

## فرمولاسیون، مشخصه یابی و ارزیابی نانوذرات مزوپورسیلیکا-کیتوسان بارگذاری شده با کورسیتین به

## منظور دارورسانی هدفمند در درمان سرطان

نوید احمدی نسب<sup>۱</sup>، حسن حسنی کومله\*<sup>۲</sup>، شهرام تیموریان<sup>۳</sup>، مجتبی بیگ زاده<sup>۴</sup>، محمود کاظم زاد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، گروه بیوتکنولوژی، رشت، ایران

<sup>۲</sup> دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گروه بیوتکنولوژی، رشت، ایران

<sup>۳</sup> دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده انرژی، کرج، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۵/۱۱/۸، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۵/۱۲/۱، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۵/۱۲/۷

**چکیده** کورسیتین یک متابولیت گیاهی ایمن است که به عنوان عامل مهار کننده شیمیایی در مهار سلول‌های توموری و پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها نقش موثر دارد. در این تحقیق به منظور بهبود کارایی و دسترسی زیستی مولکول کورسیتین از نانوحفرات مزوپورسیلیکا با پوشش کیتوسان به عنوان یک بیوپلیمر حساس به pH استفاده شد. برای این منظور ابتدا نانوحفرات مزوپورسیلیکا به روش سل-ژل سنتز شد. سپس، در یک محیط اسیدی با استفاده از گلیسیدیل اکسی پروپیل تری متوکسی سیلان، لایه‌ای از کیتوسان به دور نانوحفرات سیلیکا پوشش داده شد. برای مشخصه‌یابی نانوحامل سنتز شده از روش‌های مختلفی نظیر FESEM، BET و FTIR استفاده شد. نتایج FESEM و BET به ترتیب حاکی از اندازه ذرات و حفرات در محدوده نانومتر بود. همچنین حضور پیک‌های موجود در آنالیز FTIR نشان داد که دارو با موفقیت در نانوحامل قرار گرفته است. از طرفی نتایج محاسبه ظرفیت بارگیری دارو در نانوحامل و همچنین میزان رهایش دارو در دو pH اسیدی و فیزیولوژی بدن نشان داد نانوحامل از کارایی و پایداری مناسب در بارگیری و رهایش دارو برخوردار است. میزان سمیت سلولی فرمولاسیون دارویی در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطانی HeLa با کمک روش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد میزان سمیت سلولی فرمولاسیون دارویی نسبت به داروی آزاد به شکل معناداری افزایش می‌یابد و مقدار IC<sub>50</sub> در رده سلولی سرطانی HeLa از ۵۸ میکرومولار برای کورسیتین آزاد به ۳۶ میکرومولار برای کورسیتین بارگذاری شده در نانوحامل کاهش یافت. در نهایت، این تحقیق نشان داد نانوحامل مزوپورسیلیکا-کیتوسان قادر است به عنوان سیستم دارورسانی هوشمند و زیست‌سازگار برای انتقال داروی کورسیتین به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود.

**کلمات کلیدی:** سیستم دارورسانی هوشمند، نانوحامل، فلاونوئید، سمیت سلولی، درمان سرطان.

## Formulation, Characterization and Evaluation of Quercetin-loaded Chitosan-functionalized Mesoporous Silica for Targeted Drug Delivery in Cancer Treatment

Navid Ahmadi Nasab<sup>1</sup>, Hassan Hassani Kumleh\*<sup>2</sup>, Shahram Teimourian<sup>3</sup>, Mojtaba Beygzadeh<sup>4</sup>, Mahmood Kazemzad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Guilan, University Campus 2, Department of Biotechnology, Rasht, Iran

<sup>2</sup>University of Guilan, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Rasht, Iran

<sup>3</sup>Iran University of Medical Sciences, Department of Medical genetics, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Materials and Energy Research Center, Department of Energy, Karaj, Iran

**Abstract** Quercetin is a safe herbal metabolism which has effective role on inhibition of tumor cells and growth of many types of cancers. In this study to improve the efficiency and bioavailability of Quercetin molecule, Chitosan-functionalized nanoporous mesoporous Silica was used as a pH-sensitive biopolymer. For this purpose, at first nanoporous Mesoporous silica was synthesized by sol-gel method; then Chitosan layer was coated on nanoporous of silica using GPTMS in an acidic medium. Different analysis methods such as FESEM, BET and FTIR were used to characterize the synthesized nanocarrier. FESEM and BET analysis results demonstrated nanometric sizes of particles and porosities. FTIR analysis picks showed successful drug loading on nanocarrier. On the other hand, calculation of drug loading content and encapsulation efficiency in acidic and physiologic pH, illustrated that nanocarrier has suitable performance and stability for drug loading and release. Cytotoxicity of as-drug formulation in different concentrations was investigated by MTT assay on HeLa cells. The results showed that cytotoxicity of as-drug formulation increased in comparison to free drug and IC<sub>50</sub> value of HeLa cells decreased from 58  $\mu$ M for free Quercetin to 36  $\mu$ M for loaded Quercetin. Eventually this study showed Chitosan-functionalized Mesoporous Silica nanocarrier could be considered as a smart and biocompatible drug delivery system to carry Quercetin drug for cancer cells treatment.

