

اثر پتید مشتق از سم عقرب بر افزایش میزان نفوذ دوکسوروبیسین متصل به نانوذرات طلا در سلول‌های HeLa و MDA-MB-231

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۷/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: پتیدهای نفوذکننده در سلول (CPPs) می‌توانند از غشای سلولی عبور کنند و با قابلیت حمل مولکول‌های مختلف به درون سیتوپلاسم سلول‌ها در زمینه رهایش دارویی، ژن درمانی و درمان سرطان مورد استفاده قرار بگیرند. نانوذرات طلا کروی (GNPs) بدلیل سنتز آسان، حلالیت بالا، پراکنش نوری فوق العاده و عدم سمیت ابزار مناسبی برای تصویربرداری مولکولی می‌باشند. در این مطالعه از یکی از پتیدهای مشتق از پتید ماروکلسین (MCa) سم عقرب (MCa_{UF1-9-C}) برای اتصال به نانوذرات طلا استفاده شد تا قابلیت نفوذ انتخابی داروی ضدسرطان متصل به سامانه پتید-نانوذره، به رده‌های سلولی سرطانی و میزان مرگ و میر سلولی حاصل از آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش‌ها: سلول‌های HeLa و MDA-MB-231 با غلظت ۵۰۰ نانومولار داروی ضدسرطان دکسوروبیسین (DOX) متصل به GNP (DOX-GNP) و MCa_{UF1-9-C}-GNP (DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP) تیمار شدند و میزان مرگ میر سلولی آن‌ها با استفاده از روش MTT اندازه گیری گردید. نفوذ کیفی نانوذرات طلا به درون سلول‌ها با استفاده از میکروسکپ زمینه تاریک و نفوذ کمی آن‌ها با کمک طیف سنجی جذب اتمی (AAS) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: حدود ۸۷٪ از سلول‌های HeLa بعد از تیمار با DOX-GNP و DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP زنده باقی ماندند؛ درحالیکه درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 پس از تیمار با DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP، ۳۰٪ کاهش یافت. بعلاوه مطالعه با میکروسکپ زمینه تاریک نشان داد که نفوذ نانوذرات DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP در سلول‌های MDA-MB-231 بیشتر از سلول‌های HeLa می‌باشد. داده‌های حاصل از طیف سنجی جذب اتمی نیز نشان‌دهنده ۳۳٪ برداشت نانوذرات DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP در سلول‌های MDA-MB-231 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان داد سامانه پتید-نانوذره می‌تواند ابزار مناسبی برای طراحی یک سیستم رهایش دارو با قابلیت نفوذ انتخابی باشد.

کلمات کلیدی: ماروکلسین، نانوذره طلا، دوکسوروبیسین، جذب سلولی، سمیت سلولی.

صدیقه خامه چیان^۱، سامان حسینخانی^۲، مریم نیکخواه^۲

^۱ بخش تحقیق و تولید سرم‌های درمانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
^۲ گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

بخش تحقیق و تولید سرم‌های درمانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۰۲۶۴۵۷۰۰۳۸

E-mail: s.khamehchian@rvsri.ac.ir

مقدمه

سیستم‌های انتقال دارو به درون سلول به عنوان روش‌های موثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند. فاکتورهای مختلفی بر کاربرد موفق این سیستم‌ها تاثیرگذار است که از جمله می‌توان به راندمان بالای ورود آن‌ها به درون سلول، بارگیری بالای داروها، عدم تخریب داروها در فضای خارج سلولی، حداقل سمیت و تحریک سیستم ایمنی اشاره کرد. مطالعات بسیاری بر روی حامل‌های ویروسی و غیرویروسی نظیر لپوزوم‌ها، پروتئین‌ها و پپتیدهای نفوذکننده در سلول (CPP) که در ره‌ایش داخل سلولی داروها نقش داشته اند، انجام شده است.^{۱-۵} از بین این حامل‌ها، پپتیدهای نفوذکننده در سلول دارای مزایای متعددی در ره‌ایش داروها می‌باشند که از جمله می‌توان به ساخت آسان و امکان اصلاح توالی آن‌ها اشاره کرد.^{۶-۷} از میان پپتیدهای نفوذکننده متداول، می‌توان به پپتید TAT اشاره کرد که با وجود توانایی بالا در نفوذ به سلول، دارای قابلیت ورود انتخابی به داخل سلول‌ها که به ویژه در درمان سرطان حائز اهمیت است، نمی‌باشد.^۸ رنگ‌های فلورسانس آلی بصورت بسیار گسترده ای در تصویربرداری مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما استفاده از آن‌ها با مشکلاتی مانند عدم حلالیت و کاهش نور همراه می‌باشد.^{۹-۱۱} نانوذراتی نظیر نانوذرات طلا، نقره، نقاط کوانتومی و ذرات مغناطیسی در زمینه تصویربرداری بیولوژیک و ره‌ایش دارو مورد مطالعه قرار گرفته اند.^{۱۲-۱۵} نانوذرات طلای کروی (GNPs) دارای مزایای متعددی از جمله زیست سازگاری، حلالیت و توانایی منحصر به فرد در اتصال به مولکول‌های بیولوژیک و نیز خواص فیزیکی فوق العاده نظیر جذب و پراکندگی نوری بسیار بالا می‌باشند. بنابراین نانوذرات طلا به خوبی در ره‌ایش مولکول‌های مختلف مانند DNA، siRNA، و پروتئین‌ها موثر بوده و همچنین در تصویربرداری مولکولی سلول‌ها و بافت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند.^{۱۶}

ماروکلسین (Maurocalcine) با نام اختصاری MCa، پپتیدی است که از ۳۳ اسید آمینه تشکیل شده و اولین بار از سم یک عقرب تانزانایی به نام *Maurus palmatus* جدا شده است.^{۱۶} ماروکلسین علاوه بر فعال سازی کانال کلسیمی، به عنوان پپتید

