



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## تهیه، بررسی خصوصیات و ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات داروی دوسه تاکسل در مقابل رده سلولی A549

محمد شکرزاده<sup>۱</sup> (Ph.D)، زاوش زال زر<sup>۲</sup> (Pharm.D)، پدram ابراهیم نژاد<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه سم‌شناسی/فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳- مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۶

pebrahimnejad@mazums.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱- ۳۳۵۴۲۰۸۱

### چکیده

هدف: دوستاکسل (DTX) به‌عنوان یکی از قوی‌ترین داروهای ضد سرطان از خانواده تاکسوئیدها می‌باشد. فرمولاسیون تجاری این دارو که در بالین استفاده می‌شود، حاوی غلظت بالای توپین ۸۰ می‌باشد که مشکلات زیادی برای بیماران ایجاد می‌کند. لذا تهیه اشکال نوین دارویی با قابلیت هدف‌مندی روی بافت سرطانی و بدون توپین ۸۰ می‌تواند منجر به اثربخشی بهتر و کاهش عوارض جانبی شود. این مطالعه تهیه، بررسی خصوصیات و ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات داروی دو سه تاکسل (DTX) و پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) روی یک رده سلول سرطانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات داروی DTX و PLGA با استفاده از روش امولسیفیکاسیون/انتشار حلال ساخته شد. سپس خصوصیات آن ارزیابی شد. تعداد ۱۰۴ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کاشته شد و بعد ۲۴ ساعت انکوبه شدن، غلظت‌های مختلف از داروی آزاد و نانوذرات به چاهک‌ها اضافه شد. سپس تعداد سلول‌های زنده از طریق ارزیابی فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی با روش MTT Assay در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: اندازه قطر متوسط نانوذرات ۱۸۴/۳±۱۴/۶ نانومتر با شاخص پراکندگی ۰/۱۵ به‌دست آمد. نتایج MTT افزایش معنی‌دار سمیت دارو در نانوذرات روی رده سلولی A549 را نشان داد. غلظت مهاری برای داروی اصلی و نانوذرات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۰/۶۶±۰/۲۲، ۱۶/۲۸±۰/۴۵، ۱۰/۶۴±۰/۳۸ و ۰/۵۷±۰/۰۴، ۰/۱۶±۰/۰۴، ۰/۰۷±۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان‌دهنده سمیت بالای نانوذرات DTX-PLGA روی رده سلولی سرطان ریه انسانی می‌باشد. این فرمولاسیون می‌تواند برای مطالعه بیش‌تر به‌صورت برون‌تن در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: دوستاکسل، پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید، نانوتکنولوژی

### مقدمه

تاکسوئیدها از قبیل دوستاکسل (DTX) به‌عنوان یک گروه جدید از داروهای ضد سرطان در نظر گرفته می‌شوند [۱]. این دارو با مکانیسم مهارکننده دپلمیریزاسیون میکروتوبولی دارای طیف گسترده‌ای از کاربردهای درمانی بر علیه تومورهای جامد شامل پستان سرطان سلول غیر کوچک ریه، تخمدان، معده، تومورهای سر و گردن و سرطان پروستات می‌باشد [۲-۶]. از طرفی دیگر بسیاری محدودیت‌های مربوط به استفاده‌های بالینی داروی DTX شامل حلالیت ناچیز در آب، توزیع انتخابی پایین و حذف سریع دارو در محیط بدن (in vivo) است. در حال حاضر این دارو و بسیاری داروهای ضد سرطان دیگر حاوی

فرمولاسیون‌های با غلظت بالایی از سورفکتانت غیر یونی پلی سوربات ۸۰ (توین ۸۰) می‌باشند، که این امر منجر به بسیاری از واکنش‌های حساسیتی و عوارض جانبی (از قبیل احتباس مایعات، سمیت عصبی، اختلال اسکلتی-عضلانی و نوتروپنی) می‌شود [۷-۹]. بنابراین فرمولاسیون شکل تزریقی داروی DTX بدون استفاده از مواد جانبی مضر مانند توپین ۸۰، مورد نیاز جهت تحقیق می‌باشد.

تحقیقات نشان می‌دهند یکی از راه‌های افزایش حلالیت و پایداری داروها، تهیه نانوذرات داروهاست. با توجه به ویژگی‌های خاص نانوذرات، داروهای کم محلول یا نامحلول در آب، داروهای با جذب کم، داروهای ناپایدار در دستگاه گوارش،

تشکیل امولسیون و انتشار حلال و نیز مطالعه و بررسی اثرات سیتوتوکسیسیته نانوذرات تهیه شده در مقایسه با داروی آزاد می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش به شرح ذیل می‌باشد:  
 پلیمر PLGA (50:50; resomer RG 504 H, MW48000) از شرکت Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany) تهیه شد. پلی وینیل الکل (PVA) (MW 22000) و رودامین B ایزوتیونات (RBITC) از شرکت Sigma-aldrich خریداری شدند. دی کلرومتان، استون و متانول با درجه آنالیتیکال نیز از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شد. داروی فعال Docetaxel به صورت پودر از شرکت Cipla pharmaceutical (Mumbai, India) خریداری شد. محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با L-گلوتامین و HEPES، آنتی‌بیوتیک مخصوص کشت سلولی (پنیسیلین/استرپتومایسین) و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت PAA Laboratories Gmb (Pasching, Austria) خریداری شدند. نمک MTT (-4, 5-) dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) نیز از شرکت Sigma-aldrich خریداری شد. رده سلولی سرطان ریه انسانی (A549) از انیستیتو پاستور (تهران-ایران) تهیه شد.

#### تهیه نانو ذرات DTX-PLGA

برای تهیه نانوذرات پلیمری داروی DTX از روش تغییر یافته امولسیفیکاسیون/انتشار حلال استفاده شد [۱۷-۱۹]. به این ترتیب که ۲۰۰ میلی‌گرم از پلیمر PLGA به همراه ۱۰ میلی‌گرم DTX به مخلوط دی کلرومتان/اتانول/استون (۲۵، ۱۲/۵، ۵/۶۲٪) اضافه شد و تا اطمینان از انحلال کامل همه مواد به خوبی هم‌زده شد. سپس فاز آبی به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول PVA (۵/۰ درصد وزنی/حجمی) تحت هم‌ژنایزر (Ultra-turrax, IKA) با سرعت ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه افزوده شد و هم‌زدن برای ۳ ساعت ادامه یافت تا فاز داخلی تبخیر شود. سپس برای جداسازی نانوذرات از سانتریفیوژ (sigma3K30, steinheim, Germany) در ۲۱۰۰۰g × طی ۱۵ دقیقه، استفاده شد. پس از ۳ بار شستشوی ذرات با آب دیونیزه، مانتینول (۲٪ وزنی-حجمی) افزوده شد و در دمای ۴۰°C- برای ۴۸ ساعت لیوفیلیزه شد. پودر به دست آمده از نانوذرات در دسیکاتور نگهداری شد تا از تخریب توسط گرما و رطوبت حفظ شود.

#### بررسی خصوصیات نانوذرات

اندازه ذره‌ای، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا توسط پراکنش نور لیزر (Malvern Zetasizer ZS, Malvern, UK)

داروهای ناپایدار از لحاظ شیمیایی و نیز جهت هدف قرار دادن سلول‌ها و بافت‌های بدن به صورت اختصاصی، این نوع سیستم‌های جدید کاربردهای فراوانی پیدا کرده است [۱۰-۱۲]. تحقیقات مختلف در دهه‌های اخیر نشان داده‌اند که نانوذرات کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر نفوذپذیری و ماندگاری بیش‌تری در گردش خون (EPR effect) دارند و باعث افزایش پایداری و محلولیت بیش‌تر دارو می‌گردند. همچنین به دلیل تغییرات سلول‌های اپیتلیال عروقی اطراف تومور، نانوذرات در این محدوده اندازه می‌توانند از عروق خارج شده و تجمع بیش‌تری در داخل بافت‌های توموری نشان دهند [۱۳-۱۵].

مبحث بسیار مهم دیگر در دارورسانی، بحث رهش کنترل شده دارو در بدن است، که در سامانه‌های دارورسانی سنتی عملاً هیچ کنترلی بر روی زمان، مکان و سرعت آزادسازی دارو وجود ندارد، علاوه بر این غلظت دارو مرتباً در خون دارای نوساناتی به صورت دره و پیک می‌باشد و ممکن است از محدوده درمانی خارج و کارایی کم‌تر و عوارض جانبی بیشتر را موجب گردد. با استفاده از سامانه‌های دارورسانی نوین که به آن‌ها سامانه‌های دارورسانی با آزادسازی کنترل شده نیز گفته می‌شود، می‌توان سرعت، زمان و مکان آزادسازی دارو را تحت کنترل در آورد. این سامانه‌های نوین، توزیع بافتی و فارماکوکینتیک دارو را تغییر می‌دهند و موجب تجمع دارو در اعضای هدف می‌شوند. به‌طور کلی هدف از سامانه‌های نوین دارورسانی، افزایش اثربخشی داروها به همراه کاهش اثرات جانبی و عوارض سمی آن‌ها در بدن می‌باشد [۱۳-۱۵].

هم‌چنین میزان قابل توجهی از تحقیقات سه دهه اخیر در زمینه دارورسانی هدفمند مربوط به پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر به‌عنوان ابزارهای زیست جذبی در زمینه علوم پزشکی بوده است. یکی از این درمان‌های نوین، استفاده از حامل‌های دارویی کلوئیدی و سامانه‌های ذره‌ای می‌باشد که دارو را به محل اثر برسانند و الگوهای هیپنه آزادسازی دارو را ایجاد کنند. نانوذراتی که از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر تهیه می‌شوند اهمیت به‌سزایی در دارورسانی دارند و می‌توانند دارو را به‌صورت کنترل‌شده به محل مورد نظر برسانند و دارو را از عوامل فیزیولوژی محیطی محافظت نمایند. از این میان، پلیمر زیست تخریب‌پذیر poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) به‌عنوان پلیمر مورد تایید سازمان FDA که از لحاظ فیزیکی بسیار محکم و زیست سازگار است، به فراوانی به عنوان حامل داروها، پروتئین‌ها و بسیاری از ماکرومولکول‌ها از قبیل DNA و RNA به‌کار برده شده است [۱۶]. با توجه به مزایای این سامانه‌های نوین، هدف از این مطالعه، تهیه نانوذرات پلیمری داروی DTX و تهیه یک فرمولاسیون تزریقی جدید بدون توپین ۸۰ با استفاده از روش

