

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

زهرا هداوند میرزائی: کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. zahramirzaee40@yahoo.com

* شیوا ایرانی: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول). s.irani@srbiau.ac.ir
فاطمه اطیابی: استاد، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. atyabifa@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۰

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، اندازه نانومتری، افزایش دسترسی زیستی، کاهش اثرات جانبی و ... به طور گسترده‌ای مورد توجه محققین قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی میزان سمیت سلولی نانوذرات کیتوزان - دوسه تاکسل در سلول‌های سرطانی سینه درمان شده به وسیله نانوذرات مذکور می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا به وسیله‌ی 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 آبیگریز حاصل شده است، تشکیل نانوذرات خودتجمعی داد و صحت آن بوسیله H^1-NMR تایید شد. تأثیر نانوذرات بر روی سمیت سلولی با استفاده از تکنیک‌های MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که نانوذرات حاصل دارای اندازه ۱۸۰-۱۳۵ نانومتر، پتانسیل زتای مثبت، شکل کروی و سطح صاف هستند. مطالعات *in vitro* نشان داد که نانوذرات کیتوزان - دوسه تاکسل با گذشت زمان سمیت سلولی مناسب‌تری نسبت به داروی آزاد دارد. نتایج نشان داد که در مدت زمان ۷۲ ساعت سمیت نانوذرات نسبت به داروی آزاد تفاوت معناداری دارد ($P \leq 0.05$).

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

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

مقدمه

می‌شود (۱). به‌طور کلی یک توده سرطانی در سه مرحله تکوین می‌یابد: مرحله پیش رگ زایی، مرحله رگ زایی و مرحله تهاجم (۲). در مرحله پیش رگ زایی سلول‌های سرطانی به فنوتیپی دست پیدا می‌کنند که پاسخ‌های تعادلی موجود در سلول‌های سالم بدن را غیرفعال می‌کند. این سلول‌ها بسیار فعال هستند و از شبکه رگی معمولی بدن استفاده می‌کنند، بنابراین سلول‌های سرطانی در یک محیط اسیدی و کم اکسیژن رشد می‌کنند. در مرحله رگ زایی، ترشح سیگنال‌های شیمیایی سبب ساخته شدن رگ‌های جدید می‌شود و دسترسی سلول‌های سرطانی به مواد غذایی را افزایش می‌دهد. سلول‌های بدخیم به رشد و تکثیر ادامه می‌دهند و به بافت‌های اطراف حمله می‌کنند. سرانجام برخی از سلول‌های بدخیم

سرطان در نتیجه انباشته شدن جهش‌های پیکری در سلول‌های بدن ایجاد می‌شود. سلول‌های جهش‌یافته نسبت به سلول‌های سالم بدن دارای برتری‌های رقابتی هستند. این سلول‌ها با سرعت بالاتری تکثیر می‌شوند و مواد مغذی و اکسیژن را از دسترس سلول‌های سالم بدن خارج می‌کنند و از رشد و تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کنند. از جهت دیگر برخلاف سلول‌های سالم سلول‌های سرطانی در محیط با فقر غذایی آپوپتوز را آغاز نمی‌کنند. علاوه بر این سلول‌های توموری با ترشح فاکتورهای رگ زایی سبب تسریع در ایجاد رگ‌های جدید می‌شوند، اما سرعت رگ زایی با سرعت تکثیر سلول‌ها هماهنگ نیست و این امر منجر به ایجاد یک شبکه رگی نامنظم و نفوذپذیر

آنان است (۹).

کارایی یک روش درمانی در مبارزه با سرطان به طور مستقیم به توانایی انتخابی آن در کشتن سلول‌های سرطانی به گونه‌ای که سلول‌های سالم بدن تحت تأثیر قرار نگیرند، بستگی دارد. تنها قابلیت انتخابی در بیشتر روش‌های درمانی فعلی به واسطه 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 تاکسان‌ها می‌باشد، تاکسان‌ها 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 توپولین 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. تاکسان‌ها جزو دسته‌ی آکالوئیدهای گیاهی در داروهای ضد سرطانی می‌باشند و شامل دو داروی پاکلی تاکسل و دوسه تاکسل می‌باشند (۱۱).

در سال‌های اخیر، سیستم‌های نوین دارورسانی به خصوص 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 ۱۰۰-۱۰ 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).

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

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 به‌طور کلی 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 آکرلیک به‌طور گسترده در ساخت فرم‌های دارویی دهانی و فیلم‌های پوستی به کار می‌روند (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 مشتق‌سازی 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

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 رگ‌زایی در بافت‌های توموری برای تأمین نیاز سلول‌های در حال رشد و تکثیر منجر به شبکه مویرگی ناقص و نشت‌پذیری، امکان دسترسی آسان عوامل شیمی‌درمانی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، برخی داروها را می‌توان به‌گونه‌ای تغییر داد که در هنگام تزریق به‌صورت پیش‌دارو یا داروی غیرفعال باشند؛ اما در مواجهه با محیط توموری به فرم فعال خود تبدیل شوند. در هدف‌گیری غیرفعال با استفاده از شبکه مویرگی نشت‌پذیر 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 هدف‌گیرنده 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

دیالیز شده فریز شده و توسط دستگاه خشک کن انجمادی تحت شرایط خلأ در دمای ۳۰- درجه سانتی گراد و فشار ۰/۰۱ میلی بار لیوفیلیزه شد تا پودر سفید رنگی به دست آید.

