



Semnan University



Research Article

Folic Acid and Glucose Functionalized PEG-PEI-Based Multifunctional Nanocapsules for Targeted Gene Delivery to Hs-578T Cancer Cells

Hashem Yaghoubi*^{ORCID}, Afsun Bayrami

Department of Biology, Ard.C., Islamic Azad University, Ardabil, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 04/Oct/2025

Revised: 14/Jun/2026

Accepted: 15/Jun/2026

Keywords:

Cationic Nanoparticles,
Gene Delivery,
Hs-578T,
Nanocapsules,
PEG,
PEI.

ABSTRACT

Introduction: Targeted gene delivery can overcome limitations of conventional chemotherapy. In this study, PEI/PEG-based multifunctional nanocapsules with dual targeting were designed by simultaneous modification with folic acid and glucose to enhance gene transfer efficiency into Hs-578T breast cancer cells.

Materials and Methods: The synthesized nanocapsules were characterized using ¹H-NMR, FTIR, and TGA. Particle size, morphology, and zeta potential were evaluated by DLS and TEM. Cytotoxicity, DNA binding and protection, and transfection efficiency of the target sequence (pEGFP-N1) were assessed using MTT assay, gel electrophoresis, flow cytometry, and fluorescence microscopy.

Results: DLS analysis showed that PPF, PPG, and PPGF nanocapsules had average sizes ranging from 174 to 301 nm, with folic acid-modified nanocapsules exhibiting larger sizes than glucose-modified ones. Increasing the nanoparticle/DNA ratio reduced particle size and shifted the surface charge from -7.4 to +6.2 mV. DNA release studies demonstrated significantly higher release from PPG, PPF, and PPGF nanocapsules at pH=5.5 compared to pH=7.4, reaching 64.96% in the presence of dextran (100 μg.mL⁻¹). Moreover, folic acid modification enhanced DNA release compared to glucose. MTT results indicated that PEI/DNA complexes induced over 50% cytotoxicity at concentrations above 30 μg/mL, whereas modified nanocapsules showed improved biocompatibility. Gel electrophoresis, flow cytometry, and fluorescence microscopy confirmed effective DNA binding, enzymatic protection, and efficient gene delivery, with dual-ligand modification achieving the highest transfection efficiency.

Conclusion: Dual targeting with folic acid and glucose significantly enhances targeted gene delivery efficiency.

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2026.39270.2398>

© 2026 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Associate Professor of Biochemistry. E-mail address: yaghoubi_h@iau.ac.ir

How to cite this article: Yaghoubi, H. & Bayrami, A. (2026). Folic Acid and Glucose Functionalized PEG-PEI-Based Multifunctional Nanocapsules for Targeted Gene Delivery to Hs-578T Cancer Cells. *Applied Chemistry Today*, 21(78), 155-178. (in Persian)

نانوکپسول‌های چندمنظوره مبتنی بر PEI-PEG و عامل‌دار شده با فولیک‌اسید و

گلوکز جهت انتقال هدفمند قطعات ژنی به سلول‌های سرطانی Hs-578T

هاشم یعقوبی* و افسون بایرامی

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲	مقدمه: ژن‌رسانی هدفمند می‌تواند محدودیت‌های شیمی‌درمانی را کاهش دهد. در این مطالعه، نانوکپسول‌های مبتنی بر PEI/PEG با هدف‌گیری دوگانه فولیک‌اسید و گلوکز طراحی شدند تا کارایی انتقال ژن به سلول‌های سرطان سینه Hs-578T افزایش یابد.
بازنگری مقاله: ۱۴۰۵/۰۳/۲۴	مواد و روش‌ها: نانوکپسول‌ها با استفاده از $^1\text{H-NMR}$ ، FTIR و TGA شناسایی شدند. اندازه، مورفولوژی و پتانسیل زتا به ترتیب با TEM و DLS بررسی شد. آزمون‌های MTT، الکتروفورز ژل، فلوسیتومتری و میکروسکوپ فلورسانسی برای ارزیابی سمیت، اتصال و حفاظت DNA و کارایی انتقال توالی هدف (pEGFP-N1) انجام گرفت.
پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵	نتایج: نتایج DLS نشان داد نانوکپسول‌های PPF، PPG و PPGF دارای اندازه متوسط ۱۷۴ تا ۳۰۱ nm بودند و نانوکپسول‌های حاوی فولیک‌اسید اندازه بزرگ‌تری نسبت به نمونه‌های اصلاح‌شده با گلوکز داشتند. با افزایش نسبت نانوذره به DNA، اندازه کاهش یافته و بار سطحی از -۴/۷ به +۲/۶ mV تغییر کرد. بررسی رهایش DNA نشان داد در pH=۵/۵ رهایش از نانوکپسول‌های PPG، PPF و PPGF به‌طور معنی‌داری بیشتر از ۷/۴ pH= بود و در حضور دکستران ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) به ۶۴/۹۶ درصد رسید. هم‌چنین مشخص شد که رهایش DNA از نانوکپسول‌های پوشش داده شده توسط فولیک‌اسید نسبت به گلوکز افزایشی بود. از سویی آزمون MTT نشان داد که نانوکپسول‌های PEI/DNA در غلظت‌های بالاتر از $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ بیش از ۵۰ درصد سمیت ایجاد می‌کند، در حالی که نانوکپسول‌های اصلاح‌شده زیست‌سازگاری بالاتری داشتند. نتایج ژل الکتروفورز، فلوسیتومتری و میکروسکوپ فلورسانس بیانگر اتصال مؤثر، محافظت آنزیمی مناسب و انتقال کارآمد DNA بودند و استفاده هم‌زمان از فولیک‌اسید و گلوکز بیشترین بازدهی انتقال را نشان داد.
کلمات کلیدی:	نتیجه‌گیری: هدف‌گیری دوگانه فولیک‌اسید و گلوکز بازدهی ژن‌رسانی را افزایش می‌دهد.
انتقال ژن، نانوکپسول، نانوذرات پلی‌کاتیونی، ترانسفکشن، PEI، PEG، Hs-578T	

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2026.39270.2398>This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

۱- مقدمه

سرطان سینه یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان به خصوص در بین زنان، به شمار می‌رود [۱]. این بیماری معمولاً به دلیل ماهیت بدون علامت خود در مراحل اولیه، در مراحل پیشرفته بروز پیدا می‌کند که همین امر، تشخیص به‌موقع را دشوار می‌سازد [۲]. روش‌های متداول درمان سرطان شامل پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و جراحی است [۳]. با این حال، این روش‌ها اغلب به دلیل سمیت سیستمیک، مقاومت دارویی و عوارض جانبی نامطلوب با محدودیت‌هایی همراه هستند و همین امر، نیاز به بررسی رویکردهای خلاقانه‌تر درمانی را نشان می‌دهد [۴]. در سال‌های اخیر، فناوری نانو به‌عنوان ابزاری تحول‌آفرین در سرطان‌شناسی مطرح شده است، به‌ویژه برای بهبود هدف‌گیری و انتقال عوامل درمانی [۵]. نانوذرات

مهندسی‌شده برای انتقال دارو و ژن، حلالیت و فراهمی زیستی ترکیبات درمانی را افزایش داده و امکان رهایش کنترل‌شده و اختصاصی در محل هدف را فراهم می‌کنند، که این امر عوارض جانبی سیستمیک را کاهش داده و کارایی درمان را بهبود می‌بخشد [۶]. پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) یک پلیمر کاتیونی با بار مثبت سطحی است که توانایی بالایی در فشردن‌سازی و حمل اسیدهای نوکلئیک مانند DNA و RNA دارد و به همین دلیل به عنوان یکی از ناقل‌های غیروپروسی پرکاربرد در ژن‌درمانی شناخته می‌شود [۷]. با وجود این، سمیت سلولی بالای آن یک چالش جدی محسوب می‌شود و برای رفع این مشکل معمولاً با پلیمرهای زیست‌سازگار مانند پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) ترکیب می‌شود [۸]. در زمینه سرطان و درمان آن، نانوذرات و نانوکپسول‌های مبتنی بر PEI به عنوان حاملین داروها یا ژن‌های درمانی به کار رفته‌اند و توانسته‌اند در هدف‌گیری و انتقال مؤثر مواد درمانی به سلول‌های توموری عملکرد مطلوبی نشان دهند [۹]. کوپلیمر دیگری که در انتقال هدفمند قطعات ژنی از اهمیت بالایی برخوردار است، پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) می‌باشد [۱۰]. به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد PEG، از جمله سازگاری زیستی بالا، ایمنی‌زایی پایین و توانایی افزایش حلالیت عوامل درمانی مختلف، این پلیمر گزینه‌ای ایده‌آل برای توسعه سامانه‌های انتقال دارو یا ژن به شمار می‌رود [۸]. یکی از مزایای مهم PEG خاصیت استتاری آن است که با کاهش شناسایی توسط سیستم ایمنی، موجب افزایش زمان گردش دارو در خون و در نتیجه بهبود فراهمی زیستی می‌شود [۱۱]. در زمینه انتقال هدفمند قطعات ژنی، PEG اغلب برای اصلاح سطح نانوذرات، لیپوزوم‌ها یا سایر حامل‌ها استفاده می‌شود [۱۲]. از سویی دیگر، به‌کارگیری لیگاندهای اختصاصی سطح سلول‌های سرطانی در طراحی نانوذرات هدفمند، به‌عنوان یکی از رویکردهای نوین و کارآمد در حوزه نانودارورسانی و ژن‌درمانی شناخته می‌شود [۱۳]. بسیاری از سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم، بیان بیش‌ازحد گیرنده‌های خاصی را در سطح خود نشان می‌دهند. الحاق لیگاندهای مکمل این گیرنده‌ها به سطح نانوذرات، امکان شناسایی انتخابی و اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی را فراهم می‌سازد [۱۴]. این ویژگی منجر به افزایش جذب سلولی از طریق مکانیسم‌هایی نظیر اندوسیتوز وابسته به گیرنده شده و در نتیجه، کارایی انتقال ترکیبات درمانی به‌طور چشم‌گیری بهبود می‌یابد [۱۵]. در این میان، فولیک‌اسید (FA) به‌عنوان یکی از پرکاربردترین لیگاندها در سامانه‌های هدفمندسازی نانوذرات مطرح است. دلیل اصلی این امر، بیان بیش‌ازحد گیرنده فولیک‌اسید در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، تخمدان و ریه می‌باشد [۱۶]. بارگذاری فولیک‌اسید در سطح نانوذرات نه تنها موجب افزایش تمایل و اختصاصیت اتصال به سلول‌های سرطانی می‌شود، بلکه فرآیند ورود درون‌سلولی ترکیبات درمانی را نیز تسهیل می‌کند [۱۷]. هم‌چنین، فولیک‌اسید به دلیل اندازه کوچک، پایداری بالا، زیست‌سازگاری مطلوب و ایمنی‌زایی پایین، گزینه‌ای ایده‌آل برای استفاده در طراحی سامانه‌های نوین دارورسانی و ژن‌درمانی به شمار می‌رود [۱۸]. هم‌چنین، گلوکز به‌عنوان جزء نویدبخشی در سامانه‌های انتقال ژن مطرح شده است، به‌ویژه برای بهبود هدف‌گیری و جذب ژن‌های درمانی توسط سلول‌های سرطانی [۱۹]. به دلیل نیاز متابولیکی بالای بسیاری از سلول‌های سرطانی که اغلب مصرف گلوکز افزایش‌یافته‌ای نشان می‌دهند

