

بررسی تاثیر میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هر تز برانتقال نوکلئیک اسید به روش مگنتوفکشن

محمد ستاری'*، بهنام حاجی پور وردوم'، سامان حسینخانی"، پرویز عبدالمالکی'*

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: ۱٤۰۲/۱۱/۲۳

دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۲۸

چکیدہ

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(Fe₃O₄) به عنوان هسته عامل انتقال دهنده و بررسے اثر میدان مغناطیسے متناوب بر بازدہ انتقال می باشد. به همین منظور، ابتدا نانو ذرات مغناطیسی(MNP) به روش هم ر سوبی سنتز شد. با ا ستفاده از مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) خاصیت مغناطیسی ذارت 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. سیس، با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی(MNP)، یلیمر یلی اتیلن ایمین(PEI) و DNA پلا سمیدی حاوي ژن گزار شگر لو سيفراز(pDNA)كمپلكس دوتاييPEI-pDNA و كمپلكس سه تايي MNP-PEI pDNA سنتز شدند کمیلکس های سنتز شده با استفاده DLS و تکنیک تاخیر حرکت در ژل، ارزیابی شدند. نتایج DLS و تکنیک تاخیر حرکت در ژل،نشان داد که کمپلکس ها بار سطحی منا سبی دارند و پلیاتیلن ایمین به خوبی به pDNA متصل شده، و بار منفی آن را خنثی کرده است. سـپس ردههای سلولی سرطان سینه از سانی (MCF-7) و سلول هایHek293T با استفاده از کمیلکس سه تایی در حضور میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز ترنسفکت شدند. زنده مانی سلولی با استفاده از تست MTT اندازه گیری شد. نتایج بهدست امده نشان داد که بازده انتقال در سلول هایی که با کمپلکس سه تایی در حضور ميدان مغناطيسي متناوب ترنسفكت شده بودند نسبت به گروه كنترل، بدون هيچ گونه سميت اضافي به طور معنى دارى افزايش يافت(0.05≥ P).

کلید واژگان: مگنتوفکشین، نانوذرات مغناطیسی، میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز، پلیمر پلیاتیلن ایمین

انتقال ژن به روش های مختلفی از جمله روش های زیستی روش های شیمیایی و روش های فیزیکی و ترکیب این روشها صورت می گیرد، در روشهای زیستی که از انواع ويروس ها براي انتقال اسيدنو كلئيك استفاده مي شود، على رغم بازدهی بالا دارای معایبی چون سمیت بالا، ایجاد حساسيت ايمنولوژيک، آسيبرساني به ژنوم ميزبان به علت ورود تصادفي به ژنوم و همچنين محدوديت فضا در انتقال می باشیند [۸–۱۰]. در روش های شیمیایی از حامل های غیر ویروسے مانند پلیمر های کاتیونی، کلسیم فسـفات، لیپیدهای کاتیونی و آمینواسـیدهای کاتیونی و پپتیدهای باردار مثبت پلی ساکاریدها و نانوذرات معدنی سنتزى براى انتقال استفاده مي شود[١١]. بازده پايين انتقال از جمله مهمترین معایب روش شیمیایی برای انتقال می باشــد. در روش فیزیکی از ابزارهای فیزیکی برای انتقال اســــتفاده می شـــود. روش،هـایی از قبیـل ریزتزریق مستقیم ،الکتروپوریشن ، ترانسفکشن بر پایهی لیزر و مگنتوفکشـن^۳ جزء روش،های فیزیکی میباشـد. از مزایای روش های فیزیکی سـریع بودن آنهاسـت اما اسـتفاده از و سایل فیزیکی مدرن و همچنین آ سیب به سلول و مرگ سلولي از معايب اين روش مي باشد [17].

