

بررسی سمیت سلولی نانو ذرات داروی Docetaxel با استفاده از کشت سلول های سرطانی HepG2

محمد شکرزاده^۱پدرام ابراهیم نژاد^۲محمودامیدی^۳امیر شادبورستان^۳زاوش زال زر^۳

چکیده

سابقه و هدف: کارسینومای هیپاتوسلولار انسانی (HCC) یکی از علت های رایج مرگ و میر در دنیا است. دارو رسانی هدفمند در سطح سلول، بافت یا گیرنده های اختصاصی سلولی یکی از فن آوری های بالقوه برای درمان HCC می باشد. هدف از این مطالعه بررسی خواص سیتوتوکسیسیته نانو ذرات Docetaxel (DTX) می باشد. که توسط روش رادیکال پلیمریزاسیون تهیه شده اند.

مواد و روش ها: تعداد 1×10^4 عدد سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد و سپس مقادیر ۵۰-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو دارو و داروی اصلی پس از یک روز از زمان کشت سلول به آن ها اضافه گردید. سپس تعداد سلول های زنده و فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های مزبور با استفاده از روش MTT assay طی زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشخص گردید.

یافته ها: نتایج حاصل از تست MTT، مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول های سرطانی HepG2 را توسط نانو دارو نسبت به داروی اصلی نشان می دهد. غلظت های مهار (IC₅₀) که با آنالیز آماری به دست آمد برای نانو دارو و داروی اصلی در طی زمان های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل 1.02 ± 0.68 ، 0.39 ± 0.86 ، 0.20 ± 0.93 و 1.03 ± 1.34 ، 0.87 ± 0.97 و 0.99 ± 0.76 میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

استنتاج: شواهد موجود حاکی از سمیت سلولی بیشتر نانو ذرات داروی DTX نسبت به داروی آزاد بر روی سلول های سرطانی کبد می باشد بنابراین فرمولاسیون نانو ذرات داروی حاصل از این مطالعه می تواند به عنوان یک داروی انتخابی مناسب جهت مطالعات تکمیلی آینده در محیط درون تن پیشنهاد شود.

واژه های کلیدی: کارسینومای هیپاتوسلولار انسانی، نانو ذرات، Docetaxel، سیتوتوکسیسیته، MTT assay

مقدمه

سرطان کبد به عنوان یک مشکل بهداشت

جهانی مطرح است. کارسینومای هیپاتوسلولار

پنجمین عامل شایع سرطان در جهان و سومین عامل

به عنوان (Human Hepatocellular carcinoma: HCC)

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

E-mail= m.omid1364@gmail.com

مؤلف مسئول: محمود امیدوی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

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

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

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

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

نانو ذرات علی‌رغم دارودرمانی 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 (۱۵-۱۳). 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 به‌خصوص در مورد داروهای سیتوتوکسیک حائز اهمیت است. این داروها معمولاً به‌صورت تزریقی در دسترس هستند و تجویز این داروها نیازمند پرسنل مجرب، 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 سیتوتوکسیک از طریق سیستم گوارشی صورت گرفته است (۲۱-۱۷).

کیتوزان یک پلی‌ساکارید زیست تخریب پذیر کاتیونیک است که با د-استیل‌اسیون نسی 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 به‌عنوان 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 عودکننده بیماری HCC از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. داروی DTX یک ترکیب از خانواده تاکسان‌ها است که از نظر ساختمانی شبیه به پکلی تکسل می‌باشد اما قدرت مهار دپلمریزاسیون 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 کارسینوما یوروتلیال داشته است (۷-۴).

اگرچه داروی DTX اثرات ضد سرطانی قابل توجهی در محیط برون تن بر انواع رده‌های سلولی کارسینوما هیپاتوسلولار دارد، اما کاربردهای بالینی دارو اثرات رضایت بخشی بر HCC پیشرفته و سیروز کبدی نداشته است که دلیل عمده 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 به‌خصوص 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، به‌دلیل 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). نانو تکنولوژی باعث ایجاد یک انقلاب در تشخیص و درمان سرطان شده است. دارو رسانی هدفمند به‌واسطه

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 سیتوتوکسیک نانوذرات داروی DTX بر رده سلولی HepG2 می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داروی DTX خریداری شده از شرکت (Mumbai, India) Cipla، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط با درجه د-استیلاسیون ۸۹ درصد از شرکت (Karmoy, Norway) Primex استفاده شده است. L-گلو تانیون (GSH)، ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC) هیدروکلراید، N-هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS)، متیل متاکریلات (MMA)، آمونیوم سریوم نترات، سدیم نیتريت، اسید هیدروکلریک، اسید استیک سرد، هیدروکسید سدیم، و فسفات هیدروژن پتاسیم که از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه شده‌اند. نمک MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-methyltetrazolium bromide) از شرکت (St. Louis, MO) Sigma-Aldrich خریداری شده است. رده سلولی HEPG2 از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده است.