**Keywords:** Smart Drug Delivery System, Nanocarriers, Flavonoid, Cytotoxicity, Cancer Treatment.

## ۱- مقدمه

با وجود خصوصیات منحصربه‌فرد کورسیتین حلالیت و دسترسی زیستی بسیار پایین آن در آب، پایداری کم و نیمه عمر کوتاه کاربردهای بالینی آن را با مشکل مواجه ساخته است. بنابراین، در سال‌های اخیر برای اصلاح موانع موجود روش‌های متعددی از جمله استفاده از ابر مولکول‌های میکرو و نانو نظیر بارگیری به کمک سیکلودکسترین، به دام انداختن در نانوذرات کیتوسان و یا لیپوزوم پیشنهاد شده است. با این حال استفاده از این استراتژی‌ها محدودیت‌هایی در کنترل اندازه نانوحامل و یا تطبیق پذیری ضعیف آن‌ها با هم را به همراه دارد [۱۱، ۱۲].

نانوذرات مزوپور سیلیکا به دلیل خصوصیات منحصربه‌فردشان از جمله پایداری حرارتی و شیمیایی بالا، زیست-سازگاری مناسب، حفرات یکنواخت و منظم، سطح ویژه بسیار زیاد با حجم منافذ بالا، مورفولوژی قابل کنترل، قابلیت اصلاح سطح، سنتز ساده و توانایی در حمل و پذیرش انواع مختلف مولکول‌ها نظیر ژن‌ها، پروتئین‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطان به درون حفرات خود به عنوان یک گزینه مناسب در کاربردهای پزشکی معرفی شده‌اند. با وجود این مزایا، مزوپور سیلیکا خالص ماده‌ای غیر هوشمند است در نتیجه قادر به رهایش کنترل شده دارو در زمان و مکان مناسب با نیاز فیزیولوژیکی بدن نمی‌باشد. از سویی دیگر گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد حضور گروه‌های سیلانول بر سطح مزوپور سیلیکای اصلاح نشده و قابلیت ایجاد برهم‌کنش میان آن‌ها با غشاء سلولی می‌تواند عاملی برای ایجاد سمیت سلولی شود. برای غلبه بر این مشکل می‌توان از پوشش‌های پلیمری طبیعی و زیست‌سازگار به منظور کاهش اثرات سمی گروه‌های سیلانولی استفاده کرد [۱۳، ۱۴].

کیتوسان یک کوپلیمر کاتیونی طبیعی است که از واحدهای گلوکزآمین و N-استیل گلوکزآمین تشکیل شده است. این پلی‌ساکارید به علت خواص تخریب‌پذیری مطلوب، غیرسمی بودن و وجود خاصیت آنتی باکتریالی در طیف وسیعی از کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار گرفته می‌شود. از طرفی گروه‌های آمین موجود در ساختار کیتوسان در محدوده‌های خاصی از pH می‌تواند پروتونه شود، براین اساس از این قابلیت می‌توان به عنوان یک ابزار مولکولی هوشمند در پاسخ به محرک‌های حساس به pH بهره برد. همچنین

فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های گیاهی هستند که دارای طیف گسترده‌ای از خواص بیولوژیکی و فعالیت‌های دارویی می‌باشند. خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد میکروبی و ضد توموری از مهمترین اثرات درمانی آن‌ها است که از طریق هدف قرار دادن عوامل مختلف درون سلولی و مولکولی از جمله آنزیم‌ها، سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد، فاکتورهای رونویسی، گیرنده‌های سلولی و کینازهای سلولی باعث شده است به عنوان ساختارهای پلی‌تروپیک بالقوه با قابلیت ایمنی و اثر بخشی بالا در درمان و پیشگیری بسیاری از بیماری‌های انسان از جمله سرطان شناخته شوند [۱، ۲].

در میان فلاونوئیدها، کورسیتین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان قوی با منشأ طبیعی و ایمن شناخته شده است که می‌تواند یون‌های فلزی کلات‌ها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را حذف کند [۳]. همچنین این ترکیب دارویی در شرایط برون‌تنی قادر است سبب مهار آنزیم‌های گزانتین اکسیداز و لپید پراکسیداسیون شود. علاوه بر این، کورسیتین نشان داده است توانایی مقابله با آسیب‌های پوستی اکسیداتیو ناشی از اشعه UV را دارد [۴]. از طرفی کورسیتین به عنوان عامل مهار-کننده شیمیایی در مهار سلول‌های توموری و کاهش سرعت رشد و پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها نظیر گلیوما [۵]، گردن رحم [۶]، روده بزرگ [۷]، سینه [۸]، لوسمی میلوئید [۹] و حفره دهان [۱۰] نقش موثر داشته است.