نفوذکننده نیز عمل کرده و می‌تواند مواد مختلف از جمله پروتئین‌ها^{۱۷}، پپتیدها^{۱۸}، مولکول‌های رنگی کوچک^{۱۹}، داروها^{۲۰-۲۳} و نانوذرات^{۲۴، ۲۵} را بارگیری کند. تمامی قطعات پپتیدی مشتق از ماروکلسین قابلیت نفوذ بیشتری نسبت به شکل تانخورده این پپتید با ۳۳ آمینواسید، نشان داده اند که حاکی از آن است که هر یک از نواحی (Domains) موجود در ماروکلسین اکسید شده و تاخوردیده به صورت اختصاصی در فرایند نفوذ پپتید به داخل سلول نقش دارند. از میان این پپتیدها، MCa_{UF1-9} (UF به مفهوم تانخورده و ۹-۱ نشان‌دهنده تعداد آمینواسیدها می‌باشد) دارای بار خالص صفر بوده و خواص مربوط به نفوذ آن به سلول در مقایسه با سایر پپتیدهای حاصل از ماروکلسین که دارای میزان قابل توجهی بار مثبت می‌باشند، تا اندازه ای متفاوت است.^{۱۹} در این مطالعه، MCa_{UF1-9}C به عنوان پپتید نفوذکننده به سلول به نانوذرات طلا متصل گردید. پپتید MCa_{UF1-9}C در انتهای کربوکسیلیک خود دارای یک اسید آمینه سیستین اضافی می‌باشد که به واسطه دارا بودن عامل تیول (-SH) امکان اتصال پپتید با نانوذره را فراهم می‌کند. نانوذره طلا به عنوان عامل تصویربرداری عمل کرده و با کمک پپتیدهای متعدد متصل به خود، با سلول‌ها وارد واکنش می‌شود. این سامانه با اتصال داروی ضدسرطان بروی سطح نانوذرات می‌تواند به ره‌ایش درون سلولی دارو کمک کند. بنابراین توانمندی این سامانه در ره‌ایش دارو در دو سلول سرطانی مختلف با اتصال به داروی دوکسوروبیسین (DOX) مورد مطالعه قرار گرفت. دوکسوروبیسین یک داروی ضدسرطان بوده که در میان DNA جای گرفته و بیوسنتز ماکرومولکولی را متوقف می‌کند.^{۲۱}

مواد و روش‌ها

مواد

پپتید MCa_{UF1-9}C (پپتید سنتتیک مشتق از سم ماروکلسین عقرب) از شرکت تکاپوزیست نماینده شرکت Peptron کشور کره، رده‌های سلولی HeLa و MDA-MB-231 از بانک ژن و سلول موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، و دوکسوروبیسین (DOX) از شرکت Sigma-Aldrich.

روش‌ها

سنتز نانوذرات طلا

نانوذرات طلا براساس روش Frens^{۲۷} سنتز شدند. به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ۰/۰۱ درصد تتراکلرواوریک اسید در حال جوش، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول تری سدیم سیترات دی هیدرات ۱ درصد به عنوان عامل احیایی اضافه گردید. بعد از این مرحله، رنگ محلول از زرد به بی رنگ و در نهایت به قرمز تغییر یافت. این محلول پس از تغییر رنگ به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سپس گرمادهی متوقف گردید.

عامل دار کردن نانوذرات طلا با پپتید MCa_{UF9-1-C} و تعیین

مشخصات فیزیکوشیمیایی آن‌ها

به منظور اتصال پپتید به نانوذرات طلای کروی، ابتدا غلظت ۰/۱ مولار از پپتید MCa_{UF1-9-C} (با توالی GDALPHLKL-C، وزن مولکولی ۱۰۶۶ و خلوص بیش از ۹۰٪)، تهیه گردید. به این منظور ۱ میلی گرم از پپتید در ۹/۳۸ میلی لیتر از بافر فسفات سالین (PBS) حل گردید. سپس ۱ میکرولیتر از محلول پپتیدی تهیه شده به ۱ میلی لیتر از نانوذرات طلا اضافه گردید تا غلظت ۱۰۰ نانومولار پپتید فراهم گردد. محلول پپتید-نانوذره طلا به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه بروی همزن قرار گرفت تا امکان اتصال پپتید با نانوذرات فراهم شود. نانوذرات عامل دار شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شدند. این عمل چندین بار تکرار گردید و هر بار با آب مقطر شستشو گردید تا تمام پپتید متصل نشده موجود در محلول رویی پپتید-نانوذره حذف شود^{۲۸}. مشخصات فیزیکوشیمیایی نانوذرات طلای آزاد و متصل به پپتید بوسیله طیف سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis spectrophotometry)، و عکسبرداری میکروسکپ الکترونی عبوری (TEM) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین سایز، شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI)، و پتانسیل زتای این نانوذرات توسط اندازه گیری تفرق نور پویا (DLS) بررسی شد.

اتصال دوکسورویسین به نانوذره ی طلا

دوکسورویسین یک داروی پودری قرمز رنگ است که در دمای محیط و دور از نور نگهداری می‌شود و پس از حل شدن در

آب مقطر، در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرد. جهت اتصال دوکسورویسین به نانوذره طلا، غلظت ۱۰-۰/۵ میکرومولار از دوکسورویسین به ۱ میلی لیتر از محلول نانوذرات طلا اضافه گردید. اتصال دوکسورویسین به نانوذره از نوع میانکنش الکترواستاتیک می‌باشد. آمیزه پپتید و نانوذره به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه بروی همزن مغناطیسی قرار داده شد. پس از این مرحله، محلول بدست آمده با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و این عمل چندین بار تکرار گردید و هر بار با آب مقطر شستشو گردید تا تمام دوکسورویسین متصل نشده، از این محلول خارج شود^{۲۸}. اتصال دوکسورویسین به نانوذرات طلا با استفاده از روش DLS و طیف سنجی فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

تیمار سلول‌ها با نانوذرات متصل به دوکسورویسین

تعداد ۲۰۰۰۰ سلول از سلول‌های سرطانی HeLa (سلول سرطانی دهانه رحم انسان) و MDA-MB-231 (سلول سرطانی سینه انسان) با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل (محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد از سرم FB (Fetal bovine serum) و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین penicillin-estreptomycin (PS))، در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ای، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید. پس از سه مرتبه شستشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره آزاد (GNP)، غلظت ۱۰-۱۰۰۰۰۰ نانومولار دوکسورویسین، DOX-GNP و DOX-MCa_{UF1-9-C}-GNP، به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط قبلی انکوبه گردید. پس از شستشوی مجدد، پلیت حاوی سلول‌ها به منظور آزادسازی دوکسورویسین از نانوذره به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. در نهایت پس از شستشوی مرحله آخر، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰٪ رنگ MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) به چاهک‌ها افزوده شد و بعد از گذشت یک دوره انکوباسیون ۳ ساعته، جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه Reader خوانده شد. در نهایت درصد سلول‌های زنده با در نظر

یافته‌ها

تعیین مشخصات نانوذرات طلای آزاد (GNP)، و نانوذرات

متصل به پیتید (MCa_{UF1-9}-C-GNP)

شکل ۱ طیف‌های پلاسما سطحی نانوذرات طلا را به صورت آزاد و در واکنش با غلظت ۱۰۰ نانومولار پیتید MCa_{UF1-9}-C نشان می‌دهد. در این غلظت از پیتید، شدت جذب نانوذره آزاد در طول موج ۵۲۰ نانومتر که بیشینه جذب آن می‌باشد، کاهش یافت. کاهش جذب، نشان دهنده جذب پیتید بر روی سطح نانوذره می‌باشد.

