مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، آبان ۱۳۹۷، ۷۳۰-۷۱۵

مطالعه خاصیت ضد سرطانی نانو داروی مگنتیک کیتوسان-هیدروکسی اوره بر رده سلولی Hela : یک مطالعه آزمایشگاهی

الهام خاکریزی[۱]، مریم بی‌خوف تربتی[۲]، مسعود شعبان‌زاده[۳]

دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۱۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۲/۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۴/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۷/۴/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: نانو حامل‌های دارویی معمولاً دارای خواص بهینه شده‌ای برای سهولت نفوذ به درون سلول و افزایش اثر-پذیری دارو می‌باشند، از تخریب دارو در برابر عوامل آنزیمی جلوگیری نموده و با دارورسانی هدف‌مند به سلول‌های سرطانی، عوارض جانبی دارو را کاهش می‌دهند. هدف از این مطالعه تعیین ماهیت ضد سرطانی نانو داروی مگنتیک کیتوسان-هیدروکسی اوره سنتز شده بر رده سلولی Hela (سرطان دهانه رحم) و تعیین دوز مؤثر نانو دارو جهت حذف سلول‌های سرطانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، پس از آنالیز ساختار نانو ذرات مغناطیسی سنتز شده و کشت رده سلولی Hela، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف نانو دارو انکوبه شدند. جهت بررسی میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها از روش MTT (سنجش دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیم بروماید) و برای تعیین میزان آپوپتوز از کیت Annexin-PI و دستگاه فلوسایتومتری استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون t مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزایش غلظت نانو دارو هیدروکسی اوره به صورت وابسته به دوز، توان زیستی سلول‌ها را کاهش داد. به‌طوری‌که در غلظت‌های ۱۰۰۰($p<۰/۰۰۱$) و ۲۰۰۰ ($p<۰/۰۵$) میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. هم‌چنین، نانو دارو به طور معنی‌داری سبب افزایش القاء آپوپتوز به میزان ۲/۴۸ برابر در سلول‌های Hela تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شد ($p=۰/۰۰۰۳$).

نتیجه‌گیری: نانو داروی هیدروکسی اوره دارای خاصیت سایتوتوکسیک بر روی رده سلول سرطانی Hela می‌باشد و می‌تواند سبب القاء آپوپتوز گردد.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی‌اوره ، کیتوسان، سلول‌های Hela، داروهای ضدسرطان، آپوپتوز

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۵۵۲۲۹۲۰۱، دورنگار: ۰۲۱-۵۵۲۲۹۳۶۹، پست الکترونیک: maryam.bikhof@gmail.com

۳ - استادیار گروه آموزشی شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

مقدمه

سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر و دومین نئوپلاسم بدخیم در زنان محسوب می‌گردد [۱]. درمان‌های رایج سرطان دهانه رحم عبارت‌اند از شیمی‌درمانی، جراحی و پرتودرمانی که متأسفانه کاملاً مؤثر نمی‌باشند [۳-۲]. هیدروکسی اوره یکی از داروهای مهم شیمی‌درمانی است که با مهار آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز از تبدیل شدن ریبونوکلئوتید به دئوکسی ریبونوکلئوتید ممانعت می‌کند. هم‌چنین ممکن است از طریق مهار اتصال تیمیدین در دزوکسی ریبونوکلئوتید اسید (DNA) به طور مستقیم به رشته DNA آسیب رسانده و سلول را در فاز G1 متوقف نماید [۵-۴]. هیدروکسی اوره در کنار خواص درمانی با عوارض جانبی متفاوتی همراه است. با استفاده از سیستم دارورسانی هدف‌مند می‌توان عوارض جانبی نامطلوب را کاهش و اثر بخشی دارو را با هدایت هدف‌مند دارو به محل تومور بهبود بخشید [۶-۵]. سیستم دارورسانی مطلوب سیستمی است که قابلیت انتقال میزان مؤثر دارو به بافت هدف، ظرفیت بالا جهت بارگذاری دارو، زیست سازگار، ایمن از انتشار تصادفی، سنتز آسان، توانایی کنترل و حذف آسان را داشته باشد [۷]. کیتوسان فراوان‌ترین پلیمر طبیعی پس از سلولز است، امروزه کیتوسان یکی از محبوب‌ترین نانو حامل‌های زیستی در عرصه دارورسانی شناخته می‌شود [۸]. از خواص نانو حامل پلیمری کیتوسان می‌توان به بار مثبت طبیعی، قدرت جذب انتخابی و اثر خنثی‌سازی بار سطحی موجود در سلول‌های توموری اشاره نمود. بار منفی موجود در سطح غشاء پلاسمایی سبب جذب و قدرت چسبندگی بالای نانو حامل به سلول-های می‌گردد. در نتیجه، گزینه مناسبی در سیستم دارو رسانی به بافت تومورهای توپر محسوب می‌شود. هم‌چنین کیتوسان‌ها با تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی با گلیکوپروتئین مخاطی موجود در لایه ژل مخاطی، سبب چسبندگی بیشتر پلیمر به مخاط می‌شود و در نتیجه باعث رهایش مستمر دارو به داخل بدن می‌گردد [۱۱-۹]. از دیگر مزیت‌های کیتوسان اثر سمیت کمتر نسبت به دیگر پلیمرهای کاتیونی می‌باشد [۱۲]. مهم‌ترین ایراد وارد بر کیتوسان، حلالیت ضعیف در pH فیزیولوژیک است که علت آن وجود پروتون جزئی در گروه استیل آمین ساختار این ترکیب می‌باشد. یکی از عمده‌ترین استراتژی‌های رفع انحلال‌پذیری ضعیف کیتوسان، استفاده از مشتقات قابل انحلال در آب ازقبیل گروهای PEG (Poly ethylene glycol) می‌باشد [۹]. از مزایای ترکیبات دارویی حاوی PEG، می‌توان به ماندگاری بالای دارو در خون، کاهش سرعت تخریب دارو توسط آنزیم‌های متابولیکی و کاهش ایمونوژنسیته اشاره نمود [۱۱]. استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در ساختار داروهای شیمی‌درمانی، عوارض جانبی داروها را از طریق هدایت هدف‌مند دارو به محل تومور (تحت میدان مغناطیسی) به طرز چشم‌گیری کاهش می‌دهد، در حالی‌که فاقد اثر سایتوتوکسیک می‌باشد [۱۳]. در این مطالعه با هدف افزایش ماهیت سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره و هدف‌مندسازی آن در شیمی درمانی سرطان، از هیدروکسی اوره بارگذاری شده بر روی نانو حامل کیتوسان پگیله شده مگنتیک که برای

