مقایسه اثر سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان- دوسه تاکسل و داروی ضدسرطان دوسه تاکسل بر روی سلول‌های سرطانی سینه MDA-MB-231

زهـرا هداونـد میرزائـی: کارشـناس ارشـد ژنتیـک، گـروه زیسـت شناسـی، دانشـکده علـوم پایـه، واحـد علـوم و تحقیقـات، دانشـگاه آزاد اسـلامی، تهـران، ایـران. zahramirzaee40@yahoo.com

* **شیوا ایرانی:** استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول).s.irani@srbiau.ac.ir

فاطمه اطیابی: استاد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. atyabifa@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: در طی چند دهه اخیر، استفاده از نانوذرات به دلیل خواص منحصر به فرد از حیث زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، انـدازه نـانومتری، افزایش دسترسی زیستی، کاهش اثرات جانبی و ... به‌طور گسترده‌ای مورد توجه محققین قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی میزان سمیت سـلولی نانوذرات کیتوزان- دوسه تاکسل در سلول‌های سرطانی سینه درمان شده به‌وسیله نانوذرات مذکور می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا به‌وسیله‌ی اتصال‌دهنده‌ی سوکسینیک انیدرید بین داروی دوسه تاکسل و کیتوزان پیوند کووالانت برقرار شد و سپس با استفاده از هیالورونیک اسید بار سطحی به حدود ۱۵ تا ۱۶ رسانده شد. کونژوگه حاصل که از پلیمر آبدوست و داروی آبگریـز حاصـل شـده اسـت، تشـکیل نانوذرات خودتجمعی داد و صحت آن بوسیله H^1-NMR تایید شد. تأثیر نانوذرات بر روی سمیت سلولی با استفاده از تکنیـک‌هـای MTT مـورد ارزیـابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که نانوذرات حاصل دارای اندازه ۱۸۰-۱۳۵ نانومتر، پتانسیل زتای مثبت، شکل کروی و سطح صاف هستند. مطالعـات *in vitro* نشان داد که نانوذرات کیتوزان- دوسه تاکسل با گذشت زمان سمیت سلولی مناسب‌تری نسبت به داروی آزاد دارد. نتـایج نشـان داد کـه در مـدت زمـان ۷۲ ساعت سمیت نانوذرات نسبت به داروی آزاد تفاوت معناداری دارد ($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که نانوذره کیتوزان- دوسه تاکسل می‌تواند به عنوان جایگزین داروی آزاد دوسه تاکسل در نظر گرفته شود و به عنـوان ترکیب ضد سرطانی مؤثر مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: کیتوزان، دوسه تاکسل، MDA-MB-231Cell

مقدمه

سـرطان در نتیجـه انباشـته شـدن جهش‌هـای پیکری در سلول‌های بدن ایجاد می‌شود. سلول‌های جهش‌یافته نسبت به سلول‌های سـالم بـدن دارای برتری‌های رقابتی هستند. این سلول‌ها بـا سـرعت بالاتری تکثیر می‌شوند و مواد مغذی و اکسـیژن را از دسترس سلول‌های سالم بدن خـارج می‌کننـد و از رشد و تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کنند. از جهـت دیگر برخلاف سلول‌های سالم سلول‌های سـرطانی در محیط با فقر غذایی آپوپتوز را آغـاز نمی‌کننـد. عـلاوه بـر ایـن سـلول‌های تومـوری بـا ترشـح فاکتورهـای رگ زایـی سـبب تسـریع در ایجـاد رگ‌های جدید می‌شوند، اما سـرعت رگ زایـی بـا سرعت تکثیر سلول‌ها هماهنگ نیسـت و ایـن امـر منجر به ایجاد یک شبکه رگی نامنظم و نفوذپـذیر می‌شود (۱). به‌طورکلی یک توده سرطانی در سـه مرحله تکـوین می‌یابـد: مرحلـه پـیش رگ زایـی، مرحله رگ زایی و مرحله تهـاجم (۲). در مرحلـه پیش رگ زایی سـلول‌های سـرطانی بـه فنـوتیپی دست پیدا می‌کنند که پاسخ‌های تعـادلی موجـود در سلول‌های سالم بدن را غیرفعـال می‌کنـد. ایـن سـلول‌ها بسـیار فعـال هسـتند و از شـبکه رگـی معمولی بدن استفاده می‌کنند، بنابراین سـلول‌های سرطانی در یک محیط اسیدی و کم اکسیژن رشد می‌کنند. در مرحله رگ زایی، ترشح سـیگنال‌های شـیمیایی سـبب سـاخته شـدن رگ‌هـای جدیـد می‌شود و دسترسی سـلول‌های سـرطانی بـه مـواد غذایی را افزایش می‌دهـد. سـلول‌های بـدخیم بـه رشد و تکثیر ادامه می‌دهند و به بافت‌های اطـراف حمله می‌کنند. سرانجام برخی از سلول‌های بدخیم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

توسط سیستم رگی به سایر بافت‌های بدن حمله می‌کنند و مرحله‌ی تهاجم و متاستاز اتفاق می‌افتد (۲،۳). سرطان سینه یکی از متداول‌ترین سرطان‌های شناخته شده در بین زنان سراسر دنیا است. در حال حاضر بیش از یک میلیون زن مبتلا به سرطان سینه در سراسر دنیا وجود دارد، علیرغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زودهنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است همچنان یکی از علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است. پس از سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان محسوب می‌شود که عامل ۱۹٪ از مرگ و میرهای وابسته به سرطان در زنان می‌باشد (۴،۵). سرطان سینه یکی از ۵ سرطان رایج در ایران است، یافته‌ها نشان دادند که سن بروز بیماری بین ۱۵ تا ۸۴ سال می‌باشد که شیوع بیشتر را بین سنین ۴۰ تا ۴۹ سال می‌توان مشاهده نمود. اخیراً گزارش شده که میزان بروز سرطان سینه در ایران حدود ۵۰۰۰ مورد در سال می‌باشد که این تعداد به بیشتر از ۱۵۰۰۰ مورد در سال تا سال ۲۰۳۰ خواهد رسید(۶-۸).