رای مگنتوفکشن برای تو صیف فرایند ترانسفکشن به واژهی مگنتوفکشن برای تو صیف 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 می شود. مگنتوفکشن باعث افزایش بازده انتقال می شود و انتقال در این روش نسب بت به روش های مرسوم ترانسفکشن از جمله لیپوفکتامین³ کاراتر است [۱۶–۱۷]. این روش همچنین دارای مزایایی از قبیل بازده بالا در انتقال به بافتهایی که دچار هیپوکسی شده اند، سمیت کم، هزینهی کم، کاهش زمان انکوباسیون انتقال دهنده با سلول و روش تولید آسان است. این روش در غلظت در سالهای اخیر انتقال نوکلئیک اسید (DNA و RNA) به سلول هدف، کاربردهای فراوانی پیدا کرده است. از جمله این کاربردها می توان به ژن درمانی، افزایش بیان یک ژن یا خاموش کردن آن، بیان پروتئین های مختلف در باکتری، تولید گیاهان تراریخته و غیره اشاره کرد. ژن درمانی در دو دهه گذ شته به عنوان یک روش درمانی امیدوارکننده برای درمان بسیار از بیماریها مورد توجّه 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 می شود[۱]. از این روش برای درمان اختلالات ژنتيكى مانند نقص ايمنى شــديد تركيبي [٢]، سيستيک فيبروزيس، پارکينسون، الزايمر، ايدز[٣] و همچنین یک روش جایگزین برای شیمیدرمانی سنتی در درمان س_ طان اس_تفاده شده اس_ت[٤، ٥]. در اغلب بررسے های ژندرمانی، ژن "طبیعی" به درون ژنوم وارد می شود تا جایگزین یک ژن بیماریزای "غیرطبیعی" شود. رساندن هدفمند ژن به سلول يا بافت هدف باكارايي بالا و ايمن اصلى ترين چالش ژن درمانى است[٦]. انتقال هدفمند نوكلئيكاسيد(RNA و DNA) به سلول هدف ترنسفكشن ناميده مي شود. مهمترين مسئله در ترنسفكشن اين است که نوکلئیک اسپدها به آنزیم های تجزیه کننده یا نوکلئازها بسيار حساسند و در طی چند ساعت به واسطه آنزيمها به راحتي تجزيه مي شوند [٧]. بنابراين، لازم ا ست به منظور حفاظت در برابر تخریب آنزیمی و همچنین افزایش بازده انتقال از روش های مناسب برای انتقال آنها استفاده شود. یک مولکول حامل برای وارد کردن ژن در مانکننده به سلولهای هدف مورد استفاده قرار می گیرد که در این فرايند انتخاب حامل مناسب كه بازده مناسبي داشته باشد و سمیت بیولوژیک کمتری داشته باشد مهمترین چالش در انتقال ژن است.

۱–مقدمه

³ Magnetofection

⁴ lipofectamine

¹ Direct micro injection

² Electroporation

۲– مواد و روشها

۲–۱– سنتز نانو ذرات Fe3o4

کلرید آهن(II) چهار ابه (FeCl₂.4H₂O) با خلوص ۹۹ درصــد کلريـدآ هن، کلريـد آ هن(III) شــش ابـه (FeCl3.6H2O) با خلوص ۹۹ درصد، از شرکت مرک المان خريداری شد. سنتز نانو ذرات مغناطیسی به روش همرسوبی انجام شد و برای جلوگیری از تشکیل نانو ذرات مغناطیسی غیر از Fe₃O4 ازجمله γ-Fe₂O₃ و همانیت α-F₂O₃ در حضور گاز N₂ انجام شد. به این تر تیب که ابتدا ٤ میلی مول آهن(III) کلرید شش آبه (FeCl₃·6H₂O) و ۲ میلی مول آهن(II) کلرید چهار آبه (FeCl₂·4H₂O) در ٤٠ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس، در حالی که، مخلوط واكنش با همزن مكانيكي به شدت بهم زده مي شد، قطره قطره محلول آمونیاک ۲۵ در صد اضافه شد تا pH مخلوط واکنش به ۱۱ ر سید. سیستم به مدت ۱ ساعت در حال چرخش با همزن مغناطیسے در شرایط دمایی ۷۰ درجه سانتی گراد و حضور گاز N2 قرار داده شد. سپس، سیستم در دمای محیط خنک شد و ر سوبهای تشکیل شده با استفاده از نیروی مغناطیسی آهنربای دائمی از ته ظرف جدا شد و چندین بار با اب دیونیزه و اتانول شستشو داده شد تا pH محلول خنثی شود. سرانجام رسوب نانو ذرات مغناطیسی بهدست آمده با استفاده از استون شسته شد و در دمای ۲۰ –۷۰ درجه سانتی گراد آون خشک شد. واکنش انجام شــده حین تشـکیل نانو ذرات در معادله ۱ نشان داده شده است.

معادله ۱

 $Fe^{2+}+2Fe^{3+}+8OH^{\scriptscriptstyle -}{\rightarrow}Fe_3O_4+4H_2O$

۲-۲ - مشخصه یابی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از سنتز نانو ذرات اکسید آهن توزی - ع ان - دازه ی ذرهای (polydispersity index) و قطر آب پوش ید پایین وکتور نیز کاربرد دارد وهمچنین با این روش می توان انتقال ناحیهای با اعمال میدان مغناطی سی در ناحیهی مورد نظر انجام داد[۱۹،۱۸].

