



## ارزیابی آپوتوز و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های سرطانی و طبیعی درمان شده با نانو ذرات فیروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین در شرایط آزمایشگاهی

آرمیتا زندیان<sup>۱</sup>، فرزانه فصاحت<sup>۲</sup>، سیدمحسن میراسماعیلی<sup>۱</sup>، هادی زارع‌زردینی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۳- گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه میبد، میبد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

### چکیده

**مقدمه:** سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیاست. استفاده از نانو حامل‌ها می‌تواند منجر به بهبود مؤثرترین روش درمان سرطان‌ها، یعنی شیمی درمانی، شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر سمیت نانو داروی فیروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین بر رده‌های سلولی MCF7 و HFF و تعیین دوز مؤثر و ارزیابی میزان سطح سلولی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آپوتوز می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، نانو ذرات فیروئین ابریشم حاوی داروی دوکسوروبیسین سنتز شدند. برای ارزیابی اندازه، از تکنیک پراکندگی دینامیک نور (DLS) استفاده شد. سلول‌های طبیعی و سرطانی HFF و MCF7 با غلظت‌های مختلف نانوداروی طراحی شده در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های فوق، جهت بررسی میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها از روش MTT و برای تعیین میزان آپوتوز از کیت V-FITC/PI Annexin و دستگاه فلوسایتومتری استفاده شد.

**نتایج:** ارزیابی مورفولوژی توسط SEM اندازه کوچکتر نانوفیبرین و نانو فیروئین - دوکسوروبیسین را نسبت به سایر ساختارهای نانو نشان داد. درصد کارایی بارگذاری دارو (EE%) ۹۵/۲٪ ارزیابی شد. برای نانو فیروئین - دوکسوروبیسین، حداکثر رهایش دارو طی ۴۸ ساعت به ترتیب در شرایط طبیعی و سلول‌های سرطانی ۳۷/۹ و ۵۹/۶٪ بود. با استفاده از آزمون MTT و محاسبه درصد بقای سلول‌ها (Viability) اثر نانو ذرات فیروئین-دوکسوروبیسین بر مهار رشد رده MCF7 مشاهده شد. نتایج سنجش MTT نشان داد که نانوذرات فیروئین ابریشم لوده شده با دوکسوروبیسین طراحی شده به‌طور معنی‌داری سطح گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را در رده‌های سلولی HFF و MCF-7 کاهش داد ( $P < 0/01$ ). میزان آپوتوز در MCF-7 به میزان قابل توجهی در حضور نانوذرات فیروئین ابریشم لوده شده با دوکسوروبیسین افزایش یافت ( $P < 0/01$ ). این داده‌ها نشان می‌دهد که این دارو در جهت مرگ سلولی از طریق مسیر آپوتوز عمل می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** نانوساختار فیروئین حاوی دوکسوروبیسین مرگ سلولی از طریق مسیر آپوتوز عمل می‌نماید و می‌تواند به‌عنوان کاندیدایی جهت یافتن داروهای ضدسرطانی جدید مورد توجه قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان سینه، نانو فیروئین ابریشم، دوکسوروبیسین، گونه‌های فعال اکسیژن، آپوتوز.

\***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات خون و انکولوژی، بیمارستان شهید صدوقی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران، تلفن: ۰۳۵۳۱۸۳۴۲۳۱، نمابر: ۰۳۵۳۱۸۳۴۲۳۱. Email: hadizarezardini@gmail.com

**ارجاع:** زندیان آرمیتا، فصاحت فرزانه، میراسماعیلی سیدمحسن، زارع‌زردینی هادی. ارزیابی آپوتوز و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های سرطانی و طبیعی درمان شده با نانو ذرات فیروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛ ۱۷(۲): ۲۶-۲۷.

## مقدمه

سرطان بیماری مزمن و ناهمگون ژنتیکی هست که با به‌دست آوردن ویژگی‌هایی از جمله توانایی تکثیر خود به خودی، فرار از آپوپتوز و متاستاز ایجاد می‌گردد که در کشورهای درحال توسعه دومین علت اصلی مرگ‌ومیر می‌باشد (۳-۱). فاکتورهای محیطی از قبیل مصرف الکل، تماس با سرطان‌زاهای شیمیایی، اشعه و سایر فاکتورهای مشابه، از ریسک فاکتورهای سرطان سینه بوده و رابطه نزدیکی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) دارند که با پر اکسیداسیون لیپیدها، کاهش فعالیت آنزیم‌ها و آسیب به DNA نقش مؤثری در ایجاد سرطان دارند (۴). سرطان سینه تومور بدخیمی است که از سلول‌های سینه منشأ می‌گیرد (۵). استراتژی درمان بر اساس نوع سرطان، مرحله و شرایط فردی است (۶). درمان سرطان سینه مشتمل بر جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی می‌باشد (۷). یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان شیمی‌درمانی است که دارای معایب مختلفی همچون هدف‌گذاری غیراختصاصی، نرسیدن دوز کافی از داروهای شیمی‌درمانی به سلول‌های سرطانی و مقاومت سلول‌های سرطانی به داروی شیمی‌درمانی می‌باشد (۸، ۹). یکی از داروهای عمده در شیمی‌درمانی برای درمان سرطان سینه، دوکسوروبیسین است (۱۰). تمایل بالای اتصال داروی دوکسوروبیسین به DNA، سبب اختلال فیزیکی در عملکرد آنزیم توپوایزومراز شده و در نهایت سبب اختلال در فرایند همانندسازی سلول‌ها می‌گردد (۱۱). تجویز وریدی این دارو با پخش سیستمیک نه‌تنها سلول‌های سرطانی بلکه کلیه‌ی بافت‌ها و دستگاه‌های مختلف بدن را تحت تأثیر قرار داده و احتمال ایجاد سمیت و موتاسیون در این بافت‌ها را بالا می‌برد (۱۲). استفاده از تکنیک‌های غیرفعال و فعال تحویل دارو، می‌تواند برای کاهش عوارض داروهای شیمی‌درمانی بر روی بافت‌های سالم استفاده شود. در میان تمام سیستم‌های تحویل، نانو حامل‌ها ویژگی‌های مناسب‌تری برای این منظور دارند (۱۳) نانو حامل‌های پروتئینی به‌دلیل هزینه ساخت پایین، تحریک سیستم ایمنی، امکان بارگذاری هم‌زمان داروهای متنوع، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری دارای خواص برتری برای انتقال دارو هستند. از پروتئین‌های مختلف مانند ابریشم، کراتین، کلاژن، الاستین، ذرت و پروتئین سویا برای تهیه نانو ذرات مبتنی بر پروتئین استفاده می‌شود (۱۶-۱۴). نانو ذرات به‌دلیل نفوذپذیری‌های بیشتر به تومورهای سرطانی و در محل تومورها بیشتر تجمع می‌کنند (۱۷) و همچنین به مدت طولانی بدون ایجاد سمیت در دسترس سلول‌های سرطانی قرار می‌گیرند (۱۸). طبق تحقیقات ترکیبات ضد سرطانی که فعالیت آنتی‌اکسیدانتی دارند، ممکن است اثرات سودمند خود را به‌واسطه متعادل ساختن سطوح ROS اعمال نمایند، به‌طوری‌که نه‌تنها از تکثیر سلول‌های سرطانی ممانعت نمایند،

