

مقاله پژوهشی

بررسی اتصال نانوذرات طلائی بیولوژیک به داروی تاکسول و اثر ضدسرطانی آن بر روی سرطان پستان رده سلولی MCF7

سمانه مرادی، پرستو پورعلی، صاحبعلی منافی و بهروز یحیایی*

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

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷

چکیده

در مطالعه حاضر به بررسی امکان اتصال نانوذرات تولید شده توسط قارچ *Fusarium oxysporum* به داروی سرطانی تاکسول و بررسی سمیت اعمال شده آن‌ها در کشت سلولی رده سرطان سینه پرداخته شد. سوپرناتانت حاصل تنظیم pH و در معرض غلظت نهایی غلظت ۱ میلی مولار از نمک طلا قرار داده شد. نانوذرات طلا تولید و توسط روش‌های اسپکتروفتومتری نور مرئی و اسپکتروفتومتر مادون قرمز (FTIR)، پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تایید شد. بعد از اتصال نانوذرات طلا تولید شده به داروی تاکسول توسط تکنیک‌های اسپکتروفتومتری نور مرئی و FTIR این اتصال تایید شد و نهایتاً با انجام آزمون سمیت سلولی بر روی رده سلولی سرطانی پستان MCF7 تاثیر محلول مورد آزمون بررسی شد. نهایتاً با انجام تست ICP-OES میزان نانوذرات وارد شده به درون سلول‌های محیط کشت بررسی شد. نانوذرات طلا تولیدی کروی و شش‌وجهی با سایز متوسط ۲۵ nm بودند که دارای طبیعت کریستالین بودند. تاکسول، به عنوان داروی ضدسرطان، به نانوذرات تولیدی متصل شد. مطالعات ICP-OES نشان داد که نانوذرات طلا به درون سلول‌های کشت رده MCF7 وارد شده است. مطالعات زنده ماندن سلول‌ها نشان داد که داروی کنژوگه و تاکسول دارای اثرات کشندگی مناسب بر روی سلول‌ها بوده‌اند که این اثرات برای داروی کنژوگه بهتر بود و با اتصال داروی تاکسول به نانوذرات طلا سمیت سلولی بیشتری اعمال شد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، تاکسول، *Fusarium oxysporum*، رده سلولی MCF7.

۱- مقدمه

نانوذرات گفته می‌شود. خواص ذرات وابسته به اندازه آن‌ها دارد که هر چه اندازه کمتر شود نسبت سطح به حجم افزایش می‌یابد [۱]. نانوذرات فلزی می‌توانند در کاربردهای میکروبی کشی استفاده شوند. مثلاً نانوذرات پایدار نقره می‌توانند در پوشش‌های پلیمری فاز آبی ضد میکروبی بکار گرفته شوند، همچنین می‌توان از این نانوذرات در ترکیب

نانو تکنولوژی دستکاری دقیق و کنترل شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانو به منظور تهیه ریز ذرات با خصوصیت نوظهور و کاربردهای خاص می‌باشد. به ذرات جامد کلوئیدی که اندازه‌ای در محدوده ۱-۱۰۰ nm دارند

* عهده‌دار مکاتبات: بهروز یحیایی

نشانی: شاهرود، دانشکده علوم پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۰۰۷۷، دورنگار: ۰۲۳-۳۲۳۰۰۷۷، پست الکترونیکی: behroozyahyaei@yahoo.com

می‌یابد. ۳۰-۲۰٪ از زنانی که به سرطان پستان مبتلا می‌شوند، سابقه خانوادگی این بیماری را دارند. هر گونه سابقه خانوادگی سرطان پستان، خطر نسبی کلی را افزایش می‌دهد [۱۳]. در سرطان پستان رشد سلول‌های پوششی مجرا در پستان، بوسیله تحریک کننده‌های رشد و سیگنال‌های مختلف و همچنین مسیرهای افزایشی/مهارى مرگ سلول‌ها، کنترل می‌شود. سرطان پستان ممکن است وقتی بوجود آید که مکانیسم‌های هموستازی اختلال یابند. در حقیقت سرطان پستان یک رشد کنترل نیافته سلول‌های اپی‌تلیال با منشأی در مجرا و لوبول‌های پستان است [۱۴، ۱۵]. بر اساس افزایش آمار و روند ابتلای افراد به سرطان مذکور باید روندهای درمانی و استفاده از روش‌های مشخص و کارآمد، نیز گسترش یابد تا در خصوص کاهش مشکلات حاصل از ابتلا و نیز افزایش دارورسانی هدفمند و کاهش هزینه‌ها، بتوان گام‌های موثرتری را برداشت و مسئله مهم و دغدغه موجود در افراد را کمی ساده‌تر نمود. یکی از داروهای مصرفی در درمان سرطان پستان، تاکسول می‌باشد. تاکسول یک استر آلکالوئیدی است که از صنوبر غربی و صنوبر اروپایی استخراج می‌شود. این دارو به عنوان یک سم دوک میتوز با اتصال قدرتمند به میکروتوبول‌ها از طریق تشدید پلیمریزاسیون توبولین اثر می‌نماید. پیش‌برد چیده شدن میکروتوبول‌ها توسط تاکسول در غیاب پروتئین‌های وابسته به میکروتوبول و گوانوزین تری فسفات صورت می‌گیرد و موجب مهار میتوز و تقسیم سلولی می‌گردد [۱۶، ۱۷]. بر اساس نکات مذکور و مطالعات موجود، در مطالعه حاضر تصمیم به بررسی امکان اتصال طلای تولید شده توسط قارچ *F. oxysporum* به داروی تاکسول و گزارش میزان سمیت آن نسبت به داروی خالص بر روی کشت رده سلولی MCF7 مورد آزمون گرفته شد، تا از این طریق بتوان گامی در جهت درمان بیماری سرطان پستان متاستاتیک با استفاده از نانوذرات بیولوژیک برداشت و این زمینه گشایش و نوآوری در خصوص درمان سلول‌های سرطانی می‌تواند باشد.

