



# آماده‌سازی نانوذرات آلبومین انسانی حاوی متوتروکسات و بررسی اثر سمیت آن بر سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی

سعیده فلاح انبوهی<sup>۱</sup> | مهدی آدابی<sup>۱</sup> | مسعود خسروانی<sup>۱\*</sup> | رسول دیناروند<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup>گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**چکیده:** متوتروکسات (MTX) به‌عنوان یک عامل شیمی درمانی این توانایی را دارد که در درمان تومورهای مغزی به‌کار گرفته شود اما به‌دلیل عدم نفوذ کافی به پارانشیم مغز، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. با طراحی سامانه‌های مبتنی بر نانوفناوری، می‌توان بر این محدودیت‌ها غلبه کرد. در این بررسی، به منظور بارگذاری متوتروکسات در حامل آلبومین سرم انسانی (HSA)، از روش سونیکاسیون استفاده شد. نتایج نشان داد که اندازه نانوذرات آلبومین حاوی متوتروکسات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود. همچنین، درصد محبوس‌سازی و بارگذاری دارو به ترتیب برابر ۳٪ و ۴۷٪ بودند. آزمون حرارتی نانوذرات دلالت کرد که متوتروکسات به شکل بی‌ریخت است. همچنین، نمودار ره‌ایش دلالت بر ره‌ایش آهسته و کنترل شده متوتروکسات از نانوذرات در محیط خنثی را داشت. همچنین، نتایج دلالت بر کاهش اثر سمیت نانوذرات آلبومین حاوی متوتروکسات در مقایسه با داروی آزاد داشت. بنابراین، فرمولاسیون داده شده می‌تواند پتانسیل بالایی در سامانه‌های دارورسانی به سلول‌های گلیوبلاستوما داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** متوتروکسات، آلبومین، نانوذره، گلیوبلاستوما.

drkhosravani@tums.ac.ir

گلیوبلاستوما رایج هستند [۱ و ۲] اما عوامل دیگری هم ممکن است پتانسیل استفاده برای تومورهای مغزی را داشته باشند که به‌دلیل نفوذ کم به پارانشیم مغز و عوارض جانبی کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳].

متوتروکسات یکی از شناخته‌شده‌ترین داروهای ضدسرطانی است. متوتروکسات به‌عنوان آنتاگونیست فولیک‌اسید اثرات ضد سرطان و سرکوب کننده ایمنی مناسبی از خود نشان داده است. از آنجایی که غلظت متوتروکسات در طی تزریق داخل وریدی در مایع مغزی نخاعی، ۳٪ غلظت پلاسمایی حالت پایدار دارو است، بنابراین، به منظور رساندن غلظت این دارو به غلظت مؤثر در مایع مغزی نخاعی بایستی غلظت آن در خون افزایش یابد که

## ۱- مقدمه

گلیوبلاستوما فراوان‌ترین و کشنده‌ترین تومور مغزی است که رشد سلولی کنترل نشده، قدرت تهاجمی بیش از حد بالا، تمایل به عود رشد میکروعروقی، مقاومت به آپوپتوز و ناپایداری ژنتیکی از مشخصات آن به‌شمار می‌رود. این ویژگی‌ها باعث شده است که بقا بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما با اقدامات درمانی رایج مثل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی تغییر چندانی نکند. یک توضیح بارز برای نتایج ضعیف شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما می‌توان به انتقال ناکافی بسیاری از داروها از سد خونی مغزی اشاره داشت. اگرچه عوامل شیمی‌درمانی مانند تموزولامید و کارموستین در حال حاضر برای شیمی‌درمانی

سمیت آن بر سلول‌های گلیوبلاستوما ی U87MG مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- مواد

متوتروکسات با خلوص ۹۷٪ از Excella GmbH آلمان و آلبومین سرم انسانی با خلوص ۹۶٪ از Biotest Pharma GmbH آلمان خریداری شدند. رده‌ی سلولی U87MG از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، محیط کشت سلولی DMEM از Biosera، بافر فسفات سالین و MTT (۳-۴،۵) دی-متیل تیازول (۲،۵-۲ دی فنیل تترازولیم برمید) و کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتون از سیگما و سرم جنین گاوی (FBS)، محلول تریپسین و آنتی بیوتیک‌های Peniciline و Streptomycine از Gibco خریداری شدند.

### ۲-۲- آماده‌سازی محلول متوتروکسات

دو غلظت رقیق و غلیظ از متوتروکسات در آب دیونیزه تهیه شد. غلظت رقیق براساس جذب ویژه متوتروکسات تعیین شد. جذب ویژه متوتروکسات ۴۳۰ بود که از آن مقدار  $23 \mu\text{g/ml}$  به دست آمد تا با دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis خوانده شود. غلظت غلیظ براساس بیشترین حلالیت متوتروکسات در آب ساخته شد که مقدار  $0.1 \text{ mg/ml}$  به دست آمد. سپس، از این دو غلظت برای سنجش تأثیر زمان و شدت سونیکاسیون همراه با محلول‌های رقیق و غلیظ آلبومین سرم انسانی استفاده شد.