امروزه درمان سرطان شامل روش‌های تهاجمی از قبیل استفاده از کاترها برای انجام شیمی‌درمانی، شیمی‌درمانی اولیه برای کوچک کردن توده‌های سرطانی موجود، جراحی برای خارج کردن تومور و پرتودرمانی است. هدف از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی کشتن سلول‌های سرطانی است که به دلیل رشد و تقسیم بسیار سریع‌تری که نسبت به سلول‌های سالم بدن دارند حساسیت بیشتری به داروهای شیمی‌درمانی و پرتوها نشان می‌دهند. تحقیقات بسیاری برای بهبود روش‌های شیمی‌درمانی در طول ۲۵ سال گذشته منجر به افزایش طول عمر بیماران سرطانی شده است. تحقیقات حاضر در زمینه شیمی‌درمانی به دنبال تهیه حاملان دارویی با مسیرهای ورود دارویی متفاوت، یافتن هدف‌های درمانی جدید از قبیل رگ‌های خونی تغذیه کننده بافت توموری و توسعه اشکال دارویی هدفمند و اختصاصی هستند. این روش‌ها به دنبال افزایش طول عمر بیماران و همچنین بهبود کیفیت زندگی آنان است (۹).

کارایی یک روش درمانی در مبارزه با سرطان به‌طور مستقیم به توانایی انتخابی آن در کشتن سلول‌های سرطانی به‌گونه‌ای که سلول‌های سالم بدن تحت تأثیر قرار نگیرند، بستگی دارد. تنها قابلیت انتخابی در بیشتر روش‌های درمانی فعلی به‌واسطه اثر کشندگی بیشتر عامل درمانی بر روی سلول‌های سرطانی است، اما استفاده از داروهای شیمی‌درمانی همیشه همراه با عوارض جانبی شدیدی است که بیمار معمولاً مجبور به قطع درمان قبل از نابودی کامل توده‌های سرطانی است (۱۰).

دوسه تاکسل دارویی ضد سرطان از خانواده تاکسآن‌ها می‌باشد، تاکسآن‌ها دارای مکانیسم منحصربه‌فردی می‌باشند این‌ها با جلوگیری از انجام تقسیم میتوز در چرخه سلولی باعث مرگ سلولی و عدم تکثیر سلولی می‌شوند. این مواد با اتصال به میکروتوبول‌ها باعث پلیمریزه شدن توبولین شده و در نهایت میتوز و تقسیم سلولی مهار می‌شود، میکروتوبول‌ها در دوک تقسیم سلولی، شکل‌گیری سلول‌ها، حرکت سلولی، اتصال سلولی و انتقال داخل سلولی نقش دارند. تاکسآن‌ها جزو دسته‌ی آلکالوئیدهای گیاهی در داروهای ضد سرطانی می‌باشند و شامل دو داروی پاکلی تاکسل و دوسه تاکسل می‌باشند (۱۱).

در سال‌های اخیر، سیستم‌های نوین دارورسانی به‌خصوص سیستم‌های نانویی مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از توسعه این سیستم‌های نوین که عموماً متشکل از دارو، پلیمر و لیگاندهای هدف‌یابی از قبیل آنتی‌بادی‌ها می‌باشند، رهایش کنترل شده دارو و حفظ غلظت دارو در محدوده درمانی برای مدت زمان مناسب و همچنین انتقال اختصاصی دارو به بافت هدف است. تمرکز عمده سرمایه‌گذاری نانوپزشکی در زمینه انتقال دارو و عوامل تشخیصی با استفاده از سیستم‌های نانو است. این نانوسیستم‌ها دارای اندازه ۱۰۰۰-۱۰ نانومتر هستند. داروها یا عوامل تشخیصی در شبکه نانوذرات حل می‌شود، احاطه می‌شود، به دام می‌افتد، روی سطح جذب می‌شود و یا به آن متصل می‌شود (۱۲، ۱۳).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

انتقال هدفمند دارو به سلول‌های توموری می‌تواند به‌صورت فعال و یا غیرفعال انجام شود. در هدف‌گیری غیرفعال تکنیکی که استفاده می‌شود عبارت است از: به‌کارگیری محیط منحصربه‌فرد اندام هدف. سرعت بالای رگ زایی در بافت‌های توموری برای تأمین نیاز سلول‌های در حال رشد و تکثیر منجر به شبکه مویرگی ناقص و نشت پذیری، امکان دسترسی آسان عوامل شیمی‌درمانی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، برخی داروها را می‌توان به‌گونه‌ای تغییر داد که در هنگام تزریق به‌صورت پیش دارو یا داروی غیرفعال باشند؛ اما در مواجهه با محیط توموری به فرم فعال خود تبدیل شوند. در هدف‌گیری غیرفعال با استفاده از شبکه مویرگی نشت پذیر تومور بسیاری از نانوسامانه‌های دارورسانی از ویژگی افزایش نفوذ و نگه‌داری (Enhanced permeation retention) بافت توموری بهره می‌برند. این ویژگی که اولین بار توسط Maeda تشریح شد (۱۴)، بر پایه دو خصوصیت بافت‌های توموری است:

الف) اندوتلیال مویرگی در بافت بدخیم نامنظم‌تر از بافت‌های سالم است و از نفوذپذیری بالاتری نسبت به ماکرومولکول‌ها برخوردار است. این امر امکان خروج نانوحامل‌های دارویی از رگ‌ها را در اندوتلیال تومور فراهم می‌آورد.

ب) عدم وجود تخلیه لنفاوی در بستر توموری منجر به تجمع دارو در این ناحیه می‌شود. در نتیجه با اتصال داروی شیمی‌درمانی به پلیمر یا حامل مناسب می‌توان تجمع دارو در بافت هدف را به میزان ۱۰ تا ۱۰۰ برابر نسبت به داروی آزاد افزایش داد (۱۵).

هدف‌گیری فعال: تکنیک هدف‌گیری فعال با اتصال مولکول‌های هدف گیرنده به سامانه‌های دارورسانی این امکان را فراهم می‌کند که بتوان دارو را به‌صورت کاملاً اختصاصی به بافت توموری، درون سلول‌های سرطانی، اندامک‌های درون‌سلولی و یا مولکول‌های اختصاصی در سلول‌های سرطانی منتقل کرد. این روش حاملان دارویی را به سمت کربوهیدرات‌های سطحی، رسپتورها و آنتی‌ژن‌های اختصاصی بافت هدف هدایت می‌کنند و به‌خصوص در درمان تومورهای اولیه که هنوز متاستاز نکرده‌اند، مورد توجه است (۱۶).

سیستم‌های دارورسانی پلیمری عموماً برای کنترل زمانی و مکانی انتقال دارو به خدمت گرفته می‌شوند. به دلیل تنوع زیاد پلیمرها، انتخاب و طراحی پلیمر مناسب که دارای عملکردهای شیمیایی، مکانیکی، لایه سطحی و زیستی دلخواه باشد، کاری دشوار و مستلزم شناخت خصوصیات سطحی و توده‌ای پلیمرهاست. پلیمرهای مورد استفاده در سیستم‌های دارورسانی به‌طورکلی به دو دسته زیست تجزیه‌پذیر و زیست تجزیه‌ناپذیر تقسیم‌بندی می‌شوند (۱۷).

انواع مختلفی از پلیمرهای زیست تجزیه‌ناپذیر در سامانه‌های دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که از میان آن‌ها پلیمرهای بر پایه پلی ساکارید و بر پایه آکریلیک به‌طور گسترده در ساخت فرم‌های دارویی دهانی و فیلم‌های پوستی به کار مروند (۱۸).

انواع مختلفی از پلیمرهای زیست تجزیه‌پذیر برای انتقال داروها، ماکرومولکول‌ها، آنزیم‌ها و سلول‌ها سنتز شده‌اند. تجزیه‌پذیری این پلیمرها را می‌توان با وارد کردن گروه‌هایی چون استرها، ارتواسترها، انیدریدها، اوره و اورتان تغییر داد. زیست تجزیه‌پذیری ممکن است دارای ماهیت شیمیایی، آنزیمی یا میکروبی باشد و معمولاً تحت تأثیر عوامل بسیار دیگری قرار می‌گیرد پلیمر کیتوزان از نوع پلیمرهای زیست تجزیه‌پذیر می‌باشد (۱۷). در مطالعه حاضر از پلیمر کیتوزان استفاده شد که در ادامه مورد بحث قرار گرفته است. کیتوزان پلیمری طبیعی است که دارای خواص مطلوبی چون افزایش جذب، رهایش کنترل شده و زیست چسبندگی است. با تغییر درجه داستیلاسیون و مشتق سازی با گروه‌های جانبی مختلف می‌توان خصوصیات این پلیمر را متناسب با کاربردهای مختلف دارورسانی تغییر داد (۱۹).

کیتوزان به‌عنوان پلیمری مناسب در طراحی سیستم‌های دارورسانی مورد توجه است. از مهم‌ترین کاربردهای کیتوزان در دارورسانی می‌توان به تهیه فرمولاسیون‌های مخاط چسب، افزایش حلالیت داروهای نامحلول، دارورسانی هدفمند و افزایش جذب پروتئین‌ها اشاره کرد. با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

کنتـرل درجـه داستیلاسـیون و وزن مولکـولی کیتـوزان می‌تـوان از ایـن پلیمـر بـرای تهیـه سیستم‌های دارورسانی نانو استفاده کـرد. اسـتفاده از کیتـوزان در تهیـه نانوسـامانه‌هـا دارای مزایـای زیادی است که از آن جملـه می‌تـوان بـه رهـایش کنترل شده دارو در نانوحامل‌های کیتوزانی اشـاره کرد. علاوه بـر ایـن در روش‌هـای تهیـه نـانوذرات کیتـوزانی معمـولاً از حلال‌هـای آلـی کـه دارای سمیت هستند استفاده نمی‌شود. وجـود گروه‌هـای آمین در ساختار کیتـوزان امکـان ایجـاد اتصـالات عرضی در شبکه نانوسامانه را فراهم می‌کند کـه از نظر رهایش دارو دارای اهمیت است. همچنـین بـا توجه به بار مثبت این پلیمر می‌توان از آنیون‌هـای چند والانسـی بـه‌عنوان اتصـال‌دهنده‌های عرضـی استفاده کرد (۲۰). هدف از مطالعه حاضر تهیه‌یک سامانه دارورسانی برای انتقال داروی ضـد سـرطان دوسه تاکسل می‌باشد. پلیمر مورد انتخاب کیتوزان است که جهـت انتقـال داروی دوسـه تاکسـل بـه سلول‌های سرطانی سینه مورد استفاده قرار گرفته است.