سرامیک‌های ضدباکتری لوازم حمام و پانسمان‌های زخم استفاده کرد [۲]. از پرکاربردترین نانوذرات می‌توان به نانوذرات طلا اشاره نمود. نانوذرات طلا توانایی بالایی در جذب و پراکندگی نور و همچنین سازگاری بالا با بدن موجودات زنده دارد [۳، ۴]. نانوفناوری سرطان یک زمینه میان رشته‌ای نوپا است که بر مهندسی، طراحی و کاربرد مواد ساخت بشری برای تشخیص و درمان سرطان متمرکز است [۵]. نانومواد را می‌توان به گونه‌ای مهندسی کرد که به عنوان عوامل ضدسرطان، حامل دارو یا دارای ویژگی‌های چندمنظوره باشند تا بطور همزمان به عنوان عوامل ضدسرطان و کنترل کننده تصویر عمل کنند [۵-۷]. تولید نانوذرات به سه روش شیمیایی و فیزیکی و زیستی صورت می‌گیرد. روش‌های شیمیایی و فیزیکی دارای معایبی نظیر آلودگی بالا و هزینه‌های زیاد و همچنین غیریکخواختی در اندازه ذرات و ناپایداری نانوذرات را به دنبال دارد. از این رو استفاده و تولید نانوذرات به صورت زیستی و به کمک قارچ‌ها و باکتری‌ها رواج یافته و از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از قارچ‌های پرکاربرد در تولید نانوذرات بیولوژیک، *F. oxysporum* می‌باشد که تولید نانوذرات به کمک آن بسیار اقتصادی و مقرون به صرفه است. این قارچ یکی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی بوده که در خاک یافت می‌شود [۸-۱۰]. اخیراً ثابت شده است که قارچ *F. oxysporum* توانایی دارد تا نانوذرات فلزی را از طریق ترشح پروتئین‌های خاص به داخل محیط کشت خود تولید کند [۱۱]. سرطان پستان تقریباً یک سوم تمام سرطان‌ها را در زنان تشکیل می‌دهد و بعد از سرطان ریه، دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان است اما میزان بروز سرطان پستان از همه سرطان‌ها بیشتر است [۱۲]. کمتر از یک درصد سرطان‌های پستان در زنان جوان‌تر از ۲۵ سال رخ می‌دهد، اما بعد از ۳۰ سالگی یک افزایش ناگهانی در بروز سرطان پستان بوجود می‌آید و به جز وضعیت ثابت کوتاهی که بین ۴۵-۵۰ سالگی رخ می‌دهد، بروز آن بطور یکنواخت، با افزایش سن افزایش

۲- فعاليت‌هاي تجربي

سويه قارچ *F. oxysporum* (UTMC 5026) در محيط كشت ساپوراد دكستروزبراث به مدت يك هفته در دماي اتاق كشت و قرار داده شد.

محيط كشت حاوي قارچ به داخل لوله فالكون انتقال داده شد و با سانترفيوژ دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقيقه سانترفيوژ شد. سوپرناتانت حاصل از سانترفيوژ در ارلن‌هاي استريل ريخته و جهت توليد نانوذرات طلا، pH بر روي ۸/۵ تنظيم شد. سپس سوپرناتانت در معرض غلظت يك ميلي مولار از نمك طلا قرار گرفت. نمونه به مدت ۲۴ ساعت درون شيكر انكوباتور با دور ۲۰۰۰ rpm و در دماي ۳۰ °C قرار داده شد. از محيط كشت استريل حاوي غلظت ۱ ميلي مولار از نمك طلا به عنوان شاهد استفاده شد [۱۸].

در اين مرحله جذب نوري نانوذرات توليد شده در مقابل محلول اوليه سنجيده شد. از سوپرناتانت خالص به عنوان بلانك استفاده شد. بالاترين ميزان جذب جهت توليد نانوذرات طلا در ۵۵۰-۵۰۰ nm مورد انتظار بود. باقي ماندن ميزان جذب نور در طول موج مذکور با گذشت زمان، نشان دهنده پخش بودن نانوذرات در محيط و پايداري آن‌ها و عدم تجمع آنها در محلول است [۹، ۱۹].

جهت اثبات توليد نانوذرات فلزي، تركيب شيميايي نانوذرات توليدي بوسيله دستگاه XRD چك شد. براي اين منظور نمونه‌هاي در فاز مايع ابتدا توسط دستگاه فرينز درايبر به صورت پودر خشك در آمده و مورد آناليز قرار گرفتند [۱۸]. جهت تايد توليد نانوذرات طلا و اندازه‌گيري سايز ذرات توليدي، نمونه‌هاي بدست آمده توسط TEM مورد بررسي قرار گرفت. ابتدا نمونه بر روي گريدهاي مسي مخصوص قرار داده شد و سپس توسط ميكروسكوپ در ولتاژ ۱۲۰ kV عكس‌برداری شد [۱۸]. جهت پاكسازي نانوذرات، نمونه با آب مقطر به مدت ۶ دقيقه و دور rpm ۵۰۰۰ سانترفيوژ و سه مرتبه شستشو داده شد [۱۸].

داروي تاكسول با غلظت ۰/۱ mg/ml مورد استفاده قرار گرفت و با آب مقطر رقيق‌سازي شد [۲۰]. به منظور

اتصال دارو به نانوذرات ۳ cc از داروي تاكسول، با cc ۶۰ از محلول نانوذرات تركيب شد. محلول حاصل به مدت ۷۲ ساعت بر روي استيرر قرار داده شد [۱۹]. در صورت اتصال دارو با نانوذرات اختلافي در ميزان جذب يا پيك مربوط به نانودارو در مقابل ناي نوي خالص خواهد داشت. جذب نانودارو در مقابل نانوذرات خالص به كمك اسپكتروفوتومتري نور مرئي در طول موج ۴۰۰-۶۰۰ nm سنجيده شد [۱۹]. نمونه نانوذرات خالص، نانودارو و دارو تحت بررسي FTIR قرار گرفتند. اين آزمايش در طول موج ۴۰۰۰-۵۰۰ cm⁻¹ انجام شد [۱۹].

