ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):465-471

Toxicity of Peptide-Functionalized Gold Nanorods in Hela Cell Line

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Zaghian S.[1] *PhD,*
Tohidi Moghadam T.[1] *PhD,*
Behmanesh M.*[1] *PhD*

How to cite this article
Zaghian S, Tohidi Moghadam T., Behmanesh M. Toxicity of Peptide-Functionalized Gold Nanorods in Hela Cell Line. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):465-471.

[1]Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884451
Fax: +98 (21) 82884717
behmanesh@modares.ac.ir

Article History
Received: September24,2018
Accepted: November11,2018
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

The unique physicochemical properties of nanoscale plasmonic materials have attracted considerable attention in the fabrication of hybrid nano-bio structures because of their promising applications in biosensing, imaging, and controlled-release drug delivery. The purpose of this study was the synthesis of functionalized gold nanorods (GNRs) to both reduce the toxicity and increase the biocompatibility for further applications such as the design of a therapeutic nanocarrier for nucleic acid delivery to cancerous cells. In this study, GNRs were prepared by seed-mediated method and their surface was modified by polystyrene sulfonate (PSS) polymer. Then, peptide-functionalized GNRs was fabricated via ligand exchange method through the Au-S bond. The CTAB-GNRs and functionalized nanostructures were characterized using ultraviolet-visible spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), and zeta potential measurement. Finally, the cytotoxicity effects of functionalized GNRs on Hela cells were studied by MTT assay. The optimal concentration of PSS and peptide, which did not cause any aggregation and morphological perturbations of the nanostructure were obtained 50μM and 1mM respectively. The survival percentage of treated Hela cells significantly increased by surface modification of GNRs with PSS and functionalization with peptide compared to CTAB-GNRs. While LC50 of functionalized GNRs was calculated 50nM, treated cells with the same concentrations of CTABGNRs survived less than 20%. Functionalization of GNRs increases its biocompatibility and improves applications of this nanostructure as a therapeutic carrier in cancerous cells.

Keywords Gold Nanorod; Polystyrene Sulfonate; Biocompatibility; Hela Cell Line

CITATION LINKS

[1] Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions [2] Nanomaterials at work in biomedical research [3] Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer [4] Functionalized gold nanorods for tumor imaging and targeted therapy [5] Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids [6] Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability [7] Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible [8] Replacement of CTAB with peptidic ligands at the surface of gold nanorods and their self-assembling properties [9] Cation exchange on the surface of gold nanorods with a polymerizable surfactant: polymerization, stability, and toxicity evaluation [10] Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity [11] Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes [12] Heat induced aggregation of gold nanorods for rapid visual detection of lysozyme [13] CTAB promoted synthesis of Au nanorods – Temperature effects and stability considerations [14] Aspect ratio controlled synthesis of gold nanorods [15] Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique [16] Tailoring longitudinal surface plasmon wavelengths, scattering and absorption cross sections of gold nanorods [17] Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging [18] Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags [19] In vitro toxicity studies of polymer-coated gold nanorods [20] Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate [21] Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo [22] Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بررسی کاهش سمیت نانومیله طلای عامل‌دارشده با پپتید بر رده سلول سرطانی هلا

سعیده زاغیان PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
طاهره توحیدی‌مقدم PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
مهرداد بهمنش* PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده
خواص فیزیکی- شیمیایی منحصربه‌فرد مواد پلاسمونیک در مقیاس نانو توجه زیادی را در تولید ساختارهای هیبرید زیستی- نانویی به خود جلب کرده که در حسگری زیستی، تصویربرداری، تحویل و رهایش کنترل‌شده دارو کاربرد دارد. هدف این پژوهش ساخت نانومیله طلای عامل‌دارشده به‌منظور کاهش سمیت و افزایش میزان زیست‌سازگاری برای استفاده‌های بعدی به‌عنوان نانوسامانه حامل نوکلئیک‌اسید به سلول سرطانی بود. در این پژوهش، نانومیله طلا به روش رشد روی ذرات دانه ساخته و سطح آن به‌وسیله پلیمر پلی‌استایرن‌سولفونات (PSS) اصلاح شد. سپس به روش جابه‌جایی لیگاند از طریق اتصال Au-S به پپتید، عامل‌دار شد. صحت ساخت نانوسامانه توسط طیف‌سنجی فرابنفش- مرئی (Uv-Vis)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و اندازه‌گیری پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. در پایان، مطالعه سمیت نانومیله عامل‌دارشده روی رده سلولی هلا به کمک روش MTT انجام شد. غلظت مناسب PSS و پپتید برای عامل‌دارکردن و افزایش زیست‌سازگاری نانومیله‌ها به‌ترتیب ۵۰میکرومولار و یک‌میلی‌مولار محاسبه شد که بالاترین غلظتی بود که موجب تجمع نانومیله‌ها و اختلال در مورفولوژی میله‌ای آنها نمی‌شد. اصلاح سطح نانومیله طلا با PSS و عامل‌دارکردن با پپتید به میزان قابل توجهی سبب افزایش زیست‌سازگاری آن شد. درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا تیمارشده با نانوسامانه عامل‌دار در مقایسه با نانومیله‌های عامل‌دارنشده افزایش یافت؛ به‌طوری که غلظت ۵۰نانومولار نانوساختار عامل‌دار به‌عنوان LC50 محاسبه شد در حالی که تنها کمتر از ۲۰٪ سلول‌های تیمارشده با غلظت مشابه از نانومیله عامل‌دارنشده، زنده ماندند. عامل‌دارکردن سطح نانومیله طلا با پپتید سبب افزایش زیست‌سازگاری آن شده و استفاده از این نانوسامانه به‌عنوان حامل در سلول‌های سرطانی را بهبود می‌بخشد.
کلیدواژه‌ها: نانومیله طلا، پلی‌استایرن‌سولفونات، زیست‌سازگاری، رده سلولی هلا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰
*نویسنده مسئول: behmanesh@modares.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر به‌دلیل ساخت نانوذرات گوناگون، پیشرفت‌های زیادی در زمینه نانوپزشکی به وجود آمده است. در این بین، نانوذرات فلزی به‌دلیل خواص نوری و الکترونیکی منحصربه‌فرد بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند[1, 2].

