زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۹۳- ۱۸۳

مقاله پژوهشی

تثبیت پپتید روی سطح ناذرات لانتانیوم وانادات دارای یوروپیوم پوشش داده شده با لوودوپا برای تحویل هدفمند ۵- فلوئوروراوراسیل به تومور پستان

مریم ناظمیان[۱]، ویدا حجتی[۱]، حمید معدنچی[۲،۳*]، حمید هاشمی مقدم[٤*]، سعید زواره[٥]، بهروز جوهری[٦]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ایران

۳- واحد طراحی دارو و بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

٤- گروه شیمی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۵- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

٦- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

*مسئول مکاتبات: hamidmadanchi@yahoo.com ،hashemimogaddam@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2023.697917

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹

چکیده

شیمی‌درمانی با استفاده از سیستم‌های داروررسانی می‌تواند سلول‌های تومور را به طور انتخابی هدف قرار دهد و سلول‌های طبیعی را تحت تاثیر قرار ندهد. در این مطالعه، یک سیستم داروررسانی خاص با پپتید NL2 تثبیت شده بر روی سطح نانو داروی پلیمری برای درمان تومور پستان طراحی شد. ساختار سوم پپتید NL2 (AEGEFIHNRYNRF FYWYGDPAK) از پایگاه داده انتخاب و سنتز شد. پس از آن، به نانوکامپوزیت پلی ۳،٤-دی هیدروکسی-۱- فنیل آلانین (DOPA)/SiO_2 سنتز شده جفت شد و برای تحویل هدفمند ۵- فلوئوروراوراسیل (۵-FU) بر رده سلول‌های رده سرطان پستان SK-BR3 و رده سلول‌های نرمال پستان MCF-10A مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج MTT و همولیز گلبول‌های قرمز نشان داد که اجزای نانوکامپوست و پپتید NL2 هیچ گونه سمیت سلولی ندارند در صورتی که نتایج تست MTT بعد از شستشو نشان داد که نانوکامپوزیت‌های عملکردی شده با پپتید NL2 برای سلول‌های دارای مارکر Her2 یعنی سلول‌های SK-BR3 دارای اختصاصیت بوده ولی بعد از شستشو از سلول‌های MCF-10A که فاقد این مارکر هستند جدا شده و داروی ۵- فلورویوراسیل نمی‌تواند آثار سمی خود را بر این سلول‌ها اعمال کند.

کلمات کلیدی: ۵-فلوراوراسیل، پلی ۳،٤-دی هیدروکسی ال فنیل آلانین، پپتید ضدسرطان، سرطان سینه.

مقدمه

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAb) می‌توانند به‌عنوان عاملی برای هدف قرار دادن تومورها عمل کنند (۱). برخی از این آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به گیرنده‌ها متصل می‌شوند و با جلوگیری از عملکرد پرومیتوژنی

که به‌عنوان آنتی‌بادی‌های مونوکلونال غیرکونژوگه طبقه‌بندی می‌شوند مانند Herceptin (۲) Avastin (۳) که علیه گیرنده‌های HER2/neu و VEGF عمل کرده و با اتصال به آنها، رشد تومور را مهار می‌کنند. برخی از آنها ایمونوکونژوگه هستند، مانند Zevalin (٤) و Bbexxar (٥) که گیرنده CD20 را هدف‌گیری می‌کنند. برخی از داروهای ضدسرطان آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) هستند که گیرنده‌های سطح سلولی را هدف قرار می‌دهند. وزن مولکولی بزرگ مولکول آنتی‌بادی منوکلونال (وزن مولکولی ≤ ۱٦۰۰۰۰) یک محدودیت عمده برای نفوذ در سلول-های تومور است و نیمه‌عمر طولانی سرم آنها برای کاربردهای درمانی و تصویربرداری مناسب نیست. توسعه آنتی‌بادی‌های ضدتومور تک‌زنجیری، رویکردی برای حل مشکل وزن مولکولی این آنتی-بادی‌ها می‌باشد. جذب مولکول‌های آنتی‌بادی برای سیستم رتیکولواندوتلیال برخی از بافت‌ها مانند طحال، کبد و مغز استخوان خاص نیست و یکی دیگر از مشکلات اصلی درمان با mAb است (٦، ۷). نانوداروی عملکردی شده با پپتیدهای ضد توموری یک رویکرد مفید برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی است (۸). انتقال دارو به ناحیه خاص در سلول می‌تواند توسط یک پپتید هدف‌گیری کننده تومور که دارای زنجیره کوتاه اسید آمینه‌ای (۳-۷۰ اسید آمینه) هستند، انجام شود. پپتیدها از نظر شیمیایی نسبتاً پایدار هستند. اخیراً، پپتیدها به عنوان عوامل هدفمند درمانی برای درمان سرطان توسعه یافته‌اند. در بیوسنتز ملانین‌های طبیعی، ۳،٤-دی هیدروکسی-۱ - فنیل آلانین-۱ (DOPA) تولید می‌شود. پلی DOPA (P-DOPA) با خود پلیمریزاسیون l-DOPA به روشی مشابه پلی‌دوپامین سنتز (PDA) تهیه شد.