از سلول‌هاي رده سرطاني MCF7 استفاده و آزمون سميت سلولي با روش MTT انجام شد. محيط كشت DMEM حاوي ۱۰٪ سرم جنين گاو دكمپلمانه و ۱٪ محلول پنيسيلين-استرپتومايسين استفاده و آزمون در پليت كشت سلول ۹۸ خانه انجام شد. سلول‌ها ابتدا در كف چاهك‌ها لود شدند و پس از رشد، در تمام چاهك‌ها محيط كشت به ميزان ۱۰۰ µl وارد و به چاهك شماره ۱، ۱۰۰ µl از محلول مورد آزمون وارد شد. محلول‌هاي مورد آزمون شامل نانوذرات خالص، نانودارو و دارو بودند كه در هر ردیف از پليت هر بار يك محلول وارد و شرايط زير اجرا شد: پس از مخلوط نمودن محلول مورد آزمون در محيط كشت، ۱۰۰ µl از آن برداشته و به چاهك دوم افزوده شد.

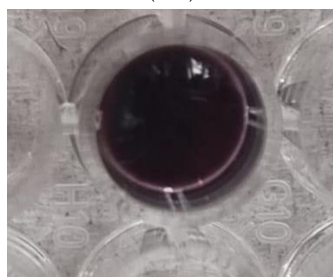
در مرحله بعد ۱۰۰ µl از چاهك دوم پس از به هم خوردن محيط برداشته شد و به چاهك سوم اضافه شد. اين عمل تا چاهك دهم انجام شد و به اين ترتيب ميزان محلول مورد آزمون در هر چاهك به ترتيب به صورت نصف بود. از چاهك ۱۰، ۱۰۰ µl دور ريخته شد. چاهك شماره ۱۱ تنها حاوي سلول بوده و به عنوان شاهد باقي ماند و تنها حاوي ۱۰۰ µl محيط كشت بود. پليت در ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاري گرديد و پس از ۲۴ ساعت سميت سلولي با استفاده از رنگ تترازوليوم تعيين گرديد. رنگ تترازوليوم به ميزان ۲۰ µl با غلظت ۵ mg/ml به تمام چاهك‌ها از جمله شاهد اضافه و در ۳۷ °C به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاري

اسپکتروفتومتری نور مرئی و اسپکتروفتومتری مادون قرمز انجام شد. نهایتاً اثرات ضدسرطانی محلول تولید شده مورد بررسی قرار گرفت.

سوپرناتانت حاوی یون‌های طلا پس از ۲۴ ساعت از انکوباسیون تغییر رنگ به ارغوانی داشت که نشان دهنده تولید نانوذرات طلا به دلیل تغییر در پلاسمون سطحی نانوذرات بود که با گذشت زمان تغییر رنگ واضح‌تر شده و افزایش یافت. شکل ۱ تغییر رنگ مذکور را نشان می‌دهد.



(الف)



(ب)

شکل ۱: (الف) مقایسه رنگ سوپرناتانت و (ب) سوپرناتانت حاوی نانوذرات طلا.

جهت تولید نانوذرات طلا، پس از کشت قارچ، از محیط فاقد سلول، سوپرناتانت کشت، استفاده شد. ابتدا سوپرناتانت توسط سود ۱ نرمال تنظیم pH گردید. بررسی‌ها نشان داده است که بهترین pH برای تولید نانوذرات pH قلیایی است زیرا یون‌های Au^+ دارای بار مثبت بوده و در نتیجه حضور محیط قلیایی میزان یون‌های H^+ را کم کرده و احتمال تبدیل Au^+ به Au^0 را افزایش می‌دهد. موکسینگ و همکارانش در سال ۲۰۰۶ عنوان نمودند که افزودن یون‌های OH⁻ به سلول‌های خشک *Aeromonas sp* سویه SHIO سبب افزایش سرعت تولید نانوذرات از یک روز به چند دقیقه می‌شود. بنابراین حضور محیط قلیایی سبب تسریع واکنش‌ها خواهد

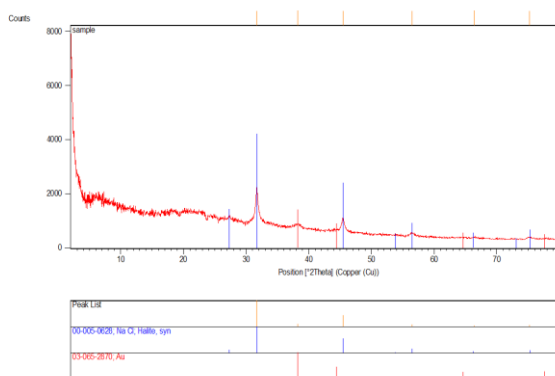
گردید. بعد از ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، ترازولیوم از چاهک‌ها خارج شد و به میزان ۱۰۰ μ l DMSO به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه پلیت در شیکر، کاملاً شیک شد. نهایتاً میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader موجود در نانودراپ در طول موج ۵۴۰ nm ثبت گردید [۱۸،۲۱]، سپس ابتدا بر اساس میزان جذب هر چاهک و مقایسه آن با شاهد، میزان IC_{50} بدست آمد.