همچنین، این دارو در مقادیری مشخص باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) در بسیاری از سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم می‌گردد و در اکثر موارد موجب توقف این سلول‌ها در فاز G2/M و یا G1 (در برخی دیگر از سلول‌ها) می‌شود که این امر می‌تواند حساسیت سلول‌های فوق را نسبت به اثرات سمیت سلولی پرتودرمانی افزایش دهد. القاء آپوپتوز توسط کورسیتین ممکن است به‌واسطه افزایش بیان کاسپازهای مختلف، آزاد شدن سیتوکروم C، القاء پروتئین‌های استرس، اختلال در میکروتوبول‌ها و یا میتوکندری انجام شود [۴].

و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت، با کمک آن خلاء در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد محلول‌های باقی‌مانده درون محصول حذف گردید.

برای بررسی مورفولوژی و ساختار نمونه سنتز شده از FE-SEM (Mira 3-XMU) و برای تعیین سطح ویژه نمونه و میانگین قطر حفره‌ها از BET استفاده شد. همچنین از روش طیف‌سنجی فوریه فروسرخ FTIR مدل Bruker Vector 33 برای تایید صحت انکپسوله شدن دارو در نانوحامل استفاده شد.

## ۲-۲ تهیه پوشش کیتوسان به دور مزوپور سیلیکا

ابتدا ۰/۱ گرم پودر MSNs در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۰/۹۹٪ به وسیله امواج فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه توزیع شد و پس از آن با کمک اسید استیک، pH در حدود چهار تنظیم شد. سپس ۰/۱ گرم گلیسیدیل اکسی پروپیل تری متوکسی سیلان (GPTMS) به سرعت به محلول افزوده گردید و اجازه داده شد به مدت سه ساعت محیط واکنش بر روی هم‌زن مغناطیسی با دور متوسط در دمای اتاق هم‌زده شود. در مرحله بعد ۲۰ میلی‌لیتر محلول کیتوسان ۰/۱٪ وزنی/حجمی با اسید سیتریک (۱/۵ درصد وزنی) به واکنش اضافه گردید و در دمای اتاق برای ۱۲ ساعت بر روی هم‌زن مغناطیسی با دور متوسط قرار گرفت. در نهایت، محصول به‌دست آمده با استفاده از سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جمع آوری و با اتانول و آب سه مرتبه شستشو داده شد و با کمک فریزدرایر خشک گردید.

## ۲-۳ بارگیری دارو در نانوحامل CS-MSNs

۱۰۰ میلی‌گرم کورسیتین در ده میلی‌لیتر اتانول حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم CS-MSNs به آن افزوده شد. سپس، با استفاده از HCl یک مولار، pH در حدود چهار تنظیم شد. واکنش به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای چهار درجه سانتیگراد بر روی هم‌زن قرار داده شد. بعد از آن pH واکنش با استفاده از محلول آمونیاک رقیق به حدود هشت رسانده شد. سپس، با استفاده از سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه محصول جمع آوری و با آب و اتانول سه مرتبه شستشو داده شد و با کمک فریزدرایر خشک گردید.

کیتوسان در مقایسه با انواع سوپرمولکولها، پلیمرها و پلی‌الکترولیت‌ها که از روش‌های پیچیده و یا چندمرحله‌ای سنتز می‌شوند به‌طور نسبی ساده‌تر، ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر از طبیعت فراهم می‌شود [۱۴، ۱۵]. از این‌رو استفاده از این ترکیب طبیعی در حوزه دارورسانی و مهندسی بافت در راستای اهداف پژوهشی و مطالعات کاربردی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

در این پژوهش به منظور بهبود کارایی و دسترسی زیستی داروی کورسیتین از نانوذرات مزوپور سیلیکا با پوشش کیتوسان به عنوان یک بیوپلیمر حساس به pH استفاده شد. برای بررسی و مشخصه‌یابی نانوحامل سنتز شده از روش‌های مختلفی شامل FESEM، BET و FTIR بهره گرفته شد. محاسبه ظرفیت بارگیری دارو و کارایی انکپسولاسیون دارو در نانوحامل و همچنین میزان ره‌ایش دارو در دو pH اسیدی و فیزیولوژی بدن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد. در نهایت، میزان سمیت سلولی فرمولاسیون دارویی در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطانی HeLa با کمک روش MTT بررسی شد.

