



Designing targeted theranostic drug delivery systems based on magnetic mesoporous silica nanoparticles and investigating their anti-cancer effects in vitro

Kamel Mohammad Al-Mosawi A^a, Bahrami AR^{a,b}, Shokooh Saljooghi A^{c,d*}, Moghadam Matin M^{a,d*}

^a student, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^b Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^d Novel Diagnostics and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Mohammad Al-Mosawi AK, Bahrami AR, Shokooh Saljooghi A, Moghadam Matin M. Designing targeted theranostic drug delivery systems based on magnetic mesoporous silica nanoparticles and investigating their anti-cancer effects in vitro. Journal of Cell and Tissue. 2023;14(1): 33.

doi <https://10.52547/JCT/14.1.33>

KEYWORDS

Colorectal cancer, Drug delivery system, Controlled release, Targeted therapy, Theranostic, Magnetic mesoporous silica nanoparticles

ABSTRACT

Aim: Cancer is a global concern and colorectal cancer (CRC) accounts for the second most common cause of cancer related death in the world. Nanotechnology could enhance the effectiveness of chemotherapy as a common therapeutic approach through development of smart nanoparticles (NPs). In this context, theranostic nanoparticles with both imaging and therapeutic potentials are considered as promising platforms in diagnosis and treatment of advanced cancers.

Materials & Methods: Here, we designed and synthesized magnetic mesoporous silica nanoparticles (SPION-MSNs) in which release of 5-fluorouracil (5-FU) at physiological conditions was inhibited with pH-responsive gold gatekeepers. Heterofunctional polyethylene glycol (PEG) polymer was then conjugated onto the outer surface of nanoparticles and non-targeted nanoparticles were successfully synthesized. In order to achieve active and specific targeting, non-targeted nanoparticles were armed with an epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) aptamer (Apt) for selective drug delivery of 5-FU to colorectal cancer cells. Finally, the physicochemical properties of NPs including functional groups, surface charge and their size were fully characterized with Fourier transform infrared (FTIR) spectra and dynamic light scattering (DLS) in each step. Moreover, morphology and homogeneity of SPION-MSNs were evaluated using field emission scanning electron microscopy (FESEM), high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and atomic force microscopy (AFM). The cumulative release of 5-FU from nanoparticles was compared in buffer solutions with two different pH values (pH 7.4 and 5.4). In the final step, anti-cancer potential and cytotoxicity of free 5-FU, non-targeted, and targeted nanoparticles were assessed on human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells and Chinese hamster ovary cells.

* Corresponding author. Tel.: +98-5138805514; Fax: +98-5138805514

E-mail address: matin@um.ac.ir & saljooghi@um.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/14.1.33>

Received: Nov. 23, 2022; Received in revised form: Dec. 26, 2022; Accepted: Jan. 2, 2023

Original Article

© Author



Results: Core-shell NPs, SPION-MSNs, were successfully prepared and the FTIR spectra showed specific peaks at the surface of nanoparticles. Obtained results from DLS measurements showed that the synthesized formulation had negative charges with size of 20 nm. Moreover, the morphology of SPION-MSNs indicated spherical shape with uniform distribution. After introducing amine groups, the surface charge was shift to positive and the two bands at 2965 and 1,560 cm^{-1} in the FT-IR spectrum were appeared and assigned to $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ and N-H groups, respectively. The results indicated, 5-FU was encapsulated in the open pores of MSNs and the encapsulation efficiency (EE%) and drug loading capacity (LC%) were about 98% and 49%, respectively. The release of 5-FU from NPs showed pH-dependent manner, with an initial rapid release (within 6 h) followed by a sustained release for 96 h at pH 5.4. interestingly, the cumulative release of 5-FU was about 3.9% in neutral medium over 96 h. the results supported the Intelligent release of cargoes from theranostic nanoparticles. At the final step, targeted nanoparticles were successfully synthesized with a final size diameter of 78 nm and negative surface charge. *In vitro* results demonstrated higher cytotoxicity and anti-cancer property of targeted nanoparticles against EpCAM-positive HT-29 cells as compared to the EpCAM-negative CHO cells, confirming the effectiveness of aptamer as a targeting ligand.

Conclusion: These findings suggest that application of the targeted formulation can be considered as a promising theranostic platform for EpCAM-positive CRC cells. However, further experiments are required before it can be practiced in the clinic.



طراحی نانوذرات ترانوستیک هدفمند بر پایه سیلیکای متخلخل مغناطیسی و بررسی اثرات ضدسرطانی آن‌ها در محیط برون تنی

اسیل کامل محمد موسوی^۱، احمد رضا بهرامی^۱، امیر شکوه سلجوقی^{۳*}، مریم مقدم متین^۴

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استاد، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۴ استاد، گروه پژوهشی تشخیص‌ها و درمان‌های نوین، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: سرطان کولورکتال (CRC)، دومین عامل مرگ و میر در دنیا محسوب می‌شود و نانوذرات ترانوستیک با قابلیت درمانی و تصویربرداری به‌صورت هم‌زمان به‌عنوان بسترهای درمانی و تشخیصی در نظر گرفته می‌شوند. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نانوذرات متخلخل مغناطیسی (SPION-MSNs) با یک طراحی ویژه، به‌منظور عدم آزادسازی داروی شیمی‌درمانی FU-5 در مجاورت سلول‌های سالم سنتز شده و توسط کنترل‌گرهای درجه‌ای طلا، رهایش دارو مهار شد. در گام بعد، به کمک پلیمر دوسر عملکردی پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) با هدف افزایش زیست‌سازگاری، سطح بیرونی نانوذرات پوشانده شده و نانوذرات غیر هدفمند سنتز شد. به‌علاوه، به‌منظور دستیابی به رویکرد درمانی فعال و تحویل انتخابی داروی FU-5، سطح بیرونی نانوذرات مجهز به آپتامر EpCAM شد. در ادامه، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات سنتز شده، ارزیابی شده و فعالیت ضدسرطانی آن‌ها در محیط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: SPION-MSNs ساختار کروی به‌همراه توزیع یکنواخت را نشان دادند. داروی شیمی‌درمانی FU-5 با موفقیت داخل منافذ باز نانوذرات سیلیکا بارگذاری شد و نتایج نشان داد که رهایش داروی FU-5 از نانوذره، وابسته به pH می‌باشد. نانوذرات هدفمند با اندازه‌ی حدود 78 nm و بار سطحی منفی سنتز شدند. مطالعات برون‌تنی سمیت معنی‌دار نانوذرات هدفمند را در برابر سلول‌های بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی EpCAM نشان داد و این سمت بر روی سلول‌های CHO بسیار ناچیز بود. این نتایج حاکی از کارایی موثر اتصال آپتامر EpCAM در هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی می‌باشد. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که این نانوذرات هدفمند، می‌توانند به‌عنوان یک نانوبستر ترانوستیک امیدوارکننده جهت درمان CRC در نظر گرفته شوند.</p>	<p>سرطان کولورکتال، سامانه‌ی حمل دارو، کنترل رهایش دارو، درمان هدفمند، ترانوستیک، نانوذرات سیلیکای متخلخل مغناطیسی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۰۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲</p>