جهت بررسی میزان حضور نانوذرات طلا در درون سلول‌ها تست ICP-OES انجام شد. به این منظور، سلول‌ها در کف پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت خارج شد و محیط کشت جدید به سلول‌ها اضافه شد. سپس در یک چاهک از حداقل دوز کشندگی تعیین شده از نانوذرات و در چاهک دیگر از نانودارو اضافه شد. یکی از چاهک‌ها شاهد و فاقد هر ترکیب و تنها دارای محیط کشت بود. سلول‌ها به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور گذاشته شدند و پس از تریپسین و کنده شدن از کف چاهک سلول‌ها با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی شدند. سه مرتبه با PBS شستشو داده شدند تا نانوذرات وارد نشده به درون سلول‌ها حذف شوند. سلول‌ها به درون آب مقطر وارد و به کمک ۳ HCl نرمال لیز شدند و نهایتاً برای انجام تست آماده شدند. از غلظت‌های شناخته شده استاندارد طلا به عنوان شاهد جهت تهیه گراف استاندارد استفاده شد [۲۲].

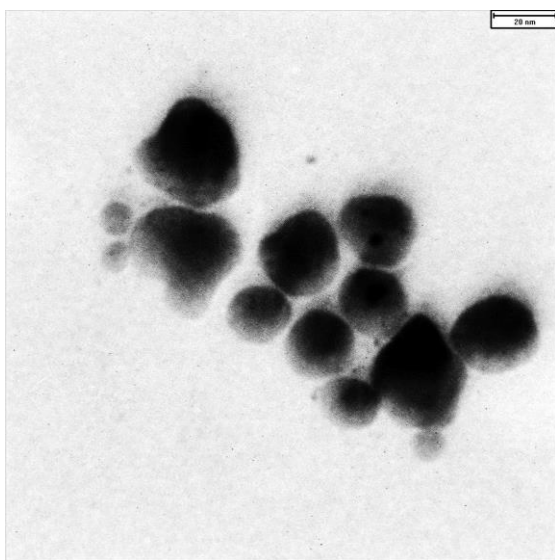
۳- نتایج و بحث

در میان قارچ‌های مختلف *F. oxysporum*، تنها قارچی است که بیشترین توانایی تولید نانوذرات مختلف را دارا می‌باشد. این نانوذرات به صورت خارج سلولی تولید و شامل انواع ذرات طلا، نقره، آلیاژ طلا و نقره، سیلیس، تیتانیوم، زیرکونیوم، آهن، مگنتیت، استرانسیوم، باریوم و ... می‌باشند [۲۳]. با توجه به قابلیت تولید نانوذرات توسط قارچ مذکور، در مطالعه حاضر به بررسی تولید زیستی نانوذرات طلا و تایید آن توسط قارچ *F. oxysporum* پرداخته شد و همچنین اتصال نانوذرات به داروی تاکسول انجام و تایید آن از طریق

نشان داد که نانوذرات به شکل کروی و چندضلعی در ابعاد ۸ تا ۴۳ نانومتر که بطور متوسط ۲۵ nm می باشند، قابل رویت هستند. اغلب نانوذرات دارای اطراف گرد شده بوده و کمتر بخشی از آن‌ها به شکل مضرس یا نوک تیز وجود دارد که خود در روند کنژوگه سازی و افزایش اثر می تواند کارآمد باشد. شکل ۴ نتایج این آزمون را نشان می دهد.



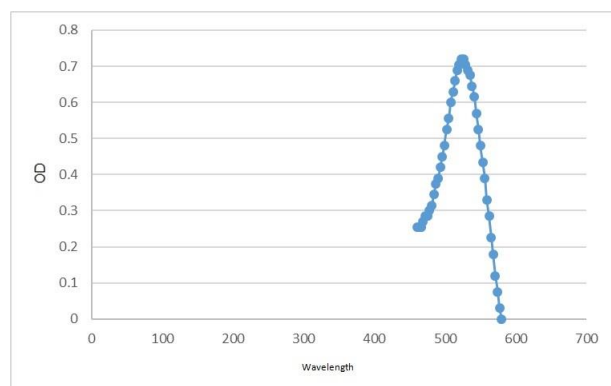
شکل ۳: نتایج آزمون XRD



شکل ۴: میکروسکوپ TEM اشکال کروی و چند ضلعی ۸-۴۳ nm و با متوسط اندازه ۲۵ nm مشاهده شدند.

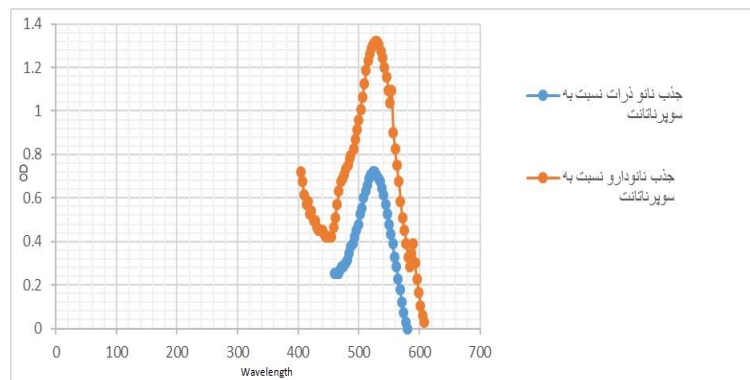
در مرحله بعد، نانوذرات توسط آب مقطر استریل شسته شدند. روش شستشو با آب مقطر ساده ترین و مطمئن ترین روش برای پاکسازی نانوذرات می باشد.

