

## بررسی تاثیر میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز بر انتقال نوکلئیک اسید به روش مگنتوفکشن

محمد ستاری<sup>۱\*</sup>، بهنام حاجی پور وردوم<sup>۲</sup>، سامان حسینخانی<sup>۳</sup>، پرویز عبدالمالکی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

parviz@modares.ac.ir, m.satari@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

### چکیده

انتقال ژن با استفاده از نیروی میدان مغناطیسی را به اصطلاح مگنتوفکشن می نامند. هدف از این مطالعه سنتز و مشخصه یابی نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن ( $Fe_3O_4$ ) به عنوان هسته عامل انتقال دهنده و بررسی اثر میدان مغناطیسی متناوب بر بازده انتقال می باشد. به همین منظور، ابتدا نانو ذرات مغناطیسی (MNP) به روش هم رسوبی سنتز شد. با استفاده از مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) خاصیت مغناطیسی ذرات سنتز شده بررسی شد، و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، ویژگی های ظاهری، و پتانسیل زتای ذرات سنتز شده ارزیابی شد. سپس، با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی (MNP)، پلیمر پلی اتیلن ایمین (PEI) و DNA پلاسمیدی حاوی ژن گزار شگر لو سیفراز (pDNA) کمپلکس دو تایی PEI-pDNA و کمپلکس سه تایی MNP-PEI-pDNA سنتز شدند کمپلکس های سنتز شده با استفاده از DLS و تکنیک تاخیر حرکت در ژل، ارزیابی شدند. نتایج DLS و تکنیک تاخیر حرکت در ژل، نشان داد که کمپلکس ها بار سطحی مناسبی دارند و پلی اتیلن ایمین به خوبی به pDNA متصل شده، و بار منفی آن را خنثی کرده است. سپس رده های سلولی سرطان سینه از سانی (MCF-7) و سلول های Hek293T با استفاده از کمپلکس سه تایی در حضور میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز ترنسفکت شدند. زنده مانی سلولی با استفاده از تست MTT اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بازده انتقال در سلول هایی که با کمپلکس سه تایی در حضور میدان مغناطیسی متناوب ترنسفکت شده بودند نسبت به گروه کنترل، بدون هیچ گونه سمیت اضافی به طور معنی داری افزایش یافت ( $P \leq 0.05$ ).

کلید واژگان: مگنتوفکشن، نانو ذرات مغناطیسی، میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز، پلیمر پلی اتیلن ایمین

## ۱-مقدمه

در سال‌های اخیر انتقال نوکلئیک اسید (DNA و RNA) به سلول هدف، کاربردهای فراوانی پیدا کرده است. از جمله این کاربردها می‌توان به ژن درمانی، افزایش بیان یک ژن یا خاموش کردن آن، بیان پروتئین‌های مختلف در باکتری، تولید گیاهان تراریخته و غیره اشاره کرد. ژن درمانی در دو دهه گذشته به عنوان یک روش درمانی امیدوارکننده برای درمان بسیار از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. ژن درمانی انتقال مواد ژنتیکی به منظور ترمیم و رفع عیب ژن است که نهایتاً منجر به درمان بیماری یا حداقل بهبود وضعیت بالینی می‌شود [۱]. از این روش برای درمان اختلالات ژنتیکی مانند نقص ایمنی شدید ترکیبی [۲]، سیستمیک فیبروزیس، پارکینسون، آلزایمر، ایدز [۳] و همچنین یک روش جایگزین برای شیمی‌درمانی سنتی در درمان سرطان استفاده شده است [۴، ۵]. در اغلب بررسی‌های ژن درمانی، ژن "طبیعی" به درون ژنوم وارد می‌شود تا جایگزین یک ژن بیماری‌زای "غیرطبیعی" شود. رساندن هدفمند ژن به سلول یا بافت هدف با کارایی بالا و ایمن اصلی‌ترین چالش ژن درمانی است [۶]. انتقال هدفمند نوکلئیک اسید (DNA و RNA) به سلول هدف ترانسفکشن نامیده می‌شود. مهمترین مسئله در ترانسفکشن این است که نوکلئیک اسیدها به آنزیم‌های تجزیه کننده یا نوکلئازها بسیار حساسند و در طی چند ساعت به واسطه آنزیم‌ها به راحتی تجزیه می‌شوند [۷]. بنابراین، لازم است به منظور حفاظت در برابر تخریب آنزیمی و همچنین افزایش بازده انتقال از روش‌های مناسب برای انتقال آن‌ها استفاده شود. یک مولکول حامل برای وارد کردن ژن در مان‌کننده به سلول‌های هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این فرایند انتخاب حامل مناسب که بازده مناسبی داشته باشد و سمیت بیولوژیک کمتری داشته باشد مهمترین چالش در انتقال ژن است.

انتقال ژن به روش‌های مختلفی از جمله روش‌های زیستی روش‌های شیمیایی و روش‌های فیزیکی و ترکیب این روش‌ها صورت می‌گیرد، در روش‌های زیستی که از انواع ویروس‌ها برای انتقال اسید نوکلئیک استفاده می‌شود، علی‌رغم بازدهی بالا دارای معایبی چون سمیت بالا، ایجاد حساسیت ایمنولوژیک، آسیب‌رسانی به ژنوم میزبان به علت ورود تصادفی به ژنوم و همچنین محدودیت فضا در انتقال می‌باشند [۸-۱۰]. در روش‌های شیمیایی از حامل‌های غیر ویروسی مانند پلیمرهای کاتیونی، کلسیم فسفات، لیپیدهای کاتیونی و آمینواسیدهای کاتیونی و پپتیدهای باردار مثبت پلی ساکاریدها و نانوذرات معدنی سنتزی برای انتقال استفاده می‌شود [۱۱]. بازده پایین انتقال از جمله مهمترین معایب روش شیمیایی برای انتقال می‌باشد. در روش فیزیکی از ابزارهای فیزیکی برای انتقال استفاده می‌شود. روش‌هایی از قبیل ریز تزریق مستقیم<sup>۱</sup>، الکتروپوریشن<sup>۲</sup>، ترانسفکشن بر پایه لیزر و مگنتوفکشن<sup>۳</sup> جزء روش‌های فیزیکی می‌باشد. از مزایای روش‌های فیزیکی سریع بودن آن‌هاست اما استفاده از وسایل فیزیکی مدرن و همچنین آسیب به سلول و مرگ سلولی از معایب این روش می‌باشد [۱۲].