هموسایتومتر قرار داده و در زیر میکروسکوپ تعداد سلول‌های موجود در مربع وسط و دو مربع بالا و پایین لام شمارش می‌شود. از اعداد شمارش شده میانگین گرفته می‌شود و طبق معادله زیر، تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به دست می‌آید [۲۱، ۲۲].

$$10^4 \times \text{میانگین تعداد سلول شمارش شده} \times \text{ضریب رقت} = \text{تعداد سلول شمارش شده در } 1 \text{ ml}$$

در ضمن می‌توان Viability یا درصد سلول‌های زنده را بدین ترتیب محاسبه کرد:

$$\text{Viability}\% = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{کل سلول ها}} \times 100$$

بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT Assay

برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات DTX-PLGA و مقایسه آن با اثرات داروی آزاد DTX از روش MTT Assay استفاده شد. این روش بر اساس تبدیل نمک تترازولیوم به کریستال‌های رنگی فورمازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و مقایسه میزان رنگ تولید شده در نمونه‌های مختلف به کمک اندازه‌گیری جذب نوری آن‌ها می‌باشد [۱۹-۲۱]. در این روش بعد از شمارش سلولی،  $10^4$  سلول در  $90 \mu\text{l}$  میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون میزان و غلظت مناسب از نمونه‌ها (داروی آزاد و نانوذرات) برای رسیدن به غلظت‌های  $0.1$ ،  $0.1$ ،  $1$ ،  $10$ ،  $25$  و  $50 \mu\text{g/ml}$  میکروگرم در میلی‌لیتر به هر خانه اضافه شد. به خانه‌های کنترل محیط کشت کامل و فاقد ماده دارویی افزوده شد. سپس هر پلیت ۲۴، ۴۸ یا ۷۲ ساعت انکوبه شد و بعد از اتمام زمان مورد نظر،  $11 \mu\text{l}$  میکرولیتر از محلول رنگ MTT تازه آماده شده به هر خانه افزوده شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون مجدد، محیط کشت هر خانه به آرامی خارج شد و میزان  $150 \mu\text{l}$  میکرولیتر DMSO به هر خانه افزوده شده و ۱۵ دقیقه به آرامی در دمای اتاق حرکت داده شد تا کریستال‌های فورمازان حل شوند و در ادامه جذب توسط دستگاه الیزا در طول موج  $570 \text{ nm}$  قرائت شد [۲۱-۲۴].

سپس نتایج حاصل از طریق فرمول ذیل به میزان بقای سلولی تبدیل شد:

$$100 \times \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} = \text{میزان بقای سلولی}$$

پس از جمع‌آوری داده‌های حاصل از ۳ بار تکرار و IC50 (میزان غلظتی که سبب مهار رشد تا میزان ۵۰٪ می‌شود) با استفاده از نرم‌افزار Prism Ver.3 محاسبه و گزارش شد.

اندازه‌گیری شد. نمونه برای این قسمت توسط پراکنده‌سازی سوسپانسیون نانوذرات در  $10 \text{ ml}$  میلی‌لیتر آب دیونیزه با استفاده از سونیکاتور آماده شد. حساسیت این دستگاه برای اندازه‌گیری ذرات در محدوده یک تا هزار نانومتر می‌باشد.

میزان داروی انکپسوله در نانوذرات (EE)

$20 \text{ mg}$  میلی‌گرم پودر لیوفیلیزه در  $1 \text{ ml}$  میلی‌لیتر استونیتریل به آرامی هم‌زده شد و سپس ۵ دقیقه سونیکه شد تا کاملاً حل گردید.  $2 \text{ ml}$  میلی‌لیتر متانول برای رسوب دادن پلیمر افزوده شد. سپس نمونه‌ها در  $21000 \text{ g}$  سانتریفیوژ شد و داروی موجود در محلول رویی توسط آنالیز HPLC اندازه‌گیری شد. میزان بارگیری DTX روی پلیمر از نسبت وزن آن به وزن نانوذرات مشخص شد و EE از نسبت جرمی میزان داروی اندازه‌گیری شده در نانوذرات به میزان داروی اولیه مورد استفاده، محاسبه شد [۱۵-۱۷].

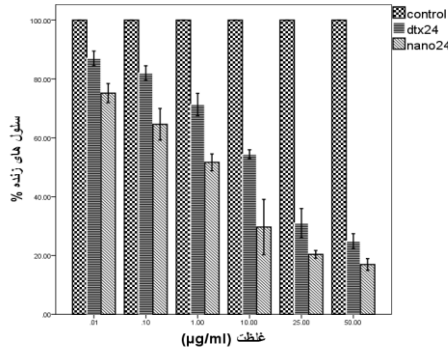
آنالیز HPLC

برای آنالیز HPLC از دستگاه WellChrom – K1001 (KNAUER, Berlin, Germany) و ستون فاز معکوس  $C_{18}$  با طول  $25 \text{ cm}$  و قطر داخلی  $0.46 \text{ cm}$  سانتی‌متر و اندازه حفرات  $5 \mu\text{m}$  میکرومتر (Teknokroma, Barcelona, Spain) استفاده شد. از محلول متانول/آب ( $v/v 20/80$ ) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده شده و شناسایی توسط دتکتور UV در  $230 \text{ nm}$  نانومتر صورت گرفت [۱۸].

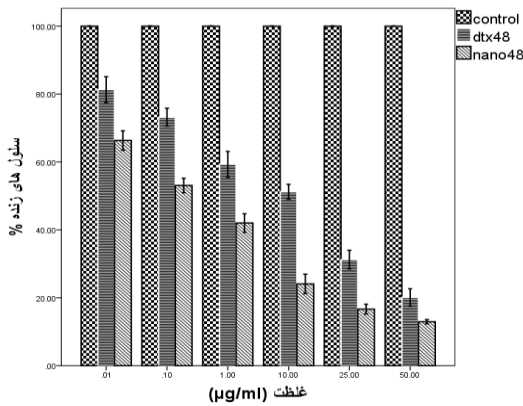
نگهداری و کشت سلولی

رده سلولی سرطان ریه انسانی A549 از بانک انیستیتو پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنسیلین-استرپتومايسين در  $\text{CO}_2$  انکوباتور (BINDER, USA) تحت شرایط  $37^\circ\text{C}$  و ۵٪ دی‌اکسید کربن کشت داده شد. برای انجام تست MTT از سلول‌هایی که در فاز رشد لگاریتمی، در فلاسک‌های با تقریباً ۶۰-۷۰٪ رشد سلولی استفاده شد [۱۹-۲۱].

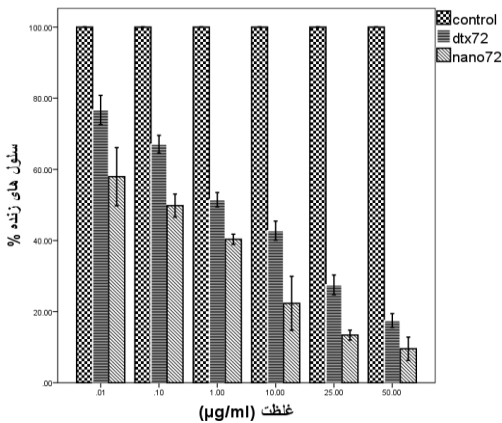
از آنجایی که رده سلولی A549 چسبنده به کف می‌باشد، برای جداسازی سلول‌ها از فلاسک یا پلیت از محلول رقیق شده تریپسین-اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) و متعاقب آن سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی در  $2000 \text{ rpm}$  برای ۵ دقیقه استفاده شد. برای بررسی زنده بودن سلول‌ها و هم‌چنین شمارش سلولی، پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی، روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر به کار گرفته شد. برای این منظور  $50 \mu\text{l}$  میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده در مرحله پاساژ سلولی را برداشته، با  $50 \mu\text{l}$  میکرولیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط می‌شود. حدود  $20 \mu\text{l}$  میکرولیتر از این مخلوط را روی لام



شکل ۲. درصد سلول های زنده A549 در مواجهه با نانوذرات DTX-PLGA در مقایسه با داروی آزاد در غلظت های مختلف، طی زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت (n=۶)



شکل ۳. درصد سلول های زنده A549 در مواجهه با نانوذرات DTX-PLGA در مقایسه با داروی آزاد در غلظت های مختلف، طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت (n=۶)



شکل ۴. درصد سلول های زنده A549 در مواجهه با نانوذرات DTX-PLGA در مقایسه با داروی آزاد در غلظت های مختلف، طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت (n=۶)

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

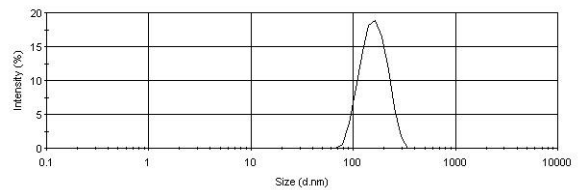
نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف از معیار با استفاده از نرم‌افزار آماری (SPSS, ver 20) گزارش شده‌اند. جهت بررسی سطح معنی‌داری از تست آماری ANOVA و Tukey Post test استفاده شده است. ( $p < 0.05$ ).

### نتایج

در این تحقیق همان‌طور که انتظار داشتیم نانوذرات داروی DTX با اندازه مناسب به دست آمد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات در جدول ۱ خلاصه شده است. هم‌چنین شکل ۱ توزیع اندازه ذره‌ای را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نانوذرات قطر کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر و فاکتور پراکندگی  $0.15$  را دارند. پتانسیل زتا برای نانو ذرات حاوی دارو  $-12.2 \pm 0.6$  و برای نانوذرات فاقد دارو  $-9.0 \pm 2.3$  و میزان داروی انکپسوله در نانوذرات  $62.2 \pm 2.5\%$  می‌باشد.

جدول ۱. اندازه ذرات و توزیع پراکندگی ذرات نانو ذرات پلیمری داروی DTX

شاخص‌ها	میانگین $\pm$ انحراف معیار اندازه ذرات (nm)	پتانسیل زتا	PDI
نانوذرات DTX-PLGA	$184.14 \pm 3.6$	$-12.2 \pm 0.6$	$0.15$



شکل ۱. محاسبه اندازه ذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر

سمیت سلولی حاصل از مواجهه رده سلولی A549 با نانوذرات DTX-PLGA و داروی آزاد، در سه زمان انکوباسیون و با غلظت‌های  $0.1$ ،  $1$ ،  $10$ ،  $25$  و  $50$  میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (شکل ۲-۴). ( $n=6$ )

هم‌چنین غلظتی از دارو که رشد  $50\%$  از سلول‌ها را متوقف کند ( $IC_{50}$ ) محاسبه شد. محاسبه مقادیر  $IC_{50}$  در هر یک از زمان‌ها، مشخص شد که میزان  $IC_{50}$  برای نانوذرات DTX-PLGA در نمونه ۲۴ ساعته نسبت به داروی آزاد از  $20.66$  به  $0.567$  کاهش یافته است ( $p < 0.05$ ). هم‌چنین این کاهش برای زمان‌های انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب از  $16.27$  به  $0.164$  ( $p < 0.05$ ) و از  $10.64$  به  $0.075$  ( $p < 0.05$ ) کاهش یافته است.

را نشان می‌دهد (کاهش قدر مطلق عدد منفی) که به دلیل اثر پوشاندگی DTX روی گروه‌های کربوکسیل نانوذرات می‌باشد [۱۷]. همچنین علت بار منفی پتانسیل زتا در نانوذرات به دست آمده به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل انتهایی با بار منفی در زنجیر پلیمر PLGA می‌باشد که می‌تواند دلیلی بر وجود پوشش مناسب پلیمر PLGA در ساختار نانوذرات حاوی دارو باشد. در تحقیقات مشابه نیز که از پلیمر PLGA استفاده شد، پتانسیل زتا با بار منفی در نانوذرات مشاهده گردید [۱۰، ۱۸].

در این تحقیق از روش لیوفیلیزه کردن یا فریزدرای برای خشک کردن نانوذرات استفاده شد. به طور عمومی از این روش جهت افزایش پایداری فیزیکوشیمیایی نانوذرات به منظور دستیابی به فرآورده قابل قبول از نظر داروسازی استفاده می‌شود، به خصوص در مواردی که شرایط نگهداری نامطلوب باشد [۲۶-۲۹]. این فرآیند مستلزم فریز نمودن سوسپانسیون نانوذرات و حذف آب محتوای آن توسط تصعید و در فشار پایین می‌باشد. پس از خشک شدن کامل، نانوذرات پودری شکل و خشک که حمل و نقل ذخیره‌سازی آن آسان است به دست می‌آید. در اکثر موارد ذرات لیوفیلیزه شده به آسانی در محلول آبی قابلیت پراکنندگی دارند. ضمن آن که از اولترا سونیکاتور جهت اطمینان از پراکنده شدن کامل نانوذرات استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر نیز مانند مطالعات قبلی نانوذرات بعد از فریزدرای نیز شرایط مطلوبی داشتند و به راحتی در محیط آبی پراکنده شدند.

از آن جایی که فریز کردن، تهاجمی ترین مرحله لیوفیلیزه کردن محلول‌های کلوییدی می‌باشد، بنابراین به منظور بهبود بخشیدن به مقاومت نانوذرات و جهت جلوگیری از شکسته شدن سوسپانسیون مانند مطالعات مشابه، یک ماده محافظ کرایو پروتکتانت اضافه شد. به همین جهت در این مطالعه از ماده محافظ مانتیول استفاده شد [۲۳-۲۵].

در این پژوهش از PLGA استفاده شده است که یک پلی‌استر زیست تخریب پذیر است که می‌تواند در اشکال نوین دارورسانی مورد استفاده قرار گیرد [۲۶]. این اشکال نوین موجب بهبود خواص فارماکو کینتیکی، کنترل رهش دارو و دارورسانی هدفمند می‌شود [۲۶-۲۹]. هدفمندسازی دارورسانی در این روش بر اساس هدفمندی غیر فعال می‌باشد.

خواص فیزیکوشیمیایی پلیمر PLGA و داروی DTX در مقیاس نانو و همچنین لیوفیلیسیتته ذرات، موجب تسهیل ورود آن‌ها به سلول و محل اثر می‌گردند که می‌تواند دلیل افزایش سمیت داروی DTX در فرمولاسیون جدید باشد. تحقیقات قبلی نیز نشان می‌دهند که اندازه کوچک ذرات منجر به ماندگاری بیشتر دارو در مایعات بیولوژیک بدن و همچنین عدم نیاز به مقادیر بالای کمک حلال یا سورفکتانت‌ها می‌شود. مجموعه این خواص

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۲، نانوذرات سمیت سلولی به مراتب بیش‌تری از داروی آزاد بر روی رده سلولی A549 نشان می‌دهند. مقایسه IC50 برای داروی آزاد و نانوذرات DTX-PLGA نشان می‌دهد که در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۲. میزان IC50 نانوذرات دارو و داروی آزاد در مقابل رده سلولی A549 در زمان‌های انکوباسیون ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت (n=۶)

زمان انکوباسیون	IC50(μg/ml)	
	نانوذرات DTX-PLGA	داروی آزاد DTX
۲۴ ساعت	۰/۵۷ ± ۰/۰۴	۲۰/۶۶ ± ۰/۲۲
۴۸ ساعت	۰/۱۶ ± ۰/۰۴	۱۶/۲۸ ± ۰/۴۵
۷۲ ساعت	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۱۰/۶۴ ± ۰/۳۸

### بحث و نتیجه گیری

روش مورد استفاده در این پژوهش منجر به ایجاد نانوذرات PLGA حاوی داروی (DTX-PLGA) با اندازه ذره‌ای کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر شد که بر اساس مطالعات مختلف، اندازه مناسب برای دستیابی به خواص مطلوب نانوذرات می‌باشد [۲۱]. در این تحقیق از امولسیفایر PVA به میزان ۰/۵٪ وزنی حجمی استفاده شد که با تحقیقات قبلی مطابقت دارد [۲۵]. به طور کلی مشخص شده است که امولسیفایرها بین دو سطح باقی می‌مانند و باعث اختلاط فاز آبی و روغنی و افزایش پایداری امولسیون تشکیل شده می‌گردند. تحقیقات قبلی نیز نشان می‌دهند افزایش غلظت بیش‌تر امولسیفایر باعث افزایش ویسکوزیته فاز خارجی و در نتیجه بزرگ شدن اندازه ذرات می‌گردد. از طرف دیگر کاهش مقادیر کم و یا بدون امولسیفایر موجب عدم تشکیل امولسیون و در نتیجه عدم تشکیل نانوذرات می‌شود. همچنین استفاده از حلال‌های آلی قابل اختلاط با آب مانند استن و اتانول در فاز آبی، موجب تسریع انتشار و نفوذپذیری بیش‌تر این فاز در فاز آبی و تشکیل امولسیون می‌گردد که دلایل استفاده از این اجزا در فرمولاسیون تهیه شده می‌باشد و با تحقیقات قبلی مطابقت دارد [۲۵-۳۰].

همچنین یکی از سوالات مهم این تحقیق استفاده از قابلیت نانوفناوری برای به دست آوردن نانوذرات داروی DTX بدون استفاده از توپین ۸۰ بود، که نتایج نشان می‌دهند این روش تکرارپذیر بوده و نانوذرات دارای اندازه ذره‌ای مناسب و شاخص پراکنندگی قابل قبول می‌باشند. همچنین پتانسیل زتا که یکی از عوامل مهم پایداری سیستم‌های کلوییدی است، در نانوذرات تهیه شده در مقدار قابل قبولی قرار دارد. پتانسیل زتا، نشان‌دهنده بار الکتریکی سطح نانوذرات است که موجب ایجاد نیروهای دافعه بین ذرات می‌شود و از تجمع و بهم چسبیدن ذرات جلوگیری می‌کند. این عدد در مقایسه با نانوذرات فاقد دارو میزان بیش‌تری

بارگذاری شده روی PCL-Pluronic F68 می‌تواند بر مقاومت دارویی موجود در سلول‌های سرطانی مذکور غلبه کرده و باعث افزایش قدرت درمانی بر علیه سرطان پستان شود [۳۴]. مطالعه انجام شده توسط شکرزاده و همکاران روی نانوذرات DTX بر پایه پلیمر کیتوزان نیز اثربخشی به مراتب بهتر نانو دارو بر سلول‌های سرطانی کبد را نشان داده است [۳۵]. بررسی خواص نانو داروی پکلی تاکسل بارگذاری شده روی پلیمر PLGA توسط Feng و همکاران رده سلولی HT29 [۳۷-۳۵] و همچنین مطالعه Jin و همکاران روی سمیت نانوذرات PLGA-PTX روی رده‌های سلولی کارسینومای پستان (MCF-7) و کارسینومای سرویکس (Hela)، بهبود اثرات ضد تئو پلاستی در این فرمولسیون‌ها را نشان می‌دهد [۳۸].

با توجه به مطالعات انجام شده و این مطالعه، می‌توان پیش‌بینی نمود که داروی DTX با فرمولاسیون با پایه نانوذرات پلیمر PLGA می‌تواند یک عامل ضد سرطان با کارایی اختصاصی‌تر نسبت به داروی آزاد باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با تهیه ذراتی با اندازه ذره‌ای کوچک‌تر و نیز نانوذرات حامل گروه‌های فعال در سطح پلیمر انجام شود. همچنین در سطح بررسی سمیت سلولی نیز، بررسی اثرات روی خطوط دیگر سلولی و همچنین استفاده از روش‌های دیگر ارزیابی سمیت سلولی و مطالعات درون تنی پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله از پژوهش انجام شده در پایان‌نامه زاوش زال زر، ثبت شده در دانشکده داروسازی ساری به شماره ۳۱۵ مستنتج شده است. همچنین نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که در این پژوهش همکاری و مساعدت داشته‌اند کمال تشکر را دارند.

### منابع

- [1] Esmaeili F, Dinarvand R, Ghahremani MH, Ostad SN, Esmaily H, Atyabi F. Cellular cytotoxicity and in-vivo biodistribution of docetaxel poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Anticancer Drugs* 2010; 21: 43-52.
- [2] 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: 1457-1465.
- [3] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafour A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
- [4] Bowerman CJ, Byrne JD, Chu KS, Schorzman AN, Keeler AW, Sherwood CA, et al. Docetaxel-loaded PLGA nanoparticles improve efficacy in taxane-resistant triple-negative breast cancer. *Nano Lett* 2017; 17: 242-248.
- [5] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- [6] Berrington de Gonzalez A, Curtis RE, Kry SF, Gilbert E, Lamart S, Berg CD, Stovall M, et al. Second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries. *Lancet Oncol* 2011; 12: 353-360.

موجب بهبود عملکرد دارو روی سلول‌ها و کاهش کارآمدی مکانیزم‌های مقاومت سلولی از قبیل مقاومت چند دارویی و خروج توسط P گلیکوپروتئین می‌گردد [۳۱-۲۶].

