

تأثیر نانوحامل‌های هدفمند شده با فولیک اسید در سونوداینامیک تراپی سرطان دهانه رحم انسانی (HeLa) تحت هدایت تصویربرداری فراصوت، مطالعه برون‌تنی

رقیه کامران سامانی^۱ (Ph.D)، هادی اکبری زاده^{۲,۳} (Ph.D Student)، فهیمه امین‌الرعایائی^۴ (Ph.D)، احمد شائنی^۴ (Ph.D)، فریبا فرهادی بیرگانی^۵ (Ph.D)، فاطمه مقصودی‌نیا^{۶*} (Ph.D)

۱- گروه فیزیک پزشکی و تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده علوم پزشکی شوشتر، شوشتر، ایران

۶- گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۳۰

f.maghsood@gmail.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۵۷۹۴۸۰۵

چکیده

هدف: نانوحامل‌های ترانوستیک، قابلیت استفاده در تشخیص و درمان سرطان به صورت هم‌زمان را دارا می‌باشند. در این مطالعه، اثر نانوقطرات حامل دوتارم و دوکسوروبیسین به عنوان عامل ترانوستیک برای دارورسانی با رهایش کنترل شده تحت هدایت تصویربرداری فراصوت بر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نانوقطره هدفمند شده با فولیک اسید حامل دوتارم (Gd-DOTA) و داروی دوکسوروبیسین با پوشش آلزینات سنتز و مشخصه‌یابی شد. در این مطالعه از رده HeLa به عنوان سلول سرطانی و از رده L۹۲۹ به عنوان سلول نرمال استفاده شد. جذب درون سلولی نانوحامل‌ها توسط طیف‌سنجی نشر نوری پلاسما جفت شده القایی (ICP-OES) مورد ارزیابی قرار گرفت. رهایش دوکسوروبیسین در پاسخ به تابش فراصوت و تأثیر آن در درمان سلول‌های سرطانی بررسی گردید. تصویربرداری فراصوت جهت بررسی تقویت سیگنال فراصوت توسط نانوقطرات سنتز شده، انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مشخصه‌یابی، سنتز موفق نانوقطره را با ویژگی‌های مطلوب فیزیکوشیمیایی تأیید نمود. سنجش سمیت سلولی نشان داد که نانوقطره سنتز شده از زیست‌سازگاری بالایی برای سلول‌های نرمال برخوردار می‌باشد و مرگ‌آوری بیش‌تری برای سلول‌های سرطانی دارد (۷۵/۳٪ در مقابل ۶۲/۱٪) و تابش فراصوت توانست آن را به طور معناداری افزایش دهد (۵۱٪). آزمون ICP-OES نشان داد که برداشت نانوقطرات توسط سلول‌های سرطانی تابش شده با فراصوت تقریباً ۱/۵ برابر بیش‌تر از سلول‌های تابش نشده پس از ۱۲ ساعت می‌باشد. نتایج نشان داد که تابش دهی نانوقطرات با امواج فراصوت به طور قابل توجهی رهایش دوکسوروبیسین از نانوقطرات را افزایش می‌دهد (۷۷/۵٪ در مقابل ۲/۱٪). همچنین، تصویربرداری فراصوت نشان داد که نانوقطرات پرفلوروهگزان سبب افزایش شدت سیگنال فراصوت می‌گردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده، نانوقطرات حامل دوکسوروبیسین و دوتارم با ویژگی‌های تشخیصی و درمانی مناسب می‌توانند عوامل ترانوستیک امیدوارکننده‌ای در دارورسانی تحت هدایت و کنترل تصویربرداری فراصوت برای کاربردهای سونوداینامیک تراپی باشند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، سیستم‌های دارورسان، نانوپزشکی ترانوستیک

مقدمه

سرطان از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در سراسر جهان است که زندگی افراد بسیاری را تحت تأثیر قرار داده است [۱، ۲]. روش‌های درمانی مختلفی برای این بیماری وجود دارد

که شیمی‌درمانی از مهم‌ترین و متداول‌ترین آن‌ها می‌باشد [۳]. از جمله داروهای شیمی‌درمانی می‌توان به دوکسوروبیسین (DOX) اشاره کرد که به طور گسترده در درمان انواع سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. این دارو، علی‌رغم تمام خواص ضد توموری خود، باعث ایجاد سمیت و آسیب به

کنند تا علاوه بر درمان، با تصویربرداری بتوان عوامل درمانی را نیز ردیابی نمود [۲۴].

تاکنون انواعی از نانوذرات حساس به امواج فراصوت شامل میسل‌ها، لیپوزوم‌ها و نانوساختارهای تغییر فازدهنده معرفی شده‌اند [۲۵]. در این مطالعه از پرفلوروهگزان که جزء ساختارهای تغییر فازدهنده هستند استفاده شده است. به دنبال تابش امواج فراصوت، پرفلوروهگزان مایع که هسته نانوقطره می‌باشد به بخار تبدیل می‌شود که این مسئله ضمن ایجاد کنتراست فراصوت سبب رهایش داروی بارگذاری شده می‌گردد. با انتشار یک موج فراصوت درون بافت، اتفاقات فیزیکی مختلفی رخ می‌دهد که می‌توان از آن‌ها برای تخریب نانوقطره و در نتیجه بروز اثرات درمانی و همچنین تشدید سیگنال فراصوت استفاده نمود [۲۶]. این اثرات فیزیکی شامل تغییرات فشار، جریان سیال اکوستیک، کویتاسیون (حفره‌سازی) و هایپرترمیای موضعی می‌باشد. حضور نانوذرات گادولینیوم سبب کاهش فشار امواج اکوستیکی مورد نیاز برای کویتاسیون و تخریب ساختار نانوقطره می‌گردد و کمک می‌کند که فرآیند تبخیر قطره صوتی در شدت‌های امواج فراصوت پایین‌تری اتفاق بیفتد [۲۷].

تاکنون مطالعات مختلفی بر روی داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین انجام شده و روش‌های مختلفی هم برای افزایش کارایی آن به کار گرفته شده است [۲۸]. مطالعاتی نیز وجود داشته که به بررسی ترکیب این دارو با سونوداینامیک تراپی پرداخته‌اند [۲۳]. با این حال، این مطالعه برای اولین بار به سنتز نانوذرات ترانوستیکی DOTA/DOX@PFH پرداخته که هدف از آن بررسی اثرات درمانی دوکسوروبیسین با سونوداینامیک تراپی و همچنین بررسی اثرات تشخیصی این نانوذره به عنوان عامل کنتراست‌زا در تصویربرداری فراصوت به عنوان روشی برای غلبه بر محدودیت‌های روش سونوداینامیک تراپی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با مصوبه اخلاق به شناسه IR.MUI.MED.REC۱۰۱،۱۳۹۹ تصویب و انجام گردید. سنتز نانوقطرات پرفلوروهگزان حامل دوتارم / دوکسوروبیسین. در این مطالعه از روش سنتز نانوامولسیون برای تهیه نانوقطرات استفاده شد [۲۹]. در این مرحله، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از پرفلوروهگزان (PFH) و دوکسوروبیسین (DOX) در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه با سرعت ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه با استفاده از همزنایزر. (Staufen, Germany215, Ultra-Turrax SG) در حمام یخ

مغز، قلب، کبد و کلیه‌ها می‌شود [۵]. عوارض جانبی جدی روش‌های متداول درمانی، می‌تواند کارایی آن‌ها و کیفیت زندگی بیماران را کاهش دهد. به همین دلیل، توسعه سیستم‌های درمانی ایمن، پیشرفته و کارآمد از مهم‌ترین چالش‌های درمان سرطان به شمار می‌رود [۶]. امروزه با پیشرفت مداوم علم، استراتژی‌های درمانی به سمت بهره‌مندی از درمان‌های غیرتهاجمی و کم‌تهاجمی در حال توسعه می‌باشند [۸،۷].