به دلیل خاصیت چسبندگی خوب، آنها به شدت به عنوان عامل پوشش برای کاربردهای مختلف به عنوان مثال در دارورسانی حسگر استفاده می‌شوند (۸، ۹).

تهیه یک پوسته-هسته (Core –shell) بر اساس پلیمریزاسیون لوودوپا بر روی تعدادی از نانوذرات در سیستم های دارورسانی بررسی شده است.

در تحقیق حاضر لوودوپا بر روی سطح نانوذرات لانتانیوم واندات با حضور ٥-فلوئوراسیل به عنوان الگو پلیمریزه شد، سپس پپتید NL2 بر روی نانوکامپوزیت پلیمری سطحی تثبیت شد. در ادامه سمیت نانوکامپوزیت و پپتید NL2 و داروی ٥-فلورویوراسیل بر سلول‌های SK-BR3، MCF-10A و گلبول‌ها قرمز انسانی سنجیده شد.

در انتها اختصاصیت پپتید NL2 برای سلول‌های دارای مارکر Her2 (SK-BR3) با روش MTT بعد از شستشو انجام شد.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) خریداری شده است، مگر اینکه به دیگری اشاره شود. ٥-فلوئوراسیل از شرکت شیمیایی سیگما (آمریکا) خریداری شد.

سنتز پپتید NL2 و اعتبار سنجی آن: پپتید NL2 که در مطالعه قبلی ما طراحی شده بود با روش سنتز فاز جامد طبق شیمی استر فعال فلورن-۹-متوکسی کربونیل-(Fmoc) توسط Mimotopes Pty Ltd (کلیتون، ویکتوریا، استرالیا) سنتز شد. درجه خلوص این پپتید با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (RP-HPLC) تا ۹٥ درصد تعیین شد. تعیین هویت پپتید بر اساس وزن مولکولی پپتید NL2 با آنالیزهای طیف سنجی جرمی توسط طیف‌سنج جرمی Sciex API100 LC/MS (Perkin Elm Co. Norwalk، CT، ایالات متحده آمریکا (در حالت یون مثبت تعیین شد.

سنتز نانوذرات لومیتسانت $LaVO_4$: Eu3: ابتدا محلولی با افزودن ۰/۶ گرم ارتووانادات سدیم (Na_3VO_4)، ۰/۶ گرم NaOH و ۰/۰۶ گرم NH_4VO_3 تهیه شد. سپس به آن مخلوطی از ۲۰ میکرولیتر نیترات یوروپیوم ($Eu(NO_3)_3\ 6H_2O$) و ۹۸۰ میکرولیتر $Na(NO_3)_3\ 6H_2O$ (هر دو ۰/۱ mol/L) به صورت قطره‌ای به آن اضافه شد. محلول Na_3VO_4 در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۲ ساعت تحت هم زدن ثابت نگه داشته شد. سپس، مقدار pH توسط آمونیاک آبی به ۹ رسانده شد. سپس محلول سانتریفیوژ شد و نمونه رسوب جمع‌آوری شد. در نهایت رسوب سه بار با اتانول مطلق و آب مقطر شسته شد و در اون با دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت خشک شد.

پلیمریزاسیون L DOPA بر روی سطح نانوذرات لانتانیوم واندات: برای سنتز پوسته هسته، ۰/۵ گرم لوودوپا به ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر تریس) ۱۰ میلی‌مولار، (pH = ۸/۵) اضافه شد، سپس ۰/۵ گرم نانوذرات لانتانیوم واندات اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت به‌طور مکانیکی همزد شد و سپس ۲۵۰ میلی‌گرم از ۵-۵ فلوئوراسیل به محلول اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. پوسته هسته به دست آمده سانتریفیوژ شد و سپس سه بار با آب دیونیزه شسته شد. در نهایت، نانوکامپوزیت هسته-پوسته تهیه شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه پخش شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جفت شدن پپتید به نانوکامپوزیت پلیمری: نانوکامپوزیت سنتز شده از طریق یک نسخه بهبودیافته از روش دو مرحله‌ای توصیف شده توسط جیانگ و همکاران (۱۱) به پپتید تهیه شده جفت شد. ابتدا ۲.۵ میلی‌لیتر از ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر N-hydroxy succinimide (NHS) به ۵ میلی‌لیتر از پلیمر اضافه شد. نانوکامپوزیت و سریع هم زده شد. سپس، ۱/۲ میلی‌لیتر محلول آبی-N اتیل -N'-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) (10 mg/mL) به سرعت اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد در حالی که pHآن در pH نگه داشته شد. سپس، برای حذف NHS اضافی، EDAC، و اوره محصول جانبی، سوسپانسیون در آب دیونیزه به مدت ۸ ساعت دیالیز شد. در مرحله بعد، ۱ میلی‌لیتر از محلول پپتیدی با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۱۴ میلی‌لیتر نانوکامپوزیت پلیمری استری اضافه شد و یک شبه هم زده شد. سپس برای حذف پپتید غیرمتصل، محلول در آب دیونیزه به مدت ۷۲ ساعت دیالیز شد. تمام مراحل این روش اصلاح شده در دمای اتاق انجام شد. فرآیند شماتیک تهیه کامپوزیت نانو پلیمری در شکل ۱ نشان داده شده است.

