

سنتز و مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت اکسید آهن/ساماریم $\text{Sm/Fe}_2\text{O}_3$ و بررسی تشکیل و تاثیر پروتئین کرونا بر جذب و سمیت سلولی نانوکامپوزیت

فاطمه عبدی^۱، امیرضارب کهن^۲، فرهاد بانی^۳، سعید جعفری‌راد^{۴*}

۱- گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- دانشیار گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* صندوق پستی ۵۱۶۶۱۴۷۳۳، تبریز، ایران

bani.farhad56@gmail.com, sjafarirad@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸

چکیده

نانوکامپوزیت‌های اکسید آهن با لانتانیدها به دلیل داشتن خواص مغناطیسی منحصربه‌فرد و زیست سازگاری، به عنوان عواملی جذاب برای تشخیص و درمان تومورهای سرطانی شناخته می‌شوند. از این رو، درک برهم‌کنش این نانوکامپوزیت‌ها با سیستم‌های زیستی برای طراحی کارآمد آنها مهم است. در این مطالعه، نانوکامپوزیت اکسید آهن/ساماریم دوپ شده با ساماریوم به روش شیمیایی بر پایه پلی اتیلن گلیکول و تری اتانول آمین سنتز شد. نانوکامپوزیت با استفاده از تکنیک‌های EDX، SEM، XRD و DLS مشخصه‌یابی شد. اندازه بلور نانوکامپوزیت با استفاده از XRD حدود ۱۲ نانومتر محاسبه شد. تصویر SEM نانوکامپوزیت سنتزی را به شکل توده ای از ذرات ریز با مورفولوژی کروی نشان داد. سپس با انکوباسیون نانوکامپوزیت در پلاسماي خون انسانی، تشکیل کمپلکس پروتئینی بنام پروتئین کرونا بر روی سطح نانوذره در مواجهه با سیستم‌های بیولوژیکی با روش ژل الکتروفورز بررسی و تأیید شد. نتایج جذب سلولی در برهم‌کنش نانوذره با سلول‌ها نشان داد که انکوباسیون نانوکامپوزیت در پلاسماي خون انسانی با کاهش جذب نانوذره در سلول‌های سرطانی MDA-MB231 و با افزایش جذب در ماکروفاژ RAW 264.7 همراه بوده است که نشان دهنده اتصال پروتئین‌های اپسونین خون بر روی سطح نانوذره می‌باشد. همچنین، نتایج نشان داد که تشکیل پروتئین کرونا بر سمیت سلولی نانوذره بر سلول‌های MDA-MB231 در غلظت‌های مختلف نانوذره تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیری نداشته است و سمیت قابل توجهی گزارش نشد.

کلید واژگان: نانوکامپوزیت اکسید آهن/ساماریم، پروتئین کرونا، جذب سلولی، سمیت سلولی

۱-مقدمه

در سال‌های اخیر، علاقه محققان برای استفاده از نانومواد که امکان بهره برداری همزمان در تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف را به‌عنوان عوامل ترانوسستیک فراهم آوردند رشد یافته است [۳-۱]. ازین رو، درک برهم‌کنش این نانوکامپوزیت‌ها با سیستم‌های زیستی برای طراحی کارآمد آنها مهم است. مطالعات نشان داده است که سطح نانومواد هنگامی که وارد مایعات بیولوژیکی می‌شوند با انواع مختلفی از مولکول‌های زیستی به‌طور ویژه با پروتئین‌های مختلف موجود در این مایعات پوشیده می‌شود که به‌عنوان پروتئین کرونا شناخته می‌شود [۵، ۶]. پروتئین‌هایی که بیشترین تحرک را دارند در ابتدا به سطح نانومواد متصل می‌شوند و در ادامه با پروتئین‌های که تمایل بیشتری به سطح نشان می‌دهند اما کم‌تحرک هستند، جایگزین می‌شوند. این فرایند می‌تواند چندین ساعت طول بکشد. کازال و همکاران [۶] تایید کردند که یک تاج نرم که به‌طور سست به سطح ذرات چسبیده است به مرور زمان به یک تاج سخت متصل برگشت ناپذیر تغییر می‌کند. بسته به خواص فیزیکوشیمیایی مختلف نانومواد مانند، اندازه، انحنا، سطح، ترکیب، میزان بارالکتریکی سطحی و نیز نوع مایع بیولوژیکی که با نانومواد در تماس هستند، مجموعه‌ای انتخابی با مقادیر متفاوت از پروتئین‌ها بر سطح نانومواد با میل ترکیبی بالا می‌چسبند که مقالات مروری جامع در این زمینه چاپ شده است [۷-۹]. شواهد نشان می‌دهد که تشکیل تاج پروتئینی می‌تواند تا حد زیادی ویژگی‌های سطح نانومواد را تغییر دهد و بر برهم‌کنش نانومواد با سیستم‌های زیستی و سرنوشت آنها تأثیر بگذارد به‌طوری که کمپلکس نانومواد-تاج پروتئین به‌عنوان مواد جدید در مقایسه با محصولات تولید شده در آزمایشگاه باید در نظر گرفته شوند [۱۰، ۱۱]. به‌عنوان مثال، تاج پروتئینی روی سطح نانومواد می‌تواند بر برهم‌کنش نانومواد-سلول تأثیر بگذارد و شناسایی گیرنده‌های سلولی

و هدف‌گیری آنها را مختل کند [۱۲]. بنابراین، بررسی عمیق تشکیل تاج پروتئینی برای درک بهتر رفتارهای نانومواد در سیستم‌های زیستی از اهمیت بالایی برخوردار است [۱۳].

