

ارزیابی فعالیت خد 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 گبلو^۱، بهزاد منصوری^۲، غلامرضا دهقان^{*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۷/۰۲ 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 Ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) به دندریمر نسل ۴ متصل شد و سپس به وسیله طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه و dynamic light scattering خواص ساختاری آن تعیین شد. جذب سلولی نانو ذرات ۴'، 6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 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 $7/29 \pm 30$ نانومتر) و بار $5/35 \pm 4/37$ میلی ولت) مناسب داشت. آنالیز فلوسایتوometri 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 دندیمیر- 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 توسعه‌یافته 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 توسعه‌یافته 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، دو میان عامل شایع مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی در سراسر جهان و کشورهای توسعه‌یافته 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 دکتراً اینمی شناسی پژوهشی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

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

و بعد از تعیین خصوصیات فیزیکو 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 mg/ml (۲) از نانو ذره دندریمر (محلول در متانول) تهیه شد. در مرحله بعد داروی متوتروکسات mg/ml (۳) محلول در DMSO تهیه شد، و برای فعال سازی گروه کربوکسیل موجود در متوتروکسات، EDC به مقدار mg/ml (۵) 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 آزاد (واکنش نداده)، مقداری از کونژوگه های سنتر 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 فیزیکو شیمیایی دندریمر:

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

کشت و تیمار رده سلولی سرطان پستان MCF-7:

رده سلولی MCF-7 از انسیستوی پاستور ایران تهیه شد. بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها در مرکز تحقیقات ایمونولوژی 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، پرتوودرمانی و جراحی از روش‌های اصلی درمان سرطان به شمار می‌روند که از این میان، شیمی‌درمانی بهطور گسترده برای درمان سرطان به کار می‌رود (۵)، (۶). 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 ازجمله 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 داردند که استفاده از آن‌ها را برای درمان سرطان محدود می‌کند (۷، ۸). متوتروکسات ازجمله داروهای ضد سرطان است که برای درمان انواع خاصی از سرطان‌ها ازجمله پستان، بوقت، سر و گردن و ریه استفاده می‌شود (۹، ۱۰). متوتروکسات مهارکننده رقبابتی 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 درنتیجه ساخت RNA و DNA ضروری است. فولات برای ایفای نقش خود به عنوان کوفاکتور باید به‌وسیله آنزیم DHFR به تترای هیدروفولات تبدیل شود. متوتروکسات به آنزیم DHFR اتصال یافته و از تبدیل دی هیدروفولات به تترای هیدروفولات جلوگیری می‌کند، درنتیجه از سنتز پورین و پیریمیدین جلوگیری می‌شود. تمايل متوتروکسات به اتصال به آنزیم DHFR هزار برابر دی هیدروفولات است (۱۲، ۱۳).

انتقال داروها به‌ویژه داروهای شیمی‌درمانی به‌واسطه استفاده از نانوذرات به عنوان راهکاری مؤثر پیشنهادشده 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 به‌طوری که 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 به عنوان حامل‌های دارویی، مطرح ساخته است. در مطالعه حاضر ابتدا، داروی متوتروکسات به سطح نانو ذره PAMAM متصل شده

بدون FBS حاوی رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ 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 ۲ mg/ml) به هر خانه اضافه شد و سلول‌های تیمار نشده به عنوان 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 فرامازین در ۵۷۰nm 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 به صورت 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 $P < 0.05$ به عنوان نتیجه معنی‌دار در نظر گرفته شد.

² Fetal Bovine Serum

کشت RPMI-1640 حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین U/ml ۱۰۰ استریتوماسین ۱۰۰mg/ml و ۱۰ درصد سرم گوساله تازه متولد شده (FBS۲) عمل بخ 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 پاشاژ سلولی روی سلول‌ها انجام گرفت و سلول‌های پاشاژ 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 ۷ MCF-7 با تراکم 10^4 سلول در یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و از نظر مورفوولوژی 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 تریپسینه کردن در ۱۳۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جهت به دست آوردن پلاک سلولی در سانتریفیوژ یخچال دار انجام شد و در نهایت در (PH 7.4) PBS حل شده و با استفاده از فلوسایتومتری آنالیز شد. شدت فلورسانس FITC در طول موج ۴۹۰ نانومتر بررسی شد. برای هر نمونه، Win ۱۰ عدد سلول جمع‌آوری شده و نتایج توسط نرم‌افزار MDI آنالیز شد.