## ۲- روش تحقیق

### ۲-۱ سنتز نانوذرات مزوپور سیلیکا (MSNs)

به منظور سنتز مولکول‌های MSNs مقدار ۰/۵ گرم CTAB به ۹۶ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و با هم‌زن مغناطیسی با ۵۵۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. بعد از مشاهده محلول به رنگ شفاف، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاکی دو مولار به سیستم افزوده شد و دمای محیط واکنش بر روی ۸۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید و به مدت پنج دقیقه با هم ترکیب شدند. سپس، ۲/۵ میلی‌لیتر TEOS به صورت قطره‌وار طی زمان ۱۰ دقیقه به درون محلول واکنش اضافه گردید. سامانه مورد نظر حدود دو ساعت توسط هم‌زن مغناطیسی با ۵۵۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد تا رسوب جامد سفید رنگ تشکیل شود. رسوب به کمک فیلتر کردن جمع آوری و با آب و اتانول پنج مرتبه شستشو داده شد. بعد از آن برای حذف سورفکتانت، محصول به مدت شش ساعت در محلول متانولیک رفلاکس شد. سپس، با آب و اتانول شستشو داده شد

## ۲-۴ محاسبه ظرفیت بارگیری دارو و بازدهی انکپسولاسیون

### کورسیتین در نانوحامل

برای محاسبه درصد ظرفیت بارگیری دارو (DC) و بازدهی انکپسولاسیون (EE) ابتدا ۱۰۰ میلی گرم از کمپلکس دارویی (Que-CS-MSNs) در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل شد. سپس، برای خروج کامل دارو از حامل به مدت ۱۵ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار گرفت. با استفاده از اسپکتروفتومتر (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) مقدار جذب دارو در بیشینه نقطه جذب ۳۷۰ nm خوانده شد و مقادیر ثبت شده با معادله خط بدست آمده از ترسیم منحنی استاندارد کمی سازی گردید. از معادلات زیر برای محاسبه ظرفیت بارگیری دارو و بازدهی انکپسولاسیون دارو در نانوحامل استفاده شد.

(معادله ۱)  $DC(\%) = 100 \times \text{وزن نانوحامل} / \text{کورسیتین قرار گرفته شده در ساختار}$

(معادله ۲)  $EE(\%) = 100 \times \text{وزن کورسیتین استفاده شده در فرمولاسیون} / \text{کورسیتین قرار گرفته شده در ساختار}$

## ۲-۵ بررسی سینتیک رهایش دارو در شرایط برون تنی

مقادیر برابری از Que-CS-MSNs لیوفیلیز شده (۱۰۰ میلی گرم) به طور مجزا در یک میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) ۰/۱ مولار حل شد و پس از آن در کیسه دیالیز با cutoff برابر با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون محصور و سپس، هر یک در محیط جداگانه حاوی ۲۰ میلی لیتر PBS ۰/۱ مولار با مقادیر pH ۵/۵ و ۷/۴ با دور پایین شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غوطه ور شد. در ادامه، در فواصل زمانی مشخص از هر دو محیط نمونه برداری شد. برای تعیین غلظت کورسیتین رهایش یافته به میزان یک میلی لیتر از محلول بافری برداشته شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول ۳۷۰ nm خوانش صورت گرفت. پس از هر بار نمونه برداری از هر یک از دو محیط بلافاصله یک میلی لیتر بافر PBS ۰/۱ مولار با مقادیر pH برابر جایگزین شد. در نهایت، نمودار درصد آزادسازی کورسیتین نسبت به مقدار بارگذاری شده آن در نانوحامل بر حسب تابع زمان رسم شد.

## ۲-۶ کشت سلولهای سرطانی و بررسی درصد زندهمانی

### سلولی با استفاده از آزمون MTT

رده سلول سرطانی HeLa از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلولها به تعداد  $5 \times 10^3$  در هر یک از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه حاوی محیط کشت RPMI-1640 با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس، در داخل انکوباتور با شرایط ۵٪  $CO_2$ ، رطوبت ۹۰٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. به منظور بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT از فرمولاسیون دارویی و داروی آزاد با نسبتهای مولی مشخص استفاده شد.