۱- مقدمه

سرطان کولورکتال یک بیماری هتروژن ژنتیکی بوده و سومین بدخیمی رایج در جهان در نظر گرفته می‌شود (۱). طیف گسترده‌ای از داروهای شیمی‌درمانی جهت درمان سرطان کولورکتال معرفی شده‌اند و ۵-فلوروراسیل (5-FU) (5-) Fluorouracil به‌عنوان یک ترکیب مرسوم در اولین خط درمان می‌باشد که می‌تواند به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر روش‌های درمانی، مورد استفاده قرار گیرد (۲). نیمه‌عمر کوتاه، پاسخ درمانی به‌نسبت کم، اثرات نامطلوب بر بافت‌های طبیعی و ایجاد مقاومت دارویی از چالش‌های مربوط به استفاده‌ی مستقیم از داروی 5-FU بوده (۳)؛ و لذا استفاده از روش‌های درمانی جدید جهت بهبود نتایج بالینی به‌شدت مورد نیاز است. یکی از رویکردهای نوین درمانی، کپسوله کردن عوامل درمانی در یک سامانه‌ی تحویلی مناسب و انتقال هدفمند آن‌ها به سلول‌های سرطانی می‌باشد (۴). با کپسوله کردن، غلظت زیادی از داروهای شیمی‌درمانی در سلول‌های هدف تجمع پیدا می‌کنند و با کنترل رهایش، نه تنها سمیت کمتری روی سلول‌های طبیعی اعمال می‌گردد، بلکه از تخریب زودرس داروی شیمی‌درمانی نیز جلوگیری می‌شود (۵). فناوری نانو، نانوذرات آلی و معدنی متنوعی را به‌عنوان سامانه‌های حمل دارو معرفی کرده که می‌توان آن‌ها را از لحاظ اندازه، شکل و ویژگی‌های سطحی، تنظیم نموده و جهت اهداف دارورسانی استفاده کرد (۶). در دهه‌ی گذشته، نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا (MSNs) (Mesoporous silica nanoparticles) با کاربردهای بالقوه در حوزه‌ی زیست‌پزشکی، مورد توجه زیادی قرار گرفتند. این نانوذرات، سطح وسیعی داشته و با ساختار متخلخل خود امکان بارگذاری عوامل درمانی را فراهم می‌کنند. از ویژگی برجسته‌ی دیگر این نانوذرات، قابلیت درپوش‌گذاری منافذ بوده که از نشت زودرس عوامل درمانی جلوگیری و رهایش هوشمندانه‌ی آن‌ها را در محل مورد نظر، ممکن می‌سازد. انواع مختلفی از کنترل‌گرهای دریچه‌ای توسعه یافته‌اند که به محرک‌های داخلی یا خارجی پاسخ داده و با رهایش اختصاصی عوامل درمانی، توزیع بهتر آن‌ها را فراهم می‌آورند. در این زمینه، نانوذرات طلا با پیوند کووالانسی به منافذ نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا متصل شده و آن‌ها را مسدود می‌کنند. این کنترل‌گرهای دریچه‌ای به تغییرات pH به‌عنوان محرک داخلی حساس می‌باشند؛ به‌طوری‌که در محیط اسیدی، پروتونه شده و اجازه‌ی آزادسازی داروی محبوس شده را صادر می‌کنند (۷). علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده سامانه‌های حمل داروی MSNs، قابلیت همراه شدن با عوامل تصویربرداری همچون نانوذرات سوپرپارامغناطیس آهن (SPIONs) (nanoparticles Superparamagnetic iron oxide) را داشته، و از این رو اطلاعات دقیقی از روند درمان را بازتاب می‌دهند. نانوذرات معدنی SPION به‌طور گسترده در حوزه‌ی تصویربرداری مورد استفاده قرار می‌گیرند و با داشتن ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی مطلوب، همچون خاصیت مغناطیسی، سمیت پایین، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۸). همچنین، پوشش‌دهی SPION توسط MSNs به‌طور قابل توجهی، پایداری کلوئیدی آن‌ها را بهبود بخشیده و از انتشار ناخواسته‌ی ذرات آهن جلوگیری می‌کند. از این طریق با تلفیق نانوذرات SPION با MSNs می‌توان به یک سامانه‌ی ترانوستیک دست یافته و اطلاعات جامعی در رابطه با توزیع زیستی و تحویل عوامل درمانی به‌دست آورد (۹). در این زمینه، Avedian و همکارانش در سال ۲۰۱۸، سامانه‌ی ترانوستیک $Fe_3O_4@MSNs$ را سنتز و جهت انتقال داروی ارلوتینیب (Erlotinib) به سلول‌های سرطانی HeLa در محیط برون تنی به‌کار بردند. افزایش زیست‌سازگاری و توزیع یکنواخت نانوذرات آهن از دستاوردهای پوشش‌دهی این نانوذرات با استفاده از MSNs می‌باشد (۱۰). همچنین، در مطالعه‌ی دیگری پوشش‌دهی سطح نانوذرات آهن توسط MSNs با هدف جلوگیری از تخریب سریع نانوذرات آهن، انباشته‌شدن آن‌ها و تشکیل لخته در محیط زیستی پیشنهاد شده است (۱۱). سامانه‌های حمل دارو از طریق فرایند افزایش نفوذپذیری و احتباس (EPR) (Enhanced permeability and retention) به‌صورت غیرفعال در ناحیه‌ی توموری تجمع یافته و از طریق منافذ رگ‌های خونی معیوب موجود در ریزمحیط توموری، عبور می‌کنند. به‌علاوه،

به منظور دستیابی به افزایش پاسخ و درمان اختصاصی سرطان کولورکتال، می توان از هدف گیری فعال نیز بهره برد (۱۲). در روش فعال، مولکول های هدفمند خاصی همچون آنتی بادی، پپتید و آپتامر در سطح نانوذرات قرار گرفته و گیرنده های دارای بیش بیان در سطح سلول های سرطانی را شناسایی می کنند (۱۳). لیگاندهای طراحی شده با گیرنده های مورد نظر برهم کنش کرده و با تحویل اختصاصی دارو به سلول های سرطانی، موجب اثربخشی بیشتر آن شده و در مقایسه با روش غیرفعال، آسیب کمتری وارد می کنند. آپتامرها، مولکول های تک رشته ای از جنس DNA یا RNA بوده و با شاخص هایی همچون پایداری مناسب، میل ترکیبی زیاد، هزینه ی تولید کم و عدم بروز پاسخ ایمنی به شهرت رسیدند (۱۴). یکی از گیرنده های بیش بیان شده در سطح بعضی از سلول های سرطانی، EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) می باشد که نقش مهمی در پیام رسانی، تکثیر و مهاجرت سلول ها دارد. این گیرنده، یک گلیکوپروتئین تراغشایی بوده و می تواند جهت دارورسانی هدفمند مورد استفاده قرار گیرد (۱۵). در مطالعه ای توسط Song و همکارانش (۱۶)، آپتامر ۴۸ نوکلئوتیدی از نوع DNA با نام تجاری SLY3C معرفی شد که به صورت اختصاصی گیرنده های بیش بیان EpCAM را در سطح سلول های سرطانی پستان (MDA-MB-23) و کولورکتال (HT-29) شناسایی و به آن ها متصل می شود. در مطالعه ی پیشین، نانوذرات هدفمند مجهز به آپتامر EpCAM را سنتز نمودیم و عملکرد اختصاصی آن ها را در تحویل داروی دوکسوروبیسین (DOX) (Doxorubicin) مورد سنجش قرار دادیم (۱۷). در این پژوهش نیز، به منظور ایجاد یک سامانه ی حمل داروی ترانوستیک هسته-پوسته، نانوذرات مغناطیسی SPIONs توسط MSNs (SPION-MSNs) محصور شدند. سپس داروی شیمی درمانی FU-5 در حفرات MSNs بارگذاری و به منظور رهایش هوشمندانه ی دارو در سلول های سرطانی، از کنترل گره های دریچه ای طلا حساس به pH استفاده گردید (Au-NPs@5-FU). در گام نهایی، پلیمر پلی اتیلن گلیکول (PEG) (Polyethylene glycol) و آپتامر EpCAM به ترتیب با هدف بهبود زیست سازگاری و شناسایی اختصاصی گیرنده های EpCAM به ساختار فوق اضافه و جهت بررسی های برون تنی استفاده شد.