شد. در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه بدست آمد و نشان داده شد که بهترین شرایط تولید نانوذرات در محدوده pH قلیایی رخ داده است [۲۴]. پس از تنظیم pH یون‌های طلا به سوپرناتانت کشت افزوده شد و ارلن مربوطه در شیکر انکوباتور قرار گرفت. گزارشاتی حاکی از تاثیر همزدن محیط کشت در تولید نانوذرات و اندازه آن‌ها وجود دارد. همزدن محیط کشت سبب آزادسازی شاتل‌های الکترونی، پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و آنزیم‌های مختلف از سلول میکروارگانیسم‌ها خواهد شد که نتیجه آن توانایی احیاء بالاتر و تبدیل یون‌های فلزی سمی موجود در محیط به نانوذرات خواهد بود [۲۵]. مشاهدات حاکی از حضور طول موج جذب حدود ۵۲۰ nm بود. این تغییر در میزان جذب نشان‌دهنده تولید نانوذرات بود (شکل ۲).



شکل ۲: میزان جذب نانوذرات تولیدی نسبت به سوپرناتانت.

بررسی‌های انجام شده حاکی از حضور پیک‌های فلز طلا به صورت عنصری در سوپرناتانت قارچ پس از انکوباسیون با یون‌های طلا بوده است. شکل ۳ نتایج بدست آمده از XRD را نشان می دهد. این تست مشخصاً عنصرهای مختلف را از هم تفکیک می کند. ۴ پیک از نانوذرات طلا در این نمودار دیده می شود. بر طبق گراف بدست آمده و مقایسه با گراف پایه، نقاط قرمز زوایای تابشی است که در آن عنصر طلا یافت شده است. بر طبق این نمودار می توان به وجود عنصر طلا در نمونه مورد نظر پی برد. نتایج حاصل از این بررسی



شکل ۵: مقایسه جذب نانودارو و نانوذرات طلا نسبت به سوپرنانانت با ماکزیمم جذب ۵۲۰ nm.

- پیک محدود ۳۴۰۰ نشان دهنده وجود گروه عاملی OH است که از پهن بودن بود نتیجه بر آن است که OH گروه اسیدی می باشد.

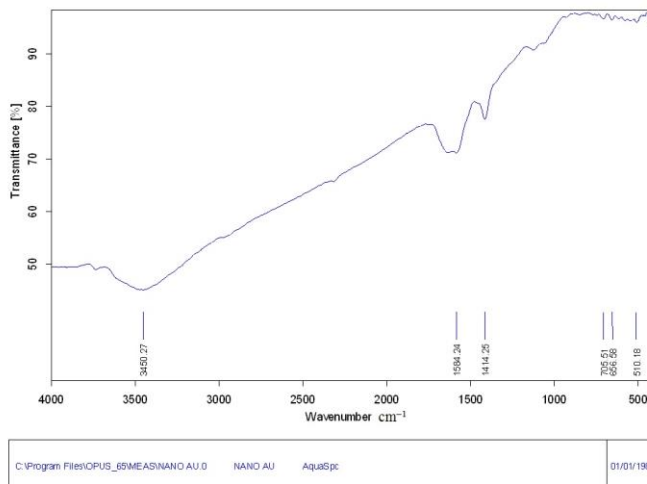
- پیک های ضعیف موجود در محدود ۳۵۰۰ تا ۳۴۰۰ ارتعاشات کششی پیوندهای NH را نشان می دهد. نشان دهنده پیوندهای آمیدی موجود در پروتئین می باشند.

- طیف موجود در ۱۵۰۰ دو شاخه است که می توان یک شاخه را به C=O نسبت داد که و شولدر کناری را به می توان به ارتعاش خمشی NH نسبت داد. در واقع نشان دهنده پیوندهای آمیدی هستند.

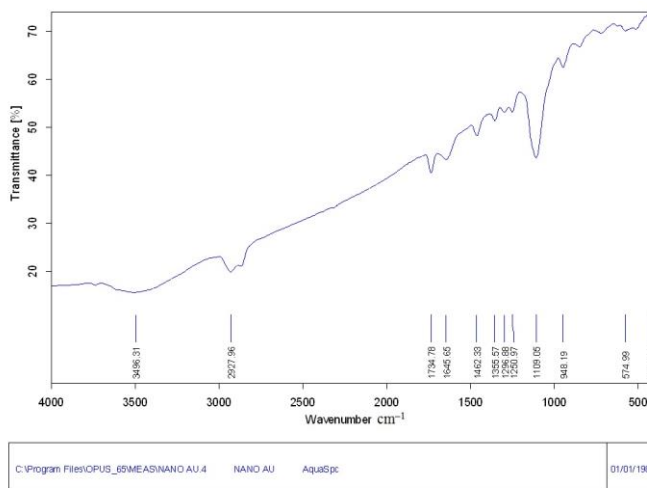
- طیف ناحیه ۱۴۰۰ نیز نشان دهنده باندهای CH₂ می باشد.

- پیک های زیر ۱۰۰۰ نشان دهنده پیوندهای فلزی می باشند (شکل ۶).

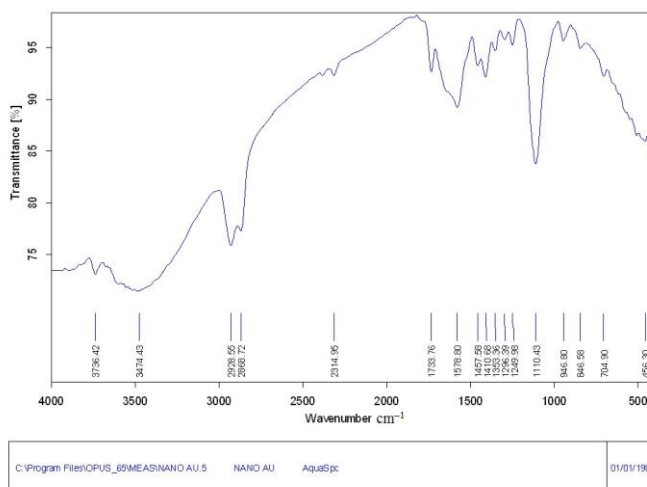
مطالعات دیگری وجود دارند که استفاده از الکل را توصیه نموده اند ولی با توجه به اینکه الکل سبب دناتور شدن پروتئین های سطحی موجود بر روی نانوذرات می شود، لذا مطمئن ترین روش، استفاده از آب مقطر می باشد. سپس نانوذرات پاک سازی شده به داروی تاکسول متصل شدند. محلول داروی متصل به نانوذرات طلا در طول موج های مختلف در مقابل محلول نانوذرات طلا به تنهایی سنجیده شد. تفاوت ها در جذب، حاکی از اتصال دارو به نانوذرات بود (شکل ۵). همانگونه که مشاهده می شود ماکزیمم جذب نوری هر دو نمونه در طول موج ۵۲۰ nm بود و میزان جذب نوری متفاوت شده بود که نشان دهنده آن است که پس از اتصال دارو به طلا شکل فضایی نانوذرات تغییر یافته و به این ترتیب نانوذرات با موفقیت به دارو متصل شده اند.