### ۲-۳- فرایند آماده‌سازی نانوذرات آلبومین سرم انسانی

#### بارگذاری شده با متوترکسات

برای تهیه نانوذرات آلبومین سرم انسانی از روش اولتراسونیکاسیون استفاده شده است. بدین منظور، محلول‌های غلیظ آلبومین سرم انسانی با محلول‌های غلیظ متوترکسات و محلول‌های رقیق آن‌ها نیز با هم ترکیب شدند. سپس، نمونه‌های F-A از این محلول‌های رقیق و غلیظ تحت سونیکاسیون در زمان‌ها و شدت‌های متفاوت سونیکاسیون طبق جدول ۱ ساخته شدند.

منجر به بروز عوارض جانبی در بیمار می‌شود. بنابراین، اگرچه متوتروکسات از سد خونی مغزی عبور می‌کند ولی غلظت درمانی مورد نیاز از آن در مایع مغزی نخاعی به دست نمی‌آید. در حقیقت نفوذ کم دارو در پارانشیم مغز به علت سد خونی مغزی رساندن مقدار مؤثر دارو را به تومورهای مغز با مشکلاتی روبرو می‌کند [۴ و ۵].

ظهور نانوفناوری باعث گشایش پنجره امیدبخشی در ارائه خدمات پزشکی شده است. این فناوری با الهام از طبیعت، سازوکارهای جدیدی را برای مقابله با سرطان به نمایش می‌گذارد. نانوذره آلبومین یکی از این الگوهای طبیعی است که می‌توان از آن در دارورسانی به عنوان یک حامل بهره جست. از آنجایی که آلبومین توانایی عبور از سد خونی مغزی را دارد، می‌توان با بارگذاری دارو به درون آلبومین، ورود آن را به درون مغز فراهم کرد. استفاده از آلبومین به عنوان حامل نه تنها با شرایط بدن سازگار است که مزیت‌هایی مانند اندازه کوچک، ماهیت طبیعی و غیرایمونوژن و مقاوم به تغییرات pH و دما، را با خود به همراه دارد. افزون بر این، رهایش آهسته دارو و نیاز به دوز دارویی کمتر نسبت به اشکال رایج دارویی از جمله دیگر مزایای به کارگیری از این حامل طبیعی است [۶]. در یک بررسی، به منظور بررسی افزایش کنتراست مغزی موش سالم، نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی گادولینیوم هدفمند شده با فولات، تهیه شد و عبور آنها از سد خونی مغزی بررسی شد. اندازه نانوذرات تهیه شده ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر بود [۷]. در بررسی که توسط Byeon و همکارانش انجام شد، نانوذرات آلبومین سرم انسانی کاتیونه و نانوذرات آلبومین سرم انسانی کاتیونه هدفمند شده با مانوز با یکدیگر کونژوگه شده و داروی دوکسوروبیسین نیز در آنها بارگذاری شد. اندازه نانوذرات ۹۰ نانومتر بود. بررسی‌ها در مدل گلیوما ارتوتوپیک نشان داد که نانوذرات در ناحیه تومور تجمع پیدا می‌کنند [۸].

در کارهای پیشین، نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی ایماتینیب با اندازه ۸۰-۹۰ نانومتر [۲] و نانوذرات mPEG-PLGA حاوی کورکومین [۹] آماده‌سازی شدند. در این پژوهش، نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات به روش سونیکاسیون آماده‌سازی شد و مقدار بارگذاری دارو در آن تعیین شد. سپس، اثر

جدول ۱ نمونه‌های F-A و مشخصات مربوط به شدت سونیکاسیون و زمان آنها

زمان (s)								شدت سونیکاسیون	غلظت	نمونه
1	5	15	30	60	120	300	600			
A8	A7	A6	A5	A4	A3	A2	A1	شدید	غلظت	A
B8	B7	B6	B5	B4	B3	B2	B1	شدید	رقیق	B
C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	متوسط	غلظت	C
D8	D7	D6	D5	D4	D3	D2	D1	متوسط	رقیق	D
E8	E7	E6	E5	E4	E3	E2	E1	ضعیف	غلظت	E
F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	ضعیف	رقیق	F

## ۲-۴- اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل سطحی نانوذرات

اندازه و توزیع اندازه نانوذرات با استفاده پراکندگی نور پویا (DLS) اندازه‌گیری شدند و پتانسیل سطحی نانوذره نمونه F4 با زتا سایزر تعیین شد.

## ۲-۵- آزمون حرارتی

آزمون حرارتی آلبومین سرم انسانی، متوتروکسات، مخلوط آلبومین سرم انسانی و متوتروکسات، آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات با گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC) شناسایی شدند.