بلکه امکان وقوع آپوپتوزیس را نیز فراهم کنند (۱۹). یکی از سازوکارهای عملکردی داروهای ضدسرطانی القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌باشد (۲۰). لذا استفاده از ترکیبات شیمیایی القاکننده آپوپتوز یکی از اهداف اصلی درمان سرطان می‌باشد (۲۱). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک و برنامه‌ریزی شده سلولی است و مکانیسمی است که سلول‌ها به‌منظور کنترل مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و یا در پاسخ به آسیب DNA که با موفقیت ترمیم نشده است، متحمل می‌شوند (۲۲). نانوذرات فیبروئین ابریشم به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین نانوذرات پروتئینی شناخته می‌شوند که می‌توانند در جنبه‌های مختلف به‌خصوص سیستم‌های تحویل دارو استفاده شوند.

لذا در این مطالعه نانوذرات فیبروئین ابریشم توسط داروی دوکسوروبیسین بارگذاری شدند و سمیت آنها بر روی سلول‌های طبیعی و سرطانی سنجش شد و اثر ظان‌ها در لقاء مرگ سلولی آپوپتوز و سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

سلول‌ها، مواد شیمیایی و ابزارها

رده‌های سلولی سرطانی سینه MCF-7 و سلول نرمال HFF از انستیتو پاستور خریداری گردید. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS)، تریپسین/EDTA و پنی‌سیلین از شرکت Gibco (اسکاتلند) خریداری شد. سایر مواد نظیر تریپان بلو، نمک فسفات با خاصیت بافری (Phosphate Buffered Saline) یا (PBS)، MTT و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت سیگما آلدريج (آلمان) خریداری شد. کیت رنگ‌آمیزی آنکسین/ پروپیدیوم یدید (Annexin V-FITC/PI) از شرکت Affymetrix آمریکا، خریداری گردید.

سنتر و مشخصه‌یابی نانوذرات فیبروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین برای استخراج پروتئین فیبروئین ۵ گرم پيله ابریشم تمیز شده در آب مقطر جوشانده و در یک ظرف شیشه‌ای ریخته شد. با افزودن کربنات سدیم ۰/۰۲ مولار، محلول حاصل، حرارت داده شده و برای ۴۰ دقیقه هم‌زده شد. فیبروئین استخراج شده جمع‌آوری گردید. برای خنک شدن فیبروئین جمع‌آوری شده، به آن یک لیتر آب مقطر اضافه شد و برای مدت ۲۰ دقیقه بر روی استیرر، هم زده شد. سپس، فیبروئین‌ها خارج شده و بر روی یک فویل آلومینیومی پهن و زیر هود به مدت یک شبانه‌روز خشک گردید. یک گرم از فیبروئین خشک شده داخل بشر ریخته و با مقدار کمی آب خیس گردید. سپس ۹ گرم لیتیم بروماید به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه به‌وسیله مگنت بهم زده شد. برای حذف نمک لیتیم بروماید، از کیسه دیالیز استفاده شد. محلول آماده شده در مرحله قبل، در داخل کیسه دیالیز از قبل آماده شده ریخته شد و در داخل یک بشر حاوی آب مقطر و دمای ۷۰ درجه قرار داده شد. به‌منظور تسریع در فرآیند نمک‌زدایی، بشر بر روی

مگنت استیرر قرار گرفت. در بازه‌های زمانی مختلف، آب بشر تعویض گردید. فرآیند دیالیز در زمان ۴۸ ساعت کامل شد و یک محلول کهربایی و شفاف به دست آمد. برای بارگذاری دارو، غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین با غلظت‌های مختلف محلول پروتئین فیروئین آماده مخلوط شد. این محلول به روش خشک شدن با یخ به مدت ۴۸ ساعت پردازش شد. سپس، نمونه‌ها در ویال‌های جداگانه جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شدند. برای کاهش اندازه، از امواج فراصوت استفاده شد. نمونه‌های تهیه‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی مادون قرمز و (FTIR) مشخصه‌یابی شدند. برای ارزیابی اندازه، از تکنیک پراکندگی دینامیک نور (DLS) استفاده شد.

ارزیابی بارگذاری و رهایش دارو

برای ارزیابی بارگذاری و رهایش دارو، منحنی استاندارد براساس غلظت‌های مختلف DOX و میزان جذب آن در ۴۸۰ نانومتر تهیه شد. برای ارزیابی بارگذاری دارو، پس از سانتیفریوژ ۱۵ میلی‌لیتر از هر سیستم طراحی‌شده، مایع‌رویی رقیق شد و میزان جذب را در ۴۸۰ نانومتر خواند. غلظت داروهای بارگیری شده توسط منحنی استاندارد محاسبه شد.