در روش مگنتو فکش از میدان مغناطیسیے جهت انتقال سامانه مغناطیسی ا ستفاده می شود. میدانهای مغناطیسی علاوه بر مگنتوفکشین کاربردهای فراوان دیگیری از قبیل: انتقال دارو [۲۱]، کمک به درمان سرطان [۲۳،۲۲]، هم افزایی اثرات داروهای ضدسرطان[۲۵،۲٤]، کاهش مقاومت دارویی[۲٦]، تمایز[۲۷]، س_مزدایی[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 مغناطیسیی در بازده انتقال موثر است در مطالعهای اعمال میدان مغناطیسی پالسے با فرکانس پایین ۲/٦٦ 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 ا برابر فزایش داد [۳۰]. افزایش ۲ برابری بازدهی ترانسفکشن ژن گزارشگر را در ردهی سلولى مختلف هنگامي كه ميدان ايستا و پالسي باهم ترکیب شدند در مقایسه با میدان ایستای تنها، نشان داد[۳۱]. این افزایش به علت تغییر در نفوذیذیری غ شا در حضور میدان پالسی بعد از افزایش رسوب به علت افزایش تماس سلول و نانو ذرات، توسط ميدان ايستا مي باشد [٢٣]. همانطور که گفته شد در روش مگنتوفکشن جهت هدایت سامانه مغناطیسے به سلول غالبا از میدان مغناطیسے و تركيب ميدان مغناطيسي ايستا و متناوب استفاده مي شود. بەنظر مىرىسىد مىدان مغناطىسىے متناوب با تاثىرى كە بر غشاي سلول دارد مي تواند ميزان انتقال سامانه مغناطيسي را تحت تاثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه برر سی اثرات میدانهای فرکانسی فوقالعاده پایین با فرکانس برق شهری ۵۰ هرتز بر بازده انتقال سامانه مغناطیسی می باشد.

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 و سیله حمام الترا سونیک سونیکیت شدند. در نهایت ذرات به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلیلیتر رسانده و توزیع اندازه ذرات بررسی شد. میکروسکوپهای الکترونی عبوری (TEM) یکی از وسیله وابزار قدرتمند جهت مشخص نمودن مستقیم اندازه نانو ذرات مغناطیسی و مطالعه ساختار و مورفولوژی مواد ذرات مغناطیسی و مطالعه ساختار و مورفولوژی مواد نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ TEM آنالیز شد. عکس میکروسکوپ الکتروونی به دست آمده از نانو ذرات نشان داد که شکل ظاهری ذرات کروی بوده و اندازهای حدود ۱۶ نانومتر دارند(شکل ۲).

۲-۳ بررسی ساختار کریستالی نانو ذرات

طیف پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات Fe3o4 سنتز شده به روش مطالعه قبلی انجام شد(شکل ۳ ب). پیک های موجود در 20 برابر با ۳۰/۵۰، ۳۰/۵۰، ۴۰/۰۵، ۲۳/۰۰ ۲۰/۰۰ و ۲۰/۰۷ به ترتیب مربوط به انعکاس صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (٤٠٠)، (۲۲۱)، (۱۱۰) و Fe3o4 (٤٤٠) است. این نتایج نشان داد ساختار کریستالی تشکیل شده مربوط به نانو ذرات Fe3o4 است.

۲-۵ سنتزو مشخصه یابی نانو ذرات مغناطیسی-پلی اتیلن ایمین

بعد ازسنتز و مشخصهیابی نانو ذرات ابر پارا مغناطیس، این نانو ذرات با استفاده از پلیمر کاتیونی پلیاتیلن ایمین به وزن مولکولی ۲۵کیلو دالتون (PEI¹ 25 KD Sigma) پوشش دهی شدند. برای پوشش دهی ابتدا نسبت جرمی ۱ به ۱۰ پلیاتیلن ایمین به نانو ذره سوپرپارامغناطیس در اب دیونیزه حل شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در این روش اتصال بار مثبت

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

بعد از پوشش دهی نانو ذرات ابر پارا مغناطیسی با پلی مر پلیاتیلن ایمین و ت شکیل کمپلکس MNP-PEI(نانو ذرات مغناطیسی_پلیاتیلن ایمین) با استفاده از یک آهنربای دایمی کمپلکس دوتایی از پلیمرهای متصل نشده ا ضافی جداشــدند. ســـپس شــعاع هیدودینامیک و همپنین بار سطحی زتا کمپلکس MNP-PEI در دمای۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از DLS مدل (Malvern instrument UK) اندازه گیری شد. همان طور که در شکل مشاهده می شود، بار سطحي جهت بررسي رفتار مغناطيسي نانوذرات مغناطیس_ ساخته شده و همچنین کمپلکس -MNP PEI(نانو ذرات مغناطیسی-پلیاتیلن ایمین) ، از مغناطیس سنج نمونه لرزان ((VSM) ا ستفاده شد. منحنی مغناطیس سنج نمونه لرزان بهدست آمده K 298 و میدان مغناطیسی Oe 10000 در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشــاهده میشــود، چرخه پســماند کاملاً برگشتپذیر بوده که این امر خصلت ابرپارامغناطیسی آن را اثبات مینماید، که این برگشت پذیر بودن چرخه پسماند به معنای کلو خه نشــدن نانوذرات در مجاورت میدان مغناطیسی می با شد. این آنالیز نشان می دهد که نانو ذرات ســـنتز شـــده قبل و بعد از پوشــش 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 برداشـــتن میدان مغناطیســـی خارجی خا صیت مغناطیسی خود را از د ست میدهند. و این ویژگی مانع از توده ای شدن و ایجاد تجمعات بعد از بردا شتن میدان مغناطیسی خارجی می شود. همان طور که در شکل نشان داده شده است پو شش دهی نانو ذرات با

