

## اثر سمیت سلولی نانوذرات هدفمند کیتوزان / رتینوئیک اسید / آلومین حاوی دوکسوروبیسین بر روی ردهی سلولی HepG2

دکتر ژاله ورشوساز<sup>۱</sup>، دکتر فرشید حسنزاده<sup>۲</sup>، دکتر حجت صادقی علی آبادی<sup>۳</sup>، زهرا علی محمد قلیچ خان<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** آنتراسیکلین‌ها در درمان سرطان‌های مختلف از جمله هپاتوسلولار کارسینوما کاربرد دارند، اما استفاده از آن‌ها با عوارض متعددی مانند سمیت قلبی همراه است. به کارگیری یک سیستم دارورسانی در اندازه‌ی نانو که دوکسوروبیسین را توسط گیرنده‌های رتینوئیک اسید برای هپاتوسلولار کارسینوما هدفمند نماید، می‌تواند این عوارض را کاهش دهد.

**روش‌ها:** کونژوگی کیتوزان/رتینوئیک اسید به روش آمیداسیون تهیه شد. نانوذرات کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلومین به روش Coacervation تهیه گردید. نانوذرات بهینه‌سازی شده بر اساس اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیته، کارایی بارگیری و رهش دوکسوروبیسین از نانوذرات جهت مطالعه‌ی سمیت بر روی ردهی سلولی HepG2 با روش MTT و میزان برداشت در این سلول‌ها با کمک میکروسکوپ فلورسانس انتخاب شد.

**یافته‌ها:** نانوذرات بهینه با اندازه‌ی ذره‌ای  $286 \pm 50$  نانومتر، پتانسیل زتای  $3/6 \pm 30/5$  میکروولت، اندکس پلی‌دیسپرسیته  $0/06 \pm 0/50$ ، کارایی بارگیری  $13/5 \pm 43/6$  درصد و رهش یک ساعته‌ی دارو به میزان  $6/00 \pm 56/17$  درصد در غلظت  $0/25$  میکروگرم در میلی‌لیتر، دارای سمیت سلولی حدود دو و سه برابر ذرات غیر هدفمند و داروی آزاد بودند و میزان برداشت سلولی آن‌ها نیز بیشتر بود.

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات هدفمند کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلومین حاوی دوکسوروبیسین اثربخشی بیشتر و اختصاصی‌تری ضد سلول‌های سرطانی HepG2 نسبت به داروی آزاد از خود نشان می‌دهند.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلومین، دوکسوروبیسین، HepG2، MTT assay

**ارجاع:** ورشوساز ژاله، حسنزاده فرشید، صادقی علی آبادی حجت، علی محمد قلیچ خان زهرا. اثر سمیت سلولی نانوذرات هدفمند کیتوزان/رتینوئیک

اسید/آلومین حاوی دوکسوروبیسین بر روی ردهی سلولی HepG2. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۸): ۲۲۱۶-۲۲۰۶

همچنین شایع‌ترین بدخیمی اولیه‌ی کبد می‌باشد. اطلاعات نشان می‌دهند که میزان ابتلا به بیماری در بعضی کشورها مانند کشورهای اروپای مرکزی، آمریکای شمالی و اقیانوسیه به علل نامعلومی همچنان

#### مقدمه

کارسینوما هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma) یا HCC پنجمین بدخیمی شایع در جهان و سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان است. این بیماری

\* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۸۹۲۴۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ژاله ورشوساز

کرد (۲۱-۱۸).

رتینوئیک اسیدها مشتقات طبیعی و صناعی ویتامین A هستند که سبب مهار تکثیر و القای تمایز در سلول‌های سرطانی می‌گردند (۲۷-۲۲). بررسی‌های انجام‌گرفته از طریق RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) و Western blot که به منظور ارزیابی بیان mRNAهای گیرنده‌ی رتینوئیک اسید در کبد مبتلا به HCC و نیز کبد سالم بود، مشخص نمود که میزان mRNA و نیز پروتئین گیرنده‌ی رتینوئیک اسید آلفا به میزان قابل توجهی نسبت به کبد سالم، بالاتر بوده است. این میزان برای گیرنده‌های نوع بتا و گاما به مراتب نسبت به نوع آلفا کمتر بوده است. همچنین مشاهده شده است که رشد رده‌ی سلولی HCC که در آن بیان گیرنده‌ی نوع آلفا افزایش پیدا کرده بود توسط درمان با رتینوئیدها مهار می‌گردد. نتایج مذکور مشخص می‌نماید که گیرنده‌ی رتینوئیک اسید آلفا در HCC، گیرنده‌ی غالب است (۲۸).