بررسی سمیت سلولی متوتروکسات و کمپلکس دندریمر- متوتروکسات:

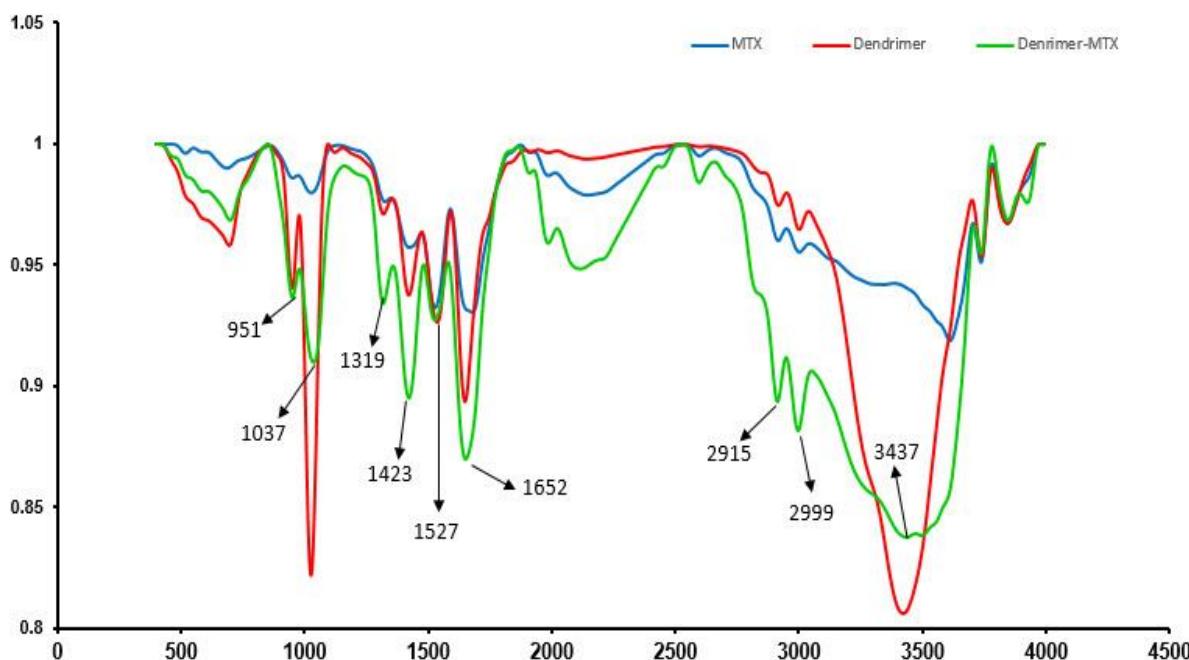
سمیت سلولی متوتروکسات و کمپلکس آن با نانو ذره دندریمر بر علیه رده سلولی MCF-7 توسط تست MTT ارزیابی شد. برای این منظور، ابتدا هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI 10% FBS حاوی ۱۰ هزار سلول پر شد. از آنجایی که سلول‌های MCF-7 چسبنده هستند و جهت ارزیابی باید در شرایط نرمال 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

¹ Roswell Park Memorial Institute 1640

پیوند آمیدی در کمپلکس دندریمر- متواتر و کسات است. همچنین طیف‌های $1423/17\text{ cm}^{-1}$, $1319/43\text{ cm}^{-1}$, $1037/33\text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H , C-O , N-O , CH_3 خمثی هستند. از عمدۀ تغییراتی که بعد از اتصال متواتر و کسات به نانو ذره دندریمر مشاهده می‌شود، می‌توان به شیفت طیف جذبی از 1652 cm^{-1} در دندریمر خالی، به 1650 cm^{-1} در دندریمر- متواتر و کسات نسبت اشاره کرد، عمق و پهنای این باندها در دندریمر- متواتر و کسات نسبت به دندریمر خالی بیشتر شده است و نشانگر تشکیل پیوند آمیدی در این ناحیه است. همچنین طیف 1537 cm^{-1} در دندریمر خالی به 1527 cm^{-1} در دندریمر- متواتر و کسات انتقال یافته است.

یافته‌ها

نتایج FTIR برای نانوذره دندریمر، متواتر و کسات، و دندریمر- متواتر و کسات در شکل ۱ مشاهده می‌شود. تغییرات در طیف جذبی در FTIR بعد از اتصال متواتر و کسات بر روی سطح نانو ذره دندریمر قابل مشاهده می‌باشد، طیف جذبی در 3437 cm^{-1} مربوط به N-H (آمین‌های نوع اول، دوم و آمیدها کششی) و 2999 cm^{-1} مربوط به نانو ذره دندریمر و متواتر و کسات هستند. طیف‌های جذبی 2915 cm^{-1} و 2999 cm^{-1} به گروه‌های C=O و ارتعاش کششی C-H از آلkanها (کششی) متعلق هستند. طیف 1652 cm^{-1} به گروه‌های C=O و ارتعاش کششی NH_2 (اساره شده به عنوان پیوند آمید I) مربوط است که نشان‌دهنده وجود

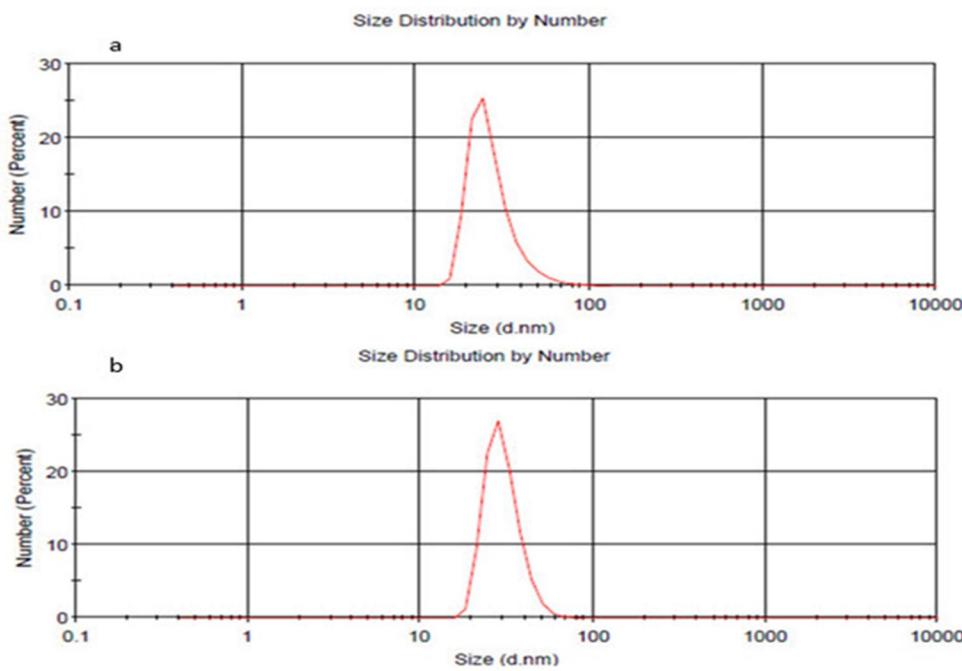


شکل (۱): طیف جذبی FTIR را برای متواتر و کسات، نانو ذره دندریمر خالیو دندریمر- متواتر و کسات را نشان می‌دهد.

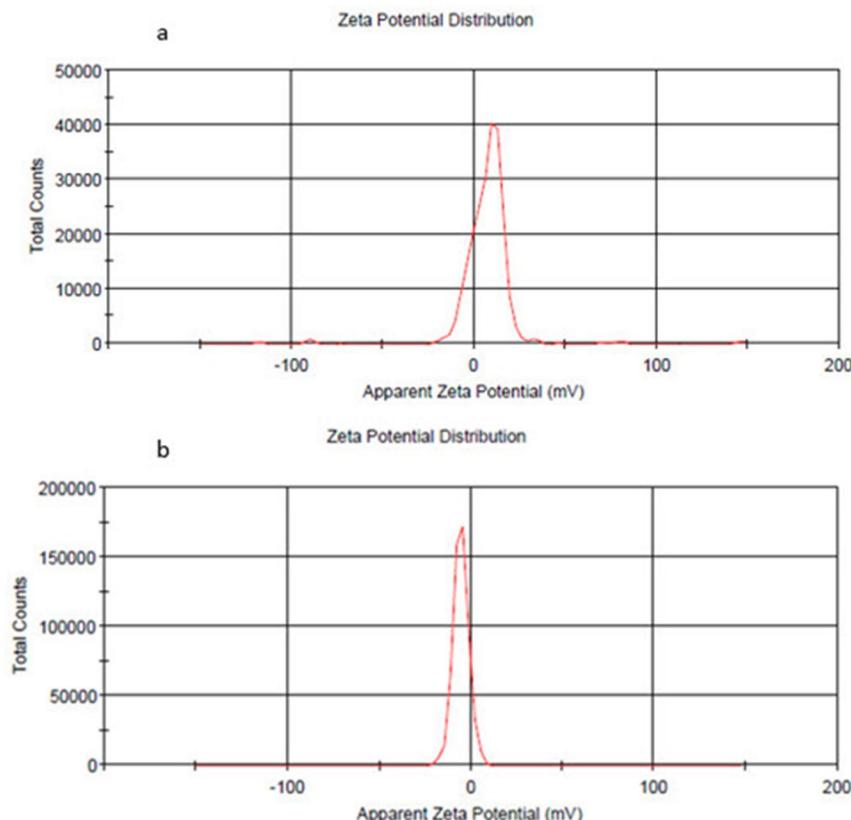
(دندریمر- متواتر و کسات) به $7/29 \pm 30\text{ nm}$ افزایش یافته است. همچنین 96% درصد از بار سطحی نانو ذره دندریمر خالی برابر $7/14 \pm 8/13\text{ mili}\mu\text{l}$ ولت مثبت بوده و برای نانو ذره کوئنزوگه به $5/35 \pm 4/37\text{ mili}\mu\text{l}$ ولت کاهش یافته است (شکل ۳) که می‌تواند مربوط به پوشش سطحی نانوذره دندریمر توسعه متواتر و کسات باشد.

ا ندازه و بار سطحی نانوذره دندریمر و دندریمر- متواتر و کسات:

همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، اندازه نانو ذره دندریمر خالی برابر $9/73 \pm 27/51\text{ nm}$ می‌باشد، این در حالی است که بعد از اتصال داروی متواتر و کسات به سطح نانو ذره، اندازه کوئنزوگه



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

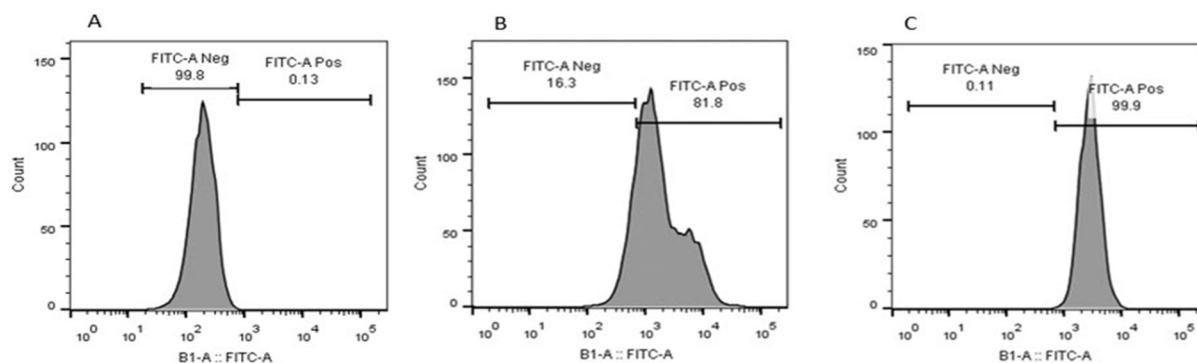


شکل (۳): بار سطحی نانو ذره دندربیمر خالی و دندربیمر - متوتروکسات که با استفاده از DLS اندازه‌گیری شده است. a. و b به ترتیب نشان‌دهنده بار سطحی نانو ذره دندربیمر خالی و دندربیمر - متوتروکسات است.

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- متواتروکسات 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.

جذب سلولی نانو ذرات:

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

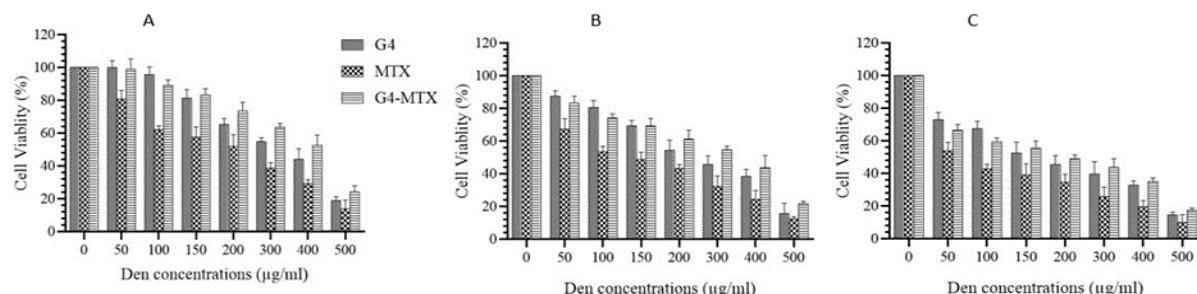


شکل (۴): جذب سلولی نانو ذره دندریمر و دندریمر- متواتروکسات نشاندار شده با FITC به وسیله فلوسایتومتری را نشان می‌دهد (غلظت نانو ذرات ۱ میکرومولار بوده و زمان تیمار ۴ ساعت است). A، B و C به ترتیب نشان‌دهنده گروه کنترل، نانو ذره خالی و دندریمر- متواتروکسات می‌باشد.

زمان اثر می‌باشد، چنانکه که با افزایش غلظت متواتروکسات و گذشت زمان، اثرات سایوتوكسیک افزایش می‌یابد. این در حالی است که در همین غلظتها و زمان‌های مورد مطالعه دندریمر- متواتروکسات اثر سایوتوكسیک کمتری در مقایسه با متواتروکسات به فرم آزاد از خود نشان داد. برای مثال مقدار IC₅₀ به دست آمده برای متواتروکسات آزاد در ۷۲ ساعت برابر با ۸۲/۱۲ $\mu\text{g}/\text{ml}$ بود، این در حالی است که همین کمیت در بازه زمانی یاد شده، برای کونژوگه دندریمر- متواتروکسات برابر $169/9 \mu\text{g}/\text{ml}$ محاسبه شد.

ارزیابی میزان سمیت سلولی با تست MTT:

جهت بررسی و تعیین اثرات سمی متواتروکسات به فرم آزاد و کونژوگه آن با نانو ذره دندریمر (دندریمر- متواتروکسات) و تعیین آزمایش IC₅₀ MTT انجام گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ از متواتروکسات به فرم آزاد و دندریمر- متواتروکسات در زمان‌های ۴۸، ۲۴ 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 متواتروکسات نسبت به سلول‌های کنترل اثر سایوتوكسیک بیشتری نشان داد و این اثرات وابسته به غلظت و

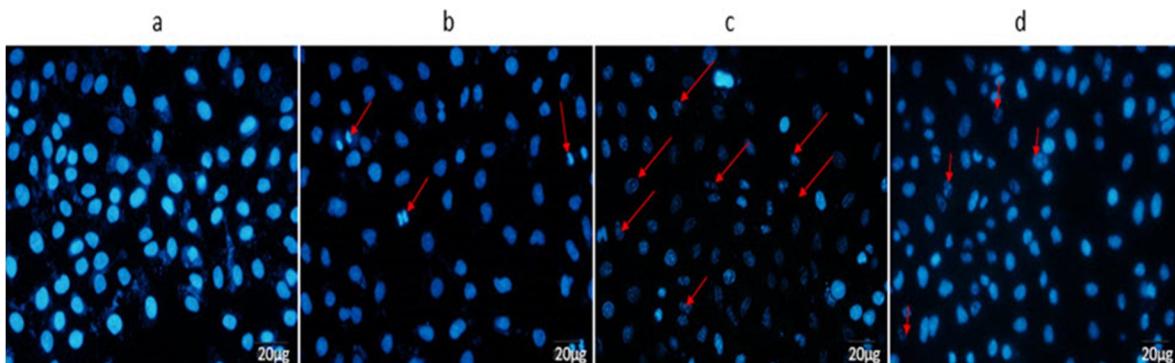


شکل (۵): اثرات سایوتوكسیک متواتروکسات و دندریمر- متواتروکسات روی سلول‌های MCF-7 A، B و C به ترتیب اثرات سایوتوكسیک متواتروکسات و دندریمر- متواتروکسات را در بازه‌های زمانی ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.