اولین بار سنتز و گزارش گردیده استفاده شد. لذا در مطالعه حاضر، اثر ضد سرطانی این نانوداروی جدید هیدروکسی اوره بر رده سلولی Hela (سرطان دهانه رحم)، در غلظت‌ها و زمان‌های تأثیر مختلف با روش MTT بررسی و تأثیر آن بر میزان القاء مرگ سلولی آپوپتوز و نکروز با روش رنگ آمیزی دوگانه Anexin V و PI مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی است که از مهرماه سال ۱۳۹۵ تا شهریور سال ۱۳۹۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق و واحد یادگار امام شهر ری به طریق زیر انجام گردید. بدین منظور رده سلول سرطانی دهانه رحم Hela (C155) از بانک سلولی انستیوپاستور ایران خریداری شد. محیط کشت (DMEM High Glucose یا Dulbecco's Modified Eagle Medium)، سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum)، تریپسین/ استرپتومایسین و L-گلوتامین از شرکت Gibco (اسکاتلند) خریداری گردید. سایر مواد نظیر تریپان آبی، نمک فسفات با خاصیت بافری (Phosphate buffered saline; PBS)، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و محلول ۳-(۲,۵-دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (3-(2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT)، از شرکت Sigma Aldrich (آلمان) و کیت رنگ آمیزی انکسین/ پروپیدیوم یدید (Annexin V-FITC / PI) از شرکت Affymetrix (آمریکا) خریداری گردید. در این مطالعه از دستگاه الایزا خوان Tecan و دستگاه فلوسایتومتری FACS Calibur BD ساخت کشور آمریکا، میکروسکوپ نوری و فاز معکوس Nicon ساخت کشور ژاپن، دستگاه اولتراسونیک Elma S80H ساخت کشور ایتالیا، دستگاه انکوباتور co_2 Biocenter ساخت کشور آمریکا، سانتریفیوژ یخچال‌دار Eppendorf و طیف سنج مادون قرمز انتقالی (Bruker، ساخت کشور آلمان)، دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (scanningElectron Microscope) Kyky-EM3200 ساخت کشور چین، دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron Zeiss microscope) ساخت کشور آلمان، استفاده گردید.

نانو ذرات مغناطیسی Fe_3O_4 سیلان‌دار بر اساس روش Liu و همکاران به روش هم رسوبی یون‌های آهن (II) و آهن (III) در محیط قلیایی و سپس واکنش با ۳-آمینوپروپیل‌تری متوکسی‌سیلان سنتز شدند [۱۴]. سپس مطابق روش Qu و همکاران نانوذرات مغناطیسی به کیتوسان پگیله شده با استفاده از گلوتارالدئید پیوند و متصل شد [۱۵]. در پایان داروی ضد سرطان هیدروکسی اوره بر روی نانو حامل مغناطیسی سنتز شده به کمک هموژنایزر بارگذاری و با پیوندهای هیدروژنی به نانوحامل متصل شد. ساختار نانودارو و مورفولوژی سطح به کمک طیف سنجی FTIR (Fourier transform infrared) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning Electron Microscopy) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM یا transmission Electron Microscopy) بررسی و تأیید شد. سپس میزان بارگذاری دارو به روش تعیین غلظت با اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۲۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد [۳۳].

سلول‌های Hela در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS و محلول ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در یک اتمسفر مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن به صورت تک لایه در فلاسک کشت داده شدند. مورفولوژی و سلامت سلول‌ها با مشاهده در زیر میکروسکوپ بررسی شد. سپس سلول‌ها از کف فلاسک توسط محلول سترون (Sigma Aldrich) تریپسین-EDTA ۰/۰۵ درصد جدا شده و پس از رنگ‌آمیزی با تریپان آبی، بر روی لام هموسیتومتر توسط میکروسکوپ نوری مشاهده و شمارش گردیدند و درصد زنده ماندن سلولی محاسبه شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی‌های باکتریایی، مایکوپلاسمایی یا قارچی، از سلول‌های با توان زیستی بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد [۱۶].

سنجش دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیم برماید (MTT assay) نوعی روش رنگ سنجی است که میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. روش MTT بر اساس احیای رنگ MTT به فرآورده نامحلول فرمازان (Formazan) بنفش-آبی توسط فعالیت آنزیمی میتوکندری‌های سلول‌های زنده استوار است [۱۶]. در این تست تعداد ۱۰۰۰۰ سلول Hela به همراه محیط کشت (کامل) به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (که سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و حالت پایدار پیدا کردند)، محلول‌های دارویی فیلتر شده با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به هر حفره اضافه شد. غلظت‌های مذکور از رقیق سازی داروی اولیه با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در حلال محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و L-گلوتامین ۲ میلی‌مولار پس از ۲ ساعت اولتراسونیک تهیه شدند. به منظور دقت بیشتر و صحت تکرارپذیری داده‌ها برای هر رقت حداقل هشت چاهک اختصاص داده شد. در تعدادی از حفره‌ها به عنوان شاهد تنها محیط کشت و در تعدادی دیگر به عنوان کنترل فقط سلول بدون دارو اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، رنگ MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر حفره اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. طی مدت انکوباسیون رنگ زرد MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری احیاء شده و کریستال‌های بنفش‌رنگ فرمازان تشکیل گردید. سپس کریستال‌های فرمازان در ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO حل شده و در نهایت میزان جذب آنها توسط دستگاه الایزا خوان در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شده و درصد زنده ماندن سلولی و نیز IC50 (Inhibitory concentration 50) نانو داروی سنتتیک هیدروکسی‌اوره محاسبه گردید. IC50 (غلظت دارویی است که در آن غلظت، ۵۰٪ رشد سلولی نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد) توان زیستی سلول‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد: [۱۶]