در حال حاضر، نانوذرات طلا با مورفولوژی میله‌ای به‌دلیل خواص نوری منحصربه‌فرد، کاربردهای بسیاری در ساخت زیست‌حسگرها، تصویربرداری بیولوژیک، تشخیص داخل سلولی و نور- گرمادرمانی سلول‌های سرطانی دارند. با توجه به زیست‌سازگاری مناسب و تجزیه زیستی، ساخت ساده، اندازه قابل تنظیم و اصلاح سطح و عامل‌دارکردن آسان، نانومیله‌های طلا (GNRs) به‌عنوان یک کاندیدای مناسب برای ساخت نانوحامل‌های انتقال دارو و ژن نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند[3]. علاوه بر این، نانومیله طلا می‌تواند با آنتی‌بادی‌های مختلف، پپتیدها و لیگاندهای مولکولی کوچک برای رسانش اختصاصی و تحویل کارآمد ژن یا دارو به سلول و بافت هدف به کار گرفته شوند[4]. یکی از موثرترین راه‌ها در جهت افزایش ویژگی و اثربخشی سامانه‌های رهایش دارویی مبتنی بر نانومیله، عامل‌دارکردن نانوذرات با آمینواسیدها و پپتیدها است. نانوذرات طلای متصل به آمینواسیدهایی نظیر هیستیدین، لیزین، پلی‌لیزین و آرژنین به نوکلئیک‌اسید متصل شده و بدون ایجاد سمیت به شکل موثری در رهایش ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ زیرا گروه‌های آمین نوع اول آمینواسیدها با ظرفیت اتصالی بالا به گروه‌های آنیونی نوکلئیک‌اسید متصل می‌شوند[5-7].

با این وجود، آنچه کاربرد زیستی GNRs را محدود می‌نماید، غلظت بالای سورفکتانت کاتیونی ستیل‌متیل‌آمونیوم‌برومید (CTAB) است که برای رشد ناهمسانگرد نانومیله‌ها ضروری است و هنگام سنتز، دولایه‌ای در اطراف نانومیله‌ها تشکیل می‌دهد که به افزایش پایداری آنها کمک می‌کند. این سورفکتانت، زیست‌سازگاری بسیار کمی دارد و در غلظت‌های کم میکرومولار هم برای سلول‌های زنده کشنده است. علاوه بر این، نانوذرات پوشش‌داده‌شده با CTAB به‌صورت غیراختصاصی جذب سلول‌ها می‌شوند[8, 9]. مطالعات نشان می‌دهد که GNRs و سایر نانوذرات حاوی CTAB قبل از کاربردهای زیستی نیاز به یک روش تخلیص دقیق دارند. دو روش معمول برای عامل‌دارکردن نانومیله‌ها، جایگزینی سورفکتانت کاتیونی به روش جابه‌جایی لیگاند و نشاندن الکترواستاتیک دولایه کوپلیمر باردار (منفی و مثبت) روی لایه CTAB است. حفظ پایداری و خواص نوری نانومیله‌ها پس از عامل‌دارکردن بسیار حائز اهمیت است[10].