سونوداینامیک تراپی یکی از این روش‌های درمانی سرطان است که در آن از ترکیب امواج فراصوت و یک ماده شیمیایی به نام حساس‌کننده صوتی استفاده می‌شود [۹]. در این روش، حساس‌کننده‌های تجمع‌یافته در محل مورد نظر با استفاده از امواج فراصوت تحریک و سبب القای اثرات ضد سرطانی می‌شوند [۱۰]. این روش در قیاس با برخی روش‌های متداول درمان سرطان، امکان درمان موضعی را فراهم می‌آورد [۱۱] و با ماهیت غیرتهاجمی و استفاده از امواج غیریونیزان می‌تواند کارایی درمان را افزایش داده و اثرات جانبی آن را کاهش دهد [۱۲]. با این حال و علی‌رغم مزیت‌های این روش، نمی‌توان حساس‌کننده‌های صوتی را ردیابی و نحوه پخش و تمرکز آن‌ها را کنترل نمود [۱۳].

ترانوستیک به شاخه‌ای از علم پزشکی گفته می‌شود که به ادغام و استفاده هم‌زمان از عوامل درمانی و تشخیصی می‌پردازد و در سال‌های اخیر، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است [۱۴]. نانوتکنولوژی علمی است که نقش غیرقابل انکاری در بسیاری از زمینه‌های علمی ایفا می‌کند [۱۶،۱۵] و با پیشرفت‌های چشمگیر آن، سامانه‌های ترانوستیک نیز توانسته‌اند پیشرفت‌های قابل توجهی داشته باشند [۱۷]. مطالعات مختلف نشان داده است که نانومواد توانایی بهبود محدودیت روش‌های متداول موجود را دارند و با بهره‌گیری از آن‌ها می‌توان بازده درمانی و تشخیصی را افزایش داد و حتی چندین هدف را به طور هم‌زمان دنبال کرد [۱۸-۲۱].

یکی از کارهایی که در دهه‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است، استفاده از قدرت نانوذرات در سونوداینامیک تراپی می‌باشد [۲۲]. می‌توان عوامل شیمی‌درمانی را در نانوذرات بارگذاری کرد و با دارورسانی با رهایش کنترل شده، درمان را هدفمند و عوارض جانبی آن را به خوبی کنترل نمود [۲۳]. علاوه بر این، اخیراً به دنبال آن بوده‌اند که با اصلاح نانوذرات، بتوانند از همان نانوذره به عنوان عامل کنتراست‌زا در تصویربرداری فراصوت هم استفاده

همگن شد [۳۰]. سپس ۱ میلی‌لیتر دوتارم (Gd-DOTA) با غلظت ۰/۵ میلی‌مول بر میلی‌لیتر و ۱۰ میکرولیتر سورفکتانت (تویین ۲۰) به محلول اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه همگن شد. در ادامه پلی‌ساکارید آلژینات (۱/۵٪ وزنی حجمی) و آلژینات - فولیک اسید (در نمونه هدفمند شده با فولیک‌اسید) تحت هموژنیزاسیون ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه به محلول اضافه شد. پس از آن، محلول کلرید کلسیم (۰/۲٪ وزنی حجمی) اضافه شد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه همگن شد [۳۱]. پس از هم‌زدن به مدت ۲ ساعت، محلول با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، مایع رویی آسپیره شد و نانوقطرات به‌دست‌آمده در ۵ میلی‌لیتر PBS پراکنده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذره. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy (TEM) (Philips em۲۰۸، هلند) تحت ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت تهیه شدند. اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات توسط دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic light scattering, (Vascov/Cordouan Technologies) (DLS)) (فرانسه) اندازه‌گیری شد. غلظت یون‌های Gd^{+3} در تمام سوسپانسیون‌های نانوقطرات آماده شده با استفاده از طیف‌سنج انتشار نوری پلاسمای جفت شده القایی (Inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) (Varian Vista-Pro، استرالیا) با حل کردن نمونه‌ها در تیزاب سلطانی (مخلوط اسید هیدروکلریک / اسید نیتریک) اندازه‌گیری شد [۳۲]. برای تعیین مقدار داروی بارگذاری شده، پس از سانتریفیوژ امولسیون نانوقطرات به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه، بخش رویی امولسیون جمع‌آوری و مقدار داروی دوکسوروبیسین در آن با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis تعیین گردید. در نهایت درصد بازده بارگذاری دارو در ساختار نانوذرات با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

همگن شد [۳۰]. سپس ۱ میلی‌لیتر دوتارم (Gd-DOTA) با غلظت ۰/۵ میلی‌مول بر میلی‌لیتر و ۱۰ میکرولیتر سورفکتانت (تویین ۲۰) به محلول اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه همگن شد. در ادامه پلی‌ساکارید آلژینات (۱/۵٪ وزنی حجمی) و آلژینات - فولیک اسید (در نمونه هدفمند شده با فولیک‌اسید) تحت هموژنیزاسیون ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه به محلول اضافه شد. پس از آن، محلول کلرید کلسیم (۰/۲٪ وزنی حجمی) اضافه شد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه همگن شد [۳۱]. پس از هم‌زدن به مدت ۲ ساعت، محلول با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، مایع رویی آسپیره شد و نانوقطرات به‌دست‌آمده در ۵ میلی‌لیتر PBS پراکنده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذره. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy (TEM) (Philips em۲۰۸، هلند) تحت ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت تهیه شدند. اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات توسط دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic light scattering, (Vascov/Cordouan Technologies) (DLS)) (فرانسه) اندازه‌گیری شد. غلظت یون‌های Gd^{+3} در تمام سوسپانسیون‌های نانوقطرات آماده شده با استفاده از طیف‌سنج انتشار نوری پلاسمای جفت شده القایی (Inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) (Varian Vista-Pro، استرالیا) با حل کردن نمونه‌ها در تیزاب سلطانی (مخلوط اسید هیدروکلریک / اسید نیتریک) اندازه‌گیری شد [۳۲]. برای تعیین مقدار داروی بارگذاری شده، پس از سانتریفیوژ امولسیون نانوقطرات به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه، بخش رویی امولسیون جمع‌آوری و مقدار داروی دوکسوروبیسین در آن با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis تعیین گردید. در نهایت درصد بازده بارگذاری دارو در ساختار نانوذرات با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

مقدار داروی اضافه شده - مقدار داروی آزاد

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی اضافه شده}}{\text{مقدار داروی اضافه شده}}$$
 درصد بازده بارگذاری دارو
 برای تعیین پایداری نانوقطرات، امولسیون به مدت ۳ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و اندازه نانوذرات و هم‌چنین بازده بارگذاری دارو هر ۱۵ روز به ترتیب با استفاده از دستگاه UV-Vis و DLS بررسی گردید.