خصوصیات نانوکامپوزیت: ویژگی‌های سطحی و اندازه‌های هسته-پوسته عامل‌دار سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) تجزیه و تحلیل شد. مدل VEGA، TESCAN، برنو، جمهوری چک. طیف‌های مادون قرمز (FT-IR) با استفاده از یک طیف‌سنجی FT-IR (6700 Thermo Nicolet) (FTIR) برای ارزیابی ترکیب شیمیایی لانتانیوم واندات فعال‌شده با پپتید سنتز شده P-DOPA در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} استفاده شد.

بررسی سینتیک آزادسازی دارو در شرایط آزمایشگاهی: اسپکتروفتومتر UV-Vis Varian-Cary 100، استرالیا (برای ارزیابی الگوی آزادسازی ۵-فلوئوراسیل از P-DOPA پوشش داده شده با لانتانیوم واندات عاملدار پپتیدی استفاده شد. در ابتدا، ۵-فلوئوراسیل بر روی P-DOPA پوشش داده شده با لانتانیوم واندات عامل‌دار شده با پپتید بارگذاری شد، در مرحله بعدی انتشار ۵ فلوئوراسیل در سالین بافر

فسفات (PBS) در pH = ۷/٤ و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بررسی شد. جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و سپس در فواصل زمانی معین اندازه‌گیری شد.

رده سلولی: رده‌های سلولی سرطان پستان انسان SK-BR3 و رده سلول نرمال پستان MCF-10A از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو یا FBS همراه با آنتی‌بیوتیک‌های پنسیلین/ استرپتومایسین در فلاسک‌های ۲۵ در شرایط ۵ درصد CO2، ۹۰ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند و هنگامی که ۸۰ درصد کف پلیت را پوشاندند تریپسینه شدند و بعد از شمارش و جمع آوری با پروتوکل فریز با دی متیل سولفوکساید (DMSO) در ۸۰- نگهداری شدند تا در موارد نیاز دفریز گردند و مجدداً کشت داده شوند.

ارزیابی فعالیت همولایتیک نانوکامپوزیت و پپتید NL2: به منظور ارزیابی فعالیت همولایتیک نانوکامپوزیت متشکل از L-DOPA با هسته لانتادیوم وانادات از تست همولیز گلبول‌های انسانی استفاده شد. به این منظور ابتدا سوسپانسیون ۲۰ درصد گلبول قرمز انسانی در PBS تهیه شد و سپس اجزای مورد تست یعنی NPs و NL2ها از غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۵ غلظت در ۱۰۰ میکرولیتر PBS رقیق‌سازی شدند و در ادامه به تمامی رقت‌های NPs و NL2 میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون خون ۲۰ درصد اضافه گردید و پلیت ۹٦ خانه در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. به عنوان کنترل مثبت برای ۱۰۰ درصد لیز گلبول قرمز از تریتون-X100 ۱۰ درصد و به عنوان کنترل منفی از PBS استفاده شد و به چاهک‌های جداگانه حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون RBC اضافه شدند. تمامی تست‌ها ۳ بار تکرار شدند. سپس پلیت با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) سانتریفیوژ شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از روشناور هر چاهک به پلیت جدید به منظور قرائت با الایزا ریدر اضافه شد. در انتها جذب هر یک در طول موج ٤۰۵ تا ٤۱۵ نانومتر توسط الیزاریدر قرائت شد.

تست MTT به منظور سنجش سمیت ناکامپوزیت و پپتید NL2: در این مطالعه برای بررسی سمیت سلولی NPs و پپتید NL2 ابتدا ۱×۱۰^{٤} سلول (شمارش با سل کانتر یا با لام سایتومتر) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت درون هر چاهک پلیت کشت سلولی ۹٦ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت روی سلول‌ها تا حد امکان خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های آماده شده از هر ماده به هر چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها برای مدت ۲٤ ساعت دیگر در مجاورت ماده با غلظت‌های مشخص قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتردر هر چاهک ریخته شد و به مدت ٤ ساعت درانکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ٤ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و DMSO به منظور توقف واکنش اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوبMTT ، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در DMSO با استفاده از دستگاه الایزاریدر (STAT FAX 2100, USA) در طول موج ۵۷۵ نانومتر محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از رابطه زیر چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه نمود.

