Journal of Animal Biology, Autumn 2025; 18(1):39-52

ISSN: 1735-9724

Research Article

Evaluation the Cytotoxicity Effect of Biological Gold Nano-particles Carrying Folate Ligand and Carboplatin Drug on Ovarian Cancer

Mahnaz Nouri [1,2], Ghazal Eshghi [3], Behrooz Yahyaei [1,2], Parmida Seraj [3], Zahra Nadia Sharifi [3,4*]

1- Department of Medical Sciences, Sha.C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran
2- Nanoparticle Research Center in Medicine, Sha.C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran
3- Department of Anatomical Sciences and Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Herbal Pharmacology Research Center, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: zsharifi@iautmu.ac.ir

Received: 10 March 2025 Accepted: 3 August 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199503

Abstract

Nanotechnology, as a novel and multidisciplinary field, has brought significant advancements in medicine, particularly in targeted cancer therapies. One of its most important achievements is the development of nanoparticles capable of specifically identifying and targeting cancer cells. This study aims to investigate the cytotoxic effects of biologically synthesized gold nanoparticles conjugated with folate ligand and loaded with the chemotherapeutic agent carboplatin on A2780 ovarian cancer cell lines. Gold nanoparticles were first synthesized and subsequently functionalized with folate. The cellular uptake and cytotoxicity of these nanoparticles were evaluated using MTT assay and ICP spectroscopy. The results demonstrated successful conjugation of folate to the nanoparticles, indicated by minor shifts in the absorption peaks in the folate spectrum, suggesting stable binding. Moreover, ICP analysis confirmed the presence of gold within the cells, verifying the effective internalization of both drug-loaded and bare nanoparticles. These findings suggest that gold nanoparticles functionalized with folate ligands can serve as efficient drug delivery carriers for the selective transport of carboplatin into ovarian cancer cells. The use of such targeted nanocarriers holds promise for enhancing therapeutic efficacy while minimizing systemic side effects.

Keywords: Gold nanoparticles, folate, carboplatin, targeted therapy, ovarian cancer, A2780, nanomedicine.

زیست‌شناسی جانوری، سال هجدهم، شماره اول، پاییز ۱٤۰٤، صفحات ۵۲-۳۹

شاپا: ۹۷۲٤-۱۷۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سلول‌کشی نانوذرات بیولوژیک طلا حامل لیگاند فولات و داروی کربوپلاتین بر سرطان تخمدان

مهناز نوری[۱،۲]، غزل عشقی[۳]، بهروز یحیایی[۱،۲]، پارمیدا سراج[۳]، زهرا نادیا شریفی[۳،٤*]

۱- گروه پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۲- مرکز تحقیقات نانوذرات بیولوژیک در پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۳- گروه علوم تشریح و اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

٤- مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: zsharifi@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۵/۱۲

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199503

چکیده

نانوفناوری به‌عنوان دانشی نوین و چندرشته‌ای، تحول قابل‌توجهی در حوزه پزشکی، به‌ویژه در درمان‌های هدفمند سرطان ایجاد کرده است. یکی از مهم‌ترین دستاوردهای این فناوری، طراحی نانوذراتی با قابلیت شناسایی و هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات بیولوژیک طلای حاوی لیگاند فولات و داروی کربوپلاتین بر سلول‌های سرطانی رده A2780 است. ابتدا نانوذرات طلا سنتز و با لیگاند فولات اصلاح شدند. سپس میزان ورود این نانوذرات به سلول و سمیت آن‌ها با استفاده از آزمون‌های MTT و طیف‌سنجی ICP ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که فولات به‌طور مؤثر به نانوذرات متصل شده است، به‌طوری که شیفت اندک پیک‌های جذبی در طیف جذب فولات، حاکی از ایجاد پیوند میان فولات و نانوذره می‌باشد. همچنین، تحلیل ICP حضور نانوذرات طلا در داخل سلول‌ها را تأیید کرد که بیانگر ورود موفق این نانوسامانه‌ها به سلول‌های هدف است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات طلا با لیگاند فولات می‌توانند به‌عنوان حامل‌های دارویی مؤثر برای انتقال انتخابی داروی کربوپلاتین به سلول‌های سرطانی تخمدان به کار روند و به‌کارگیری آن‌ها در درمان سرطان می‌تواند موجب افزایش اثربخشی درمان و کاهش عوارض جانبی گردد.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، فولات، کربوپلاتین، درمان هدفمند، سرطان تخمدان، A2780، نانوپزشکی.

مقدمه

سرطان به عنوان یک از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان شناخته شده است که رویکردهای درمانی محدودی دارد. همچنین متاستاز و عود آن باعث ناتوانی و مرگ-ومیر زیادی می‌شود (۱، ۲). در سال ۲۰۲٤، تعداد ۲۰۰۱۱٤۰ مورد جدید سرطان و ٦۱۱۷۲۰ مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده پیش‌بینی شد (۳). این بیماری با تغییر مکانیسم‌های تنظیم چرخه سلولی منجر به تغییر مسیرهای سیگنال‌دهی و در نهایت بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی بدخیم می‌گردد. مهار آپوپتوز علاوه‌بر گسترش سرطان، باعث مقاومت در برابر پرتو درمانی و شیمی‌درمانی می‌شود (٤). سرطان تخمدان دومین نئوپلاسم بدخیم زنانه در کشورهای غربی و

