

Assessment of Chitosan Modified Nanoparticles, as Boron Carriers in BNCT

Farshid Hassanzadeh¹,
Hossein Sadeghi²,
Jaleh Varshosaz³,
Hafez Nikbakht Kashkooli⁴,
Mahboubeh Rostami⁵

¹ Associate Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² Associate Professor, Department of Applied Physics, Faculty of Applied Sciences, Malek Ashtar University of Technology, Isfahan, Iran

³ Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Master student in Applied Physics, Faculty of Applied Sciences, Malek Ashtar University of Technology, Isfahan, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received December 11, 2016, Accepted August 5, 2017)

Abstract

Background and purpose: Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a promising radiotherapy based on the accumulation of Boron into the tumor and subsequent irradiation with low energy neutrons. It leads to the decay of ^{10}B to ^7Li and α particle, causing the death of the neoplastic cells. Here we report some chitosan modified nanoparticles bearing boron phenyl alanine (BPA) as an inexpensive novel promising boron containing structures for practical use in BNCT.

Materials and methods: In an experimental study, different BPA-containing nanoparticles of Chitosan (CS) were prepared. Some properties including size and zeta potential were determined by DLS method. The extent of BPA loading was determined using UV-Vis. Spectroscopy and the in-vitro release profiles were analyzed using HPLC method.

Results: Tripolyphosphate (TPP) cross-linked CS-BPA nanoparticles released 51% of the BPA content, TPP cross-linked CS-FA-BPA nanoparticles released 24% of its BPA content and TPP cross-linked CS-SA-FA-BPA nanoparticles released 66% of its BPA content in the same time.

Conclusion: This study introduces two kinds of the Chitosan NPs as BPA carriers. This modified formulations with different release profiles have the opportunity to test in BNCT. Regarding the Chitosan safety and price these systems can be promising candidates in BNCT cancer treatment. In the future studies, the in-vitro neutron capture studies will be carried out to evaluate the boron content efficiency in the prepared formulations.

Keywords: Glioma, Boron neutron capture therapy, nanoparticles, boron phenyl alanine

تهیه و ارزیابی نانو ذرات کیتوزان حاوی بور به منظور کاربرد در روش درمانی گیر اندازی نوترونی بور برای درمان سرطان

فرشید حسن زاده^۱حسین صادقی^۲ژاله ورشوساز^۳حافظ نیکبخت کشکولی^۴محبوبه رستمی^۵

چکیده

سابقه و هدف: روش درمانی گیراندازی نوترونی بور (BNCT) (توانایی بالقوه ای در درمان سرطان گلیوما دارد. این روش بر پایه گیراندازی نوترون توسط اتم‌های B^{10} که از لحاظ نظری توانایی از بین بردن گزینشی سلول‌های تومور را دارد. در این پژوهش، نانو ذرات کیتوزان حاوی بور فنیل آلانین (BPA) برای استفاده در BNCT ساخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کونژوگه‌های کیتوزان/فولات و کیتوزان/فولات/استئارات تهیه و تایید ساختار شدند. نانو ذرات حاوی BPA با روش ژل شدن یونی ساخته و مشخصات فیزیکی و شیمیایی ذرات شامل سایز، پتانسیل سطح، اندکس پلی دیسپرسیتی به وسیله تکنیک DLS، کارایی بارگیری با استفاده از روش طیف سنجی UV-Vis و رهش BPA از نانو ذرات با استفاده از HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: BPA به صورت کمی در نانو ذرات بارگیری شده و مقدار رهش آن از نانو ذرات کیتوزان ۵۱ درصد، برای کیتوزان/فولات ۲۴/۸ درصد و برای کیتوزان/فولات/استئارات ۶۶ درصد می‌باشد.

استنتاج: با توجه به نتایج، دو نوع فرمولاسیون با نرخ رهش سریع و کند به دست آمد که انتخاب هر یک به طرح درمان یعنی مدت زمان تابش، مدت زمان لازم برای تحویل دارو به مغز، دز تابش و... بستگی دارد.