## ۲-۷ آنالیز آماری

تمام آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار (v16.0) SPSS انجام شد. دادهها به صورت میانگین انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل ارائه شدند. از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) جهت آنالیز آماری دادهها استفاده گردید و مقدار  $P < 0.05$  به عنوان معیار معناداری در تمام آزمون در نظر گرفته شد. در این پژوهش تمام بررسیها با سه تکرار و در قالب گروههای کنترل، داروی آزاد و بارگذاری شده با نانوحامل انجام گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

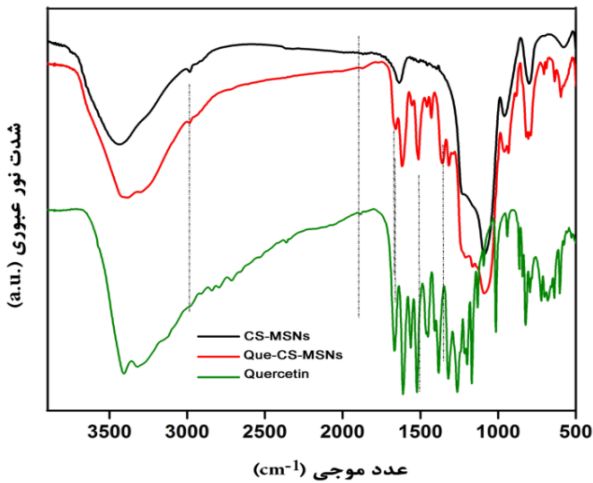
### ۳-۱ بررسی و مشخصه یابی نانوحامل

در شکل (۱) مراحل تهیه نانوحامل CS-MSNs به صورت شماتیک نمایش داده شده است. این مراحل به ترتیب شامل سنتز نانوحامل MSNs، آماده سازی سطح نانوحامل با استفاده از پیش ماده آلی-معدنی GPTMS و در نهایت، پوشش دهی نانوحامل با پلیمر زیستی کیتوسان می باشد که در ادامه همراه با بررسی روشهای شناسایی هر یک به تفکیک شرح داده شده است. شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نمونه CS-MSNs را نشان می دهد. همانطور که دیده می شود، نمونه به طور قابل توجهی دارای توزیع یکنواخت و نانوکرهها با مورفولوژی همسان و قطر تقریبی ۱۷۵ تا ۱۸۵ نانومتر هستند. هم چنین نتایج مطالعات BET و BJH نشان داد قطر حفرات نمونه سنتز شده به طور متوسط حدود ۳/۳ نانومتر و سطح ویژه در حدود ۱۰۵۰ متر مربع بر گرم است.

مربوط به گروه ارتعاش‌های کششی  $C=O$  گروه کتونی است. حضور پیک‌های موجود نشان‌دهنده این است که دارو با موفقیت در نانوحامل قرار گرفته است.

### ۲-۳ محاسبه میزان بارگذاری دارو در نانوحامل

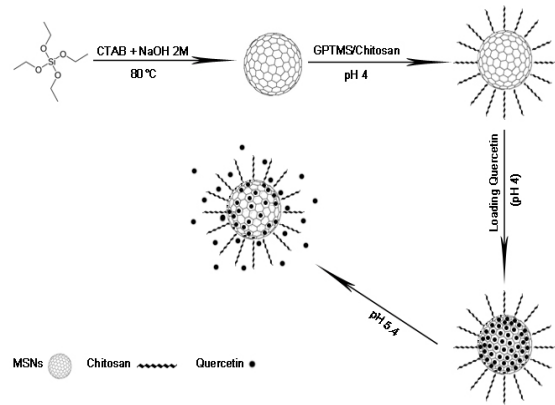
با استفاده از معادلات (۱) و (۲) اشاره شده در بخش ۲-۴ مقدار دارو بارگذاری شده و بازده انکپسولاسیون برای ۱۰۰ میلی‌گرم از کمپلکس دارویی در ده میلی لیتر اتانول به ترتیب برابر  $۳۴/۶۴ \pm ۱/۳۱$  و  $۵۳ \pm ۲/۱۴$  درصد محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات CS-MSNs از کارایی بالایی برای بارگذاری دارو کورسیتین برخوردار می‌باشند.



شکل ۳. طیف FTIR برای نمونه‌های مزوپور سیلیکا-کیتوسان، مزوپور سیلیکا-کیتوسان بارگذاری شده با کورسیتین و داروی کورسیتین.

### ۳-۳ ارزیابی سینتیک رهایش دارو

شکل (۴) نتایج مطالعه هم‌زمان رهایش دارو از-MSNs در pH های مختلف را نشان می‌دهد. مطابق نمودارهای به‌دست آمده از سینتیک رهایش دارو مشاهده می‌شود که کورسیتین آزاد شده از نانوحامل CS-MSNs در  $pH=۵/۵$  از میزان رهایش بیشتر نسبت به  $pH=۷/۴$  برخوردار است. هم‌چنین درصد میزان رهایش دارو از CS-MSNs در دو محیط اسیدی و خنثی به ترتیب  $۴۵/۸۸ \pm ۳/۲۵$  و  $۲۳/۷۰ \pm ۱/۵۳$  در زمان ۲۴ ساعت به‌دست آمد. نتایج تحقیقات Sapino و همکاران در سال ۲۰۱۴ میلادی نشان داد میزان رهایش داروی کورسیتین از نانوحامل مزوپورسیلیکا اصلاح شده با آمینوپروپیل در محیط PBS با  $pH=۵$  حدود ۲۶ درصد می‌باشد [۴]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۱ مطالعات Barreto بر روی نانوحامل مغناطیسی آهن برای حمل داروی کورسیتین نشان