هم‌چنین نتایج IC50 در زمان‌های ذکر شده برای نانوذرات در مقایسه با داروی آزاد، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سمیت سلولی نانوذرات نسبت به داروی آزاد در هر زمان انکوباسیون می‌باشد که با توجه به خواص نانوذرات و نکات بیان شده در مورد پلیمر PLGA توجیه می‌شود. اما نکته قابل توجه در تجزیه و تحلیل آماری این بوده که IC50 نانوذرات در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به زمان طولانی‌تر (۷۲ ساعت) برای داروی اصلی نیز به صورت معنی‌دار کم‌تر بوده است. هم‌چنین با افزایش مدت انکوباسیون، IC50 برای هر یک از اشکال دارویی کاهش پیدا کرد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نانوذرات DTX-PLGA نه تنها موجب افزایش قابل توجه در سمیت سلولی دارو می‌شوند بلکه مدت زمان بروز و پیک اثر را به شدت کاهش می‌دهد. در واقع این مطالعات نشان می‌دهند که نانوذرات داروی DTX با غلظت کم‌تر سمیت سلولی و اثرپذیری بیش‌تری در مقابل سلول‌های سرطانی در مقایسه با داروی آزاد دارند. این نتایج با تحقیقات قبلی که روی نانوذرات داروی DTX انجام شده است مطابقت دارد [۲۸، ۱۸]. البته این نتیجه در محیط آزمایشگاهی می‌باشد و برای تعمیم آن به شرایط بدن باید مطالعات درون تنی ((in vivo صورت گیرد، که البته بروز چنین آثاری مستلزم توزیع مناسب دارو در بافت‌های مورد نظر می‌باشد.

با توجه به مطالعات متعدد توزیع بافتی روی موش‌های سوری نشان داده شده که نانوذرات در طحال و ریه و هم‌چنین در پلاسما ماندگاری بالا دارند [۱۸]، احتمالاً می‌توان انتظار داشت که نانوذرات DTX-PLGA گزینه مناسبی برای مطالعات بعدی روی سرطان‌های ریه، طحال و سلول‌های خونی با منشأ مغز استخوان می‌باشد. در یک مطالعه توسط Yutao Liu و همکاران در مورد نانوذرات با پوسته مونومر لیبیدی و هسته پلیمری زیست تخریب‌پذیر داروی DTX کونژوگه با فولیک اسید صورت گرفته است، با بررسی میکروسکوپی فلوروسنت نشان داده شده که این نانو دارو به صورت کنترل شده و هدفمند با نیمه عمر بالا به محل سلول سرطانی هدایت می‌شود [۳۲]. در یک مطالعه دیگر Ho-Young Howang و همکارانش نشان داده‌اند که نانوذرات DTX-HGC اثر ضد سرطانی چشمگیری از قبیل کاهش حجم تومور و افزایش بقا در موش سرطانی با هدفمند قرار دادن خطوط سرطانی A549 و کاهش سمیت دارو در سلول‌های نرمال شده‌اند [۳۳]. هم‌چنین در مطالعه دیگری نانوذرات داروی DTX در مقایسه با نوع تجاری دارو بر روی خط سلول سرطانی MCF-7 سمیت بیش‌تری نشان داده است و دیده شده که این نانوذرات

