

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی متوتروکسات کونژوگه شده با دندریمر پلی آمیدو آمین نسل ۴ به صورت کوالانسی بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7: یک مطالعه تجربی

فریدون عابدی گیلو^۱، بهزاد منصوری^۲، غلامرضا دهقان^{۳*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۴/۳۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: دندریمر پلی آمیدو آمین ماکرومولکولی با شاخه‌های زیاد، در مقیاس نانو، و با گروه‌های آمینی بسیار فعال در سطح خود است، که به آن اجازه اتصال به داروهای ضد سرطانی، از جمله متوتروکسات را می‌دهد. هدف از مطالعه حاضر سنتز و بررسی خواص ساختاری کمپلکس دندریمر پلی آمیدو آمین-متوتروکسات و سپس بررسی توانایی سمیت سلولی کمپلکس سنتز شده بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 است.

مواد و روش کار: برای انجام این مطالعه تجربی، ابتدا متوتروکسات به واسطه EDC (Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) به دندریمر نسل ۴ متصل شد و سپس به وسیله طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوری و dynamic light scattering خواص ساختاری آن تعیین شد. جذب سلولی نانو ذرات به صورت کمی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. آزمون methylthiazol tetrazolium (MTT) و رنگ‌آمیزی 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) dihydrochloride به ترتیب برای ارزیابی توانایی القاء سمیت سلولی و آپوپتوز سلولی توسط دندریمر - متوتروکسات و متوتروکسات به فرم آزاد بر روی سلول‌های MCF-7 استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌های این مطالعه نشان داد، که کمپلکس دندریمر- متوتروکسات اندازه $(30 \pm 7/29)$ نانومتر و بار $(4/37 \pm 5/35)$ میلی ولت مناسب داشت. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که اتصال متوتروکسات به دندریمر پلی آمیدو آمین، میزان جذب سلولی را در مقایسه با دندریمر خالی، ۱۸ درصد افزایش داد. نتایج سمیت سلولی و رنگ‌آمیزی هسته سلولی نشان داد، که سمیت سلولی و القای آپوپتوز سلول‌های MCF-7 تیمار شده با دندریمر- متوتروکسات، نسبت به متوتروکسات آزاد کم‌تر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که اگرچه کمپلکس دندریمر- متوتروکسات جذب سلولی بیشتری داشت اما سمیت سلولی و آپوپتوز کم‌تر از متوتروکسات آزاد بود.

کلیدواژه‌ها: متوتروکسات، دندریمر، آپوپتوز، سمیت، جذب سلولی

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره پنجم، ص ۳۹۲-۳۸۱، مرداد ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تلفن: +۹۸۳۳۳۹۲۷۱۷

Email: dehghan2001d@yahoo.com

مقدمه

کشورهای کم‌تر توسعه یافته به شمار می‌رود (۱، ۲). سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در میان زنان است. بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر دچار سرطان پستان می‌شود. بر اساس آمارهای ایران، از هر ۱۰ تا ۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد اما سن بروز سرطان پستان در بین زنان ایرانی دست‌کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است (۳، ۴). روش‌های درمان سرطان با توجه به نوع

سرطان، نوعی بیماری مزمن و غیر واگیر است که طیف وسیعی از اختلالات را موجب می‌شود. این بیماری در حال حاضر یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامتی افراد و از شایع‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در سطح جهان است. سرطان، دومین عامل شایع مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی در سراسر جهان و کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی و حوادث در

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ دانشجوی دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ استاد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

و بعد از تعیین خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانوذرات، سمیت سلولی و القاء آپوپتوز القاء شده با نانوذرات بر روی سلول‌های MCF-7 با استفاده از تست MTT و رنگ‌آمیزی DPAI ارزیابی شد.

مواد و روش کار

در مطالعه تجربی حاضر، نانو ذره دندریمر نسل ۴ از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شد. سپس محلول (۲ mg/ml) از نانو ذره دندریمر (محلول در متانول) تهیه شد. در مرحله بعد داروی متوتروکسات (۳ mg/ml) محلول در DMSO تهیه شد، و برای فعال سازی گروه کربوکسیل موجود در متوتروکسات، EDC به مقدار ۵ mg/ml اضافه گردید و عمل مخلوط کردن روی استیریر صورت گرفت. برای انجام واکنش بین گروه‌های آمین از نانو ذره دندریمر با گاما کربوکسیلیک فعال شده از داروی متوتروکسات، مقدار مشخصی از نانو ذره دندریمر را با مقدار مشخصی از متوتروکسات فعال شده با EDC مخلوط کرده (نسبت ۱:۲ دندریمر: متوتروکسات) و سپس اجازه داده شد تا به مدت سه روز در تاریکی کامل روی استیریر عمل انجام واکنش صورت گیرد. از آنجایی که بدیهی است تمام متوتروکسات کاملاً به نانو ذره متصل نخواهد شد، لذا برای حذف داروی متوتروکسات و EDE آزاد (واکنش نداده)، مقداری از کونژوگه های سنتز شده (دندریمر- متوتروکسات)، به داخل کیسه دیالیز با سطح مقطع ۱۰ کیلو دالتون منتقل شد و کیسه‌ی حاوی کونژوگه به داخل بشر حاوی ۵۰ میلی لیتر PBS قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق استیریر گردید.

تعیین خصوصیات فیزیکی شیمیایی دندریمر:

اندازه، ضریب پراکندگی و بار سطحی نانو ذره دندریمر خالی و دندریمر- متوتروکسات با استفاده از اسپکتروفتومتری DLS (dynamic light scattering, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument) در ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۱۹). هم- چنین برای بررسی صحت اتصال متوتروکسات به نانوذره دندریمر از طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (Fourier transform infrared spectroscopy) استفاده شد (۲۰).

کشت و تیمار رده سلولی سرطان پستان MCF-7:

رده سلولی MCF-7 از انستیتوی پاستور ایران تهیه شد. بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها در مرکز تحقیقات ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، در داخل ۷ میلی لیتر محیط

