

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

Fereshteh Atabi¹, Seyed Latif Mousavi Gargari^{2*}, Mehrdad Hashemi³,
Parichehreh Yaghmaei⁴

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

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

فرشته عتابی^۱، سید لطیف موسوی گرگری^{۲*}، مهرداد هاشمی^۳، پریمچهره یغمایی^۴

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

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۴/۱۵

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۱۶

چکیده

هدف: سیستم‌های متنوع انتقال دارو در ارتباط با درمان انواع سرطان‌ها در حال گسترش است. در سال‌های اخیر کیتوسان 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 نانوزل 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: نانوزل‌های فسفریله کیتوسانی (PCS) و نانوزل‌های میریستیل کیتوسانی (MCS) به ترتیب از ترکیب کیتوسان با تری پلی فسفات و میریستیک اسید تهیه و سپس با داروی دکسوروبیسین بارگذاری شدند. نانوزل‌ها با روش‌های مختلف مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی، پراکنش دینامیکی نور و طیف سنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفتند. سمی بودن داروی آزاد (DOX)، نانوزل MCS و MCS بارگذاری شده با DOX با روش MTT سنجیده شد.

نتایج: نتایج حاصل از بارگذاری و رهایش نانوزل‌ها 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 نانوزل PCS و MCS هم از نظر اندازه و هم از نظر ظرفیت‌های بارگذاری و رهایش از قابلیت‌های مناسبی برخوردار بودند.

کلیدواژگان: دارورسانی، نانوزل فسفریله کیتوسان، نانوزل میریستیل کیتوسان، دکسوروبیسین، نانودارو

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

مقدمه

وخصوصاً محل ویژه هدف دارو از عوامل حیاتی در سیستم‌های انتقال دارو است [۱]. فناوری نانو به همراه گسترش

نانوتکنولوژی سرطان یکی از جدیدترین گرایش‌ها در درمان سرطان است. در این میان تنظیم رهایش، جذب

طراحی و مقایسه دو نوع نانوذله

می‌شود [۱۰، ۱۱]. بنابراین ذرات میکرو و نانو به سادگی با واکنش الکترواستاتیک متقابل بین گروه‌های آمین موجود در کیتوسان و گروه کتیری از مواد پلی آنیونی مانند سیترات، سولفات، تری پلی فسفات (TPP)، گلو تار آلیدید و غیره که دارای قابلیت سازگاری زیستی هستند قابل تهیه است [۱۰، ۱۲، ۱۳]. این واکنش متقابل نیازمند شرایط بهینه‌ای از نظر دما و pH است [۱۳، ۱۴]. کلونیدهای کیتوسان برای مصرف دارو (از ترکیبات با وزن مولکولی پایین گرفته تا داروهای با وزن مولکولی بالا) از طریق دهان، واژن و تزریق و به منظور افزایش جذب مواد زیستی قابل تجزیه یا به منظور افزایش جذب مواد آب دوست در سرتاسر لایه‌های اپیتلیال، به طور گسترده‌ای بررسی شده است [۱۵]. با توجه به ویژگی‌های مطرح شده برای کیتوسان، در این تحقیق دو نانوذله به اسامی PCS (Phosphorylated chitosan) و MCS (Myristylated chitosan) با پایه کیتوسان طراحی و تهیه شد و پس از بارگذاری با داروی دوکسوروبیسین (Doxorubicine)، خصوصیات فیزیکی 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 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)، دی متیل سولفو کساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) و گلو تار آلیدید که از نمایندگی شرکت Merck آلمان خریداری شد. همچنین سدیم بوروهیدرات (NaBH_4)، کیتوسان، 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC)، میریستات و MTT (hydroxysuccinimide)، رودامین ۱۲۳، میریستات و [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

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]. به طور معمول، نانوحامل‌های حاوی دارو می‌تواند از دارو در راه عزیمت به محل مورد نظر در برابر تخریب یا غیر فعال سازی محافظت نماید [۳]، در حالی که استفاده مستقیم از این داروها به دلیل سمی بودن یا عواملی از این قبیل مقدور نیست. تحقیقات قابل توجهی در زمینه توسعه نانوذرات مؤثر در سیستم‌های انتقال دارو با تخریب پذیری زیستی وجود دارد [۴، ۵]. تثبیت دارو در یک بستر و حامل مناسب، روش مناسبی را برای پایداری، ذخیره سازی یا عرضه مداوم دارو ارایه می‌دهد. دارو به روش‌های مختلف مانند حل شدن، محبوس شدن، جذب یا متصل شدن در ماتریس نانوذرات قرار می‌گیرد [۵، ۶]. ماتریس نانوذرات می‌تواند از موادی با تخریب پذیری زیستی نظیر پلیمرها یا پروتئین‌ها باشد. با توجه به تنوع روش‌های آماده سازی، نانوذرات را می‌توان با خواص مختلف مانند میزان بارگیری و رهایش عامل درمانی در نانو ذره تهیه نمود [۵]. بسته بندی داروها در حامل‌های خاص شامل نانوذله‌ها، 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 [۷]. کیتوسان (Chitosan) به طور گسترده در تهیه نانوذله‌ها برای امر دارورسانی مطالعه و بررسی شده است [۸، ۹] 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 [۱۰]. در ساختار کیتوسان، به دلیل حضور گروه آمین در موقعیت کربن شماره ۲ در واحدهای D-گلوکز آمین در محیط اسیدی، پلی ساکارید به پلی کاتیون تبدیل

