

بررسی اثر فلاونوئید کوئرستین کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان بر سمیت سلولی، آپوپتوزیس و رشد رده سلولی K562

روح الله کامیابی^۱، علیرضا جهان‌دیده^{۲*}، نگار پناهی^۱، صمد محمدنژاد^۳

چکیده

بیماری سرطان از مهمترین علل مرگ در جوامع امروزی به شمار می‌رود. عوارض غیر قابل تحمل و مقاومت نسبت به داروهای شیمی درمانی دانشمندان را نسبت به ابداع ترکیبات دارویی جدید با عوارض کمتر ترغیب نموده است. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثرات سینرژیک کوئرستین کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان بر سمیت سلولی، آپوپتوز و رشد سلولی رده سلولی K562 بوده است. فلاونوئید کوئرستین در نانوذرات کیتوزان کپسوله شدند و ویژگی‌های فیزیکی آنها با استفاده از روشهای استاندارد، بررسی FTIR و تصویر میکروسکوپ SEM تعیین گردید. سلول‌های K562 در محیط کشت سلولی کشت شدند، سمیت سلولی داروها با روش MTT و اثرات نانوداروها بر آپوپتوزیس در آنها مورد بررسی قرار گرفت. میزان IC50 در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض قرار گیری سلولها با داروی نانوکوئرستین ۱۶،۷۱ و ۱۰،۳۶ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. نانوداروی کوئرستین دارای پتانسیل ذاتی مثبت بود. داده‌ها نشان داد که فرم نانوداروی کوئرستین کپسوله شده با کیتوزان در مقایسه با فرم خالص کوئرستین به صورت معنی دار از نظر آماری دارای تاثیر گذاری بیشتری بر روی سلولهای سرطانی بود ($p < 0.05$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فرم انکپسوله نانوداروی کوئرستین با کیتوزان دارای سمیت سلولی بیشتری نسبت به فرم خالص داروها بوده است. از سوی دیگر نتایج نشان داد که کوئرستین به صورت کمپلکس نانودارو دارای اثر قابل توجه در القای آپوپتوز در سلولهای لوسمی میلوئیدی مزمن انسانی بوده است. از این رو این نانودارو میتواند در زمینه درمان لوسمی میلوئیدی مزمن مقاوم به درمان مورد تحقیقات بیشتری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کوئرستین، نانودارو، کیتوزان، رده سلولی K562

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۷

مقدمه

امروزه و علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه درمان سرطان، این بیماری از مهمترین علل مرگ و میر انسان‌ها در سراسر جهان به شمار می‌رود. لوسمی گروهی از انواع سرطان است که معمولاً از سلولهای مادر خونساز در مغز استخوان شروع می‌شود و باعث شکل‌گیری تعداد زیادی گلبول سفید سرطانی همراه با اختلال در عملکرد می‌گردد(۱). لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myeloid Leukemia) نوعی سرطان خون است که از تکثیر سلول بنیادی خونساز حاصل می‌شود. این بدخیمی اغلب با یک ناهنجاری ژنتیکی اکتسابی در کروموزوم ۲۲ همراه است که به نام کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود و در بیش از ۹۰ درصد بیماران وجود دارد(۲). این ناهنجاری در نتیجه بازآرایی بین ژن‌های BCR و Abelson به وجود می‌آید. در اثر این جابجایی کروموزومی در این کمپلکس ژنی، ژن ABL1 از کروموزوم ۹ در کنار ژن BCR از کروموزوم ۲۲ قرار می‌گیرد. بیان ژنی این کمپلکس جدید منجر به تولید یک پروتئین هیبریدی می‌شود که خاصیت تیروزین کینازی دارد و در عملکرد تکثیر سلول دخیل است(۳). مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین هیبریدی BCR-ABL در تعامل با سایر پروتئین‌های سیتوپلاسمی منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ Ras-ERK و Akt-(PI3K) و STAT5 می‌گردد که تکثیر و مقاومت نسبت به آپوپتوزیس را در سلولهای سرطانی به همراه دارد(۴). به استثنای موارد

۱- گروه علوم پایه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* ۲- گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

Dr.jahandideh@gmail.com

۳ مرکز تحقیقات ژن درمانی، پژوهشگاه بیماریهای غارشی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

CML که در دوران بارداری به تازگی تشخیص داده شده اند، درمان خط اول در آن استفاده از دسته داروهای مهار کننده تیزوزین کیناز است. امروزه ایماتینیب، داساتینیب، نیلوتینیب و بوزو تینیب از دسته داروهای تیزوزین کیناز تایید شده توسط سازمانهای بین المللی هستند (۵). داروهای تیزوزین کیناز با اتصال اختصاصی به ABL از فسفریلاسیون سوپسترا جلوگیری می نمایند، مسیر انتقال سیگنال را قطع مینماید که منجر به آپتوز سلول سرطانی می گردد. از مهمترین مشکلات در زمینه درمان CML مقاومت بیماران به داروهای شیمی درمانی است که تعدادی از مکانیسم های آن در مطالعات بسیاری بررسی گردیده است (۶).