Page 1/1
شکل ۶: طیف مربوط به نانوذرات.



Page 1/1
شکل ۷: طیف مربوط به دارو.



Page 1/1
شکل ۸: طیف مربوط به نانوذرات.

بعدی این فرآیند نیز تحت بررسی قرار گیرد. احتمالاً حضور پروتئین‌های پوشش دهنده در فرآیند اتصال تاکسول به سطح نانوذرات عمل نموده‌اند. پس از کشت سلول سرطانی در فلاسک، شمارش سلول‌ها انجام شد که در حد مطلوب بودند و به این ترتیب سلول‌ها آماده تست MTT می‌باشند. برای تفاوت گذاشتن بین سلول‌های مرده و زنده، نمونه معمولاً در یک رنگ خاص مانند تریپان بلو محلول می‌شود. این روش رنگ آمیزی به نام رنگ آمیزی حذف شناخته شده که با استفاده از یک رنگ دو ظرفیتی که از غشاء سلول‌های مرده می‌گذرد و آن‌ها را آبی می‌کند شناخته می‌شود، در حالی که سلول‌های زنده این رنگ را جذب نمی‌کنند و در نتیجه سلول‌های زنده از مرده تفکیک می‌شوند. هنگامی که این نمونه در زیر میکروسکوپ مشاهده شود سلول‌های مرده مانند نقطه‌های تاریک دیده می‌شوند. نتایج نشان دهنده عملکرد متفاوت نانوذرات و دارو بر روی دو رده مورد استفاده بوده است. مقادیر IC_{50} برای هر رده سلولی بدست آمد که در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. همانطور که مشاهده می‌شود در چاهک‌های اول به دلیل غلظت بالا از مواد مورد آزمون کمترین رشد سلول وجود داشته است که با کمترین جذب نوری بررسی می‌شود. قابل توجه آنکه در بعضی از اولین چاهک‌ها تغییر رنگ وجود دارد در حالیکه به سمت چاهک‌های وسط تغییر رنگ چاهک حضور ندارد و مجدداً رنگ بنفش در چاهک‌های آخر دیده می‌شود. رنگ‌هایی که در چاهک‌های دوم معمولاً وجود دارد حاصل از ترازولیوم نبوده و مربوط به جذب نوری خود نمونه‌ها می‌باشد که رنگی هستند (شکل ۹). طبق شکل و جذب‌های خوانده شده، حداقل دوز کشندگی دارو و نانودارو که بتواند نیمی از سلول‌ها را بکشد IC_{50} به ترتیب در چاهک‌های شماره ۵ و ۶ می‌باشد. طبق جذب‌های خوانده شده حداقل دوز کشندگی

- پیک‌های ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۳۰۰ و همچنین ۱۷۰۰ پیوندهای استری فراوانی که در ترکیب موجود است را نشان می‌دهد.
 - پیک پهن ناحیه ۳۴۰۰ پیوندهای OH الکی و فنلی را نشان می‌دهد که به دلیل داشتن پیوندهای هیدروژنی با ترکیبات همراه ضعیف و پهن شده است.
 - پیک‌های زیر ۱۰۰۰ بخصوص ناحیه ۹۰۰ در واقع موقعیت‌های استخلاف‌های حلقه‌های آروماتیک را تعیین می‌کنند که در اینجا قابل بحث و کارای نمی‌باشد. همچنین طیف‌های ضعیف ناحیه ۱۶۰۰ به همین صورت می‌باشند.
 - پیک‌های قوی‌تر ناحیه ۱۶۰۰ را می‌توان به پیوندهای $C=C$ در حلقه‌های آروماتیک نسبت داد.
 - طیف دو شاخه ناحیه ۲۹۰۰ هیریدهای sp^3 در پیوندهای CH را نشان می‌دهد (شکل ۷).
 در این طیف پیک‌های مربوط به استخلاف‌های حلقه در توضیح طیف دارو گذشت به خوبی معلوم می‌شود (۹۰۰ و محدود ۱۶۰۰). همچنین پیک‌های پیوند استری موجود در دارو، پیوندهای CH، پیوند دوگانه کربنی نیز مشاهده می‌شود. در عین حال پیک آمیدی ناحیه ۳۵۰۰ موجود در نانوذره بیشتر نمایان است. پیک کربونیلی نانوذره نیز همچنان ثابت بوده در نتیجه نانوذره بدون تغییری در ماهیت خود توسط دارو کرشل شده است (شکل ۸).
 جهت انجام فرآیند اتصال، داروی تاکسول به نانوذرات زیستی از هیچ نوع حاملی جهت اتصال استفاده نشد. باید خاطر نشان کرد که نانوذرات زیستی تولید شده توسط قارچ *F. oxysporum* به علت داشتن آنزیم‌های قارچی و پروتئین‌های متفاوت ترش‌حی در سطح خود باعث عملکرد اتصال شده‌اند که در نتایج FTIR وجود این پروتئین‌ها اثبات شده است. برای تشخیص این پروتئین‌ها به صورت دقیق مطالعه‌ای انجام نشده است که توصیه می‌شود در مطالعات

جدول ۱: مقادیر جذب نوری (OD) مربوط به پلیت ۹۶ خانه در حضور نانودارو، دارو و نانوذرات طلا به تنهایی.