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

تهیه نانوذله 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 به دست آمد. یک درصد وزنی TPP در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و یک محلول TPP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. pH این محلول روی ۴ 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 نانوذله PCS با نسبت ۹ : ۱ از CS : TPP تهیه شد.

تهیه نانوذله کیتوسان - میریستیک اسید (MCS)

برای تهیه ۰/۵ الی ۱ درصد (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 ۱ درصد در دمای اتاق با همزدن مداوم حل گردید تا یک محلول یکنواخت و همگنی از کیتوسان به ترتیب با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد وزنی (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به دست آید. محلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز سونیکه شدند و سپس pH محلول‌ها اندازه‌گیری گردید. به منظور تهیه نانوذله MCS با نسبت ۹ : ۱ از کیتوسان: میریستیک اسید همزمان با همزدن محلول در روی هم زن مغناطیسی، ۳۶ میلی‌گرم اسید چرب میریستیک محلول در متانول به همراه ۹۰ میلی‌گرم EDC و ۵۵ میلی‌گرم NHS به آرامی به کیتوسان ۰/۵ درصد اضافه شدند. پس از ۲ ساعت

همزدن مداوم، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول به محلول فوق اضافه شد و همزدن محلول به مدت دو الی ۵ ساعت در شرایط تاریکی ادامه یافت. ژل کیتوسان با افزودن سود ۱۰ نرمال در شرایط pH قلیایی با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب حاصل به ترتیب با آب مقطر، اتانول و آب مقطر شستشو داده شد و در ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد حل شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز سونیکه شد. ژل حاصل با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون چندین مرتبه فیلتر شد. محلول نانوذله MCS تهیه شده در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ارزیابی خواص فیزیکی شیمیایی نانوذله‌های 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 کیلوولت و با یک بزرگنمایی ۲۰X و ۴۰X به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope: SEM) مشخص شد.

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

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

طراحی و مقایسه دو نوع نانوژل

استفاده شد. مخلوط فوق به یک کیسه دیالیز با امکان عبور (Cut off) تا ۳ کیلو دالتون منتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مقابل ۳۰ میلی لیتر آب مقطر در حین هم خوردن دیالیز شد. کیسه دیالیز به ۳۰ میلی لیتر بافر نمکی فسفات (PBS)، pH ۷/۴ منتقل شد و عمل دیالیز برای مدت زمان ۳ ساعت در این بافر ادامه یافت. در فواصل زمانی مشخص، مقدار ۲ میلی لیتر 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) اندازه گیری 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 اندازه گیری شد. پس از متعادل سازی ستون با بافر سدیم لوریل سولفات - فسفریک اسید : استونیتریل، با نسبت ۵۰:۵۰ نمونه های جمع آوری شده از مرحله دیالیز به طور جداگانه به ستون (۴/۶ میلی متر در ۲۵۰ میلی متر، ۵ میکرومتر، C18) تزریق و با بافر فوق با سرعت خروج ۱ میلی لیتر در دقیقه شستشو داده شد. خروجی های ستون در ۲۵۴ 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:

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

مقدار کل داروی دکسوروبیسین

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

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

طیف سنجی مادون قرمز FT-IR

برای نشان دادن برهمکنش اجزای مختلف تشکیل دهنده نانوذرات با یکدیگر از روش (Fourier transform infrared spectroscopy) FT-IR استفاده شد. بدین منظور نمونه های TPP، میریستیک اسید، کیتوسان (CS)، دکسوروبیسین (DOX)، MCS، PCS، DOX-PCS و DOX-MCS با پودر خالص KBr مخلوط شد و سپس از آن ها قرص های فشرده تهیه گردید. طیف نمونه های مورد نظر با دستگاه اسپکتروسکوپی مادون قرمز اندازه گیری 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 نانوژل های MCS و PCS به ۰/۵ میلی لیتر داروی دکسوروبیسین با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر افزوده شد. محلول های فوق کاملاً مخلوط گردیده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت به آرامی هم زده شد. به منظور حذف داروی دکسوروبیسین اضافی بارگذاری نشده در نانوژل از روش دیالیز

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 چسبیده به کف فلاسک به کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد 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 به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری گردید. در کلیه موارد برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد. به منظور کنترل و تنظیم مقدار سلول‌ها و چگالی آن‌ها در محیط کشت سلولی، قبل از انجام آزمون MTT درصد سلول‌های زنده تعیین شد؛ به طوری که درصد سلول‌های زنده کمتر از ۹۰ درصد نبود. غلظت‌های مختلف دارو و نانوذل 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 به دست 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 نانوذل و نانوذل 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) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ 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 ۴ ساعت پلیت با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه به مدت 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:

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

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

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \text{درصد میزان سمی بودن} - 1$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با حداقل سه بار تکرار به صورت میانگین $\pm$ 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 نانوذل MCS و نانودارو با استفاده از آزمون توکی (Tukey) انجام شد و سطح معنی دار $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

شکل و اندازه نانوذل‌های کیتوسان

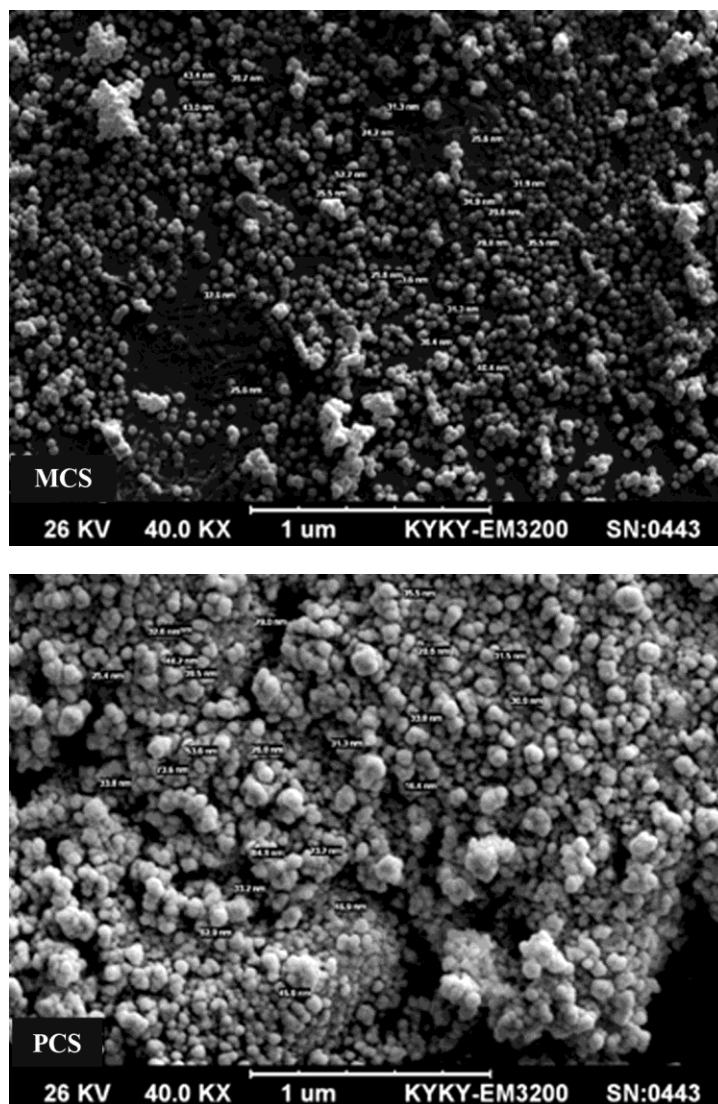
نتایج حاصل از بررسی اندازه و شکل ذرات نانوذل‌های MCS و PCS با SEM و DLS در شکل ۱ و جدول ۱ ارائه شده است. متوسط قطر ذرات برای نمونه‌های MCS و PCS به ترتیب ۱۵ و ۱۵۲ نانومتر به دست آمد.

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

طراحی و مقایسه دو نوع نانوذله

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

نوع نانوذله	MCS	PCS
میانگین اندازه ذره با DLS (نانومتر)	$24/48 \pm 5/09$	$116 \pm 32/65$
تعداد دفعات شمارش توسط دستگاه DLS	۵۲	۳۶
پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	$40 \pm 2/02$	$28/7 \pm 7/02$
اندازه متوسط قطر ذرات با SEM (نانومتر)	۱۵/۶۴	۱۵۲/۲
PdI	۰/۰۱۶	۰/۴۰۶



