مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۱/هفته سوم مرداد ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۵

# اثر سمیت سلولی میسل‌های پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) حاوی دوکسوروبیسین بر روی رده‌ی سلولی MCF-7

دکتر ژاله ورشوساز[۱]، دکتر فرشید حسن‌زاده[۲]، دکتر حجت صادقی علی‌آبادی[۳]، زهرا لاریان[۴]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** دوکسوروبیسین در درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان کاربرد دارد اما استفاده از آن با عوارض متعددی مانند سمیت قلبی همراه است. به کارگیری یک سیستم دارورسانی مانند میسل‌های پلیمری حاوی دوکسوروبیسین ممکن است بتواند باعث کاهش عوارض این دارو شود.

**روش‌ها:** ابتدا مشتق پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) سنتز شد. میسل‌های حاوی دوکسوروبیسین به روش انحلال مستقیم تهیه گردید. میسل‌ها بر اساس اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیتی، کارایی بارگیری و رهش دوکسوروبیسین از میسل‌ها، بهینه‌سازی شد و جهت مطالعه‌ی سمیت روی رده‌ی سلولی MCF-7 با روش MTT به کار برده شد.

**یافته‌ها:** میسل‌های بهینه دارای اندازه‌ی ذره‌ای ۳۸ ± ۴۱۹ نانومتر، پتانسیل زتای ۱/۲ ± ۱۳/۳– میلی‌ولت، اندکس پلی‌دیسپرسیتی ۰/۰۱۹ ± ۰/۴۵، کارایی بارگیری ۲/۷ ± ۹۳/۵ درصد و کارایی رهش چهار ساعته‌ی دارو به میزان ۳/۷ ± ۲۹/۰۳ درصد بودند. میسل‌های بارشده با دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۰/۲۱، ۰/۲۶، ۰/۳۴، ۰/۴۷ و ۰/۷۸ میکرومولار به طور معنی‌دار ( $P < ۰/۰۵$) سمیت سلولی بیشتری در مقایسه با میسل‌های بدون دارو و داروی آزاد داشتند.

**نتیجه‌گیری:** میسل‌های پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) حاوی دوکسوروبیسین اثر بخشی بیشتری علیه سلولهای سرطانی MCF-7 نسبت به داروی آزاد از خود نشان می‌دهند.

**واژگان کلیدی:** میسل‌های پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید)، دوکسوروبیسین، MCF-7، MTT assay

**ارجاع:** ورشوساز ژاله، حسن‌زاده فرشید، صادقی علی‌آبادی حجت، لاریان زهرا. **اثر سمیت سلولی میسل‌های پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) حاوی دوکسوروبیسین بر روی رده‌ی سلولی MCF-7**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۱): ۸۸۴-۸۷۶

## مقدمه

سرطان پستان یکی از بدخیمی‌هایی است که در جوامع به سرعت رو به رشد است. این سرطان در میان زنان شایع‌تر است و با مرگ و میر زیادی همراه بوده است (۱).

سرطان، دومین عامل مرگ و میر در آمریکا بعد از

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۹۰۴۸۷ 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، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، 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
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر ژاله ورشوساز
Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir

بیماری‌های قلبی- عروقی است. سالانه در حدود ۶۰۰/۰۰۰ مرگ در اثر سرطان رخ می‌دهد (یک مرگ در هر دقیقه). بیشترین شیوع سرطان در میان سالمندان (بزرگ‌تر از ۷۰ سال) گزارش شده است (۲).

پس از کشف دوکسوروبیسن، این دارو به سرعت به یکی از قوی‌ترین عوامل مورد استفاده در شیمی‌درمانی تبدیل شد (۳). دوکسوروبیسن یک آنتی‌بیوتیک آنتراسیکلین ضد سرطان است که از طریق ایجاد اتصالات کوالان بازهای نوکلئوتیدی باعث مهار نسخه‌برداری نوکلئوتیدها و عملکرد DNA و RNA پلیمراز می‌شود. همچنین با مهار توپوایزومراز ۲ منجر به تشکیل کمپلکس‌های شکننده‌ی DNA می‌شود و با تشکیل رادیکال‌های آزاد و تغییر در غشاهای سلولی باعث مرگ در سلول سرطانی می‌شود. دوکسوروبیسن یک عامل غیر اختصاصی چرخه‌ی سلولی است و همچنین دارای خصوصیات ضد باکتری و مهارکننده‌ی سیستم ایمنی می‌باشد (۵-۴).