(پدیده‌ای که به اثر واربرگ معروف است)، الحاق گلوکز به حامل‌های انتقال ژن می‌تواند از این ترجیح متابولیکی بهره‌برداري کند [۴]. با عاملی‌سازی نانوذرات یا لیپوزوم‌ها با گروه‌های گلوکز، پژوهشگران می‌توانند سامانه‌های انتقال هدفمندی ایجاد کنند که به طور اختصاصی به ناقلین گلوکز که در سطح سلول‌های سرطانی بیش‌بیان می‌شوند متصل گردند. این راهبرد نه تنها کارایی جذب ژن را افزایش می‌دهد بلکه اثرات ناخواسته بر بافت‌های سالم را نیز به حداقل می‌رساند [۱۳]. از سویی دیگر ژن‌درمانی فرصت‌های جدیدی برای درمان بیماری‌های ژنتیکی و سرطان‌هایی که پیش‌تر غیرقابل‌درمان تلقی می‌شدند فراهم کرده است [۲۰]. این اسیدهای نوکلئیک با بار منفی می‌توانند با پلیمرهای کاتیونی کمپلکس شوند و نانوکامپوزیت‌هایی با کارایی بالاتر در انتقال تشکیل دهند [۲۱]. با توجه به اهمیت انتقال هدفمند قطعات ژنی، این پژوهش با هدف طراحی نانوذرات چندمنظوره‌ای انجام شد که کارایی انتقال ژن به بافت‌های سرطانی را افزایش داده و اثرات ناخواسته بر سلول‌های طبیعی را کاهش دهد. بدین منظور، از PEI برای متراکم نمودن DNA استفاده شد. به‌منظور افزایش زمان گردش سیستمیک و انتقال هدفمند به سلول‌های سرطان سینه، پلیمر انشعابی با PEG، اسید فولیک و گلوکز اصلاح گردید.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد مورد استفاده

کلریدپتاسیم (KCl)، متیل‌سولفوکسید (DMSO)، نمک MTT، اتانول، اسیدکلریدریک (HCl)، کلریدسدیم (NaCl)، دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH₂PO₄)، N-hydroxysuccinimide (NHS)، EDC، 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride، هیدروکسیدسدیم (NaOH) کلروفرم و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. محلول پارافرمالدهید از آزمایشگاه شیمی دکتر موجال-ایران تهیه گردید. هم‌چنین سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت RPMI 1640 و تریپسین-EDTA از شرکت بایووایست-ایالات متحده آمریکا تأمین شدند.

۲-۲- ترانسفورماسیون پلاسمید pEGFP-N1

پلاسمید pEGFP-N1 از انستیتوپاستور ایران تهیه گردید. سپس به منظور تکثیر و استفاده طی مراحل آزمایش، به کمک روش کلریدکلسیم (CaCl₂) تهیه و طبق پروتوکل زیر به باکتری *E. coli* منتقل گردید [۲۲].

۲-۳- تایید ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* توسط پلاسمید pEGFP-N1

پس از رشد کلونی‌های باکتری روی محیط LB حاوی کانامایسین، تک‌کلونی‌ها در محیط کشت مایع و به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور بر دقیقه و ۵ دقیقه) و پلاسمید با روش لیز قلیایی شامل Tris-HCl/EDTA، NaOH/SDS و استات پتاسیم استخراج شد. پس از سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور بر دقیقه و ۵ دقیقه)، DNA با اتانول رسوب داده

شد و در بافر TE حل گردید. برای حذف RNA، از RNase A استفاده شد. پلاسمید استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز (۱ درصد) تأیید شد.

۴-۲- سنتز نانوذرات

۴-۲-۱- سنتز پلیمرهای (PPG) PEI-PEG-Glu

بدین منظور، ابتدا ۱۰ mg NHS با جرم‌مولی ۱۱۵/۰۹ g/mol و ۲۰ mg EDC با جرم مولی ۱۱۹/۷۰ g/mol، در دمای اتاق و pH=۵/۵ به ۳۰ mg COOH-PEG(MW≈5 kDa)-Glu (MW≈۵/۱۶ kDa) اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق تحت همزن مغناطیسی (۵۰ دور در دقیقه) قرار گرفت تا گروه‌های کربوکسیلی فعال شوند. در مرحله بعد، ۱۰ μmol PEI شاخه‌ای (جرم مولی اسمی ۲۵ kDa) به ۳۰ μmol COOH-PEG-Glu فعال، اضافه گردید و واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ °C تحت هم‌زدن مداوم ادامه یافت. پس از اتمام واکنش، به‌منظور خالص‌سازی پلیمر سنتز شده (PEG-) PEI-Glu، محلول واکنش در کیسه دیالیز (MWCO=۳/۵ kDa) منتقل گردید و پس از ۴۸ ساعت در برابر آب دیونیزه دیالیز گردید، به‌طوری که آب دیالیز در فواصل زمانی منظم (هر ۶ ساعت) در مجموع ۸ مرتبه تعویض گردید تا ترکیبات غیرواکنشی و ترکیبات با وزن مولکولی پایین به‌طور کامل حذف گردند. در نهایت، پلیمر خالص به وسیله دستگاه خشک کن انجمادی، خشک گردید و جهت استفاده در آزمایشات بعدی در دمای ۴ °C نگهداری شدند [۸].

۴-۲-۲- سنتز پلیمرهای (PPF) PEI-PEG-FA

از روش فوق‌الذکر جهت سنتز (PPF) PEI-PEG-FA استفاده گردید، با این تفاوت که از پلیمر COOH-PEG(MW≈5 kDa)-FA (MW≈۵/۴۳ kDa) به جای COOH-PEG-Glu استفاده گردید.

۴-۲-۳- سنتز پلیمرهای (PPGF) PEI-PEG-Gly-FA

هم‌چنین جهت سنتز پلیمر (PPGF) PEI-PEG-Gly-FA نیز از هر دو پلیمر COOH-PEG-Glu و COOH-PEG-FA غلظت برابر استفاده گردید.

۵-۲- ارزیابی خصوصیات پلیمرهای سنتز شده

برای بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلیمرهای سنتز شده از طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR-ABB Bomem-MB) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای هیدروژن (¹H-NMR-Bruker 400 MHz) استفاده گردید. آنالیز وزن‌سنجی حرارتی (TG-DTA-32، ژاپن) برای بررسی ویژگی‌های حرارتی نانوذرات در دماهای ۲۵ تا ۶۰۰ °C با نرخ گرمایش ۲۰ °C در دقیقه تحت فشار هوا استفاده گردید [۲۳]. PDI معیاری برای توزیع جرم مولکولی در یک نمونه معین است. در زمینه نانوذرات، PDI بیش‌تر در مورد یکنواختی اندازه ذرات ارائه می‌دهد. PDI پایین‌تر نشان‌دهنده نمونه یکنواخت‌تر است، در حالی که PDI بالاتر نشان‌دهنده توزیع اندازه وسیع‌تر است. مقادیر PDI نانوذرات به شرح زیر تعیین شد:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

(Mn= میانگین وزن مولکولی، متوسط وزن مولکولی Mw=)

مقادیر Mn و Mw به کمک معادلات زیر تعیین می شود

$$M_w = \frac{\sum(N_i \cdot M_i^2)}{\sum(N_i \cdot M_i)} \quad M_n = \frac{\sum(N_i \cdot M_i)}{\sum N_i}$$

که در این فرمول Ni: تعداد نانوذرات و Mi: جرم نانوذرات است

۶-۲- تهیه نانوکپسول‌های PEI-PEG-Glu/DNA (PPG/DNA)، PEI-PEG-FA/DNA (PPF/DNA) و

PEI-PEG-Glu-FA/DNA (PPGF/DNA)

ابتدا محلول استوک DNA با غلظت $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ در بافر PBS تهیه و غلظت آن در توسط دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ۲۶۰ nm تأیید گردید. سپس محلول‌های استوک کوپلیمرهای PPG، PPF یا PPGF با غلظت‌های مختلف آماده گردید (بر اساس جدول ۱). برای تشکیل نانوکپسول‌ها، محلول پلیمر به صورت قطره‌ای به محلول DNA تحت همزن ملایم افزوده شد تا نسبت N/P مطلوب حاصل گردد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه و سپس در 20°C - نگهداری شد [۲۴].

جدول ۱- نسبت‌های پلیمری و DNA مورد استفاده جهت تولید نانوکپسول‌ها

DNA (میلی گرم)	PPF (میلی گرم)	PPG (میلی گرم)	نوع نانوکپسول
۰/۱	-	۰/۰۱	NP _A /DNA
۰/۱	-	۰/۰۵	NP _A /DNA
۰/۱	-	۰/۱	NP _A /DNA
۰/۱	-	۰/۲	NP _A /DNA
۰/۱	۰/۰۱	-	NP _B /DNA
۰/۱	۰/۰۵	-	NP _B /DNA
۰/۱	۰/۱	-	NP _B /DNA
۰/۱	۰/۲	-	NP _B /DNA
۰/۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	NP _{AB} /DNA
۰/۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	NP _{AB} /DNA
۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۵	NP _{AB} /DNA
۰/۱	۰/۱	۰/۱	NP _{AB} /DNA
۰/۱	-	-	PEI _(N/P=5) /DNA

۷-۲- ارزیابی خصوصیات نانوکپسول‌ها

برای بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، اندازه و پتانسیل زتای سطحی نانوکپسول‌های سنتز شده به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM، JEOL، JEM-2100، Japan) و پراکندگی نور دینامیکی (DLS، Malvern Instruments، Westborough، USA) استفاده گردید.

۸-۲- تعیین راندمان کپسوله کردن DNA در نانوکپسول‌های سنتز شده

قابلیت کپسوله نمودن DNA در نانوکپسول‌های PPG/DNA، PPF/DNA، PPGF/DNA و PEI/DNA (غلظت‌های هر نمونه بر اساس جدول ۱)، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SmartSpec Plus، Bio-Rad Laboratories، USA) و با اندازه‌گیری جذب

محلول رویی سوسپانسیون آنها در طول موج ۲۶۰ nm ارزیابی شد. راندمان کپسوله‌سازی با مقایسه جذب اندازه‌گیری شده با مقدار اولیه DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۱].

$$\text{(درصد بازدهی بارگذاری)} = \frac{\text{مقدار DNA فاقد پوشش} - \text{مقدار DNA کپسوله شده}}{\text{مقدار DNA فاقد پوشش}} \times 100$$

۹-۲- سینتیک رهایش DNA از نانوکپسول‌ها

پروفایل‌های رهایش DNA از نانوکپسول‌های PPG/DNA، PPF/DNA، PPGF/DNA و PEI/DNA تحت دو شرایط pH متمایز ارزیابی شدند (شرایط اطراف سلول‌های سرطانی pH=۵/۵ و شرایط اطراف سلول‌های سالم pH=۷/۴). علاوه‌براین، مطالعات رهایش DNA در حضور سولفات‌دکستران در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ انجام گردید. برای نمونه، نانوکپسول PPG/DNA ابتدا در ۲۰ mL محلول نمکی بافر فسفات (PBS) و در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ (۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه)، مایع رویی برای تجزیه و تحلیل برداشت شد و نانوکپسول‌ها جهت بررسی در زمان‌های دیگر در بافر تازه دوباره به حالت تعلیق درآمدند [۱۳]. میزان غلظت DNA در هر نمونه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. درصد تجمعی DNA آزاد از نانوکپسول‌ها به شرح زیر محاسبه گردید:

$$\text{(درصد تجمع)} = \frac{\text{محتوای کل DNA در مایع رویی PBS}}{\text{مقدار DNA محصور شده در نانوکپسول‌ها}} \times 100$$

۱۰-۲- کشت سلولی

رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی Hs-578T (CVCL-5423) از بانک سلولی ملی ایران، انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و پنی‌سیلین/استرومایسین (۱ درصد) کشت و در انکوباتور (دمای ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) نگهداری شدند [۱۴].