روش کار

تهیه کیتوزان با وزن مولکولی دلخواه

دپلیمریزه کردن کیتوزان بـه روش تجزیـه اکسیداتیو: در محلول اسید اسـتیک ۶ درصـد ۲ گرم پودر کیتوزان با وزن مولکولی (KD 400) حل نموده تا محلول 2% (W/V) از کیتوزان به دسـت آید. برای تهیه پلیمر کیتوزان با وزن مولکولی KD 10، mL10 محلـول سـدیم نیتریـت بـا غلظـت 14 mg/mL به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول کیتـوزان اضافه شد. این محلول به مدت ۱ ساعت در دمـای اتاق تحت هم زدن مغناطیسی قرار گرفت. واکنش دپلیمریزاسـیون بـا افـزودن محلـول ۱ مـولار از NaOH و افزایش PH تا ۹ متوقف شـد، کیتـوزان دپلیمریزه شده رسوب می‌کند و رسوب حاصـل بـا استفاده از قیف بوخنر و تحت خلأ جداسازی شد و ۳ بار با استون شستشو داده شد. توده خشک شده در حداقل حجمی از استیک اسید ۰/۱ مولار حـل شده و دو بار به مدت ۹۰ دقیقه و سپس یک شب تا صبح در مقابل آب دیونیزه دیـالیز شـد. محلـول دیالیز شده فریز شده و توسط دسـتگاه خشـک‌کن انجمادی تحت شرایط خـلأ در دمـای ۳۰- درجـه سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۱ میلی بار لیوفیلیزه شد تـا پودر سفید رنگی به دست آید.

کونژوگه کیتـوزان – دوسـه تاکسـل: بـرای تهیه‌ی کونژوگه کیتوزان – دوسه تاکسل، ابتـدا بـا اسـتفاده از سوکسـینیک انیدریـد مشـتق کربوکسیله‌ی دوسـه تاکسـل (سوکسـینیل دوسـه تاکسل) تهیه می‌شود. سپس در مرحلـه‌ی بعـد بـا اسـتفاده از واکنشـگرهای EDC و NHS، پیونـد استری بین گروه‌های کربوکسیل سوکسینیل دوسه تاکسل و گروه‌های آمین کیتوزان ایجاد می- شـود (۲۱).

EDC و NHS از مهم‌تـرین واکنشـگرهای مـورد استفاده برای اتصال گروه کربوکسیل به آمین نـوع اول هستند و در کاربردهای مختلفی از جمله سنتز پپتیـدها و نشـاندار کـردن اسـیدهای نوکلئیـک از طریق گروه فسفات مورد استفاده قـرار می‌گیرنـد. EDC با گروه کربوکسیل واکنش می‌دهد و تشکیل یک حد واسطی را می‌دهد که می‌تواند با آمین نوع اول واکنش و تشکیل پیوند آمیدی دهد، امـا ایـن مولکول حدواسط ناپایدار و حسـاس بـه هیـدرولیز است، با افـزودن NHS ایـن حـد واسـط بـه اسـتر NHS تبدیل می‌شـود. ایـن اسـتر دارای پایـداری کافی برای انجام واکنش با گروه آمین است و ایـن امر کارایی واکنش اتصالی را افزایش می‌دهـد (۲۲, ۲۳).

تهیه دوسه تاکسل همی سوکسـینات: ۵۰۰ میلـی‌گـرم دوسـه تاکسـل در ۱۲۴ میلـی گـرم سوکسینیک انیدرید به همراه ۲۱۶ میکرولیتر تری اتیل آمین خشک و ۶ میلی‌لیتر دی کلرومتان حل شد و واکنش به مدت ۴۸ ساعت در دمـای اتـاق و در تاریکی تحت هم زدن مغناطیسی ادامـه یافـت، به محلول حاصل ۳۸ میلی‌لیتر بـافر فسـفات =PH ۹/۵) اضافه شد و واکنش به مدت سه و نیم ساعت ادامه یافت، سپس به محصول بـه دسـت آمـده در حالی که تحت هم زدن مغناطیسی قرار دارد اسید فسفریک ۸۵٪ اضافه می‌شود تا PH محلـول بـه ۴ برسد و واکنش به مدت نـیم سـاعت ادامـه یافـت. پس از اتمام مدت زمان واکنش محصول به دسـت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

آمده به دکانتور انتقال داده می‌شود و ۴۸ ساعت زمان داده می‌شود تا فاز آلی از حالت امولسیون خارج شود، به عبارت دیگر محلول شیری رنگ اولیه ابتدا بوسیله اسید فسفریک ۸۵٪ دو فاز شد سپس پس از ۴۸ ساعت از حالت امولسیون خارج شد. فاز آلی که فاز پایینی است و حاوی دوسه تاکسل و دوسه تاکسل همی سوکسینات است جدا می‌شود و تحت شرایط خلأ قرار داده شد تا محلول حاصل خشک شود (۲۴).

