

بررسی اثر سیس پلاتین نانونیوزومه شده بر رده سلولی سرطان مغز C6

ماهرخ بابایی^۱، عظیم اکبرزاده^{۲*}، مهدی ارجمند^۳، علی اکبر سیف کردی^۱

۱. گروه مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲. بخش بیوتکنولوژی، پایلوت، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از نانو حامل ها در صنعت نانو دارو رسانی افزایش پیدا کرده است. نیوزوم یکی از نانوحامل ها با سورفاکتانت غیریونی است که باعث افزایش پایداری دارو در بدن می شود. با توجه به این که استفاده از داروی سیس پلاتین در درمان انواع سرطان ها با عوارض جانبی همراه است، از این رو با استفاده از فناوری نانو، نیوزومه شد.

مواد و روش ها: برای ساخت نیوزوم از اسپن ۶۰ و کلسترول استفاده شد. میانگین قطر ذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر اندازه گیری شد. بازده انکپسولاسیون و درصد رهائش دارو با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون نیز به کمک روش MTT بر روی رده سلولی C6 بررسی شد.

یافته ها: میانگین قطر ذرات در ابعاد نانو تایید شد. بازده انکپسولاسیون و درصد رهائش دارو در مدت زمان ۴۸ ساعت به ترتیب ۴۳/۶٪ و ۹۷٪ به دست آمد. میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون سیس پلاتین نانونیوزومه شده $38/6 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

بحث: نتایج نشان داد سمیت فرمولاسیون سیس پلاتین نیوزومه نسبت به فرم استاندارد دارو بر روی رده سلولی C6 برخوردار بوده است.

نتیجه گیری: بررسی ها نشان داد، برای کاهش اثرات جانبی داروی سیس پلاتین و افزایش سمیت آن می توان از فرمولاسیون نانونیوزومی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: دارو رسانی، سیس پلاتین، نیوزوم، MTT، C6

مقدمه

ویژگی های مواد و هم چنین ساخت نانو ساختارها قادر به ارائه بهتری از سیستم های دارو رسانی برای مدیریت و درمان بهتر بیماری ها است (۱۲،۱۶). سرطان از بیماری های خطرناکی است که سالانه جان بسیاری از انسان ها را می گیرد و سرطان مغز از بیماری های مهلک به شمار می رود. بهترین فاکتور شناخته شده برای ایجاد سرطان مغز و نخاع، مجاورت با اشعه های یونیزه کننده که به طور معمول انواعی از درمان با اشعه است می باشد (۱). روش های درمانی برای سرطان مغز جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی می باشد (۳،۹،۱۳). سیس پلاتین از داروهای شیمی درمانی مورد استفاده در درمان انواع مختلفی از سرطان ها و یک عامل ضد تومور می باشد (۲). مکانیسم عمل سیس پلاتین بدین

امروزه فناوری نانو تحول شگرفی را در علوم مختلف به ویژه در صنعت پزشکی ایجاد کرده است. با کمک این فناوری، بسیاری از درمان های زمان بر و پرهزینه به درمان های سریع تر و ارزان تر توسعه یافته اند. از کاربردهای مهم فناوری نانو دارو رسانی هدفمند بودن آنها می باشد. این فناوری با دست کاری

نویسنده مسئول : تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، پایلوت
پست الکترونیکی: azimakbarzadeh1326@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۵

تعیین بازده انکپسولاسیون

جهت بررسی مقدار سیس پلاتین انکپسوله شده، یک میلی لیتر حاوی ۰/۵ میلی گرم دارو از فرمولاسیون دارویی نانونیوزومه شده سانتیفریوژ شد (۳۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد، ۲۱۰۰۰ rpm). جذب نوری محلول رویی فرمولاسیون در طول موج ۳۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV - 1601PC شرکت SHIMADZU) اندازه گیری شد. پس از آن با استفاده از فرمول زیر بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید (۱۵).

$$100 \times \text{کل دارو} / \text{داروی انکپسوله شده} = \text{درصد بازده انکپسولاسیون}$$

بررسی رهایش دارو در محیط آزمایشگاهی

برای بررسی الگوی آزاد شدن سیس پلاتین از نانونیوزوم ها، ۱ میلی لیتر حاوی ۰/۵ میلی گرم از فرمولاسیون تهیه شده، در داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات سالین با pH 7.4 درحالی که بر روی مگنتیک استایر قرار داشت، قرار داده شد (۳۷ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ rpm). سیس میزان داروی آزاد شده در بافر PBS در بازه ای زمانی مختلف، طی ۴۸ ساعت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۰۰ نانومتر اندازه گیری و درصد رهایش سیس پلاتین با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد (۱۱).