دانشمندان همواره به دنبال داروهایی بوده اند که علاوه بر کاهش عوارض شدید داروهای شیمی درمانی گاه کیفیت زندگی بیماران را بسیار کاهش می دهند. همچنین داده ها نشان داده است که درمان های ترکیبی که در طی آن از عوامل دارویی همچون نانوذرات یا فلاونوئیدها همراه با داروهای شیمی درمانی استفاده می شود می تواند منجر به کاهش دوز عوامل دارویی شده و همچنین مقاومت دارویی و عوارض درمان را در بیماران کاهش دهد (۷). مطالعات نشان داده اند که ترکیب داروهای ضد سرطان با عوامل ضد سرطان دیگر با مکانیسم عمل متفاوت میتواند منجر به افزایش اثر آنها به صورت سینرژیک شده و مقاومت به آنها را کاهش دهد. تاکنون ترکیب داروهای ضد سرطانی بر پایه پلاتینیوم، مهارکننده پروتئازوم، مهارکننده های هیستون داستیلاز، مهارکننده های آمینوپپتیداز، مهار کننده های COX-2 با ایماتینیب مطالعه گردیده است (۸-۱۰).

فلاونوئیدها ترکیبات فیتوشیمیایی با اثرات مختلف دارویی هستند که در سالهای اخیر توجه دانشمندان را جلب کرده اند. کوئرستین یک رنگدانه طبیعی و نوعی فلاونوئید پتاهیدروکسی است که در میوه ها و سبزیجات مختلف یافت می شود (۱۱). این ترکیب در میان مهم ترین

آنتی اکسیدان های لازم برای بدن انسان ها قرار می گیرد. مطالعات نشان می دهند که کوئرستین در ترکیب با سایر داروها ممکن است موجب افزایش اثرات آنتی پرولیفراتیو و آپوپتوتیک آنها شده و با جلوگیری از ترشح فاکتورهای پیش التهابی همچون فاکتور نکروز توموری (TNF) و اینترلوکین ۱ بتا از مونوسیت ها موجب کاهش التهاب گردد. مطالعات در باره این عامل نشان داده است که اثرات ضد سرطانی کوئرستین به توانایی آن در کاهش تکثیر، القاء آپتوز، ایجاد توقف چرخه سلولی و مهار فرآیندهای میتوز با تعدیل سیکلین ها، مسیرهای مولکولی پرو آپوتوتیک، PI3K/Akt و پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) وابسته است (۱۲). دیگر مطالعات نشان داده اند که کوئرستین مسیر سیگنالینگ JAK-STAT را مهار میکند که می تواند در اثر گذاری آنتی پرولیفراتیو آن دخیل باشد (۱۳). علاوه بر این مطالعات نشان داده اند که کوئرستین می تواند با کاهش سطح بیان پروتئین های مرتبط با مقاومت چند دارویی و ضد آپوپتوتیک منجر به افزایش اثر گذاری داروها شوند (۱۴). تاکنون اثرات سینرژیک ترکیب کوئرستین با داروهای مختلف ضد سرطان در رده های مختلف سلولهای سرطانی انسان همچون MCF-7 (15)، SMMC-7721 (16)، PMC42 (17) اثبات گردیده است. بنابراین مسیر اثر گذاری این فلاونوئید متفاوت از داروهای مهار کننده تیزوزین کیناز است. میکروانکپسولیشن یا تولید ریزپوشینه ها روشی در حال ظهور برای ایجاد نانو حامل های دارو است که راه حل های مناسبی را برای مشکلات در زمینه دارودرمانی ایجاد نموده است (۱۸، ۱۹). امروزه تعداد زیادی از نانوحامل ها برای انتقال مولکولهای درمانی به کار می روند. کیتوزان یک آمینوپلی ساکارید خطی و زیست تجزیه پذیر است که موجب افزایش پایداری ترکیبات شیمیایی و زیست فعال می شود. کیتوزان و انواع ساختارهای شیمیایی آن همچون کربوکسی متیل کیتوزان به

کشت سلول

سلولهای ۵۶۲ BCR-ABL مثبت (Bcr-Abl⁺ CML) مقاوم به ایماتینیب از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در شرایط استاندارد در محیط کشت RPMI1640 (Invitrogen) حاوی ۱۰ سرم جنین گاوی (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) mL/units، ۱۰۰ استریپتومايسين سولفات نگهداری شده و در ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند.