درصد کارایی گیرانداختن (درصد دارویی که با موفقیت در نانو ذرات محبوس می‌شود)  $EE\% =$  براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times [دارو\ اضافه\ شده / دارو\ اضافه\ شده - داروی\ آزاد] = EE\%$$

ظرفیت بارگیری (درصد وزن ذرات نانو از دارو تشکیل شده است)  $LC\%$  براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times [وزن\ دارو / نانو\ ذرات\ محبوس] = LC\%$$

برای ارزیابی رهایش دارو، ۱۵ میلی‌گرم نانو ذرات خشک در بافر PBS حل شد (pH=۷/۴) و در کیسه دیالیز ریخته شد. کیسه دیالیز به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بافر (pH=۷/۴) PBS غوطه‌ور شد. نمونه‌برداری از محیط بافر در اطراف کیسه دیالیز در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. شرایط مشابه در بافر با pH=۵/۴ در C40۰ تکرار شد. شرایط اول و دوم به‌عنوان محیط طبیعی و سرطانی سلول در نظر گرفته شد. غلظت داروی آزاد شده در محیط بافر بر اساس میزان جذب در ۴۸۰nm و منحنی استاندارد محاسبه شد.

رده سلولی و شرایط کشت

رده‌های سلولی سرطانی سینه (MCF-7) و سلول طبیعی (HFF)، از انستیتو پاستور خریداری گردید و براساس پروتکل استاندارد در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰٪ پنی‌سیلین (۵۰ میکرولیتر) به‌صورت تک لایه در فلاسک رشد داده شدند و در آنکوباتور ۳۷ سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت اشباع نگهداری شدند.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT

سمیت سلولی با استفاده از روش MTT انجام شد. سلول‌ها کشت داده شدند سپس به تعداد cell/well 10000 سلول زنده در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای در پلیت‌های جداگانه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C آنکوباتور شدند و سلول‌ها از نظر چسبیدن به کف پلیت توسط میکروسکوپ Invert مورد بررسی قرار گرفتند سپس به سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانو دارو (۱/۳۳، ۰/۶۶۵، ۰/۳۳، ۰/۱۶ و ۰/۸۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت، انکوبه شدند. سلول‌های چاهک کنترل با بافر PBS تیمار شدند. در زمان‌های ذکر شده، سمیت توسط آزمون MTT ارزیابی شد. جهت انجام این آزمون، آزمون پودر MTT را با غلظت نهایی ۵/0 mg/ml در حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه کرده، بعد از گذشت ۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به همه چاهک‌ها اضافه کرده سپس بعد از ده دقیقه مقادیر OD جذب‌شده را با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای کاهش خطا، این عملیات را با ۳ بار برای هر غلظت انجام دهید. IC50 به‌عنوان کمترین غلظت با ۵۰٪ بازدارندگی رشد سلول در مقایسه با گروه کنترل اندازه‌گیری شد. توان‌زیستی سلول‌ها براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{میانگین جذب نوری کنترل} / \text{میانگین جذب نوری تست}) = \text{میزان توان‌زیستی}$$

آماده‌سازی سلول‌ها جهت ارزیابی ROS

آماده‌سازی تمام رده‌های سلولی طبق پروتکل گزارش شده در تحقیق سوهی کیم و همکاران انجام شده است (۲۳). سطوح پایه ROS درون سلولی در غیاب القای تولید تروت بوتیل هیدروپراکسید (TBHP؛ I36007؛ پروب‌های مولکولی) ارزیابی شد. سلول‌ها با TBHP (غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بعد از اتمام انکوباسیون جهت اندازه‌گیری مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت ROS با استفاده از یک پروب فلورسنت حساس به اکسیداسیون، شناخته‌شده به‌عنوان (۵ و ۶ -کربوکسی) -۲' و -۷ دی کلرودی هیدروفلوئورسئین دی استات (کر بوکسی) -H2DCFDA؛ I36007؛ پروب‌های مولکولی) ارزیابی شد.

برای اندازه‌گیری گونه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی (ROS)، به سلول‌ها ۲ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS) افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتیفریوژ شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی به سلول‌ها اضافه شده و با استفاده از سیستم فلوسایتومتری (FACSCalibur) (Becton Dickinson Biosciences, USA, CA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها توسط نرم‌افزار FlowJo تجزیه و تحلیل شد.

بررسی آپوپتوز

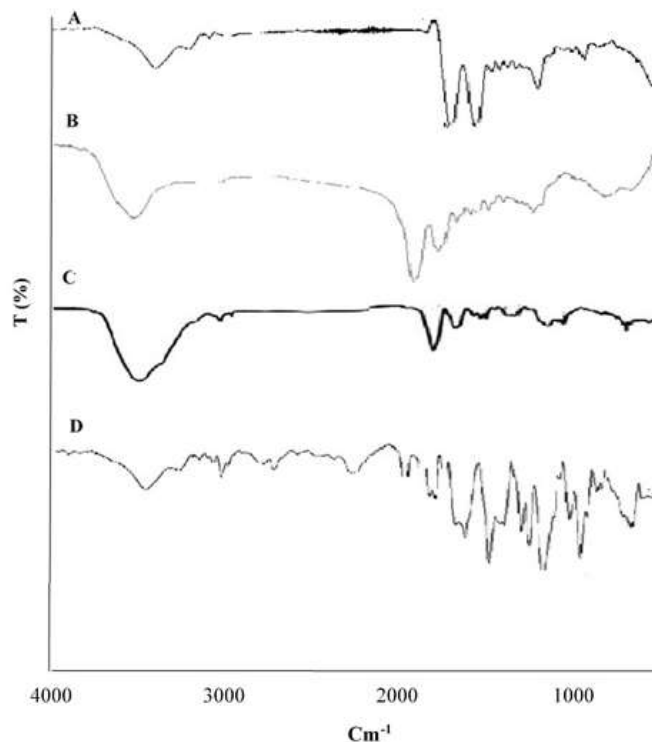
Smirnov بررسی شد. از روش آماری تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (nonparametric or mixed) one-way ANOVA برای مقایسه گروه‌ها با کنترل استفاده شد. همچنین مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