مهم‌ترین عارضه‌ی جانبی دوکسوروبیسین، سمیت قلبی آن است که به طور عمده به صورت مزمن و به شکل نارسایی احتقانی قلب بروز می‌کند. همچنین سمیت حاد سلول‌های مغز استخوان و اپیتلیال روده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سمیت سلولی غیر انتخابی دلیل اصلی محدودیت استفاده از دوزهای بالاتر داروهای شیمیدرمانی است (۶).

یکی از سیستم‌های دارورسانی نویدبخش بر مبنای تکنولوژی نانوذره‌ای، میسل‌های پلیمری هستند که در مطالعات کلینیکی داروهای ضد سرطان به کار رفته‌اند. میسل‌های پلیمری ساختار پوسته- هسته دارند که می‌توانند داروهای کم محلول در آب را در داخل هسته‌ی هیدروفوب خود حل کنند و بنابراین باعث افزایش زیست دستیابی، کاهش دوز داروی مورد استفاده و در نتیجه کاهش عوارض جانبی و سمیت وابسته به دوز می‌شوند (۹-۷).

کوپلیمرهای بلوکی پلورونیک پلیمرهای صناعی آمفی‌فیلیکی هستند که از بلوک‌های هیدروفیل پلی (اتیلن اکساید) و بلوک‌های هیدروفوبیک پلی (پروپیلن اکساید) تشکیل شده‌اند (۱۰). پلورونیک مهارکننده‌ی پمپ P-گلیکوپروتئین است. این پمپ مسؤول مقاومت دارویی به داروهایی مانند دوکسوروبیسین، پاکلی‌تاکسل، وین‌بلاستین و سایر داروهای ضد سرطان است (۱۱).

میسل‌های پلورونیک نوع جدیدی از حامل‌های نانوداروها هستند که نه تنها باعث بهبود حلالیت، افزایش زمان در گردش آن و رهش طولانی دارو می‌شوند، بلکه سبب مهار پمپ P-گلیکوپروتئین و حساس کردن سلول‌های مقاوم به دارو نیز می‌شوند. به تازگی با اتصال پلی‌آکریلیک اسید به این پلیمر، خواص محلول‌سازی داروها را در آن افزایش داده‌اند (۱۲).

پلی (متیل وینیل اتر- مالئیک اسید) یک پلیمر اسیدی است که تاکنون از آن جهت افزایش پایداری و پتانسیل زتای دیسپرسیون‌های پلی‌آنیلین استفاده شده است (۱۳). دوکسوروبیسین به طور وسیع در درمان سرطان پستان به کار رفته است اما عوارض جانبی شدید ناشی از آن کاربرد کلینیکی وسیع آن را محدود می‌کند. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی میسل‌های پلیمری پلورونیک F127- پلی (متیل وینیل اتر- مالئیک اسید) بارشده با دوکسوروبیسین بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد بود.

## روش‌ها

برای تهیه‌ی میسل‌های حاوی دوکسوروبیسین ابتدا کوپلیمر پلورونیک F127- پلی (متیل وینیل اتر- مالئیک اسید) تهیه شد. به این صورت که جهت اتصال پلورونیک F127 به پلی (متیل وینیل اتر- مالئیک اسید) ابتدا ۱ گرم پلی (متیل وینیل اتر- مالئیک اسید) و ۰/۳۶ گرم DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) را به بالون ۳ دهانه افزودیم. سپس ۳/۶ گرم پلورونیک و ۰/۰۷ گرم DMAP (Dimethylaminopyridine) به همراه ۲۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید DMSO (Dimethyl sulfoxide) بدون آب به آن اضافه شد و تحت نیتروژن در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت روی هیتر استیرر قرار گرفت تا واکنش انجام شود. بعد از اتمام واکنش برای خارج کردن مواد واکنش‌نداده، محصول در کیسه‌ی دیالیز با نقطه‌ی برش (Cut off) ۱۲۰۰۰ دالتون در بافر فسفات با pH = ۷/۴ برای ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس برای ۲۴ ساعت در بافر استات با pH = ۶ قرار گرفت. در نهایت برای خارج کردن DMSO، محصول فریز درای گردید. سپس ۲۴ میلی‌گرم از کوپلیمر در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه‌ی حل‌شده و ۶ میلی‌گرم دوکسوروبیسین به این محلول اضافه شد. برای مدت زمان ۱ ساعت با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد روی هیتراستیرر در حال به هم زدن قرار گرفت. جهت تهیه‌ی بلانک تمامی مراحل مذکور منهای افزودن دارو تکرار گردید.