سرطان، میزان پیشرفت بیماری و سن ابتلا به این بیماری متفاوت است، اما در حال حاضر شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی از روش‌های اصلی درمان سرطان به شمار می‌روند که از این میان، شیمی‌درمانی به‌طور گسترده برای درمان سرطان به کار می‌رود (۵)، شیمی‌درمانی استفاده از داروهای گوناگون باهدف درمان، کنترل و یا تسکین نشانه‌های ناشی از سرطان است، که با توجه به نوع سرطان و درجه پیشرفت آن انجام می‌شود. داروهای شیمی‌درمانی در اغلب موارد عوارض جانبی از جمله عدم اختصاصی بودن، توزیع دارو بین سلول‌های سالم و سرطانی، سمیت بالا، مشکل عدم حالت دارو دفع سریع کلیوی و واکنش دارو از طریق گروه فعال خود با پروتئین‌های آزاد در گردش خون را به همراه دارند که استفاده از آن‌ها را برای درمان سرطان محدود می‌کند (۷، ۸). متوتروکسات از جمله داروهای ضد سرطان است که برای درمان انواع خاصی از سرطان‌ها از جمله پستان، پوست، سر و گردن و ریه استفاده می‌شود (۹، ۱۰). متوتروکسات مهارکننده رقابتی تولید فولیک اسید است که با اتصال به آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) از تبدیل دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات جلوگیری می‌کند (۱۱). فولات برای ساخت طبیعی پورین‌ها و پیریمیدین‌ها و در نتیجه ساخت DNA و RNA ضروری است. فولات برای ایفای نقش خود به‌عنوان کوفاکتور باید به‌وسیله آنزیم DHFR به تتراهیدروفولات تبدیل شود. متوتروکسات به آنزیم DHFR اتصال یافته و از تبدیل دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات جلوگیری می‌کند، در نتیجه از سنتز پورین و پیریمیدین جلوگیری می‌شود. تمایل متوتروکسات به اتصال به آنزیم DHFR هزار برابر دی هیدروفولات است (۱۲، ۱۳). انتقال داروها به‌ویژه داروهای شیمی‌درمانی به‌واسطه استفاده از نانوذرات به‌عنوان راهکاری مؤثر پیشنهاد شده و در مطالعات مختلفی داروهای شیمی‌درمانی را با نانوذرات مختلف به داخل سلول‌های سرطانی منتقل کرده‌اند (۱۴-۱۶). از جمله نانوذراتی که برای انتقال داروهای ضد سرطانی به‌مراتب بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است، نانوذره دندریمر است (۱۷). اولین خانواده از دندریمرهای تجاری شده، نوع دندریمر پلی آمیدو آمین (PAMAM) است. در مورد سری PAMAM، اندازه (قطر) به ازای هر نسل به‌اندازه یک نانومتر افزایش می‌یابد به‌طوری‌که از نسل ۱ تا نسل ۱۰ این قطر بین ۱/۱ تا ۱۲/۴ نانومتر تغییر می‌کند (۷، ۱۸). تعداد زیادی از واحدهای شیمیایی تکراری در داخل دندریمرها (مونومرهای سلولی شاخه‌دار منشعب) باعث القا خاصیت نانو حاملی در نسل‌های ۴ و بالاتر می‌شود. در مقایسه با پلیمرهای خطی، دندریمرها دارای گروه‌های انتهایی فعال چند ظرفیتی می‌باشند که آن‌ها را برای ایفای نقش به‌عنوان حامل‌های دارویی، مطرح ساخته است. در مطالعه حاضر ابتدا، داروی متوتروکسات به سطح نانو ذره PAMAM متصل شده

بدون FBS حاوی رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از متوتروکسات و متوتروکسات-نانو ذره دندریمر جایگزین شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط حاوی ترکیبات دارویی فوق دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کامل به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط کشت انکوبه شدند. ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (با غلظت 2 mg/ml) به هر خانه اضافه شد و سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی برای مقایسه استفاده شدند. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط به دقت برداشته شده و ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر خانه اضافه گردید. سپس، پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و جذب فرمازین در 570nm با استفاده از دستگاه سنجش الایزا سنجیده شد. مانایی نسبی به شکل درصد سلول‌های زنده به سلول‌های تیمار نشده نشان داده شد و بررسی اثر درمانی کمپلکس هر غلظت از داروها در گروه‌های ذکر شده در سه چاهک تکرار شد.

بررسی آپوپتوز به روش رنگ‌آمیزی DAPI:

برای بررسی القاء آپوپتوز به روش کیفی (مورفولوژی هسته سلول‌ها)، آزمون رنگ‌آمیزی فلورسنت DAPI انجام شد. بدین منظور سلول‌های MCF-7 به تعداد 2×10^5 عدد در هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای که کف آن با لامل استریل پوشانده شده بود کشت داده شد، و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با گروه‌های دارویی متوتروکسات و متوتروکسات-دندریمر (با غلظت IC50) به مدت ۴ ساعت تیمار شدند و سپس مایع رویی حاوی گروه دارویی با ۲ میلی لیتر از محیط کشت کامل جایگزین شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. در نهایت محیط رویی دور ریخته شده و با PBS شستشو داده شده و با محلول Triton X100 به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون سلول‌ها دوباره با PBS شستشو و با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شدند. بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌ها رنگ اضافی از روی سلول‌ها با PBS شستشو داده شده و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس عکس برداری شد (۲۱).

آنالیز آماری:

برای افزایش دقت آزمایش، کلیه بررسی‌ها به‌صورت سه تکرار صورت گرفتند. تمامی داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph pad prism v6.07 (Graph pad Software, USA) و واریانس دو طرفه مورد آنالیز قرار گرفت و $PV < 0.05$ به‌عنوان نتیجه معنی‌دار در نظر گرفته شد.

کشت RPMI-1640 حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین U/ml ۱۰۰ استرپتوماسین ۱۰۰ mg/ml و ۱۰ درصد سرم گوساله تازه متولد شده (FBS۲) عمل یخ زدائی سلول‌ها انجام شد. سلول‌های دفریز شده به فلاسک ۷۵ میلی لیتر منتقل شده و بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم بالای ۷۰ درصد، سلول‌ها با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد از ته فلاسک جدا شدند. عمل پاساژ سلولی روی سلول‌ها انجام گرفت و سلول‌های پاساژ سوم برای انجام آزمایشات سلولی به کار گرفته شدند.

جذب سلولی نانو ذرات:

در ابتدا نانو ذره دندریمر با FITC با نسبت (۱:۱ مول: مول) نشاندار شد و سپس میزان جذب سلولی آن با استفاده از فلوسایتومتری ارزیابی شد. برای این منظور، رده سلولی MCF-7 با تراکم 5×10^4 سلول در یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و از نظر مورفولوژی و سیالیت کنترل گردید. سپس سلول‌های مذکور با غلظت ۱ میکرومولار از نانو ذره خالی و دندریمر-متوتروکسات نشاندار شده با FITC مواجهه گردیده و برای ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت، برای آنالیز کمی محیط کشت دور ریخته شده و سلول‌ها سه بار با PBS (pH ۷/۴) شسته شدند. عمل تریپسین کردن در rpm ۱۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جهت به‌دست آوردن پلاک سلولی در سانتریفیوژ یخچال دار انجام شد و در نهایت در PBS (PH 7.4) حل شده و با استفاده از فلوسایتومتری آنالیز شد. شدت فلورسانس FITC در طول موج ۴۹۰ نانومتر بررسی شد. برای هر نمونه، 1×10^4 عدد سلول جمع‌آوری شده و نتایج توسط نرم‌افزار Win MDI آنالیز شد.