در میان انواع مختلف نانومواد های مورد استفاده در کاربردهای زیست‌پزشکی، نانومواد مبتنی بر اکسید آهن به دلیل قابلیت‌های زیست‌پزشکی چند منظوره مانند کاربردهای ترانوسستیک تصویربرداری و تحویل هدفمند داروها، هایپرترمی، ترانسفکشن و ردیابی سلولی، به‌عنوان یکی از امیدوارکننده ترین نانومواد در این حوزه شناخته می‌شوند [۱۶-۱۴]. جذب بافتی و سلولی نانومواد مبتنی بر اکسید آهن به شدت تحت تأثیر اندازه ذرات و همچنین شیمی سطح و اصلاح آن با گروه‌های عاملی و دنبالش اتصال با مولکول‌های زیستی است. به دلیل پیچیدگی کنترل فرایندهای هسته‌زایی و رشد در آب، به‌دست آوردن کلونیدهای تک پراکنده این نانومواد در محیط‌های آبی یک کار چالش‌برانگیز است. همچنین به علت تمایل به تجمع که به دلیل خاصیت مغناطیسی این نانوذرات دارند، کارایی آنها به‌طور قابل توجهی می‌تواند کاهش یابد و مهمتر از آن، سطح آنها تمایل به اکسید شدن دارد و خواص آن را تغییر می‌دهد [۱۷]. بنابراین، در بیشتر مواقع نیاز به اصلاح سطحی نانومواد مبتنی بر اکسید آهن وجود دارد. اگرچه گزارش‌های گسترده‌ای در مورد پاسخ‌های زیستی (مانند جذب سلولی، مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی و توزیع زیستی) نانومواد مبتنی بر اکسید آهن با خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف وجود دارد [۱۸]، گزارش‌های کمی در مورد تشکیل تاج پروتئینی در سطوح این نانومواد و تأثیر آن بر سمیت و سرنوشت بیولوژیکی آنها وجود دارد [۱۱]. عناصر گروه لانتانیدها (Ln) به‌عنوان دوپ‌کننده‌های موثر نانومواد مبتنی بر اکسید آهن شناخته شده‌اند که می‌توانند خواص ترانوسستیک آنها را بهبود بخشند [۱۹]. در این میان، ساماریم (Sm) دارای پتانسیل بسیار قوی‌تری در

بهبود این ویژگی است. به‌همین دلیل، جایگزینی Fe^{+3} در مگمیت با یون‌های Sm^{+3} می‌تواند خواص ترانوسستیک Fe_2O_3 را بهبود بخشد. هر دو روش ترسیب همزمان در یک محلول قلیایی و روش میسل معکوس، کنترل مناسبی بر توزیع اندازه نانوذرات $Ln:Fe_2O_3$ نداشتند [۲۰-۲۲]، در حالی که تجزیه حرارتی مخلوط حاوی $Fe(Acac)_3$ و $Ln(Acac)_3 \cdot 2H_2O$ (استیل استونات) در حضور سورفکتانت‌های غیرفعال‌کننده اجازه می‌دهد تا نانوکامپوزیت اکسید آهن: ساماریوم با اندازه ذرات یکنواخت‌تری به‌دست آید [۲۳].

در این مطالعه ابتدا یک روش مرطوب ساده جدید برای سنتز نانوکامپوزیت مگمیت و ساماریم (Sm/Fe_2O_3) توسعه داده شد. سپس، برهم‌کنش این نانوکامپوزیت با سرم خون انسانی برای تشکیل پروتئین کرونا و تاثیر آن بر جذب سلولی و سمیت نانوکامپوزیت بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی در این مطالعه از درجه آنالیزی بودند و از آب دیونیزه در تمام آزمایش‌ها استفاده شد. نیترات ساماریم هگزا هیدرات، هیدروکسید سدیم، پلی اتیلن گلیکول (۶۰۰۰ دالتون) و کلرید آهن از شرکت مرک خریداری شد. ۳- [۴،۵-دی متیل تiazول-۲-یل]-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم برومید (MTT)، ۲- (۴-آمیدینوفنیل)-۶-ایندولکاربامیدین دی هیدروکلراید (DAPI)، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شد. آلبومین سرم انسانی از شرکت بایومدیکامنتس (LFB BIOMEDICAMENT) خریداری و محلول استوک آن تهیه و در محلول PBS با $pH = 7.4$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در این پژوهش برای بررسی صحت سنتز، اندازه، پایداری و مورفولوژی نانوکامپوزیت آهن/ساماریم، از تکنیک‌های $FE-XRD$ (PANalytical X Pert PRO, Germany)، $SEM-EDX$ (Hitachi-Japan) و DLS (Nanotracer)

(Wave, Microtrac Co. USA) استفاده شدند. برای بررسی برهم‌کنش پروتئین-نانوذرات تکنیک‌های DLS، SDS-PAGE و جذب اتمی استفاده شدند. پراش سنج پودری XRD با یک تک رنگساز گرافیت، تابش $CuK\alpha$ در محدوده زاویه ۱۰ تا ۹۰ درجه 2θ ، استفاده شد. میکروسکوپ FE-SEM مجهز به EDX دارای یک آشکارگر ثانویه الکترون با خلاء کم در ولتاژ ۳۰ کیلو ولت بود و نمونه‌ها بر روی یک بستر آلومینیومی پراکنده و سپس روکش طلا بر روی نمونه کشیده شد. برای اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی، توزیع اندازه و پتانسیل زتا نمونه‌ها از دستگاه DLS استفاده شد. بافر PBS به‌عنوان حلال و زاویه پراکندگی ۹۰ درجه برای ارزیابی نتایج در DLS استفاده شد. پیش از اندازه‌گیری، نمونه‌ها در حمام فراصوت (Bandelin Sonorex Digitec، ۴۰ KHz) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه قبل از اندازه‌گیری رها شدند. از نمک KBr برای تهیه قرص‌های از نمونه خشک برای ثبت طیف‌های FTIR در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ استفاده شد.

۲-۱ سنتز نانوکامپوزیت آهن/ساماریم Sm/Fe_2O_3

سنتز نانوکامپوزیت به روش شیمیایی در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول ۰/۹ گرم نمک کلرید آهن (III) و ۰/۱ گرم نمک ساماریم اکسید توزین و به ۷۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه افزوده شدند و ۰/۷ گرم پلی اتیلن گلیکول (PEG) به‌عنوان کاتالیزگر به مخلوط اضافه شد. محلول حاصل به یک بالن دو دهانه منتقل شد و بالن در داخل حمام روغن بر روی هیتز استایرر مغناطیسی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس، محلول از روی هیتز برداشته شده و بعد از سرد شدن تا دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه در اولتراسوند قرار داده شد. در مرحله دوم محلول مورد نظر روی هیتز قرار داده شد و ۳ میلی‌لیتر تری اتانول آمین

سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه گذاشته شد. سپس، محلول رویی بیرون ریخته و ماده مورد نظر در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۴].