## ۲-۶- تعیین مقدار بازده محبوس‌سازی و بازده بارگذاری

مقدار متوتروکسات محبوس‌شده در نانوذرات و بازده بارگذاری دارو با جذب UV در طول موج ۳۰۵ nm با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis بررسی شدند. ابتدا، ۱ mg از نانوذره آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات در ۵ ml استونیتریل و ۱۵ ml آب حل شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm گریزانه شده و در نهایت ۲۰ دقیقه با شدت بالا سونیکه شد. پس از جداسازی دارو از نانوذرات، غلظت متوتروکسات آزاد در سوپرناتانت با مقایسه‌ی آن با منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. بازده محبوس‌سازی ((Encapsulation Efficiency (EE)) دارو به‌عنوان نسبت جرم دارو محبوس شده به جرم داروی استفاده شده برای تهیه نانوذرات تعریف می‌شود و با معادله ۱ قابل محاسبه است:

$$Drug\ loading\% = \frac{\text{supernatant MTX}}{\text{HSA weight} + \text{MTX NPs}} \times 100 \quad (1)$$

بازده بارگذاری ((Drug Loading(DL)) دارو به‌عنوان حجم داروی محبوس شده در نانوذرات با استفاده از معادله ۲ قابل محاسبه است:

$$Entrapment\ efficiency\% = \frac{\text{supernatant MTX}}{\text{MTX NPs}} \times 100 \quad (2)$$

## ۲-۷- رهایش داروی بارگذاری شده در محیط برون تن

مقدار ۵/۵ mg از پودر نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات لیوفیلزه شده را در ۲ ml محلول فسفات بافر سالین حل کرده و در داخل کیسه‌ی دیالیز با cut off برابر ۱۲۰۰۰Da قرار داده می‌شوند و سپس، کیسه‌ی به‌دست آمده را در حجم ۷۰ ml از محلول فسفات بافر سالین با pH برابر با ۷/۴ تحت انکوباتور با ۱۰۰ rpm در دمای ۳۷°C قرار داده می‌شوند. در گستره زمانی ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از محلول فسفات بافر سالین اطراف کیسه دیالیز نمونه تهیه شد که البته بلافاصله این مقدار با حجم برابری از محلول فسفات بافر سالین جایگزین شد. غلظت داروی آزاد شده در نمونه‌ها با طیف‌سنجی UV-Vis اندازه‌گیری و درصد رهایش داروی تعیین شد. نمونه کنترلی نیز با همین شرایط تهیه و مورد آنالیز قرار گرفت. برای پی بردن به رهایش داروی آزاد نیز مقدار ۵ mg از متوتروکسات را در فسفات بافر سالین حل کرده و آنرا داخل کیسه دیالیز می‌ریزیم. بقیه‌ی مراحل کار مشابه شرایط بیان شده پیش می‌رود.

## ۲-۸- بررسی اثر سمیت نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات بر سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی

سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی U87MG در محیط DMEM با ۱۰٪ فسفات بافر سالین و ۱۰۰ μg/ml آنتی بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور مرطوب با ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. سلول‌ها در فاز رشد تصاعدی با رقیق‌سازی دوره‌ای با محیط تازه نگه‌داشته شدند.

$1 \times 10^4$  سلول در  $100 \text{ ml}$  از محیط رشد در تعداد کافی از چاهک‌ها کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت برای اتصال سلول‌ها به ظرف انکوبه شدند.

پس از کشت و رشد سلول‌ها در تعداد کافی از چاهک‌ها، برای پی بردن به اثرات سمیت ترکیبات، داروی آزاد متوترکسات، نانوذرات آلبومین سرم انسانی و نانوذرات آلبومین سرم انسانی حاوی متوتروکسات را بر سلول‌ها انکوبه شدند. برای این کار، به منظور پی بردن به وابستگی زمانی و غلظتی ترکیبات، تست سمیت MTT به صورت یک روزه، دو روزه و سه روزه انجام شد. به این صورت که، برای هر یک از روزها ۹ چاهک از سلول‌ها به‌عنوان کنترل برای دارو و نانودارو و ۹ چاهک از سلول‌ها به‌عنوان کنترل برای آلبومین و ۳ چاهک به ازای هر یک از غلظت‌های ۰/۴، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و  $80 \mu\text{g/ml}$  از نانودارو و ۳ چاهک به ازای هر یک از غلظت‌های ۰/۴، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و  $80 \mu\text{g/ml}$  از داروی آزاد متوتروکسات و ۳ چاهک به ازای هر یک از غلظت‌های ۰/۴، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و  $80 \mu\text{g/ml}$  از آلبومین برای مواجهه با سلول‌ها اختصاص داده شد. پس از گذشت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سلول‌ها را در مواجهه با مقدار  $100 \mu\text{l}$  رنگدانه‌ی MTT با غلظت  $0.5 \text{ mg/ml}$  قرار داده شدند. پس از مواجهه‌ی سلول‌ها به مدت ۳ ساعت با رنگدانه‌ی MTT شدت تغییرات رنگ آنها را با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر مشاهده و ثبت شد.

