

ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxicity Evaluation of Docetaxel Nanoparticles by Culturing HepG2 Carcinoma Cell Lines

Mohammad Shokrzadeh¹,
Pedram Ebrahimnejad²,
Mahmood Omidi³,
Amir Shadboorestan³,
Zavosh Zalzar³

¹ Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology/Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Student Research Committee, Student of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 30, 2012 ; Accepted June 25, 2012)

Abstract

Background and purpose: Human hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common causes of death in the world. Targeted drug delivery to cells, tissues or specialized receptor cells is an advanced technology in treatment of HCC. The purpose of this study was to investigate the cytotoxicity properties of DTX nanoparticles. In this research nanoparticles were prepared through radical polymerization.

Materials and methods: HepG2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 10,000 viable cells per well. Then 0.01-0.50 µg/ml of the nanoparticle and the free drug was added the day after seeding. Afterwards, the number of viable cells was counted and the activity of mitochondrial dehydrogenase enzymes of the cells was detected in 24, 48 and 72 hrs using MTT assay.

Results: The results of MTT assay showed strong and dose-dependent inhibition of HepG2 carcinoma cell growth of the nanoparticle compared with DTX. Inhibitory concentrations (IC_{50}) that was obtained for nanoparticles and free drug incubation times of 24, 48 and 72 hours were 1.02 ± 0.68 , 0.39 ± 0.86 , 0.20 ± 0.93 and 10.39 ± 1.34 , 8.87 ± 0.97 , 5.99 ± 0.76 µg/ml, respectively.

Conclusion: The results showed higher cytotoxicity effect of nanoparticles in comparison with free drug against HepG2 cell lines in all mentioned incubation times. Hence, thiolated-chitosan nanoparticles could be a potentially useful delivery system for docetaxel as an anticancer agent in treatment of liver cancer.

Keywords: Human hepatocellular carcinoma (HCC), docetaxel nanoparticles, cytotoxicity, MTT assay

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(90): 2-10 (Persian).

بررسی سعیت سلولی نانوذرات داروی Docetaxel با استفاده از کشت سلول های سرطانی HepG2

محمد شکرزاده^۱

پدرام ابراهیم نژاد^۲

محمود امیدی^۳

امیر شادبورستان^۳

زاوش زال زر^۳

چکیده

سابقه و هدف: کارسینومای هپاتوسلولار انسانی (HCC) یکی از علت‌های رایج مرگ و میر در دنیا است. دارو رسانی هدفمند در سطح سلول، بافت یا گیرنده‌های اختصاصی سلولی یکی از فن‌آوری‌های بالقوه برای درمان HCC می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی خواص سیتو توکسیسیته نانوذرات Docetaxel (DTX) می‌باشد. که توسط روش رادیکال پلیمریزاسیون تهیه شده‌اند.

مواد و روش‌ها: تعداد 1×10^4 عدد سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد و سپس مقدار ۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات دارو و داروی اصلی پس از یک روز از زمان کشت سلول به آن‌ها اضافه گردید. سپس تعداد سلول‌های زنده و فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های مزبور با استفاده از روش MTT assay طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشخص گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT، مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول‌های سرطانی HepG2 را توسط نانوذرات دارو نسبت به داروی اصلی نشان می‌دهد. غلظت‌های مهاری (IC₅₀) که با آنالیز آماری به دست آمد برای نانوذرات دارو و داروی اصلی در طی زمان‌های انکوباسیون ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل $10/0 \pm 0/68$ ، $10/0 \pm 0/86$ ، $0/39 \pm 0/84$ و $10/0 \pm 0/93$ ، $10/0 \pm 0/97$ و $8/87 \pm 0/76$ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

استنتاج: شواهد موجود حاکی از سمتی سلولی بیشتر نانوذرات داروی DTX نسبت به داروی آزاد بر روی سلول‌های سرطانی کبد می‌باشد بنابراین فرمولاسیون نانوذرات داروی حاصل از این مطالعه می‌تواند به عنوان یک داروی انتخابی مناسب جهت مطالعات تکمیلی آینده در محیط درون تن پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: کارسینومای هپاتوسلولار انسانی، نانوذرات، Docetaxel، سیتو توکسیسیته، MTT assay

مقدمه

سرطان کبد به عنوان یک مشکل بهداشت جهانی مطرح است. کارسینومای هپاتوسلولار پنجمین عامل شایع سرطان در جهان و سومین عامل

^۱ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۰-۵۰ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است.