پس از تهیه‌ی میسل‌ها، اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیتی توسط دستگاه نانو- زتا سایزر مالورن (Malvern Nano ZSZEN 3600, UK) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در میسل‌ها، ۶۰۰ میکرولیتر از آن برداشته شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع شفاف حاصل جداسازی گردید و به نسبت ۱ به ۷ با آب دیونیزه رقیق‌سازی شد. جذب محلول حاصل در برابر بلانک (که تمامی مراحل گفته‌شده برای آن نیز انجام شد) در طول موج ۲۴۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش (Shimadzo UV– mini1240, Japan) خوانده شد. با استفاده از معادله‌ی جذب– غلظت در محیط آب مقطر میزان داروی آزاد و از روی آن داروی بارگیری‌شده محاسبه شد. کارایی بارگیری دارو در میسل‌ها و درصد بارگیری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{کارایی بارگیری} = \frac{\text{میزان داروی بارگیری شده}}{\text{وزن داروی بکار رفته}} \times 100$$

برای اندازه‌گیری سرعت رهش دارو از میسل‌ها، مقدار ۲ میلی‌لیتر از میسل‌های بهینه در کیسه‌ی دیالیز (Membra– Cel, Viskase، آمریکا) با نقطه‌ی برش (Cut off) وزن مولکولی ۱۲۰۰۰ دالتون ریخته شد. پس از بستن دو سر کیسه، ابتدا درون آب دیونیزه قرار گرفت تا داروی آزاد خارج شود. سپس درون بافر فسفات (pH = ۷/۴) حاوی ۲ درصد توین ۲۰ قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی استیرر با دور ۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. در فواصل زمانی مشخص از محیط رهش نمونه‌گیری شد و جذب آن در برابر بلانک (که تمامی مراحل گفته‌شده برای آن نیز انجام

شد) در طول موج ۴۹۹/۴ نانومتر خوانده شد و نمودار رهش در برابر زمان میسل‌ها رسم شد.

برای بررسی شکل و ساختار میسل‌های بهینه از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM یا Scanning electron microscope) استفاده شد. نمونه بر روی لام به صورت لایه‌ای نازک خشک شد و توسط لایه‌ی نازکی از طلا پوشش داده شد و با بزرگ‌نمایی مناسب عکس گرفته شد.

سمیت سلولی به روش MTT (۳-(۴،۵- دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵، ۲-دی فنیل تترازولیوم بروماید) تعیین شد. در ابتدا سوسپانسیون سلولی، با غلظت $۴ \times ۱۰^{۴}$ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد و ۱۸۰ میکرولیتر در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ درصد $CO_2$ و ۹۵ درصد رطوبت قرار داده شدند. یک ردیف به عنوان بلانک سلولی، تنها با محیط کشت پر شد. میسل های حاوی دارو پس از تهیه به نحو زیر به چاهک‌ها اضافه شد:

با توجه به $IC_{50}$ دوکسوروبیسین در سلول‌های رده‌ی سلولی MCF-7 که در آزمایشات مقدماتی تعیین گردید و معادل ۰/۲۶ میکرومولار بود، غلظت‌های یک رقت پایین و سه رقت بالای این مقدار انتخاب شد تا بهبود یا افزایش $IC_{50}$ را مشخص نمایند. ۲۰ میکرولیتر از میسل‌های حاوی دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۰/۲۱، ۰/۲۶، ۰/۳۴، ۰/۴۷و ۰/۷۸ میکرومولار، ۲۰ میکرولیتر از میسل‌های فاقد دارو در همان غلظت‌ها به عنوان بلانک میسل‌های 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 به آرامی برگردانده شد تا مواد اضافی خارج شوند و کریستال‌های بنفش فورمازان درون چاهک‌ها باقی بمانند. سپس به هر چاهک مقدار ۱۸۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به آرامی هر ردیف پیپتاژ گردید تا DMSO به خوبی با کریستال‌ها مخلوط شود. در نهایت پلیت درون دستگاه ELISA reader قرار داده شد و جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. کلیه‌ی مراحل فوق ۳ بار تکرار گردید.