۱۰۰×(میانگین جذب نوری کنترل/میانگین جذب نوری تست)= میزان توان زیستی

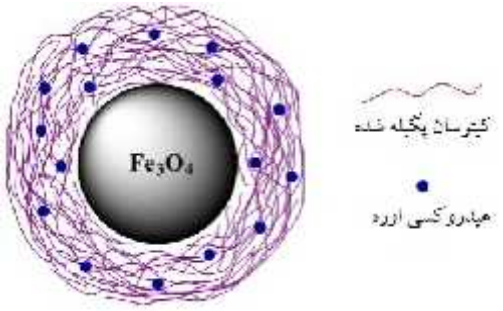
جهت بررسی مرگ سلولی و تشخیص آپوپتوز اولیه و دیررس از نکروز رنگ آمیزی دوگانه سلول‌ها با Annexin V/PI، طبق دستورالعمل کیت انکسین/پروپیدیوم یدید

(Affymetrix) انجام گرفت. بدین ترتیب که سلول‌های کشت داده شده Hela با غلظت IC50 نانو داروی هیدروکسی‌اوره به مدت ۲۴ ساعت تیمار و جهت بررسی میزان القاء آپوپتوز ابتدا تریپسینه و سپس با بافر سالین فسفات شستشو داده شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر بایندینگ سوسپانسیون شده و پس از اضافه کردن ۳ میکرو لیتر رنگ Annexin V-FITC به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. سپس سلول‌ها با ۱ میلی‌لیتر محلول بایندینگ شستشو و سانتریفیوژ گردید. پس از اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر بافر بایندینگ به رسوب سلولی، ۵ میکرو لیتر رنگ PI به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سپس بلافاصله سوسپانسیون سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری در طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و فیلتر قرائت ۵۱۵ نانومتر (در کانال سبزFL1) برای فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و فیلتر ۶۰۰ نانومتر (در کانال قرمز FL2) برای رنگ اختصاصی DNA، پروپیدیوم یدید (PI) ارزیابی و درصد هریک از مربعات چهارگانه نسبت به‌کل ثبت گردید. چهار ناحیه Q_1 تا Q4 ثبت شده پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار دستگاه عبارتند از: Q_1 نمایان‌گر سلول‌های نکروزی ($Annexin\ V^-/PI^+$)، Q_2 نمایان‌گر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس ($Annexin\ V^+/PI^+$)، Q_3 نمایانگر سلول‌های آپوپتوزی اولیه ($Annexin\ V^+/PI^-$) و Q_4 سلول‌های زنده ($Annexin\ V^-/PI^-$) [۱۷].

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۶/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، مقایسه گروه تیمار و گروه کنترل با استفاده از روش واریانس یک طرفه و آزمون t مستقل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل گردید. اطلاعات به صورت انحراف معیار±میانگین نمایش داده شده‌اند، هم چنین میزان IC50 با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۶/۱ تعیین شد. تحلیل راندمان و نوع مرگ سلولی سلول‌های مورد بررسی در روش فلوسایتومتری نیز توسط نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷/۶/۱ دستگاه فلوسایتومتر صورت گرفت.

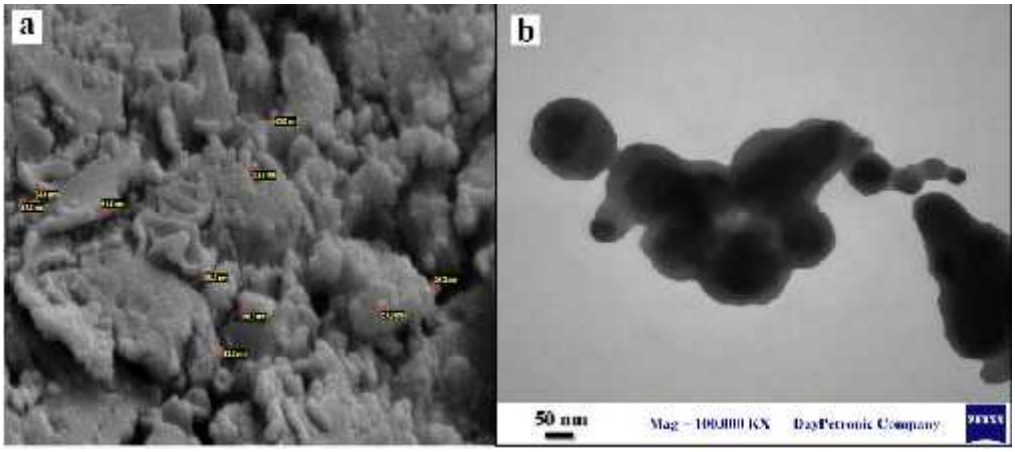
نتایج

با مطالعه طیف FTIR نانوذرات سنتز شده، ساختار شیمیایی نانو دارو تأیید شد. فرکانس جذبی ارتعاشات کششی در cm^{-1} ۲۹۲۰، ۱۰۲۰، ۳۴۳۹، ۶۴۷ و ۵۳۱ به ترتیب مربوط به گروه‌های CH_2، C-O-C، OH، NH و Fe-O در ساختار نانو دارو است. افزایش شدت جذب گروه CH_2 تأیید کننده اتصال پلی اتیلن گلیکول و حذف جذب گروه C=O گلوتارالدئید اتصال شیمیایی کیتوسان پگیله شده به نانوذرات مغناطیسی را نشان می‌دهد. پیک جذبی پیوند C=N در cm^{-1} ۱۵۸۶ که مؤید پگیله شدن کیتوسان می‌باشد و ارتعاش کششی پیوند C=O داروی هیدروکسی-اوره بارگذاری شده در cm^{-1} ۱۶۷۴ دیده می‌شود. ساختار شماتیک شیمیایی نانوداروی مغناطیسی کیتوسان پگیله بارگذاری شده با داروی ضد سرطان در شکل ۱ دیده می‌شود. میزان بارگذاری دارو به روش اسپکتروفتومتری UV، ۴/۸۸ درصد به دست آمد.