$$\text{Toxicity\%} = (1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}) \times 100$$

$$\text{Viability\%} = 100 - \text{Toxicity\%}$$

تست MTT بعد از شستشو به منظور بررسی اختصاصیت نانوکامپوزیت حاوی ۵- فلورویوراسیل عملکردی شده با پپتید NL2: به منظور بررسی اختصاصیت پپتید NL2 به مارکر Her2 از تست MTT بعد از شستشو استفاده شد. اصول انجام این تست همانند تست MTT معمولی است که در بالا ذکر شد با این تفاوت که در این تست بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت‌های حاوی دارو و پوشیده شده با پپتید NL2 (NPs-NL2) سلول‌های با PBS شسته شده و سپس به آن محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه می‌گردد و به مدت ٢٤ ساعت سلول‌ها با همان شرایط ذکر شده در CO2 انکوباتور گرمادهی می‌شوند. بنابراین اگر پپتید NL2 به گیرنده های Her2 سطح سلول های SK-BR3 تمایل داشته باشند NPs-NL2بعد از شستشو به سلول‌ها متصل مانده و ۵- فلورویوراسیل خود را به سلول‌های هدف انتقال داده و سلول‌ها می‌میرند. اما سلول‌های MCF-10A فاقد این مارکر Her2 بوده و NPs-NL2 بعد از شستشو از آن کنده شده و نمی‌توانند اثر کشندگی ۵- فلورویوراسیل را به سلول‌های هدف انتقال دهند. این تفاوت نشان دهنده انتخابیت و اتصال پپتید NL2به Her2 می‌باشد.

تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS نسخه ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) از طریق ANOVA یک طرفه و Tukey's HSD به عنوان آزمون تعقیبی انجام شد. مقادیر $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری میزان بقا بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از رویکرد کاپلان مایر انجام شد و یک آزمون رتبه‌بندی برای تعیین تفاوت‌ها در توزیع بقا برای انواع مختلف آزمایش انجام شد.

نتایج

خصوصیات پپتید عامل دار لانتانیوم واندات پوشش داده شدهP-DOPA: تصویر SEM از پوسته هسته عامل‌دار سنتز شده در شکل ۱ نشان داده شده است. این تصاویر تایید کردند که نانو داروی سنتز شده کروی شکل و کاملا یکنواخت است و تجمع مهمی وجود ندارد. اندازه لانتانیوم واندات فعال شده با پپتید P-DOPA به طور میانگین ۷۰ نانومتر بود.

FTIR Spectra: در طیف FTIR سنتز شده هسته- پوسته عامل دار، یک قله قوی در ۱۱۰۳ و ۸۰۷ سانتیمتر -۱ به ارتعاشات کششی Si-O-Si و حالت خمشی (در ٤٧١ سانتی متر-۱) به عنوان یک باند ضعیف ۲۱ مرتبط بود. جذب در ٣٤١٦ سانتی‌متر-۱ با گروه OH- و NH- مطابقت دارد. قله‌های ضعیف در ١٦٣٢ سانتی متر-۱ مربوط به حلقه‌های آروماتیک در پلیمر P-DOPA بود. طیف FTIR نانوکامپوزیت عامل-دار در شکل ۲ نشان داده شده است.

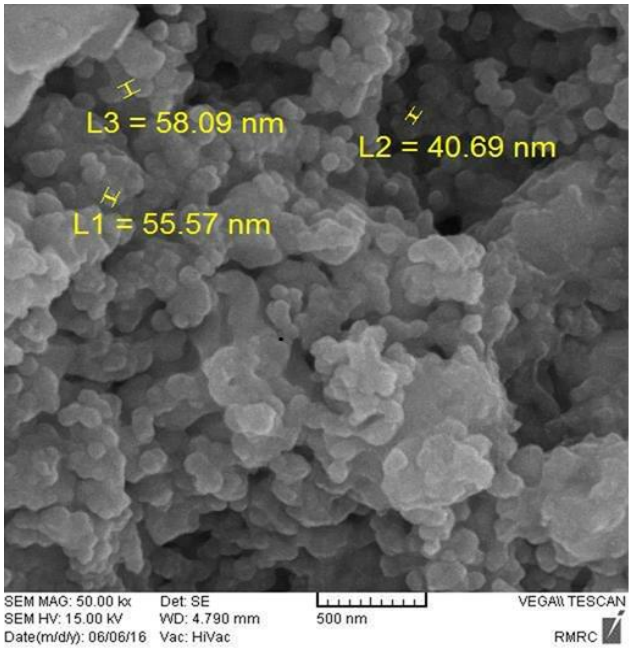
بررسی سینتیک آزادسازی دارو در شرایط آزمایشگاهی: آزادسازی ۵-فلوئوراسیل از P-DOPA پوشش داده شده با لانتانیوم واندات عاملدار پپتیدی ملایم و ثابت است، جذب اندازه‌گیری شده پس از ۲۲ ساعت ثابت می‌ماند و دفع و جذب ۵-فلوئوراسیل دارای سرعت مساوی است. تحویل مداوم ۵-فلوئوراسیل به تومور را می‌توان با انتشار آهسته و مداوم دارو به دست آورد. الگوی انتشار ۵-فلوئوراسیل در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتایج تست همولیز گلبول‌های قرمز: نتایج تست همولیز گلبول‌های قرمز انسانی نشان داد که اجزای نانوکامپوزیت متشکل از لانتادیوم وانادات و L-DOPA در غلظت ۱۰۰۰ زیر ۵ درصد فعالیت