سومین سرطان شایع زنان در سراسر جهان و علت اصلی مرگ و میر در میان بدخیمی‌های زنان می‌باشد که اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود.(۵, ٦) تومورهای تخمدان به دو دسته اپیتلیال تقسیم می‌شوند که تقریباً ۹۰ درصد موارد را تشکیل می‌دهند (۷). درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته تخمدان شامل جراحی و سپس شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین است (۸). داروهای مبتنی بر پلاتین سیس پلاتین، کربوپلاتین و اگزالی‌پلاتین به طور گسترده برای ریشه‌کنی شیمی درمانی سرطان استفاده می‌شوند (۹). نرخ پاسخ دهی کلی و کامل در هنگام درمان با پلاتینیم نسبت به رژیم‌های غیر پلاتینیم دو برابر می‌باشد (۱۰، ۱۱). داروهای پلاتینیم هنوز یکی از پراستفاده‌ترین داروهای ضدسرطان محسوب می‌شوند و نقش اساسی در شیمی‌درمان سرطان تخمدان دارند، اما در حال حاضر درمان سرطان زنان، با مدیریت گذشته متفاوت است. امروزه رویکردهای درمانی را بر اساس درجه و مرحله زیرگروه بافت شناسی و مولکولی بیمار درنظر می‌گیرند. در واقع، کارسینوم تخمدان نشان دهنده یک بیماری هتروژن متشکل از گروهی از تومورها است که هر کدام دارای ضایعات پیش ساز، پاتوژنز، الگوهای انتشار، پاسخ به شیمی درمانی و پیش آگهی متفاوت هستند (۱۰، ۱۱). امروزه با پیشرفت علم نانوتکنولوژی، نانوذرات (NPs) هوشمند که می‌توانند به نشانه‌های بیولوژیکی پاسخ دهند یا توسط آنها هدایت شوند، به عنوان یک پلتفرم تحویل دارو برای درمان دقیق سرطان در حال ظهور هستند.(۱۲، ۱۳) در مطالعات اخیر، نانوذرات فلزی نجیب، به ویژه نانوذرات طلا (AuNPs)، توجه بیشتری را در حوزه پزشکی، با تاکید ویژه بر تومورشناسی، به خود جلب کرده‌اند (۱٤). ناوذرات طلا می‌توانند به طور مستقیم یا غیر مستقیم با مولکول‌های مختلف، از جمله داروها، اسیدهای نوکلئیک (DNA) یا (RNA)، پروتئین‌ها یا پپتیدها، پادتن‌ها، لیگاندهای هدف و مولکول‌های دیگر، مزدوج شوند (۱۵). استفاده از نانوذرات چند منظوره ممکن است فعالیت ضدتومور را بهبود بخشیده ، طول عمر دارو را افزایش داده و دارو را به مدت زمان طولانی‌تری فعال باقی نگه دارد (۱٦) و همچنین این امکان را ایجاد می‌کند که قبل از بروز علایم بالینی از طریق سنسورهای مخصوص، احتمال وقوع بیماری را تشخیص دهد (۱۷) همچنین می‌توانند در پرداختن به مسئله مقاومت دارویی با به حداقل رساندن آسیب به سلول‌ها و بافت‌های سالم و کاهش سمیت کلی دارو کمک کنند (۱۸). البته استفاده از نانوذرات با چالش‌هایی روبه‌رو است. در شرایط پاتولوژیک، دستیابی به توزیع بیولوژیک و دارورسانی موثر دشوار است، زیرا نانوذرات با موانع فیزیکی و بیولوژیکی – از جمله نیروهای برشی، جذب پروتئین و پاکسازی سریع – مواجه هستند که بخشی از نانوذرات تجویز شده را که به محل درمانی هدف می رسند محدود می‌کند (۱۹–۲۵). در چند دهه اخیر، گیرنده فولیت (FR) به عنوان یک هدف ضدسرطان مورد توجه قرار گرفته‌است. پیوند به این گیرنده، یکی از چندین روش است که به وسیله آن فولات توسط سلول‌ها جذب می‌شود. با توجه به اینکه نانوذرات طلا دارای سمیت پایین، پایداری بالا، سنتز ساده، و مزدوج شدن با بیومولکول-های خاص هستند (۲۳، ۲٤)، و از سوی دیگر، گیرنده فولیت در طیف وسیعی از تومورهای جامد، از جمله سرطان تخمدان، ریه و پستان، یک هدف دارویی ضدسرطان مناسبی است ،استفاده از نانوذرات طلا با گیرنده فولات در درمان این نوع سرطان امری بسیار مؤثر است (۲۲). از این جهت در این مطالعه، با بهره‌گیری از لیگاند فولات، اثرسلول کشی نانوذرات بیولوژیک حامل لیگاند فولات و داروی کربوپلاتین بر رده سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت تا از این طریق بتوان گامی نوآورانه در زمینه درمان بیماری

سرطان تخمدان با استفاده از نانودرات بیولوژیک برداشت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.IAU.TMU.REC.1399.408 با استفاده از سلول‌های سرطانی رده A2780 خریداری شده از انستیتو پاستور ایران انجام شد. ابتدا سلول‌های سرطانی در سه محیط کشت مختلف کشت شدند. سپس به هر یک از این محیط‌ها، جداگانه داروی کربوپلاتین، ترکیب طلا-کربوپلاتین و ترکیب طلا-لیگاند فولات-کربوپلاتین اضافه شد و نتایج مشاهده و بررسی شدند.

تهیه و کشت قارچ اکسیپارم (*Fusarium oxysporum*): نمونه قارچ از کلکسیون قارچ‌های صنعتی ایران تهیه و پودر لیوفلیزه قارچ به‌مدت ٢٤ ساعت قبل از شروع آزمایشات در محیط کشت سابوراد دکستروز براث و سرم فیزیولوژی حل شد و سپس قارچ فعال شده درمحیط کشت مذکور به مدت سه روز تحت دمای ۳۵ درجه سانتیگراد کشت داده شد.

ایجاد شرایط جهت تولید نانو ذرات طلا: بعد از بدست آوردن بیوماس سلولی از مرحله قبل، ابتدا با ۲۰۰۰ دور بر ثانیه، ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی سوپرناتانت حاصل شده از محیط کشت، به منظورتولید نانوذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت. سوپرناتانت در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتر با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولاراز محلول HAuCl4 در حجم‌نهایی با ۱ درصد حجمی (۱% v/v) مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به طول یک شبانه روز در شیکر قرار گرفت. تجمع خارج سلولی ذرات فلز با تغییر رنگ محیط کشت مورد بررسی قرارگرفت. شاهدهای استفاده شده در این مطالعه عبارتند از انکوباسیون محیط کشت و یون فلز در آب مقطر. اسپکتروفوتومتر نور مرئی: در گام بعدی جهت تایید قطعی ایجاد نانوذرات طلا، جذب نور ازطول موج ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتوفتومتر مورد بررسی قرارگرفت. انتظار می‌رود حداکثرمیزان جذب نوری برای ایجاد نانو ذرات طلا درطول موج ۵۲۰ -۵۸۰ نانومتر باشد. تغییر رنگ ایجاد شده نشان‌دهنده تولید نانوذرات طلا در محلول مذکور است. علت این تغییر رنگ ایجاد شده تحریک پلاسمون‌های سطحی تشدیدی (Surface Plasmon Resonance) در سطح نانو ذرات طلا است. ادامه‌دار بودن جذب نور در طول موج ذکر شده، نشان‌دهنده پراکنده‌شدن نانوذرات طلا در محیط، عدم تجمع و همچنین پایدار بودن آن‌ها استنباط می‌شود.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): دراین مطالعه از میکروسکوپ الکترونی عبوری جهت تایید قطعی ایجاد نانو ذرات طلا واندازه گیری سایز ذرات تشکیل دهنده آن استفاده شد. به این صورت که از نمونه‌ها پس از فیکس شدن روی گریدهای مسی مخصوص میکروسکوپ الکترونی در ولتاژ ۱۲۰ KW (kilowatt) عکس برداری شد. جهت تایید اتصال نانوذرات طلا به داروی کربوپلاتین لیگاند فولات و اندازه گیری سایز ذرات تولید شده، نمونه‌ها بوسیله ی میکروسکوپ الکترونی عبوری، مجددا طبق دستورالعمل قبلی مورد بررسی قرار گرفت.