بررسی سمیت سلولی متوتروکسات و کمپلکس دندریمر-متوتروکسات:

سمیت سلولی متوتروکسات و کمپلکس آن با نانو ذره دندریمر بر علیه رده سلولی MCF-7 توسط تست MTT ارزیابی شد. برای این منظور، ابتدا هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت FBS 10% RPMI حاوی ۱۰ هزار سلول پر شد. از آنجایی‌که سلول‌های MCF-7 چسبنده هستند و جهت ارزیابی باید در شرایط نرمال رشد قرار داشته باشند، تمامی آزمایشات بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون و چسبیدن کامل سلول‌ها به کف پلیت و همین‌طور رسیدن به تراکم بالای ۷۰ درصد انجام شد. پس از این زمان انکوباسیون، محیط رویی با محیط جدید RPMI

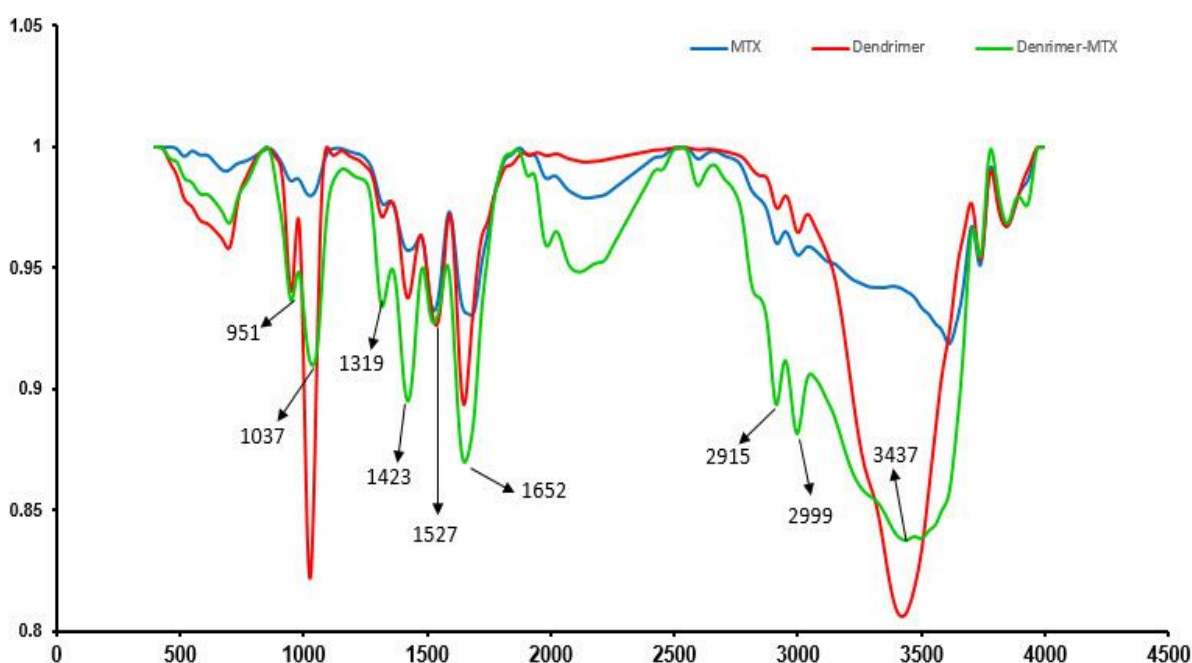
² Fetal Bovine Serum

¹ Roswell Park Memorial Institute 1640

یافته‌ها

نتایج FTIR برای نانوذره دندریمر، متوتروکسات، و دندریمر-متوتروکسات در شکل ۱ مشاهده می‌شود. تغییرات در طیف جذبی در FTIR بعد از اتصال متوتروکسات بر روی سطح نانو ذره دندریمر قابل مشاهده می‌باشد، طیف جذبی در 3437cm^{-1} مربوط به N-H (آمین‌های نوع اول، دوم و آمیدها کششی) و O-H مربوط به نانو ذره دندریمر و متوتروکسات هستند. طیف‌های جذبی 2999cm^{-1} و 2915cm^{-1} به پیوند C-H از آلکانها (کششی) متعلق هستند. طیف 1652cm^{-1} به گروه‌های C=O و ارتعاش کششی NH₂- (اشاره شده به‌عنوان پیوند آمید I) مربوط است که نشان‌دهنده وجود

پیوند آمیدی در کمپلکس دندریمر-متوتروکسات است. همچنین طیف‌های $1423/17$ ، $1319/43$ ، $1037/33$ ، $951/51$ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H، C-O، N-O، -CH₃ هستند. از عمده تغییراتی که بعد از اتصال متوتروکسات به نانو ذره دندریمر مشاهده می‌شود، می‌توان به شیفت طیف جذبی از 1650cm^{-1} در دندریمر خالی، به 1652cm^{-1} در دندریمر-متوتروکسات اشاره کرد، عمق و پهنای این باندها در دندریمر-متوتروکسات نسبت به دندریمر خالی بیشتر شده است و نشانگر تشکیل پیوند آمیدی در این ناحیه است. همچنین طیف 1537cm^{-1} در دندریمر خالی به 1527cm^{-1} در دندریمر-متوتروکسات انتقال یافته است.

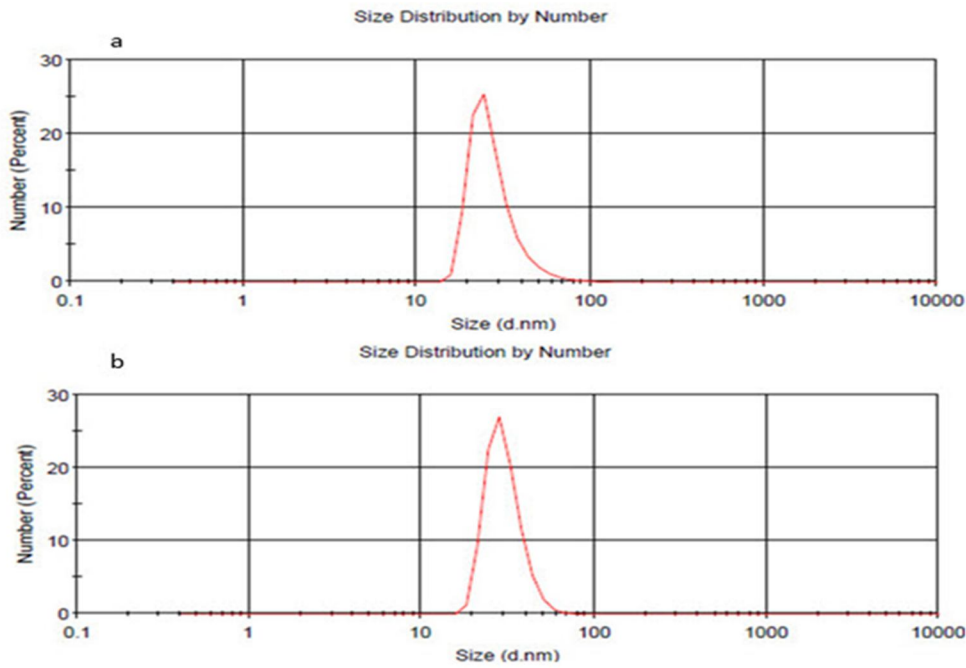


شکل (۱): طیف جذبی FTIR را برای متوتروکسات، نانو ذره دندریمر خالیو دندریمر-متوتروکسات را نشان می‌دهد.