⁵ Dynamic light scattering

[°] Polyethylenimine

پلی مر باعث کاهش اشباع شدگی مغناطیسی ذرات ابر پارا مغناطیس می شود که نشان دهندهی این است که پو شش دهی نانو ذرات صورت گرفته است.

۲–٥تاخیر حرکت در ژل

بررسى تاثير ميدان مغناطيسى ...

توانایی اتصال پلیمر PEI به DNA در نسبتهای مختلف N:P (نسبت بار مثبت گروه آمین پلیمر پلیاتیلن ایمین به بار منفی فسفات DNA پلاسمیدی) با روش تأخیر حرکت در ژل آگارز مورد آزمایش قرار گرفت. غلظتهای مختلف PEI با DNA (۰٫۰ میکروگرم سو سپانسیون در بافر آبی پلاسمید) مخلوط شد تا نسبت N/P مختلف (۰٫۰، ۰٫۰، بال ممید) محلوط شد تا نسبت آید، سپس در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. این کمپلکس بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد و توسط دستگاه فرابنفش زول آگارز ۱٪ بارگذاری شد و توسط دستگاه فرابنفش عنوان شاهد استفاده شد.

۲-۲ سمیت سلولی

برای ارزیابی سمیت سلولی از آزمایش سنجش MTT استفاده شد. برای این کار ابتدا سلولهای رده سلولی MCF7 از انستیتو یاستورخریداری شده به انکوباتور دارای د مای ۳۷ در جه سانتی گراد و هوای مرطوب با غلظت ٥ درصد CO2 انتقال داده شدند هنگامي كه سلول ها به جمعیت مناسبی ر سیدند تعداد ۱۰^۴ سلول در چاهک پلیتهای ۹٦ کا شته شدند و به مدت ۲٤ ساعت (۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ CO2 درصد) انکوبه شدند. سپس، محیط کشت روی پلیتها خارج و با محیط کشت حاوى كمپلكس هاى لازم براى ترنسفكشن (براى نسبت N به P برابر ۱۲ به ازای هر چاهک ۰/۵ میکروگرم MNP ۲,٤ میکروگرم PEI و ۱ میکروگرم pDNA در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر مورد نیاز است) تیمار شدند. بعد از گذشت ٤٨ ساعت محیط رویی با ١٠٠ میکرولیتر نمک 0.5 میلی گرم بر میلی لیتر MTT جایگزین شد و به مدت ٤ ساعت انکوبه شد. MTT نمک تترازولیم محلول در آب

است.در اثر آنزیم های دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلولهای زنده فعال می با شند، در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شده و به بلورهای آبی رنگ فورمازان غیر محلول تبدیل می شود؛ بلورهای فورمازان تشکیل شده در آب نامحلول می باشد با حل کردن این بلورها در حلال دی متیل سولفواکساید (DMSO) محلول بنفش رنگی حاصل می شود که غلظت رنگ ایجاد شده با میزان سلولهای زنده متناسب است به منظور محاسبه دقیق زنده مانی سلولیها پس از نیم ساعت انکوبا سیون با DMSO جذب پلیتها با استفاده از روش نور سنجی در طول موج مادی شد.

۲-۷ ترنسفکشن

سلولهای MCF7 درپلیت ۲٤ ول کشت شدند و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دى اكسيد كربن ٥ درصـد انكوبه شـدند. سـيس، محيط کشت روی سلولها دورریخته شد و به سلولها ۱۰۰ میکرولیترمحیط کشت بدون سرم حاوی کمپلکس -PEI pDNA (پلیاتیلن ایمین-DNA پلاسمیدی) و کمپلکس سے تایی PEI-pDNA-MNP (پلی اتیلن ایمین-DNA يلا سميدي- نانو ذرات مغناطيسي) اضافه شد يک پليت بلافا صله در معرض میدان مغناطیسی متناوب قرار گرفت و به مدت ۲ ساعت در شرایط انکوباتور انکوبه شد. گروه کنترل در شــرایط مشــابه و در غیاب میدان مغناطیســی متناوب انکوبه شد پس از گذشت دو ساعت محلول رویی سلولها با محیط کامل حاوی سرم جایگزین شد. پس از ٤٨ ساعت، سلولها با استفاده از بافر CCLR ليز شدند و فعالیت لو سیفراز در حضور لو سیفرین، ATP و Mg²⁺ با لومينومتر Berthold Detection Systems GmbH، سنجيده شد.