واژه های کلیدی: گلیوما، روش درمانی گیراندازی نوترونی بور (BNCT)، نانو ذرات، BPA (بور فنیل آلانین)

مقدمه

در نهایت مرگ سلول‌های تومور می‌شود (۱). یکی از بارزترین چالش‌های توسعه BNCT، دستیابی به ترکیبات شیمیایی بور دار به نحوی است که اتم بور را با غلظت مناسب در محدوده سلول‌های سرطانی توزیع نماید. یک حامل بور موفق بایستی حداقل توکسیسیته سیستمیک همراه با کلیرانس سریع، جذب گزینشی در

روش درمانی گیراندازی نوترونی بور (BNCT) یک روش درمانی است که از تمایل اتم‌های B^{10} برای گیراندازی نوترون بهره می‌برد. محصولات این واکنش هسته‌ای دارای انرژی خطی بالا با طول مسیر زیر ۱۰ میکرو متر می‌باشند که در محدوده قطر سلولی باعث از بین بردن گستره وسیعی از مولکول‌های فعال زیستی و

Email: m.rostami@pharm.mui.ac.ir

مؤلف مسئول: محبوبه رستمی - اصفهان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ایران

۱. دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیک کاربردی، دانشکده علوم کاربردی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، اصفهان، ایران

۳. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴. دانشجوی رشته فیزیک کاربردی، دانشکده علوم کاربردی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، اصفهان، ایران

۵. استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۳/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۱۴

و کارایی بارگیری دارو در نانو ذرات با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$EE (\%) = \frac{\text{entrapped BPA in NPs}}{\text{total amount of BPA added}} \times 100$$

برای بررسی رهش دارو، مقدار ۱۰۰ میلی گرم از سوسپانسیون بهینه در کیسه دیالیز با نقطه برش ۸۰۰۰ دالتون در مقابل بافر فسفات ۷/۴ دیالیز شد. در فواصل زمانی مشخص از محیط نمونه‌گیری شده و میزان BPA با HPLC (دستگاه Waters، HPLC، Nova-pack-C18، فاز متحرک بافر فسفات (pH 4/7) با سرعت شویش ml/min 2/1 در مدت زمان ۷ دقیقه) در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین و نمودار رهش رسم شد (۱۰).

یافته ها و بحث

با تهیه نانو ساختارهای حاوی بور می‌توان ضریب برداشت آن را توسط سلول‌ها بیش‌تر کرد. در طراحی‌های انجام شده با اتصال فولیک اسید امکان گزینشی‌تر عمل کردن و با قرار دادن گروه‌های هیدرو فوب استئارات خود تجمعی ذرات را به منظور ایجاد سیستم‌هایی با قابلیت رهش کنترل شده افزایش داده ایم. نانو ذرات تهیه شده از پایداری مناسبی به دلیل سایز و پتانسیل سطحی بالا برخوردار هستند.

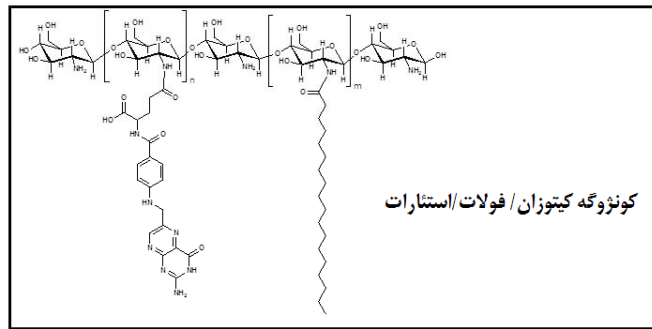
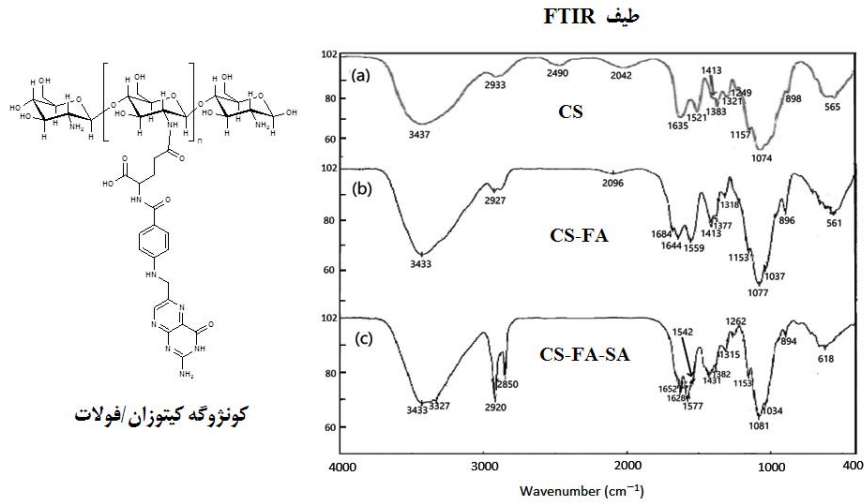
طیف FT-IR و HNMR کونژوگه‌های تهیه شده در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود. در طیف مادون قرمز، علاوه بر باندهای جذبی مشخصه کیتوزان باند جذبی جدیدی در ناحیه ۱۶۸۴ cm⁻¹ دیده می‌شود که مؤید تشکیل پیوند آمیدی جدید می‌باشد. در طیف HNMR کونژوگه کیتوزان/فولات/استئارات، حضور پیک‌های جذبی هر سه جزء به خوبی مشهود است که متقاعد کننده اتصال شیمیایی بین اجزا است.