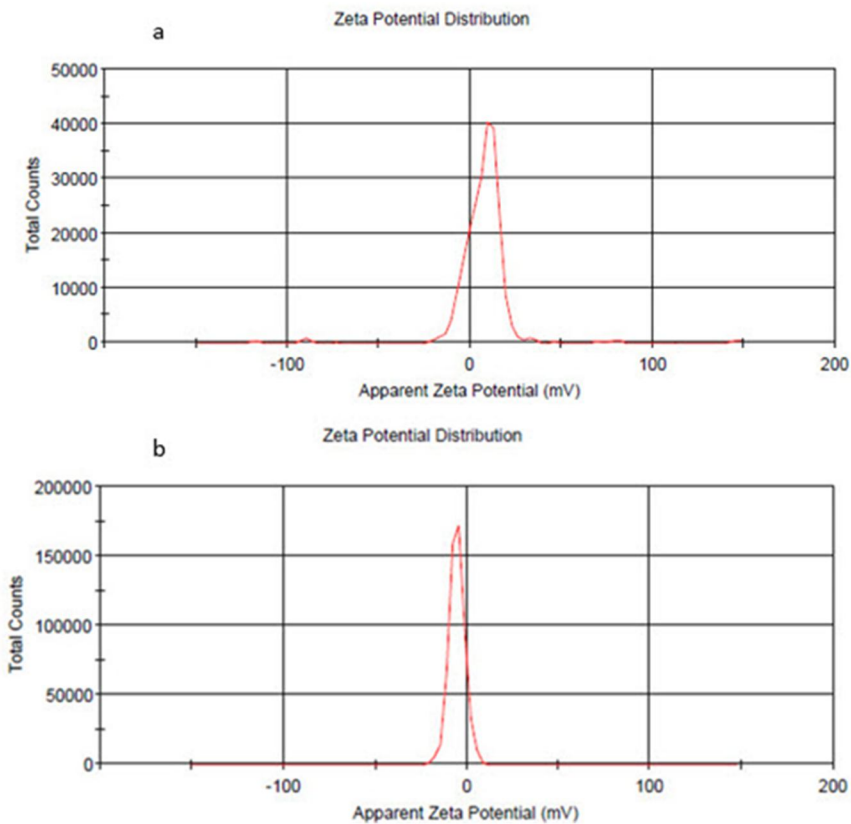
۱ اندازه و بار سطحی نانوذره دندریمر و دندریمر-متوتروکسات:

همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، اندازه نانو ذره دندریمر خالی برابر $27/51 \pm 9/73$ نانو متر می‌باشد، این در حالی است که بعد از اتصال داروی متوتروکسات به سطح نانو ذره، اندازه کونژوگه

(دندریمر-متوتروکسات) به $30 \pm 7/29$ نانو متر افزایش یافته است. همچنین ۹۶ درصد از بار سطحی نانو ذره دندریمر خالی برابر $7/14 \pm 8/13$ میلی ولت مثبت بوده و برای نانو ذره کونژوگه به $5/35 \pm 4/37$ - میلی ولت کاهش یافته است (شکل ۳) که می‌تواند مربوط به پوشش سطحی نانوذره دندریمر توسط متوتروکسات باشد.



شکل (۲): اندازه نانو ذره دندریمر خالی و دندریمر - متوتروکسات که با استفاده از DLS اندازه‌گیری شده است. a. و b به ترتیب نشان‌دهنده اندازه نانو ذره دندریمر خالی و دندریمر - متوتروکسات است.

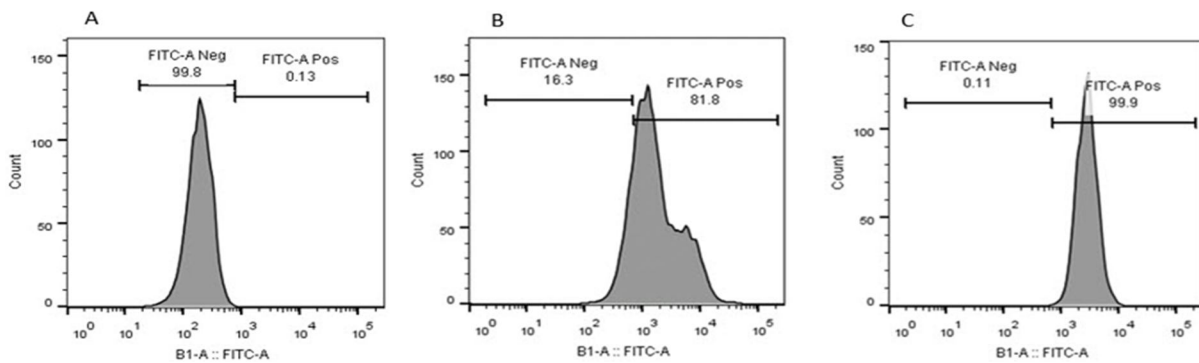


شکل (۳): بار سطحی نانو ذره دندریمر خالی و دندریمر- متوتروکسات که با استفاده از DLS اندازه‌گیری شده است. a. و b به ترتیب نشان‌دهنده بار سطحی نانو ذره دندریمر خالی و دندریمر - متوتروکسات است.

جذب سلولی نانو ذرات:

دندریمر خالی نشاندار شده با FITC تیمار می‌شود، ۸۱/۸ درصد سلول‌ها از نظر FITC مثبت بودند (شکل ۴-B)، به علاوه ۹۹/۹ درصد از سلول‌های تیمار شده با نانو ذره دندریمر-متوتروکسات نشاندار شده هم از نظر FITC مثبت می‌باشند (شکل ۴-C). مثبت بودن سلول‌ها از نظر FITC، نشان دهنده جذب سلولی موفقیت آمیز نانو ذره و کونژوگه نشان‌دار شده با FITC است.

