فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۶، جلد ۱۰، شماره ۱، زمستان ۹۵، صفحه ۱ تا ۱۰

بررسی اثر محلول پکلی تاکسل- پلی اتیلن گلیکول بر روی سلول HeLa

مریم افشار[۱]، مهروز دزفولیان[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز. ایران. mehrdezfulian@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۵/۸/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: پکلی تاکسل یکی از مهم ترین داروهای ضد سرطانی است که در درمان بسیاری از انواع سرطان کاربرد دارد، نامحلول بودن این ماده در آب و استفاده از حلال سمی کروموفور EL عوارض جانبی بسیاری به همراه دارد. این مطالعه با هدف افزایش حلالیت پکلی تاکسل به منظور تهیه کونژوگه جدیدی از پلی اتیلن گلیکول-پکلی تاکسل و بررسی میزان سمیت آن می-باشد.

روش کار: رده سلولی سرطانی هلا و فیبروبلاستی در محیط کشت RPMI 1640 حاوی سرم جنین گاو و آنتی بیوتیک کشت گردید. کونژوگه ی حاوی پکلی تاکسل- پلی اتیلن گلیکول به روش فیزیکی در غلظت های مختلف تهیه و میزان سایتوتوکسیسیتی دارو پس از ٢٤ ساعت با روش MTT بر روی سلول های هلا (HeLa) و فیبروبلاست(L_{929}) سنجیده شد. میانگین داده های سه بار تکرارآزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS،آنالیز آماری آنووا و آزمون تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: کونژوگه دارویی کاملاً یکنواخت و پکلی تاکسل کاملاً حل شده بود. کونژوگه پکلی تاکسل- پلی اتیلن گلیکول با دوز کمتر تاثیر بیشتری نسبت پکلی تاکسل محلول درکروموفور EL داشته، هم چنین پلی اتیلن گلیکول دارای سمیت به مراتب کمتر از کروموفور EL بر روی سلول ها است(P-value<۰/۰۵) .

نتیجه‌گیری: کونژوگه ی تهیه شده در این مطالعه فعالیت ضد توموری بالاتر و سمیت کمتری را نشان داد که می تواند به عنوان حامل دارو برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پکلی تاکسل، پلی اتیلن گلیکول، MTT assay، HeLa، L_{929}.

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ بعد از بیماری های قلبی-عروقی است. سرطان سرویکس شایع ترین سرطان بعد از سرطان سینه بوده وبه عنوان یکی از مشکلات مهم سلامت عمومی با میزان شیوع سالانه نیم میلیون مورد در جهان است(۳). سرطان سرویکس در جوامع صنعتی و پیشرفته شیوع بیشتری داشته و چهارمین سرطانی است که باعث مرگ در زنان می-شود(۱۹). سلول های Hela رده ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا و تاکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد. عملکرد این سلول‌ها از بافت های مجاور متفاوت بوده و خاصیت تهاجمی داشته و با بافت های مجاور برای رسیدن به ذخایر خونی رقابت کرده و آن ها را از بین می برند(۲). امروزه بیش از ۴۰% از ترکیبات شیمیایی جدید کشف شده توسط کارخانه های داروسازی ترکیباتی هیدروفوب هستند. فرمولاسیون این داروها یکی از مهم‌ترین مشکلات برای استفاده کلینیکی است. درمان-های ناموفق به وسیله داروهای هیدروفوب اغلب به علت عدم دسترسی به جایگاه فعال دارو در دوز مناسب اختصاصی است(۱۹). تاکسول یک ترکیب دی ترپنی با ساختاری پیچیده می باشد که مهم ترین منبع استخراج آن پوست درخت گیاه سرخدار با نام علمی *Taxus brevifolia* است و به طور گسترده به عنوان دارو در سراسر دنیا برای درمان انواع سرطان ها از جمله