### ۳- نتایج و بحث

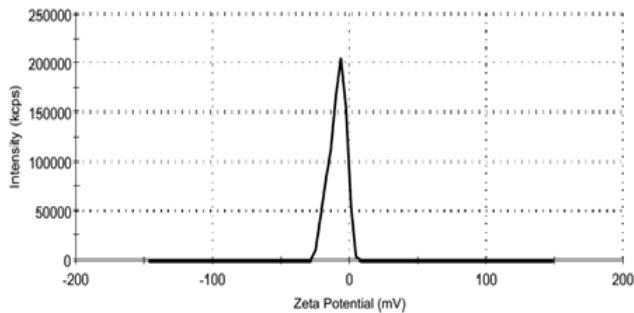
اندازه و توزیع اندازه ۴۲ نمونه F-A با استفاده از DLS به‌دست آمدند. اندازه ذرات حاصل و توزیع اندازه ذرات محلول‌های غلیظ و رقیق به ترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲. اندازه و شاخص پراکندگی نمونه‌های A، C و E

نمونه‌ها	اندازه (نانومتر)	شاخص پراکندگی
A1	19900	0.74
A2	50.9	1.01
A3	100	1
A4	100	1.1
A5	18.6	0.9
A6	8820	1.12
A7	43.9	5.4
A8	2.08	4.7
C1	358	1.01
C2	58.5	1.2
C3	47	1.11
C4	3.86	6.4
C5	82.5	6.4
C6	256	6.4
C7	141	6.4
C8	63.8	0.8
E1	27.7	1.67
E2	1.74	1.6
E3	34.4	2.56
E4	88.7	6.4
E5	114	6.4
E6	61.3	2.3
E7	44	2.3
E8	60	1.46

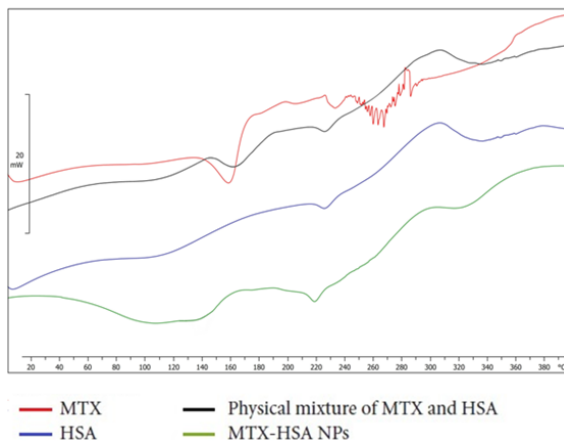
در ادامه، از نمونه F4 برای انجام آزمایشات استفاده شد که اندازه آن مطابق شکل ۱ حدود ۷ نانومتر و شاخص پراکندگی ۲/۰۱ است.

پتانسیل زتا معیاری از پایداری ذرات در محیط‌های آبی است. گروه‌های عاملی باردار در سطح ذرات تعیین‌کننده پتانسیل زتا هستند. پتانسیل زتای پایین‌تر از ۲۵- از نظر الکتروستاتیکی ناپایدار محسوب شده و منجر به تجمع ذرات می‌شود. پس با توجه به مقدار به‌دست آمده برای نمونه F4 که  $-9 \text{ mV}$  بود، طاهری و همکارانش با کانژوگاسیون داروی متوتروکسات به آلبومین سرم انسانی با استفاده از روش desolvation ذراتی با اندازه  $95 \text{ nm}$  را تولید کردند که پتانسیل زتای حدود  $-9 \text{ mV}$  داشتند [۱۰].



شکل ۲. پتانسیل زتای نمونه F4

طیف‌های به‌دست آمده از آزمون حرارتی HSA، داروی آزاد، مخلوط فیزیکی از HSA، MTX و نانوذرات HSA-MTX در شکل ۳ نمایش داده شده است. آلبومین دارای یک پیک گرماگیر در دمای  $231^{\circ}\text{C}$  و یک پیک گرماده تقریبی در دمای  $310^{\circ}\text{C}$  از خود نشان داده است. متوتروکسات دارای چند پیک اندوترمیک در دمای  $160$ ،  $230$  و در گستره دمای  $280-250^{\circ}\text{C}$  است و یک پیک گرماده تقریبی در دمای  $280^{\circ}\text{C}$  نشان داده است. آزمون حرارتی مخلوط فیزیکی آلبومین و متوتروکسات تغییری نسبت به نمونه‌های خود آلبومین و متوتروکسات از خود نشان نداد. در حالی که، در آزمون حرارتی نانوذرات مطابق ۳ جابه‌جایی پیک به سمت راست مشاهده شد که حاکی از وجود دارو به شکل بی‌ریخت در ترکیب آلبومین است.

