مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

دارو رسانی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه و پگیله شده به رده ی سلولی سرطان سینه

مائده کوهی مفتخری اصفهانی[۱]، سید ابراهیم علوی[۲*]، عظیم اکبرزاده[۳]

[۱]کارشناسی ارشد، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، پایلوت
[۲]کارشناسی ارشد، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، پایلوت
[۳]پرفسور، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، پایلوت

چکیده

سابقه و هدف: در دهه های گذشته تحقیقات گشترده ای در زمینه ی فرمولاسیون های جدید دارویی صورت گرفته است. نانولیپوزم های پگیله به عنوان حامل های موثر دارو و یک وسیله ی نقلیه برای تحویل دارو مورد استفاده قرار گرفته اند. هدف از این مطالعه بررسی عملکرد پلی اتیلن گلایکول در ساختار لیپوزوم ها است.

مواد و روش ها: برای تهیه پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده نسبت های مشخصی از فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ و پاکلی تاکسل را با یکدیگر ترکیب نمودیم. با استفاده از دستگاه زتاسایزر میانگین قطر پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده بدست آمد. بازده محصورسازی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله با استفاده از منحنی استاندارد پاکلی تاکسل بدست آمد. با استفاده از روش دیالیز میزان رهایش دارو طی ۲۸ ساعت محاسبه گردید. همچنین اثر سایتوتوکسیسیتی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله با روش MTT ارزیابی شد.

یافته ها: قطر ذرات در ابعاد نانو تایید شد. بازده انکپسولاسیون و درصد رهایش پاکلی تاکسل از فرمولاسیون تهیه شده به ترتیب ۶/۳±۹۵/۲ و ۵/۰۲ درصد بدست آمد. نتایج نشان دهنده افزایش سمیت در فرمولاسیون تهیه شده، بود.

نتیجه گیری: پلی اتیلن گلیکول باعث پایداری بیشتر و رهایش کندتر دارو می شود.

کلمات کلیدی: پلی اتیلن گلایکول، لیپوزوم، پاکلی تاکسل، نانو

مقدمه

امروزه پیشرفت بسیاری در زمینه نانو دارورسانی هدفمند داشته ایم. به دلیل متنوع بودن خواص فیزیکی و شیمیایی داروهای متنوع، نیازمند به یک سیستم هوشمند می باشیم. به منظور افزایش شاخص درمانی، افزایش غلظت دارو در سلول های توموری و کاهش قرار گرفتن در معرض بافت‌های طبیعی که نتیجه ی آن کاهش عوارض جانبی است، از سیستم دارورسانی استفاده می شود. فن آوری نانو یکی از روش های مدرن و موفق در دارورسانی می باشد. این فن آوری انقلابی را در تشخیص و درمان بیماری ها به وجود آورده است. نانو لیپوزوم ها به عنوان حامل های دارو استفاده می شوند. یعنی دارو داخل یک غشا قرار می گیرد (۸). لیپوزوم ها از یک یا چند لایه ی چربی متحدالمرکز تشکیل شده اند که متشکل از محفظه های چربی و آبی که چربی در بین دو لایه لیپیدی می باشد (۵،۶). لیپوزوم ها دارو را درمقابل تخریب حفاظت می کنند و بیمار را در مقابل عوارض جانبی دارو محافظت می نمایند. این نانو حامل با وجود کارایی بسیاری که دارد در بدن از پایداری خوبی برخوردار نیست (۹،۱۱). پلی اتیلن گلایکول در پایداری بیشتر دارو در بدن به ما کمک می کند (۳). سرطان سینه از نوع سرطان بافت پستان می باشد که در بین زنان بیشترین شیوع را دارد (۴). از روش های درمانی رایج در درمان این بیماری جراحی، رادیو تراپی و شیمی درمانی را می توان نام ببریم که پیشرفت های قابل ملاحظه ای را در درمان سرطان پستان ایجاد کرده اند. پاکلی تاکسل از داروهای بسیار موثر در درمان سرطان سینه به روش شیمی درمانی می باشد. این دارو در دراز مدت عوارض