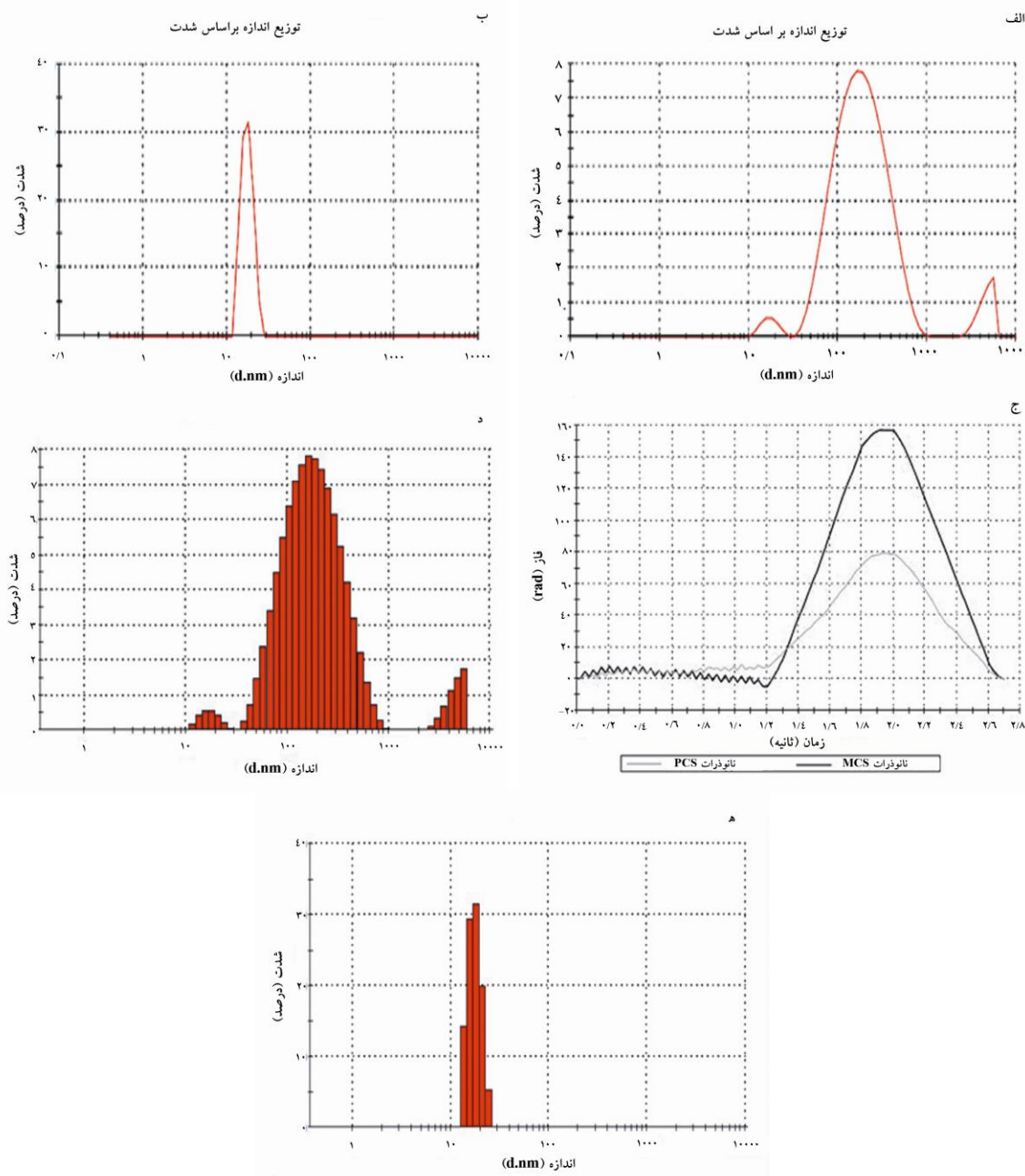
شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM از نانوذله‌های MCS و PCS (تصاویر در غلظت زیاد تهیه شده‌اند).

نانوذله PCS ۱۵۲ نانومتر و مقدار PdI به‌دست آمده که نمایانگر میزان پراکندگی داده‌هاست، برای نانوذله‌های PCS حدود ۰/۴۰۶ بود. متوسط قطر نانوذله محاسبه شده از DLS

نتایج DLS برای نانوذله‌های MCS و PCS در آب مقطر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ و شکل ۲ ارائه شده است. متوسط اندازه ذرات به‌دست آمده با DLS برای

توزیع پتانسیل زتا برای نانوذلهای MCS و PCS در شکل ۲ (ج) مقایسه شده است. پتانسیل زتای به دست آمده برای نانوذرات MCS و PCS به ترتیب حدود ۴۰ و ۲۸/۷ میلی ولت بود (جدول ۱)

برای نانوذلهای MCS، در حدود ۱۵/۶۴ نانومتر بود. همان گونه که در شکل ۱ ملاحظه می شود، توزیع اندازه ذرات برای نانوذله MCS، در حدود ۱۱-۲۵ نانومتر و مقدار PDI به دست آمده برای نانوذله MCS نیز ۰/۱۶ بود. چگونگی