واژه‌ی مگنتوفکشن برای توصیف فرایند ترانسفکشن به کمک میدان مغناطیسی پلانک و همکاران معرفی شد [۱۳]. در روش مگنتوفکشن سامانه مغناطیسی با استفاده از میدان مغناطیسی خارجی به سمت بافت هدف هدایت می‌شود. مگنتوفکشن باعث افزایش بازده انتقال می‌شود و انتقال در این روش نسبت به روش‌های مرسوم ترانسفکشن از جمله لیپوفکتامین<sup>۴</sup> کارا تر است [۱۴-۱۷]. این روش همچنین دارای مزایایی از قبیل بازده بالا در انتقال به بافت‌هایی که دچار هیپوکسی شده‌اند، سمیت کم، هزینه‌ی کم، کاهش زمان انکوباسیون انتقال دهنده با سلول و روش تولید آسان است. این روش در غلظت

<sup>3</sup> Magnetofection<sup>4</sup> lipofectamine<sup>1</sup> Direct micro injection<sup>2</sup> Electroporation

## ۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز نانو ذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

کلرید آهن (II) چهار آبه (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) با خلوص ۹۹ درصد کلرید آهن، کلرید آهن (III) شش آبه (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) با خلوص ۹۹ درصد، از شرکت مرک المان خریداری شد. سنتز نانو ذرات مغناطیسی به روش هم‌رسوبی انجام شد و برای جلوگیری از تشکیل نانو ذرات مغناطیسی غیر از Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> از جمله γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> و همانیت α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> در حضور گاز N<sub>2</sub> انجام شد. به این ترتیب که ابتدا ۴ میلی‌مول آهن (III) کلرید شش آبه (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) و ۲ میلی‌مول آهن (II) کلرید چهار آبه (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) در ۴۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس، در حالی که مخلوط واکنش با همزن مکانیکی به شدت بهم زده می‌شد، قطره قطره محلول آمونیاک ۲۵ درصد اضافه شد تا pH مخلوط واکنش به ۱۱ رسید. سیستم به مدت ۱ ساعت در حال چرخش با همزن مغناطیسی در شرایط دمایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد و حضور گاز N<sub>2</sub> قرار داده شد. سپس، سیستم در دمای محیط خنک شد و رسوب‌های تشکیل شده با استفاده از نیروی مغناطیسی آهنربای دائمی از ته ظرف جدا شد و چندین بار با آب دیونیزه و اتانول شستشو داده شد تا pH محلول خنثی شود. سرانجام رسوب نانو ذرات مغناطیسی به دست آمده با استفاده از استون شسته شد و در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد آون خشک شد. واکنش انجام شده حین تشکیل نانو ذرات در معادله ۱ نشان داده شده است.

معادله ۱



## ۲-۲- مشخصه‌یابی اندازه و مورفولوژی نانو ذرات

پس از سنتز نانو ذرات اکسید آهن توزیع اندازه و ذره‌ای (PDI) (polydispersity index) و قطر آب پوشید

پایین وکتور نیز کاربرد دارد و همچنین با این روش می‌توان انتقال ناحیه‌ای با اعمال میدان مغناطیسی در ناحیه‌ی مورد نظر انجام داد [۱۹، ۱۸].

در روش مگنتوفکشن از میدان مغناطیسی جهت انتقال سامانه مغناطیسی استفاده می‌شود. میدان‌های مغناطیسی علاوه بر مگنتوفکشن کاربردهای فراوان دیگری از قبیل: انتقال دارو [۲۱]، کمک به درمان سرطان [۲۳، ۲۲]، هم افزایی اثرات داروهای ضدسرطان [۲۵، ۲۴]، کاهش مقاومت دارویی [۲۶]، تمایز [۲۷]، سم‌زدایی [۲۸] و... دارند. میدان مغناطیسی ایستا با وارد کردن نیرو به سامانه مغناطیسی، غلظت آن را در سطح غشا افزایش داده و همچنین در حضور نانو ذرات مغناطیسی میزان اندو سیتوز را افزایش می‌دهد [۲۹]. ترکیب انواع میدان‌های مغناطیسی در بازده انتقال موثر است در مطالعه‌ی اعمال میدان مغناطیسی پالسی با فرکانس پایین ۲/۶۶ تا ۱۰ هرتز به مدت ۳۰ تا ۱۲۰ ثانیه بعد از مگنتوفکشن با میدان مغناطیسی ایستا، بازدهی ترانسفکشن را نسبت به میدان مغناطیسی ایستا به تنهایی ۱/۵ تا ۱/۹ برابر افزایش داد [۳۰]. افزایش ۶ برابری بازدهی ترانسفکشن ژن گزارشگر را در رده‌ی سلولی مختلف هنگامی که میدان ایستا و پالسی با هم ترکیب شدند در مقایسه با میدان ایستای تنها، نشان داد [۳۱]. این افزایش به علت تغییر در نفوذپذیری غشا در حضور میدان پالسی بعد از افزایش رسوب به علت افزایش تماس سلول و نانو ذرات، توسط میدان ایستا می‌باشد [۲۳]. همانطور که گفته شد در روش مگنتوفکشن جهت هدایت سامانه مغناطیسی به سلول غالباً از میدان مغناطیسی و ترکیب میدان مغناطیسی ایستا و متناوب استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد میدان مغناطیسی متناوب با تاثیری که بر غشای سلول دارد می‌تواند میزان انتقال سامانه مغناطیسی را تحت تاثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات میدان‌های فرکانسی فوق‌العاده پایین با فرکانس برق شهری ۵۰ هرتز بر بازده انتقال سامانه مغناطیسی می‌باشد.

پلی مر کاتیونی PEI با بار سطحی منفی نانو ذرات سوپر پارامغناطیس که برهمکنش می دهد و این برهمکنش باعث پوشاندن سطح نانو ذرات با پلیمر می شود.

بعد از پوشش دهی نانو ذرات ابر پارامغناطیسی با پلی مر پلی اتیلن ایمین و تشکیل کمپلکس MNP-PEI (نانو ذرات مغناطیسی-پلی اتیلن ایمین) با استفاده از یک آهنربای دائمی کمپلکس دوتایی از پلیمرهای متصل نشده اضافی جدا شدند. سپس شعاع هیدودینامیک و همپنین بار سطحی زتا کمپلکس MNP-PEI در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از DLS مدل (Malvern instrument UK) اندازه گیری شد. همان طور که در شکل مشاهده می شود، بار سطحی جهت بررسی رفتار مغناطیسی نانو ذرات مغناطیسی ساخته شده و همچنین کمپلکس MNP-PEI (نانو ذرات مغناطیسی-پلی اتیلن ایمین)، از مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) استفاده شد. منحنی مغناطیس سنج نمونه لرزان به دست آمده K 298 و میدان مغناطیسی Oe 10000 در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، چرخه پسماند کاملاً برگشت پذیر بوده که این امر خصلت ابرپارامغناطیسی آن را اثبات می نماید، که این برگشت پذیر بودن چرخه پسماند به معنای کلوخه نشدن نانو ذرات در مجاورت میدان مغناطیسی می باشد. این آنالیز نشان می دهد که نانو ذرات سنتز شده قبل و بعد از پوشش دهی دارای رفتار ابرپارامغناطیسی هستند و در نتیجه بدون اینکه تجمعی بین آنها رخ دهد قابلیت جمع آوری و پخش مجدد در محیط واکنش را دارند و بعد از برداشتن میدان مغناطیسی خارجی خاصیت مغناطیسی خود را از دست می دهند. و این ویژگی مانع از توده ای شدن و ایجاد تجمعات بعد از برداشتن میدان مغناطیسی خارجی می شود. همان طور که در شکل نشان داده شده است پوشش دهی نانو ذرات با

ذرات توسط دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS) به دست آمد. برای این کار ابتدا ذرات در آب دیونیزه حل شد سپس، به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله حمام التراسونیک سونیکیت شدند. در نهایت ذرات به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسانده و توزیع اندازه ذرات بررسی شد. میکروسکوپ های الکترونی عبوری (TEM) یکی از وسیله و ابزار قدرتمند جهت مشخص نمودن مستقیم اندازه نانو ذرات مغناطیسی و مطالعه ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می شود. به همین منظور، شکل ظاهری و اندازه نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ TEM آنالیز شد. عکس میکروسکوپ الکترونی به دست آمده از نانو ذرات نشان داد که شکل ظاهری ذرات کروی بوده و اندازه ای حدود ۱۴ نانومتر دارند (شکل ۲).