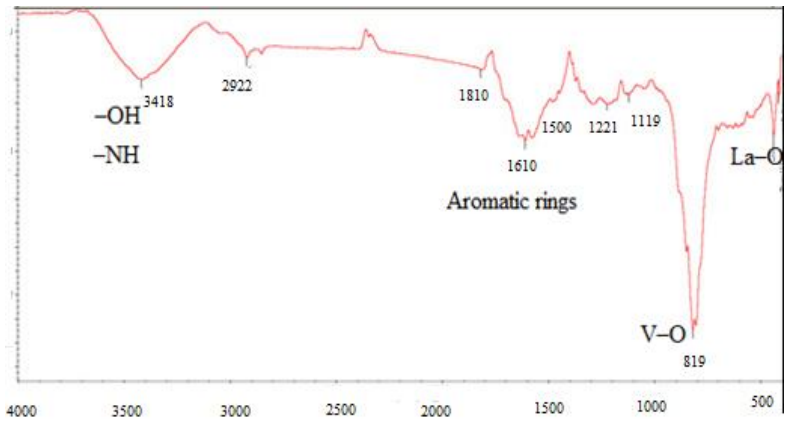
همولایتک دارند درصورتی که پپتید NL2 در همین غلظت دارای ۹/۵۵ درصد فعالیت همولایتک دارد. مطالعات اندازه‌گیری HD_{50} نشان داد که میزان این پارامتر برای هر دو NPsو پپتید NL2 بزرگتر از ۱۰۰۰ است. HD_{50} غلظتی از ماده است که در آن ۵۰ درصد گلبول‌های قرمز لیز می گردند. نتایج نشان دهنده این موضوع است که هم NPsو هم پپتید NL2آثار سمی بر گلبول‌های قرمز انسانی ندارند. شکل ٤ نشان دهنده نمودار درصد همولیز/ غلظت است.

سمیت سلولی نانوکامپوزیت و پپتید NL2 بر سلول های SK-BR3 و MCF-10A: نتایج تست MTT نشان داد که حد اکثر سمیت NPs بر سلول‌های SK-BR3 و MCF-10A در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۳/٦۷ و ٥/٤٤ درصد است. همین نتایج برای پپتید NL2 در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر این سلول‌ها به تریتب ۳/۲۷ و ۳/۵۵ درصد است که نشان دهند غیر سمی بودن پپتید NL2می باشد. سمیت ۵- فلورویوراسیل بر هر دو سلول SK-BR3 و MCF-10A در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۸۹ و ۹۷ درصد است. محاسبه میزان IC_{50} نشان داد که IC_{50} ۵- فلورویوراسیل برای این دو سلول به ترتیب ۱/۵ و ۲/۳۵ درصد است. IC_{50} غلظت از یک ماده است که در آن رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها مهار می‌گردد. شکل ۵ نشان دهنده نمودار درصد سمیت/ غلظت است.

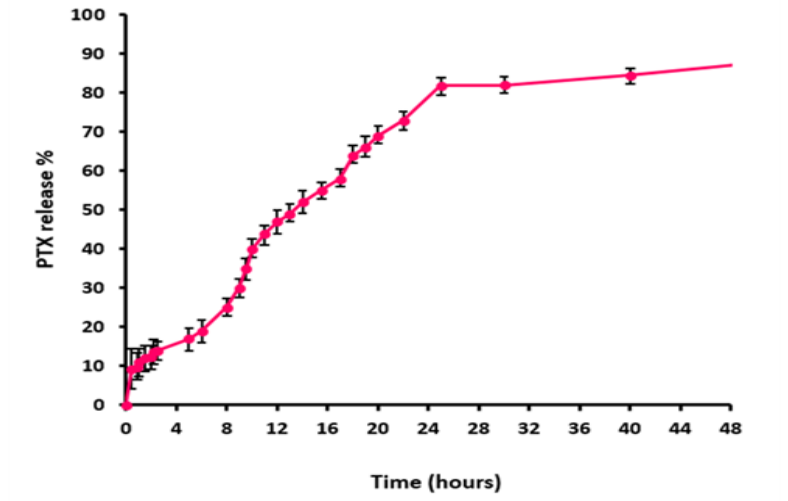
انتخابیت پپتید NL2 به سلول‌های دارای مارکر Her2: نتایج تست MTT بعد از شستشو نشان داد که NPs-NL2 بعد از شستشو به سلول‌های SK-BR3 متصل مانده و بعد از ٢٤ ساعت تیمار ۵- فلورویوراسیل در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر NPs-NL2 توانسته است ٥٦ درصد از سلول‌های SK-BR3را از بین ببرد ولی در همین غلظت NPs-NL2 تنها ٤/٥٧ درصد از سلول‌های MCF-10A که فاقد مارکر Her2 می‌باشند از بین رفته‌اند که میتواند در اثر رهش میزان کمی از ۵- فلورویوراسیل قبل از شستشو باشد (شکل ٦). مقایسه آثار سمی NPs-NL2 در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های MCF-10SA و SK-BR3 اختلاف معناداری (p < ۰/۰۰۰۰۱) را نشان داد.