بررسی القای آپوپتوزیس در سلولهای K562

سمیت سلولی کوئرستین در فرم طبیعی و در فرم انکپسوله شده با کیتوزان به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر به روش استاندارد MTT تعیین گردید. در ابتدا تعداد ۸۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ چاهکی کشت گردیدند و بلافاصله تیمارهای کوئرستین خالص یا انکپسوله شده به پلیت اضافه گردید. به منظور مقایسه اثر کپسوله سازی، گروههای مطالعه شامل گروه کیتوزان خالص، گروه کوئرستین خالص و گروه نانوانکپسوله شده با کیتوزان در سه تکرار جداگانه به سلولها اضافه گردید و پس از مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان زنده مانده سلولی و ایجاد رنگ بنفش بررسی شد.

بررسی آپوپتوزیس

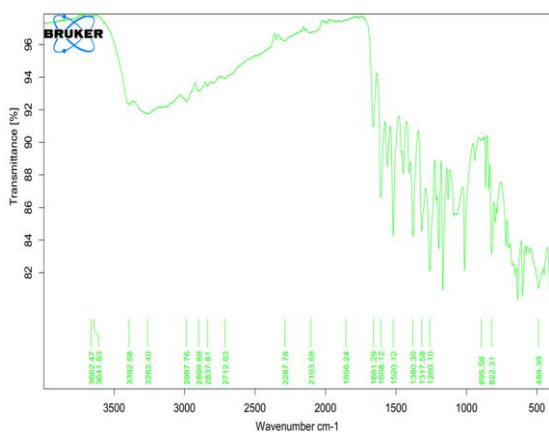
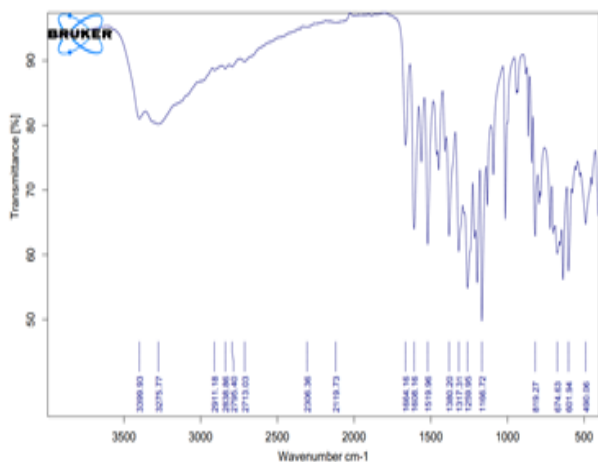
برای اثبات وقوع آپوپتوزیس در سلولهای K562 در اثر تیمار با غلظت‌های IC₅₀ نانوپارتیکل‌های حاوی کوئرستین خالص و کوئرستین کپسوله و بلانک از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد. سوسپانسیون سلولی حاوی تعداد ۲×۱۰^۵ سلول به پلیت ۹ خانه ای منتقل شدند و محیط کشت همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در هر چاهک تا حجم نهایی ۲ میلی لیتر اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی سلولها با محیط کشت تازه تعویض گردید. بعد از ۱۶

عنوان نانوحامل های دارویی شناخته می‌شوند (۱۸، ۱۹). این مطالعه بر آن بوده است تا اثر کوئرستین انکپسوله شده با نانوذرات کیتوزان را بر سمیت سلولی، آپوپتوزیس و رشد رده سلولی K562 (سرطان سلول‌های میلوییدی خون انسان) بررسی نماید.