تومور، حداقل جذب در بافت‌های سالم و پایداری زمانی کافی در تومور برای انجام مراحل درمان را داشته باشد (۲). از میان صدها ترکیب حاوی بور با وزن مولکولی کم به غیر از بوریک اسید و مشتقات ساده اش، دو ترکیب سدیم بوروکاپتات و بور فنیل آلانین (BPA) نوید بخش بود (۳). این دو ترکیب و مشتقاتشان به دلیل ایجاد غلظت گزینشی و بالای بور در محل تومور برای درمان انواع تومور به خصوص گلیوما استفاده می‌شوند (۴). اخیراً نانو ذرات پلیمری حاوی بور مورد توجه قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال می‌توان به نانو کپسول‌های پلی اتیلن گلیکول/بوران اشاره کرد (۵، ۶). موضوع تحقیق حاضر تهیه نانو ذرات کیتوزان/BPA جهت استفاده در BNCT می‌باشد. در این تحقیق از اتصال شیمیایی فولیک اسید و استئاریک اسید برای اصلاح بدنه کیتوزان و ساخت نانو ذرات هدفمند استفاده شده است که انتظار می‌رود کارایی مناسبی در مطالعات برون تنی و بالینی داشته باشند.

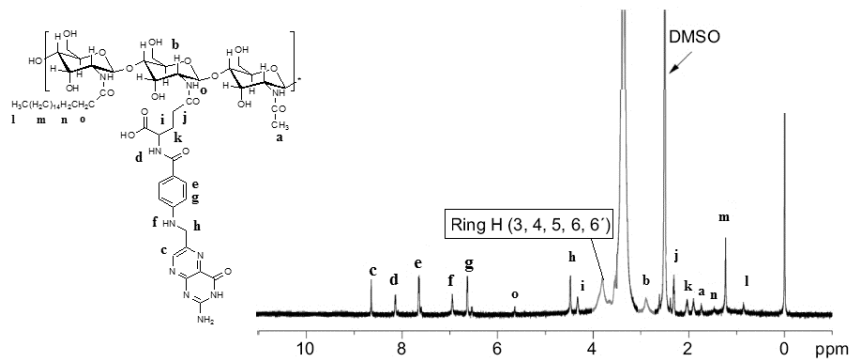
مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، کلیه مواد مورد نیاز از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شد. برای افزایش حلالیت بور فنیل آلانین در آب از فروکتوز (Fr-BPA) استفاده شد (۷). برای سنتز کونژوگه‌های کیتوزان/فولات و کیتوزان/فولات/استئارات با میزان تئوریک استخلاف ۵ درصد، از روش استاندارد استری شدن استفاده شد (۸). ساختار محصولات نهایی با استفاده از بررسی طیفی تایید شدند. نانو ذرات حاوی BPA با استفاده از روش ژل شدن یونی در حضور TPP، به دست آمدند (۹).

اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا با دستگاه زتا سائزر مالورن اندازه گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان BPA در نانو ذرات، ۶۰۰ میکرو لیتر از آن به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. غلظت BPA در محلول رویی در طول موج ۲۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه UV-Vis تعیین



طیف HNMR کونژوگه CS-FA-SA

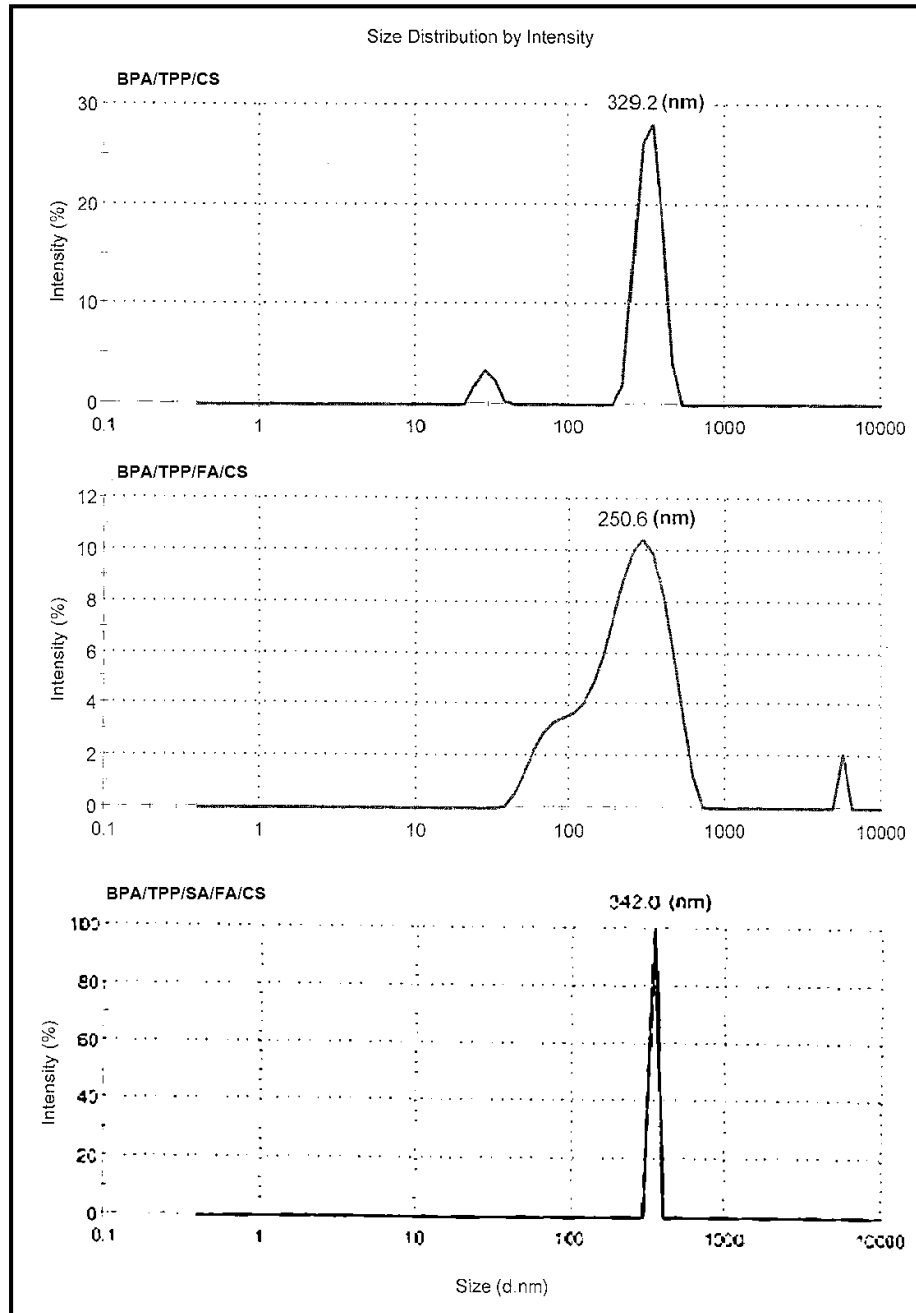


شکل شماره ۱: طیف FTIR و HNMR مربوط کونژوگه های نهایی

جدول شماره ۱: مشخصات فیزیکی نانو ذرات تهیه شده،

PDI	پتانسیل زتا (mV)	سایز ذره ای (nm)	نام فرمول
۰/۶۸	۳۴/۴	۳۴۹/۲	کیتوزان/BPA/TPP
۰/۵۶	۲۵/۲	۲۵۰/۶	کیتوزان/فولات/BPA/TPP
۱/۰۰	۳۴/۸	۳۴۲/۰	کیتوزان/فولات/استنارات/BPA/TPP

اندازه ذرات تهیه شده در بازه ۲۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر (بر اساس نتایج جدول شماره ۱ و شکل شماره ۲) قرار دارد. این اندازه ذره‌ای نسبتاً بالا عمدتاً به دلیل نسبت بالای TPP در تهیه آن‌ها می‌باشد که در بررسی‌های تکمیلی استفاده از نسبت‌های پایین‌تر می‌تواند این نظریه را تایید یارد کند(۱۱).



شکل شماره ۲: نمودار توزیع اندازه ذره ای

می‌باشد قابل قبول است. برای بررسی میزان رهش از HPLC استفاده شد. بر اساس نتایج شکل شماره ۳ برای نانو ذرات کیتوزان تا روز چهارم، نرخ رهش از معادله درجه دو پیروی می‌کند و با توجه به سطح زیر منحنی،

همه‌ی فرمولاسیون‌ها، BPA را به صورت کمی (۵ ± ۹۵ درصد) بارگیری نموده‌اند. این نتیجه با توجه به برهم کنش‌های درون شبکه‌ای که عمدتاً پیوندهای هیدروژنی هستند و به خوبی قادر به نگهداری BPA

ایجاد شبکه سه بعدی BPA را گیر می‌اندازد و اجازه رهش بیش تر را نمی‌دهد، بررسی نسبت‌های دیگر TPP و دارو در ساخت فرمولاسیون لازم است (۱۲).

با توجه به نتایج، رهش BPA از نانو ذرات کیتوزان/ فولات و کیتوزان/ فولات/ استئارات به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین نرخ را دارد. انتخاب فرمولاسیون، وابسته به طرح درمان یعنی مدت زمان تابش، مدت زمان لازم برای تحویل دارو به مغز، دز تابش و... می‌باشد. با توجه به این که این کار با ایده تهیه نمونه‌های کاربردی برای روش BNCT طراحی و اجرا شده است تحقیقات تکمیلی در این زمینه در حال انجام است و از نتایج این پژوهش به عنوان مبنا استفاده خواهد شد.

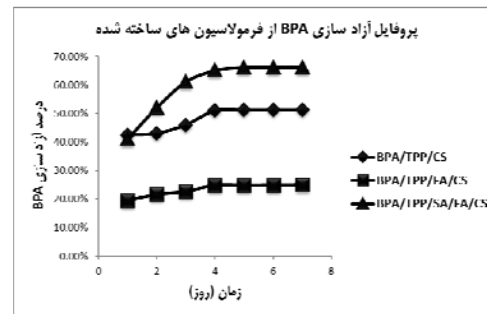
سپاسگزاری

از حمایت‌های دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و دانشگاه صنعتی مالک اشتر جهت تکمیل این طرح تحقیقاتی مشترک تشکر و قدر دانی به عمل می‌آید.

References

- Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res*. 2005;11(11):3987-4002.
- Barth RF. Boron neutron capture therapy at the crossroads: challenges and opportunities. *Appl Radiat Isot*. 2009;67(7-8 Suppl):S3-S6.
- Takagaki M, Oda Y, Miyatake S-I, Kikuchi H, Kobayashi T, Sakurai Y, et al. Boron neutron capture therapy: Preliminary study of BNCT with sodium borocaptate (Na₂B₁₂H₁₁SH) on glioblastoma. *J Neurooncol*. 1997;35(2):177-185.
- Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saari-Lahti K, Atula T, Collan J, et al. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(1):e67-e75.
- Nakamura H, Ueno M, Ban H, Nakai K, Tsuruta K, Kaneda Y, et al. Development of boron nanocapsules for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot*. 2009;67(7):S84-S87.

رهش دارو تقریباً ۵۱ درصد می‌باشد. به همین ترتیب رهش BPA از نانو ذرات کیتوزان/ فولات، ۲۴/۸ درصد و از نانو ذرات کیتوزان/ فولات/ استئارات که تا روز پنجم صعودی است و از معادله نمایی پیروی می‌کند، ۶۶ درصد می‌باشد.



شکل شماره ۳: منحنی رهش BPA از نانو ذرات

آزمایش رهش نشان می‌دهد برای هر سه فرمولاسیون، از روز چهارم تقریباً نمودار به فاز پلاتو رسیده و رهش محسوسی وجود ندارد (بالاترین نرخ رهش ۶۶ درصد)، دلیل این رفتار می‌تواند مرتبط با نسبت TPP به کیتوزان در تهیه فرمولاسیون‌ها باشد که با

6. Simon YC, Ohm C, Zimny MJ, Coughlin EB. Amphiphilic carborane-containing diblock copolymers. *Macromolecules*. 2007;40(16):5628-5630.
7. Bergland R, Elowitz E, Coderre J, Joel D, Chadha M. A Phase 1 trial of intravenous boronophenylalanine-fructose complex in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Neutron Capture Therapy*. New York : Springer; 1996. p. 739-45.
8. Montalbetti CA, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005;61(46):10827-10852.
9. Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RB. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydr Polym*. 2013;94(2):940-945.
10. Dick L, Dooley N, Elliott MA, Ford SJ, Gordon MR, Halbert GW, et al. Boron phenylalanine and related impurities: HPLC analysis, stability profile and degradation pathways. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;56(3):633-636.
11. Koukaras EN, Papadimitriou SA, Bikiaris DN, Froudakis GE. Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. *Mol Pharm*. 2012;9(10):2856-2862.
12. Desai K, Park HJ. Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *J Microencapsul*. 2006;23(1):91-103.