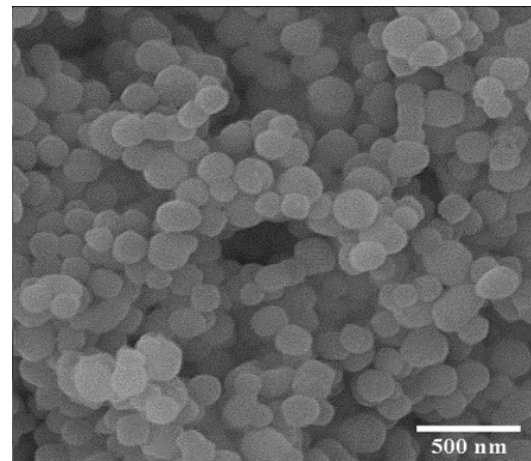


شکل ۱. مراحل تهیه نانوحامل CS-MSNs.

شکل (۳) طیف FTIR برای نمونه‌های مزوپور سیلیکا-

کیتوسان، مزوپور سیلیکا-کیتوسان بارگذاری شده با کورسیتین

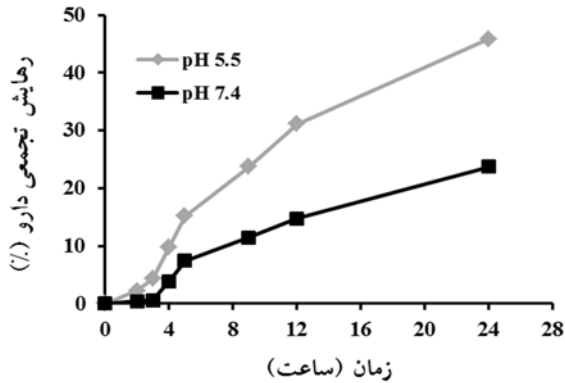
و داروی کورسیتین را نشان می‌دهد.



شکل ۲. تصویر FESEM از نانوحفرت مزوپور سیلیکا.

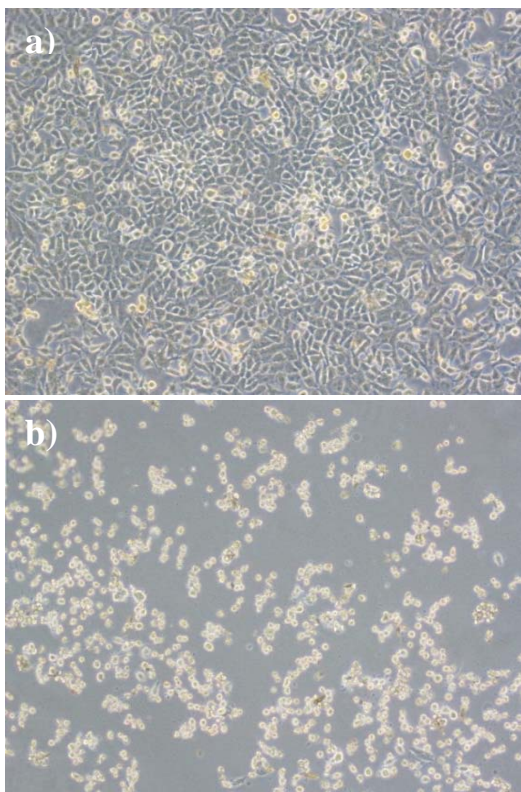
با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که پیک موجود در عدد موجی  $۸۰۰ \text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند Si-O و عدد موجی  $۱۰۸۵ \text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده پیوند Si-O-Si است. عدد موجی  $۲۹۸۵ \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های کششی C-H از گروه های آلکیل است. هم‌چنین به منظور تایید داروی کورسیتین بارگذاری شده در نانوحامل می‌توان به پیک‌های حاصل شده در اعداد موجی فوق اشاره کرد. اعداد موجی  $۱۲۱۰ \text{ cm}^{-1}$  و  $۱۲۴۰ \text{ cm}^{-1}$  معرف حرکات کششی C-O گروه فنلی هستند. عدد موجی  $۱۳۹۰ \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های خمشی گروه OH فنلی می‌باشد. جذب نواحی  $۱۵۱۰ \text{ cm}^{-1}$  و  $۱۶۱۲ \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی آروماتیک  $C=C$  است. عدد موجی  $۳۲۹۰ \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات OH کششی گروه فنلی است. دو پیک موجود در اعداد موجی  $۱۵۲۱ \text{ cm}^{-1}$  و  $۱۶۶۸ \text{ cm}^{-1}$

شده با دارو (با غلظت ۳۶ میکرومولار کورسیتین  $IC_{50}$ ) به طور محسوسی مورفولوژی آنها دستخوش تغییرات شد به گونه‌ای که سلول‌ها به شکل چروکیده درآمدند و از میزان سطح سیتوپلاسم کاسته شد.