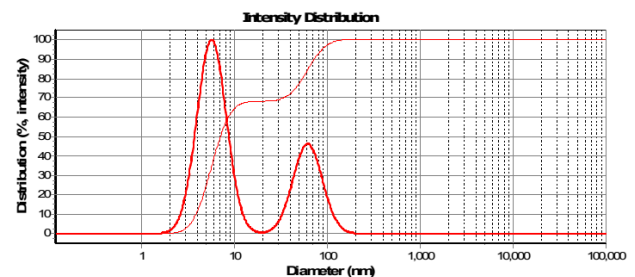


شکل ۳. طیف تغییرات حرارتی با استفاده از روش DSC برای HSA، داروی آزاد، مخلوط فیزیکی از HSA و MTX و نانوذرات HSA-MTX

همچنین، بازدهی محبوس‌سازی و بازدهی بارگذاری نانوذرات HSA-MTX تهیه شده به ترتیب  $47\%$  و  $3\%$  محاسبه شد. Subia و همکارش متوتروکسات را در درون نانوذراتی بارگذاری کردند که از ترکیب آلبومین و فیبروئین ابریشم تشکیل شده بود. بازده بارگذاری دارو گستره‌ای از  $14\%$  تا  $18\%$  و بازده

جدول ۳. اندازه و شاخص پراکندگی نمونه‌های B، D و F

نمونه‌ها	اندازه (نانومتر)	شاخص پراکندگی
B1	3.98	1.1
B2	11.7	1.01
B3	7.16	1.54
B4	1.75	1.2
B5	1.48	0.9
B6	3.35	2.06
B7	1.66	1.56
B8	1.9	0.7
D1	10	1.3
D2	806	4.7
D3	15	1.35
D4	8.56	9.1
D5	22.1	2.8
D6	9.64	2.42
D7	5.11	2.4
D8	22.6	1.35
F1	3.35	2.1
F2	8.32	1.17
F3	551	6.4
F4	7.17	2.01
F5	7.28	0.7
F6	10.7	6.4
F7	5.11	0.7
F8	15.5	1.32



شکل ۱. اندازه نمونه F4

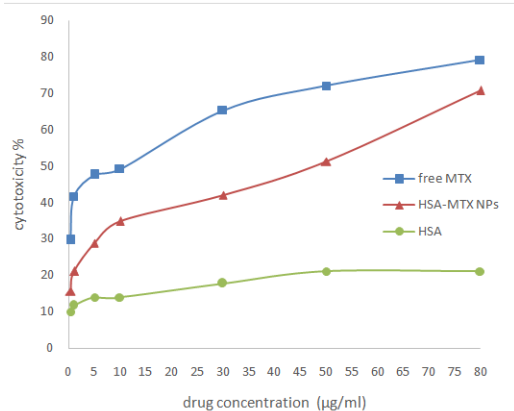
پتانسیل زتای نمونه F4 با استفاده از دستگاه Malvern Zeta sizer اندازه‌گیری شد که در شکل ۲ نشان داده شده است.

دارو در نانوذرات HSA-MTX به طور تقریب در ۰/۵ ساعت اولیه و در ۸ ساعت حداکثر مقدار دارو آزاد شده است.

بررسی اثر سمیت نانوذرات در دوره‌های زمانی متفاوت شامل: ۲۴، ۴۸ و ۷۲، غلظت‌های برابری از MTX در فرمولاسیون‌های داروی آزاد و نانوذرات HSA-MTX و همچنین غلظت مشابه با آن از HSA در مواجهه با سلول‌های گلیوبلاستوما U87MG قرار گرفتند. پس از انکوبه کردن سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۴، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فرمولاسیون‌های داروی آزاد، نانوذرات HSA-MTX و HSA به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد که نتایج آن در شکل ۴، ۵ و ۶ است.

با استفاده از شکل ۷ و ۸ اثر وابستگی غلظتی و زمانی داروی آزاد متوترکسات بر سمیت سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی U87MG نشان داده شد.

شکل ۹ و ۱۰ نیز اثر وابستگی غلظتی و زمانی نانوذرات HSA-MTX بر سمیت سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی U87MG نشان داده شد.



شکل ۴. مقدار مهار سلول‌های U87MG مواجه شده با فرمولاسیون‌های داروی آزاد، نانوذرات HSA و نانوذرات HSA-MTX انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت

محبوس‌سازی آن حدود ۸۳-۸۷٪ را داشت. البته desolvation روش مورد استفاده آن‌ها برای تهیه این نانوذرات بود [۱۱].