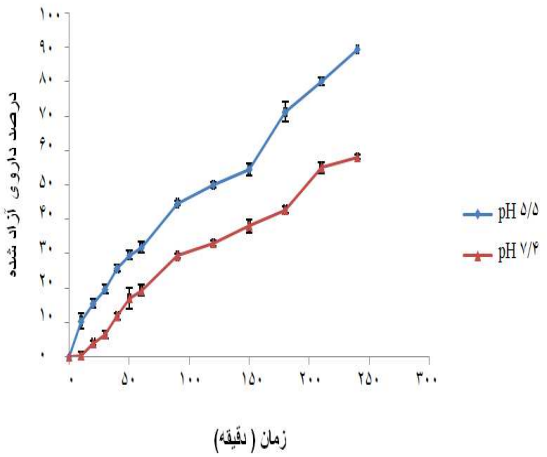
با استفاده از معادله‌ی زیر درصد زنده بودن سلول‌ها برای هر ردیف محاسبه شد:

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{میانگین بلانک} - \text{میانگین هر ردیف}}{\text{میانگین بلانک} - \text{میانگین کنترل منفی}} \times 100$$

## یافته‌ها

میانگین اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیتی به دست‌آمده برای میسل‌های فرمولاسیون بهینه محاسبه شد. میانگین اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیتی، کارایی بارگیری و درصد داروی آزادشده در ۴ ساعت برای فرمولاسیون بهینه به ترتیب ۳۸ ± ۴۱۹ نانومتر، ۱/۲ ± ۱۳/۳- میلی‌ولت، ۰/۰۲ ± ۰/۴۵، ۲/۷ ± ۹۳/۵ درصد و ۳/۷ ± ۲۹/۰۳ درصد بود.

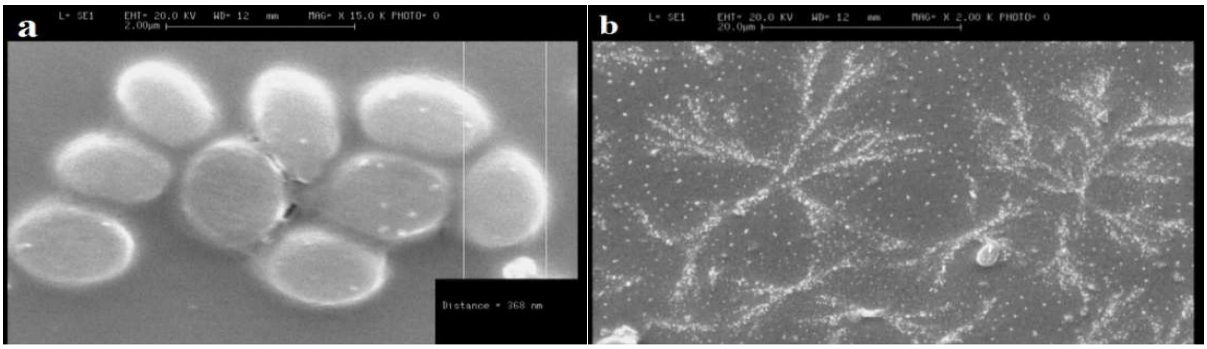
نتایج حاصل از سه مرتبه تکرار بررسی میزان آزادسازی دارو از میسل‌های بهینه محاسبه شد و در شکل ۱ نشان داده شده است.