نانوذرات با ساختار مجموعه‌های پلی‌الکترولیتی که از طریق واکنش بین پلی‌یون‌های با بار مخالف تهیه می‌شوند، توجه زیادی را به عنوان سیستم‌های دارورسانی به خود جلب کرده‌اند. مشاهده شده است که کیتوزان قادر است چنین نانوذراتی را با پلی‌آنیون‌های مختلفی از جمله هیالورونیک اسید، آلژینات، Carboxy methyl cellulose (CMC)، هپارین، کاراژینان، کندرویتین سولفات، DNA تشکیل دهد. نانوذرات مذکور جهت رساندن داروهایی از جمله 5-FU (5-Fluorouracil)، سیس‌پلاتین و دوکسوروبیسین به کار رفته‌اند. به عنوان مثال سیتوتوکسیسیته‌ی نانوذرات کیتوزان/ پلی‌آکرلیک

در حال افزایش است (۲-۱). این در حالی است که مرگ و میر در اثر سایر عوارض مرتبط با سیروز رو به کاهش گذاشته است (۳). میزان بقای ۵ ساله‌ی HCC در سراسر جهان کمتر از ۵ درصد است و هر سال در حدود ۶۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا جان خود را از دست می‌دهند (۴-۵).

بیمارانی که در مراحل اولیه تشخیص داده می‌شوند از جراحی و پیوند کبد سود می‌برند، اما بیش از ۸۰ درصد بیماران در مراحل میانی تشخیص داده می‌شوند (۱۰-۶). حتی پس از اقدامات درمانی فوق میزان عود بالا است (۱۱). مشکل دیگر حساسیت پایین به پرتودرمانی و مقاومت بالا در برابر داروهای ضد سرطان موجود است (۱۳-۱۲).

علاوه بر این، عوارض جانبی این داروها تا حدود زیادی درمان را با محدودیت مواجه ساخته است. از جمله داروهایی که در درمان HCC به کار می‌روند آنتراسیکلین‌ها هستند که از میان آن‌ها می‌توان به دوکسوروبیسین اشاره کرد. مهم‌ترین عارضه‌ی جانبی دوکسوروبیسین، سمیت قلبی آن است که به طور عمده به صورت مزمن و به شکل نارسایی احتقانی قلب بروز می‌کند (۱۷-۱۴).

با توجه به محدودیت‌ها و عوارض ذکر شده تهیه‌ی یک شکل دارویی که به طور اختصاصی سلول‌های مبتلای کبدی را هدف قرار دهد، از اهمیت خاصی برخوردار است. از میان روش‌های دارورسانی هدفمند در HCC، آن‌هایی که از طریق شناسایی اجزای سطحی مختص سلول‌های مبتلا به HCC عمل می‌کنند اختصاصی‌تر هستند. از این اجزا می‌توان به VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor)، آپتامرها و مولکول‌های کوچکی مانند گالاکتوز اشاره

برابر آب دیونیزه درون یک غشای دیالیز با Cut off ۲۰۰۰ دیالیز شد و در انتها توسط دستگاه فریز درایر لیوفیلیزه شد.

جهت تهیه نانوذرات حاوی دوکسوروبیسین، ابتدا کونژوگه کیتوزان رتینوئیک اسید در مخلوط آب و اسید استیک حل گردید. pH مخلوط روی ۲/۴ تنظیم شد. دیسپرشن (Dispersion) حاصل به کمک پروب سونیکاتور سونیکه گردید و دوکسوروبیسین به ظرف فوق اضافه شد. سپس محلول آلبومین به صورت قطره قطره در حین هم خوردن ظرف حاوی دارو با ۶۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه گردید. جهت تهیه محلول بلانک تمامی مراحل مذکور منهای افزودن دارو تکرار شد. جهت تهیه نانوذرات بدون رتینوئیک اسید، به جای کونژوگه کیتوزان/رتینوئیک اسید از مقدار مساوی کیتوزان استفاده شده است.

پس از تهیه نانوذرات، اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی دیسپرسیته توسط دستگاه نانو-زتا سایزر مالورن اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان دوکسوروبیسین بارگیری شده در نانوذرات، ۶۰۰ میکرولیتر از آن برداشته شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. جذب محلول باقی مانده در ته لوله‌ی سانتریفوژ در برابر بلانک (که تمامی مراحل گفته شده برای آن نیز انجام شده است) در طول موج ۲۴۷ نانومتر خوانده شد. با استفاده از معادله‌ی جذب-غلظت در محیط آب مقطر میزان داروی آزاد و از روی آن داروی بارگیری شده محاسبه شد. کارایی بارگیری دارو در نانوذرات و درصد بارگیری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

اسید که با دوکسوروبیسین بارگیری شده بود، بر روی رده‌ی سلولی HepG2 با میزان مشاهده شده برای داروی آزاد قابل مقایسه بود (۲۹).

