

انتقال هدفمند داروی اسکولومول به سلول‌های سرطانی روده بزرگ با سامانه حمل دارویی هدفمند سیلیکا میان تخلخل مغناطیسی

مجتبی تارین^۱، مریم بابایی^۲، حسین عشقی^۳، مریم مقدم‌متین^۴ و امیر شکوه سلجوقی^{۵*}

۱. دانشجوی دکترای گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. دکترای شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استاد شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴. استاد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۵. دانشیار شیمی معدنی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۲ بازنگری: تیر ۱۴۰۲ پذیرش: تیر ۱۴۰۲



10.30495/JACR.2023.1985186.2123

چکیده

در این پژوهش، انتقال هدفمند داروی پادسرطانی اسکولومول به سلول‌های سرطانی روده بزرگ از راه گسترش نانوذره‌های میان(مزو)تخلخل سیلیکای مغناطیسی (MMSNs) و پیوند عامل‌های متفاوت مانند واپایش‌گرهای دریچه‌ای طلا، بسیار پلی‌اتیلن-گلیکول (PEG) دوامی و آپتامر مربوط به مولکول‌های چسبنده سطح سلول‌های اپی‌تلیالی (EpCAM) به سطح نانوحامل صورت گرفت. پس از سنتز سامانه حمل دارویی، ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی آن ارزیابی شدند. همچنین، ویژگی پادسرطانی داروی اسکولومول و سامانه حمل دارویی با لیگاند ویژه آپتامر EpCAM و بدون آن در شرایط برون‌تنی مقایسه شد. بررسی تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذره‌های MMSNs کروی با قطر حدود ۱۹ نانومتر بودند. اسکولومول با موفقیت در حفره‌های باز این نانوذره‌ها بارگذاری شد و درصد بارگذاری حدود ۳۹ درصد تخمین زده شد. همچنین، پس از فرایند درپوش‌گذاری و مسدوسازی حفره‌ها، نانوذره‌های Au-ELC-MMSN-NH₂ در طی ۹۶ ساعت، رهایش پیوسته و وابسته به pH نشان دادند. نتیجه‌های MTT نشان داد که این نانوذره‌ها سمیت چشمگیری را در برابر سلول‌های سرطانی روده بزرگ و بیان‌کننده گیرنده EpCAM در مقایسه با سلول‌های CHO اعمال می‌کنند. با توجه به نتیجه‌های امیدوارکننده APT-PEG-Au-ELC-MMSN-NH₂ سامانه تهیه‌شده می‌تواند به‌عنوان جایگزین درمانی اسکولومول برای سرطان روده بزرگ استفاده شود. هرچند، پیش از استفاده گسترده آن در حوزه بالینی، به آزمایش‌های بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: سرطان روده بزرگ، اسکولومول، نانوذره‌های میان(مزو)تخلخل سیلیکا، دارورسانی هدفمند، واپایش رهایش دارو.

بهبود نیمه عمر آن‌ها، تجمع هدفمند آن‌ها در ریزمحیط توموری، کاهش توزیع غیرویه‌های و عوارض نامطلوب عامل‌های درمانی همراه است [۱۱]. نانوذره‌های میان (مزو)تخلخل سیلیکا (MSNs^۵) یکی از نانوحامل‌های امیدوارکننده در زمینه دارورسانی هستند که به دلیل تولید آسان در مقیاس گسترده، تخلخل زیاد و قابل تغییر، مساحت سطح مناسب و حلالیت در محلول‌های آبی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران در زمینه درمان سرطان قرار گرفتند [۱۲] و [۱۳]. سامانه‌های MSNs قابلیت طراحی بسیار متنوعی دارند که به طوری که برای بهبود نتیجه‌های درمانی و اصلاح دارورسانی، سه رویکرد متفاوت همراه‌سازی سامانه‌های تصویربرداری به این نانوذره‌ها برای ردیابی فرایند درمان [۱۴ و ۱۵]، به کارگیری واپایش-گرهای درجه‌های حساس به محرک‌های داخلی و خارجی برای ره‌ایش هوشمندانه عامل‌های درمانی [۱۶ و ۱۷] و هدف‌گیری فعال برای شناسایی سلول‌های سرطانی [۱۸ و ۱۹]، گزارش شده‌اند. نانوسترهای ترانوستیک^۶ با روش‌های غیرتهاجمی مانند تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI^۷) همراه شده و مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. برای مثال، هی^۸ و همکارانش گادالونیم اکسید (Gd₂O₃) را در مرکز نانوذره‌های سیلیکا قرار دادند و برای بررسی ره‌ایش داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین^۹ (DOX) و تجمع نانوذره‌ها در ریزمحیط توموری، روش MRI را به کار گرفتند. نتیجه‌های تصویربرداری از خرگوش‌های حامل تومور نشان داد که مقدار سیگنال ساطع شده در زمان آسایش T1 پس از یک هفته ادامه دارد. از این رو، تزریق‌های نانوذره‌ها با فاصله یک هفته‌ای انجام شد [۲۰]. سوخت‌وساز سلول‌های سرطانی موجب تولید مقدار زیادی لاکتات، پروتون‌های اضافی و کربن دی‌اکسید در سلول‌های سرطانی شده که در مجموع منجر به اسیدی شدن (pH = ۶٫۸ - ۷٫۲) ریزمحیط توموری می‌شود [۲۱]. برپایه مطالعه‌های صورت گرفته، اسیدی شدن ریزمحیط توموری یکی از عامل‌های موثر در مهاجرت

السلکومول^۱ یک عامل درمانی با قابلیت هدف‌گیری اندامک میتوکنندری بوده و اثرات پادسرطانی آن در طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها در محیط برون‌تنی و درون‌تنی به اثبات رسیده است [۱ و ۲]. همچنین، با چندین کارآزمایی بالینی (جدول ۱) سمیت سلولی السلکومول در برابر سلول‌های سرطانی بررسی شد [۳ و ۴] و نتیجه‌های کلی نشان داد که السلکومول ایمنی مناسبی را به تنهایی یا در ترکیب با سایر عامل‌های درمانی در بدن بیماران ایجاد می‌کند. برای مثال، نتیجه‌های به دست آمده از کارآزمایی بالینی در مرحله سوم برای بیماران ملانوما با سطح پایین لاکتات‌دهیدرژناز (LDH) نشان داد که این بیماران به درمان ترکیبی السلکومول-پاکلیتاکسل پاسخ امیدوارکننده‌ای دادند [۵]. این نتیجه‌ها نیز از فرضیه ارتباط بین حساسیت درمانی سرطان به السلکومول و سوخت‌وساز سلولی حمایت می‌کند. به طور کلی السلکومول با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^۲) در درون سلول، القای تنش اکسند و تغییر الگوهای بیانی در پاسخ به آن موجب بروز اثرهای پادسرطانی مطلوب می‌شود [۶ تا ۹]. السلکومول نیز مشابه با سایر داروهای شیمی‌درمانی متداول، سمیت مشابهی را در برابر سلول‌های سالم و طبیعی ایجاد می‌کند. از این رو، موجب محدودیت در استفاده گسترده آن در حوزه درمانی شده است. در این زمینه، مودیکا-ناپولی تانو^۳ و همکارانش نشان دادند که السلکومول کارکرد راکیزه‌های^۴ سلول‌های سالم را مختل می‌کند، به طوری که تیمار با مقادیر بالاتر از ۴۰ میکرومولار از السلکومول، موجب تولید ROS و کاهش چشمگیر پتانسیل غشای راکیزه‌ای در سلول‌های طبیعی می‌شود [۲۴]. به همین دلیل، گسترش و به-کارگیری روش‌های درمانی جدید برای بهینه‌سازی رویکردهای درمانی پادسرطان مورد نیاز است. یکی از روش‌های درمانی امیدوارکننده استفاده از سامانه‌های حمل دارویی مبتنی بر فناوری نانو است که با مزایایی مانند افزایش حلالیت داروهای شیمی‌درمانی،

1. Elesclomol(N-malonyl-bis(N'-methyl-N' thiobenzoylhydrazide))
 3. Modica-Napolitano
 5. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs)
 7. Magnetic resonance imaging (MRI)
 9. Doxorubicin (DOX)

2. Reactive oxygen species
 4. Mitochondrial
 6. Theranostics
 8. He

بخش تجربی

مواد مورد استفاده

آمونیم هیدروکسید، N-متیل بنزوتیوهیدرازید^۴، تترامتیل آمونیم هیدروکسید (TMAH^۵)، هیدرازید، مالونیل کلرید^۶ (CH₂(COCl)₂)، تتراتیل اورتوسیلیکات (TEOS)^۷، (۳-آمینوپروپیل) تری اتوکسی سیلان (APTES^۸)، ستیل تری متیل-آمونیم برمید (CTAB^۹)، تیوگلیکولیک اسید، سدیم هیدروکسید، متیل هیدرازین و SPION از شرکت سیگما خریداری شدند. آپتامر تک رشته‌ای از نوع DNA با توالی 5'-amineCACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCCA CGTTGTCATGGGGGGTTGGCCTG-3'-thiol از شرکت میکروسینت (سوئیس) خریداری شد. بسیار دو عاملی PEG (SH-PEG-COOH) از شرکت JenKem (آمریکا) تهیه شد. آنزیم تریپسین-EDTA، رنگ دی‌متیل تیازولیل دی فیل تترازولیم برمید (MTT^{۱۱})، سرم جنینی گاو (FBS^{۱۱})، محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) و پنی سیلین-استرپتومایسین از شرکت گیکو اسکاتلند تهیه شد.

