Archive of SID

Original Article

Designing and Comparison of Two Types of Chitosan Nanogels for Doxorubicine Delivery

Fereshteh Atabi[1], Seyed Latif Mousavi Gargari[2]*, Mehrdad Hashemi[3], Parichehreh Yaghmaei[4]

1- Ph.D., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 3319118651, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran*
Email: slmousavi@shahed.ac.ir

Received: 06/Mar/2015, Accepted: 06/Jul/2015

Abstract

Objective: Drug delivery systems related to different cancer therapies is now expanding. Chitosan (CS) is currently receiving enormous interest for medical and pharmaceutical applications due to its biocompatibility in animal tissues. In this study, two nanogels were prepared from CS. Some of the critical factors such as controlling the release, adsorption and specially targeting drug delivery are considered while preparing the nanogels.

Methods: Phosphorylated CS (PCS) and Myristilated CS (MCS) nanogels were prepared by reacting CS with tripolyphosphate (TPP) and Myristate as cross-linking agents respectively and then were loaded with Doxorubicin (DOX). The nanogels were characterized by different techniques such as scanning electron microscopy, dynamic light scattering and Fourier-transform infrared. The cytotoxicity of free DOX, MCS nanogels and DOX loaded MCS was evaluated by the MTT assay.

Results: The result of DOX loading and releasing of the nanogels showed high loading capacity and drug loading efficiency of about 97%. Results indicated slow release of about 16-28% of DOX from PCS within 5 days and 18-40% from MCS within 15 days. DOX and MCS-DOX showed the same toxic effect on the prostate cancer cells (LNCaP).

Conclusion: Both PCS and MCS nanogels were qualified on the basis of size, loading and releasing capacity.

Keywords: Drug delivery, Phosphorylated chitosan nanogels, Myristilated chitosan nanogels, Doxorubicin, Nanomedicine

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 53-67

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل

طراحی و مقایسه دو نوع نانوژل کیتوسان به منظور هدایت داروی دکسوروبیسین

فرشته عتابی[1]، سید لطیف موسوی گرگری[2*]، مهرداد هاشمی[3]، پریچهره یغمایی[4]

۱- دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم-تحقیقات، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم-تحقیقات، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email: slmousavi@shahed.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۴/۱۵

چکیده

هدف: سیستم‌های متنوع انتقال دارو در ارتباط با درمان انواع سرطان‌ها در حال گسترش است. در سال‌های اخیرکیتوسان از نظر سازگاری زیستی در سلول‌های جانوری و کاربرد آن در زمینه‌های پزشکی و دارویی مورد توجه زیادی واقع شده است. در این تحقیق دو نانوژل کیتوسانی تهیه شد. در تهیه این نانوداروها به عامل‌های حیاتی مثل تنظیم رهایش، جذب و به‌ویژه ارسال هدفمند دارو توجه شده است.

مواد و روش‌ها: نانوژل‌های فسفریله کیتوسانی (PCS) و نانوژل‌های میریستیله کیتوسانی (MCS) به‌ترتیب از ترکیب کیتوسان با تری پلی فسفات و میریستیک اسید تهیه و سپس با داروی دکسوروبیسین بارگذاری شدند. نانوژل‌ها با روش‌های مختلف مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی، پراکنش دینامیکی نور و طیف سنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفتند. سمی بودن داروی آزاد (DOX)، نانوژل MCS و MCS بارگذاری شده با DOX با روش MTT سنجیده شد.

نتایج: نتایج حاصل از بارگذاری و رهایش نانوژل‌ها با داروی دکسوروبیسین نشان دهنده ظرفیت بالای بارگذاری و ظرفیت مؤثر دارو حدود ۹۷ درصد بود. همچنین رهایش ملایم دارو ۱۶-۲۸ درصد از PCS طی ۵ روز و ۱۸-۴۰ درصد از MCS در مدت ۱۵ روز بود. DOX و MCS-DOX اثر کشندگی مشابهی روی سلول‌های سرطانی پروستات (LNCaP) نشان دادند.

نتیجه‌گیری: هر دو نانوژل PCS و MCS هم از نظر اندازه و هم از نظر ظرفیت‌های بارگذاری و رهایش از قابلیت‌های مناسبی برخوردار بودند.

کلیدواژگان: دارورسانی، نانوژل فسفریله کیتوسان، نانوژل میریستیله کیتوسان، دکسوروبیسین، نانودارو

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۵۳-۶۷

مقدمه

نانوتکنولوژی سرطان یکی از جدیدترین گرایش‌ها در درمان سرطان است. در این میان تنظیم رهایش، جذب وخصوصاً محل ویژه هدف دارو از عوامل حیاتی در سیستم‌های انتقال دارو است [۱]. فناوری نانو به همراه گسترش

www.SID.ir

Archive of SID

دامنه آن در زمینه‌های مختلف علمی، پیشرفت قابل توجهی در کاربردهای زیست پزشکی از جمله روش‌های نوین تحویل دارو داشته است. در بسیاری از موارد فناوری نانو و پلیمر نسبت به دیگر فناوری‌ها در زمینه‌هایی مانند صنعت داروسازی و نوآوری درمانی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۲]. به‌طور معمول، نانوحامل‌های حاوی دارو می‌تواند از دارو در راه عزیمت به محل مورد نظر در برابر تخریب یا غیر فعال‌سازی محافظت نماید [۳]، در حالی که استفاده مستقیم از این داروها به‌دلیل سمی بودن یا عواملی از این قبیل مقدور نیست. تحقیقات قابل توجهی در زمینه توسعه نانوذرات مؤثر درسیستم‌های انتقال دارو با تخریب‌پذیری زیستی وجود دارد [٤، ٥]. تثبیت دارو در یک بستر و حامل مناسب، روش مناسبی را برای پایداری، ذخیره‌سازی یا عرضه مداوم دارو ارایه می‌دهد. دارو به روش‌های مختلف مانند حل شدن، محبوس شدن، جذب یا متصل شدن در ماتریس نانوذرات قرار می‌گیرد [٥، ٦]. ماتریس نانوذرات می‌تواند از موادی با تخریب‌پذیری زیستی نظیر پلیمرها یا پروتئین‌ها باشد. با توجه به تنوع روش‌های آماده‌سازی، نانوذرات را می‌توان با خواص مختلف مانند میزان بارگیری و رهایش عامل درمانی در نانو ذره تهیه نمود [٥]. بسته‌بندی داروها در حامل‌های خاص شامل نانوژل‌ها، هیدروژل‌ها، لیپوزوم‌ها، دندریمر و غیره علاوه بر حفاظت آن‌ها در برابر عواملی مانند اکسیژن، رطوبت، pH و سایر عوامل محیطی در افزایش فعالیت زیستی آن‌ها و همچنین در فراهم کردن غلظت‌های مناسب از دارو در محیط نیز مؤثر است [٧]. کیتوسان (Chitosan) به‌طور گسترده در تهیه نانوژل‌ها برای امر دارورسانی مطالعه و بررسی شده است [٨، ٩] از جمله خواص ارزنده این پلیمر که آن را برای مقاصد دارورسانی در بدن مناسب ساخته است، قابلیت تزریق آسان، نسبت بالای سطح به حجم و کاهش احتمال وقوع آمبولی (Embolus) است [١٠]. در ساختار کیتوسان، به‌دلیل حضور گروه آمین در موقعیت کربن شماره ۲ در واحدهای D –گلوکز آمین در محیط اسیدی، پلی ساکارید به پلی‌کاتیون تبدیل می‌شود [١٠، ١١]. بنابراین ذرات میکرو و نانو به سادگی با واکنش الکترواستاتیک متقابل بین گروه‌های آمین موجود در کیتوسان و گروه کثیری از مواد پلی آنیونی مانند سیترات، سولفات، تری پلی فسفات (TPP)، گلوتارآلدیید و غیره که دارای قابلیت سازگاری زیستی هستند قابل تهیه است [١٠، ١٢، ١٣]. این واکنش متقابل نیازمند شرایط بهینه‌ای از نظر دما و pH است [١٣، ١٤]. کلوئیدهای کیتوسان برای مصرف دارو (از ترکیبات با وزن مولکولی پایین گرفته تا داروهای با وزن مولکولی بالا) از طریق دهان، واژن و تزریق و به‌منظور افزایش جذب مواد زیستی قابل تجزیه یا به‌منظور افزایش جذب مواد آب دوست در سرتاسر لایه‌های اپیتلیال، به‌طور گسترده‌ای بررسی شده است [١٥]. با توجه به ویژگی‌های مطرح شده برای کیتوسان، در این تحقیق دو نانوژل به اسامی PCS (Phosphorylated chitosan) و MCS (Myristilated chitosan) با پایه کیتوسان طراحی و تهیه شد و پس از بارگذاری با داروی دوکسوروبیسین (Doxorubicine)، خصوصیات فیزیکو شیمیایی آن‌ها مانند اندازه، میزان بارگذاری و رهایش دارو و... با روش‌های مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی شامل اسید سیتریک، TPP (Pentasodium tripolyphosphate $Na_5P_3O_{10}$)، دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) و گلوتارآلدیید که از نمایندگی شرکت Merck آلمان خریداری شد. همچنین سدیم بوروهیدرات (NaBH4)، کیتوسان، EDC [1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide]، NHS (N-hydroxysuccinimide)، رودامین ۱۲۳، میریستات و MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] که از نمایندگی شرکت Sigma آمریکا خریداری شد. رده سلولی سرطان پروستات (LNCaP) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI

www.SID.ir

Archive of SID

(Roswell Park Memorial Institute medium) (شرکت Gibco، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum: FBS) رشد داده شد.

تهیه نانوژل کیتوسان –TPP (PCS)

برای تهیه نانوذرات PCS از روش ارایه شده توسط ترانه‌جو و همکاران با تغییراتی استفاده شد [۱۳]. بدین منظور ۰/۱ گرم از کیتوسان (CS) در ۲۰ میلی‌لیتر اسید استیک یک درصد در دمای اتاق حل گردید تا یک محلول یکنواخت و همگنی از کیتوسان با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. یک درصد وزنی TPP در۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و یک محلول TPP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. pH این محلول روی ٤ تنظیم گردید. محلول TPP حاصل قطره قطره به محلول کیتوسان فوق در حین سونیکاسیون مداوم با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز و در حین همزدن اضافه گردید و بدین ترتیب محلول نانوذره PCS با نسبت ۹ : ۱ از CS : TPP تهیه شد.

تهیه نانوژل کیتوسان- میریستیک اسید (MCS)

برای تهیه ۰/۵ الی ۱درصد (حجمی/ وزنی) از نانوذرات کیتوسانی MCS، ابتدا مقادیر ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم از کیتوسان در دو ظرف جداگانه هر یک حاوی ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱درصد در دمای اتاق با همزدن مداوم حل گردید تا یک محلول یکنواخت و همگنی از کیتوسان به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۵ و ۱درصد وزنی (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌دست آید. محلول‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه و با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز سونیکه شدند و سپس pH محلول‌ها اندازه‌گیری گردید. به‌منظور تهیه نانوذره MCS با نسبت ۹ : ۱ از کیتوسان: میریستیک اسید همزمان با همزدن محلول در روی هم زن مغناطیسی، ۳٦ میلی‌گرم اسید چرب میریستیک محلول در متانول به همراه ۹۰ میلی‌گرم EDC و ۵۵ میلی‌گرم NHS به آرامی به کیتوسان ۰/۵درصد اضافه شدند. پس از ۲ ساعت همزدن مداوم، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول به محلول فوق اضافه شد و همزدن محلول به‌مدت دو الی ۵ ساعت در شرایط تاریکی ادامه یافت. ژل کیتوسان با افزودن سود ۱۰ نرمال در شرایط pH قلیایی با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب حاصل به‌ترتیب با آب مقطر، اتانول و آب مقطر شستشو داده شد و در ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱درصد حل شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز سونیکه شد. ژل حاصل با فیلتر سرسرنگی۰/۲۲ میکرون چندین مرتبه فیلتر شد. محلول نانوذره MCS تهیه شده در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ارزیابی خواص فیزیکو شیمیایی نانوژل‌های کیتوسانی

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی ابتدا نمونه‌ها روی یک نگهدارنده (Holder) قرار داده شدند و سپس تحت خلأ در آون خشک و با طلا پوشانده شدند. اندازه ذرات در یک شتاب ولتاژ ۳۰ کیلو ولت و با یک بزرگنمایی ۲۰X و ٤۰ X به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope: SEM) مشخص شد.

پتانسیل زتا و پراکنش دینامیکی نور DLS (Dynamic light scattering)

برای اندازه‌گیری قطر نانوذرات، ابتدا نمونه نانوژل در آب حل شد تا به غلظت نهایی ۰/۵درصد وزن خشک نانوژل در مخلوط رسید. مخلوط حاصل در حمام آب سونیکه شد تا نانوذرات کاملاً پراکنده شدند. سپس قطر ذرات و پراکندگی نانوژل‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری شد. همچنین حرکت الکتروفورتیک نانوذرات با استفاده از دستگاه پتانسیل زتا در فاز PALS [Zeta Sizer Nano-ZS-90 (Malvern Instruments)]

www.SID.ir

Archive of SID

محاسبه گردید. میانگین قطر ذرات با حداقل ۳۰ مرتبه تکرار به همراه شاخص پراکندگی pdI (polydispersity Index) توسط دستگاه محاسبه شد.

طیف سنجی مادون قرمز FT-IR

برای نشان دادن برهمکنش اجزای مختلف تشکیل دهنده نانوذرات با یکدیگر از روش FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های TPP، میریستیک اسید، کیتوسان (CS)، دکسوروبیسین (DOX)، PCS، MCS، DOX-PCS و DOX-MCS با پودر خالص KBr مخلوط شد و سپس از آن‌ها قرص‌های فشرده تهیه گردید. طیف نمونه‌های مورد نظر با دستگاه اسپکتروسکوپی مادون قرمز اندازه‌گیری و بررسی شد.

