مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره سیزدهم، زمستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

فعالیت سایتوتوکسیک هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه ی پگیله بر رده سلولی MCF-۷

سید ابراهیم علوی[۱]، مائده کوهی مفتخری اصفهانی[۱*]، عظیم اکبرزاده[۱]

[۱]بخش نانوبیوتکنولوژی، پایلوت، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سالانه بیماری سرطان سینه جان هزاران نفر را می گیرد. فن آوری نانو از مباحث عمده ی مجامع علمی امروز در زمینه دارورسانی هدفمند می باشد. فن آوری نانو کمک می کند تا زمان، مکان و سرعت آزاد سازی دارو کنترل شود. هیدروکسی اوره از داروهای مورد استفاده در درمان سرطان سینه است که استفاده از آن عوارض جانبی یی را در پی دارد. به همین دلیل برای کاهش عوارض، افزایش کارایی، راحتی و آسایش بیماران از فن آوری نانو دارورسانی لیپوزومی استفاده شد.

مواد و روش ها: نسبت مشخصی از فسفاتیدیل کولین، کلسترول و پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ با یکدیگر ترکیب شدند، سپس داروی هیدروکسی اوره به آن اضافه گردید. میانگین قطر هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه ی پگیله با کمک دستگاه زتا سایزر اندازه گیری شد. بازده انکپسولاسیون و میزان رهایش دارو از فرمولاسیون نانولیپوزومه ی پگیله به ترتیب با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و روش دیالیز بررسی شد. جهت سنجش سمیت دارو از روش MTT استفاده شد.

یافته ها: میانگین قطر هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه ی پگیله ۳۳۸/۲ نانومتر شد. بازده انکپسولاسیون فرمولاسیون تهیه شده ۶۴/۲۱۲±۰/۱۷۳ درصد بدست آمد. میزان رهایش دارو از نانولیپوزوم های پگیله طی ۲۸ ساعت ۲۱/۷۱٪ بود. این بررسی نشان داد که اثر سایتوتوکسیسیتی داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده ۳۸/۹۳٪ بیشتر از داروی آزاد می باشد.

نتیجه گیری: استفاده از پلی اتیلن گلیکول حلالیت دارو و همچنین برخورد آن را با سلول های هدف افزایش می دهد.

کلمات کلیدی: فن آوری نانو، دارورسانی هدفمند، سرطان سینه، لیپوزومه ی پگیله، هیدروکسی اوره

مقدمه

پیشرفت سریع در فن آوری نانو سبب افزایش روز به روز دارو های جدید شده است (۷). از مقوله های مهم در دارو سازی، بحث دارورسانی هدفمند می باشد. با روش های معمول، دارو در سراسر بدن پخش می شود و تمامی بدن تحت تاثیر دارو قرار می گیرد. کاربرد بالینی بسیاری از درمان های معمولی بوسیله ی ناتوانی در رساندن غلظت های درمانی دارو به بافت های هدف و یا اثرات مضر سمی و شدید روی عضوها و بافت های معمولی، محدود شده است. رویکرد های مختلف برای غلبه بر مشکلات با ارایه ی انتخابی رساندن دارو به منطقه ی آسیب دیده با استفاده از حامل های مختلف دارویی بکار گرفته شده اند. در میان نانوحامل ها، لیپوزوم ها بیشترین توجه را به خود جلب کرده است. فن آوری نانودارو رسانی لیپوزومی یکی از روش های مجدید در زمینه ی دارورسانی می باشد که موفقیت های زیادی را در این عرصه بدست آورده است. لیپوزومها وزیکولهای دارای دولایه فسفولیپیدی متحدالمرکز می باشند (۸). یکی از بزرگترین مشکلات سلامتی در نقاط مختلف جهان بیماری سرطان می باشد (۵). سرطان مخرب ترین بیماری در جهان به شمار می آید که سالانه که بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید از آن گزارش می شود. (۱). در سال های اخیر فن آوری نانو انقلابی را در تشخیص و درمان سرطان به وجود آورده است. روش های درمانی رایج از جمله جراحی، رادیو تراپی و شیمی درمانی پیشرفت های قابل ملاحظه ای را در درمان سرطان ایجاد کرده اند. هیدروکسی اوره یک عامل سیتوتوکسیک و ضد سرطان است، که با توجه به خاصیت ضدتوموری آن در درمان انواع سرطان از جمله سرطان پستان مورد استفاده قرار