رهایش غیرفعال و فعال دارو. برای ارزیابی رهایش غیرفعال دارو، امولسیون نانوقطره به کیسه دیالیز

۱۲۰۰۰) منتقل شد و در ۸۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با دو pH متفاوت ۷/۴ و ۵/۵ که به ترتیب معرف pH بافت نرمال و بافت سرطانی می‌باشند، غوطه‌ور گردید [۳۳]. سپس در انکوباتور شیکردار (BioSan Shaker-Incubator ES, England) تحت شرایط ۲۰۰ دور در دقیقه و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت ۳ میلی‌لیتر از امولسیون در فواصل زمانی مشخص (۱، ۴، ۱۶، ۲۴ و ۳۲ ساعت) از مخزن برداشته شد و مقدار دوکسوروبیسین آزاد شده با استفاده از دستگاه UV-Vis در طول موج ۴۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی الگوی رهایش فعال داروی دوکسوروبیسین از نانوقطرات، محلول ناقطره در یک پوشش از جنس لاتکس در یک ظرف بزرگ حاوی PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌ها با امواج فراصوت در فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت $1W/cm^2$ در فواصل زمانی مختلف (۰، ۱، ۳، ۵ و ۷ دقیقه) تابش‌دهی شدند. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر از محلول نانوقطرات خارج شده و در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. غلظت دوکسوروبیسین در مایع رویی با استفاده از طیف سنجی UV-Vis تعیین گردید.

تصویربرداری فراصوت. برای بررسی اثر تبخیر قطره صوتی (Acoustic droplet vaporization, (ADV) و تشکیل میکروحباب‌ها از نانوقطرات، تصویربرداری فراصوت از PBS (به عنوان محلول کنترل) و PBS حاوی نانوقطرات سنتز شده توسط سیستم تصویربرداری فراصوت تشخیصی B-mode (UGEO H۶۰، سامسونگ) انجام شد. تصاویر فراصوت با شاخص مکانیکی (Mechanical index, (MI) ۱/۴ قبل و بعد از تزریق نانوقطرات درون PBS تهیه گردید.

کشت سلولی. سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسانی (رده سلولی HeLa) و سلول‌های نرمال (رده سلولی L۹۲۹) در محیط کشت DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) غنی شده با ۱۰٪ FBS، و ۱٪ پنی‌سیلین / استرپتومایسین کشت داده شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند.

سنجش سمیت سلولی. برای ارزیابی کمی سمیت سلولی نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg بر روی رده‌های سلولی سرطانی HeLa و نرمال L۹۲۹ و نیز تاثیر آن‌ها در سونوداینامیک تراپی از تست MTT استفاده شد. سمیت سلولی بر حسب غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) انجام شد و غلظت بهینه نانوذره (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مطالعات بعدی انتخاب گردید. برای گروه‌های تحت تابش فراصوت، ۱ ساعت پس از

۱/۵ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. در گروه فراصوت بعداز تیمار با نانوقطره، تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع) به مدت ۴ دقیقه صورت پذیرفت. سپس پلیت‌ها دوباره به انکوباتور بازگردانده شدند. بعد از گذشت ۱۰ روز، کلونی‌های شکل‌گیری شده با استفاده از فرمالدهید ۴٪ تثبیت و با کریستال یوله ۰/۵٪ رنگ‌آمیزی شدند. سپس شمارش کلونی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد.

تحلیل آماری. در این مطالعه، آزمون‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. نمودارها با نوارهای خطا (error bars) نشان داده شدند که نشان‌دهنده انحراف معیار (خطا) میانگین بود. آنالیزهای آماری با استفاده از one-way ANOVA بر اساس آزمون مقایسه‌ای post-hoc Tukey's multiple انجام شد. در مقایسه‌های آماری، $P\text{-value} < 0/05$ و $P\text{-value} > 0/05$ به ترتیب به عنوان شاخص‌های تفاوت آماری ناچیز و معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

سنتز و ارزیابی خواص نانوذرات. در این مطالعه، نانوقطرات بارگذاری شده با دوتارم و دوکسوروبیسین با استفاده از روش نانوامولسیون تهیه شدند. میانگین اندازه هیدرودینامیکی نانوقطره Gd/DOX-FA@Alg برابر با $37/3 \pm 4/2$ نانومتر بود. علاوه بر این، همان‌طور که در شکل ۱ (الف) نشان داده شده است، نانوقطرات سنتز شده شکل نسبتاً کروی دارند و اندازه متوسط آن‌ها $25 \pm 4/1$ نانومتر می‌باشد. آزمایش UV-Vis نشان داد که $92/11 \pm 3/6$ ٪ از داروی دوکسوروبیسین مورد استفاده در نانوقطرات بارگذاری شده است. سنجش پایداری نانوذرات Gd/DOX-FA@Alg بر اساس بررسی اندازه و تغییرات مقدار داروی دوکسوروبیسین باقی‌مانده در ساختار نانوقطره به مدت ۳ ماه انجام شد. همان‌طور که در شکل ۱ (ب و ج) نشان داده شده است، هیچ‌گونه تغییر قابل توجهی در اندازه نانوذره و میزان کپسولاسیون دارو در طول این ۹۰ روز مشاهده نشد.

رهایش غیرفعال دارو. با توجه به سینتیک رهایش دارو (شکل ۲ (الف)) در ابتدا، آهنگ رهایش سریعی برای دوکسوروبیسین مشاهده گردید، در حالی که رهایش طولانی‌مدت دارو با انتشار آهسته از آلژینات به عنوان یک ماتریکس بیوپلیمر رخ داد. شکل ۲ (الف) نشان می‌دهد که دوکسوروبیسین توسط ساختار نانوقطره کاملاً تثبیت شده، به

تیمار سلول‌ها با نانوقطرات با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر، سلول‌های سرطانی با پروب فراصوت ۱ مگاهرتز در شدت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع) مورد تابش قرار گرفتند [۳۴] و سنجش MTT پس از ۲۳ ساعت انجام شد. برای تعیین درصد سلول‌های زنده، مایع رویی سلول‌ها دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی MTT با غلظت $0/5 \text{ mg mL}^{-1}$ به هر چاهک اضافه گردید و سپس به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن، مایع رویی برداشته شد و ۱۰۰ میلی لیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازان حل شوند. در نهایت میزان جذب نور در هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

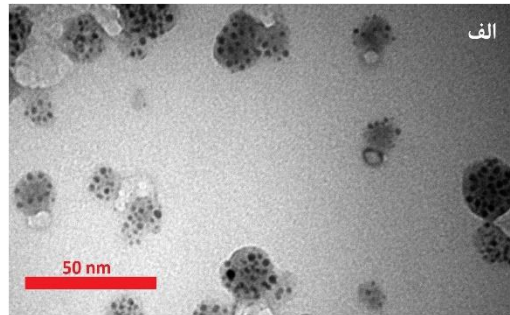
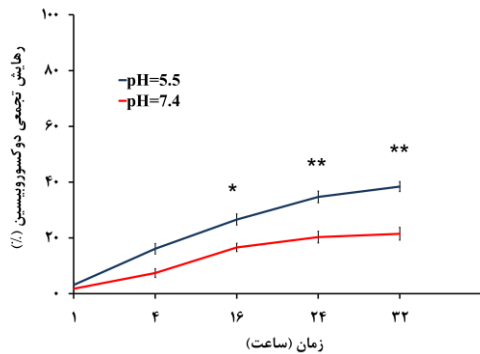
جذب سلولی نانوقطرات. برای ارزیابی نقش فولیک اسید به عنوان عامل هدفمندسازی در جذب سلولی نانوذرات، تعداد 2×10^6 سلول سرطانی HeLa (رده سلولی دارای گیرنده فولات) را در هر چاهک یک پلیت ۶ چاهکی کشت داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سلول‌ها با نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg در غلظت $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ گادولینیم (با و بدون تابش فراصوت) به مدت ۰/۵، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها را با استفاده از PBS شست‌وشو داده و به وسیله‌ی تریپسین جدا شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر PBS پراکنده شده و در ۳ میلی لیتر تیزاب سلطانی حل شدند. جذب داخل سلولی یون‌های گادولینیم توسط دستگاه ICP-OES اندازه‌گیری شد. میانگین میزان جذب یون‌های Gd^{3+} توسط هر سلول HeLa بر اساس تعداد کل سلول‌ها و غلظت Gd^{3+} محاسبه گردید.