شکل ۲ (الف و ب)، تصویر میکروسکپ الکترونی نانوذرات تولید شده در حالت آزاد و متصل به پیتید MCa_{UF1-9}-C را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، مورفولوژی اکثر نانوذرات در حالت آزاد و متصل به پیتید کروی و شبه کروی (چند وجهی) می‌باشد، اگرچه در حالت متصل به پیتید (شکل ۲-ب)، شکل‌های چند وجهی و نامتقارن بیشتری در بین نانوذرات دیده می‌شود. در این تصویر، یکنواختی کمتری بین اندازه نانوذرات نسبت به تصویر ۲-الف مشاهده می‌شود.

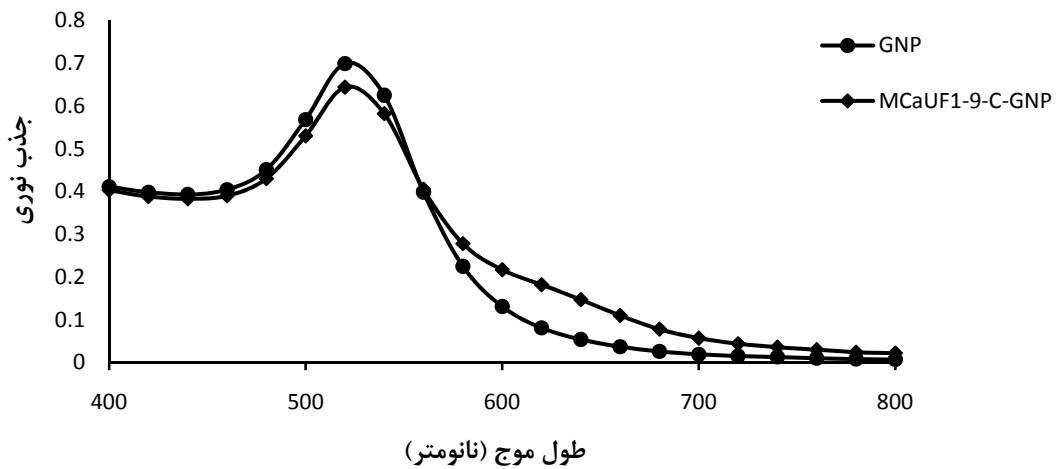
جدول ۱ داده‌های حاصل از پارامترهای اندازه‌گیری شده در روش DLS را نشان می‌دهد. میانگین سایز نانوذرات آزاد در این روش، ۵۳/۵۴ نانومتر و شاخص توزیع اندازه (PDI) آن‌ها نیز ۰/۲۴ بدست آمد. PDI بدست آمده نشان داد که یکنواختی نسبتاً خوبی بین اندازه نانوذرات وجود دارد. همچنین میانگین اندازه نانوذرات متصل به MCa_{UF1-9}-C (MCa_{UF1-9}-C-GNP) و PDI آن‌ها، به ترتیب ۸۵ نانومتر و ۰/۳۵ بدست آمد که نسبت به نانوذرات آزاد بالاتر بوده و نشان دهنده موندیسپرسیتهی کمتر این نانوذرات می‌باشد. علاوه بر سایز و توزیع اندازه ذرات، پارامتر دیگری که با استفاده از اندازه‌گیری DLS بررسی گردید، زتا پتانسیل نانوذرات در حالت آزاد و متصل به پیتید بود. نتایج این بررسی نشان داد که با اتصال نانوذره به پیتید MCa_{UF1-9}-C، زتا پتانسیل آن از ۳۱/۶- به ۱۷/۲- کاهش یافته است. کاهش بار منفی GNP نیز تایید دیگری بر اتصال پیتیدهاست.

گرفتن چاهک کنترل که تنها حاوی محیط بوده و ۱۰۰ درصد سلول‌ها زنده در نظر گرفته شده اند، محاسبه گردید.^۸

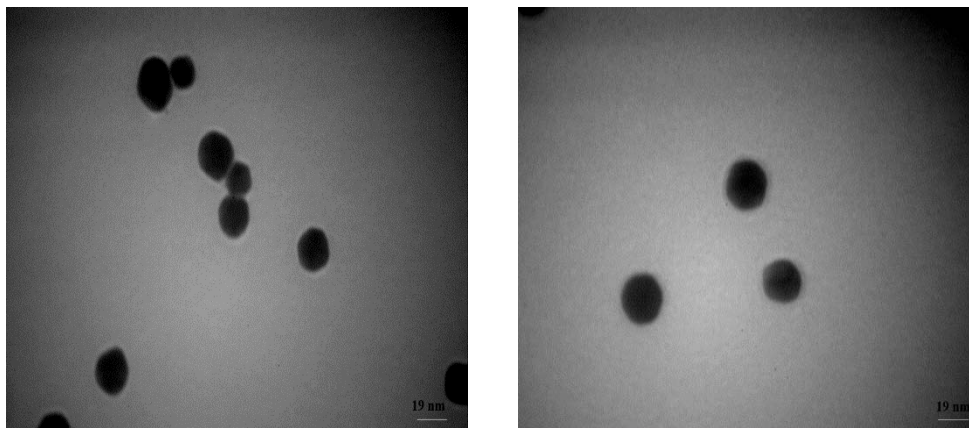
بررسی نفوذ کمپلکس‌های دوکسوروبیسین در سلول‌های سرطانی برای مطالعه جذب نانوذرات عامل دار شده در سلول‌های HeLa و MDA-MB-231، از هر نوع سلول، روی لامل‌هایی به سایز ۱۸×۱۸ میلی‌متر که از قبل داخل چاهک‌های پلیت ۶ خانه ای جای گرفته بودند، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از GNP و DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP بروی هر یک از سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط قبلی انکوبه شدند. پس از شستشو، سلول‌ها در متانول فیکس شدند. سپس سلول‌ها براساس خاصیت پراکنش نوری نانوذرات طلا، زیر میکروسکپ زمینه تاریک Olympus مطالعه گردیدند.^۸

سنجش کمی نفوذ کمپلکس‌های دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی

برای مطالعه کمی نفوذ کمپلکس‌های دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی، از روش طیف سنجی جذب اتمی استفاده گردید.^{۲۹} به این منظور تعداد ۱۰^۴ سلول از هر یک از سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 در چاهک‌های میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای، با حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، کشت شدند و برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از DOX-GNP، و DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP، به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط قبلی انکوبه گردیدند. پس از سه مرتبه شستشو با PBS، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تریپسین-EDTA به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و برای مدت ۴-۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. برای لیز کردن سلول‌ها، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول تیزاب سلطانی (Agua regina) به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط انکوبه گردید. پس از گذشت این دوره انکوباسیون حجم هر یک از نمونه‌ها به وسیله آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و محتوای طلای آن‌ها اندازه‌گیری شد.