هدف از مطالعه حاضر، تهیه‌ی دوکسوروبیسین بارشده در نانوذرات هدفمند کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلبومین (CRA) و بررسی تأثیر آن بر روی سلول‌های سرطانی کبد در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد به منظور ارائه‌ی یک روش دارورسانی هدفمند بود.

### روش‌ها

در این مطالعه کونژوگه‌ی کیتوزان/رتینوئیک اسید به روش آمیداسیون و نانوذرات کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلبومین به روش Coacervation تهیه گردید.

جهت تهیه کونژوگه‌ی کیتوزان/رتینوئیک اسید ۱۲۰ میلی گرم رتینوئیک اسید همراه با N-هیدروکسی سوکسینیمید (NHS) و دی‌سیکلو هگزایل کربو دی ایمید (DCC) هر کدام به میزان ۱/۵ برابر مولی رتینوئیک اسید در ۲۰ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) خشک، حل شد. محلول به دست آمده تحت اتمسفر نیتروژن در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. پس از ۲۴ ساعت محصول جانبی واکنش یعنی دی‌سیکلو هگزایل اوره با فیلتر جدا گردید. سپس این محلول به محلول ۲ گرم کیتوزان در ۲۰ میلی لیتر بافر استات ۰/۱ مول (با pH = ۴/۷) به صورت قطره قطره و در حال هم خوردن اضافه شد و اجازه داده شد که مخلوط فوق به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق به هم بخورد. پس از اتمام واکنش، pH توسط محلول رقیق به ۹ رسانده شد. در مرحله‌ی بعد محصول واکنش دو روز در مقابل بافر فسفات (pH = ۷/۴) و دو روز در

۱۰ میکروگرم در میلی لیتر با و بدون عامل کونژوگه‌ی رتینوئیک اسید/ کیتوزان، ۲۰ میکرولیتر از نانوذرات فاقد دارو با و بدون عامل کونژوگه‌ی مذکور در همان غلظت‌ها به عنوان بلانک نانوذرات حاوی دارو و ۲۰ میکرولیتر از داروی خالص در همان غلظت‌ها به عنوان شاهد مثبت به سلول‌ها اضافه شد. به یک ردیف سلول که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود، چیزی اضافه نشد.

پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از این مدت به تمامی چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر MTT افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس پلیت خارج شد و پس از تخلیه‌ی محلول درون چاهک‌ها، به هر چاهک مقدار ۱۸۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و هر ردیف پیتاژ شد. در نهایت جذب چاهک‌ها به کمک دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

درصد سلول‌های زنده پس از سه مرتبه تکرار با استفاده از معادله زیر برای هر ردیف محاسبه شد:

$$\text{Cell survival}\% = \frac{\text{Mean of each group} - \text{mean of blank}}{\text{mean of negative control} - \text{mean of blank}} \times 100$$

برای بررسی برداشت سلولی به کمک میکروسکوپ فلورسانس، ابتدا در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه بر روی لامل‌های قرار داده شده در کف پلیت ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی که با غلظت  $10^5$  سلول در هر میلی لیتر تهیه شده بود، ریخته شد و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ CO<sub>2</sub> درصد و رطوبت ۹۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از این مدت به هر ردیف از چاهک‌ها مواد زیر اضافه شد:

۱ میلی لیتر محلول سدیم فلورسئین خالص با

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

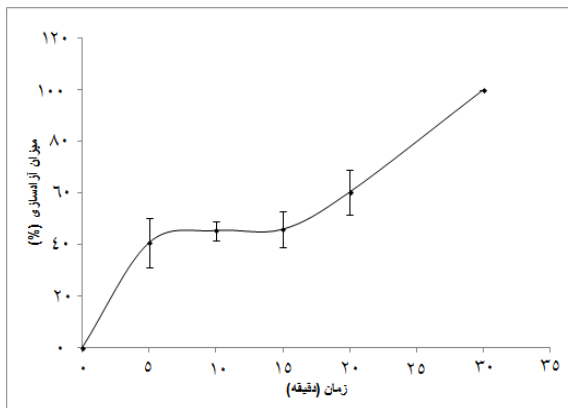
برای اندازه‌گیری سرعت رهش دارو از نانوذرات مقدار ۲ میلی لیتر از نانودیسپرشن بهینه در کیسه‌ی دیالیز (Viskase، Membra-Cel، آمریکا) با Cut off (نقطه‌ی برش) وزن مولکولی ۱۲۰۰۰ دالتون ریخته شد. پس از بستن دو سر کیسه درون بافر فسفات (pH = ۷/۴) حاوی ۲ درصد تویین ۲۰ قرار داده شد. در زمان‌های مشخص از محیط رهش نمونه‌گیری شد و جذب آن در برابر بلانک (که تمامی مراحل گفته شده برای آن نیز انجام شده بود) در طول موج ۴۹۹/۴ نانومتر خوانده شد و نمودار رهش در برابر زمان نانوذرات رسم شد.