تست کولونی‌زایی. جهت بررسی اثر نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg در سونوداینامیک‌تراپی سرطان دهانه رحم، آزمون کولونی‌زایی در شدت‌های مختلف امواج فراصوت (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع) صورت پذیرفت. آزمون سنجش کولونی‌زایی تمام سلول‌هایی را که توانایی تکثیر نامحدود خود را بعد از درمان حفظ کرده‌اند، مشخص می‌سازد. توان تولید یک کلونی توسط یک سلول منفرد زمانی است که تعداد سلول‌های تکثیر یافته از یک سلول منفرد بیش از ۵۰ عدد باشند [۳۵]. در ابتدا برای هر گروه درمانی سه چاهک در پلیت ۶ خانه در نظر گرفته شد. تعداد ۵۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده و در انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، تیمار سلول‌ها با نانوقطره با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (۰، ۰/۵، ۱،

۷ دقیقه شود (شکل ۲ (ب)). قبل از تابش فراصوت، دارو در ساختار نانوقطرات باقی ماند و مقدار کمی دوکسوروبیسین در مدت ۷ دقیقه (۲/۱٪) از نانوقطرات آزاد شد.

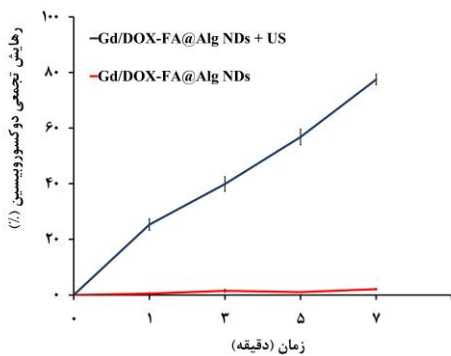
طوری که رهایش آن از نانوقطرات در pH ۷/۴ پس از ۳۲ ساعت تنها ۲۱/۵٪ بود. همچنین نتایج نشان داد که رهایش داروی دوکسوروبیسین از نانوذرات Gd/DOX-FA@Alg در pH ۵/۵ به میزان ۳۸/۴٪ است که بیش‌تر از pH نرمال می‌باشد ($P\text{-value} < 0.05$).

الف



الف

ب

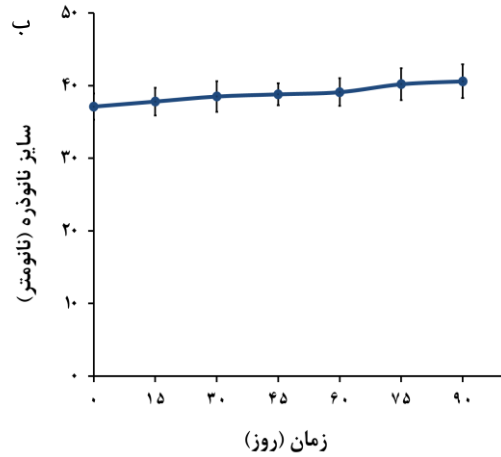


شکل ۲. الف) الگوی رهایش غیرفعال داروی دوکسوروبیسین از نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg در pH ۷/۴ و ۵/۵. ب) الگوی رهایش فعال داروی دوکسوروبیسین از نانوقطرات-Gd/DOX-FA@Alg پس از تابش‌دهی فراصوت (۱ مگاهرتز، ۱ وات بر سانتی متر مربع) در pH ۷/۴، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. ($P\text{-value} < 0.05^*$) و ($P\text{-value} < 0.01^{**}$)

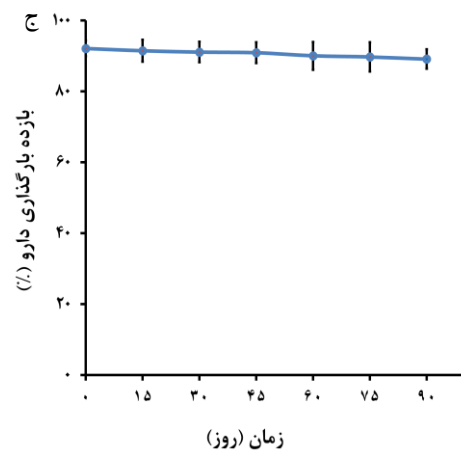
تصویربرداری فراصوت. برای مشاهده اثر تبخیر قطرات صوتی (ADV)، رفتار اکوژنیک نانوقطرات و تشکیل میکروحباب‌ها از نانوقطرات از سیستم تصویربرداری فراصوت تشخیصی استفاده شد (شکل ۳). محلول کنترل PBS (شکل ۳ الف)) یک تصویر سیاه را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده عدم حضور میکروحباب‌ها و نانوحباب‌ها می‌باشد. در حالی که در شکل ۳ ب) لکه‌های روشنی پس از تزریق نانوقطرات درون PBS مشاهده می‌گردد.

سمیت سلولی. اثر سمیت نانوقطرات-Gd/DOX-FA@Alg با استفاده از آزمون MTT برای دو رده سلولی سرطانی HeLa و نرمال ۹۲۹L با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین بررسی گردید (شکل ۴). بر اساس نتایج به دست آمده، افزایش غلظت نانوقطرات منجر به افزایش سمیت سلولی برای هر دو رده سلولی شد.

ج



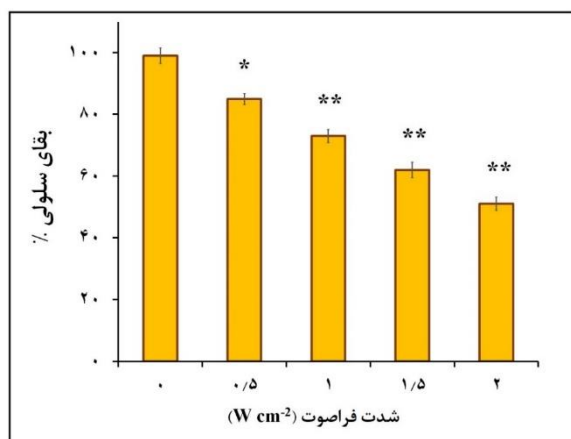
د



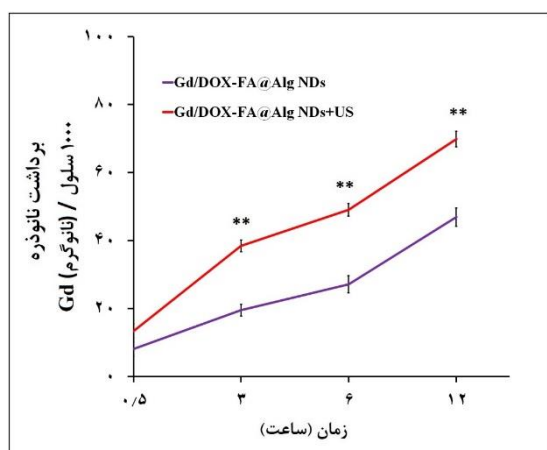
شکل ۳. الف) تصویر TEM از نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg. ب) نمودار پایداری نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg بر اساس تغییرات سایز آن‌ها. ج) نمودار پایداری نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg بر اساس میزان داروی دوکسوروبیسین باقیمانده در ساختار آن‌ها پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه.