بارگذاری و رهایش داروی دکسوروبیسین از نانوذرات

بارگذاری و رهایش دارو در نانوذرات بر اساس روش دیالیز و مطابق روش وانگ (Wang) و همکارانش ارزیابی شد [۱۶]. برای مشخص نمودن اثر غلظت نانوژل بر روی بارگذاری و رهایش دارو، مطابق جداول ۲ و ۳ مقادیر مشخصی از نانو ژل‌های PCS و MCS به ۰/۵ میلی‌لیتر داروی دکسوروبیسین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. محلول‌های فوق کاملاً مخلوط گردیده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت به آرامی هم زده شد. به‌منظور حذف داروی دکسوروبیسین اضافی بارگذاری نشده در نانوژل از روش دیالیز استفاده شد. مخلوط فوق به یک کیسه دیالیز با امکان عبور (Cut off) تا ۳ کیلو دالتون منتقل و به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقابل ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر در حین هم خوردن دیالیز شد. کیسه دیالیز به ۳۰ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (PBS)، pH ۷/٤ منتقل شد و عمل دیالیز برای مدت زمان ۳ ساعت در این بافر ادامه یافت. در فواصل زمانی مشخص، مقدار ۲ میلی‌لیتر از بافر دیالیز برداشت و با همان مقدار از بافر PBS جایگزین گردید. مقدار داروی موجود در بافر به کمک HPLC (High-performance liquid chromatography) اندازه‌گیری و غلظت دارو با کمک منحنی استاندارد محاسبه شد.

تعیین ظرفیت بارگذاری (LC) و میزان رهایش دارو

مقادیر بارگذاری و رهایش داروی دکسوروبیسین با استفاده از کروماتوگرافی HPLC و ستون فاز معکوس اندازه‌گیری شد. پس از متعادل‌سازی ستون با بافر سدیم لوریل سولفات- فسفریک اسید : استونیتریل، با نسبت ۵۰:۵۰ نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرحله دیالیز به‌طور جداگانه به ستون (٤/٦ میلی‌متر در ۲۵۰میلی‌متر، ۵ میکرومتر، C۱۸) تزریق و با بافر فوق با سرعت خروج ۱ میلی‌لیتر در دقیقه شستشو داده شد. خروجی‌های ستون در ۲۵٤ نانومتر خوانده شدند و غلظت دارو با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. بارگذاری مؤثر (Loading Efficiency: LE) و ظرفیت بارگذاری (Loading Capacity: LC) دارو بر طبق معادلات زیر محاسبه گردید:

$$LE = \frac{\text{مقدار کل داروی دکسوروبیسین} - \text{مقدار داروی دکسوروبیسین آزاد}}{\text{مقدار کل داروی دکسوروبیسین}}$$

$$LC = \frac{\text{مقدار کل داروی دکسوروبیسین} - \text{مقدار داروی دکسوروبیسین آزاد}}{\text{مقدار نانوژل}}$$

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون MTT

سمی بودن نانوذرات تهیه شده روی سلول‌ها به روش MTT بررسی شد. بدین منظور پس از رشد و ازدیاد سلول‌های LNCaP در محیط RPMI 1640، سلول‌های چسبنده به کف فلاسک به کمک تریپسین ۰/۲۵درصد جدا شدند. پس از سانتریفوژ و شمارش سلولی با لام نئوبار، میزان ۱۰۰۰۰ سلول به هر چاهک از یک پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور نگهداری گردید. در کلیه موارد برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد. به‌منظور کنترل و تنظیم مقدار سلول‌ها و چگالی آن‌ها در محیط کشت سلولی، قبل از انجام آزمون MTT درصد سلول‌های زنده تعیین شد؛ به‌طوری‌که درصد سلول‌های زنده کمتر از ۹۰ درصد نبود. غلظت‌های مختلف دارو و نانوژل بر حسب نوع آزمایش در محیط کشت RPMI تهیه شده روی سلول‌ها اثر داده شدند. برای ایجاد شرایط استریل کلیه محلول‌های تهیه شده از صافی (فیلتر) سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند.

برای به‌دست آوردن LC_{50} میزان سمی بودن دارو در غلظت‌های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مول در تکرارهای دوتایی روی سلول‌ها بررسی شد. سپس غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرومول از نانوژل و نانوژل به همراه دارو در مجموع در ۳ گروه تهیه شدند. بدین ترتیب برای هر نوع تیمار، ۲ یا ۳ چاهک برای هر غلظت در مقایسه با سلول‌های طبیعی بدون تیمار (غلظت صفر) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت، ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت مجدداً در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ٤ ساعت پلیت با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع روی سلول‌ها کاملاً خارج شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO در تاریکی به هر چاهک اضافه و کاملاً مخلوط گردید تا محلول بنفش رنگ یکنواختی در هر چاهک ایجاد شد. در نهایت پلیت توسط دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد میزان سمی بودن (Cytotoxicity) در سلول‌ها از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد میزان سمی بودن} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب ماده سمی}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}}$$

و درصد سلول‌های زنده پس از تیمار از فرمول ذیل محاسبه شد:

درصد سلول‌های زنده = درصد میزان سمی بودن − ۱

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با حداقل سه بار تکرار به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شد و داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (Analysis of variance: ANOVA One-Way) بررسی شد. مقایسه میان نانوژل MCS و نانودارو با استفاده از آزمون توکی (Tukey) انجام شد و سطح معنی‌دار $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

شکل و اندازه نانوژل‌های کیتوسان

نتایج حاصل از بررسی اندازه و شکل ذرات نانوژل‌های MCS و PCS با SEM و DLS در شکل ۱ و جدول ۱ ارایه شده است. متوسط قطر ذرات برای نمونه‌های MCS و PCS به‌ترتیب ۱۵ و ۱۵۲ نانومتر به‌دست آمد.

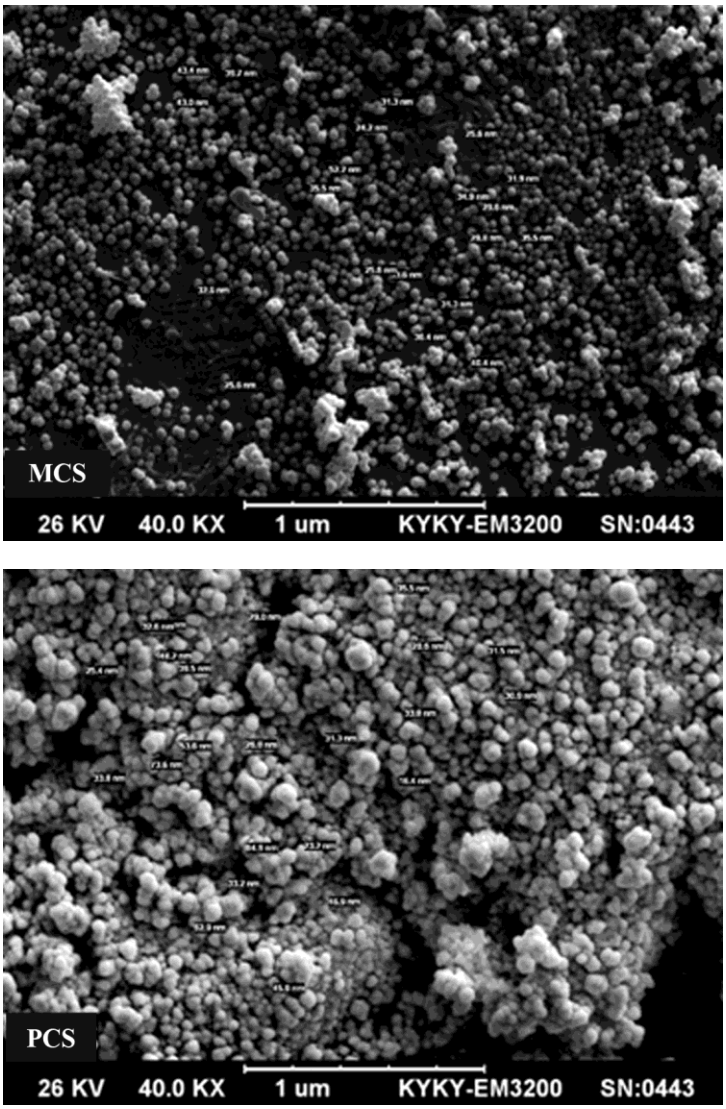
همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود در تصاویر حاصل از SEM، نانوژل‌های PCS و MCS ظاهری کروی با سطحی فشرده و زمینه یکنواخت دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ نتایج مربوط به SEM و DLS نانوژل‌های PCS و MCS