۳-۲ بررسی پرو فایل پروتئینی در پروتئین کرونی تشکیل شده با ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

ابتدا ژل پلی‌آکریل آمید لازم طبق روش استاندارد آماده شد [۲۴]. نمونه‌ها بر روی ژل بارگذاری شده و تحت ولتاژ خاص الکتروفورز انجام شد. سپس، ژل داخل ظرف مناسب گذاشته شده و رنگ کوماسی بلو داخل آن ریخته شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت روی شیکر گذاشته شد. ژل با آب مقطر دوبار شسته شد و با کمک دستگاه ژل داک تصویری از ژل انجام شد.

۴-۲ بررسی اثر پروتئین کرونا بر جذب سلولی توسط سلول سرطانی و ماکروفاژ

برای این بررسی، رده سلولی سرطان سینه انسان MDA-MB 231 و نیز ماکروفاژ RAW264.7 با تراکم ۱۰ هزار سلول جداگانه در محیط کشت RPMI با FBS ۱۰ درصد و مقادیر کافی از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با CO₂ ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، زیر میکرو سکوپ از نظر مورفولوژی کنترل شدند و جداگانه به سلول‌های مذکور غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوکامپوزیت قبل و بعد از تشکیل پروتئین کرونا اضافه گردیدند و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، برای آنالیز کمی میزان جذب نانوذره، محیط کشت حذف و سلول‌ها تریپسینه شده و سه بار با PBS (pH=7.4) شسته شدند و با روش جذب اتمی میزان جذب سلولی نانوکامپوزیت براساس غلظت آهن آنالیز شدند.

۵-۲ بررسی اثر پروتئین کرونا در مانایی سلولی (تست (MTT

(TEA) و مقداری محلول هیدروکسید سدیم برای تنظیم pH در ۹/۵ افزوده شد و محلول دوباره به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، به مدت ۳ دقیقه در ماکروبو با توان ۳۶۰ وات قرار داده شد. پس از اتمام واکنش، محلول واکنش درون فالكون‌های مشخص برای سانتی‌فیوژ ریخته شد. پس از سانتی‌فیوژ، برای حذف ناخالصی‌های رسوب، عمل شست‌وشو انجام شد. جهت پراندن حلال، رسوب به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه روی هیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ای به رنگ آجری روشن حاصل شد و این نمونه برای انجام آنالیزهای بعدی در شیشه پنی‌سیلین نگه داری شد.

۲-۲ تشکیل پروتئین کرونا

پس از خونگیری از یک فرد سالم، خون در لوله‌های سیترا ته ریخته شده و یک تا دو دقیقه تکان داده شد تا لخته نشود سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰ دور بر دقیقه سانتی‌فیوژ شد. سپس، ۹۰ درصد از حجم پلاسما برداشته شده و در میکروتیوب‌های دیگری ریخته شده و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتی‌فیوژ یخچال‌دار با سرعت ۲۴۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود. سپس، مجدداً به مدت ۶ دقیقه داخل سانتی‌فیوژ با سرعت ۱۶۲۰۰ دور بر دقیقه گذاشته می‌شود. در این مرحله، به اندازه حجم پلاسما، PBS برای رقیق کردن بر روی آن ریخته می‌شود. ۱ میلی‌گرم نانوذره به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر پلاسما به دست آمده داخل فالكون ریخته شده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گذاشته شد. سپس، به مدت ۳ دقیقه سانتی‌فیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه گذاشته شد تا پروتئین‌های آزاد به طور کامل رسوب کنند و بعد از سانتی‌فیوژ عمل شست‌وشو با PBS سه بار انجام شد که در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه در سانتی‌فیوژ با

مطالعات سمیت نانو کامپوزیت قبل و بعد از انکوباسیون با پلا سما بر روی سلول‌های سرطان MDA-MB231 بر طبق روش استاندارد MTT اجرا شد. به‌طور خلاصه ۱۰ هزار سلول سرطانی به‌ازای هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ تایی طبق روش فوق کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، نانوکامپوزیت خالی و نانوکامپوزیت انکوبه شده با پلاسما در دوزهای مشخص به چاهک‌های جداگانه افزوده شدند. ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نانوذرات، محیط کشت سلولی چاهک‌ها با محیط کشت حاوی MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جایگزین شد و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه، محیط کشت از همه چاهک‌ها خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO برای حل شدن کریستال‌های تشکیل شده فورمازان بنفش اضافه شد. پلیت درون شیکر قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت متوسط تکان داده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده شد. مانایی سلولی نسبی مطابق معادله زیر محاسبه و گزارش شد:

$$\text{Relative Cell Viability (\%)} = ((A_{\text{test}} - A_0) / (A_{\text{control}} - A_0)) \times 100$$

در این رابطه، A_{test} مقدار جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر نمونه سلولی تحت تیمار، A_{control} جذب نمونه سلولی بدون تیمار و A_0 نمونه سلولی بدون افزایش MTT می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت

۳-۱-۱ آنالیز XRD

الگوی XRD نانوکامپوزیت سنتزی (شکل ۱.۱ A) حاکی از آن است که این الگو، بیشترین مطابقت را با کارت (JCPDS no. 080093) مربوط به $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ با ساختار

کریستالی اورتورومبیک دارد. وجود پیک‌های فاز مگمیت ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) در ۲۰، ۱۸، ۲۷، ۲۴، ۱۷، ۳۰، ۰۸، ۳۶، ۰۲، ۴۳، ۱۳، ۴۶، ۵۳، ۴۸، ۸۱، ۶۲، ۷۶ و ۶۷، ۵۲ به ترتیب (۱۱۱)، (۲۱۰)، (۲۲۰)، (۲۱۰)، (۲۲۰)، (۲۱۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱)، (۴۴۰) و (۵۳۳) فاز کریستالی اورتورومبیک Fe_2O_3 را تایید می‌کنند [۲۵]. پیک‌های پراش در ۲۰ مربوط به ۱۹، ۹۶، ۳۱، ۴۸، ۳۴، ۶۵، ۳۸، ۷۳، ۳۹، ۶۵ و ۵۵، ۱۶ درجه به سیستم کریستالی مکعبی با کارت JCPDS card no. (150813) مربوط به فاز Sm_2O_3 مطابقت دارد [۲۶].

