



ساخت و مشخصه یابی فیزیکو شیمیایی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی فلاونوئید کوئرستین با اهداف درمانی

نجمه طالعی اردکانی^۱، فاطمه دانشمند^۲، محبوبه میرحسینی^۳، مرضیه ابراهیم‌پور^۳، محمد مجدی‌زاده^۴، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۵*}

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی - گروه زیست‌شناسی - دانشگاه پیام نور تفت - یزد - ایران

۲- استادیار - گروه زیست‌شناسی - دانشگاه پیام نور - تهران - ایران

۳- کارشناسی ارشد بیوشیمی - مرکز نانوتکنولوژی و مهندسی بافت - پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.

۴- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - شرکت ریز زیست فناوریان فردانگر - مرکز زیست فناوری - پارک علم و فناوری - یزد - ایران.

۵- استادیار - مرکز نانوتکنولوژی و مهندسی بافت - پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷

چکیده

مقدمه: ماده موثره گیاهی کوئرستین، ترکیبی فلاونوئیدی موجود در اکثر گیاهان است که به علت داشتن خواص پیش آپوپتوزی و ضد سرطانی می‌تواند باعث افزایش سمیت داروها از جمله داروهای شیمی درمانی شود. هدف این مطالعه، ساخت و مشخصه یابی سامانه نیوزومی حاوی کوئرستین به منظور افزایش ویژگی‌های درمانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، با هیدراتاسیون فیلم نازک، نانو حامل نیوزومی حاوی کوئرستین تهیه گردید و پس از سونیکاسیون و کاهش اندازه، عمل فیلتراسیون و جداسازی داروی آزاد انجام گرفت. در ادامه میزان کوئرستین بارگذاری شده و همچنین روند رهایش کوئرستین از نانو سامانه نیوزومی مورد بررسی قرار گرفت. سپس نانو ذره تولید شده از نظر اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی ذرات و برهم کنش شیمیایی میان سامانه نیوزومی و کوئرستین مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بازده درونگیری کوئرستین در حامل‌های نیوزومی $2/3 \pm 64/49\%$ ، اندازه و پتانسیل زتای نانو حامل قبل از بارگذاری کوئرستین به ترتیب $153/8$ nm و $-9/5$ mV و پس از بارگذاری کوئرستین به ترتیب 170 nm و $-1/6$ mV بودند. الگوی رهایش دارو نشان می‌دهد که در مجموع رهایش کوئرستین به صورت آهسته بوده و طی ۷۲ ساعت ۹۵٪ کوئرستین از نیوزوم آزاد گردیده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی و نتایج FT-IR نیز نشان می‌دهد که سامانه نیوزومی تشکیل گردیده و برهمکنش شیمیایی بین سامانه نیوزومی و ماده کوئرستین ایجاد نشده است.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که حامل‌های نیوزومی حاوی کوئرستین دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب می‌باشد، لذا این سامانه نیوزومی می‌تواند حامل مناسبی جهت رسانش کوئرستین باشد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، کوئرستین، نانو حامل‌های دارویی، رهایش دارو.

* نویسنده مسئول: یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، مرکز نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، کد پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸،

نمبر: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، Email: Fhaghrosadat@gmail.com

ارجاع: طالعی اردکانی نجمه، دانشمند فاطمه، میرحسینی محبوبه، ابراهیم‌پور مرضیه، مجدی‌زاده محمد، حقیرالسادات بی بی فاطمه. ساخت و مشخصه یابی فیزیکو شیمیایی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی فلاونوئید کوئرستین با اهداف درمانی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۱): ۳۲-۴۰.

مقدمه

افزایش عوارض کاربرد داروهای شیمیایی از یک سو و ارزش اقتصادی و جایگاه دیرینه‌ای که گیاهان معطر و دارویی در بحث بهداشت و سلامت جامعه دارند از سوی دیگر، سبب افزایش رویکرد جهانی به سمت شناسایی گیاهان دارویی مؤثر و بررسی کمی و کیفی ترکیبات مؤثره آنها با هدف فرمولاسیون و تولید داروهای مؤثر و کم خطر گردیده است. در حیطه پزشکی (بهداشت و درمان) امید بسیاری از محققان برای درمان انواع سرطان‌ها و بیماری‌ها به داروهای گیاهی است. از جمله مواد مؤثره گیاهی کوئرستین را می‌توان نام برد که به‌عنوان ترکیب فلاوونوئیدی در بیشتر میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها و دانه‌ها یافت می‌شود. کوئرستین به علت خاصیت پیش آپوپتوزی و ضدسرطانی موجب افزایش تأثیرات ضدتوموری داروهای شیمی درمانی شده و به‌صورت هم‌افزایی، سمیت داروها را افزایش می‌دهد (۱) و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای پیشگیری از سرطان و سلامت توصیه می‌شود (۲). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که کوئرستین نقش مهمی در مهار سلول‌های سرطانی پستان، روده بزرگ، پروستات، تخمدان و ریه دارد. همچنین کوئرستین با حساس کردن سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی درمانی، فعالیت ضدتکثیری بالایی را علیه انواع سرطان‌ها نشان می‌دهد و به‌عنوان حساس‌کننده شیمی درمانی (chemosensitizer) شناخته شده و باعث افزایش اثر بخشی داروها و تأثیر هم‌افزایی در از بین بردن سلول‌های سرطانی شده است (۳). علاوه بر نقش ضدسرطانی (۴)، کوئرستین دارای تأثیرات درمانی و نقش‌های بالقوه‌ای شامل فعالیت ضدباکتریایی (۵)، ضدویروسی (۶)، ضددیابت (۷) و ضدالتهاب و همچنین دارای عملکرد مفید برای قلب و عروق (۸) می‌باشد. با توجه به مشکلات سیستم‌های دارورسان رایج، از قبیل ضعف در زیست دسترسی، پایداری ناچیز در محیط درون تنی، انحلال‌پذیری ضعیف، ضعف در تحویل هدفمند و پیوسته به جایگاه هدف، امروزه استفاده از نانوحامل‌ها به‌منظور درون‌گیر کردن ترکیبات دارویی و رسانش آن به بافت‌های هدف مورد توجه محققین است. در این میان، منظور از درون‌گیر کردن، به دام انداختن دارو درون حامل‌های دارویی می‌باشد که باعث محافظت داروها از اکسیداسیون، ایزومریزاسیون و تجزیه می‌شود و همچنین نیمه عمر داروها را در بازه زمانی افزایش داده و در بدن باعث تحویل کنترل شده و مداوم داروها به بافت‌های هدف می‌شود (۹). نیوزوم‌ها حامل‌های لیپیدی هستند که از خودتجمعی سورفاکتانت‌ها در محیط آبی شکل گرفته و ساختار دولایه محصور را ایجاد می‌کنند. وزیکول نیوزومی دولایه بوده که از مواد فعال در سطح غیر یونی تشکیل می‌شود. ساختار منحصر به فرد نیوزوم‌ها آنها را قادر می‌سازد مواد آب‌گریز و آب‌دوست را به دام ببنداند و برای اینکار نیوزوم، مواد آب‌گریز را در قسمت لیپیدی