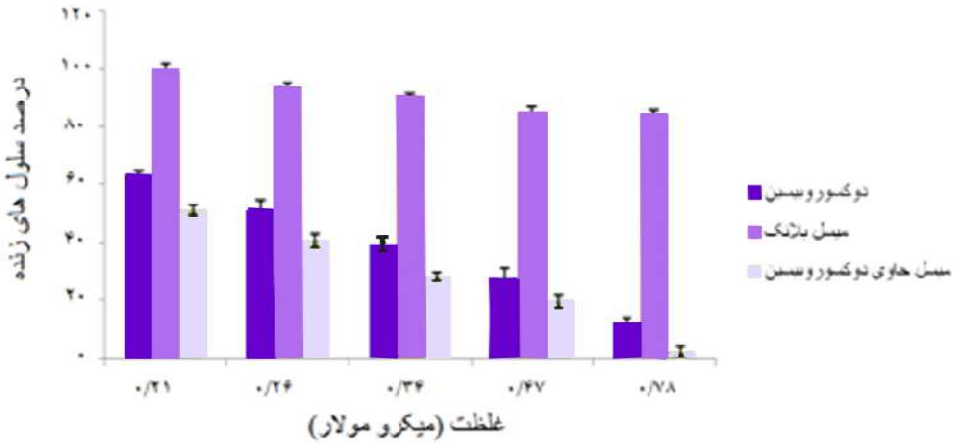

**شکل ۱. میزان آزادسازی دارو از میسل‌های بهینه در دو pH مختلف**

عکس SEM تهیه‌شده از میسل‌های بهینه در شکل ۲ آورده شده است.

سمیت سلولی دوکسوروبیسین آزاد همراه با غلظت‌های مختلف از میسل‌های حاوی دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7 به روش MTT تست گردید که نتایج آن در شکل ۳ آمده است. در این شکل درصد سلول‌های زنده باقی‌مانده در غلظت‌های ۰/۲۱، ۰/۲۶، ۰/۳۴، ۰/۴۷و ۰/۷۸ میکرومولار در مورد میسل‌های بهینه‌ی حاوی دارو، میسل‌های بدون دارو و نیز داروی آزاد نشان داده شده است. در تمام غلظت‌ها، اختلاف بین میسل‌های حاوی دارو و داروی آزاد معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).




**شکل ۲. تصویر SEM (Scanning electron microscope) تهیه‌شده‌ی میسل‌های بهینه‌ی پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید)**




**شکل ۳. درصد زنده ماندن سلول‌ها در گروه‌های مختلف تحت آزمایش در رده‌ی سلولی MCF-7**

## بحث

آنتی‌بیوتیک‌های آنتراسیکلین از جمله دوکسوروبیسین از مؤثرترین داروهای شیمی‌درمانی در درمان طیف وسیعی از تومورهای جامد مانند سرطان پستان و کبد می‌باشند. متأسفانه سمیت غیر اختصاصی دوکسوروبیسین باعث عوارض جانبی شدیدی از جمله سمیت قلبی مزمن می‌شود که عامل محدودکننده‌ی افزایش دوز دارو است (۱۴). بنابراین اگر بتوان دارو را به طریقی به سلول‌های سرطانی رساند که کمتر در بافت‌های سالم توزیع شوند، علاوه بر کاهش عوارض جانبی قادر خواهیم بود اثر دارو را افزایش دهیم و دوز کمتر از آن را به کار ببریم.

میسل‌های پلیمری مانند پلورونیک به طور وسیعی به عنوان حامل دوکسوروبیسین به کار گرفته شده است. پلورونیک با اثر بر غشای سلول، پمپ P- گلیکوپروتئین را مهار می‌کند. این پمپ مسؤول Efflux دارو و ایجاد مقاومت دارویی است (۱۵).

ضریب توزیع دوکسوروبیسین بین آب و پلورونیک حدود ۰/۵ گزارش شده است که عامل محدودکننده‌ی بارگیری دارو در میسل است و باعث افزایش سرعت آزادسازی دارو از میسل می‌شود (۱۶).

برای بهبود ظرفیت بارگیری دارو، پلورونیک را به یک پلیمر هیدروفیل مانند پلی‌آکریلیک اسید متصل کردند (۱۷). این نوع کوپلیمر تمایل زیادی برای اتصال به دوکسوروبیسین دارد. همچنین مشاهده شده است که به دلیل گروه‌های هیدروکسیل موجود در این کوپلیمر، آزادسازی دارو از آن وابسته به pH است. سلول‌های توموری pH حدود ۵ تا ۵/۵ دارند که باعث افزایش سرعت آزادسازی دارو می‌شود (۱۸).