پراش اشعه اکس: به منظور اثبات تولید نانوذرات فلزی، ترکیب شیمیایی نانودرات تولیدی توسط دستگاه XRD (X-Ray Difraction) مورد بررسی قرارگرفت به این منظور نمونه‌های درفاز مایع ابتدا توسط دستگاه فریزدرایر به صورت پودر خشک در آمدند و مورد آنالیز قرار گرفتند.

آماده‌سازی ترکیب داروی ضدسرطان: محلولی با غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی لیتر از داروی کربوپلاتین مورد آزمون تهیه و سپس محلول در دمای اتاق نگهداری شدند.

اتصال نانوذرات طلا به داروی ضدسرطانی: برای اتصال نانو ذرات طلا به داروی کربوپلاتین، ۱ میکرولیتر از آن به صورت قطره قطره به ۱ میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا شسته شده اضافه شده و سپس نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. داروی آزاد با استفاده از سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محلول جداسازی و سطح نانوذرات ۳ مرتبه با بافر شسته شد. سپس میزان داروی غیرمتصل در محلول به وسیله اسپکتروفوتومتر UV- Visible بررسی شد.

اتصال لیگاند فولات به نانوذرات طلا: برای اتصال نانو ذرات طلا با لیگاند فولات ، ۱ میکرولیتر از آن به صورت قطره قطره به ۱ میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا شسته شده اضافه شده و سپس نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد. لیگاند آزاد با استفاده از سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور بر ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه از محلول جداسازی و سطح نانوذرات ۳ مرتبه با بافر شستشه شد. سپس میزان لیگاند متصل نشده در محلول به وسیله اسپکتروفوتومتر UV- Visible بررسی شد.

اتصال همزمان داروی کربوپلاتین و لیگاند فولات به نانوذرات طلا: پس از به دست آوردن نتایج مناسب از اتصال هر ماده به نانوذرات طلا، روش های بالا همزمان با هم اجرا شدند. دلیل اینکه ابتدا لیگاند و دارو به صورت غیر همزمان به نانوذرات متصل شدند چند نکته می‌باشد. اول آنکه بهینه سازی مد نظر می‌باشد. به این منظور که چنانچه اتصال هر مولکول مناسب نباشد، فرایند با ایجاد تغییراتی در دما، زمان و pH تکرار شود تا مناسب ترین حالت اتصال اتفاق بیفتد. دوم آنکه هر کدام از نانوذرات طلا- کربوپلاتین و نانوذرات طلا- فولات به عنوان شاهد آزمون در کشت سلول مورد استفاده می‌باشند.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (Transform Infrared Spectrometer): از تمام نمونه‌های محتوی نانوذرات طلا-داروی کربوپلاتین، نانوذرات طلا-فولات، نانوذرات طلا-داروی کربوپلاتین -لیگاند فولات و نیز نمونه خالص کربوپلاتین، فولات و نانوذرات طلا طیف‌سنجی مادون قرمز به دست آمد.

تست سنجش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide): در این بررسی از سلول‌های رده‌ی A2780 استفاده شد. سلول‌ها در غلظت (۱۰٤×٤) همراه با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium و ۵ درصد از سرم جنین گاو وارد پلیت‌های ۹٦ خانه شدند و بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در انکوباتور کشت سلولی و رسیدن به میزان ۸۰٪ از تجمع در معرض غلظت‌های مختلف، که به ترتیب به صورت نصف کاهش می‌یابند، از محلول مورد آزمون قرار گرفتند. این محلول‌ها شامل کربوپلاتین، فولات، فولات-نانوذرات طلا، کربوپلاتین -نانوذرات طلا، کربوپلاتین-فولات-نانوذرات طلا و نانوذرات طلا بودند. کنترل مثبت، چاهک‌های فاقد هر نوع محلول خواهند بود. پلیت‌ها در انکوباتور CO_2 ۵ درصد که وابسته به درصد بی‌کربنات سدیم درون محیط کشت است، مدت ۲٤ ساعت قرار داده شده و سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از رنگ MTT به آن‌ها اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ ساعت نگه‌داری شد. بعد از جداسازی محلول، رنگ به وسیله سمپلر، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، به چاهک‌ها اضافه شده و جذب نوری آن‌ها در ۵۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا بررسی گردید تا کمترین غلظت از محلول‌ها که دارای خاصیت ضدسرطانی و سلول کشی است، مشخص شود.

بررسی نانوذرات طلای وارد شده به داخل سلول‌های سرطانی: برای بررسی وجود طلا در داخل سلول‌ها از

روش Inductively coupled plasma (ICP) استفاده شد. سلول‌ها در پلیت‌های ۲٤ خانه قرار گرفتند و همانند مرحله قبل یک شبانه روز سلول‌ها کشت داده شدند. سپس در هر چاهک از کمترین میزان کشندگی مشخص شده از نانوذرات، نانوذرات طلا- کربوپلاتین، نانوذرات طلا-فولات، نانوذرات طلا-فولات-کربوپلاتین به چاهک‌ها اضافه گردید. یک چاهک که تنها حاوی محیط کشت بود، به عنوان شاهد درنظر گرفته شد. سلول‌ها به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرارگرفته و سپس توسط سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی و به وسیله PBS، سه مرتبه شسته شدند تا نانوذرات وارد نشده به سلول‌ها حذف گردند. سپس سلول‌ها وارد آب مقطر شده و توسط HCl ۳ نرمال هضم صورت گرفت ودر انتها نیز از روش برای بررسی وجود طلا استفاده شد. به منظور تهیه گراف استاندارد از غلظت‌های استاندارد طلا به عنوان شاهد استفاده گردید.

تهیه و کشت قارچ *Fusarium oxysporum* : از بین قارچ‌های گوناگون *Fusarium oxysporum* تنها قارچی است که قادر به تولید نانودرات مختلف به صورت خارج سلولی می‌باشد. با توجه به قابلیت تولید نانوذرات توسط قارچ مذکور، در مطالعه حاضر به بررسی تولید زیستی نانوذرات طلا و تایید آن توسط قارچ *Fusarium oxysporum* پرداخته شد. همچنین اتصال نانوذرات به داروی کربوپلاتین با لیگاند فولات انجام و تایید آن توسط اسپکتروفوتومتری نور مرئی و میکروسکوپ الکترونی عبوری صورت گرفت. اثرات ضدسرطانی محلول تولید شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. سوپرناتانت حاوی یون‌های طلا ۲٤ ساعت پس از انکوباسیون به ارغوانی تغییر رنگ داده که مشخصه تولید نانودرات طلا به دلیل تغییر در پلاسمون سطحی نانوذرات می‌باشد که با گذشت زمان تغییر رنگ افزایش یافته و واضح‌تر گردید.