خود و مواد آب‌دوست را در داخل هسته‌ی آبی محبوس می‌کند (۱۰). طراحی آسان، زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، انعطاف‌پذیری و رهایش آهسته دارو از جمله مزایای این نانوحامل دارویی است (۱۱) و (۱۲).

هدف از پژوهش حاضر ساخت و بررسی نانوسامانه‌های نیوزومی حاوی ماده کوئرستین می‌باشد که در طی آن این نانوحامل حاوی دارو از منظر درصد درون‌گیری کوئرستین، الگوی رهایش کوئرستین از سامانه‌ی نیوزومی، اندازه نانوسامانه، بار سطحی نانوسامانه، مورفولوژی نانوسامانه و برهم‌کنش میان کوئرستین و نانوسامانه مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه‌ی آزمایشگاهی بوده که در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1398.039 انجام شده است.

ماده مؤثره کوئرستین از شرکت Sigma-Aldrich، فسفاتیدیل کولین و کلسترول از شرکت Sigma-Aldrich و کلروفرم، ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین از شرکت Merck تهیه و خریداری شد.

در این مرحله ابتدا، کوئرستین در حلال متانول تهیه گردید و با استفاده از آن، رقت‌های مختلفی از کوئرستین در حلال ایزوپروپیل و رقت‌های مختلفی کوئرستین در PBS آماده شد. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هریک از رقت‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در این مرحله سه مرتبه تکرار گردید و در ادامه با استفاده از طول موج‌های جذبی به‌دست آمده، نمودار استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل و نمودار استاندارد کوئرستین در PBS رسم گردید (۱۳).

به‌منظور ساخت سامانه‌ی نیوزومی حامل کوئرستین، از روش آب پوشانی لایه نازک (Thin Film hydration) استفاده گردید که خلاصه آن به این شرح است: ابتدا سورفاکتانت و لیپیدهای مورد استفاده به نسبت مولی ۳۰:۷۰ توزین و در کلروفرم حل گردید و محلول حاصل جهت تشکیل فیلم نازک لیپیدی، در دمای ۴۰ درجه بر روی روتاری (Heidolph، آلمان) با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد تا فاز آلی تبخیر و فیلم نازک و یکنواختی تشکیل گردد. در ادامه با توجه به آبدوست بودن کوئرستین، محلولی با غلظت ۱ mg/ml از کوئرستین و بافر فسفات سالین (PBS) در حجم مشخص تهیه شد و عمل هیدراتاسیون فیلم نازک لیپیدی به‌منظور ایجاد کره‌های نیوزومی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی دستگاه روتاری با دور ۱۵۰ rpm انجام گرفت. جهت کاهش اندازه ذرات محلول شیری رنگ حاصل از این مرحله، از سونیکیت حمامی به مدت زمان ۶۰ دقیقه، استفاده شد. همچنین به‌منظور جداسازی ذرات بزرگ‌تر از کوچک‌تر، محلول حاصل از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. در پایان برای جداسازی کوئرستین

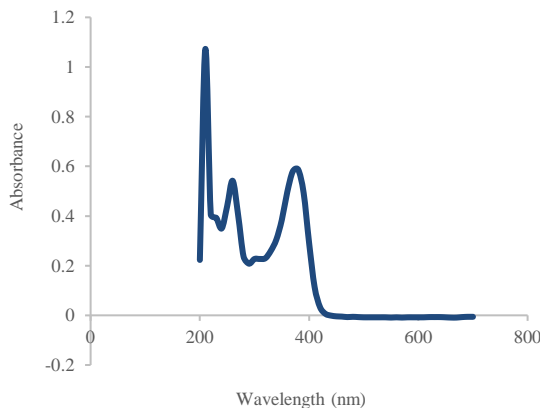
و مواد اضافی در نمونه نانونیوزوم، از نمونه دیالیز شده نانونیوزوم، استفاده گردید و به منظور کاهش رطوبت، حدود نیم ساعت نمونه در آون با دمای تقریبی 60°C قرار داده شد.

در مطالعه حاضر بیان داده‌ها و رسم گراف‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Origin و Excel صورت پذیرفته است. داده‌ها به صورت (انحراف معیار \pm میانگین) بیان شده است.