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

صد میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰۰۰۰ سلول C6 را در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت ۵٪ CO₂ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها را برداشته و غلظت های مختلف از فرمولاسیون سیس پلاتین نانونیوزومه شده و کنترل آن بر روی سلول ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه شد. سیس محلول رویی را برداشته و محلول (MTT 0.5 mg/ml) اضافه شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون رنگ ارغوانی (مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول های زنده در ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول حل گردید. جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری (دستگاه الایزا ریدر BioTek Instruments, VT, U.S.A. و میزان IC50 با استفاده از برنامه ی Pharm محاسبه گردید (۱۰)).

یافته ها

تعیین اندازه نانوذرات

میانگین قطر نیوزوم ها، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای آن ها به ترتیب ۲۴۲ نانومتر، ۰/۲۴۲ و ۲۳/۴ - میلی ولت به دست آمد.

گونه است که با آلکیل کردن DNA مانند سایر عوامل آلکیل کننده یک گروه آلکیل (C_nH_{2n+1}) را به مولکول DNA پیوند می دهد و با این روش مانع همانند سازی DNA می شود (۶،۱۴،۱۸).

استفاده از این دارو علاوه بر خواص درمانی، عوارض جانبی نیز دارد. نوتروپنی، ترمبوسیتوپنی، سمیت کلیوی، افزایش اسید اوریک خون، اشکال شنوایی، از دست دادن حس چشایی، کاهش غلظت کلسیم و منیزیم خون از عوارض جانبی است که در بیماران تحت درمان سیس پلاتین در دراز مدت مشاهده شده است (۸). به همین دلیل روش های مختلفی برای کاهش عوارض جانبی و افزایش راندمان درمان به کار گرفته شده است. فناوری نانو دارو رسانی لیپیدی یکی از روش های مدرن و موفق در این زمینه می باشد. نیوزوم ها یکی از نانوحامل های لیپیدی می باشد که زیست سازگار و زیست تخریب پذیر هستند (۵،۱۷).

هدف از این مطالعه، نانونیوزومه کردن داروی سیس پلاتین به منظور بهبود شاخص درمانی و کاهش عوارض جانبی آن است.

روش کار

مواد

سیس پلاتین، کلسترول، اسپن ۶۰ و محلول MTT (0.5 mg/ml) از شرکت سیگما خریداری شد. اتانول از شرکت مرک و محیط کشت RPMI-1640 از شرکت Invitrogen تهیه شد. سلول C6 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

تهیه داروی نانونیوزومه شده

نانوذرات نیوزومی به روش تبخیر فاز معکوس بدست آمد. برای تهیه این نانوذرات مقدار ۳۰ میلی گرم اسپن ۶۰، ۱۵ میلی گرم کلسترول و ۵ میلی گرم سیس پلاتین در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۸٪ تحت شرایط هم زدن (۳۷ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ rpm، ۳۰ دقیقه) حل شد. فاز حلال توسط دستگاه روتاری اوپوراتور (۵۰ درجه سانتی گراد، ۹۰ rpm) تبخیر شد. سپس ۱۰ میلی لیتر PBS به ژلوز حاصل اضافه گردید. مشاهده شد مواد جامد تشکیل شده تحت شرایط هم زدن به وسیله دستگاه هم زن مغناطیسی (حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ rpm) پس از گذشت ۶ ساعت به طور کامل در بافر حل شدند.