مقادیر جذب نانودارو بر روی کشت سلول	۰/۰۰۴	۰/۰۱۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۱۳۵	۰/۴۴۸	۰/۲۸۲	۰/۱۸۶	۰/۱۷۸	۰/۵۹۶
مقادیر جذب دارو بر روی کشت سلول	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۱۳	۰/۰۱۹	۰/۴۲۴	۰/۴۶۶	۰/۲۹۱	۰/۱۶۸	۰/۱۹۹	۰/۵۰۳
مقادیر جذب نانوذرات بر روی کشت سلول	۰/۰۱۰	۰/۳۲۲	۰/۴۴۷	۰/۴۹۸	۰/۴۱۶	۰/۴۴۱	۰/۶۴۸	۰/۳۰۹	۰/۴۶۸	۰/۳۲۸

اینکه نانودارو به میزان کمی وارد سلول‌ها شده‌اند و با دوز کم توانسته‌اند اثر کشندگی خود را در سلول اعمال نمایند، نتایج به هدف اصلی مطالعه که کاهش دوز مصرفی دارو و نتیجتاً کاهش اثرات جانبی دارو در بیمار می‌باشد، بسیار نزدیک می‌باشد.

در سال ۲۰۱۲ Ciprian Tmouleasa و همکارانش به بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات طلا در شرایط آزمایشگاهی همراه با داروهای شیمی درمانی سیس پلاتین، کاپسیتاین و دوکسوروبیسین در درمان سرطان کبد با حداقل سمیت پرداختند. آن‌ها از نانوذرات طلا پوشش داده شده با اسپارتیک اسید استفاده کردند که احتمالاً سبب کنژوگه شدن بهتر با دارو شده است [۶]. سپس توانایی اثرات ضدسرطانی تاکسول، نانوذرات طلا و نانوذرات طلا متصل شده به تاکسول در کشت سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از اثرات بهتر ضدسرطانی نانوذرات طلا کنژوگه شده به دارو نسبت به داروی خالص بوده است. Mioc و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثرات Betulin به عنوان ماده ضدسرطانی متصل شده به نانوذرات طلا غیربیولوژیک پرداختند و نشان دادند که ماده مذکور پس از اتصال به نانوذرات طلا توانایی سمیت سلولی وابسته به دوز در بسیاری از رده‌های مختلف سلولی را دارد که نتایج آن‌ها همسو با نتایج ما است ولی تفاوت آن در استفاده از نانوذرات غیربیولوژیک برای حامل دارو و استفاده از سدیم سترات به عنوان پوشش نانوذرات بوده است در حالیکه در مطالعه ما از افزودن ماده و پوشش دهنده نانوذرات خبری

برای طلای خالص، چاهک شماره ۲ می‌باشد که نشان دهنده اینست که خود نانوذرات طلا به تنهایی نیز سمیت کمی برای سلول‌ها ایجاد می‌کند. به این ترتیب اتصال دارو به نانوذرات باعث عملکرد بهتر دارو شده است.



شکل ۹: نتایج تست MTT دو ردیف اول مربوط به جذب نوری نانودارو، دو ردیف دوم دارو و دو ردیف سوم مربوط به نانوذرات طلا به تنهایی می‌باشد.

نتایج آزمون ICP-OES به شرح جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲: نتایج ICP-OES.

Test Results			
lab.NO.	Sample Labels	Element	Wavelength
		Au	242.794
	Blank (ppm)	0.00	
493	mcf7 nano (ppm)	2.53	
495	mcf7 moradi (ppm)	0.07	

نانوذرات وارد شده به سلول‌ها با این تست اندازه‌گیری شد. طبق نتایج گزارش شده مقدار نانوذرات خالص وارد شده به سلول‌ها ۲/۵۳ ppm می‌باشد اما میزان نفوذ نانودارو در حدود ۰/۰۷ ppm بوده است. این کاهش نفوذ نانودارو نسبت به نانوذرات ممکن است به دلیل افزایش سایز نانودارو در حالت ایجاد کمپلکس با نانوذرات طلا باشد. بنابراین با توجه به

میزان مصرف می تواند اثر دارو بر سلول های سرطانی را حفظ کرده اما اثرات جانبی ناشی از آن را کاهش دهد.