نتایج

نتایج حاصل از طیف‌سنجی فرابنفش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به شرح زیر می‌باشد:

طیف جذبی کوئرستین در بازه طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر رسم گردید. با بررسی داده‌های نمودار، بیشترین میزان جذب کوئرستین طول موج ۳۸۰ نانومتر انتخاب گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- نمودار بیشترین جذب کوئرستین در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر

نمودار استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل و بافر PBS به رسم گردید. معادله‌ی خط استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل دارای معادله خط $y = 0.1106x + 0.0549$ و ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9991$ می‌باشد (نمودار ۲). همچنین معادله‌ی خط استاندارد کوئرستین در PBS دارای معادله خط $y = 0.0656x + 0.0172$ و ضریب رگرسیون $R^2 = 0.999$ می‌باشد (نمودار ۳). با توجه نمودار استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل، میزان کوئرستین درون‌گیری شده در سامانه‌ی نیوزومی $2/3 \pm 64/49\%$ می‌باشد.

نمودار رهائش کوئرستین از سامانه نیوزومی با استفاده از نمودار استاندارد کوئرستین در PBS رسم گردید (نمودار ۴). بررسی پروفایل رهائش کوئرستین از نانوسامانه نیوزومی نشان می‌دهد که میزان آزادسازی کوئرستین در شرایط مشابه سلول‌های طبیعی (دمای 37°C و $\text{pH} = 7/4$) در زمان‌های مختلف، در مجموع آهسته رهش بوده و روند پیوسته‌ای داشته است. با توجه به نمودار حاصل، بیشترین میزان شیب نمودار مربوط به ده ساعت اولیه می‌باشد.

انکپسوله نشده، محلول شیری رنگ حاصل به درون کیسه دیالیز انتقال داده و به مدت ۱ ساعت در دمای 4°C در محیط PBS خنثی استیرر گردید (۱۳).

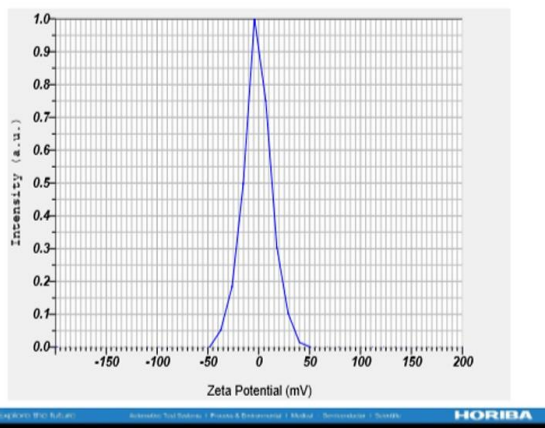
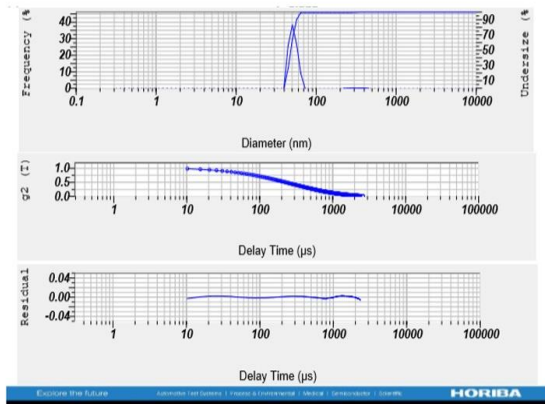
ابتدا نیوزوم‌های ساخته شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف دارو شکسته شود و کوئرستین آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب کوئرستین درون‌گیری شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم کوئرستین (380 nm) محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد بارگذاری کوئرستین در سامانه نیوزومی محاسبه گردید (۱۳).

$$\text{(رابطه ۱)} \quad 100 \times \frac{\text{مقدار کوئرستین محصور شده}}{\text{مقدار کوئرستین اولیه}} = \text{راندمان بارگذاری کوئرستین}$$

به منظور شبیه‌سازی رهائش دارو از حامل در محیط *in vivo* از PBS و دمای 37°C استفاده شد تا بتوان شرایط سینک درون‌تنی را برقرار ساخت. در ادامه مقدار ۱ mL از محلول نیوزومی حاوی کوئرستین درون کیسه دیالیز قرار گرفت. سپس با قرار دادن کیسه دیالیز درون یک محیط ایزوله (فالكون استریل و بسته) با تنظیمات یاد شده استیرر شد. نمونه برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز در زمان‌های مشخص صورت پذیرفت. در انتها با بهره‌گیری از معادله استاندارد کوئرستین در بافر PBS نسبت به محاسبه غلظت‌های آزاد شده دارو در دماهای 37°C و $7/4\text{ pH}$ در زمان‌های مختلف و رسم نمودار آن اقدام گردید (۱۳).

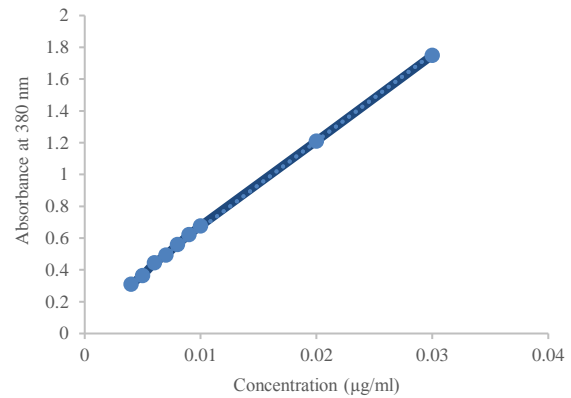
محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانسایزر Horiba استفاده گردید. اندازه‌گیری نانونیوزوم‌ها در زاویه 90° درجه و تابش نور لیزر با طول موج 657 nm در دمای 25°C صورت گرفت. نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت 0.1 mg/ml آماده گردید و بلافاصله پس از آماده‌سازی اندازه‌گیری صورت گرفت. همچنین اندازه‌گیری نمونه‌ها در ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. میزان بار سطحی (پتانسیل زتا) نانونیوزوم‌های حامل دارو نیز با استفاده از دستگاه زتاسایزر شرکت Horiba در دمای 25°C اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی به $150\text{ }\mu\text{L}$ با غلظت 0.1 mg/ml نیاز است.

از نانونیوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونیکی نیروی اتمی (Atomic Force Microscope) به منظور اطمینان از تشکیل نانو سامانه نیوزومی و بررسی شکل و ساختار نانوسامانه‌های تولیدی تصویر گرفته شد. گروه‌های عاملی سطح نانونیوزوم تولید شده توسط تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز (IR) بررسی گردید. در طیف مادون قرمز عمدتاً دو ناحیه مورد توجه است. ناحیه گروه عاملی از 1550 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} ناحیه‌ای است که بیشتر کشش‌های پیوندی اتفاق می‌افتد. این ناحیه معمولاً تعداد نسبتاً کمی پیک دارند. اما بسیاری از پیک‌های آن مشخص‌کننده گروه‌های عاملی هستند. برای اطمینان از نبود داروی آزاد

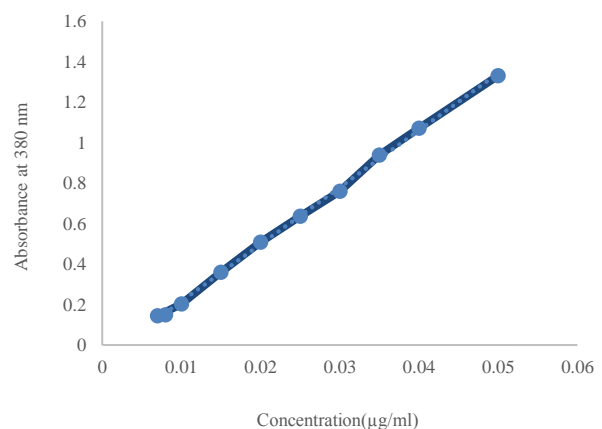


نمودار ۵- اندازه و پتانسیل زتای نانوسامانه قبل از بارگذاری کوئرستین نتایج تصویری حاصل از عکس‌برداری از نانوحامل به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی (AFM)، جهت بررسی سطح و مورفولوژی ساختار کروی نانو سامانه، با توجه به شکل ۱ و ۲ نشان می‌دهد که نانوحامل نیوزومی قبل از بارگذاری کوئرستین ایجاد شده است و با بارگذاری کوئرستین شکل خود را حفظ نموده است. در نمودار FT-IR کوئرستین (نمودار ۷ a)، پیک‌های شاخص cm^{-1} ۱۰۱۰/۲۰، cm^{-1} ۱۲۴۲/۵۵ و cm^{-1} ۱۳۱۶/۹۳ که مربوط به پیوند کششی C-C کربوکسیلیک اسید می‌باشد قابل مشاهده است. همچنین در این نمودار پیک‌های cm^{-1} ۱۶۱۱/۷۷ و cm^{-1} ۱۶۵۵/۷۴ مربوط به پیوند کششی C=C آلکن‌ها و پیک شاخص cm^{-1} ۳۳۳۴/۵۹ مربوط به پیوند C-C کربوکسیلیک اسید قابل مشاهده است. در نمودار FT-IR نیوزوم بدون دارو (نمودار ۷ b)، پیک‌های شاخص cm^{-1} ۳۴۱۲ مربوط به پیوند O-H الکل و cm^{-1} ۱۶۳۷/۷۳ مربوط به پیوند کششی C=C آلکن و در نمودار FT-IR سامانه‌ی نیوزومی دارای دارو (نمودار ۷ c)، پیک‌های شاخص cm^{-1} ۳۴۵۱/۹۶ مربوط به پیوند کششی O-H گروه الکی، cm^{-1} ۱۶۴۳/۲۶ مربوط به پیوند کششی C=C آلکن قابل مشاهده است. با

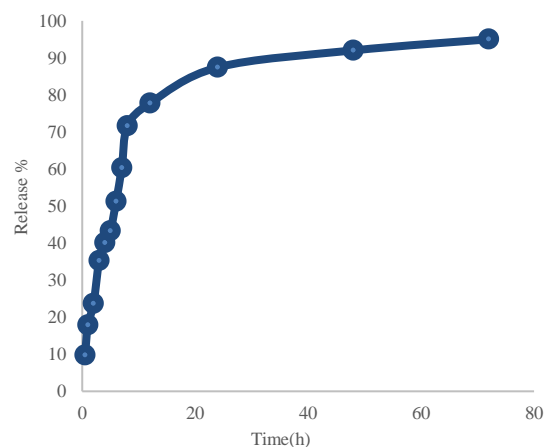
نتایج حاصل از مشخصه‌یابی نشان می‌دهد که اندازه و بار سطحی (پتانسیل زتا) نانو ذرات ساخته‌شده قبل از بارگذاری کوئرستین به‌ترتیب ۱۷۰nm و $۹/۵\text{mV}$ - و پس از بارگذاری کوئرستین به‌ترتیب ۱۷۰nm و $۱/۶\text{mV}$ - می‌باشد (نمودار ۵ و ۶).



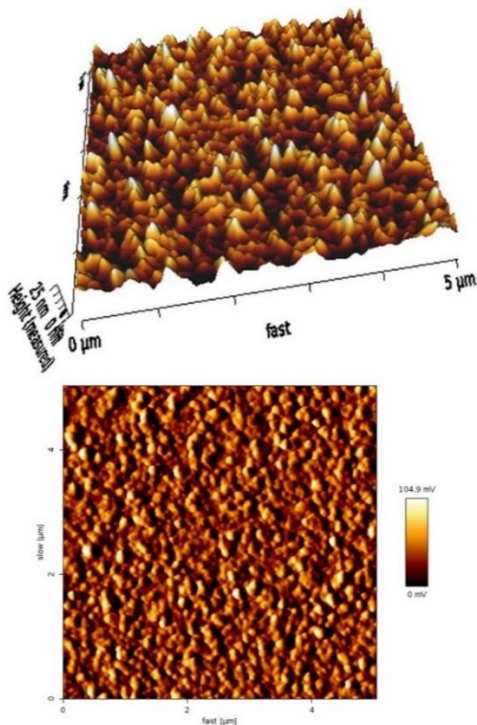
نمودار ۲- نمودار استاندارد کوئرستین در ایزوپروپیل



