



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه رساله دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

تهیه و ارزیابی فیزیکوشیمیایی نانوذرات لیپیدی پوشش دار شده با
کیتوزان و بارگذاری شده با پاکلیتاکسل و بررسی کارایی دارورسانی به
سلول‌های سرطانی رده MCF-7

استاد راهنما:

دکتر حسینعلی ابراهیمی

نگارش:

سونیا پرهیزکار

بهمن ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د-۲۰۳

سوگندنامه

گواهی صحت و اصالت پایان نامه

تقدیم به:

پدر و مادرم که در این مسیر حامی و پشتیبان من بودند.

همسر و فرزند عزیزم که در این راه مشوقم بودند.

استاد گرانقدر دکتر ابراهیمی که در این راه الگو و راهنمای من بودند.

جناب آقای محبی که با لطف و عنایت خود مرا در این مسیر یاری نمودند.

تقدیر و سپاس فراوان از
استاد گرانقدر
دکتر حسینعلی ابراهیمی

چکیده

مقدمه: بیماری سرطان یکی از اصلی‌ترین چالش‌های پزشکی مدرن به شمار می‌رود. با وجود تنوع نسبتاً بالای داروهای موثر بر بافت‌های سرطانی، پیدایش مقاومت سلول‌های سرطانی به این داروها، از علل مهم شکست دارودرمانی بیماری‌های سرطانی به شمار می‌رود. یکی از مکانیسم‌های مقاومت سلول‌های سرطانی، ترشح داروهای ضدسرطان از طریق پمپ‌های P-gp به شمار می‌رود. دیده شده است که داروهای بارگذاری شده در نانوذرات به دلیل جذب فعال از غشای سلولی قادر به دور زدن این مسیر مقاومت سلول‌های سرطانی می‌باشند. پاکلیتاکسل یک ترکیب طبیعی است که به عنوان خط اول شیمی درمانی در انواع مختلفی از سرطان‌های رایج مانند سرطان پستان، تخمدان، ریه و ... استفاده می‌شود. در این مطالعه سعی گردید تا این دارو در نانوذرات لیپیدی پوشش دار شده با کیتوزان بارگذاری و خصوصیات فیزیکوشیمیایی دارو و اثرات زیستی آن بر رده سلول‌های سرطان پستان بررسی گردد.

روش کار: جهت تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی پاکلیتاکسل از روش انتشار حلال استفاده شد. برای تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی پاکلیتاکسل به این روش به دو فاز لیپیدی و آبی نیاز بود. فاز چربی فرمولاسیون اسید استئاریک بود که پس از تهیه فرمولاسیون نهایی پاکلیتاکسل نیز وارد همین فاز شد. برای بررسی خصوصیات مورفولوژی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی جهت ارزیابی همگن یا ناهمگن بودن سطوح استفاده گردید. به منظور بررسی بارگذاری دارو در نانوذرات کیتوزان دار NLC الگوی رهش دارو از نانوذرات با حامل‌های چربی نانوساختار و کیتوزان آزمایشات در دو محیط مختلف با pH متفاوت انجام شد. در نهایت کارایی زیستی داروی بارگذاری شده در نانوذرات از روش MTT استفاده شد.

یافته‌ها: نانوذرات سنتز شده به منظور اندازه گیری پتانسیل زتا با دستگاه DLS (زتا سائزر) اندازه گیری و مشخص شد نانوذرات با پوشش کیتوزان دار در ابعاد نانومتری می‌باشند. بررسی خصوصیات مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد ذرات ساختار تقریباً کروی با سطح ناهمگن داشته‌اند. درصد احتباس دارویی ۹۶٪ با انحراف معیار ۰/۰۱ محاسبه گردید و بارگذاری نیز ۱۵٪ با انحراف معیار ۰/۳ به دست آمد. منحنی درصد رهش به روش کیسه دیالیز در نانوذرات با دارو و پوشش کیتوزان دار نمودار آزمایش رهش تا زمانی که غلظت دارو به سطح یکنواخت (حالت پایدار) برسد ادامه یافت. درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت دارو و نانوذره نزولی‌ترین روند را داشت و پس از آن داروی تنها و نانوذره بدون دارو به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشتند. میزان IC_{50} دارو ۵۳۳/۲ نانومولار، نانوذره و دارو ۲۵۱ نانومولار محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات سنتز شده قابلیت این را دارند که درصد بالایی از دارو را در خود به احتباس در بیاورند. بررسی رهش دارو به روش کیسه دیالیز بیانگر توانایی پوشش کیتوزان در کنترل رهش انفجاری و ارتقا سرعت و میزان رهش دارو بود که استفاده از پوشش کیتوزان را در فرمولاسیون دارو/ نانوذره مفید جلوه داد. همچنین کاهش غلظت داروی مورد نیاز برای اثرگذاری با کاهش IC_{50} ترکیب دارو و نانوذره لیپیدی در مقایسه با دارو به تنهایی مشهود گردیده بود.

کلیدواژه‌ها: پاکلیتاکسل، سرطان پستان، MCF-۷، نانوذره، کیتوزان، NLC، سمیت سلولی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه.....	۹
۱-۱- سرطان.....	۱۰
۱-۱-۱- کلیات سرطان.....	10
۱-۱-۲- ها علائم و نشانه.....	11
۱-۱-۳- دلایل بروز سرطان.....	12
۱-۲- سرطان پستان.....	۱۲
۱-۲-۱- های سرطان پستان علائم و نشانه.....	14
۱-۲-۲- فاکتورهای خطر سرطان پستان.....	18
۱-۲-۳- تشخیص سرطان پستان.....	19
۱-۲-۴- پیشگیری از سرطان پستان.....	19
۱-۲-۴-۱- سبک زندگی.....	19
۱-۲-۴-۲- جراحی پیشگیرانه.....	20
۱-۲-۴-۳- داروها.....	21
۱-۲-۴-۴- مقاومت سلولهای سرطانی به داروهای شیمی درمانی Error! Bookmark not defined.	
۱-۲-۵- های کنترل سرطان پستان.....	21
۱-۳- پاکلیتاکسل.....	۲۹
۱-۳-۱- کاربردهای بالینی پاکلیتاکسل.....	30
۱-۳-۲- اثرات جانبی پاکلیتاکسل.....	31
۱-۳-۳- مکانیسم اثر پاکلیتاکسل.....	31
۱-۴- حامل های دارویی نانومقیاس.....	۳۲

..... 33	۱-۴-۱- نانوذرات لیپیدی
..... 35	۱-۴-۲- پلیمری نانوذرات
..... ۳۶	۱-۵- روش‌های آماده‌سازی نانوذرات لیپیدی
..... 37	شونده ۱-۵-۱- تیخیر یا انتشار حلال امولسیون
..... ۳۸	۱-۶- اهمیت موضوع
..... ۳۹	۱-۷- بررسی مطالعات پیشین
..... ۴۲	۱-۸- اهداف پژوهش
..... 42	۱-۸-۱- هدف کلی
..... 42	۱-۸-۲- اهداف اختصاصی
..... 42	۱- تهیه نانو ذره لیپیدی جامد
..... 42	۲- تعیین درصد بارگزاری پاکلیتاکسل در نانوذرات
..... 43	۳- تعیین الگوی آزادسازی دارو
..... 43	۱-۸-۳- هدف کاربردی
..... 43	۱-۸-۴- فرضیات پژوهش
..... ۴۳	فصل دوم: مواد و روش‌ها
..... ۴۵	۲-۱- نوع مطالعه
..... ۴۵	۲-۳- مواد شیمیایی و دستگاه‌های مورد استفاده
..... 45	۲-۳-۱- مواد شیمیایی و حلال
..... 45	۲-۳-۲- دستگاه‌های مورد استفاده
..... ۴۶	۲-۴- روش انجام پژوهش
..... 46	گیری غلظت بندی برای اندازه ۱-۴-۲- تهیه محلول استوک و رسم منحنی درجه پاکلیتاکسل
.....	۲-۴-۲- تهیه نانو ذره لیپیدی با پوشش کیتوزان
.....	Error! Bookmark not defined.