آدرس نویسنده مسئول : تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، پایلوت
Email :s.ebrahimalavi@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۱/۲۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.5.0]

سوئی را در بیماران بوجود می آورد (۱،۲). از این رو استفاده از نانوحامل ها به منظور بهبود کارایی و الگوی سمیت پاکلی تاکسل به نظر امیدبخش می رسد. استفاده از فن آوری نانولیپوزومی و پگیله می تواند گامی موثر در کاهش عوارض جانبی این دارو ها باشد. در این مطالعه میزان سمیت پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده با نمونه ی استاندارد آن مقایسه شد.

مواد و روش ها

فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰، پاکلی تاکسل و محلول MTT [۱](۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از شرکت سیگما[۲] خریداری شد. اتانول و ایزوپروپانول از شرکت مرک[۳] و محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از شرکت اینویتروژن[۴] خریداری و همچنین سلول MCF-۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

ساخت نانولیپوزوم پگیله شده ی دارو

مقادیر مشخصی از فسفاتیدیل کولین، کلسترول و پلی اتیلن گلایکول (PEG ۲۰۰۰) 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 به سوسپانسیون اضافه شد و با کمک همزن مغناطیسی مخلوط گردید (دمای محیط، ۳۰ دقیقه، ۳۰۰ دور بر دقیقه). در ادامه فاز حلال، به کمک روتاری اواپوراتور[۵] (شرکت Heidolph آلمان) تبخیر شد و ژلوز حاصله در ۱۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید. سپس فرمولاسیون تهیه شده، به مدت ۵ دقیقه سونیکه (Bandelin Sonorex Digitec، ۶۰ هرتز) گردید.

تعیین اندازه نانو لیپوزوم پگیله شده

با استفاده از دستگاه زتا سایزر[۶] (Malvern Instruments Ltd) میانگین قطر نانولیپوزوم های پگیله، سنجیده شد.

میزان محصورسازی دارو

برای بررسی میزان داروی محصور شده در فرمولاسیون تهیه شده، حجمی از محلول به دست آمده با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس با روش اسپکتروفوتومتری جذب نوری محلول رویی در طول موج ۲۲۷ نانومتر سنجیده شد. پس از آن با استفاده از فرمول زیر بازده بارگذاری محاسبه گردید.

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

جهت رسم منحنی استاندارد غلظت های متفاوتی را از پاکلی تاکسل تهیه و مقدار جذب با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۲۷ نانومتر سنجیده شد.

میزان رهایش دارو

برای بررسی الگوی آزاد شدن دارو از نانولیپوزوم های پگیله شده، مقدار ۱ میلی گرم از فرمولاسیون تهیه شده، در داخل کیسه دیالیز ریخته و آن را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین با pH ۷.۴ گذاشته و در نهایت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد). سپس میزان داروی آزاد شده در بافر PBS به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۲۷ نانومتر اندازه گیری و درصد رهایش دارو با استفاده از منحنی استاندارد دارو به دست آمد.

بررسی اثر کشندگی دارو

پس از کشت رده سلولی MCF۷ در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول بود در چاهک های ۹۶ خانه ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت CO_2 ٪۵ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها را حذف کرده و غلظت های مختلفی از فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده (۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و کنترل آن، بر روی سلول ها ریخته شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مذکور انکوبه شد. پس از آن محلول رویی را بیرون ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه گردید 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(اسپکتروفوتومترمدل Power Eave XS) ومیزان IC۵۰ با استفاده از برنامه pharm محاسبه گردید.