در این پژوهش، با هدف طراحی یک نانوسامانه هدفمند حامل نوکلئیک‌اسید به درون سلول سرطانی، سطح نانومیله‌ها ابتدا با پلیمر آنیونی پلی‌استایرن‌سولفونات پوشش‌دهی و سپس با توالی پپتیدی عامل‌دار شدند. پپتید به‌صورتی طراحی شده بود که علاوه بر داشتن بار مثبت و توانایی اتصال الکترواستاتیک به توالی‌های نوکلئیک‌اسید، قادر به شناسایی اختصاصی سلول‌های سرطانی باشد. همچنین وجود توالی تکرارشونده هیستیدین- لایزین با ایجاد خاصیت بافری، پدیده فرار اندوزومی نانوساختار را تسهیل نموده و به رهایش آن درون سیتوپلاسم سلول هدف کمک می‌کند[5-11]. در ادامه اثر اصلاح سطح و عامل‌دارنمودن نانومیله‌ها بر سمیت سلولی و افزایش زیست‌سازگاری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پودر تتراکلرواورات ($HAuCl_4.3H_2O$) ۹۹/۹٪، سدیم‌بوروهیدرید ($NaBH_4$) ۹۹٪، ستیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌برومید (CTAB)، اسیدآسکوربیک ۹۹٪ و نیترات‌نقره ($AgNO_3$) ۹۹٪ و پلی‌استایرن‌سولفونات (وزن مولکولی ۷۰۰۰۰؛ سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. در تمام آزمایش‌ها آب دیونیزه به کار رفت.

سنتز نانومیله طلا: در این مطالعه، نانومیله طلا براساس روش رشد روی ذرات دانه ساخته شد[12]. ابتدا نانوذرات کروی‌شکل دانه با اضافه‌نمودن ۲۵۰میکرولیتر محلول طلای تتراکلرواورات (۰/۰۱مولار) به ۷/۵میلی‌لیتر محلول سورفکتانت کاتیونی CTAB (۰/۰۱مولار) و ۶۰۰میکرولیتر از محلول سرد سدیم‌بورهیدرید (۰/۰۱مولار) با تکان شدید در دمای اتاق ساخته شد. محلول حاصل به‌منظور رشد دانه‌ها به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

در مرحله رشد، ۹/۵میلی‌لیتر CTAB (۰/۱مولار)، ۴۰۰میکرولیتر محلول طلای تتراکلرواورات (۰/۰۱مولار)، ۹۰میکرولیتر نیترات‌نقره (۰/۰۱مولار) و ۶۴میکرولیتر آسکوربیک‌اسید (۰/۱مولار) و ۴۰میکرولیتر از محلول دانه به محیط واکنش افزوده و پس از چند دقیقه تکان آرام، نانوذرات حاصل به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. در این مرحله تغییر رنگ محلول به ارغوانی موید ساخت و رشد نانومیله‌های طلا بود. پیش از مطالعات آتی، برای تخلیص نانوساختارها و جداسازی سورفکتانت کاتیونی و یون‌های اضافی که در واکنش شرکت نکرده‌اند، محلول نانومیله طلا دوبار به‌مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب ته‌نشین‌شده با احتیاط خارج و در آب دیونیزه حل شد. به‌منظور همگن‌سازی، محلول حاوی نانوساختار به‌مدت ۲۰دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار گرفت. برای ادامه مطالعه، غلظت محلول نانومیله طلا روی OD برابر با یک تنظیم شد.

اصلاح سطح نانومیله با پلیمر پلی‌استایرن‌سولفونات (PSS): برای پوشش‌دهی PSS روی سطح نانومیله طلا، ۱۰میلی‌لیتر از محلول‌های آبی ۱۰ تا ۱۰۰میکرومولار PSS (حاوی ۶میلی‌مولار سدیم‌کلرید) به ۱۰میلی‌لیتر نمونه تخلیص‌شده CTAB-GNRs با OD برابر با یک اضافه شد. محلول در دمای اتاق به‌مدت ۴ساعت روی همزن مغناطیسی (۱۰۰دور در دقیقه) ترکیب شد. PSS اضافی توسط دوبار سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰دور بر دقیقه جدا شد و حجم کل نانومیله پوشش‌داده‌شده با PSS به ۱۰میلی‌لیتر رسید.

عامل‌دارکردن سطح نانومیله طلا حاوی PSS با پپتید: قطعه پپتیدی دارای یک اسیدآمینه سیستئین در انتهای آمینی و توالی تکراری اسیدهای آمینه بار مثبت هیستیدین، لایزین و آرژنین (GL Biochem؛ چین) خریداری شد. محلول پپتید در غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱ و ۲میلی‌مولار تهیه شد. سپس ۵۰میکرولیتر از هر غلظت محلول پپتید به یک‌میلی‌لیتر از محلول PSS-GNRs اضافه و پس از ۳۰دقیقه حمام فراصوت، به‌مدت ۴۸ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی به‌منظور تشکیل پیوند Au-S مخلوط شد. درنهایت، دوبار به‌مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۸۵۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصل که حاوی نانومیله‌های عامل‌دارشده با پپتید بود، در آب دیونیزه حل شد.

پایش نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا: سریع‌ترین و ساده‌ترین روش برای تایید ساخت نانومیله‌های طلا استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش- مرئی است. پس از تخلیص، نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارها در گستره طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل لامبدا ۲۵ (Perkin Elmer؛ ایالات متحده آمریکا) ثبت شد.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیله طلا: برای تعیین مورفولوژی و اندازه دقیق نانومیله‌های طلا، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) زایس مدل EM10C-80 KV (زایس؛ آلمان) استفاده شد. نمونه آماده‌سازی‌شده روی شبکه مسی پوشیده از کربن نشانده و برای تصویربرداری آماده شد.