برای تهیه‌ی عکس میکروسکوپی TEM (Transmission electron microscopy)، مقدار مناسب از نانودیسپرشن بر روی یک گرید مسی با مش ۳۰۰ و روکش کربنی قرار داده شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. سپس تصاویر با ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی ۸۰ کیلوولت و با بزرگ‌نمایی‌های مختلف تهیه شدند.

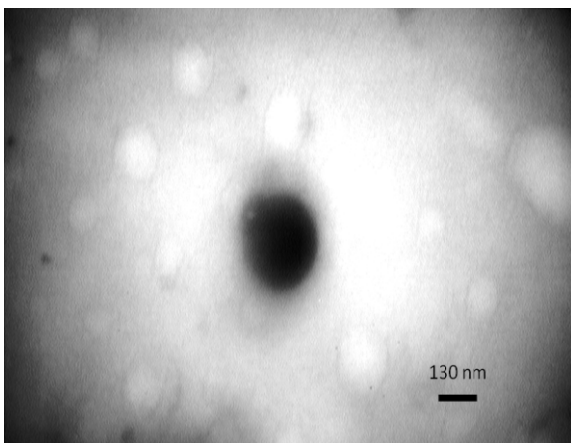
برای بررسی سمیت سلولی به روش MTT در ابتدا سوسپانسیون سلولی، با غلظت  $10^4 \times 5$  سلول در هر میلی لیتر تهیه شد و ۱۸۰ میکرولیتر در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ CO<sub>2</sub> درصد و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. یک ردیف به عنوان بلانک سلولی، تنها با محیط کشت پر شد.

نانوذرات حاوی دارو پس از تهیه به به چاهک‌ها اضافه شد. برای این کار ۲۰ میکرولیتر از نانوذرات حاوی دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۵، ۲/۵ و

دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی HepG2 به روش MTT تست گردید که نتایج آن در شکل ۳ آمده است. در این شکل درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در مورد نانوذرات بهینه‌ی حاوی دارو و عامل هدفمند کننده‌ی رتینوئیک اسید و نانوذرات مذکور بدون دارو، نانوذرات حاوی دارو بدون عامل هدفمندکننده و نانوذرات مذکور بدون دارو و نیز داروی آزاد آورده شده است.



شکل ۱. میزان آزادسازی دارو از نانوذرات بهینه‌ی کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلبومین



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ TEM (Transmission electron microscopy) تهیه شده از نانوذرات بهینه‌ی کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلبومین

غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که از استوک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شده بود، ۱ میلی‌لیتر نانوذرات حاوی سدیم فلورسئین با و بدون عامل کونژوگه‌ی رتینوئیک اسید/کیتوزان و ۱ میلی‌لیتر نانوذرات فاقد سدیم فلورسئین با و بدون عامل مذکور با همان غلظت به عنوان بلانک نانوذرات حاوی سدیم فلورسئین.

سپس پلیت در انکوباتور قرار گرفت و پس از ۱ ساعت لامل‌های قرارگرفته در کف یک ردیف از پلیت بیرون آورده شد و توسط میکروسکوپ نور مرئی و میکروسکوپ فلورسانس از آن‌ها عکس‌برداری شد. همین کار ۳ ساعت بعد نیز برای یک ردیف دیگر از پلیت تکرار شد.