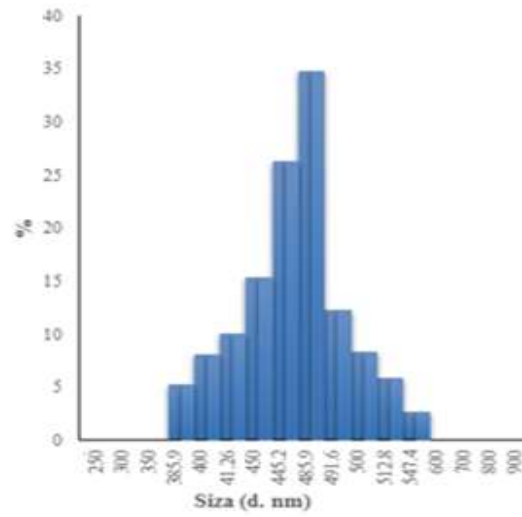
نتایج تجزیه و تحلیل FTIR در شکل ۱ نشان داده شده است. در طیف مربوط به فیبروین، پیک‌های محدوده ۱۶۳۰-۱۶۴۵، ۱۵۳۰-۱۴۵۰ و ۱۲۳۰-۱۲۴۰  $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب نشان‌دهنده حضور آمید I (کشش C-O)، آمید II (خم شدن N-H) و آمید III (کشش C-N) هستند. در طیف‌های نانوفیبروین-دوکسوروبیسین پیک‌های مشخص در  $3291 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاشات کششی NH- مربوط می‌شوند. نانوفیبروین ابریشم دارای یک پیک مشخص در  $1400 \text{ cm}^{-1}$  است که توسط نشان‌دهنده ارتعاش کششی C-N است. در طیف نانوفیبروین - دوکسوروبیسین، پیک‌های قابل مشاهده در ۲۸۴۵، ۱۲۸۲، ۱۲۱۲ و  $988 \text{ cm}^{-1}$  در هر گروه مربوط به گروه‌های

هر رده سلولی با غلظت بهینه از نانو ذرات فیبروئین ابریشم به مدت ۲۴ ساعت تیمار و سپس سلول‌ها از کف فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۲۵٪ از کف فلاسک کشت جداسازی شده و بعد از شستشو با محلول PBS مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها توسط X 1 buffer (Fluorescein Binding شستشو داده شد.  $5 \mu\text{M}$  محلول ( FITC (isothiocyanate متصل به Annexin V اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و در تاریکی انکوبه گردید. سپس به میزان یک میلی‌لیتر از محلول Binding Buffer x 1 اضافه و سانتریفیوژ گردید و به رسوب سلولی  $500 \mu\text{l}$  دیگر x1 Buffer Binding اضافه شد. بعد از افزودن ۳ میکرولیتر رنگ پروپودیوم یدید، نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری ( BD biosciences, San Jose, CA, USA) BD FACS Calibur مورد خوانش و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

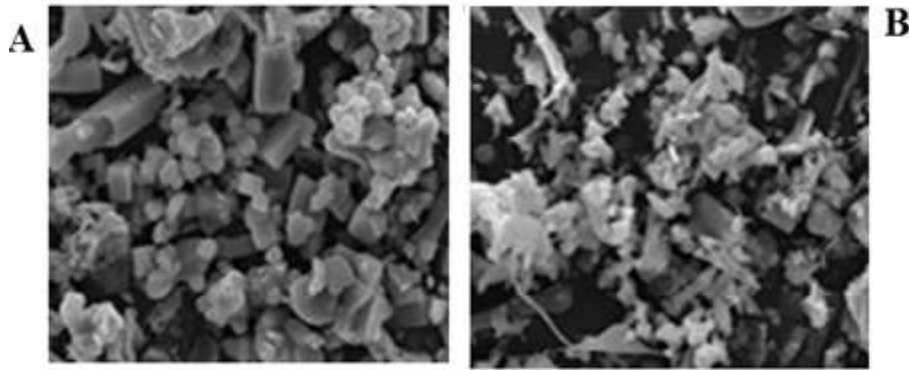
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS، Graph Pad Prism و Excel انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارایه شدند. طبیعی بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون‌های Shapiro-Wilk و Kolmogorov-



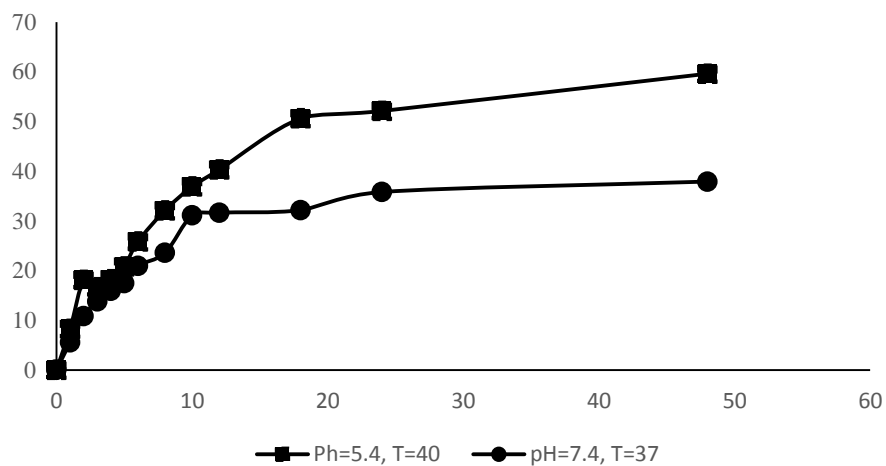
شکل ۱- نانو ساختارهای طراحی شده (A) فیبروئین ابریشم (B) نانو فیبروئین (C) دوکسوروبیسین (D) دوکسوروبیسین- نانوفیبروئین



