

مروری جامع بر فعالیت زیست سازگاری (M=Mn, Ca, Zn) MFe₂O₄ به عنوان نانوحامل دارو سرطان سینه سنتز شده به روش عملیات گرمایی

احسان نادری^۱، مهسا صفری^۱، محمود ناصری^{۱*}، رمضانعلی طاهری^{۲*}

۱. گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملی ملایر، ملایر، ایران

۲. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده: در این پژوهش، نانوذرات فریت منگنز (Mn)، فریت کلسیم (Ca) و فریت روی (Zn) با روش عملیات گرمایی سنتز شدند. مقدار بارگذاری و رهایش کورکومین (CUR) از نانوحامل‌های Mn، Ca، Zn در pHهای متفاوت بررسی شد. درصد بارگذاری دارو در نانوحامل‌های Mn نسبت به Ca و Zn بیشتر بوده که نتیجه خنثی بودن فریت منگنز در محیط بارگذاری است. برهمکنش قوی $\pi-\pi$ بین CUR و نانوحامل‌های فریت منگنز باعث افزایش درصد بارگذاری دارو می‌شود. با تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵، رهایش کورکومین از نانوحامل‌های Mn، Ca و Zn به ترتیب از ۴۱، ۲۴/۷ و ۴۴ درصد به ۹۲، ۵۸/۷ و ۵۳ درصد افزایش یافت. زیست سازگاری نانوحامل‌های Mn، Ca و Zn با استفاده از روش MTT، آزمایش همولیز و آزمون دوز کشنده تعیین شد. بررسی‌ها نشان داد که علی‌رغم اینکه در حضور نانوحامل‌های Zn، درصد بالایی از سلول‌های سرطانی MCF-7 تخریب می‌شوند اما این نانو حامل‌ها بر سلول‌های نرمال HEK-293 تأثیر مخربی دارند.

واژگان کلیدی: نانوحامل دارو، کورکومین، زیست سازگاری، آزمون همولیز.

*mahmoud.naseri55@gmail.com

*taheri@bmsu.ac.ir

۱- مقدمه

که به دلیل تأثیر بر همه سلول‌ها (سلول‌های بیمار و سالم) عوارض زیادی برای بیماران به همراه دارد، بر این اساس بسیاری از محققان در تلاش‌اند که یک درمان استاندارد، مؤثر و فوری برای سرطان سینه پیدا کنند [۵و۴]. سیستم‌های دارورسانی نانو (DDS) با توجه به برخورداری از مزایایی مانند حلالیت زیاد در محیط‌های آبی، بهبود قابلیت‌های شاخص‌های بیوشیمیایی و تصویربرداری تشخیصی، کاهش سمیت و عوارض جانبی داروها بر سلول‌های سالم و افزایش موضعی غلظت دارو بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۶-۱۰]. تاکنون مواد متفاوت بسیاری به منظور استفاده در سیستم‌های دارورسانی و رهایش دارو مورد

در طی چند سال گذشته بر طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۱ در کشورهای توسعه‌یافته و کشورهای در حال توسعه، بیش از ۵۰ میلیون نفر توسط سرطان‌های متفاوت به ویژه سرطان سینه که بیشتر در زنان دیده می‌شود به کام مرگ رفته‌اند. سرطان سینه پیشرفته بسیار خطرناک است زیرا با انتقال سلول‌های سرطانی به سایر بافت‌های بدن، مقدار بقاء را به کمتر از ۲۵٪ می‌رساند [۱-۳]. امروزه درمان‌های متفاوتی برای درمان سرطان از جمله شیمی‌درمانی، جراحی و رادیوتراپی پیشنهاد شده

² Nano Drug Delivery Systems

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

¹ World Health Organization

تابستان ۱۴۰۰ | شماره ۲ | سال هشتم

به دلیل ویژگی مغناطیسی و سمیت پایین برای استفاده در سیستم‌های دارورسانی نانو بسیار مناسب بوده و قابلیت کاهش فعالیت سلول‌های سرطانی بدون اثرگذاری بر سلول‌های طبیعی را دارند [۲۶ و ۲۷]. کورکومین (CUR) موجود در ریزوم‌های زردچوبه (Turmeric) در گروه آنتی‌اکسیدان طبیعی پلی‌فنل‌های غیر فلاونوئیدی قرار می‌گیرد که دارای ویژگی و ویژگی‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی است [۲۸]. مطالعات زیادی روی اثرات ضد سرطانی کورکومین از جمله در سرطان پانکراس، رحم و سرطان‌های کلیوی انجام گرفته است [۲۹-۳۳].

برای ساخت نانوحامل‌های مورد استفاده در سیستم‌های دارورسانی از روش‌های متفاوتی بهره گرفته شده است [۳۴-۳۶]. به عنوان مثال در یک پژوهش، از روش مایسل معکوس برای ساخت نانوحامل‌های $MnFe_2O_4$ با ویژگی سوپر پارامغناطیس استفاده شده است که این نانوذرات را افزون بر استفاده در سیستم‌های دارورسانی، در تقویت وضوح تصاویر MRI نیز مناسب کرده است [۳۷]. در پژوهشی که بر ساخت فریت مناسب $CaFe_2O_4$ با استفاده از روش‌های ساخت خود احتراقی و هم‌رسوبی به منظور استفاده در دارورسانی انجام شده، خصوصیات ساخت نانوذرات با هم مقایسه شده که در آن ویژگی ساختاری و مغناطیسی نانوذرات ساخته شده به روش هم‌رسوبی دارای ویژگی‌های بهتری نسبت به روش خود احتراقی بودند [۳۸]. در پژوهشی دیگر، نانوذرات فریت منگنز/روی به روش هم‌رسوبی ساخته شده و به منظور پژوهش بر سلول‌های سرطانی سینه مورد استفاده قرار گرفتند که پایداری خوبی در محیط‌های بیولوژیکی داشته و از فعالیت به نسبت خوبی بر سلول‌های سرطانی برخوردار بودند [۳۹].

در بیشتر روش‌های ساخت نانوذرات فریت، با اینکه امکان دستیابی به اندازه و شکل دلخواه وجود دارد اما دارای معایب و مزیت‌هایی نیز هستند که روش جدید عملیات گرمایی مورد استفاده در این پژوهش، مراحل بسیار ساده‌تری داشته و نیازی به شرایط فوق بحرانی نظیر فشار و دمای بسیار بالا که به دشواری بدست می‌آیند نداشته و به علت عدم تولید محصولات سمی، سازگاری خوبی با محیط زیست نیز دارند [۴۰].

مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۱-۱۵]. به عنوان مثال، در پژوهشی که بر سلول‌های سرطانی سینه انجام گرفته است، به منظور بهبود توانایی ضدسرطانی اپی‌گالوکتشین گالات (EGCG)^۱، آرژنین - گلیسین - اسپارتیک اسید (RGD)^۲ حاوی حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC)^۳ به عنوان یک سیستم دارورسانی پیشنهاد شد و نتایج نشان داد که NLC-RGD بارگذاری شده با EGCG دارای بیشترین فعالیت مرگ سلولی در مقایسه با EGCG است [۱۶]. در مطالعه‌ای دیگر، از نانوذرات اکسید آهن بهبودیافته که به روش تجزیه حرارتی ساخته شده و با آنتی‌بیوتیک آنتراسیکلین ویولامایسین B1 پوشانیده شده بود استفاده شد که از نظر اثر ضدتوموری بر روی سلول‌های سرطانی سینه بسیار مؤثرتر از موارد تجاری بود [۱۷].

در این بین، نانوذرات فریت‌های اسپینلی با فرمول کلی MFe_2O_4 که M یک یون دو ظرفیتی مانند آهن، روی، منگنز، کبالت و ... می‌باشد که به دلیل برخورداری از خاصیت مغناطیسی عالی، سطح ویژه بالا و پایداری شیمیایی خوب بسیار مورد توجه هستند [۱۸ و ۱۹]. از میان فریت‌ها، فریت منگنز ($MnFe_2O_4$) بیشترین خاصیت ابرپارامغناطیسی را از خود بروز می‌دهد. به علاوه به دلیل پایداری بالا در محیط‌های اسیدی متوسط، قابلیت کار در محدوده وسیعی از pH را دارد [۲۰ و ۲۱]. فریت کلسیم ($CaFe_2O_4$) دارای ساختار اسپینلی ترکیبی بوده و به دلیل حضور یون Ca^{2+} می‌تواند زیست سازگاری بیشتری با محیط داشته باشد و در کاربردهای بیولوژیکی نقش مؤثری را ایفا کند [۲۲ و ۲۳]. در فریت روی ($ZnFe_2O_4$) با توجه به ساختار اسپینلی ترکیبی و روش ساخت آن از پایداری شیمیایی عالی، وادارندگی پایین و مغناطش اشباع محدودی برخوردار است [۲۴ و ۲۵]. مقادیر مغناطش اشباع نانوذرات فریت‌های (M=Mn, Ca, Zn) MFe_2O_4 به ترتیب برابر است با ۷/۹۶، ۴۴/۸۲ و ۱/۸ emu/g که پایین بودن مقدار مذکور برای فریت‌های Mn و Zn می‌تواند به ترتیب به علت ایجاد بی‌نظمی در سطح نانوذرات بر اثر برهمکنش یون‌های فلزی انتقالی با اتم‌های اکسیژن در شبکه اسپینلی و وجود فاز ناخالصی $\alpha-Fe_2O_3$ به عنوان مانعی بین برهمکنش گشتاورهای مغناطیسی باشد [۲۱، ۲۳ و ۲۵]. نانوفریت‌ها

¹ Epigallocatechin Gallate

² Arginine-Glycine-Aspartic Acid

³ Nanostructured Lipid Carriers

صورت که ۱۰ میلی گرم از CUR در ۲ میلی لیتر از استون حل شده و به صورت قطره‌ای به محلول ۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه با ۱۰ میلی گرم از نانوحامل‌ها در دمای اتاق افزوده شد. باگذشت زمان استون کامل تبخیر شده و CUR بارگذاری شده بر نانوحامل‌ها بدست آمد. محصول نهایی با آهنربا جدا شده و در دمای اتاق خشک می‌شود [۲۴،۲۲،۲۰].

۲-۴- محاسبه مقدار بارگذاری دارو

تعیین مقدار بارگذاری دارو روی نانوحامل‌ها با استفاده از رابطه زیر قابل محاسبه است:

(۱)

$$DL\% = \frac{W_{Drug}}{W_{Carrier}} \times 100$$

درصد DL نشان دهنده مقدار بارگذاری دارو، $W_{Carrier}$ و W_{Drug} به ترتیب نشان دهنده وزن CUR بارگذاری شده روی نانوحامل‌ها و وزن کل نانوحامل‌های بارگذاری شده با CUR است. برای اندازه‌گیری مقدار درصد DL، ۱ میلی گرم از CUR بارگذاری شده با نانوحامل‌های خشک شده را در استون حل کرده و مقدار CUR با استفاده از طیف‌سنجی ($\lambda_{max}=420\text{ nm}$, 10S GENESYSTM) بررسی می‌شود.

۲-۵- رهائش دارو در شرایط آزمایشگاهی (برون تنی)^۵

برای بررسی رهائش دارو در شرایط آزمایشگاهی، ۱ mg از CUR بارگذاری شده با نانوحامل‌ها در ۱۰ میلی لیتر از نمک فسفات بافری (PBS) با همزن مغناطیسی به طور ملایم پراکنده شد. آزمایشات در pH=۷/۴ (بافت سالم) و pH=۵/۵ (بافت تومور) انجام شد. سپس، مقدار CUR رهائش یافته از نانوحامل‌ها در ترکیب برای مدت زمان مشخصی با استفاده از طیف‌سنجی (GENESYSTM 10S, $\lambda_{max}=420\text{ nm}$) تخمین زده شد.

۲-۶- سمیت سلولی

سمیت سلولی نانوحامل‌ها با استفاده از روش MTT تعیین شد. در این روش سلول‌های MCF-7^۶ (سلول‌های سرطانی) و HEK-

در ادامه، مقدار بارگذاری و رهائش داروی کورکومین (CUR) در pH های متفاوت بررسی شد و همچنین سمیت نانوذرات و مقدار تخریب سلول‌های سرطانی این نانوحامل‌ها باهم مقایسه شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کورکومین (CUR) مرک، ۱- (۴،۵-دی‌متیل تiazول-۲-یل) - ۳،۵-دی‌فیل ترازولیوم برمید، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) آلدریج، محیط کشت سلولی DMEM^۲ (سیگما-آلدریج)، نمک فسفات بافری (PBS)^۳، گیبکو^۴، پنی‌سیلین/استرپتومايسين (سیگما-آلدریج)، پلی‌وینیل الکل (PVA) مرک. نیترات منگنز ((Mn(NO₃)₂.6H₂O))، نیترات آهن ((Fe(NO₃)₃.6H₂O))، نیترات کلسیم ((Ca(NO₃)₂.6H₂O)) و نیترات روی ((Zn(NO₃)₂.6H₂O)) آلدریج.

۲-۲- ساخت فریت‌ها

نانوحامل‌های فریت منگنر (Mn)، فریت کلسیم (Ca) و فریت روی (Zn) با استفاده از روش عملیات گرمایی ساخته شدند. ۰/۱ میلی مول از نیترات آهن Fe(NO₃)₃ و ۰/۱ میلی مول از نیترات فلز M (M=Mn, Ca, Zn) در یک محلول مرکب از ۱۰۰ ml آب مقطر و ۳g پلی‌وینیل‌الکل (PVA) در دمای ۹۰ °C و به مدت حدود ۳ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی باهم ترکیب شدند. سپس، ترکیب به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ °C درون آون خشک شد. جامد خشک شده را خرد کرده و پودر حاصل در دمای ۵۵۰ °C کلسینه شد [۲۵،۲۳،۲۱].

۲-۳- بارگذاری کورکومین بر نانوحامل‌ها

با استفاده از روش هم‌رسوبی از استون به عنوان حلال برای بارگذاری کورکومین (CUR) بر نانوحامل‌ها استفاده شد. بدین

¹ Dimethyl sulfoxide

² Dulbecco's Modified Eagle Medium

³ Phosphate Buffered Saline

⁴ Gibco

⁵ In Vitro

⁶ Michigan Cancer Foundation-7

آزمون LD^۴ (دوز کشنده) عبارت است از غلظت معینی از یک سم که اگر بر یک تعدادی از حیوانات آزمایشگاهی مورد مصرف قرار گیرد، آنان را از بین می‌برد. هرچه مقدار LD بزرگ‌تر باشد، سمیت ماده کم‌تر است. ۱۰ عدد موش (۳۵-۴۰ گرم) انتخاب شده و طبق دستورالعمل‌های سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD)^۵ هر ۵ موش چند روز قبل از آزمایش در یک قفس مناسب قرار داده شدند. لازم به ذکر است OECD از جمله سازمان‌هایی همانند سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۶ است که جمع‌آوری مجموعه‌ای از دستورالعمل‌هایی برای مدیریت ریسک مواد شیمیایی و نانومواد را در دستورکار خود دارد. وزن تمام حیوانات، پیش و پس از تعیین مصرف دوز خوراکی (برای ۱ روز و ۱ هفته) اندازه‌گیری شد. تغییرات فیزیکی و رفتاری آنها به مدت ۶ ساعت تحت نظر قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت اگر همه حیوانات زنده بمانند، بیشترین دوز به دو حیوان دیگر داده می‌شود. در صورت زنده ماندن حیوانات، آزمایش متوقف شده و دوز کشنده آن تعیین می‌شود. اگر حیوانات از بین بروند، حیوانات دیگری انتخاب و دوزهای پایین‌تری برای تعیین دوزهای حاد مشخص می‌شوند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی بارگذاری و رهایش دارو

در این بخش، راندمان بارگذاری و رهایش دارو مورد بررسی قرار گرفته است. مقادیر بارگذاری کورکومین در نانوحامل‌های فریت منگنز (Mn)، فریت کلسیم (Ca) و فریت روی (Zn) در جدول (۱) نشان داده شده است. همانطور که از جدول (۱) قابل مشاهده است، مقدار بارگذاری دارو در نانوحامل‌های Mn نسبت به Ca و Zn بیشتر بوده که ناشی از این حقیقت است که فریت منگنز نسبت به دو نانوحامل دیگر در محیط بارگذاری خنثی است [۲۴، ۴۱، ۴۲] و در این وضعیت برهمکنش قوی π-π بین CUR و نانوحامل‌های فریت منگنز به وجود آمده است و مقدار CUR بیشتری بارگذاری شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات فریت کلسیم در مقایسه با فریت روی در محیط بارگذاری، دارای

293 (سلول‌های سالم) با تراکم ۱۰^۴ در ۹۶ عدد پلیت که حاوی DMEM با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (V/V) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌های HEK-293^۲ با مقادیر متفاوتی از CUR و CUR بارگذاری شده روی نانوحامل‌ها تیمار شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شده و هر چاهک با ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پر شد. پس از ۴ ساعت، این محلول با ۱۰۰ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) جایگزین شد به هر چاهک افزوده و در نهایت مقدار جذب اندازه‌گیری شد.

۲-۷- روش همولیز

در این آزمایش زیست‌سازگار، تخریب غشاء گلبول قرمز (RBC) با اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین در نمونه‌ها محاسبه می‌شود تا برآوردی از سمیت نانوحامل‌ها برای خون بدست آید. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی هپارین جمع‌آوری و سپس، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm گریزانه شدند. پس از حذف پلاسمای خون، RBCهای باقی‌مانده توسط PBS و محلول RBCها که با نسبت ۱:۲۰ (RBC:PBS) تهیه شده بود، شسته شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول RBCها و ۲ mg/ml از ترکیب نانوحامل‌ها باهم مخلوط شدند. برای تعیین درصد همولیز، آب دیونیزه به عنوان کنترل مثبت (۱۰۰٪ همولیز) انتخاب و PBS به عنوان کنترل منفی (۰٪ همولیز) انتخاب شدند. پس از گریزانه کردن لوله‌ها با سرعت ۱۲۰۰ rpm، درصد همولیز با استفاده از طیف‌سنج UV- (Eppendorf Bio Photometer) در ۵۴۰ nm از طریق رابطه (۲) محاسبه شد. آزمایش سه بار انجام شد.

(۲)

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{negative}}}{A_{\text{positive}} - A_{\text{negative}}} \times 100$$

۲-۸- دوز کشنده

^۴ Lethal dose

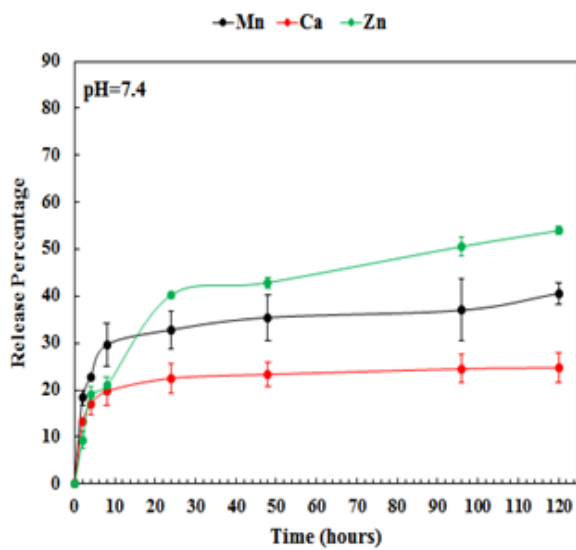
^۵ Organization for Economic Cooperation and Development

^۶ The International Organization for Standardization

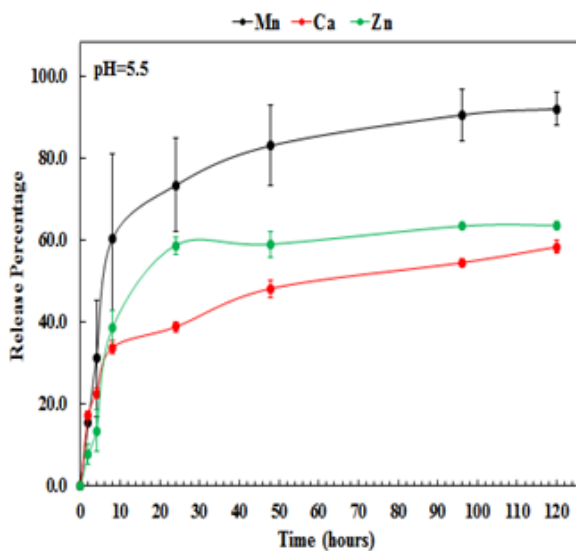
^۱ Fetal Bovine Serum

^۲ Human Embryonic Kidney 293 cells

^۳ Red Blood Cell



شکل ۱: نمودار رهایش CUR از تمامی نانوحامل‌ها در pH=7/4 [۲۰، ۲۲ و ۲۴]



شکل ۲: نمودار رهایش CUR از تمامی نانوحامل‌ها در pH=5/5 [۲۰، ۲۲ و ۲۴]

۳-۲- آزمون همولیز

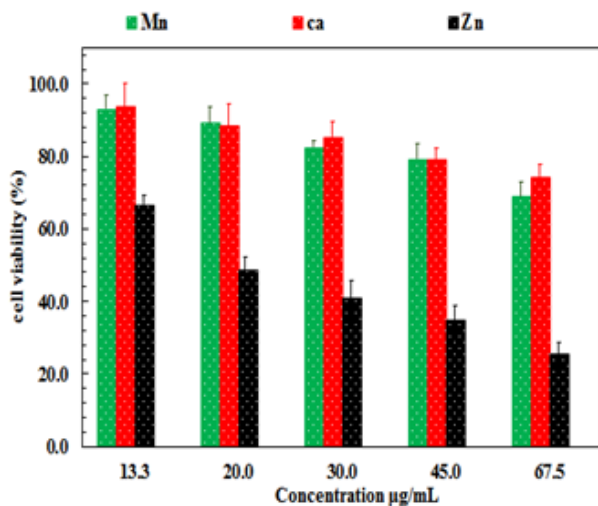
برای تعیین برآوردی از سمیت نانوحامل‌ها برای خون از آزمون همولیز استفاده شد. فعالیت همولیز نانوحامل Mn کمتر از ۳٪ بود و زیست سازگاری قابل قبولی را به نمایش گذاشت. نانوحامل Ca نیز فعالیت همولیز قابل توجهی نداشته و درصد آن کمتر از ۳٪ بود. مقدار فعالیت همولیز نانوحامل Zn کمتر از ۵٪ بوده که ناشی از سمیت بسیار کم روی است. با این وجود، با توجه به جدول (۲)، آزمون همولیز نشان داد که نانوحامل‌های Mn، Ca و

بار منفی بیشتری هستند و در نتیجه تعامل ضعیف‌تری بین CUR و نانوحامل‌های فریت کلسیم نسبت به روی شکل گرفته است [۲۴ و ۴۲].