سرطان پوست، ریه، مجاری ادرار، مری، غدد لنفاوی مورد استفاده قرار می گیرد. تاکسول در سال ۱۹۷۷ برای درمان سرطان رحم و سرطان پستان نیز توسط FDA مورد تایید قرار گرفت. تاکسان ها اولین ترکیباتی هستند که با مکانیسمی متفاوت از سایر داروهای مشابه درمان سرطان با تشکیل دوک تقسیم غیرطبیعی به عنوان پایدارکننده میکروتوبول شناخته شده است. تاکسول پلی مریزاسیون توبولین را در نبود GTP یا MAPs نیز تحریک می کند. میکرو توبول‌های شکل گرفته در حضور تاکسول در شرایط آزمایشگاهی کاملاً محکم متصل می شوند و خصوصیاتی غیر از میکروتوبول های طبیعی دارند. در نتیجه این ترکیبات بدون آن که روی سنتز DNA، RNA و پروتئین ها تاثیر مهمی داشته باشند باعث جلوگیری از تکثیر سلولی در فاز G_2/M چرخه سلولی می گردند(۱۴، ۱۰، ۴). ویال های معمول پکلی تاکسل به صورت ۳۰ میلی گرم تاکسول حل شده در ۵ میلی-لیتر از مخلوط(حجمی/حجمی) ریسینولات ۳۵، کروموفور EL و اتانول بدون آب است. کروموفر EL در فرمولاسیون ترکیبات دارویی کم محلول در آب به کار می رود و نقش حامل را ایفا می کند، به این ترتیب انحلال پذیری دارو در خون و آب میان بافتی اندام‌های دریافت کننده میسر می شود(۱۶). از عوارض جانبی این دارو می توان به از بین رفتن رگ های مورد تزریق، مهار سلول های مغز استخوان در تولید گلبول های قرمز خون و مسمومیت ناشی ازکروموفر EL اشاره کرد که در نتیجه آن اغلب تجویز کورتیکواستروئیدها و آنتی هیستامین ها لازم می گردد(۴). کونژگه کردن داروها به منظورهای مختلفی انجام می شود. یکی از عللی که دانشمندان مایل هستند که کونژوگه های مختلف را ایجاد کنند دست یافتن به داروهای موثرتر است(۱۲، ۱۱). یکی دیگر از اهداف سنتز کونژوگه ها ایجاد داروهایی با پایداری بیشتر و اثرات جانبی کمتر، با استفاده از حلال هایی با سمیت کمتر است(۱۳).از نظر میزان حلالیت در آب بسیاری از کونژوگه ها بسیار مورد توجه بوده و بسیاری از آن ها سبب افزایش قابل ملاحظه میزان حلالیت در آب پکلی تاکسل می شود. مشاهده شده است که افزایش حلالیت سبب بهبود فعالیت های ضد سرطانی این دارو شده است(۱۵، ۱۴). یکی از پر استفاده ترین پلی مرهای استفاده شده برای انتقال دارو، پلی اتیلن گلیکول(PEG) است. پلی اتیلن گلیکول پلی مر آمفی فیلیکی است، که در آب و برخی حلال های ارگانیک محلول و غیر سمی بوده و از طریق مسیرهای کلیوی وکبدی از بدن خارج می-شود. بنابراین پلی اتیلن گلیکول برای کاربردهای دارویی EL مناسب است.. به علاوه این ترکیب توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای استفاده ی داخل وریدی، خوراکی و موضعی انسانی تایید شده است(۱). بنابراین، هدف ازتحقیق حاضر بررسی استفاده از پلی اتیلن گلیکول برای افزایش حلالیت پکلی تاکسل در آب و بررسی تاثیرات حاصل از این محلول در عملکرد ضد سرطانی پکلی تاکسل بر روی سلول های توموری و سطح سمیت آن در رده سلولی فیبروبلاستی می باشد.

مواد و روش ها

مواد

پکلی تاکسل(پکلی تاکسل استراژن، سبحان انکولوژی، ایران)، پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰(مرک، آلمان)، اتانول(مرک، آلمان)، رده سلولی سرطان سرویکس انسانی(هلا) و رده سلولی فیبروبلاستی(بانک سلولی انستیتوپاستورایران)، محیط RPMI 1640(سیگماالدریچ،آمریکا)، سرم جنین گوساله FBS (سیگماآلدریچ،آمریکا)، پنی‌سیلین / استرپتومایسین (گیبکو،آلمان)، تریپان بلو (سیگما،آلمان)، متیل تیازول تترازولیوم(MTT)(سیگما، آلمان) برای ساخت هر میلی

لیتر دارو، مقدار ۰/۶ میلی گرم پکلی تاکسل را در ۱۰ میکرولیتر اتانول خالص به خوبی حل گردید. پلی اتیلن گلیکول را با آب دی یونیزه به نسبت ۵:۱ مخلوط کرده، داروی حل شده را به پلی اتیلن گلیکول ۲۰٪(بالاترین غلظت پلی اتیلن گلیکول با کمترین میزان سمیت) اضافه کرده و محلول را ۲۰ دقیقه به وسیله همزن مغناطیسی به خوبی مخلوط گردید. محلول به دست آمده را سونیکیت کرده تا ذرات دارویی کاملاً در محلول پراکنده شود.