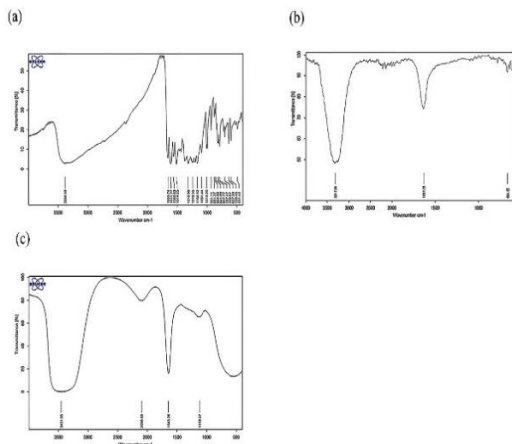
نمودار ۳- نمودار استاندارد کوئرستین در بافر فسفات سالیین (PBS)



نمودار ۴- نمودار رهایش کوئرستین از نانو سامانه نیوزومی



شکل ۲- مورفولوژی ذرات سامانه نیوزومی بعد از بارگذاری کوئرتستین

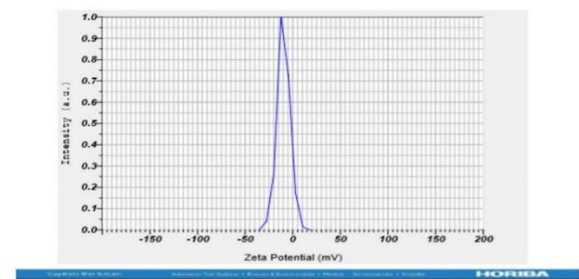
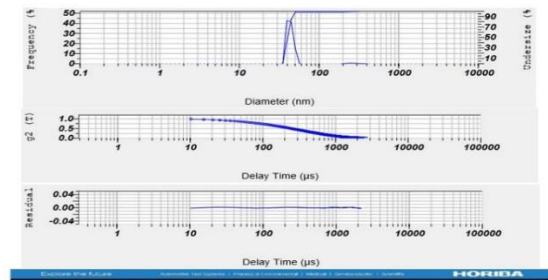


نمودار ۷- نمودار FTIR کوئرتستین آزاد (a)، سامانه نیوزومی بدون دارو (b) و سامانه نیوزومی حاوی کوئرتستین (c)

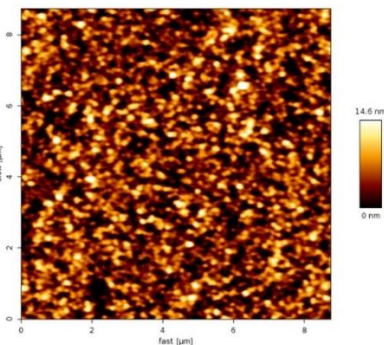
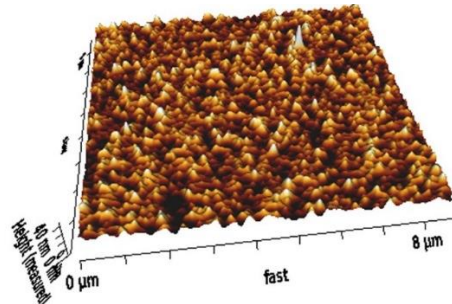
بحث

پژوهش حاضر منتهی به سامانه نیوزومی حاوی کوئرتستین شد و بررسی‌های فیزوشیمیایی نشان داد که این سامانه‌ی لیپیدی حاوی کوئرتستین از بازده درون‌گیری ۶۴/۴۹٪، اندازه ۱۷۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۱/۶- میلی‌ولت برخوردار می‌باشد. همچنین بررسی الگوی رهائش کوئرتستین از سامانه نیوزومی، رهائش کنترل شده دارو را تأیید می‌کند، به گونه‌ای که حداکثر رهائش کوئرتستین از این سامانه طی ۷۲ ساعت، حدود ۹۵٪ بوده است. برخورداری ذرات سازنده سامانه‌ی لیپیدی از

توجه به اینکه با بارگذاری کوئرتستین در سامانه‌ی نیوزومی، پیک جدیدی ایجاد نشده و فقط مقداری جابه‌جایی در پیک‌ها ایجاد شده است به گونه‌ای که پیک‌های 3412 cm^{-1} و $1637/73 \text{ cm}^{-1}$ در سامانه فاقد دارو با پیک‌های $3451/96 \text{ cm}^{-1}$ و $1643/26 \text{ cm}^{-1}$ جابه‌جا گردیده است، می‌توان ادعا نمود که میان سامانه‌ی نیوزومی و کوئرتستین برهم‌کنش شیمیایی ایجاد نشده است.