نتایج

تایید تولید نانوذرات طلاتوسط اسپکتروفوتومتر نور مرئی: جهت تایید تولید نانوذرات طلا از اسپکتروفوتومتر نور مرئی استفاده شد. مشاهدات حاکی از حضور طول موج جذب حدود ۵۳۷ نانومتر بوده است. این تغییر در میزان جذب نشان دهنده تولید نانودرات می‌باشد (شکل ۱).

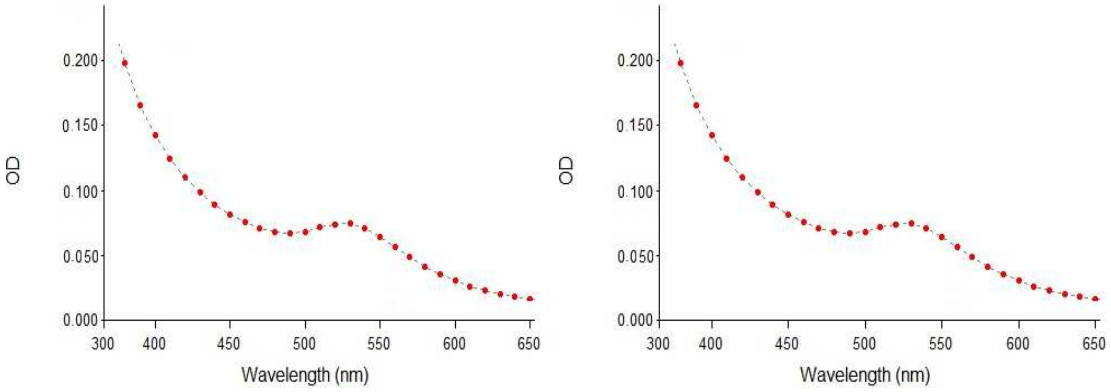
نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): تصاویر میکروسکوپ الکترونی، نانودراتی با شکل کروی و چند ضلعی به ابعاد ۸ تا ٤۳ نانومتر نشان داد .اغلب نانوذرات تولید شده دارای اطراف گرد شده بوده و کمتر به شگل مضرس و نوک تیز دیده شدندکه در روند کونزوگه سازی و افزایش اثر می‌تواند کارآمد باشد. شکل ۲ نتایج این آزمون را نشان می‌دهد. بررسی نتایج و نمودار بدست آمده توسط نرم افزار X'Pert Highscore Plus، وجود نانوذرات طلا را در محلول تایید کرد. شکل ۳ نتایج بدست آمده از آزمون پراش اشعه ایکس را نشان می‌دهد. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهند حضور طلا به صورت فلزی در بین سایر ترکیبات موجود در محیط کشت قابل مشاهده است.

نتایج حاصل از اسپکتروفوتومتر نور مرئی: جهت تایید اتصال نانوذرات طلا به دارو و لیگاند، نمونه‌های به دست آمده توسط اسپکتروفوتومتر نور مرئی مجددا طبق دستورالعمل قبلی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ٤ نشان دهنده اتصال نانوذرات با دارو و لیگاند می‌باشد. پیک نانوذرات به تنهایی به رنگ قرمز و پیک نانوذرات پس از اتصال به دارو سبز و به لیگاند بنفش می‌باشند. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهند جذب نوری نانوذرات پس از اتصال به دارو و لیگاند به سمت طول موج های بالاتر رفته و شدت جذب نیز افزایش داشته است.

آزمون طیف‌سنجی FTIR: از نمونه‌های حاوی نانوذرات طلا، دارو، لیگاند و نیز نمونه خالص نانوذرات طلا و دارو طیف سنجی FTIR به دست آمد. طیف کربوپلاتین-لیگاند فولات بر بستر نانو: پیک ۳۳۱۵ این پیک با توجه به تغیر دوقله ای به تک قله ای مربوط به گروه N-H می‌باشد یعنی آمین نوع دوم که می‌توان نتیجه گرفت جذب بر بستر از سمت گروه آمینی انجام شده است. پیک۲۹٤۲ این پیک مربوط به پیوند C-H می‌باشد. پیک۱٦٥٤ این پیک مربوط به گروه کربونیل می‌باشد و دلیل شیفت آن به سمت فرکانس بالاتر ناشی از شکست پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی به دلیل جذب بر بستر می‌باشد. پیک۱۳۹۵ این پیک مربوط به گروه CH3 می‌باشد. پیک ۱۱۰۵-۱۰٤۲ این پیک مربوط به پیوند C-O گروه استری می‌باشد و دلیل شارپ شدن آن شکست پیوندهای هیدوزنی بین مولکولی می‌باشد. پیک٤۰۰- ٦۰۰ پیک‌های این محدوده مربوط به پیوندهای فلزی می‌باشد که به دلیل افزایش پیک‌های این ناحیه نسبت به طیف دارو می‌توان نتیجه بر جذب دارو بر بستر فلزی گرفت. پیک حضور پیک‌های موقعیت ۳۳۲٤ تا ۳٥٤۲ که به ترتیب برای گروه‌های عاملی NH و OH می‌باشند و نیز پیک قوی موقعیت ۱٦۹۰-۱۷۰۰ که مربوط به اسید کربوکسیلیک است. در طیف ترکیب نانو دارو لیگاند مشخص می‌باشند. با توجه به حفظ پیک‌های موقعیت های فوق در فولات وتنها اندکی شیفت آن‌ها به طول موج‌های کمتر که مشخص‌کننده اتصال فولات به نانوذرات می‌باشد، نشان‌دهنده آن است که لیگاند به ترکیب دارو و طلا متصل شده است (شکل ٥)