آدرس نویسنده مسئول : تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی،بخش پایلوت
Email :maedehkoohi@gamil.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۲/۰۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.4.13.5.4]

می گیرد. این بیماری بیشترین شیوع را در بین زنان دارد. این بیماری در میان زنان ایرانی رتبه ی دوم را در بین سرطان ها داراست. این بیماری در زنان ایرانی یک دهه زودتر از زنان کشورهای توسعه یافته بروز می کند. استفاده از هیدروکسی اوره علاوه بر خواص درمانی در دراز مدت باعث بوجود آمدن اثرات نامطلوب پوستی و خونی در بیماران تحت درمان می شود (۱۱). به همین دلیل از فن آوری نانو برای کاهش عوارض جانبی و افزایش راندمان درمان استفاده کردیم. در این مطالعه به منظور افزایش کارایی داروی هیدروکسی اوره از فن آوری نانولیپوزوم پگیله شده استفاده شد.

مواد و روش ها

هیدروکسی اوره، فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ (PEG ۲۰۰۰) و محلول MTT [1](۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از شرکت سیگما[2] خریداری شد. اتانول و ایزوپروپانول از شرکت مرک[3] تهیه گردید. محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI از شرکت اینویتروژن[4] خریداری و سلول MCF-۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

ساخت داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده

برای ساخت نانولیپوزوم، فسفاتیدیل کولین، کلسترول و پلی اتیلن گلایکول (به نسبت۲۰:۱۰:۱) در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۸ درصد حل شد (دمای محیط، ۳۰۰ دور بر دقیقه). برای ساخت داروی نانولیپوزومه و پگیله شده فاز حلال فوق، با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور[5] (شرکت Heidolph آلمان) حذف شد، سپس به میزان مشخص سرم فیزیولوژی و هیدروکسی اوره (۸ میلی گرم) به ژلوز حاصل اضافه و هم زده شد (دمای محیط، ۲۴ ساعت، ۳۰۰ دور بر دقیقه). برای این فرمولاسیون کنترل بدون دارو نیز سنتز شد. سپس محلول ها به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد (Bandelin Sonorex Digitec، ۶۰ هرتز) تا بازده بارگذاری دارو افزایش یابد.

تعیین اندازه نانو ذره

با استفاده از دستگاه زتا سایزر[6] (Malvern Instruments Ltd) متوسط قطر نانولیپوزوم های پگیله شده اندازه گیری شد.

بازده انکپسولاسیون

جهت بررسی مقدار هیدروکسی اوره ی انکپسوله شده، یک میلی لیتر (۰/۳۲ میلی گرم) از فرمولاسیون تهیه شده را با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل ۱۶۰۱PC – UV شرکت SHIMADZU) جذب نوری محلول رویی فرمولاسیون در طول موج ۲۱۴ نانومتر سنجیده شد. پس از آن با استفاده از فرمول زیر، بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید.

درصد انکپسولاسیون= (کل دارو / مقدار داروی انکپسوله شده)×۱۰۰

بررسی رهایش دارو

برای بررسی الگوی آزاد شدن دارو از نانولیپوزوم های پگیله شده، مقدار ۰/۳۲ میلی گرم از فرمولاسیون دارویی نانولیپوزومه ی پگیله، در داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در ۱۰میلی لیتر بافر فسفات سالین با pH ۷.۴ در حالی که بر روی مگنتیک استایرر قرار داشت، قرار داده شد (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۲۴ ساعت). سپس میزان داروی آزاد شده در بافر PBS به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۱۴ نانومتر اندازه گیری و درصد رهایش هیدروکسی اوره را با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

ابتدا رده سلولی MCF-۷ در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI کشت داده شد. صد میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰۰ سلول M-CF۷ در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای[7] 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 مختلف از فرمولاسیون داروی نانولیپوزومه ی پگیله و کنترل آن را بر روی سلول ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه شد، سپس سوپرناتانت را دفع کرده و محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه و پس از ۳ ساعت انکوباسیون

1 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
2 Sigma
3 Merck
4 Invitrogen
5 Rotary Evaporator
6 Zeta sizer
7 96-well plate

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.4.13.5.4]

رنگ ارغوانی (مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول های زنده در ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول حل شد. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری (اسپکتروفوتومترمدل Power Eave XS) و میزان IC۵۰ با استفاده از برنامه ی pharm محاسبه گردید.

نتیجه گیری

تعیین اندازه ی نانو ذره

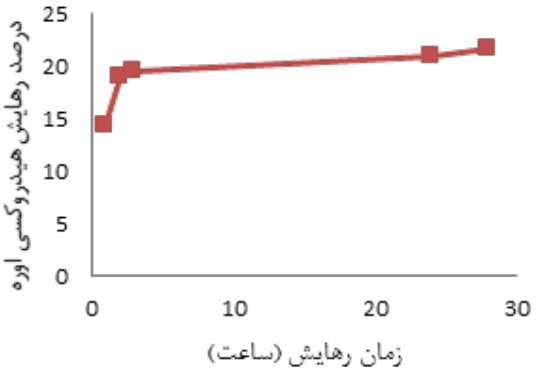
متوسط قطر نانولیپوزوم ها برای فرمولاسیون هیدروکسی اوره نانولیپوزومه و پگیله شده ۳۳۸/۲ نانومتر بدست آمد.

درصد انکپسولاسیون

درصد انکپسولاسیون با توجه به منحنی استاندارد دارو برای هر نمونه محاسبه شد. با توجه به فرمول بازده انکپسولاسیون، مقدار داروی انکپسوله نشده را از مقدارداروی اولیه کم کرده و بر داروی اولیه تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد، درنتیجه درصد داروی انکپسوله شده برای داروی نانولیپوزومه ی پگیله ۶۴/۲۱۲±۰/۱۷۳ به دست آمد.

بررسی رهایش دارو

مقدار هیدروکسی اوره ی آزاد شده از فرمولاسیون دارویی نانولیپوزومه ی پگیله در بافر PBS طی بازه های زمانی مختلف با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد. مقدار داروی آزاد شده از فرمولاسیون هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده و پگیله ۲۱/۷۱٪ شد.



شکل ۱: الگوی رهایش هیدروکسی اوره نانولیپوزومه و پگیله شده در بافر PBS

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون ها در غلظت های مختلف به کمک روش MTT بررسی شد که نتایج در شکل ۲ آورده شده است.

نمودار۲: مقادیر IC۵۰ برای فرمولاسیون هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه ی پگیله و داروی استاندار