۱۱-۲- مطالعات سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی

۱۱-۲-۱- تست MTT

در این مطالعه، اثرات سمیت سلولی نانوکپسول‌ها از طریق روش MTT ارزیابی شد. برای این منظور ابتدا سلول‌های Hs-578T در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با تراکم 7×10^3 سلول در هر خانه، با استفاده از ۲۰۰ μL محیط کشت کامل RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک ۱ درصد کشت داده شده و نگهداری شدند (۲۴ ساعت، دما ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ درصد و رطوبت ۹۶ درصد). سپس غلظت‌های مختلفی از نانوکپسول‌ها (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ $\mu\text{g.mL}^{-1}$) به طور مجزا در هر کدام از چاهک‌ها اعمال گردید و پس از ۲۴ ساعت، محلول MTT با غلظت (۰/۵ mg/mL) به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور (دما ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ درصد و رطوبت ۹۶ درصد) نگهداری شدند. سپس، کریستال‌های فورمازان تولیدشده با

افزودن $100 \mu\text{L}$ DMSO خالص به حالت محلول درآمده و جذب نوری در طول موج 570 nm با استفاده از دستگاه الیزاریدر (BioTek Synergy HTX, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد تا درصد زیست‌پذیری سلول‌ها تعیین گردد [۲۵].

۲-۱۲- الکتروفورز نانوکپسول‌ها بر روی ژل آگارز

برای تعیین راندمان پوشش DNA توسط نانوکپسول‌های PPGF₁₀₀/DNA، PPF₁₀₀/DNA، PPG₁₀₀/DNA و PEI₁₀₀/DNA از الکتروفورز ژل آگارز در غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μg) انجام شد. برای این منظور ابتدا یک ژل آگارز یک درصد (وزنی/حجمی) تهیه شد و $2 \mu\text{g}$ DNA، چه کپسوله شده و چه آزاد، در هر چاهک بارگذاری شد. الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ 100 V در بافر TBE انجام شد. جهت تعیین اثر بخش نانوکپسول‌ها و اندازه DNA حرکت کرده از DNA ladder به‌عنوان استاندارد استفاده شد [۲۶].

۲-۱۳- سنجش بازدهی انتقال محموله DNA توسط نانوذرات

در این مطالعه، راندمان انتقال DNA توسط نانوکپسول‌های PPGF₁₀₀/DNA، PPF₁₀₀/DNA، PPG₁₀₀/DNA و PEI₁₀₀/DNA به سلول‌های سرطان سینه رده Hs-578T مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها در حجم 3×10^5 و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای حاوی 1 mL محیط کشت RPMI 1640 (۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک) مورد کشت قرار گرفته و ۲۴ ساعت در انکوباتور (دما 37°C ، 5 CO_2 درصد و رطوبت ۹۶ درصد) نگهداری شدند. سپس محیط کشت رویی برداشته شده و سپس 1 mL محیط کشت جدید (حاوی FBS ۱۰ درصد) و یا بدون آن) به سلول‌ها اضافه گردید، در ادامه $2 \mu\text{g}$ DNA (چه به صورت کپسوله شده با نانوذرات و چه به صورت آزاد)، در اختیار سلول‌ها قرار گرفتند. گروه‌های کنترل شامل DNA بدون پوشش و کمپلکس‌های PEI/DNA بودند. پس از انکوباسیون از فلوسایتومتری (CyFlow Space، آلمان) و میکروسکوپ فلورسانس معکوس (Nikon TE200) برای ارزیابی بیان pEGFP-N1 و بازدهی انتقال محموله ژنی استفاده شد.

۲-۱۴- تحلیل آماری

تمامی فاکتورهای کمی مورد بررسی در این تحقیق با حداقل ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS22 و از طریق تجزیه واریانس یک طرفه انجام گرفت. از آزمون چندمرحله‌ای دانکن در سطح ۵ درصد به منظور بررسی مقایسه میانگین استفاده گردید و سپس میانگین هر یک از تیمارها به همراه استاندارد دیویشن ($\text{Mean} \pm \text{SE}$) بیان شد.

۳-نتایج

استخراج و تأیید پلاسمید pEGFP-N1

به منظور تأیید نهایی انتقال پلاسمید، از باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط گزینشگر، پلاسمیدها به کمک روش لیز قلیایی استخراج گردید. پس از تأیید نهایی باکتری هدف (باکتری حاوی پلاسمید)، وجود پلاسمید مورد نظر نیز توسط برش با آنزیم

EcoRI تایید گردید. نتایج ژل آگارز حاصل از استخراج پلاسمید بیانگر وجود الگوی پلاسمیدی بود (شکل ۱). هم‌چنین نتایج برش پلاسمید توسط آنزیم EcoRI و مقایسه باند حاصل با باند نمونه لدر (۲۵ Kbp)، بیانگر تطابق اندازه باند حاصل با اندازه پلاسمید pEGFP-N1 بود (شکل ۱-A). هم‌چنین با بررسی منابع مختلف، انتظار می‌رفت پس از برش آنزیمی، پلاسمید pEGFP-N1 باندی به اندازه ۵/۶ Kbp را نشان دهد، که نتایج حاصل با نتیجه مورد انتظار مطابقت داشت (شکل ۱-B).

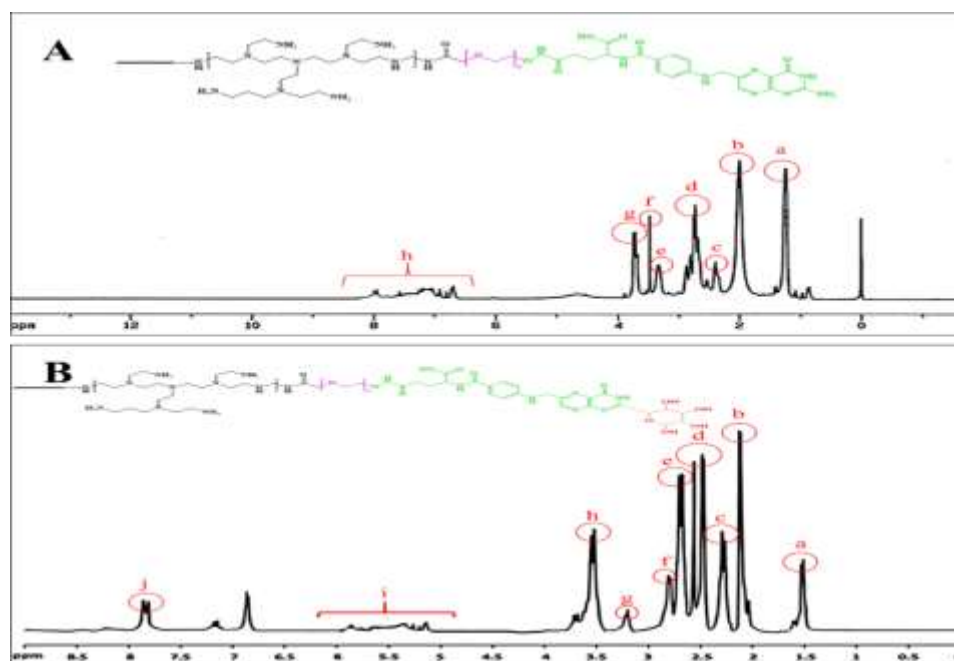


شکل ۱- استخراج و تأیید پلاسمید pEGFP-N1؛ (A) نقشه باند لدر، (B) ژل آگارز مربوط به فرایند انتقال پلاسمید pEGFP-N1، چاهک شماره ۱ لدر ۲۵ Kbp، چاهک دوم پلاسمید pEGFP-N1 استخراج شده از باکتری *E. coli*، چاهک شماره ۳، پلاسمید pEGFP-N1 برش یافته توسط آنزیم EcoRI. (C) تصویر پتری دیش حاوی کلونی باکتری بر روی محیط گزینشگر پس از انتقال پلاسمید pEGFP-N1

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و تأیید گروه‌های عاملی

¹H-NMR

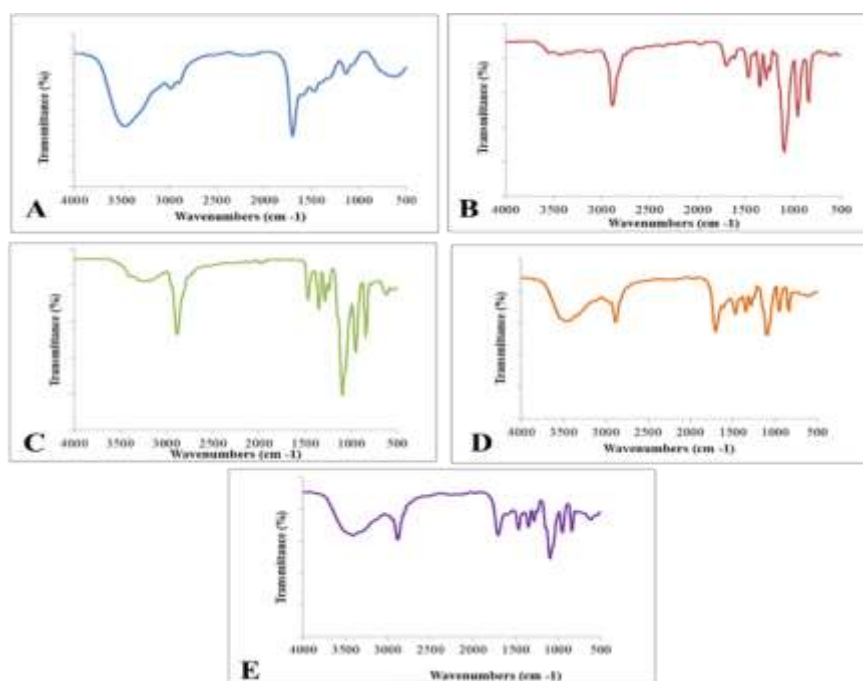
نتایج طیف سنجی ¹H-NMR کوپلیمر PPF نشان داد که پیک‌های به‌دست‌آمده در ۱/۷ و ۲/۱ ppm به ترتیب مربوط به هیدروژن‌های زنجیره کربنی و N-H موجود در PEI هستند (شکل ۲-اندیس‌های a و b). علاوه‌براین، پیک‌های مربوط به اتم هیدروژن در پیوند N-H و OH در زنجیره اصلی PEG به ترتیب در ۲/۸ الی ۳/۷ ppm مشاهده شدند (شکل ۱-اندیس‌های c تا g). علاوه‌براین، پیک‌های مربوط به اسیدفولیک در محدوده ۶ تا ۸ ppm مشاهده شدند (شکل ۲-اندیس‌های h). با افزودن گلوکز به کوپلیمر PPF، پیک‌های جدیدی در ناحیه ۶ تا ۸ ppm مشاهده شدند که مربوط به هیدروژن‌های گلوکز بودند (شکل ۲-اندیس‌های j).