## ۲-۳ بررسی ساختار کریستالی نانو ذرات

طیف پراش اشعه ایکس (XRD) نانو ذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> سنتز شده به روش مطالعه قبلی انجام شد (شکل ۳ ب). پیک های موجود در 2θ برابر با ۳۵/۴°، ۴۱/۷°، ۵۰/۹°، ۶۳/۷°، ۶۸/۰° و ۷۵/۱° به ترتیب مربوط به انعکاس صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (۴۴۰) است. این نتایج نشان داد ساختار کریستالی تشکیل شده مربوط به نانو ذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> است.

## ۲-۴ سنتز و مشخصه یابی نانو ذرات مغناطیسی-پلی اتیلن ایمین

بعد از سنتز و مشخصه یابی نانو ذرات ابر پارامغناطیس، این نانو ذرات با استفاده از پلیمر کاتیونی پلی اتیلن ایمین به وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون (PEI<sup>+</sup> 25 KD Sigma) پوشش دهی شدند. برای پوشش دهی ابتدا نسبت جرمی ۱ به ۱۰ پلی اتیلن ایمین به نانو ذره سوپر پارامغناطیس در اب دیونیزه حل شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در این روش اتصال بار مثبت

5 Dynamic light scattering

<sup>6</sup> Polyethylenimine

است. در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلول‌های زنده فعال می‌باشند، در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شده و به بلورهای آبی رنگ فورمازان غیر محلول تبدیل می‌شود؛ بلورهای فورمازان تشکیل شده در آب نامحلول می‌باشند با حل کردن این بلورها در حلال دی متیل سولفواکساید (DMSO) محلول بنفش رنگی حاصل می‌شود که غلظت رنگ ایجاد شده با میزان سلول‌های زنده متناسب است به منظور محاسبه دقیق زنده مانی سلولی‌ها پس از نیم ساعت انکوباسیون با DMSO جذب پلیت‌ها با استفاده از روش نورسنجی در طول موج ۵۴۰-۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### ۷-۲ ترنسفکشن

سلول‌های MCF7 در پلیت ۲۴ ول کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. سپس، محیط کشت روی سلول‌ها دورریخته شد و به سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم حاوی کمپلکس PEI-pDNA (پلی اتیلن ایمین-DNA پلاسمیدی) و کمپلکس سه تایی PEI-pDNA-MNP (پلی اتیلن ایمین-DNA پلاسمیدی-نانو ذرات مغناطیسی) اضافه شد یک پلیت بلافاصله در معرض میدان مغناطیسی متناوب قرار گرفت و به مدت ۲ ساعت در شرایط انکوباتور انکوبه شد. گروه کنترل در شرایط مشابه و در غیاب میدان مغناطیسی متناوب انکوبه شد پس از گذشت دو ساعت محلول رویی سلول‌ها با محیط کامل حاوی سرم جایگزین شد. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌ها با استفاده از بافر CCLR لیز شدند و فعالیت لو سیفراز در حضور لو سیفرین، ATP و  $Mg^{2+}$  با لو مینومتر Berthold Detection Systems GmbH، سنجیده شد.

#### ۸-۲ دستگاه مولد میدان مغناطیسی متناوب

د دستگاه مولد میدان مغناطیسی حاصل از دو سیم پیچ که ۱۸۰ دور سیم مسی روکش دار به قطر ۲/۵ میلی‌متر می

پلی مر باعث کاهش اشباع شدگی مغناطیسی ذرات ابر پارا مغناطیس می‌شود که نشان دهنده‌ی این است که پوشش دهی نانو ذرات صورت گرفته است.

#### ۲-۵ تاخیر حرکت در ژل

توانایی اتصال پلیمر PEI به DNA در نسبت‌های مختلف N:P (نسبت بار مثبت گروه آمین پلیمر پلی اتیلن ایمین به بار منفی فسفات DNA پلاسمیدی) با روش تأخیر حرکت در ژل آگارز مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت‌های مختلف PEI با pDNA (۰,۵ میکروگرم سو سپانسیون در بافر آبی پلاسمید) مخلوط شد تا نسبت N/p مختلف (۰,۲۵، ۰,۵، ۱، ۲، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴) به دست آید، سپس در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. این کمپلکس بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد و توسط دستگاه فرابنفش (Keil auv-tech، آلمان) مشاهده شد. پلاسمید تنها به عنوان شاهد استفاده شد.

#### ۲-۶ سمیت سلولی

برای ارزیابی سمیت سلولی از آزمایش سنجش MTT استفاده شد. برای این کار ابتدا سلول‌های رده سلولی MCF7 از انستیتو پاستور خریداری شده به انکوباتور دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب با غلظت ۵ درصد  $CO_2$  انتقال داده شدند هنگامی که سلول‌ها به جمعیت مناسبی رسیدند تعداد  $10^4$  سلول در چاهک پلیت‌های ۹۶ کا شته شدند و به مدت ۲۴ ساعت (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵  $CO_2$  درصد) انکوبه شدند. سپس، محیط کشت روی پلیت‌ها خارج و با محیط کشت حاوی کمپلکس‌های لازم برای ترنسفکشن (برای نسبت N به P برابر ۱۲ به ازای هر چاهک ۰/۵ میکروگرم MNP ۲,۴ میکروگرم PEI و ۱ میکروگرم pDNA در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر مورد نیاز است) تیمار شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط رویی با ۱۰۰ میکرولیتر نمک 0.5 میلی‌گرم بر میلی لیتر MTT جایگزین شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. MTT نمک تترازولیم محلول در آب

ساخت آلمان مدل ۹۳-۱۳۶۱۰ با دقت ۱۰ درصد استفاده شد. هر گونه تغییر در جریان ورودی دستگاه توسط اسیلوسکوپ (۴۰ MHz مدل ۱۸۰۴۰- Leader ساخت کشور ژاپن) سنجیده شد. در شکل ۱ تصویر دستگاه به همراه دستگاه انکوباتور دارای شرایط استاندارد نگهداری سلول، نشان داده شده است.

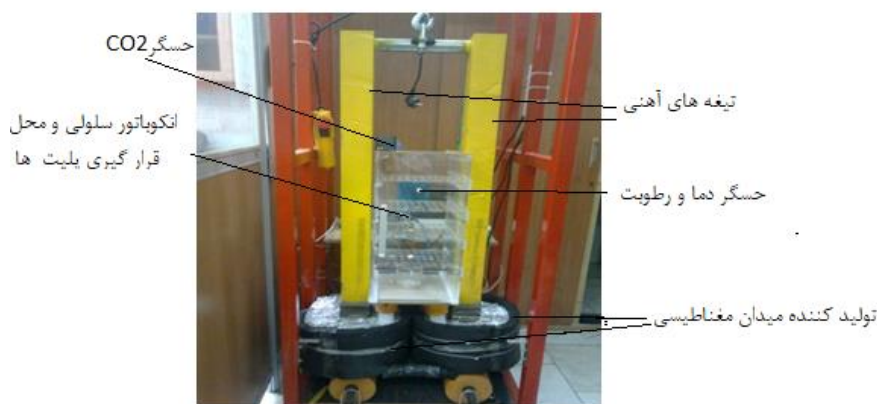
برای کنترل حرارت دیواره‌های جانبی نگهدارنده از داخل مجهز به شبکه سیمی گرم‌کننده است که به ترموستات متصل می‌باشد و دما را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه می‌دارد. برای تنظیم فشار گاز CO<sub>2</sub> نیز از حسگر ویژه در داخل محفظه استفاده شده که فشار گاز را بر روی مانیتور مخصوص نشان می‌دهد. محفظه دستگاه توسط شیلنگ گاز به کپسول گاز کربنیک متصل می‌باشد که فشار گاز ورودی با شیرهای تنظیم‌کننده روی آن کنترل می‌شود.