نمودار ۶- اندازه و پتانسیل زتای سامانه نیوزومی بعد از بارگذاری کوئرتستین



شکل ۱- مورفولوژی ذرات سامانه نیوزومی قبل از بارگذاری کوئرتستین

برای کنترل رهایش دارو با هدف قرار دادن دارو به سمت مکان‌های خاص استفاده می‌شود. نانوذرات پلیمری باعث کاهش دوز دارو، بهبود روند درمان و جذب ترکیبات فعال می‌شوند. این نانوذرات پلیمری ضمن برخورداری از پایداری، غیرسمی و غیرالتهابی می‌باشند و با اجتناب از سیستم رتیکیولو اندوتلیال، برای استفاده در خون سودمند هستند (۲۱). کویی و همکاران، نانو لیپوزوم‌های حاوی عصاره میخک تهیه نمودند که اندازه نانوذرات را بین ۷۸/۳ تا ۱۵۶/۱ نانومتر، پتانسیل زتا ذرات را ۵/۲۴- و درصد درون‌گیری را ۲۰/۴۱ درصد گزارش نمودند (۲۲). درصد بارگذاری بالاتر و استفاده از نانوحامل نیوزومی به جای نانوحامل لیپوزومی که از ثبات بالاتر، هزینه ساخت کمتر (۲۳) و سمیت پایین‌تر (۱۲) برخوردار است، از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش کویی می‌باشد. امیری و همکاران در پژوهشی نیوزوم حاوی سیلیبیین که ماده مؤثره گیاه خار مریم است را به روش تیخیر فاز معکوس تهیه و گزارش نمودند که قطر نانوذرات در حدود ۱۹۲/۳ نانومتر و میزان درون‌گیری دارو ۲۲٪ محاسبه گردید (۲۴). میزان بارگذاری بالاتر از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش امیری و همکاران می‌باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در روش ساخت نانو سامانه‌ی نیوزومی، تفاوت در نوع ماده بارگذاری شده و تفاوت در درصد مولی مواد به کار رفته در ساختمان سامانه نیوزومی باشد. حقیرالسادات و همکاران ضمن ساخت سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس زنیان، بازده درون‌گیری ۳۵/۶٪، اندازه ۱۸۶/۱ نانومتر، پتانسیل زتا بین ۱- تا ۶/۷- میلی‌ولت و رهایش کنترل شده‌ی اسانس از لیپوزوم را به‌عنوان بخشی از شاخصه‌های فیزیوشیمیایی این نانو سامانه‌ی لیپیدی گزارش نمودند (۲۵). استفاده از سامانه‌ی نیوزومی و درصد درون‌گیری بالاتر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات می‌باشد. سجادیان و همکاران، نانولیپوزوم پگیله حاوی سیلیبیین را تهیه نمودند که سایز نانوذرات حاوی سیلیبیین ۳۲۲/۳ نانومتر و میزان درون‌گیری دارو در حدود ۹۲/۸ درصد تخمین زده شد (۲۶). درصد بارگذاری بالاتر در پژوهش سجادیان از مزایای این پژوهش نسبت به پژوهش حاضر می‌باشد که می‌تواند ناشی از پگیله کردن سامانه‌ی لیپیدی، اندازه بزرگ‌تر ذرات و نوع ماده بارگذاری شده باشد. مجدی‌زاده و همکاران، نانولیپوزوم‌های آهسته رهش حاوی اسانس نعناع فلفلی را با درصد بارگذاری ۶۱/۳۸ درصد، اندازه ۲۴۵ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۳۲ و پتانسیل زتای ۳۴/۵۴- میلی‌ولت تهیه نمودند (۱۳). ساسانی و همکاران، سامانه‌ی لیپونیوزومی حاوی کورکومین تهیه و گزارش نمودند که اندازه، درصد بارگذاری و پتانسیل زتای این سامانه‌ی لیپیدی به ترتیب ۱۴۷/۵ نانومتر، ۹۸/۱۲٪ و ۸/۹- میلی‌ولت بوده است (۱۷). همچنین کریمی‌مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۹ سامانه‌ی لیپیدی نیوزومی حاوی سیلیبیین را تهیه و گزارش نمودند که سامانه‌ی مذکور دارای بازده درون‌گیری $92/87 \pm 5$ درصد، اندازه ذرات ۱۱۸ نانومتر و

مورفولوژی مناسب و عدم برهمکنش شیمیایی میان سامانه نیوزومی و داروی کوئرستین از دیگر ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب سامانه‌ی نیوزومی حاوی کوئرستین می‌باشد. بازده درون‌گیری که در پژوهش حاضر ۶۴/۴۹٪ محاسبه شده است، از شاخصه‌های بسیار مهم سامانه‌های لیپیدی می‌باشد به گونه‌ای که سامانه‌های لیپیدی با بازده درون‌گیری بالا نسبت به سامانه‌هایی با بازده درون‌گیری پایین، مطلوب‌تر است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بازده درون‌گیری سامانه‌های لیپیدی به عوامل متعددی از جمله اندازه ذرات نانو سامانه، نوع لیپیدهای به کار رفته و درصد مولی هر یک از آنها در ساختمان سامانه لیپیدی و نوع ماده درون‌گیر شده وابسته است (۱۴ و ۱۵). مجدی‌زاده و همکاران و برکت و همکاران، به ترتیب ضمن ساخت سامانه‌های لیپیدی حاوی اسانس *Mentha piperita* و عصاره *Nepeta persica* بازده درون‌گیری ۶۷/۱۱٪ و ۶۱/۳۸٪ را برای این سامانه‌ها گزارش نمودند (۱۳ و ۱۶). نتایج بازده درون‌گیری گزارش شده در این پژوهش‌ها، بسیار نزدیک به پژوهش حاضر می‌باشد. فاکتور مهم دیگر در ساخت سامانه‌های لیپیدی الگوی رهایش دارو می‌باشد که در پژوهش حاضر این شاخصه پر اهمیت در شرایط سلول‌های سالم (دمای ۳۷°C و pH=۷) مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل از آن نشان می‌دهد که رهایش به صورت پیوسته و آهسته بوده است، به گونه‌ای که در ساعات اولیه (حدود ۱۰ ساعت اولیه)، رهایش کوئرستین از سامانه انفجاری بوده و سپس تا پایان رهایش، از سرعت آزادسازی کوئرستین کاسته شده و در ساعات پایانی شیب رهایش نمودار به صفر نزدیک شده است. به نظر می‌رسد که زیاد بودن اختلاف غلظت کوئرستین میان بافر فسفات سالیین و سامانه‌ی نیوزومی در ساعات اولیه باعث رهایش انفجاری کوئرستین از سامانه گردیده است ولی در ادامه با کاهش این اختلاف غلظت از سرعت رهایش کوئرستین کاسته شده است (۱۷). بار سطحی سامانه‌های لیپیدی یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نانوحامل‌ها می‌باشد به گونه‌ای که هر اندازه میزان بار سطحی سامانه لیپیدی افزایش یابد، میزان نیروی دافعه میان ذرات سازنده سامانه بیشتر شده و امکان تجمع و رسوب نانوذرات کاهش می‌یابد در نتیجه پایداری سامانه‌ی لیپیدی افزایش می‌یابد (۱۸-۲۰).