اندازه‌گیری پتانسیل زتا: برای تعیین بار سطحی نانومیله‌ها قبل و بعد از عامل‌دارشدن، با استفاده از دستگاه زتاسایزر DLS مدل Nano ZS90 (مالورن؛ انگلستان) بار سطحی آنها تعیین شد.

بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT: به‌منظور بررسی عامل‌دارکردن نانومیله‌های طلا بر افزایش زیست‌سازگاری آنها از روش MTT استفاده شد. در این روش، تعداد 10^4 سلول هلا در هر چاهک پلیت ۹۶خانه حاوی ۱۰۰میکرولیتر محیط DMEM حاوی ۱۰% FBS و ۱% پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شد. پس از ۲۴ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C و در حضور غلظت ۵% دی‌اکسیدکربن، غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰نانومولار نانومیله طلای عامل‌دارنشده، پوشش‌دهی‌شده با PSS و عامل‌دارشده با پپتید به سلول‌ها اضافه و به‌مدت ۴۸ و ۲۴ساعت تحت شرایط قبلی گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی زمان‌های مذکور محلول MTT با غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده و به‌مدت ۴ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از طی زمان لازم، محیط کشت حاوی محلول MTT به‌دقت خارج و به هر خانه میزان ۱۰۰میکرولیتر DMSO به‌منظور حل‌کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا مدل ELx 800 (BioTek؛ ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۵۷۰نانومتر قرائت شد. نتایج حاصل به‌صورت میزان بقای سلولی و LC50 (غلظتی که سبب مرگ سلولی تا میزان ۵۰% می‌شود) با درنظرگرفتن چاهک شاهد (بدون تیمار) که ۱۰۰% سلول‌ها، زنده در نظر گرفته شدند، گزارش شد. هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام و مقادیر ±انحراف‌استاندارد محاسبه شد. آنالیز نتایج سمیت سلولی با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس دوطرفه و نرم‌افزار GraphPad Prism 6 صورت پذیرفت.

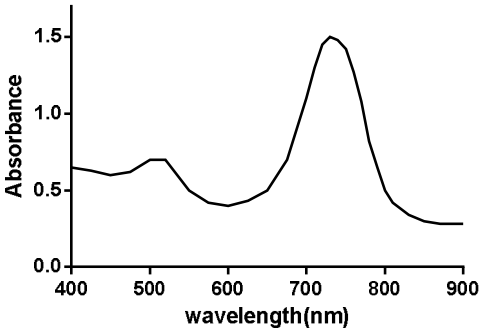
.

یافته‌ها و بحث

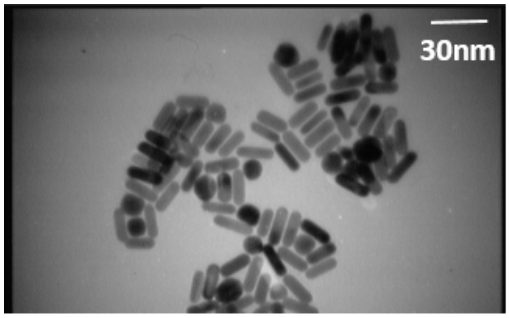
مشخصه‌یابی نانومیله طلای ساخته‌شده: اولین و ساده‌ترین روش برای تایید ساخت نانومیله‌های طلا، پایش نوسانات پلاسمون سطحی این نانوساختارها توسط طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش در ناحیه مرئی تا مادون‌قرمز نزدیک است. با برخورد پرتو الکترومغناطیس به نمونه نانومیله طلا، بسته به‌شدت قطبش‌پذیری پرتو، نوسانات الکترونی در دو جهت اتفاق می‌افتد. برانگیختگی الکترون‌ها در قسمت عرضی نانومیله و نوسان پلاسمون سطحی در این ناحیه، یک طیف جذبی در محدوده مرئی نشان می‌دهد که به رزونانس پلاسمون سطحی عرضی (TSPR) معروف است. از سوی

دیگر، الکترون‌ها در طول نانومیله‌های طلا رفتار نوسانی متفاوتی نشان می‌دهند که به پدیدارشدن یک طیف پلاسمونیک جذبی قوی در محدوده نزدیک مادون‌قرمز می‌انجامد و طیف رزونانس پلاسمون سطحی طولی (LSPR) نامیده می‌شود[13]. محدوده این نوع جذب پلاسمونیک به طول نانوساختار، شکل و شرایط ساخت آن وابسته است[14, 15]. شکل ۱- الف نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارهای میله‌ای مورد استفاده در این پژوهش را نشان می‌دهد که به‌ترتیب در گستره طول موج ۵۲۰ و ۷۳۰نانومتر پدیدار شده است.