محاسبه میانگین اندازه نانوکامپوزیت با استفاده از رابطه شرر انجام شد. رابطه‌ی شرر به‌صورت $D = k\lambda / \beta \cos \theta$ تعریف می‌شود که در آن λ طول موج اشعه X (0.154 nm)، β پهنای پیک (بر حسب رادیان) در نصف ارتفاع پیک، θ زاویه‌ی پراش و k مقدار ثابتی برابر با ۰/۸۹ می‌باشد. با استفاده از این رابطه اندازه‌ی ذرات (D) بر حسب نانومتر به دست می‌آید. محاسبات بر اساس پر شدت‌ترین پیک‌های ظاهر شده انجام می‌گیرد. با توجه به معادله شرر، میانگین اندازه نانوکامپوزیت ۱۲ نانومتر محاسبه شد. لازم به ذکر است که به‌دلیل همپوشانی پیک‌های فازهای مختلف در الگوی XRD نانوکامپوزیت تهیه شده و اثر آن بر پهن‌شدگی پیک‌ها، صحت رابطه شرر می‌تواند دستخوش تغییر شود.

۳-۱-۲ آنالیز SEM-EDX

تصویر SEM نانوکامپوزیت سنتز شده در شکل ۱.۱ B نمایش داده شده است که نشان دهنده مورفولوژی و سایز ذرات می‌باشند. همان‌طور که مشاهده می‌شود ذرات به شکل کروی و میانگین سایز ذرات در حدود ۱۸ نانومتر می‌باشد و ذرات بزرگ، توده‌ای از ذرات کوچک هستند.

در طیف EDX نانوکامپوزیت (شکل ۱.۱ C)، عناصر آهن (سه پیک در ۰/۶، ۴/۶ و ۷/۲) و ساماریم (۱/۱، ۱/۳، ۵/۷ و ۶/۳) به ترتیب با فراوانی ۴۶/۰۱ و ۳۶/۹۰ درصد وزنی دیده می‌شوند. همچنین، طیف EDX سیگنال مربوط به

۲-۳ مشخصه‌یابی پروتئین کرونا

۱-۲-۳ ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

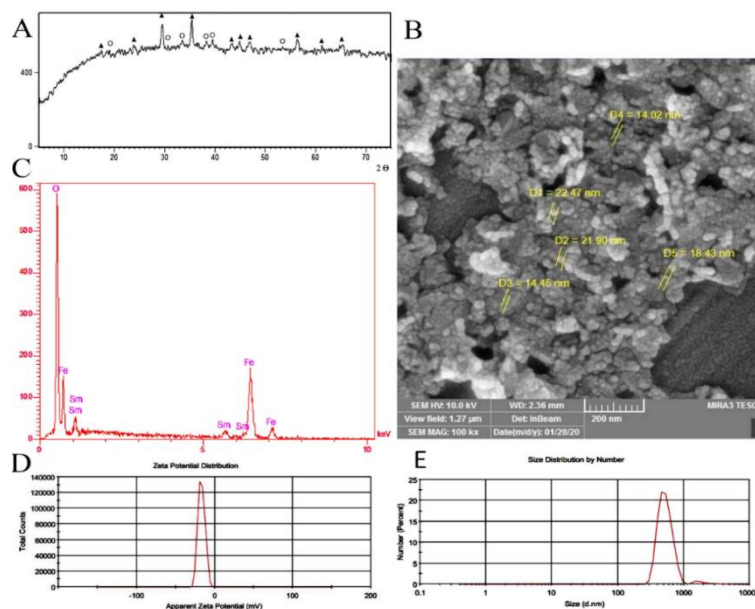
به کمک تکنیک SDS-PAGE تشکیل پروتئین کرونا بر روی سطح نانوکامپوزیت در مواجهه با محیط سرم به‌عنوان محیط بیولوژیکی درون‌تن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج اتصال پروتئین‌های سرمی بر روی سطح نانوذره را به وضوح اثبات می‌کند (شکل ۲). بر اساس این نتایج، طیف وسیعی از پروتئین‌ها با اندازه‌های متنوع بر روی نانوذره سنتز شده به روش شیمیایی می‌تواند جذب شود. این یافته با نتایج بسیاری از مطالعات بررسی تشکیل پروتئین کرونا بر روی نانوذرات مختلف در مواجهه با محیط زیستی تطابق دارد [۲۷-۲۹]. شایان ذکر است یافته‌های SDS-PAGE یافته‌هایی کیفی بوده و برای بررسی دقیق‌تر تنوع پروتئین‌های متصل شده، نیاز به استفاده از تکنیک‌های کمی مانند Mass spectroscopy می‌باشد.

عنصر اکسیژن و کربن را با درصد وزنی به ترتیب ۶/۰۲ و ۱۱/۰۷ نشان می‌دهد که کربن به پلی اتیلن گلیکول (PEG) که در طی سنتز نانوکامپوزیت استفاده شد، نسبت داده می‌شود.