طیف سنجی ^1H NMR کونژوگه کیتوزان- دوسه تاکسل: طیف ^1H NMR کونژوگه کیتوزان- دوسه تاکسل در آب دوتره (D2O) تهیه شد. برای دوسه تاکسل همی سوکسینات از DMSO به‌عنوان حلال استفاده شد.

تهیه نانوذرات خودتجمعی از کیتوزان- دوسه تاکسل: کیتوزان- دوسه تاکسل با غلظت‌های (۰/۵ mg/ml) در آب حل شدند. در حالی که در دمای محیط تحت هم زدن مغناطیسی قرار داده می‌شوند.

تعیین اندازه، پتانسیل زتا و ضریب پراکندگی ذرات: پراش دینامیک نور (DLS) روشی مناسب برای اندازه گیری اندازه ذرات در حد چند نانومتر تا چند میکرون است. مزیت مهم این روش، زمان کوتاه (چند دقیقه) برای اندازه گیری ذرات است، درضمن این روش از نظر هزینه و فضا نیز نسبت به سایر روش‌ها برتری دارد. اندازه نانوذرات با روش پراش دینامیک نور توسط دستگاه نانوسایزر مجهز به لیزر سبز با طول موج نور ۶۳۳ نانومتر در زاویه ۹۰ درجه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری می‌شود، همچنین بار سطحی الکتروستاتیک ذرات توسط دستگاه نانوسایزر مرد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان- دوسه تاکسل و داروی آزاد: هنگامی که میزان پوشیده شدن سطح کشت به ۹۰٪ رسید، پاساژ سلولی ضرورت می‌یابد. مراحل انجام پاساژ سلولی به‌صورت زیر است (۲۵).

۱- محیط کشت قدیمی خارج می‌شود.

۲- مقدار ۲ میلی‌لیتر بافر PBS به سلول‌های چسبیده به سطح فلاسک اضافه می‌شود، بافر PBS برای حذف مقادیر جزئی باقیمانده سرم که ممکن است مانع عمل تریپسین شود اضافه می‌شود.

۳- بافر PBS خارج می‌شود.

۴- مقدار ۱ میلی‌لیتر تریپسین ۰/۲۵٪ اضافه می‌شود.

۵- سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده تا از سطح فلاسک و از یکدیگر جدا شوند.

۶- برای جلوگیری از ادامه تأثیر تریپسین و تخریب سلولی،۲ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم اضافه می‌شود.

۷- محتویات فلاسک به لوله سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۵ دقیقه با دور 1200 rpm سانتریفیوژ می‌شود و سپس محلول رویی خارج می‌شود.

۸- دو میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم به سلول‌های ته نشین شده اضافه و به‌طور کامل مخلوط می‌شود. حجم مناسب از سوسپانسیون سلولی به فلاسک حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه می‌شود.

۹- فلاسک به انکوباتور $37\ ^{\circ}C$ و ۵٪ CO_2 منتقل می‌شود.

سلول‌ها در فلاسک های مربوطه و به روشهای اشاره شده در بالا کشت داده شدند و ۲۴ ساعت قبل از بررسی و انجام آزمایشات مربوطه، شمارش شده و به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک ظرف کشت سلول ۹۶ خانه ای در $100\mu l$ کاشته شد. ظرف کشت سلول حاصل در انکوباتور $37^{\circ}C$ با O_2٪ انکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کاشت سلول‌ها و رسیدن سلول‌ها به یک سطح کشت یکنواخت به آنها مقدار ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰ یکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی آزاد و نانوذرات به‌عنوان کنترل مثبت اضافه شد و به‌عنوان کنترل منفی نیز تنها از محیط کشت استفاده شد. برای افزایش دقت هر آزمایش برای ۴ چاهک تکرار شد. پس از گذشت مدت زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان سلول‌های زنده به روش MTT شمارش شد. درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به کنترل از تقسیم میانگین OD (Optical Density)خوانده شده در هر گروه (در ۴ چاهک) بر میانگین OD چاهک های کنترل ضرب در ۱۰۰ به دست می‌آید.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

یافته‌ها

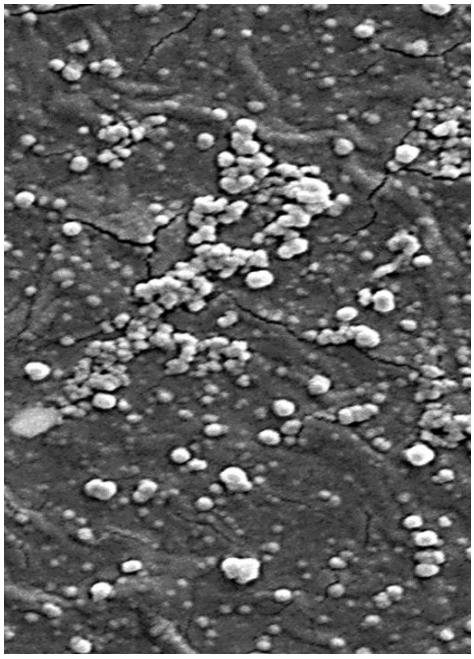
بررسی خصوصیات نانوذرات: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دهنده ی نانوذراتی کروی با سطح صاف و توزیع اندازه باریک است.