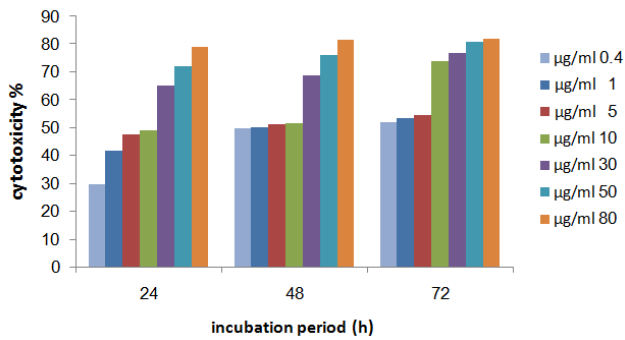
نمودار رهائش دارو در محیط برون‌تنی PBS با رهائش داروی آزاد و نانوذرات MTX-HSA در pH = 7.4 در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت در فواصل زمانی مشخص بررسی شد. در گروه کنترل نیز، نمونه‌هایی از داروی آزاد و نانوذرات MTX-HSA با ویژگی‌های گفته شده، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور محاسبه درصد رهائش داروی نمونه‌ها، جذب نمونه‌های برداشته شده از محلول در زمان‌های معین با طیف‌سنجی UV-Vis خوانده و براساس معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد غلظت، درصد رهائش محاسبه شد. نمودار درصد رهائش تجمعی داروی آزاد نسبت به زمان در جدول ۴ نشان داده شده است. همچنین، نمودار رهائش دارو از نانوذرات HSA-MTX در pH=7.4 مشابه داروی آزاد در فواصل زمانی گفته شده، مشخص شد. سپس، مقدار جذب نمونه‌ها در دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis خوانده شد. مقدار داروی آزاد شده از نانوذرات و درصد رهائش هر کدام از نمونه‌ها تعیین شد که این مقادیر به ترتیب در جدول ۴ آورده شده‌اند.

جدول ۴. مقادیر درصد رهائش داروی MTX و نانوذرات HSA-MTX در pH=7.4 در زمان‌های معین

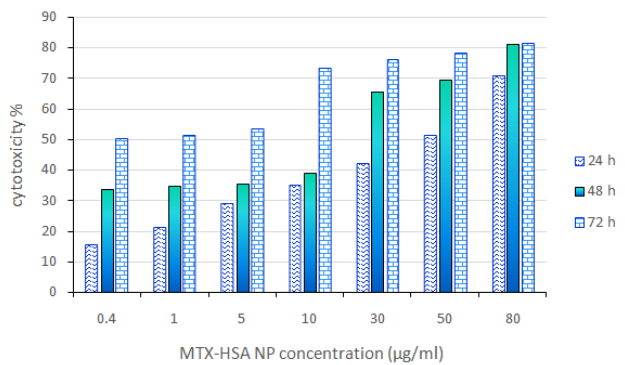
زمان (h)	۰.۵	۱	۲	۴	۶	۸	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲
درصد رهائش MTX	۵۸	۶۸	۷۴	۸۹	۸۹	۸۹	۸۹	۸۹	۸۹	۸۹
درصد رهائش HSA-MTX	۵۳	۶۳	۸۱	۹۱	۹۴	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶

در ساعات نخستین، رهائش به صورت تابعی از حلالیت دارو و نفوذ محیط به داخل بستر بسیار انجام می‌شود که در نتیجه آن داروی جذب شده بر سطح، داروی قرار گرفته بر سطح و داروی نزدیک به سطح به محیط آزاد می‌شوند. در ساعات بعدی، سرعت رهائش آهسته‌تر شده و به حالت به نسبت پایداری می‌رسد. در این مرحله، با نفوذ محیط به داخل توده‌ی کامل بستر بسیار و آبکافت و تخریب بسیار، دارو آزاد می‌شود و این آزادسازی دارو تا انحلال کامل بسیار ادامه دارد. هرچند نوع دارو بر فرایند رهائش تاثیر می‌گذارد [۱۲]. کل مقدار داروی آزاد حداکثر در ۴ ساعت رها شده و همان‌طور که مشخص است حدود ۵۰٪ از

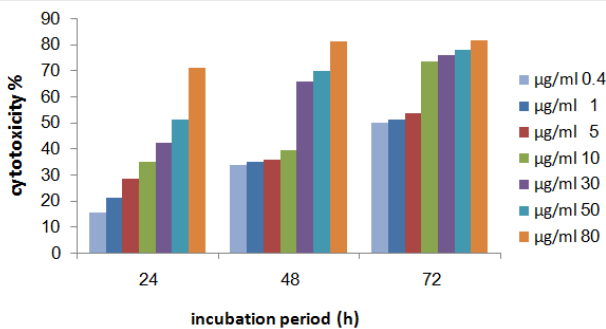
که در نمودارهای ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود، منحنی مربوط به سمیت نانوذرات HSA-MTX در وضعیتی پایین‌تر از منحنی مربوط به سمیت MTX قرار گرفته و با گذشت زمان این دو منحنی به هم نزدیک می‌شوند تا اینکه در ۷۲ ساعت به‌طور تقریب بر روی هم می‌افتند. این مسئله حاکی از نوعی رهایش کنترل شده با فرمولاسیون آورده شده، تلقی می‌شود.