رهایش فعال دارو با تحریک امواج فراصوت. با توجه به الگوی رهایش فعال دارو، تابش‌دهی فراصوت می‌تواند باعث رهایش ۷۷/۵٪ دوکسوروبیسین از نانوقطرات در مدت زمان

با امواج فراصوت، جذب سلولی بالاتری نسبت به نانوقطرات تابش نشده در تمام زمان‌های انکوباسیون داشتند.

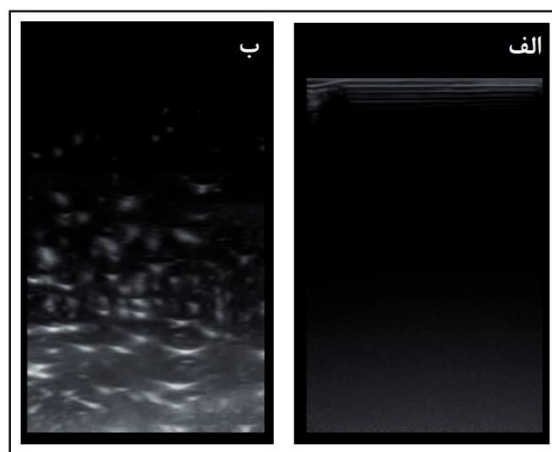


شکل ۵. سمیت سلولی نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دوکسوروبیسین به همراه تابش فراصوت در شدت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع برای سلول‌های سرطانی HeLa.

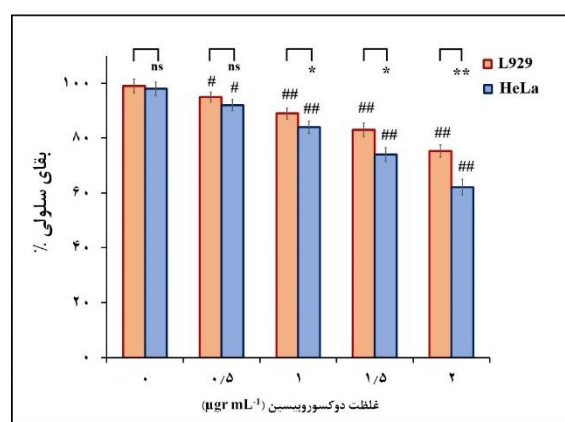


شکل ۶. ارزیابی کمی برداشت نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg (با و بدون تابش فراصوت) توسط سلول‌های HeLa پس از انکوباسیون به مدت ۰/۵، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت با استفاده از آزمون ICP-OES (*P < ۰/۰۵). (P-value < ۰/۰۱** و value < ۰/۰۱**).

تست کولونی‌زایی. جهت بررسی اثر درمانی نانوقطرات در ترکیب با امواج فراصوت از آزمون سنجش کولونی‌زایی استفاده شد. بر اساس شکل ۷، نتایج نشان داد که قدرت کولونی‌زایی سلول‌ها در گروه‌های درمان شده با نانوقطره و امواج فراصوت نسبت به گروه درمان شده با نانوقطره تنها به طور قابل توجهی کاهش یافته است (P-value < ۰/۰۵). با افزایش شدت امواج فراصوت، تشکیل کولونی به طور معناداری کاهش یافته است. تعداد کولونی تشکیل شده به ازاء ۵۰۰ سلول کشت داده شده برای گروه درمان شده با نانوقطره Gd/DOX-FA@Alg با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و شدت فراصوت ۱ وات بر سانتی متر مربع ۳/۴±۶۷ است.



شکل ۳. تصاویر فراصوت (الف) PBS (محلول کنترل) و (ب) نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg پس از تزریق به درون محلول PBS.



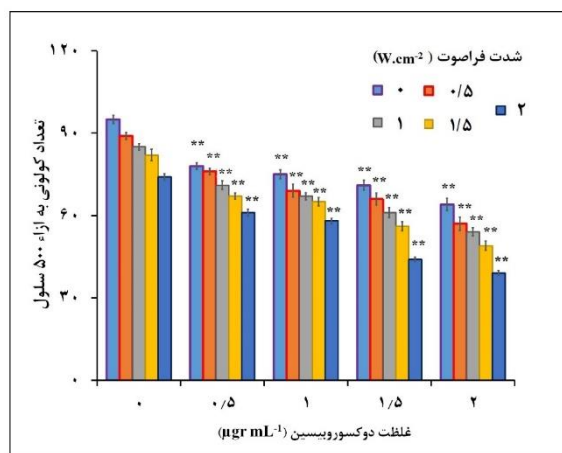
شکل ۴. سمیت سلولی نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg در غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین برای سلول‌های سرطانی HeLa و نرمال L929 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.

همچنین سمیت سلولی نانوقطرات برای سلول‌های سرطانی بیش‌تر از سلول‌های نرمال در همان غلظت بود (حدود ۶۲/۱٪ بقای سلولی برای HeLa در مقایسه با حدود ۷۵/۳٪ برای L929 در غلظت ۲ μg/mL). علاوه بر این، نتایج آزمون MTT، سمیت سلولی بالاتر نانوقطرات را در ترکیب با فراصوت در مقایسه با نانوقطرات به تنهایی بر روی سلول‌های سرطانی HeLa نشان داد (شکل ۵). به عنوان مثال، امواج فراصوت با شدت ۱/۵ وات بر سانتی‌متر مربع سمیت سلولی نانوقطرات با غلظت ۱ μg/mL را حدود ۳۷٪ نسبت به گروه کنترل افزایش داد.