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نمونه‌های خالص‌شده نیز ساخت نانوساختارهای ناهمسانگرد با مورفولوژی میله‌ای را تایید کرد (شکل ۱- ب). با توجه به تصویر و براساس نوار مقیاس، میانگین طول نانوساختارها حدود ۱۸نانومتر به دست آمد.



الف



ب

شکل ۱) الف) طیف جذبی نانومیله طلا در بازه طول موج ٤٠٠ تا ۹۰۰نانومتر؛ دو باند جذبی در ناحیه ۵۲۰ و ۷۳۰نانومتر به‌ترتیب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی در عرض و طول نانومیله و تاییدکننده اولیه ساخت نانومیله طلا است، ب) تصویر TEM نانومیله طلا؛ تشکیل نانوذره با مورفولوژی میله‌ای را نشان می‌دهد.

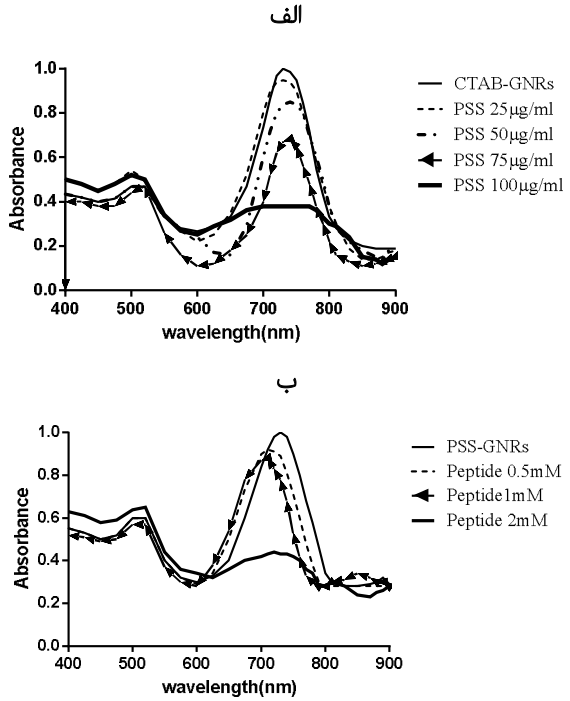
اصلاح سطح نانومیله‌های طلا با پلیمر پلی‌استایرن‌سولفونات: سطح نانومیله طلا ماتریکس مناسبی برای میان‌کنش یا اتصال به مولکول‌های مورد نظر برای کاربردهای مختلف شیمیایی، فیزیکی و زیستی فراهم می‌کند. در حالی که TSPR معمولاً تغییرات خاصی را در برابر تغییرات ضریب شکست نشان نمی‌دهد، LSPR حساسیت قابل توجهی نسبت به تغییرات محیطی دارد، بنابراین تاثیر دست‌ورزی شرایط ساخت نانوساختار و نشاندن عوامل سطحی مختلف با ماهیت شیمیایی و زیست‌مولکولی در شدت جذب LSPR و محل پدیدارشدن آن نمایان و قابل‌ردیابی می‌شود[16]. CTAB سورفکتانتی است که برای کنترل شکل نانومیله‌های طلا استفاده می‌شود و دولایه کاتیونی روی سطح نانومیله طلا تشکیل می‌دهد که سبب افزایش پایداری آن می‌شود ولی می‌تواند سبب اختلال در غشای سلولی و مرگ سلول شود. مطالعات نشان داده که این مولکول‌ها سبب کاهش ۶۵ تا ۷۵% بقای سلول‌ها می‌شوند؛ به همین دلیل استفاده از نانومیله‌های پوشیده از CTAB در کاربردهای زیستی محدود می‌شود. از آنجایی که نانومیله‌های سنتزشده با CTAB حتی پس از سانتریفیوژ، درصدی از سمیت را در سامانه‌های زیستی نشان می‌دهند، بنابراین ضروری است که به‌منظور کاهش سمیت نانومیله‌ها، بخشی از CTAB موجود را با مولکول‌های با سازگاری زیستی بیشتر جایگزین کرد، زیرا حذف کامل CTAB سبب تجمع غیرقابل‌کنترل نانومیله‌ها و ناپایداری آن می‌شود. تاکنون مولکول‌های مختلفی به‌منظور سازگارنمودن نانومیله‌های طلا با سیستم زیستی استفاده شده‌اند[8, 17-19]. در این مطالعه به‌منظور افزایش سازگاری زیستی نانوساختارهای طلا، سطح نانومیله‌ها با غلظت‌های مختلف پلیمر پلی‌استایرن‌سولفونات (PSS) پوشش‌دهی شد. نانوساختار GNRs/PSS از طریق میان‌کنش الکترواستاتیک بین PSS بار منفی و CTAB با بار مثبت ایجاد شد و به‌صورت یک‌لایه اطراف مولکول‌های CTAB را احاطه کرد.