نتیجه گیری

تعیین اندازه نانو ذره ی لیپوزومه ی پگیله شده

۱(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
۲ Sigma
۳Merck
٤Invitrogen
٥Rotary evaporator
٦Zeta sizer

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.5.0]

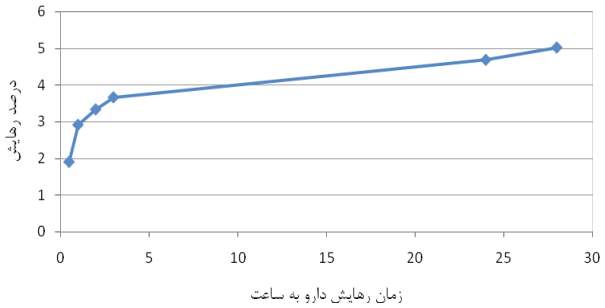
میانگین قطر برای نانو ذره ی لیپوزومه ی پگیله شده ۳۶۹/۱ نانومتر بدست آمد.

میزان محصورسازی دارو

بازده محصورسازی با توجه به منحنی استاندارد پاکلی تاکسل محاسبه گردید. با توجه به فرمول بازده محصورسازی، مقدار داروی محصور نشده بدست آمد، که با کم کردن از مقدار داروی اولیه درصد داروی محصور شده ۶/۳±۹۵/۲ درصد گزارش شد.

میزان رهایش دارو

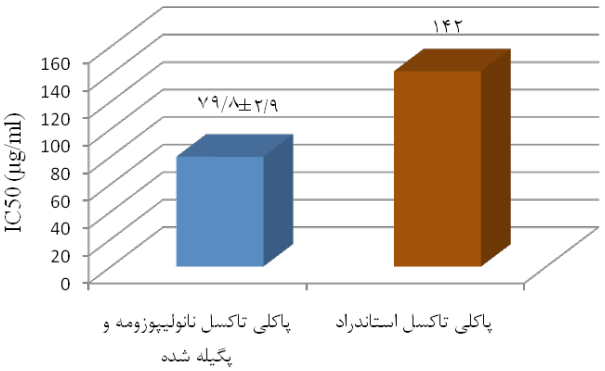
با استفاده از منحنی استاندارد پاکلی تاکسل، مقدار داروی آزاد شده از فرمولاسیون پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله در بافر PBS طی بازه های زمانی ۳۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۲۴ ساعت، ۲۸ ساعت به دست آمد. مقدار پاکلی تاکسل آزاد شده در بافر PBS در پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده ۵/۰۲ درصد شد.



شکل ۱: بررسی رهایش داروی پاکلی تاکسل از فرمولاسیون دارویی لیپوزومه و پگیله شده در بافر PBS

بررسی سمیت دارو

میزان سمیت دارو در غلظت های مختلف بر اساس تکنیک MTT بررسی شد و نتایج در شکل ۲ آورده شده است.