۲-۸ دستگاه مولد میدان مغناطیسی متناوب
د ستگاه مولد میدان مغناطیسی حاصل از دو سیم پیچ که
۱۸۰ دور سیم مسی روکش دار به قطر ۲/۵ میلیمتر می

۔ دورہ ۱۵، شمارہ ۲، بھار ۱٤۰۳

ساخت آلمان مدل ۹۳–۱۳۹۱ با دقّت ۱۰ در صد استفاده شد. هر گونه تغییر در جریان ورودی دستگاه توسط اسیلوسکوپ (Leader -۱۸۰٤۰ مدل ۱۸۰٤- 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 دیواره های جانبی نگهدارنده از داخل مجهز به شبکه سیمی گرمکننده است که به ترموستات متصل می باشد و دما را در ۳۷ درجه سانتی گراد ثابت نگه می دارد. برای تنظیم فشار گاز CO2 نیز از حسگر ویژه در داخل محفظه استفاده شده که فشار گاز را بر روی مانیتور مخصوص نشان می دهد. محفظه دستگاه توسط شیلنگ گاز به کپسول گاز کربنیک متصل می با شد که فشار گاز ورودی با شیرهای تنظیم کننده روی آن کنترل می شود.

۲–۹آنالیز آماری

کلیه ی آزمایش ها با سـه بار تکرار صـورت گرفت. میانگین و انحراف معیار به کمک نسخه ۵ نرمافزار graph pad prism برای تمام داده ها محاسبه شـد. معنی دار بودن یافته های حاصـل با اسـتفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و تسـت Tukeyدر سطح معنی داری 0.05<p ارزیابی شد.

باشد، که با اتصال به منبع تأمين انرژی الکتريکی (۰-۰۰ ولت با توان حداکثر ۱ کیلووات) در فضای بین آنها پدید مى آيد. اين دستگاه قدرت توليد ميدان مغناطيسي با شدت ۰/۵ تا ۳۰ میلی تسلا را دارد که با تنظیم ولتاژ برق یکسو شدهٔ ورودی می توان شدت میدان ایستا با شدت مورد نیاز را ایجاد کرد. از طرفی با اتصال دوشاخه ی میدان به برق شهری، میدان الکترومغناطی سبی با فرکانس ٥٠ هرتز تولید می شود که برخلاف میدان مغناطیسی ایستا دارای خاصیت آهنربایی مستقیم نمی باشد و با نزدیک کردن یک آهنربا به آن شروع به نوسان می کند تا اینکه در فاصله ای بسیار نزدیک باعث ربایش آهنربا می شود. یک دستگاه نگهدارنده دست ساز به ارتفاع ٤٠ سانتی متر که بهدستگاه تنظیم حرارت و فشار گاز کربنیک شرایط استاندارد متصل است، جهت کشت سلول زنده در مرکز آن تعبیه شده است. بخش نگهدارنده، سلولها رادر شرایط استاندارد (دمای ۳۷ درجه ســانتی گراد، فشــار گاز کربنیک ٥ درصــد و رطوبت مناسب) برای کشت قرار میدهد. جنس بدنهٔ این بخش از دستگاه از سطوح پلاستیکی بدون خلل و فرج تهيّه شده كه به راحتي ضدعفوني مي شود.

برای تنظیم د ستگاه و برر سی 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 CO2 دربین صفحاتی از جنس آهن قرار گرفته است.

۳- نتايج

۳–۱ نتایج مشخصهیابی نانوذرات

اندازه، نانوذرات سنتز شده با استفاده از DLS ومیکرو سکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی شد(شکل ۲). نتایج بهد ست 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 منا سب بود به طوری که

PDI فرات سنتزی ۱۲/۲ بهدست آمد که نشان می دهد فرات دارای توزیع یکنواخت بسیار عالی هستند. میانگین اندازه هیدرودینامیک فرات بهدست آمده از DLS هم حدود ۰۰ نانومتر بهدست آمد. اختلاف این اندازه با اندازه بهدست آمده از TEM مربوط به این است که DLS شعاع اب پوشیده فرات را اندازه گیری می کند. این نتایج نشان داد که اندازه این فرات کوچکتر از اندازه بحرانی لازم برای تک حوزه ای شدن نانو فرات مغناطیسی است. بنابراین، این فرات سنتز شده سوپرپارامغناطیس هستند.