برای اطمینان از حفظ مورفولوژی میله‌ای نانوذرات، طیف SPR در حضور غلظت‌های مختلف PSS بررسی شد. نمودار ۱- الف نشان‌دهنده طیف SPR نانومیله‌ها در حضور غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰میکرومولار PSS است. در حضور محلول پلیمری، در طیف رزونانس پلاسمون سطحی طولی نانوساختارها جابه‌جایی قرمز و کاهش شدت SPR طولی دیده شد. چنین تغییراتی در طیف SPR می‌تواند نشانه تغییر سطح نانومیله‌های طلا با PSS باشد. غلظت‌های بالای ۵۰میکرومولار PSS موجب افزایش ناپایداری نانومیله‌های طلا و تجمع آنها شد. توده‌های ماکروسکوپی مشاهده‌شده در نمونه می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در مورفولوژی نانوساختار و ازدست‌دادن شکل میله‌ای آن باشد[20]. در ادامه مطالعه از غلظت ۵۰میکرومولار پلیمر به‌عنوان غلظت بهینه استفاده شد.

عامل‌دارکردن نانومیله‌های طلا با پپتید: در ادامه کار سطح نانومیله طلا با یک توالی پپتیدی بار مثبت عامل‌دار شد. اسیدهای آمینه موجود در این پپتید، مولکول‌های قطبی بار مثبت شامل توالی تکرارشونده هیستیدین- لایزین و آرژنین بودند که سبب افزایش بار مثبت سطح نانومیله‌ها و همچنین افزایش تمایل آنها به اتصال الکتروستاتیک با توالی‌های نوکلئیک‌اسید می‌شود که کاربردهای بعدی این نانوساختار به‌عنوان حامل نوکلئیک‌اسید را امکان‌پذیر می‌کند. در انتهای آمینی پپتید یک اسیدآمینه سیستئین در نظر گرفته شد که با توجه به تمایل بالای پیوندی طلا و گروه تیول و نیز ترجیح این پیوند کووالانسی بر پیوند الکتروستاتیک بین CTAB و نانوذره، از طریق روش جابه‌جایی لیگاند سبب اتصال پپتید به نانوذره و نیز حذف CTAB از سطح نانومیله می‌شود. فرآیند عامل‌دارنمودن، با افزودن غلظت‌های متفاوت پپتید به غلظت ثابتی از نانومیله‌ها و ۳۰دقیقه قراردادن در حمام فراصوت و ٤٨ساعت همزنی مغناطیسی در دمای محیط انجام شد. برای حصول اطمینان از عامل‌دارشدن

نانومیله‌ها، پایش نوسانات پلاسمونی انجام شد. طیف SPR نانوساختارهای عامل‌دارشده در دو غلظت ۰/۵ و یک‌میلی‌مولار نشان داد که پیک جذبی اول در ناحیه ۵۲۰نانومتر پس از عامل‌دارشدن بدون تغییر بود. این در حالی است که در پیک جذبی دوم اندکی جابه‌جایی آبی و کاهش شدت جذب مشاهده شد که نشان‌دهنده جذب پپتید روی سطح نانومیله است (نمودار ۱- ب). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، غلظت ۲میلی‌مولار پپتید سبب کاهش شدید جذب پیک دوم و ازدست‌رفتن پایداری نانومیله‌ها شد؛ بنابراین غلظت بهینه پپتید در ادامه، یک‌میلی‌مولار در نظر گرفته شد که بالاترین غلظتی است که در حضور آن نانومیله‌ها برای مدت بیش از یک ماه در دمای ٤°C پایداری خود را حفظ نمودند.

در آخرین مرحله از تعیین مشخصات نانوساختار، پتانسیل زتای نانومیله قبل و بعد از عامل‌دارشدن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این مقدار برای نانومیله دارای CTAB و عامل‌دارشده با پپتید مثبت و برای نانومیله پوشش‌داده‌شده با PSS منفی بود (جدول ۱). بار خالص پپتید به‌دلیل وجود باقی‌مانده‌های بازی هیستیدین- لایزین و آرژنین مثبت است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، پلیمر PSS به‌دلیل وجود یون‌های SO_3^- گروه سولفونات دارای بار منفی و CTAB نیز یک سورفکتانت کاتیونی است. تغییر میزان پتانسیل زتا تاییدکننده صحت اتصال در هر مرحله است.



نمودار ۱) مقایسه طیف جذبی الف) نانومیله‌های پوشش‌داده‌شده با غلظت‌های مختلف PSS و نانومیله‌های پوشیده با CTAB (CTAB-GNRs). در حضور غلظت‌های مختلف PSS در طیف LSPR نانوساختارها جابه‌جایی قرمز و کاهش شدت پیک مشاهده شد که نشان‌دهنده تغییر سطح نانومیله‌ها با PSS بود، ب) نانومیله‌های عامل‌دارشده با غلظت‌های مختلف پپتید و نانومیله‌های پوشش‌داده‌شده با غلظت ۵۰میکرومولار PSS، در حضور غلظت‌های مختلف پپتید در طیف LSPR نانوساختارها جابه‌جایی آبی دیده شد. غلظت بالاتر پپتید سبب تجمع نانومیله‌ها و کاهش شدید پیک LSPR شد.