برای افزایش پایداری میسل‌های پلورونیک L121 در خون بعد از رقیق‌سازی، آن‌ها را با پوسته‌ای هیدروفیل واکنش دادند (۱۹). در یک تحقیق گزارش شد که تومورها حساسیت بیشتری به ترکیب پلورونیک/ دوکسوروبیسین در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد داشتند (۲۰).

همان گونه که نتایج نشان داد ذرات تهیه‌شده اندازه و اندکس پلی‌دیسپرسیتی مناسب داشتند که به معنی یکنواختی خوب در توزیع اندازه‌ی آن‌ها بود. همچنین ذرات دارای کارایی بارگیری بالای ۹۳ درصد دوکسوروبیسین بودند که میزان قابل قبولی است. کارایی رهش پس از ۴ ساعت حدود ۲۹ درصد بود. این میزان نشان‌دهنده‌ی کند رهش شدن دارو به طور مناسب و کارآمد از میسل‌های بهینه‌ی تهیه‌شده، بود. تصویر SEM هم اندازه‌ی مناسب و شکل یکنواخت ذرات را به خوبی نشان می‌دهد. این یکنواختی به معنی تشکیل مناسب ذرات بود که با نتایج تعیین اندازه‌ی ذره‌ای با دستگاه مالورن هم‌خوانی داشت.

در شکل ۳ دیده می‌شود که $IC_{50}$ در میسل‌ها در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد کاهش یافته است. بیشترین اثر مهاری بر روی رشد در سلول‌هایی مشاهده شد که با میسل‌ها در غلظت ۰/۲۱ میکرومولار تیمار شده بودند که ۱۲/۵درصد بیشتر از اثری بود که با داروی آزاد در همان غلظت مشاهده گردید. Gao و همکاران نیز گزارش نمودند که سمیت دوکسوروبیسین بارشده در میسل‌های پلورونیک F127– استئاریک اسید روی رده‌ی سلولی MCF-7 بیشتر از دوکسوروبیسین آزاد بود (۲۱).

Minko و همکاران گزارش کردند که دوکسوروبیسین/ پلورونیک P85 در مقایسه با

دوکسوروبیسین تنها به صورت کارآمدتری باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مقاوم شدند (۲۲).

## نتیجه‌گیری

میسل‌های پلورونیک F127– پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) حاوی دوکسوربیسین می‌توانند سبب بهبود اثر سایتوتوکسیک این دارو در رده‌ی سلولی MCF-7 (سرطان پستان) شوند. با توجه به کاهش $IC_{50}$، دوکسوروبیسین این سیستم حامل دارویی شاید بتواند برای کاهش دوز مورد مصرف این دارو و در نتیجه کاهش عوارض سیستمیک آن به ویژه سمیت قلبی ارزشمند باشد.

## تشکر و قدردانی

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

## References

1. Greenwald P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. J Nutr 2004; 134(12 Suppl): 3507S-12S.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50(1): 7-33.
3. Di MA, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. Cancer Chemother Rep 1969; 53(1): 33-7.
4. Ganz WI, Sridhar KS, Ganz SS, Gonzalez R, Chakko S, Serafini A. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. Oncology 1996; 53(6): 461-70.
5. Nip J, Strom DK, Fee BE, Zambetti G, Cleveland JL, Hiebert SW. E2F-1 cooperates with topoisomerase II inhibition and DNA damage to selectively augment p53-independent apoptosis. Mol Cell Biol 1997; 17(3): 1049-56.
6. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res 1986; 46(12 Pt 1): 6387-92.
7. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. J Control Release 2001; 73(2-3): 137-72.
8. Rapoport N. Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery, Colloids Surf. B Biointer faces 1999; 16: 93-111.
9. Rapoport NY, Herron JN, Pitt WG, Pitina L. Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake. J Control Release 1999; 58(2): 153-62.
10. Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. J Pharm Sci 2003; 92(7): 1343-55.
11. Alakhov VY, Klinkski E, Li S, Pietrzynski G, Venne A, Batrakova E, et al. Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1999; 16: 113-34.
12. Bromberg L. Synthesis and Self-Assembly of Poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide)-g-poly(acrylic acid) Gels. Ind Eng Chem Res 2001; 40(11): 2437-44.
13. Koo CM, Jeon BH, Chung IJ. The Effect of Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) Stabilizer on the Stability of Polyaniline-Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) Dispersions. J Colloid Interface Sci 2000; 227(2): 316-21.
14. Sweetman S. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th ed. London, UK: Pharmaceutical Press; 2009.
15. Batrakova EV, Dorodnych TY, Klinskii EY, Kliushnenkova EN, Shemchukova OB, Goncharova ON, et al. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. Br J Cancer 1996; 74(10): 1545-52.
16. Melik-Nubarov NS, Kozlov MY. Evaluation of partition coefficients of low molecular weight solutes between water and micelles of block copolymer of ethylene oxide based on dialysis kinetics and fluorescence spectroscopy. Colloid & polymer science 1998; 276: 381-7.