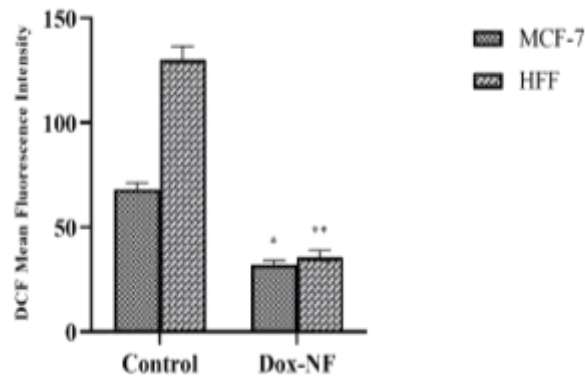
شکل ۲- داده‌های DLS دوکسوروبیسین - نانو فیروئین



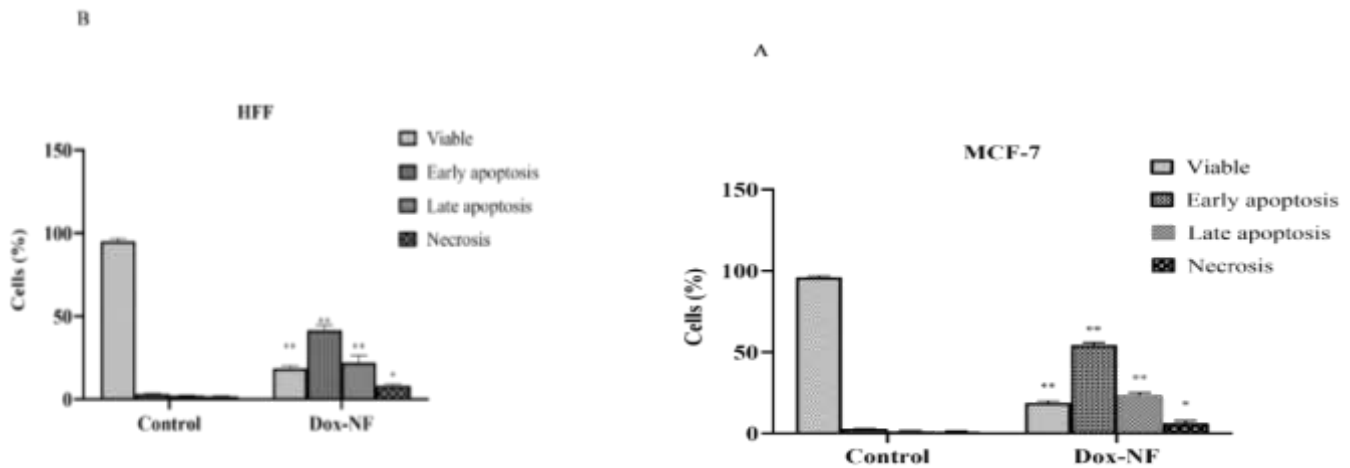
شکل ۳- تصاویر SEM از نانو فیروئین (A)، دوکسوروبیسین - نانو فیروئین (B)



شکل ۴- نمودار رهایش دارو از منحنی استاندارد دوکسوروبیسین براساس میزان جذب در ۸۰nm دوکسوروبیسین - نانو فیروئین در شرایط عادی سلول (PH=7.3 و T=37) و سرطان (PH=4.5 و T=40)



شکل ۵- سطح انواع اکسیژن فعال داخل سلولی (ROS) در رده سلول‌های طبیعی و سرطانی. DOX-NF: DOX-Nanofibroin. داده‌ها میانگین  $\pm$  SD هستند. داده‌ها از حداقل سه آزمایش مستقل به دست آمد. \* $P < 0.05$  و \*\* $P < 0.01$  در مقابل کنترل.



شکل ۶- تشخیص آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC / PI و فلوسیتومتری. (A) MCF-7 و (B) HFF اختلافات معنی‌دار بین گروه کنترل در مقابل هر رده سلولی تحت درمان با \* $P < 0.05$  و \*\* $P < 0.01$  در مقابل شاهد نشان داده شده است.

بررسی سمیت سلولی نانو فیبروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین بر روی رده سلول‌ها نشان داد که این ترکیب دارویی به صورت وابسته به دوز منجر به مهار معنی‌دار رشد سلولی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد ( $P < 0.01$ ). همچنین مقادیر دوز مؤثر دارویی، کمترین دوز دارویی که ۵۰٪ رشد سلولی را مهار می‌کند ( $IC_{50}$ )، برای رده سلولی MCF7 و HFF به ترتیب برابر ۰/۲۲۹ و ۰/۶۴۷ به دست آمد.

تیمار سلول‌های رده سرطانی MCF-7 با نانوفیبروئین ابریشم حاوی دوکسوروبیسین باعث کاهش معنی‌داری در سطح ROS درون سلولی در مقایسه با سلول‌های همین رده بدون تیمار دارویی به عنوان کنترل شدند ( $P < 0.01$ ) (شکل ۵). در سلول‌های سرطانی پستان برای کشف اینکه آیا فعالیت ضدتکثیر نانو دارو مربوط به القای آپوپتوز است، ما از فلوسیتومتری استفاده کردیم. داده‌های به دست آمده نشان داد که میزان آپوپتوز اولیه (انکسین-FITC + به علاوه PI-), آپوپتوز دیررس

عملکردی دوکسوروبیسین (کینون و کربونیل‌ها) و همچنین تشکیل پیوندهای آمین بین دوکسوروبیسین و نانوفیبرین است. ارزیابی اندازه ذرات توسط DLS نشان داد که اندازه نانوفیبرین ۴۸۵/۹ نانومتر بوده است (شکل ۲). ارزیابی مورفولوژی توسط SEM اندازه کوچکتر نانوفیبرین و نانو فیبروئین - دوکسوروبیسین را نسبت به سایر ساختارهای نانو نشان داد (شکل ۳). از طرف دیگر نانو ذرات حاوی دوکسوروبیسین کوچکتر از نانو ذرات بدون دوکسوروبیسین هستند (شکل ۳). براساس معادلات ۱ و ۲،  $EE\% = 95/2$  و  $LC\% = 34/5$  بود. ما همچنین رهاسازی دارو را در دو شرایط مختلف ارزیابی کردیم: سلول‌های طبیعی و سرطانی (شکل ۴). براساس این شکل، برای نانو فیبروئین - دوکسوروبیسین، حداکثر رهایش دارو طی ۴۸ ساعت به ترتیب در شرایط طبیعی و سلول‌های سرطانی ۳۷/۹ و ۵۹/۶٪ بود.



(انکسین-FITC + به علاوه PI +) و همچنین سلول‌های نکروز شده (PI +) به دنبال ۲۴ ساعت درمان با داروی نانو فیروئین حاوی دوکسوربیسین در هر دو رده MCF-7 و HFF در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ( $P < 0.001$ ) (شکل ۷). همچنین، کاهش قابل‌توجهی در تعداد سلول‌های زنده تحت تیمار دارویی در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت که تایید کننده تأثیر این نانو دارو بر روند زنده مانی سلول‌ها می‌باشد.

### بحث

نانو ذرات پروتئینی مانند فیروئین ابریشم دارای ویژگی‌های منحصر به فردی برای طراحی سیستم تحویل دارو هستند. خصوصیات اصلی این نانوذرات زیست سازگاری، تجزیه‌پذیری و سینتیک کنترل‌شده رهایش دارو است (۲۴ و ۲۵). در این مطالعه، از نانوذرات مبتنی بر پروتئین فیروئین به‌عنوان سیستم تحویل داروی دوکسوربیسین استفاده شد. اطلاعات به‌دست‌آمده نشان داد که در نانوذرات فیروئین حاوی دوکسوربیسین، میزان آپوپتوز را (به‌عنوان مجموع سلول‌های آپوپتوز اولیه و دیررس) در سلول‌های MCF-7 و HFF به‌ترتیب به میزان ۷۸/۰۱٪ و ۶۳/۶۷٪ افزایش دادند. نرخ القای آپوپتوز در رده سرطانی بیشتر از رده طبیعی بود. مطالعات مشابه نشان داد که نانو ساختارها باعث ایجاد آپوپتوز intrinsic و extrinsic می‌شوند (۲۸-۲۶). سوهاییبودین و همکاران اظهار داشتند که سمیت نانوساختارها، به‌ویژه در القای آپوپتوز، به اندازه آنها وابسته است. هر چه ابعاد نانوساختار کوچک‌تر باشد، تأثیر آن بر القای آپوپتوز و سایر فرآیندهای مربوط بیشتر است. آپوپتوز توانایی یک سلول در القای خود تخریبی به‌وسیله فعال‌سازی برنامه خودکشی داخل سلولی می‌باشد که هنگامی که دیگر نیازی به سلول‌ها نیست یا سلول‌ها به‌طور جدی آسیب دیده‌اند، این شرایط رخ می‌دهد. از نظر مورفولوژیکی، آپوپتوز به‌وسیله حبابدار شدن ظاهر غشاء، چروکیدگی سلول، متراکم شدن کروماتین، شکافتگی DNA و قطعه‌قطعه شدن سلول به اجساد مرده غشادار مشخص می‌شود (۲۹). مطالعه ما، مطابق با مطالعات مشابه، نتایج مشابهی را در مورد تأثیر اندازه‌های مختلف نانو ذرات بر میزان القای آپوپتوز نشان داد. بعد نانومتری ساختارهای طراحی شده منجر به تأثیر بیشتر داروی دوکسوربیسین و اثر سینرژسم نانو در راستای القای آپوپتوز شد. سوپیا و همکاران با طراحی سامانه نانویی بر پای نانوذرات فیروئین ابریشم و فولیک اسید برای داروی اپی‌روبیسیین نشان دادند که نانو ذرات فیروئین نه‌تنها باعث افزایش احتباس داروی نوترکیب در محل تومور می‌شود، بلکه باعث افزایش جذب سلولی دارو در سیستم‌های انتقال توسط اندوسیتوز می‌شود (۳۰). لی و همکاران در مطالعه‌ای مشابه اثرات سامانه نانوذرات فیروئین ابریشم بارگذاری شده با فلورواوراسیل و کورکومین را بررسی کردند. این گروه نشان دادند که

میزان آپوپتوز پس از تیمار با این سامانه به میزان قابل توجهی بیشتر از سلول‌های تیمار شده با داروهای آزاد است. نانوساختار حاوی دارو همچنین باعث کاهش اندازه تومورهای می‌شود و کاهش سطح ROS شد (۳۰). مطالعه ما نیز نشان داد که نرخ آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات فیروئین حاوی دوکسوربیسین به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. مولکول‌های ROS در دوزهای خیلی کم و خیلی بالا در تکثیر سلول‌های سرطانی دخیل هستند (۳۱). البته عدم‌تغییر و یا حتی بیان بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح سلولی ROS برای ممانعت از پیشرفت سرطان ضروری می‌باشد. لذا هدف قرار دادن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند علاوه بر مطالعه اثرات داروهای ضدسرطانی بر روی فعالیت و بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در درک مکانیسم عملکرد دارو نیز مؤثر باشد (۳۲). تومه و همکاران نشان دادند که فیروئین ابریشم به‌عنوان سیستم تحویل دارو برای رهاسازی کنترل‌شده دارو، خواص قوی و منحصر به فردی دارد (۳۳). بررسی رهایش دارو در دو شرایط مختلف محیطی نیز نشان داد که نانوذرات فیروئینی ابریشم، متناسب با شرایط محیطی، میزان رهایش و سرعت رهایش متفاوتی دارند. در شرایط اسیدی، میزان رهایش دارو از سامانه نانویی با سرعت بیشتری نسبت به محیط با اسیدیته خنثی رخ می‌دهد. بعد از ۴۸ ساعت، در PH اسیدی، ۵۹/۶ و در PH خنثی، ۳۷/۹ درصد رهایش دارو، اتفاق می‌افتد. این تفاوت نشان می‌دهد که سامانه نانویی می‌تواند متناسب با اسیدیته محیط، سرعت رهایش متفاوتی داشته باشد. این تفاوت می‌تواند در هدفمندسازی رهایش دارو در سلول دلتخواه مؤثر و مفید باشد. با توجه به PH پایین‌تر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، این برتری نسبی برای سامانه نانویی فیروئینی ابریشم برای رهایش بیشتر دارو در سلول‌های سرانی فراهم می‌کند. یکی از کمبودهای داروی شیمی‌درمانی توزیع یکنواخت آنها در همه سلول‌ها و بافت‌ها، اعم از طبیعی و سرطانی است (۳۴). رهاسازی هدفمند این داروها براساس ویژگی‌های مختلف بیوفیزیکی و بیوشیمیایی سلول‌های سرطانی یکی از راه‌های اصلی برای غلبه بر این نقص است (۳۵). از طرف دیگر، رهایش آهسته دارو منجر به کاهش هم زمان دوزهای تجویز شده دارو می‌شود (۳۶). وجود رهایش وابسته با شرایط فیزیولوژیک محیط از سامانه نانویی طراحی شده، می‌تواند این توزیع یکسان را تا حدودی مرتفع سازد و با رهایش بیشتر دارو در سلول‌های سرطانی، عوارض کمتری بر سلول‌های طبیعی بر جای گذارد، زیرا در یک بازه زمانی یکسان، دوز بالاتری از دارو در سلول‌های سرطانی آزاد می‌شود. علت رهایش سریع‌تر دارو در PH اسیدی می‌تواند به‌دلیل اتصال بین دوکسوربیسین و گروه کربوکسیل نانوفیروئین، پروتون‌دهی مجدد گروه‌های آمین دوکسوربیسین و افزایش پایداری دوکسوربیسین در PH اسیدی باشد.

- nanotechnology in biomedicine: a major focus on cancer therapy. *J Nano Res* 2016; 35: 55-66. doi:10.4028/www.scientific.net/JNanoR.35.55
14. Hong S, Choi DW, Kim HN, Park CG, Lee W, Park HH. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics* 2020;12:604. doi: 10.3390/pharmaceutics12070604
  15. Martínez-López AL, Pangua C, Reboredo C, Campión R, Morales-Gracia J, Irache JM. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int J Pharm* 2020;581:119289. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119289
  16. Varanko A, Saha S, Chilkoti A. Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2020. doi: 10.1016/j.addr.2020.08.008
  17. Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol Med* 2015;21:223-32. doi: 10.1016/j.molmed.2015.01.001
  18. Shakya AK, Nandakumar KS. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface* 2013;10:20120536. doi: 10.1098/rsif.2012.0536
  19. Ali M, Mahmoud A, Rashad A. Inhibition of human MCF-7 breast cancer growth by free radicals enhancement of polycondensed thienopyrimidine derivatives. *Asian J Pharm Clin Res* 2011;4:118-22.
  20. Zhang H-Z, Kasibhatla S, Kuemmerle J, Kemnitzer W, Ollis-Mason K, Qiu L, et al. Discovery and structure-activity relationship of 3-aryl-5-aryl-1, 2, 4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers and potential anticancer agents. *J Med Chem* 2005;48:5215-23. doi: 10.1021/jm050292k
  21. Li J, Cheng Y, Qu W, Sun Y, Wang Z, Wang H, et al. Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;108:84-93. doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00613.x
  22. Syam S, Abdul AB, Sukari M, Mohan S, Abdelwahab SI, Wah TS. The growth suppressing effects of girinimbine on HepG2 involve induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Molecules* 2011;16:7155-70. doi: 10.3390/molecules16087155
  23. Kim S, Agca C, Agca Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:1051-64. doi: 10.1071/RD12212
  24. Baruah RR, Kalita MC, Devi D. Novel non-mulberry silk fibroin nanoparticles with enhanced activity as potential candidate in nanocarrier mediated delivery system. *RSC Adv* 2020;10:9070-8. doi: 10.1039/c9ra08901b
  25. Pham DT, Tiyaboonchai W. Fibroin nanoparticles: A promising drug delivery system. *Drug Deliv* 2020;27:431-48. doi: 10.1080/10717544.2020.1736208
  26. Ma D-D, Yang W-X. Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy. *Oncotarget* 2016;7:40882. doi: 10.18632/oncotarget.8553
  27. Naik LS, Devi CVR. Induction of extrinsic and intrinsic apoptosis in cervical cancer cells by Momordica dioica mediated gold nanoparticles. *IET Nanobiotechnol* 2019;14:172-9. doi: 10.1049/iet-nbt.2019.0075
  28. Zhao J, Bowman L, Magaye R, Leonard SS, Castranova V, Ding M. Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Int J Oncol* 2013;42:1349-59. doi: 10.3892/ijo.2013.1828
  29. Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:1-17. doi: 10.1186/1743-8977-7-22

نتایج این مطالعه مؤید آن می‌باشد که نانو داروی فیبروئین ابریشم-دوکسوروبیسین سبب کاهش توان‌زیستی سلول‌های سرطان سینه MCF7 به صورت وابسته به دوز می‌شود. همچنین به صورت معناداری باعث القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد این یافته‌ها نشان داد که نانو داروی فیبروئین ابریشم-دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی ضدسرطان می‌تواند دارای اثرپذیری مناسبی با دوز کمتر نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد در درمان سرطان باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات خون و انکولوژی به خاطر حمایت مادی و معنوی، تشکر و قدردانی می‌کنند

### References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424. doi: 10.3322/caac.21492
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108. doi: 10.3322/caac.21262
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002
4. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013;502:333-9. doi: 10.1038/nature12634
5. Cokkinides V, Albano J, Samuels A, Ward M, Thum J. American cancer society: Cancer facts and figures. *J Adv Pract Oncol* 2005. doi: 10.6004/jadpro.2020.11.2.1
6. Chamsaz S, Collins DM, Perry AS, Prence M. Novel strategies for cancer treatment: highlights from the 55th IACR Annual Conference. *Cancers (Basel)* 2019;11:1125. doi: 10.3390/cancers11081125
7. Wang C, Yang W, Dong F, Guo Y, Tan J, Ruan S, et al. The prognostic role of Sirt1 expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:66343. doi: 10.18632/oncotarget.18494
8. Biswas S, Torchilin VP. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;66:26-41. doi: 10.1016/j.addr.2013.11.004
9. El-Awady RA, Semreen MH, Saber-Ayad MM, Cyprian F, Menon V, Al-Tel TH. Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates synergism between doxorubicin and a new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2016;37:1-11. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.10.004
10. Nagai K, Fukuno S, Oda A, Konishi H. Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses. *Anticancer Drugs* 2016;27:17-23. doi: 10.1097/CAD.0000000000000299
11. Jain D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J Nucl Cardiol* 2000;7:53. doi: 10.1067/mnc.2000.103324
12. Mohammadpour R, Safarian S, Norouzi S, Razazan A. Cellular effects of antibacterial drugs, sulfathiazole and sulfacetamide, on a breast cancer cell line (t-47d). *Cell Biol Int* 2014. doi: 10.1002/cbin.10047
13. Zare-Zardini H, Ferdowsian F, Soltaninejad H, Ghorani Azam A, Soleymani S, Zare-Shehneh M, et al., editors. Application of



30. Thapa RK, Byeon JH, Ku SK, Yong CS, Kim JO. Easy on-demand self-assembly of lateral nanodimensional hybrid graphene oxide flakes for near-infrared-induced chemothermal therapy. *NPG Asia Mater* 2017;9:e416-e. doi: 10.1038/am.2017.141
31. Kim KS, Lee D, Song CG, Kang PM. Reactive oxygen species-activated nanomaterials as theranostic agents. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10:2709-23. doi: 10.2217/nmm.15.108
32. Hamzelo-Moghadam M, Aghaei M, Abdolmohammadi MH, Khalaj A, Fallahian F. Cytotoxic effect of *Drimys maritima* bulb extract and induction of mitochondrial apoptotic signaling in human breast cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-468. *Onco Targets Ther* 2018;11:7669. doi: 10.2147/OTT.S182786
33. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. Silk fibroin as a functional biomaterial for drug and gene delivery. *Pharmaceutics* 2019;11:494. doi: 10.3390/pharmaceutics11100494
34. Marin JJ, Romero MR, Blazquez AG, Herraez E, Keck E, Briz O. Importance and limitations of chemotherapy among the available treatments for gastrointestinal tumours. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:162-84. doi: 10.2174/187152009787313828
35. Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36:715-8. doi: 10.1248/bpb.b12-01102
36. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, del Pilar Rodriguez-Torres M, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* 2018;16:1-33. doi: 10.1186/s12951-018-0392-8



## In vitro Evaluation of Apoptosis and Reactive Oxygen Species in Treated Cancerous and Normal Cells with Doxorubicin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles

Armita Zandian (M.Sc.)<sup>1</sup>, Farzaneh Fesahat (Ph.D.)<sup>2</sup>, Seyed Mohsen Miresmaeili (Ph.D.)<sup>1</sup>, Hadi Zare-Zardini (Ph.D.)<sup>3\*</sup>

1- Dept. of Biology, Science and Arts University, Yazd, Iran.

2- Reproductive Immunology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

3- Dept. of Biomedical Engineering, Meybod University, Meybod, Iran.

Received: 30 August 2021, Accepted: 06 March 2022

### Abstract:

**Introduction:** Breast cancer is the most common neoplastic malignancy in women in the world. The use of nanocarriers can lead to the improvement of the most effective method of cancer treatment, e.g., chemotherapy. The aim of this study was evaluation of the toxicity of doxorubicin-containing silk fibroin nanoparticles on cell lines, MCF7 and HFF and determination of the effective dose and evaluation of the cellular level of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis.

**Methods:** In this study, doxorubicin-containing silk fibroin nanoparticles were synthesized. Light dynamics scattering (DLS) technique was used for size evaluation. Normal (HFF) and cancerous (MCF7) cells were treated with different concentrations of designed nanostructures at 24, 48 and 72 hour intervals. After the above times, MTT method was used to evaluate the vital activity of cells and V-FITC/PI Annexin kit and flow cytometry device were used to determine the rate of apoptosis.

**Results:** Morphological evaluation by SEM showed a smaller size of nanofibroin and nanofibroin-doxorubicin than other nanostructures. The encapsulation efficiency percentage (EE%) was 95.2%. For nanofibroin-doxorubicin, the maximum drug release within 48 hours under normal conditions and cancer cells was 37.9% and 59.6%, respectively. The inhibitory effect of fibroin-doxorubicin nanoparticles was observed on MCF7 growth by MTT test. The results of MTT assay showed that doxorubicin-coated silk fibroin nanoparticles have a dose-dependent anti-cancer effect on MCF7 cell line and low cytotoxicity on normal HFF cells. Doxorubicin-loaded silk fibroin nanoparticles significantly reduced the level of ROS in the HFF and MCF-7 cell lines ( $P < 0.01$ ). The rate of apoptosis in MCF-7 increased significantly in the presence of doxorubicin-coated silk fibroin nanoparticles ( $P < 0.01$ ). These data suggest that the drug acts to induce cell death through the apoptotic pathway.

**Conclusion:** Silk fibroin nanoparticles containing doxorubicin acts through the apoptotic pathway and can be considered as a candidate for new anticancer drugs.

**Keywords:** Breast cancer, Silk nanofibroin, Doxorubicin, Reactive oxygen species, Apoptosis.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: H. Zare-Zardini, Email: hadizarezardini@gmail.com

**Citation:** Zandian A, Fesahat F, Miresmaeili SM, Zare-Zardini H. In vitro evaluation of apoptosis and reactive oxygen species in treated cancerous and normal cells with doxorubicin-loaded silk fibroin nanoparticles. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;17(2):27-36.