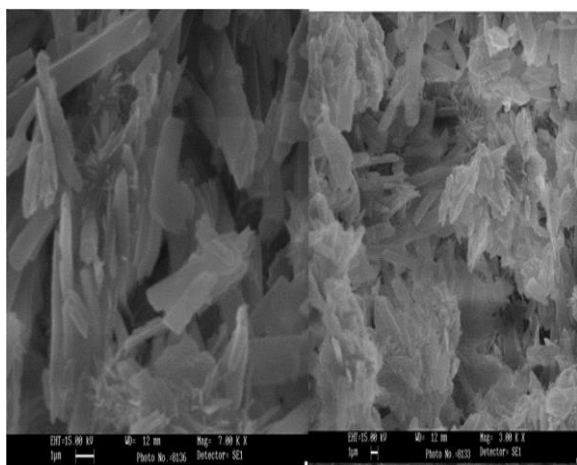
مواد و روش کار

تهیه نانوذرات کیتوزان حاوی کوئرستین

نانو ذرات با توجه به مطالعه قبلی و به روش ionic gelation آماده شدند (20). ابتدا مقدار یک گرم کیتوزان (Sigma) با به طور کامل در ۵۰ میلی لیتر استیک اسید ۱٪ حل شده و در دمای ۲۵ درجه به مدت ۵ ساعت همزده شد. سپس به صورت جداگانه ۰٫۵ گرم از کوئرستین (Sigma) و ایماتینیب مسیلات (Merck) به محلول کیتوزان اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه مخلوط شد. سپس ۰٫۲ گرم تری پلی فسفات سدیم در ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و به محلولهای قبلی اضافه گردید. پس از ۶۰ دقیقه مخلوط شدن در دمای اتاق در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی تخلیه می‌شد. سپس نانوذرات کیتوزان حاوی کوئرستین (Cs-Q) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک می‌گردیدند. تعیین ویژگی های نانوپارتیکل های تهیه شده با میکروسکوپ SEM و با روش FTIR توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز (Shimadzu ، کیوتو ، ژاپن) تعیین می‌گردید. بار سطحی (پتانسیل زتا) ، توزیع اندازه ، شاخص پراکندگی (PDI) و اندازه متوسط نانوذره های کیتوزان بارگیری شده توسط دستگاه Nano-ZS ZEN (Malvern Instruments Ltd, England) 3600، با استفاده از تکنیک پراکندگی نور پویا (DLS) ارزیابی شد. تعیین loading efficiency نانوذره‌ها توسط طیف سنجی UV-Vis (در λ_{max} 370 نانومتر) تعیین گردید.



نگاره ۱: نمودار FTIR از کوئرستین در حالت خالص (بالا) و کپسوله شده با نانوذرات کیتوزان (پایین).



نگاره ۲: تصویر میکروسکوپ SEM از نانوذرات کوئرستین (بالا) کپسوله شده با کیتوزان.

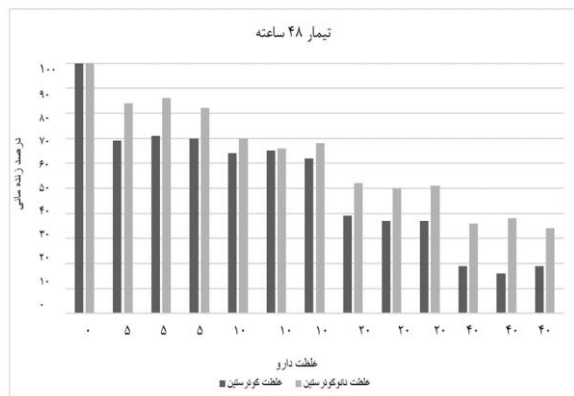
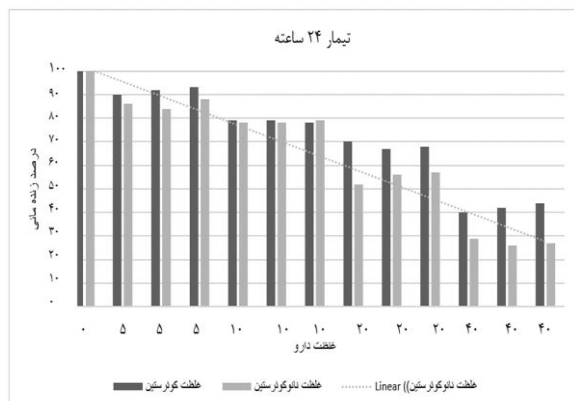
ساعت تیمار با غلظت IC_{50} داروها آنها سلولها در لوله های فالكون مجزا جمع آوری شدند و سانتریفیوژ گردیدند. سپس ۰,۵ میلی لیتر رنگ DAPI به غلظت ۱ میکرولیتر در میلی لیتر به آنها اضافه شده و سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت خارج شد و مجدداً ۰,۵ میلی لیتر رنگ DAPI به نمونه ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ مجدد، محلول رنگ DAPI خارج شد و بافر PBS اضافه گردید و سوسپانسیون سلولی با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده گردیدند.

بررسی آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار Graphpad Prism نسخه ۶ استفاده شد. با توجه به کمی بودن متغیرها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف جهت بررسی نرمال بودن توزیع فراوانی داده ها استفاده شد. همگنی واریانسها با آزمون Levene انجام گرفت ($p < 0.05$). نتایج آزمایشگاهی به صورت انحراف معیار \pm میانگین (در سه تکرار) گزارش گردید. از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی داری ۰/۰۵ و آزمون تعقیبی Tukey جهت بررسی اختلاف بین اثر اشکال مختلف دارو بر زنده ماندن سلول های سرطانی استفاده شد.