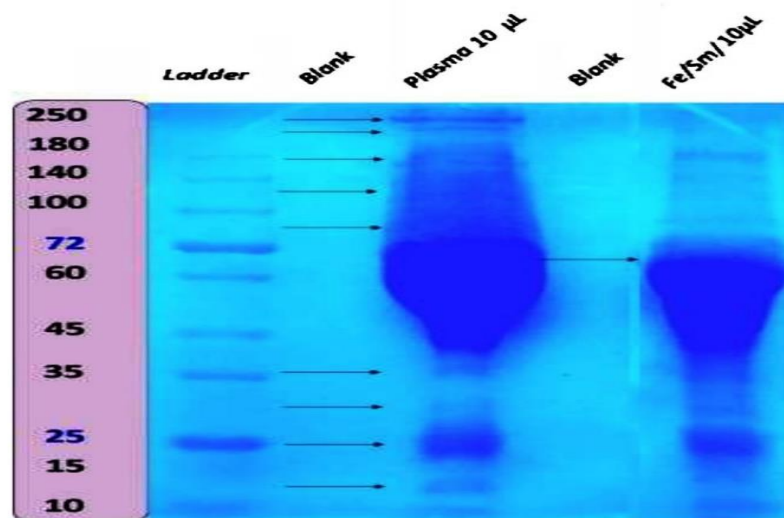
۳-۱-۳ بررسی سایز و پتانسیل زتا نانوکامپوزیت با

DLS

قطر هیدرودینامیک و بار سطحی نانوکامپوزیت پراکنده در آب توسط DLS بررسی شد. بر اساس نتایج شکل ۱ D و E، میزان پتانسیل زتا (ζ) برای سوسپانسیون کلئیدی ۲۰- میلی ولت بود. پتانسیل زتا می‌تواند یک شاخص برای پایداری کلئیدی نانومواد باشد که در مقادیر قدر مطلق بالای ۲۵ پایداری کلئیدی الکترواستاتیکی را سبب می‌شود. همانطور که مشاهده می‌شود، اندازه ذرات اندازه گیری شده در DLS برابر برابر ۴۳۹ نانومتر می‌باشد که نشان می‌دهد نانوذره به شکل توده‌ای و تجمع یافته باهم در محلول کلئیدی حضور داشت.



شکل ۱ (A) طیف XRD، (B) تصویر SEM، (C) آنالیز EDX، (D) توزیع پتانسیل زتا و (E) توزیع سایز هیدرودینامیکی نانوذره اکسید آهن/ساماریم



شکل ۲ نتایج ژل الکتروفورز. ستون‌ها به ترتیب لدر، خالی، پلاسما، خالی و کمپلکس پروتئینی سطح نانوذره می‌باشد.

۳-۲-۲ توزیع اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا

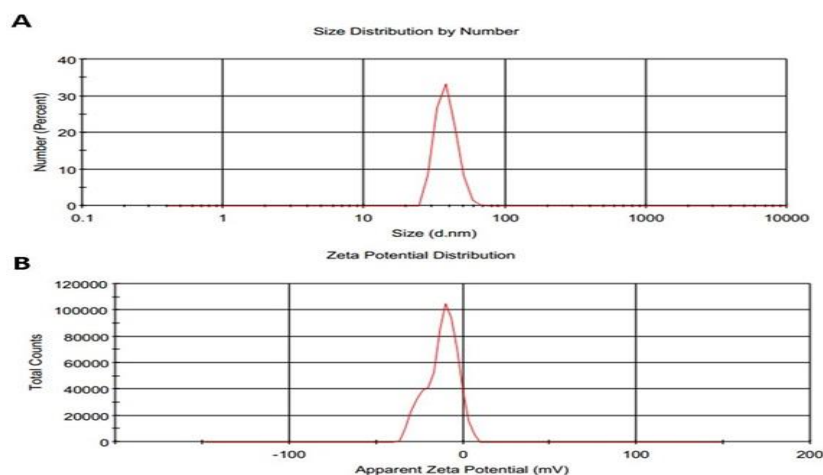
همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، میانگین قطر و پتانسیل زتا نانوکامپوزیت بعد از انکوباسیون با پلاسما تغییر مشخصی می‌یابد. به‌طوری‌که، میانگین قطر هیدرودینامیکی ۳۸ نانومتر و پتانسیل زتا برابر ۱۲- میلی‌ولت بود. این نتیجه جالب است، زیرا نشان می‌دهد که پروتئین‌های سیستم بیولوژیکی می‌توانند به‌طور قابل توجهی بر روی نانوکامپوزیت متصل شوند و این تغییر سطحی سبب پایداری کلئیدی نانوذره با مکانیسم پایداری فضایی (Steric Stabilization) می‌شود. به‌طوری‌که آگلومره تشکیل شده از نانوذرات پس از انکوباسیون با پلاسما از هم گسسته شده و سایز ذرات کاهش می‌یابد. پایداری کلئیدی بهتر نانوذرات پس از تشکیل پروتئین کرونا در مطالعات آقای سئنگوتیان و بوندزیچ نیز گزارش شده است [۲۹، ۲۸]. اندازه به‌دست آمده از تکنیک DLS در مقایسه با اندازه به‌دست آمده از SEM بزرگتر است که به دلیل گزارش قطر هیدرودینامیکی در روش DLS می‌باشد که اندازه نانوذره را همراه با لایه دو گانه الکتریکی سطح روی نانوذره در داخل حلال گزارش می‌کند [۳۱، ۳۰].