کونژوگه کیتوزان - دوسه تاکسل: برای تهیه‌ی کونژوگه کیتوزان - دوسه تاکسل، ابتدا با استفاده از سوکسینیک انیدرید مشتق کربوکسیله‌ی دوسه تاکسل (سوکسینیل دوسه تاکسل) تهیه می‌شود. سپس در مرحله‌ی بعد با استفاده از واکنشگرهای EDC و NHS، پیوند استری بین گروه‌های کربوکسیل سوکسینیل دوسه تاکسل و گروه‌های آمین کیتوزان ایجاد می‌شود (۲۱).

EDC و NHS از مهم‌ترین واکنشگرهای مورد استفاده برای اتصال گروه کربوکسیل به آمین نوع اول هستند و در کاربردهای مختلفی از جمله سنتز پپتیدها و نشاندار کردن اسیدهای نوکلئیک از طریق گروه فسفات مورد استفاده قرار می‌گیرند. 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، اما این مولکول حدواسط ناپایدار و حساس به هیدرولیز است، با افزودن NHS این حد واسط به استر NHS تبدیل می‌شود. این استر دارای پایداری کافی برای انجام واکنش با گروه آمین است و این امر کارایی واکنش اتصالی را افزایش می‌دهد (۲۲).

تهیه دوسه تاکسل همی سوکسینات: ۵۰۰ میلی‌گرم دوسه تاکسل در ۱۲۴ میلی‌گرم سوکسینیک انیدرید به همراه ۲۱۶ میکرولیتر تری اتیل آمین خشک و ۶ میلی‌لیتر دی کلرومتان حل شد و واکنش به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی تحت هم زدن مغناطیسی ادامه یافت، به محلول حاصل ۳۸ میلی‌لیتر بافر فسفات $\text{PH}=9/5$ اضافه شد و واکنش به مدت سه و نیم ساعت ادامه یافت، سپس به محصول به دست آمده در حالی که تحت هم زدن مغناطیسی قرار دارد اسید فسفریک ۰/۸۵٪ اضافه می‌شود تا PH محلول به ۴ برسد و واکنش به مدت نیم ساعت ادامه یافت. پس از اتمام مدت زمان واکنش محصول به دست

کنترل درجه داستیلاسیون و وزن مولکولی کیتوزان می‌توان از این پلیمر برای تهیه سیستم‌های دارورسانی نانو استفاده کرد. استفاده از کیتوزان در تهیه نانوسامانه‌ها دارای مزایای زیادی است که از آن جمله می‌توان به رهایش کنترل شده دارو در نانوحامل‌های کیتوزانی اشاره کرد. علاوه بر این در روش‌های تهیه نانوذرات کیتوزانی معمولاً از حلال‌های آلی که دارای سمیت هستند استفاده نمی‌شود. وجود گروه‌های آمین در ساختار کیتوزان امکان ایجاد اتصالات عرضی در شبکه نانوسامانه را فراهم می‌کند که از نظر رهایش دارو دارای اهمیت است. همچنین با توجه به بار مثبت این پلیمر می‌توان از آنیون‌های چند والانس به‌عنوان اتصال‌دهنده‌های عرضی استفاده کرد (۲۰). هدف از مطالعه حاضر تهیه یک سامانه دارورسانی برای انتقال داروی ضد سرطان دوسه تاکسل می‌باشد. پلیمر مورد انتخاب کیتوزان است که جهت انتقال داروی دوسه تاکسل به سلول‌های سرطانی سینه مورد استفاده قرار گرفته است.

روش کار

تهیه کیتوزان با وزن مولکولی دلخواه

دپلیمریزه کردن کیتوزان به روش تجزیه اکسیداتیو: در محلول اسید استیک ۶ درصد ۲ گرم پودر کیتوزان با وزن مولکولی (KD 400) حل نموده تا محلول ۲% (W/V) از کیتوزان به دست آید. برای تهیه پلیمر کیتوزان با وزن مولکولی KD 10، 10 mL محلول سدیم نیتريت با غلظت 14 mg/mL به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول کیتوزان اضافه شد. این محلول به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق تحت هم زدن مغناطیسی قرار گرفت. واکنش دپلیمریزاسیون با افزودن محلول ۱ مولار از NaOH و افزایش PH تا ۹ متوقف شد، کیتوزان دپلیمریزه شده رسوب می‌کند و رسوب حاصل با استفاده از کیف 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 حل شده و دو بار به مدت ۹۰ دقیقه و سپس یک شب تا صبح در مقابل آب دیونیزه دیالیز شد. محلول

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 rpm 1200 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°C و $5\% \text{CO}_2$ منتقل می‌شود.