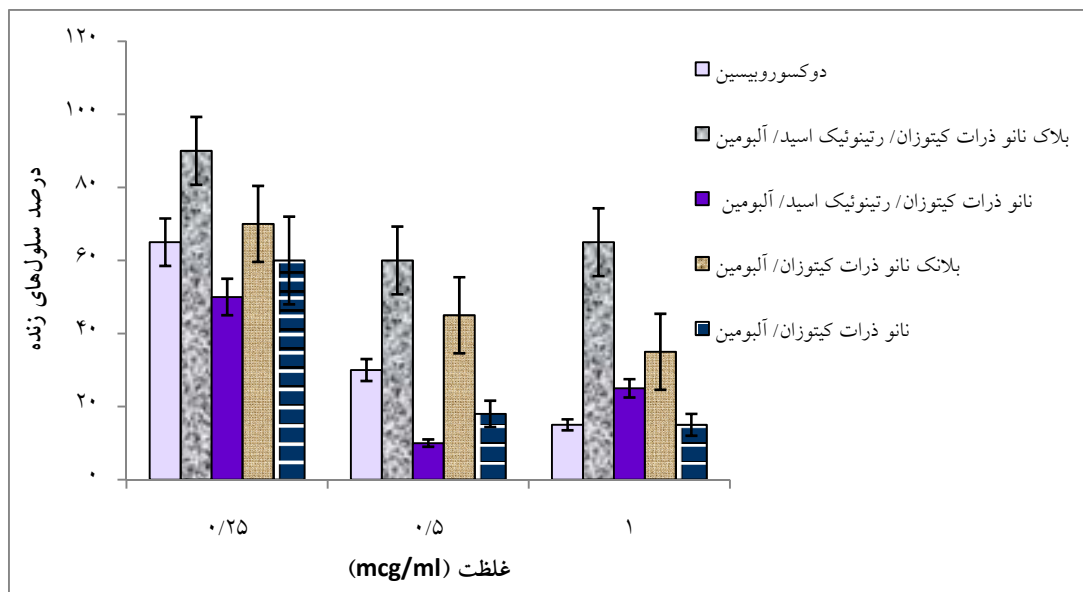
### یافته‌ها

میانگین اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیته به دست‌آمده برای نانوذرات فرمولاسیون بهینه محاسبه شد. میانگین اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیته، کارایی بارگیری و درصد داروی آزاد شده تا ۳۰ دقیقه برای فرمولاسیون بهینه به ترتیب  $286 \pm 50$  نانومتر،  $30/5 \pm 3/6$  میلی‌ولت،  $0/5 \pm 0/06$ ،  $43/6 \pm 13/5$  درصد و  $56/17 \pm 6/0$  بود.

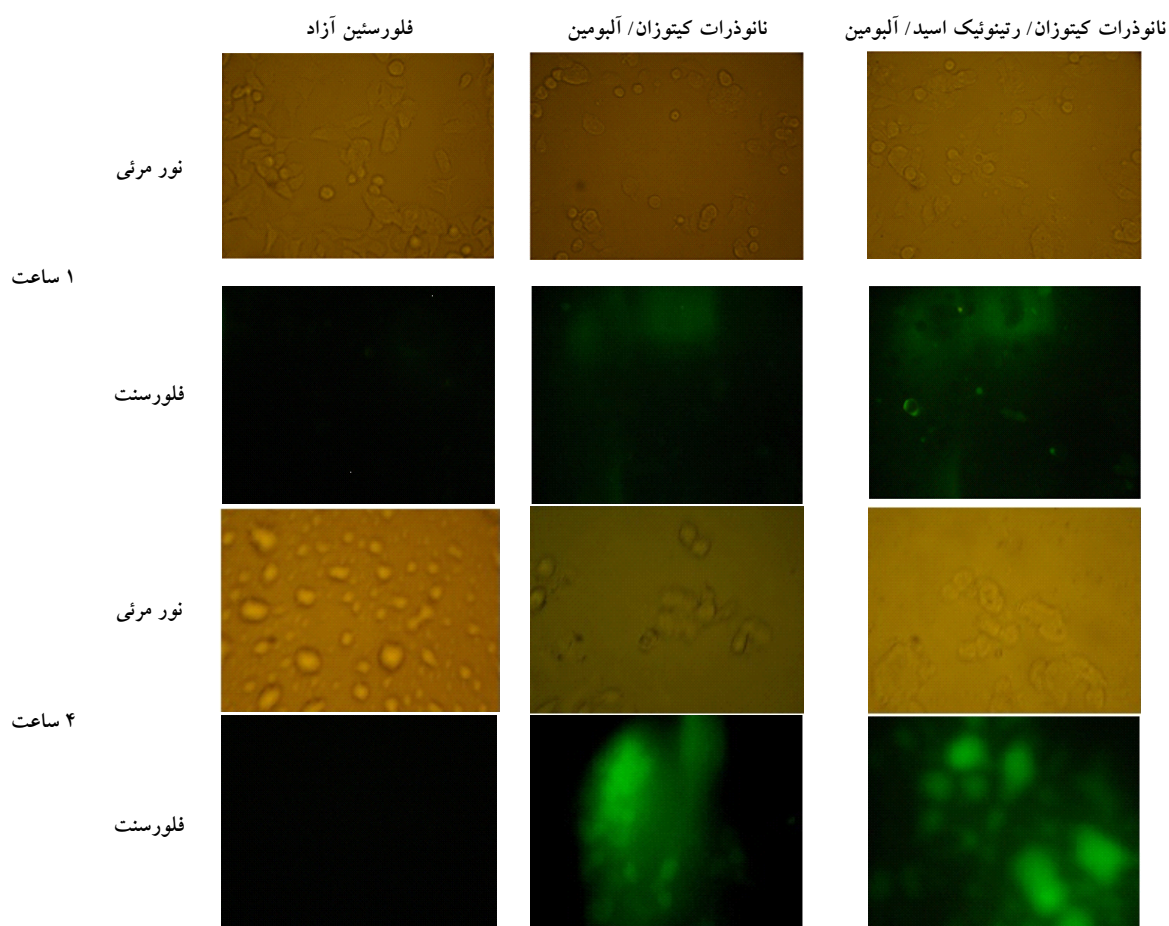
نتایج حاصل از سه مرتبه تکرار بررسی میزان آزادسازی دارو از نانوذرات بهینه‌ی در شکل ۱ نشان داده شده است.

