مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هشتم، پاییز ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تاثیر سیس پلاتین کپسوله شده در نانو حامل آرکئوزوم بر رشد و گسترش سلول های سرطان سینه در رده سلولی MCF-7

فاطمه باغی[۱]، علیرضا بزرگ نژاد*[۲]، عظیم اکبرزاده[۳]، مهدی ارجمند[۴]، بهنام راسخ[۵]

[۱] کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی – مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی – مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ،ایران
[۳] استاد، پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۴] دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران
[۵] مربی، گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در این پژوهش هدف رسیدن به میزان بالاتر پایداری و کشندگی داروی سیس پلاتین با به کار گیری فرآیند کپسوله کردن در نانو آرکئوزوم می باشد که با بررسی نتایج حاصل از تست های MTT بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 موفقیت این پژوهش اثبات می گردد.

مواد و روش ها: بعد از کشت رده سلولی MCF-7 در اتاق کشت، با انجام تست های MTT مربوطه میزان کشندگی داروی سیس پلاتین کپسوله شده با سیس پلاتین معمولی با یکدیگر مقایسه می شوند. اعداد خروجی از دستگاه الیزا ریدر میزان مرگ و میر سلول های سرطانی را نشان می دهند.

یافته ها: در طی انجام تست های MTT بر روی رده سلولی MCF-7 میزان اثر بخشی داروی سیس پلاتین کپسوله شده و معمولی با یکدیگر مقایسه شده و با بررسی نمودار های بدست آمده از اعداد خروجی الیزا ریدر به خوبی مشخص می گردد که پایداری و میزان کشندگی داروی بارگذاری شده به مراتب بیشتر از داروی معمولی است.

نتیجه گیری: از نانوآرکئوزوم برای کپسوله کردن سیس پلاتین استفاده می شود. این امر علاوه بر افزایش پایداری دارو باعث بالارفتن میزان کشندگی آن نیز می گردد. این مسئله با آزمایش بر روی سلول های سرطان سینه رده سلولی MCF-7 به خوبی نشان داده می شود.

کلمات کلیدی : سیس پلاتین، نانو آرکئوزوم، بارگذاری، تست MTT، رده سلولی MCF-7

مقدمه

سرطان یا چنگار بیماری ای است که در آن سلول‌های بدن در یک تومور بدخیم به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر می‌شوند و بافت‌های سالم را نابود می‌کنند. سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع است. این سرطان در صورتی که به موقع تشخیص داده شود به راحتی قابل درمان است. شیمی درمانی یک شیوه رایج در معالجه بیماری هاست که سلول‌ها و به خصوص سلول‌های میکروارگانیسم‌ها وسلول‌های سرطانی را با استفاده از داروهای شیمیای و مواد شیمیایی از بین می‌برد. یکی از رایج ترین داروهای شیمی درمانی سیس پلاتین می باشد که همان طوری که در کتاب آشنایی با سرطان پستان نیز بیان شده است در درمان سرطان سینه هم به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد. (۴) هدف اصلی پژوهش های انجام شده پیرامون درمان انواع سرطان بالا بردن ضریب تاثیر داروهای شیمی درمانی و افزایش پایداری این داروها در بدن بیماران می باشد. هرچه مدت زمان حضور دارو در بدن بیمار بیشتر باشد می توان با استفاده از دوز های کمتر دارو به میزان تاثیر مطلوب تر رسید، لذا همواره ایجاد روش هایی جهت افزایش پایداری دارو در بدن بیماران بسیار مورد توجه پزشکان و پژوهشگران بوده است. یکی از موثرترین روش های به کار

آدرس نویسنده مسئول: گروه مهندسی شیمی – مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ،ایران
Email: Abnejad62@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله:۹۰/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش:۹۱/۴/۳۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-24]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.8.7]