تهیه نانوذره‌های میان (مزو)تخلخل مغناطیسی (MMSNs)

نانوذره‌های متخلخل مغناطیسی SPION@MSN به روش استوبر^{۱۲} ساخته شدند. ۲۰۰ میلی گرم از نانوذره‌های SPION^{۱۳} در ۸۰ میلی لیتر از محلول ۸۰ درصد اتانول و آب پراکنده شد. سپس، یک میلی لیتر از ترکیب TEOS تحت گاز نیتروژن در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به صورت قطره قطره به مخلوط واکنش افزوده و مخلوط ۲ ساعت هم‌زده شد. در مرحله

سلول‌های سرطانی، متاستاز، مقاومت در برابر درمان و مهار پاسخ ایمنی است [۲۲]. از این رو، واپایش رهایش داروی بارگذاری شده در نانوذره‌های سیلیکا با درپوش‌های حساس به pH مانند نانوذره‌های طلا برای یک رویکرد نوین، مورد توجه پژوهشگران بسیاری در حوزه درمان سرطان قرار گرفته است [۲۳ تا ۲۵]. انواع متفاوتی از لیگاندها مانند پیپتیدها، پادتن‌ها، پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها، مولکول‌های کوچک و آپتامر برای هدف‌گیری فعال گسترش یافته‌اند [۲۶]. آپتامرها توالی کوتاه و تک‌رشته‌ای از نوکلئوتیدها هستند و می‌توانند به یک گیرنده هدف با میل ترکیبی بالا متصل شوند [۲۷]. آپتامرها ابزاری مناسب برای تحویل هدفمند و ویژه عوامل درمانی به سلول‌های مورد نظر هستند [۲۸]. EpCAM^۱ یکی از گیرنده‌های بیش‌بیان شده در سطح برخی از سلول‌های سرطانی و سلول‌های بنیادی سرطانی است و در پیام‌رسانی و تحریک فرایندهای مهم سلولی مانند رشد، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها نقش دارد. از این رو، می‌تواند برای دارورسانی هدفمند به کار گرفته شود [۲۹].

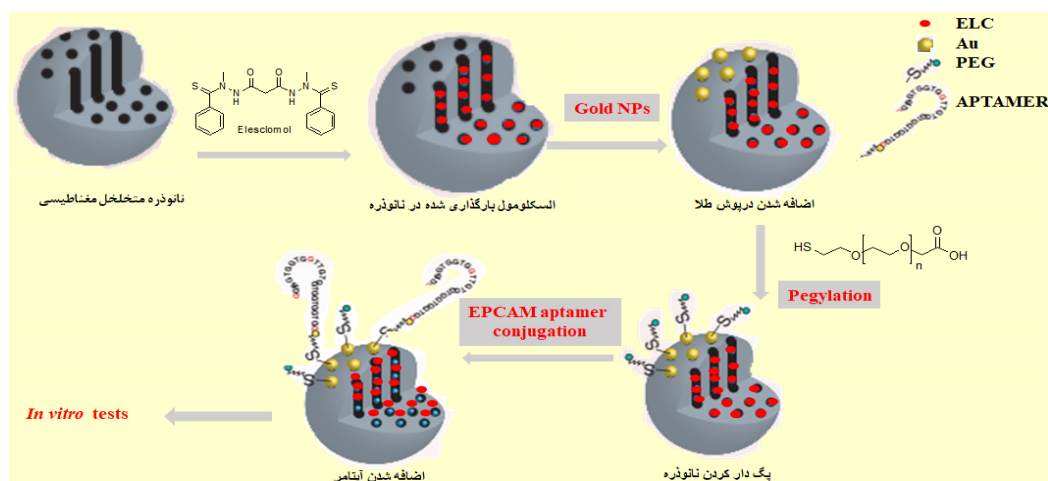
در این پژوهش، برای نخستین بار از سامانه حمل دارویی MSNs با هدف تحویل ویژه داروی اسکولومول به سلول‌های سرطانی روده بزرگ استفاده شد. بدین منظور ابتدا، نانوذره‌های مغناطیسی SPIONs در مرکز سامانه حمل دارویی MSNs قرار گرفت (MMSNs^۲) و یک نانوحامل ترانوستیک سنتز شد. سپس داروی شیمی‌درمانی اسکولومول در حفره‌های MSNs بارگذاری شد. برای واپایش رهایش دارو در مجاور سلول‌های سرطانی روده بزرگ، از درپوش‌های طلای حساس به pH استفاده شد (Au-NPs@ELC). در گام پایانی، بسیار پلی اتیلن گلیکول (PEG^۳) و آپتامر EpCAM به ترتیب با هدف بهبود زیست‌سازگاری و شناسایی ویژه گیرنده‌های EpCAM، به ساختار یادشده افزوده و برای بررسی‌های برون تنی استفاده شد.

1. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)
3. Polyethylene glycol (PEG)
5. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH)
7. Tetraethyl orthosilicate (TEOS)
9. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
11. Fetal bovine serum (FBS)
12. Stöber method

2. Magnetic MSNs (MMSNs)
4. N-Benzylidenemethanamine
6. Malonyl chloride
8. (3-Aminopropyl) triethoxysilane
10. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
13. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)

پیوند گروه آمین برای ایجاد بارهای مثبت ($MMSN-NH_2$) ابتدا ۱۶ میلی‌گرم از نانوذره‌های $SPION@MSN$ به دست آمده از مرحله پیشین در ۱۶ میلی‌لیتر اتانول پراکنده و سپس، ۶۰ میکرولیتر APTES به آن افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت، نانوذره‌های آمین دار شده با دستگاه گریزانه در مدت ۲۰ دقیقه و با نیروی g ۱۰۰۰۰ جدا و سه بار با اتانول شسته شدند [۳۱].

بعد، نانوذره‌های تشکیل شده با دستگاه گریزانه (۶۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۱۵ دقیقه) جدا و در محلول حاوی 0.75 گرم CTAB در دو میلی‌لیتر NH_3 پراکنده شدند. پس از حدود ۳ ساعت، $SPION@MSN$ جمع‌آوری و در دمای $60^\circ C$ درجه سلسیوس در مدت ۵ ساعت خشک شد [۳۰].



شکل ۱ طرحواره کلی مراحل سنتز سامانه دارورسان هدفمند

جدول ۱ کارآزمایی‌های بالینی صورت گرفته در رابطه با داروی اسکولومول

منبع*	نتیجه‌ها	دارو یا داروهای مورد استفاده	وضعیت گزارش شده	مرحله	نوع سرطان
۲۶۷۳۲۴۳۷	اسکولومول ایمنی بسیار خوبی ایجاد کرد، ولی پاسخ بالینی مشاهده نشد.	اسکولومول	نامشخص	I	لوسمی حاد میلوئیدی
۱۷۲۵۵۲۸۱	سمیت اسکولومول مشابه پاکلیتاکسل بود و استفاده از این عامل ترکیبی برای بیماران قابل تحمل بود.	اسکولومول و پاکلیتاکسل	کامل	I	تومورهای سخت
۱۹۸۲۶۱۳۵	اثرات هم‌افزایی این دو عامل درمانی منجر به نتیجه‌های مطلوب درمانی شد و سمیت قابل قبولی نیز گزارش شد.	اسکولومول و پاکلیتاکسل	کامل	I/II	مالانوما
۲۳۴۰۱۴۴۷	ترکیب درمانی استفاده شده منجر به بقای معنادار بیماران بدون پیشرفت بیماری شد.	اسکولومول و پاکلیتاکسل	خاتمه طرح	III	مالانوما
۳۰۳۰۹۷۱	ترکیب درمانی استفاده شده توسط بیماران قابل تحمل بود، ولی پاسخ به درمان مناسب نبود.	اسکولومول و پاکلیتاکسل	کامل	II	سرطان تخمدان پیشرفته و سرطان صفاق
۱۶۷۸۴۰۲۹	اسکولومول موجب افزایش کارایی تاکسان از راه القای Hsp70 شد.	اسکولومول و تاکسان	کامل	II	سرطان بافت نرم

* کارآزمایی‌های مرتبط با اسکولومول با بررسی سامانه ClinicalTrials.gov انجام شد.