شکل ۲ نتایج بهدست آمده از DLS میانگین اندازه ذرات را حدود ۵۰ نانومتر است و گستردگی اندازه ذرات بسیار مناسب و اندازه همه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانو متر می باشد(شکل سمت راست). تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که اندازه نانوذرات Fe3O4 در مقیاس نانو حدود ۱٤ نانومتر می باشد(شکل سمت چپ).



شکل ۳ منحنی مغناطیس سنج نمونه لرزان (VSM) نانوذرات Fe3O4 نشان داد که چرخه پسماندمغناطیسی ذرات کاملاً برگشتپذیر بوده و وذرات خصلت ابرپارامغناطیسی دارند(شکل سمت راست). الگوی پراش پرتــو ایکـــس، نانو ذرات Fe3O4. پیکهای موجود در 20 برابر با °۳۵/۶ و °۲۳/۲، که ویژه نانو ذرات مغناطیسی Fe3O4 نشـان میدهد که ذرات سـنتز شـده Fe3O4 می باشـد(شـکل سـمت چپ). (برگرفته از منبع[۲۲])

کمپلکس دو تایی PEI-pDNA افزایش می یابد و اندازه آن كاهش مى يابد. افزايش بار سطحى به علت افزايش 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 افزایشN:P و به دنبال آن افزایش بار مثبت پلیمر کاتیونی pDNA را بهتر در برمی گیرد و ساختار متراکم تر شده اندازه کمپلکس كاهش مي يابد. اين نتايج نشان مي دهد كمپلكس دو تايي PEI-pDNA به خوبی تشکیل شده و از نظر اندازه و بار سطحی برای انتقال منا سب می با شد. مقایسه بار سطحی MNP، كمپلكس دوتايي PEI-pDNA و كمپلكس سەتايي pDNA-PEI-MNP (شکل ٤) نشان داد هنگامی که pDNA-PEI-MNP در ساختار کمیلکس PEI-pDNA حضور می یابد و کمیلکس سه تایی pDNA-PEI-MNP تشکیل می شود بار کمپلکس سه تایی را در مقایسه با کمپلکس دوتایی 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 کمیلکس است. لازم به ذکر است که بار نهایی کمیلکس 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 برر سی های انجام شده و گزارشات ارائه شده در زمینه رفتار مغناطیسی نانوذرات، ذرات با اندازه کمتر از ۳۰ نانومتر که در غیاب میدان مغناطیسی از دارای پسماند مغناطیسی صفر هستند، رفتار ابرپارامغناطیسی از خود نشان می دهند. منحنی VSM به دست آمده از نانوذرات مود نشان می دهند. منحنی VSM به دست آمده از نانوذرات می شود چرخه پسماند کاملاً برگشت پذیر بوده که این امر نیزیر بوده که این امر نیزیر بودن چرخه پسماند کاملاً برگشت می کند، که این برگشت می مجاورت میدان مغناطیسی آن را اثبات می کند، که این برگشت نانوذرات در مجاورت میدان مغناطیسی می با شد. این آنالیز نشان می دهد که نانوذرات سنتز شده دارای رفتار ابرپارامغناطیسی بوده و بدون اینکه تجمعی بین آن ها رخ بد هد قابلیت جمع آوری و پخش مجدد در محیط واکنش را دارند.

۲-۳ 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 بهدست آمد. به این منظور نسبت های مختلف N:P از کمپلکس ها تهیه شد و مشخصات کمپلکس ها بهدست آمد. همان طور که در شکل ٤ مشاهده می شود با افزایش نسبت N:P بار سطحی



pDNA افزایش می یابد.



شکل ۵ ارزیابی تأخیر حرکت در ژل کمپلکس دوتایی pDNA- PEI در نسبتهای مختلف N:P (از ۲۰/۲۵ تا ۱٤. در نسبتهای N:P بالاتر از ۱ بار مثبت پلیمر بر بارمنفی 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 ۲ نشان داده شده همه گروههای تیمار مقداری سمیت را در سلولها القا میکنند و نسبت به گروه کنترل معنا دار می با شد. این سمیت القا شده در تیمارهای داری پلیمر PEI مربوط به این پلیمر می باشد. همانطور که در شکل مشخص است اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هر تز 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 مقایسیه بازده انتقال سیامانه های انتقال از روش سنجش فعالیت آنزیم لو سیفراز استفاده شد. در این روش pDNA دارای ژن گزارشگر لوسیفراز می باشد. این ژن آنزیم لوسیفراز را بیان می کند که این آنزیم با مصرف آدنوزین تری فسفات (ATP) لوسیفرین را به اکسی لوسیفرین تبدیل می کند. در این واکنش ATP به AMP تبدیل شده و انرژی موجود در پیوندهای فسفات به شکل نور منتشر می شود که دستگاه لومینومتر قادر است نور نشر شده را اندازه گیری کند. میزان نور نشر شده که از دستگاه لومینومتر به دست می آید 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 N:P میلکس دوتایی pDNA-PEI در نسبت های مختلف N:P روی ژل آگارز ۱ درصد برده شدند. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود در P:Nهای بالاتر از ۱ بار مثبت پلیمر بر با رمنفی DNA غلبه کرده و کمپلکس به علت دارا سمت قطب مثبت حرکت نکرده است در حالی که، در N:P های کمتر نتوانست مانع از تأخیر کا مل حرکت پلاسمید روی ژل شوند. این نتیجه نشان می دهد که پلیمر PEI به خوبی به DDNA متصل می شود.