آماده‌سازی تیولات کیتوزان کونژوگه با نانو ذرات 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 نیتريك ۰/۲ مول بر لیتر در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در شرایط استیرر و در مجاورت گاز نیتروژن حل گردید. پس از ۱۰ دقیقه در شرایط استیرر قوی با مگنت محلول ۰/۰۸ مول بر لیتر سریوم آمونیوم نترات (CAN) در اسید نیتريك ۰/۲ مول بر لیتر و MMA اضافه شد تا حجم کل به ۵ میلی لیتر رسید.

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 استیرر 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 CAN، DTX در ۰/۵ میلی لیتر متانول در شرایط استیرر حل شد و ۰/۲۵ میلی لیتر از MMA برای دستیابی به محلول با رنگ شفاف اضافه گردید. در شرایط قوی استیرر با مگنت DTX به فلاسک دو طرفه اضافه گردید. فرایند حباب نیتروژن به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. DTX اضافه شده به میزان ۴-۱ درصد (وزنی-وزنی) بر اساس وزن MMA و تیولات کیتوزان بوده است. واکنش در شرایط ملایم استیرر 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 از ستون $5\mu\text{m}$ Bondapak (Waters, Milford, MA) انجام شد. فاز متحرک شامل نسبت ۷۵:۲۵ متانول و آب با میزان جریان ۱ میلی متر در دقیقه بود. میزان جذب ترکیبات شسته شده با استفاده از آشکارساز Spectra100 UV-Vis در طول موج ۲۲۷ نانومتر قرائت شد (۲۳).

اندازه و توزیع پراکندگی ذرات:

تعیین اندازه ذرات و توزیع پراکندگی نانو ذرات تهیه شده از طریق پراکندگی نور لیزر (Zetasizer Nano (ZS, Malvem Instrument Ltd., Malvem, UK صورت گرفت. به طور خلاصه نمونه پودر خشک شده نانو ذرات با حل کردن در آب دیونیزه به صورت سوسپانسیون در آورده 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 پراکندگی (PDI) تعیین شد که در جدول شماره ۱ آمده است (۲۴).

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

شاخص ها	اندازه ذرات (nm)	پتانسیل زتا	PDI
نانوداروی Docetaxel	۱۸۷±۲۳	۴۱/۲±۲	۰/۲۵۱±۰/۰۳۹

نگهداری و کشت سلولی:

در این مطالعه رده سلولی سرطانی کبد انسان HepG2 که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شده‌اند از پاساژهای سلولی بین ۲۶ تا ۳۱ در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ g/l سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین که در CO₂ انکوباتور (BINDER, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن استفاده شد. برای انجام تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین - اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی‌سی 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 هموسایتومتر و بررسی با

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

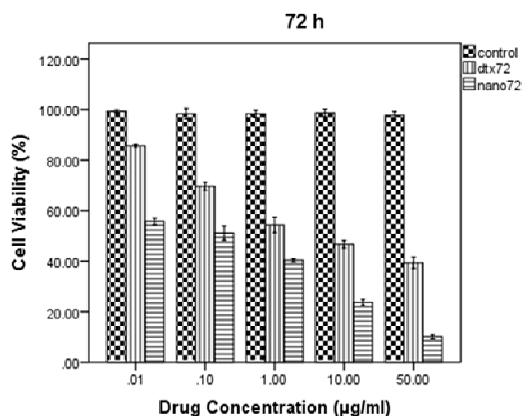
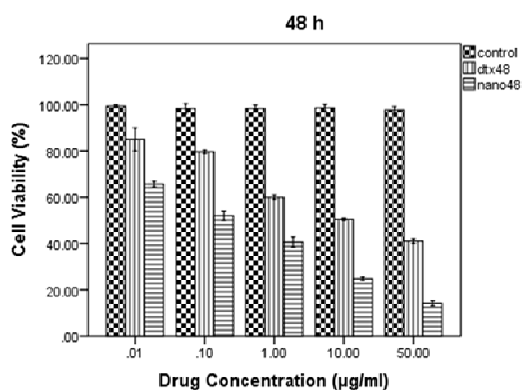
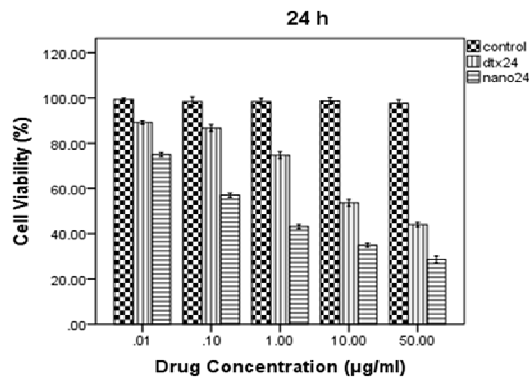
بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT assay:

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 ترازولیوم 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 ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به‌دقت خارج شد و به هر خانه پلیت میزان ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی شده جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج رفرنس ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و IC₅₀ (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) براساس منحنی غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر) گزارش شدند (۲۶). هر کدام از این آزمایش‌ها جهت نتیجه بهتر سه بار تکرار شد و میزان بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل/جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

نتایج براساس میانگین \pm انحراف از معیار با استفاده

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 می شود) نانوذرات و داروی اصلی دو ستاکسل نیز در جدول شماره ۲ آورده شده است.

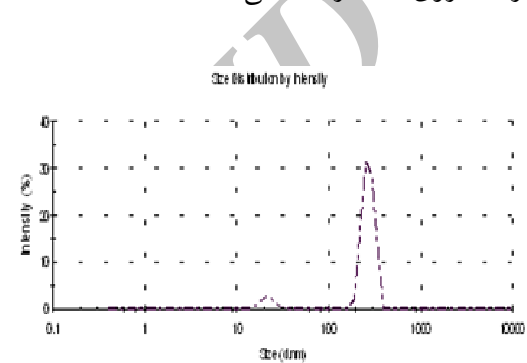


نمودار شماره ۲: میزان بقای سلولی (درصد) رده HepG2 در مواجهه با نانو داروی DTX در مقایسه با داروی اصلی در غلظت های مساوی ($n=5$) طی زمان های آنکوباسیون ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.

از نرم افزار آماری SPSS 15 گزارش شده اند. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده ها از Student t- test استفاده شده است ($p \leq 0/05$).

یافته ها

نانو ذرات قطر کمتر از ۲۰۰ نانومتر را نشان می دهند. فاکتور پراکندگی ذرات کمتر از ۰/۲ و پتانسیل زتا تا ۳۵/۴ می باشد. نمودار شماره ۱ توزیع نانو ذرات داروی DTX را نشان می دهد.



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 می باشد که در مواجهه نانودارو و داروی اصلی قرار گرفته است. نانودارو و داروی اصلی با غلظت های مساوی ۰/۰۱، ۰/۱، ۱۰/۱ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب تهیه گردید ($n=5$). از نمودار شماره ۱ می توان نتیجه گرفت میزان بقای سلولی پس از ۲۴ ساعت آنکوباسیون در غلظت ۱۰ سلولی میکروگرم بر میلی لیتر دارو به میزان ۵۴/۱۳ درصد برای داروی اصلی به ۳۷/۱۲ درصد برای نانودارو با فرمولاسیون تیولات کیتوزان می باشد (افزایش ۳۹/۱۷ درصد سمیت سلولی، ($p \leq 0/05$)) به طور مشابه در مقایسه با داروی اصلی میزان سمیت سلولی برای نانودارو ۴۲/۵۳ درصد ($p \leq 0/05$) و ۳۹/۱۷ درصد ($p \leq 0/05$) به ترتیب برای زمان های آنکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش یافته است. با توجه به نتایج به دست آمده

جدول شماره ۲: میزان IC_{50} (µg/ml) نانودارو و داروی اصلی در غلظت های مختلف در مقابل سلول های HepG2 پس از زمان های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (n=3).