کشت سلول

رده سلولی سرطان سرویکس انسانی(هلا) در محیط RPMI 1640 با ۱۰٪ سرم جنین گوساله FBS و ۱٪ محلول پنی سیلین/استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۰٪ کشت داده شد. سلول ها به صورت تک لایه و چسبنده با نمای دوکی و کشیده در کف فلاسک رشد و پس از آن که سلول-ها کاملاً کف فلاسک را پوشاندند با استفاده از محلول استریل تریپسین سلول ها را از کف فلاسک جدا کرده و پس از سانتریوفوژ محلول رویی دور ریخته شده و با اضافه کردن ۱ میلی لیتر سرم جنین گاوی سوسپانسیون سلولی تهیه شد. تعداد سلول های زنده در سوسپانسیون، با استفاده از تریپان بلو و لام هموسایتوژنز(نئوبار) تعیین گردید(۲).

بررسی میزان سمیت سلولی دارو

برای بررسی اثر دارو بر روی رده سلولی هلا، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای، ۸×۱۰^{۴} سلول را کشت داده پس از ۲۴ ساعت، داروی آماده شده را با توجه به تعیین $IC_{۵۰}$ در آزمایشات اولیه با یک دوز پایین و دو دوز بالاتر و با غلظت های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۷ و ۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر بر روی سلول ها اثر داده شد و حجم هر چاهک با محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله و ۱٪ محلول پنی سیلین/ استرپتومایسین به ۲۰۰ میکرولیتر رسیده و ۲۴ ساعت انکوبه شد. هر آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت درصد سلول های زنده در برابر سلول های کنترل ارائه گردید(۱۷). پس از ۲۴ ساعت محلول روی سلول ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر MTT(۳- (۵و۴-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۵ و۲ دی فنیل تترازولیوم بروماید) به هر چاهک اضافه تا بر اساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول های زنده، ماده زرد رنگ MTT به کریستال های آبی تیره و نامحلول در آب فورمازان تبدیل شود. پس از ۴ ساعت، MTT خارج شده و ۲۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه و کاملاً مخلوط، بلورهای فورمازان حل و ایجاد رنگ گردید. جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله الایزا ریدر(ELISA reader) اندازه گیری و درصد سمیت بر روی سلول محاسبه شد(۹).

$$\text{درصد سمیت سلولی} = \left(1 - \frac{\text{میزان جذب متوسط تست}}{\text{میزان جذب متوسط کنترل}}\right) \times ۱۰۰$$

تست چسبندگی

برای بررسی میزان چسبندگی سلول ها پس از خارج کردن محیط کشت، سلول ها با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر فرم آلدئید ۴٪ تثبیت شده و پس از ۵ دقیقه فرمالدئید خارج، سپس ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله به هر چاهک اضافه، پس از ۵ دقیقه رنگ خارج و چاهک با PBS شستشو شد. تعداد سلول ها سنجش و مورفولوژی مشاهده و تصویر برداری گردید.

ارزیابی سایتوتوکسیسیتی با استفاده از روش سنجش کلونی(colony assay)

برای بررسی اثر ترکیبات و توانایی آن بر میزان ممانعت از تشکیل کلنی های جدید، از سنجش کلونی استفاده شد. با کشت $۱۰^{۴}$ سلول بر روی آگار ۵ درصد حاوی محیط کشت و سرم جنین گاوی در چاهک ۵

سانتی متری، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۴٪ دی اکسیدکربن و در حضور بالاترین دوز کشندگی کونژوگه ی دارویی و فرم تجاری، به دست آمده از تست MTT، تعداد کلنی ها شمارش و مقایسه شد.