سنتز داروی اسکولومول

داروی اسکولومول در دو مرحله سنتز شد. نخستین مرحله ساخت N-متیل بنزوتیوهیدرازید و دومین مرحله واکنش حدواسط مرحله پیشین یعنی هیدرازید با مالونیل کلرید است تا اسکولومول به دست آمد. در مرحله اول، ۱۰ میلی مول اس-تیوگلیکولیک اسید در سود حل (۱/۸۵ گرم تیوگلیکولیک اسید در ۳۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید) و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخ هم‌زده شد. پس از آن متیل هیدرازین سرد (نگهداری شده در دمای یخچال) با حجمی مساوی (۳۰ میلی لیتر) به صورت قطره‌قطره افزوده شد. پس از اتمام واکنش، فاز آبی با دی کلرومتان و با کمک قیف جداکننده از فاز آلی جدا و چندین بار با سود ۰/۱ مولار شسته شد. سپس، ۲ میلی لیتر هپتان به آن افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در خلأ داخل خشکانه به N-متیل بنزوتیوهیدرازید تبدیل شد. در گام بعد، N-متیل بنزوتیوهیدرازید در حضور تری اتیلن آمین و اتیل استات خشک در حال هم‌زدن، افزوده و حل شد. سپس، با کاهش دما و افزودن مالونیل کلرید در دمای ۴ درجه سلسیوس به صورت قطره‌قطره، دوباره این مخلوط به مدت نیم ساعت هم‌زده شد. لایه آلی از لایه آبی با به کارگیری خلأ جدا شد و در پایان ترکیب اسکولومول با روش سوانگاری به دست آمد. فرآورده پس از خشک شدن به صورت پودر جامد زرد ننگه‌داری شد.

بارگذاری داروی اسکولومول در حفره‌های نانوبستر (ELC- $MMSN-NH_2$)

داروی اسکولومول سنتز و ۲ میلی گرم از آن با ۲ میلی گرم از نانوذره‌های آمین دار شده مخلوط و با شدت بالا روی هم‌زن هم‌زده شد. پس از ۴۸ ساعت، برای ارزیابی مقدار داروی بارگذاری شده (% LC) از روش غیرمستقیم استفاده شد. بدین منظور، نانوذره‌ها با گریزانه با نیروی ۵۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه جدا شدند و محلول رویی به دست آمده در طول موج

۲۶۶ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش (UV/VIS) بررسی شد. در گام نهایی % LC و کارایی پوشینه‌داری^۲ (% EE) دارو به ترتیب با معادله‌های ۱ و ۲ محاسبه شدند.

$$(1) \quad 100 \times (\text{وزن کل نانوذره‌های بارگیری شده} / \text{وزن \% LC داروی موجود در مایع رویی} - \text{وزن داروی اولیه}) =$$

$$(2) \quad 100 \times (\text{وزن کل داروی اولیه} / \text{وزن داروی آزاد درون \% EE مایع رویی} - \text{وزن کل داروی اولیه}) =$$

پیوند واپایش‌گرهای درجه‌ای طلا برای ره‌ایش هوشمندانه (Au-ELC-MMSN-NH₂)

در این مرحله به منظور واپایش ره‌ایش هوشمندانه دارو از نانوذره‌های طلا برای مسدود کردن حفره‌های نانوذره‌های سیلیکا استفاده شد. ابتدا، ۲ میلی لیتر از محلول حاوی نانوذره‌های طلا به همراه ۲ میلی گرم از نانوذره‌های ELC-MMSN-NH₂ مخلوط و ۲۴ ساعت به صورت ملایم با هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شدند [۲۴].

پوشش‌دهی سطح نانوذره‌ها با بسپار PEG (-Au-ELC-PEG) / MMSN-NH₂

در این مطالعه، سطح بیرونی نانوذره‌ها با بسپار دو عاملی PEG با هدف سنتز نانوذره‌های غیرهدفمند و زیست‌سازگار پوشش‌دهی شد. به مخلوط واکنش به دست آمده از مرحله پیشین، ۶ میلی گرم از بسپار PEG دو عاملی (-SH-PEG-COOH) افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، هم‌زده شد [۲۳].

پیوند آبتامر EpCAM با هدف سنتز نانوذره‌های هدفمند (APT-PEG-Au-ELC-MMSN-NH₂)

با هدف تحویل انتخابی و ویژه داروی اسکولومول با سامانه حمل دارو، از آبتامر EpCAM استفاده شد.

مقایسه اثرهای پادسرطانی نانوحامل‌های غیرهدفمند و هدفمند در محیط برون‌تنی

شناسایی ویژه سلول‌های بیان‌کننده گیرنده EpCAM و مقایسه سمیت سلولی از راه آزمون MTT صورت گرفت. بدین منظور، از دو رده سلولی با بیان متفاوتی از گیرنده EpCAM استفاده شد. رده سلولی سرطانی روده بزرگ (HT-29) برای سلول‌هایی با بیان بالای گیرنده EpCAM و رده سلولی تخمدان همستر چینی^۴ (CHO) با بیان کم این گیرنده انتخاب و از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری شدند. ابتدا سلول‌ها با تراکم $10^3 \times 6$ سلول در هر چاهک از ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، با غلظت‌های متفاوتی از داروی اسکولومول، نانوذره‌های غیرهدفمند و هدفمند (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و $100 \mu\text{g/ml}$) با مقدار برابری از داروی اسکولومول بارگذاری شده در نانوبستر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. در هر یک از بازه‌های زمانی، محیط کشت حاوی ۱۰ درصد رنگ MTT تهیه و حدود ۲۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در تاریکی در گرم‌خانه قرار داده شدند. سپس، محلول روی هر یک از چاهک‌ها تخلیه و با دی‌متیل سولفوکسید (DMSO^۵)، نمک‌های تترازولیم حل شد. خوانش جذب نوری (OD) چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا (Awareness Technology) انجام شد.

بررسی‌های آماری

رهایش داروی اسکولومول در دو pH متفاوت و سمیت گروه‌های متفاوت تیماری بر سلول‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism 6.1 رسم و مقایسه شدند. نمودارهای دوز-پاسخ و غلظت موثر (IC₅₀) برای دو رده سلولی و گروه‌های متفاوت تیماری با تجزیه و تحلیل وردایی یک‌طرفه^۷ و با مقایسه

ابتدا گروه‌های کربوکسیلیک اسید در سطح سامانه حمل دارو با افزودن ۱/۹۶ میلی‌گرم از NHS و ۳/۲۷ میلی‌گرم از EDC به مخلوط واکنش مرحله پیشین، فعال شد. سپس، ۰/۰۰۲ میکرومول از آپتامر EpCAM به نانوذره‌ها افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. نانوذره‌های هدفمند -APT-PEG-Au-ELC- MMSN-NH₂ با گریزانه جدا و برای ارزیابی مشخصات فیزیکی-شیمیایی و انجام مطالعه‌های برون‌تنی در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، همگن شدند.