شکل ۲- طیف حاصل از ¹H-NMR، (A) پلیمر PPF و (B) پلیمر PPGF

FTIR

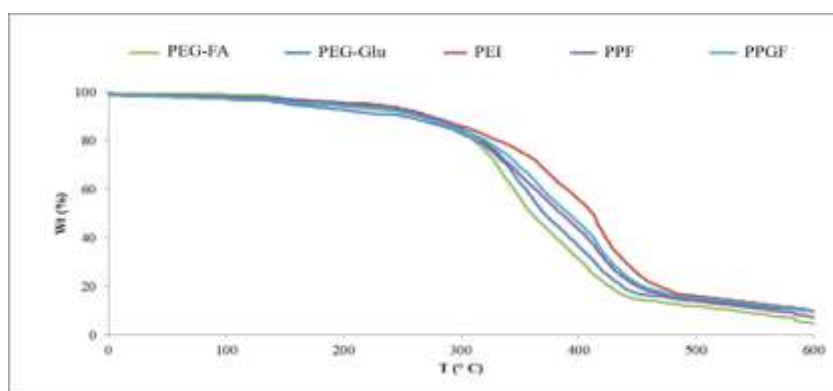
طبق نتایج به دست آمده از طیف سنجی FTIR پلیمرهای PPF و PPGF و اجزای سازنده آنها (شکل ۲)، مشخص شد که پیک‌های مشاهده شده در محدوده 1342 cm^{-1} و 955 cm^{-1} به ترتیب مربوط به کشش حاصل از گروه‌های C-O-C و -CH- پلیمر PEG در پلیمرهای PPF و PPGF می‌باشند (شکل ۳-D و E). هم‌چنین طبق نتایج به دست آمده از طیف FTIR پلیمر PEG (شکل ۳-B و C)، وجود یک باند جذب قوی بین 2880 تا 2900 cm^{-1} را نشان می‌دهد که به کشش متقارن و نامتقارن گروه‌های CH_2 نسبت داده می‌شود و ساختار اصلی PEG را تأیید می‌کند. یک پیک خمشی مخصوص CH_2 در محدوده 1460 تا 1480 cm^{-1} ظاهر شده است، که نشان‌دهنده وجود یک ستون فقرات پلی‌اتیلن است. مشخص‌ترین پیک PEG بین 1100 تا 1150 cm^{-1} ثبت شد که مربوط به ارتعاشات کششی C-O-C پیوندهای اتر است (شکل ۳-B و C). هم‌چنین باند تیز در محدوده 1750 cm^{-1} و پیک‌ها کوچک در محدوده 1450 تا 1500 cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه کربونیل C=O و N-H اسید فولیک در ترکیب با PEG است (شکل ۳-B). ظهور یک پیک پهن در محدوده 3370 cm^{-1} در طیف FTIR پلیمر PEG پس از اتصال گلوکز، نشان‌دهنده افزایش محتوای گروه هیدروکسیل است. افزایش شدت پیک 2900 cm^{-1} با سهم متیلن از گلوکز سازگار است (شکل ۳-C و E). هم‌چنین پیک جدید مشاهده شده در 1100 - 1120 cm^{-1} ، که با کشش C-O گلوکز مرتبط است، با ناحیه اتر PEG همپوشانی دارد. تغییرات طیفی در محدوده 1500 - 1650 cm^{-1} ممکن است به دلیل پیوند هیدروژنی بین گروه‌های OH گلوکز و آمین‌های PEG باشد. این تغییرات ترکیبی، پیوند موفقیت‌آمیز گلوکز را در PEG تأیید می‌کند (شکل ۳-C و E). این نتایج نشان‌دهنده وجود گروه‌های عاملی مربوط به PEG، PEI، FA و Glu در پلیمرهای PPF و PPGF می‌باشد.



شکل ۳-طیف‌های FTIR (A) PEI، (B) PEG-FA، (C) PEG-Glu، (D) پلیمر PPF و (E) پلیمر PPF

TGA

نتایج آنالیز TGA نشان داد که پلیمر PEG-FA کمترین مقاومت حرارتی را در میان نمونه‌ها دارا می‌باشد، به طوری که دمای شروع تجزیه آن در حدود ۲۸۰ الی ۲۹۰ °C مشاهده شد (شکل ۴). این پلیمر در بازه دمایی ۲۹۰ تا ۳۸۰ °C دچار کاهش وزن در حدود ۴۵ الی ۵۰ درصد گردید که به تجزیه زنجیره‌های PEG نسبت داده می‌شود. هم‌چنین مرحله دوم کاهش وزن این ترکیب در محدوده ۳۸۰ تا ۴۵۰ °C با مقدار تقریبی ۲۰ الی ۲۵ درصدی مشاهده گردید، که مربوط به تجزیه فولیک‌اسید می‌باشد. وجود دو مرحله مجزای کاهش وزن، بیانگر حضور بیش از یک جزء در ساختار این پلیمر است. پلیمر PEG-Glu رفتار حرارتی مشابهی از خود نشان داد، با این تفاوت که دمای شروع تجزیه آن به حدود ۳۰۰ °C افزایش یافت (شکل ۴). کاهش وزن اصلی این پلیمر در بازه ۳۰۰ تا ۳۹۰ °C با مقدار تقریبی ۴۵ درصد رخ داد که نشان‌دهنده پایداری حرارتی بیشتر گلوکز نسبت به فولیک‌اسید بود. بیشترین پایداری حرارتی مربوط به پلیمر PEI بود، به طوری که دمای شروع تجزیه آن در حدود ۳۳۰ الی ۳۴۰ °C مشاهده شد. مرحله اصلی کاهش وزن PEI در بازه ۳۳۰ تا ۴۲۰ °C با مقدار تقریبی ۵۵ الی ۶۰ درصد بود. هم‌چنین نتایج TGA (شکل ۴)، نشان داد که با اتصال PEI به کوپلیمرهای PEG-FA و PEG-Glu و تشکیل نانوذرات PPF و PPGF، دمای شروع تجزیه به حدود ۳۱۰ الی ۳۲۰ °C افزایش یافت که بیانگر بهبود قابل توجه مقاومت حرارتی نانوذرات در مقایسه با پلیمرهای اولیه می‌باشد.



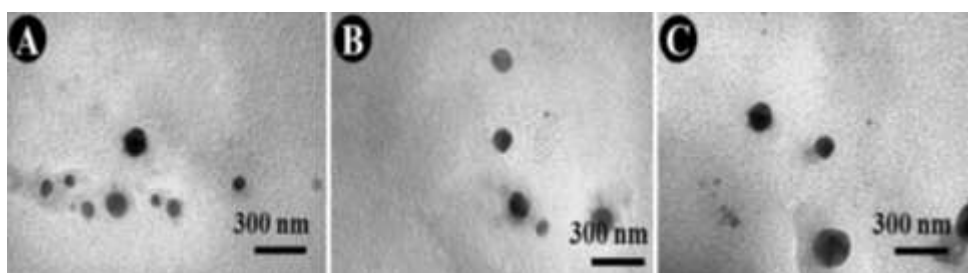
شکل ۴- نمودار TGA کوپلیمرهای PPF و PPGF و اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوکپسول‌های PPF/DNA، PPG/DNA و PPGF/DNA

TEM

خصوصیات فیزیکوشیمیایی نظیر ساختار مرفولوژیکی، اندازه و بار سطحی نانوذرات تأثیر معنی‌داری بر کارایی آن‌ها دارند به گونه‌ای که تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که نانوذرات با ساختار کروی و اندازه کمتر از ۳۰۰ نانومتر از توانایی بیشتری در انتقال دارو یا قطعات ژنی به سلول‌ها و بافت سرطانی در مقایسه با نانوذرات چند وجهی با اندازه بزرگتر برخوردارند [۵]. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان می‌دهند که نانوکپسول‌های تهیه‌شده در هر سه فرمولاسیون (نانوذرات حاوی تنها گلوکز یا تنها فولیک‌اسید و یا ترکیب هر دو لیگاند) به صورت ذرات مجزا با مورفولوژی تقریباً کروی تشکیل شده‌اند (شکل ۵).

همچنین طبق نتایج به دست آمده تفاوت‌هایی در اندازه، پراکندگی و تجمع ذرات میان فرمولاسیون‌ها مشاهده می‌شود. طبق نتایج حاصل، نانوکپسول‌های هدفمند شده با گلوکز (PPG/DNA) ذرات عمدتاً کروی بوده و دارای توزیع اندازه نسبتاً گسترده هستند. همچنین مقداری تجمع در برخی نواحی دیده می‌شود که احتمالاً ناشی از برهم‌کنش‌های بین‌ذره‌ای یا فرآیند خشک کردن نمونه روی گرید TEM است. با این حال، ساختار کلی نانوکپسولی حفظ شده است. این در حالیست که نانوکپسول‌های PPF/DNA پراکندگی یکنواخت‌تری نسبت به نمونه نانوکپسول‌های PPG/DNA دارند و تجمع کمتری مشاهده می‌شود. مورفولوژی کروی ذرات به خوبی حفظ شده و توزیع ذرات در زمینه نسبتاً همگن‌تر به نظر می‌رسد. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پایداری بیشتر ساختار نانوکپسول‌ها در حضور PPF باشد. از سویی دیگر، نانوکپسول‌های حاوی هر دو لیگاند به طور توأمان (PPGF/DNA) نیز ذرات عمدتاً کروی هستند، اما به نظر می‌رسد اندازه برخی ذرات نسبت به دو فرمولاسیون دیگر بزرگ‌تر باشد. علاوه بر این، حضور هم‌زمان فولیک‌اسید و گلوکز ممکن است منجر به تشکیل جمعیت‌های ذره‌ای با اندازه‌های متفاوت شده باشد که به صورت ناهمگنی نسبی در توزیع اندازه مشاهده می‌شود. با این وجود، تجمع شدید ذرات مشاهده نمی‌شود و ساختار نانوکپسولی همچنان قابل تشخیص است. به طور کلی، تصاویر TEM تشکیل موفق نانوکپسول‌های حاوی DNA را در هر سه فرمولاسیون تأیید می‌کنند. تمامی نمونه‌ها دارای مورفولوژی تقریباً کروی بوده و در مقیاس نانومتری قرار دارند. مقایسه کیفی تصاویر نشان می‌دهد که فرمولاسیون حاوی PPF (شکل ۵-B) از یکنواختی و پراکندگی بهتری برخوردار است، در حالی که نمونه حاوی PPG (شکل ۵-A) تمایل بیشتری به تجمع نشان می‌دهد. همچنین فرمولاسیون ترکیبی PPGF/DNA (شکل ۵-C) نیز مورفولوژی مناسبی داشته اما ناهمگنی بیشتری در اندازه ذرات از خود نشان می‌دهد.

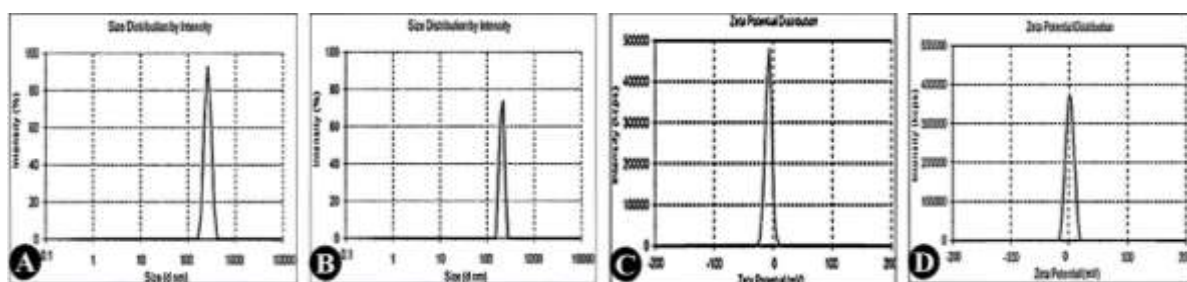


شکل ۵- تصاویر TEM نانوکپسول‌های (A) $PPG_{(0.23)}/DNA_{(0.1)}$ ، (B) $PPF_{(0.23)}/DNA_{(0.1)}$ و (C) $PPG_{(0.18)}F_{(0.18)}/DNA_{(0.1)}$

DLS

به منظور بررسی اندازه و بار سطحی نانوکپسول‌های PPF/DNA، PPG/DNA و PPGF/DNA از دستگاه DLS استفاده گردید. این نتایج نشان داد نانوکپسول‌های مذکور دارای اندازه‌ای در حدود ۱۷۴ الی ۳۰۱ نانومتر بودند (جدول ۲). همچنین این نتایج نشان داد که بیشترین اندازه نانوکپسول‌ها در نسبت‌های پایین پلیمر به DNA مشاهده شد. با افزایش نسبت پلیمر به DNA اندازه نانوکپسول کاهش می‌یابد، با این حال در نسبت‌های بالاتر کمی اندازه نانوکپسول‌ها افزایش یافت (جدول ۲). به نظر می‌رسد عدم توانایی پلیمرها در فشرده سازی DNA در نسبت‌های پایین مهم‌ترین دلیل افزایش اندازه نانوکپسول‌ها می‌باشد. در برخی

مواقع در نسبت‌های بالاتر پلیمر به DNA خودتجمعی قطعات پلیمر آزاد اطراف نانوکپسول‌ها می‌تواند سبب افزایش اندازه آن‌ها شود. به طور مثال اندازه نانوکپسول‌های PPF/DNA در نسبت ۲ PPF به ۲۰ DNA برابر با ۲۹۷ نانومتر بود، در حالیکه با افزایش نسبت پلیمر از ۲ به ۲۰ اندازه نانوکپسول از ۲۹۷ به ۱۹۷ کاهش یافت (جدول ۲ و شکل ۶-A و B). هم‌چنین روند مشابهی برای سایر نانوکپسول‌ها مشاهده شد. هم‌چنین نتایج حاصل از دستگاه DLS نشان داد که بار سطحی نانوکپسول‌ها به طور قابل توجهی وابسته به غلظت پلیمر به DNA است، به نحوی که با افزایش غلظت پلیمر به DNA بار سطحی نانوکپسول‌ها افزایش یافت (جدول ۲). با توجه به اینکه DNA یک ابرملکول با بار سطحی منفی می‌باشد (به دلیل وجود گروه‌های فسفات در اسکلت DNA)، افزایش غلظت پلیمر به DNA سبب کاهش بار منفی DNA می‌شود. PEI دارای گروه‌های آمین مثبت در سطح خود می‌باشند که از توانایی خنثی‌سازی و فشردن‌سازی DNA برخوردار هستند. لذا با افزایش نسبت کوپلیمرهای حاوی PEI به DNA میزان بار منفی کاهش می‌یابد (جدول ۲). به عنوان مثال با افزایش غلظت پلیمر PPG از ۰/۰۱ میلی‌گرم به ۰/۲ میلی‌گرم بار سطحی نانوذرات از ۴/۷- به ۲/۶+ mV افزایش یافت (جدول ۲ و شکل ۶-C و D).