#### ۲-۹ آنالیز آماری

کلیه‌ی آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفت. میانگین و انحراف معیار به کمک نسخه ۵ نرم‌افزار graph pad prism برای تمام داده‌ها محاسبه شد. معنی‌دار بودن یافته‌های حاصل با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey در سطح معنی‌داری  $p > 0.05$  ارزیابی شد.

باشد، که با اتصال به منبع تأمین انرژی الکتریکی (۰-۵۰ ولت با توان حداکثر ۱ کیلووات) در فضای بین آن‌ها پدید می‌آید. این دستگاه قدرت تولید میدان مغناطیسی با شدت ۰/۵ تا ۳۰ میلی‌تسلا را دارد که با تنظیم ولتاژ برق یکسو شده ورودی می‌توان شدت میدان ایستا با شدت مورد نیاز را ایجاد کرد. از طرفی با اتصال دوشاخه‌ی میدان به برق شهری، میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز تولید می‌شود که برخلاف میدان مغناطیسی ایستا دارای خاصیت آهنربایی مستقیم نمی‌باشد و با نزدیک کردن یک آهنربا به آن شروع به نوسان می‌کند تا اینکه در فاصله‌ای بسیار نزدیک باعث ربایش آهنربا می‌شود. یک دستگاه نگهدارنده دست‌ساز به ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر که به دستگاه تنظیم حرارت و فشار گاز کربنیک شرایط استاندارد متصل است، جهت کشت سلول زنده در مرکز آن تعبیه شده است. بخش نگهدارنده، سلول‌ها را در شرایط استاندارد (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فشار گاز کربنیک ۵ درصد و رطوبت مناسب) برای کشت قرار می‌دهد. جنس بدنه این بخش از دستگاه از سطوح پلاستیکی بدون خلل و فرج تهیه شده که به راحتی ضد عفونی می‌شود.

برای تنظیم دستگاه و بررسی یکنواختی میدان مغناطیسی ایجاد شده توسط آن، از تسلامتر PHYWE Gottingen



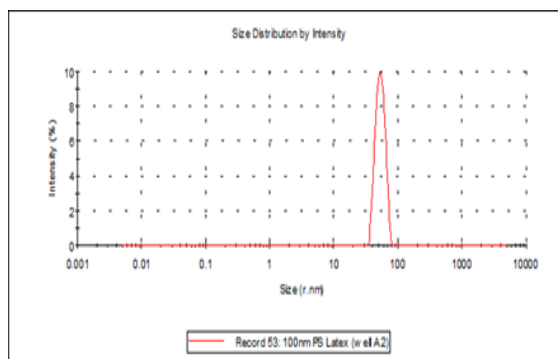
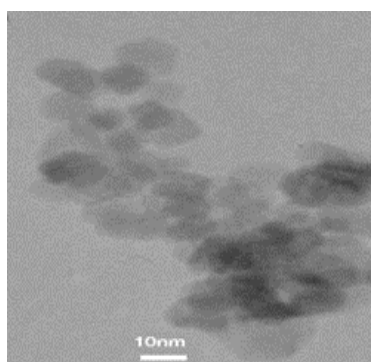
شکل ۱ دستگاه مولد میدان مغناطیسی متناوب و اجزای تشکیل‌دهنده آن: انکوباتور مجهز به سنسورهای دما، رطوبت و CO<sub>2</sub> در بین صفحاتی از جنس آهن قرار گرفته است.

PDI ذرات سنتزی ۰/۱۲ به دست آمد که نشان می‌دهد ذرات دارای توزیع یکنواخت بسیار عالی هستند. میانگین اندازه هیدرودینامیک ذرات به دست آمده از DLS هم حدود ۵۰ نانومتر به دست آمد. اختلاف این اندازه با اندازه به دست آمده از TEM مربوط به این است که DLS شعاع آب پوشیده ذرات را اندازه‌گیری می‌کند. این نتایج نشان داد که اندازه این ذرات کوچکتر از اندازه بحرانی لازم برای تک حوزه‌ای شدن نانو ذرات مغناطیسی است. بنابراین، این ذرات سنتز شده سوپرپارامغناطیس هستند.

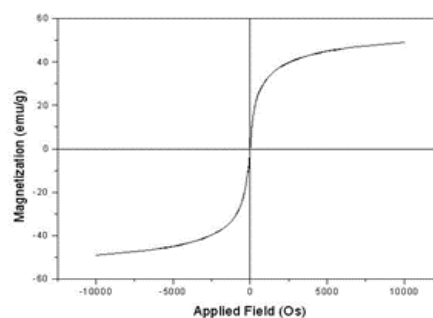
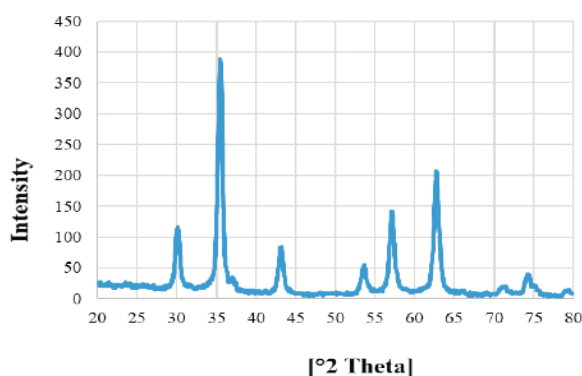
### ۳- نتایج

#### ۱-۳ نتایج مشخصه‌یابی نانو ذرات

اندازه، نانو ذرات سنتز شده با استفاده از DLS و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی شد (شکل ۲). نتایج به دست آمده از آن میکروسکوپ نشان داده که اندازه نانو ذرات سنتز شده زیر ۲۰ نانومتر است. همان که در شکل ۲ الف نشان داده شده است توزیع اندازه ذرات بسیار مناسب بود به طوری که



شکل ۲ نتایج به دست آمده از DLS میانگین اندازه ذرات را حدود ۵۰ نانومتر است و گستردگی اندازه ذرات بسیار مناسب و اندازه همه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشد (شکل سمت راست). تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که اندازه نانو ذرات  $Fe_3O_4$  در مقیاس نانو حدود ۱۴ نانومتر می‌باشد (شکل سمت چپ).



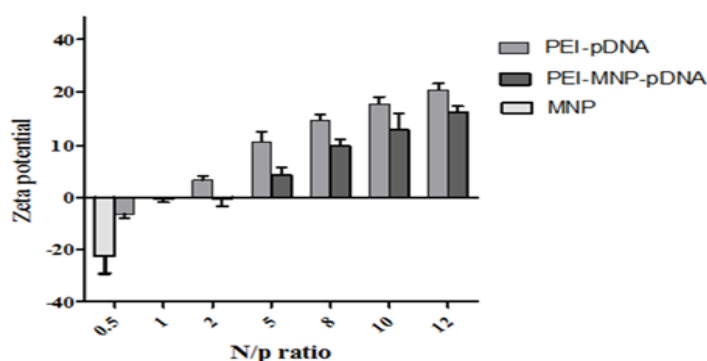
شکل ۳ منحنی مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) نانو ذرات  $Fe_3O_4$  نشان داد که چرخه پسماند مغناطیسی ذرات کاملاً برگشت پذیر بوده و ذرات خصلت ابرپارامغناطیسی دارند (شکل سمت راست). الگوی پراش پرتو ایکس، نانو ذرات  $Fe_3O_4$  پیک‌های موجود در  $2\theta$  برابر با  $35/4^\circ$  و  $63/7^\circ$ ، که ویژه نانو ذرات مغناطیسی  $Fe_3O_4$  نشان می‌دهد که ذرات سنتز شده  $Fe_3O_4$  می‌باشد (شکل سمت چپ). (برگرفته از منبع [۲۲])