شکل ۱- ساختار نانوذرات مغناطیسی حاوی هیدروکسی‌اوره

تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM با مقیاس ۱ میکرومتر در شکل a-۲ نشان داده شده است. در تصویر SEM مورفولوژی سطح و کروی بودن تقریبی نانو ذرات سنتز شده مشهود است. اندازه نانو ذرات در محدوده ۴۳ تا ۶۷ نانومتر به دست آمده است. تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM با مقیاس ۵۰ نانومتر در شکل b-۲ تشکیل ساختار هسته-پوسته با هسته مغناطیسی تیره و پوسته کیتوسان پگیله حاوی دارو را تأیید می‌کند.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات مغناطیسی حامل دارو (a) SEM (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰۰۰) و (b) TEM (بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰۰۰)

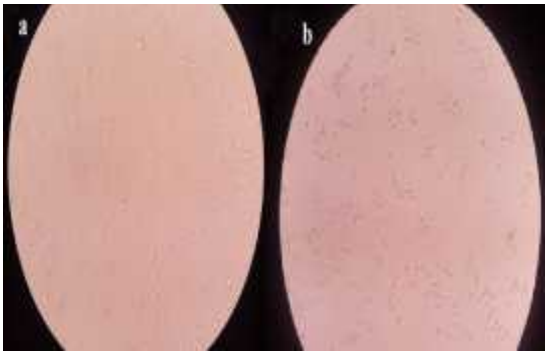
آنالیز آماری بررسی حاضر نشان داد، افزایش غلظت نانو دارو سبب کاهش توان زیستی سلول می‌شود. مطابق جدول ۱ توان زیستی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو داروی هیدروکسی اوره به ترتیب، ۷۲/۴۳۳٪ ($p<۰/۰۰۱$) و ۶۸/۱۷۱٪ ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل کاهش زیستایی معنی‌داری یافته است. در حالی که توان زیستی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های کمتر یعنی ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ($p>۰/۰۵$). غلظت IC50 نانو دارو هیدروکسی اوره در مدت ۴۸ ساعت تیمار، ۳۰۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. تغییرات مورفولوژیکی رده سلولی Hela بعد از تیمار با غلظت IC50 نانوداروی

مگنتیک کیتوسان- هیدروکسی اوره در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده توسط میکروسکوپ نوری در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار توان زیستی رده سلولی Hela پس از تیمار با نانو داروی هیدروکسی‌اوره در مدت زمان ۴۸ ساعت به روش MTT

زمان	کنترل	۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۴۸ ساعت	۱۰۰ ± ۱۹/۱	۹۵/۰۹ ±۱۲/۵	۸۶/۴۹ ± ۵/۴۳	۹۹/۸۱ ± ۷/۳۹	۸۰/۹۷ ± ۴/۰۶	۷۲/۴۳ ± ۵/۵۹	۶۸/۱۷ ± ۲/۰۹
مقدار P	-	۰/۰۵۵	۰/۰۶۱	۰/۰۵۹	۰/۰۶۲	۰/۰۰۰۹	۰/۰۲۴

مقادیر به دست آمده بر اساس انحراف معیار ± میانگین و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است. نوع آزمون آماری مورد استفاده واریانس یک طرفه می‌باشد.



شکل ۳- ارزیابی تغییرات مورفولوژیکی رده سلولی Hela قبل و بعد از تیمار با نانوداروی مگنتیک کیتوسان- هیدروکسی‌اوره توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×۱۰ .a) گروه کنترل b) بعد از ۴۸ ساعت تیمار با نانودارو

درطی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ظهور فسفولیپیدهای آنیونی (فسفاتیدیل سرین) در سطح خارجی غشاء که با حرکت Flip Flap از غشاء داخلی به آن منتقل گردیده است، مهم‌ترین تغییر غشایی در فاز اولیه آپوپتوز می‌باشد. فسفاتیدیل سرین طی رنگ‌آمیزی به کونژوگه‌های Annexin V-FITC متصل می‌شود. این اتصال در فاز تأخیری آپوپتوز نیز اتفاق می‌افتد. در فاز اولیه آپوپتوز، سلول به PI نفوذناپذیر است، ولی در جمعیت سلولی نکروزی یا آپوپتوز تأخیری تمامیت غشاء سلول از بین می‌رود که در نتیجه آن، سلول به رنگ PI نفوذپذیر می‌شود. پس از ورود PI به داخل سلول، به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. سلول‌های سالم زنده به هر دورنگ Annexin V-FITC و PI نفوذناپذیر هستند.

در شکل ۴، هیستوگرام‌های a، انتخاب محدوده‌هایی از سلول‌ها جهت بررسی مرگ سلولی به ترتیب در دو گروه کنترل (بدون تیمار دارویی) و تیمار را نشان می‌دهد. نقاط رنگی موجود در ناحیه Q1 (مربع بالا سمت چپ) هیستوگرام‌های b، نشان دهنده سلول‌های نکروز شده،

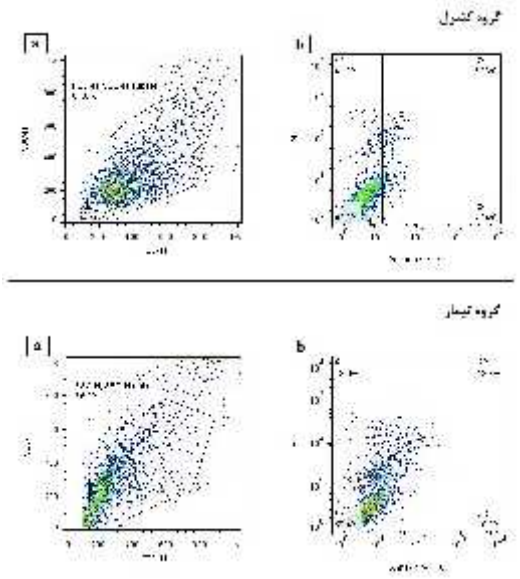
ناحیه Q2 (مربع بالا سمت راست) نشان‌دهنده آپوپتوز تأخیری یا late apoptosis و ناحیه Q3 (مربع پایین سمت راست) نشان‌دهنده آپوپتوز زودرس یا Early apoptosis می‌باشد. نقاط رنگی موجود در ناحیه Q4 نشان دهنده سلول‌های زنده است. میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز و نکروز شده Hela در هر دو گروه کنترل و تیمارشده با غلظت IC50 (۳۰۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانو دارو هیدروکسی اوره پس از دو بار تکرار در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین درصد آپوپتوز القاء شده در سلول‌های تحت تیمار با نانو دارو در مقایسه با گروه کنترل پس از دو بار تکرار آزمایش