۳-۲-۳ بررسی جذب سلولی نانوکامپوزیت توسط

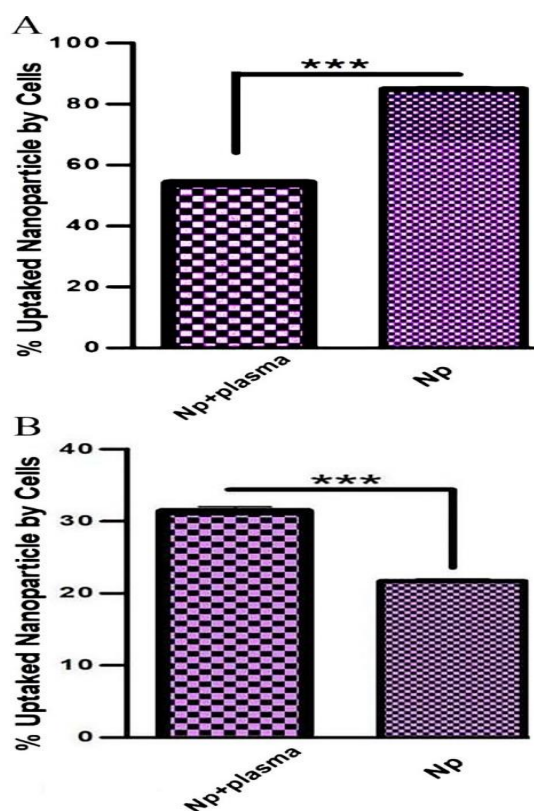
سلول سرطانی و ماکروفاژ

نتایج جذب سلولی نانوذرات با و بدون حضور پروتئین کرونا در شکل ۴ نمایش داده شده است. آنالیز آماری با استفاده از Student's t test انجام شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری تغییر معنی‌دار محسوب شد. نتایج نشان می‌دهد جذب نانوذرات توسط سلول‌های MDA-MB 231 پس از تشکیل پروتئین کرونا بر سطح آن، کاهش چشمگیری از خود نشان می‌دهد که نشان می‌دهد با وجود کاهش بار منفی نانوذره بعد از تشکیل پروتئین کرونا، این کاهش موجب افزایش برهمکنش با غشایی منفی سلول و افزایش در جذب سلولی نشد. به نظر می‌رسد همچنان‌که در مطالعات دیگر گزارش شده است عوامل پروتئین کرونای شکل گرفته بر سطح نانوکامپوزیت تعاملات سلولی آن را با سلول‌های سرطان پستان محدود می‌کند و بر همین اساس کاهش جذب سلولی نانوذرات پس از مواجهه با پلاسما به‌دست آمده است [۳۲، ۳۳]. اما این روند در خصوص جذب سلولی نانوذرات توسط ماکروفاژها برعکس می‌باشد به نحوی که ماکروفاژ RAW264.7 به‌طور موثرتری نانوکامپوزیت با پروتئین کرونا را جذب می‌کند.

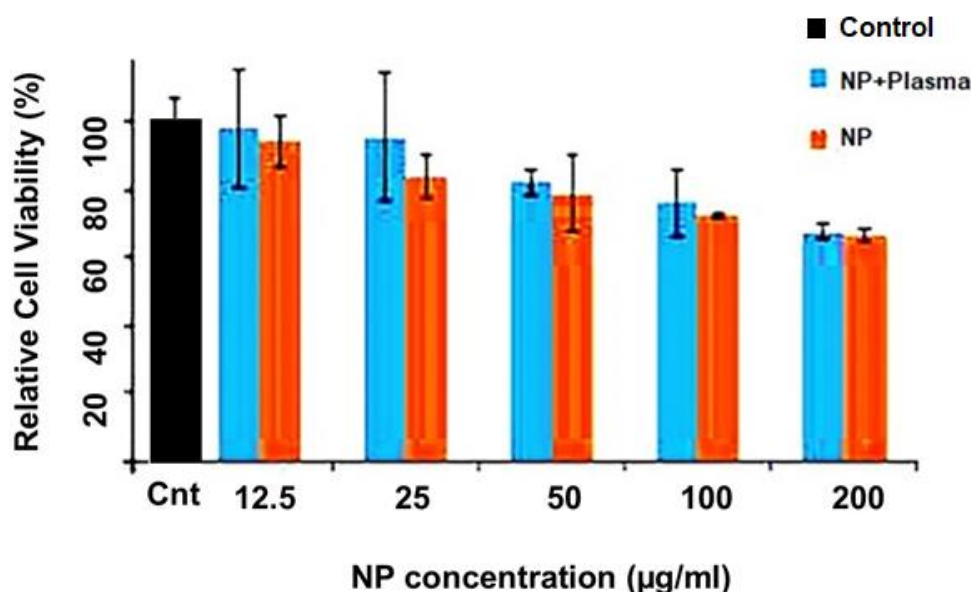
که این امر نشان دهنده این است که به سطح نانوذرات، افزایش جذب نانوذرات به وسیله ماکروفاژها می شود پروتئین های اپسونین خون متصل شده اند که منجر به [۳۴].



شکل ۳ نتایج (A) توزیع سایز هیدرودینامیکی و (B) توزیع پتانسیل زتا نانوذره پس از انکوباسیون با پلاسما که توسط تکنیک DLS به دست آمده است.



شکل ۴ جذب نانوذره قبل و بعد از انکوباسیون با پلاسما توسط (A) سلول های سرطانی MDA-MB 231 و (B) ماکروفاژ RAW264.7. نتایج میانگین سه اندازه گیری $\pm$ انحراف معیار استاندارد و $*** P < 0.001$ را نشان می دهد.



شکل ۵ نتایج مانایی سلول‌های MDA-MB231 پس از تیمار با نانوذره قبل و بعد از انکوباسیون با پلاسما. نتایج میانگین سه اندازه‌گیری $\pm$ انحراف معیار استاندارد را نشان می‌دهد.

زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت شده است. همچنین، تشکیل پروتئین کرونا مانند گزارشات موجود اثر نامطلوبی بر سمیت سلولی نگذاشته است [۳۵،۳۶].

۴-نتیجه‌گیری

هدف ما در این مطالعه سنتز نانوذرات ماگنیت دوپه شده با عناصر خاکی کمیاب مانند ساماریوم و بررسی جذب پروتئین‌های خاص در سیستم‌های بیولوژیکی بر روی سطح نانوکامپوزیت و تاثیر آن بر روی خواص فیزیکوشیمیایی و برهمکنش با سلول‌ها بود. بر این اساس، در ابتدا سنتز نانوکامپوزیت با مورفولوژی کروی با اندازه‌های تقریبی ۱۴ تا ۲۲ نانومتر مورد تأیید قرار گرفت. تشکیل کمپلکس پروتئینی کرونا در مواجهه نانوذره با محیط پلاسمایی با ژل الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت که باعث تغییر خواص فیزیکوشیمیایی سطح از جمله زتا پتانسیل و پایداری کلئیدی ناوذره گردید.