جدول (۱): درصد بارگذاری کورکومین در نانوحامل‌ها [۲۰، ۲۲ و ۲۴]

نانوحامل وزن نانوحامل (mg) وزن دارو (mg) درصد بارگذاری دارو (%)	Mn	Ca	Zn
۲۱/۳۳ ± ۰/۱۵	۳	۱۰	
۱۶/۶۰ ± ۰/۰۴	۳	۱۰	
۲۰/۷۳ ± ۰/۱۰	۳	۱۰	

شکل‌های (۱) و (۲) رهایش دارو از نانوحامل‌ها را در دو pH متفاوت (۷/۴ و ۵/۵) نشان می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود مقدار رهایش CUR از نانوحامل Mn در طی ۱۲۰ ساعت از ۴۱٪ در محیط خنثی به ۹۲٪ در محیط اسیدی رسید. پتانسیل زتا می‌تواند مقدار رهایش در این نانوحامل‌ها را به خوبی توجیه کند [۴۳ و ۴۴]. بررسی پتانسیل زتا نشان می‌دهد که با اسیدی شدن محیط انتشار، بار خنثی نانوحامل‌های Mn مثبت شده [۴۱] و پیوند هیدروژنی مابین CUR و نانوحامل‌های Mn به خوبی شکسته می‌شود و در نتیجه رهایش برای فریت منگنز تا ۹۲ درصد در محیط اسیدی افزایش می‌یابد. رهایش CUR در نانوحامل Ca بعد از ۱۲۰ ساعت از ۲۴/۷٪ در pH=7/4 به ۵۸/۳٪ در pH=5/5 رسید. با اسیدی شدن محیط انتشار، بار نانوحامل‌های Ca از -۱۸ به -۸ تغییر می‌کند و همچنان منفی است [۴۲]. رهایش CUR از نانوحامل Zn در pH‌های ۷/۴ و ۵/۵ به ترتیب به ۴۴٪ و ۵۳٪ رسید. با اسیدی شدن محیط انتشار، بار نانوحامل‌های Zn از -۵ به خنثی تغییر می‌کند [۲۴] و همین بدون بار بودن فریت روی در محیط اسیدی، تغییر کم رهایش را توجیه می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که رهایش کورکومین در pH‌های متفاوت به برهمکنش پیوند هیدروژنی و تعادل الکترواستاتیک بین نانوحامل‌ها و کورکومین بستگی دارد [۲۴].



شکل (۳): فعالیت سلولی نانوحامل‌ها بر روی سلول‌های طبیعی HEK-293 [۲۴ و ۲۰، ۲۰]

۳-۴- آزمایش فعالیت ضد سرطانی

مقدار فعالیت ضدسرطانی CUR و CUR بارگذاری شده با نانوحامل‌ها روی سلول‌های MCF-7 با استفاده از روش MTT در شکل (۴) نشان داده شده است. بر اساس آن، با افزایش غلظت Mn (بارگذاری شده با CUR)، فعالیت سلول‌های سرطانی از ۶۷٪ در غلظت ۱۳/۳ mg/ml به ۴۰٪ در غلظت ۶۷/۵ mg/ml رسید. در نانوحامل Ca (بارگذاری شده با CUR) با افزایش غلظت به ۶۷/۵ mg/ml بیشتر سلول‌های سرطانی از بین رفته و فعالیت سلول‌های سرطانی به ۳۲٪ کاهش پیدا می‌کند. فعالیت سلول‌های سرطانی در نانوحامل Zn نیز در غلظت ۶۷/۵ mg/ml به ۲۲٪ رسید. با مقایسه مقادیر مشخص شد که بیشترین تخریب تومور برای نانوحامل Zn رخ می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین تخریب سلول‌های سرطانی و غلظت CUR بارگذاری شده روی نانوحامل‌ها وجود دارد. با افزایش غلظت CUR، فعالیت سلولی سلول‌های سرطانی کاهش پیدا می‌کند و تخریب تومور بیشتری انجام می‌شود. علی‌رغم تخریب بالای سلول‌های سرطانی MCF-7 با نانوحامل Zn، این نانوحامل‌ها بر سلول‌های نرمال HEK-293 تأثیر مخربی ندارند. نتیجه اینکه به نظر می‌رسد در میان نانوحامل‌های مورد مطالعه در این پژوهش، به ترتیب نانوحامل‌های Ca و سپس نانوحامل‌های Mn به دلیل سمیت کم و تخریب بالای سلول‌های سرطانی، گزینه مناسب‌تری برای سیستم دارورسانی هستند.

Zn دارای زیست‌سازگاری قابل قبول برای خون و درصد همولیز مناسب هستند [۲۴ و ۲۰، ۲۰].

جدول (۲): درصد همولیز [۲۴ و ۲۰، ۲۰]

همولیز (%)	غلظت (mg/ml)	نانوحامل
۱/۲۴ ± ۰/۳۵	۲	Mn
۲/۳۹ ± ۰/۹۱	۱۰	Ca
۸/۴۵ ± ۰/۸۵	۱۰	Zn

۳-۳- آزمون سمیت سلولی

فعالیت سلولی نانوحامل‌ها بر روی سلول‌های نرمال HEK-293 در نمودار شکل (۳) با هم مقایسه شده است. همانطور که در نمودار شکل (۳) نشان داده شده، فعالیت سلولی HEK-293 با افزایش غلظت از ۱۳/۳ mg/ml به ۶۷/۵ mg/ml برای نانوحامل‌های Mn و Ca به ترتیب از ۹۳/۱، ۹۳/۸ به ۶۹/۵ درصد کاهش می‌یابد. نمودار شکل (۳) نشان می‌دهد که نانوذرات فریت کلسیم و نانوذرات فریت منگنز دارای سمیت بسیار کم برای سلول‌های طبیعی HEK-293 هستند [۲۴ و ۲۰]. این در حالی است که زیست‌پذیری سلولی برای نانوحامل فریت روی با افزایش غلظت از ۱۳/۳ mg/ml به ۶۷/۵ mg/ml از ۶۶/۹ درصد به ۲۵/۸ درصد کاهش می‌یابد که این مقدار سمیت می‌تواند به علت حضور یون‌های Zn بر سلول‌ها باشد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که هنگامی که اندازه فریت روی از بالک به مقیاس نانو کاهش می‌یابد، سمیت نانوذرات اثر بیشتری بر فعالیت سلول‌ها دارد [۲۴].

جدول (۳): تغییر وزن موش‌ها پس از ۲۴ ساعت و ۱ هفته [۲۰، ۲۲ و ۲۴]

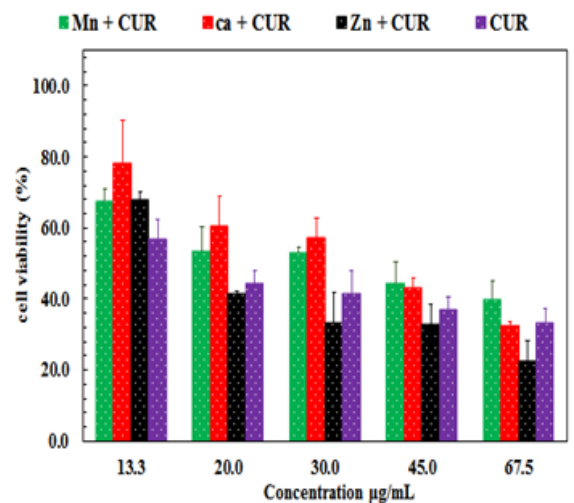
نمونه	تغییر وزن بعد از ۲۴ ساعت (%)	تغییر وزن بعد از ۱ هفته
کنترل	۲۰۰۰ mg/kg	۲۰۰۰ mg/kg
Ca	۴/۰ ± ۲/۰	۲/۰ ± ۰/۰
Zn	۴/۰ ± ۱۴/۰ -	مرده

جدول (۴): تغییر وزن موش‌ها پس از ۲۴ ساعت و ۱ هفته [۲۰، ۲۲ و ۲۴]

نمونه	تغییر وزن بعد از ۲۴ ساعت (%)	تغییر وزن بعد از ۱ هفته
کنترل	۷۳۰ mg/kg	۷۳۰ mg/kg
Mn	۴/۰ ± ۲/۰	۰/۰ ± ۲/۰

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق نانوذرات فریت منگنز (Mn)، فریت کلسیم (Ca) و فریت روی (Zn) با روش عملیات گرمایی سنتز شدند. مقدار بارگذاری دارو در نانوحامل‌های Ca، Mn و Zn به ترتیب برابر $0.15 \pm 0.33/21$ ، $0.04 \pm 0.6/16$ و $0.10 \pm 0.73/20$ درصد بدست آمد. بیشترین مقدار بارگذاری دارو در نانوحامل‌های Mn بوده که ناشی از آن است که فریت منگنز در محیط بارگذاری خنثی است و در این وضعیت برهمکنش قوی $\pi-\pi$ بین CUR و نانوحامل‌های فریت منگنز به وجود آمده است. با تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵، رهایش کورکومین از نانوحامل‌های Ca، Mn و به ترتیب از ۴۱، ۷/۲۴ و ۴۴ درصد به ۹۲، ۷/۵۸ و ۵۲ درصد افزایش یافت. زیست سازگاری نانوحامل‌های Ca، Mn و Zn با استفاده از روش MTT، آزمایش همولیز و آزمون دوز کشنده تعیین شد. با استفاده از آزمون دوز کشندگی مشخص شد که نانوحامل‌های Ca و Zn در دوزهای پایین‌تر از ۲۰۰۰ mg/kg و نانوحامل‌های Mn در دوزهای پایین‌تر از ۷۳۰ mg/kg بی‌خطر هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ترتیب مناسب برای سیستم دارورسانی به صورت $CaFe_2O_4 > MnFe_2O_4 > ZnFe_2O_4$ است.



شکل ۴: فعالیت سلولی نانوحامل‌ها بر روی سلول‌های MCF-7 [۲۰، ۲۲ و ۲۴]

۳-۵- آزمایش دوز کشنده

آزمایش دوز کشنده، یک آزمایش مناسب برای تعیین زیست‌سازگاری در داخل بدن (درون‌تنی) است. همانطور که در جدول (۳) قابل مشاهده است، بالاترین دوز برای نانوحامل‌های Ca و Zn بود که در آن تمامی حیوانات برای نانوحامل‌های Ca توانستند پس از مصرف (بعد از ۲۴ ساعت و ۱ هفته) زنده بمانند اما برای نانوحامل‌های Zn مردند. بنابراین ۲۰۰۰ mg/kg (دوز کشنده) است. برای نانوحامل‌های Mn (جدول (۴)) بالاترین دوز مصرفی که در آن تمام حیوانات توانستند پس از ۲۴ ساعت و ۱ هفته زنده بمانند ۷۳۰ mg/kg (دوز کشنده) است. تغییر وزن بدن عامل مهمی برای تعیین سمیت احتمالی نانوحامل‌ها است. در این بررسی مشخص شد که وزن موش‌ها (پس از ۲۴ ساعت و ۱ هفته) به طور طبیعی افزایش یافت و کلیه موش‌ها در دوزهای تعیین شده دارای فعالیت فیزیکی طبیعی بودند [۴۵]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوحامل‌های Ca و Zn در دوزهای پایین‌تر از ۲۰۰۰ mg/kg و نانوحامل‌های Mn در دوزهای پایین‌تر از ۷۳۰ mg/kg بی‌خطر هستند.

- [8] M. Colilla, A. Baeza, M. Vallet - Regí, "Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and controlled release applications", *The Sol-Gel Handbook*, 1309-1344, 2015.
- [9] K. Cheung, D .B Das, "Microneedles for drug delivery: trends and progress", *Drug delivery*, 23(7), 2338-54, 2016.
- [10] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, " Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery", *Nature biotechnology*, 33(9), 941, 2015.
- [11] A. Srivastava, T. Yadav, S. Sharma, A. Nayak, AA. Kumari, N. Mishra, "Polymers in drug delivery", *Biosciences and Medicines*, 25, 69-84, 2015.
- [12] D. Iannazzo, A. Pistone, M. Salamò, S. Galvagno, R. Romeo, SV. Giofré, C. Branca, G. Visalli, A. Di Pietro, "Graphene quantum dots for cancer targeted drug delivery", *International journal of pharmaceutics*, 25,185-92, 2017.
- [13] R .Heidari, J. Rashidiani, M. Abkar, R. A. Taheri, et al, "CdS nanocrystals/graphene oxide-AuNPs based electrochemiluminescence immunosensor in sensitive quantification of a cancer biomarker", *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 7-14, 2019.
- [14] H. Hajipour, H. Hamishehkar, N. Soltan, et al, " Improved anticancer effects of epigallocatechin gallate using RGD-containing nanostructured lipid carriers", *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46, 283-92, 2018.
- [15] A. R. Nikpoor, M. R. Jaafari, P. Zamani, et al, Cell cytotoxicity, immunostimulatory and antitumor effects of lipid content of liposomal
- [1] J. Ding, T. Liang, Y. Zhou, Z. He, Q. Min, L. Jiang, J. Zhu, "Hyaluronidase-triggered anticancer drug and siRNA delivery from cascaded targeting nanoparticles for drug-resistant breast cancer therapy", *Nano Research*, 10, 690-703, 2017.
- [2] J.W. Park, "Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment", *Breast Cancer Research*, 4, 95, 2002.
- [3] F. Danhier, O. Feron, V. Pr at, "To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery", *Journal of controlled release*, 148, 135-146, 2010.
- [4] A.R. Chowdhuri, D. Laha, S. Chandra, P. Karmakar, S.K. Sahu, "Synthesis of multifunctional upconversion NMOFs for targeted antitumor drug delivery and imaging in triple negative breast cancer cells", *Chemical Engineering Journal*, 319, 200-211, 2017.
- [5] M. Zamani, K. Rostamizadeh, H.K. Manjili, H. Danafar, "In vitro and in vivo biocompatibility study of folate-lysine-PEG-PCL as nanocarrier for targeted breast cancer drug delivery", *European Polymer Journal*, 103, 260-270, 2018.
- [6] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, "Impact of particle elasticity on particle-based drug delivery systems", *Advanced drug delivery reviews*, 108, 51-67, 2018.
- [7] V.P. Torchilin, "Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery", *Nature reviews Drug discovery*, 13, 813, 2014.

by thermal treatment method", *Magnetism and magnetic Materials*, 323(13), 1745-9, 2011.

[22] E. Naderi, M. Aghajanzadeh, M. Zamani, A. Sharafi, M. Naseri, H. Danafar. "The Effect of Calcination Temperature on the Anticancer Activity of $\text{CaFe}_2\text{O}_4@PVA$ Nanocarriers: Photodynamic Therapy and Drug Delivery Study", *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(12):5261-9, 2020.

[23] M. Naseri, E. Naderi, A. R. Sadrolhosseini, "Effect of phase transformation on physical and biological properties of $PVA/CaFe_2O_4$ nanocomposite", *Fibers and Polymers*, 17(10), 1667-74, 2016.

[24] M. Zamani, E. Naderi, M. Aghajanzadeh, M. Naseri, A. Sharafi, H. Danafar, " $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ based nanocarriers for dual-targeted anticancer drug delivery: Synthesis, characterization and in vivo and in vitro biocompatibility study", *Molecular Liquids*, 15, 60-7, 2019.

[25] M.G. Naseri, E. B. Saion, M. Hashim, A.H. Shaari, "Synthesis and characterization of zinc ferrite nanoparticles by a thermal treatment method", *Solid State Communications*, 151, 14-15, 2011,

[26] E. Naderi, M. Naseri, H. Taimouri Rad, R. Zolfaghari Enameh, G. Farnoosh, RA. Taheri, "In vivo and In vitro Biocompatibility Study of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZnO$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ as Photosensitizer for Targeted Breast Cancer Drug Delivery", *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 1, 357-68, 2020.

[27] E. Naderi, M. Aghajanzadeh, M. Zamani, A. Hashiri, A. Sharafi, A. Kamalianfar, M. Naseri, H. Danafar, "Improving the anti-cancer activity of quercetin-loaded AgFeO_2 through UV irradiation:

delivery platforms in cancer immunotherapies. A comprehensive in-vivo and in-vitro study", *International journal of pharmaceutics*, 567, 118492, 2019.

[16] H. Hajipour, H. Hamishehkar, S. Nazari Soltan Ahmad, S. Barghi, NF. Maroufi, RA. Taheri. "Improved anticancer effects of epigallocatechin gallate using RGD-containing nanostructured lipid carriers". *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 46(sup1):283-92,2018.

[17] A. Marcu, S. Pop, F. Dumitrache, M. Mocanu, CM. Niculite, M. Gherghiceanu, CP. Lungu, C. Fleaca, R. Ianchis, A. Barbu, C. Grigoriu. "Magnetic iron oxide nanoparticles as drug delivery system in breast cancer". *Applied Surface Science*. 281:60-5, 2013.

[18] M. G. Naseri, M. K. Halimah, A. Dehzangi, et al, "comprehensive overview on the structure and comparison of magnetic properties of nanocrystalline synthesized by a thermal treatment method", *Physics and Chemistry of Solids*. 75, 315-27, 2014.

[19] M.G. Naseri, E.B. Saion, "Crystalization in spinel ferrite nanoparticles. *Advances in Crystallization*", *Processes*, 27, 349-80, 2012

[20] M. Aghajanzadeh, E. Naderi, M. Zamani, A. Sharafi, M. Naseri, H. Danafar, "In vivo and in vitro biocompatibility study of MnFe_2O_4 and $\text{Cr}_2\text{Fe}_6\text{O}_{12}$ as photosensitizer for photodynamic therapy and drug delivery of anti-cancer drugs", *Drug development and industrial pharmacy*, 46(5), 846-51, 2020.

[21] M.G. Naseri, E. B. Saion, H. A. Ahangar, M. Hashim, A. H. Shaari, "Synthesis and characterization of manganese ferrite nanoparticles

- [36] Chen P, Cui B, Bu Y, Yang Z, Wang Y. Synthesis and characterization of mesoporous and hollow-mesoporous $M_xFe_{3-x}O_4$ (M= Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) microspheres for microwave-triggered controllable drug delivery. *Journal of Nanoparticle Research*. 19(12):1-1, 2017.
- [37] Liu C, Zou B, Rondinone AJ, Zhang ZJ. Reverse micelle synthesis and characterization of superparamagnetic $MnFe_2O_4$ spinel ferrite nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B* 17;104(6):1141-5, 2000.
- [38] Sulaiman NH, Ghazali MJ, Yunas J, Rajabi A, Majlis BY, Razali M. Synthesis and characterization of $CaFe_2O_4$ nanoparticles via co-precipitation and auto-combustion methods. *Ceramics International*. 1;44(1):46-50, 2018.
- [39] Latorre-Esteves M, Cortes A, Torres-Lugo M, Rinaldi C. Synthesis and characterization of carboxymethyl dextran-coated Mn/Zn ferrite for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009 Oct 1;321(19):3061-6.
- [40] م. ناصری، ا. نادری، "مروری بر نانوذرات فریت‌های سنتز شده به روش عملیات گرمایی"، نشریه نانو مقیاس، سال سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۵.
- [41] Y. Xiao, H. Liang, Z. Wang, "MnFe₂O₄/chitosan nanocomposites as a recyclable adsorbent for the removal of hexavalent chromium", *Journal of Mater Res Bull*, 48, 3910–3915, 2013.
- [42] W. Shi, Q. Li, S. An, T. Zhang and L. Zhang, "Magnetic nanosized calcium ferrite particles for efficient degradation of crystal violet using microwave-induced catalytic method: insight into the degradation pathway", *Journal of Chem Technol Biotechnol*, 2, 367-374, 2016.
- Synthesis, characterization, and in vivo and in vitro biocompatibility study", *Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101645, 2020.
- [28] S.J. Hewlings, D .S. Kalman, " Curcumin: a review of its effects on human health", *Foods*, 6(10), 92, 2017.
- [29] A. Shehzad, J. Lee, Y. S. Lee, " Curcumin in various cancers. *Biofactors*", 39(1), 56-68, 2013.
- [30] B. B. Aggarwal, A. Kumar, A. C. Bharti, " Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies", *Anticancer research*, 23, 363-98, 2003.
- [31] S. Bimont, A. Barbieri, M. Leongito, et al, " Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer", *Nutrients*, 8, 433, 2016.
- [32] M. S. Zaman, N. Chauhan, M. M. Yallapu, et al, " Curcumin nanoformulation for cervical cancer treatment", *Scientific reports*, 3, 1-4, 2016.
- [33] P. Amini, H. Saffar, M. R. Nourani, et al, "Curcumin mitigates radiation-induced lung pneumonitis and fibrosis in rats", *International journal of molecular and cellular medicine*, 7, 212, 2018.
- [34] Wang G, Zhao D, Ma Y, Zhang Z, Che H, Mu J, Zhang X, Zhang Z. Synthesis and characterization of polymer-coated manganese ferrite nanoparticles as controlled drug delivery. *Applied Surface Science*. 15; 428:258-63, 2018..
- [35] Okoroh DO, Ozuomba J, Aisida SO, Asogwa PU. Thermal treated synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) mediated zinc ferrite nanoparticles. *Surfaces and interfaces*. 1;16:127-31, 2019.

[43] R.A. Bohara, N.D. Thorat, H.M. Yadav, S.H. Pawar, "One-step synthesis of uniform and biocompatible amine functionalized cobalt ferrite nanoparticles: a potential carrier for biomedical applications", *New Journal of Chemistry*, 38, 2979-2986, 2014.

[44] J. Li, D.H. Ng, P. Song, Y. Song, C. Kong, "Bio-inspired synthesis and characterization of mesoporous $ZnFe_2O_4$ hollow fibers with enhancement of adsorption capacity for acid dye", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 23, 290-298, 2015.

[45] O.O. Guideline, 425: acute oral toxicity—up-and-down procedure, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 2, 12-16, 2001.

A comprehensive overview on biocompatibility activity of MFe_2O_4 (M = Mn, Ca, Zn) as a nanocarrier of breast cancer drug synthesized by heat treatment method

E. Naderi¹, M. Safari¹, M. Naseri^{1*}, R.A. Taheri^{2*}

1. Department of Physics, Faculty of Basic Sciences, Malayer National University, Malayer, Iran

2. Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract: In this research, manganese ferrite (Mn), calcium ferrite (Ca), and zinc ferrite (Zn) nanoparticles were synthesized by thermal treatment method. Curcumin (CUR) loading and release rate of Mn, Ca, and Zn nanocarriers were investigated at different pHs. The drug loading percentage in Mn nanocarriers were higher than Ca and Zn, which is the result of neutral manganese ferrite in the loading medium. Strong π - π interaction between CUR and manganese ferrite nanocarriers increases drug loading percentage. By changing the pH from 7.4 to 5.5, the release of curcumin from Mn, Ca and Zn nanocarriers increased from 41, 24.7, and 44% to 92, 58.7, and 53%, respectively. The biocompatibility of Mn, Ca and Zn nanocarriers were determined using the MTT method, hemolysis test, and lethal dose test. Studies have shown that although a high percentage of MCF-7 cancer cells are destroyed in the presence of Zn nanocarriers, these nanocarriers have a destructive effect on normal HEK-293 cells.

Keywords: Nano-drug carrier, Curcumin, Biocompatibility, Hemolysis test