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانوذره‌های سنتز شده

قطر و پتانسیل زتا نانوذره‌ها در هر مرحله با پراکندگی نور پویا^۱ و با دستگاه Nano-ZS (Malvern, UK) دانشکده داروسازی مشهد تعیین شد. گروه‌های عاملی متصل شده به نانوذره‌ها با طیف‌سنج فرورسرخ تبدیل فوریه Thermo Nicolet مدل AVATAR 370 FTIR ساخت آمریکا، بررسی شد. ریخت‌شناسی و شکل ظاهری نانوذره‌های MMSNs با میکروسکوپ الکترونی عبوری با تفکیک بالا^۲ (HRTEM; FEI, USA) و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM; TESCAN MIRA, Czech Republic) بررسی شد. همچنین، کارایی درپوش‌گذاری در دو محیط کاراندام-شناختی و اسیدی با روش کیسه تراکافت^۳ ارزیابی شد. بدین منظور، حدود ۳ میلی‌گرم از نانوذره‌های Au-ELC-MMSN-NH₂ در ۳ میلی‌لیتر بافر پراکنده و در کیسه تراکافت با قطر منافذ ۱۰۰۰ Da قرار داده شد. کیسه تراکافت در دو ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط رهایش با دو pH متفاوت (۷/۴ و ۵/۴) نهاده شد. ارلن‌ها به گرم‌خانه تکاننده‌دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت قرار داده شدند. رهایش دارو در دو محیط ذکر شده در بازه‌های زمانی مشخص با دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش بررسی شد.

1. Dynamic light scattering (DLS)
3. Dialysis
5. Dimethyl sulfoxide
7. Tukey's multiple comparison

2. High Resolution Transmission Electron Microscopy
4. Chinese hamster ovary (CHO)
6. One-Way ANOVA (analysis of variance)

چندگانه توکی^۱ به‌دست‌آمدند. آزمون‌ها سه بار تکرار و به‌صورت «میانگین \pm انحراف معیار» (Mean \pm SD) نمایش داده شدند. لازم به ذکر است، معناداری در سطح $p < 0.05$ ، در نظر گرفته شد.

نانوذره‌های طلا برای درپوش استفاده شد و طی یک واکنش ۲۴ ساعته تمام منافذ نانوذردهای حاوی دارو مسدود شد. پس از افزودن واپایش‌گرهای دریچه‌ای طلا، بار سطحی و قطر Au-ELC-MMSN-NH₂ دارو به‌ترتیب ۱۱/۱۹- و ۵۴/۹۲ نانومتر گزارش شد. در گام بعد کارایی پیوند درپوش‌گذاری در دو محیط شبیه‌سازی‌شده با pH سلول‌های طبیعی و سرطانی بررسی شد تا از عدم نشت دارو در محیط کاراندام‌شناختی اطمینان لازم به‌دست‌آید. همان‌طور که در شکل ۲-D مشاهده می‌شود، بیشترین رهائش داروی اسکولومول در محیط اسیدی (pH مشابه با اندوزوم سلول‌های سرطانی) بوده، به‌طوری‌که رهائش در ۹۶ ساعت، ۴۲/۲۶ درصد تخمین زده شد که به مقدار معناداری از رهائش دارو در محیط طبیعی، ۵/۴ درصد، بیشتر است. در گام بعد، با هدف سنتز نانوذردهای غیرهدفمند و زیست‌سازگار از PEG استفاده و تمام سطح بیرونی نانوستر پوشش‌دهی شد.

طیف FTIR ترکیب PEG-Au-ELC-MMSN-NH₂، نوار جدیدی را در ناحیه 1383 cm^{-1} نشان داد که مربوط به کشش گروه‌های C-OH است. برپایه انتظار، قطر نانوذردها حدود ۱۴ نانومتر افزایش یافت و بار سطحی آن‌ها به ۱۲/۳۷- رسید. در بخش پایانی سنتز، برای تحویل ویژه داروی اسکولومول به سلول‌های سرطانی روده بزرگ از آپتامر EpCAM با هدف شناسایی هوشمندانه این سلول‌ها استفاده شد. قطر نهایی نانوذردهای هدفمند، ۸۹/۳۵ نانومتر و بار سطحی آن‌ها ۱۴/۱۱- محاسبه شد.

قطر (A)، پتانسیل زتا (B)، پیوندهای (C) گروه‌های عاملی در هر مرحله از سنتز در طیف‌های FTIR بررسی و رهش داروی اسکولومول (D) از نانوذردهای حاوی واپایش‌گرهای دریچه‌ای در دو محیط کاراندام‌شناختی و اسیدی نیز با یکدیگر مقایسه شدند (شکل ۲). نتیجه‌ها با سه بار تکرار و به‌صورت «میانگین \pm انحراف معیار» (Mean \pm SD) گزارش شدند.

بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانوذردهای سنتز شده در این پژوهش، ابتدا نانوذردهای متخلخل مغناطیسی MMSNs سنتز، سپس قطر و بار سطحی آن با آزمون DLS تخمین زده شد. این نانوذردها بار سطحی منفی داشتند و قطر آن‌ها حدود ۱۹/۱۰ نانومتر گزارش شد (شکل‌های ۲-A و B). همچنین، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، نانوذردهای MMSNs کروی بودند، توزیع یکنواخت به همراه منافذ باز داشتند. آزمون FTIR نیز نشان داد که نوارهای موجود در 1088 cm^{-1} و 806 cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به Si-O، Fe-O و Si-O-Si هستند [۳۲] که حاکی از سنتز موفق نانوذردهای MMSNs است. پس از تأیید آماده‌سازی این نانوذردهای پایه، گروه آمین به ساختار افزوده شد و گروه‌های عاملی جدید در نواحی 1588 cm^{-1} و 2931 cm^{-1} دیده شد که به‌ترتیب مربوط به کشش‌های گروه‌های N-H و CH₂-CH₂ هستند. این نتیجه‌ها، گواهی پیوند موفقیت‌آمیز گروه‌های آمیدی به سطح نانوذردهای MMSN بود. همچنین، در تأیید نتیجه‌های به‌دست‌آمده، بار سطحی نانوذردها نیز از گستره منفی به مثبت تغییر و قطر آن‌ها حدود ۳ نانومتر افزایش یافت. تصویرهای HR-TEM نشان داد (شکل ۳-ب)، نانوذردها منافذ بازی داشتند که منجر به بارگذاری موفقیت‌آمیز داروی اسکولومول شد؛ به‌طوری‌که LC و EE به‌ترتیب حدود ۳۹ و ۸۸ درصد بود. همچنین، بار سطحی و قطر نانوذردهای ELC-MMSN-NH₂ به‌ترتیب ۸/۵۴- و ۳۵/۲۶ نانومتر محاسبه شد. در گام سوم، برای دستیابی به رهائش واپایش‌شده و هوشمندانه داروی اسکولومول، از