بحث

همانطور که ثابت شده است، نانو حامل ها توانایی رساندن عوامل درمانی به سلول های هدف را با پتانسیلی که اساساً درمان سرطان را با افزایش تعداد عوامل موثر در درمان تغییر می دهد، را دارند (۶). نتایج دلگرم کننده ای از داروهای لیپوزومه شده در درمان و یا پیشگیری طیف وسیعی از بیماری ها، در حیوانات آزمایشگاهی و همچنین انسان ها، نشان می دهد که محصولاتی بر پایه ی لیپوزوم برای کاربردهای بالینی در آینده ی نه چندان دور تولید خواهد شد (۴). لیپوزوم ها توانایی عبور از موانع متعدد زیستی، حفاظت از دارو در مقابل تخریب، تحویل هدف دار دارو و آزادسازی محموله ی درمانی در یک دوز بهینه را دارند (۳،۹). تکنولوژی لیپوزوم پگیله شده یک رویکرد جدید برای بهبود خواص فارماکوکینتیکِ پروتئین های درمانی است. بر خلاف روش هایی مثل جهش زایی، پگیلاسون مستقیم، یا همجوشی به پروتئین حامل، تکنولوژی لیپوزوم پگیله توالی اسید آمینه ی یک پروتئین را تغییر نمی دهد و دلبستگی کووالانسی عامل های برقراری ثبات را ایجاد نمی کند (۱۰). لیپوزوم پگیله شده باعث تاخیر در آزاد سازی دارو می شود (۱). همچنین این فرمولاسیون، پیوستگیِ به سلول های سرطانی و جذب سلولی داروها را افزایش می دهد (۲). نتایج حاصل از بررسی میزان انکپسولاسیون دارو نشان داد که مقدار انکپسولاسیون۶۴/۲۱۲ است. از آنجا که اضافه کردن دارو پس از پگیله کردن لیپوزوم صورت گرفته است به نظر می رسد این مقدار به دلیل ممانعت PEG ۲۰۰۰ از نفوذ دارو، است. برای اینکه الگوی داروی آزاد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.4.13.5.4]

شده در زمان های مختلف مشخص شود از روش دیالیز استفاده کردیم. آزاد سازی هیدروکسی اوره از نانوذرات شامل فاز اولیه انتشار سریع و در ادامه ی آن فاز انتشار کند بود. بیشترین میزان رهایش دارو در ۲ ساعت اول رخ داد. اثر سایتوتوکسیک فرمولاسیون دارویی نانولیپوزومه و پگیله شده با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت و رده ی سلولی مورد استفاده MCF-۷ بود. در این آزمایش فرمولاسیون نانولیپوزومی پگیله شده ی فاقد دارو اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی MCF-۷ نشان نداد. نتایج نشان داد که داروی نانولیپوزومه ی پگیله مقدار IC۵۰ کمتری را نسبت به داروی استاندارد دارد که نشان دهنده ی اثر سمیت بالای فرمولاسیون تهیه شده است.

منابع

1. Cheong I, Zhou S. Tumor-Specific Liposomal Drug Release Mediated By Liposomase. Methods Enzymol. 2009; 465: 251-65.
2. 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.
3. G. Gregoriadis, Fate of Injected Liposomes: Observations on Entrapped Solute Retention, Vesicle Clearance and Tissue Distribution in vivo, in Liposomes as Drug Carrier: Recent Trends and Progress (Ed.G. Gregoriadis), Wiley, Chichester 1988, 3–18.
4. Guo J, Bourre L, Soden DM, O'Sullivan GC, O'Driscoll C. 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.
5. Mohanty C, Das M, Kanwar JR, Sahoo SK. Receptor Mediated Tumor Targeting: an Emerging Approach for Cancer Therapy. Curr Drug Deliv. 2011; 8(1):45-58.
6. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. Nat Nanotechnol. 2007; 2(12):751-60.
7. Riaz M, Liposomes Preparation Methods, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 1996; 19(1): 65-77.
8. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science. 1972; 175(4023): 720-31.
9. Yatuv R, Robinson M, Dayan-Tarshish I, Baru M. The Use of PEGylated Liposomes in the Development of Drug Delivery Applications for the Treatment of Hemophilia. Int J Nanomedicine. 2010; 5: 581-91.
10. Zaccaria E, Cozzani E, Parodi. Secondary Cutaneous Effects of Hydroxyurea: Possible Pathogenetic Mechanisms. Journal of dermatological treatment. 2006; 17: 176-178.
11. Bakker-Woudenberg IA, ten Kate MT, Guo L, Working P, Mouton JW. Ciprofloxacin in Polyethylene Glycol-Coated Liposomes: Efficacy in Rat Models of Acute or Chronic Pseudomonas Aeruginosa Infection. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(8):2575-81.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.4.13.5.4]