بررسی نانوذرات خودتجمعی کیتوزان- دوسه تاکسل: اندازه ذرات حاصل بین ۱۵۰ نانومتر بوده است، پتانسیل زتا و ضریب پراکندگی نانوذرات به ترتیب ۲۰mv و ۰/۲ به دست آمد.

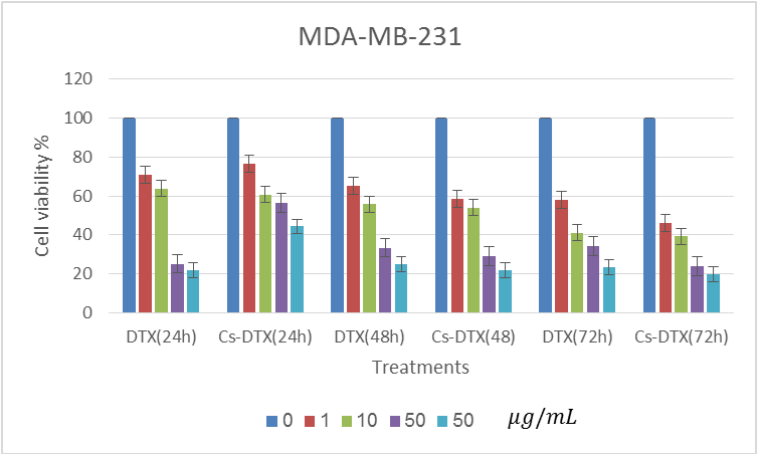
مطالعات سلولی (*In vitro*): شکل شماره ۲ نشان دهنده سمیت سلولی نانوذرات حاوی دوسه تاکسل در مقایسه با داروی آزاد می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان سینه یکی از متداول‌ترین سرطان‌های شناخته شده در بین زنان سراسر دنیا است. اگرچه گزینه های درمانی معمول از قبیل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در دهه گذشته پیشرفت داشته اند اما درمان سرطان هنوز به حد مطلوب نرسیده است و سرطان سینه معمولاً علاج ناپذیر است و به‌عنوان یک چالش بالینی اساسی مطرح است. مقاومت ذاتی یا کسب شده سلول‌های سرطانی به



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی حاصل از کونژوگه کیتوزان- دوسه تاکسل: نانوذرات کروی و با سطح صاف مشاهده می شود.



شکل ۲- مقایسه اثرات سمیت نانوذره حاوی دارو در مقایسه با داروی آزاد بر روی رده سلولی مورد نظر. میزان سمیت نانوذرات در ۷۲ ساعت به طور معناداری از داروی آزاد بیشتر است ($p<0.05$)*.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

شیمی‌درمانی، مشکل اساسی است که در بیماران مبتلا به سرطان سینه منجر به مرگ می‌شود (۶، ۲۶، ۲۷).

در تحقیق حاضر از داروی دوسه تاکسل که یک داروی شیمی‌درمانی است برای تیمار سلول MCF-7 استفاده شد.

شیمی‌درمانی از روش‌های اصلی در درمان سرطان به حساب می آید. متاسفانه علی رغم تلاش های انجام گرفته در طی چند دهه گذشته در زمینه کشف داروی ضد سرطان، عوامل شیمی‌درمانی از اختصاصیت پایینی برای بافت توموری برخوردار هستند و عموماً همراه با عوارض جانبی بر روی بافت‌های سالم بدن هستند که میزان دوز مصرفی این داروها را محدود می‌کنند. در تحقیق حاضر از نانوذره کیتوزان- دوسه تاکسل به‌عنوان نانوحامل دارویی استفاده شد.

مطالعات زیادی در جهت سنتز کونژوگه داروهای ضد سرطانی با پلیمر ها، پلی پپتیدها، پلی دکسترآن‌ها و آلبومین به منظور افزایش اثر ضد سرطانی و کاهش عوارض سیستمیک دارویی انجام شده است، این مطالعات نشان داده که ماکرومولکول‌هایی مانند آلبومین، کیتوزان و پلیمرهای سنتتیک در بافت تومور تجمع پیدا می‌کنند که این ویژگی به دلیل افزایش نفوذپذیری شبکه تومور در ضمن نبود سیستم شستشو و حذف لنفاوی می‌باشد (۲۸, ۲۹).

علاوه بر این، کونژوگه کردن دارو با ماکرومولکول‌ها باعث آزاد سازی آهسته دارو می‌شود، در این صورت احتیاج به یک مرحله شکست باند بین ماکرومولکول و دارو و آزاد سازی دارو بوجود می آید (۳۰). در مطالعه حاضر از روش کونژوگه کردن دارو به پلیمر کیتوزان استفاده شد. بررسی های بسیاری بر روی نانوذرات مختلف حامل داروی دوسه تاکسل و همینطور استفاده از کیتوزان به‌عنوان حامل دارویی برای القای مرگ سلولی صورت گرفته است، در پژوهشی در سال ۲۰۰۹ نانوذره آلبومین- دوسه تاکسل تهیه کرده و اثر سمیت سلولی آن را روی رده‌های سلولی T47D و SKOV3 بررسی کردند، آن‌ها توانستند میزان ورود نانوذرات را به بافت توموری افزایش دهند و از این طریق مقدار داروی بیشتری در محل اثر بارگذاری کنند(۳۱). در بررسی در سال ۲۰۰۸ کونژوگه ای از کیتوزان- پاکلی تاکسل تهیه شد و اثر سمیت سلولی آن روی سلول‌های سرطانی سینه، ریه و تخمدان بررسی شد،نتایج حاکی از آن بود که اثر سمیت داروی آزاد و متصل به کیتوزان تقریبا مشابه بود (۳۲).