بررسی مورفولوژی سلول ها

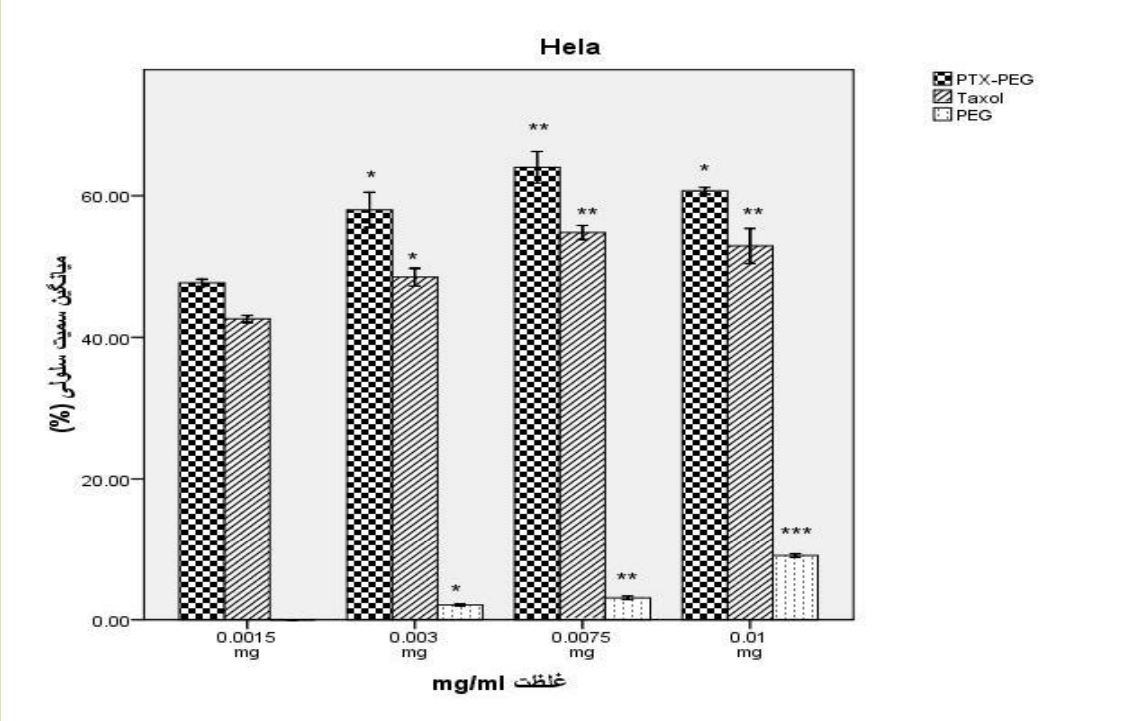
در هر مرحله سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف از محلول ساخته شده با میکروسکوپ معکوس مطالعه و تغییرات مورفولوژیک آن ها نسبت به سلول-های کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

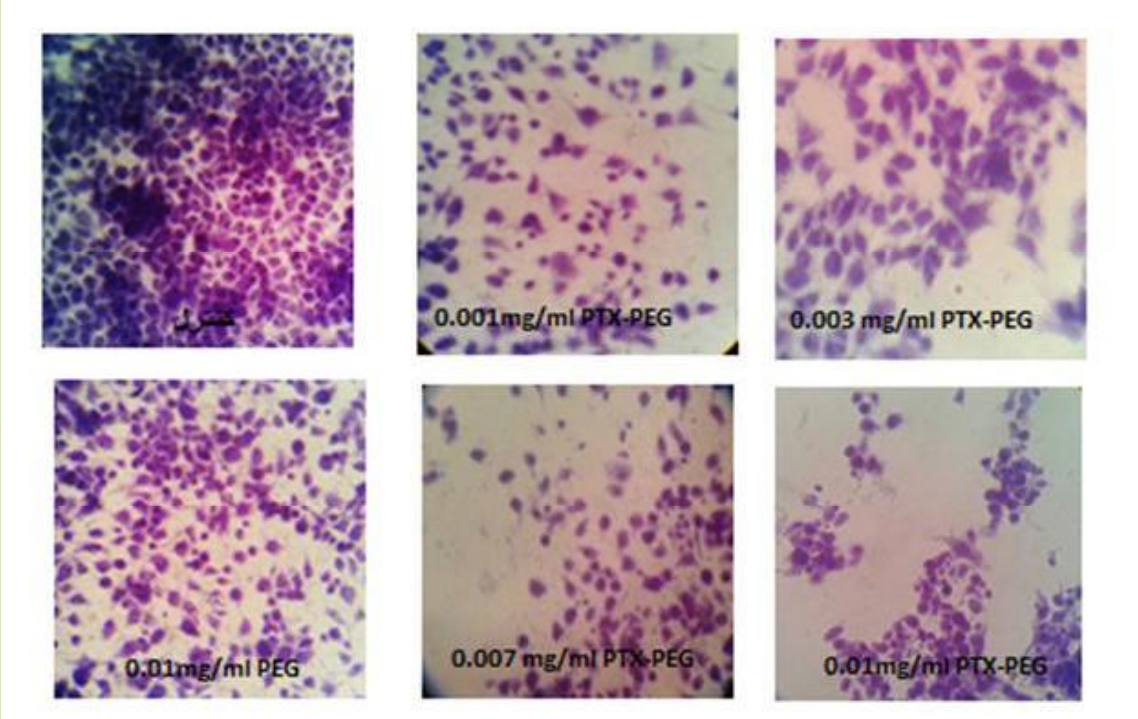
سمیت سلولی پکلی تاکسل حل شده در پلی اتیلن گلیکول با غلظت های مختلف بر روی رده سلولی هلا(نمودار۱) و فیبروبلاست(نمودار۲) به روش MTT سنجیده شد. در سلول های هلا دوز ۰/۰۰۷ میلی گرم در میلی لیتر در ۲۴ ساعت سبب مرگ بیش از ۶۰٪ از سلول ها گردید(نمودار۱). تاثیر این محلول بر روی سلول های فیبروبلاست نشان دهنده سمیت کمتر کونژوگه پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول بر روی سلول های نرمال و در نتیجه عوارض جانبی کمتر دارو است(نمودار۲). هم چنین اثر تاکسول استراژن نیز بر روی رده سلولی هلا و فیبروبلاست به روش MTT سنجیده و با کونژوگه پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول مقایسه شد. با افزایش دوز از ۰/۰۰۱ میلی گرم در میلی‌لیتر به ۰/۰۰۳ میلی گرم در میلی لیتر میزان سمیت سلولی بر روی سلول های هلا افزایش یافته و پس از آن تقریباً ثابت ماند. سمیت سلولی پکلی تاکسل تجاری بر روی سلول هلا کمتر از کونژوگه دارویی پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول و در برخی دوزها سمیتی برابر با آن دارد که با توجه به نتایج سمیت بیشتر به علت کروموفور بوده تا اثر پکلی تاکسل است(نمودار۱). میزان سمیت کونژوگه جدید دارویی بر روی سلول های فیبروبلاستی ثابت و بسیارکمتر از پکلی تاکسل تجاری می باشد. در نهایت میزان سمیت سلولی پلی اتیلن گلیکول با کروموفر EL بر روی رده سلولی فیبروبلاستی مقایسه شد و اختلاف معنی دار بین سمیت کروموفر و پلی اتیلن گلیکول مشخص گردید(نمودار۲). پلی اتیلن جایگزین مناسبی برای کروموفر است. برای بررسی مورفولوژی و میزان سلول‌هایی که پس از اثر دارو چسبندگی خود را حفظ کرده اند، پس از انجام مراحل تثبیت سلول ها(تست چسبندگی) از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس، عکس برداری شد. مشاهده نتایج نشان می دهد که کونژوگه جدید دارویی است که علاوه بر میزان کشندگی، بر مورفولوژی و میزان چسبندگی سلول ها نیز موثر می باشد.