جذب سلولی. از روش ICP-OES برای ارزیابی جذب سلولی نانوقطرات توسط سلول‌های سرطانی HeLa با و بدون تابش فراصوت در زمان‌های مختلف استفاده شد. همان‌طور که شکل ۶ نشان می‌دهد، جذب داخل سلولی نانوقطرات با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد و به حداکثر مقدار پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون می‌رسد. نانوقطرات تابش شده

آهسته دارو از ساختار پلیمر رخ داد که نشان می‌دهد مولکول‌های دوکسوروبیسین با پوسته آلزینات نانوقطرات پرفلوروهگزان به خوبی تثبیت شده‌اند. مقایسه‌ی ره‌ایش داروی دوکسوروبیسین در pH‌های متفاوت طبیعی و اسیدی نشان داد که در pH‌های کم‌تر به دلیل پروتونه شدن گروه‌های کربوکسیل آلزینات و در نتیجه دشارژ شدن نسبی آن‌ها برهمکنش الکترواستاتیکی بین آلزینات و دارو ضعیف شده که منجر به افزایش نرخ ره‌ایش دارو می‌گردد [۳۹]. که این مطلب بیان‌کننده این می‌باشد که سامانه سنتز شده حساس به تغییرات pH بوده و دارو در سلول‌های سرطانی که pH کم‌تری دارند، ره‌ایش داروی بیش‌تری خواهد داشت. هم‌چنین در نتیجه‌ی تابش فراصوت، پرفلوروهگزان موجود در هسته نانوقطرات تبخیر شده و به میکروحباب‌های گازی تبدیل می‌گردد [۴۰]. حضور گادولینیم به عنوان مرکزی برای تشدید کاویتاسیون سبب افزایش رخداد این فرآیند می‌گردد. در نتیجه‌ی انفجار حباب‌ها تحت تابش فراصوت، مقدار زیادی داروی بارگذاری شده در نانوقطرات آزاد می‌شود. سیستم دارورسانی کنترل شده با ره‌ایش فعال دارو در محل هدف، یکی از مهم‌ترین دستاوردها در سونوداینامیک تراپی سرطان است. بررسی رفتار اکوزینیک نانوقطرات نشان‌دهنده تبدیل نانوقطرات به میکروحباب‌ها به دنبال تابش امواج فراصوت است. تابش امواج فراصوت طی فرآیند ADV سبب شکل‌گیری میکرو و نانوحباب‌ها می‌گردد که در تصویر فراصوت گرفته شده به صورت نقاط روشن در زمینه تیره رنگ مربوط به PBS رویت می‌گردد. پدیده ADV و تولید میکروحباب‌ها می‌تواند برای تولید سیگنال در سونوگرافی و نیز دارورسانی با ره‌ایش کنترل شده نتایج امیدوارکننده‌ای به همراه داشته باشد.

نتایج تست MTT نشان داد که افزایش غلظت نانوقطرات منجر به افزایش سمیت سلولی برای هر دو رده سلولی سرطانی و نرمال شد، که این مسئله به علت بالا رفتن میزان برداشت داروی دوکسوروبیسین توسط سلول‌ها می‌باشد. هم‌چنین، سمیت سلولی نانوقطرات در تمامی غلظت‌های مورد بررسی برای سلول‌های سرطانی بیش‌تر از سلول‌های نرمال بود. زیرا بیان بالای فولیک اسید در سطح سلول‌های سرطانی و هم‌چنین نوع عملکرد غشای این سلول‌ها منجر به جذب بیش‌تر نانوقطرات در غشای آن‌ها و تجمع بیش‌تر نانوذرات در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال و سمیت بیش‌تر برای این سلول‌ها می‌شود. بنابراین نانوقطرات سنتز شده سمیت سلولی کم و زیست سازگاری بالایی برای سلول‌های نرمال دارند. نتایج نشان داد که میزان مرگ سلولی



شکل ۷. تعداد کلونی‌های تشکیل شده به ازاء ۵۰۰ سلول کشت داده شده برای گروه‌های مختلف تحت درمان با غلظت‌های مختلف نانوقطره Gd/DOX-FA@Alg (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر) و شدت‌های مختلف امواج فراصوت (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع)

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، نانوقطرات حساس به امواج فراصوت حامل داروی دوکسوروبیسین و دوتارم معرفی شدند. در این نانوقطرات، یون‌های گادولینیم به عنوان ماده تشدیدکننده فرآیند کویتاسیون و دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی به عنوان عوامل ترانوستیک در سونوداینامیک تراپی مورد استفاده قرار گرفتند. تصویربرداری فراصوت تأیید نمود که نانوقطرات می‌توانند با پدیده ADV تبدیل به میکروحباب و نانوحباب شوند که باعث ره‌ایش داروی محصور شده و کنتراست قوی فراصوت در ناحیه تومور می‌شود.

نتایج نشان داد که نانوقطرات با اندازه هیدرودینامیکی مناسب سنتز شدند. در شکل ۱ (الف)، محتویات تیره در ساختار نانوقطرات نشان‌دهنده یون‌های گادولینیم بارگذاری شده است که این یافته مشابه مقاله Vezeridis و همکاران در سال ۲۰۱۹ است که نانوذرات اکسید آهن را با موفقیت در نانوقطرات بارگذاری نمودند [۲۷]. برای بهینه کردن خواص بیولوژیکی نانوقطرات از جمله پایداری و جلوگیری از خروج گاز درون هسته از پلیمر زیست‌سازگار آلزینات استفاده شد. ماهیت هیدروفیلیک آلزینات ضمن کمک به بارگذاری مقادیر زیاد دارو [۳۶] سبب گردید که نانوقطره از پایداری مناسبی برخوردار باشد. بر اساس الگوی ره‌ایش غیرفعال دارو، در ابتدا آهنگ ره‌ایش سریعی برای دوکسوروبیسین مشاهده می‌گردد که ممکن است در نتیجه داروی بارگذاری شده در سطح نانوقطرات باشد [۳۸،۳۷] و با گذشت زمان ره‌ایش

امواج فراصوت و زیست سازگاری مناسب تأیید می‌کند که نانوقطرات Gd/DOX-FA@Alg می‌توانند به عنوان نانوحامل‌های دارورسانی تحت هدایت تصویربرداری فراصوت برای افزایش بازده سونوداینامیک‌تراپی سلول‌های سرطانی عمل کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: رقیه کامران سامانی: ایده‌پردازی اولیه، انجام آزمایشات عملی، نوشتن متن مقاله. هادی اکبری‌زاده: نوشتن متن اولیه مقاله، آنالیز داده‌ها، بازنگری نهایی مقاله. فهیمه امین‌الرعیائی: نوشتن متن اولیه مقاله، آنالیز داده‌ها. احمد شائبی: ویرایش و بازنگری نهایی مقاله. فریبا فرهادی بیرگانی: آنالیز داده‌ها. فاطمه مقصودی‌نیا: مدیر پروژه، ایده‌پردازی اولیه، نوشتن متن مقاله

منابع

- [1] Shanei A, Abedi I, Saadatmand P, Amouhedar AR, Akbari-Zadeh H. Comparison of 3D conformal and intensity modulated radiotherapy in early stage oral tongue cancer: Dosimetric and radiobiological evaluation. *Int J Radiat Res* 2020; 18: 33-42.
- [2] Dadashpour M, Ganjibakhsh M, Mousazadeh H, Nejati K. Increased pro-apoptotic and anti-proliferative activities of simvastatin encapsulated PCL-PEG Nanoparticles on human breast cancer adenocarcinoma cells. *J Clust Sci* 2022; 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02217-y>
- [3] Mogheri F, Jokar E, Afshin R, Akbari AA, Dadashpour M, Firouzi-amandi A, et al. Co-delivery of metformin and siibinin in dual-drug loaded nanoparticles synergistically improves chemotherapeutic in human non-small cell lung cancer A549 cells. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021; 66: 102752. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102752>
- [4] Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther* 2018; 10: 131. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S170239> PMID:30237735 PMID:PMC6138971
- [5] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3267-3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312> PMID:19548866
- [6] Shanei A, Akbari-Zadeh H. Investigating the sonodynamic-radiosensitivity effect of gold nanoparticles on HeLa cervical cancer cells. *J Korean Med Sci* 2019; 34. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e243> PMID:31559711 PMID:PMC6763396
- [7] Maghsoudinia F, Akbari-Zadeh H, Aminolroayaei F, Birgani FF, Shanei A, Samani RK. Ultrasound responsive Gd-DOTA/doxorubicin-loaded nanodroplet as a theranostic agent for magnetic resonance image-guided controlled release drug delivery of melanoma cancer. *Eur J Pharm Sci*