از یکسو با در نظر گرفتن عوارض داروهای شیمی درمانی و لزوم جایگزینی این داروها با ترکیبات طبیعی و از سوی دیگر با توجه به چالش‌های پیش روی استفاده از ترکیبات طبیعی، استفاده از نانوحامل‌ها به‌منظور رسانش ترکیبات طبیعی به ارگان‌های هدف ضروری بوده و توجه پژوهشگران را به سمت خود جلب نموده است. تاکنون پژوهش‌های متعددی در زمینه نانوحامل‌های لیپیدی انجام شده است که به بخشی از آنها اشاره می‌شود. بونیفاکایو و همکاران، به مطالعه روی سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر فناوری نانو و داروهای گیاهی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که نانوذرات پلیمری، سیستمی کلونیدی هستند که از آنها

- Minaei A, Sabzichi M, Ramezani F, Hamishehkar H, Samadi N. Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells. *Molecular Biology Reports* 2016;43:99-105. doi:10.1007/s11033-016-3942-x
- Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry* 2008;72:797-804. doi:10.1271/bbb.70680
- Hirai I, Okuno M, Katsuma R, Arita N, Tachibana M, Yamamoto Y. Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. *International Journal of Food Science & Technology* 2010;45:1250-4. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02267.x
- Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, Yang J. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses* 2016;8:6. doi:10.3390/v8010006
- Oršolić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Đikić D, Prskalo ZŠ, Sirovina D. DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* 2011;656:110-8. doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.021
- Rogério AP, Dora CL, Andrade EL, Chaves JS, Silva LF, Lemos-Senna E, Calixto JB. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research* 2010;61:288-97. doi:10.1016/j.phrs.2009.10.005
- Chiu YT, Chiu CP, Chien JT, Ho GH, Yang J, Chen BH. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:5123-30. doi:10.1021/jf0700069
- Hemati M, Haghirsadat F, Jafari F, Moosavizadeh S, Moradi A. Targeting cell cycle protein in gastric cancer with CDC20siRNA and anticancer drugs (doxorubicin and quercetin) co-loaded cationic PEGylated nanoliposomes. *International Journal of Nanomedicine* 2019;14:6575. doi:10.2147%2FIJN.S211844
- Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. *SSU_Journals* 2019;26:879-94.[Persian].
- Abhinav K, Lal PJ, Amit J, Vishwabhan S. Review on niosomes as novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy* 2011;2:61-5.
- Majdzadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU_Journals* 2018;25:853-64.[Persian].
- Mohawed OA, El-Ashmoony MM, Elgazayerly ON. Niosome-encapsulated clomipramine for transdermal controlled delivery. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:567-75.
- Ghanbarzadeh B, Pezeshky A, Hamishehkar H, Moghadam M. Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 2016;12:261-75.[Persian].
- Barakat F, Aboee-Mehrizi F, Haghirsadat BF, Dehghani Ashkezari M. Designing and optimization of liposomal nano-carriers containing Nepeta persica extract and study of its cytotoxicity on the breast cancer cell line (MCF-7). *JSSU* 2019;27:1202-15.[Persian].
- Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. A new study on synthesizing and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU_Journals* 2018;26:528-41.[Persian].
- Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013;12:265-73.

پتانسیل زتا $0.9 \pm 31/33$ میلی ولت می باشد (۲۷). درصد بارگذاری بالاتر و بار سطحی بیشتر از جمله فاکتورهای متفاوت پژوهش ساسانی و همکاران و پژوهش کریمی مقدم و همکاران با پژوهش حاضر می باشد. سلطانی و نیکونهاد لطف آبادی، سامانه‌ی نیوزومی حاوی اسانس رزماری تهیه و گزارش نمودند که این سامانه‌ی لیپیدی دارای اندازه $73/6$ نانومتر، بازده درون گیری $86/75\%$ و پتانسیل زتای $45/46$ میلی ولت بوده است (۲۸). درصد بارگذاری بالاتر و اندازه کوچکتر از جمله مزایای پژوهش سلطانی نسبت به پژوهش حاضر می باشد. هرچند روش ساخت سامانه نیوزومی در پژوهش سلطانی مشابه پژوهش حاضر می باشد، اما به نظر می رسد تفاوت نتایج این دو پژوهش ناشی از تفاوت در ماهیت ماده بارگذاری شده و تفاوت درصد مولی مواد به کار رفته در ساختمان سامانه نیوزومی باشد. همتی و همکاران، فرمولاسیون های متعدد نیوزومی حاوی کوئرستین را تهیه نمودند که دارای بازده درون گیری بین ۷۱ تا ۹۵ درصد، اندازه ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر و پتانسیل زتای بین $6/5$ تا $35/2$ میلی ولت بوده اند (۲۹).

پژوهش حاضر اگرچه با توجه به نتایج حاصل از آن، منتهی به فرمولاسیون مناسب نیوزومی جهت رسانش فلاونوئید کوئرستین شد، ولی همانند بسیاری از پژوهش ها دارای نواقص و کاستی هایی نیز می باشد. عدم بررسی رهایش سامانه نیوزومی حاوی کوئرستین در شرایط سلول های سرطانی، عدم ساخت فرمولاسیون های نیوزومی با درصد مولی متفاوتی از لیپیدها و عدم بررسی پایداری سامانه نیوزومی از جمله مهم ترین کاستی های پژوهش حاضر می باشد که اصلاح و انجام هر یک از موارد ذکر شده را به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می شود.