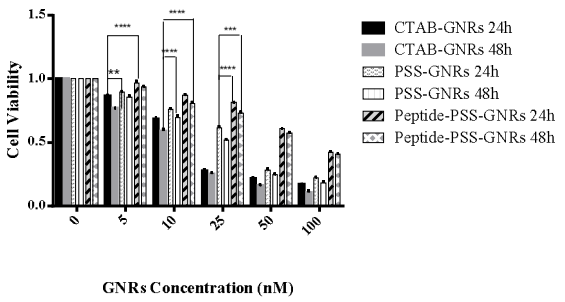
جدول ۱) بررسی تغییرات پتانسیل زتا نانومیله طلا قبل و بعد از عامل‌دارشدن؛ CTAB-GNRs به‌دلیل وجود یون‌های کاتیونی CTA^+ دارای بار مثبت است. PSS-GNRs به‌دلیل وجود یون‌های آنیونی SO_3^- گروه سولفونات، بار سطحی نانومیله‌ها را منفی می‌کند و بار خالص پپتید به‌دلیل وجود باقی‌مانده‌های بازی مانند هیستیدین- لایزین و آرژنین مثبت است، تغییر پتانسیل زتا موید تغییر سطح در هر مرحله است.

	زتا پتانسیل (میلی‌ولت)
CTAB-GNRs	+۴۳/۷ (±۰/۶)
PSS-GNRs	-۳۹/۴۳ (±۰/۹۷)
Peptide-GNRs	+۲۳/۵ (±۰/۷)

بررسی میزان سمیت سلولی به روش MTT: شیمی سطح نانومیله‌های طلا به‌شدت بر میزان سمیت و جذب سلولی آنها تاثیر دارد[21]. از آنجایی که موضوع کاهش سمیت نانوذرات در سامانه‌های زیستی بسیار حائز اهمیت است، بنابراین، اثر عامل‌دارکردن نانومیله‌های طلا در کاهش سمیت سلولی و افزایش بقای سلول‌ها با استفاده از سنجش MTT، مورد بررسی قرار گرفت. این روش یک سنجش متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و براساس احیای معرف تترازولیوم به محصول فورمازان نامحلول، توسط آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است[22].

برای بررسی سمیت نانوسامانه عامل‌دارشده، سلول‌های سرطانی دهانه رحم هلا به‌مدت ۲٤ و ٤٨ساعت در معرض غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰نانومولار نانومیله‌های عامل‌دارنشده حاوی CTAB و عامل‌دارشده با ۵۰میکرومولار PSS و یک‌میلی‌مولار پپتید قرار گرفتند.

همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، نتایج گویای کاهش قابل ملاحظه در میزان مرگ سلول‌های تیمارشده با نانومیله عامل‌دار در مقایسه با سلول‌های تیمارشده با CTAB-GNRs بود. در واقع سلول‌ها تا غلظت ۵۰نانومولار نانومیله عامل‌دار را تحمل کردند، در حالی که غلظت ۱۰نانومولار از CTAB-GNRs موجب مرگ بیش از ۵۰% سلول‌ها شد که تاییدی بر سمیت مولکول CTAB بود[21].



نمودار ۲) الگوی اثر سمیت نانومیله طلای عامل‌دارنشده (CTAB-GNRs) و نانومیله پوشش‌دهی‌شده با PSS (PSS-GNRs) و عامل‌دارشده با پپتید بر رده سلولی هلا. تغییر سطح نانومیله طلا باعث افزایش زیست‌سازگاری در غلظت‌های مشابه نسبت به CTAB-GNRs می‌شود. آنالیز آماری با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد (*=p<۰/۰۵؛ **=p<۰/۰۱؛ ***p<۰/۰۰۱ و ****=p<۰/۰۰۰۱).

نتایج نشان داد که میزان LC50 به مقدار قابل ملاحظه‌ای به‌وسیله عامل‌دارکردن نانومیله‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین جایگزینی CTAB با قطعه پپتید با ایجاد پیوند کووالانسی بین پپتید و سطح GNRs، سازگاری زیستی نانوساختار را در مقایسه با نانومیله‌هایی که فقط با PSS پوشش‌دهی شده بودند، بهبود بیشتری بخشید، به‌طوری که LC50 نانومیله پوشیده با PSS، ۲۵نانومولار و نانومیله عامل‌دار با پپتید ۵۰نانومولار محاسبه شد[9]. همچنین ۴۰% سلول‌های تیمارشده با نانومیله عامل‌دار با پپتید، در غلظت ۱۰۰نانومولار زنده ماندند، در حالی که به‌ترتیب حدود ۲۰ و ۱۰% سلول‌ها در حضور همین غلظت از PSS-GNRs و CTAB-GNRs زنده بودند. همان‌طور که پیش‌تر گزارش شده بود سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های پایین PSS-GNRs درصد زنده‌مانی بالایی از خود نشان دادند ولی با افزایش غلظت، میزان سمیت افزایش یافت. این سمیت می‌تواند به‌دلیل اختلال در کمپلکس CTAB-PSS در سطح نانومیله‌های طلا و رهاشدن مولکول CTAB از سطح آن باشد[9, 20]. در مطالعه دیگری از پپتید CLPFFD برای اتصال کوالان به سطح نانومیله طلا استفاده شد و نتایج نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های تیمارشده با GNRs-CLPFFD، نسبت به سلول‌هایی که با CTAB-GNRs تیمار شده بودند کمتر تحت تاثیر قرار گرفته است[6].