در پژوهشی در سال ۲۰۰۹ کونژوگه ای از کیتوزان- دوسه تاکسل تهیه شد و اثر سمیت سلولی آن روی دوسلول سرطانی انسان (گلیوبلاستوما و شش) بررسی شد، نتایج نشان داد که کارایی کونژوگه حاصل دارای اثر بخشی یکسان با دارو به تنهایی است با این تفاوت که اثر نامطلوب دارو روی وزن بدن و سمیت هماتولوژیکی در مطالعات In vivo دیده نشد (۲۱).

در پژوهش حاضر از کونژوگه کیتوزان- دوسه تاکسل استفاده شد که علاوه بر آن به شکل نانوذره تهیه شد. مطالعه ای در سال ۲۰۱۱ یک سیستم دارورسانی نانو برای انتقال هدفمند ترکیب شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین تهیه کردند که نانوذرات تهیه شده از جنس کربوهیدرات کیتوزان بوده و از آنتی بادی هرسپتین به‌عنوان مولکول هدف گیرنده استفاده شده بود، آنها نشان دادند که در غلظت های بالای دارو اثر سمیت سلولی نانوذرات متصل به آنتی بادی بیشتر از نانوذرات فاقد آنتی بادی است اما در مقایسه با داروی آزاد، نانوذرات سمیت کمتری بر روی سلول‌ها نشان دادند، از سوی دیگر آنها بیان کردند که مطالعه فلورسانس برداشت نانوذرات توسط سلول‌های MCF-7(Her2-) و SKOV-3(Her2+) به روشنی بر انتخاب پذیری و هدفمند بودن نانوذرات کیتوزان- دوکسوروبیسین دلالت دارد بنابراین سمیت نسبی پایین تر نانوذرات ناشی از عدم ورود نانوذرات نیست به نظر می رسد اتصال کوالان دوکسوروبیسین به کیتوزان از فعالیت مؤثر دارو می کاهد (۱).

در پژوهشی در سال ۲۰۱۱ از دو نانوذره کیتوزان در درمان سرطان استفاده شد که در یک نوع از نانوذرات دارو بصورت کونژوگه به کیتوزان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

متصل شده بود ودر نوع دیگر بصورت بارگذاری شده، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هر دو سیستم در محیط آبی پراکنده شده و شکل پایدار خود را حفظ کردند اما نانوذره ای که دارو به آن کونژوگه شده بود پتانسیل بیشتری برای آزاد کردن دارو در بافت تومور دارا می‌باشند (۳۳). در یک بررسی در سال ۲۰۱۱ نانوذرات کیتوزان تیوله بارگذاری شده با دوسه تاکسل تهیه کردند، آنها نشان دادند که سمیت نانوذرات تهیه شده از کیتوزان تیوله حاوی دارو بر روی سلول‌های Caco-2 در اغلب غلظت ها بیشتر از داروی تنها می‌باشد و در سلول MCF-7 سمیت نانوذرات حاوی دارو در مقایسه با دارو به تنهایی تقریبا مشابه است (۳۴). تهیه چنین سیستم‌های دارورسانی در ابعاد نانو، باعث دارورسانی غیرفعال به بافت‌های توموری با استفاده از شبکه نشت پذیر تومور و کاهش اثرات جانبی داروها در دیگر بافت‌های بدن می‌شود (۳۵).

میزان پراکندگی محاسبه شده توسط دستگاه DLS به‌طور رضایت بخشی پایین بود و حاکی از عدم بهم پیوستگی (Aggregate) نانوذرات بود. پتانسیل زتای مثبت ایجاد شده در نانوپارتیکل ها جهت جذب بهتر نانوپارتیکل ها به سلول‌های سرطانی که به دلیل حضور فسفولیپیدهای فراوان در غشای سلولی خود دارای شارژ منفی هستند، امری مطلوب است.

بر اساس نتایج نشان داده شد که نانوذره کیتوزان- دوسه تاکسل از نظر سمیت سلولی حساسیت بیشتری روی رده ی سلولی MDA-MB-231 نسبت به داروی آزاد دارند، بطور خلاصه نتایج نشان داد که نانوذرات کیتوزان-دوسه تاکسل می‌تواند به‌عنوان جایگزین داروی آزاد دوسه تاکسل در نظر گرفته شود و به‌عنوان ترکیب ضد سرطانی مؤثر مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1. Yousefpour P, Atyabi F, Vasheghani-Farahani E, Movahedi A, Dinarvand R. Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab. Int J Nanomedicine; 2011.6:1977-90.

2. Weinberg R. The biology of cancer: Garland science; 2013.

3. Moreira J, Deutsch A. Cellular automaton models of tumor development: a critical review. Advances in Complex Systems; 2002.5(02n03):247-67.

4. Thongsuksai P, Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care :a study in Thai women. Medical care; 2000.38(1):108-14.

5. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians; 2008.58(2):71-96.