کمپلکس دو تایی PEI-pDNA افزایش می یابد و اندازه آن کاهش می یابد. افزایش بار سطحی به علت افزایش نسبت پلیمر به pDNA است که این امر باعث افزایش بار مثبت می شود و از N:P بالاتر از ۱ بار کمپلکس مثبت می شود. با افزایش نسبت پلیمر PEI به pDNA اندازه کمپلکس کاهش می یابد. دلیل این کاهش این است که با افزایش N:P و به دنبال آن افزایش بار مثبت پلیمر کاتیونی pDNA را بهتر در برمی گیرد و ساختار متراکم تر شده اندازه کمپلکس کاهش می یابد. این نتایج نشان می دهد کمپلکس دو تایی PEI-pDNA به خوبی تشکیل شده و از نظر اندازه و بار سطحی برای انتقال مناسب می باشد. مقایسه بار سطحی MNP، کمپلکس دو تایی PEI-pDNA و کمپلکس سه تایی pDNA-PEI-MNP (شکل ۴) نشان داد هنگامی که در ساختار کمپلکس PEI-pDNA حضور می یابد و کمپلکس سه تایی pDNA-PEI-MNP تشکیل می شود بار کمپلکس سه تایی را در مقایسه با کمپلکس دو تایی منفی تر می کند که این اتفاق به دلیل بار منفی MNP رخ می دهد. منفی تر شدن بار کمپلکس سه تایی دلیلی بر تشکیل این کمپلکس است. لازم به ذکر است که بار نهایی کمپلکس سه تایی در N:P برابر ۱۲ در محدوده ۲۰ میلی ولت است که برای انتقال مناسب می باشد.

برای بررسی رفتار مغناطیسی نانوذرات ساخته شده از مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) استفاده شد. طبق بررسی های انجام شده و گزارشات ارائه شده در زمینه رفتار مغناطیسی نانوذرات، ذرات با اندازه کمتر از ۳۰ نانومتر که در غیاب میدان مغناطیسی دارای پسماند مغناطیسی صفر هستند، رفتار ابرپارامغناطیسی از خود نشان می دهند. متحنی VSM به دست آمده از نانوذرات  $Fe_3O_4$  در دمای ۲۹۸ K و میدان مغناطیسی ۱۰۰۰۰ Oe در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که در این شکل دیده می شود چرخه پسماند کاملاً برگشت پذیر بوده که این امر خصلت ابرپارامغناطیسی آن را اثبات می کند، که این برگشت پذیر بودن چرخه پسماند به معنای نشدن نانوذرات در مجاورت میدان مغناطیسی می باشد. این آنالیز نشان می دهد که نانوذرات سنتز شده دارای رفتار ابرپارامغناطیسی بوده و بدون اینکه تجمعی بین آن ها رخ بدهد قابلیت جمع آوری و پخش مجدد در محیط واکنش را دارند.

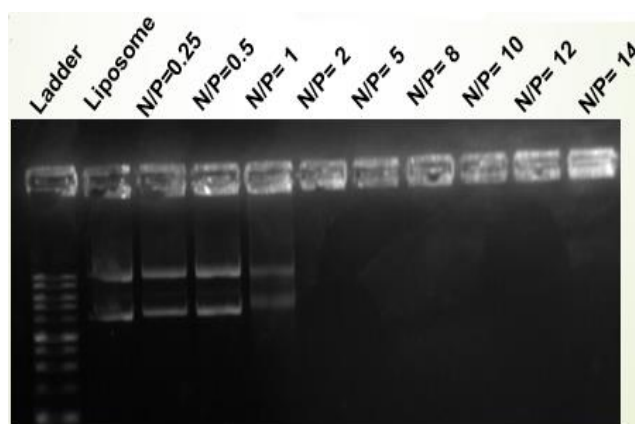
### ۳-۲ نتایج تشکیل کمپلکس های انتقال

بار سطحی از عوامل موثر بر بازده انتقال می باشد. بار سطحی نهایی کمپلکس باید مثبت باشد تا با بار منفی غشاء سلول برهمکنش کند. بار سطحی و توزیع اندازه ذرات کمپلکس ها به وسیله DLS به دست آمد. به این منظور نسبت های مختلف N:P از کمپلکس ها تهیه شد و مشخصات کمپلکس ها به دست آمد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود با افزایش نسبت N:P بار سطحی



شکل ۴ بار سطحی کمپلکس های دو تایی و سه تایی در نسبت های مختلف N:P. با افزایش نسبت N:P بار سطحی کمپلکس دو تایی-PEI pDNA افزایش می یابد.





شکل ۵ ارزیابی تأخیر حرکت در ژل کمپلکس دوتایی pDNA-PEI در نسبت‌های مختلف N:P (از ۰/۲۵ تا ۱۴). در نسبت‌های N:P بالاتر از ۱ بار مثبت پلیمر بر بار منفی pDNA غلبه کرده و کمپلکس به علت دارا بودن بار مثبت در چاهک بدون حرکت باقی مانده و به سمت قطب مثبت حرکت نکرده است.

از روش MTT سنجیده شد. همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده همه گروه‌های تیمار مقاداری سمیت را در سلول‌ها القا می‌کنند و نسبت به گروه کنترل معنا دار می‌باشد. این سمیت القا شده در تیمارهای دارای پلیمر PEI مربوط به این پلیمر می‌باشد. همانطور که در شکل مشخص است اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز هیچ گونه سمیت اضافی را نسبت به کمپلکس‌های دو تایی و سه تایی تنها در هر دو رده سلولی القا نمی‌کند و این روش مگنتو فکشن سمیت اضافی ندارد.

برای مقایسه بازده انتقال سامانه‌های انتقال از روش سنجش فعالیت آنزیم لوسیفراز استفاده شد. در این روش pDNA دارای ژن گزارشگر لوسیفراز می‌باشد. این ژن آنزیم لوسیفراز را بیان می‌کند که این آنزیم با مصرف آدنوزین تری فسفات (ATP) لوسیفیرین را به اکسی لوسیفیرین تبدیل می‌کند. در این واکنش ATP به AMP تبدیل شده و انرژی موجود در پیوندهای فسفات به شکل نور منتشر می‌شود که دستگاه لومینومتر قادر است نور نشر شده را اندازه‌گیری کند. میزان نور نشر شده که از دستگاه لومینومتر به دست می‌آید نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز است که آن هم معادل میزان انتقال نوکلئیک اسید