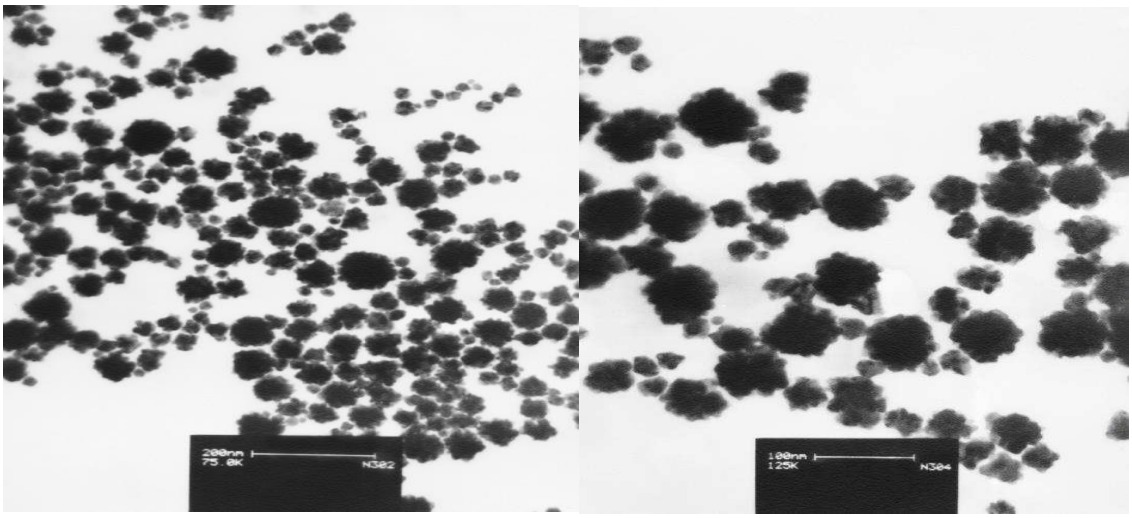
نتایج تست MTT: شکل شماره ٦ نشان می‌دهد که دارو به تنهایی سمیت زیادی داشته لیکن نانوذرات طلا به تنهایی سمیت اندکی دارد و به نظر می‌رسد در ترکیب با دارو و لیگاند، سمیت دارو و عوارض جانبی دارو کاهش می یابد.ترکیب دارو، لیگاند و نانوذرات طلا در غلظت های بالا گرچه اثر سمی بر روی سلول های سرطانی دارد لیکن با کاهش غلظت بیشترین میزان زنده ماندن سلول‌ها را نسبت به ترکیب داروی تنها و ترکیب دارو و لیگاند و دارو و نانوذرات طلا را نشان می‌دهد، یعنی این ترکیب برای سلول‌ها کمترین آسیب را ایجاد می کند و برای کاهش عوارض جانبی دارویی مناسب است. ترکیب لیگاند به تنهایی بیشترین میزان زنده ماندن سلول‌ها را نشان داده و اثر سمی ندارد.

نتایج تست ICP-OES: نتایج بدست آمده میزان نفوذ نانودرات به سلول‌ها را نشان داد (جدول ۱). میزان نفوذ نانوذرات طلا ppm ۰/۹۸ و میزان نفوذ نانوذرات طلا-لیگاندppm ۱/۰٤ بدست آمد.در صورتیکه میزان نفوذ نانوذرات طلا- لیگاند- دارو ppm ۱/۰۰ بوده است. این کاهش نسبت به نفوذ نانودرات – لیگاند احتمالا به دلیل افزایش اندازه نانودارودر حالت ایجاد کمپلکس با نانوذرات طلا باشد. بنابر این با وجود اینکه نانوداروبه میزان کمتر از نانوذرات طلا- لیگاند وارد سلول شده بود توانسته بود اثر کشندگی خود را در سلول اعمال نمایند، نتایج به هدف اصلی خود که همانا کاهش دوز مصرفی دارو و نتیجتاً کاهش اثرات جانبی دارو می‌باشد نزدیک شده است.



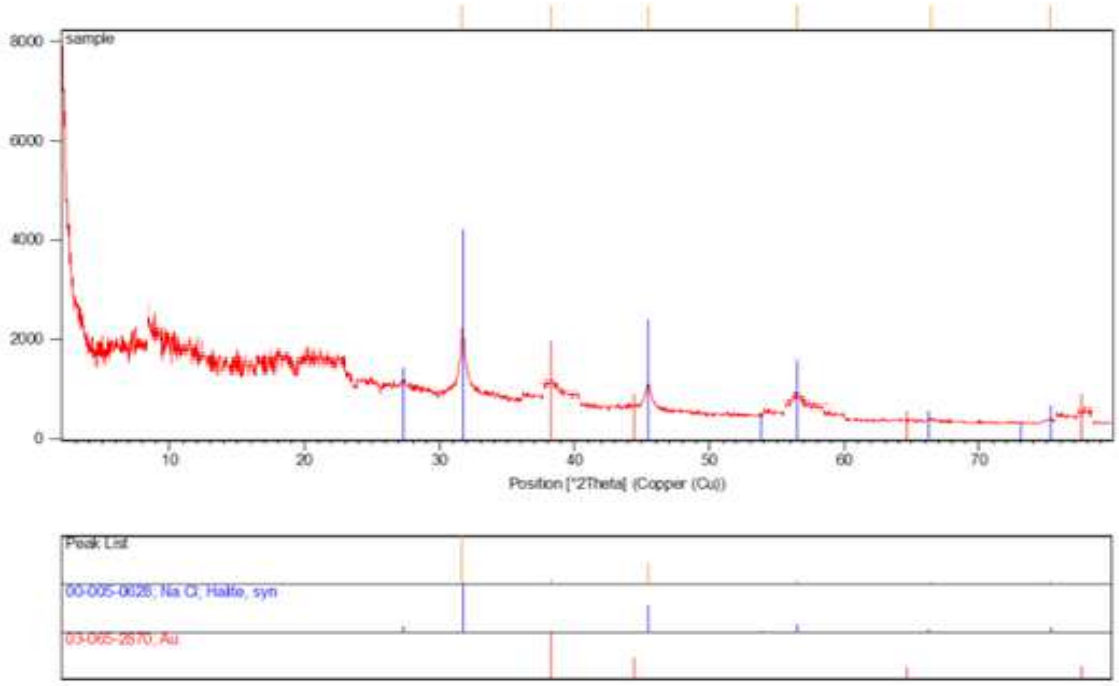
شکل ۱- اسپکتروفوتومتر نور مرئی: جهت تایید تولید نانوذرات طلا. نانوذرات طلای تولیدی دارای بیشینه جذب نوری در محدوده ۵۳۷ نانومتر بوده‌اند.

Fig. 1. Visible light spectrophotometer: To confirm the production of gold nanoparticles. The produced gold nanoparticles had a maximum light absorption in the range of 537 nm.