47 47-2-4-3- کیتوزاندار کردن نانوذرات
47 47-2-4-4- طرز تهیه محلول آبی کیتوزان
48 48-2-4-3- نحوه تعیین اندازه ذره ای نانوذرات
48 48-2-4-4- DLS با دستگاه - تعیین پتانسیل زتای نانوذرات
49 49-2-4-5- NLC با پوشش - بررسی خصوصیات مورفولوژی نانوذرات (SEM کیتوزان با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی)
50 50-2-5- تعیین میزان داروی بارگذاری شده (DLE) پاکلیتاکسل در نانوذرات
51 51-2-6- آزمایشات رهش داروی پاکلیتاکسل بارگذاری شده در نانوذرات NLC با و بدون پوشش کیتوزان
51 51-2-6-1- آماده سازی روش کیسه های دیالیز
52 52-2-6-2- Error! Bookmark not defined. آزمایش رهش با استفاده از کیسه های دیالیز
52 52-2-6-3- روش کار بررسی زنده مانی سلولی نانوذرات لیپیدی و بررسی کارایی این 2-6-3- MCF های 7- نانوذرات در انتقال دارو به سلول
53 53-7-2- پاساژ دادن سلول:
53 53-8-2- تعویض کردن محیط کشت:
53 53-9-2- شمارش سلولی:
54 54-10-2- تست MTT:
54 54-Mann-Whitney U 11-2- روش آماری
55 55-2-12- ملاحظات اخلاقی
56 56- فصل سوم: نتایج
57 57-3-1- رسم منحنی کالیبراسیون داروی پاکلیتاکسل
58 58-3-2- اندازه گیری اندازه نانوذرات با دستگاه DLS
59 59-3-3- بررسی خصوصیات مورفولوژی سطح نانوذرات بارگذاری شده با پاکلیتاکسل با و بدون پوشش کیتوزان با تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی (SEM) 61-.....

۶۲.....	۴-۳- تعیین میزان احتباس و بارگذاری دارو در نانوذره
۶۴.....	۳-۵- تعیین میزان رهش دارو به روش کیسه دیالیز
۶۵.....	۳-۶- مقایسه وضعیت زنده مانی سلول‌های سرطانی بر اساس نتایج کشت سلولی در نمونه‌های مختلف
۷۰.....	فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
۷۱.....	۴-۱- بحث
۷۴.....	نتیجه‌گیری
۷۵.....	پیشنهادها
۷۶.....	فهرست منابع
Error! Bookmark not defined.....	پیوست

فهرست جداول

جدول ۲-۲- لیست مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده ۴۵

جدول ۲-۳- لیست دستگاه‌های مورد استفاده ۴۵

جدول ۳-۱- مجموعه کل نتایج مربوط به PI و Z-Average نانوذرات تهیه شده ... ۶۰

جدول ۳-۲- تعیین درصد رهش نمونه‌های مختلف نانوذرات در فواصل زمانی

مختلف ۶۴

فهرست شکل

- شکل ۱-۳- طیف جذب داروی پاکلیتاکسل ۵۷
- شکل ۲-۳- منحنی درجه بندی به دست آمده برای تعیین غلظت دارو ۵۸
- شکل ۳-۳- نمودار DLS و پتانسیل زتا نانوذره با داروی کیتوزان دار ۵۹
- شکل ۳-۴- نمودار DLS و پتانسیل زتا نانوذره بدون دارو و بدون پوشش کیتوزان ۶۰
- شکل ۳-۵- نمودار میانگین نانو ذرات با دارو و با پوشش کیتوزان (میانگین ۱ و ۲) ۶۵
- شکل ۳-۶- نمودار زنده مانی سلول‌های سرطانی در مجاورت با داروی پاکلیتاکسل نانو ذره حاوی دارو و نانو ذره بدون دارو ۶۵
- شکل ۳-۷- نمودار زنده مانی سلول‌های سرطانی در مجاورت با ۲ نمونه مختلف داروی تنها و نانوذره فاقد دارو پاکلیتاکسل ۶۶
- شکل ۳-۸- نمودار زنده مانی سلول‌های سرطانی در مجاورت با ۲ نمونه مختلف داروی تنها و نانوذره و دارو پاکلیتاکسل ۶۸
- شکل ۳-۹- نمودار زنده مانی سلول‌های سرطانی در مجاورت با ۲ نمونه مختلف نانو ذره با دارو و بدون دارو ۶۷

فهرست تصاویر

- تصویر ۱-۱- ساختار شیمیایی پاکلیتاکسل (۷۰-۷۱)..... ۳۰
- تصویر ۱-۲- لیپیدهای موجود در غشای پلاسمایی سلول (۸۰-۸۱)..... ۳۴
- تصویر ۱-۳- لیپوپلکس تشکیل شده از نانوذرات لیپیدی و DNA با اندازه ۱۰۰ نانومتر (۸۲)..... ۳۵
- تصویر ۲-۱- شماتیک تزریق نمونه به درون کووت (مایل)(۹۱)..... ۴۹
- تصویر ۳-۱- تصویر SEM از نانوذرات بارگذاری شده با داروی پاکلیتاکسل با پوشش کیتوزان..... ۶۲