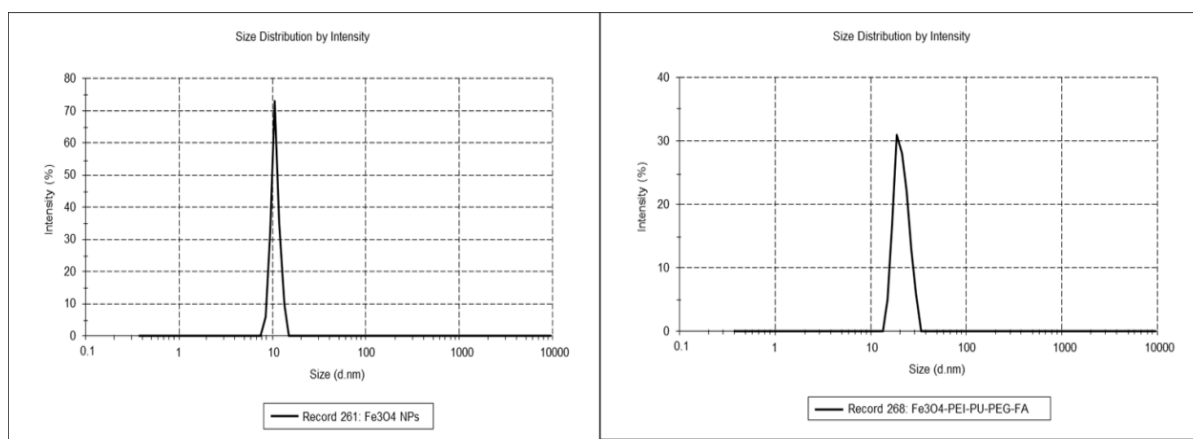
شکل ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA (A و B) به ترتیب تصاویر حاصل از نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA (B) توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (C) الگوی مغنتیک نانوذرات  $Fe_3O_4$  و  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA (D) مقایسه میانگین بازده انکپسوله سازی DNA توسط نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA



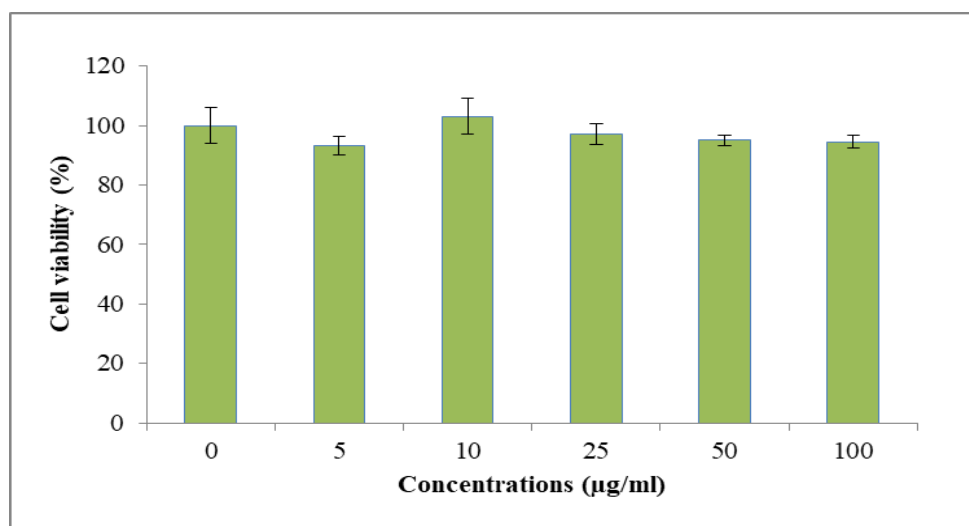
مقایسه میانگین نتایج حاصل از بررسی سمیت نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA توسط تست MTT نشان داد، نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA تا غلظت مورد استفاده ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ گونه تاثیر معنی داری بر مرگ سلول های MCF-7 نداشته اند (شکل ۴). لذا می توان چنین نتیجه گرفت نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA از زیست-سازگاری مطلوبی جهت استفاده در سیستم های انتقال ژن و دارو برخوردار می باشند.