تست سنجش کلنی(colony assay)

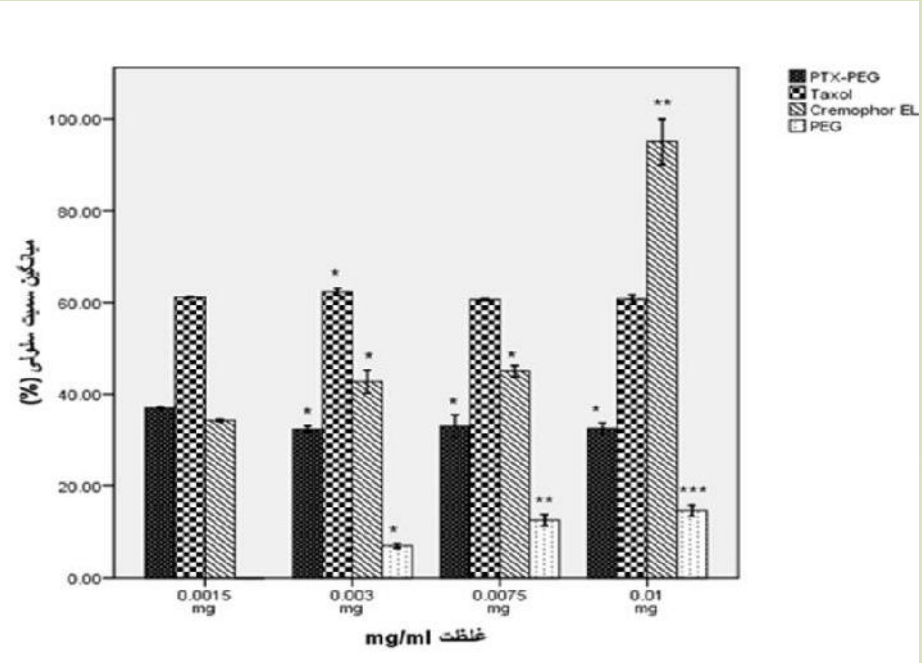
با استفاده از تست سنجش کلنی میزان ممانعت از تشکیل کلنی رده سلولی هلا بررسی شد. در چاهک ها پس از ۲۴ ساعت، کلنی واضح(بیش از ۱۰ سلول) مشاهده نگردید. پس از ۹۶ ساعت کلنی ها سطح چاهک کنترل را پوشانده و غیر قابل تفکیک از یک دیگر و غیر قابل شمارش بودند(۱۰۰۰۰<). همان طور که در تصویر ها مشخص است، کلنی ها در چاهک تیمار شده با تاکسول بسیار کمتر از کنترل بوده ولی باز هم کلنی ها به یک دیگر متصل و غیر قابل شمارش به طور مستقل هستند. در چاهک های تیمار شده با گونژوگه ی پکلی تاکسل-پلی اتین گلیکول تعداد کلنی ها قابل شمارش بودند(۱۵۵۰ کلنی) ولی به علت غیر قابل شمارش بودن چاهک کنترل قابل مقایسه آماری نبودند.