مرگ سلولی	گروه تیمار با غلظت **IC50** نانو دارو	گروه کنترل	سطح معنی‌داری
آپوپتوز اولیه	۹/۴۲ ± ۲/۰۹	۴/۸۴ ± ۱/۱۲	۰/۱۱۱
آپوپتوز تأخیری	۲۰/۲۰ ± ۱/۹۸	۷/۰۶ ± ۰/۶۶	۰/۰۱۲
آپوپتوز	۰/۱۱ ± ۲۹/۶۲	۰/۴۵ ± ۱۱/۹۰	۰/۰۰۰۳
نکروز	۱۴/۲۰ ± ۱/۷۰	۶/۱۳ ± ۱/۲۰	۰/۰۳۲
زنده	۱/۵۹ ± ۵۶/۱۷	۸۱/۹۷ ± ۱/۶۵	۰/۰۰۴

مقادیر به دست آمده بر اساس انحراف معیار ± میانگین و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است. نوع آزمون آماری مورد استفاده آزمون t مستقل می‌باشد.

مطابق نتایج جدول ۲، ۹/۴۲±۲/۰۹ درصد سلول‌های Hela تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی اوره دچار آپوپتوز اولیه و حدود ۲۰/۲۰±۱/۹۸ درصد دچار آپوپتوز تأخیری شده‌اند و حدود ۱۴/۲±۱/۷۰ درصد دچار نکروز شده‌اند. این نتایج به وضوح نشان می‌دهند که درصد سلول‌های آپوپتوز شده در سلول‌های تیمار شده با نانو داروی هیدروکسی اوره نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. افزایش آپوپتوز تأخیری با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۲ و افزایش نکروز با سطح معنی‌داری ۰/۰۳۲ در گروه تیمار نسبت گروه کنترل معنی‌داری بوده ولی افزایش آپوپتوز اولیه با سطح معنی‌داری ۰/۱۱۱ اختلاف معنی‌داری را در دو گروه نشان نمی‌دهد. این در حالی است که درصد فراوانی کل آپوپتوز در سلول‌های تیمارشده (آپوپتوز اولیه و ثانویه) با میزان ۲۹/۶۲۵±۰/۱۱ درصد نسبت به گروه کنترل با میزان ۱۱/۹۰±۰/۴۵درصد حدود ۲/۵ برابر افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۰/۰۰۰۳ معنی‌دار می‌باشد. نوع و درصد مرگ سلولی آپوپتوز و نکروز سلول‌های تیمارشده توسط نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷/۶/۱ دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شد.



شکل ۴- نتایج هیستوگرام Annexin/PI در تست فلوسایتومتری آپوپتوز گروه‌های کنترل و تیمار با نانو دارو

هیستوگرام a ناحیه مورد بررسی (Gating) می‌باشد. ناحیه Q1 هیستوگرام b معرف میزان نکروز ($Annexin^-/PI^+$)، ناحیه Q2 معرف آپوپتوز تأخیری ($Annexin^+/PI^+$)، ناحیه Q3 معرف آپوپتوز اولیه ($Annexin^+/PI^-$) و ناحیه Q4 معرف سلول‌های زنده ($Annexin^-/PI^-$) می‌باشد. (در شکل فقط یک تکرار نمایش داده‌شده است)

بحث

نانوتراپی سرطان به دلیل رفع برخی از محدودیت‌های موجود در سیستم دارورسانی سنتی از قبیل عدم زیست تخریب‌پذیری دارو، عدم انحلال‌پذیری دارو در آب و شاخص‌های درمانی کم به‌سرعت در حال رشد و توسعه است و بهره‌گیری از نانو ذرات در دارورسانی نوین در جهت بهبود کیفیت انتشار و توزیع دارو، افزایش ماندگاری در سیستم گردش خون، افزایش جذب دارو، کاهش ایمونوژنیسیتی، درمان هدف‌مند و کاهش عوارض جانبی دارو می‌باشد [۱۸]. در مطالعه حاضر برای اولین بار به‌منظور افزایش خاصیت سایتوتوکسیک هیدروکسی‌اوره و دارورسانی مؤثرتر و کاهش عوارض جانبی داروی هیدروکسی‌اوره از نانو داروی کیتوسان-هیدروکسی‌اوره مگنتیک سنتزی استفاده گردید. ساختار شماتیک آن در شکل ۱ نشان داده شده است. از آن‌جایی که نانو حامل کیتوسان، انحلال‌پذیری ضعیفی در pH فیزیولوژیک دارد، در ساختار نانو حامل از ترکیب PEG استفاده شده است. هم‌چنین به‌منظور امکان هدایت هدف‌مند نانو دارو به بافت تومور و کاهش اثرات مخرب آن بر بافت‌های سالم، در ساختار نانو دارو، ذرات اکسید آهن پارامگنتیک به کار برده شده است. وجود نانو ذرات اکسیدآهن (Fe_3O_4) در ساختار نانو دارو این امکان را فراهم می‌آورد تا نانو دارو تحت میدان مغناطیسی خارجی، به محل تومور هدایت گردد. ساختار نانو دارو قبل از انجام آزمایشات توسط طیف سنجی FTIR، SEM و TEM تأیید گردید (شکل۲). نتایج این مطالعه نشان داد نانو داروی کیتوسان- هیدروکسی-اوره مگنتیک می‌تواند سبب کاهش توان زیستی رده سلولی سرطان دهانه رحم Hela و هم‌چنین القاء آپوپتوز در آنها گردد. هیدروکسی اوره به عنوان یکی از داروهای رایج در شیمی‌درمانی است [۱۹]. مطالعات نشان داده هیدروکسی اوره علاوه بر آن که مانع از تکثیر DNA در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها، ازجمله ساکارومایسس سرویزیه می‌شود [۲۰]. هیدروکسی اوره در کنار خواص درمانی آن، عوارض جانبی متعددی نیز دارد به طوری‌که سمیت هماتولوژی ناشی از درمان در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم بسیار شایع و شدید می‌باشد [۱۹].