در این تحقیق اندازه نانوذرات توسط DLS بررسی شد نتایج حاصل از این دستگاه نشان داد به طور کلی با اضافه شدن پلیمرهای PU، PEI و PEG بر سطح نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ، اندازه ذرات حاصل افزایش خواهد یافت به عنوان مثال با اتصال پلیمر PEI-PU-PEG-FA بر سطح نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ، اندازه نانوذرات از ۱۲ نانومتر به ۲۶ نانومتر افزایش یافت.

### بررسی سمیت نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA



شکل ۳- تصاویر حاصل از دستگاه DLS از اندازه نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA



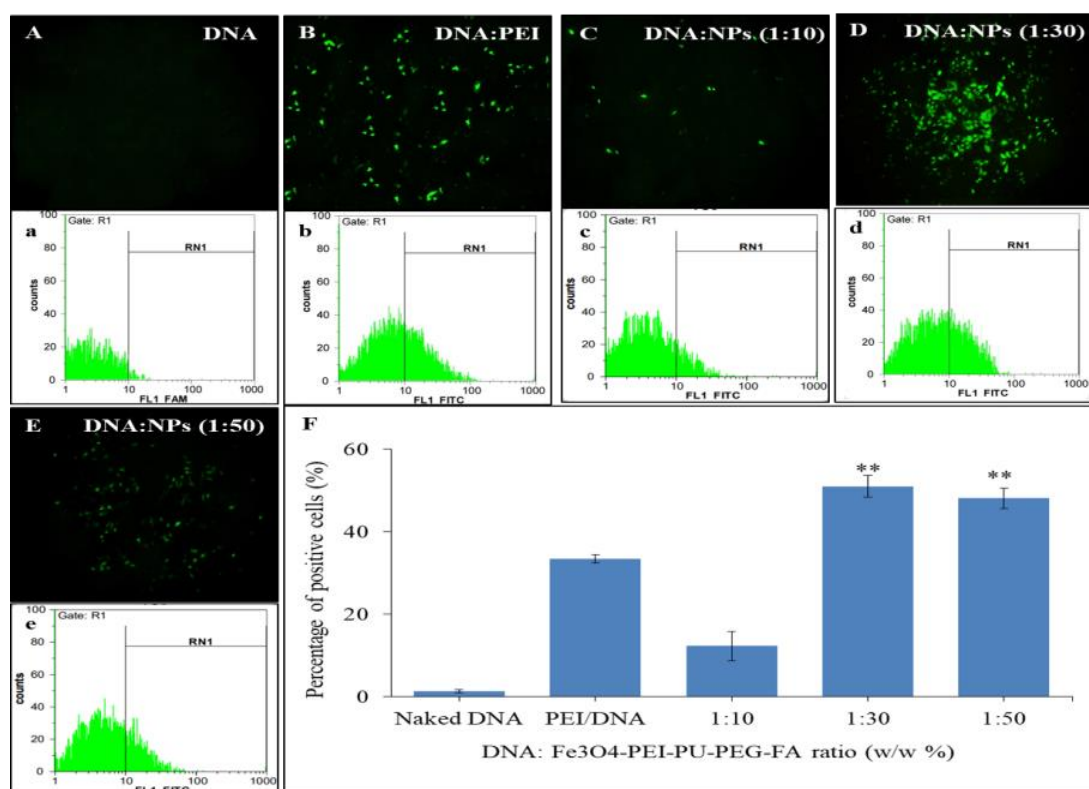
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سمیت نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEI-PU-PEG-FA بر زنده ماندی سلول های MCF-7

(تکرار=۳، \* نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد)



فلوسایتومتری نشان داد بیشترین بازده انتقال ژن در محیط حاوی سرم در نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  با نسبت (۱:۳۰) از  $\text{DNA: Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA}$  (۵۳ درصد) همچنین کمترین بازده انتقال ژن در محیط حاوی سرم در نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  با نسبت (۱:۱۰) از  $\text{DNA: Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA}$  مشاهده شد (۱۷ درصد). بیان ژن در کمپلکس  $\text{PEI/DNA}$  در مقایسه با نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  تهیه شده در نسبت ۱:۳۰ و ۱:۵۰ از  $\text{DNA: Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA}$  از بازده کمتری برخوردار بود (شکل ۵).