نوع نانوژل	MCS	PCS
میانگین اندازه ذره با DLS (نانومتر)	۲٤/٤۸±٥/۰۹	۱۱٦± ۳۲/٦٥
تعداد دفعات شمارش توسط دستگاه DLS	٥۲	۳٦
پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	٤۰±۲/۰۲	۲۸/۷ ± ۷/۰۲
اندازه متوسط قطر ذرات با SEM (نانومتر)	۱٥/٦٤	۱٥۲/۲
PdI	۰/۰۱٦	۰/٤۰٦



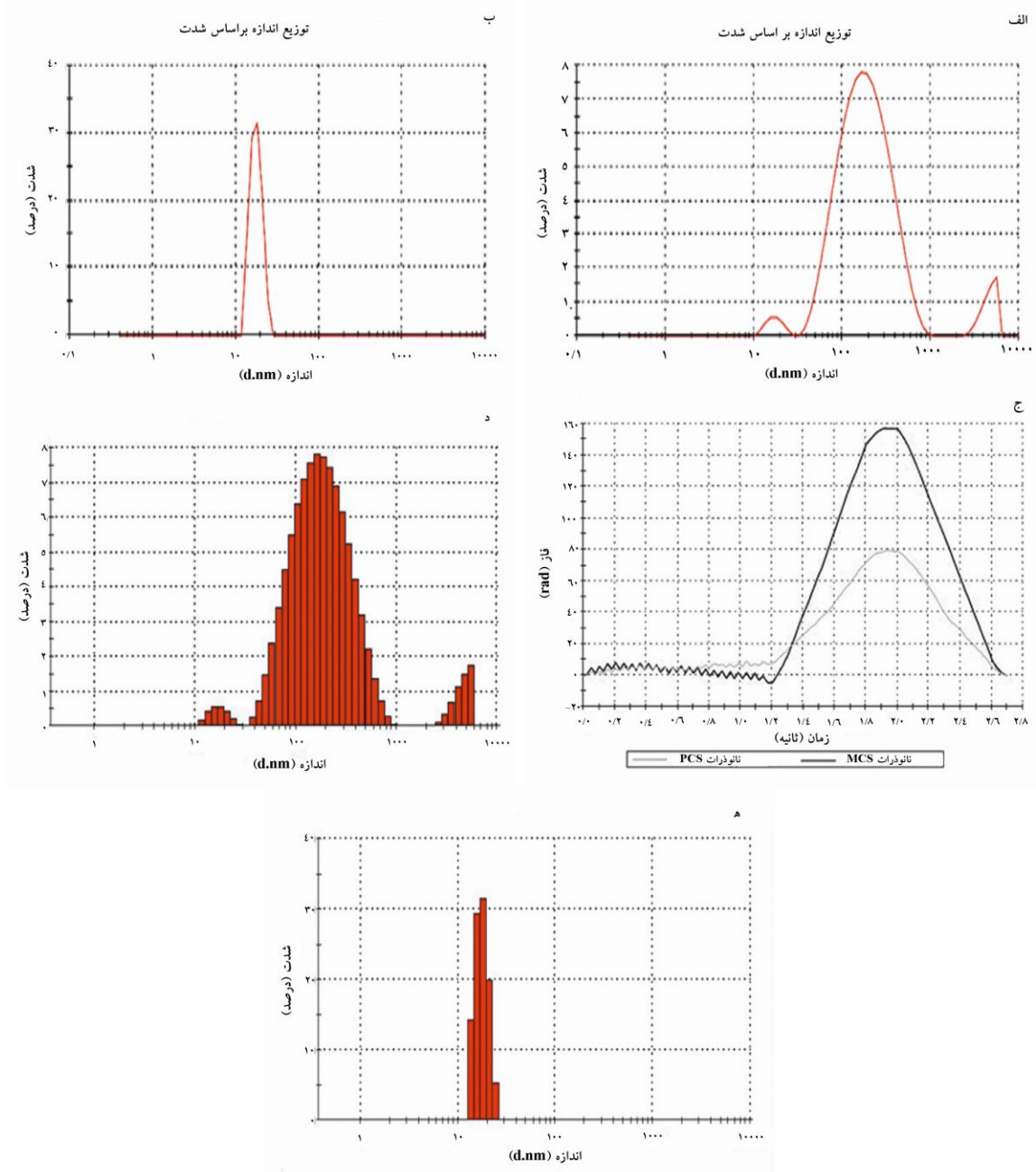
شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM از نانوژل‌های MCS و PCS (تصاویر در غلظت زیاد تهیه شده‌اند).

نتایج DLS برای نانوژل‌های MCS و PCS در آب مقطر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ و شکل ۲ ارایه شده است. متوسط اندازه ذرات به‌دست آمده با DLS برای نانوژل PCS ۱۵۲ نانومتر و مقدار PdI به‌دست آمده که نمایان‌گر میزان پراکندگی داده‌هاست، برای نانوژل‌های PCS حدود ۰/٤۰٦ بود. متوسط قطر نانوژل محاسبه شده از DLS

www.SID.ir

Archive of SID

بـرای نـانوژل‌هـای MCS، در حـدود ۱۵/٦٤ نـانومتر بـود. همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، توزیع اندازه ذرات برای نانوژل MCS، در حـدود ۱۱–۲۵ نـانومتر و مقـدار PdI به‌دست آمده برای نـانوژل MCS نیـز ۰/۰۱٦ بـود. چگـونگی توزیع پتانسیل زتا برای نانوژل‌های MCS و PCS در شکل ۲ (ج) مقایسه شده است. پتانسیل زتـای بـه‌دسـت آمـده بـرای نانوذرات MCS و PCS به‌ترتیب حدود ٤۰ و ۲۸/۷ میلی‌ولت بود (جدول ۱)