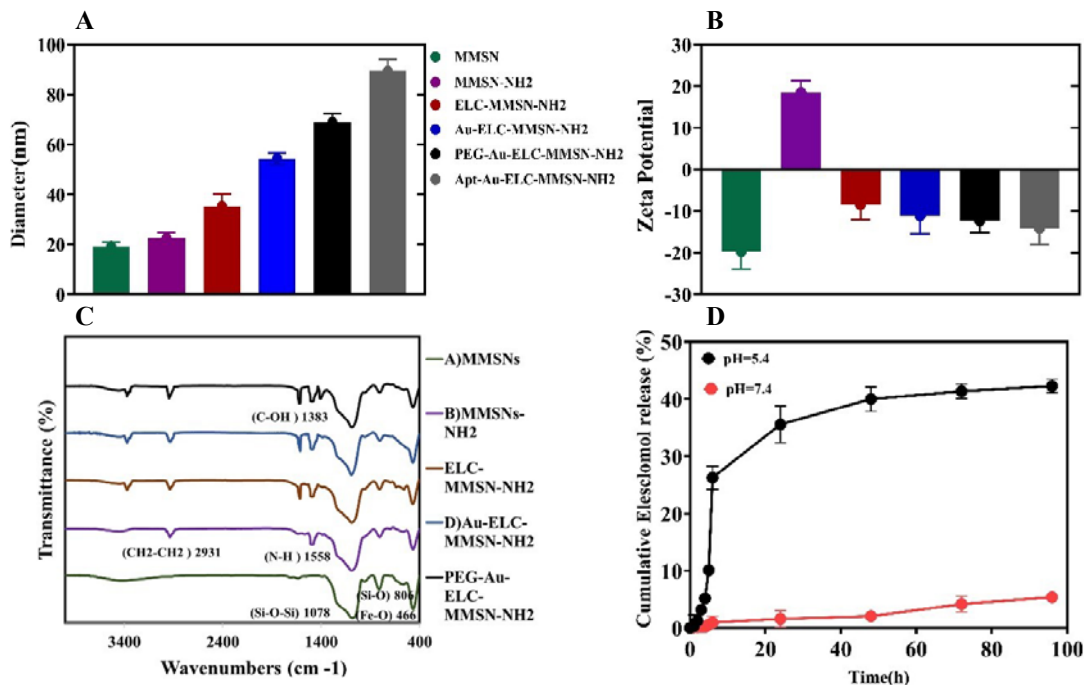
نتیجه‌ها و بحث

بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانوذردهای سنتز شده

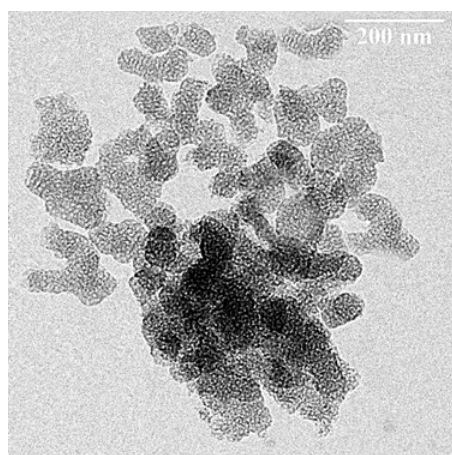
در این پژوهش، ابتدا نانوذردهای متخلخل مغناطیسی MMSNs سنتز، سپس قطر و بار سطحی آن با آزمون DLS تخمین زده شد. این نانوذردها بار سطحی منفی داشتند و قطر آن‌ها حدود ۱۹/۱۰ نانومتر گزارش شد (شکل‌های ۲-A و B). همچنین، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، نانوذردهای MMSNs کروی بودند، توزیع یکنواخت به همراه منافذ باز داشتند. آزمون FTIR نیز نشان داد که نوارهای موجود در 1088 cm^{-1} و 806 cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به Si-O، Fe-O و Si-O-Si هستند [۳۲] که حاکی از سنتز موفق نانوذردهای MMSNs است. پس از تأیید آماده‌سازی این نانوذردهای پایه، گروه آمین به ساختار افزوده شد و گروه‌های عاملی جدید در نواحی 1588 cm^{-1} و 2931 cm^{-1} دیده شد که به‌ترتیب مربوط به کشش‌های گروه‌های N-H و CH₂-CH₂ هستند. این نتیجه‌ها، گواهی پیوند موفقیت‌آمیز گروه‌های آمیدی به سطح نانوذردهای MMSN بود. همچنین، در تأیید نتیجه‌های به‌دست‌آمده، بار سطحی نانوذردها نیز از گستره منفی به مثبت تغییر و قطر آن‌ها حدود ۳ نانومتر افزایش یافت. تصویرهای HR-TEM نشان داد (شکل ۳-ب)، نانوذردها منافذ بازی داشتند که منجر به بارگذاری موفقیت‌آمیز داروی اسکولومول شد؛ به‌طوری‌که LC و EE به‌ترتیب حدود ۳۹ و ۸۸ درصد بود. همچنین، بار سطحی و قطر نانوذردهای ELC-MMSN-NH₂ به‌ترتیب ۸/۵۴- و ۳۵/۲۶ نانومتر محاسبه شد. در گام سوم، برای دستیابی به رهائش واپایش‌شده و هوشمندانه داروی اسکولومول، از

الکترونی عبوری با قدرت تفکیک بالا (HRTEM) (ب) ارزیابی شد. تصویرهای مربوط در شکل ۳ ارائه شده‌اند.

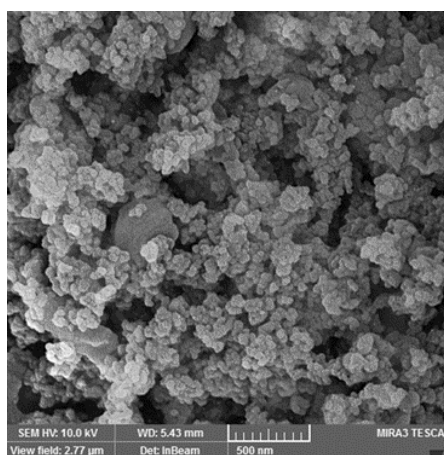
شکل و همگن بودن نانوذره‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) (الف) و میکروسکوپ



شکل ۲ قطر (A)، پتانسیل زتا (B)، بررسی پیوندهای گروه‌های عاملی در طیف‌های FTIR (C) نمونه‌ها و رهش داروی اسکولومول از نانوذره‌های حاوی واپایش‌گرهای دریچه‌ای در دو محیط کاراندام‌شناختی و اسیدی (D)



ب

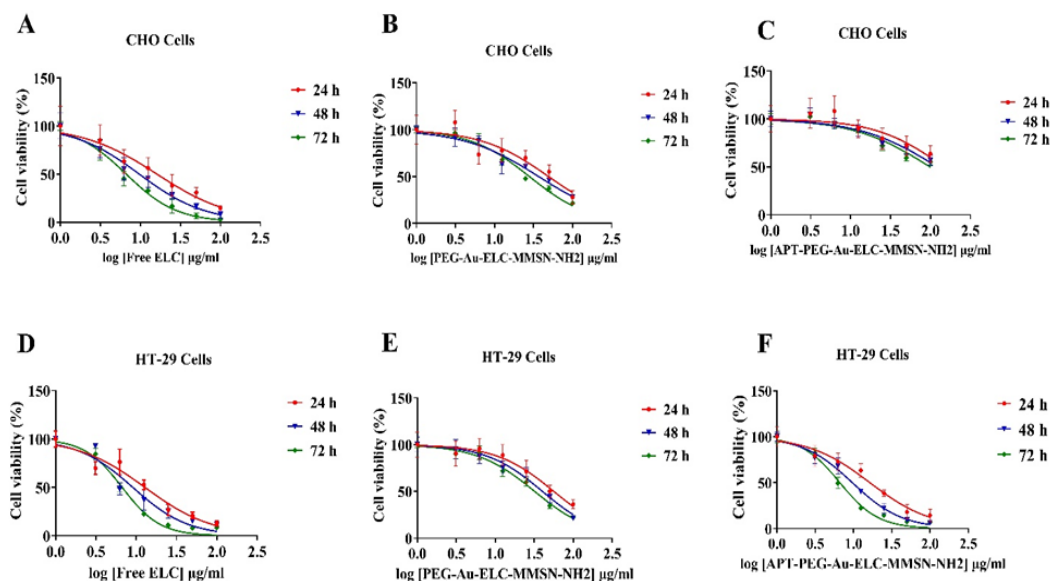


الف

شکل ۳ تصویرهای FESEM (الف) و HR-TEM (ب) نانوذره‌های سیلیکای متخلخل مغناطیسی (MMSNs)

اسکولومول و نانوذره‌های غیرهدفمند با کارکرد ناویژه، سمیت مشابهی نسبت به هر دو رده سلولی داشتند. مقادارهای IC_{50} (غلظتی از ماده که در آن، نیمی از سلول‌ها زنده هستند؛) به‌دست‌آمده از بررسی‌های آماری در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که نانوحامل هدفمند سمیت ناچیزی در مقایسه با گروه غیرهدفمند و داروی اسکولومول در برابر سلول‌های CHO نشان داد که بیانگر القای سمیت انتخابی نانوذره‌های APT-PEG-Au-ELC-MMSN-NH₂ است.