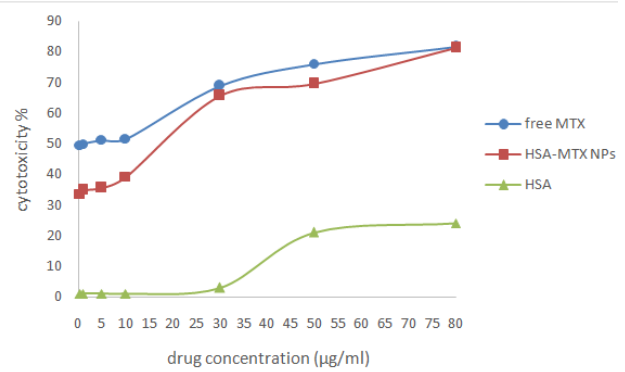
شکل ۸. تاثیر زمان انکوباسیون بر کشندگی سلول‌های گلیوبلاستوماى U87MG مواجه شده با متوترکسات



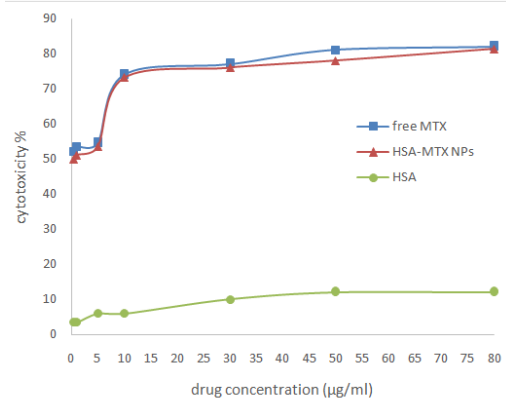
شکل ۹. تاثیر غلظت‌های متفاوت از نانوذرات HSA-MTX بر کشندگی سلول‌های گلیوبلاستوماى U87MG



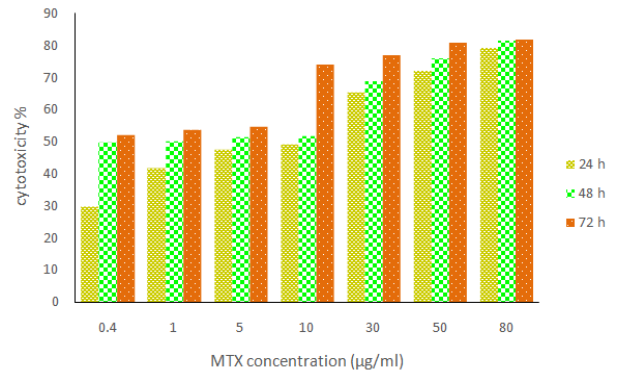
شکل ۱۰. تاثیر زمان انکوباسیون بر کشندگی سلول‌های گلیوبلاستوماى U87MG مواجه شده با نانوذرات HSA-MTX



شکل ۵. مقدار مهار سلول‌های U87MG مواجه شده با فرمولاسیون‌های داروی آزاد، نانوذرات HSA و نانوذرات HSA-MTX انکوبه شده به مدت ۴۸ ساعت



شکل ۶. مقدار مهار سلول‌های U87MG مواجه شده با فرمولاسیون‌های داروی آزاد، نانوذرات HSA و نانوذرات HSA-MTX انکوبه شده به مدت ۷۲ ساعت



شکل ۷. تاثیر غلظت‌های متفاوت از متوترکسات بر کشندگی سلول‌های گلیوبلاستوماى U87MG

از آنجایی که غلظت داروی موجود در فرمولاسیون MTX و نانوذرات HSA-MTX یکسان است، پس منحنی مربوط به سمیت نانوذرات HSA-MTX یا باید بر منحنی مربوط به سمیت MTX بیفتد که نشان‌دهنده عدم وجود رهایش کنترل شده با حامل است یا اینکه در وضعیت پایین‌تر از منحنی مربوط به MTX قرار گیرد که نشان‌دهنده پوشش دارو بوسیله آلبومین و کاهش اثر سمیت سلولی در غلظت‌های مشابه از دارو در فرمولاسیون MTX و نانوذرات HSA-MTX است. همان‌طور

camptothecin analogues as antitumor agents,” JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 85, 271-291, 1993.

[4] J.H. Schornagel, J.G. McVie, “The clinical pharmacology of methotrexate,” Cancer Treatment Reviews, 10, 53-75, 1983.

[5] B. Cronstein, J. Bertino, Birkhauser Verlag AG, Basel-Berlin-Boston, 2000.

[6] K. Ren, A. Dusad, R. Dong, L. Quan, “Albumin as a delivery carrier for rheumatoid arthritis,” Journal Nanomedicine Nanotechnology, 4, 176-178, 2013.