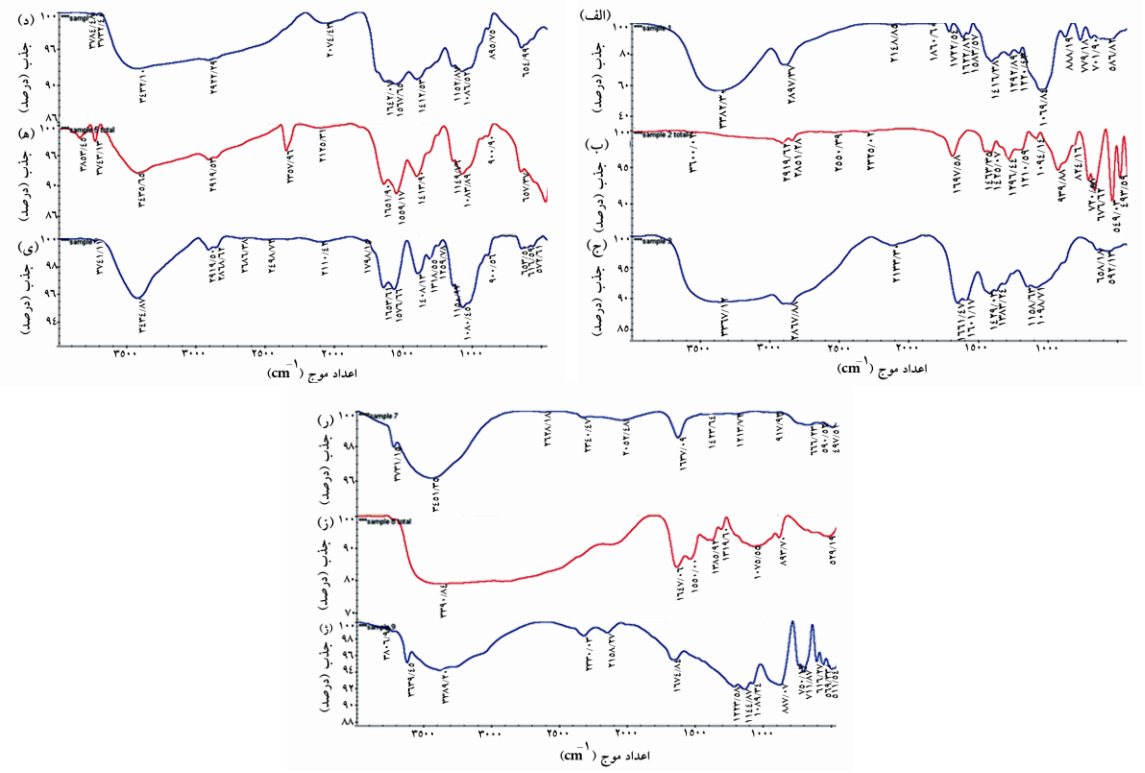
شکل ۲ نتایج DLS برای نانوژل‌های MCS و PCS؛ (الف) توزیع اندازه نانوذرات PCS بر اساس شدت (Intensity)، (ب) توزیع نانوذرات MCS بر اسـاس شـدت، (ج) مقایسه توزیع پتانسیل زتا در هر دونوع نانوذرات، (د) منحنی آمار اندازه نانوذراتPCS، (ه) منحنی آمار اندازه نانوذرات MCS

www.SID.ir

Archive of SID

طیف سنجی مادون قرمز FT-IR

نتـــایج ارزیـــابی ســـاختاری کیتوســـان (CS)، داروی دکسوروبیســـین (DOX)، PCS و PCS بارگـــذاری شـــده بـــا DOX (PCS-DOX) و میریستات، MCS و MCS بارگـذاری شده با DOX (MCS –DOX) بـه کمـک اسـپکترومتری FT-IR در شکل ۳ ارایه شده است.



شکل ۳ اسپکترومتری FT-IR از (الف) DOX، (ب) میریستات، (ج) CS، (د) MCS، (ه) MCS -DOX بدون سونیکاسیون، (ی) MCS -DOX با سونیکاسیون، (ر) TPP، (ز) PCS، (ژ) PCS-DOX

جدول ۲ نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از نانول PCS بر اساس روش دیالیز

ظرفیت مؤثر (LE) (درصد)	بارگذاری دارو (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	ظرفیت بارگذاری (LC) (درصد)	PCS:DOX	PCS (میلی‌گرم)
۹۶/۵	۹۶۵	۱۹۳	۱ : ۲	۰/۵
۹۷/۳	۹۷۳	۱۲۲	۱ : ۱/۲۵	۰/۸
۹۷/۵	۹۷۵	۹۷/۵	۱ : ۱	۱/۰

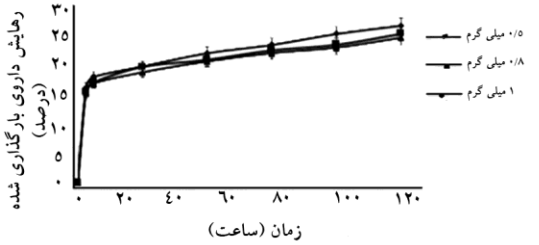
بارگذاری و رهایش داروی دکسوروبیســین از نانوژل‌های PCS

نتـایج بارگـذاری ۱ میلـی‌گـرم داروی دکسوروبیسـین بـا غلظت‌های مختلف نانوژل PCS در جدول ۲ و میزان رهایش دارو در شکل ٤ ارایـه شـده اسـت. الگـوی رهـایش دارو در ساعات اولیه سریع بود و به تـدریج شـیب رهـایش بـا دامنـه

www.SID.ir

Archive of SID

ملایم‌تری ادامه یافت. نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از غلظت‌های مختلف PCS در شکل ٤ نشان دهنده ٢٦درصد رهایش دارو طی ٣ ساعت اولیه است. این میزان پس از گذشت ١٢٠ ساعت، در مجموع به ٢٨ درصد رسید.



شکل ٤ نمودار رهایش داروی بارگذاری شده در نانوژل PCS در مدت زمان ١٢٠ ساعت؛ رهایش داروی بارگذاری شده از غلظت‌های مختلف نانوژل PCS

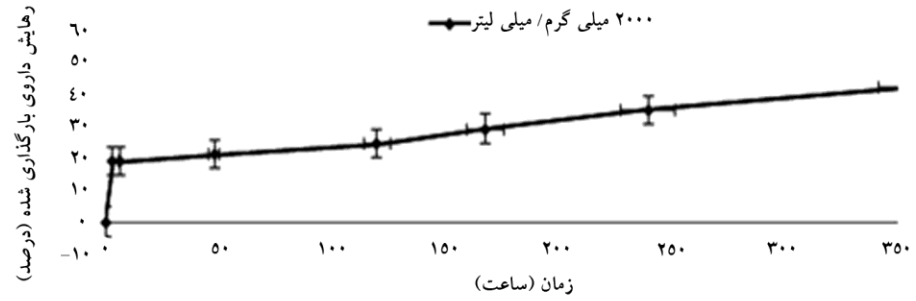
بارگذاری و رهایش داروی دکسوروبیسین از نانوژل‌های MCS

نتایج بارگذاری ٢ میلی‌گرم داروی دکسوروبیسین محلول در DMSO با ٥ میلی‌گرم نانوژل MCS در جدول ٣ و میزان رهایش دارو در شکل ٥ ارایه شده است. در این حالت نیز الگوی رهایش دارو در ساعات اولیه سریع بود و به تدریج شیب رهایش با دامنه ملایم‌تری ادامه یافت.

نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از MCS در شکل ٥ نشان دهنده رهایش ١٨/٥درصدی دارو طی ٣ ساعت اولیه است. این میزان بعد از گذشت ٣٦٠ ساعت (١٥ روز)، در مجموع به حدود ٤٠ درصد رسید.

جدول ٣ نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از نانوژل MCS بر اساس روش دیالیز

ظرفیت مؤثر (LE) (درصد)	بارگذاری دارو (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	ظرفیت بارگذاری (LC) (درصد)	MCS:DOX	DOX (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
٩٩/٠٨	١٩٨١/٤٦	٣٩/٦٣	١ : ٠/٤	٢

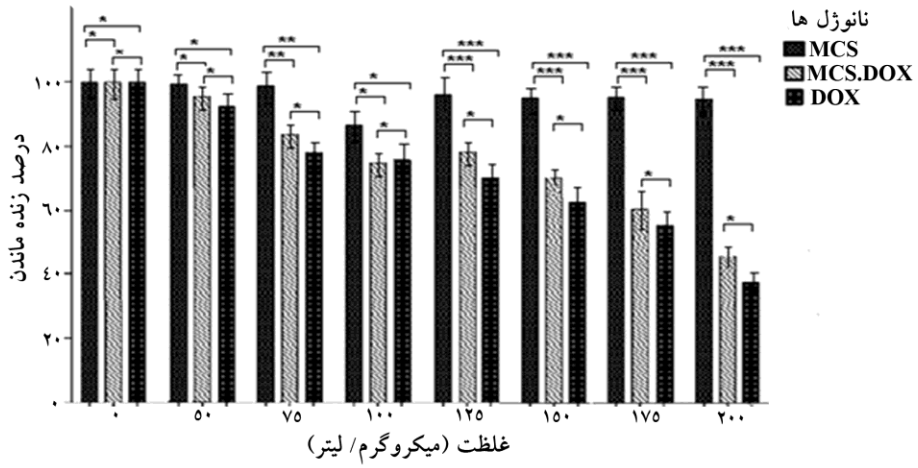


شکل ٥ نمودار رهایش داروی بارگذاری شده در نانوژل MCS در مدت زمان ٣٥٠ ساعت

نتایج آزمون MTT نانوژل‌ها و دارو بر سلول‌های سرطانی در شکل ٦ نشان دهنده آن است که نانوژل حاوی دارو (MCS-DOX) در مقایسه با نانوژل تنها (MCS)، با سطح معنی‌داری ٠/٠٠١ >P (***) موجب کاهش حیات سلول‌ها شده است. داروی DOX در مقایسه با MCS، در غلظت‌های بالای ١٢٥ میکرومولار با سطح معنی‌داری ٠/٠٠١ >P (***) موجب کاهش حیات سلول‌ها شده است. نانوژل حاوی دارو (MCS-DOX) در مقایسه با داروی DOX هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در حیات سلول‌ها نداشته است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦ مقایسه آثار سمی غلظت‌های مختلف نانوژل‌های میریستیله بر سلول‌های LNCaP؛ علامت * نشان‌دهنده معنی‌داری مقایسه انجام شده در سطح P< ۰/۱ است. علامت ** نشان‌دهنده معنی‌داری مقایسه انجام شده در سطح P< ۰/۰۱ است. علامت *** نشان‌دهنده معنی‌داری مقایسه انجام شده در سطح P< ۰/۰۰۱ است. MCS نانوژل میریستیله، DOX داروی DOX و MCS-DOX نانوژل بارگذاری شده با داروی DOX است. نانوژل MCS نسبت به دوتای دیگر بر حیات سلول‌ها تأثیر منفی نداشته است.

بحث

از آن‌جایی که ظرفیت بارگـذاری (LC) دارو در حـاملین توسعه یافته نانو همچنان پایین است، بنابراین برای عملکرد مؤثر دارو، بهبود بارگذاری مؤثر (LE) حاملین دارو، امـری حیـاتی است [۸]. کیتوسان به‌عنوان پلیمری غیرسمی بـا سـازگاری و تجزیه‌پذیری زیستی و ایمنی‌زایی بسیار کم، پلیمر بسیار مناسبی برای دارو رسانی است. دوکسوروبیسین در آب و در DMSO محلول است و در حال حاضر مـؤثرترین داروی انتخـابی در درمان سرطان پروستات است؛ به همین دلیل دو نانوژل کیتوسانی MCS و PCS به‌ترتیب با دو اتصال دهنـده، یکـی تـری پلـی فسفات (TPP) مناسب برای داروی محلول در آب و دیگری میریستیک اسید مناسب برای داروی محلول در DMSO تهیـه شد. یکی از روش‌های مناسب و مؤثر بـرای اصـلاح خـواص هیدروژل کیتوسان، ایجاد و چگونگی ایجاد اتصالات عرضی در آن است. گروه‌های آمین و هیدروکسیل موجود در واحدهای گلوکز آمین کیتوسان مناطق واکنش دهنده مناسبی برای ایجـاد اتصالات عرضی است. از میریستات برای ایجاد اتصالات عرضی در کیتوسان استفاده شد و داروی دوکسوروبیسین محلـول در DMSO در آن بارگذاری شد. روش جدید ارایه شده در ایـن تحقیق برای تهیه نانوژل‌های PCS و MCS بر پایه کیتوسان، از روش ساده یک مرحله‌ای تهیه نانوژل بـا نسـبت ۹ : ۱ بـرای کیتوسان : TPP/ میریستات استفاده شد. با تغییر نسـبت مـولی کیتوسان: TPP اندازه ذرات کوچک شد کـه امکـان عملکـرد نانوذرات حاصل در pH فیزیولوژیک را مهیا می‌سازد. به‌علاوهً این‌که نانوژل PCS حاصل به سادگی بـا انکوباسـیون بـا دارو بارگذاری شد و مدت زمان رهایش آن در pH فیزیولوژیـک افزایش یافت. در تهیه PCS و MCS استفاده از مقـادیر کمتـر TPP و میریستات به‌عنوان اتصال دهنده باعث می‌شود که اغلب گروه‌های آمین کیتوسان بار مثبت خود را حفـظ کننـد. بـدین ترتیب آمین‌های باردار می‌تواند با دیگر گروه‌های فعـال نظیـر گلوتارآلدیید، کربوکسی‌پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG-COO) و غیره واکنش دهند کـه ایـن روش در دارورسـانی بـه روش فعـال (Active) مناسب میباشد. در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین، متعاقب اثر TPP بر کیتوسان، به لحاظ استفاده از نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

بالای TPP، بارهای مثبت موجود در کیتوسان به بار منفی تغییر می‌یابد و در نتیجه میل اتصال الکترواستاتیک نانوژل با سطح موکوس بالا می‌رود. نانوژل‌هایی با این ویژگی، برای دارورسانی هدفمند به روش غیرفعال (Passive) مناسب می‌باشند [۱۷]