تعیین اندازه نانو ذره

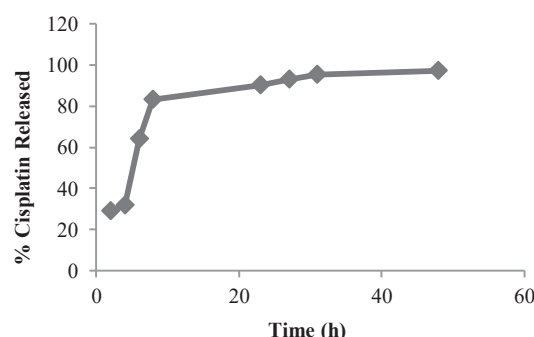
متوسط قطر و پتانسیل زتای نیوزوم ها با استفاده از دستگاه (Zeta sizer Malvern Instruments Ltd) اندازه گیری شد.

بازده انكپسولاسيون

درصد انكپسولاسيون سيس پلاتين با توجه به منحنی استاندارد این دارو محاسبه شد. با توجه به فرمول بازده انكپسولاسيون، مقدار داروی انكپسولاسيون نشده به دست آمد، که با کم کردن از مقدار داروی اولیه درصد داروی انكپسوله شده ۴۳/۶ درصد به دست آمد.

بررسی رهائش دارو در محیط آزمایشگاهی

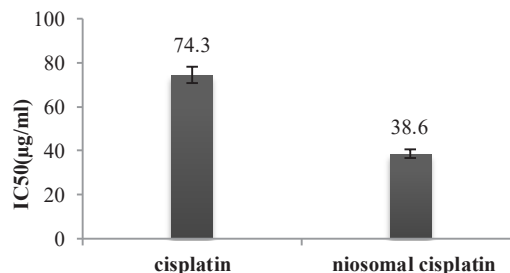
مقدار سيس پلاتين آزاد شده از فرمولاسيون نانونیوزومی در بافر PBS طی بازه های زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۳، ۲۵، ۳۱ و ۴۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد. مقدار درصد داروی آزاد شده پس از ۴۸ ساعت ۹۷ درصد به دست آمد. در شکل ۱ الگوی رهائش سيس پلاتين نانونیوزومه آورده شده است.



شکل ۱: الگوی رهائش دارو از فرمولاسيون سيس پلاتين نانو نیوزومه شده در مدت ۴۸ ساعت

بررسی اثر سایتوتوکسیسیته دارو

میزان سایتوتوکسیسیته فرمولاسيون سيس پلاتين نانونیوزومه شده در غلظت های مختلف به کمک روش MTT بررسی شد که نتایج در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲: مقایسه IC50 (برحسب µg/ml) بین فرمولاسيون سيس پلاتين نانونیوزومه شده و فرم استاندارد آن

بحث

بشر برای درمان بیماری ها با مشکلاتی روبرو است. داروهای مورد استفاده جهت درمان بیماری ها علاوه بر خواص درمانی، اثرات سمی بر روی اعضاها و بافت های سالم نیز دارد. از دیگر

مشکلات در درمان بیماری ها ناتوانی در رساندن غلظت های درمانی دارو به بافت های هدف می باشد. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده است با استفاده از نانو دارو رسانی از بروز این عوارض بکاهد.

از بین نانو حامل ها، نانوحامل های لیپیدی زیست سازگارتر هستند و در شرایط In vivo سمی نیستند (۷، ۱۹). استفاده از این نانوحامل ها نه تنها باعث افزایش ماندگاری دارو در جریان خون می شود بلکه اثر سایتوتوکسیسیته دارو را بر روی سلول های غیر هدف کاهش می دهد (۵، ۱۷). در مطالعه حاضر میزان رهائش، بارگذاری و سمیت فرمولاسيون سيس پلاتين نانونیوزومه شده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از اندازه گیری میانگین قطر ذرات در فرمولاسيون سيس پلاتين نانونیوزومه شده، اندازه ذرات را در ابعاد نانو تایید کرد (۴). میزان بارگذاری دارو با استفاده از روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد. این بررسی نشان داد که مقدار قابل قبولی از دارو بارگذاری شده است. در مطالعه حاضر میزان رهائش دارو در بازه های زمانی مختلف با استفاده از روش دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از نانونیوزوم ها باعث افزایش پایداری دارو در بدن می شوند، از این رو این بررسی نشان داد که رهائش دارو از نانونیوزوم ها به صورت آهسته انجام می گیرد. رهائش دارو از نیوزوم ها شامل دو فاز انتشار سریع و کند بود. شکل ۱ نشان داد که میزان رهائش دارو در ۸ ساعت اول بیش تر بود. اثر سایتوتوکسیسیته فرمولاسيون تهیه شده با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی استفاده شده در این مطالعه C6 بود. در این آزمایش فرمولاسيون نانونیوزومه فاقد دارو اثر سایتوتوکسیسیته ناچیزی داشت.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل می توان گفت که داروی نانونیوزومه شده نسبت به فرم استاندارد آن بر روی سلول های سرطانی اثر سایتوتوکسیسیته بهتری را دارد. برای توجیه این مطلب می توان گفت که فرمولاسيون نانونیوزومی پایداری بیش تری نسبت به شرایط مختلف (pH، دما، لیپازها) از خود نشان می دهند.