شکل ۱: طیف جذبی نانوذره طلا به تنهایی (GNP)، و نانوذره بعد از اتصال به پیپتید $MCA_{UF1-9-C}$ ($MCA_{UF1-9-C-GNP}$ ، ۱۰۰ نانومولار)



شکل ۲: تصاویر TEM نانوذرات طلا (الف) و $MCA_{UF1-9-C-GNP}$ (ب)

جدول ۱: تعیین مشخصات نانوذرات GNP و $MCA_{UF1-9-C-GNP}$ از طریق اندازه گیری DLS

سایز (نانومتر)	شاخص توزیع اندازه ذرات	زتا پتانسیل (میلی ولت)
۵۳/۵۴	۰/۲۴	-۳۱/۶
۸۵	۰/۳۵	-۱۷/۲

جدول ۲: تعیین مشخصات نانوذرات DOX-GNP و DOX- $MCA_{UF1-9-C-GNP}$ از طریق اندازه گیری DLS

سایز (نانومتر)	شاخص توزیع اندازه ذرات
۵۸/۱۰	۰/۲۸
۹۰/۷۹	۰/۳۰۷

نانوذرات قبلی (فاقد دوکسوروبیسین) بالاتر بوده و نشان‌دهنده اتصال دوکسوروبیسین به این ذرات است. در حالی که تا اندازه ای PDI آن کاهش پیدا کرده و اتصال دوکسوروبیسین توانسته به یکنواختی اندازه نانوذرات کمک کند.

بررسی اثر سمیت نانوذرات طلای متصل به دوکسوروبیسین (DOX-GNP، DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP) بر سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231

بعد از تأیید اتصال دوکسوروبیسین به نانوذرات طلا، میزان سمیت کمپلکس‌های ایجاد شده بروی سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231، توسط تست MTT سنجش گردید. نمودارهای ۲-الف، و ب، درصد بقای سلول‌های تیمار شده، پس از گذشت ۲ ساعت را نشان می‌دهد. در سلول‌های HeLa (نمودار ۲-الف)، درصد بقای سلول پس از تیمار با محلول ۰/۵ میکرومولار دوکسوروبیسین آزاد، DOX-GNP، و DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP به ترتیب ۸۷/۹۵٪، ۸۷/۱۲٪، و ۸۷/۶۲٪ محاسبه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که درصد بقای سلول در اثر اتصال دوکسوروبیسین به نانوذرات طلا، نسبت به دوکسوروبیسین آزاد تفاوتی نداشته است؛ در صورتیکه درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 (نمودار ۲-ب) پس از تیمار با DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP نسبت به دوکسوروبیسین آزاد با درصد بقا ۱۰۰٪، ۳۰٪ کاهش نشان داده است که با توجه به جذب ۳۱٪ دوکسوروبیسین بروی آن، درصد قابل توجهی می‌باشد.

نفوذ نانوذرات DOX-GNP، DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP در سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231

برای بررسی کیفی نفوذ نانوذرات متصل به دوکسوروبیسین، هر یک از انواع سلول‌های سرطانی HeLa، و MDA-MB-231، بوسیله میکروسکپ زمینه تاریک مورد مطالعه قرار گرفتند. تصاویر بدست آمده نشان داد که نفوذ DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP در سلول‌های MDA-MB-231 نسبت به سلول‌های HeLa بیشتر می‌باشد. بعلاوه اثری از نفوذ نانوذره DOX-GNP به درون هیچ یک از سلول‌های سرطانی مشاهده نگردید (شکل ۳).

تعیین غلظت بهینه دوکسوروبیسین جهت اتصال به نانوذرات طلا

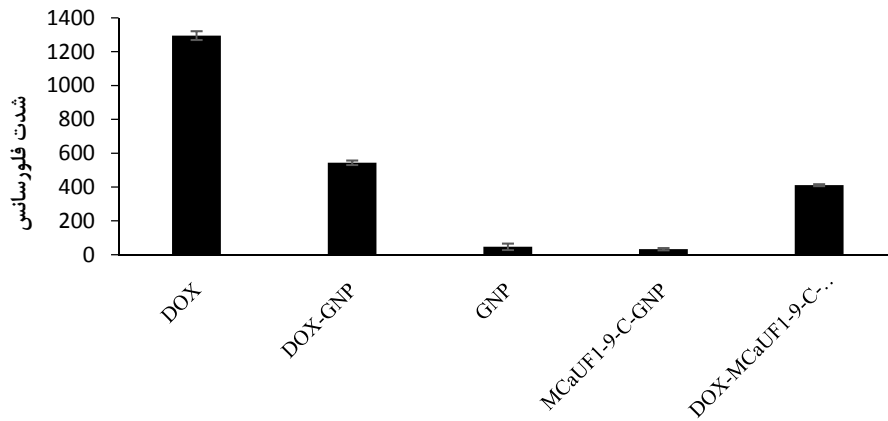
به منظور تعیین غلظت بهینه دوکسوروبیسین، غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱۰ میکرومولار از دوکسوروبیسین به ۱ میلی لیتر از نانوذرات (GNP، و MCa_{UF1.9}-C-GNP) اضافه گردید و مشخص شد که غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار دوکسوروبیسین پس از گذشت دوره انکوباسیون منجر به تجمع نانوذره می‌گردند، در حالی که در غلظت ۰/۵ میکرومولار (۵۰۰ نانومولار) دوکسوروبیسین، محلول نانوذره طلا و کژوگه پپتیدی آن، پایداری خود را حفظ می‌کنند.

تعیین مشخصات نانوذرات طلای متصل به دوکسوروبیسین (DOX-GNP و DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP)