گرفته شده جهت افزایش پایداری دارو و بالا بردن ضریب تاثیر آن در بدن کپسوله کردن دارو می باشد.کپسوله کردن علاوه بر حفظ دارو در مقابل صدمات ناشی از تاثیرات مواد شیمیایی و تغییرات pH می تواند به طور چشمگیری باعث پایداری بیشتر دارو شده که این امر موجب چند برابر شدن اثر بخشی دارو در بدن بیمار می شود.طبق اظهار نظر محمد رضا مظفری و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از رایج ترین روش های کپسوله کردن دارو، بارگذاری آن بر روی انواع حامل ها می باشد (۳). دارو درون حامل ها کپسوله شده و علاوه بر مصون ماندن از صدمات فیزیکی و شیمیایی و تاثیرات ناشی از تغییرات pH، پایداری و اثر بخشی آن به طور مطلوبی افزایش می یابد. با استفاده از فناوری نانو نسل جدیدی از حامل ها در فرآیند کپسوله کردن داروهای شیمی درمانی به کار گرفته شده اند. نانو حامل آرکئوزوم از جمله جدیدترین و کاربردی ترین حامل های دارویی می باشد. بعد از تولید نانو آرکئوزوم و بارگذاری داروی سیس پلاتین بر روی آن که توسط علیرضا بزرگ نژاد و همکارانش در سال ۱۳۹۰ انجام پذیرفت (۱)، برای مقایسه میزان اثر بخشی داروی کپسوله شده با داروی معمولی یک رده سلولی سرطان سینه انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفت. طبق تحقیقات انجام شده توسط نرگس بوذری و همکارانش در سال ۱۳۸۶ سرطان سینه از رایج ترین سرطان های موجود در ایران است (۲). رده سلولی سرطان سینه MCF-7 به دلیل تهاجمی بودن و قابلیت چسبیده شدن به کف فلاسک از جمله رده های سلولی مناسب جهت انجام آزمایشات مختلف در نظر گرفته می شود.

مواد و روش ها

کشت سلولی

جهت انجام آزمایشات در ردهٔ سلولی و بررسی اثر دارو و داروی کپسوله شده بر روی سلول‌های سرطانی یک واحد از ردهٔ سلولی سرطان سینه MCF-7 مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت سلولی طبق روش به کار گرفته شده توسط لیو ژن و همکارانش در سال ۲۰۱۱ محیط کشت RPMI 1640 استفاده شد (۱۱). سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۲ میلی مولار گلوتامین، ۲ گرم در لیتر بی کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین در انکوباتور CO2 باشرایط۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد هوای مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

دفریز کردن و کشت اولیه سلول

میکروتیوب حاوی رده سلولی MCF-7 موجود در فریزر 70- پس از خارج شدن از فریزر حدود ۱۰ دقیقه به دمای محیط رسیدند. برای تعیین میزان سلول‌های زنده و سالم بودن نمونه مقدار کمی از آن را روی لام نئوبار ریخته و پس از رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ شمارش شدند. در این مرحله با استفاده از پیپت پاستور در طی چند مرحله حدود ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت (حاوی ۹۰ درصد RPMI1640 و ۱۰ درصد FBS) اضافه شود و پس از چند بار پیپتاژ کردن، مخلوط توسط پیپت پاستور به داخل یک فلاسک منتقل گردید. فلاسک داخل انکوبارتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵% قرار داده شد. ادامه فرآیند طبق روش محمد الروبی در سال ۲۰۰۹ (۵) که حاصل تجربیات وی از کار کردن با رده های سلولی متفاوت می باشد، پیش می رفت. به دلیل اینکه سلول ها بسیار حساس هستند، پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت محیط کشت یک بار دیگر تعویض می شد. در این مرحله نیز از ۱۵ درصد FBS برای کمک به رشد بهتر سلول ها استفاده می‌شد. پس از گذشت چند روز از آنجا که سلول‌های سرطان سینه MCF-7 چسبنده هستند به تدریج به کف فلاسک چسبیده و کلونی‌های کوچکی تشکیل دادند. با توجه به تعداد سلول ها و روند رشد آن ها و استفاده از مواد غذایی موجود در محیط کشت رنگ محیط کشت از رنگ قرمز کمرنگ به تدریج به سمت زرد تغییر کرد که نشان دهنده مصرف مواد غذایی می‌باشد. با کنترل مرتب فلاسک هر زمان که محیط کشت ضعیف می شد از محیط کشت جدید استفاده می شد. این کار آن قدر ادامه پیدا کرد تا تمام کف فلاسک از سلول های MCF-7 پوشیده شد. در این زمان تراکم سلول های کشت داده شده به حدود ۸۵ درصد رسید که میزان کشت مطلوب برای ما به شمار می رفت.