عکس مربوط به میکروسکوپ TEM تهیه شده از نانوذرات بهینه در شکل ۲ نشان داده شده است.

سمیت سلولی دوکسوروبیسین آزاد همراه با غلظت‌های مختلف از نانوذرات CRA حاوی



شکل ۳. درصد زنده ماندن سلول‌ها در گروه‌های مختلف تحت آزمایش در رده‌ی سلولی HepG2



شکل ۴. تصاویر تهیه شده از برداشت سلولی سدیم فلورسئین به فرم آزاد، بارشده در نانوذرات هدفمند کیتوزان/رتینوئیک اسید/آلبومین یا غیر هدفمند کیتوزان/آلبومین به کمک میکروسکوپ نور مرئی و فلورسنت



تولید ذرات نیز کاهش می‌یابد.

به این منظور روش Coacervation به عنوان روش تهیه انتخاب گردید. در این روش که شامل تهیه‌ی یک محلول از پلیمر مورد نظر و سپس افزودن جزء دومی به محل مذکور جهت تهیه‌ی یک کمپلکس نامحلول از پلیمر است، کیتوزان با بار مثبت با اضافه کردن آلبومین با بار منفی ایجاد نانوذراتی می‌کند که در محیط به صورت نانودیسپرسن رسوب می‌کنند (۳۰).

همان گونه که نتایج نشان داد، ذرات تهیه شده اندازه‌ی مناسب  $286 \pm 50$  نانومتر و اندکس پلی‌دیسپرسیویتی  $0.06 \pm 0.5$  داشتند که به معنی یکنواختی خوبی در توزیع اندازه‌ی آن‌ها است. همچنین ذرات دارای کارایی بارگیری متوسط  $13/5 \pm 43/6$  درصد دوکسوروبیسین بودند که میزان قابل قبولی است. کارایی رهش  $6/00 \pm 56/17$  درصد بود. این میزان نشان‌دهنده‌ی رهش مناسب و در مجموع کارآمد دارو از نانوذرات بهینه‌ی تهیه‌شده، بود. تصویر TEM هم اندازه‌ی مناسب و شکل یکنواخت ذرات را به خوبی نشان داد. این یکنواختی به معنی تشکیل مناسب ذرات بود.

در شکل ۳ دیده شد که  $IC_{50}$  هم در نانوذرات هدفمند و هم غیر هدفمند در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد کاهش یافت و ذرات هدفمند کمترین  $IC_{50}$  را داشتند؛ به نحوی که  $IC_{50}$  در مورد ذرات هدفمند برابر با  $0.25$  میکروگرم در میلی‌لیتر، برای ذرات غیر هدفمند برابر با  $0.5$  میکروگرم در میلی‌لیتر و در مورد داروی آزاد برابر  $0.25$  تا  $0.5$  میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین اثر مهار بر روی رشد در سلول‌هایی مشاهده شد که با ذرات

نتایج بررسی به کمک میکروسکوپ نور مرئی و نیز فلورسانس در شکل ۴ مشاهده می‌شود. از سلول‌ها پس از ۱ و ۴ ساعت از انکوباسیون با نانوذرات حاوی فلورسین سدیم و نیز فلورسین سدیم خالص توسط این دو میکروسکوپ عکس‌برداری شده است. فلورسانس به صورت نقاط سبز رنگ در سلول‌ها قابل رؤیت است.

### بحث

دوکسوروبیسین در انواع سرطان به کار رفته است و عوارض جانبی متعددی برای این دارو ذکر شده است که از میان آن‌ها می‌توان به سمیت قلبی مزمن به عنوان مهم‌ترین عارضه اشاره کرد. این عارضه حتی می‌تواند تا حد نارسایی احتقانی قلبی مرحله‌ی ۴ هم پیشرفت کند و جزء عوامل مهم محدودکننده‌ی درمان است. بنابراین اگر بتوانیم به طریقی دارو را به صورت اختصاصی به سلول‌های مبتلای کبد برسانیم، علاوه بر کاهش این عوارض جانبی قادر خواهیم بود اثر دارو را افزایش دهیم و دوز کلی کمتری از آن را به کار ببریم. با قرار دادن دارو در حاملی با اندازه‌ی نانو می‌توانیم برداشت آن را توسط سلول‌ها افزایش دهیم. این حامل را با به کارگیری دو عامل طبیعی آلبومین و کیتوزان تهیه کردیم. همچنین جهت رساندن اختصاصی دارو به سلول‌های کبدی از اتصال رتینویک اسید به سطح نانوذرات استفاده کردیم. با به کارگیری آلبومین و کیتوزان جهت ساخت حامل، از یک روش بی‌نیاز از حامل‌های آلی استفاده شده است. بنابراین علاوه بر نبودن بقایای سمی در فرآورده‌ی نهایی که سبب کاهش عوارض مصرف دارو به این فرم می‌گردد، مراحل خالص‌سازی و بالطبع هزینه‌های