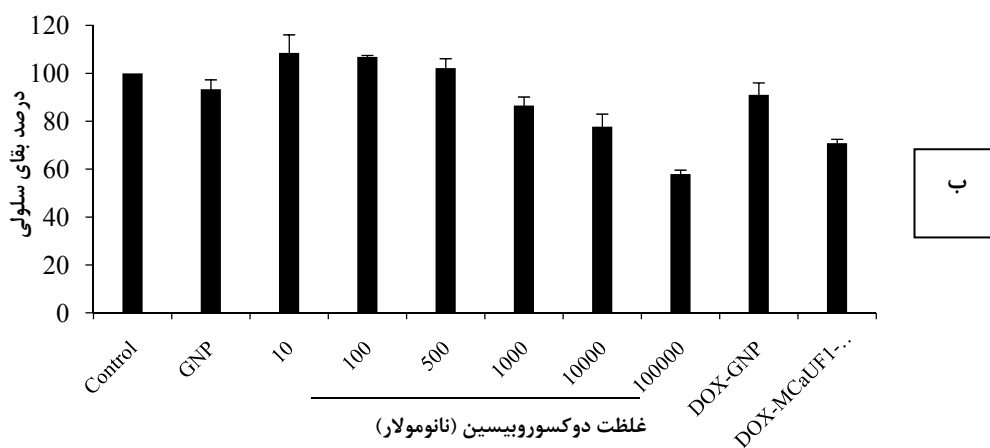
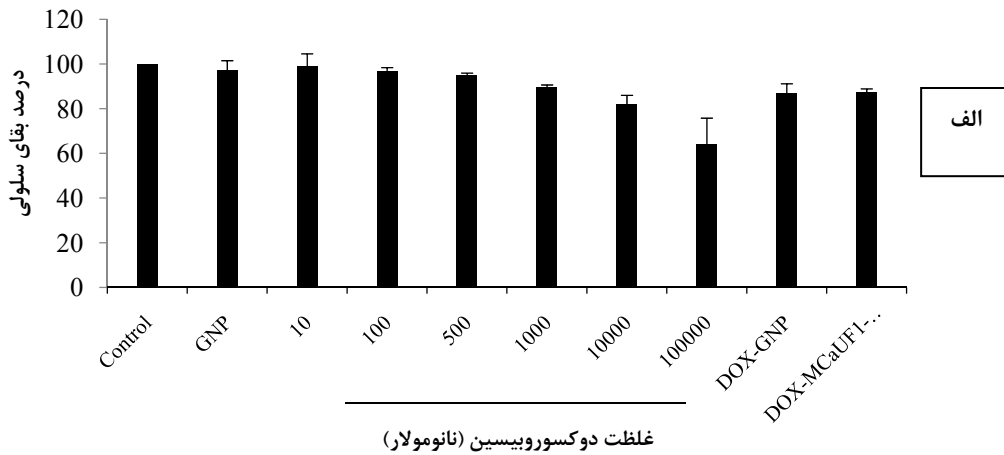
برای ارزیابی اتصال دوکسوروبیسین به نانوذره طلا (GNP، و MCa_{UF1.9}-C-GNP)، محلول نانوذره یا نانوذره-پپتید پس از سانتریفوژ و حذف دوکسوروبیسین موجود در محلول رویی، مجدداً در آب مقطر حل گردید و سپس شدت فلورسانس آن اندازه گیری شد و با شدت فلورسانس همان غلظت از محلول دوکسوروبیسین (۵۰۰ نانومولار) مقایسه گردید. اتصال دوکسوروبیسین و نانوذره از طریق میانکنش الکترواستاتیک بین بار مثبت گروه آمینوی دوکسوروبیسین و بار منفی روی سطح نانوذره صورت می‌گیرد که این میانکنش از اتصال کووالان بین پپتید و نانوذره ضعیف تر است. نمودار ۱ شدت فلورسانس محلول دوکسوروبیسین آزاد، DOX-GNP، و DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP، را در غلظت ۰/۵ میکرومولار دوکسوروبیسین نشان می‌دهد. در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد، جذب دوکسوروبیسین بروی GNP، و MCa_{UF1.9}-C-GNP به ترتیب معادل ۴۱٪، و ۳۱٪ بود. نتایج بدست آمده نشان داد که حضور پپتید بر سطح نانوذره، بر شدت فلورسانس تأثیر چندانی نداشته است.

جدول ۲ داده‌های حاصل از پارامترهای اندازه گیری شده ذرات DOX-GNP را در روش DLS نشان می‌دهد. در این روش، میانگین اندازه این ذرات ۵۸/۱۰ نانومتر و PDI آن‌ها نیز ۰/۲۸ بدست آمد که نسبت به اندازه و PDI نانوذرات آزاد افزایش نشان داد.

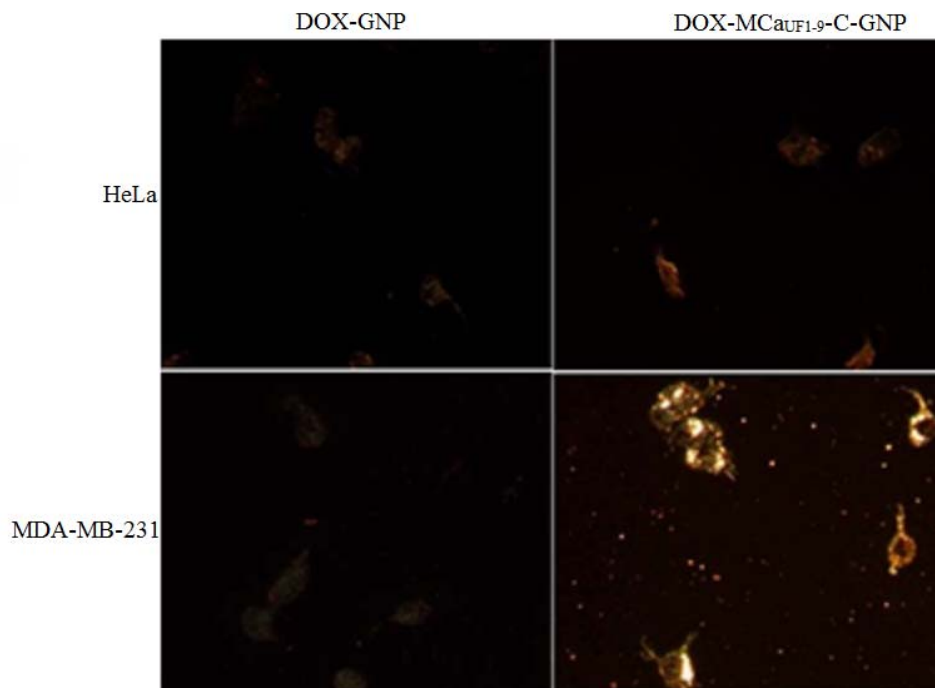
میانگین اندازه نانوذرات MCa_{UF1.9}-C-GNP متصل به دوکسوروبیسین (DOX-MCa_{UF1.9}-C-GNP) و PDI آن‌ها، به ترتیب ۹۰/۷۹ نانومتر و ۰/۳ بدست آمد که سائیز آن نسبت به



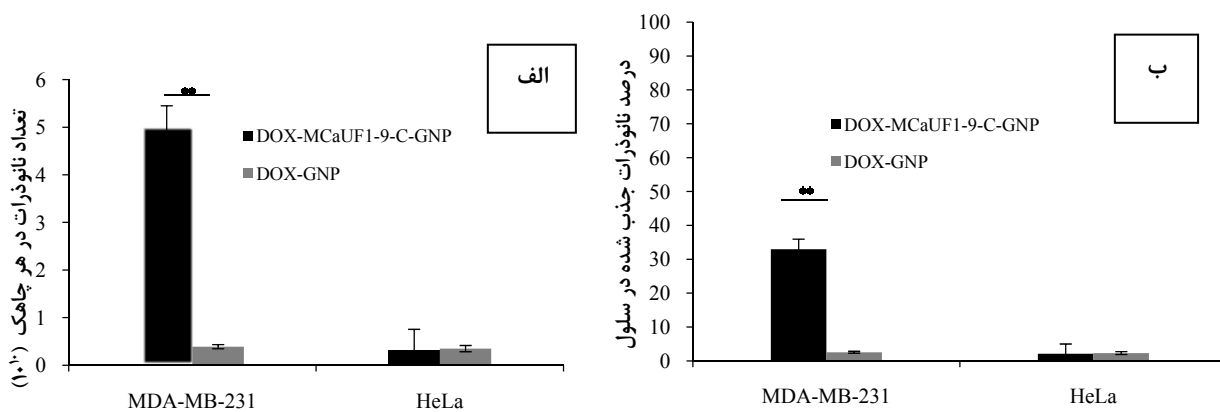
نمودار ۱: مقایسه شدت فلورسانس DOX-GNP و DOX-MCAUF1-9-C-GNP با غلظت ۵۰۰ نانومولار (۰/۵ میکرومولار) دوکسوروبیسین آزاد