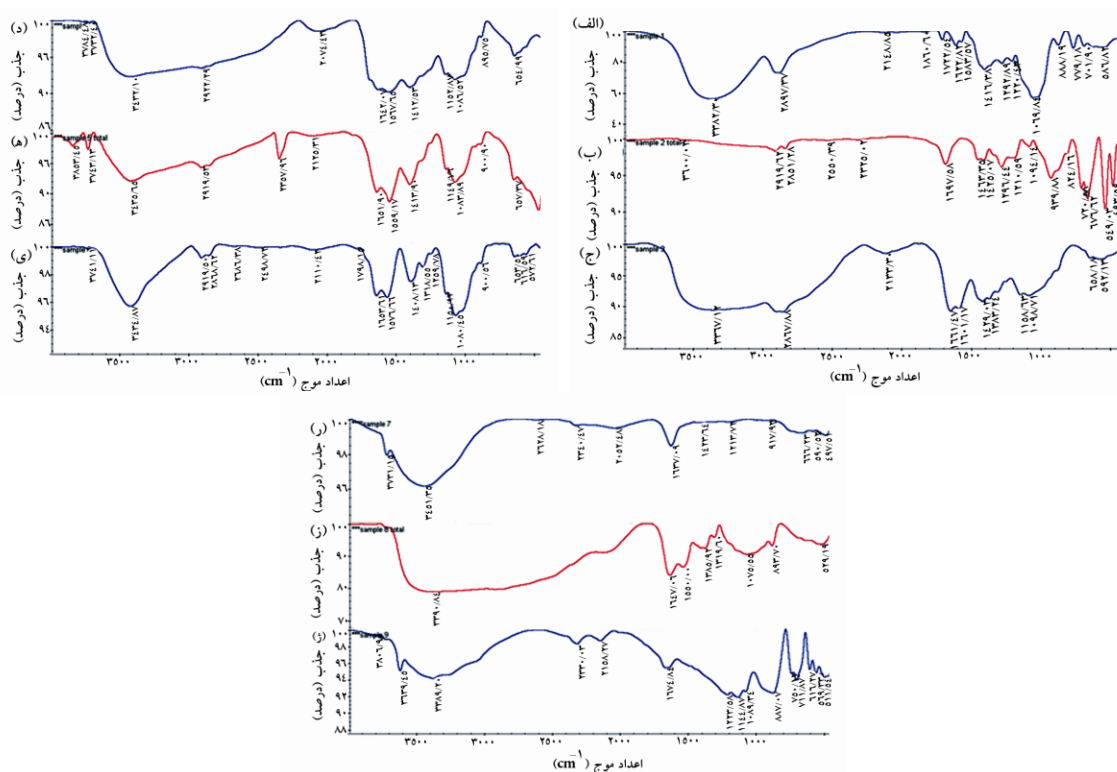
شکل ۲. نتایج DLS برای نانوذلهای MCS و PCS؛ (الف) توزیع اندازه نانوذرات PCS بر اساس شدت (Intensity)، (ب) توزیع نانوذرات MCS بر اساس شدت، (ج) مقایسه توزیع پتانسیل زتا در هر دو نوع نانوذرات، (د) منحنی آمار اندازه نانوذرات PCS، (ه) منحنی آمار اندازه نانوذرات MCS

طراحی و مقایسه دو نوع نانوذله

DOX (PCS-DOX) و میریستات، MCS و MCS بارگذاری شده با DOX (MCS-DOX) به کمک اسپکترومتری FT-IR در شکل ۳ ارائه شده است.

طیف سنجی مادون قرمز FT-IR

نتایج ارزیابی ساختاری کیتوسان (CS)، داروی دکسوروبیسین (DOX)، PCS و PCS بارگذاری شده با



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) PCS-DOX (ز)، PCS، TPP

جدول ۲ نتایج حاصل از مطالعات رهش دارو از نانوذله PCS بر اساس روش دیالیز

ظرفیت مؤثر (LE) (درصد)	بارگذاری دارو (میلی گرم بر میلی لیتر)	ظرفیت بارگذاری (LC) (درصد)	PCS:DOX	PCS (میلی گرم)
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 رهش داروی دکسوروبیسین از

نانوذله های PCS

نتایج بارگذاری ۱ میلی گرم داروی دکسوروبیسین با

غلظت های مختلف نانوذله PCS در جدول ۲ و میزان رهش دارو در شکل ۴ ارائه شده است. الگوی رهش دارو در ساعات اولیه سریع بود و به تدریج شیب رهش با دامنه

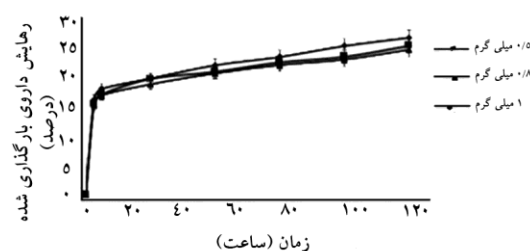
بارگذاری و رهایش داروی دکسوروبیسیسین از

نانوژل‌های MCS

نتایج بارگذاری ۲ میلی گرم داروی دکسوروبیسیسین محلول در DMSO با ۵ میلی گرم نانوژل MCS در جدول ۳ و میزان رهایش دارو در شکل ۵ ارائه 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 ۵ نشان دهنده رهایش ۱۸/۵ درصدی دارو طی ۳ ساعت اولیه است. این میزان بعد از گذشت ۳۶۰ ساعت (۱۵ روز)، در مجموع به حدود ۴۰ درصد رسید.