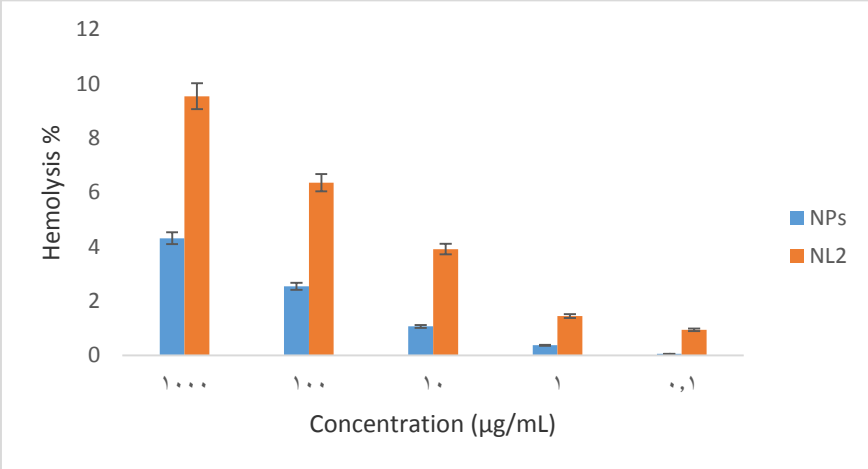
شکل ۱- تصاویر SEM لانتانیوم واندات پوشش داده شده با P-DOPA عامل‌دار