[7] H. Korkusuz, K. Ulbrich, V. Bihrer, K. Welzel, V. Chernikov, T. Knobloch, S. Petersen, F. Huebner, H. Ackermann, S. Gelperina, “Contrast enhancement of the brain by folate-conjugated gadolinium–diethylenetriaminepentaacetic acid–human serum albumin nanoparticles by magnetic resonance imaging,” Molecular imaging, 11, 272-279, 2012.

[8] H.J. Byeon, S. Lee, S.Y. Min, E.S. Lee, B.S. Shin, H.G. Choi, Y.S. Youn, “Doxorubicin-loaded nanoparticles consisted of cationic-and mannose-modified-albumins for dual-targeting in brain tumors,” Journal of controlled release, 225 301-313, 2016.

[9] M.R. Malekpour, M. Naghibzadeh, M.R.H. Najafabadi, S.S. Esnaashari, M. Adabi, B. Mujokoro, M. Khosravani, M. Adabi, “Effect of various parameters on encapsulation efficiency of mPEG-PLGA nanoparticles: artificial neural network,” Biointerface research in applied chemistry, 8, 3267-3272, 2018.

[10] A. Taheri, F. Atyabi, F.S. Nouri, F. Ahadi, M.A. Derakhshan, M. Amini, M.H. Ghahremani,

همان‌طور که در نمودارهای ۷، ۸، ۹ و ۱۰ مشخص است، وابستگی زمانی و غلظتی در فرمولاسیون داروی آزاد و نانوذرات HSA-MTX مشاهده می‌شود. بدین ترتیب که، با افزایش غلظت درصد کشندگی سلولی افزایش می‌یابد و در یک غلظت با افزایش زمان مواجهه درصد کشندگی سلولی بهبود یافته است.

## ۴- نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که سامانه نانوداروی طراحی‌شده توانایی نوعی رهایش کنترل شده و آهسته متوترکسات را دارد. افزون‌بر این سامانه طراحی‌شده دارای روش تولید آسان بوده و فرایند تولید را از حیث وجود هرگونه تجهیزات خاص و مشکلات ناشی از استفاده از ماده فعال در سطح و اتصالات عرضی بی‌نیاز می‌کند. بنابراین، با بهینه‌سازی تهیه این نوع سامانه در آینده‌ای نزدیک می‌توان به استفاده از آن در تومورهای مغزی و به‌خصوص گلیوبلاستومای مولتی‌فرم امیدوار باشیم.

## ۵- تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۸۰۷۹-۸۷-۰۱-۹۴ است.

## مراجع

[1] T.A. Juratli, G. Schackert, D. Krex, “Current status of local therapy in malignant gliomas—a clinical review of three selected approaches,” Pharmacology & therapeutics, 139, 341-358, 2013.

[2] M. Kamali, R. Dinarvand, H. Maleki, H. Arzani, P. Mahdavian, H. Nekounam, M. Adabi, M. Khosravani, “Preparation of imatinib base loaded human serum albumin for application in the treatment of glioblastoma,” RSC Advances, 5, 62214-62219, 2015.

[3] W.J. Slichenmyer, E.K. Rowinsky, R.C. Donehower, S.H. Kaufmann, “The current status of



S.N. Ostad, P. Mansoori, R. Dinarvand, "Nanoparticles of conjugated methotrexate-human serum albumin: preparation and cytotoxicity evaluations," Journal of nanomaterials, 2011, 5, 2011.

[11] B. Subia, S. Kundu, "Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers," Nanotechnology, 24, 035103, 2012.

[12] L. Mo, L. Hou, D. Guo, X. Xiao, P. Mao, X. Yang, "Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells," International journal of pharmaceutics, 436, 815-824, 2012.



# Preparation of Methotrexate loaded Human Serum Albumin and its toxic effects on human glioblastoma cell

Saeedeh Fallah anbohi<sup>1</sup>, Mahdi Adabi<sup>1</sup>, Masood Khosravani<sup>1\*</sup>, Rassoul Dinarvand<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

<sup>2</sup>Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

**Abstract:** Methotrexate (MTX) as a chemotherapeutic agent has the potential to be used in the treatment of brain tumors, but it is less used due to insufficient penetration into the brain parenchyma. By designing nanotechnology-based systems, it can be possible to overcome these limitations. In this study, the sonication method was used to prepare MTX loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. The results indicated that MTX loaded HSA nanoparticles have the size less than 100 nm. The obtained values for drug loading and encapsulation efficacy were 3% and 47%, respectively; and the results of thermal analysis of nanoparticles demonstrated the amorphous form of MTX in HSA. In the release profile, slow and controlled release of nanoparticles was also observed in the neutral environment. In addition, the results indicated the decreased cytotoxic effects of MTX loaded HSA nanoparticles in comparison with free MTX. Therefore, the proposed formulation can have high potential in drug delivery systems to glioblastoma cells.

**Keywords:** Methotrexate, Albumin, Nanoparticle, Glioblastoma.