ترانسفکشن سلولهای MCF-7 با استفاده از نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  توانایی نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  در انتقال و رهش DNA به سلولهای MCF-7 توسط میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتومتری به اثبات رسید (شکل ۵) تصویر میکروسکوپ فلورسانس نشان داد در برخی از سلولهای MCF-7 تیمار شده با نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  نشر سبز رنگ مشاهده شد که نشان دهنده توانایی این نانوذرات در انتقال و رهش DNA درون این سلولها بود این در حالی بود که DNA فاقد پوشش از توانایی انتقال به سلولهای MCF-7 برخوردار نبود. علاوه بر این نتایج دستگاه



شکل ۵- آنالیز کمی از بیان ژن EGFP-N1 در سلولهای MCF-7 توسط Naked DNA، PEI/DNA، نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  در محیط حاوی سرم (A-F و a-f) به ترتیب تصویر میکروسکوپ فلورسانس و طیف سنجی فلوسایتومتری از سلولهای MCF-7 تیمار شده با توسط Naked DNA، PEI/DNA، و نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA/DNA}$  در نسبت های متفاوت  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-PU-PEG-FA}$  (NPs) (G) نمودار مقایسه میانگین از بیان ژن در سلولهای MCF-7 تیمار شده با نانوذرات حاوی DNA (\*\* معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد).

## بحث

میرسد که نانوذرات سنتز شده در این تحقیق از توانایی مناسبی جهت استفاده در تصویربرداری MRI برخوردار باشند [۱۰].

انتقال DNA فاقد پوشش به درون سلول، به دلایلی از جمله اندازه و پتانسیل سطحی نامناسب، هضم زود هنگام DNA توسط مکانیزم دفاعی سلول طی انتقال درون سلولی و تحت سلولی و غیره مشکل می باشد [۱۴]. پلیمرهای کاتیونی از قبیل PEI، با خنثی سازی بار منفی DNA و همچنین فشردن آن سبب افزایش بازده انتقال ژن می گردد. از عوامل دخیل در فشردن سازی DNA توسط پلیمرهای کاتیونی می توان به وزن مولکولی، بار سطحی شدید مثبت و همچنین انعطاف پذیری زنجیره پلیمر اشاره کرد [۴، ۲۵]. علاوه بر این پلیمر با ایجاد اثر اسفنج پرتون سبب محافظت از DNA در برابر شرایط نامساعد آندوزوم نیز می شود [۱].

علیرغم مزایایی ذکر شده استفاده از کاتیونی از قبیل PEI به دلیل سمیت بالا، ناپایداری بالا و رهش سریع ژن در برابر پلی آنیون ها با محدودیت هایی مواجه شده است [۱]. تعامل های الکترواستاتیکی پلیمرهای کاتیونی و سطح آنیونی سلولی، از اهمیت بسیار بالایی برای جذب کمپلکس های DNA-نانوحامل به درون سلولها برخوردار است. اما این برهمکنش های غشایی به نظر می رسد که از لحاظ سمیت نیز مهم باشد چرا که باعث آسیب مستقیم به سلول های هدف می شوند [۶]. تحقیقات گذشته در زمینه بررسی علت سمیت پلیمرهای کاتیونی بر سلول های پستانداران، نشان داد ایجاد حفره و نازک شدن غشاء سلولی در اثر برهمکنش غشاء سلولی با پلی کاتیون ها علت اصلی سمیت این پلیمرها می باشد [۹]. لذا به نظر می رسد یکی از دلایل کاهش سمیت

نانوذرات مغناطیسی نتایج موفق آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده اند. استفاده از نانوذرات مغناطیسی در تصویر برداری MRI و همچنین هایپرترمیا (درمان به واسطه افزایش حرارت) یکی از مهمترین مباحث مورد مطالعه در سال های اخیر بوده است [۲۲]. مطالعات گذشته نشان داده است اتصال نانوذرات آهن با برخی سورفکتانت ها و یا پلیمرهایی از قبیل PEG علاوه بر تثبیت این نانوذرات سبب سهولت در هدفمندسازی نانوذرات آهن از طریق اتصال برخی ملکولها به PEG متصل شده به نانوذرات آهن می گردد [۱۱]. با توجه به توانایی نانوذرات چندکاره در انجام همزمان چند عملکرد از جمله تشخیص و درمان، در دهه های گذشته توجه زیادی به تحقیق در این زمینه معطوف شده است که به نتایج درخشانی نیز منتهی شده است [۲۱]. در این تحقیق نیز تلاش شد تا با اتصال قطعات موثر در انتقال دارو و ژن نانوذرات چندکاره ای تهیه گردد که از توانایی های متعددی از جمله تصویر برداری، محافظت از دارو در شرایط مخرب، انتقال هدفمند دارو به بافت هدف و غیره برخوردار باشد.