شکل ۴. سینتیک رهائش دارو از CS-MSNs در دو pH ۵/۵ و ۷/۴.

همچنین هسته‌ها به صورت پیگمانته و غشا برجسته مشاهده شد. این عوامل ممکن است ناشی از تغییرات متابولیسم سمیت سلولی و ژنتیکی تحت تاثیر دوز موثر دارو بر سلول‌های سرطانی باشد (شکل ۶).



شکل ۶. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های HeLa بعد از ۷۲ ساعت. (a) نمونه کنترل (b) سلول‌های تیمار شده با نانوحامل بارگذاری شده با دارو.

داد میزان رهائش دارو در محیط PBS با  $pH=7/4$  حدود  $14/5$  درصد می‌باشد [۱۶]. در مطالعه حاضر بر خلاف دو مطالعه گزارش شده میزان رهائش دارو به طور هم‌زمان در دو محیط اسیدی و خنثی بررسی شد که نتایج داده‌ها حاکی از برتری نانوحامل CS-MSNs نسبت به نانوحامل‌های اشاره شده است. همچنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد حضور یون  $H^+$  در محیط‌های اسیدی موجب می‌شود که گروه‌های آمینو و هیدروکسیل واکنش نداده از ساختار کیتوسان احاطه شده به دور مزوپور سیلیکا به یون‌های آمونیوم و هیدرونیوم یونیزه شود، در نتیجه دافعه ایجاد شده بین یون‌های با بار همسان سبب متورم شدن ساختار کیتوسان شود که این امر موجب می‌گردد پوشش محافظ دور کانال‌های مزوپور سیلیکا باز شود و داروی بارگذاری شده در آن آزاد گردد. از سویی دیگر در pH های بالاتر به دلیل کاهش غلظت یون  $H^+$  تعداد یون‌های آمونیوم و هیدرونیوم کاهش پیدا کرده در نتیجه، میزان جذب آب کاهش می‌یابد و زنجیره‌های پلیمری کیتوسان به دور کانال‌های مزوپور سیلیکا تجمع کرده و در روند رهائش دارو اختلال ایجاد می‌کنند [۱۴].

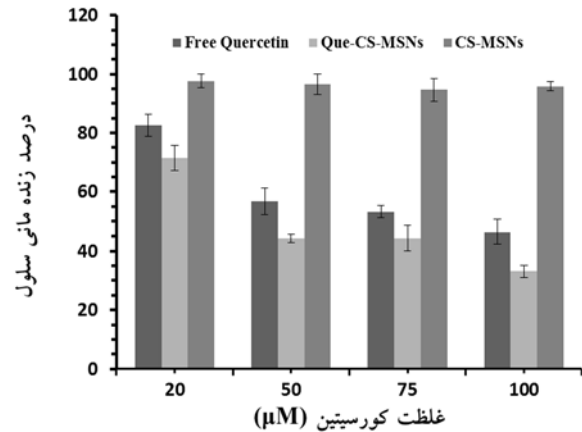
### ۳-۴ بررسی سمیت سلولی بر روی رده سلولی HeLa

در این بررسی، سلول‌های HeLa به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های متفاوت کورسیتین (در محدوده ۲۰-۱۰۰ میکرومولار) در هر دو حالت آزاد و فرمولاسیون دارویی Que-CS-MSNs تیمار شدند. نتایج آزمون MTT نشان داد میزان سمیت سلولی با تیمار Que-CS-MSNs نسبت به داروی آزاد به شکل معناداری افزایش یافته است (شکل ۵). میزان  $IC_{50}$  از ۵۸ میکرومولار برای کورسیتین آزاد به ۳۶ میکرومولار برای کورسیتین بارگذاری شده در CS-MSNs کاهش یافت. همچنین ارزیابی میزان سمیت سلولی در غلظت‌های بالای تیمار نانوحامل فاقد دارو در مقایسه با نمونه کنترل اختلاف معناداری ( $P < 0/05$ ) نشان نداد که نتیجه حاصل شده نشان‌دهنده زیست‌سازگار بودن نانوحامل است.

مطالعه شواهد میکروسکوپی نشان داد سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) پس از ۷۲ ساعت دارای مورفولوژی نرمال، دوکی شکل، هسته سالم و غشای فاقد چین‌خوردگی هستند. از طرفی سلول‌های تیمار شده با نانوحامل بارگذاری

the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1015 (2015) 914-921.