در تحقیق حاضر فرمولاسیون ساده تهیه کیتوسان – TPP (PCS) و کیتوسان – میریستات (MCS) و بارگذاری با داروی دوکسوروبیسین می‌تواند جایگزین روش‌های نسبتاً پیچیده و چند مرحله‌ای تهیه میکرو/نانوذرات توسط دیگر محققین شود که در ساخت حامل‌ها و بارگذاری دارو و یا عوامل زیستی دیگر به‌کار می‌رود. با این‌که هر دو نانوژل MCS و PCS از نظر ظرفیت بارگذاری و آهنگ رهایش دارو برای دارورسانی بسیار مناسب بودند ولی هر کدام از نانوژل‌های تهیه شده مزایا و معایبی نسبت به یکدیگر داشتند. پلیمر کیتوسان در pH فیزیولوژیک نامحلول بود و استفاده از TPP با نسبت ۹ :۱ از کیتوسان: TPP برای ایجاد اتصالات عرضی باعث افزایش حلالیت نانوژل PCS حاصل درpH فیزیولوژیک (۷/٤) شد که از این نظر بهتر از MCS عمل می‌کرد. اما استفاده از غلظت‌های بیشتر TPP باعث پل زدن TPP بین ذرات کیتوسان و در نتیجه بزرگ شدن ذرات، تجمع و رسوب پلیمر شد. استفاده از نسبت ۱:۹ در کیتوسان: مریستات علاوه بر افزایش ظرفیت بارگذاری نانوژل MCS باعث کوچک‌تر شدن اندازه نانوذرات و افزایش پتانسیل زتا نسبت به نانوژل PCS تا حدود دو برابر شد. این امر در اتصال ترکیبات دیگر حاوی گروه‌های عامل بر نانوژل نقش اساسی دارد. در تحقیق حاضر غلظت کیتوسان مورد استفاده در هر دو نوع نانوژل ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. بنابراین اندازه کوچک نانوذرات می‌تواند به‌دلیل استفاده از غلظت پایین کیتوسان نیز باشد. افزایش غلظت کیتوسان می‌تواند باعث افزایش متوسط اندازه قطر نانوذرات شود. میانگین اندازه ذرات برای نانوژل MCS حدود ۱۵ نانومتر با PdI حدود ۰/۰۱٦ و پتانسیل زتای ٤۰ میلی‌ولت و برای PCS حدود ۱۱٦ نانومتر با PdI ۰/٤ و همچنین پتانسیل زتای ۲۸ میلی‌ولت به‌دست آمد. نانوژل MCS نسبت به نانوژل PCS، هم از نظر اندازه قطر نانوذره و بار سطحی آن و هم از نظر میزان پراکندگی برای انتقال دارو مناسب‌تر است.

مشاهده تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به طیف‌سنجی مادون قرمز بیانگر انتقال نقاط اوج cm^{-1} ۵۹۲ و ٦۵۸ مربوط به O-C-O قیچی‌وار (Scissors) در ساختار کیتوسان به موقعیت cm^{-1} ۸۹۳ در PCS و cm^{-1} ۸۹۵ در MCS برای تشکیل پیوند استری P-O-R است. نقاط اوج موجود در فرکانس‌های cm^{-1} ۱۲۲۰ و ۱٤۱٦ موجود در ساختار دکسوروبیسین به ترتیب در نانوژل‌های PCS-DOX و نانوژل‌های MCS-DOX نیز مشاهده می‌شود که تأیید کننده حضور دکسوروبیسین در ساختمان نانوژل PCS-DOX و MCS-DOX است. نتایج ارایه شده توسط جایاکومار (Jayakumar) و فیگورولا (Figuerola) و همکارانشان در تأیید یافته‌های این تحقیق است [۹، ۱۸]. یک انتقال از موقعیت cm^{-1} ۷۷۹ در دکسوروبیسین به cm^{-1} ۸۸۷ در PCS-DOX مربوط به N-H جنبانه‌ای (wagging)، تأیید کننده حضور پیوند هیدروژنی بین مولکولی بین DOX و PCS در ساختار PCS-DOX است. نقطه اوج فرکانس cm^{-1} ۱٦٦۱ در کیتوسان به cm^{-1} ۱٦٤۷ در PCS و به cm^{-1} ۱٦٤۷ در PCS-DOX و به cm^{-1} ۱٦٤۲ در MCS و به cm^{-1} ۱٦۵۱ و ۱٦۵۳ در هر دو نمونه MCS-DOX منتقل شده است. این تغییرات می‌تواند مربوط به قرارگیری داروی دکسوروبیسین در نانوژل‌های PCS و MCS باشد. نتایج مشابهی هنگام قرارگیری داروی دکسوروبیسین در نانوهیبریدهای اکسیدگرافن (Graphene oxide) توسط یانگ (Yang) و همکارانش مشاهده شد [۸]. دو نقطه اوج ساختاری از فرکانس‌های ارتعاشی کششی N-H در cm^{-1} ۳۳۸۹ و فرکانس ارتعاشی کششی O-H در cm^{-1} ۳٦۳۲ در ترکیب PCS-DOX مشاهده می‌شود که در ساختار کیتوسان و PCS روی هم افتاده و با ترکیب هر دو فرکانس ارتعاشی کششی یک نقطه اوج پهن و قوی در موقعیت cm^{-1} ۳۳٦۷ در کیتوسان و cm^{-1} ۳۳۹۰ در PCS ایجاد نموده است. این نقطه اوج در ساختار MCS تیز

www.SID.ir

Archive of SID

(Sharp) و پرانـرژی در موقعیـت $3432\ cm^{-1}$ در سـاختار MCS-DOX در موقعیـت $3435\ cm^{-1}$ مشـاهده مـی‌شـود. به‌عبارت دیگر؛ این نقطه اوج که مربوط به فرکانس ارتعاشـی کششی N-H و O-H در ساختار اصلی اسکلت کیتوسانی است، در MCS و MCS-DOX قوی‌تر و تیزتر شـده اسـت. طیـف مادون قرمز ساختار دکسوروبیسین، چندین جذب را در ناحیه $586-779\ cm^{-1}$ نشان می‌دهد که به موقعیت $511-887\ cm^{-1}$ در PCS-DOX و بـه $572-900\ cm^{-1}$ در MCS-DOX منتقـل شده‌اند. این امر تأیید دیگری بر حضور داروی دکسوروبیسـین در ساختار نانوژل‌ها است. نتایج مشابهی توسط میترا (Mitra) و همکارانش به‌دست آمده است [۲۰].