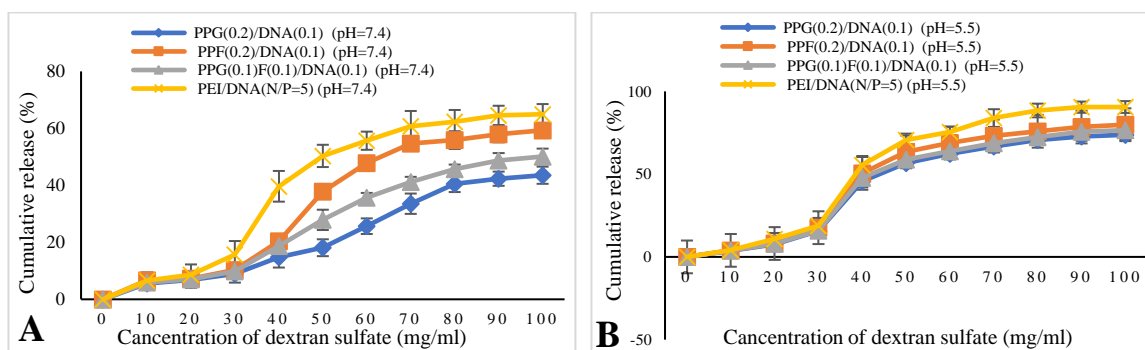
شکل ۶- نتایج حاصل از اندازه و پتانسیل زتای برخی از نانوکپسول‌ها؛ (A و B) اندازه به ترتیب نانوکپسول‌های PPF/DNA در نسبت‌های (۲۰:۲۰) و (۲:۲۰) (C و D) پتانسیل زتای به ترتیب نانوکپسول‌های PPG/DNA در نسبت‌های (۲۰:۲۰) و (۰/۲:۱) (PPG:DNA=۰/۲:۱) و (PPG:DNA=۰/۰۱).

جدول ۱- اندازه و پتانسیل زتای نانوکپسول‌های PPF/DNA، PPG/DNA و PPGF/DNA در غلظت‌های مختلف

PDI	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	اندازه (نانومتر)	DNA (میلی‌گرم)	PPG (میلی‌گرم)	PPF (میلی‌گرم)	نوع نانوکپسول
۰/۴۳±۰/۰۰۵	-۷/۶±۱/۶۷	۲۹۷±۹/۵	۰/۱	-	۰/۰۱	PPF/DNA
۰/۳۸±۰/۰۰۴	-۳/۱±۱/۲	۲۲۷±۷/۱	۰/۱	-	۰/۰۵	PPF/DNA
۰/۳۲±۰/۰۰۴	-۲/۷±۰/۶	۱۹۷±۳/۷	۰/۱	-	۰/۱	PPF/DNA
۰/۲۶±۰/۰۰۶	۲/۵±۰/۷	۲۰۷±۵/۶	۰/۱	-	۰/۲	PPF/DNA
۰/۵۳±۰/۰۰۹	-۴/۷±۰/۸۸	۲۷۵±۸/۵	۰/۱	۰/۰۱	-	PPG/DNA
۰/۴۸±۰/۰۰۶	-۱/۱±۰/۲	۲۱۷±۵/۳	۰/۱	۰/۰۵	-	PPG/DNA
۰/۴۰±۰/۰۰۷	۱/۷±۰/۲	۱۸۶±۲/۲	۰/۱	۰/۱	-	PPG/DNA
۰/۳۳±۰/۰۰۸	۲/۶±۰/۵	۲۱۱±۵/۳	۰/۱	۰/۲	-	PPG/DNA
۰/۷۲±۰/۰۰۸	-۵/۷±۰/۹	۳۰۱±۱۱/۸	۰/۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	PPGF/DNA
۰/۶۶±۰/۰۰۵	-۲/۶±۰/۲	۲۳۱±۸/۵	۰/۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	PPGF/DNA
۰/۶۰±۰/۰۰۹	-۱/۵±۰/۲	۱۹۲±۶/۴	۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۵	PPGF/DNA
۰/۶۳±۰/۰۰۷	۴/۵±۰/۵	۲۱۴±۶/۷	۰/۱	۰/۱	۰/۱	PPGF/DNA
۰/۷۳±۰/۰۰۱	۶/۳±۱/۱	۱۷۴±۲/۵	۰/۱	-	-	PEI _(N/P=5) /DNA

الگوهای رهاسازی DNA از نانوکپسول‌های PSPFG/DNA و PSPF/DNA، PSPG/DNA

میزان بارگذاری DNA در نانوکپسول‌های $PPG_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ ، $PPF_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ و $PPG_{(0.1)F(0.1)}/DNA_{(0.1)}$ به ترتیب ۴۳/۶، ۴۰/۴۵ و ۴۲/۳۳ درصد بود. نتایج مطالعه الگوی رهاسازی DNA از نانوکپسول‌های مذکور در اسیدی (pH=۵/۵) و خنثی (pH=۷/۴) و مقایسه آن‌ها با کمپلکس $PEI_{(N/P=5)}/DNA$ نشان داد که میزان رهاسازی DNA از این کمپلکس در pH=۷/۴ حاوی غلظت‌های بالای دکستران، سریع‌تر از هر سه نانوکپسول ذکر شده بود (شکل ۷). طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دکستران، میزان رهایش DNA از کمپلکس $PEI_{(N/P=5)}/DNA$ و نانوکپسول‌های $PPG_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ ، $PPF_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ و $PPG_{(0.1)F(0.1)}/DNA_{(0.1)}$ به ترتیب ۶۴/۹۶، ۴۳/۵۵، ۵۹/۳۳ و ۵۰/۱۱ درصد بود (شکل ۷-۸). این در حالیست که میزان رهاسازی DNA از هر سه نانوکپسول به همراه کمپلکس $PEI_{(N/P=5)}/DNA$ در محیط اسیدی (pH=۵/۵) در مقایسه با محیط خنثی به طور قابل توجهی افزایش یافت. علاوه بر این، هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان رهاسازی DNA بین هر ۳ نانوکپسول با کمپلکس $PEI_{(N/P=5)}/DNA$ در محیط‌های اسیدی وجود نداشت (شکل ۷-۸). بر اساس نتایج به دست آمده، وجود اسیدفولیک در نانوکپسول‌ها، رهاسازی DNA را در هر دو pH تسهیل می‌نماید، که این عمل می‌تواند به دلیل وجود بار سطحی مشابه بین اسیدفولیک و توالی DNA باشد و احتمال نیروی دافعه را احیا کند. همچنین نتایج بیانگر تأثیر مستقیم تغییر pH بر شدت رهاسازی DNA از نانوکپسول‌ها بود به طوری که کاهش pH از ۷/۴ به ۵/۵، رهاسازی DNA کپسوله شده از نانوکپسول‌های $PPG_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ ، $PPF_{(0.2)}/DNA_{(0.1)}$ و $PPG_{(0.1)F(0.1)}/DNA_{(0.1)}$ را افزایش می‌دهد. با توجه به ویژگی ریزمحیط کمی اسیدی سلول‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی، پیش‌بینی می‌شود که این نانوکپسول‌های سنتز شده، کارایی بهتری در تحویل هدفمند توالی‌های ژنی یا عوامل درمانی به‌طور خاص به سلول‌های سرطانی از خود نشان دهند.



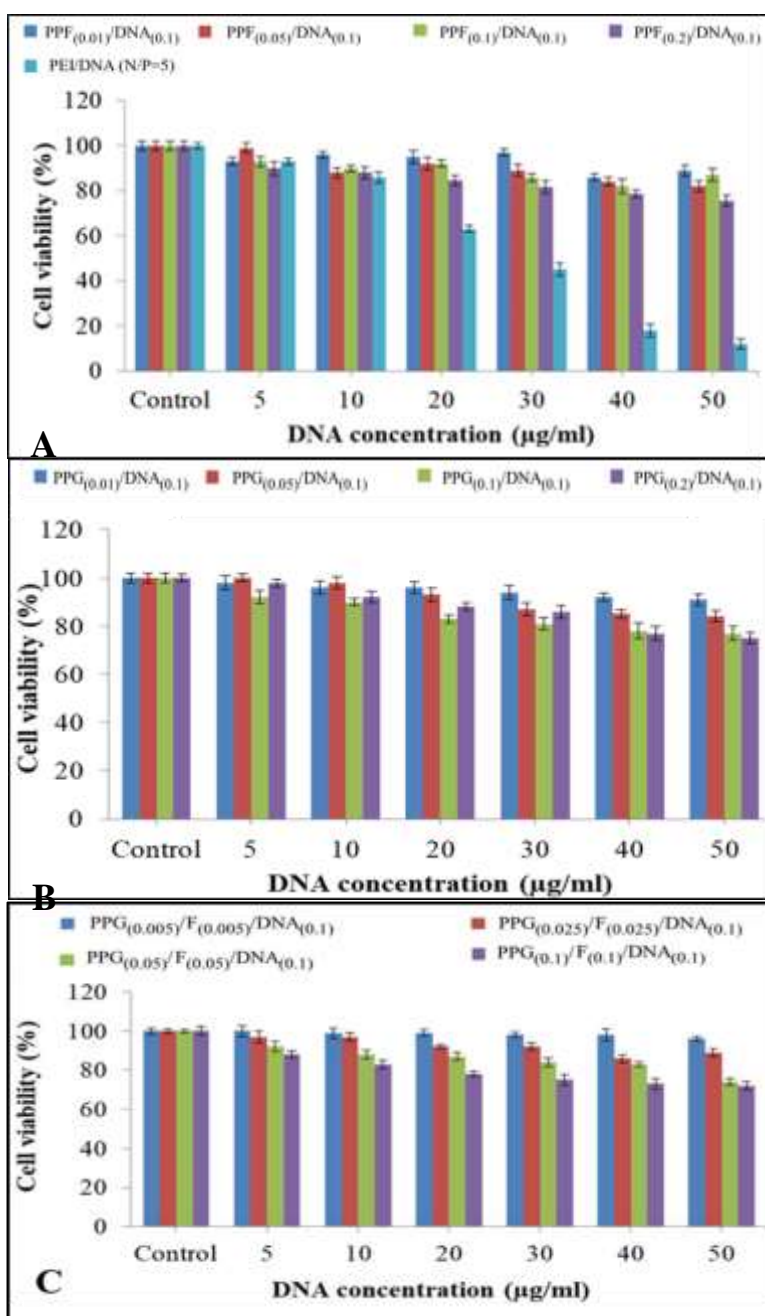
شکل ۷- الگوهای رهاسازی DNA از نانوکپسول‌های PPG، PPF، PSPFG و PEI در pH مختلف: (A) pH=۷/۴ و (B) pH=۵/۵

بررسی سمیت نانوکپسول‌های PPG، PPF، PSPFG و PEI

آزمون MTT

نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی توسط آزمون MTT نشان داد که ترکیب PEI/DNA از سمیت بالایی بر سلول‌های سرطانی Hs-578T برخوردار بودند، به نحوی که در غلظت بالاتر از $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ بیش از ۵۰ درصد از سلول‌ها از بین رفتند

(شکل ۸). این در حالی بود که نانوکپسول‌های PPF/DNA، PPG/DNA و PPGF/DNA در مقایسه با کمپلکس PEI/DNA سمیت بسیار کمتری داشتند (شکل ۸). بطور مثال میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از تیمار با $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ از ترکیب PEI/DNA و نانوکپسول‌های PPF/DNA، PPG/DNA و PPGF/DNA به ترتیب برابر با ۹/۶۱، ۸۱/۳۴، ۷۸/۸۴ و ۸۰/۶۴ درصد بود. هم‌چنین نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت پلیمرها نسبت به DNA درصد زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد (شکل ۸) با توجه به اینکه پلیمرهای مذکور در ساختار خود از PEI نیز بهره می‌برند، لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که پوشش PEI با استفاده از PEG به طور قابل توجهی سبب افزایش زیست‌سازگاری PEI می‌گردد.