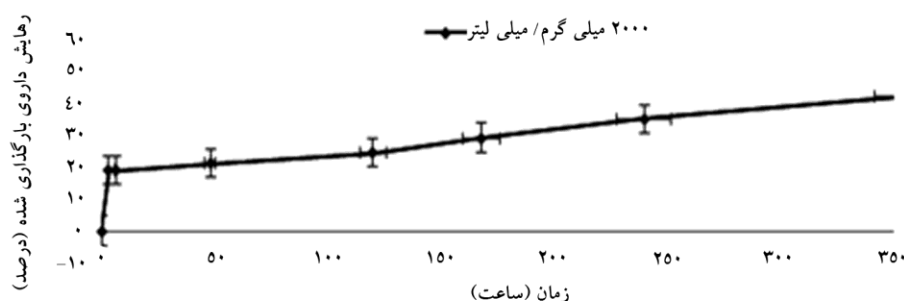
ملایم‌تری ادامه یافت. نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از غلظت‌های مختلف PCS در شکل ۴ نشان دهنده ۲۶ درصد رهایش دارو طی ۳ ساعت اولیه است. این میزان پس از گذشت ۱۲۰ ساعت، در مجموع به ۲۸ درصد رسید.



شکل ۴ نمودار رهایش داروی بارگذاری شده در نانوژل PCS در مدت زمان ۱۲۰ ساعت؛ رهایش داروی بارگذاری شده از غلظت‌های مختلف نانوژل PCS

جدول ۳ نتایج حاصل از مطالعات رهایش دارو از نانوژل MCS بر اساس روش دیالیز

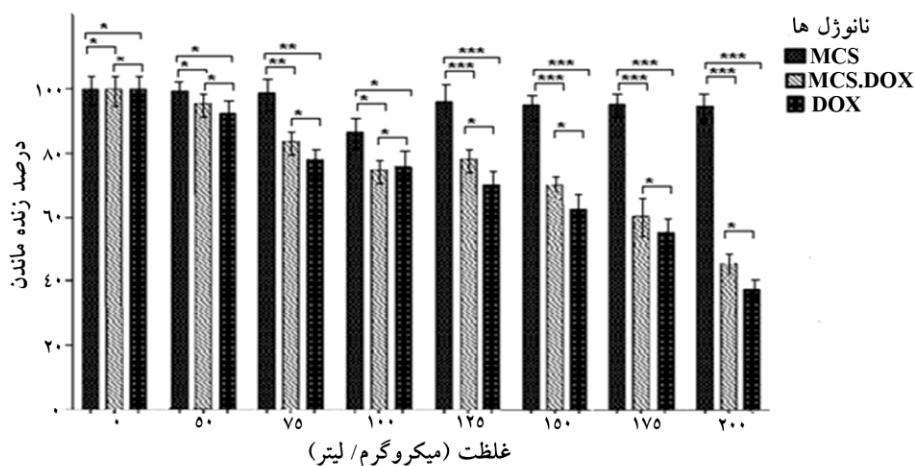
ظرفیت مؤثر (LE) (درصد)	بارگذاری دارو (میلی گرم بر میلی لیتر)	ظرفیت بارگذاری (LC) (درصد)	MCS:DOX	DOX (میلی گرم بر میلی لیتر)
۹۹/۰۸	۱۹۸۱/۴۶	۳۹/۶۳	۱ : ۰/۴	۲



شکل ۵ نمودار رهایش داروی بارگذاری شده در نانوژل MCS در مدت زمان ۳۵۰ ساعت

غلظت‌های بالای ۱۲۵ میکرومولار با سطح معنی‌داری $P > 0.001$ (***) موجب کاهش حیات سلول‌ها شده است. نانوژل حاوی دارو (MCS-DOX) در مقایسه با داروی DOX هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در حیات سلول‌ها نداشته است.

نتایج آزمون MTT نانوژل‌ها و دارو بر سلول‌های سرطانی در شکل ۶ نشان دهنده آن است که نانوژل حاوی دارو (MCS-DOX) در مقایسه با نانوژل تنها (MCS)، با سطح معنی‌داری $P > 0.001$ (***) موجب کاهش حیات سلول‌ها شده است. داروی DOX در مقایسه با MCS در



شکل ۶ مقایسه آثار سمی غلظت‌های مختلف نانوذله‌های میریستیل بر سلول‌های LNCaP؛ علامت * نشان‌دهنده معنی‌داری مقایسه انجام شده در سطح $P < 0.01$ است. علامت ** نشان‌دهنده معنی‌داری مقایسه انجام شده در سطح $P < 0.001$ است. MCS نانوذله میریستیل، DOX داروی DOX و MCS-DOX نانوذله بارگذاری شده با داروی DOX است. نانوذله MCS نسبت به دواتی دیگر بر حیات سلول‌ها تأثیر منفی نداشته است.