نمودار ۲: تعیین مرگ سلول‌های HeLa (الف)، و MDA-MB-231 (ب) در اثر تیمار با دوکسوروبیسین آزاد، DOX-GNP و DOX-MCAUF1-9-C-GNP



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ زمینه تاریک سلول‌های HeLa و MDA-MB-231 در اثر تیمار با DOX-GNP و DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP (بزرگ نمایی ۲۰x)



نمودار ۳: بررسی کمی نفوذ DOX-GNP و DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP در سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 بر اساس تعداد (الف) و درصد نفوذ (ب) نانوذرات به درون سلول‌ها از طریق طیف سنجی جذب اتمی. ** P < ۰/۰۱

همچنین نتایج حاصل از مقایسه کمی نفوذ سلولی نانوذرات متصل به دوکسوروبیسین (DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP, DOX-GNP) به روشنی نشان داد که تعداد و درصد برداشت ذرات DOX-

در سلول‌های HeLa می‌باشد (نمودار ۳-الف و ب). محاسبات انجام شده نشان می‌دهد که پس از یک دوره انکوباسیون ۲ ساعته، ۳۳٪ از

ای به نام رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) می‌باشد. در این مطالعه پیوند نانوذرات طلا به پپتید $MCa_{UF1.9-C}$ صورت گرفت که انجام این پیوند از طریق کاهش شدت جذب $MCa_{UF1.9-C-GNP}$ نسبت به GNP در محدوده مرئی به اثبات رسید (شکل ۱).

در مرحله بعد مطالعه DLS (سایز، زتا پتانسیل، و توزیع اندازه ذرات) به منظور تعیین خصوصیات GNP و $MCa_{UF1.9-C-GNP}$ و مقایسه آنها با یکدیگر، انجام شد (جدول ۱). نتایج این مطالعه نشان داد که اندازه نسبت به GNP افزایش یافته و این افزایش نشان‌دهنده اتصال پپتید با نانوذره می‌باشد. همچنین در مطالعه زتا پتانسیل، کاهش بار منفی $MCa_{UF1.9-C-GNP}$ نسبت به GNP نشان داده شد. بار نانوذره طلا بدلیل وجود لایه سیترات روی آن منفی می‌باشد که بدلیل نشستن پپتید با بار مثبت، میزان بار منفی نانوذره عامل دار شده با پپتید کاهش می‌یابد که خود دلیل دیگری بر اتصال پپتید با نانوذره می‌باشد. جدول ۲ نیز نتایج حاصل از اتصال نانوذره، و سامانه پپتید- نانوذره، به دکسورویسین را با استفاده از روش اندازه گیری DLS نشان می‌دهد. در حقیقت، داده‌های بدست آمده از این روش، تاییدکننده نتایج حاصل از طیف سنجی فلورسانس می‌باشد. چون همزمان با افزایش فلورسانس نمونه‌ها در مقایسه با نانوذرات فاقد دکسورویسین، سایز آن‌ها نیز افزایش پیدا کرده است. اثر کشندگی سلولی DOX-GNP و $DOX-MCa_{UF1.9-C-GNP}$ نیز بر روی سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 آزمایش شد و سامانه طراحی شده توانست مرگ سلولی را به میزان ۳۰٪ در سلول‌های MDA-MB-231 افزایش دهد. نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعات کیفی (عکسبرداری زمینه تاریک) و کمی (طیف سنجی جذب اتمی) حاصل از مطالعه قبلی ما که ورود انتخابی پپتید- نانوذره را به درون این سلول‌ها نشان می‌داد^{۳۱} کاملاً منطبق بوده و می‌توان مرگ سلولی بیشتر و انتخابی کمپلکس‌های پپتید- نانوذره- دکسورویسین را به فعالیت پپتید متصل به نانوذره نسبت داد.

نانوذرات طلا به سبب رزونانس پلاسمون سطحی موضعی، دارای خاصیت پراکنش نوری قوی هستند. این خاصیت به همراه پایداری نوری نانوذره طلا، آن را به یک عامل کنتراست قدرتمند در تصویربرداری تبدیل کرده است^{۳۲}. بنابراین در مرحله بعد نفوذ $DOX-GNP$ و $DOX-MCa_{UF1.9-C-GNP}$ به داخل هر یک از

ذرات $DOX-MCa_{UF1.9-C-GNP}$ توسط سلول‌های MDA-MB-231 برداشت شده اند، در حالیکه درصد برداشت نانوذرات $DOX-GNP$ و $DOX-MCa_{UF1.9-C-GNP}$ بسیار ناچیز و در حدود ۲٪ بوده است.

بحث

مطالعه اخیر با هدف افزایش نفوذ نانوذرات طلا به داخل سلول‌های سرطانی با تکیه بر اتصال پپتید مشتق از ماروکلسین ($MCa_{UF1.9-C}$) به نانوذره به منظور تولید یک نانوحامل دارویی با پتانسیل حمل داروی دکسورویسین ($DOX-MCa_{UF1.9-C-GNP}$) صورت پذیرفت.

ماروکلسین در طیف وسیعی از توکسین‌های عقرب وجود دارد که به عنوان پپتید نفوذکننده به سلول عمل کرده و جزئیات خصوصیات آن نیز به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است^{۱۶}. مزیت بزرگ پپتیدهای نفوذکننده به سلول، توانایی آن‌ها برای رساندن محموله به اجزای داخل سلولی نظیر میتوکندری، لیزوزوم، هسته و سیتوپلاسم است. پپتیدهای نفوذکننده می‌توانند به محموله‌های متعددی با سایزهای مختلف متصل شده و به شکل موثری، پپتیدها، پروتئین‌ها، آنتی بادی‌ها، نوکلئیک اسیدها (الیگونوکلوئوتیدها، cDNA، RNA، siRNA)، فلوروکروم‌ها، نانوذرات، فرمولاسیون‌هایی با پایه لیپیدی، کوآتوم دات‌ها، ویروس‌ها، عوامل تباین در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی، و دارو را در *in vitro* و *in vivo* انتقال دهند^{۳۰}.