در پژوهش حاضر نانوحامل های نیوزومی حاوی کوئرستین ساخته شد که ضمن تأیید ویژگی های فیزیکی شیمیایی مناسب آن، دارای بازده درون گیری مطلوب، اندازه ذرات در مقیاس نانو، مورفولوژی مناسب و رهایش کنترل شده طی ۷۲ ساعت بوده است. بنابراین با توجه به شواهد فوق می توان این نانوسامانه نیوزومی را به عنوان حاملی مناسب جهت رسانش کوئرستین به سلول های هدف و انجام تحقیقات تکمیلی به پژوهشگران حوزه رسانش هدفمند دارو پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می باشد. بدینوسیله از حمایت های آن دانشگاه قدردانی می گردد.

References

- Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-x1. *PLoS one* 2012;7:e51764. doi: 10.1371/journal.pone.0051764
- Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *International Journal of Cancer* 2009;124:1918-25. doi:10.1002/ijc.24151

19. Zhao W, Song Zhuang X-RQ. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int J Nanomedicine* 2011;6:3087-98. doi: 10.2147%2FIJN.S25399
20. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2010;148:135-46. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027
21. Bonifacio BV, da Silva PB, dos Santos Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine* 2014;9:1-15. doi: 10.2147%2FIJN.S52634
22. Cui H, Zhao C, Lin L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control* 2015;56:128-34. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.026
23. Mujoriya RZ, Dhamandeb K, Bodla RB. Niosomal drug delivery system—a review. *Int J Appl Pharm* 2011;3:7-10.
24. Amiri B, Ebrahimi-Far M, Saffari Z, Akbarzadeh A, Soleimani E, Chiani M. Preparation, characterization and cytotoxicity of silibinin-containing nanoniosomes in T47D human breast carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17:3835-8.
25. Haghirsadat FA, Azhdari MA, Kalantar SM, Naderinezhad SA, Teymourizadeh KE, Yazdani MO, et al. Strategy of improvements in the therapeutic index of medicinal herbs of Iranian origin: Synthesis and characterization of phospholipid-based vesicles incorporated Trachyspermum copticum. *SSU_Journals* 2016;24:468-78.[Persian].
26. Sajjadiyan SZ, Ghadernejad H, Milani AT, Mohammadian M, Abdolapour S, Taslimi S, et al. Preparation of silibinin loaded pegylated niosomal nanoparticles and investigation of its effect on MCF-10A human breast cancer cell line. *Der Pharmacia Lettre* 2016;8:70-5.
27. Karimi-Moghddam A, Nikounahad-Lotfabadi N, Haghirsadat BF, Majdizadeh M. Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences* 2019;6:1-2.[Persian].
28. Soltani N, Nikoonahad Lotfabadi N. Evaluation of the effect of niosomal nano-carriers containing rosemary (rosemary officinalis) essential oil on survival of kg-1 cell line of acute myeloid leukemia. *SJIMU* 2019;27:162-72.[Persian].
29. Hemati M, Haghirsadat F, Yazdian F, Jafari F, Moradi A, Malekpour-Dehkordi Z. Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2019;47:1295-311. doi:10.1080/21691401.2018.1489271



Fabrication and Characterization of Physicochemical Niosomal Nano-Carriers Containing Quercetin Flavonoids for Therapeutic Purposes

Najme Talei-Ardakani (M.Sc.)¹, Fatemeh Daneshmand (Ph.D)², Mahboobeh Mirhoseini (Ph.D)³, Marziieh Ebrahimpour (M.Sc.)⁴, Mohammad Majdizadeh (M.Sc.)⁵, BibiFatemeh Haghirsadat (Ph.D)^{6*}

1- Dept. of Biology, Payam Noor University of Taft, Yazd, Iran.

2- Assistant Professor, Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Biology Department, Payame Noor University, Tehran, Iran.

4- MSc. Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

5- M.Sc. Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.

6- Assistant Professor, Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Received: 29 December 2019, Accepted: 7 July 2020

Abstract:

Introduction: Quercetin is a flavonoid compound in most plants that due to its pre-apoptotic and anticancer properties can increase the toxicity of drugs such as chemotherapy drugs. The study aimed to fabricate and characterize the niosomal system containing quercetin to increase its therapeutic properties.

Methods: In this in vitro study, with thin-film hydration, niosomal carriers containing quercetin were prepared and after sonication and size reduction, filtration and free drug separation were performed. Subsequently, the amount of quercetin was loaded and the process of quercetin release from the niosomal nanosystem was investigated. The nanoparticles were also evaluated for size, zeta potential, particle morphology, and chemical interactions between the niosomal system and quercetin.

Results: The encapsulation efficiency of quercetin in the niosomal carriers was $64.49 \pm 2.3\%$, the size and zeta potential of the nanocarrier before quercetin loading was 153.8 nm and -9.5 mV respectively, and after quercetin loading was 170 nm and -1.6 mV, respectively. The pattern of drug release indicates that overall quercetin release was slow and 95% of quercetin was released from the niosome within 72 hours. Electron microscopy images and FT-IR results also show that the niosomal system was formed and that no chemical interaction was observed between the niosomal system and quercetin.

Conclusion: The results of the present study show that nano-carriers containing quercetin have appropriate physicochemical properties. Therefore, this niosomal system can be a suitable carrier for quercetin delivery.

Keywords: Niosome, Quercetin, Drug Nano-Carriers, Drug Liberation.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: Bibi Fatemeh Haghirsadat, Email: Fhaghirsadat@gmail.com

Citation: Talei-Ardakani N, Daneshmand F, Mirhoseini M, Ebrahimpour M, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Fabrication and characterization of physicochemical niosomal nano-carriers containing quercetin flavonoids for Therapeutic Purposes. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(1):32-40.