پس از ۴ ساعت انکوباسیون، فلورسانس به وضوح در سلول‌هایی که با نانوذرات هدفمند حاوی سدیم فلورسئین تیمار شده بودند، نسبت به سلول‌های انکوبه‌شده با نانو ذرات غیر هدفمند بیشتر بود و فلورسانس قابل مشاهده‌ای در سلول‌های انکوبه‌شده با سدیم فلورسین خالص دیده نشد. از این مطالب می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان مرگ سلولی مشاهده شده در داده‌های حاصل از مطالعات سمیت سلولی، ناشی از برداشت اختصاصی نانوذرات هدفمند حاوی دارو بوده است که به علت قرار داشتن عامل رتینویک اسید بر روی این ذرات صورت گرفته است.

### نتیجه‌گیری

نانوذرات CRA حاوی دوکسوروبیسین که برای گیرنده‌های رتینویک اسید هدفمند شده‌اند، می‌توانند سبب افزایش اثر سیتوتوکسیک داروی مورد نظر در HCC که این گیرنده‌ها در آن به میزان زیادی بیان می‌گردند، شوند.

با توجه به کاهش سه برابری IC50 دوکسوروبیسین این سیستم حامل دارویی ممکن است بتواند برای کاهش دوز مورد مصرف این دارو و همچنین کاهش عوارض سیستمیک آن به ویژه سمیت قلبی ارزشمند واقع شود.

### تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

هدفمند در غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار شده بودند که به ترتیب در حدود دو و سه برابر بیشتر از اثری بود که با ذرات غیر هدفمند و داروی آزاد در همان غلظت مشاهده می‌گردد.

درصد زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر ذرات هدفمند CRA افزایش داشت. Antonyak و همکاران گزارش نمودند که رتینویک اسید و آنالوگ‌های صناعی مختلف آن بر رشد، تمایز و آپوپتوز سلول‌های پستانداران تأثیر می‌گذارند (۳۱). درمان رده‌ی سلولی HL60، که یک رده‌ی سلولی لوکمیک انسانی است، با رتینویک اسید منجر به تمایز سلولی و افزودن N (۴-هیدروکسی فنیل) رتینامید (HPR) که یک رتینوئید صناعی است سبب آپوپتوز سلول‌های HL60 گردیده است.

علاوه بر این، پیش تیمار سلول‌های HL60 و سایر رده‌های سلولی (به عنوان مثال سلول‌های NIH3T3) با رتینویک اسید، از مرگ سلولی ناشی از HPR جلوگیری نموده است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثرات مهار رتینویک اسید بر روی رده‌ی سلولی HepG2 که در HCC از طریق بیان افزایش‌یافته‌ی گیرنده‌های  $\alpha$  اعمال می‌شود، ممکن است وابسته به دوز باشد. هنگامی که غلظت نانوذرات افزایش داده شد، غلظت رتینویک اسید که بر روی ذرات قرار گرفت نیز در محیط اطراف سلول‌ها افزایش یافت. این موضوع ممکن است سبب جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از دوکسوروبیسین موجود در ذرات، شده باشد در نتیجه میزان سلول‌های زنده در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت.