شکل ۸- نتایج حاصل از مقایسه میانگین تاثیر نانوکپسول‌های مختلف بر زنده‌مانی سلول‌های Hs-578T (A) نانوکپسول‌های PPF، (B) نانوکپسول‌های PPG و (C) نانوکپسول‌های تجمیعی PPGF.

توانایی نانوکپسول‌های PPG, PPF, PPGF در خنثی‌سازی بار منفی DNA

الکتروفورز ژل آگارز

در این تحقیق از الکتروفورز ژل آگارز به منظور بررسی توانایی نانوکپسول‌های PPG, PPF و PPGF در خنثی‌سازی بار منفی DNA استفاده شد. نتایج حاصل (شکل ۹)، نشان داد که در غلظت‌های پایین‌تر از این پلیمرهای موجود در ساختار نانوکپسول‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای در حرکت نانوکپسول‌های PPG/DNA, PPF/DNA, PPGF/DNA در مقایسه با DNA شاهد (DNA فاقد پوشش)، وجود نداشت بطور مثال همانطور که در شکل ۹ قابل مشاهده است در غلظت ۰/۰۵ mg از نانوذره PPF و ۰/۱ mg DNA (شکل ۹-نمونه ۳). هم‌چنین روند مشابهی برای سایر نانوکپسول‌ها نیز مشاهده شد. این نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پلیمرهای نانوکپسول‌ها نسبت به DNA، موجب کندی حرکت DNA در امتداد ژل آگارز گردید. به عنوان مثال در نسبت بالاتر از ۰/۱ mg از پلیمر PPG به ۰/۱ mg از DNA (PPG_(۰/۱)/DNA_(۰/۱))، باند DNA در چاهک بدون حرکت متوقف گردید (شکل ۹-نمونه ۸). باتوجه به اینکه حرکت ژل آگارز از سمت قطب منفی به سمت قطب مثبت می‌باشد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت پلیمر در نانوکپسول‌ها، بار منفی DNA توسط این پلیمرها خنثی شده و حرکت ترکیب نانوکپسول‌های حاوی DNA به سمت قطب مثبت ژل آگارز متوقف می‌شود. این نتایج همراستا با نتایج به دست آمده از دستگاه DLS (جدول ۱) بود که توزیع نانوذره و سنتز موفق آن را تأیید می‌کند.



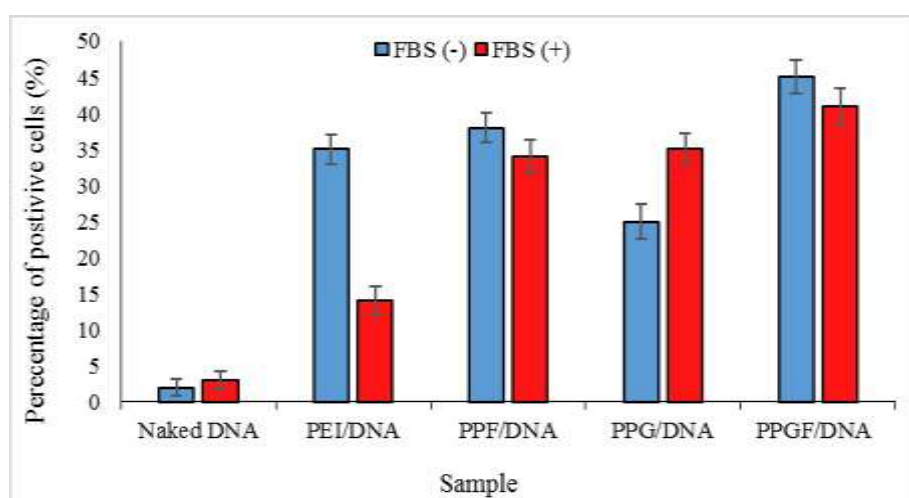
شکل ۹- تصویر ژل آگارز از نمونه‌های مورد بررسی: (۱) DNA شاهد، (۲) الی (۵) نانوکپسول‌های حاوی به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ mg PPF در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم DNA، (۶) الی (۹) نانوکپسول‌های حاوی به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ mg PPG در ترکیب با ۰/۱ mg DNA و (۱۰) الی (۱۳) نانوکپسول‌های حاوی به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ mg PPGF (در ترکیب با هم) در ترکیب با ۰/۱ mg DNA

بررسی توانایی نانوکپسول‌های PPG/DNA, PPF/DNA, PPGF/DNA در انتقال DNA به سلول‌های Hs-

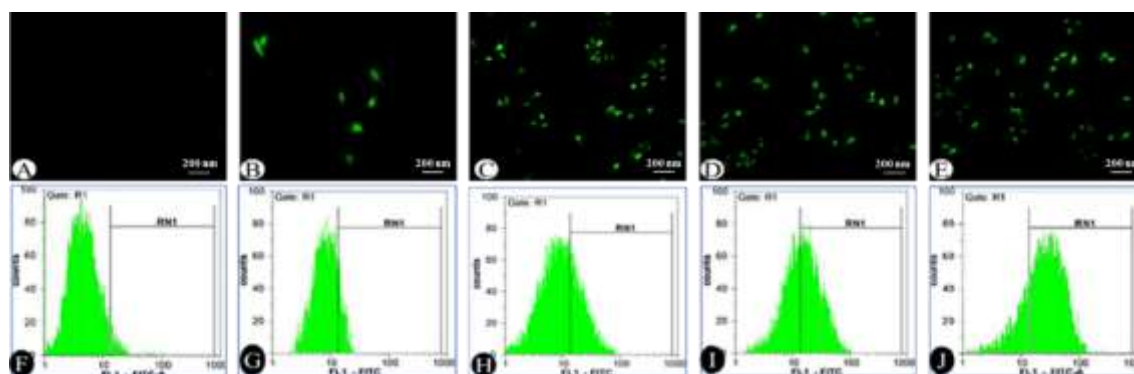
578T

همانطوریکه در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، نانوکپسول‌های PPG_(۰/۲)/DNA_(۰/۱)، PPF_(۰/۲)/DNA_(۰/۱) و F_(۰/۱)/DNA_(۰/۱) از قابلیت انتقال و رهایش سالم DNA برخوردار بودند. طبق نتایج به دست آمده، کمترین و بیشترین بازده انتقال ژن برابر با ۴/۳ و ۴۴/۸ به ترتیب مربوط به سلول‌های تیمار شده با DNA فاقد پوشش (در محیط فاقد FBS) و نانوکپسول‌های (FBS فاقد FBS) PPG_(۰/۱)/DNA_(۰/۱) (در محیط فاقد FBS) مشاهده شد (شکل ۱۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده‌ی همزمان از دو لیگاند متفاوت (فولیک اسید و گلوکز) در فرآیند انتقال ژن به سلول‌های سرطانی، می‌تواند کارایی و بازده این فرآیند را به‌طور

معناداری افزایش دهد. در واقع، زمانی که تنها یک لیگاند به کار گرفته می‌شود، میزان انتقال ژن محدودتر بوده و بخشی از سلول‌ها به‌طور مؤثر ژن مورد نظر را دریافت نمی‌کنند. اما حضور دو لیگاند مکمل با قابلیت‌های متفاوت در شناسایی و اتصال به گیرنده‌های سطحی سلول، موجب افزایش احتمال ورود کمپلکس‌های حامل ژن به درون سلول و در نتیجه ارتقاء بازده کلی انتقال می‌گردد. این یافته‌ها اهمیت طراحی سیستم‌های چندلیگاندی را در بهبود روش‌های ژن‌درمانی و توسعه راهکارهای نوین برای درمان مؤثرتر سرطان برجسته می‌سازد. هم‌چنین نشر فلورسانس ساطع شده از سلول‌های Hs-578T پس از تیمار با نانوکپسول‌های $PPG_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$ ، $PPF_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$ و $PPG_{(0.1)}F_{(0.1)}/DNA_{(0.1)}$ که ناشی از بیان ژن GFP درون سلول-هاست، بیانگر تأثیر چشمگیر استفاده هم‌زمان از دو لیگاند در انتقال ژن به این سلول‌ها بود (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- مقایسه میانگین راندمان انتقال DNA (پلاسمید pEGFP-N1) به سلول‌های Hs-578T توسط نانوکپسول‌های $PPG_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$ ، $PPG_{(0.1)}F_{(0.1)}/DNA_{(0.1)}$ و $PPF_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$



شکل ۱۱- نتایج فلوسایتومتری ضرب انتقال DNA (پلاسمید pEGFP-N1) به سلول‌های Hs-578T به ترتیب A و F DNA فاقد پوشش، B و G $PEI/DNA_{(N/P=5)}$ ، C و H نانوکپسول $PPG_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$ ، D و I نانوکپسول $PPF_{(0.12)}/DNA_{(0.1)}$ و E و J نانوکپسول‌های $PPG_{(0.1)}F_{(0.1)}/DNA_{(0.1)}$

۴- بحث

پیشرفت‌های اخیر در پزشکی امکان کنترل بسیاری از بیماری‌ها را فراهم کرده‌اند، با این حال درمان مؤثر برای اغلب بیماری‌های ژنتیکی همچنان با چالش مواجه است. ژن‌درمانی به‌عنوان رویکردی نوین برای اصلاح یا مهار بیان ژن‌های معیوب مطرح شده