مؤلف مسئول: محمود امیدی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پامبر اعظم، دانشکده، داروسازی

E-mail=m.omid1364@gmail.com

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سمسانی / فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. گروه فارماسویتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشجویی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۳/۲ تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۵

نانو ذرات علی‌رغم دارودمانی نامناسب در گذشته، یک شیوه جدید درمانی را فراهم کرده که در آن دارویی که از راه وریدی یا خوراکی تجویز شده است، به طور مؤثر عمل کند و باعث کاهش عوارض جانبی در بیمار شود، بهویژه این که دارو رسانی هدفمند نسبت به درمان‌های رایج دارای مزیت‌های برجسته‌تری از قبیل حلالیت بهتر در آب و عملکرد اختصاصی است(۱۳-۱۵). با توجه به نکات ذکر شده فرمولاسیون نانو داروی DTX برای دارو رسانی هدفمند در شیمی درمانی اهمیت برجسته‌تری خواهد داشت(۱۶).

دارو درمانی از طریق سیستم گوارشی یکی از روش‌های قابل قبول دارو رسانی در بدن است. این شیوه به خصوص در مورد داروهای سیتو توکسیک حائز اهمیت است. این داروها معمولاً به صورت تزریقی در دسترس هستند و تجویز این داروها نیازمند پرسنل مهربان، حضور بیمار در بیمارستان و مراقبت‌های ویژه است. برخی از مزایای شیمی درمانی از طریق سیستم گوارشی عبارتند از: افزایش کارایی و نیمه عمر دارو، جلوگیری از افزایش بیش از حد غلظت دارو در خون و افزایش سمیت دارو و کاهش عوارض جانبی دارو در بدن است(۱۷، ۱۸). به همین علت در سال‌های گذشته مطالعات متعددی در مورد تجویز داروهای سیتو توکسیک از طریق سیستم گوارشی صورت گرفته است(۲۱-۲۱).

کیتوزان یک پلی‌ساقارید زیست تخریب پذیر کاتیونیک است که با د-استیلاسیون نسبی کیتین مشتق شده از پوست سخت پوستان (خرچنگ و میگو) تهیه می‌شود. توانایی افزایش نفوذپذیری ترکیبات هیدروفیل و همچنین سالم بودن این پلیمر در بدن سبب شده که به عنوان یک ترکیب جدید برای سیستم‌های دارو رسانی مورد استفاده قرار گیرد. جذب کیتوزان به واسطه اتصال به موکوس روده و باز شدن سریع و ناپایدار اتصالات محکم غشای سلول‌های موکوسی انجام می‌شود. اتصال کیتوزان به موکوس به دلیل تداخل بار مثبت کیتوزان با بار منفی گروه‌های سالیسیلیک اسید موسین می‌باشد. این

مرگ و میر در انواع سرطان‌ها است(۱). درمان این عارضه شامل دو بخش اصلی اقدامات درمانی و تسکین دهنده است اما این اقدامات در افراد دارای تومورهای متاستاتیک محدودیت‌های زیادی دارد(۲). بنابراین شیمی درمانی مؤثر برای افزایش میزان بقای بیماران و درمان هرچه بهتر بیماری در مراحل پیشرفته و عود کننده بیماری HCC از اهمیت به سزایی برخوردار است. داروی DTX یک ترکیب از خانواده تاکسان‌ها است که از نظر ساختمانی شبیه به پکلی تکسل می‌باشد اما قدرت مهاری دیلیمیریزاسیون میکرو‌توبولی بیشتری دارد(۳). این دارو در ترکیب با برخی داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی اثرات درمانی قابل توجهی بر سرطان‌های سینه، پانکراس، معده و کارسینومای یوروتیال داشته است(۴-۷).