بحث

در کیتوسان استفاده شد و داروی دوکسوروبیسین محلول در DMSO در آن بارگذاری شد. روش جدید ارایه شده در این تحقیق برای تهیه نانوذله‌های PCS و MCS بر پایه کیتوسان، از روش ساده یک مرحله‌ای تهیه نانوذله با نسبت ۹:۱ برای کیتوسان: TPP/میریستات استفاده شد. با تغییر نسبت مولی کیتوسان: TPP اندازه ذرات کوچک شد که امکان عملکرد نانوذرات حاصل در pH فیزیولوژیک را مهیا می‌سازد. به‌علاوه این‌که نانوذله PCS حاصل به سادگی با انکوباسیون با دارو بارگذاری شد و مدت زمان رهایش آن در pH فیزیولوژیک افزایش یافت. در تهیه PCS و MCS استفاده از مقادیر کمتر TPP و میریستات به‌عنوان اتصال دهنده باعث می‌شود که اغلب گروه‌های آمین کیتوسان بار مثبت خود را حفظ کنند. بدین ترتیب آمین‌های باردار می‌تواند با دیگر گروه‌های فعال نظیر گلوکارآلدئید، کربوکسی‌پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG-COO) و غیره واکنش دهند که این روش در دارورسانی به روش فعال (Active) مناسب می‌باشد. در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین، متعاقب اثر TPP بر کیتوسان، به لحاظ استفاده از نسبت

از آن جایی که ظرفیت بارگذاری (LC) دارو در حاملین توسعه یافته نانو همچنان پایین است، بنابراین برای عملکرد مؤثر دارو، بهبود بارگذاری مؤثر (LE) حاملین دارو، امری حیاتی است [۸]. کیتوسان به‌عنوان پلیمری غیرسمی با سازگاری 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 مؤثرترین داروی انتخابی در درمان سرطان پروستات است؛ به همین دلیل دو نانوذله کیتوسانی MCS و PCS به‌ترتیب با دو اتصال دهنده، یکی تری پل‌ی فسفات (TPP) مناسب برای داروی محلول در آب و دیگری میریستیک اسید مناسب برای داروی محلول در DMSO تهیه شد. یکی از روش‌های مناسب و مؤثر برای اصلاح خواص 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 ایجاد اتصالات عرضی است. از میریستات برای ایجاد اتصالات عرضی

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

در تحقیق حاضر فرمولاسیون ساده تهیه کیتوسان-TPP (PCS) و کیتوسان-میرستات (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 به کار می‌رود. با این‌که هر دو نانوذله MCS و PCS از نظر ظرفیت بارگذاری و آهنگ رهایش دارو برای دارورسانی بسیار مناسب بودند ولی هر کدام از نانوذله‌های 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 نانوذله PCS حاصل در pH فیزیولوژیک (۷/۴) 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 ۹:۱ در کیتوسان: میرستات علاوه بر افزایش ظرفیت بارگذاری نانوذله MCS باعث کوچک‌تر شدن اندازه نانوذرات و افزایش پتانسیل زتا نسبت به نانوذله PCS تا حدود دو برابر شد. این امر در اتصال ترکیبات دیگر حاوی گروه‌های عامل بر نانوذله نقش اساسی دارد. در تحقیق حاضر غلظت کیتوسان مورد استفاده در هر دو نوع نانوذله ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. بنابراین اندازه کوچک نانوذرات می‌تواند به دلیل استفاده از غلظت پایین کیتوسان نیز باشد. افزایش غلظت کیتوسان می‌تواند باعث افزایش متوسط اندازه قطر نانوذرات شود. میانگین اندازه ذرات برای نانوذله MCS حدود ۱۵ نانومتر با PdI حدود ۰/۱۶ و پتانسیل زتای ۴۰ میلی‌ولت و برای PCS حدود ۱۱۶ نانومتر با PdI ۰/۴ و همچنین پتانسیل زتای ۲۸ میلی‌ولت به دست آمد. نانوذله MCS

نسبت به نانوذله PCS، هم از نظر اندازه قطر نانوذله 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 cm^{-1} ۶۵۸ 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 cm^{-1} ۱۴۱۶ موجود در ساختار دکسوروبیسین به ترتیب در نانوذله‌های PCS-DOX و نانوذله‌های MCS-DOX نیز مشاهده می‌شود که تأیید کننده حضور دکسوروبیسین در ساختمان نانوذله 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} ۱۶۶۱ در کیتوسان به cm^{-1} ۱۶۴۷ در PCS و به cm^{-1} ۱۶۴۷ در PCS-DOX و به cm^{-1} ۱۶۵۱ و cm^{-1} ۱۶۵۳ در هر دو نمونه MCS-DOX منتقل شده است. این تغییرات می‌تواند مربوط به قرارگیری داروی دکسوروبیسین در نانوذله‌های PCS و MCS باشد. نتایج مشابهی هنگام قرارگیری داروی دکسوروبیسین در نانو هیبریدهای 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} ۳۶۳۲ 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} ۳۳۶۷ در کیتوسان و cm^{-1} ۳۳۹۰ در PCS ایجاد نموده است. این نقطه اوج در ساختار MCS نیز

طراحی و مقایسه دو نوع نانوذله

دوکسوروبیسین به عنوان یک مدل دارویی در خارج از بدن و در آزمایشگاه و شیب ملایم رهایش آن از نانوذله های PCS و MCS می تواند آن ها را کاندید و جایگزین مناسبی به عنوان حامل دارو در درمان سرطان مطرح نماید.