آنالیز نتایج مربوط به جذب سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری نشان داد که ۹۹/۸ درصد سلول‌های تیمار نشده از نظر FITC منفی بودند (شکل ۴-A)، بدین معنی که سلول‌ها هیچ سیگنالی مینی بر جذب رنگ FITC را نشان ندادند. این در حالی است که وقتی سلول‌های MCF-7 با ۱ میکرو مولار از نانو ذرات

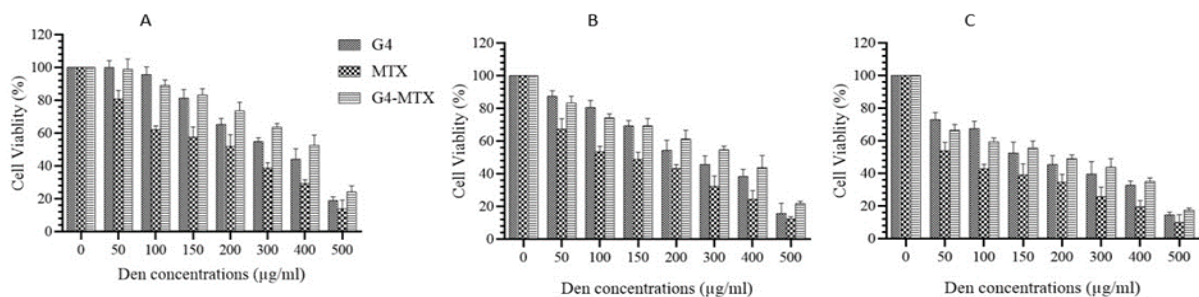


شکل (۴): جذب سلولی نانو ذره دندریمر و دندریمر-متوتروکسات نشاندار شده با FITC به وسیله فلوسایتمتری را نشان می‌دهد (غلظت نانو ذرات ۱ میکرومولار بوده و زمان تیمار ۴ ساعت است). A، B و C به ترتیب نشان‌دهنده گروه کنترل، نانو ذره خالی و دندریمر-متوتروکسات می‌باشد.

ارزیابی میزان سمیت سلولی با تست MTT:

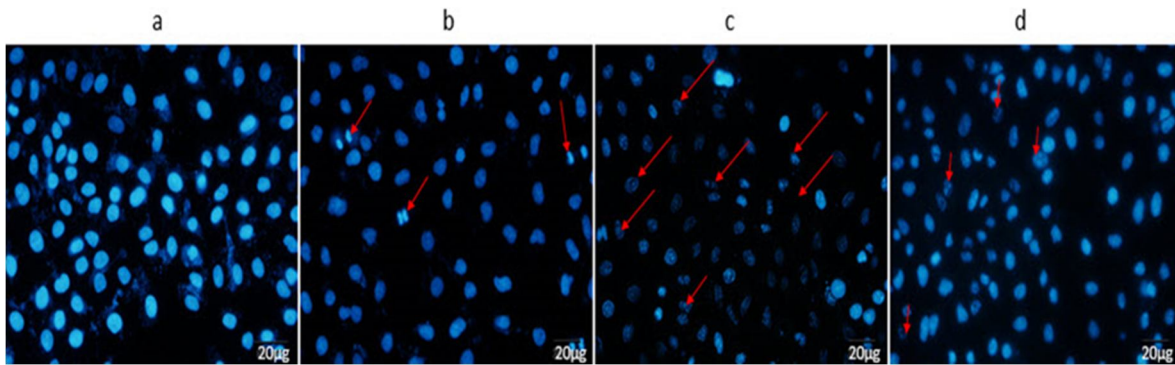
زمان اثر می‌باشد، چنانکه که با افزایش غلظت متوتروکسات و گذشت زمان، اثرات سایتوتوکسیک افزایش می‌یابد. این در حالی است که در همین غلظت‌ها و زمان‌های مورد مطالعه دندریمر-متوتروکسات اثر سایتوتوکسیک کمتری در مقایسه با متوتروکسات به فرم آزاد از خود نشان داد. برای مثال مقدار IC50 به دست آمده برای متوتروکسات آزاد در ۷۲ ساعت برابر با ۸۲/۱۲ $\mu\text{g/ml}$ بود، این در حالی است که همین کمیت در بازه زمانی یاد شده، برای کونژوگه دندریمر-متوتروکسات برابر ۱۶۹/۹ $\mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

جهت بررسی و تعیین اثرات سمی متوتروکسات به فرم آزاد و کونژوگه آن با نانو ذره دندریمر (دندریمر-متوتروکسات) و تعیین IC50 آزمایش MTT انجام گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از متوتروکسات به فرم آزاد و دندریمر-متوتروکسات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۵ A، B، C نشان داده شده است. نتایج MTT نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی MCF-7 تیمار شده با متوتروکسات نسبت به سلول‌های کنترل اثر سایتوتوکسیک بیشتری نشان داد و این اثرات وابسته به غلظت و



شکل (۵): اثرات سایتوتوکسیک متوتروکسات و دندریمر-متوتروکسات روی سلول‌های MCF-7. A، B و C به ترتیب اثرات سایتوتوکسیک متوتروکسات و دندریمر-متوتروکسات را در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.

کروماتین بود (شکل ۶). همانطور که مشاهده می‌شود تغییرات فوق در هسته سلولی گروه کنترل (یکدست و سالم) مشاهده نمی‌شود (شکل ۶ - a). این در حالی است که در سلول‌های تیمار شده با داروی متوتروکسات و دندریمر - متوتروکسات، علایم آپوپتوز کاملاً مشاهده می‌شود، و شدت آپوپتوز در گروه‌های تیمار شده با متوتروکسات در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر است.



شکل ۶): رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های MCF-7 با رنگ DAPI جهت ارزیابی کیفی آپوپتوز را نشان می‌دهد. a، b، c و d به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های سالم (کنترل منفی)، سلول‌های تیمار شده با نانو ذره دندریمر (کنترل مثبت)، سلول‌های تیمار شده با متوتروکسات و سلول‌های تیمار شده با دندریمر - متوتروکسات. مدت‌زمان تیمار ۷۲ ساعت است.

بحث و نتیجه‌گیری

ناخواسته مواد لازم جهت تسریع رشد سلول‌های سرطانی را فراهم نموده‌ایم. در نتیجه به نظر می‌رسد متوتروکسات یک جایگزین بسیار مناسب برای استفاده به‌عنوان لیگاند می‌باشد (۲۴). لذا در مطالعه حاضر، جهت استفاده از مزیت لیگاندی متوتروکسات، آن را به‌صورت کوآلانسی به سطح نانوذره دندریمر متصل کردیم و تأثیر کونژوگه (نانو حامل) دندریمر- متوتروکسات بر روی جذب سلولی، سمیت سلولی و آپوپتوز ارزیابی شد.