پلی ساکارید طبیعی کیتوسان یکی از محبوب‌ترین نانو حامل‌ها در زمینه انتقال دارو محسوب می‌گردد که به دلیل خواص بسیار جالب بیولوژیک و ساختاری از قبیل خاصیت کاتیونی، حلالیت در محیط آبی، سازگاری زیستی، قابلیت تجزیه زیستی و چسبندگی بالای این نانو حامل، طرف‌داران زیادی در عرصه دارو رسانی پیدا کرده است [۱۱-۹]. کیتوسان حلالیت ضعیفی در pH فیزیولوژیک دارد. این ایراد ذاتی کیتوسان با تغییراتی از قبیل پگیلاسیون، کربوکسیلاسیون، کنجوگات مختلف، استیلاسیون و تیول دارشدن برطرف گشته و به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش ماندگاری زیستی و افزایش مدت زمان به گردش در آمدن دارو در خون و بهبود حلالیت نانو حامل شده است [۲۱]. پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلیمری غیر سمی، غیر آنتی ژنیک، محلول در آب و مورد تأیید سازمان غذا و دارو آمریکا می‌باشد. ترکیبات دارویی حاوی PEG دارای چندین مزیت از قبیل، افزایش مدت زمان ماندگاری دارو در بدن، کاهش سرعت تجزیه نانو حامل توسط آنزیم‌های متابولیکی یا حذف توسط سیستم ایمنی بدن است [۲۳-۲۲]. بنابراین کیتوسان حاوی PEG، دیرتر توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک مایعات روده و معده هضم می‌گردد [۲۱]. در بررسی حاضر اثر سایتوتوکسیک نانوداروی کیتوسان هیدروکسی اوره مگنتیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان داد (جدول ۱) توان زیستی رده سلولی Hela تحت تأثیر نانو دارو هیدروکسی اوره با افزایش غلظت از ۶۲/۵ به ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. به طوری‌که سمیت سلولی نانو دارو وابسته به دوز بوده و در مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار سلول با نانو دارو هیدروکسی اوره، در غلظت‌های بالا یعنی ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف سطح معنی‌دار نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. میزان IC50 نانو داروی هیدروکسی‌اوره مگنتیک پگیله ۳۰۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که با توجه به میزان بارگذاری ۴/۸۸ درصدی هیدروکسی اوره بر نانوحامل کیتوسان مگنتیک پگیله میزان هیدروکسی اوره موجود در ساختار نانو دارو در غلظت IC50 بر روی رده سلولی Hela، ۱۴/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید، در حالی‌که میزان IC50 گزارش شده داروی استاندارد هیدروکسی‌اوره بر روی رده سلولی Hela، ۴۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد [۲۴]. به این ترتیب سمیت سلولی نانو داروی سنتز شده بر روی رده سلولی Hela، ۲۹/۱ برابر نسبت به داروی استاندارد هیدروکسی اوره افزایش یافته است که می‌تواند به طور قابل توجه‌ای منجر به کاهش عوارض جانبی هیدروکسی اوره گردد. شکل ۳، نشان دهنده تغییر مورفولوژی و مرگ سلول‌های سرطانی Hela پس از اثر نانودارو از حالت دوکی به شکل کروی و سیتوپلاسم گرانوله شده می‌باشد. در مطالعه‌ای موافق با تحقیق حاضر، Hou و همکاران نشان دادند که نانو حامل mPEG-FA-CNP نسبت به mPEG-CNP و نانو ذرات ساده CNP به میزان بیشتری توسط سلول‌های توموری جذب شده و سمیت میتومایسین C افزایش یافت. هم‌چنین مدت ماندگاری نانو دارو در خون نیز افزایش نشان داد [۲۵]. در پژوهشی دیگر Xiaodan و همکاران نشان دادند که

نانوذرات کیتوسان در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، از آنزیم‌ها محافظت کرده و سبب اتصال مؤثر نانو دارو به سطح سلول‌های سرطان پستان انسانیBcap37 می‌شود [۲۶]، که تأیید کننده نقش نانو حامل کیتوسان در افزایش ماهیت سایتوتوکسیک داروهای ضد سرطانی مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. کیتوسان هم‌چنین کاندید مناسبی برای انتقال siRNA است، به طوری‌که Ragelle و همکاران نشان دادند که کیتوسان پگیله همراه با پلی‌اتیلن ایمین سبب خاموشی ژن در حد بالایی در شرایط in vitro شده، سایتوکسیتی پایین و پایداری زیادی در پلاسمای خون دارد [۲۷].