پاساژ دادن و تقسیم فلاسک‌ها

پاساژ دادن سلول ها با روش ذکر شده توسط جان مسترز و همکارش که در سال ۲۰۰۰ شرح داده اند، انجام می گرفت (۲). به این صورت که پس از اینکه تمام سطح کف فلاسک از سلول پر شد به منظور افزایش تعداد سلول‌ها، حذف شود به چند فلاسک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.8.7]

تقسیم شدند. برای این کار ابتدا محیط روی سلول‌ها خارج شده و با PBS شستشو داده شد تا تمام محیط کشت و FBS خارج شود و بعد به آن ها 1ml تریپسین اضافه شد تا خاصیت چسبندگی سلول‌ها از بین رفته و از کف فلاسک جدا شوند. بعد از حدود ۴ تا ۵ دقیقه حدود ۵ تا ۱۰ میلی‌متر از محیط کشت طی چند مرحله به فلاسک اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن، سلول ها به داخل یک فالکن منتقل شده و سانتریفیوژ شدند (با دور ۱۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه). بعد از سانتریفیوژ. مایع رویی با دقت دور ریخته شده و به سلول‌ها محیط کشت اضافه شد . سلول ها به دو قسمت تقسیم شده و در دو فلاسک جدید ریخته شدند و در صورت نیاز مجدداً محیط کشت حاوی FBS به آن ها اضافه شد و مجدداً داخل آنکوباتور با CO_2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

بررسی تاثیر سیس پلاتین کپسوله شده بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 در قالب تست MTT

یکی از فلاسک های موجود در انکوباتور انتخاب شده و پس از خارج کردن محیط کشت روی سلول ها یک پی‌پت پاستور تریپسین به آن اضافه می شد. پس از حدود ۳ دقیقه محتویات درون فلاسک به یک فالکون منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه و با دور 1100rpm سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی فالکون خارج شده و رسوب های به جا مانده در حقیقت سلول های MCF-7 هستند. سپس ۷.۵ میلی لیتر محیط کشت به آن اضافه شده و به خوبی پی پتاژ گردید. برای انجام تست MTT به روش سیتاراما ساتیانارایاناجویز که در سال ۲۰۱۱ به کار گرفته شده است (۸)، از یک پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. دورتادور پلیت خالی گذاشته شده و در وسط در هر کدام از چاهک های پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول موجود در فالکون (شامل MCF-7 و محیط کشت) ریخته شده و پلیت برای حدود ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. در ادامه برای ساخت غلظت های متفاوت از داروی کپسوله شده نیاز به یک پلیت ۲۴ خانه می باشد. در خانه یکم پلیت ۲۴ خانه ۱ میلی لیتر از نانو آرکئوزوم حامل دارو و در خانه دهم ۱ میلی لیتر محیط کشت ریخته می شود و در خانه‌های ۲ تا ۹ در هر کدام ۰.۵ ml محیط کشت ریخته سپس ۰.۵ml از خانه ۱ برداشته و به خانه ۲ منتقل گردیده و پس از پی‌پتاژ کردن، ۰.۵ml از خانه ۲ برداشته و به خانه ۳ اضافه گردید و این فرآیند تا خانه ۹ ادامه یافت. در حقیقت از رقیق سازی سری[1] استفاده شد. مایع رویی سلول های موجود در پلیت ۹۶ خانه که روز قبل در انکوبار گذاشته شده بود، با سمپلر خارج شد. در دو ردیف اول پلیت فقط محیط کشت ریخته می شود که به عنوان سلول های شاهد در نظر گرفته شدند. در هر چاهک موجود در دو ردیف دوم پلیت ۹۶ خانه ای ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق سازی شده سیس پلاتین که در پلیت ۲۴ خانه ای تهیه شده به صورت نظیر به نظیر ریخته می شود و به همین ترتیب در دو ردیف سوم پلیت ۹۶ خانه ای محلول رقیق سازی شده نانو آرکئوزوم حامل دارو ریخته شد. سپس پلیت ۹۶ خانه ای برای مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مایع رویی چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای خارج شد و به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر محلول MTT شامل ۰.۵ میلی گرم MTT در ۱ میلی لیتر بافر فسفات اضافه شده و پلیت برای مدت ۴ ساعت مجددا درون انکوباتور قرار داده شد. بعد از خارج کردن مایع رویی موجود در هر چاهک، به هر چاهک (تعداد ۶۰ چاهک مورد آزمایش قرار گرفتند) ۱۰۰میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. پلیت در دمای محیط حدود ۲۰ دقیقه به صورت آهسته تکان داده شد و همزمان محلول درون چاهک ها پیپتاژ گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه محلول موجود در هر چاهک به صورت کاملا یکنواخت در آمد. سپس پلیت ۹۶ خانه جهت انجام تست MTT درون دستگاه الیزا ریدر قرار داده شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده از دستگاه الیزا ریدر به صورت اعدادی هستند که در واقع شدت نور جذب شده در غلظت های موجود در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه می باشند. برای تخمین تعداد سلول های زنده موجود در هر چاهک میزان جذب نوری خوانده شده در مرحله ای که هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حدود ۸۰۰۰ سلول دربر داشته برابر است با:

Absorbance = 0.963

1- Serial Dilution

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-24]

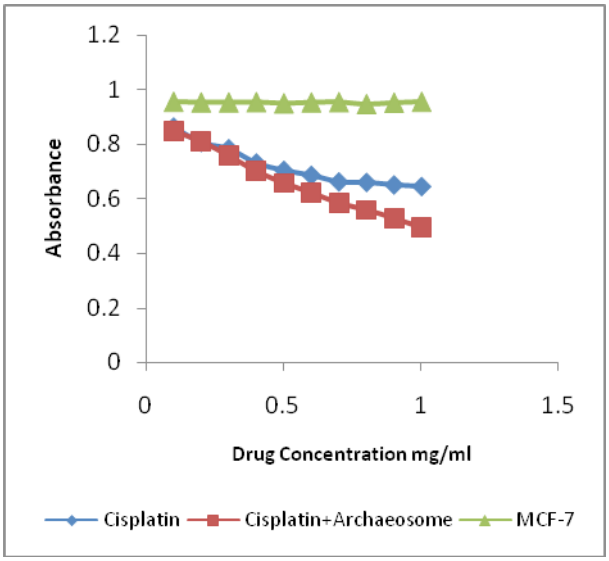
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.8.7]

این عدد در واقع به عنوان معیار برای تعیین تعداد سلول های زنده در هر چاهک در نظر گرفته می شود و شدت نور جذب شده در مراحل بعدی تست با توجه به این عدد، به تعداد سلول های زنده در هر چاهک نسبت داده می شود. این روش تخمین تعداد سلول های زنده توسط الن دویلی در سال ۱۹۹۸ بیان شده است (۶). به عنوان مثال اگر عدد خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر ۰,۸۱۲ باشد، تعداد سلول های زنده در چاهک مورد نظر با تقریب بسیار خوبی برابر خواهد بود با :

$$x = 8000 * \frac{0.812}{0.963} = 6746\ cell$$

$$x = 8000 * \frac{0.812}{0.963} = 6746\ cell$$

از آنجایی که شدت نور جذب شده با تعداد سلول های زنده موجود در هر چاهک نسبت مستقیم دارد، می توان نموداری بر حسب دوز داروی مصرفی و شدت نور جذب شده (تعداد سلول های زنده) رسم نمود.



نمودار ۱- شدت جذب نور بر حسب غلظت دارو.

با توجه به نمودار که حاصل نتایج بدست آمده از دستگاه الیزا ریدر می باشد، می توان به اثر بخشی بیشتر سیس پلاتین کپسوله شده نسبت به سیس پلاتین معمولی پی برد.