مطالعات زیادی در جهت سنتز کونژوگه داروهای ضد سرطانی با پلی‌مرها و نانو ذرات پلی‌مری، پلی‌پپتیدها و پلی‌دکستران‌ها به‌منظور افزایش خاصیت ضد سرطانی و کاهش عوارض سیستمیک دارویی انجام شده است. در مطالعه حاضر ابتدا داروی متوتروکسات به‌واسطه استفاده از EDC به سطح نانو ذره دندریمر متصل شد و آنالیز طیف‌های FTIR نشان داد که پیوند آمیدی در کونژوگه دندریمر- متوتروکسات در طیف‌های 1652cm^{-1} و 3437cm^{-1} تشکیل شده است، که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن اتصال متوتروکسات به نانوذره دندریمر به‌واسطه پیوند کوآلانسی می‌باشد. از آنجایی‌که برای اتصال متوتروکسات به دندریمر از EDC استفاده شده است، این نتیجه منطقی بوده و هم راستا با نتایج پژوهشی است که در سال ۲۰۰۹ توسط ژانگ و همکارانش به دست آمد (۲۵). و آن اینکه به‌دلیل اتصال کوآلانسی دارو به دندریمر احتمال جداشدن

رنگ‌آمیزی DAPI جهت بررسی کیفی آپوپتوز:

نتایج این آزمون نشان داد که به دنبال مواجه شدن سلول‌های MCF-7 با داروی متوتروکسات آزاد و دندریمر- متوتروکسات به مدت ۷۲ ساعت با غلظت IC_{50} ، تغییرات در مورفولوژی هسته سلولی (علایم آپوپتوز) مشاهده شد، و این تغییرات شامل قطعه قطعه شدن هسته، فشرده شدن کروماتینی و قطعه قطعه شدن

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های شناخته شده در بین زنان در سراسر دنیا است. اگرچه گزینه‌های درمانی مرسوم از جمله شیمی‌درمانی و پرتو درمانی، پیشرفت‌های قابل‌توجهی داشته‌اند، اما درمان سرطان به حد مطلوب نرسیده و به‌عنوان یک چالش بالینی اساسی مطرح می‌باشد (۲۲). بنابر این، به نظر می‌رسد که طراحی حامل‌های مناسب جهت تحویل مقادیر مناسب دارو به داخل سلول‌های سرطانی جهت نجات جان بیماران مبتلا بسیار حیاتی است. جهت اینکار موارد مختلفی از جمله ویژگی‌های لیگاند (اندازه، اختصاصیت به گیرنده و همچنین تمایل اتصال به گیرنده)، توپوگرافی گیرنده، نوع لینکر باید کاملاً مورد دقت و نظر قرار گیرند (۲۳). متوتروکسات به‌عنوان یکی از داروهای شیمی‌درمانی سرطان پستان مورد استفاده می‌باشد، اما به‌دلیل ماهیت فیزیکی شیمیایی آن (اسیدی بودن)، دارای پروفایل زیست‌فراهمی ضعیفی می‌باشد. این دارو آنالوگ فولیک اسید بوده و به خوبی گیرنده فولات را با تمایل اتصال پایین‌تر از اسید فولیک شناسایی می‌کند (۲۳). در نتیجه این یک مزیت بزرگ برای این دارو محسوب می‌گردد. از طرف دیگر به‌دلیل افزایش بیان گیرنده‌های فولات در برخی از سرطان‌ها مخصوصاً سرطان پستان گزینه بسیار مناسبی برای هدف‌گیری سلول‌ها می‌باشند. اما با این وجود یک مشکل بیولوژیکی وجود دارد و آن هم اینکه در صورت استفاده از فولات به‌عنوان لیگاند به شکل

به سلول‌های هدف برساییم. در مطالعه حاضر جذب سلولی کونژوگه دندیرمر- متوتروکسات ۱۸ درصد بیشتر از دندیرمر خالی صورت گرفته است، و دلیل این امر نقش لیگاندی متوتروکسات می‌باشد، که قادر است به واسطه اندوسیتوز به روش فولیک اسید - رسپتور وارد سلول شده و جذب سلولی را افزایش دهد. این یافته هم راستا با یافته‌های Qi و همکاران در سال ۲۰۱۵ می‌باشد (۳۴).

به دنبال مواجه شدن سلول‌های MCF-7 با متوتروکسات به فرم آزاد در سه بازه زمانی مورد مطالعه، میزان زیستایی سلول‌ها به شکل معنی‌داری کاهش یافت، این در حالی است که میزان سمیت در نانو حامل دندیرمر- متوتروکسات به مراتب کم‌تر از داروی آزاد بود. از آنجایی که اتصال بین داروی متوتروکسات و نانو ذره دندیرمر از نوع کوالانسی است و بسیار بدیهی است که دارویی که به شکل کوالانسی به نانو ذره متصل شده است توانایی رهایش و آزاد شدن ندارد (۲۶)، در نتیجه اثر درمانی دارو نیز کاهش خواهد یافت. با مراجعه به نتایج جذب سلولی، مشاهده می‌شود که کونژوگه کردن متوتروکسات با نانو ذره دندیرمر قادر است که جذب سلولی را بیشتر کند، اما وجود پیوند کوالانسی بین دارو و نانو ذره، رهایش متوتروکسات از نانو ذره دندیرمر را مختل کرده و سمیت کم‌تر کونژوگه دندیرمر- متوتروکسات نیز از این ناشی می‌شود. این یافته نیز هم سو با مطالعه Gurdag و همکاران در سال ۲۰۰۴ می‌باشد (۳۵). طی پژوهشی در سال ۲۰۱۴ Khatri و همکاران داروی متوتروکسات را به واسطه پیوند آمیدی به سطح نانو ذره دندیرمر نسل ۵ متصل کردند (۱۹). در مطالعه دیگری، متوتروکسات به واسطه اتصال الکتروستاتیکی به سطح حامل کیتوزانی اصلاح شده، متصل شد و نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار سمیت سلولی در مقایسه با متوتروکسات آزاد بود، علت آن را به رهایش موفقیت آمیز دارو و نوع پیوند بین دارو و حامل ارتباط دادند (۳۶). برای تأیید نتایج سمیت سلولی، میزان آپوپتوز به روش کیفی از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج نشان داد که داروی متوتروکسات به تنهایی به میزان بیشتری باعث القاء آپوپتوز (قطعه قطعه شدن هسته سلولی) نسبت به دندیرمر- متوتروکسات می‌شود، که می‌تواند تأییدی بر یافته حاصل از سمیت سلولی باشد. شایان ذکر است که آزمایشات سمیت و آپوپتوز سلولی جهت نشان دادن پایداری نانوحامل سنتز شده و عدم رهایش دارو انجام شده است و هدف از این آزمایشات رساندن دارو نبوده، بلکه ساخت نانوحامل پایدار جهت هدف‌گیری سلول‌های هدف بوده است. لذا توانایی القاء سمیت و آپوپتوز سلولی کم‌تر توسط کونژوگه نسبت به داروی آزاد دلالت بر پایداری پیوند کوالانسی و به دنبال آن پایداری نانو حامل تولید شده دارد. از آنجایی که نتایج مطالعات حیوانی کاملاً متفاوت از مطالعات آزمایشگاهی است، لذا عدم بررسی نانو حامل تولید شده در مدل