۳–۳ نتایج سمیت سلولی و ترنسفکشن

یکی از پارامتر های مهم و تأثیر گذرا در هر روش انتقال نوکلئیک اسید، میزان سمیت سلولی است که آن روش دارد. روش ها و سامانه های انتقال باید زیست سازگار با شند. در این مطالعه سمیت سلولی القا شده سامانه های انتقال کمپلکس دوتایی، سه تایی، لیپوفکتامین (به عنوان یک و کتور انتقال تجاری) و میدان مغناطیسی متناوب با استفاده

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

شــد. در هر دو رده ســلولی اعمال میدان معغناطیســی در زمان انکوباسـیون به طور معنا داری بازده انتقال را افزایش میدهد. به سلول میباشد. همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است بازده انتقال لیپوفکتامین، کمپلک سه تایی و کمپلکس سه تایی با اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۰۰ هرتز با استفاده از سنجش فعالیت لو سیفراز با هم مقایسه



شکل ٦ میزان سمیت القا شده در سلولهای HEK293T و MCF7 توسط سامانه ای انتقال در حضور و عدم حضور میدان مغناطیسی متناوب ٥٠ هرتز. هر عدد مربوط به میانگین سه بار آزمایش مستقل میباشد (میانگین ± انحراف معیار) که نسبت به گروه کنترل محاسبه شده است (حروف لاتین متفاوت وجود اختلاف معنیدار را مشخص میکند و حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنیدار در گروهها میباشد).



شکل ۷ مقایسه میزان ترنسفکشن لیپوفکتامین، کمپلکس سه تایی کمپلکس سه تایی با اعمال میدان مغناطیسی متناوب ۵۰ هرتز دادهها بر اساس میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار ارائه شده است.(0.01 × *)

کمیلکس ها مثبت است و برای انتقال مناسب می باشد، چرا که می تواند با بار منفی غشاء سلول برای ورود برهمکنش کند. در روش های انتقال ژن به ســلول روش هایی کاراتر هستند که بتوانند از موانع موجود بر سر راه انتقال بهتر عبور كنند. تعدد موانع خارج سلولي و داخل سلولي باعث به دام افتادن و تخریب کمپلکس حمل کننده نوکلئیک اسید می شود و در نتیجه بازده انتقال را کم می کند[۳۳]. ا صلى ترين مانع خارج سلولى غشاء سلول است كه به مولکول های اب دوست اجازه عبور از غشاء را نمی دهد[۳۷]. در روش های انتقال، کمپلکس حاوی نوکلئیک اسید به صورت محلول روی سلولهای هدف ریخته می شـود و کمپلکس هایی که با حرکات برونی در مدت زمان انکوبا سیون به غشا برخورد میکنند شانس عبور از غشاء سلول را دارند[۳۸]. در این فرایند ر سیدن کمپلکس به سطح سلول وابسته به انتشار بوده و غیر هدفمند است. جهت افزایش احتمال برخورد کمپلکس به سطح غشاء سلول، ناگزیر زمان انکوبا سیون باید افزایش یابد. افزایش زمان انکوباسیون احتمال اگریگیشین کمپلکس را افزایش میدهد و از طرفی باعث افزایش سمیت کمپلکس روی ســلول ها میشــود[٤٠،٣٩]. بنابراین، اعمال نیرویی به كمپلكس در جهت سطح غشاء سلول مي تواند وابستگي 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 می شود. این نیرو می تواند 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 g ۲۱۰ کاهش زمان انکوباسیون از ٤ ساعت به ۱ ساعت شد[٤١].