القاء شده توسط نانوقطرات در ترکیب با امواج فراصوت بیش‌تر از درمان با نانوقطرات به تنهایی است. این یافته را می‌توان به رهایش داروی دوکسوروبیسین با تحریک فراصوت تحت اثر ADV و وقوع کاویتاسیون نسبت داد که این پدیده احتمال نفوذ نانوقطرات به سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد [۴۱]. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، میزان سمیت سلولی با افزایش شدت فراصوت افزایش می‌یابد. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمده، نانوذرات سنتز شده پتانسیل بالایی برای استفاده در کاربردهای بیولوژیکی مانند دارورسانی به سلول‌های سرطانی با رهایش کنترل شده و سونوداینامیک‌تراپی دارند. نتایج برداشت سلولی نشان داد که با افزایش زمان، میزان جذب نانوقطرات توسط سلول‌ها افزایش می‌یابد که دلیل آن افزایش احتمال مواجه شدن نانوقطرات با گیرنده‌های سطح سلول است. هم‌چنین میزان ورود نانوقطرات بعد از تابش امواج فراصوت به شدت افزایش یافت که علت آن ورود آسان نانوقطرات به سلول‌های سرطانی از طریق اثرات مکانیکی قوی امواج فراصوت شامل میکروجریان و کاویتاسیون می‌باشد [۴۲]. به عبارت دیگر امواج فراصوت می‌توانند نفوذپذیری غشای سلولی را افزایش دهند و در نتیجه مقدار زیادی نانوذره وارد سلول شود. در این مطالعه برای بررسی بهره سونوداینامیک‌تراپی در حضور نانوقطره Gd/DOX-FA@Alg با غلظت‌های مختلف و امواج فراصوت با شدت‌های مختلف از سنجش کلونی‌زایی استفاده شد. نتایج نشان داد که قدرت کلونی‌زایی در گروه‌های تحت درمان با نانوقطره و امواج فراصوت نسبت به گروه نانوقطره تنها به طور قابل توجهی کاهش یافته است. با افزایش شدت امواج فراصوت تشکیل کلونی به طور معناداری کاهش یافته است. این نتایج بیان می‌کند که نانوقطره سنتز شده می‌تواند به عنوان یک عامل ترانوستیک سبب تشدید اثر امواج فراصوت در درمان سرطان شود.

نانوقطرات سنتز شده با ویژگی‌های تشخیصی و درمانی مناسب می‌توانند به عنوان عوامل ترانوستیک در دارورسانی تحت هدایت و کنترل تصویربرداری فراصوت برای سونوداینامیک‌تراپی سرطان به‌کار بروند.

از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به انجام آزمون تنها روی یک رده سلول سرطانی اشاره کرد. پیشنهاد می‌گردد این مطالعه بر روی چند رده سلولی دیگر و نیز در صورت امکان مطالعات به صورت درون‌تنی (*in vivo*) بر روی مدل حیوانی انجام شود.

در نتیجه، خواص مطلوب نانوقطرات سنتز شده از جمله اندازه کوچک، پایداری بالا، توانایی رهایش کنترل شده توسط

- [22] Pan X, Wang H, Wang S, Sun X, Wang L, Wang W, et al. Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics. *Sci China Life Sci* 2018; 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9262-x> PMID:29666990
- [23] Shen S, Wu L, Liu J, Xie M, Shen H, Qi X, et al. Core-shell structured Fe₃O₄@ TiO₂-doxorubicin nanoparticles for targeted chemo-sonodynamic therapy of cancer. *Int J Pharm* 2015; 486: 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.iipharm.2015.03.070> PMID:25841570
- [24] Heng PW. Controlled release drug delivery systems. *Pharm Dev Technol* 2018; 23: 833. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1534376> PMID:30375914
- [25] Sheeran PS, Dayton PA. Phase-change contrast agents for imaging and therapy. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 2152-2165. <https://doi.org/10.2174/138161212800099883> PMID:22352770 PMCid:PMC5045864
- [26] Loskutova K, Grishenkov D, Ghorbani M. Review on acoustic droplet vaporization in ultrasound diagnostics and therapeutics. *Biomed Res Int* 2019; 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9480193> PMID:31392217 PMCid:PMC6662494
- [27] Vezeridis AM, Gracia C De, Barnhill SA, Kim S, Wu Z, Jin S, et al. Fluorous-phase iron oxide nanoparticles as enhancers of acoustic droplet vaporization of perfluorocarbons with supra-physiologic boiling point. *J Control Release* 2019; 302: 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.013> PMID:30928487
- [28] Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. Advances in delivery systems for doxorubicin. *J Nanomed Nanotechnol* 2018; 9. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000519> PMID:30613436 PMCid:PMC6319900
- [29] Baghbani F, Chegeni M, Moztarzadeh F, Hadian-Ghazvini S, Raz M. Novel ultrasound-responsive chitosan/perfluorohexane nanodroplets for image-guided smart delivery of an anticancer agent: Curcumin. *Mater Sci Eng C* 2017; 74: 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.107> PMID:28254284
- [30] Meng D, Guo L, Shi D, Sun X, Shang M, Zhou X, et al. Charge-conversion and ultrasound-responsive O-carboxymethyl chitosan nanodroplets for controlled drug delivery. *Nanomedicine* 2019; 14: 2549-2565. <https://doi.org/10.2217/nmm-2019-0217> PMID:31271101
- [31] Gu T, He F, Zhang Y, Hatton TA, Khan SA. Nanoemulsion meets droplet microfluidics: controlled mass transport and applications in micro-and nanoparticle preparation. 2018 AICHE Annu Meet AICHE 2018.
- [32] Mortezaazadeh T, Gholibegloo E, Riyahi Alam N, Dehghani S, Haghighi S, Ghanaati H, et al. Gadolinium (III) oxide nanoparticles coated with folic acid-functionalized poly(β -cyclodextrin-co-pentetic acid) as a biocompatible targeted nano-contrast agent for cancer diagnostic: in vitro and in vivo studies. *Magn Reson Mater Physics Biol Med* 2019; 32: 487-500. <https://doi.org/10.1007/s10334-019-00738-2> PMID:30730021
- [33] Wang X, Shang M, Sun X, Guo L, Xiao S, Shi D, et al. Dual-responsive nanodroplets combined with ultrasound-targeted microbubble destruction suppress tumor growth and metastasis via autophagy blockade. *J Control Release* 2022; 343: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.009> PMID:35085694
- [34] Wang P, Tang Q, Zhang L, Xu M, Sun L, Sun S, et al. Ultrasmall barium titanate nanoparticles for highly efficient hypoxic tumor therapy via ultrasound triggered piezocatalysis and water splitting. *ACS Nano* 2021; 15: 11326-11340. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c00616> PMID:34180675
- [35] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2022; 106207. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106207> PMID:35577179
- [8] Jeyamogan S, Khan NA, Siddiqui R. Application and Importance of Theranostics in the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Arch Med Res* 2021; 52: 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.016> PMID:33423803
- [9] Rengeng L, Qianyu Z, Yuehong L, Zhongzhong P, Libo L. Sonodynamic therapy, a treatment developing from photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017; 19: 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.003> PMID:28606724
- [10] Shanei A, Akbari-Zadeh H, Attaran N, Salamat MR, Baradaran-Ghahfarokhi M. Effect of targeted gold nanoparticles size on acoustic cavitation: An in vitro study on melanoma cells. *Ultrasonics* 2019; 106061. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.106061> PMID:31948804
- [11] Ninomiya K, Ogino C, Oshima S, Sonoke S, Kuroda S, Shimizu N. Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles. *Ultrason Sonochem* 2012; 19: 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.09.009> PMID:22019790
- [12] Shanei A, Akbari-Zadeh H, Fakhimikabir H, Attaran N. The role of gold nanoparticles in sonosensitization of human cervical carcinoma cell line under ultrasound irradiation: an in vitro study. *J Nano Res Trans Tech Publ* 2019; p: 1-14. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.59.1>
- [13] Palekar-Shanbhag P, Jog S V, Chogale MM, Gaikwad SS. Theranostics for cancer therapy. *Curr Drug Deliv* 2013; 10: 357-362. <https://doi.org/10.2174/1567201811310030013> PMID:23286214
- [14] Rostami A, Sazgarnia A. Gold nanoparticles as cancer theranostic agents. *Nanomedicine J* 2019; 6: 147-160.
- [15] Azadeh SS, Rahmanian N. Letter to the Editor: Treatment of Covid-19 with Fisetin flavonoid nanoparticles. *Koomesh* 1401; 24: 283-287. (Persian)
- [16] Akbari Jonoush Z, Mansori R, Yazdian F, Omidi M. Detection of prostate cancer biomarker using optical nanobiosensor based on gold nanoparticle. *Koomesh* 1396; 19: 774-784. (Persian)
- [17] Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Talanta* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088> PMID:29674080
- [18] Maghsoudinia F, Tavakoli MB, Samani RK, Hejazi SH, Sobhani T, Mehradnia F, et al. Folic acid-functionalized gadolinium-loaded phase transition nanodroplets for dual-modal ultrasound/magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma. *Talanta* 2021; 228: 122245. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122245> PMID:33773745
- [19] Pourgholi A, Dadashpour M, Mousapour A, Amandi AF, Zarghami N. Anticancer potential of silibinin loaded polymeric nanoparticles against breast cancer cells: insight into the apoptotic genes targets. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2021; 22: 2587. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.8.2587> PMID:34452574 PMCid:PMC8629447
- [20] Nejati K, Rastegar M, Fathi F, Dadashpour M, Arabzadeh A. Nanoparticle-based drug delivery systems to overcome gastric cancer drug resistance. *J Drug Deliv Sci Technol* 2022; 103231. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103231>
- [21] Salmani Javan E, Lotfi F, Jafari-Gharabaghloou D, Mousazadeh H, Dadashpour M, Zarghami N. Development of a magnetic nanostructure for co-delivery of metformin and silibinin on growth of lung cancer cells: Possible action through leptin gene and its receptor regulation. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2022; 23: 519-527. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.2.519> PMID:35225464 PMCid:PMC9272620