بررسی اثر پادسرطانی نانوذره‌ها در برابر سلول‌های سرطانی روده بزرگ کارایی گزینشی و ویژه نانوحامل هدفمند با نانوحامل غیرهدفمند و داروی اسکولومول در برابر رده‌های سلولی بیان‌کننده گیرنده EpCAM و سلول‌ها با بیان بسیار کم این گیرنده بررسی شد. منحنی دوز-پاسخ در شکل ۴ نشان داده شده است و حاکی از سمیت چشمگیر نانوذره‌های هدفمند در برابر سلول‌های سرطانی روده بزرگ و همچنین، سمیت ناچیز در برابر رده سلولی CHO است. برپایه انتظار، داروی



شکل ۴ نمودارهای دوز-پاسخ ناشی از داروی اسکولومول، نانوذره‌های غیرهدفمند و هدفمند در برابر سلول‌های CHO (A، B و C) و HT-29 (D، E و F) در سه بازه زمانی ۲۴ (A و D)، ۴۸ (B و E) و ۷۲ ساعت (C و F)

جدول ۲ نتیجه‌های به‌دست‌آمده از آزمون MTT و مقایسه مقادارهای IC_{50}^*

IC_{50} (µg/ml) ± SD (CHO cells)			IC_{50} (µg/ml) ± SD (HT-29 cells)			نمونه‌ها
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۶۶۶ ± ۱,۲۸	۹۶۹ ± ۰,۵۴	۱۶,۱۲ ± ۳,۵۷	۶,۷۰ ± ۱,۴۵	۹,۰۸ ± ۲,۴۲	۱۲,۸۵ ± ۱,۷۱	داروی اسکولومول
۳۲,۰۵ ± ۱,۴۷	۳۶,۷۸ ± ۲,۰۴	۴۹,۴۲ ± ۱,۲۵	۳۲,۰۵ ± ۴,۶۹	۴۰,۳۵ ± ۱,۹۵	۵۶,۴۲ ± ۱,۹۹	PEG-Au-ELC-MMSN-NH ₂
۹۸,۶۳ ± ۱,۸۷	۱۲۲,۸ ± ۱,۷۸	۱۴۸,۶ ± ۲,۳۴	۶,۶۴ ± ۲,۳۷	۹,۶۶ ± ۳,۹۵	۱۶,۳۸ ± ۳,۲۹	APT-PEG-Au-ELC-MMSN-NH ₂

* IC_{50} نشان دهنده غلظتی از دارو یا نانوحامل است که در آن فقط نیمی از سلول‌ها زنده هستند.

برون تنی بررسی شد [۳۶]. انتقال و تحویل عامل‌های درمانی با سامانه‌های حمل دارویی فرایند پیچیده‌ای است و می‌بایست بر موانع زیادی همچون نیمه‌عمر، شناسایی ویژه سلول‌های سرطانی در ریزمحیط توموری، ره‌ایش واپایش شده عامل‌های درمانی، سرنوشت نانوذره‌ها در بدن، چگونگی توزیع و دفع آن‌ها چیره شد [۳۷ و ۳۸]. افزودن بسپارهایی همچون PEG، پلی-وینیل‌الکل^۳، دکستران، گلوکوز و کیتوسان به نانوحامل‌ها به‌طور موثری پایداری کلوتیدی آن‌ها را بهبود بخشیده و موجب فرار آن‌ها از سامانه ایمنی می‌شود. در نتیجه، این نانوحامل‌ها نیمه‌عمر مناسبی دارند و می‌توانند از راه فرایند افزایش نفوذپذیری و احتیاس (EPR^۴) در ریزمحیط توموری تجمع یابند. به همین ترتیب برای رسیدن به دارورسانی موفق، طراحی دقیق و کارآمد مورد نیاز است. در پژوهشی، برای نخستین بار از سامانه حمل دارویی ترانوستیک MMSNs برای تحویل داروی اسکولومول به سلول‌های سرطانی روده بزرگ استفاده شد [۳۹]. نانوذره‌ها SPION برای عامل ترانوستیک و قابل ردیابی با تصویربرداری در مرکز سامانه حمل دارویی قرار گرفت تا نظارت کامل بر درمان فراهم شود. داروی شیمی‌درمانی اسکولومول در حفره‌های نانوحامل بارگذاری شد و برای ره‌ایش هوشمندانه دارو از درپوش‌های طلا استفاده شد. همچنین، زیست‌سازگاری و نیمه‌عمر بالای نانوذره‌ها از راه پوشش‌دهی سطح بیرون با بسپار PEG مدیریت و نانوذره‌های غیرهدفمند سنتز شدند. در پایان، برپایه بیش‌بیاں گیرنده EpCAM در سلول‌های سرطانی روده بزرگ از لیگاند ویژه آن، آپتامر EpCAM، برای دارورسانی ویژه استفاده شد [۴۰].

نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که تغییرهای صورت گرفته در هر مرحله مانند الحاق هسته ترانوستیک، افزودن گروه‌های آمیدی، پیوند نانوذره‌های طلا، پوشش‌دهی با بسپار PEG و پیوند لیگاند با موفقیت انجام شده است. به‌طور کلی،

سرطان روده بزرگ یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها دستگاہ گوارش بوده و دومین عامل مرگ و میر در جهان به‌حساب می‌آید [۳۳]. سازوکار مولکولی سرطان روده بزرگ به‌صورت دقیق مشخص نشده است، ولی عامل‌هایی همچون افزایش سن، چاقی، التهاب، سابقه خانوادگی و جهش در ژن‌هایی مانند BRCA2 می‌توانند منجر به بروز این بیماری شود [۳۴]. در حال حاضر شیمی‌درمانی از جمله درمان‌های متداول برای سرطان روده بزرگ است. به‌طور کلی این روش با ارائه داروهای پادسرطانی مانند اسکولومول، دوکسوروبیسین، ۵-فلورورابینول (5-FU)، به تنهایی یا ترکیب با چندین دارو و با معیایی همچون کارکرد ناویژه، سمیت زیاد، مقاومت دارویی و عدم کارایی همراه است. از این‌رو، پژوهشگران به دنبال یافتن روش‌های ایمن‌تر و مناسب‌تر هستند و با هدف دستیابی به «رضایت بیماران»، روش‌های متفاوت درمانی را توسعه داده‌اند. یکی از روش‌های درمانی نوپا، استفاده از سامانه‌های حمل دارویی است که بر مبنای نانوذره‌ها طراحی می‌شوند [۳۵]. این سامانه‌ها با قابلیت واپایش ره‌ایش دارو و بهبود خواص پادسرطانی داروها مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. در این زمینه، نانوحامل MSN را برای حمل ویژه و هدفمند داروی 5-FU به‌کار برده شد و همچون پژوهش حاضر با استفاده از نانوذره‌های طلا، PEG و آپتامر تزئین شد. نتیجه‌های امیدوارکننده در جهت کاهش سمیت داروی شیمی‌درمانی 5-FU منجر به این شد که اثر نانوحامل یادشده بر داروی اسکولومول نیز بررسی شود [۴۴]. همچنین، لیو^۱ و همکارانش از نانوحامل MSNs برای تحویل ویژه داروی پادسرطانی تریپتولید^۲ به سلول‌های سرطانی روده بزرگ LNCaP استفاده کردند. با توجه به قابلیت طراحی و مهندسی سامانه‌ها، پس از بارگذاری دارو درپوش‌های حساس به محرک pH از نوع PAH-DA به سامانه افزوده شد و کارایی آن در محیط

1. Liu

3. Polyvinyl alcohol

2. Triptolide

4. Enhanced permeability and retention (EPR)

استفاده کردند. همچنین، برای افزایش زیست‌سازگاری به سامانه طراحی‌شده بسپار PEG افزودند و ساختار مهندسی‌شده در برابر رده سلولی سرطانی روده بزرگ ارزیابی شد. نتیجه‌ها نشان داد که LC حدود ۱۷ درصد بود و بار سطحی سامانه دارورسانی در گستره مثبت قرار داشت و قطر آن‌ها ۳۶۶ نانومتر بود. پس از تیمار سلول‌های سرطانی روده بزرگ با نانوذره‌ها، مهاجرت آن‌ها مهار شد و سمیت سلولی حدود ۳/۸ برابر بیشتر از تیمار با داروی فنبدازول به‌تنهایی بود [۷].

نتیجه‌گیری

نتیجه‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که استفاده از سامانه طراحی‌شده دارویی MMSN به‌طور چشمگیری اثرهای نامطلوب داروی اسکولومول را کاهش و مزایای زیادی در درمان سرطان روده بزرگ ارائه داد که می‌تواند برای یک روش موثر در درمان سرطان روده بزرگ به‌کارگرفته شود. این سامانه با بهره‌گیری از نانوفناوری، قابلیت تحویل دارو به‌صورت دقیق به سلول‌های سرطانی را در مقایسه با روش‌های درمانی سنتی و متداول، داشت. در نتیجه، سامانه MMSN می‌تواند برای یک روش موثر و نوین در درمان سرطان روده بزرگ استفاده شود. اگرچه توسعه این نانوذره‌های هدفمند در حوزه بالینی، همچنان نیاز به آزمون‌ها و بررسی‌های بیشتری دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه‌های شیمی معدنی و زیست-شناسی سلولی مولکولی و با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد (۵۲۶۷۲) انجام شد و بدین وسیله نویسندگان، مراتب قدردانی خود را اعلام می‌کنند.