اگرچه داروی DTX اثرات ضد سرطانی قابل توجهی در محیط برون تن بر انواع رده‌های سلولی کارسینومای هپاتوسلولار دارد، اما کاربردهای بالینی دارو اثرات رضایت‌بخشی بر HCC پیش‌رفته و سیروز کبدی نداشته است که دلیل عدمه آن توزیع نامناسب بافتی و عملکرد غیر اختصاصی بر سلول‌های سرطانی است(۸-۱۰). علی‌رغم نتایج نوید بخش داروی DTX، این دارو باعث سمیت سیستمیک می‌شود که دوز دارو و دوره درمان را به خصوص در بیماران سالخورده محدود می‌کند عوارض جانبی این دارو شامل: واکنش‌های بیش حساسیتی، تضعیف و سرکوب مغز استخوان، واکنش‌های جلدی، احتباس مایعات بدن، نوروپاتی محیطی، آلوپسی، اختلالات قلبی و خستگی می‌باشد(۱۱). علاوه بر این، جهت استفاده‌های بالینی، به دلیل حلالیت بسیار پایین دارو در آب، نیازمند سیستم‌های حلال خاصی از قبیل محلول اتانول و پلی‌سوربات ۸۰ می‌باشد که باعث واکنش‌های بیشتر حساسیتی، کاهش تجمع دارو در بافت تومور و افزایش مواجهه دارو با دیگر بخش‌های بدن می‌شود(۱۲). نانو‌تکنولوژی باعث ایجاد یک انقلاب در تشخیص و درمان سرطان شده است. دارو رسانی هدفمند به واسطه

فرایند گاز نیتروژن به مدت ۱۰ دقیقه دیگر ادامه یافت و سپس واکنش به مدت ۴۰ دقیقه دیگر در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در شرایط ملایم استیر ادامه یافت و پس از خنک شدن در دمای اتاق، PH محلول با استفاده از سود ۱ نرمال در ۴/۵ تنظیم شد. سوسپانسیون NPs با استفاده از دیالیز در مقابل ۱ لیتر محلول اسید استیک ۱۶ میکرومول بر لیتر در آب مقطر دوبار به مدت ۹۰ دقیقه خالص سازی شد. سوسپانسیون فریز شده در دمای -۵۰ درجه سانتی گراد در فشار ۰/۰۱ میلی بار لیوفیلیزه شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مراحل بعدی نگهداری شد.(۲۳).

آماده سازی DTX بارگیری شده روی NPs برای تهیه داروهای ضد سرطان بارگیری شده روی NPs از کیتوزان با وزن مولکولی ۲۰ کیلو دالتون استفاده شده است. پس از اضافه کردن محلول اسیدی DTX در ۰/۵ میلی لیتر مтанول در شرایط استیر حل شد و ۰/۲۵ میلی لیتر از MMA برای دستیابی به محلول با رنگ شفاف اضافه گردید. در شرایط قوی استیر با مگنت DTX به فلاشک دو طرفه اضافه گردید. فرایند حباب نیتروژن به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. DTX اضافه شده به میزان ۱-۴ درصد (وزنی - وزنی) بر اساس وزن MMA و تیولات کیتوزان بوده است. واکنش در شرایط ملایم استیر به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد ادامه یافت. پس از تنظیم PH در ۴/۵ سوسپانسیون نانوذرات با روش دیالیز تخلیص شد. مقدار داروی بارگیری شده بر روی NPs با روش کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) ارزیابی شد. فاز معکوس ایزوکراتیک HPLC با استفاده از سیستم Knauer (Knauer, Berlin, Germany) HPLC از استفاده (Waters, Milford, MA) Bondapak ۵ μ m انجام شد. فاز متحرک شامل نسبت ۷۵:۲۵ مтанول و آب با میزان جریان ۱ میلی متر در دقیقه بود. میزان جذب ترکیبات شسته شده با استفاده از آشکارساز UV-Vis Spectra100 در طول موج ۲۲۷ نانومتر قرائت شد.(۲۳).

تداخل سبب تقویت تماس طولانی مدت ماده‌ی دارویی و غشای جذب شده و به این روش دارو جذب می‌شود(۲۲). با توجه به مطالب فوق مطالعه حاضر به بررسی اثرات سیتوکسیک نانوذرات داروی DTX بر رده سلولی HepG2 می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داروی DTX خریداری شده از شرکت Cipla (Mumbai, India)، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط با درجه د-استیلاسیون ۸۹ درصد از شرکت Primex (Karmoy, Norway) استفاده شده است. L-گلوتاتیون (GSH)، ۱-اتیل-۳-دی متیل آمینو بروپیل (EDC) هیدروکلراید، N-هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS)، متیل متاکریلات (MMA)، آمونیوم سریوم نیترات، سدیم نیتریت، اسید هیدروکلریک، اسید استیک سرد، هیدروکسید سدیم، و فسفات هیدروژن پتابسیم که از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه شده‌اند. ۳-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-MTT (2,5-diphenyl tetrazolium bromide) از شرکت Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) خریداری شده است. رده سلولی HEPG2 از انسیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده است.

آماده سازی تیولات کیتوزان کونژوگه با نانوذرات PMMA (پلی متیل متاکریلات): نانوذرات با استفاده از روش اصلاح شده رادیکال پلیمریزاسیون تهیه شد. ۳۷ میلی گرم کیتوزان کونژوگه با وزن‌های متفاوت مولکولی (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون) در ۴ میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۲ مول بر لیتر در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در شرایط استیر و در مجاورت گاز نیتروژن حل گردید. پس از ۱۰ دقیقه در شرایط استیر قوی با مگنت محلول ۰/۰۸ مول بر لیتر سریوم آمونیوم نیترات (CAN) در اسید نیتریک ۰/۲ مول بر لیتر و MMA اضافه شد تا حجم کل به ۵ میلی لیتر رسید.

میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلدگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد.

بررسی میزان سمیت سلولی با روش *MTT assay*: به منظور بررسی اثر نانودارو و داروی اصلی بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از روش رنگ سنجی *MTT* استفاده شد^(۲۵). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک ترازوکلیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. در این روش میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی تعداد ۱۰^۴ سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو دارو و داروی اصلی به سلول‌ها اضافه شد و به ترتیب طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوبه شدند، پس از طی زمان‌های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرولیتر *MTT* با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی *MTT* به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت میزان ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی شده جهت حل کردن فورمازان ارگوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج رفرنس ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و IC_{50} (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) براساس منحنی غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر) گزارش شدند^(۲۶). هر کدام از این آزمایش‌ها جهت نتیجه بهتر سه بار تکرار شد و میزان بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\times 100 = \frac{\text{جدب نوری کنترل}}{\text{جدب نوری تست}} - \text{میزان بقای سلولی}$$

نتایج براساس میانگین \pm انحراف از معیار با استفاده

اندازه و توزیع پراکنده‌گی ذرات:

تعیین اندازه ذرات و توزیع پراکنده‌گی نانو ذرات *Zetasizer Nano* (ZS, Malvern Instrument Ltd., Malvern, UK) صورت گرفت. به طور خلاصه نمونه پودر خشک شده نانوذرات با حل کردن در آب دیونیزه به صورت سوسپانسیون درآورده شد و به مدت چند دقیقه سونیکه شد. پس از آن که یک محلول سوسپانسیون هموژن به دست آمد با استفاده از دستگاه فوق اندازه ذرهای، پتانسیل زتا و پراکنده‌گی (PDI) تعیین شد که در جدول شماره ۱ آمده است^(۲۴).

جدول شماره ۱: اندازه ذرات و توزیع پراکنده‌گی ذرات نانو ذرات داروی *Docetaxel* (n=3).

نامداری اکتوپلیمر	شناختی	اندازه ذرات (nm)	پتانسیل زتا	PDI
انکوباسیون	Docetaxel	۱۸۷ \pm ۲۳	۴۱/۲ \pm ۲	۰/۰۵۱ \pm ۰/۰۳۹

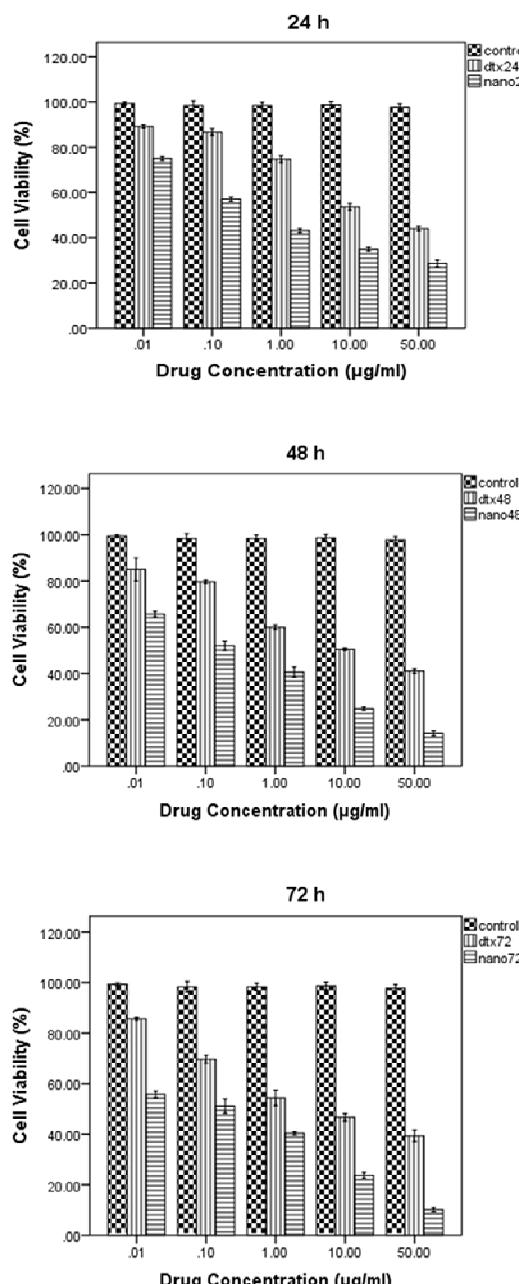
نگهداری و کشت سلولی:

در این مطالعه رده سلولی سرطانی کبد انسان HepG2 که از بانک سلولی انسستیتو پاستور تهران خریداری شده‌اند از پاسازهای سلولی بین ۲۶ تا ۳۱ در میکرومتر *DMEM* با ۱۰ درصد سرمه جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ g/l سدیم یکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین که در CO_2 انکوباتور (BINDER, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن استفاده شد. برای انجام ۵ تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-اتیلن دی آمین تراستیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایوتومتر و بررسی با

نانودارو سمیت سلولی بالاتری بر رده سلولی HepG2 نسبت به داروی DTX دارد ($p \leq 0.05$). میزان IC_{50} (غلظتی که باعث مهار ۵۰٪ رشد سلول می‌شود) نانوذرات و داروی اصلی دوستاکسل نیز در جدول شماره ۲ آورده شده است.

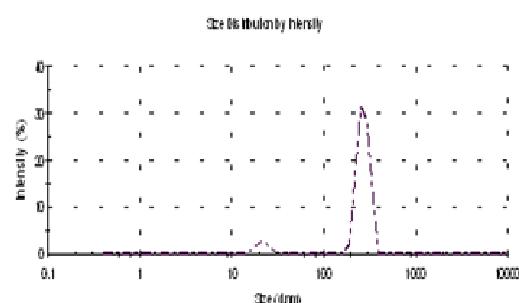
از نرم افزار آماری SPSS 15 گزارش شده‌اند. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از Student t-test استفاده شده است ($p \leq 0.05$).

یافته‌ها



نمودار شماره ۲: میزان بقای سلولی (درصد) HepG2 در مواجهه با نانو داروی DTX در مقایسه با داروی اصلی در غلظت‌های مساوی (n=5) طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

نانو ذرات قطر کمتر از ۲۰۰ نانومتر را نشان می‌دهند. فاکتور پراکندگی ذرات کمتر از ۰/۲ و پتانسیل زتا $35/4$ می‌باشد. نمودار شماره ۱ توزیع نانو ذرات داروی DTX را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱: اندازه گیری اندازه ذرات نانودارو با استفاده از دستگاه زتا سایزر

نمودار شماره ۲ نمایانگر میزان بقای سلولی رده HepG2 در محیط آزمایشگاهی می‌باشد که در مواجهه نانودارو و داروی اصلی قرار گرفته است. نانودارو و داروی اصلی با غلظت‌های مساوی ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میکرو گرم بر میلی لیتر به ترتیب تهیه گردید (n=5). از نمودار شماره ۱ می‌توان نتیجه گرفت میزان بقای سلولی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت ۰/۱ میکرو گرم بر میلی لیتر دارو به میزان ۵۴/۱۳ درصد برای داروی اصلی به ۳۷/۱۲ درصد برای نانودارو با فرمولاسیون تیولات کیتوزان می‌باشد (افزایش ۳۹/۱۷ درصد سمیت سلولی، (p ≤ 0.05) به طور مشابه در مقایسه با داروی اصلی میزان سمیت سلولی برای نانودارو ۴۲/۵۳ درصد (p ≤ 0.05) و ۳۹/۱۷ درصد (p ≤ 0.05) به ترتیب برای زمان‌های انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش یافته است. با توجه به نتایج به دست آمده

اتصال الکترواستات نانو ذرات فوق به جداره موکوس روده با بار منفی مناسب می‌باشد و از حذف آن‌ها از روده کوچک جلوگیری می‌کند. میزان بارگیری بالای داروی DTX با خواص چربی دوستی بالا در نانو ذرات فوق می‌تواند به دلیل ورود دارو به هسته چربی دوست (PMMA) نانو ذرات می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که وزن ملکولی کیتوزان عامل مهمی در خصوصیات نانو ذرات می‌باشد که شامل اندازه ذره‌های، میزان نفوذ به داخل سلول و شدت پاسخ سیستم ایمنی به دارو می‌باشد. با توجه به وزن ملکول بالا و در نتیجه ویسکوزیته بالا و محلولی تک در مایعات فیزیولوژیک بدن در محصولات تجاری کیتوزان با وزن ملکولی بالا، در این تحقیق جهت دار مؤثر از کیتوزان با وزن مولکولی متوسط استفاده شد.

در این مطالعه از نانو ذرات تیولات کیتوزان PMMA برای دارورسانی هدفمند از طریق خوراکی برای داروی DTX استفاده شده، داروی DTX بر روی نانو ذرات تیولات کیتوزان PMMA با استفاده از متاد اصلاح شده رادیکال پلیمریازیون بارگیری شده است. این روش تهیه نانو دارو دارای مزیت‌هایی از قبیل: حذف حلال‌های آلی، سورفاکtant و آماده‌سازی در شرایط ملایم تراست. نتایج مربوط به اثرات سیتو توکسیک نانو دارو و داروی اصلی بر سلول‌های سرطانی به روش MTT assay ارائه شده است. میزان غلظت دارو و نانو دارو بین ۰/۰۵-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. میزان IC₅₀ نانو ذرات و داروی اصلی یک روند مهار رشد سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت را نشان می‌دهد. در یک مطالعه نشان داده شده است که نانو ذرات تیولات کیتوزان هیچ‌گونه اثر سمی بر سلول‌های سرطانی نداشته است (۲۷). میزان IC₅₀ پایین تر نانو دارو نسبت به داروی اصلی حاکی از حساسیت بالاتر سلول‌های HepG2 نسبت به نانو دارو می‌باشد. این امر می‌تواند به بارگیری بیشتر و بهتر نانو دارو بر سلول سرطانی و عملکرد آهسته رهش دارو نسبت داده شود همچنین فرمولازیون نانوی

جدول شماره ۲: میزان (μg/ml) IC₅₀ نانو دارو و داروی اصلی در غلظت‌های مختلف در مقابل سلول‌های HepG2 پس از زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (n=3).

زمان انکوباسیون	نانو دارو IC ₅₀ (μg/ml)	داروی DTX IC ₅₀ (μg/ml)	زمان انکوباسیون	نانو دارو IC ₅₀ (μg/ml)	داروی DTX IC ₅₀ (μg/ml)
۲۴ ساعت	۱۰/۳۹±۱/۳۴	۱/۰۲±۰/۶۸	۴۸ ساعت	۸/۸۷±۰/۹۷	۰/۳۹±۰/۸۶
				۵/۹۹±۰/۷۶	۰/۲۰±۰/۹۳
۷۲ ساعت					

بحث

ارزیابی اثر درمانی در محیط آزمایشگاه (In Vitro) بر اساس IC₅₀ ارزیابی می‌شود که عبارت است از غلظتی از دارو که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها در یک بازه زمانی می‌شود. با توجه به جدول بالا می‌توان نتیجه گرفت که نانو دارو عملکرد بهتری نسبت به داروی اصلی دارد. IC₅₀ برای داروی اصلی به ترتیب از ۵/۹۹، ۰/۳۹، ۰/۸۷، ۱۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۲۰، ۰/۳۹، ۱۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای نانو دارو در زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی‌دار و قابل توجهی داشته است که این خود سمیت سلولی بالاتر نانو دارو نسبت به داروی اصلی را نشان می‌دهد که این تفاوت‌ها معنی‌دار می‌باشد. در این تحقیق نانو ذرات داروی DTX با پلیمر کیتوزان تهیه شد. یکی از سؤالات مهم در این تحقیق این بود که آیا فرمولازیون نانو ذرات اثرات داروی DTX را افزایش می‌دهد. نانو ذرات داروی فوق دارای اندازه مناسب برای ایجاد اثر افزایش نفوذپذیری و افزایش زمان ماندگاری در بدن (EPR) و نیز افزایش نفوذ و جذب به داخل موکوس روده می‌باشند. تحقیقات نشان می‌دهند که وقتی ذرات به ۵۰۰ نانو متر می‌رسند میزان جذب از موکوس روده کاهش می‌یابد. همچنین ذرات، پتانسیل زتا با بار مثبت و پراندگی مناسب و پایدار را نشان دادند. بار مثبت ذرات نشان می‌دهد که بار سطحی منفی PMMA به خوبی توسط کیتوزان با بار مثبت پوشیده شده است. بار مثبت نانو ذرات فوق دلیل وجود گروه‌های آمین آزاد در سطح ذرات می‌باشد. همچنین وجود بار مثبت برای

نشان دهنده بارگیری مناسب دارو توسط نانوذرات می باشد(۲۳).

در پایان نتیجه گیری می شود با توجه به مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر، داروی Docetaxel با تأکید بر فرمولاسیون نانو می تواند به عنوان یک عامل ضد سرطان برای درمان سرطان هپاتوسلولار پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت و تأمین هزینه این طرح کمال تشکر را دارند.

دارو می تواند بر مقاومت چند دارویی سلول‌های سرطانی غلبه کند(۲۸). مکاتیسم‌های دیگر جلوگیری از انتشار دارو به خارج سلول سرطانی توسط p-gp (گلیکوپروتئین p)(۲۹) و تداخل و تمرکز داخل سلولی دارو توسط نانوذرات می باشند. محل اثر داروی DTX سیتوپلاسم می باشد و نانوذرات به عنوان یک عامل ذخیره کننده دارو در سیتوپلاسم عمل می کنند. در مطالعه‌ای که توسط صارمی و همکاران صورت گرفته است میزان اثر بخشی به دام انداخن دارو توسط نانوذرات تیولات کیتوزان PMMA به روشن ذکر شده بیشتر از ۹۰ درصد ارزیابی شده است که

References

1. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2003; 362(9399): 1907-1917.
2. Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2002; 8(2): 193-199.
3. Guérinne-Voegelein F, Guénard D, Lavelle F, Le Goff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. J Med Chem 1991; 34(3): 992-998.
4. Cascinu S, Graziano F, Barni S, Labianca R, Comella G, Casaretti R, et al. A phase II study of sequential chemotherapy with docetaxel after the weekly PELF regimen in advanced gastric cancer. A report from the Italian group for the study of digestive tract cancer. Br J Cancer 2001; 84(4): 470-474.
5. Ryan DP, Kulke MH, Fuchs CS, Grossbard ML, Grossman SR, Morgan JA, et al. A Phase II study of gemcitabine and docetaxel in patients with metastatic pancreaticcarcinoma. Cancer 2002; 94(1): 97-103.
6. Sinibaldi VJ, Carducci MA, Moore-Cooper S, Laufer M, Zahurak M, Eisenberger MA. Phase II evaluation of docetaxel plus one-day oral estramustine phosphate in the treatment ofpatients with androgen independent prostate carcinoma. Cancer 2002; 94(5): 1457-1465.
7. Wenzel C, Locker GJ, Schmidinger M, Rudas M, Taucher S, Gnant MF, et al. Combined analysis of two phase II trials in patients with primary and advanced breast cancer with epodoxorubicin and docetaxel+granulocyte colony stimulating factor. Anticancer Drugs 2002; 13(1): 67-74.
8. Geng CX, Zeng ZC, Wang JY. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. World J Gastroenterol 2003; 9(4): 696-700.
9. Hebbar M, Ernst O, Cattan S, Dominguez S, Oprea C, Mathurin P, et al. Phase II trial of docetaxel therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Oncology 2006; 70(2): 154-158.
10. Lin HL, Liu TY, Chau GY, Lui WY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiol-



- induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 2000; 89(5): 983-994.
11. Petrylak DP. The treatment of hormone-refractory prostate cancer: docetaxel and beyond. *Rev Urol* 2006; 8 (Suppl 2): S48-55.
 12. Lee E, Kim H, Lee IH, Jon S. In vivo antitumor effects of chitosan-conjugated docetaxel after oral administration. *J Control Release* 2009; 140(2): 79-85.
 13. Kawasaki ES, Player A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine* 2005; 1(2): 101-109.
 14. Kim KY. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine*. 2007; 3(2): 103-110.
 15. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007; 3(1): 20-31.
 16. Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, Ruozzi B, Montenegro L, Pignatello R, ET AL. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int J Pharm* 2006; 325(1-2): 172-179.
 17. Arangoa MA, Ponchel G, Orecchioni AM, Renedo MJ, Duchêne D, Irache JM. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11(4): 333-341.
 18. Dong Y, Feng SS. Poly (d,l-lactide-co-glycolide) montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005; 26(30): 6068-6076.
 19. Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol* 1999; 19(3): 163-165.
 20. Atyabi F, Aghaei Moghaddam F, Dinarvand R, Zohuriaan-Mehr M, Ponchel G. Thiolated chitosan coated poly hydroxyethyl methacrylate nanoparticles: synthesis and characterization. *Carbohydr Polym* 2008; 74: 59-67.
 21. Bernkop-Schnürch A, Kast CE. Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52(2): 127-137.
 22. Feng BH, Zhang ZY. Carboxymethyl chitosan grafted ricinoleic acid group for nanopesticide carriers. *Advanced Materials Research* 2011; 236-238: 1783-1788.
 23. Saremi S, Atyabi F, Akhlaghi SP, Ostad SN, Dinarvand R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 119-128.
 24. Ebrahimnejad P, Dinarvand R, Sajadi SA, Atyabi F, Ramezani F, Jaafari MR. Preparation and characterization of poly lactide-co-glycolide nanoparticles of SN-38. *PDA J Pharm Sci Technol* 2009; 63(6): 512-520.
 25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 26. Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol* 1999; 19(3): 163-165.
 27. Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, Dinarvand R, Atyabi F. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine* 2010; 6(5):

- 689-697.
28. Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm* 2002; 233(1-2): 51-59.
29. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(5): 631-651.