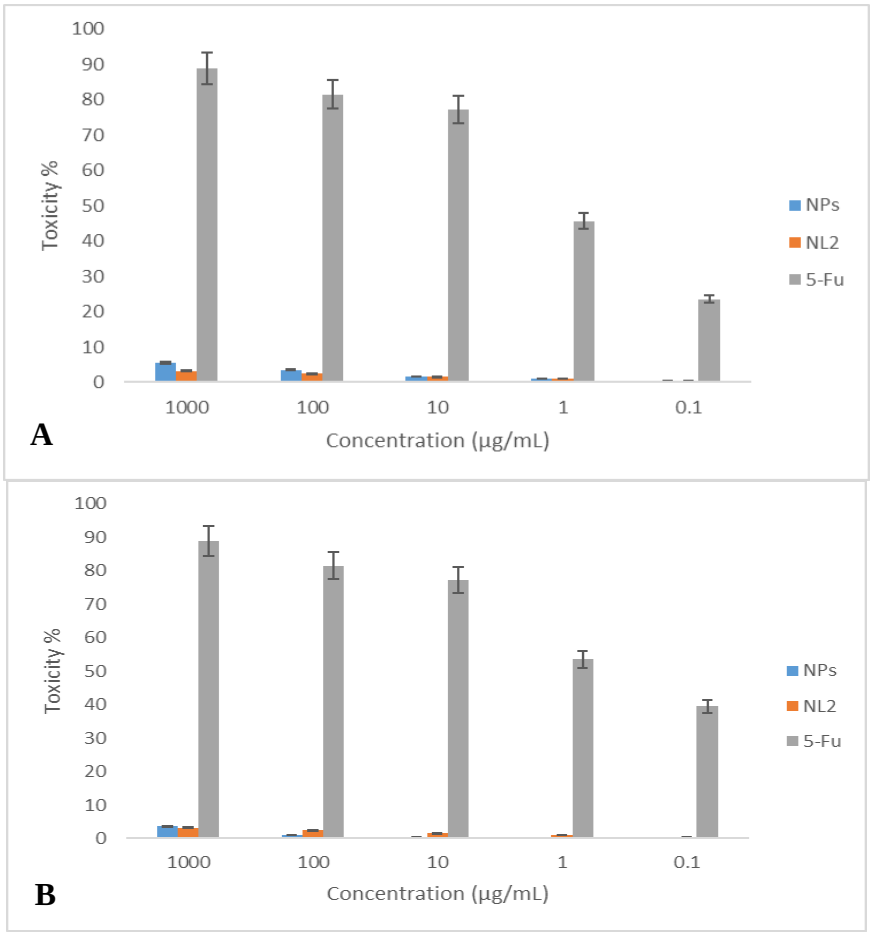
شکل ۲- طیف FTIR نانوکامپوزیت سنتز شده



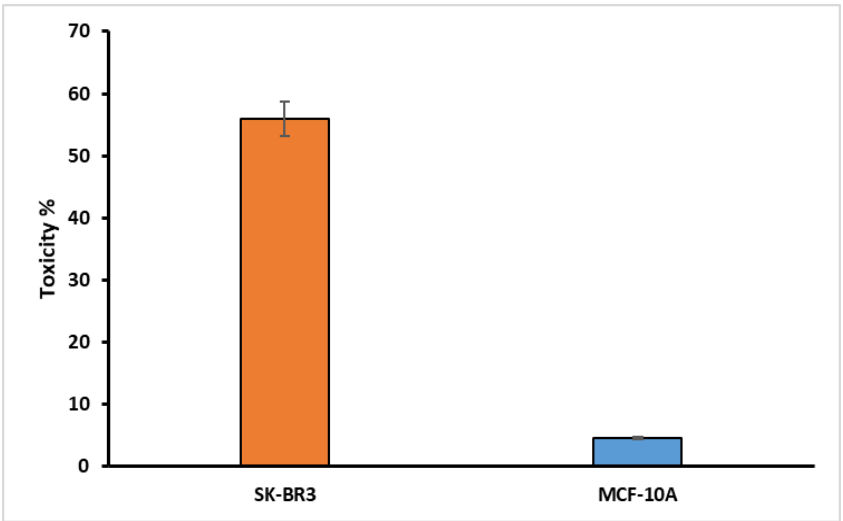
شکل ۳- الگوی رهش ۵-فلوئوراسیل از نانوکامپوزیت‌های عملکردی شده با پپتید



شکل ٤- نمودار درصد همولیز/ غلظت NPs و پپتید NL2



شکل ۵- نمودارهای سمیت/ غلظت برای (A) رده سلولی SKBR3 و (B) MCF-10A نشان دهنده این است که نانوکامپوزیت (NP)و پپتید NL2 هیچ سمیتی بر دو رده سلولی ندارد اما ۵- فلوریوراسیل هر دو رده سلولی را با درصد سمیت بالایی کشته است (IC50 در حدود ۱/۵ تا ۲/۵).



شکل ٦- تست MTT بعد از شستشو نشان دهنده انتخابیت پپتید NL2 برای سلول‌های SK-BR3 با مارکر HER2 می‌باشد و توانسته است بعد از ٢٤ ساعت ٥٦ درصد از این سلول‌ها را از بین ببرد. درحالی که نانوکامپوزیت‌های دارای NL2 (NPs-NL2) به دلیل فقدان بیان HER2 روی سلول های MCF-10A در اثر شستشو حذف شده و کمتر از ۵ درصد از این سلول‌ها در اثر آزادسازی ۵- فلورویوراسیل قبل از شستشو کشته شده‌اند.

بحث

در مطالعه حاضر، اندازه تومور برای ارزیابی قدرت درمان ۵-فلوئوراسیل در شرایط مختلف فرمولاسیون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. PDOPAs با پوشش لانتانیوم واندانی عامل‌دار با پپتید یک داروی اصلاح شده جدید است که می‌تواند به عنوان حاملی برای دارورسانی انتخابی به تومورها استفاده شود. تهیه یک داروی خاص منطقه جذابی در تحقیقات دارویی است. PDOPA به عنوان یک پوشش قطبی و زیست-سازگار دارای چندین مزیت از جمله حلالیت خوب، رهش پایدار، پلیمریزاسیون آسان در شرایط محیطی و پلیمریزاسیون مستقیم است.

مورفولوژی و ساختارهای شیمیایی نانو داروی نانوپوسته هسته عامل‌دار سنتز شده به ترتیب توسط طیف‌سنجی SEM و FTIR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج SEM به‌دست‌آمده تأیید می‌کند که نانو داروی سنتز شده از نظر شکل بسیار یکنواخت است و تجمعی وجود ندارد. یکنواختی در سایز نانوذرات یکی از مهمترین پارامترها می‌باشد زیرا هتروژنی در سایز ذرات و شکل آنها سبب می‌شود میزان بارگیری دارو و آزادسازی آن یکسان نباشد. اندازه نانو داروی عامل‌دار شده تقریباً ۷۰ نانومتر است، توانایی تهیه نانوکامپوزیت بسیار کوچک به دلیل پلیمریزاسیون مستقیم لوودوپا بر روی سطح نانوذرات لانتانیوم واندات محدود است. طیف FTIR ساختار شیمیایی P-DOPA سنتز شده و حضور نانوذرات لانتانیوم واندات در هسته نانو کامپوزیت را تایید می‌کند. علاوه بر این، سینتیک انتشار دارو نشان داد که ۵-فلوئوراسیل به مدت ۲۴ ساعت به طور یکنواخت آزاد می‌شود. سنجش سمیت سلولی با روش MTT نشان‌دهنده زیست‌سازگار بودن نانوکامپوزیت ما است. عدم سمیت نانوکامپوزیست‌ها از شرایط اساسی آنها به منظور استفاده آنها در تحویل داروی هدفمند است. تست همولیز گلبول‌های قرمز نیز تائید می‌کند که اجزای نانوکامپوزیت‌ها فاقد فعالیت همولایتیک بوده بنابراین فرمت تزریقی آنها نیز قابل استفاده می‌باشد. البته علاوه بر زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری نیز یکی دیگر از این شروط است. تراکم و اندازه خلل و فرج موجود در نانوکامپوزیت اثر مستقیمی بر میزان ظرفیت بارگیری و رهش دارو از این نانوذرات دارد. مطالعات قبلی ما انتخابیت پپتید NL2 برای سلول‌های دارای مارکر HER2 را ثابت کرده است (۸، ۱۲). در این مطالعه نیز در تست MTT بعد از شستشو مشخص شد که NPs-NL2 حتی بعد از شستشو نیز از محیط سلول‌های دارای HER2 یعنی SK-BR3 جدا نشده و داروی ۵- فلورویوراسیل را در معرض این سلول‌ها قرار می‌دهند. اما همین نانوکامپوزیت‌های دارای NL2 نمی‌تواند بعد از شستشو در محیط سلول-های MCF-10A فاقد HER2 باقی بماند بنابراین این سلول‌ها زنده می مانند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از نانوکامپوزیت ۵-فلوئوراسیل سنتز شده با پپتید NL2 می‌تواند کاندید خوبی برای تحویل هدفمند دارو به سلول‌های سرطان پستان دارای مارکر HER2 باشد. زیرا علاوه بر عدم سمیت نانوکامپوزیت سنتز شده، پپتید NL2 نیز سبب تحویل هدفمند داروی ۵- فلورویوراسیل به سلول-های سرطان پستان دارای مارکر HER2 می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از انستیتو پاستور ایران برای تهیه رده سلولی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین نویسندگان مقاله هیچ تضاد منافعی ندارند. تأیید اخلاقی همه آزمایش‌ها بر اساس اصول راهنمای بین‌المللی برای