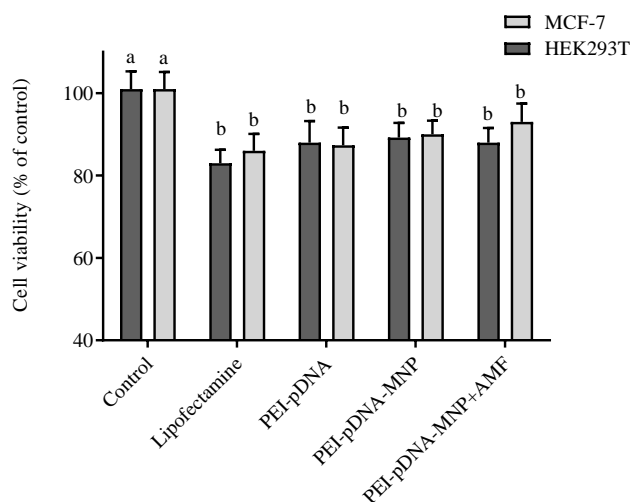
توانایی اتصال به DNA یکی از ملزومات سامانه‌های ژن رسانی است. به منظور بررسی اتصال اجزاء کمپلکس به pDNA و تشکیل کمپلکس دوتایی و سه تایی از تست تأخیر حرکت در ژل استفاده شد. در این روش ابتدا کمپلکس دوتایی pDNA-PEI در نسبت‌های مختلف N:P روی ژل آگارز ۱ درصد برده شدند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در N:P‌های بالاتر از ۱ بار مثبت پلیمر بر بار منفی pDNA غلبه کرده و کمپلکس به علت دارا بودن بار مثبت در چاهک بدون حرکت باقی مانده و به سمت قطب مثبت حرکت نکرده است در حالی که، در N:P‌های کمتر نتوانست مانع از تأخیر کامل حرکت پلاسمید روی ژل شوند. این نتیجه نشان می‌دهد که پلیمر PEI به خوبی به pDNA متصل می‌شود.

### ۳-۳ نتایج سمیت سلولی و ترنسفکشن

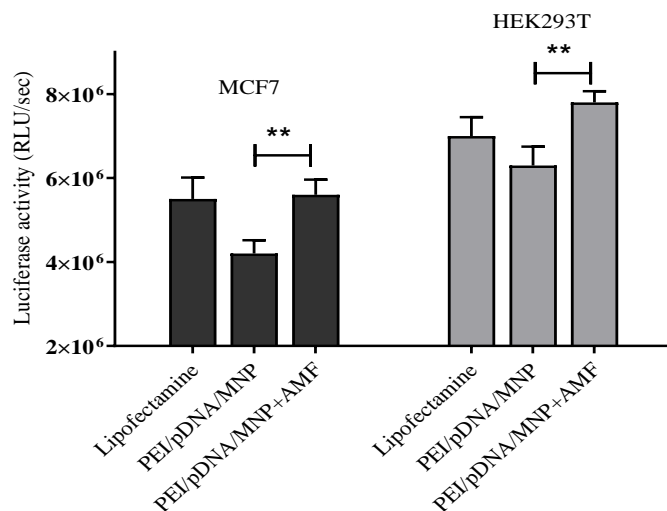
یکی از پارامترهای مهم و تأثیر گذار در هر روش انتقال نوکلئیک اسید، میزان سمیت سلولی است که آن روش دارد. روش‌ها و سامانه‌های انتقال باید زیست سازگار باشند. در این مطالعه سمیت سلولی القا شده سامانه‌های انتقال کمپلکس دوتایی، سه تایی، لیپوفکتامین (به عنوان یک وکتور انتقال تجاری) و میدان مغناطیسی متناوب با استفاده

شد. در هر دو رده سلولی اعمال میدان مغناطیسی در زمان انکوباسیون به طور معنا داری بازده انتقال را افزایش می دهد.

به سلول می باشد. همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است بازده انتقال لیپوفکتامین، کمپلکس سه تایی و کمپلکس سه تایی با اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز با استفاده از سنجش فعالیت لوسیفرز با هم مقایسه



شکل ۶ میزان سمیت القا شده در سلول های HEK293T و MCF7 توسط سامانه ای انتقال در حضور و عدم حضور میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز. هر عدد مربوط به میانگین سه بار آزمایش مستقل می باشد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) که نسبت به گروه کنترل محاسبه شده است (حروف لاتین متفاوت وجود اختلاف معنی دار را مشخص می کند و حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در گروه ها می باشد).



شکل ۷ مقایسه میزان ترنسکریپشن لیپوفکتامین، کمپلکس سه تایی کمپلکس سه تایی با اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز داده ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار برای سه تکرار ارائه شده است. ( $P < 0.01$ )

کمپلکس‌ها مثبت است و برای انتقال مناسب می‌باشد، چرا که می‌تواند با بار منفی غشاء سلول برای ورود برهمکنش کند. در روش‌های انتقال ژن به سلول روش‌هایی کارا تر هستند که بتوانند از موانع موجود بر سر راه انتقال بهتر عبور کنند. تعدد موانع خارج سلولی و داخل سلولی باعث به دام افتادن و تخریب کمپلکس حمل‌کننده نوکلئیک اسید می‌شود و در نتیجه بازده انتقال را کم می‌کند [۳۶]. اصلی‌ترین مانع خارج سلولی غشاء سلول است که به مولکول‌های آب دوست اجازه عبور از غشاء را نمی‌دهد [۳۷]. در روش‌های انتقال، کمپلکس حاوی نوکلئیک اسید به صورت محلول روی سلول‌های هدف ریخته می‌شود و کمپلکس‌هایی که با حرکات برونی در مدت زمان انکوباسیون به غشا برخورد می‌کنند شانس عبور از غشاء سلول را دارند [۳۸]. در این فرایند رسیدن کمپلکس به سطح سلول وابسته به انتشار بوده و غیر هدفمند است. جهت افزایش احتمال برخورد کمپلکس به سطح غشاء سلول، ناگزیر زمان انکوباسیون باید افزایش یابد. افزایش زمان انکوباسیون احتمال اگریگیشن کمپلکس را افزایش می‌دهد و از طرفی باعث افزایش سمیت کمپلکس روی سلول‌ها می‌شود [۳۹، ۴۰]. بنابراین، اعمال نیرویی به کمپلکس در جهت سطح غشاء سلول می‌تواند وابستگی به عامل انتشار را کم کرده و به صورت هدفمند کمپلکس را به سطح سلول سوق دهد. این نیرو باعث کاهش زمان انکوباسیون و در نتیجه کاهش سمیت سلولی کمپلکس می‌شود. این نیرو می‌تواند از منابع متفاوتی تامین شود برای مثال در مطالعه‌ای از نیروی سانتریفیوژ برای رساندن هدفمند کمپلکس به سطح غشای سلول استفاده شد در این مطالعه نیروی ۲۱۰ g کاهش زمان انکوباسیون از ۴ ساعت به ۱ ساعت شد [۴۱].

در این مطالعه نشان داده شد که بازده انتقال در حضور میدان متناوب ۵۰ هرتز افزایش می‌یابد. میدان الکترومغناطیسی با فرکانس فوق‌العاده پایین انرژی کمی

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

مشخصه‌یابی نانو ذرات مغناطیسی به وسیله TEM و DLS نشان داد که توزیع اندازه ذرات سنتز شده کمتر از اندازه بحرانی می‌باشد در اندازه‌های کمتر از اندازه بحرانی هر ذره به یک حوزه مغناطیسی تبدیل می‌شود [۳۳]. به نانو ذرات تک حوزه ابرپارامغناطیس اطلاق می‌شود. اندازه بحرانی برای ذرات ابرپارامغناطیس اکسید آهن (SPION) حدود ۲۵ نانومتر می‌باشد [۳۴]. که نتایج TEM ابرپارامغناطیس بودن ذرات سنتز شده را تایید می‌کند. توزیع اندازه نتایج VSM هم ابرپارامغناطیس بودن ذرات را از طریق برگشت پذیر بودن چرخه پسماند تایید کرد به علاوه نشان داد که این ذرات خاصیت مغناطیسی بالای دارند و خیلی سریع در میدان مغناطیسی خارجی به حد اشباع شدگی مغناطیسی می‌رسند. SPION در میدان مغناطیسی خارجی سریع به اشباع شدگی مغناطیسی می‌رسند و در نبود میدان مغناطیسی خارجی، خاصیت مغناطیسی خود را از دست می‌دهند. این ویژگی این ذرات را برای کاربرهای زیست پزشکی بسیار مناسب کرده است، زیرا با از دست داد خاصیت مغناطیسی احتمال تجمع این ذرات و رسوب در مویرگها کاهش می‌یابد. این ویژگی یعنی عدم تشکیل تجمعات در مگنتوفکشن باعث افزایش بازده این روش انتقال می‌شود [۳۴]. نتایج پتانسیل زتا نشان داد که بار سطحی SPION سنتز شده حدود -۱۹ میلی‌الکترون ولت است که این بار سطحی قابلیت اتصال از طریق برهمکنش الکتروستاتیک را به بارهای مثبت برای مثال PEI می‌دهد [۳۵].