6. Vostakolaei FA, Broeders MJ, Mousavi SM, Kiemeney LA, Verbeek AL. The effect of demographic and lifestyle changes on the burden of breast cancer in Iranian women: A projection to 2030. The Breast; 2013.22(3):277-81.

7. Brook A, Homaie F, Tavakkol Afshari J, Ganjali R, Afzalaghaee M, Mousavi SM, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13 (4): 383-91. Armaghane danesh; 2011.15(4):316-24.

8. Shadi Kolahdoozan M, Alireza Sadjadi M, Radmard AR, Hooman Khademi M. Five common cancers in Iran. Archives of Iranian medicine; 2010.13(2):143.

9. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Advanced drug delivery reviews; 2004.56(11):1649-59.

10. Feng SS, Chien S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. Chemical Engineering Science; 2003.58(18):4087-114.

11. Wang LF, Yin HT, Qian XP, Wei J, Zhao Y, Yu LX, et al. Beta-tubulin III mRNA expression and docetaxel sensitivity in non-small cell lung cancer. Clinical & Investigative Medicine; 2009.32(6):278-84.

12. Duncan R, Vicent M, Greco F, Nicholson R. Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endrocine-related cancer. Endocrine-related cancer; 2005.12(Supplement 1): S189-S99.

13. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 2007.5(1):561-73.

14. Maeda H, Matsumura Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems; 1988.6(3):193-210.

15. Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Molecular cancer therapeutics; 2006.5(8):1909-17.

16. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. Nano today; 2007. 2(3):14-21.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

17. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. Current opinion in chemical biology; 2001.5(4):447-51.

18. Ravi Kumar MN, Kumar N. Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities. Drug development and industrial pharmacy; 2001.27(1):1-30.

19. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. Pharmaceutical Science & Technology Today; 1998.1(6):246-53.

20. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. Journal of controlled release; 2004.100(1):5-28.

21. Lee E, Kim H, Lee IH, Jon S. In vivo antitumor effects of chitosan-conjugated docetaxel after oral administration. Journal of Controlled Release; 2009.140(2):79-85.

22. Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters . Analytical biochemistry; 1990.185(1):131-5.

23. Hermanson GT. Bioconjugate techniques: Academic press; 2013.

24. Liu J, Zahedi P, Zeng F, Allen C. Nano-sized assemblies of a PEG-docetaxel conjugate as a formulation strategy for docetaxel. Journal of pharmaceutical sciences; 2008.97(8):3274-90.

25. Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. John Wiley and Sons, inc; 2010.

26. Aljarrah K, Mhaidat NM, Al-Akhras MAH, Aldaher AN, Albiss B, Aledealat K, et al. Magnetic nanoparticles sensitize MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. World journal of surgical oncology; 2012.10(1):1.

27. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. The breast journal; 2007.13(4):383-91.

28. John TA, Vogel SM, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology; 2003.284(1):L187-L96.

29. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients: Pharmaceutical press; 2009.

30. Lee JW, Lu JY, Low P, Fuchs P. Synthesis and evaluation of taxol–folic acid conjugates as targeted antineoplastics. Bioorganic & medicinal chemistry; 2002.10(7):2397-414.

31. Esmaeili F, Dinarvand R, Ghahremani MH, Amini M, Rouhani H, Sepehri N, et al. Docetaxel–albumin conjugates: preparation, in vitro evaluation and biodistribution studies. Journal of pharmaceutical sciences; 2009.98(8):2718-30.

32. Lee E, Lee J, Lee IH, Yu M, Kim H, Chae SY, et al. Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel. Journal of medicinal chemistry; 2008.51(20):6442-9.

33. Lee SJ, Koo H, Lee DE, Min S, Lee S, Chen X, et al. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. Biomaterials; 2011. 32(16):4021-9.

34. 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(1):119-28.

35. Frank D, Tyagi C, Tomar L, Choonara YE, du Toit LC, Kumar P, et al. Overview of the role of nanotechnological innovations in the detection and treatment of solid tumors. International journal of nanomedicine; 2014.9(1):589-613.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

Comparison of cytotoxicity of chitosan- docetaxel nanoparticles and docetaxel anticancer drug on MDA-MB-231 breast cancer cells

*** Zahra Hadavand Mirzaie**, MSc, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. zahramirzaee40@yahoo.com
***Shiva Irani**, Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (*Corresponding author). s.irani@srbiau.ac.ir
Fatemeh Atyabi, Professor, Nanotechnology Research Centre, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. atyabifa@tums.ac.ir

Abstract

Background: To date, the unique characteristics of nanoparticles in terms of biocompatibility, biodegradability, and particle size and bioavailability, reduced side effects and etc. have attended many researchers. The main aim of this study was to determine effects of chitosan conjugated to docetaxel nanoparticles in treatment of breast cancer.
Methods: The self-assembled nanoparticles were prepared though conjugation of docetaxel, using succinic anhydride as a linker. Conjugation was confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) studies. Evaluation was *in vitro* cytotoxicity of the nanoparticles by MTT assay.
Results: The results indicated that prepared nanoparticles have spherical shape with narrow size distribution around 150 nm with positive zeta potential. According to *in vitro* studies, we observed increased cell death in treat by nanoparticles
Conclusion: Our findings showed that docetaxel-chitosan nanoparticles can be suggested as an alternative of docetaxel anticancer medicine for breast cancer treatment.

Keywords: Chitosan-docetaxel, MDA-MB-231 cells

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]