- Vulcain, E., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., Dangles, O., Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. lipid phase, *Free radical research*, 395 (2005) 547-563.
- Sapino, S., Ugazio, E., Gastaldi, L., Miletto, I., Zonari, G., Oliaro-Bosso, S., Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89 (2015) 116-125.
- Braganhol, E., Zamin, L.L., Canedo, A.D., Horn, F., Tamajusuku, A.S., Wink, M.R., Salbego, C., Battastini, A.M., Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line, *Anti-Cancer Drugs*, 176 (2006) 663-671.
- Priyadarsini, R.V., Murugan, R.S., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., Nagini, S., The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition, *European Journal of Pharmacology*, 6491 (2010) 84-91.
- Priego, S., Feddi, F., Ferrer, P., Mena, S., Benloch, M., Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., Asensi, M., Estrela, J.M., Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2-and superoxide dismutase 2-dependent mechanism, *Molecular Cancer Therapeutics*, 710 (2008) 3330-3342.
- Choi, E.J., Bae, S.M. and Ahn, W.S., Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells, *Archives of Pharmacal Research*, 3110 (2008) 1281-1285.
- Duraj, J., Zazrivcova, K., Bodo, J., Sulikova, M., Sedlak, J., Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants, *Neoplasma*, 524 (2004) 273-279.
- Kang, J.W., Kim, J.H., Song, K., Kim, S.H., Yoon, J.H., Kim, K.S., Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells, *Phytotherapy Research*, 24 (2010) 632.
- Cadena, P.G., Pereira, M.A., Cordeiro, R.B., Cavalcanti, I.M., Barros Neto, B., Mdo, C.P., Filho, J.L.L., Silva, V.L., Santos-Magalhães, N.S., Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 18282 (2013) 309-316.
- Carlotti, M., Sapino, S., Ugazio, E., Caron, G., On the complexation of quercetin with methyl- $\beta$ -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 701 (2011) 81-90.
- Xing, R., Lin, H., Jiang, P., Qu, F., Biofunctional mesoporous silica nanoparticles for magnetically oriented target and pH-responsive controlled release of ibuprofen, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 403 (2012) 7-14.
- Pourjavadi, A., Tehrani, Z.M., Mesoporous Silica Nanoparticles (MCM-41) Coated PEGylated Chitosan as a pH-Responsive Nanocarrier for Triggered Release of Erythromycin, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 6313 (2014) 692-



شکل ۵. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کورسیتین بر درصد زنده‌مانی سلول های HeLa پس از ۷۲ ساعت تیمار.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق از نانوحامل‌های مزوپور سیلیکا اصلاح شده با کیتوسان به عنوان یک پلیمر حساس به pH به منظور، پایدار کردن، افزایش حلالیت، زیست دسترسی و افزایش کارآمدی خاصیت ضدسرطانی کورسیتین استفاده گردید. نتایج تحقیقات این پژوهش نشان داد که نانوحامل CS-MSNs از کارایی انکپسولاسیون مطلوبی برای کورسیتین برخوردار است. از طرفی بررسی‌های رهایش دارو نشان داد که میزان رهایش کورسیتین از CS-MSNs به غلظت و زمان وابسته است و مشخص گردید در محیط‌هایی با pH نزدیک به محیط اطراف سلول‌های سرطانی، CS-MSNs قادر است میزان داروی بیشتر و با پایداری بالاتری را به درون محیط در مقایسه با داروی آزاد رها سازد. هم‌چنین نتایج مطالعات سمیت سلولی نشان داد کورسیتین انکپسوله شده در CS-MSNs از میزان سمیت بالاتری نسبت به کورسیتین آزاد برخوردار است. در نهایت، این مطالعه نشان می‌دهد نانوحامل CS-MSNs می‌تواند به عنوان سیستم دارورسانی حساس به pH و زیست‌سازگار برای انتقال کورسیتین به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود.

#### مراجع

- Harborne, J.B., *The flavonoids: advances in research since 1980*, Springer, (2013).
- Dower, J.I., Geleijnse, J.M., Gijsbers, L., Zock, P.L., Kromhout, D., Hollman, P.C., Effects of

- 697.
15. Hu, X., Wang, Y., Peng, B., Chitosan-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as pH-Responsive Nanocarriers for Controlled Drug Release, *Chemistry-An Asian Journal*, 91 (2014) 319-327.
  16. Barreto, A., **Santiago**, V.S., Mazzetto, S.E., Denardin, J.C., Lavín, R., Mele, G., Ribeiro, M.E.N.P., Vieira, I.G.P., Gonçalves, T., Ricardo, N.M.P.S., Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy, *Journal of Nanoparticle Research*, 1312 (2011) 6545-6553.