حضور گروه‌های عاملی موردنظر، تغییرهای بار سطحی و قطر نانوذره‌ها در مراحل متفاوت تأیید شد و سامانه حمل دارویی هدفمند با قطر حدود ۸۹ نانومتر سنتز شد. ویژگی پادسرطانی و کارکرد گزینشی نانوذره‌های هدفمند در برابر سلول‌های سرطانی روده بزرگ HT-29 ارزیابی و تأیید شد. به‌طورمشابه، لیو و همکارانش از نانوذره‌های MSNs برای حمل داروی شیمی-درمانی دوکسوروبیسین استفاده کردند و واپایش‌گرهای درپچه‌ای حساس به pH اسیدی کلسیم کربنات (CaCO_3) را برای مسدودسازی منافذ به‌کار بردند. همچنین، در این طراحی، از غشای سلول‌های سرطانی روده بزرگ نیز برای پوشش‌دهی سطح بیرونی سامانه حمل دارویی و فرار از سامانه ایمنی استفاده شد. نانوحامل نهایی با قطر ۱۰۰ نانومتر سنتز و سمیت آن در برابر رده سلولی LNCaP ارزیابی شد. نتیجه‌های آن‌ها نشان داد که ره‌ایش دارو وابسته به pH و زمان بود و نانوحامل سمیت قابل‌توجهی را در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین در دو محیط برون‌تنی و درون‌تنی نشان داد [۴۱]. به‌نظر می‌رسد که پیوند الکتروستاتیک گروه‌های مثبت آمین موجود در سطح MSNs و گروه‌های منفی سیترات در نانوذره‌های طلا، عامل اصلی فرایند درپوش‌گذاری است [۲۳] و کارایی آن با آزمون ره‌ایش بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که در محیط اسیدی نانوذره‌های طلا منافذ MSNs را ترک می‌کنند و منجر به ره‌اسازی داروی اسکولومول می‌شوند. در مطالعه دیگری، دو داروی پاکلیتاکسل و آرسنیک‌تیرواکسیداز به‌صورت هم‌زمان در حفره‌های نانوذره‌ها MSN بارگذاری شدند. پلی‌آکرلیک اسید برای واپایش‌گرهای درپچه‌ای استفاده شد و برای شناسایی ویژه سلول‌های سرطانی پستان از پیپتید ویژه F56 استفاده شد. نتیجه‌های برون‌تنی و درون‌تنی نشان داد که سامانه حمل دارویی با تحویل دو دارو به‌صورت هم‌زمان موجب القای سمیت در سلول‌های سرطانی شدند [۴۲]. اصفهانی و همکارانش نیز از داروی پادسرطانی فنبدازول^۱ برای بارگذاری در حفره‌های نانوذره‌های MSNs

1. Fenbendazole

- [1] Arkaban H, Jaberi J, Bahramifar A, Emameh RZ, Farnoosh G, Taheri RA, et al. Fabrication of Fe (III)-Doped Mesoporous Silica Nanoparticles as Biocompatible and Biodegradable Theranostic System for Remdesivir Delivery and MRI Contrast Agent. *Inorganic Chemistry Communications*. 2023;110398. doi: [org/10.1016/j.inoche.2023.110398](https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110398)
- [2] Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, Amel Farzad S, Peivandi MT, Ramezani M, et al. Synthesis of theranostic epithelial cell adhesion molecule targeted mesoporous silica nanoparticle with gold gatekeeper for hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine*. 2017;12(11):1261-79. doi: [org/10.2217/nmm-2017-0028](https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0028)
- [3] Barui S, Cauda V. Multimodal decorations of mesoporous silica nanoparticles for improved cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2020;12 (6) :527. doi: [org/10.3390/pharmaceutics12060527](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060527)
- [4] Buccarelli M, D'Alessandris QG, Matarrese P, Mollinari C, Signore M, Cappannini A, et al. Elesclomol-induced increase of mitochondrial reactive oxygen species impairs glioblastoma stem-like cell survival and tumor growth. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021;40:1-17. doi: [org/10.3390/cancers14246193](https://doi.org/10.3390/cancers14246193)
- [5] Chen S, Sun L, Koya K, Tatsuta N, Xia Z, Korbut T, et al. Syntheses and antitumor activities of N' 1, N' 3-dialkyl-N' 1, N' 3-di-(alkylcarbonothioyl) malonohydrazide: The discovery of elesclomol. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2013;23(18):5070-6. doi: [org/10.1016/j.bmcl.2013.07.032](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.032)
- [6] Cheng Y-J, Qin S-Y, Ma Y-H, Chen X-S, Zhang A-Q, Zhang X-Z. Super-pH-sensitive mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system for effective combination cancer therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(4):1878-86. doi: [org/10.1021/acsbiomaterials.9b00099](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00099)
- [7] Esfahani MKM, Alavi SE, Cabot PJ, Islam N, Izake EL. PEGylated Mesoporous Silica Nanoparticles (MCM-41): A promising carrier for the targeted delivery of fenbendazole into prostate cancer cells. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1605. doi: [org/10.3390/pharmaceutics14081579](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081579)
- [8] Farjadian F, Roointan A, Mohammadi-Samani S, Hosseini M. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment. *Chemical Engineering Journal*. 2019;359:684-705. doi: [org/10.1016/j.cej.2018.11.156](https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.156)
- [9] Feng L, Dong Z, Tao D, Zhang Y, Liu Z. The acidic tumor microenvironment: a target for smart cancer nano-theranostics. *National Science Review*. 2018;5(2):269-86. doi: [org/10.1093/nsr/nwx062](https://doi.org/10.1093/nsr/nwx062)
- [10] Fu Z, Xiang J. Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 ;21(8):2793. doi: [org/10.3390/ijms21239123](https://doi.org/10.3390/ijms21239123)
- [11] Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020;39:969-87. doi: [org/10.1007/s10555-020-09898-3](https://doi.org/10.1007/s10555-020-09898-3)
- [12] He K, Li J, Shen Y, Yu Y. pH-Responsive polyelectrolyte coated gadolinium oxide-doped mesoporous silica nanoparticles (Gd₂O₃@MSNs) for synergistic drug delivery and magnetic resonance imaging enhancement. *Journal of Materials Chemistry B*. 2019;7(43):6840-54. doi: [org/10.1039/C8TA11172C](https://doi.org/10.1039/C8TA11172C)
- [13] Hedley D, Shamas-Din A, Chow S, Sanfelice D, Schuh AC, Brandwein JM, et al. A phase I study of elesclomol sodium in patients with

- acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2016;57(10):2437-40. doi: [org/10.3390/biomedicines9080852](https://doi.org/10.3390/biomedicines9080852)
- [14] Iranpour S, Bahrami AR, Nekooei S, Matin MM. Improving anti-cancer drug delivery performance of magnetic mesoporous silica nanocarriers for more efficient colorectal cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021;19(1):1-22. doi: [org/10.1186/s12951-021-01056-3](https://doi.org/10.1186/s12951-021-01056-3)
- [15] Iranpour S, Bahrami AR, Saljooghi AS, Matin MM. Application of smart nanoparticles as a potential platform for effective colorectal cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021;442:213949. doi: [org/10.1016/j.ccr.2021.213949](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213949)
- [16] Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer cell international*. 2013;13:1-8. doi: [org/10.1186/1475-2867-13-89](https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89)
- [17] Keshavarz H, Khavandi A, Alamolhoda S, Naimi-Jamal MR. pH-Sensitive magnetite mesoporous silica nanocomposites for controlled drug delivery and hyperthermia. *RSC advances*. 2020;10(64):39008-16. doi: [org/10.1039/D0RA06916G](https://doi.org/10.1039/D0RA06916G)
- [18] Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang C-Y, Zhang M, et al. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(8):2319-27. doi: [org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0298](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0298)
- [19] Koochi Moftakhari Esfahani M, Alavi SE, Cabot PJ, Islam N, Izake EL. Application of mesoporous silica nanoparticles in cancer therapy and delivery of repurposed anthelmintics for cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1579. doi: [org/10.3390/pharmaceutics14081579](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081579)
- [20] Li S-D, Huang L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2010;145(3):178. doi: [org/10.1016/j.jconrel.2010.03.016](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.016)
- [21] Li Y, Duo Y, Bi J, Zeng X, Mei L, Bao S, et al. Targeted delivery of anti-miR-155 by functionalized mesoporous silica nanoparticles for colorectal cancer therapy. *International journal of nanomedicine*. 2018;13:1241. doi: [org/10.2147/IJN.S158290](https://doi.org/10.2147/IJN.S158290)
- [22] Liu C-M, Chen G-B, Chen H-H, Zhang J-B, Li H-Z, Sheng M-X, et al. Cancer cell membrane-cloaked mesoporous silica nanoparticles with a pH-sensitive gatekeeper for cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;175:477-86. doi: [org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.038](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.038)
- [23] Liu C-M, Chen G-B, Lin L-H, Zhang J-B, Guo S-M, Sheng M-X. Mesoporous silica nanoparticles with surface transformation ability for prostate cancer treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021;621:126592. doi: [org/10.1016/j.colsurfa.2021.126592](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126592)
- [24] Modica-Napolitano JS, Bharath LP, Hanlon AJ, Hurley LD. The anticancer agent elesclomol has direct effects on mitochondrial bioenergetic function in isolated mammalian mitochondria. *Biomolecules*. 2019;9(8):298. doi: [org/10.3390/biom9080298](https://doi.org/10.3390/biom9080298)
- [25] Mohammed A, Reza A, Shokooch Saljooghi A. Using magnetic mesoporous silica nanoparticles armed with EpCAM aptamer as an efficient platform for specific delivery of 5-fluorouracil to colorectal cancer cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;10. doi: [org/10.3389/fbioe.2022.1095837](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1095837)
- [26] Nagai M, Vo NH, Ogawa LS, Chimmanamada D, Inoue T, Chu J, et al. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52(10):2142-50. doi: [org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.017](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.017)
- [27] O'Day SJ, Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Kefford R, Grob JJ, Mortier L, et al. Final results of phase III SYMMETRY study:

- randomized, double-blind trial of elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone as treatment for chemotherapy-naive patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(9):1211-8. doi: [org/10.1200/JCO.2012.44.5585](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.5585)
- [28] Olivas A, Price RS. Obesity, inflammation, and advanced prostate cancer. *Nutrition and Cancer*. 2021;73(11-12):2232-48. doi: [org/10.1080/01635581.2020.1856889](https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1856889)
- [29] She X, Chen L, Velleman L, Li C, Zhu H, He C, et al. Fabrication of high specificity hollow mesoporous silica nanoparticles assisted by Eudragit for targeted drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;445:151-60. doi: [org/10.1016/j.jcis.2014.12.053](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.053)
- [30] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2023;73(1):17-48. doi: [org/10.3322/caac.21763](https://doi.org/10.3322/caac.21763)
- [31] Su S, M Kang P. Recent advances in nanocarrier-assisted therapeutics delivery systems. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):837. doi: [org/10.3390/pharmaceutics12090837](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090837)
- [32] Tiburcius S, Krishnan K, Jose L, Patel V, Ghosh A, Sathish C, et al. Egg-yolk core-shell mesoporous silica nanoparticles for high doxorubicin loading and delivery to prostate cancer cells. *Nanoscale*. 2022;14(18):6830-45. doi: [org/10.1039/D2NR00783E](https://doi.org/10.1039/D2NR00783E)
- [33] Torabi M, Aghanejad A, Savadi P, Barzegari A, Omidi Y, Barar J. Fabrication of mesoporous silica nanoparticles for targeted delivery of sunitinib to ovarian cancer cells. *BioImpacts*. 2023. doi: [org/10.34172/bi.2023.25298](https://doi.org/10.34172/bi.2023.25298)
- [34] Torabi M, Aghanejad A, Savadi P, Barzegari A, Omidi Y, Barar J. Targeted Delivery of Sunitinib by MUC-1 Aptamer-Capped Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles. *Molecules*. 2023;28(1):411. doi: [org/10.3390/molecules28010411](https://doi.org/10.3390/molecules28010411)
- [35] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, Dreishpoon M, Verma A, Abdusamad M, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*. 2022;375(6586):1254-61. doi: [org/10.1126/science.abf0529](https://doi.org/10.1126/science.abf0529)
- [36] Wong HN, Lewies A, Haigh M, Viljoen JM, Wentzel JF, Haynes RK, et al. Anti-melanoma activities of artemisone and prenylated amino-artemisinins in combination with known anticancer drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:558894. doi: [org/10.3389/fphar.2020.558894](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.558894)
- [37] Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(8):771. doi: [org/10.3390/jpm11080771](https://doi.org/10.3390/jpm11080771)
- [38] Xu Y, Zhao H, Hou J. Correlation between overexpression of EpCAM in prostate tissues and genesis of androgen-dependent prostate cancer. *Tumor Biology*. 2014;6695:700-35. doi: [org/10.1007/s13277-014-1892-2](https://doi.org/10.1007/s13277-014-1892-2)
- [39] Zhang B-b, Chen X-j, Fan X-d, Zhu J-j, Wei Y-h, Zheng H-s, et al. Lipid/PAA-coated mesoporous silica nanoparticles for dual-pH-responsive codelivery of arsenic trioxide/paclitaxel against breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021;42(5):832-42. doi: [org/10.1038/s41401-021-00648-x](https://doi.org/10.1038/s41401-021-00648-x)
- [40] Zhang Y, Zhi Z, Jiang T, Zhang J, Wang Z, Wang S. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *Journal of Controlled Release*. 2010 ;145(3):257-63. doi: [org/10.1016/j.jconrel.2010.04.029](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.029)
- [41] Zheng P, Zhou C, Lu L, Liu B, Ding Y. Elesclomol: a copper ionophore targeting mitochondrial metabolism for cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2022;41(1):1-13. doi: [org/10.1186/s13046-022-02485-0](https://doi.org/10.1186/s13046-022-02485-0)
- [42] Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature reviews Drug discovery*. 2017 ;16(3):181-202. doi: [org/10.1038/nrd.2016.199](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199)

- [43] Zhu D, Hu C, Liu Y, Chen F, Zheng Z, Wang X. Enzyme-/redox-responsive mesoporous silica nanoparticles based on functionalized dopamine as nanocarriers for cancer therapy. ACS Omega. 2019;4(4):6097-105. doi: org /10.1021/acsomega.8b02537
- [44] Kamil Mohammad Al-Mosawi A, Bahrami AR, Nekooei S, Saljooghi AS, Matin MM. Using magnetic mesoporous silica nanoparticles armed with EpCAM aptamer as an efficient platform for specific delivery of 5-fluorouracil to colorectal cancer cells. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023;14(1):33-49 doi: org /10.61186/JCT.14.1.33

Targeted delivery of Elesclomol to colorectal cancer using a drug delivery system based on magnetic mesoporous silica nanoparticles

M. Tarin¹, M. Babaei², H. Eshghi³, M. Moghadam Matin^{4,*}, A. Shokoh Saljooghi^{5,*}

1. PhD Student of Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. PhD of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Professor of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
5. Associate Prof. of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract: In this research, the targeted delivery of elesclomol to colorectal cancer cells was explored through the development of magnetic mesoporous silica nanoparticles (MMSNs) loaded with elesclomol and surface modification with gold gatekeepers, bifunctional polyethylene glycol (PEG) polymer, and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) aptamers to improve drug delivery performance. The physicochemical properties of nanocarriers were characterized and the cellular toxicity of elesclomol, and nano-delivery system with and without EpCAM aptamer modification has been investigated in vitro. High resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and field emission scanning electron microscopy (FESEM) showed that MMSNs had a uniform spherical morphology with a diameter of 19 nm and a negative surface charge. Elesclomol was successfully encapsulated in the open porous structure of the nanocarrier. The encapsulation efficiency (EE) and drug loading capacity (LC) were about 88% and 39%, respectively. Moreover, the prepared Au-ELC-MMSN-NH₂ displayed pH responsive and sustained drug release within 96 h. Targeted nano-delivery systems were prepared with a final diameter of 89 nm and a negative surface charge. The MTT assay revealed that the targeted nano-delivery system induced highly effective cytotoxicity on colorectal cancer cells-expressing EpCAM aptamer (HT-29) compared to the CHO cells. This engineered nano-platform is a promising elesclomol replacement therapy for colorectal cancer. However, further experiments are required before it can be practiced in the clinic.

Keywords: Colorectal cancer, Elesclomol, Mesoporous silica nanoparticles, Targeted therapy, Controlled release.

* Corresponding author Email:
saljooghi@um.ac.ir & matin@um.ac.ir