در سال ۲۰۰۶ Hu و همکارانش گزارش کردند نانوذرات  $Fe_3O_4@PEG-COOH$  از قابلیت مناسبی جهت استفاده در تصویر برداری MRI در شرایط بالینی دارند. باتوجه به اینکه نانوذرات  $Fe_3O_4@PEG-COOH$  مورد استفاده در تحقیق Fengqin و همکارانش از لحاظ اندازه و خاصیت مغناطیسی مشابه نانوذرات تهیه شده در این تحقیق بودند و نظر به اینکه دو فاکتور اندازه و خاصیت مغناطیسی نقش اساسی در تعیین قابلیت نانوذرات در تصویربرداری MRI برخوردار می باشند لذا بنظر

ژن به هسته را با محدودیت روبرو می‌کند. همچنین برهمکنش این وکتورها با پروتئین‌های پلاسما سبب شناسایی سریع آن‌ها توسط سیستم ایمنی بدن شده و موجب حذف سریع آنها و در نتیجه کاهش بازده انتقال ژن در شرایط زنده می‌گردد [۳۸]. پوشش پلیمر PEI توسط پلیمرهای PU و PEG علاوه بر کاهش سمیت پلیمر PEI سبب کاهش برهمکنش‌های نامطلوب PEI با پلی‌آنیون‌ها و پروتئین‌های آنیونی درون پلاسما می‌گردد و از این طریق طول عمر نانوذرات را در سیستم گردش خون افزایش می‌دهد [۱].

از عوامل موثر بر دارورسانی که تاثیر آن هم به صورت آزمایشی و هم به صورت محاسباتی مشخص شده است می‌توان به مورفولوژی نانوذرات اشاره کرد [۳۱]. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است نانوذرات دارای ساختار کروی از توانایی بالایی در انتقال به سلول برخوردار می‌باشند همچنین شناسایی نانوذرات با ساختار کروی در مقایسه با سایر اشکال نانوذرات، توسط سیستم ایمنی بدن مشکل‌تر می‌باشد که در نتیجه آن پایداری نانوذرات در سیستم گردش خون افزایش می‌یابد [۲]. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA دارای ساختار کروی می‌باشند (شکل ۲ A و B). تکنیک‌های متفاوتی به منظور بارگذاری DNA درون پلیمرهای آمفی‌پاتیک از قبیل PU-PEG وجود دارد تاثیر این تکنیک‌ها بر ساختار مورفولوژی و اندازه نانوذرات در گزارشات متعددی به اثبات رسیده است [۱۲، ۲۷]. با توجه به اینکه تکنیک *Water-in-oil solvent diffusion technique* ذرات کروی و کوچک‌تر و همچنین بازده انکپسولاسیون بالاتری در مقایسه با سایر تکنیک‌ها

نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA کاهش سطح تماس PEI با غشاء سلولی، در اثر پوشش آن توسط PU و PEG باشد (شکل ۴). در تحقیق مشابه، Liu و همکارانش اثبات کردند پوشش PEI با استفاده از پلیمر PEG به صورت قابل توجهی سبب کاهش سمیت نانوذرات PEI می‌گردد. بطوری‌که در غلظت ۳۲ میکروگرم بیش از ۷۰ درصد از سلول‌های تیمار شده با پلیمر PEI از بین رفتند این درحالی بود که این میزان برای پلیمر PEI-PEG کمتر از ۲۰ درصد بود [۱۸].