17. Tian Y, Bromberg L, Lin SN, Hatton TA, Tam KC. Complexation and release of doxorubicin from its complexes with pluronic P85-b-poly(acrylic acid) block copolymers. J Control Release 2007; 121(3): 137-45.
18. Choo ES, Yu B, Xue J. Synthesis of poly(acrylic acid) (PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of doxorubicin. J Colloid Interface Sci 2011; 358(2): 462-70.
19. Yang TF, Chen CN, Chen MC, Lai CH, Liang HF, Sung HW. Shell-crosslinked Pluronic L121 micelles as a drug delivery vehicle. Biomaterials 2007; 28(4): 725-34.
20. Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. J Control Release 2008; 130(2): 98-106.
21. Gao Q, Liang Q, Yu F, Xu J, Zhao Q, Sun B. Synthesis and characterization of novel amphiphilic copolymer stearic acid-coupled F127 nanoparticles for nano-technology based drug delivery system. Colloids Surf B Biointerfaces 2011; 88(2): 741-8.
22. Minko T, Batrakova EV, Li S, Li Y, Pakunlu RI, Alakhov VY, et al. Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells. J Control Release 2005; 105(3): 269-78.

**Journal of Isfahan Medical School**
Received: 19.04.2013
**Vol. 31, No. 241, 3rd Week, August 2013**
Accepted: 15.06.2013

# Cytotoxic Effect of Pluronic F127-Poly (Methyl Vinyl Ether-Alt-Maleic Acid) Micelles Loaded with Doxorubicin on MCF-7 Cells

Jaleh Varshosaz PhD[1], Farshid Hassanzadeh PhD[2], Hojjat Sadeghi Aliabadi PhD[3], Zahra Larian[4]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Doxorubicin is used for treatment of different types of cancer including breast cancer. However, there are various side effects such as cardiotoxicity. Using a suitable drug delivery system such as polymeric micelles containing doxorubicin may reduce these effects.

**Methods:** Micelles were prepared by direct dissolution method. After optimization according to their particle size, zeta potential, polydispersity index, loading efficiency and release of doxorubicin, micelles were used for further tests of cytotoxicity on MCF-7 cell line by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

**Findings:** The optimum targeted micelles with particle size of 419 ± 38 nm, zeta potential of -13.3 ± 1.2 mv, polydispersity index of 0.45 ± 0.019, loading efficiency of 93.5 ± 2.7 percent and drug release efficiency of 29.03 ± 3.7 percent in different concentrations of 0.21, 0.26, 0.34, 47.0 and 0.78 µM showed higher cytotoxicity than blank micelles and free drug.

**Conclusion:** Pluronic F127-poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) micelles showed more cytotoxicity than free drug against MCF-7 cell line.

**Keywords:** Pluronic F127, Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid), Micelles, Doxorubicin, MCF-7, MTT assay

**Citation:** Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi Aliabadi H, Larian Z. **Cytotoxic Effect of Pluronic F127-Poly (Methyl Vinyl Ether-Alt-Maleic Acid) Micelles Loaded with Doxorubicin on MCF-7 Cells.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(241): 876-84

* This paper is derived from a Pharm D doctorate thesis No. 390487 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 Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Student of Pharmacy, 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