۲- مواد و روش ها

مواد مورد استفاده: SPION، آمونیوم هیدروکسید (NH_4OH) (Ammonium hydroxide) تترامتیل آمونیوم هیدروکسید (TMAH) (Tetramethylammonium hydroxide)، تترائیل اورتو سیلیکات (TEOS) (orthosilicate Tetraethyl)، ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) (3-Aminopropyl)triethoxysilane و ستیل تری متیل آمونیوم برمید (CTAB) (Cetyltrimethylammonium bromide) از شرکت سیگما (آلمان; Sigma) خریداری شدند. پلیمر PEG با گروه های عاملی تیولی و کربوکسیلیک اسید در دو انتها (SH-PEG-COOH) از شرکت JenKem (آمریکا) تهیه گردید. رنگ دی متیل تiazولیل دی فنیل تترازولیوم برمید (MTT) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) (diphenyltetrazolium bromide) ، و آنزیم تریپسین از شرکت تیناب شیمی (ایران) خریداری گردید. سرم جنینی گاو (FBS) (Fetal bovine serum) ، پنی سیلین-استرپتومایسین و محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) از شرکت گیبوکو (اسکاتلند; Gibco) تهیه شد. آپتامر تک رشته ای DNA با توالی 5'- amine CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCCACGTTGTCATGGGGGGTTGGCCTG-3'-thiol از شرکت میکروسینت (سوئیس) تهیه شد. این مطالعه در گروه تجربی و از نوع بنیادی-کاربردی طبقه بندی می شود.

تهیه‌ی نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs: به‌منظور تهیه‌ی نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs، ۲۰۰ میلی‌گرم از نانوذرات SPION توزین و به ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر TEOS به‌صورت قطره‌ای به محلول فوق اضافه و واکنش تحت گاز نیتروژن در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌شدت هم‌زده شد. پس از گذشت ۲ ساعت، نانوذرات تشکیل شده توسط آهنربای خارجی جدا شدند و در ۰/۷۵ گرم CTAB و ۱ میلی‌لیتر آمونیوم‌هیدروکسید به‌مدت ۳ ساعت پراکنده شدند. محصول نهایی با استفاده از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ g به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و سه بار با مخلوط اتانول-آب شستشو داده شد. به‌منظور حذف کامل CTAB، نانوذرات SPION-MSNs به‌مدت ۶ ساعت در کوره‌ای با دمای ۶۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد فعال شدند (۱۸).

اتصال گروه آمین به نانوذرات SPION-MSNs (SPION-MSNs-NH₂): ۱۶ میلی‌گرم از نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs در ۱۶ میلی‌لیتر اتانول و ۶۰ میکرولیتر APTES به‌مدت ۲۴ ساعت هم‌زده شد. در انتها، نانوذرات آمین‌دار حاصل توسط سانتریفیوژ با نیروی ۱۰۰۰۰ g جمع‌آوری و به‌منظور حذف APTES اضافی، سه بار با اتانول شسته شدند (۱۹).

بارگذاری داروی شیمی‌درمانی 5-FU در حفرات MSNs: ۲ میلی‌گرم از نانوذرات حاصل از مرحله‌ی قبل، در ۱ میلی‌لیتر 5-FU با غلظت ۲ میلی‌لیتر پراکنده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. مخلوط واکنش به‌مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی به‌طور مداوم هم‌زده شد. در پایان به‌منظور ارزیابی میزان داروی بارگذاری شده (به‌صورت خلاصه NPs@5-FU نشان داده می‌شود)، نانوذرات به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب روشناور (داروی بارگذاری نشده) در طول موج ۲۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش (UV/VIS) ثبت شد. لازم به ذکر است، درصد میزان داروی بارگذاری شده (%LC) (Loading content) و کارایی بارگذاری (%EE) (Encapsulation efficiency) به‌ترتیب با استفاده از معادلات ۱ و ۲ محاسبه شدند:

معادله‌ی ۱:

$$LC\% = \frac{A - B}{C} \times 100$$

معادله‌ی ۲:

$$EE\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

(A) مقدار کل داروی استفاده شده

(B) داروی بارگذاری‌نشده موجود در روشناور

(C) مقدار کلی نانوذره پس از بارگذاری دارو

در پوش‌گذاری نانوذرات حامل دارو با استفاده از کنترل‌گرهای دریچه‌ای طلا ($Au-NPs@5-FU$): ۱ میلی‌لیتر از کنترل‌گرهای دریچه‌ای طلای سنتز شده در مطالعه‌ی پیشین به ۲ میلی‌گرم از نانوذرات $NPs@5-FU$ اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد (۱۷).

اتصال پلیمر PEG و آپتامر EpcAM به نانوذرات: به منظور پوشش نانوذرات $Au-NPs@5-FU$ با پلیمر PEG و سنتز نانوذرات غیرهدفمند ($PEG-Au-NPs@5-FU$)، ۶ میلی‌گرم از پلیمر PEG دو سر عمل‌کردی ($SH-PEG-COOH$) به مخلوط واکنش حاصل از مرحله‌ی قبل اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. پس از سنتز نانوذرات غیرهدفمند به منظور فعال‌سازی گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید، ۳/۲۷ میلی‌گرم EDC به همراه ۱/۹۶ میلی‌گرم NHS به مخلوط واکنش اضافه گردید. پس از گذشت ۱ ساعت، ۵۰ میلی‌لیتر آپتامر EpcAM با غلظت ۱۰ میکرومولار به واکنش فوق اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد هم زده شد. نانوذرات هدفمند ($Apt-PEG-Au-NPs@5-FU$) با استفاده از سانتریفیوژ (نیروی g ۹۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه) جدا شده و جهت انجام مطالعات در ۵۰۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، پراکنده گردیدند.

ارزیابی خصوصیات نانوذرات سنتز شده: گروه‌های عاملی متصل‌شده به نانوذرات در هر مرحله از سنتز توسط طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) (Thermo Fourier transform infrared spectroscopy) ساخت کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ریخت‌شناسی و همگن بودن نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs، از میکروسکوپ الکترونی گذاره با قدرت تفکیک بالا (HR-TEM; FEI, USA) (High resolution-transmission electron microscopy)، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM; TESCAN MIRA, Czech Republic) (High resolution-transmission electron microscopy) و میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic force microscopy) (AFM; Are Research Co. Iran) استفاده شد. همچنین اندازه و بار سطحی نانوذرات سنتز شده در هر مرحله با استفاده از روش طیف‌سنجی نور پویا (DLS) (Dynamic light scattering) توسط دستگاه Cordouan ساخت کشور فرانسه اندازه‌گیری شد. به علاوه، اتصال آپتامر EpcAM به سطح نانوذرات با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت. بدین منظور، نانوذرات غیرهدفمند، هدفمند، آپتامر EpcAM و نشانگر DNA در چاهک‌های ژل ۲٪ بارگذاری و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل‌نگار تصویربرداری شدند.

بررسی رهایش داروی 5-FU در شرایط آزمایشگاهی: به منظور ارزیابی کارایی کنترل‌گرهای دریچه‌ای طلا، میزان رهایش 5-FU از نانوذرات در پوش‌گذاری شده در دو pH مختلف (۷/۴ و ۵/۴) با استفاده از کیسه‌ی دیالیز (وزن مولکولی: ۱۰۰۰ Da) بررسی شد. بدین منظور، حدود ۳ میلی‌گرم از نانوذرات $Au-NPs@5-FU$ توزین و در کیسه دیالیز حاوی ۳ میلی‌لیتر بافر، مهر و موم شد و سپس در دو ظرف بزرگ‌تر حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط رهایش (pH= ۵/۴ و pH= ۷/۴) شناور گردید. ظروف حاوی کیسه‌ی دیالیز در گرم‌خانه شیکردار با دور ۷۰ rpm و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت قرار داده شد. در فواصل زمانی مشخص، ۳ میلی‌لیتر از محیط خارج و با ۳ میلی‌لیتر محیط تازه جایگزین شد تا حجم محلول ثابت بماند. جذب نمونه‌های خارج شده با استفاده از دستگاه طیف‌سنج UV/VIS در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد.

کشت سلول و مقایسه‌ی اثرات ضدسرطانی نانوذرات: در این مطالعه دو رده‌ی سلولی با بیان متفاوتی از گیرنده‌ی سطحی EpCAM انتخاب شد. بدین منظور رده‌ی سلولی سرطانی کولورکتال (HT-29) به‌عنوان سلول‌هایی با بیان بالای گیرنده‌ی EpCAM و رده‌ی سلولی تخمدان همستر چینی (CHO) (Chinese hamster ovary) با بیان نسبتاً کم این گیرنده، از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری شدند. رده‌های سلولی، در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین-استرپتومایسین) نگهداری و در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ در صد نگهداری شدند. برای ارزیابی و مقایسه‌ی اثرات کشندگی نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند، روش رنگ‌سنجی MTT به‌کار گرفته شد. برای این منظور، هر دو رده‌ی سلولی با تراکم ۷۰۰۰ سلول، در هر یک از چاهک‌های ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت شده و پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلفی از داروی FU-5، نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml با مقدار برابری از داروی FU-5 برای نانوذرات) در سه تکرار به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. در هر یک از بازه‌های زمانی مذکور، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر یک از چاهک‌ها افزوده و به‌مدت ۳ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای حل کردن بلورهای فورمازان تشکیل‌شده، محیط کشت با ۱۵۰ میکرو لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) جایگزین شد و جذب نوری (OD) در طول موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش الیزا (Awareness Technology) ساخت کشور آمریکا خوانده شد. لازم به ذکر است که این مطالعه با مجوز کد اخلاق IR.UM.REC.1400.013 و در دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت.

۳- آنالیز آماری

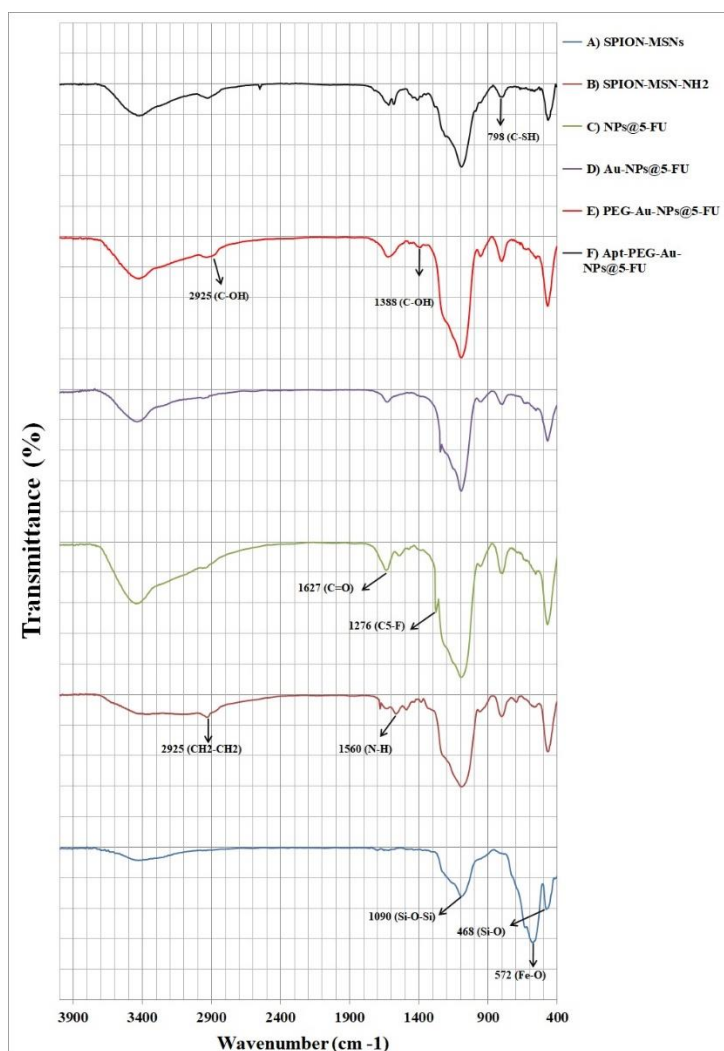
اثرات ضدسرطانی گروه‌های مختلف تیمار شده به‌صورت نمودارهای ستونی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6.1 رسم و مقایسه شد. میزان زنده‌مانی گروه‌های مختلف تیماری در هر دو رده‌ی سلولی با استفاده از آزمون One-way ANOVA با مقایسه‌ی چندگانه‌ی Tukey (Tukey's multiple comparison) بررسی شد. آزمون‌ها حداقل سه بار تکرار و به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) نمایش داده شدند. لازم به ذکر است، معناداری در سطح $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

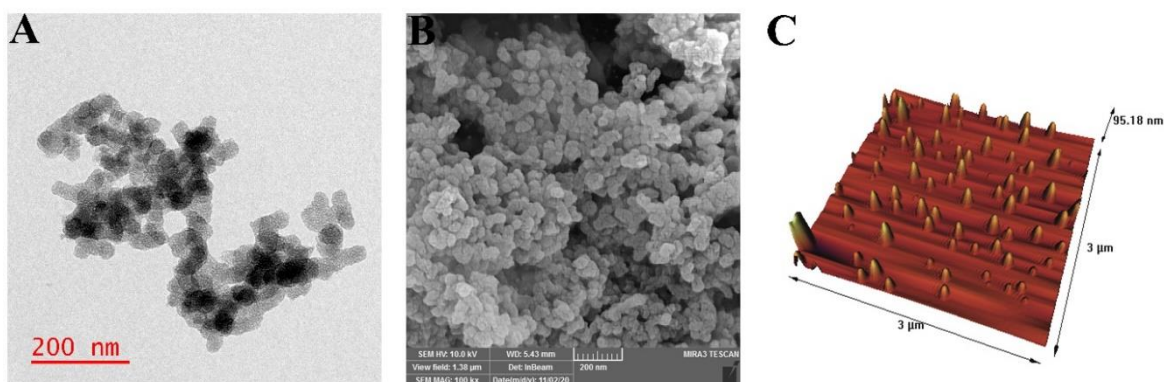
بررسی نانوذرات سنتز شده و تعیین مشخصات آن‌ها

در این پژوهش، ابتدا نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs سنتز و توسط آزمون FTIR، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، نوارهای واقع در $468, 572$ و 1090 cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به پیوندهای Fe-Si-O، Si-O-Si و O می‌باشند (۲۰). همچنین تصاویر HR-TEM، FE-SEM و AFM نشان داد که نانوذرات هسته-پوسته، ریخت‌شناسی کروی داشته و به‌صورت همگن توزیع یافته‌اند (شکل ۲). تصاویر مربوط به HR-TEM هسته‌ی متراکم SPION را در مرکز MSNs نشان داده و وجود منافذ فراوان را در این نانوذرات اثبات نمود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل پتانسیل زتا و آزمون DLS در شکل ۳ (A و B) نشان داده شده است. نانوذرات هسته-پوسته بار سطحی منفی داشته و اندازه-ی آن‌ها حدود $19/8$ nm تخمین زده شد. پس از تایید صحت سنتز SPION-MSNs، گروه آمین به ساختار هسته-پوسته افزوده شد. نوارهای موجود در ناحیه‌ی 1560 و 2925 cm^{-1} در طیف FTIR به‌ترتیب مربوط به کشش‌های گروه‌های N-H و CH₂-CH₂ است که حاکی از اتصال موفقیت‌آمیز گروه‌های آمیدی به SPION-MSNs می‌باشد (۲۱). علاوه براین، حضور گروه‌های مثبت آمیدی، بار سطحی را به سمت محدودی مثبت تغییر داده و اندازه‌ی آن‌ها حدود $20/4$ nm ثبت شد (شکل ۳).

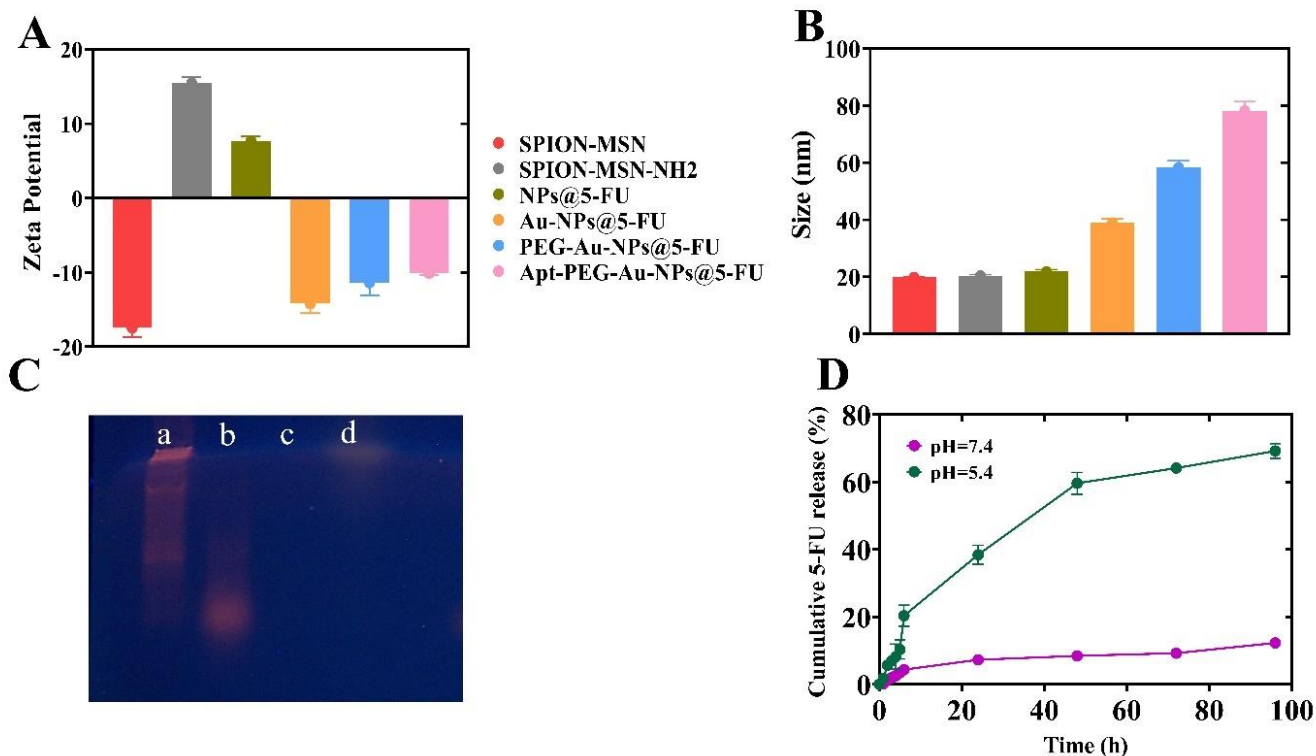
A و B). جهت بارگذاری داروی شیمی‌درمانی 5-FU در حفرات باز SPION-MSNs-NH₂، واکنش بارگذاری به‌مدت ۲۴ ساعت با نسبت حجمی یکسانی از نانوذره و دارو انجام شد. پس از اتمام مدت زمان مذکور، جذب محلول حاصل از سانتریفیوژ، خوانش و میزان LC% و EE% به ترتیب حدود ۴۹٪ و ۹۸٪ محاسبه شد. قله‌های موجود در طیف FTIR در محدوده ۱۲۷۶ و ۱۶۲۷ cm⁻¹ به ترتیب مربوط به کشش‌های C5-F و C=O در ترکیب NPs@5-FU می‌باشند (شکل ۱). همچنین بار سطحی و اندازه‌ی این نانوذرات به ترتیب حدود ۷/۶ mV+ و ۲۱/۸ nm تخمین زده شد. نتایج حاصل، بارگذاری موفقیت‌آمیز داروی 5-FU را در منافذ MSNs اثبات نمود. در ادامه‌ی پژوهش، از کنترل‌گرهای دریچه‌ای طلا جهت مسدود نمودن منافذ MSNs و ره‌ایش هوشمندانه‌ی دارو استفاده شد. در این راستا، بار سطحی و اندازه‌ی MSNs حاوی دارو به ترتیب ۱۴/۱۹- و ۳۸/۹ nm محاسبه شد. در گام بعد، جهت سنتز نانوذرات غیرهدفمند از پلیمر PEG دارای دو انتهای متفاوت (SH-PEG-COOH) استفاده شده و سطح بیرونی Au-NPs@5-FU با استفاده از این پلیمر زیست‌سازگار به‌طور کامل پوشانیده شد. طیف FTIR مربوط به ترکیب PEG-Au-NPs@5-FU، قله‌های جدیدی را در نواحی ۱۳۸۸ و ۲۹۲۵ cm⁻¹ نشان داد که مربوط به کشش‌های C-OH در این نانوذرات می‌باشد. همچنین، اندازه‌ی نانوذرات پس از اتصال PEG حدود ۲۰ nm افزایش یافته و بار سطحی آن‌ها نیز ۱۱/۴ mV- ثبت گردید. در گام آخر، از آبتامر EpCAM برای آماده‌سازی نانوذرات هدفمند استفاده شد. در طیف FTIR ترکیب Apt-PEG-Au-NPs@5-FU، قله‌ی نازکی در ناحیه‌ی ۷۹۸ cm⁻¹ مشاهده شد که به گروه C-SH اختصاص دارد. همچنین پتانسیل زتا و اندازه‌ی نهایی نانوذرات هدفمند آماده‌شده به ترتیب حدود ۱۰/۱ mV- و ۷۸/۲ nm محاسبه شد. اتصال آبتامر EpCAM به سطح نانوذرات غیرهدفمند با استفاده از ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳C قابل مشاهده می‌باشد، آبتامر EpCAM در ناحیه‌ی حدود ۵۰ bp متوقف شده و نانوذرات هدفمند در محل چاهک بارگذاری‌شده، مشاهده شدند. همچنین، نواری برای نانوذرات غیرهدفمند مشاهده نشد.



شکل ۱: بررسی اتصال گروه‌های عاملی متصل شده به نانوذرات. در هر مرحله از سنتز، اتصال گروه‌های عاملی توسط طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه (FTIR) مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲: بررسی ریخت‌شناسی نانوذرات هسته-پوسته‌ی SPION-MSNs. (A) میکروسکوپ الکترونی گذاره با قدرت تفکیک بالا (HR-TEM)، (B) میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) و (C) میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) جهت ارزیابی ریخت‌شناسی نانوذرات هسته-پوسته استفاده شده و تصاویر نشان داد که نانوذرات به صورت کروی و همگن توزیع یافته‌اند.



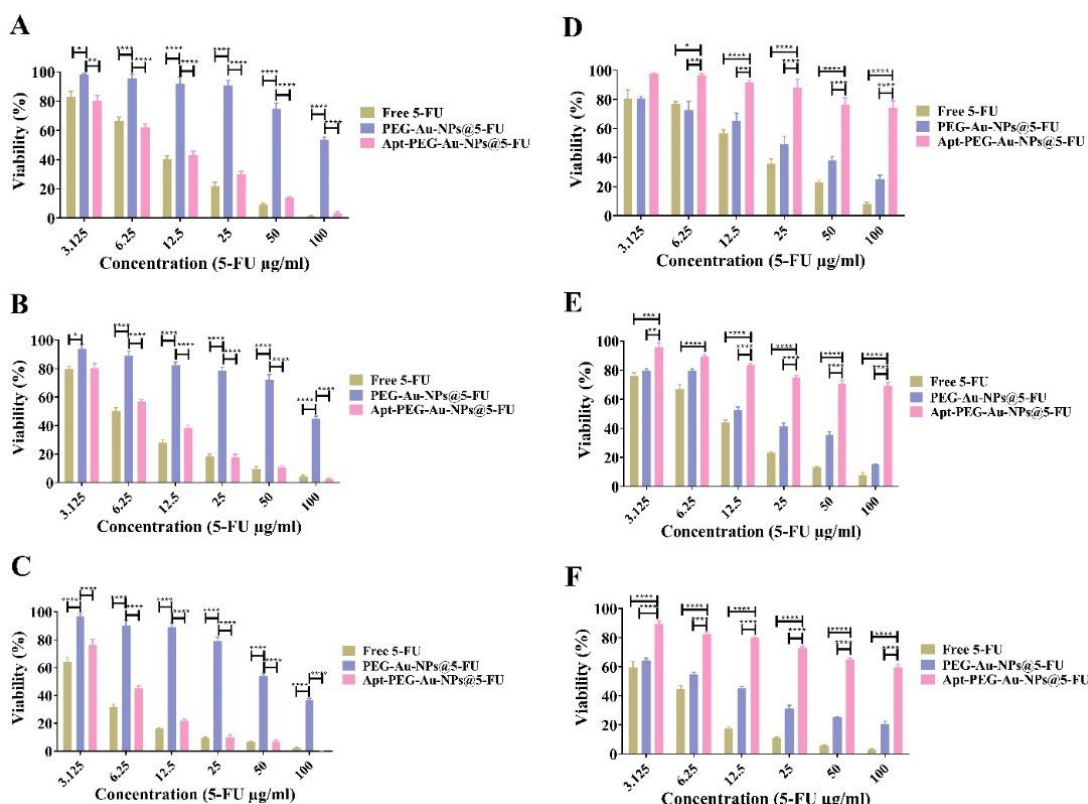
شکل ۳: بررسی خصوصیات مختلف نانوذرات سنتز شده. (A) بار سطحی و (B) اندازه‌ی نانوذرات در هر مرحله از سنتز مورد ارزیابی قرار گرفت. (C) صحت اتصال آبتامر به سطح نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش الکتروفورز تایید شد. a, b, c و d به ترتیب نشان‌دهنده‌ی نشانگر DNA، آبتامر EpCAM، نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند می‌باشند. (D) رهائش داروی شیمی درمانی ۵-فلوروراسیل (5-FU) از نانوذرات درپوش گذاری شده در دو محیط با pH متفاوت مقایسه شد. داده‌ها در شکل‌های A، B و D با سه بار تکرار و به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) نمایش داده شده است.

مطالعه‌ی رهائش دارو از نانوذرات درپوش‌گذاری شده

نانوذرات طلا به pH اسیدی حساس بوده، و لذا می‌توان از این ویژگی در جهت کنترل هوشمندانه‌ی رهائش دارو در داخل سلول‌های سرطانی استفاده نمود. بدین منظور، آزمون رهائش داروی 5-FU توسط نانوذرات Au-NPs@5-FU در محیط مشابه با اندوزوم (pH= ۵/۴) و شرایط فیزیولوژیک (pH= ۷/۴) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳D قابل مشاهده می‌باشد، بیشترین انتشار داروی 5-FU در محیط اسیدی (pH مشابه با اندوزوم سلول‌های سرطانی) بوده و به‌طور معنی‌داری بیشتر از pH طبیعی می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که داروی آزاد شده در محیط اسیدی و طبیعی به ترتیب حدود ۶۹/۲ درصد و ۱۲/۳۰ درصد در ساعت ۹۶ می‌باشد.

مقایسه‌ی نتایج بررسی سمیت سلولی نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند

در این پژوهش، به منظور مقایسه‌ی کارایی اتصال آپتامر در ایجاد سمیت انتخابی، از آزمون MTT استفاده شد. رده‌ی سلولی HT-29 به عنوان بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی EpCAM و سلول‌های CHO با بیان بسیار کم این گیرنده به ترتیب به عنوان سلول مثبت و منفی انتخاب گردید. در ابتدا میزان سمیت سلولی نانوذرات هسته-پوسته (SPION-MSNs) بر روی هر دو رده‌ی سلولی بررسی و نتایج به دست آمده حاکی از عدم سمیت نانوذرات فوق بود (نتایج نشان داده نشدند). همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نانوحامل Apt-PEG-Au-NPs@5-FU سمیت قابل توجهی در مجاورت با سلول‌های HT-29 اعمال نمود که حاکی از اختصاصی بودن این سامانه‌ی حمل دارو می‌باشد. همچنین تفاوت معناداری در سمیت ناشی از PEG-Au-NPs@5-FU و Apt-PEG-Au-NPs@5-FU در تمام غلظت‌های 5-FU در هر سه بازه‌ی زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات هدفمند، سمیت مشابهی با داروی شیمی درمانی 5-FU در برابر سلول‌های HT-29 دارند؛ به طوری که تفاوت معناداری بین این دو گروه مشاهده نشد. به علاوه، نانوذرات Apt-PEG-Au-NPs@5-FU سمیت ناچیزی در مقایسه با گروه PEG-Au-NPs@5-FU و داروی 5-FU در برابر سلول‌های CHO نشان دادند که حاکی از عملکرد اختصاصی و هدفمند این نانوذرات می‌باشد.



شکل ۴: بررسی مقایسه‌ای تأثیرات ضدسرطانی نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند با استفاده از روش MTT. سمیت ناشی از داروی 5-FU، نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند در برابر سلول‌های HT-29 (A, B, C) و CHO (D, E, F) در سه بازه‌ی زمانی ۲۴ (A, D)، ۴۸ (B, E) و ۷۲ ساعت (C, F) مقایسه شد. نتایج به صورت میانگین درصد زنده‌مانی (سه بار تکرار) \pm انحراف از معیار (SD) می‌باشند. (*, **, ***, ****) و **** به ترتیب نشان‌دهنده‌ی اختلاف معناداری در سطح $p < 0.05$ و $p < 0.01$ می‌باشند. ($p < 0.0001$ و $p < 0.001$).

۴- بحث

سرطان کولورکتال سومین سرطان رایج در جهان بوده و بر اساس تحقیقات مختلف میزان شیوع این بیماری به عواملی همچون سبک زندگی، سابقه‌ی خانوادگی و ژنتیک بستگی دارد (۲۲). تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال و به‌کارگیری روش درمانی مناسب و بهینه‌شده به‌طور قابل توجهی نرخ بقای بیماران را افزایش می‌دهد. داروی شیمی‌درمانی 5-FU که برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ تولید و به‌صورت گسترده به‌کار گرفته می‌شد، یکی از داروهای شیمی‌درمانی مؤثر برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد (۲۳). عوارض جانبی شدید بر روی بافت‌های طبیعی و سالم از معایب اصلی داروهای شیمی‌درمانی در نظر گرفته می‌شود. لذا می‌توان عملکرد داروهای شیمی‌درمانی را از طریق سامانه‌های تحویل داروی هوشمند و هدفمند بهبود بخشید (۲۴) و از این طریق موجب افزایش کارایی و کاهش عوارض جانبی نامطلوب آن‌ها شد (۲۵، ۲۶). نانوذرات سیلیکای مزومتخلخل یکی از مهم‌ترین گروه‌های نانومواد معدنی بوده و به‌طور گسترده به‌عنوان یک سامانه‌ی مؤثر دارورسانی استفاده می‌شوند (۲۷). این نانوذرات با ویژگی‌های منحصربه‌فردی همچون توانایی بارگیری چندین عامل درمانی به‌صورت هم‌زمان (۲۸)، قابلیت کنترل رهایش عوامل درمانی، تخلخل مناسب (۲۹)، زیست‌تخریب‌پذیری (۳۰)، زیست‌سازگاری و ترکیب با عوامل تصویربرداری موردتوجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۳۱). در پژوهش حاضر، نانوذرات SPION به‌عنوان یک هسته‌ی قابل ردیابی توسط تصویربرداری در مرکز MSNs قرار گرفته و بدین ترتیب یک سامانه‌ی ترانوستیک طراحی گردید. این نانوذرات هسته-پوسته امکان نظارت بر درمان را فراهم کرده و اطلاعات جامعی از توزیع و جذب نانوذرات در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهند (۳۲). در این مطالعه، پس از بارگذاری داروی شیمی‌درمانی FU-5، دریچه‌های کنترل‌گر منافذ MSNs را مسدود کرده و رهاسازی هوشمند دارو در سلول‌های سرطانی توسط محرک داخلی pH مدیریت شد. همچنین، به‌منظور افزایش زیست‌سازگاری و هدف‌گیری دقیق سلول‌های سرطانی، به‌ترتیب پلیمر PEG و آپتامر EpCAM به ترکیب فوق اضافه شد. لازم به ذکر است که گیرنده‌ی سطحی EpCAM به میزان بالایی بر روی سلول‌های سرطانی کولورکتال نسبت به بافت‌های مجاور بیان شده (۳۳)؛ و از این رو جهت تحویل اختصاصی داروی FU-5 به سلول‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تغییرات صورت گرفته در هر مرحله با موفقیت انجام شده و گروه‌های عاملی مورد نظر توسط طیف‌سنجی FTIR تایید شد. تصاویر HR-TEM، FE-SEM و AFM از SPION-MSNs نشان داد که نانوحامل هسته-پوسته‌ی طراحی‌شده، ریخت‌شناسی کروی با توزیع یکنواخت داشته که این یافته‌ها، مطابق با پژوهش Cai و همکاران بود (۳۴). پس از افزودن گروه‌های آمینی، داروی شیمی‌درمانی FU-5 در منافذ باز MSNs بارگذاری شد. میزان تقریبی EE% و LC% به ترتیب ۴۹ درصد و ۹۸ درصد محاسبه شد که گواهِ بارگذاری موفق داروی FU-5 می‌باشد. ساختار متخلخل و منافذ باز MSNs موجب بارگذاری موفق داروی FU-5 شده که منطبق با نتایج HR-TEM می‌باشد. به‌طور مشابه Iranpour و همکاران (۱۷) نیز میزان بارگذاری داروی DOX در MSNs را حدود ۴۹/۸ درصد نشان دادند جهت پوشاندن منافذ حاوی داروی MSNs و کنترل رهایش دارو از کنترل‌گرهای دریچه‌ای طلا استفاده شد. سازوکار اصلی درپوش‌گذاری را می‌توان به پیوند الکتروستاتیک گروه‌های مثبت آمین موجود در سطح MSNs و گروه‌های منفی سیترات در نانوذرات طلا نسبت داد (۳۵). جهت ارزیابی کارایی درپوش‌گذاری، رهایش داروی FU-5 در محیط شبیه‌سازی شده با اندوزوم سلول‌های سرطانی و شرایط فیزیولوژیک مقایسه شد. نتایج نشان داد که در محیط اسیدی کنترل‌گرهای دریچه‌ای کنار رفته و منجر به رهاسازی داروی FU-5 می‌گردد. لازم به ذکر است این رهایش در محیط اسیدی به‌صورت معناداری بیشتر از محیط فیزیولوژیک بوده و در دو مرحله‌ی سریع و آهسته صورت می‌گیرد. به‌طور مشابه، Liu و همکارانش (۲۸)، رهایش عامل درمانی

موجود در MSNs را از طریق اتصال گروه‌های استال حساس به محیط اسیدی به نانوذرات طلا کنترل نمودند. علاوه بر این، Babaei و همکاران رهایش هوشمندانه‌ی داروی FU-5 را با کمک درپوش‌های طلا کنترل کردند و از این طریق موجب افزایش انتشار عامل درمانی در pH اسیدی شدند (۳۵). بر اساس مطالعات انجام شده، به‌کارگیری درپوش‌های پاسخ‌گو به محیط اسیدی برای اهداف دارورسانی مفید خواهد بود (۳۶). همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، به‌منظور بهبود زیست‌سازگاری و افزایش نیمه‌عمر نانوذرات، می‌توان سطح بیرونی آن‌ها را با استفاده از پلیمر PEG پوشانید. پس از پوشش‌دهی نانوذرات با استفاده از PEG، اندازه‌ی آن‌ها به حدود ۵۸ nm رسید و گروه‌های عاملی C-OH توسط طیف FTIR مشاهده شد. این یافته‌ها همسو با نتایج ذکر شده، حاکی از اتصال موفقیت‌آمیز پلیمر PEG به سطح نانوذرات می‌باشد. مطالعات زیادی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی MSNs را از طریق پوشش‌دهی با PEG بهبود بخشیدند. به‌عنوان مثال، He و همکارانش (۳۷) نشان دادند پوشش‌دهی نانوذرات با استفاده از پلیمر PEG، موجب افزایش نیمه عمر ذرات و کاهش توزیع غیراختصاصی آن‌ها در بافت‌هایی همچون طحال، کبد و ریه می‌شود. علاوه بر این، در مطالعات صورت گرفته توسط Desai و همکارانش (۳۸) مشخص شد که پوشش‌دهی با PEG نه تنها به‌صورت قابل توجهی می‌تواند بر چالش‌های ناشی از تزریق دهانی کمک کند، بلکه نفوذپذیری آن‌ها را به سلول‌های اپی‌تلیالی روده افزایش می‌دهد. برهم‌کنش بین گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید در سطح PEG و گروه‌های انتهایی آمین موجود در سطح آپتامر عامل اصلی تشکیل نانوذرات Apt-PEG-Au-NPs@5-FU بود و این اتصال با استفاده از ژل آگارز تایید شد. همان‌طور که در شکل ۳C نشان داده شده است، آپتامر EpCAM در امتداد نشانگر DNA حرکت کرده و گروه نانوذرات Apt-PEG-Au-NPs@5-FU به علت وزن مولکولی بالا در ابتدای چاهک قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان می‌دهد که نانوذرات هدفمند با اندازه‌ی حدود ۷۸ nm سنتز شدند. به‌طور کلی، مطالعات بسیاری نشان دادند که اثرات ضدسرطانی نانوذرات به اندازه و ریخت‌شناسی آن‌ها بستگی دارد. به‌عنوان مثال، نانوذرات کوچک‌تر از ۱۰ nm به‌سرعت از کلیه دفع می‌شوند و نانوذرات بزرگ‌تر از ۱۰۰ nm در کبد و طحال انباشته شده و نیمه‌عمر کوتاهی نیز دارند (۳۹). همچنین، نانوذراتی با ریخت‌شناسی کروی قابلیت نفوذ در ریزمحیط تومور را داشته (۴۰) و با توجه به این گزارش، نانوذرات کروی هدفمند سنتز شده با اندازه‌ای حدود ۷۸ nm قابلیت مناسبی برای ورود به تومور را دارند. در گام پایانی این پژوهش، اثرات ضدسرطانی نانوذرات غیرهدفمند و هدفمند بر روی دو رده‌ی سلولی با بیان متفاوت گیرنده‌ی EpCAM مقایسه شد. نتایج نشان داد نانوذرات هدفمند با قابلیت شناسایی گیرنده‌ی سطحی EpCAM سمیت بیشتری بر روی رده‌ی سلولی HT-29 اعمال کرده و این تاثیر وابسته به زمان بود؛ به‌طوری‌که با گذشت زمان خاصیت مهاری افزایش یافت. در مقابل، این نانوذرات بر روی رده‌ی سلولی CHO به‌عنوان سلول‌هایی با بیان کم گیرنده‌ی EpCAM نسبتاً بی‌تاثیر بودند. داروی 5-FU و نانوذرات غیرهدفمند به‌صورت غیراختصاصی تاثیر مشابهی بر روی هر دو رده‌ی سلولی نشان دادند. فعالیت ضد سرطانی نانوذرات هدفمند در کنار عدم سمیت آن‌ها بر روی سلول‌های طبیعی، بر فعالیت ضدسرطانی انتخابی این نانوذرات تأکید می‌کند. هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر، Xie و همکارانش افزایش جذب داروی DOX به سلول‌های سرطانی SW620 و در نتیجه مرگ معنادار آن‌ها را پس از اتصال آپتامر EpCAM به سطح MSNs در مقایسه با گروه غیرهدفمند در محیط برون تنی نشان دادند (۴۱). همچنین، Sakhtianchi و همکاران (۴۲) نشان دادند که نانوذرات سیلیکای هدفمند شده با آپتامر MUC-1 فعالیت ضد سرطانی بیشتری در مقایسه با نانوذرات فاقد آپتامر داشته و به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر گروه‌های درمانی، سلول‌های MCF-7 را مهار می‌کند.

۵- نتیجه‌گیری

هنگام طراحی نانوذرات می‌بایست جنبه‌های مختلفی همچون ریزمحیط توموری، تراکم گیرنده‌های دارای بیش‌بیان در

سلول‌های سرطانی و مقایسه‌ی بیان آن‌ها با سلول‌های طبیعی در نظر گرفته شوند تا حداکثر پاسخ درمانی حاصل گردد. از این رو در این مطالعه نانوذرات هسته-پوسته‌ی ترانوستیک، پاسخ‌گو به محرک درونی pH، زیست‌سازگار و هدفمند جهت تحویل اختصاصی داروی 5-FU به سلول‌های سرطانی کولورکتال طراحی و سنتز گردید. بر اساس نتایج ذکر شده، نانوحامل Apt-PEG-Au-NPs@5-FU با اندازه‌ی حدود ۷۸ nm و ویژگی‌های مطلوب ذکر شده، قابلیت استفاده در حوزه‌ی دارورسانی را دارد. اگرچه توسعه‌ی این نانوذرات هدفمند در حوزه‌ی بالینی، همچنان نیاز به آزمون‌ها و بررسی‌های بیشتری دارد.

۶- تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه‌های شیمی معدنی و زیست‌شناسی سلولی مولکولی و با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد (۵۱۷۲۰) انجام شد و بدین وسیله نویسندگان، مراتب قدردانی خود را اعلام می‌کنند.

۷- منابع

1. Patel SG, Karlitz JJ, Yen T, Lieu CH. et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* . 2022; 7(3):262-274.
2. Chakrabarti S, Sara J, Lobo R, Eiring R. et al. Bolus 5-fluorouracil (5-FU) in combination with oxaliplatin is safe and well tolerated in patients who experienced coronary vasospasm with infusional 5-FU or capecitabine. *Clinical Colorectal Cancer*. 2019;18(1):52-57.
3. Sethy C, Kundu CN. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;137:111285.
4. Sukumaran S, Neelakandan M, Shaji N, Prasad P. et al. Magnetic nanoparticles: Synthesis and potential biological applications. *JSM Nanotechnology & Nanomedicine*. 2018;6(2):1068.
5. Dang Y, Guan J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*. 2020;1:10-19.
6. Iranpour S, Bahrami AR, Saljooghi AS, Matin MM. Application of smart nanoparticles as a potential platform for effective colorectal cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021;442:213949.
7. Kundu M, Chatterjee S, Ghosh N, Manna P. et al. Tumor targeted delivery of umbelliferone via a smart mesoporous silica nanoparticles controlled-release drug delivery system for increased anticancer efficiency. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;116:111239.
8. Palanisamy S, Wang Y-M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. *Dalton Transactions*. 2019;48(26):9490-515.
9. Hapuarachchige S, Artemov D. Theranostic Pretargeting Drug Delivery and Imaging Platforms in Cancer Precision Medicine. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(1131):1-8.
10. Avedian, N., Zaaeri, F., Daryasari, M. P., Javar, H. A., & Khoobi, M. pH-sensitive biocompatible mesoporous magnetic nanoparticles labeled with folic acid as an efficient carrier for controlled anticancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;44: 323-332.
11. Shahabadi, N., Falsafi, M., & Mansouri, K. Improving antiproliferative effect of the anticancer drug cytarabine on human promyelocytic leukemia cells by coating on Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016; 141: 213-222.

12. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z. et al. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(8):1185-98.
13. Dhar P, Samarasinghe RM, Shigdar S. Antibodies, nanobodies, or aptamers—which is best for deciphering the proteomes of non-model species? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2485.
14. Maimaitiyiming Y, Yang C, Wang Y, Hussain L. et al. Selection and characterization of novel DNA aptamer against colorectal carcinoma Caco- 2 cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2019;66(3):412-18.
15. Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M. et al. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020;39(3):969-87.
16. Song Y, Zhu Z, An Y, Zhang W. et al. Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Analytical Chemistry*. 2013;85(8):4141-49.
17. Iranpour S, Bahrami AR, Nekooei S, Saljooghi AS. et al. Improving anti-cancer drug delivery performance of magnetic mesoporous silica nanocarriers for more efficient colorectal cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021;19(1):1-22.
18. Zhang Y, Zhi Z, Jiang T, Zhang J. et al. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *Journal of Controlled Release*. 2010;145(3):257-63.
19. She X, Chen L, Velleman L, Li C. et al. Fabrication of high specificity hollow mesoporous silica nanoparticles assisted by Eudragit for targeted drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;445(1):51-60.
20. Dong L, Peng H, Wang S, Zhang Z. et al. Thermally and magnetically dual- responsive mesoporous silica nanospheres: preparation, characterization, and properties for the controlled release of sophoridine. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014; 131(13):1-20.
21. Srivastava P, Hira SK, Sharma A, Kashif M. et al. Telomerase responsive delivery of doxorubicin from mesoporous silica nanoparticles in multiple malignancies: therapeutic efficacies against experimental aggressive murine lymphoma. *Bioconjugate Chemistry*. 2018; 29(6): 2107-2119.
22. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
23. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):330-38.
24. Mitra AK, Kwatra D, Vadlapudi AD. *Drug Delivery* (book): Jones & Bartlett Publishers; 2014.
25. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018;3(1):1-19.
26. Entezar-Almahdi E, Mohammadi-Samani S, Tayebi L, Farjadian F. Recent advances in designing 5-fluorouracil delivery systems: a stepping stone in the safe treatment of colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:5445.
27. Zhang W, Kan Q, Chen L, Xie L. et al. Preparation and application of mesoporous core-shell nanosilica using leucine derivative as template in effective drug delivery. *Chinese Chemical Letters*. 2020;31(5):1165-67.
28. Liu R, Zhang Y, Zhao X, Agarwal A. et al. pH-responsive nanogated ensemble based on gold-capped mesoporous silica through an acid-labile acetal linker. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(5):1500-1510.
29. Florek J, Caillard R, Kleitz F. Evaluation of mesoporous silica nanoparticles for oral drug delivery—current status and perspective of MSNs drug carriers. *Nanoscale*. 2017; 9(40), 15252-15277.

30. Kong M, Tang J, Qiao Q, Wu T. et al. Biodegradable hollow mesoporous silica nanoparticles for regulating tumor microenvironment and enhancing antitumor efficiency. *Theranostics*. 2017;7(13):3276.
31. Bhaisare ML, Abdelhamid HN, Wu B-S, Wu H-F. Rapid and direct MALDI-MS identification of pathogenic bacteria from blood using ionic liquid-modified magnetic nanoparticles (Fe₃O₄@SiO₂). *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(29):4671-83.
32. Muthu MS, Leong DT, Mei L, Feng S-S. Nanotheranostics- application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics*. 2014;4(6):660.
33. Boogerd LS, Van Der Valk MJ, Boonstra MC, Prevo HA. et al. Biomarker expression in rectal cancer tissue before and after neoadjuvant therapy. *OncoTargets and Therapy*. 2018;11:1655.
34. Cai D, Liu L, Han C, Ma X. et al. Cancer cell membrane-coated mesoporous silica loaded with superparamagnetic ferroferric oxide and Paclitaxel for the combination of Chemo/Magnetocaloric therapy on MDA-MB-231 cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-10.
35. Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, Amel Farzad S. et al. Synthesis of theranostic epithelial cell adhesion molecule targeted mesoporous silica nanoparticle with gold gatekeeper for hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine*. 2017;12(11):1261-79.
36. Tıǧlı Aydın RS, Pulat M. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*. 2012;2012.
37. He, Q., Zhang, Z., Gao, F., Li, Y. & Shi, J. In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation. *Small*. 2011; 7(2): 271-280.
38. Desai, D., Prabhakar, N., Mamaeva, V., Karaman, D. Ş., Lähdeniemi, I. A., Sahlgren, C., Rosenholm, J. M. & Toivola, D. M. Targeted modulation of cell differentiation in distinct regions of the gastrointestinal tract via oral administration of differently PEG-PEI functionalized mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2016; 11: 299.
39. Kulkarni SA ,Feng S-S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical Research*. 2013;30(10):2512-22.
40. Shiraishi K, Yokoyama M. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2019;20(1):324-36.
41. Xie, X., Li, F., Zhang, H., Lu, Y., Lian, S., Lin, H., Gao, Y. & Jia, L. EpCAM aptamer-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient colon cancer cell-targeted drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 83: 28-35.
42. Sakhtianchi, R., Darvishi, B., Mirzaie, Z., Dorkoosh, F., Shanehsazzadeh, S. & Dinarvand, R. Pegylated magnetic mesoporous silica nanoparticles decorated with AS1411 Aptamer as a targeting delivery system for cytotoxic agents. *Pharmaceutical Development & Technology*. 2019; 24(9): 1063-1075.