با اتصال کوولان یا غیرکوولان پپتید نفوذکننده به محموله، توزیع موثر مولکول‌های مورد نظر به داخل سلول انجام می‌شود. در میان محموله‌ها، نانوذرات به میزان قابل توجهی مورد مطالعه قرار گرفته اند، زیرا تعداد زیادی از مولکول‌های فعال بیولوژیک می‌توانند به آن‌ها اتصال یابند. اما عدم توانایی نانوذرات در عبور از غشای لیپیدی سلول، استفاده از آن‌ها را در *in vitro* و *in vivo* به میزان زیادی محدود می‌کند. بنابراین نانوذرات اغلب به صورت کمپلکس با پپتید نفوذکننده به سلول استفاده می‌شوند تا سختی نفوذ آن‌ها مرتفع شود^{۳۰}.

نانوذرات طلا جذب بالای امواج الکترومغناطیس را در محدوده نور مرئی از خود نشان داده و بیشینه جذب آن‌ها در محدوده طول موج ۵۵۰-۵۲۰ نانومتر می‌باشد. این قابلیت جذب به علت پدیده

(۳۳٪) در سلول‌های MDA-MB-231 می‌باشد. نتایج بدست آمده از آنالیز جمعیت‌های سلولی تیمار شده با نانوذرات، با تصاویر زمینه تاریک سلول‌ها منطبق بود و این به مفهوم آن است که حضور $\text{Ca}_{\text{UF1-9-C}}$ رفتار جذبی نانوذره طلا را به درون سلول‌ها تغییر داده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سامانه‌ای متشکل از نانوذره طلا و پپتید با قابلیت ورود به سلول ساخته شد. این پپتید از پپتید بزرگتری به نام ماروکلسین گرفته شده بود که با توجه به توالی و بار خالص خود که معادل صفر می‌باشد، قابلیت نفوذ متفاوتی در سلول‌ها نشان داد. این پپتید از طریق گروه تیول ریشه سیستئین به نانوذره طلا متصل شد و به این مجموعه داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین اضافه گردید. سامانه پپتید-نانوذره-دوکسوروبیسین ($\text{DOX-MCa}_{\text{UF1-9-C}}$) (C-GNP) توانست در مقایسه با محلول دوکسوروبیسین آزاد و نیز مجموعه نانوذره-دوکسوروبیسین (DOX-GNP)، مرگ سلولی را به شکل انتخابی افزایش دهد که این بدلیل قابلیت نفوذ انتخابی پپتید به سلول بود. سامانه پپتید-نانوذره می‌تواند در زمینه تحقیقات سرطان برای ساخت سیستم‌های جدید ره‌ایش انتخابی دارو در سلول‌ها، استفاده شود و در تشخیص و درمان سرطان با بهره‌وری بالا و سمیت پایین مفید واقع شود.

تشکر و سپاسگزاری

از اعضای محترم بخش بانک ژن و سلول و نیز جناب آقای دکتر مجید تیبانیان در بخش تصفیه سرم‌های درمانی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج که در انجام مراحل مختلف این مطالعه ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

بودجه/پشتیبانی

این کار با بودجه دانشگاه تربیت مدرس و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام شد.

سلول‌ها با استفاده از میکروسکپ زمینه تاریک مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳). بین هیچ یک از این نانوذرات طلا و سلول‌های سرطانی HeLa میانکنشی صورت نگرفت. اما در مورد سلول MDA-MB-231، پپتید $\text{Ca}_{\text{UF1-9-C}}$ توانست باعث افزایش نفوذ نانوذره طلا به داخل سلول شود، در حالیکه خود DOX-GNP به تنهایی نتوانست به داخل این سلول نفوذ بکند.

در مطالعه ای که توسط Poillot و همکارانش انجام گردیده، خصوصیات پپتید $\text{Ca}_{\text{UF1-9-C}}$ برای حمل Cy5 به داخل سلول‌های F98 مورد مطالعه قرار گرفته است.^{۱۹} نکته قابل توجهی که در مورد $\text{Ca}_{\text{UF1-9-C-GNP}}$ وجود دارد، آن است که این پپتید توانسته با غلظت ۱۰۰ نانومولار در تصویربرداری میکروسکپ زمینه تاریک مورد استفاده قرار بگیرد که حدود ۳۰ برابر کمتر از غلظتی است ($3 \mu\text{M}$) که در مطالعه قبلی برای $\text{Ca}_{\text{UF1-9-C-Cy5}}$ استفاده شده است. دلیل این موضوع وجود پپتیدهای متعدد بروی سطح نانوذره طلا می‌باشد.^{۲۸}

تصاویر میکروسکپ زمینه تاریک می‌توانند عملکرد نفوذی ذرات DOX-GNP و $\text{DOX-MCa}_{\text{UF1-9-C-GNP}}$ به درون سلول‌های سرطانی را نشان دهند، اما تفاوت‌های کمی مشخصی در برداشت آن‌ها توسط سلول‌های مختلف ارائه نمی‌دهند. طیف سنجی جذب اتمی در مقایسه با تصویربرداری زمینه تاریک، از دقت بیشتری برخوردار است، چون به جای بررسی تک تک سلول‌ها، مجموعه سلول‌های در معرض تیمار را بررسی می‌کند.^{۲۹} این روش علاوه بر دقت بالا، از حساسیت بیشتری نیز برخوردار است، چون قابلیت اندازه‌گیری مقادیر اندک نانوذرات طلای درون سلول را داشته و می‌تواند تفاوت نفوذ نانوذرات به درون سلول‌ها را در سطح ppb تشخیص دهد.^{۳۳} بنابراین بر مبنای داده‌های طیف سنجی جذب اتمی و با توجه به مقدار کل نانوذرات به کار رفته، میزان نفوذ DOX-GNP و $\text{DOX-MCa}_{\text{UF1-9-C-GNP}}$ در سلول‌های HeLa، و MDA-MB-231، براساس تعداد و درصد برداشت آن‌ها توسط سلول‌ها، محاسبه گردید. براساس این محاسبات مشخص شد که حداکثر نفوذ نانوذرات مربوط به وجود $\text{DOX-MCa}_{\text{UF1-9-C-GNP}}$