شکل۲: مقایسه مقدار IC۵۰ بین فرمولاسیون نانولیپوزومه ی پگیله و نمونه ی استاندارد

بحث

دارورسانی یکی از چالش های اصلی بیوتکنولوژی دارویی است. ثابت شده است که نانوحامل ها توانایی رساندن داروها را به سلول های هدف را دارند. از مشکلاتی که در درمان بیماران با آن روبرو هستیم، ناتوانی در رساندن غلظت های درمانی دارو به بافت های هدف و یا اثرات سمی و شدید داروها بر روی عضوها و بافت های معمولی می باشد. نانوحامل های لیپیدی زیست سازگار هستند و در شرایط In vivo سمی نیستند. استفاده از این نانوحامل ها نه تنها باعث افزایش ماندگاری دارو در جریان خون می شود بلکه اثر سایتوتوکسیسیتی دارو را بر روی سلول های غیر هدف کاهش می دهد. در مطالعه ی کنونی اثر سمیت داروی پاکلی تاکسل نانولیپوزومه ی پگیله شده بر روی رده ی سلولی MCF-۷ مورد بررسی قرار گرفت.پس از ساخت لیپوزوم با استفاده از دستگاه زتاسایزر میانگین قطر فرمولاسیون نانولیپوزومه ی پگیله اندازه گیری شد. چون پلی اتیلن گلایکول ماهیت آبدوستی و نفوذ پذیری بالایی دارد، به لایه های لیپوزمی نفوذ می کند و آن ها را به هم فشرده می سازد، بنابراین نانوذرات با اندازه ی کوچکتری نسبت به نانوذراتی که در ساختارشان فقط لیپوزوم قرار دارد، تشکیل می دهد (۷). نتایج حاصل از بررسی میزان محصورسازی پاکلی تاکسل نشان داد که مقدار قابل توجهی از دارو محصور شده است. از آنجا که پلی اتیلن گلایکول، نانولیپوزوم محتوی پاکلی تاکسل را می پوشاند، خروج دارو را کندتر کرده و باعث می شود ماندگاری دارو بیشتر شود. به همین دلیل رهایش دارو از فرمولاسیون تهیه شده به کندی صورت می گیرد (۷). اثر سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون تهیه شده با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش فرمولاسیون نانو لیپوزومی پگیله فاقد دارو اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی MCF-۷ نشان نداد. نتایج نشان داد که پاکلی تاکسل نانو لیپوزومه ی پگیله اثر کشندگی بالاتری نسبت به فرم استاندارد دارو دارد. به نظر می رسد علت این پدیده ناشی از تاثیر پلی اتیلن گلیکول در پایداری بیشتر و رهایش کندتر دارو در فرمولاسیون لیپوزومی پگیله باشد. همچنین پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش حلالیت دارو و برخورد بیشتر آن با سلول هدف می شود (۱۰،۱۲).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.5.0]

منابع

1. Abal M, Andreu JM, Barasoain I. Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. Curr Cancer Drug Targets. 2003; 3(3): 193- 203.
2. Bakker-Woudenberg IA, ten Kate MT, Guo L, Working P, Mouton JW. Improved Efficacy of Ciprofloxacin Administered in Polyethylene Glycol-Coated Liposomes for Treatment of Klebsiella Pneumoniae Pneumonia in Rats. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(5):1487-92.
3. Barbeau J, Cammas-Marion S, Auvray P, Benvegnu T. Preparation and Characterization of Stealth Archaeosomes Based on a Synthetic PEGylated Archaeal Tetraether Lipid. J Drug Deliv. 2011; 2011:396068.
4. Dorr RT. Pharmacology and Toxicology of Cremophor EL Diluent. Ann Pharmacother. 1994; 28(5 Suppl): S11-Gabizon AA: Stealth Liposomes and Tumor Targeting: a Step Further in the Quest for the Magic Bullet. Clin Cancer Res. 2001; 7: 223-25.
5. Latif N, Bachhawat BM. Liposomes in Immunology. J. Biosci., Vol. 6, Number 4, 1984; 491– 502.
6. Li Z, Chen J, Sun W, Xu Y. Investigation of Archaeosomes as Carriers for Oral Delivery of Peptides. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 2; 394(2): 412- 7.
7. Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. Developments in Liposomal Drug Delivery Systems. Expert Opin Biol Ther. 2001; 1(6): 923- 47.
8. Purwaningsih EH, Schubert R. The Preparation of Liposomes Derived from Mixed Micelles of Lecithin Added by Sodium Cholate, Followed by Dialysing Using Hemoflow High Flux F60S. Makara Keshatan. 2004; 8(2): 49-52.
9. Sariego J. Breast Cancer in the Young Patient. Am Surg. 2010; 76(12): 1397-400.
10. 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.
11. Zalipsky S, Brandeis E, Newman MS, Woodle MC: Long Circulating, Cationic Liposomes Containing Amino-PEG-Phosphatidylethanolamine. FEBS Lett. 1994; 53: 71-4.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.5.0]