است، اما تحویل ایمن و کارآمد مواد ژنتیکی به سلول‌ها به دلیل بار منفی، ناپایداری و اندازه بزرگ آن‌ها همچنان یک مانع اساسی محسوب می‌شود [۲۷]. نانوحامل‌های کاتیونی با خنثی‌سازی بار منفی اسیدهای نوکلئیک و تسهیل فرار اندوزومی، نقش مهمی در بهبود ترانسفکشن ایفا می‌کنند. در این میان، PEI به‌رغم کارایی بالای انتقال ژن، به دلیل سمیت وابسته به بار بالا، کاربرد بالینی محدودی دارد. از این رو، اصلاح ساختاری PEI با هدف کاهش برهم‌کنش‌های مخرب با غشای سلولی و بهبود سازگاری زیستی، به‌عنوان یک راهبرد کلیدی در توسعه سامانه‌های نوین ژن‌رسانی مورد توجه قرار گرفته است [۲۸]. بر اساس موارد ذکر شده و خواص منحصر به فرد و پرکاربرد اسیدفولیک و گلوکز در شناسایی گیرنده‌های سطح سلول و انتقال هدفمند دارو و ژن، در این مطالعه، از اسیدفولیک و گلوکز به‌عنوان گیرنده‌های سطح سلول برای انتقال هدفمند DNA (پلاسمید pEGFP-N1) به سلول‌های سرطانی Hs-578T با سنتز نانوکپسول‌های کوپلیمری مبتنی بر PEI-PEG استفاده شدند.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از $^1\text{H-NMR}$ ، FTIR و TGA، ساختار و ماهیت پلیمرهای مختلف، مانند PEG و PEI به همراه گلوکز یا اسید فولیک و سنتز صحیح کوپلیمر PEI-PEG/اسیدفولیک/گلوکز تأیید شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). در سال ۲۰۱۹، Amani و همکارانش کوپلیمرهای PEI-PEG متصل به اسیدفولیک را سنتز کردند و عامل‌دار شدن آن‌ها را با استفاده از طیف‌سنجی $^1\text{H-NMR}$ تأیید کردند، همچنین این گروه سیگنال‌های پروتون آروماتیک فولات را در محدوده ۶/۶ و ۷/۵ ppm شناسایی کردند که با پیک اسیدفولیک موجود در کوپلیمر PPF تحقیق ما (در ۶-۸ ppm) هم‌خوانی داشت. علاوه بر این، ظهور پیک‌های جدید در طیف $^1\text{H-NMR}$ پس از افزودن گلوکز، مشابه رفتار گزارش شده در سایر سامانه‌های کوپلیمر چندمنظوره است؛ به طوری که در آن‌ها نیز بخش‌های قندی رزونانس‌های ویژه‌ای را در همین ناحیه طیفی نشان می‌دهند [۸]. در مطالعه‌ای که توسط Mohajeri و همکاران (۲۰۲۵) انجام شد، نانوذرات پلی‌اسپرین-PEG-گلوکز برای انتقال هدفمند قطعات ژنی سنتز گردید. آن‌ها با استفاده از طیف‌سنجی FT-IR حضور گروه‌های عاملی را تأیید کرده و گزارش نمودند که پس از اتصال گلوکز، یک پیک کششی پهن مربوط به گروه N-H در محدوده ۳۳۰۰-۳۵۰۰ cm^{-1} و همچنین افزایش شدت پیک هیدروکسیل در 3370 cm^{-1} در طیف FT-IR مشاهده کردند [۱۳]، که با تغییرات طیفی مشاهده شده در نانوذرات PPF-گلوکز ما مطابقت نزدیکی داشت (شکل ۳). از سوی دیگر، Ramalho و همکاران (۲۰۲۴)، نانوذرات پلی-لاکتیک-کو-گلیکولیک‌اسید (PLGA) متصل به اسیدفولیک را که با اسیدگالیک بارگذاری شده بود، برای درمان هدفمند گلیوبلاستوما توسعه دادند. طیف‌های FT-IR آن‌ها، ترکیب موفقیت‌آمیز اسیدفولیک را با پیک‌های مشخص در 1750 cm^{-1} (کشش C=O) و 1650 cm^{-1} (خمش C=C آروماتیک) تأیید کرد [۱۷]، که با مشاهدات ما در طیف‌های FT-IR کوپلیمرهای PPF و PPGF سازگار است (شکل ۲). شکل و مورفولوژی نانوذرات، به‌عنوان عوامل کلیدی در فرآیند انتقال هدفمند قطعات ژنی، بسیار مهم هستند و به طور قابل توجهی بر کارایی این سیستم‌های دارورسانی تأثیر می‌گذارند [۲۹]. نانوذرات با اشکال و اندازه‌های مختلف می‌توانند خواص فیزیکی و شیمیایی خود را به نمایش بگذارند که به طور مستقیم بر برهمکنش آن‌ها با بافت‌ها و سلول‌های بیولوژیکی تأثیر می‌گذارد

[۳۰]. سطوح صاف و یکنواخت نانوکپسول‌ها در تصاویر TEM بیانگر ویژگی‌های مثبت آن‌ها است که برای جذب سلولی و رهایش کنترل‌شده دارو مطلوب هستند. یکنواختی مشاهده‌شده در مورفولوژی و تجمع محدود ذرات، نشان‌دهنده یک فرآیند سنتز بهینه است که نانوکپسول‌های کلئیدی پایدار را ایجاد می‌کند که برای عبور از موانع بیولوژیکی و کاربردهای دارورسانی هدفمند مناسب هستند (شکل ۵). در یک مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۵ منتشر شد، نشان داد که سنتز نانوذرات *PLA-PEG-اسیدفولیک* با اندازه متوسط تقریباً ۲۴۱ نانومتر از شکل و مورفولوژی. تصاویر TEM نشان داد که این نانوذرات دارای مورفولوژی کروی یکنواخت و سطوح صاف هستند [۵]، که با مشاهدات ما از نانوکپسول‌ها مطابقت دارد. چنین ویژگی‌های مورفولوژیکی برای دارورسانی کارآمد و ژن‌رسانی ضروری هستند، زیرا به جذب و پایداری مطلوب سلولی کمک می‌کنند. این یافته‌ها از مناسب بودن نانوکپسول‌های ما برای کاربردهای درمانی هدفمند پشتیبانی می‌کنند. توانایی پلیمرهای کاتیونی در خنثی‌سازی بار منفی DNA، فشردن DNA و انتقال ژن به سلول‌های مختلف سرطانی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است [۲۱].

باتوجه به اینکه PEI مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از پلیمر PEG و لیگاندهای گلوکز و فولیک‌اسید اصلاح شد، لذا ضروری به نظر می‌رسد تا توانایی این پلیمر در خنثی‌سازی بار منفی DNA و حفظ شرایط کاتیونی مورد بررسی قرار گیرد. از این رو آزمون الکتروفورز ژل آگارز به منظور بررسی این توانایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانوکپسول‌های PPG، PPF و PPGF به خوبی از توانایی خنثی‌سازی بار منفی DNA برخوردار بودند. به نحوی که در نسبت‌های مورد استفاده ۰/۱ میلی‌گرم به طور کامل بار منفی DNA را خنثی نموده و از حرکت آن به سمت قطب مثبت ژل آگارز ممانعت کردند (شکل ۹). هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی بار سطحی نانوذرات حاوی DNA با استفاده از دستگاه DLS نیز تایید کننده این امر بود (جدول ۲). این نتایج نشان داد با افزایش نسبت نانوذرات به DNA بار سطحی از منفی به مثبت گرایش یافت به طوری که در نسبت‌های بالای نانوذرات به DNA سطح ذرات به طور کامل کاتیونی بود که این خصوصیات جهت استفاده از این نانوذرات برای انتقال ژن به سلول‌های سرطانی مطلوب است. از سویی دیگر، نتایج DLS نشان داد که بار سطحی نانوکپسول‌های PPG/DNA، PPF/DNA و PPGF/DNA با افزایش نسبت پلیمر به DNA از مقادیر منفی به مثبت تغییر می‌کند، به طوری که در نسبت‌های پایین (برای مثال ۰/۱-۰/۰۵ mg پلیمر به DNA) بار سطحی منفی و در نسبت‌های بالاتر (برای نمونه ۰/۲ mg پلیمر) مثبت شد. این تغییر ناشی از خنثی‌سازی گروه‌های فسفات DNA توسط گروه‌های آمین مثبت PEI و افزایش تراکم پلیمر روی سطح نانوکپسول‌ها است [۳۱]. مقادیر منفی جزئی در برخی نسبت‌های متوسط نشان‌دهنده پوشش ناقص یا تجمع ناقص پلیمر اطراف DNA بوده و هم‌زمان، در نسبت‌های پایین‌تر، عدم توانایی کامل پلیمر در فشردن DNA موجب حفظ بار منفی می‌شود. این رفتار با اصول کمپلکس‌های PEI-DNA سازگار است و توضیح‌دهنده تغییرات اندازه و بار سطحی مشاهده شده در نانوکپسول‌ها است و نشان‌دهنده تأثیر مستقیم نسبت پلیمر به DNA بر پایداری کلئیدی و پتانسیل ترانسفکشن آن‌ها می‌باشد [۳۲]. علاوه بر مزایایی بسیار پلیمر PEI در انتقال ژن از قبیل، توانایی در خنثی‌سازی بار

منفی DNA، توانایی در انتقال بالای قطعات ژن، توانایی در فشرده‌سازی و هم‌چنین محافظت از DNA در برابر نوکلئازها، با این حال دو مشکل اصلی در استفاده بالینی از این پلیمر وجود دارد، که از جمله مهم‌ترین این مشکلات سمیت نسبتاً بالای این پلیمر در مقایسه با سایر نانوناقل‌های مورد استفاده در سیستم‌های دارورسانی است [۳۳]. از سویی دیگر، مشخص شده است که اتصال PEG به PEI مانع از برهمکنش مستقیم بین غشاء و گروه‌های آمین در این پلیمر می‌گردد، این در حالیست که ممانعتی جهت برهکنش و فشرده‌سازی DNA به دلیل ساختار رشته‌ای و متفاوت DNA با غشاء سلولی فراهم نمی‌کند [۹]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اتصال PEG به PEI نه تنها مانع از برهمکنش و خنثی‌سازی بار منفی DNA نشد، بلکه بطور قابل توجهی سمیت پلیمر PEI در نانوکپسول‌های حاوی PEI (PPG، PPF و PPGF) در مقایسه با کمپلکس PEI/DNA گردید (شکل ۸) علاوه‌براین، اتصال PEG به سطح نانوکپسول‌ها با افزایش چشمگیر نیمه‌عمر آن‌ها در سیستم گردش خون همراه است، در حالی که اندازه نانوذرات کاتیونی و هیدروفوبیک به دلیل برهم‌کنش با پلی‌آنیون‌ها و هم‌چنین پروتئین‌های موجود در پلاسما به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد [۱۰]. اتصال PEG به نانوذرات کاتیونی و آبگریز سبب می‌شود تا برهمکنش این ترکیبات با اجزاء تشکیل دهنده خون به حداقل برسد، در نتیجه اندازه نانومتری آن‌ها حفظ می‌گردد، اما افزایش اندازه ذرات بازده انتقال دارو و ژن را بطور قابل توجهی کاهش می‌دهد. بنابراین اصلاح سطحی نانوذرات علاوه بر حفظ بازده انتقال دارو و ژن، ماندگاری آن در سیستم گردش خون را نیز افزایش می‌دهد [۳۴]. از نانوذرات عامل‌دار شده با لیگاندهای سطحی برای رهایش هدفمند ژن‌ها و داروها به سلول‌های دارای گیرنده‌های خاص استفاده شده است [۳۵]. از آنجایی که سلول‌های سرطانی سطح بالایی از گیرنده‌های گلوکز و اسیدفولیک در سطح خود دارند [۱۶]، از این لیگاندها می‌توان برای اصلاح سطحی نانوذرات به منظور هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی استفاده نمود [۳۶]. در دهه‌های اخیر، مطالعات بسیاری برای انتقال هدفمند داروها و یا قطعات ژنی به سلول‌های سرطانی با استفاده از اسیدفولیک انجام شده است [۱۸]. تحقیقات گذشته نشان داده است که هدفمند کردن نانوذرات با اسیدفولیک نقش مهمی در افزایش اثر دارو و کاهش عوارض آن دارد [۳۷]. Komuro و همکارانش (۲۰۱۹) نشان دادند که جذب گلوکز در سلول‌های سرطانی به دلیل فعالیت متابولیسی بسیار بالا نسبت به سلول‌های نرمال به‌طور قابل توجهی افزایشی است [۳۸]. هدف‌گیری سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای اندوسیتوزی به دلیل تعداد محدود گیرنده‌های سطحی با چالش‌های جدی همراه است. در سال‌های اخیر، پژوهشگران برای غلبه بر این مشکل تلاش کرده‌اند و یکی از رویکردهای مؤثر، اتصال چندین لیگاند هدفمند بر سطح نانوذرات بوده است [۲۷]. در این مطالعه، ما از نانوکپسول‌های مبتنی بر PEG-PEI که بر سطح خود حامل گیرنده‌های فولیک‌اسید و گلوکز هستند، برای انتقال و رهایش DNA (پلاسمید pEGFP-N1) به سلول‌های سرطانی Hs-578T استفاده نمودیم. نتایج حاصل از بررسی بازده انتقال ژن با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که نانوکپسول‌هایی که حاوی هر دو لیگاند فولیک‌اسید و گلوکز در سطح خود بودند (PPGF) در

مقایسه با نانوذراتی که تنها یک لیگاند فولیک‌اسید (PPF/DNA) و یا گلوگز (PPG/DNA) بودند بازده انتقال ژن را به طور قابل توجهی افزایش دادند (شکل ۱۰).