آنالیز بار سطحی و تاخیر حرکت در ژل تشکیل کمپلکس‌های دوتایی pDNA-PEI و کمپلکس سه تایی pDNA-PEI-MNP را تایید کرد. آنالیز بار سطحی کمپلکس‌های دوتایی و سه تایی نشان داد که بار نهایی این

میدان مغناطیسی متناوب در حضور نانو ذرات مغناطیسی منجر با افزایش ورود سامانه مغناطیسی به سلول می‌شود.

#### ۵- منابع

- [1] L. N.- Nature and undefined 2015, "Gene therapy returns to centre stage," nature.com.
- [2] F. Ferrua and A. Aiuti, "Twenty-Five Years of Gene Therapy for ADA-SCID: From Bubble Babies to an Approved Drug," *Hum. Gene Ther.*, vol. 28, no. 11, pp. 972–981, Nov. 2017.
- [3] T. Gonzalo, M. I. Clemente, L. Chonco, N. D. Weber, L. Díaz, M. J. Serramía, R. Gras, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, L. A. Lopez-Fernández, M. Á. Muñoz-Fernández, and J. L. Jiménez, "Gene Therapy in HIV-Infected Cells to Decrease Viral Impact by Using an Alternative Delivery Method," *ChemMedChem*, vol. 5, no. 6, pp. 921–929, Jun. 2010.
- [4] S. Rosenberg, N. R.- Science, and undefined 2015, "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer," science.sciencemag.org.
- [5] M. V. Maus, J. A. Fraietta, B. L. Levine, M. Kalos, Y. Zhao, and C. H. June, "Adoptive Immunotherapy for Cancer or Viruses," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 32, no. 1, pp. 189–225, Mar. 2014.
- [6] M. Al-Dosari and X. Gao, "Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress," *AAPS J.*, 2009.
- [7] R. Waehler, S. Russell, and D. Curiel, "Engineering targeted viral vectors for gene therapy," *Nat. Rev. Genet.*, 2007.
- [8] J. van der Loo, J. W.-H. molecular genetics, and undefined 2015, "Progress and challenges in viral vector manufacturing," academic.oup.com.
- [9] M. A. Kotterman, T. W. Chalberg, and D. V. Schaffer, "Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 17, no. 1, pp. 63–89, Dec. 2015.
- [10] M. Mintzer and E. Simanek, "Nonviral vectors for gene delivery," *Chem. Rev.*, 2008.
- [11] D. Jere, H. Jiang, R. Arote, Y. Kim, Y. Choi, M. Cho, T. Akaike, and C. Cho, "Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 8, pp. 827–834, Aug. 2009.

دارد، و نمی‌تواند با برهمکنش مستقیم باعث شکست پیوندهای شیمیایی مولکول‌های غشا سلول شود، اما میدان مغناطیسی متناوب موجب تحریک و افزایش دانسیته‌ی جریان (جریان الکتریکی در واحد سطح) در بافت موردنظر همسو با میدان اعمالی می‌شود [۴۲]. همچنین، میدان مغناطیسی متناوب بر واکنش‌های بیوشیمیایی و رفتار مولکول‌های باردار نزدیک به غشای سلول از طریق اعمال نیرو به حامل‌های بار در حال حرکت مثل یون‌ها، و سامانه باردار مثبت مغناطیسی اثر می‌گذارد [۴۳]. بنابراین، غلظت سامانه مغناطیسی در سطح غشای سلول را افزایش می‌دهد. از دیگر دلایل افزایش بازده انتقال در حضور میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز اثری است که این میدان بر غشاء سلول و بر کمپلکس مغناطیسی دارد. کمپلکس مغناطیسی در حضور این میدان در جهات مختلف شروع به حرکات نوسانی می‌کند که این نوسانات بر غشاء سلول اثر گذاشته و عبور کمپلکس از غشاء سلول را افزایش می‌دهد [۳۲]. مطالعات نشان داده است که میدان مغناطیسی متناوب نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهد این میدان با تاثیر بر یکپارچگی غشاء سلول منجر به القای آزاد سازی پروتئاز درون سلولی می‌شود که این امر نشان دهنده تغییر یکپارچگی غشاء و نفوذپذیری غشا پس از قرار گرفتن در معرض میدان است [۴۴]. همچنین، به نظر می‌رسد اثرات گرمایی میدان مغناطیسی متناوب هم بر افزایش بازده انتقال سامانه مغناطیسی موثر باشد. نانو ذرات مغناطیسی موجود در سامانه مغناطیسی نیروی میدان خارجی را جذب کرده و آن را از طریق افزایش ارتعاش‌های درونی به گرما تبدیل می‌کنند. و دمای بافت‌ها و سلول هدف بسته به شدت میدان، غلظت نانو ذره، مدت اعمال میدان و .. تا ۴۱ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد بالا می‌رود [۴۵]. افزایش دما از طریق افزایش سیالیت غشاء، فرایند اندوسیتوز را تسریع می‌کند [۴۶]. از انجایی که ورود سامانه مغناطیسی به سلول از طریق اندوسیتوز است پس در نتیجه اثرات گرمایی

- [22] M. Satari, N. Haghghat, F. Javani Jouni, and P. Abdolmaleki, "The effects of synthesized superparamagnetic Iron Oxide nanoparticles and electromagnetic field on cell death of MCF-7 breast cancer cell line," *Multidiscip. Cancer Investig.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–21, 2018.
- [23] J. Zafari *et al.*, "Anticancer Effects of Moderate Static Magnetic Field on Cancer Cells In Vitro," *Res. Mol. Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 54–64, 2019.
- [24] S. Kamalipooya, A. Sabet, F. J. Jouni, M. Satari, P. Abdolmaleki, and H. Soleimani, "Effect of Co-Treatment with Static Magnetic Field and Cis-diamminedichloroplatinum(II) on Apoptosis and Cell Cycle Progression in HeLa Cell Line and HuO2," *Cytol. Genet.*, vol. 55, no. 2, pp. 162–170, 2021.
- [25] M. Satari, F. J. Jouni, P. Abolmaleki, and H. Soleimani, "Influence of static magnetic field on HeLa and Huo2 cells in the presence of Aloe vera extract," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 21, 2020.
- [26] J. Zafari, F. J. Jouni, ... P. A.-M. J. of, and undefined 2018, "Toxicity of Cisplatin under the Influence of Static Magnetic Field in Susceptible and Drug-Resistant Cells," *udd.modares.ac.ir J Zafari, F Javani Jouni, P Abdolmaleki, MJ Khodayar, A Jalali Modares J. Biotechnol. 2018\*udd.modares.ac.ir.*
- [27] N. Haghghat, P. Abdolmaleki, M. Behmanesh, and M. Satari, "Stable morphological–physiological and neural protein expression changes in rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with electromagnetic field and nitric oxide," *Bioelectromagnetics*, vol. 38, no. 8, 2017.
- [28] F. Javani Jouni, J. Zafari, P. Abdolmaleki, H. Vazini, L. Ghandi, and M. Satari, "Aflatoxin M1 detoxification from infected milk using Fe3O4 nanoparticles attached to specific aptamer," *J. Nanostructure Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 13–22, Apr. 2018.
- [29] S. Huth, J. Lausier, S. W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch, and J. Rosenecker, "Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. 8, pp. 923–936, 2004.
- [30] C. Dahmani, O. Mykhaylyk, F. Helling, T. Weyh, H.-G. Herzog, and C. Plank, "Rotational
- [12] A. Das, P. Gupta, D. C.-A. Reviews, and undefined 2015, "Physical methods of gene transfer: Kinetics of gene delivery into cells: A Review.," *arccjournals.com.*
- [13] J. Singh, I. Mohanty, S. R.-A. J. of, and undefined 2017, "In vivo magnetofection: a novel approach for targeted topical delivery of nucleic acids for rectoanal motility disorders," *Am Physiol. Soc.*
- [14] M. Kazemi-Ashtiyani, B. Hajipour-Verdom, M. Satari, P. Abdolmaleki, S. Hosseinkhani, and H. Shaki, "Estimating the two graph dextran–stearic acid–spermine polymers based on iron oxide nanoparticles as carrier for gene delivery," *Biopolymers*, vol. 113, no. 7, Jul. 2022.
- [15] F. Krötz, H.-Y. Sohn, T. Gloe, C. Plank, and U. Pohl, "Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells," *J. Vasc. Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 425–434, 2003.
- [16] X. Pan, J. Guan, J.-W. Yoo, A. J. Epstein, L. J. Lee, and R. J. Lee, "Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 358, no. 1, pp. 263–270, 2008.
- [17] C. Plank and J. Rosenecker, "Magnetofection: the use of magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2009, no. 6, p. pdb–prot5230, 2009.
- [18] C. C. Berry and A. S. G. Curtis, "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R198–R206, Jul. 2003.
- [19] S. Prijic, G. S.-R. and oncology, and undefined 2011, "Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology," *degruyter.com.*
- [20]- Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res.* 2015;15(1):96–108.
- [21] F. Ashoori, B. Hajipour-Verdom, M. Satari, and P. Abdolmaleki, "Polyethylenimine-based iron oxide nanoparticles enhance cisplatin toxicity in ovarian cancer cells in the presence of a static magnetic field," *Front. Oncol.*, vol. 13, 2023.

- [39] X. Luo, F. Huang, S. Qin, H. Wang, J. Feng, and X. Zhang, "A strategy to improve serum-tolerant transfection activity of polycation vectors by surface hydroxylation," *Biomaterials*, 2011.
- [40] M. Ikonen, L. Murto, and K. Kontturi, "Controlled complexation of plasmid DNA with cationic polymers: effect of surfactant on the complexation and stability of the complexes," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2008.
- [41] C. Hsu and H. Uludağ, "A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine," *Nat. Protoc.*, 2012.
- [42] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins," *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, vol. 94, 2010.
- [43] C. L. Ross, M. Siriwardane, G. Almeida-Porada, C. D. Porada, P. Brink, G. J. Christ, and B. S. Harrison, "The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation," *Stem Cell Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 96–108, 2015.
- [44] C. P. Ashdown *et al.*, "Pulsed low-frequency magnetic fields induce tumor membrane disruption and altered cell viability," *cell.com* CP Ashdown, SC Johns, E Amin. M Unanian, W Connacher, J Friend, MM Fuster *Biophysical journal*, 2020 • *cell.com*, vol. 118, pp. 1552–1563, 2020.
- [45] B. Chen, W. Wu, and X. Wang, "Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy," *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011.
- [46] N. Ben-Dov and R. Korenstein, "Proton-induced endocytosis is dependent on cell membrane fluidity, lipid-phase order and the membrane resting potential," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*-, 2013.
- magnetic pulses enhance the magnetofection efficiency in vitro in adherent and suspension cells," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 332, pp. 163–171, 2013.
- [31] S. W. K. Chapman, P. O. Hassa, S. Koch-Schneidemann, B. von Rechenberg, M. Hofmann-Antenbrink, B. Steitz, A. Petri-Fink, H. Hofmann, and M. O. Hottiger, "Application of pulsed-magnetic field enhances non-viral gene delivery in primary cells from different origins," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 320, no. 8, pp. 1517–1527, 2008.
- [32] S. Kamau, P. Hassa, ... B. S.-N. A., and undefined 2006, "Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field," *academic.oup.com*.
- [33] Jun, Y.-w., Seo, J.-w., Cheon, J., "Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences". *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 179-189.
- [34] J. Estelrich, E. Escribano, ... J. Q.-I. journal of, and undefined 2015, "Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery," *mdpi.com*.
- [35] S. McBain, H. Yiu, and J. Dobson, "Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery," *Int. J.*, 2008.
- [36] C. Wiethoff and C. Middaugh, "Barriers to nonviral gene delivery," *J. Pharm.*, 2003.
- [37] A. El-Sayed, S. Futaki, and H. Harashima, "Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment," *AAPS J.*, 2009.
- [38] S. Moffatt, R. C.-I. J. of Pharmaceutics, and undefined 2006, "Uptake characteristics of NGR-coupled stealth PEI/pDNA nanoparticles loaded with PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymer for targeted delivery to human," Elsevier.

# Investigating the effect of 50 Hz alternating magnetic field on nucleic acid delivery by magnetofection method

Mohammad Satari\*<sup>1</sup>, Behnam Hajipour-Verdom<sup>2</sup>, Saman Hosseinkhani<sup>3</sup>, Parviz Abdolmaleki\*<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Science, Malayer University, Malayer, Iran.

2. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

m.satari@modares.ac.ir, parviz@modares.ac.ir

Receipt: 2023/01/18

Accepted: 2024/02/12

## Abstract

Gene delivery using the force of a magnetic field is called magnetofection. The purpose of this study is the synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) as the core of the transfer agent and to investigate the effect of alternating magnetic field on transfection efficiency. For this purpose, the first magnetic nanoparticles (MNP) were synthesized by coprecipitation method. The magnetic properties of the synthesized MNP were investigated by vibrating sample magnetometer (VSM), appearance characteristics, and zeta potential of the synthesized particles were evaluated using transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). Then, using magnetic nanoparticles (MNP), polyethylene imine (PEI) and plasmid DNA containing luciferase reporter gene (pDNA), PEI-pDNA binary complex and MNP-PEI-pDNA ternary complex were synthesized. The complexes were evaluated using DLS and gel retardation techniques. The results of DLS and gel retardation technique showed that the complexes have a suitable surface charge and polyethyleneimine is well joined to pDNA and neutralized its negative charge. Finally, human breast cancer cell lines (MCF-7) and Hek293T cells were transfected by ternary complex in the presence of 50 Hz alternating magnetic field. Cell viability was measured using the MTT test. The obtained results showed that the transfection efficiency in the cells that were transfected with the ternary complex in the presence of alternating magnetic field increased significantly compared to the control group, without any additional toxicity ( $P \leq 0.05$ ).

**Keywords:** Magnetofection, magnetic nanoparticles, 50 Hz alternating magnetic field, polyethylene imine polymer