علاوه بر زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری مناسب از دیگر مزایایی پلیمرها زیست‌تخریب‌پذیر از قبیل PU، PCL و PLA می‌توان به سهولت این پلیمرها در هدمندسازی، اشاره کرد [۷]. با این حال این پلیمرها از توانایی مناسبی جهت خنثی سازی بار منفی DNA و فشردن آن برخوردار نبوده و به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل در سطح PLA از پتانسیل مناسبی در مقایسه با پلیمرهای کاتیونی جهت انتقال ژن برخوردار نیست [۲۴، ۳۸]. لذا استفاده از پلیمرهای کاتیونی جهت انتقال ژن ضروری می‌باشد. استفاده همزمان پلیمر PEI به دلیل بار سطحی مناسب و توانایی آن در خنثی‌سازی بار منفی و همچنین فشردن سازی DNA، با پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر سبب کاهش سمیت PEI می‌گردد در حالیکه تاثیر معنی‌داری بر فشردن سازی DNA و بازده انتقال ژن توسط PEI نخواهد گذاشت. علاوه بر این از دیگر مشکلات استفاده از پلیمرهای کاتیونی از قبیل PEI می‌توان به تمایل این پلیمرها به جذب آنیونی پروتئین‌های موجود در سرم اشاره کرد. این عمل علاوه بر رهش زودهنگام DNA، سبب بزرگتر شدن ذرات شده و عبور این وکتورها را از غشاء و یا ارائه

حاوی FBS برخوردار بودند، با توجه به مطالعات گذشته می توان چنین نتیجه گرفت وجود پلیمر PEG و همچنین فولیک اسید موجود در سطح این نانوذرات به ترتیب سبب کاهش اندازه و جذب بیشتر این نانوذرات در مقایسه به کمپلکس PEI/DNA به سلول های MCF-7 می گردد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلول های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که ما را در اجرای هر چه بهتر تحقیق یاری کردند صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

### منابع

- [1] Abebe, D. G., Kandil, R., Kraus, T., Elsayed, M., Merkel, O. M., & Fujiwara, T. 2015. Three-Layered Biodegradable Micelles Prepared by Two-Step Self-Assembly of PLA-PEI-PLA and PLA-PEG-PLA Triblock Copolymers as Efficient Gene Delivery System. *Macromolecular bioscience*, 15(5), 698-711.
- [2] Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- [3] Bala, I., Hariharan, S., & Kumar, M. R. 2004. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(5).
- [4] Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., & Goepferich, A. 2007. Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14454-14459.
- [5] Chen, J., Wu, Q., Luo, L., Wang, Y., Zhong, Y., Dai, H. B., & Wang, G. X. 2017. Dual tumor-targeted poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol-folic acid nanoparticles: a novel biodegradable

انکپسولاسیون دارو، دارد. لذا در تحقیق حاضر جهت انکپسولاسه کردن DNA از این تکنیک استفاده گردید.

گیرنده های فولیک اسید در اکثر سلول های سرطانی به مقدار قابل توجهی بیان می گردند این در حالی است که این گیرنده ها در سلول های نرمال از بیان بسیار کمتری در مقایسه با سلول های سرطانی برخوردارند، بنابراین هدفمندسازی نانوذرات با استفاده از فولیک اسید سبب کاهش جذب غیر اختصاصی آنها به سایر سلول های می گردد [۱۶]، [۳۶]. نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات انجام شده توسط Chen و همکارانش [۵]، Li و همکارانش [۱۵] و همچنین Zhao و همکارانش [۳۷] مطابقت داشت. بطور مثال Chen و همکارانش اثبات کردند که پوشش PLGA توسط پلیمر PEG و فولیک اسید بطور معنی داری سبب افزایش کارایی داروی دوکسوروبیسین در مقایسه با زمانی که PLGA به تنهایی استفاده شود می گردد.

علاوه بر این باتوجه به اینکه جذب فولیک اسید به سلول های سرطانی از طریق اتصال به گیرنده های فولیک اسید و به صورت آندوسیتوز انجام می گیرد لذا استفاده از آنها جهت ارسال هدفمند دارو به سلول های سرطانی با جذابیت ویژه ای همراه است. در مطالعه حاضر سعی بر این شد تا طراحی نانوذرات به گونه ای صورت گرفت که فولیک اسید در سطح نانوذرات قرار گیرد به نحوی که حداکثر دسترسی را به گیرنده های سطحی سلول های سرطانی داشته باشد. نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEI-PU-PEG-FA از بازده انتقال ژن بالاتری در مقایسه با کمپلکس PEI/DNA به منظور انتقال ژن به سلول های MCF-7 در محیط