- regia on human cancer cell lines (HepG2- HeLa) by MTT Assay. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26: 160-164. (Persian).
- [23] Mehdizadeh M, Rouhani H, Sepehri N, Varshochian R, Ghahremani MH, Amini M, et al. Biotin decorated PLGA nanoparticles containing SN-38 designed for cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017; 45: 495-504.
- [24] Balzus B, Sahle FF, Hönzke S, Gerecke C, Schumacher F, Hedtrich S, et al. Formulation and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *Eur J Pharm Biopharm* 2017; 115: 122-130.
- [25] Ebrahimnejad P, Dinarvand R, Sajadi A, Jaafari MR, Nomani AR, Azizi E. Preparation and in vitro evaluation of actively targetable nanoparticles for SN-38 delivery against HT-29 cell lines. *Nanomedicine* 2010; 6: 478-486.
- [26] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 631-651.
- [27] Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm* 2002; 233: 51-59.
- [28] Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* 2000; 17: 100-106.
- [29] 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: 983-994.
- [30] Rafiei P, Haddadi A. Docetaxel-loaded Plga and Plga-Peg nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 935-939.
- [31] Wenzel C, Locker GJ, Schmidinger M, Rudas M, Taucher S, Gnatt MFX, et al. Combined analysis of two phase II trials in patients with primary and advanced breast cancer with epidoxorubicin and docetaxel+ granulocyte colony stimulating factor. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 67-74.
- [32] Yutao L, Kai L, Jie P, Bin L, Si-Shen F. Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel. *Biomaterials* 2010; 31: 330-338.
- [33] Ho-Young H, In-San K, Ick CK, Yong-Hee K. Tumor targetability and antitumor effect of docetaxel-loaded hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Controlled Release* 2008; 128: 23-33.
- [34] Mei L, Zhang Y, Zheng Y, Tian G, Song C, Yang D, et al. A novel docetaxel-loaded poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)/pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4: 1530-1539.
- [35] Shokrzadeh M, Ebrahimnejad P, Omid M, Shadboorestan A, Zaalzar Z. Cytotoxicity evaluation of docetaxel nanoparticles by culturing HepG2 carcinoma cell lines. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22: 2-10. (Persian).
- [36] Feng SS, Mu L, Win KY, Huang G. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Curr Med Chem* 2004; 11: 413-424.
- [37] Fonseca C, Simoes S, Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release* 2002; 83: 273-286.
- [38] Jin C, Bai L, Wu H, Song W, Guo G, Dou K. Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells. *Pharm Res* 2009; 26: 1776-1784.
- [7] Engels FK, Mathot RA, Verweij J. Alternative drug formulations of docetaxel: a review. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 95-103.
- [8] Zhang W, Shi Y, Chen Y, Ye J, Sha X, Fang X. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. *Biomaterials* 2010; 32: 2894-2906.
- [9] Baker J, Ajani J, Scott F, Winther D, Martin M, Aapro MS, von Minckwitz G. Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs* 2009; 13: 49-59.
- [10] Mohammadi M, Dinarvand R, Esfandiari F, Ebrahimnejad P. Encapsulation of irinotecan in polymeric nanoparticles: Characterization, release kinetic and cytotoxicity evaluation. *Nanomedicine J* 2016; 3: 159-168. (Persian).
- [11] Fakhavar Z, Ebrahimnejad P, Akbarzadeh A. Nanoliposomes: Synthesis methods and applications in cosmetics. *J Cosmet Laser Ther* 2015; 12: 1-31.
- [12] Jafari M, Heidari D and Ebrahimnejad P. Synthesizing and characterizing functionalized short multiwall carbon nanotubes with folate, magnetite and polyethylene glycol as multi-targeted nanocarrier of anti-cancer drugs. *IJPR* 2016; 15: 449-456. (Persian).
- [13] Enayati AA, Ebrahimnejad P. Nano pesticides, production and application, a review. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22: 298-311. (Persian).
- [14] Ebrahimnejad P, Mir M. Preparation and characterization of bifunctional nanoparticles of vitamin E TPGS-emulsified PLGA-PEG-FOL containing deferasirox. *Nanosci Nanotechnol Asia* 2014; 4: 80-85. (Persian).
- [15] Akhtari J, Ebrahimnejad P, Rafiei. A review on the use of nanoparticles in the release of growth factors. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24: 431-445. (Persian).
- [16] Bouissou C, Rouse JJ, Price R, Van Der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res* 2006; 23: 1295-1305.
- [17] Esmaili F, Dinarvand R, Ghahremani MH, Amini M, Rouhani H, Sepehri N, et al. Docetaxel albumin conjugates: preparation, in vitro evaluation and biodistribution studies. *J Pharm Sci* 2008; 98: 2718-2730.
- [18] Esmaili F1, Ghahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, et al. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J Drug Target* 2008; 16: 415-423.
- [19] Niapour N, shokri gara geshlagi S, amani M, sharifi pasandi M, salehi H, niapour A. Effects of all trans retinoic acid on apoptosis induction and notch1, hes1 genes expression in gastric cancer cell line MKN-45. *Koomesh* 2016; 17: 1024-1032. (Persian).
- [20] Eskandari A, Jaberipour M, khodadadi A, Ghaderi A. IL-23 and IL-27 gene expression in three breast cancer cell lines and metastatic and non-metastatic lymph nodes in breast cancer patients. *Koomesh* 2011; 12: 428-434. (Persian).
- [21] Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Naderi H, Saedi Saravi SS. Comparison of the cytotoxic effects of *Juniperus sabina* and *Zataria multiflora* extracts with *Taxus baccata* extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacogn Mag* 2010; 6: 176-179.
- [22] Shokrzadeh M, Habibi E, Dadkhah G, Modanloo M. Evaluating the cytotoxicity effect of hydroalcoholic extract of juglans



## Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation of docetaxel nanoparticles against A549 cell line

Mohammad Shokrzadeh (Ph.D)<sup>1</sup>, Zavosh Zalzar (Pharm.D)<sup>2</sup>, Pedram Ebrahimnejad (Ph.D)<sup>\* 2,3</sup>

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

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

3 -Pharmaceutical Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

\* Corresponding author. +98 11-33553081 pebrahimnejad@mazums.ac.ir

Received: 7 Feb 2018; Accepted: 27 Nov 2018

**Introduction:** Docetaxel (DTX) is one of the most potent anticancer drugs in the taxane family. The commercial formulation of DTX for clinical use consists of high concentrations of tween80, which has been caused serious patient's difficulties. Therefore, preparation of novel drug delivery system with ability of removing tween 80 and targeting on cancer tissue can lead more effective and also decrease side effects. This study is focused on preparation, characterization and cytotoxicity evaluation of docetaxel and poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (NPs) against a tumor cell line.

**Materials and Methods:** NPs of DTX and PLGA was prepared by a modified emulsification/solvent diffusion method. Then the obtained NPs were characterized and evaluated. For this purpose, 10000 viable cells were seeded in each well of 96-well plate and after 24 hours of incubation different concentrations of conventional and NPs were added to the wells. Then mitochondrial dehydrogenase activities in living cells were determined at 24, 48 and 72 hours by MTT assay.

**Results:** The average diameter of the NPs was approximately  $184.3 \pm 14.6$  nm with poly dispersity index of 0.15. Notably, the results showed significant increase in cytotoxicity of the NPs against the A549 cell line. Inhibitory concentration (IC50) of free drug and NPs was  $20.66 \pm 0.22$ ,  $18.27 \pm 0.45$ ,  $10.64 \pm 0.38$  and  $0.57 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.04$ ,  $0.07 \pm 0.01$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) at 24, 48 and 72 hours respectively.

**Conclusion:** This study demonstrates the higher cytotoxicity of DTX-PLGA NPs on human lung cancer cell line. The present formulation can be considered for the further studies on other cell lines and in vivo evaluation.

**Keywords:** Docetaxel, Polylactic Acid-Polyglycolic Acid Copolymer, Nanotechnology