سلول‌ها در فلاسک‌های 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 $100 \mu\text{l}$ کاشته شد. ظرف کشت سلول حاصل در انکوباتور 37°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 یکرگرم 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 چاهک‌های کنترل ضرب در ۱۰۰ به دست می‌آید.

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 ۰/۸۵٪ 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 $^1\text{H NMR}$ کونژوگه کیتوزان - دوسه تاکسل: طیف $^1\text{H NMR}$ کونژوگه کیتوزان - دوسه تاکسل در آب دوتره (D_2O) 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 پراکنندگی 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 نانو سایزر 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 نانو سایزر 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

تاکسل در مقایسه با داروی آزاد می‌باشد.

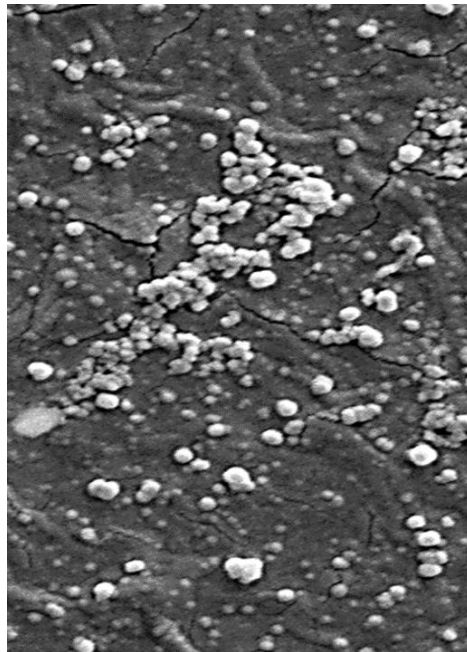
یافته‌ها

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

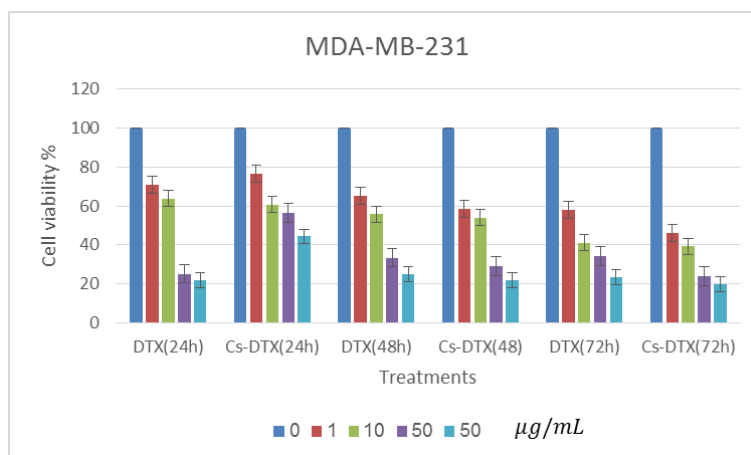
بررسی نانوذرات خودتجمعی کیتوزان-دوسه تاکسل: اندازه ذرات حاصل بین ۱۵۰ نانومتر بوده است، پتانسیل زتا و ضریب پراکندگی نانوذرات به ترتیب ۲۰ mV و ۰/۲ به دست آمد. **مطالعات سلولی (In vitro):** شکل شماره ۲ نشان دهنده سمیت سلولی نانوذرات حاوی دوسه

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان سینه یکی از متداول‌ترین سرطان‌های شناخته شده در بین زنان سراسر دنیا است. اگرچه گزینه‌های 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 می‌شود.



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 ($p < 0.05$).

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 تقریباً 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 هر سپتین به عنوان مولکول هدف گیرنده استفاده شده بود، آنها نشان دادند که در غلظت‌های 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 روشی 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 می‌رسد اتصال کوالان دوکسوروبیسین به کیتوزان از فعالیت مؤثر دارو می‌کاهد (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

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 می‌آید. متاسفانه علی‌رغم تلاش‌های 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 به عنوان نانوحامل دارویی استفاده شد.

مطالعات زیادی در جهت سنتز کونژوگه داروهای ضد سرطانی با پلیمرها، پلی‌پپتیدها، پلی‌دکستران‌ها 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 می‌آید (۳۰). در مطالعه حاضر از روش کونژوگه کردن دارو به پلیمر کیتوزان استفاده شد. بررسی‌های بسیاری بر روی نانوذرات مختلف حامل داروی دوسه تاکسل و همینطور استفاده از کیتوزان به عنوان 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

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 endocrine-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.

متصل شده بود و در 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 غلظت‌ها بیشتر از داروی تنها می‌باشد و در سلول MCF-7 سمیت نانوذرات حاوی دارو در مقایسه با دارو به تنهایی تقریباً 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 نانوپارٹیکل‌ها جهت جذب بهتر نانوپارٹیکل‌ها 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, Vashghani-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.

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.

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*

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 through 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