مراجع

- [1] K. Donaldson, L. Tran, L.A. Jimenez, R. Duffin, D.E. Newby, N. Mills, W. MacNee, V. Stone, *Particle and Fibre Toxicology*, **2**, 2005, 1.
- [2] N. Taniguchi, "On the Basic Concept of Nanotechnology: Proc. Intern. Conf. of Production Engineering", 1974.
- [3] K. Moghaddam, *Journal of Young Investigators*, **19**, 2010, 1.
- [4] J. Zhang, L. Mou, X. Jiang, *Chemical Science*, **11**, 2020, 923.
- [5] A.G. Cuenca, H. Jiang, S.N. Hochwald, M. Delano, W.G. Cance, S.R. Grobmyer, *Cancer*, **107**, 2006, 459.
- [6] R.L. Manthe, S.P. Foy, N. Krishnamurthy, B. Sharma, V. Labhassetwar, *Molecular Pharmaceutics*, **7**, 2010, 1880.
- [7] P. Sharma, A. Singh, S.C. Brown, N. Bengtsson, G.A. Walter, S.R. Grobmyer, N. Iwakuma, S. Santra, E.W. Scott, B.M. Moudgil, *Cancer Nanotechnology*, **15**, 2010, 67.
- [8] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, *Biotechnology Advances*, **27** 2009, 76.
- [9] F.D. Lipša, E.L. Ursu, C. Ursu, E. Ulea, A. Cazacu, *Agronomy*, **10**, 2020, 1143.
- [10] B. Yahyaei, S. Arabzadeh, P. Pourali, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **8**, 2014, 4495.
- [11] M. Schaffie, M. Hosseini, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2**, 2014, 386.
- [12] N.F. Boyd, G.A. Lockwood, J.W. Byng, M.J. Yaffe, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **7**, 1998, 1133.
- [13] K. Chan, W. Knox, A. Gandhi, D. Slamon, C.S. Potten, N.J. Bundred, *British journal of Surgery*, **88**, 2001, 412.
- [14] V.J. Assikis, A. Buzdar, *Seminars in Oncology*, Elsevier, 2002, 120.
- [15] K.L. Britt, J. Cuzick, K.A. Phillips, *Nature Reviews Cancer*, **20**, 2020, 417.
- [16] B.G. Katzung, "Basic and clinical pharmacology, Mc Graw Hill", 2012.
- [17] A.S. El-Sayed, M. Fathalla, M.A. Yassin, N. Zein, S. Morsy, M. Sitohy, B. Sitohy, *Molecules*, **25**, 2020, 263.
- [18] P. Pourali, S.H. Badiee, S. Manafi, T. Noorani, B. Yahyaei, *Electronic Journal of Biotechnology*, **29**, 2017, 86.
- [19] N. Naimi-Shamel, S. Dolatabadi, P. Pourali, *J Neyshabur Univ Med Sci*, **4**, 2016, 9.
- [20] C.G. Kumar, Y. Poornachandra, S.K. Mamidyala, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **123**, 2014, 311.
- [21] M. Vairavel, E. Devaraj, R. Shanmugam, *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 2020, 8166.
- [22] P. Murawala, A. Tirmale, A. Shiras, B. Prasad, *Materials Science and Engineering: C*, **34**, 2014, 158.
- [23] D. Rautaray, A. Sanyal, S.D. Adyanthaya, A. Ahmad, M. Sastry, *Langmuir*, **20**, 2004, 6827.
- [24] M. Gericke, A. Pinches, *Gold Bulletin*, **39**, 2006, 22.
- [25] J. Zeng, Y. Ma, U. Jeong, Y. Xia, *Journal of Materials Chemistry*, **20**, 2010, 2290.
- [26] M. Mioc, I.Z. Pavel, R. Ghiulai, D.E. Coricovac, C. Farcaș, C.V. Mihali, C. Oprean, V. Serafim, R.A. Popovici, C.A. Dehelean, *Frontiers in Pharmacology*, **23**, 2018, 429.
- [27] G.F. Paciotti, J. Zhao, S. Cao, P.J. Brodie, L. Tamarkin, M. Huhta, L.D. Myer, J. Friedman, D.G. Kingston, *Bioconjugate Chemistry*, **27**, 2016, 2646.
- [28] Y. Du, L. Xia, A. Jo, R.M. Davis, P. Bissel, M.F. Ehrlich, D.G. Kingston, *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 2018, 420.
- [29] D.N. Heo, D.H. Yang, H.J. Moon, J.B. Lee, M.S. Bae, S.C. Lee, W.J. Lee, I.C. Sun, *Biomaterials*, **33**, 2012, 856.

نبود [۲۶]. Paciotti و همکاران در سال ۲۰۱۶ از نانوذرات طلای غیربیولوژیک جهت اتصال به داروی تاکسول استفاده نمودند. آن ها مجدداً مانند سایر تحقیقات با تیولدار نمودن دارو توانستند آن را به نانوذرات طلا متصل نمایند و نشان دادند که داروی مذکور دارای اثرات بهتر ضدسرطانی در کشت سلول پس از اتصال به نانوذرات بوده است [۲۷]. همانگونه که اشاره شد برخلاف تحقیق Paciotti، نانوذرات طلای موجود در تحقیق حاضر بیولوژیک بوده و بدون نیاز به هیچ ماده اتصال دهنده به داروی تاکسول متصل شده اند. Du و همکاران در سال ۲۰۱۸ از نانوذرات طلای غیربیولوژیک جهت اتصال به داروی دوکسوروبیسین استفاده نمودند و نشان دادند که داروی مذکور دارای اثرات بهتر ضدسرطانی در کشت سلول پس از اتصال به نانوذرات بوده است. با این حال تفاوت آن ها مانند مطالعات قبلی در استفاده از نانوذرات غیربیولوژیک و استفاده از لینک دهنده های خاص بوده است [۲۸]. Heo و همکاران در سال ۲۰۱۲ از نانوذرات طلای غیربیولوژیک پوشش داده شده با پلی اتیلن گلیکول و سپس بیوتین جهت اتصال به داروی تاکسول و درمان هدفمند سرطان دهانه رحم و ریه استفاده نمودند. با وجود نتایج بدست آمده مناسب، مجدداً تفاوت کار آن ها با تحقیق حاضر در استفاده از نانوذرات غیربیولوژیک و استفاده از لینک دهنده های خاص بوده است [۲۹].

۴- نتیجه گیری

با توجه به اینکه نانوذرات متصل شده به داروی تاکسول با غلظتی بسیار کمتر از دارو وارد سلول های سرطانی شده اند، اثراتی بهتر از داروی خالص داشتند. نتایج ICP-OES حاکی از کاهش ورود نانوذرات متصل به دارو نسبت به داروی خالص بوده است که این کاهش ورود ممکن است ناشی از اتصال دارو به نانوذرات و بزرگ شدن شکل فضایی آن ها باشد. با توجه به اثرات جانبی داروها بر روی دیگر سلول های بدن، می توان نتیجه گرفت که با اتصال دارو به نانوذرات طلا، می توان از میزان کمتری دارو استفاده کرد و این کاهش