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

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 IC50، تغییرات در مورفوژوئی هسته سلولی (عالیم آپوپتوز) مشاهده شد، و این تغییرات شامل قطعه قطعه شدن هسته، فشرده شدن کروماتینی و قطعه قطعه شدن



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 نانوذره دندریمر (کنترل مثبت)، سلول‌های تیمار شده با متوتروکسات و سلول‌های تیمار شده با دندریمر - متوتروکسات. مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت است.

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

مطالعات زیادی در جهت سنتز کوئنزوگه داروهای ضد سرطانی با پلیمرها و نانوذرهات پلیمری، پلی پیپتیدها و پلی دکسترین‌ها به منظور افزایش خاصیت ضد سرطانی و کاهش عوارض سیستمیک داروئی انجام شده است. در مطالعه حاضر ابتدا داروی متوتروکسات به واسطه استفاده از EDC به سطح نانوذره دندریمر متصل شد و آنالیز طیفی‌های FTIR نشان داد که پیوند آمیدی در کوئنزوگه دندریمر - متوتروکسات در طیف‌های ۳۴۳۷cm⁻¹ و ۱۶۵۲cm⁻¹ تشکیل شده است، که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن اتصال متوتروکسات به نانوذره دندریمر به واسطه پیوند کوالانسی می‌باشد. از آنجایی که 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 زانگ و همکارانش به دست آمد (۲۵). و آن اینکه به دلیل اتصال کوالانسی دارو به دندریمر احتمال جداشدن

بحث و نتیجه‌گیری

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 قابل توجهی داشته‌اند، اما درمان سرطان به حد مطلوب نرسیده و به عنوان یک چالش بالینی اساسی مطرح می‌باشد (۲۶). بنابر این، به نظر می‌رسد که طراحی حامل‌های مناسب جهت تحويل 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 تصال به گیرنده)، توپوگرافی گیرنده، نوع لینکر باید کاملاً مورد دقت و نظر قرار گیرند (۲۳). متوتروکسات به عنوان یکی از داروهای شیمی‌درمانی سرطان پستان مورد استفاده می‌باشد، اما به دلیل ماهیّت فیزیکو شیمیایی آن (اسیدی بودن)، دارای پروفایل زیست فراهمی 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 به دلیل افزایش بیان گیرنده‌های فولات در برخی از سرطان‌ها مخصوصاً سرطان پستان گزینه بسیار مناسبی برای هدف گیری سلول‌ها می‌باشند. اما با این وجود یک مشکل بیولوژیکال وجود دارد و آن هم اینکه در صورت استفاده از فولات به عنوان لیگاند به شکل