در یک تحقیق موافق با مطالعه حاضر که توسط Feng و همکاران انجام شد، توانایی کمپلکس پلی الکترولیتی کیتوسان و کربوکسی متیل کیتوسان حساس به pH جهت انتقال داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید به صورت خوراکی بررسی گردید. نتایج بررسی آنان نشان داد، تجویز داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید توسط نانوحامل مذکور سبب افزایش پایداری دارو در خون می‌شود. هم-چنین بر اساس بررسی‌های بیوپسی صورت گرفته بر بافت موش صحرایی تحت درمان با نانو دارو سنتزی نشان داد، استفاده از این نانو حامل سبب کاهش چشم‌گیر سمیت دارویی بر بافت کلیه و قلب شده است [۲۸]. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از تست فلوسایتومتری آپوپتوز AnnexinV-FITC/PI (جدول ۲) در این تحقیق نیز نشان داد که غلظت IC50 نانو داروی کیتوسان- هیدروکسی‌اوره مگنتیک پگیله در مدت زمان تأثیر ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری باعث مرگ سلولی با افزایش القاء آپوپتوز و نکروز به ترتیب به میزان ۲/۴۸ و ۲/۳۱ برابر در سلول‌های Hela تیمار شده با نانو دارو نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری گردید که تأیید کننده نتایج به دست آمده از سنجش سمیت سلولی نانو دارو می‌باشد. هم‌چنین القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز بیشتر از بروز نکروز سلولی بود که این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود. این یافته‌ها نیز که تأیید کننده سایر مطالعات بود بیان‌گر آن است که نانو داروی هیدروکسی اوره سنتز شده مانند هیدروکسی‌اوره قادر به القاء آپوپتوز می‌باشد و می‌تواند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کند. به عنوان مثال Iglesias-Guimarais و همکاران نشان دادند تجمع قطعات DNA شکسته شده تحت تیمار با داروی هیدروکسی اوره با سمیت سلولی مرتبط است. طی این بررسی، محققان قطعات DNA شکسته شده را مطالعه و گزارش دادند، قطعات DNA به‌صورت تکه‌های منظم الیگونوکلئوزومی است که خود یکی از ویژگی‌های بارز مرگ سلولی آپوپتوز محسوب می‌شود [۲۹]. هم چنین در پژوهشی دیگر توسط Hakan و همکارانش مشخص شد هیدروکسی اوره می‌تواند آپوپتوز را در رده‌ی سلولی انسانی Hela القاء نماید. در این تحقیق پاسخ القاء شده تحت تأثیر هیدروکسی اوره، تراکم منظم کروماتین‌ها بر دیواره هسته سلولی به همراه تشکیل اجسام آپوپتوتیک غشایی کاملاً مشهود بود [۳۰]. Singh و همکارانش گزارش کردند داروی هیدروکسی اوره علاوه بر القاء آپوپتوز، با ایجاد شکست در ساختار DNA سبب مهار سنتز DNA و توقف چرخه سلولی در فاز S نیز می‌شود [۳۱]. هم‌چنین Yeo و همکارانش نشان دادند، تیمار سلول‌های فیبروبلاستی

دیپلوئیدی انسان با هیدروکسی اوره می‌تواند سبب پیری سلولی از طریق القای ژن‌های P53 و p21(Waf1) گردد و رشد سلول‌ها را متوقف کند. افزایش P53 که حاصل القاء هیدروکسی اوره می‌باشد می‌تواند سبب القاء آپوپتوز و مرگ سلولی نیز گردد [۳۲] که در تأیید نتایج حاصل از این تحقیق می‌باشد. از آن‌جایی که این مطالعه آزمایشگاهی است با محدودیت‌هایی مواجه است و نمی‌توان نتایج آن را به جامعه انسانی تعمیم داد، لذا پیشنهاد می‌شود برای استفاده از نتایج حاصل از آن، تحقیقات گسترده‌تری به منظور بررسی عوارض جانبی نانو دارو بر روی سلول‌های سالم و هم‌چنین در شرایط درون-تنی بر روی مدل‌های حیوانی نیز انجام گیرد. ضمناً پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌های آتی به ارزیابی اثر این نانو داروی هیدروکسی اوره بر روی سایر سرطان‌ها و بیماری‌هایی نظیر کم خونی که در آنها از هیدروکسی اوره جهت درمان استفاده رایج می‌شود نیز پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد نانو داروی مگنتیک کیتوسان هیدروکسی اوره سبب کاهش توان زیستی سلول‌های سرطان دهانه رحم Hela به‌صورت وابسته به دوز می‌شود. هم‌چنین به‌صورت معناداری باعث القاء مرگ آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد. این یافته‌ها نشان داد که نانو داروی هیدروکسی اوره به عنوان یک داروی ضد سرطان احتمالاً دارای اثر پذیری مناسبی با دوز کمتر نسبت به داروی هیدروکسی اوره در درمان سرطان می‌باشد و در صورت انجام بررسی‌های درون‌تنی به منظور کاهش عوارض جانبی دارو می‌توان آن را جایگزین داروی ضد سرطان استاندارد هیدروکسی اوره نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق (قیام دشت) و واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری جهت حمایت اجرایی در انجام این پایان نامه نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

References

[1] Speck N, Pinheiro J, Pereira E, Rodrigues D, Focchi G, Ribalta J. Cervical cancer screening in young and elderly women of the Xingu Indigenous Park: evaluation of the recommended screening age group in Brazil. *Einstein* 2015; 13(1): 52-7.

[2] Sudhakar, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J Cancer Sci Ther* 2009; 1(2): 1-4.

[3] Dragojevic S, Ryu J, Raucher D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules* 2015; 20(12): 21750-69.

[4] Ballas S, Singh P, Adams, P –Graves, Cindy J Wordell . Idiosyncratic Side Effects of Hydroxyurea in Patients with Sickle Cell Anemia. *J Blood Disord Transfus* 2013; 4(5): 162-4.

[5] Nazaretyan SA, Savic N, Sadek M, Hackert BJ, Courcelle J, Courcelle CT. Replication rapidly recovers and continues in the presence of hydroxyurea in Escherichia coli. *J Bacteriol* 2018; 200: e00713-17.

[6] Khan, D.R. The use of nanocarriers for drug delivery in cancer therapy. *J Cancer Sci Ther* 2010; 2(3): 58-62.

[7] Hardainiyan S, Chandra Nandy B, Nakuleshwar Dut Jasuja, Vyas, Pramod K Ragha v. Recent Trends in Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems. *The Pharma Innovation* 2013; 2(6): 1-6.

[8] Sailaja, A.K. P. Amareshwar, and P. Chakravarty, Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2010; 1(3): 474-84.

[9] Elgadir M.A, Salim Uddin Md, Ferdosh S, Adam A, Jalal Khan A, Chowdhury et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *J Food Drug Anal* 2015; 23(4): 619-29.

[10] Rodrigues S, Dionísio M, Remuñán L, Grenha A. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *J Funct Biomater* 2012; 3(3): 615-41.

[11] Aruna U, Rajalakshmi R, Indira Muzib Y, Vinesha V, Sushma M, Vandana KR and Vijay Kumar. Role of Chitosan Nanoparticles in Cancer Therapy International. *Int J Innov. Pharm Sci Res* 2013; 4(3): 318-24.

[12] Zhong H, Lei X, Qin L, Wang J, Hun T. Augmentation of adenovirus 5 vector-mediated gene transduction under physiological pH conditions by a chitosan/NaHCO3 solution. *Gene ther* 2011; 18(3): 232-9.

[13] Unsoy G, Khodadust R, Yalcin S, Mutlu P, Gunduz U. Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2014; 1(62): 243-50.

[14] Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H. Preparation and characterization of amino–silane modified

superparamagnetic silica nanospheres. *J Magn Magn Mater* 2004; 270(1-2): 1-6.

[15] Qu J, Liu G, Wang Y, Hong R. Preparation of Fe_3O_4–chitosan nanoparticles used for hyperthermia. *Adv. Powder Technol* 2010; 21(4): 461-7.

[16] Bikhof Torbati M, Ebrahimian M, Yousefi M, Shaabanzadeh M. GO-PEG as a drug nanocarrier and its antiproliferative effect on human cervical cancer cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017; 45(3): 568-73.

[17] Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *JoVE* 2011; 50: 2597-601.

[18] Hamidi M; Azadi A; Rafiei P; Ashrafi H. A pharmacokinetic overview of nanotechnology-based drug delivery systems: an ADME-oriented approach. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2013; 30(5): 435–67.

[19] Madaan K, Kaushik D, Verma T, Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; 12(1): 19-29.

[20] Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 223-30.

[21] Chopra S, Jasjeet M, Zeenat K, Sushma I, Talegaonkar Farhan J. Ahmad Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58(8): 1021-32.

[22] Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhirs S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2011; 6(4): 715-28.

[23] Jung S, Qingguo X, Namho K, Justin H, Laura M. *Ensign*. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99(Pt A): 28-51.

[24] Ruswanto, Miftah AM, Tjahjono DH, Siswandono. Synthesis and in vitro Cytotoxicity of 1-Benzoyl-3-methyl thiourea Derivatives. *Procedia Chem* 2015; 17: 157-61.

[25] Hou Z, Zhan C, Jiang Q, Hu Q, Li L, Chang D, et al. Both FA-and mPEG-conjugated chitosan nanoparticles for targeted cellular uptake and enhanced tumor tissue distribution. *Nanoscale Res Lett* 2011; 6(1): 563-74.

[26] Xiaodan C, Chao C, Yu H, Wang P. Horseradish peroxidase-encapsulated chitosan

nanoparticles for enzyme-prodrug cancer therapy. *Biotechnol Lett* 2015; 37(1): 81-8.

[27] Ragelle H.R, Riva G, Vandermeulen B, Naeye V, Pourcelle C.S, Le Duff, et al. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J. Control. Release* 2014; 176: 54-63.

[28] Feng C, Wang Z, Jiang C, Kong M, Zhou X, Li Y, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2013; 457(1): 158-67.

[29] Iglesias-Guimarais V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, García-Belinchón M, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, et al. Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease. *J Biol Chem* 2012; 287(10): 7766-79.

[30] Hakan A, Osman O. Hydroxyurea Induces P53 Accumulation and Apoptosis in Human Cervical Carcinoma Cells. *Turk J Biol* 2002; 26: 145-50.

[31] Singh A, Xi Y-J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes* 2016; 7(11): 99-114.

[32] Yeo EJ , Hwang YC, Kang CM, Kim IH, Kim DI, Parka JS, et al. Senescence-like Changes Induced by Hydroxyurea in Human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 2000; 35(5): 553-71.

[33]. Alavi E, Koohi Moftakhari Esfahani M, Akbarzadeh A, Hassanshahi G. In Vitro Evaluation of the Efficacy of Liposomal and Pegylated Liposomal Hydroxyurea. *Indian J Clin Biochem* 2014; 29(1): 84-8.

The Study of Anticancer Effect of Magnetic Chitosan-Hydroxyurea Nanodrug on HeLa Cell line: A Laboratory Study

E. Khakrizi[1], M. Bikhof Torbati[2], M. Shaabanzadeh[3]

Received: 06/01/2018 Sent for Revision: 29/04/2018 Received Revised Manuscript: 17/07/2018 Accepted: 17/07/2018

Background and Objectives: Drug nanocarriers have usually optimized features which facilitate cellular uptake and increase drug efficacy, prevent drug degradation against enzymatic factors and decrease drug complications by targeted drug delivery to cancer cell. This study aimed to determine the anti-cancer nature of the synthesized magnetic Chitosan-hydroxyurea nanodrug on HeLa cell line, cervical cancer, and to determine the effective dose of the nanoparticle in order to remove cancerous cells.

Materials and Methods: In this laboratory study, after analyzing the structure of synthesized magnetic nanoparticles and culture of HeLa cell line, cells were incubated with different concentrations of nanodrug for 48 h. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method was used in order to evaluate the vital activity of the cells. For analyzing induction of apoptosis, the Annexin-PI kit was used by flow-cytometry. Data were analyzed using one-way ANOVA and independent t-test.

Results: The viability of the cells decreased in a dose dependent manner by increasing the concentration of nano-drug hydroxyurea. So, at the concentrations of 1000 ($p<0.001$) and 2000 ($p<0.05$) µg/ml, a significant difference was observed compared to the control group. The results also demonstrated that the nanodrug significantly increased apoptosis induction 2.48 times in the treated HeLa cells in comparison with the control group ($p=0.0003$).

Conclusion: Hydroxyurea nanodrug has a cytotoxic enhancement effect on the Hela cancer cell line and can induce apoptosis.

Keywords: Hydroxyurea, Chitosan, HeLa cells, Antineoplastic agents, Apoptosis

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University, East Tehran Branch approved the study.

How to cite this article: Khakrizi E, Bikhof Torbati M, Shaabanzadeh M. The Study of Anticancer Effect of Magnetic Chitosan-Hydroxyurea Nanodrug on HeLa. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (8): 715-30. [Farsi]

1- BSc Student of Genetic, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0003-2359-2881

2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Yadegar-e-Imam Khomeini(RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-8784-8589

(Corresponding Author) Tel: (021) 55229201, Fax: (021) 55229369, E-mail: maryam.bikhof@gmail.com

3- Assistant Prof., Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, ORCID: 0000-0002-4065-6798