۳-۲-۴ بررسی مانایی سلولی با استفاده از MTT assay

برای ارزیابی پتانسیل نانوکامپوزیت برای کاربردهای زیستی پزشکی مانند تصویربرداری NIR و MIR، سمیت سلولی نانوکامپوزیت قبل و بعد از تشکیل پروتئین کرونا بر روی سلول‌های MDA-MB231 با انجام روش سنجش MTT ارزیابی شد. استفاده از مقدار کم نانوکامپوزیت ($10 \mu\text{g}$ میکروگرم در میلی‌لیتر) در کاربرد های بیولوژیکی مانند درمان سرطان بسیار حیاتی است. مطابق نتایج شکل ۵، افزایش غلظت از ۱۲،۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکامپوزیت در هر دو تیمار با کاهش مانایی سلول‌ها همراه بوده است اما این کاهش اندک بوده به نحوی که حتی در بالاترین غلظت تیمار شده ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانایی سلول‌ها در هر دو تیمار حدود ۸۰ درصد مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد مواد شیمیایی غیر سمی مانند پلی اتیلن گلیکول که در سنتز استفاده شده است به عنوان عوامل پایدارساز بر روی سطح نانوذره، سبب

Protein corona formation around nanoparticles - from the past to the future. *Mat Horizons*. 1(3), 301-13.

[8] Pearson, RM., Juettner, VV., and Hong, S. (2014) Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Front Chem*. 2 (108), 2296-2646.

[9] Winzen, S., Schoettler, S., Baier, G., Rosenauer, C., Mailaender, V., Landfester, K., and et al. (2015) Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. *Nanoscale*. 7(7), 2992-3001.

[10] Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., and Dawson, K. A. (2011) Nanobiotechnology: nanoparticle coronas take shape. *Nat. Nanotechnol*. 6, 11-12.

[11] Sakulkhu, U., Mahmoudi, M., Maurizi, L., Salaklang, J., and Hofmann, H. (2014) Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings. *SCIENTIFIC REPORTS*. 4, 5020-5028.

[12] Ziyao, L., Xiaohui, Z., Minggang, Y., Qi, Y., Xianghui, X., Fang, L., Yao, W., and Zhongwei G. (2016) Magnetic-dependent protein corona of tailor-made superparamagnetic iron oxides alters their biological behaviors. *Nanoscale*. 8, 7544-7555.

[13] Lynch, I., and Dawson, and K. A. (2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*. 3, 40-47.

[14] Sharma, VK., Alipour, A., Soran-Erdem, Z., Aykut, ZG., and Demir, HV. (2015) Highly monodisperse low-magnetization magnetite nanocubes as simultaneous T(1)-T(2) MRI contrast agents. *Nanoscale*. 7(23), 10519-10526.

[15] Kossatz, S., Grandke, J., Couleaud, P., and et al. (2015) Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res*. 17(1), 1-17.

[16] Shi, D., Sadat, ME., Dunn, AW., and Mast, DB. (2015) Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 7(18), 8209-8232.

[17] Martens, U., Böttcher, D., Talbot, D., Bornscheuer, U., Abou-Hassan, A., and Delcea,

علاوه بر این، تاثیر کمپلکس پروتئینی تشکیل شده از نظر جذب توسط سلول‌های RAW 264.7 و MDA-MB 231 مورد ارزیابی قرار گرفت که با کاهش جذب در سلول‌های سرطانی و با افزایش جذب در ماکروفاژ همراه بود. به منظور ارزیابی بیشتر پتانسیل نانوذره برای کاربردهای زیست پزشکی مانند NIR و MIR، سمیت سلولی آن بر سلول‌های MDA-MB231 در غلظت‌های مختلف بررسی شد که سمیت قابل توجهی برای سلول‌ها حتی در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نداشت. در نتیجه، به نظر می‌رسد که دوپینگ موفقیت آمیز عناصر خاکی کمیاب مانند ساماریوم به ماگنیت، علی‌رغم جذب پروتئین‌ها بر روی سطح خود در محیط‌های بیولوژیکی می‌تواند به عنوان یک ابزار پربار و بالقوه برای استفاده در کاربردهای زیست پزشکی در تحقیقات مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

۵- منابع

[1] Jafarirad, S. (2015) Dendritic Architectures: Theranostic Applications, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis. 2391-2399.

[2] Jafarirad, S. (2015) Dendritic architectures: Therapeutics, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis. 2400-2407.

[3] Jafarirad S. (2015) Dendritic Architectures: Delivery Vehicles, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis. 2376-2382.

[4] Mahmoudi, M. et al. (2011) Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem. Rev*. 111, 5610-5637.

[5] Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., and Petri-Fink, A. (2012) Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Rev*. 112, 2323-2338.

[6] Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, GJ., and Punt, V. (2010) Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*. 4(7), 3623-32.

[7] Del Pino, P., Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, GU., and Parak, WJ. (2014)

- [26] Jafarirad, S., Kosari-Nasab, M., Tavana, R., Mahjouri, S., and Ebadollahi, R. (2021) Impacts of manganese bio-based nanocomposites on phytochemical classification, growth and physiological responses of *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 209, 111841.
- [27] Nemati, M., Bani, F., Sepasi, T., Eghdam Zamiri, R., Rasmi, Y., Kahroba, H., Rahbarghazi, R., Sadeghi, M.R., Wang, Y., Zarebkohan, A. and Gao, H. (2021) Unraveling the Effect of Breast Cancer Patients' Plasma on the Targeting Ability of Folic Acid-Modified Chitosan Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*, 18 (12), 4341-4353.
- [28] Sengottayan, S., Mikolajczyk, A., Jagiełło, K., Swirow, M. and Puzyn, M. (2023) Core, Coating, or Corona? The Importance of Considering Protein Coronas in nano-QSPR Modeling of Zeta Potential. *ACS Nano*. 17 (3), 1989-1997.
- [29] Bondžić, AM., Jovanović, D., Arsenijević, N., Laban, B., Lazarević Pašti, T., Klekotka, U., Bondžić, BP. (2022) Soft Protein Corona as the Stabilizer of the Methionine-Coated Silver Nanoparticles in the Physiological Environment: Insights into the Mechanism of the Interaction. *Int J Mol Sci*. 23(16), 8985.
- [30] Jafarirad, S., Kosari-Nasab, M., Tavana, R., Mahjouri, S., and Ebadollahi, R. (2021) Impacts of manganese bio-based nanocomposites on phytochemical classification, growth and physiological responses of *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 209, 111841.
- [31] Jafarirad, S., Kordi, M., and Kosari-Nasab, M. (2018) Investigation on Microstructure, Lattice and Structural Chemistry of Biogenic Silver Nanoparticles. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14 (3), 197-206.
- [32] Mahmoudi, M., Landry, M.P., Moore, A. and et al. (2023) The protein corona from nanomedicine to environmental science. *Nat Rev Mater*. 8, 422-438.
- [33] Farshbaf, M., Valizadeh, H., Panahi, Y., et al. (2022) The impact of protein corona on the biological behavior of targeting nanomedicines. M. (2019) Maghemite nanoparticles stabilize the protein corona formed with transferrin presenting different iron-saturation levels. *Nanoscale*. 11, 16063-16071.
- [18] Vogel, C., Charrier, J, Wu, D., McFall, A., Li, W., Abid, A., Kennedy, I., and Anastasio, C. (2016) Physicochemical properties of iron oxide nanoparticles that contribute to cellular ROS-dependent signaling and acellular production of hydroxyl radical. *Free Radical Research*. 50(11), 1153-1164.
- [19] Zhenfeng, Y., Eich, C., and Cruz, L. (2020) Recent Advances in Rare-Earth-Doped Nanoparticles for NIR-II Imaging and Cancer Theranostics. *Front. Chem*. 8.
- [20] Weiwei, H., Chao, C., Yuxiang, Y., Hongming, Y., and Yongxia, L. (2012) a study on the magnetic and photoluminescence properties of Eu^{n+} and Sm^{3+} doped Fe_3O_4 nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 12, 4621-4634.
- [21] Aghazadeh1, M., and Ganjali, M. (2017) Samarium-doped Fe_3O_4 nanoparticles with improved magnetic and supercapacitive performance: a novel preparation strategy and characterization. *J Mater Sci Ceramics*. 53, 295-308.
- [22] Lastovina, T.A., Budnyk, A.P., Kudryavtsev, E.A., Nikolsky, A.V., Kozakov, A.T., Chumakov, N.K., Emelyanov, A.V., and Soldatov, A.V. (2017) Solvothermal synthesis of Sm^{3+} -doped Fe_3O_4 nanoparticles. *Materials Science and Engineering*. 80, 110-116.
- [23] Silva, C.R., Smith, S., Shim, I., Pyun, J., Gutu, T., Jiao, J., and Zheng, Z. (2009) Lanthanide(III)-doped magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc*. 131, 6336-6337.
- [24] Pourali, P., Neuhöferová, E., Dzmitruk, V., Benson, V. (2022) Investigation of Protein Corona Formed Around Biologically Produced Gold Nanoparticles. *Materials (Basel)*. 15(13), 4615.
- [25] Behzad, F., Jafarirad, S., Samadi, A., and Barzegar, A. (2020) A systematic investigation on spectroscopic, conformational, and interactional properties of polypeptide/nanomaterial complex: effects of bio-based synthesized maghemite nanocomposites on human serum albumin. *Soft Materials*. 18(4), 471-486.

corona complex and cells and its toxic effect on cells. Chemosphere. 245, 125624.

[36] Abraham, A.N., Sharma, T.K., Bansal, V. and Shukla, S. (2018) Phytochemicals as Dynamic Surface Ligands To Control Nanoparticle-Protein Interactions. ACS Omega. 3 (2), 2220–2229.

International Journal of Pharmaceutics. 614, 121458.

[34] Papini, E., and et al. (2020) Opsonins and Dysopsonins of Nanoparticles: Facts, Concepts, and Methodological Guidelines. Frontiers in immunology. 11, 567365.

[35] Liu, N., Tang, M., Ding, J., (2020) The interaction between nanoparticles-protein

Synthesis and Characterization of Sm/Fe₂O₃ Nanocomposite and Investigation of Protein Corona Formation and Its Effects on Uptake and Cytotoxicity of the Nanocomposite

Fatemeh Abdi¹, Amir Zarebkohan², Farhad Bani^{*3}, Saeed Jafarirad^{*4}

1-Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

4- Associate Professor, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

bani.farhad56@gmail.com, sjafarirad@yahoo.com

Receipt: 2024/03/18

Accepted: 2024/07/17

Abstract

Iron oxide nanocomposites with lanthanides, due to their unique magnetic properties and biocompatibility, are recognized as attractive agents for the detection and treatment of cancerous tumors. Therefore, understanding the interaction of these nanocomposites with biological systems is important for their efficient design. In this study, samarium-doped magnetite iron oxide nanocomposite was synthesized chemically based on polyethylene glycol and triethanolamine. The nanocomposite was characterized using XRD, SEM, EDX, and DLS techniques. The crystal size of the nanocomposite was calculated to be approximately 12 nanometers using XRD. SEM image showed the synthetic nanocomposite as an agglomeration of fine particles with a spherical morphology. Subsequently, by incubating the nanocomposite in human blood plasma, the formation of a protein complex called corona protein on the surface of nanoparticles when exposed to biological systems was investigated and confirmed by gel electrophoresis. Cellular uptake results in the interaction of nanoparticles with cells showed that incubating the nanocomposite in human blood plasma led to a decrease in nanoparticle uptake in MDA-MB231 cancer cells and an increase in uptake in RAW 264.7 macrophages, indicating the binding of blood opsonin proteins on the nanoparticle surface. Furthermore, the results indicated that the formation of corona protein had no significant effect on the cellular toxicity of nanoparticles on MDA-MB231 cells at different nanoparticle concentrations up to 200 micrograms per milliliter, and no significant toxicity was reported.

Keywords: Sm/Fe₂O₃ Nanocomposite, Protein Corona, Cell Uptake, Cytotoxicity