به سلول‌های هدف برسانیم، در مطالعه حاضر جذب سلولی کونژوگه دندریمر- متاتروکسات ۱۸ درصد بیشتر از دندریمر خالی صورت گرفته است، و دلیل این امر نقش لیگاندی متاتروکسات 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 متاتروکسات 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 دندریمر- متاتروکسات به مراتب کمتر از داروی آزاد بود. از آنجایی که اتصال بین داروی متاتروکسات و نانو ذره دندریمر 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)، درنتیجه اثر درمانی دارو نیز کاهش خواهد یافت. با مراجعة به نتایج جذب سلولی، مشاهده می‌شود که کونژوگه کردن متاتروکسات با نانو ذره دندریمر قادر است که جذب سلولی را بیشتر کند، اما وجود پیوند کوالانسی بین دارو و نانو ذره، رهایش متاتروکسات از نانو ذره دندریمر را مختل کرده و سمیت کمتر کونژوگه دندریمر- متاتروکسات 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 متاتروکسات را به واسطه پیوند آمیدی به سطح نانو ذره دندریمر نسل ۵ متصل کردند^(۱۹). در مطالعه دیگری، متاتروکسات به واسطه اتصال الکتروستاتیکی به سطح حامل کیتوزانی اصلاح شده، متصل شد و نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار سمیت سلولی در مقایسه با متاتروکسات 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 متاتروکسات به تنها‌یی به میزان بیشتری باعث القاء آپوپتوز (قطعه قطعه شدن هسته سلولی) نسبت به دندریمر- متاتروکسات می‌شود، که می‌تواند تاییدی 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 هدف گیری 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 نانوحامل تولید شده دارد. از آنجایی که نتایج مطالعات حیوانی کاملاً متفاوت از مطالعات آزمایشگاهی است، لذا عدم برسی نانوحامل 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 فیزیکو شیمایی نانو ذره نهایی شود. نتایج حاصل از DLS نشان داد، که به دنبال اتصال متاتروکسات به دندریمر، اندازه نهایی کونژوگه ۳ نانومتر بیشتر از دندریمر به فرم آزاد می‌باشد. از آنجایی که متاتروکسات یک مولکول کوچک است، اثر نه چندان چشمگیر بر اندازه نهایی کونژوگه می‌تواند قابل قبول باشد. همچنین بار سطحی دندریمر خالی بعد از اتصال متاتروکسات کاهش یافتد و می‌تواند به پوشش آمینه‌های سطحی نانو ذره دندریمر به دنبال اتصال کوالانسی متاتروکسات مربوط باشد. در مطالعه‌ای Lv و همکاران در سال ۲۰۱۷ آنالوگ متاتروکسات (فولیک اسید) را به سطح نسل‌های مختلف نانو ذره دندریمر متصل کردند^(۲۷) و نتایج آنها نشان داد که اندازه و بار سطحی در دندریمر- فولیک اسید در مقایسه با دندریمرهای 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 فاگوسیتیز، اندوسیتوز به واسطه کلاترین، اندوسیتوز وابسته به کاوثولین، اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کاوثولین و ماکروپینوسیتوز اشاره کرد^(۳۰). از آنجایی که حامل‌های دارویی و محتويات آنها بعد از ورود داخل سلولی، ابتدا در لیزوژوم اولیه (با pH ~6.3) و سپس به لیزوژوم ثانویه (pH ~4.7) می‌رسند، بنابرین ترا رهاسازی عوامل دارویی از لیزوژوم ثانویه به سیتوپلاسمیم، مقداری از محتويات دارویی تحت تأثیر اسیدیتیه پایین تخریب می‌شود. از بین مسیرهای جذب سلولی ذکر شده، مسیر اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کاوثولین، قادر است محتويات خود را مستقيماً و بدون رسیدن به لیزوژمها به سیتوپلاسم آزاد کند و یا قادر است محتويات خود را از گزند آنزیم‌های لیزوژومی حفظ کند^(۷). از آنجایی که مسیر جذب سلولی فولیک اسید از مسیر اندوسیتوز غیر وابسته به کلاترین/کاوثولین، اتفاق می‌افتد^(۲۹)، لذا در صورت اتصال متاتروکسات به سطح دندریمر، محتويات 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 لیگاندها یمان عوامل مختلف درمانی مانند قطعات ژنتیکی، siRNA و miRNA و داروهای دیگر را به شکل ترکیبی با استفاده از این حامل

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

تشکر و قدردانی

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

حیوانی (به دلیل 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 دهنده تا پتانسیل انتقال سایر عوامل دارویی این نانو حامل مشخص گردد.

References:

- Etemadi A, Sadjadi A, Semnani S, Nouraei SM, Khademi H, Bahadori M. Cancer registry in Iran: a brief overview. *Arch Iran Med* 2008;11: 577-80.
- Alsayyad J, Hamadeh R. Cancer incidence among the Bahraini population: a five-year (1998-2002) experience. *Ann Saudi Med* 2007;27: 251-8.
- Salem AA, Salem MAE, Abbass H. Breast cancer: surgery at the south Egypt cancer institute. *Cancers (Basel)* 2010;2: 1771-8.
- 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.
- 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.
- Weberpals J, Jansen L, Müller OJ, Brenner H. Long-term heart-specific mortality among 347 476 breast cancer patients treated with radiotherapy or chemotherapy: a registry-based cohort study. *Eur Heart J* 2018;39: 3896-903.
- Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl Mater Today* 2018;12: 177-90.
- Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment—from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicalscience* 2017;11.
- 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.
- Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res* 2010;2: 293.
- 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, Deeband 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, Kiemeneij 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 Dehghan^{2*}

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

² Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Corresponding Author)