نتایج

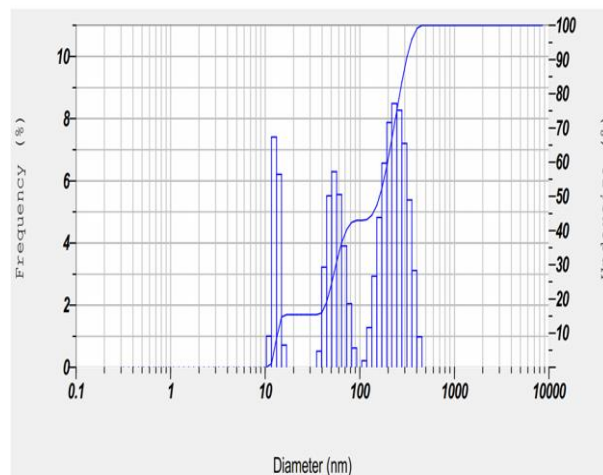
بررسی داده های به دست آمده از بررسی ویژگی های فیزیکی نشان داد که سایز کوئرستین کپسوله شده با نانوذرات کیتوزان از ۱۰ نانومتر تا ۴۱۲ نانومتر و به طور میانگین برابر با ۱۵۶,۳ نانومتر است و همچنین میزان PI در این نانوپارتیکل ها برابر با ۰,۴۶۲ است. پتانسیل زتای ذرات نانوداروی کوئرستین برابر با ۱۰ mV + بود. شکل شماره ۱ نتایج بررسی FTIR و شکل شماره ۲ و ۳ نتایج بررسی ویژگی ها در کوئرستین کپسوله شده با کیتوزان را نشان می دهد.



نگاره ۴: اثر تیمار دارو و نانوداروها در سلولهای K562 مقاوم به ایماپتیب. سلولهای K562 با نانوداروی کوئرستین و کوئرستین خالص در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر لیتری به مدت ۲۴ (بالا) و ۴۸ ساعت (پایین) تیمار گردیدند. آپوپتوزیس با استفاده از رنگ آمیزی Annexin-V and PI سنجیده شد. داده ها نشانگر ۳ آزمون مستقل است.

بررسی آپوپتوزیس

رنگ آمیزی DAPI به منظور تایید تاثیرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیر غلظت‌های IC50 کوئرستین کپسوله شده با کیتوزان و کوئرستین خالص انجام گرفت. مطالعه میکروسکوپی به شکلی واضح بیانگر کاهش تعداد سلولها و ایجاد تغییرات مورفولوژیک همچون چروکیدگی، گرد شدن، قطعه قطعه شدن کروماتین، برآمدن غشا و همچنین پررنگ شدن رنگ آبی فلورسنت و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در سلولهای سرطانی K562 تیمار شده با داروی کپسوله شده در مقایسه با سلولهای کنترل بود که به ترتیب تأیید کننده مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ سلولی به صورت وابسته به دوز هستند (شکل ۵).



نگاره ۳: نمودار پراکنندگی سایز نانوذرات کیتوزان-کوئرستین.

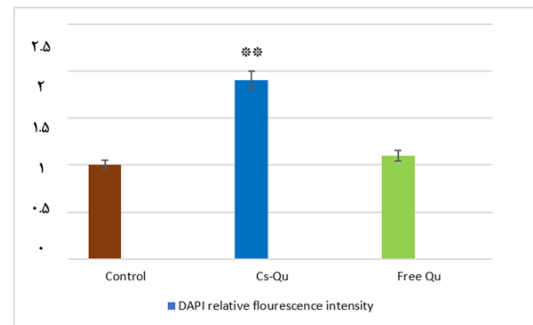
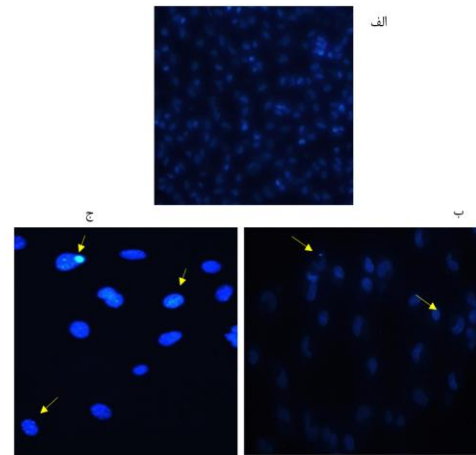
نتایج MTT

بررسی نتایج MTT به منظور بررسی میزان زنده مانی سلولهای K562 نشان داد که میزان زنده مانی سلولهای سرطانی در اثر تیمار ۴۸ ساعته و ۲۴ ساعته با کوئرستین خالص و کوئرستین کپسوله شده با کیتوزان به طور معنی داری در همه گروههای تست نسبت به کنترل کمتر بوده است ($p < 0.05$). علاوه بر این درصد زنده مانی در گروه کپسوله شده کوئرستین نسبت به شکل خالص دارو کمتر بوده است ($p < 0.05$). (شکل ۴)

تعیین میزان اختصاصی IC50 داروها

پس از محاسبه درصد اثر داروی کوئرستین بر حسب جذب حاصل از آزمون MTT برای هر غلظت از این دارو، IC50 این دارو تعیین گردید. میزان IC50 در طی ۲۴ ساعت در معرض قرار گیری سلولها با دارو برای داروی خالص کوئرستین ۲۳،۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در طی ۴۸ ساعت تیمار سلولها با دارو به ۱۹،۷۱ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت. مبنایست ذکر شود که میزان IC50 در طی ۲۴ ساعت در معرض قرار گیری سلولها با دارو برای داروی نانوکوئرستین ۱۶،۷۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در تیمار ۴۸ ساعته به ۱۰،۳۶ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت.

بررسی اثر دارورسانی به شیوه نانو در کاهش عوارض جانبی ایما تینیب مسیلات میپرداخت نانوذرات پلی (لاکتید-گلیکولید) دارای بار ایما تینیب مسیلات ساخته شد که می توانست دارو را به طور پایدار آزاد کند. سپس اثر آن با استفاده از روش های ضد سرطان *in vitro* و سمیت قلبی داخل بدن مطالعه شد. روش MTT نشان داد که نانوداروها در مقایسه با غلظت معادل ایما تینیب مسیلات خالص برای سلولهای سرطانی MCF-7 سمیت سلولی بیشتری دارند. موشهای صحرایی ویستار که به صورت خوراکی با ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانودارو به مدت ۲۸ روز درمان می شدند، سمیت قلبی یا تغییرات مرتبط را نشان ندادند. در حالی که افزایش آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و قلیایی فسفاتاز و کاهش میزان گلبول سفید، گلبول قرمز و هموگلوبین در حیواناتی که با داروی خالص درمان میشدند مشاهده شد. در حالی که بخشهای بافت شناسی قلب حیواناتی که نانودارو دریافت کرده بودند هیچ گونه علائم قلبی سمی قابل توجهی را نشان ندادند، از دست دادن معماری طبیعی و افزایش واکوئلیزاسیون سیتوپلاسمی در بخشهای قلب حیوانات که با مسیلات ایما تینیب خالص درمان شده بودند مشاهده شد. بر اساس این نتایج، نتیجه گرفته شد که نانو کپسوله سازی ایما تینیب مسیلات، اثر آن را در برابر سلول های سرطانی، تقریباً بدون سمیت قلبی افزایش می دهد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز داده های تست MTT نشان داد که کپسوله سازی داروی کوئرستین موجب افزایش تاثیر گذاری آن نسبت به حالت خالص دارو میگردد. شکر زاده و همکاران در مطالعه مشابه دیگری به بررسی سمیت سلولی کمپلکس نانو ذرات داروی Docetaxel همراه با کیتوزان با استفاده از کشت سلول های سرطانی کبد انسانی پرداختند. نتایج حاصل از تست MTT، مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول های سرطانی HepG2 را توسط نانو دارو نسبت به داروی اصلی نشان می داد. غلظت های IC₅₀ که با آنالیز آماری به دست آمد برای نانو دارو و داروی اصلی در طی زمان های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل ۱/۰۲±۰/۶۸، ۰/۳۹±۰/۸۶، ۰/۲۰±۰/۹۳ و ۱/۰۱±۰/۳۹، ۰/۸۷±۰/۹۷، ۰/۷۶±۰/۹۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. شواهد آنها حاکی از سمیت سلولی بیشتر نانو ذرات داروی



نگاره ۵: الف، ب و ج تصاویر رنگ آمیزی DAPI سلولهای K562 پس از تیمار با کوئرستین و کوئرستین انکپسوله شده با کیتوزان در برابر کنترل. فلشهای زرد رنگ در شکل ب و ج هسته های تکه تکه شده سلول را نشان میدهند. نمودار میزان شدت نور فلورسنس را در سلولهای رنگ آمیزی شده با رنگ DAPI نشان میدهد. **: $p < 0.01$

بحث

افزایش مقاومت نسبت به داروهای شیمی درمانی در بیماری های لوسمیک نشان داده است که روش های درمانی دارویی برای سرطان چندان موثر نبوده و از طرفی عوارض جانبی شدیدی دارند بنابراین توسعه روش های درمانی جدید می تواند به عنوان راهکاری برای درمان این بیماری ها در نظر گرفته شود (۱۹). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که داروی کوئرستین دارای توانایی القای آپوپتوزیس در سلولهای K562 مقاوم به ایما تینیب است. همچنین فرم نانوداروی کپسوله شده با کیتوزان در مقایسه با فرم خالص کوئرستین تاثیر گذاری بیشتری داشت که از نظر آماری معنی دار بود. علاوه بر این اثر سینرژیک ترکیب نانوداروها در آنالیز آماری اثبات گردید. در مطالعه ای که به

درجه سانتی گراد، از آنزیم‌ها محافظت کرده و سبب اتصال مؤثر نانو دارو به سطح سلول‌های سرطان پستان انسانی Bcap37 می‌شوند (۲۶).

نتیجه گیری

داده های حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد فرم نانوداروی کوئرستین دارای سمیت سلولی بیشتری نسبت به داروی کوئرستین در فرم خالص بوده است. از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهند که صورت کمپلکس نانودارو به صورت وابسته به دوز دارای اثر القای آپوپتوز در سلولهای لوسمی میلوئیدی مزمن انسانی مقاوم به ایمانتینیب بوده است. از این رو کمپلکس کیتوزان و کوئرستین میتواند در زمینه درمان لوسمی میلوئیدی مزمن مقاوم به درمان مورد تحقیقات بیشتری قرار گیرد.

فهرست منابع

1. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic myeloid leukemia: a model disease of the past, present and future. *Cells*. 2021;10(1):117.
2. Hsieh Y-C, Kirschner K, Copland M. Improving outcomes in chronic myeloid leukemia through harnessing the immunological landscape. *Leukemia*. 2021;35(5):1229-42.
3. Cortes J, Lang F. Third-line therapy for chronic myeloid leukemia: current status and future directions. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):1-18.
4. Adnan-Awad S, Kim D, Hohtari H, Javarappa KK, Brandstoeetter T, Mayer I, et al. Characterization of p190-Bcr-Abl chronic myeloid leukemia reveals specific signaling pathways and therapeutic targets. *Leukemia*. 2021;35(7):1964-75.
5. Zhang L, Meng L, Liu B, Zhang Y, Zhu H, Cui J, et al. Flumatinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia: A Phase III, Randomized, Open-label, Multi-center FESNd Study. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(1):70-7.

DTX نسبت به داروی آزاد بر روی سلول‌های سرطانی کبد بوده است (۲۲). نتایج تحقیق آنها همچون نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که فرم نانودارو میتواند به طور معنی داری منجر به افزایش سمیت دارو نسبت به حالت آزاد دارو شود. خاکریزی و همکاران در تحقیقی به مطالعه خاصیت ضد سرطانی نانو داروی مگنتیک کیتوسان-هیدروکسی-اوره بر رده سلولی Hela پرداختند. نتایج آنها نشان داد که افزایش غلظت نانو دارو هیدروکسی اوره به صورت وابسته به دوز، توان زیستی سلول‌ها را کاهش داد. به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین، نانو دارو به طور معنی داری سبب افزایش القاء آپوپتوز به میزان ۲/۴۸ برابر در سلول‌های Hela تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شد (۲۳). این یافته ها در زمینه تاثیر گذاری نانوذرات کیتوزان در دارو رسانی به سلولهای سرطانی است. هر دو مطالعه نشان دادند که فرم نانوی داروهای کوئرستین و هیدروکسی اوره در حالت وابسته به دوز به طور معنی داری موجب کاهش توان زیستی سلولها شدند. در یک تحقیق موافق با داده های به دست آمده در مطالعه حاضر که توسط Feng و همکاران انجام شد، توانایی کمپلکس پلی الکترولیتی کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوسان حساس به pH جهت انتقال داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید به صورت خوراکی بررسی گردید. نتایج بررسی آنان نشان داد، تجویز داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید توسط نانوحامل مذکور سبب افزایش پایداری دارو در خون می‌شود. همچنین بر اساس بررسی‌های بیویسی صورت گرفته بر بافت موش صحرايي تحت درمان با نانو دارو سنتزی نشان داد، استفاده از این نانو حامل سبب کاهش چشم‌گیر سمیت دارویی بر بافت کلیه و قلب شده است (۲۴). در یک تحقیق، Hou و همکاران نشان دادند که نانو ذره حامل فولیک اسید و متوکسی پلی اتیلن گلیکول کونژوگه شده با کیتوزان نسبت به نانو ذرات ساده کیتوزان به میزان بیشتری توسط سلول‌های توموری جذب شد و سمیت میتومايسين C را در آنها افزایش نشان داد و علاوه براین مدت ماندگاری نانو دارو در خون نیز طولانی تر گردید (۲۵). در مطالعه ای دیگر که توسط Cao و همکارانش انجام شد، داده‌ها نشان دادند که نانوذرات کیتوزان در دمای ۳۷