References

- Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 637-51.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; v4: v346-58.
- Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; 9: 1647-52.
- Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 99-103.
- Xia H, Mao Q, Davidson BL. The HIV Tat protein transduction domain improves the biodistribution of beta-glucuronidase expressed from recombinant viral vectors. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 640-4.
- Sebbage V. Review cell-penetrating peptides and their therapeutic applications. *Bio-horizons* 2009; 2: 64-72.
- Snyder EL, Dowdy SF. Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm Res* 2004; 21: 389-93.
- Park H, Tsutsumi H, Mihara H. Cell-selective intracellular drug delivery using doxorubicin and α -helical peptides conjugated to gold nanoparticles. *Biomaterials* 2014; 35: 3480-87.
- Song L, Varma CA, Verhoeven JW, Tanke HJ. Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys J* 1996; 70: 2959-68.
- Song L, van Gijlswijk RP, Young IT, Tanke HJ. Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Cytometry* 1997; 27: 213-23.
- Bernas T, Zarebski M, Cook RR, Dobrucki JW, Cook PR. Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. *J Microsc* 2004; 215: 281-96.
- Song S, Qin Y, He Y, Huang Q, Fan C, Chen HY. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. *Chem Soc Rev* 2010; 39: 4234-43.
- Zrazhevskiy P, Sena M, Gao X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem Soc Rev* 2010; 39: 4326-54.
- Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev* 2011; 40: 1647-71.
- Corr SA, Rakovich YP, Gun'ko Yurii K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. *Nanoscale Res Lett* 2008; 3: 87-104.
- Fajloun Z, Kharrat R, Chen L, Lecomte C, di Luccio E, Bichet D, et al. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* 2000; 469: 179-85.
- Esteve E, Mabrouk K, Dupuis A, Smida-Rezgui S, Altafaj X, Grunwald D, et al. Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem* 2005; 280: 12833-9.
- Ram N, Weiss N, Texier-Nogues I, Aroui S, Andreotti N, Pirollet F, et al. Design of a disulfide-less, pharmacologically-inert and chemically-competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 27048-56.
- Poillot C, Bichraoui H, Tisseyre C, Bahemberae E, Andreotti N, Sabatier JM, et al. Small efficient cell-penetrating peptides derived from scorpion toxin maurocalcine. *J Biol Chem* 2012; 287: 17331-42.
- Aroui S, Brahim S, de Waard M, Breard J, Kenani A. Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231. *Cancer Lett* 2009; 285: 28-38.
- Aroui S, Brahim S, de Waard M, Kenani A. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: A comparative study. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 419-25.
- Aroui S, Brahim S, Hamelin J, de Waard M, Breard J, Kenani A. Conjugation of doxorubicin to cell penetrating peptides sensitizes human breast MDA-MB 231 cancer cells to endogenous trail-induced apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 1352-65.
- Aroui S, Ram N, Appaix F, Ronjat M, Kenani A, Pirollet F, et al. Maurocalcine as a non-toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231. *Pharm Res* 2009; 26: 836-45.
- Ram N, Texier-Nogues I, Pernet-Gallay K, Poillot C, Ronjat M, Andrieux A, et al. In vitro and in vivo cell delivery of quantum dots by the cell penetrating peptide maurocalcine. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* 2011; 2: 12-32.
- Stasiuk GJ, Tamang S, Imbert D, Poillot C, Giardiello M, Tisseyre C, et al. Cell-permeable In(III) chelate-functionalized InP quantum dots as multimodal imaging agents. *ACS Nano* 2011; 5: 8193-201.
- You J, Zhang G, Li C. Exceptionally high payload of doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release. *ACS Nano* 2010; 4: 1033-41.

27. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat Phys Sci* 1973; 241: 20-2.
28. Park H, Tsutsumi H, Mihara, H. Cell penetration and cell-selective drug delivery using α -helix peptides conjugated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 2013; 34: 4872-9.
29. Freese C, Unger RE, Deller RC, Gibson MI, Brochhausen C, Klock H-A, et al. Uptake of poly (2-hydroxypropylmethacrylamide)-coated gold nanoparticles in microvascular endothelial cells and transport across the blood-brain barrier. *Biomater Sci* 2013; 1: 824-33.
30. Koren E, Torchilin VP. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. 2012; 18: 385-93.
31. Khamehchian S, Nikkiah M, Madani R, Hosseinkhani S. Enhanced and selective permeability of gold nanoparticles functionalized with cell penetrating peptide derived from maurocalcine animal toxin. *J Biomed Mater Res Part A* 2016; 104A: 2693-700.
32. Uboldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns MI, Pohl C, Baldi G, et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6: 1-12.
33. Freese C, Uboldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero IA, et al. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2012; 9: 23.

Sedigheh Khomehchian^{1*},
Saman Hosseinkhani²,
Maryam Nikkha²

¹ Department of Venomous
Animals and Antivenom
Production, Razi Vaccine and
Serum Research Institute,
Agricultural Research
Education and Extension
Organization (AREEO),
Karaj, Iran

² Department of
Nanobiotechnology, Faculty
of Biological Science, Tarbiat
Modares University, Tehran,
Iran

Effect of Peptide Derived from Scorpion Toxin on Enhanced Permeability of Doxorubicin Conjugated Gold Nanoparticles in HeLa and MDA-MB-231 Cells

Received:13 Oct. 2019; Accepted:12 Jun. 2020

Abstract

Background: Cell penetrating peptides (CPPs) can enter a cell through the cell membrane, and used in the fields of drug delivery, gene therapy, and cancer therapy by their property transporting various molecules into cytoplasm. Gold nanospheres (GNSs) are a useful tool for molecular imaging, because they are not cytotoxic and have high solubility, excellent light scattering property and ease of synthesis. We constructed a drug delivery system by developing gold nanospheres conjugated to MCa_{UF1-9}-C, a CPP derived from maurocalcine (MCa) scorpion toxin. We examined the applicability of this cell-selective anti-cancer drug delivery system by evaluating its cell-penetrating and cell death activities.

Methods: Cell viability of HeLa and MDA-MB-231 cells, against 500 nanomolar concentration of doxorubicin (DOX)-conjugated gold nanoparticles (DOX-GNPs, and DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP) were evaluated using MTT assay. Cell penetrability of MCa_{UF1-9}-C peptide conjugated to gold nanoparticles investigated using of dark field imaging and atomic absorption spectroscopy (AAS).

Results: HeLa cell viability was about 87% when treated with DOX-GNP and DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP, whereas DOX-MCa_{UF1-9}-C-GNP induced high cytotoxicity in MDA-MB-231 cells (30%). Dark field imaging demonstrated higher affinity of MCa_{UF1-9}-C-GNP for the MDA-MB-231 cell compared with HeLa cells. Moreover, atomic absorption spectrometry data analysis showed that 33% of the total amounts of the applied MCa_{UF1-9}-C-GNP were internalized in MDA-MB-231 cells.

Conclusion: These results demonstrated that peptide conjugated GNP would be a useful tool for the development of a cell-selective drug delivery system.

Keywords: Maurocalcin, Doxorubicin, Gold nanoparticle, Cellular uptake, Cytotoxicity

***Corresponding Author:**
Department of Venomous
Animals and Antivenom, Razi
Vaccine and Serum Research
Institute, Agricultural
Research Education and
Extension Organization
(AREEO), Karaj, Iran. P. O.
Box: 31975/148

Tel: 02634570038
E-mail: s.khomehchian@rvsri.ac.ir