نتایج این تحقیق نشان داد کـه ظرفیـت بارگـذاری (LC) نانوژل‌های PCS با افزایش غلظت دارو، افزایش مـی‌یابـد. در حالی که بارگذاری مؤثر (LE) تـا رسـیدن بـه نسـبت ۱:۱ از PCS:DOX افزایش یافته و پـس از آن افـزایش غلظـت دارو تـأثیر قابـل تـوجهی بـر LE نداشـته اسـت. افـزایش زمـان انکوباسیون تا ۲٤ ساعت، باعـث افـزایش بارگـذاری دارو تـا حدود ۹۷ درصد شد. ظرفیت بارگـذاری در ۵ میلـی گـرم از نانوژل های MCS کـه بـا ۲ میلـی گـرم بـر میلـی لیتـر دارو بارگذاری شده، تنها از حدود ٤۰ درصد از ظرفیت بارگـذاری نانوژل استفاده شد. در صورتی که ظرفیت مؤثر در این شرایط تقریباً ۱۰۰ درصد است. نتـایج بـه‌دسـت آمـده نشـان دهنـده رهایش ۱۸/۵ درصـدی دارو از نـانوژل هـای MSC طـی ۳ ساعت اولیه و حدود ٤۰ درصد بعـد از گذشـت ۳٦۰ سـاعت در ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد بـود. چگـونگی رهـایش داروی دکسوروبیسین وابسته به زمان بود و بـا شـیب بسـیار ملایمـی ادامه یافت. رهایش آرام مولکول‌های داروی دکسوروبیسین از نانوژل‌ها در یک محـیط آبـی، مـی‌توانـد رهـایش پیوسـته و مناسبی از داروی دکسوروبیسین در بافـت تومـور را تضـمین نماید. این رهایش پایدار و کافی دارو در منطقه هدف مـورد نظر می‌تواند در کاهش حجم تومور نقش به‌سزایی ایفا نماید. ظرفیت بالای بارگذاری (LC) نانوژل‌های کیتوسان بـا داروی دوکسوروبیسین به‌عنوان یک مدل دارویی در خارج از بـدن و در آزمایشگاه و شیب ملایم رهایش آن از نانوژل‌های PCS و MCS می‌تواند آن‌ها را کاندید و جایگزین مناسـبی بـه‌عنـوان حامل دارو در درمان سرطان مطرح نماید.

نانوداروها سبب افزایش انتقال داروهـای ضـد سـرطانی می‌شوند و با کاهش دوز مصرفی این داروها عوارض ناشی از تجمع دارو در بافت‌های سالم را محدود می‌کنند. اگرچه تحقیق روی سامانه‌های درمانی هدفمند برای درمان سرطان بـه‌طـور مؤثری به‌منظور کاربردهای انسانی تجاری نشده است، اما ردی (Reddy) و همکارانش با ارایه محصولاتی مانند لیپوزوم‌های با نیمـه عمـر بـالا حـاوی دوکسوروبیسـین و پولیفپروسـان ۲۰ (Polifeprosan-20) با کارموستین (Carmustine) بـه بـازار برای درمان سرطان علاقه جدیدی در زمینه انتقال هدفمند دارو به سرطان‌ها به‌وجـود آورده‌انـد [۲۱]. همچنـین لیـو (Liu) و همکارانش نشان دادند که اختصاصی بودن و تمایـل زیـاد بـه میزان زیادی بازده انتقال دارو را افزایش و اثر سمی داروها را کاهش می‌دهد [۲۲].

نتایج آزمون MTT نانوژل‌ها و دارو بر سلول‌های سرطانی نشان دهنده آن است که نانوژل به تنهـایی بـر سـلول‌هـا اثـر کشندگی ندارد؛ در صورتی که نانوژل حاوی دارو و دارو بـه تنهایی به میزان نسبتاً مشابه باعث مرگ و میر سلول‌ها شدند.

پلیمر کیتوسان با توجه به فراوانی، فرمولاسیون ساده تهیـه کیتوسان–TPP و کیتوسان– میریستات، ظرفیـت بـالا و قابـل قبول بارگذاری با داروی دوکسوروبیسین و رهایش مناسب آن می‌تواند جایگزین روش‌های نسبتاً پیچیده و چند مرحله‌ای تهیه میکرو/ نانوذرات باشد که در حال حاضردر ساخت حامل‌ها و بارگذاری دارو یا عوامل بیولوژیکی دیگر به‌کار می‌رود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر افشین محسنی فر مـدیر شـرکت نانوزینو جهت همکاری در ساخت نانوپلیمر کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[1] Cox JC, Hayhurst A, Hesselberth J, Bayer TS, Georgiou G, Ellington AD. Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. Nucleic Acids Res 2002; 30(20): e108.

[2] Bravo-Osuna I, Vauthier C, Chacun H, Ponchel G. Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm 2008; 69(2): 436-44.

[3] Rees M, Moghimi SM. Nanotechnology: from fundamental concepts to clinical applications for healthy aging. Maturitas 2012; 73(1): 1-4.

[4] Shi P, Gustafson JA, MacKay JA. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. Int J Nanomedicine 2014; 9: 1617-26.

[5] Sonia TA, Sharma CP. Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. Adv Polym Sci 2011; 243: 23-54.

[6] Raj L, Chauhan GS, Azmi W, Ahn JH, Manuel J. Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel. Bioresour Technol 2011; 102(3): 2177-84.

[7] Cifani N, Chronopoulou L, Pompili B, Di Martino A, Bordi F, Sennato S, Di Domenico EG, Palocci C, Ascenzioni F. Improved stability and efficacy of chitosan/pDNA complexes for gene delivery. Biotechnol Lett 2015; 37(3): 557-65.

[8] Morris G, Kök S, Harding S, Adams G. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. Biotechnol Genet Eng Rev 2010; 27: 257-84.

[9] Aranaz I, Harris R, Heras A. Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. Curr Organic Chem 2010; 14(3): 308-30.

[10] Yang X, Zhang X, Liu Z, Ma Y, Huang Y, Chen Y. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. J Physic Chem 2008; 112(45): 17554-8.

[11] Kim YT, Yum S, Heo JS, Kim W, Jung Y, Kim YM. Dithiocarbamate chitosan as a potential polymeric matrix for controlled drug release. Drug Dev Ind Pharm 2014; 40(2): 192-200.

[12] Hauser-Kawaguchi AMN, Luyt LG. Nanomedicine_ Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. Genomic Instab Canc Metastas 2015; 20: 205-44.

[13] Taranejoo S, Janmaleki M, Rafienia M, Kamali M, Mansouri M. Chitosan microparticles loaded with exotoxin A subunit antigen for intranasal vaccination against Pseudomonas aeruginosa: An in vitro study. Carbohydrete Polymers 2011; 83(4): 1854-61.

[14] Zhang H, Oh M, Allen C, Kumacheva E. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. Biomacromolecules 2004; 5(6): 2461-8.

[15] Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Sandri G, Faccendini A, Puccio A, Caramella C. Comparison of poloxamer- and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. Drug Dev Ind Pharm 2014; 40(3): 352-60.

www.SID.ir

Archive of SID

[16] Wang C, Mallela J, Garapati US, Ravi S, Chinnasamy V, Girard Y, Howell M, Mohapatra S. A chitosan-modified graphene nanogel for noninvasive controlled drug release. Nanomedicine 2013; 9(7): 903-11.

[17] Tsai ML, Bai SW, Chen RH. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan G_O sodium tripolyphosphate nanoparticle. Carbohydrate Polymers 2008; 71: 448-57.

[18] Figuerola A, Di Corato R, Manna L, Pellegrino T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. Pharmacol Res 2010; 62(2): 126-43.

[19] Jayakumar R, Nair A, Sanoj Rejinold N, Maya S, Nair SV. Doxorubicin-loaded pH-responsive chitin nanogels for drug delivery to cancer cells. Carbohydrate Polymers 2012; 87(3): 2352-6.

[20] Mitra T, Sailakshmi G, Gnanamani A, Mandal AB. Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. Mat Res 2013; 16(4): 755-65.

[21] Reddy LH. Drug delivery to tumours: recent strategies. J Pharm Pharmacol 2005; 57(10): 1231-42.

[22] Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, Dai H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. Cancer Res 2008; 68(16): 6652-60.

www.SID.ir