در این مطالعه نشان داده شد که بازده انتقال در حضور میدان متناوب ۰۰ هر تز افزایش مییابد. میدان الکترومغناطیسی با فرکانس فوق العاده پایین انرژی کمی ٤- بحث و نتیجه گیری

مشخصهیابی نانو ذرات مغناطیسی به وسیله TEM و DLS نشان داد که توزیع اندازه ذرات سنتز شده کمتر از اندازه بحرانی میباشـــد در اندازههای کمتر از اندازه بحرانی هر ذره به یک حوزه مغناطیســی تبدیل میشـود[۳۳]. به نانو ذرات تک حوزه ابر پارامغناطیس اطلاق می شود. اندازه بحرانی برای ذرات ابرپارامغناطیس اکسید آهن(SPION) حدود ۲۵ نانومتر می اشد [۳٤]. که نتایج TEM ابرپارامغناطیس بودن ذرات سینتز شیده را تایید میکند. توزيع اندازه نتايج VSM هم ابر پارامغناطيس 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 ر سوب در مویر گها کاهش می یابد. این ویژگی یعنی عدم تشکیل تجمعات در مگنتوفکشن باعث افزایش بازده این روش انتقال می شود[۳٤]. نتایج پتادسیل زتا نشان داد که بار سطحی SPION سنتز شده حدود –۱۹ ميلى الكترون ولت است كه اين بار سطحى قابليت اتصال از طريق برهمكنش الكتروستاتيك را به بارهاي مثبت براي مثال PEI می دهد[۳۵].

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

۔ دورہ ۱۵، شمارہ ۲، بھار ۱٤۰۳

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 نمی تواند با بر همکنش مستقیم باعث شکست ييوندهاي شيميايي مولكول هي غشا سلول شود، اما ميدان مغناطیسے متناوب موجب تحریک و افزایش دانسیته ی جريان (جريان الكتريكي در واحد سطح) در بافت موردنظر همسو با میدان اعمالی می شود[۲3]. همچنین، میدان مغناطیسے متناوب بر واکنش های بیوشےمیایی و رفتار مولکولهای باردار نزدیک به غشای سلول از طریق اعمال نيرو به حامل هاي بار در حال حركت مثل يون ها، و سامانه باردار مثبت مغناطبسی اثر می گذارد[٤٣]. بنابراین، غلظت سامانه مغناطیسی در سطح غشای سلول را اقزایش می دهد. از دیگر دلایل افزایش بازده انتقال در حضور میدان مغناطیسی متناوب ۰۰ هر تز اثری است که این میدان بر غشاء سلول و بر کمیلکس مغناطیسی دارد. کمیلکس مغناطیسی در حضور این میدان در جهات مختلف شروع به حرکات نوسانی میکند که این نوسانات بر غشاء سلول اثر گذاشته وعبور كميلكس از غشاء سلول را افزايش مى دهد[٣٢]. مطالعات نشان داده است كه ميدان مغناطيسي متناوب نفوذیذیری غشاء را افزایش می دهد این میدان با تاثیر بر یکیارچگی غشاء سلول منجر به القای آزاد سازی پروتئاز درون سلولی می شود که این امر نشان دهنده تغییر یکیارچگی غشاء و نفوذیذیری غشا پس از قرار گرفتن در معرض میدان است[٤٤]. همچنین، به نظر می رسداثرات 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 ارتعاش های درونی به گرما تبدیل می کنند. و دمای بافت ها و سلول هدف بسته به شدت میدان، غلظت نانو ذره، مدت اعمال میدان و .. تا ٤١ تا ٤٧ درجه سانتي گراد بالا مي رود [٤٥]. افزايش دما از طريق افزايش سياليت غشاء، فرايند اندوسيتوز را تسريع مي كند[٤٦]. از انجايي كه ورود سامانه مغناطيسي به سلول از طریق اندوسیتوز است پس در نتیجه اثرات گرمایی

[22] M. Satari, N. Haghighat, F. Javani Jouni, and P. Abodolmaleki, "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 Fieldand Cis-diamminedichloroplatinum(II) on Apoptosis and Cell Cycle Progression in HeLa Cell Line and Hu02," *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.irJ Zafari, F Javani Jouni, P Abdolmaleki, MJ Khodayar, A JalaliModares J. Biotechnol. 2018•udd.modares.ac.ir.*

[27] N. Haghighat, P. Abdolmaleki, M. Behmanesh, "Stable and M. Satari, morphological-physiological and neural protein expression changes in rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with electromagnetic field and oxide," nitric 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, "Polyethyleniminebased 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. Murtomäki, 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 lowfrequency magnetic fields induce tumor membrane disruption and altered cell viability," *cell.comCP Ashdown, SC Johns, E Amin. M Unanian, W Connacher, J Friend, MM FusterBiophysical 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, "Protoninduced 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-Amtenbrink, 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 argininerich 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^{*1}, Behnam Hajipour-Verdom², Saman Hosseinkhani³, Parviz Abdolmaleki^{*2}

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 (Fe₃O₄) 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 ($P \le 0.05$).

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