دارو از سطح آن، چه در خارج و چه در داخل سلول به شدت کاهش می‌یابد (۲۶) که این موضوع هدف اصلی ما در این مطالعه بوده است. کونژوگه شدن دارو با نانو ذره ممکن است باعث تغییراتی در خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانو ذره نهایی شود. نتایج حاصل از DLS نشان داد، که به دنبال اتصال متوتروکسات به دندیرمر، اندازه نهایی کونژوگه ۳ نانومتر بیشتر از دندیرمر به فرم آزاد می‌باشد. از آنجایی که متوتروکسات یک مولکول کوچک است، اثر نه چندان چشمگیر بر اندازه نهایی کونژوگه می‌تواند قابل قبول باشد. همچنین بار سطحی دندیرمر خالی بعد از اتصال متوتروکسات کاهش یافت و می‌تواند به پوشش آمین‌های سطحی نانو ذره دندیرمر به دنبال اتصال کوالانسی متوتروکسات مربوط باشد. در مطالعه‌ای Lv و همکاران در سال ۲۰۱۷ آنالوگ متوتروکسات (فولیک اسید) را به سطح نسل‌های مختلف نانو ذره دندیرمر متصل کردند (۲۷) و نتایج آنها نشان داد که اندازه و بار سطحی در دندیرمر- فولیک اسید در مقایسه با دندیرمرهای خالی به ترتیب افزایش و کاهش جزئی دارد که هم راستا با نتایج مطالعه حاضر است.

از جمله مقوله‌های بسیار مهم در بحث دارورسانی جذب سلولی مؤثر نانو ذرات توسط سلول‌ها می‌باشد (۲۸). حامل‌های دارو رسان بسته به نوع اصلاحات سطحی می‌توانند از مسیرهای مختلفی به داخل سلول ورود کنند. از جمله مسیرهایی که سلول‌ها برای جذب عوامل مختلفی استفاده می‌کنند، می‌توان به فاگوسیتوز، اندوسیتوز به واسطه کلاترین، اندوسیتوز وابسته به کائولین، اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کائولین و ماکروپینوسیتوز اشاره کرد (۲۹، ۳۰). از آنجایی که حامل‌های دارویی و محتویات آنها بعد از ورود داخل سلولی، ابتدا در لیزوزوم اولیه (با pH ~6.3) و سپس به لیزوزوم ثانویه (pH ~4.7) می‌رسند، بنابراین تا رهاسازی عوامل دارویی از لیزوزوم ثانویه به سیتوپلاسم، مقداری از محتویات دارویی تحت تأثیر اسیدیته پایین تخریب می‌شود. از بین مسیرهای جذب سلولی ذکر شده، مسیر اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کائولین، قادر است محتویات خود را مستقیماً و بدون رسیدن به لیزوزوم‌ها به سیتوپلاسم آزاد کند و یا قادر است محتویات خود را از گزند آنزیم‌های لیزوزومی حفظ کند (۷، ۳۱). از آنجایی که مسیر جذب سلولی فولیک اسید از مسیر اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کائولین، اتفاق می‌افتد (۲۹، ۳۲، ۳۳)، لذا در صورت اتصال متوتروکسات به سطح دندیرمر، محتویات دارویی منتقل شده نسبت به سایر مسیرها از درجه تخریب بسیار کم‌تری برخوردار خواهد بود، و این خود مزیت بسیار مهم دیگری برای نانوحامل (کونژوگه) سنتز شده ما محسوب می‌شود. این ویژگی به ما این اجازه را می‌دهد که بدون جدا شدن لیگاندهایمان عوامل مختلف درمانی مانند قطعات ژنتیکی، siRNA، miRNA و داروهای دیگر را به شکل ترکیبی با استفاده از این حامل

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که نانو حامل دندریمر-متوتروکسات به‌طور چشمگیری توسط سلول‌های MCF-7 جذب می‌شوند. با این حال سمیت سلولی و توانایی القاء آپوپتوز توسط نانو حامل تولید شده کم‌تر از داروی متوتروکسات آزاد بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نا حامل یاد شده از پایداری خوبی برخوردار است و می‌توان برای انتقال عوامل دارویی از جمله داروها و قطعات ژنتیکی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از آقای عباس نوبخت که در ویرایش علمی مقاله کمک کردند، اعلام می‌دارند. و همچنین از همکاران مرکز تحقیقات ایمونولوژی بابت همکاری بی دریغ‌شان تشکر صمیمانه دارند.

حیوانی (به‌دلیل هزینه مالی بالا) برای مقایسه با نتایج حاصل از این مطالعه از محدودیت بسیار مهم در این پژوهش می‌باشد. با توجه به اینکه امکان دارد نتایج ارزیابی‌های آزمایشگاهی و حیوانی متفاوت باشند، پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ی مشابهی در مدل حیوانی هم انجام گیرد تا تأثیر نانو حامل تولید شده بر روی تومورهای سرطان پستان مشخص شود. با توجه به اینکه نوع پیوند بین دارو و نانو حامل در پایداری نانو حامل نهایی تأثیر مهمی دارد و در مطالعه حاضر، تنها پیوند کوالانسی بین دارو و نانو حامل بررسی شده است که محدودیت دیگری برای این پژوهش می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که اتصال متوتروکسات به دندریمر با پیوندهای مختلف ارزیابی گردد تا تأثیر نوع پیوندها بر نانو حامل نهایی نیز مشخص گردد. هم چنین پیشنهاد می‌شود که برای ارزیابی کارایی نانو حامل تولید شده، آن را به شکل ترکیبی با داروها و قطعات ژنتیکی مختلف مورد آزمایش قرار دهند تا پتانسیل انتقال سایر عوامل دارویی این نانو حامل مشخص گردد.

References:

1. Etemadi A, Sadjadi A, Semnani S, Nourae SM, Khademi H, Bahadori M. Cancer registry in Iran: a brief overview. Arch Iran Med 2008;11: 577-80.
2. Alsayyad J, Hamadeh R. Cancer incidence among the Bahraini population: a five-year (1998-2002) experience. Ann Saudi Med 2007;27: 251-8.
3. Salem AA, Salem MAE, Abbass H. Breast cancer: surgery at the south Egypt cancer institute. Cancers (Basel) 2010;2: 1771-8.
4. Forrest AP, Stewart HJ, Everington D, Prescott RJ, McArdle CS, Harnett AN, et al. Randomised controlled trial of conservation therapy for breast cancer: 6-year analysis of the Scottish trial. Lancet 1996;348: 708-13.
5. Asselain B, Barlow W, Bartlett J, Bergh J, Bergsten-Nordström E, Bliss J, et al. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. Lancet Oncol 2018;19: 27-39.
6. Weberpals J, Jansen L, Müller OJ, Brenner H. Long-term heart-specific mortality among 347 47 breast cancer patients treated with radiotherapy or chemotherapy: a registry-based cohort study. Eur Heart J 2018;39: 3896-903.
7. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravaszani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. Appl Mater Today 2018;12: 177-90.
8. Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment—from the papyrus to individualised treatment approaches. Ecancermedicallscience 2017;11.
9. Ahirwar MK, Yogi V, Singh O, Ghori H, Tiwari V, Francis B. Role of induction chemotherapy in downstaging of locally advanced head-and-neck squamous cell cancer. Clin Cancer Investig J 2018;7: 221.
10. Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. Cancer Manag Res 2010;2: 293.
11. Sramek M, Neradil J, Veselska R. Much more than you expected: the non-DHFR-mediated effects of methotrexate. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2017;1861: 499-503.

12. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2004;50: 2766-74.
13. Wong P, Choi S. Mechanisms and implications of dual-acting methotrexate in folate-targeted nanotherapeutic delivery. *Int J Mol Sci* 2015;16: 1772-90.
14. Maeng JH, Lee D-H, Jung KH, Bae Y-H, Park I-S, Jeong S, et al. Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer. *Biomaterials* 2010;31: 4995-5006.
15. Li M, Neoh K-G, Wang R, Zong B-Y, Tan JY, Kang E-T. Methotrexate-conjugated and hyperbranched polyglycerol-grafted Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted anticancer effects. *Eur J Pharm Sci* 2013;48: 111-20.
16. Chowdhury P, Nagesh PK, Hatami E, Wagh S, Dan N, Tripathi MK, et al. Tannic acid-inspired paclitaxel nanoparticles for enhanced anticancer effects in breast cancer cells. *J Colloid Interface Sci* 2019;535: 133-48.
17. Kesharwani P, Iyer AK. Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery. *Drug Discov. Today* 2015;20: 536-47.
18. Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* 2010;15: 171-85.
19. Khatri S, Das NG, Das SK. Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of MES-SA uterine cancer cells. *J Pharm Bioallied Sci* 2014;6: 297.
20. Zarebkohan A, Najafi F, Moghimi HR, Hemmati M, Deevband MR, Kazemi B. Synthesis and characterization of a PAMAM dendrimer nanocarrier functionalized by SRL peptide for targeted gene delivery to the brain. *Eur J Pharm Sci* 2015;78: 19-30.
21. Rahimi M, Safa KD, Salehi R. Co-delivery of doxorubicin and methotrexate by dendritic chitosan-g-mPEG as a magnetic nanocarrier for multi-drug delivery in combination chemotherapy. *Polym Chem* 2017;8: 7333-50.
22. Vostakolaei FA, Broeders MJ, Mousavi SM, Kiemeny LA, Verbeek AL. The effect of demographic and lifestyle changes on the burden of breast cancer in Iranian women: a projection to 2030. *Breast* 2013;22: 277-81.
23. Srinivasarao M, Low PS. Ligand-targeted drug delivery. *Chem Rev* 2017;117: 12133-64.
24. van Dongen MA, Rattan R, Silpe J, Dougherty C, Michmerhuizen NL, Van Winkle M, et al. Poly (amidoamine) dendrimer-methotrexate conjugates: the mechanism of interaction with folate binding protein. *Mol Pharm* 2014;11: 4049-58.
25. Jiang Y-Y, Tang G-T, Zhang L-H, Kong S-Y, Zhu S-J, Pei Y-Y. PEGylated PAMAM dendrimers as a potential drug delivery carrier: in vitro and in vivo comparative evaluation of covalently conjugated drug and noncovalent drug inclusion complex. *J. Drug Target* 2010;18: 389-403.
26. Wong PT, Choi SK. Mechanisms of drug release in nanotherapeutic delivery systems. *Chem Rev* 2015;115: 3388-432.
27. Lv T, Yu T, Fang Y, Zhang S, Jiang M, Zhang H, et al. Role of generation on folic acid-modified poly (amidoamine) dendrimers for targeted delivery of baicalin to cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C* 2017;75: 182-90.
28. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, et al. Cellular

- uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev* 2017;46: 4218-44.
29. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009;78: 857-902.
30. Kumari S, Swetha M, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 2010;20: 256.
31. Behr J-P. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia (Aarau)* 1997;51: 34-6.
32. Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64: 342-52.
33. Kelemen LE. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer* 2006;119: 243-50.
34. Qi R, Majoros I, Misra AC, Koch AE, Campbell P, Marotte H, et al. Folate receptor-targeted dendrimer-methotrexate conjugate for inflammatory arthritis. *J Biomed Nanotechnol* 2015;11: 1431- 41.
35. Gurdag S, Khandare J, Stapels S, Matherly LH, Kannan RM. Activity of dendrimer- methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and-resistant cell lines. *Bioconjug Chem* 2006;17: 275-83.
36. Rahimi M, Shafiei-Irannejad V, Safa KD, Salehi R. Multi-branched ionic liquid-chitosan as a smart and biocompatible nano-vehicle for combination chemotherapy with stealth and targeted properties. *Carbohydr Polym* 2018;196: 299-312.

EVALUATION OF ANTI-CANCER ACTIVITY OF COVALENTLY CONJUGATED METHOTREXATE TO POLYAMIDOAMINE GENERATION 4 DENDRIMER ON MCF-7 CANCER CELLS: AN EXPERIMENTAL STUDY

Fereydoon Abedi Gaballu¹, Behzad Mansoori¹, Gholamreza Dehghan¹

Received: 17 May, 2019; Accepted: 29 July, 2019

Abstract

Background & Aims: Poly (amidoamine) dendrimer (PAMAM) is highly macromolecular at nanosize with widely active amine groups on the surface that allows it to attach to the anti-cancer drugs such as Methotrexate (MTX). This study aimed to synthesize and characterize PAMAM-MTX (dendrimer-MTX) complex, then to evaluate the cytotoxic effect of the synthesized complex on MCF-7 cancer cells.

Materials & Methods: To perform this experimental study, initially, MTX was conjugated to the G4 dendrimer using Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), then it was characterized by Fourier-transform infrared (FTIR) and dynamic light scattering (DLS). Quantitative cellular uptake of nanoparticles was carried out using flow cytometry. The methylthiazol tetrazolium (MTT) and 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining assays were used for evaluating the ability of dendrimer-MTX and MTX in inducing cell cytotoxicity and apoptosis on MCF-7 cancer cells, respectively.

Results: The results of this study illustrated that the dendrimer-MTX complex had optimal size (30 ± 7.29 nm) and zeta potential (5.35 ± 4.37 mV). Flow cytometry analysis revealed that the cellular uptake was increased (18%) after conjugating MTX on the dendrimer compared to bare dendrimer. Interestingly, cell cytotoxicity and DAPI staining results displayed lower cell cytotoxicity and apoptosis for MCF-7 cells that were treated with dendrimer-MTX compared to free MTX.

Conclusion: The obtained data indicated that dendrimer-MTX complex had a higher cellular uptake, but cell cytotoxicity and apoptosis were lower than free MTX.

Keywords: Methotrexate, dendrimer, apoptosis, cytotoxicity, cellular uptake.

Address: Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Tel: +9833392717

Email: dehghan2001d@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(5): 392 ISSN: 1027-3727

¹ MSc of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³ Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(Corresponding Author)