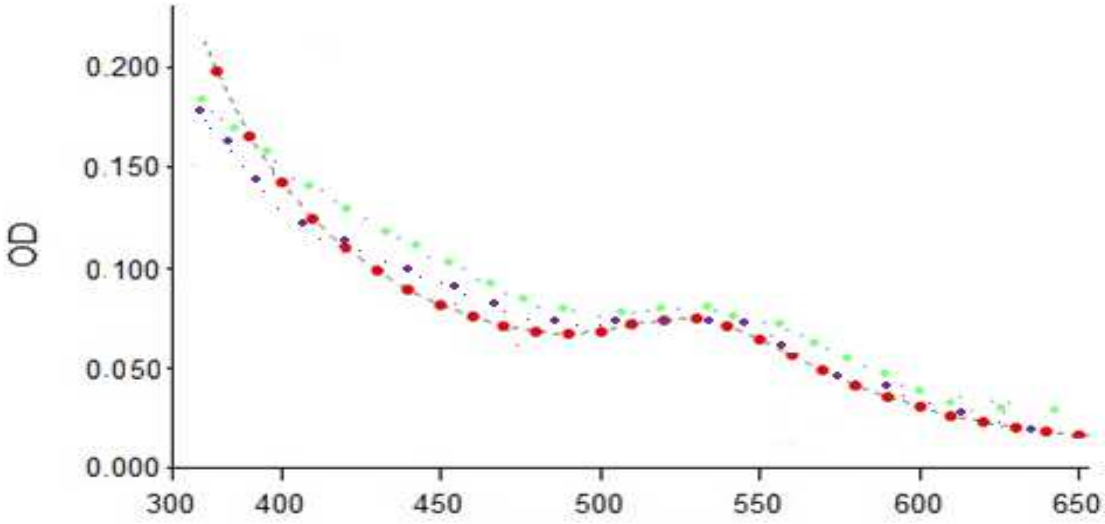
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری، نانودراتی با شکل کروی و چند ضلعی به ابعاد ۸ تا ٤۳ نانومتر نشان داد.

Fig. 2. Transmission electron microscope images showed spherical and polygonal nanowires with dimensions of 8 to 43 nm.



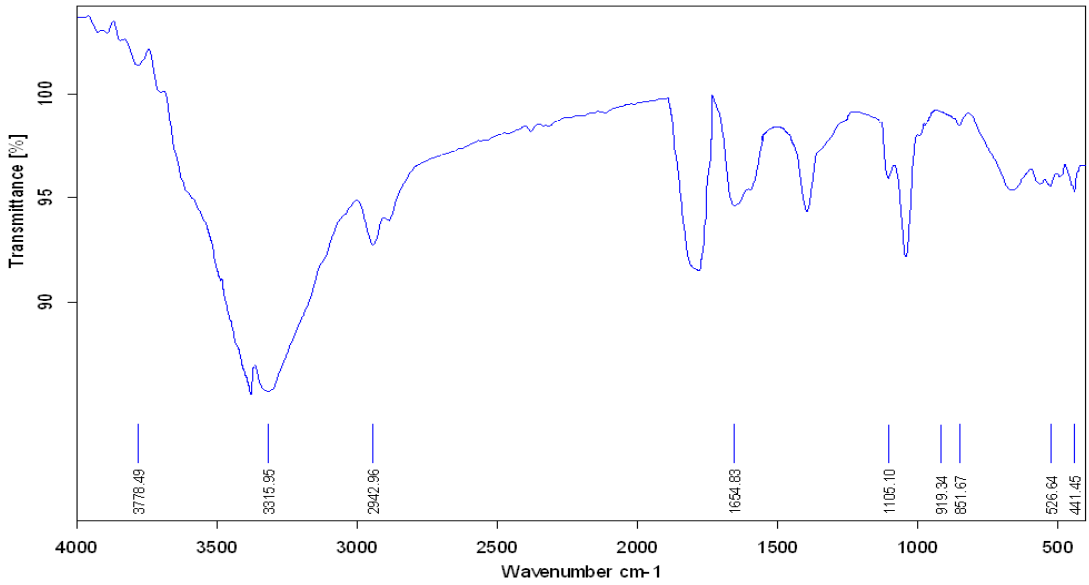
شکل ۳- پراش اشعه ایکس حضور طلا به صورت فلزی را در بین سایر ترکیبات موجود در محیط کشت نشان می‌دهد.

Figure 3 - X-ray diffraction shows the presence of gold in metallic form among other compounds present in the culture medium.



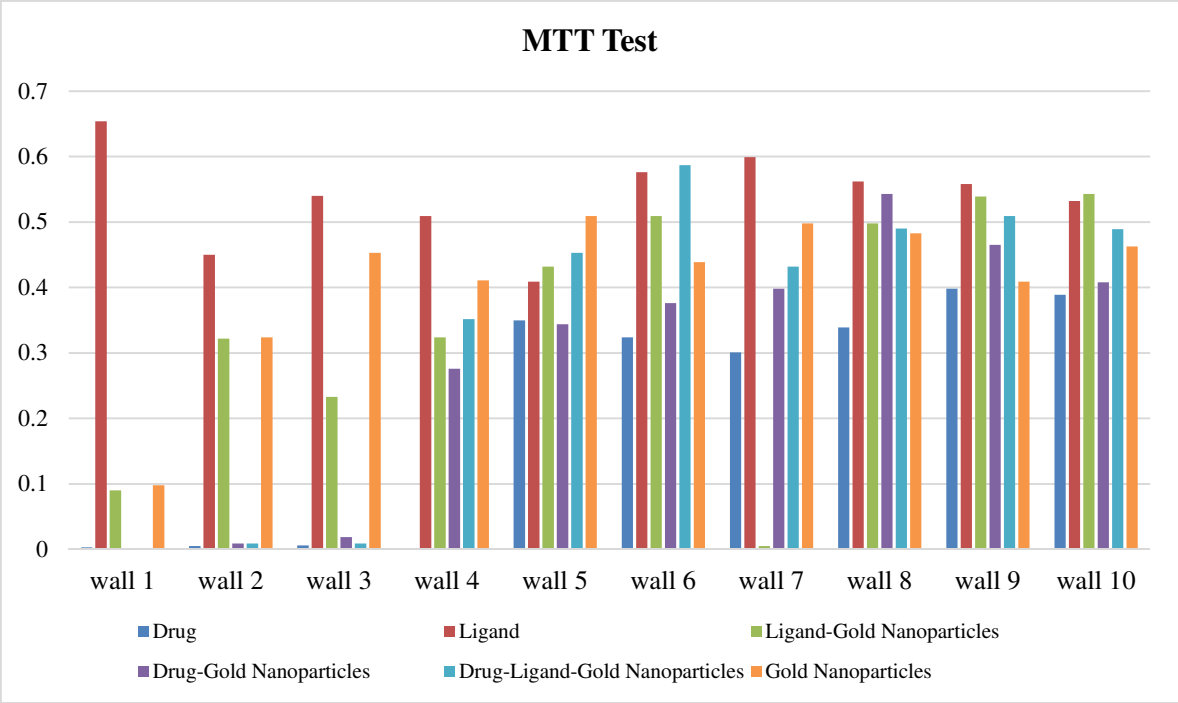
شکل ٤- اسپکتروفوتومتر نور مرئی نشان دهنده نانوذرات پس از اتصال با دارو و لیگاند

Fig. 4. Visible light spectrophotometer showing nanoparticles after binding with drug and ligand



شکل ۵- آزمون طیف سنجی FTIR: طیف کربوپلاتین-لیگاند فولات بر بستر نانو

Fig. 5. FTIR spectroscopy test: spectrum of carboplatin-folate ligand on nano-substrate