سپاسگزاری

این مطالعه به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شد. بدین وسیله از تمامی همکاران تشکر می گردد.

- 1.American Cancer Society, www.cancer.org
- 2.Cepeda, V., M.A., Fuertes, J., Castilla, C., Alonso, C., Quevedo, and J.M., Pérez, Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2007. 7(1): p. 3-18.
- 3.DeAngelis, L.M., Brain tumours. *N. Engl. J. Med.*, 2001. 344(2): p. 114-123
- 4.Heidi, M., R., Yun-Seok, and W., Xiao, Nanomedicine in pulmonary delivery. *International J. Nanomedicine*, 2009. 4: p. 299-319
- 5.Ismail, A.A., A., Sanaa, E., Gizawy, M.A., Fouda, and M.A., Donia, Influence of a niosomal formulation on the oral bioavailability of acyclovir in rabbits. *AAPS Pharm Sci. Tech.*, 2007. 8: E1-E7.
- 6.Jordan, P., M., and Carmo-Fonseca, Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 2000; 57(8-9):1229-35
- 7.Julie, B., C., Sandrine, A., Pierrick, and B., Thierry, Preparation and Characterization of Stealth Archaeosomes Based on a Synthetic PEGylated Archaeal Tetraether Lipid. *J. Drug Delivery*, 2011. 11: 396088
- 8.Kelland, L.R., Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 2000. 59(4): p. 37-38.
- 9.Kornblith, P.L., and M. Walker, Chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurosurg.*, 1998. 68(1): p. 1-17.
- 10.Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
- 11.Naresh, A., et al., Formulation and Evaluation of Lansoprazole niosome. *RJC Rasayan J. Chem*, 2008. 1(3): p. 561-563.
- 12.Nelson, A., O., Patrick, and C., Ndidi, Nanostructures for Drug Delivery, *J. Pharmaceutical Research*, 2009. 8(3): p. 275-287
- 13.Nelson, D.F., J.S., Nelson, D.R., Davis, C.H., Chang, T.W., Griffin, and T.F., Pajak, Survival and prognosis of patients with astrocytoma with atypical or anaplastic features. *J. Neurooncol.*, 1985; 3(2): p. 99-103.
- 14.Pinto, A.L., and S.J., Lippard, Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis and trans-diamminedichloroplatinum(II), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985. 82(14): p. 4616-4619.
- 15.Sudhamani, T., N., Priyadarisini, and M., Radhakrishnan, Proniosomes – A Promising Drug Carriers, *International J. PharmTech Research*, 2010. 2: p. 1446-1454.
- 16.Varshney, M., and S., Mohan, Nanotechnology' current status in pharmaceutical science: A. *IJTA*, 2012. 6: p. 14-24.
- 17.Verma, S., S.K. Singh, N., Syan, P., Mathur, and V., Valecha, Nanoparticle vesicular systems: a versatile tool for drug delivery. *J. Chem. Pharm.*, 2010. 2(2): p. 496-509.
- 18.Villani, G., U., Hübscher, and J.L., Butour, Sites of termination of in vitro DNA synthesis on cis-diamminedichloroplatinum(II) treated single-stranded DNA: a comparison between E.coli DNA polymerase I and eucaryotic DNA polymerases α . *Nucleic Acids Res.*, 1988. 16(10): p. 4407-4418.
- 19.Li, Z., J., Chen, W., Sun, and Y., Xu. Investigation of archaeosomes as carriers for oral delivery of peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010. 394(2): p. 412-417.