۵- نتیجه گیری

این مطالعه پس از بررسی منابع مختلف و با هدف بهبود سیستم‌های ارائه شده در تحقیقات سال‌های اخیر و همچنین افزایش کارایی این سیستم‌ها طراحی و انجام گرفت. بنابراین پلیمر PEI به عنوان یکی از پربازده‌ترین پلیمرهای مورد استفاده در انتقال ژن انتخاب گردید و مشکلات آن از جمله سمیت بالا و برهمکنش آن با پلی‌آنیون‌ها و همچنین پایداری کم آن در سیستم گردش خون با استفاده از اتصال PEG به آن برطرف گردید. علاوه‌براین در این تحقیق از گلوگز و فولیک‌اسید به منظور هدفمندسازی نانوکپسول‌ها جهت انتقال و رهایش هدفمند DNA (پلاسمید pEGFP-N1) به بافت سلول‌های سرطان پستان استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد اتصال PEG سبب کاهش سمیت پلیمر PEI بطور قابل توجهی شد. این در حالی بود که توانای این نانوناقل در برهمکنش با DNA و خنثی‌سازی بار منفی آن دستخوش تغییر قرار نگرفت. همچنین نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که استفاده همزمان از فولیک‌اسید و گلوگز یک استراتژی موثر و کارآمد جهت بهبود بازده انتقال هدفمند دارو و ژن به سلول‌های سرطانی Hs-578T می‌باشد.

۷- فهرست منابع و ماخذ

- [1] Ahmad, A. (2019). Breast cancer statistics: recent trends. *Breast cancer metastasis and drug resistance: challenges and progress*, 1-7.
- [2] Bourang, S., Noruzpour, M., Jahanbakhsh Godekahriz, S., Ebrahimi, H. A. C., Amani, A., Asghari Zakaria, R., & Yaghoubi, H. (2024). Application of nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(9), 6459-6505.
- [3] Behranvand, N., Nasri, F., Zolfaghari Emameh, R., Khani, P., Hosseini, A., Garssen, J., & Falak, R. (2022). Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer immunology, immunotherapy*, 71(3), 507-526.
- [4] Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., & Emuowhochere, R. (2017). Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 45-51.
- [5] Noruzpour, M., Zakaria, R. A., Zare, N., Bourang, S., Ebrahimi, H. A., & Granados-Principal, S. (2025). Delivery of Moringa oleifera extract via PLA-PEG-FA/chitosan-PLA NPs into breast cancer cell lines. *BioNanoScience*, 15(2), 287.
- [6] Mosleh-Shirazi, S., Abbasi, M., reza Moaddeli, M., Vaez, A., Shafiee, M., Kasaei, S. R., ... & Hatam, S. (2022). Nanotechnology advances in the detection and treatment of cancer: an overview. *Nanotheranostics*, 6(4), 400.

- [7] Casper, J., Schenk, S. H., Parhizkar, E., Detampel, P., Dehshahri, A., & Huwyler, J. (2023). Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 362, 667-691.
- [8] Amani, A., Kabiri, T., Shafiee, S., & Hamidi, A. (2019). Preparation and characterization of PLA-PEG-PLA/PEI/DNA nanoparticles for improvement of transfection efficiency and controlled release of DNA in gene delivery systems. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 18(1), 125.
- [9] Abebe, D. G., Kandil, R., Kraus, T., Elsayed, M., Merkel, O. M., & Fujiwara, T. (2015). Three-layered biodegradable micelles prepared by two-step self-assembly of PLA-PEI-PLA and PLA-PEG-PLA triblock copolymers as efficient gene delivery system. *Macromolecular bioscience*, 15(5), 698-711.
- [10] Wang, Z., Ye, Q., Yu, S., & Akhavan, B. (2023). Poly ethylene glycol (PEG)-based hydrogels for drug delivery in cancer therapy: a comprehensive review. *Advanced healthcare materials*, 12(18), 2300105.
- [11] Bourang, S., Noruzpour, M., Azizi, S., Yaghoubi, H., & Ebrahimi, H. A. (2024). Synthesis and in vitro characterization of PCL-PEG-HA/FeCo magnetic nanoparticles encapsulating curcumin and 5-FU. *Nanomedicine Journal*, 11(2).
- [12] Ke, X., Shelton, L., Hu, Y., Zhu, Y., Chow, E., Tang, H., ... & Mao, H. Q. (2020). Surface-functionalized PEGylated nanoparticles deliver messenger RNA to pulmonary immune cells. *ACS applied materials & interfaces*, 12(32), 35835-35844.
- [13] Mohajeri, S., Dashti, S., Noruzpour, M., Bourang, S., & Yaghoubi, H. (2025). Design and preparation of PLA-chitosan-PEG-glucose copolymer for combined delivery of Paclitaxel and siRNA. *Discover Applied Sciences*, 7(8), 801.
- [14] Bourang, S., Asadian, S., Noruzpour, M., Mansuryar, A., Azizi, S., Ebrahimi, H. A., & Amani Hooshyar, V. (2024). PLA-HA/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles loaded with curcumin: physicochemical characterization and toxicity evaluation in HCT116 colorectal cancer cells. *Discover Applied Sciences*, 6(4), 186.
- [15] Bourang, S., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Noruzpour, M., Asghari Zakaria, R., & Granados-Principal, S. *Anticancer properties of copolymer nanoparticles loaded with Foeniculum vulgare derivatives in Hs578T and SUM159 cancer cell lines. Cancer Nano. 2025; 16: 1–28.*
- [16] Narmani, A., Rezvani, M., Farhood, B., Darkhor, P., Mohammadnejad, J., Amini, B., ... & Abdi Goushbolagh, N. (2019). Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug development research*, 80(4), 404-424.
- [17] Ramalho, M. J., Alves, B., Andrade, S., Lima, J., Loureiro, J. A., & Pereira, M. C. (2024). Folic-acid-conjugated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with gallic acid induce glioblastoma cell death by reactive-oxygen-species-induced stress. *Polymers*, 16(15), 2161.

- [18] Soltani, M., Ahmadzadeh, N., Nasiraei Haghighi, H., Khatamian, N., & Homayouni Tabrizi, M. (2025). Targeted cancer therapy potential of quercetin-conjugated with folic acid-modified nanocrystalline cellulose nanoparticles: a study on AGS and A2780 cell lines. *BMC biotechnology*, 25(1), 29.
- [19] Rostami, N., Gomari, M. M., Abdouss, M., Moeinzadeh, A., Choupani, E., Davarnejad, R., ... & Bencherif, S. A. (2023). Synthesis and characterization of folic acid-functionalized DPLA-co-PEG nanomicelles for the targeted delivery of letrozole. *ACS Applied Bio Materials*, 6(5), 1806-1815.
- [20] Hamimed, S., Jabberi, M., & Chatti, A. (2022). Nanotechnology in drug and gene delivery. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 395(7), 769-787.
- [21] Lin, P. H., Huang, C., Hu, Y., Ramanujam, V. S., Lee, E. S., Singh, R., ... & Chew, S. Y. (2023). Neural cell membrane-coated DNA nanogels as a potential target-specific drug delivery tool for the central nervous system. *Biomaterials*, 302, 122325.
- [22] Angusamy, A., Palanisamy, S., Ravi, S., Kumaresan, M., Mohandoss, S., You, S., & Ramar, M. (2025). Investigation of antioxidant, antibacterial, anticancer and wound healing properties of eco-friendly synthesized copper oxide nanoparticles from *Plumeria rubra* leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 48(8), 1295-1310.
- [23] Ahmadi-Nouraldinvand, F., Bourang, S., Azizi, S., Noori, M., Noruzpour, M., & Yaghoubi, H. (2024). Preparation and characterization of multi-target nanoparticles for co-drug delivery. *Medicine in Drug Discovery*, 21, 100177.
- [24] Mohajeri, S., Yaghoubi, H., Bourang, S., & Noruzpour, M. (2025). Multifunctional magnetic nanocapsules for dual delivery of siRNA and chemotherapy to MCF-7 cells (Breast cancer cells). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-23.
- [25] Noruzpour, M., Asghari, Z. R., Zare, N., Ebrahimi, H. A., Parsa, H., & Bourang, S. (2024). Investigating the anticancer properties of the essential oil and aqueous extract of *Moringa oleifera* and its biosynthesized metal nanoparticles on MCF-7 and BT-549 cell lines.
- [26] Bourang, S., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Asghari Zakaria, R., Parsa, H., & Noruzpuor, M. (2024). Green synthesis of iron oxide, copper, zinc oxide and silver nanoparticles from aqueous extract of *F. vulgare* and evaluation of their structural and antimicrobial properties. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 60-88.
- [27] Mohajeri, S., Fathi Erdi, A., & Yaghoubi, H. (2026). Targeted gene delivery to MCF-7 cells via polyspermine-PEG-glucose/DNA nanoparticles: Preparation and characterization. *Molecular Biotechnology*, 68(3), 1470-1488.
- [28] Zhang, H., Qin, Z., Shi, S., Li, Y., Song, Y., & Zhang, Y. (2024). Construction and Identification of Eukaryotic Expression Vector pEGFP-N1-MIC-1 for Mouse MIC-1 Gene and Its Effect on Gastric Cancer Cells. *Analytical Cellular Pathology*, 2024(1), 2165242.

- [29] Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137-146.
- [30] Khalid, A., Ahmed, R. M., Taha, M., & Soliman, T. S. (2023). Fe₃O₄ nanoparticles and Fe₃O₄@SiO₂ core-shell: synthesis, structural, morphological, linear, and nonlinear optical properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 947, 169639.
- [31] Cai, X., Dou, R., Guo, C., Tang, J., Li, X., Chen, J., & Zhang, J. (2023). Cationic polymers as transfection reagents for nucleic acid delivery. *Pharmaceutics*, 15(5), 1502.
- [32] Jia, W., Wu, Y., Xie, Y., Yu, M., & Chen, Y. (2025). Advanced polymeric nanoparticles for cancer immunotherapy: materials engineering, immunotherapeutic mechanism and clinical translation. *Advanced Materials*, 37(8), 2413603.
- [33] Xu, L., Cao, Y., Xu, Y., Li, R., & Xu, X. (2024). Redox-Responsive polymeric nanoparticle for nucleic acid delivery and cancer therapy: progress, opportunities, and challenges. *Macromolecular bioscience*, 24(3), 2300238.
- [34] Liu, M., Chu, Y., Liu, H., Su, Y., Zhang, Q., Jiao, J., ... & Song, Y. (2019). Accelerated blood clearance of nanoemulsions modified with PEG-cholesterol and PEG-phospholipid derivatives in rats: the effect of PEG-lipid linkages and PEG molecular weights. *Molecular pharmaceutics*, 17(4), 1059-1070.
- [35] Mansuryar, A., Bourang, S., Noruzpour, M., Ebrahimi, H. A., Amani, A., Granados-Principal, S., & Calahorra, J. (2025). The effect of Fe₃O₄ biosynthesized through the green synthesis of *Silybum marianum* and HA in the targeted delivery of 5-Fluorouracil to HCT116 cell line. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(2), 27.
- [36] Wang, C., Wang, Q., Wang, H., Li, Z., Chen, J., Zhang, Z., ... & Li, Z. (2023). Hydroxyethyl starch-folic acid conjugates stabilized theranostic nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 353, 391-410.
- [37] Qenawi, N., Aziz, A. E., Asmaa, M., Tawfik, W., & Elfeky, S. A. (2025). Innovative graphene oxide-folic acid-MoS₂ nanocomposite for targeted near-infrared photothermal cancer therapy. *Egyptian Journal of Chemistry*, 68(11), 363-375.
- [38] Komuro, H., Sasano, T., Horiuchi, N., Yamashita, K., & Nagai, A. (2019). The effect of glucose modification of hydroxyapatite nanoparticles on gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(1), 61-66.