بحث

بیشتر از یک دهه است که نشان داده شده آرکئوزوم ها می توانند در نقش یک نانو سیستم برای آزادسازی داروها و واکسن ها به کارگرفته شوند. خصوصیات ساختاری لیپیدهای قطبی آرکیا، اجازه تهیه فرمولاسیون های آرکئوزومی پایدار را در غیاب احتیاط معمول مانند حفاظت در مقابل هوا جهت اجتناب از اکسیداسیون که برای فرمولاسیون های لیپوزومی استری نیاز است می دهد. آرکئوزوم ها به دلیل اینکه از لیپیدهای دو قطبی آرکیا که از غشای سلول عبور می کنند ساخته شده اند، دارای امتیازهای قابل توجهی نسبت به سایر حامل های رایج هستند و پایداری فیزیکوشیمیایی بیشتری از قبیل : پایداری حرارتی پایداری در سرم، پایداری در pH های خیلی بالا و خیلی پایین، مقاومت به استرس های اکسیداتیو، مقاومت در مقابل فسفولیپازها و نمک های صفراوی و اثرات درمانی و پیشگیری در مقابل توسعه سرطان دارند. در این تحقیق به افزایش حدود ۲۴٪ بازدهی عملکرد داروی سیس پلاتین کپسوله شده در نانو آرکئوزوم دست یافته شد که این امر نشان از نقش بسیار مهم و کلیدی این نانو حامل دارد. این نتیجه نسبت به سایر نتایج به دست آمده در فرآیندهای کپسوله کردن با حامل های دیگر از جمله فسفاتیدیل اتانول امین که توسط هووانگ تیسانگ لانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام پذیرفته است (۹) و یا لیپوزوم که توسط پتر ورکینگ و همکارانش در سال ۱۹۹۸ انجام شده است که به ترتیب افزایش ۱۹٪ و ۱۵٪ در عملکرد داروی سیس پلاتین را در پی داشتند (۱۰)، بسیار مطلوب بوده و بیانگر این مطلب است که نانوحامل آرکئوزوم می تواند در افزایش بازدهی عملکرد داروی سیس پلاتین و در نتیجه درمان بیماری سرطان نقش بسیار موثر و مفیدی ایفا کند.

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است که بدین وسیله از زحمات و مساعدت های مسئولین بخش پایلوت انستیتو پاستور ایران سپاسگزاری می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.8.7]

منابع

(۱) بزرگ نژاد ع، باغی ف، اکبرزاده ع، ارجمند م. نانوحاملی برگرفته از آرکی باکتر ها تحت عنوان آرکئوزوم و بررسی بارگذاری داروی سیس پلاتین بر روی آن. تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی . ۱۳۹۰ ؛ شماره پنجم : ۱۳-۹ .

(۲) بوذری ن، بوذری ن ، عطری م ، زندگی با سرطان سینه . اول مذاکره ، ۱۳۸۶ ، ۳۴- ۱۸

(۳) مظفری م، خسروی ک. نانو مواد و نانو سامانه ها برای کاربرد های زیست پزشکی. اول اسپرینگر. ۲۰۰۶؛۱۹۰-۵۸.

(۴) مودی م، شریفی راد غ، مصطفوی ف. آشنایی با سرطان پستان. اول دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۱۳۹۰.؛ ۴۸-۲۱

(5) Al-Rubeai M,Selection Methods for High-Producing Mammalian Cell Lines,Cell Line Development (Cell Engineering),First Edition, Dublin, Springer127-153;2009.

(6) Doyle A, Griffiths J B, Cell Quantification, Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures in Biotechnology, First Edition,Toronto,Wiley.1998;53-64

(7) Masters J, Palsson B, Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines, Cancer Cell Line (Human Cell Culture), Third Edition, New York, Springer.2000;1-19

(8) Satyanarayanajois S, Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability Drug Design and Discovery Methods and Protocols, First Edition, New York, Humana Press. 2011;157-168

(9) Tsong-Long H, Woan-Ruoh L, Shu-Chiou H, Jia-You F. Cisplatin Encapsulated in Phosphatidyl Ethanolamine Liposomes Enhances the In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Intratumor Drug Accumulation Against Melanomas. J Dermatol Sci.2007; 46:11-20

(10) Working P K, Newman M S, Sullivan T, Brunner M, Podell M, Sahenk Z, Turner N. Comparative Intravenous Toxicity of Cisplatin Solution and Cisplatin Encapsulated in Long-Circulating Pegylated Liposomes in Cynomolgus Monkeys. J Toxicol Sci. 1998; 46:155-165

(11) Zhen-zhen L, Ping C, Zhen-Duo L, Shu-de C, Zi-ming D. Enrichment of Breast Cancer Stem Cells Using a Keratinocyte Serum-Free Medium. Chin Med J. 2011;124:2934-2936

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.8.7]