شکل ٦- نتایج بدست آمده از تست MTT

Fig. 6. Results obtained from the MTT test

جدول ۱- نتایج بدست آمده از آزمون ICP-OES

Table 1. Results obtained from ICP-OES test

lab.NO.	Sample Labels	Element	Wavelength
		Au	242.794
	Blank (ppm)		0.00
301	Gold Nanoparticles (ppm)		0.98
302	Drug-Gold Nanoparticles (ppm)		0.95
305	Ligand-Gold Nanoparticles (ppm)		1.04
306	Drug-Ligand-Gold Nanoparticles (ppm)		1.00

بحث

در طول دهه‌های گذشته، انکولوژی سهم بزرگی از برنامه‌های کاربردی نانو پزشکی داشته است (۱٤, ۲۵-۲۷) نانوذرات متنوعی که شامل نانوذرات لیپیدی، پلیمری و معدنی می‌شوند، برای ارسال اسیدهای نوکلئیک درمانی، عوامل شیمی‌درمانی و عوامل ایمنی به تومورها توسعه یافته‌اند. همچنین مولکول‌های کوچک مزدوج دارو می‌توانند با تحویل خاص دارو به سلول‌های سرطانی، سمیت ناخواسته به سلول‌های طبیعی را کاهش دهند (۲۸). سیستم‌های تحویل دارو بر پایه نانوذرات طلا به علت کارایی برجسته‌شان، به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند. بسیاری از نانوداروهای مبتنی بر نانوذرات طلا که با دیگر ذرات هدفمند ترکیب شده‌اند، به عنوان حامل‌های مؤثر شناخته می‌شوند (۲۹). در این مطالعه،از نانوذرات طلا استفاده شد زیرا ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب، آن‌ها را به یک بستر مناسب برای کاربردهای درمانی مثل دارو رسانی تبدیل کرده‌است (۳۰). قابلیت فعال‌سازی نانوذرات طلا با ذرات خاص، امکان ارسال هدفمند آن‌ها به نقاط موردنظر در سرطان را فراهم می‌کند. در سال‌های اخیر، مقالات متعدد و آزمایش‌ها بالینی بر وعده تشخیص و درمان سرطان وابسته به AuNPs، با بررسی‌های بسیاری بر روی این موضوع تاکید کرده‌اند (۲۳, ۳۱) داروهای شیمی‌درمانی متعددی - از جمله Paclitaxel (PTX), 5-fluorouracil (5-FU)و Gemcitabine (GMC) برای کاهش دوز و در نتیجه، اثرات جانبی درمان ترکیب شده‌اند.(۳۲). یکی از راه های مناسب سنتز نانوذرات طلا، استفاده از قارچ ها است که می‌توانند با کاهش آنزیم های داخل یا خارج سلولی نانوذرات را ایجاد کنند.(۳۳) در میان قارچ‌های مختلف در این صنعت، قارچ‌های از جنسFusarium، به خوبی می‌توانند با سنتز سریع و سازگار با محیط‌زیست، نانوذراتی با اندازه بهتر و یکنواختی بیشتر ایجاد کنند (۳٤) . از میان مولکول‌های هدفمند مورد بررسی برای نانوذرات طلا، مولکول‌های کوچک، انتخاب مناسب‌تری بنظرمی‌آیند زیرا این مولکول‌های کوچک معمولاً پایداری بیشتری نسبت به مولکول‌های هدفمند دیگر دارند و به راحتی از طریق تومورها نفوذ کرده و محموله‌ها را به هدف خود می‌رسانند. اسید فولیک، که به عنوان فولات (FA) نیز شناخته می‌شود، رایج‌ترین مولکول کوچک استفاده شده برای هدفمند کردن نانوذرات طلا است. این ماده یک لیگاند طبیعی برای گیرنده‌های فولات است که به سمت گیرنده‌های سطح سلولی(به‌ویژه سلول‌های سرطانی) می‌رود. (۳۵). فولات یک ویتامین محلول در آب از خانواده ویتامین‌های B است که نقش کلیدی در سنتز و ترمیم DNA دارد. این ویتامین از طریق اندوسیتوز وابسته به گیرنده‌های فولات وارد سلول می‌شود. بیان بیش از حد این گیرنده‌ها در بسیاری از

تومورهای جامد، به‌ویژه سرطان پستان، مشاهده شده است، در حالی که در بافت‌های طبیعی به میزان کمی حضور دارد. این ویژگی با ترکیب نانوذرات ، یک استراتژی نویدبخش برای درمان است. (۳۸-۳٦) از این جهت در این مطالعه، از لیگاند فولات استفاده شده است. طبق مطالعات Tagde و همکاران، نانوحامل‌های مزدوج با فولات که با عوامل شیمی‌درمانی مختلفی مانند دوکسوروبیسین، دوکتاکسل، پاکلیتاکسل و ۵-فلوئورواوراسیل بارگذاری شده‌اند، در مقایسه با داروهای آزاد، افزایش کارایی ضدسرطانی و کاهش سمیت نشان داده‌اند (۳۹). از آنجاییکه فولات در سلول‌های سرطانی تخمدان بیش از حد بیان می گردد، در صورتیکه به نانوذرات متصل شودقادر است سبب افزایش تمایل در سلول‌های رده سرطان تخمدان ۲۷۸۰ Aبه داروهای ضدسرطان گردد. (40).یافته های مطالعه مذکور مشابه با یافته های این مطالعه می‌باشد . در مطالعه ما نیز مشخص گردید که فولات گیرنده مناسبی برای داروهای هدف در جهت درمان سرطان تخمدان می‌باشد. در مطالعه ای که با هدف بررسی فولات به عنوان لیگاند برای ورود داروهای موثر در درمان سرطان تخمدان مشخص گردید که فولات به عنوان یک ماده مهم سلولی در روند انتقال مواد موثر بوده و می‌تواند به عنوان لیگاند برای انتقال نانوذرات مختلف از جمله طلا در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مورد استفاده قرار گیرد.(٤۱) این یافته با یافته های بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد .دراین مطالعه نیز نشان داده شد که فولات بعنوان یک لیگاند موثر برای انتقال کربوپلاتین در سرطان تخمدان موثر می‌باشد و می‌تواند به عنوان اهداف لیگاندی جهت انتقال دارو مورد استفاده قرار گیرد. فولات به عنوان یک لیگاند مناسب برای انتقال نانوذرات به سلول‌های سرطانی تخمدان در موارد متاستاتیک و گردن رحم، سبب افزایش ورود افزایش ورود ماده ضدسرطانی شده و نیز روند آپوپتوز سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۳-۱۱). یافته های مطالعه مذکور تایید کننده یافته های به دست آمده ازاین مطالعه می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فولات می‌تواند به عنوان یک لیگاند مناسب برای انتقال نانوذرات در درمان سرطان تخمدان مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که لیگاند به ترکیب دارو و طلا متصل شده و نانوذرات طلا-دارو به خوبی قادر است وارد سلول شود. از این رو، انتظار می‌رود که با استفاده از نانوذرات طلا با لیگاند انتخابی فولات، بتوان در درمان سرطان تخمدان موفقیت‌های قابل توجهی بدست آورد. البته برای اطمینان از این موضوع، لازم است که تمامی پارامترهای بهینه‌سازی مورد بررسی دقیق قرار گیرد. این تحقیقات امروزه در بسیاری از جوامع در حال انجام است و به نظر می‌رسد که در آینده، این رویکرد بتواند به عنوان یکی از روش‌های موثر در درمان سرطان تخمدان مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. Cancer Cell. 2017;32(2):135-54.