6. Garcia-Gutiérrez V, Luna A, Alonso-Dominguez JM, Estrada N, Boque C, Xicoy B, et al. Safety and efficacy of asciminib treatment in chronic myeloid leukemia patients in real-life clinical practice. *Blood Cancer Journal*. 2021;11(2):1-4.
7. Erdenetsogt U, Nadmid S, Paulus C, Chanagsuren G, Dolgor E, Gotov C, et al. Bioactive flavonoids from plant extract of *Pyrethrum pulchrum* and its acute toxicity. *Natural Product Research*. 2021;35(24):5960-3.
8. Mottaghi S, Abbaszadeh H. The anticarcinogenic and anticancer effects of the dietary flavonoid, morin: Current status, challenges, and future perspectives. *Phytotherapy Research*. 2021.
9. Zuo S, Sun L, Wang Y, Chen B, Wang J, Ge X, et al. Establishment of a novel mesenchymal stem cell-based regimen for chronic myeloid leukemia differentiation therapy. *Cell death & disease*. 2021;12(2):1-15.
10. Mutlu Altundağ E, Yılmaz AM, Serdar BS, Jannuzzi AT, Koçtürk S, Yalçın AS. Synergistic induction of apoptosis by quercetin and curcumin in chronic myeloid leukemia (K562) cells: II. Signal transduction pathways involved. *Nutrition and Cancer*. 2021;73(4):703-12.
11. Mohammed HA, Sulaiman GM, Anwar SS, Tawfeeq AT, Khan RA, Mohammed SA, et al. Quercetin against MCF7 and CAL51 breast cancer cell lines: apoptosis, gene expression and cytotoxicity of nano-quercetin. *Nanomedicine*. 2021;16(22):1937-61.
12. Ghafouri-Fard S, Shabestari FA, Vaezi S, Abak A, Shoorei H, Karimi A, et al. Emerging impact of quercetin in the treatment of prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;138:111548.
13. Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, Verma AK, Aloliqi A, Allemailem KS, et al. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules*. 2021;26(5):1315.
14. Molani Gol R, Kheirouri S. The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: A Systematic Review. *Nutrition and Cancer*. 2021:1-18.
15. Mawalizadeh F, Mohammadzadeh G, Khedri A, Rashidi M. Quercetin potentiates the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Molecular Biology Reports*. 2021;48(12):7733-42.
16. Guo D, Wu C, Li J, Guo A, Li Q, Jiang H, et al. Synergistic effect of functionalized nickel nanoparticles and quercetin on inhibition of the SMMC-7721 cells proliferation. *Nanoscale research letters*. 2009;4(12):1395-402.
17. Ackland ML, Van De Waarsenburg S, Jones R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In vivo*. 2005;19(1):69-76.
18. Cárdenas-Triviño G, Monsalve-Rozas S, Vergara-González L. Microencapsulation of Erlotinib and Nanomagnetite Supported in Chitosan as Potential Oncologic Carrier. *Polymers*. 2021;13(8):1244.
19. Suryavanshi VS, Maharana T, Jagtap PK. Microencapsulation of Cassia fistula Flower Extract with Chitosan and its Antibacterial Studies. *Current Drug Delivery*. 2021.
20. Santos MA, Machado MT. Coated alginate-chitosan particles to improve the stability of probiotic yeast. *International Journal of Food Science & Technology*. 2021;56(5):2122-31.
21. Marslin G, Revina AM, Khandelwal VKM, Balakumar K, Prakash J, Franklin G, et al. Delivery as nanoparticles reduces imatinib mesylate-induced cardiotoxicity and improves anticancer activity. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:3163.

22. محمد ش, پدرام ان, محمود ا, امیر ش, زاوش ز. بررسی

سمیت سلولی نانو ذرات داروی Docetaxel با استفاده از

کشت سلول های سرطانی HepG2.

23. Khakrizi E, BikhofTorbati M, Shaabanzadeh M. The Study of Anticancer Effect of Magnetic Chitosan-Hydroxyurea Nanodrug on HeLa Cell line: A Laboratory Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2018;17(8):715-30.
24. Feng C, Wang Z, Jiang C, Kong M, Zhou X, Li Y, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: in vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2013;457(1):158-67.
25. Hou Z, Zhan C, Jiang Q, Hu Q, Li L, Chang D, et al. Both FA-and mPEG-conjugated chitosan nanoparticles for targeted cellular uptake and enhanced tumor tissue distribution. *Nanoscale research letters*. 2011;6(1):1-11.
26. Cao X, Chen C, Yu H, Wang P. Horseradish peroxidase-encapsulated chitosan nanoparticles for enzyme-prodrug cancer therapy. *Biotechnology letters*. 2015;37(1):81-8.