- 1565-1574.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.05.007>
- [40] Kripfgans OD, Fowlkes JB, Miller DL, Eldevik OP, Carson PL. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26: 1177-1189.
[https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(00\)00262-3](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(00)00262-3)
PMid:11053753
- [41] Ho YJ, Yeh CK. Theranostic performance of acoustic nanodroplet vaporization-generated bubbles in tumor intertissue. *Theranostics* 2017; 7: 1477-1488.
<https://doi.org/10.7150/thno.19099>
PMid:28529631 PMCID:PMC5436507
- [42] Rapoport N. Phase-shift, stimuli-responsive perfluorocarbon nanodroplets for drug delivery to cancer. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2012; 4: 492-510.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1176>
PMid:22730185 PMCID:PMC3482424
- 2006; 1: 2315-2319.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
PMid:17406473
- [36] Douglas KL, Tabrizian M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005; 16: 43-56.
<https://doi.org/10.1163/1568562052843339>
PMid:15796304
- [37] Kumari SDC, Tharani CB, Narayanan N, Kumar CS. Formulation and characterization of Methotrexate loaded sodium alginate chitosan Nanoparticles. *Indian J Res Pharm Biotechnol* 2013; 5674: 915-921.
- [38] Liu G, Li DC, Li PP, Li RR, Chen SY. Nanoparticle methotrexate delivery system for the treatment of paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Biomed Res* 2017; 28.
- [39] Bajpai SK, Tankhiwale R. Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. *React Funct Polym* 2006; 66:

The Effect of Folic Acid-Targeted Nanocarriers in Ultrasound Imaging-guided Sonodynamic Therapy of Human Cervical Carcinoma (HeLa): in vitro Study

Roghayeh Kamran Samani (Ph.D)¹, Hadi Akbari-Zadeh (Ph.D Student)^{2,3}, Fahimeh Aminolroayaei (Ph.D)⁴, Ahmad Shanei (Ph.D)⁴, Fariba Farhadi Birgani (Ph.D)⁵, Fatemeh Maghsoudinia (Ph.D)^{*6}

1- Department of Medical Physics and Radiology, School of Allied Medical Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2 - Candidate of Medical Physics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Student Research Committee, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Dept. of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Dept. of Radiology, Shoushtar Faculty of Medical Sciences, Shoushtar, Iran

6- Dept. of Radiology Sciences, Faculty of Paramedicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

* Corresponding author. +98 9165794805 f.maghsood@gmail.com

Received: 20 Oct 2022; Accepted: 19 Apr 2023

Introduction: Theranostic nanocarriers can be used simultaneously for the diagnosis and treatment of cancer. In this study, the effect of dotarem- and doxorubicin-loaded nanodroplet as a theranostic agent for ultrasound-guided and -controlled release drug delivery on HeLa cervical cancer cells was investigated.

Materials and Methods: Folic acid-targeted nanodroplets consisting of dotarm (Gd-DOTA) and doxorubicin (DOX) with alginate shells were synthesized and characterized. In this study, HeLa and L929 cell lines were used as cancer and normal cells, respectively. Intracellular uptake of nanocarriers was evaluated using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). Doxorubicin release in response to ultrasound exposure and its effect on cancer treatment were investigated. Ultrasound imaging was performed to assess the ultrasound signal enhancement by nanodroplets.

Results: The characterization results confirmed the successful synthesis of nanodroplets with desirable physicochemical properties. Cytotoxicity test showed that the synthesized nanodroplets had high biocompatibility for normal cells and induced more death in cancer cells (75.3% vs 62.1%). This effect was enhanced under ultrasound exposure (51%). The ICP-OES test showed that the uptake of Gd/DOX-loaded nanodroplets for sonicated cancer cells was approximately 1.5 times higher than that for non-sonicated cells after 12 h. The results showed that the ultrasound exposure significantly increased the doxorubicin release from nanodroplets (77.5% vs 2.1%). Also, ultrasound imaging showed that perfluorohexane nanodroplets could enhance ultrasound signal intensity.

Conclusion: According to the results, doxorubicin- and dotarem-loaded nanodroplets with proper diagnostic and therapeutic properties can be promising theranostic agents in ultrasound-guided and controlled drug delivery for sonodynamic therapy of cancer.

Keywords: Nanoparticles, Drug Delivery Systems, Theranostic Nanomedicine