در ادامه پیشنهاد می‌شود تاثیر نانوسامانه طراحی‌شده به‌عنوان حامل، در انتقال و رهایش هدفمند اسیدنوکلئیک و دارو به درون سلول‌های سرطانی مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ساخت نانومیله طلا به روش رشد روی ذرات دانه صورت گرفت. به‌منظور کاهش سمیت و افزایش زیست‌سازگاری به‌منظور کاربرد زیستی، سطح نانومیله‌های طلا با پلیمر پلی‌استایرن‌سولفونات و پپتید حاوی اسیدهای آمینه بار مثبت، تغییر یافت. نتایج بررسی سمیت سلولی نشان داد نانومیله‌های عامل‌دارشده نسبت به نانومیله‌های عامل‌دارنشده زیست‌سازگاری بیشتری نشان داده و سبب افزایش بقای سلول‌ها شده‌اند. به این ترتیب امکان استفاده از این نانوسامانه در مطالعات بعدی به‌عنوان حامل ژن و دارو به‌صورت هدفمند به درون سلول‌های سرطانی وجود خواهد داشت.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت‌مدرس قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سعیده زاغیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ طاهره توحیدی‌مقدم (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰%)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت‌مدرس انجام شده است.

منابع

1- Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64(2):190-9.
2- Xia Y. Nanomaterials at work in biomedical research. Nat Mater. 2008;7:758-60.
3- Lei Y, Tang L, Xie Y, Xianyu Y, Zhang L, Wang P, et al. Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer. Nat Commun. 2017;8:15130.
4- Gui C, Cui DX. Functionalized gold nanorods for tumor imaging and targeted therapy. Cancer Biol Med. 2012;9(4):221-33.
5- Chen QR, Zhang L, Stass SA, Mixson AJ. Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids. Nucleic Acids Res. 2001;29(6):1334-40.
6- Adura C, Guerrero S, Salas E, Medel L, Riveros A, Mena J, et al. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. ACS Appl Mater Interfaces. 2013;5(10):4076-85.
7- Selvakannan PR, Mandal S, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M. Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. Langmuir. 2003;19(8):3545-9.
8- Hamon C, Bizien T, Artzner F, Even-Hernandez P, Marchi V. Replacement of CTAB with peptidic ligands at the surface of gold nanorods and their self-assembling properties. J Colloid Interface Sci. 2014;424:90-7.
9- Alkilany AM, Nagaria PK, Wyatt MD, Murphy CJ. Cation exchange on the surface of gold nanorods with a polymerizable surfactant: polymerization, stability, and toxicity evaluation. Langmuir. 2010;26(12):9328-33.
10- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. Small. 2005;1(3):325-7.
11- Chen QR, Zhang L, Stass SA, Mixson AJ. Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes. Gene Ther. 2000;7(19):1698-705.
12- Tohidi Moghadam T, Ranjbar B. Heat induced aggregation of gold nanorods for rapid visual detection of lysozyme. Talanta. 2015;144:778-87.
13- Becker R, Liedberg B, Käll PO. CTAB promoted synthesis of Au nanorods – Temperature effects and stability considerations. J Colloid Interface Sci. 2010;343(1):25-30.
14- Kang, SK, Chah S, Yun CY, Yi J. Aspect ratio controlled synthesis of gold nanorods. Korean J Chem Eng. 2003;20(6):1145-8.
15- El-Brolossy TA, Abdallah T, Mohamed MB, Abdallah S, Easawi K, Negm S, Talaat H. Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. Eur Phys J Spec Top. 2008;153(1):361-4.
16- Ni W, Kou X, Yang Z, Wang J. Tailoring longitudinal surface plasmon wavelengths, scattering and absorption

cross sections of gold nanorods. ACS Nano. 2008;2(4):677-86.
17- Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, et al. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. Acc Chem Res. 2008;41(12):1721-30.
18- Boca SC, Astilean S. Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags. Nanotechnology. 2010;21(23):235601.
19- Rayavarapu RG, Petersen W, Hartsuiker L, Chin P, Janssen H, van Leeuwen FW, et al. In vitro toxicity studies of polymer-coated gold nanorods. Nanotechnology. 2010;21(14):145101.
20- Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, Wei A. Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate. ACS Nano. 2008;2(12):2481-8.
21- Wan J, Wang JH, Liu T, Xie Z, Yu XF, Li W. Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. Sci Rep. 2015;5:11398.
22- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119(2):203-10.