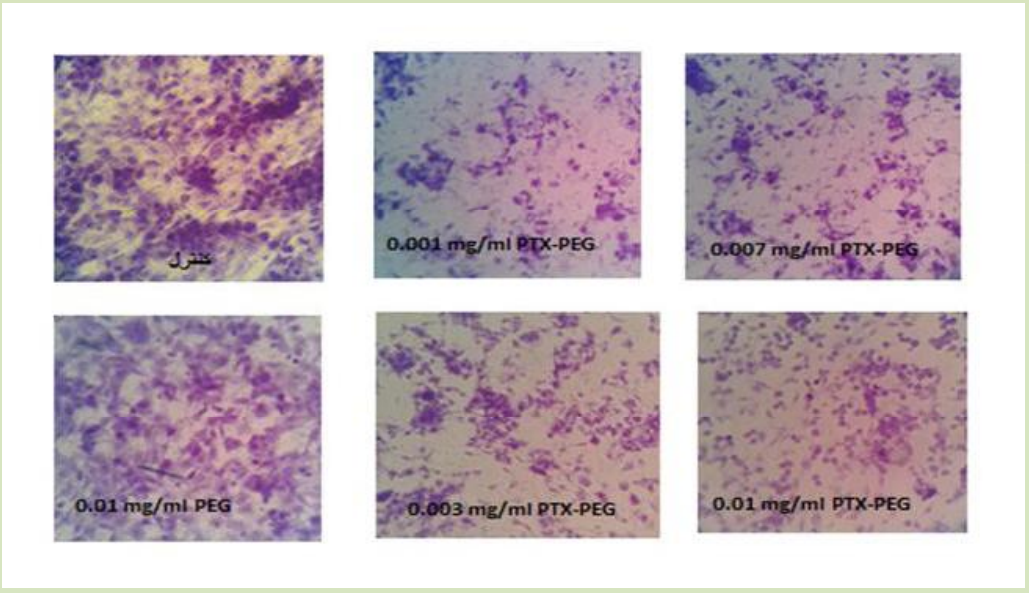
نمودار ۱-درصد میانگین سمیت غلظت های مختلف پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول، پکلی تاکسل تجاری و پلی اتیلن گلیکول بر روی رده سلولی هلا پس از ۲٤ ساعت، ۰/۰۵>>p=* ، 0.01 ≥p=،0.001 ≥p=*****



شکل ۱- میزان چسبندگی سلول ها ی هلا پس از۲٤ ساعت تیمار با کونژوگه پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول و مقایسه با کنترل(بزرگنمایی۴۰۰ ✕)



نمودار۲-درصد میانگین سمیت غلظت های مختلف پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول، پکلی تاکسل تجاری و پلی اتیلن گلیکول و کروموفور EL، بر روی رده سلولی فیبروبلاستی پس از ۲٤ ساعت، ۰/۰۵>>p=* ، 0.01 p=،0.001 p=*****



شکل ۲- میزان چسبندگی سلول ها ی L929 پس از ۲٤ ساعت تیمار با کونژوگه پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول و مقایسه آن با کنترل(بزرگنمایی×٤۰۰)

شکل ۳-میزان ممانعت از تشکیل کلنی پس از ۹٦ ساعت تیمار با دارو و مقایسه آن با کنترل(بزرگنمایی ۱۰۰×)

بحث و نتیجه گیری

پکلی تاکسل یک داروی ضد سرطان بسیار مهم محسوب شده و با فعال کردن چندین کاسپاز موجب آپوپتوز در سلول ها می شود. اگر این دارو با سایر ترکیبات شیمیایی و یا داروهای ضد سرطان دیگر ترکیب و کونژوگه گردد امکان آن را می یابد که با تاثیرات بیشتر بر روی سلول های سرطانی و فعال کردن مسیرهای آپوپتوتیک سبب از بین رفتن سلول‌های سرطانی شود(۱۰). از این رو ترکیبات شیمیایی متعددی تاکنون با پکلی تاکسل کونژوگه شدند(۸). پوشاندن سطح ذرات دارویی با پلی مرهای آبدوست مانند پلی اتیلن گلیکول ذرات نهان ایجاد نموده که پروتئین های پلاسما را دفع و از نشانه گذاری و حذف ذرات توسط سیستم رتیکولواندوتلیال جلوگیری می نماید(۲۱، ۲). در ۲۰۱۳ Arpico و همکاران با ایجاد پیوند های استری یک سری از کونژوگه های سنتتیک پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول تهیه نمودند که پایداری بالاتر، سمیت و همولیز کمتر داشته و پکلی تاکسل را آهسته تر آزاد نموده اما سنتز این کونژوگه ها به مراحل و زمان طولانی نیاز دارد(۱). در ۲۰۱۳ Xiaolong Jing و همکاران دو نوع نانو امولسیون لیپیدی را با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و امولسیون لیپیدی به عنوان حامل داروی پکلی تاکسل تهیه کردند که این نانو امولسیون ها(CPLE,TPLE) به طورقابل توجهی کمتر از ارگان های سیستم رتیکولو اندوتلیال خارج شده و بیشتر توسط تومور جذب می گردد و التهاب داخل وریدی از خود نشان نداده و فعالیت ضد توموری موثرتر، سمیت و همولیز کمتری را بر روی سلول های هلا نشان می دهد. اما پایداری فیزیکوشیمیایی کم و عدم دسترسی به مقادیر بالا برای تولید صنعتی این نانو داروها از موانع استفاده تجاری آن ها است(۱۸). در سال۲۰۱۳ Hyunah Cho و همکاران میسلی از پلی اتیلن گلیکول و کاپرولاکتون به منظور حلالیت و انتقال داروی ترکیبی تهیه نمودند که موجب افزایش مهار تومور و بقای طولانی مدت دارو شد(۶). در مطالعه حاضر پکلی تاکسل برای اولین بار با استفاده از روش-های فیزیکی محلول و سمیت آن در in vitro به روش MTT آزمایش گردید. کونژوگه تهیه شده از پلی اتیلن گلیکول در این مطالعه به جز در دوز اول سمیت بیشتری نسبت به تاکسول بر روی سلول های هلا از خود نشان داد. از نظر ایجاد سمیت بر روی سلول های نرمال، رده سلولی فیبروبلاست مورد آزمایش قرار گرفت و تاکسول(کروموفور- پکلی تاکسل) سمیت سلولی بالاتر از کونژوگه پکلی تاکسل-پلی اتیلن گلیکول نشان داد. با توجه به سمیت بالای کروموفور و نتایج به دست آمده از این مطالعه می توان گفت استفاده از پلی اتیلن گلیکول برای انتقال و افزایش حلالیت پکلی تاکسل موجب کاهش اثرات مخرب ناشی از کروموفور و افزایش تاثیر پکلی تاکسل بر سلول های سرطانی می شود. برای بهبود اثر این کونژوگه و به دست آوردن اطلاعات بیشتر، باید مطالعات بیشتری به منظور بررسی مکانیسم اثر، مسیرهای مولکولی موثر در آپوپتوز، سرعت رهایش، پایداری و میزان لود دارو در این کونژوگه انجام شود. تحقیقات آینده در مورد فرآیند بهینه سازی داروهای کم محلول است که مطالعات آینده را راهبری می کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از شرکت سبحان انکولوژی جهت حمایت مالی و اهدا پکلی تاکسل مورد نیاز تحقیق ابراز می دارد.

منابع

1.Arpiccoa, S., Stella, B., Schiavonb, O., Millaa, P., Zonaria, D., Catte, L. (2013). Preparation and characterization of novel poly(ethylene glycol) paclitaxel derivatives. International Journal of Pharmaceutics, 454; 653– 659.

2.Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv. Drug Deliv. Rev, 54; 631–51.

3.Castellsague, X., Diaz, M., Sanjose, S. (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. J Natl Cancer Inst, 98; 303–315.

4.Davis, J.M. (2010). Basic cell calture. 2nd ed. London Oxford University Press, 112-123.

5.Ferlay, J., Shin, HR., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, DM. (2010). Globocan 2008, cancer incidence and mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 . Available from. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 765–781.

6.Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. European Journal of Cancer, 37; 1590–1598.

7.Greenwald, R.B., Choe, Y.H., McGuire, J., Conover, C.D. (2003). Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. Adv. Drug Deliv. Rev, 55; 217–250.

8.Hyunah Cho, A., Tsz Chung Lai, B., Glen, S. (2013). Poly(ethylene glycol)-block-poly(α-caprolactone) micelles for combination drug delivery: Evaluation of paclitaxel, cyclopamine and gossypol in intraperitoneal xenograft models of ovarian cancer. Journal of Controlled Release, 166 ;1–9.

9.Jennewin, S., Croteau, R. (2001). Taxol biosynthesis: taxan 13α-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent mono oxygenase. Appl. Microbiol. Biotachnol, 57;13-19.

10. Joaqu, M., Adriana, C., Elenae, V., Leticia, R., Alma, M. Fuentes, G. (2014). The role of signaling pathways in cervical cancer and molecular therapeutic targets, Archives Of Medical Research, 45; 525-539.

11. Kesisoglou, F., Panmai, S., Wu, Y. (2007). Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. Adv Drug Deliv Rev, 59; 631-44.

12. Khanavi, M., Moshteh, M., Manayi, A., Ajani, Y. (2011). Cytotoxic activity of Lythrum salicaria L. Research Journal of Biological Sciences, 6 (2); 55-57.

13. Khazir, J., Mir, BA., Mir, SA., Cowan, D. (2013). Natural products as lead compounds in drug discovery. J.Asian Nat Prod Res, 15(7); 764-88.

14. Latif, N., Bachhawat, BM. (1984). Liposomes in immunology. J. Biosci, 6(4); 491– 502.

15. Li, Z., Chen, J., Sun, W., Xu, Y. (2010). Investigation of archaeo somes as carriers for oral delivery of peptides. Biochem Biophys Res Commun, 2; 394(2); 412- 7.

16. Lipinski, C. (2002). Poor aqueous solubility-an industry wide problem in drug discovery. Am Pharm Rev, 5;82-5

17. Lowe, J., Li, H., Downing, KH., Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha betatubulin at 3.5 A resolution. J Mol Biol, 313; 1045-1057.

18. Rowinsky, EK., Donehower, RC. (1995). Paclitaxel (Taxol). N Engl J Med, 332(15);1004-14.

19. Rowinsky, EK., Onetto, N., Canetta, RM., Arbuck, SG. (1992). Taxol: The first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. Semin Oncol, 19(6); 646-62.

20. Sparreboom, A., Loos, WJ., Verweiij, J., Vos, AI., Vanderburg, MEI., Stoter, G. (1998). Quantitation of cremophor el in human plasma samples using a colorimetric dye-binding microassay. Analytical Biochemistry,255(2); 171–175.

21. Spector, D.L., Goldman, D., Leinwan, L.A. (1998). Cells. first ed. cold spring harbor. laboratory press, 1-25.

22. Storm, G., Belliot, SO., Daemen, T., Lasic, DD. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocytic system. Adv. Drug Deliv. Rev, 17; 31–48.

23. Xiaolong, Jing., Li, Deng., Baoan, G., Lin, Xiao., Yingying, Zh., Xingfa, Ke. (2014). A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel. Nanomedicine: Nanotechnology Biology, and Medicine, 10(2); 371–380.

24. Xuejiao, Z., Xinge, Z., Zhongming, W., Xiujun, Gao., Cui, Ch., Zhen, W., Chaoxing, Li. (2011). A hydrotropic b-cyclodextrin grafted hyperbranched polyglycerol co-

polymer for hydrophobic drug. Delivery, 15(7); 764-88.

.

The Effect of Paclitaxel – Polyethylene Glycol Solution on Hela Cells

M. Afshar[1], **M. Dezfulian[1]**
1. Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz. Iran.
mehrdezfulian@yahoo.com
Received:2016.4. 11 **Accepted:2017.28. 1**

Abstract

Inroduction & Objective: Paclitaxel (PTX) is one of the most effective chemotherapeutic agents for a wide spectrum of cancers, but its therapeutic benefit is often limited by its poor solubility in aqueous solutions and Cremophor El severe side effects. However, the aim of this study is to develop highly water-soluble paclitaxel. For this purpose we prepared a new paclitaxel–poly (ethylene glycol) (PEG) conjugates that were characterized and evaluated for their in vitro cytotoxicity.

Materials and Methods: The cell lines used were HeLa and L_{929}. Both cell lines were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bowin serum and 1% antibiotics. Various dilutions of PTX-PEG conjugate by physical method were prepared and in vitro cytotoxicity and drug uptake were determined by MTT assay on HeLa and L_{929} cells. Data were expressed as the means of three separate experiments, and were compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test of SPSS software.

Results: Quite homogeneous solution was obtained and paclitaxel was completely dissolved. Using MTT assay was determined that a lower dose of paclitaxel nanoparticle have a greater efficacy on cancer cells compared with PTX/ Cremophor EL. (* = P-value<0.05)

Conclusion: The new conjugate formulation exhibited a high efficiency of antitumor activity and low toxicity and can be used as a drug delivery vehicle for cancer therapy.

Key word: Paclitaxel, Poly Ethylene Glycol, MTT Assay, Hela, L_{929}