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

بحث

ارزیابی اثر درمانی در محیط آزمایشگاه (In Vitro) بر اساس IC_{50} ارزیابی می شود که عبارت است از غلظتی از دارو که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول ها در یک بازه زمانی می شود. با توجه به جدول بالا می توان نتیجه گرفت که نانودارو عملکرد بهتری نسبت به داروی اصلی دارد. IC_{50} برای داروی اصلی به ترتیب از ۵/۹۹، ۸/۸۷، ۱۰/۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر به ۰/۲۰، ۰/۳۹، ۱/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای نانودارو در زمان های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی دار و قابل توجهی داشته است که این خود سمیت سلولی بالاتر نانو دارو نسبت به داروی اصلی را نشان می دهد که این تفاوت ها معنی دار می باشد. در این تحقیق نانو ذرات داروی DTX با پلیمر کیتوزان تهیه شد. یکی از سوالات مهم در این تحقیق این بود که آیا فرمولاسیون نانو ذرات اثرات داروی DTX را افزایش می دهد. 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 می باشند. تحقیقات نشان می دهند که وقتی ذرات به ۵۰۰ نانو متر می رسند میزان جذب از موکوس روده کاهش می یابد. همچنین ذرات، پتانسیل زتا با بار مثبت و پراکندگی مناسب و پایدار را نشان دادند. بار مثبت ذرات نشان می دهد که بار سطحی منفی PMMA به خوبی توسط کیتوزان با بار مثبت پوشیده شده است. بار مثبت نانو ذرات فوق دلیل وجود گروه های آمین آزاد در سطح ذرات می باشد. همچنین وجود بار مثبت برای

اتصال الکترواستات نانوذرات فوق به جداره موکوس روده با بار منفی مناسب می باشد و از حذف آن ها از روده کوچک جلوگیری می کند. میزان بارگیری بالای داروی DTX با خواص چربی دوستی بالا در نانو ذرات فوق می تواند به دلیل ورود دارو به هسته چربی دوست (PMMA) نانو ذرات می باشد. بررسی ها نشان می دهند که وزن ملکولی کیتوزان عامل مهمی در خصوصیات نانو ذرات می باشد که شامل اندازه ذره های، میزان نفوذ به داخل سلول و شدت پاسخ سیستم ایمنی به دارو می باشد. 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 نانوذرات 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 متد اصلاح شده رادیکال پلیمریزاسیون بارگیری شده است. این روش تهیه نانودارو دارای مزیت هایی از قبیل: حذف حلال های آلی، سورفاکتانت و آماده سازی در شرایط ملایم تر است. نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک نانودارو و داروی اصلی بر سلول های سرطانی به روش MTT assay ارائه شده است. میزان غلظت دارو و نانو دارو بین ۵۰-۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر است. میزان IC_{50} نانو ذرات و داروی اصلی یک روند مهار رشد سلول های سرطانی وابسته به غلظت را نشان می دهد. در یک مطالعه نشان داده شده است که نانو ذرات تیولات کیتوزان هیچ گونه اثر سمی بر سلول های سرطانی نداشته است (۲۷). میزان IC_{50} پایین تر نانودارو نسبت به داروی اصلی حاکی از حساسیت بالاتر سلول های HepG2 نسبت به نانودارو می باشد. این امر می تواند به بارگیری بیشتر و بهتر نانو دارو بر سلول سرطانی و عملکرد آهسته رهش دارو نسبت داده شود همچنین فرمولاسیون نانوی

نشان دهنده بارگیری مناسب دارو توسط نانو ذرات 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

نویسندگان 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 سلول های سرطانی غلبه کند (۲۸). مکانیسم های 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 مطالعه ای که توسط صارمی و همکاران صورت گرفته است میزان اثر بخشی به دام انداختن دارو توسط نانوذرات تیولات کیتوزان PMMA به روش ذکر شده بیشتر از ۹۰ درصد ارزیابی شده است که

References

- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362(9399): 1907-1917.
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8(2): 193-199.
- Guéritte-Voegelein F, Guénard D, Lavelle F, Le Goff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimetabolic activity. *J Med Chem* 1991; 34(3): 992-998.
- 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.
- 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 pancreatic carcinoma. *Cancer* 2002; 94(1): 97-103.
- 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 of patients with androgen independent prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94(5): 1457-1465.
- 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 epirubicin and docetaxel+granulocyte colony stimulating factor. *Anticancer Drugs* 2002; 13(1): 67-74.
- 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.
- Hebbar M, Ernst O, Cattani 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.
- 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, Ruozi 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. Arango MA, Ponchel G, Orecchioni AM, Renedo MJ, Duchêne D, Irache JM. Bioadhesive potential of gliadinnanoparticulate 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 methacrylatenano particles: 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): 512-520.

- 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.

Archive of SID