- nanocarrier for secure and efficient antitumor drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 12, 5745-5760.
- [6] Chen, J., Tian, B., Yin, X., Zhang, Y., Hu, D., Hu, Z., & Hou, C. 2007. Preparation, characterization and transfection efficiency of cationic PEGylated PLA nanoparticles as gene delivery systems. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 107-113.
- [7] Cherng, J. Y., Hou, T. Y., Shih, M. F., Talsma, H., & Hennink, W. E. 2013. Polyurethane-based drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 450(1-2), 145-162.
- [8] Hamadi, H., Gholami, M., & Khoobi, M. 2011. Polyethyleneimine-modified super paramagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: an efficient, reusable and water tolerance nanocatalyst.
- [9] Hong, S., Bielinska, A. U., Mecke, A., Keszler, B., Beals, J. L., Shi, X., & Banaszak Holl, M. M. 2004. Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjugate chemistry*, 15(4), 774-782.
- [10] Hu, F. Q., Wei, L., Zhou, Z., Ran, Y. L., Li, Z., & Gao, M. Y. 2006. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. *Advanced Materials*, 18(19), 2553-2556.
- [11] Junejo, Y., Baykal, A., & Sözeri, H. 2013. Simple hydrothermal synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG nanocomposite. *Open Chemistry*, 11(9), 1527-1532.
- [12] Kakizawa, Y., & Kataoka, K. 2002. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Advanced drug delivery reviews*, 54(2), 203-222.
- [13] Khoobi, M., Motevalizadeh, S. F., Asadgol, Z., Forootanfar, H., Shafiee, A., & Faramarzi, M. A. 2015. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for lipase immobilization: characterization and application. *Materials Chemistry and Physics*, 149, 77-86.
- [14] Kichler, A., Mason, A. J., Marquette, A., & Bechinger, B. 2019. Histidine-Rich Cationic Cell-Penetrating Peptides for Plasmid DNA and siRNA Delivery. In *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery* (pp. 39-59). Humana Press, New York, NY.
- [15] Li, T. S. C., Yawata, T., & Honke, K. 2014. Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly (ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 48-61.
- [16] Liu, L., Zheng, M., Librizzi, D., Renette, T., Merkel, O. M., & Kissel, T. 2015. Efficient and Tumor Targeted siRNA Delivery by Polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly (ethylene glycol)-folate (PEI-PCL-PEG-Fol). *Molecular pharmaceutics*, 13(1), 134-143.
- [17] Liu, L., Zheng, M., Renette, T., & Kissel, T. 2012. Modular synthesis of folate conjugated ternary copolymers: polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly (ethylene glycol)-folate for targeted gene delivery. *Bioconjugate chemistry*, 23(6), 1211-1220.
- [18] Liu, X. Q., Du, J. Z., Zhang, C. P., Zhao, F., Yang, X. Z., & Wang, J. 2010. Brush-shaped polycation with poly (ethylenimine)-b-poly (ethylene glycol) side chains as highly efficient gene delivery vector. *International journal of pharmaceutics*, 392(1-2), 118-126.
- [19] Low, P. S., & Kularatne, S. A. 2009. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Current opinion in chemical biology*, 13(3), 256-262.
- [20] Merkel, O. M., Beyerle, A., Librizzi, D., Pfestroff, A., Behr, T. M., Sproat, B., & Kissel, T. 2009. Nonviral siRNA delivery to the lung: Investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Molecular pharmaceutics*, 6(4), 1246-1260.
- [21] Mickoleit, F., & Schüler, D. 2018. Generation of multifunctional magnetic nanoparticles with amplified catalytic activities by genetic expression of enzyme arrays on bacterial magnetosomes. *Advanced Biosystems*, 2(1), 1700109.
- [22] Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery.