2. Gallaher JA, Enriquez-Navas PM, Luddy KA, Gatenby RA, Anderson ARA. Spatial Heterogeneity and Evolutionary Dynamics Modulate Time to Recurrence in Continuous and Adaptive Cancer Therapies. Cancer Res. 2018;78(8):2127-39.

3. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. CA Cancer J Clin. 2024;74(1):12-49.

4. Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-Mahyari H, Motevaseli E, Najafi M, Farhood B, et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. J Cell Physiol. 2019;234(8):12537-50.

5. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. American Journal of Preventive Medicine. 2016;50(3):384-94.

6. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin. 2021;71(1):7-33.

7. Board E. Female genital tumours. WHO Classification of Tumours (International Agency for Research on Cancer). 2020.

8. Narod S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured? Nature Reviews Clinical Oncology. 2016;13(4):255-61.

9. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. Theranostics. 2022;12(5):2115-32.

10. Prat J, Mutch DG. Pathology of cancers of the female genital tract including molecular pathology. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2018;143:93-108.

11. Prat J, D'Angelo E, Espinosa I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. Hum Pathol. 2018;80:11-27.

12. Ali ES, Sharker SM, Islam MT, Khan IN, Shaw S, Rahman MA, et al. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives. Semin Cancer Biol. 2021;69:52-68.

13. Sun L, Liu H, Ye Y, Lei Y, Islam R, Tan S, et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. Signal transduction and targeted therapy. 2023;8(1):418.

14. Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2943-70.

15. Ramalingam V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. Adv Colloid Interface Sci. 2019;271:101989.

16. Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. Molecules. 2023;28(18).

17. Alrushaid N, Khan FA, Al-Suhaimi EA, Elaissari A. Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Treatment. Pharmaceutics. 2023;15(3).

18. Giannakou C, Park MV, de Jong WH, van Loveren H, Vandebriel RJ, Geertsma RE. A comparison of immunotoxic effects of nanomedicinal products with regulatory immunotoxicity testing requirements. Int J Nanomedicine. 2016;1.۵۲-۱:۲۹۳۵

19. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nature reviews materials. 2016;1(5):1-12.

20. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Nature biotechnology. 2015;33(9):941-51.

21. Nag OK, Delehanty JB. Active cellular and subcellular targeting of nanoparticles for drug delivery. Pharmaceutics. 2019;11(10):543.

22. Oliva N, Carcole M, Beckerman M, Seliktar S, Hayward A, Stanley J, et al. Regulation of dendrimer/dextran material performance by altered tissue microenvironment in inflammation and neoplasia. Science translational medicine. 2015;7(272):272ra11-ra11.

23. Kang MS, Lee SY, Kim KS, Han DW. State of the Art Biocompatible Gold Nanoparticles for Cancer Theragnosis. Pharmaceutics. 2020;12(8).

24. Capek I. Polymer decorated gold nanoparticles in nanomedicine conjugates.

nanotechnology. In: Kumar A, Singh AK, Choudhary KK, editors. Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology: Woodhead Publishing; 2019. p. 145-62.

34. Rai M, Bonde S, Golinska P, Trzcińska-Wencel J, Gade A, Abd-Elsalam KA, et al. Fusarium as a Novel Fungus for the Synthesis of Nanoparticles: Mechanism and Applications. J Fungi (Basel). 2021;7(2).

35. Goddard ZR, Marín MJ, Russell DA, Searcey M. Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics. Chemical Society Reviews. 2020;49(23):8774-89.

36. Zwicke GL, Ali Mansoori G, Jeffery CJ. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. Nano reviews. 2012;3(1):18496.

37. Kue CS, Kamkaew A, Burgess K, Kiew LV, Chung LY, Lee HB. Small molecules for active targeting in cancer. Medicinal research reviews. 2016;36(3):494-575.

38. Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. Drug Resistance Updates. 2014;17(4-6):89-95.

39. Tagde P, Kulkarni GT, Mishra DK, Kesharwani P. Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2020;56:101613.

40. Ak G YH, Güneş A, Hamarat Sanlier S. In vitro and in vivo evaluation of , cancer fr-tanmddsfo, 2018;46(sup1):926-937. tACNB.

41. Li S, Li X, Ding J, Han L, Guo X. Anti-tumor efficacy of folate modified PLGA-based nanoparticles for the co-delivery of drugs in ovarian cancer. Drug Des Devel Ther. 2019;13:1271-80.

Adv Colloid Interface Sci. 2017;249:386-99.

25. Younis NK, Roumieh R, Bassil EP, Ghoubaira JA, Kobeissy F, Eid AH. Nanoparticles: Attractive tools to treat colorectal cancer. Semin Cancer Biol. 2022;86(Pt 2):1-13.

26. Younis NK, Ghoubaira JA, Bassil EP, Tantawi HN, Eid AH. Metal-based nanoparticles: Promising tools for the management of cardiovascular diseases. Nanomedicine. 2021;36:102433.

27. Boehnke N, Straehla JP, Safford HC, Kocak M, Rees MG, Ronan M, et al. Massively parallel pooled screening reveals genomic determinants of nanoparticle delivery. Science. 2022;377(6604):eabm5551.

28. Rana A, Bhatnagar S. Advancements in folate receptor targeting for anti-cancer therapy: A small molecule-drug conjugate approach. Bioorg Chem. 2021;112:104946.

29. Siddique S, Chow JC. Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. Applied Sciences. 2020;10(11):3824.

30. Sharifi M, Attar F, Saboury AA, Akhtari K, Hooshmand N, Hasan A, et al. Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. J Control Release. 2019;311-312:170-89.

31. Lopes TS, Alves GG, Pereira MR, Granjeiro JM, Leite PEC. Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine. J Cell Biochem. 2019;120(10):16370-8.

32. Yafout M, Ousaid A, Khayati Y, El Otmani IS. Gold nanoparticles as a drug delivery system for standard chemotherapeutics: A new lead for targeted pharmacological cancer treatments. Scientific African. 2021;11.

33. Srivastava AK. 9 - The role of fungus in bioactive compound production and