نانوداروها سبب افزایش انتقال داروهای ضد سرطانی می شوند و با کاهش دوز مصرفی این داروها عوارض ناشی از تجمع دارو در بافت های سالم را محدود می کنند. اگرچه تحقیق روی سامانه های درمانی هدفمند برای درمان سرطان به طور مؤثری به منظور کاربردهای انسانی تجاری نشده است، اما ردی (Reddy) و همکارانش با ارایه محصولاتی مانند لیپوزوم های با نیمه عمر بالا حاوی دوکسوروبیسین و پولیپروسان ۲۰ (Polifeprosan-20) با کارموستین (Carmustine) به بازار برای درمان سرطان علاقه جدیدی در زمینه انتقال هدفمند دارو به سرطان ها به وجود آورده اند [۲۱]. همچنین لیو (Liu) و همکارانش نشان دادند که اختصاصی بودن و تمایل زیاد به میزان زیادی بازده انتقال دارو را افزایش و اثر سمی داروها را کاهش می دهد [۲۲].

نتایج آزمون MTT نانوذله ها و دارو بر سلول های سرطانی نشان دهنده آن است که نانوذله به تنهایی بر سلول ها اثر کشندگی ندارد؛ در صورتی که نانوذله حاوی دارو و دارو به تنهایی به میزان نسبتاً مشابه باعث مرگ و میر سلول ها شدند. پلیمر کیتوسان با توجه به فراوانی، فرمولاسیون ساده تهیه کیتوسان-TPP و کیتوسان-میرستات، ظرفیت بالا و قابل قبول بارگذاری با داروی دوکسوروبیسین و رهایش مناسب آن می تواند جایگزین روش های نسبتاً پیچیده و چند مرحله ای تهیه میکرو/نانوذرات باشد که در حال حاضر در ساخت حامل ها و بارگذاری دارو یا عوامل بیولوژیکی دیگر به کار می رود.

تشکر و قدردانی

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

(Sharp) و پرانرژی در موقعیت 3432 cm^{-1} در ساختار MCS-DOX در موقعیت 3435 cm^{-1} مشاهده می شود. به عبارت دیگر؛ این نقطه اوج که مربوط به فرکانس ارتعاشی کششی N-H و O-H در ساختار اصلی اسکلت کیتوسانی است، در MCS و MCS-DOX قوی تر و تیزتر شده است. طیف مادون قرمز ساختار دکسوروبیسین، چندین جذب را در ناحیه $586-779 \text{ cm}^{-1}$ نشان می دهد که به موقعیت $511-887 \text{ cm}^{-1}$ در PCS-DOX و به $572-900 \text{ cm}^{-1}$ در MCS-DOX منتقل شده اند. این امر تأیید دیگری بر حضور داروی دکسوروبیسین در ساختار نانوذله ها است. نتایج مشابهی توسط میترا (Mittra) و همکارانش به دست آمده است [۲۰].

نتایج این تحقیق نشان داد که ظرفیت بارگذاری (LC) نانوذله های PCS با افزایش غلظت دارو، افزایش می یابد. در حالی که بارگذاری مؤثر (LE) تا رسیدن به نسبت ۱:۱ از PCS:DOX افزایش یافته و پس از آن افزایش غلظت دارو تأثیر قابل توجهی بر LE نداشته است. افزایش زمان انکوباسیون تا ۲۴ ساعت، باعث افزایش بارگذاری دارو تا حدود ۹۷ درصد شد. ظرفیت بارگذاری در ۵ میلی گرم از نانوذله های MCS که با ۲ میلی گرم بر میلی لیتر دارو بارگذاری شده، تنها از حدود ۴۰ درصد از ظرفیت بارگذاری نانوذله استفاده شد. در صورتی که ظرفیت مؤثر در این شرایط تقریباً ۱۰۰ درصد است. نتایج به دست آمده نشان دهنده رهایش ۱۸/۵ درصدی دارو از نانوذله های MSC طی ۳ ساعت اولیه و حدود ۴۰ درصد بعد از گذشت ۳۶۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد بود. چگونگی رهایش داروی دکسوروبیسین وابسته به زمان بود و با شیب بسیار ملایمی ادامه یافت. رهایش آرام مولکول های داروی دکسوروبیسین از نانوذله ها در یک محیط آبی، می تواند رهایش پیوسته و مناسبی از داروی دکسوروبیسین در بافت تومور را تضمین نماید. این رهایش پایدار و کافی دارو در منطقه هدف مورد نظر می تواند در کاهش حجم تومور نقش به سزایی ایفا نماید. ظرفیت بالای بارگذاری (LC) نانوذله های کیتوسان با داروی

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. *Carbohydrate 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.

- [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.