- International journal of pharmaceutics, 385(1-2), 113-142.
- [23] Peng, S., Liu, H. X., Ko, C. Y., Yang, S. R., Hung, W. L., & Chu, I. M. 2017. A hydrolytically-tunable photocrosslinked PLA-PEG-PLA/PCL-PEG-PCL dual-component hydrogel that enhances matrix deposition of encapsulated chondrocytes. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(3), 669-678.
- [24] Perez, C., Sanchez, A., Putnam, D., Ting, D., Langer, R., & Alonso, M. J. 2001. Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of controlled Release*, 75(1-2), 211-224.
- [25] Prabowo, B., Khairunnisa, T., & Nandiyanto, A. B. D. 2018. Economic Perspective in the Production of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles by Co-precipitation Method. *World Chemical Engineering Journal*, 2(2), 1-4.
- [26] Rao, L., Zhou, H., Li, T., Li, C., & Duan, Y. Y. 2012. Polyethylene glycol-containing polyurethane hydrogel coatings for improving the biocompatibility of neural electrodes. *Acta biomaterialia*, 8(6), 2233-2242.
- [27] Rozman, H. D., Yeo, Y. S., Tay, G. S., & Abubakar, A. 2003. The mechanical and physical properties of polyurethane composites based on rice husk and polyethylene glycol. *Polymer Testing*, 22(6), 617-623.
- [28] Low, P. S., & Kularatne, S. A. 2009. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Current opinion in chemical biology*, 13(3), 256-262.
- [29] Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent E. coli using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3932.
- [30] Torchilin, V. P. 2001. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 137-172.
- [31] Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., & Aigner, A. 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene therapy*, 12(5), 461.
- [32] Venkataraman, S., Hedrick, J. L., Ong, Z. Y., Yang, C., Ee, P. L. R., Hammond, P. T., & Yang, Y. Y. 2011. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63(14-15), 1228-1246.
- [33] Waldron, R. D. 1955. Infrared spectra of ferrites. *Physical review*, 99(6), 1727.
- [34] Yoo, M. K., Park, I. K., Lim, H. T., Lee, S. J., Jiang, H. L., Kim, Y. K., ... & Cho, C. S. 2012. Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging. *Acta biomaterialia*, 8(8), 3005-3013.
- [35] Yu, S., He, C., Ding, J., Cheng, Y., Song, W., Zhuang, X., & Chen, X. 2013. pH and reduction dual responsive polyurethane triblock copolymers for efficient intracellular drug delivery. *Soft Matter*, 9(9), 2637-2645.
- [36] Zhang, H., Li, F., Yi, J., Gu, C., Fan, L., Qiao, Y., & Wu, H. 2011. Folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(5), 517-526.
- [37] Zhang, L., Li, Y., Jimmy, C. Y., & Chan, K. M. 2016. Redox-responsive controlled DNA transfection and gene silencing based on polymer-conjugated magnetic nanoparticles. *RSC Advances*, 6(76), 72155-72164.
- [38] Zhao, M., Li, J., Ji, H., Chen, D., & Hu, H. (2019). A versatile endosome acidity-induced sheddable gene delivery system: increased tumor targeting and enhanced transfection efficiency. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6519.
- [39] Zou, W., Liu, C., Chen, Z., & Zhang, N. 2009. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale research letters*, 4(9), 982.

## Preparation and characterization of biodegradable magnetic nanoparticles biodegradable based on polyurethane for gene delivery into MCF-7 cells

Alirezazad Zh.<sup>1</sup>, Yaghoubi H.<sup>2\*</sup>, Ajam Z.<sup>1</sup>, Javid S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

\* Email: yaghoubi\_h@iauardabil.ac.ir

Received: 23 April 2019

Accepted: 24 September 2019

### Abstract

The folate receptor (FR) is known to be over-expressed extracellularly on a variety of human cancers. Therefore, this molecule is an ideal candidate for targeting nanoparticles to drug delivery using these nanoparticles to cancer cells or cancer tissues. In this study, we designed an amphiphilic cationic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles. The prepared nanoparticles were characterized by FTIR, VSM, TEM measurements. FTIR indicated that the synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles have been performed successfully. Vibrating sample magnetometry (VSM) showed that the biodegradable-magnetic nanoparticles were superparamagnetic at room temperature. The morphology of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles were evaluated using a transmission electron microscopy. TEM showed the nanoparticles were spherical in shape. Moreover biocompatibility assay of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles was performed using MTT test. Also the ability of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles to DNA delivery into MCF-7 cells were analysis using MTT test and flow cytometry respectively. Interestingly, due to the incorporation of PU and PEG segments, this Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles showed less toxicity but better gene transfection efficiency than PEI.

**Keywords:** Nanoparticle targeting, Drug delivery, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI-PU-PEG-FA nanoparticles.