## References

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35(5 Suppl 2): S72-S78.
2. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 378-90.
3. Deuffic S, Poynard T, Buffat L, Valleron AJ. Trends in primary liver cancer. *Lancet* 1998; 351(9097): 214-5.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
5. Cabrera R, Nelson DR. Review article: the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31(4): 461-76.
6. Rustgi VK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987; 16(4): 545-51.
7. London WT. Primary hepatocellular carcinoma-etiology, pathogenesis, and prevention. *Hum Pathol* 1981; 12(12): 1085-97.
8. Lai CL, Gregory PB, Wu PC, Lok AS, Wong KP, Ng MM. Hepatocellular carcinoma in Chinese males and females. Possible causes for the male predominance. *Cancer* 1987; 60(5): 1107-10.
9. Muir CS, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan SL. Cancer incidence in five continents. Lyon, France: Scientific Publications; 1987. p. 88.
10. Nerenstone SR, Ihde DC, Friedman MA. Clinical trials in primary hepatocellular carcinoma: current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 1988; 15(1): 1-31.
11. Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25(27): 3866-84.
12. Huang M, Liu G. The study of innate drug resistance of human hepatocellular carcinoma Bel7402 cell line. *Cancer Lett* 1999; 135(1): 97-105.
13. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362(9399): 1907-17.
14. Katz A, Goldenberg I, Maoz C, Thaler M, Grossman E, Rosenthal T. Peripartum cardiomyopathy occurring in a patient previously treated with doxorubicin. *Am J Med Sci* 1997; 314(6): 399-400.
15. Lacasse Y, Bolduc P. Sudden death in leukemic patients treated with doxorubicin. *Can J Cardiol* 1992; 8(1): 53-6. [In French].
16. Viale PH, Yamamoto DS. Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment. *Clin J Oncol Nurs* 2008; 12(4): 627-38.
17. Lishner M, Elis A, Ravid M. Late doxorubicin cardiotoxicity. *Anticancer Drugs* 1992; 3(4): 367-9.
18. Chen J, Wu H, Han D, Xie C. Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett* 2006; 231(2): 169-75.
19. Liu P, Li Z, Zhu M, Sun Y, Li Y, Wang H, et al. Preparation of EGFR monoclonal antibody conjugated nanoparticles and targeting to hepatocellular carcinoma. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(2): 551-6.
20. Kou G, Wang S, Cheng C, Gao J, Li B, Wang H, et al. Development of SM5-1-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374(2): 192-7.
21. Kim TH, Park IK, Nah JW, Choi YJ, Cho CS. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. *Biomaterials* 2004; 25(17): 3783-92.
22. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 2007; 129(4): 723-33.
23. Recchia F, Saggio G, Cesta A, Candeloro G, Di BA, Amiconi G, et al. Phase II study of interleukin-2 and 13-cis-retinoic acid as maintenance therapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5): 699-708.
24. Guo J, Xiao B, Lou Y, Yan C, Zhan L, Wang D, et al. Antitumor effects of all-trans-retinoic acid on cultured human pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(2): 443-8.
25. Tsimberidou AM, Tirado-Gomez M, Andreeff M, O'Brien S, Kantarjian H, Keating M, et al. Single-agent liposomal all-trans retinoic acid can cure some patients with untreated acute promyelocytic leukemia: an update of The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Series. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(6): 1062-8.
26. Singh B, Murphy RF, Ding XZ, Roginsky AB, Bell RH, Jr., Adrian TE. On the role of transforming growth factor-beta in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2007; 6: 82.
27. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3): 181-93.
28. Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid

- receptor alpha in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2003; 9(10 Pt 1): 3679-83.
29. Patel MP, Patel RR, Patel JK. Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. J Pharm Pharm Sci 2010; 13(4): 536-57.
30. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. Int J Pharm 2004; 274(1-2): 1-33.
31. Antonyak MA, Singh US, Lee DA, Boehm JE, Combs C, Zgola MM, et al. Effects of tissue transglutaminase on retinoic acid-induced cellular differentiation and protection against apoptosis. J Biol Chem 2001; 276(36): 33582-7.

## Cytotoxic Effects of Chitosan/Retinoic Acid/Albumin Targeted Nanoparticles Loaded with Doxorubicin on Human Hepatoma Cells

Jaleh Varshosaz PhD<sup>1</sup>, Farshid Hassanzadeh PhD<sup>2</sup>, Hojat Sadeghi Aliabadi PhD<sup>3</sup>,  
Zahra Alimohammad Ghelichkhan<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Anthracyclines are used to treat different types of cancer including hepatocellular carcinoma. However, they have various side effects such as cardiotoxicity. Designing a drug delivery system which targets retinoic acid receptors in hepatocellular carcinoma can reduce these side effects.

**Methods:** Chitosan/retinoic acid/albumin nanoparticles were prepared using a coacervation method. Nanoparticles which were optimized according to their particle size, zeta potential, polydispersity index, loading efficiency and release of doxorubicin, were used for further tests of cytotoxicity on HepG2 cells [by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay] and cellular uptake tests (by fluorescent microscopy).

**Findings:** The optimum targeted nanoparticles (with particle size of  $286 \pm 50.0$  nm, zeta potential of  $30.5 \pm 3.6$  mv, polydispersity index of  $0.50 \pm 0.06$ , loading efficiency of  $43.6 \pm 13.5\%$ , and drug release of  $56.17 \pm 6.00\%$ ) in a concentration of 0.5 mg/ml were two to three times more cytotoxic than non-targeted nanoparticles and free drug. Their cellular uptake was also more.

**Conclusion:** Chitosan/retinoic acid/albumin targeted nanoparticles loaded with doxorubicin could affect HepG2 cells more effectively than non-targeted nanoparticles and free drug.

**Keywords:** Chitosan/retinoic acid/albumin nanoparticles, Doxorubicin, HepG2, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay

**Citation:** Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi Aliabadi H, Alimohammad Ghelichkhan Z. **Cytotoxic Effects of Chitosan/Retinoic Acid/Albumin Targeted Nanoparticles Loaded with Doxorubicin on Human Hepatoma Cells.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(218): 2206-16

\* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 389241 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Pharm D Student, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Jaleh Varshosaz PhD, Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir