مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دهم، بهار ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

نانولیپوزومه کردن پاکلی تاکسل و بررسی اثر آن بر روی MCF-۷

مائده کوهی مفتخری اصفهانی[۱]، سید ابراهیم علوی*[۲]، امیر حیدری نسب[۳]، محسن چیانی[۴]، عظیم اکبرزاده[۵]

[۱] کارشناس ارشد، تهران-دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی-گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی
[۲] کارشناس ارشد، تهران-دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی-گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی
[۳] دانشیار، تهران-دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی-گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی
[۴] کارشناس ارشد، تهران- میدان پاستور- خیابان ۱۲ فروردین- انستیتو پاستور ایران-بخش بیوتکنولوژی- پایلوت
[۵] استاد، تهران-دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی-گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:35 +0330 on Thursday January 21st 2021

چکیده

سابقه و هدف: سرطان سینه شایع ترین سرطان در بین زنان می باشد. داروی پاکلی تاکسل یک عامل ضد سرطان است که در درمان این بیماری کاربرد دارد. استفاده از پاکلی تاکسل عوارضی را در بر دارد. به همین دلیل با هدف کاهش عوارض جانبی و بهبود کارایی دارو از فناوری دارورسانی نانولیپوزومی استفاده شد.

مواد و روش ها: برای تهیه پاکلی تاکسل نانولیپوزومه، نسبت های مشخصی از فسفاتیدیل کولین، کلسترول و پاکلی تاکسل با یکدیگر ترکیب شدند. قطر پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده با استفاده از دستگاه زتاسایزر محاسبه شد. الگوی آزاد سازی دارو از نانولیپوزوم ها با روش دیالیز بررسی شد و در نهایت اثر سایتوتوکسیسیتی داروی نانولیپوزومه شده با استفاده از روش MTT بررسی گردید.

یافته ها: با استفاده از دستگاه زتاسایزر میانگین قطر پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده ۴۲۱/۴ نانومتر به دست آمد. بازده انکپسولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ۹۱/۳٪ بدست آمد. با استفاده از روش دیالیز میزان رهایش دارو طی ۲۸ ساعت در فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه بررسی شد که برابر با ۵/۵۳٪ بود.

نتیجه گیری: این بررسی نشان داد که اثر سایتوتوکسیسیتی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه نسبت به فرم استاندارد آن بیشتر است.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، نانودارورسانی، پاکلی تاکسل، لیپوزومه کردن

مقدمه

سرطان سینه شایع ترین سرطان در بین زنان می باشد (۱۵). سالانه یک میلیون مورد سرطان سینه در سراسر جهان تشخیص داده می شود (۱). از راه های درمان سرطان سینه می توان به شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی اشاره کرد (۱۰). پاکلی تاکسل از خانواده تاکسان ها می باشد که در درمان سرطان سینه مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو در درمان سرطان های تخمدان، سینه، سر و گردن و سلول های غیر کوچک ریه[۱] مورد استفاده قرار می گیرد (۹،۱۳،۱۴). پاکلی تاکسل یک داروی شیمی درمانی جدید می باشد. این مولکول، تجمع میکروتوبول ها از دیمرهای توبولین را تسهیل می کند و از طریق جلوگیری از دی پلیمرازیسیون میکروتوبول ها باعث تثبیت آن ها می گردد. این ثبات مانع از دوباره سازمان یافتن فعال و طبیعی شبکه میکروتوبول ها می شود که برای اینترفاز حیاتی و اعمال سلولی میتوزی ضروری است. به علاوه پاکلی تاکسل سبب القا آرایش غیرطبیعی و یا خوشه ای از میکروتوبول ها در طی چرخه سلولی گشته و منجر به ایجاد آسترهای متعدد از میکروتوبول ها در طی میتوز می گردد. داروی پاکلی تاکسل با وجود اثر درمانی، باعث بروز عوارض جانبی در بیمار می شود (۴). این دارو با یک نیمه عمر کوتاه متابولیزه می شود و به همین دلیل به منظور دستیابی به غلظت مورد نیاز در طی دوره های مناسب زمانی، استفاده مکرر از دوزهای نسبتا بالا ضروری است و این مسئله منجر به سمیت می شود (۲). استفاده از نانو حامل ها به منظور بهبود کارایی و الگوی سمیت پاکلی تاکسل

1-Non-small cell lung cancer

آدرس نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی- گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی
Email: s.ebrahimalavi@gamil.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۵/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۳۰

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:35 +0330 on Thursday January 21st 2021

به نظر امیدبخش می رسد. یکی از موارد بحث برانگیز در نانودرمانی، کاهش و یا حذف کامل عوارض جانبی می باشد. حامل های تزریقی در مقیاس نانو با هدف عبور از موانع زیستی، حفاظت از دارو و رها کردن دُز بهینه دارو استفاده می شود (۵). ترکیبات لیپیدی به عنوان اهداف جدید برای داروهای ضد سرطان در حال تولید می باشد (۸). یکی از این حامل ها لیپوزوم می باشد. لیپوزوم ها، وزیکول های متشکل از یک یا چند لایه ی فسفولیپیدی متحدالمرکز می باشند که محفظه های آبی را در بر می گیرند (۱۱،۱۲). لیپوزوم ها دارو را در مقابل تخریب حفاظت می کنند و بیمار را در مقابل عوارض جانبی دارو محافظت می نمایند (۶). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر داروی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه در بهبود اثر درمانی و کاهش عوارض جانبی آن می باشد.

مواد و روش ها

فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پاکلی تاکسل و محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از شرکت سیگما خریداری شد. اتانول و ایزوپروپانول از شرکت مرک و محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از شرکت Invitrogen خریداری و همچنین سلول MCF۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

ساخت نانولیپوزوم و انکپسولاسیون دارو

فسفاتیدیل کولین وکلسترول (نسبت ۱۵ به ۱) در ۱۲۰ میلی لیتر اتانول ۹۸٪ حل شد (دمای محیط، ۳۰۰ دور بر دقیقه) تا سوسپانسیون، شفاف و زرد رنگ شود. سپس ۱۳ میلی گرم پاکلی تاکسل اضافه و با کمک همزن مغناطیسی مخلوط گردید (دمای محیط، ۳۰ دقیقه، ۳۰۰ دور بر دقیقه). در ادامه فاز حلال، به کمک روتاری اواپوراتور (۵۰ درجه سانتی گراد، ۱۰۰ دور بر دقیقه) (شرکت Heidolph آلمان) تبخیر گردید و ژلوز حاصله در ۱۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید. پس از آن فرمولاسیون به دست آمده به مدت ۵ دقیقه سونیکه (Bandelin Sonorex Digitec, ۶۰ Hz) شد.

تعیین اندازه نانو لیپوزوم ها

میانگین قطر لیپوزوم ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Mal-vern Instruments Ltd) تعیین شد.

بازده انکپسولاسیون

برای بررسی درصد داروی انکپسوله شده، مقدار ۲ میلی لیتر (۲ میلی گرم) از فرمولاسیون پاکلی تاکسل لیپوزومه شده، با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV – ۱۶۰۱PC شرکت SHIMADZU) جذب نوری محلول رویی در طول موج ۲۲۷ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید.جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت های سریالی از استاندارد پاکلی تاکسل تهیه و جذب نوری آن ها با کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۲۷ نانومتر سنجیده شد.

بررسی رهایش دارو

برای بررسی الگوی آزاد شدن پاکلی تاکسل از لیپوزوم ها، مقدار ۱ میلی میلی لیتر از فرمولاسیون داروی لیپوزومه شده در داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین با pH ۷.۴ قرار گرفت و سپس بر روی همزن مغناطیسی گذاشته شد (۲۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد). برای ارزیابی الگوی رهایش دارو، در زمان های مختلف مقدار یک میلی لیتر از بافر فسفات برداشته شده و با یک میلی لیتر بافر فسفات تازه جایگزین می گردید. جذب نوری در نمونه های برداشت شده در ساعت های مختلف در طول موج ۲۲۷ نانومتر اندازه گیری شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت داروی آزاد شده در هر زمان محاسبه گردید. در نهایت نمودار رهایش دارو بر حسب زمان رسم شد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

پس از کشت رده سلولی MCF۷ در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول بود در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت ۵٪ CO_2 انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها را برداشته و غلظت های مختلفی از فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده و کنترل آن بر

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:35 +0330 on Thursday January 21st 2021

روی سلول ها ریخته شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی را بیرون ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون رنگ ارغوانی (مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول های زنده در ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول حل شد. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری (اسپکتروفتومترمدل Power Eave XS) و میزان IC۵۰ با استفاده از برنامه pharm محاسبه گردید.

یافته ها

تعیین اندازه نانو لیپوزوم ها

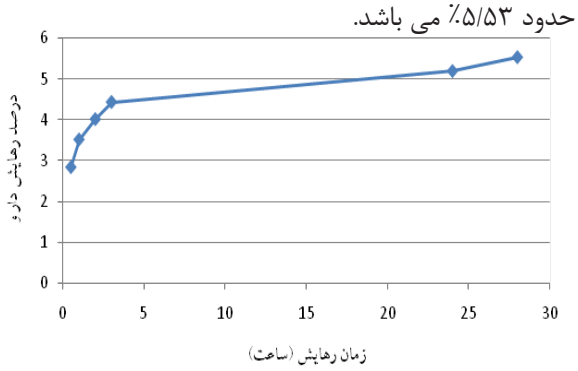
میانگین قطر پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده ۴۲۱/۴ نانومتر بدست آمد.

بازده انکپسولاسیون

بازده انکپسولاسیون (EE٪) برای این فرمولاسیون با توجه به فرمول شماره ۱ برابر ۹۱/۳ درصد تعیین شد.

بررسی رهایش دارو

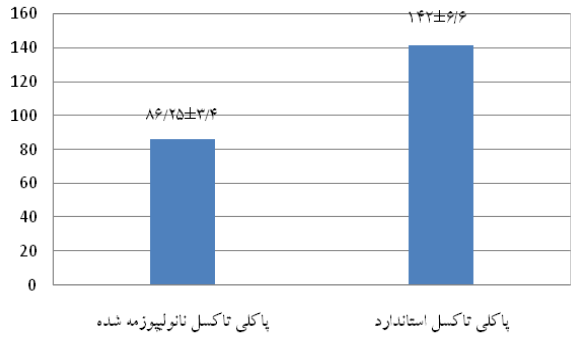
مقدار پاکلی تاکسل آزاد شده از فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده در بافر PBS طی بازه های زمانی ۳۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۲۴ ساعت، ۲۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد پاکلی تاکسل محاسبه شد. الگوی آزاد سازی دارو مطابق نمودار زیر می باشد. این نمودار نشان می دهد که حداکثر مقدار داروی آزاد شده از لیپوزوم ها در مدت ۲۸ ساعت، حدود ۵/۵۳٪ می باشد.



منحنی ۱- میزان رهایش پاکلی تاکسل از فرمولاسیون پاکلی تاکسل لیپوزومه شده در بافر PBS

بررسی سایتوتوکسیسیتی دارو

میزان سایتوتوکسیسیتی دارو در غلظت های مختلف بر اساس روش MTT برسی شد که نتایج در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار۱- مقادیر IC۵۰ (میکرو گرم بر میلی لیتر) برای دو فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه و استاندارد پاکلی تاکسل.

بحث

دارورسانی یکی از چالش های اصلی بیوتکنولوژی دارویی است (۶). ثابت شده است که نانوحامل ها توانایی رساندن داروها به سلول های هدف را دارند. یکی از نانوحامل های لیپیدی، لیپوزوم می باشد. لیپوزوم ها دارو را درمقابل تخریب حفاظت می کنند و درمقابل، بیمار را در برابر عوارض جانبی داروی محصور شده، محافظت می کند (۵). در سال ۲۰۰۵، چن و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم را از طرق مختلف بر مدل های منتشر شده ی سرطان سینه تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دهنده ی جذب درصد بالایی از آدریامایسین محصور در لیپوزوم توسط سلول های توموری بود و همچنین نتایج نشان داد که میزان توکسیسیته ی دارو به شدت افزایش یافته است (۳). در سال ۲۰۰۷، ژیوتا و همکاران داروی دوکسوربیسین محصور در لیپوزوم را در ترکیب، سیکلوفسفامید به عنوان خط اول درمان سرطان سینه مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق نتایج بدست آمده نشان دهنده ی افزایش سمیت سلولی داروی دوکسوربیسین محصور در لیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد آن بود (۷). در این پژوهش، تاثیر فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه بر روی رده ی سلولی سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بازده انکپسولاسیون نشان می دهد

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:35 +0330 on Thursday January 21st 2021

که مقدار قابل توجهی از دارو در داخل وزیکول ها قرار گرفته است و این مسئله می تواند تا حد زیادی مربوط به نسبت های کنترل شده فسفولیپید، کلسترول، دارو و همچنین روش مورد استفاده (تبخیر فاز معکوس) باشد. بررسی الگوی رهایش دارو نانولیپوزومه شده نشان دهنده ی این است که رهایش دارو به صورت نسبتاً آهسته انجام می گیرد و همانطور که انتظار می‌رفت استفاده از لیپوزوم ها به عنوان عامل دارو رسانی نقش بسزایی در کند کردن رهایش دارو دارد و این بخاطر این است که دارو زمان بیشتری نیاز دارد تا بتواند از لایه های فسفولیپیدی لیپوزوم عبور کند. مقایسه اثر سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه شده با استاندارد پاکلی تاکسل، حاکی از تاثیر بیشتر داروی نانولیپوزومه ی پاکلی تاکسل در از بین بردن سلول های سرطانی می باشد. برای توجیه این مسئله می توان گفت که فرمولاسیون نانولیپوزومی پاکلی تاکسل به دلیل داشتن ساختارهای فسفولیپیدی مشابه با ساختار دولایه ای غشاء سلول های MCF-7 بهتر می توانند با این سلول ها ارتباط برقرار کرده و با جوش خوردن غشاهای آن ها با یکدیگر و آزاد سازی مستقیم دارو به داخل سلول هدف باعث افزایش مرگ این سلول ها شوند.

تشکر و قدردانی

مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. بدینوسیله از زحمات خانم ها شقایق امیری، مهدیه تقوی و مریم فرحناک که در تمامی مراحل پژوهش یار و یاور ما بودند، کمال تشکر را داریم.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:35 +0330 on Thursday January 21st 2021

منابع

(1) Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. Clin Breast Cancer, 2009; 9 Suppl 2:S73-81.

(2) Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunagaran D, Anto RJ. Sensitization of Taxol-Induced Apoptosis by Curcumin Involves Down-Regulation of Nuclear Factor-KappaB and the Serine/Threonine Kinase Akt and is Independent of Tubulin Polymerization. J Biol Chem. 2005; 280(8):6301-8.

(3) Chen JH, Ling R, Yao Q, Li Y, Chen T, Wang Z, Li KZ. Effect of Small-Sized Liposomal Adriamycin Administered by Various Routes on a Metastatic Breast Cancer Model. Endocr Relat Cancer, 2005; 12(1):93-100.

(4) Dorr RT. Pharmacology and Toxicology of Cremophor EL Diluent. Ann Pharmacother, 1994; 28(5 Suppl):S11-4.

(5) Costantino L, Boraschi D. Is There a Clinical Future for Polymeric Nanoparticles as Brain-Targeting Drug Delivery Agents? Drug Discov Today, 2012; 17(7-8):367-78.

(6) Georgens C, Weyermann J, Zimmer A. Recombinant Virus Like Particles as Drug Delivery System. Curr Pharm Biotechnol, 2005; 6(1):49-55.

(7) Giotta F, Lorusso V, Maiello E, Filippelli G, Valerio MR, Caruso M, Verderame F, Latorre A, Colucci G. Liposomal-Encapsulated Doxorubicin Plus Cyclophosphamide as First-Line Therapy in Metastatic Breast Cancer: a Phase II Multicentric Study. Ann Oncol, 2007; 18 Suppl 6:vi66-9.

(8) Gonzalez RO, Higa LH, Cutrullis RA, Bilen M, Morelli I, Roncaglia DI, Corral RS, Morilla MJ, Petray PB, Romero EL. Archaeosomes Made of Halorubrum Tebenquichense Total Polar Lipids: a New Source of Adjuvancy. BMC Biotechnol. 2009 Aug 13;9:71 .

(9) Greco FA. Paclitaxel-Based Combination Chemotherapy in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. Lung Cancer, 2001; 34 Suppl 4:S53-6.

(10) Jianfeng Guo, Ludovic Bourre, Declan M. Soden, Gerald C. O'Sullivan, Caitriona O'Driscoll. Can Non-Viral Technologies Knockdown the Barriers to siRNA Delivery and Achieve the Next Generation of Cancer Therapeutics? Biotechnol Adv, 2011; 29(4):402-17.

(11) Latif N and Bachhawat BK. Liposomes in Immunology. J Biosci, 1984, Vol. 6; 491–502.

(12) Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. Developments in Liposomal Drug Delivery Systems. Expert Opin Biol Ther, 2001; 1(6):923-47.

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

(14) Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG.Taxol: The First of the Taxanes, an Important New Class of Antitumor Agents. Semin Oncol, 1992; 19(6):646-62.

(15) Warner E. Clinical Practice. Breast-Cancer Screening. N Engl J Med, 2011; 365(11):1025-32.