تحقیقات زیست‌پزشکی شامل حیوانات انجام شده و توسط کمیسیون اخلاق زیستی سازمانی تأیید گردید.

منابع

1. Adams G.P., Weiner L.M. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Natural Biotechnology*, 23(9):1147.

2. Aina O.H., Sroka T.C., Chen M.L., Lam K.S. 2002. Therapeutic cancer targeting peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(3):184-199.

3. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E., 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 279(5349):377-380.

4. Brahmbhatt H., MacDiarmid J. 2018. Targeted delivery of drugs, therapeutic nucleic acids and functional nucleic acids to mammalian cells via intact killed bacterial cells. (Google Patents, 2018).

5. Chilkoti A., Chen G., Stayton P.S., Hoffman A.S. 1994. Site-specific conjugation of a temperature-sensitive polymer to a genetically engineered protein. *Bioconjugate Chemistry*, 5(6):504-507.

6. Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney D.W., Leahy D.J. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924):756.

7. Das P., Jana N.R. 2015. Dopamine functionalized polymeric nanoparticle for targeted drug delivery. *RSC Advances*, 5(42):33586-33594.

8. Hashemi-Moghaddam H., Zavareh S., Mirsaeed Gazi E., Jamili M. 2018. Assessment of novel core–shell Fe_3O_4@ poly l DOPA nanoparticles for targeted Taxol® delivery to breast tumor in a mouse model. *Materials Science and Engineering*, C93:1036-1043.

9. Horning S.J., Younes A., Jain V., Kroll S., Lucas J., Podoloff D., Goris M. 2005. Efficacy and safety of tositumomab and iodine-131 tositumomab (Bexxar) in B-cell lymphoma, progressive after rituximab. *Journal of Clinical Oncology*, 23(4);712-719.

10. Http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope.

11. Jiang K., Schadler L.S., Siegel R.W., Zhang X., Zhang H., Terrones M. 2004. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *Journal of Materials Chemistry*, 14(1):37-39.

12. Zavareh S., Mahdi M., Erfanian S., Hashemi-Moghaddam H. 2016. Synthesis of polydopamine as a new and biocompatible coating of magnetic nanoparticles for delivery of doxorubicin in mouse breast adenocarcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(5):1073-1084.

Immobilized Peptide on the Surface of Core-shell LaVO4: Eu3@ poly (levodopa) for Targeted Delivery of 5-Fluorouracil to Breast Tumor

Maryam Nazemian[1], Vida Hojati[1], Hamid Madanchi[2,3*], Hamid Hashemi-Moghaddam[4*], Saeed Zavareh[5], Behrouz Johari[6]

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Iran
3- Drug Design and Bioinformatics Unit, Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Department of Chemistry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
5- Department of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
6- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Abstract

Chemotherapy using drug delivery systems can target tumor cells selectively and do not affect normal cells. In this study, a specific drug delivery system was designed with immobilized NL2 peptide on the surface of polymeric nano drug for breast tumor treatment. The tertiary structure of NL2 peptide (AEGEFIHNRYNRFFYWYGDPAK) was selected from the database and synthesized. After that, it was coupled to the synthesized poly-3,4-dihydroxy-1-phenylalanine (DOPA)/SiO_2 nanocomposite and tested for targeted delivery of 5-fluorouracil (5-FU) to SK-BR3 breast cancer cell line and MCF-10A normal breast cell line. The results of MTT and hemolysis of red blood cells showed that the components of the nanocomposite and NL2 peptide do not have any cytotoxicity, while the results of the MTT test after washing showed that the nanocomposites functionalized with NL2 peptide had specificity for cells with Her2 marker, i.e. SK-BR3 cells, but after washing, they were separated from MCF-10A cells, which lack this marker, and the drug 5- Fluorouracil cannot exert its toxic effects on these cells.

Keywords: 5-Fluorouracil, Poly 3,4-dihydroxy-l-phenylalanine, Anti-cancer peptide, Breast Cancer.