

### مقایسه اثر سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین به شکل آزاد و محصور شده در لیپوزوم با بار منفی و بدون بار الکتریکی با رده سلولی MDA-MB-231 (سرطان پستان)

بصیر ملک پور<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا جلالی ندوشن<sup>۲</sup>، صادق منصوری<sup>۳\*</sup>، دکتر رضا  
حاجی حسینی<sup>۳</sup>، محسن میرزائی<sup>۴</sup> و داوود جمالی<sup>۵</sup>

- ۱- کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۲- دانشیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۳- دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور
- ۴- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد واحد بروجرد
- ۵- کارشناس ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

Email: mansouri@shahed.ac.ir

نویسنده مسئول: صادق منصوری

#### چکیده

مقدمه: سرطان پستان یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی درمانی زنان است. به دلیل ناهمگونی و سختی این بافت‌های سرطانی، امروزه از لیپوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های انتقال دارو بدون این سلول‌ها استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: لیپوزوم‌های حاوی بار الکتریکی منفی با اختلاط ترکیبات دستیل فسفات، کسترویل و فسفاتیدیل کولین (۱:۲:۱) و فاقد بار الکتریکی از ترکیب فسفاتیدیل کولین-کسترویل (۱:۱) تهیه شد. سپس لیپوزوم‌ها با غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با داروی دوکسوروبیسین پر شدند. سمیت سلولی غلظت‌های مشابه داروی آزاد در برابر داروی محصور در لیپوزوم‌های مذکور در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آزمون تی مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

نتایج: نظر به این‌که سمیت سلولی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو در زمان‌های مذکور در لیپوزوم‌های بدون بار الکتریکی به ترتیب ۸۸/۳۷، ۹۱/۷ و ۹۳/۴ درصد و در غلظت و زمان مشابه برای داروی آزاد ۷۲/۳۴، ۷۹/۴۱ و ۷۹/۹ درصد به دست آمد، سمیت سلولی داروی محصور در این لیپوزوم‌ها نسبت به داروی آزاد بیشتر است. همچنین نظر به این‌که در غلظت و دوره زمانی مشابه سمیت سلولی داروی محصور در لیپوزوم با بار منفی به ترتیب ۵۹/۴۰، ۶۷/۲۸ و ۷۴/۵۶ درصد به دست آمد، سمیت سلولی داروی محصور در لیپوزوم دارای بار منفی نسبت به داروی آزاد کمتر است.

نتیجه‌گیری: لیپوزوم‌های بدون بار الکتریکی حاوی داروی دوکسوروبیسین سمیت سلولی بیشتری در مقایسه با شکل آزاد دارو هستند. نتیجتاً می‌توان از این لیپوزوم‌ها برای بهبود تأثیر و کاهش اثرات سمی دارو پس از تکمیل این آزمایش‌ها در شرایط محیط زنده استفاده کرد.

واژگان کلیدی: لیپوزوم، داروی دوکسوروبیسین، سمیت سلولی، رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231)

این پژوهش طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات دانشگاه شاهد بوده است و بودجه آن از محل اعتبارات این مرکز تأمین شده است.

دوماهنامه علمی - پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال هفدهم - شماره ۸۵  
اسفند ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۱۰/۱۵

آخرین اصلاحات: ۸۸/۱۲/۲۲

پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۷

## مقدمه

سرطان پستان، یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی درمانی در میان زنان است و هیچ سرطانی برای خانم‌ها نگران‌کننده‌تر از سرطان پستان نیست [۱]. سرطان پستان از تکثیر بدخیم و بی‌رویه سلول‌های اپی‌تلیال پوشاننده مجاری یا لوبول‌های موجود در بافت پستان به وجود می‌آید. سرطان پستان، دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان بعد از سرطان ریه است [۲-۴]. همچنین این سرطان بالاترین میزان بروز را در بین سرطان‌ها دارا است [۲]. در سال ۲۰۰۴ میلادی، حدود ۲۱۶۰۰۰ مورد سرطان پستان مهاجم و ۴۰۰۰۰ مرگ‌ومیر ناشی از آن در امریکا گزارش شده است [۵]. در ایران براساس آخرین گزارش کشوری، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. از بین ۲۴۴۹۸ زن مبتلا به سرطان، سرطان پستان ۵۹۸۱ (۲۴/۴۱ درصد) بیشترین میزان را به خود اختصاص داده است [۶].

ناهمگونی بافت‌های توموری پستان و فشار درونی آن‌ها موجب کاهش پاسخ مطلوب به داروهای ضدسرطان و نیز افزایش سمیت داروهای تجویز شده باعث محدود شدن دوز دارویی تجویز شده می‌شود [۵]. از روش‌های جدید دارو درمانی استفاده از حاملین دارویی یا سیستم انتقال دارو (Drug Delivery) و لیپوزوم‌های حاوی دارو است [۲، ۴، ۵]. لیپوزوم‌ها گویچه‌های ریزی هستند که از مولکول‌های چربی و عمدتاً فسفولیپیدها تشکیل شده‌اند. فسفولیپیدها مولکول‌های آمفی‌پاتیک هستند و موادی مانند کلسترول، دی‌ستیل فسفات آمین را نیز در ساختمان غشاء لیپوزوم‌ها می‌توان به کار برد [۳، ۴، ۷].

داروی دوکسوروبیسین که به‌طور وسیعی در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد، به دلایل مختلف از جمله سمیت دارو، پایداری کم در سیستم گردش خون، نفوذ دشوار در بافت ناهمگون تومورهای پستان و از بین رفتن دارو توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده درون بدن، دارای محدودیت استفاده است.

تحقیقات زیادی در رابطه با استفاده از سیستم‌های انتقال دارو برای درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان در سراسر جهان به عمل آمده است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ شارام و همکاران در دانشگاه پنجاب هند انجام دادند، لیپوزوم‌ها به‌عنوان سیستم انتقال

دارو در سرطان پستان مورد بررسی قرار داده شد، به طوری که نتایج حاصل بیان‌کننده نقش مهم داروهای محصور شده در لیپوزوم‌های نشان‌دار شده با آنتی بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های سلول‌های توموری در تشخیص و درمان این سرطان است [۸]. همچنین در سال ۱۹۹۶، دیمیتری کِرپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران در مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمونولیپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در شرایط آزمایشگاهی (Invitro) طراحی کردند که نتایج حاصل در طراحی ایمونولیپوزوم‌های حاوی داروی ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفته شد [۹]. محصور کردن داروی دوکسوروبیسین (Doxorubicin) در لیپوزوم می‌تواند از اثرات سمی آن کاسته و در ضمن کارایی درمانی آن را افزایش دهد [۱۰، ۱۱، ۱۲].

در این کار تحقیقی با استفاده از تبخیر فاز معکوس (REV: Reverse Phase Evaporation) لیپوزوم (LUV: Large Unilamellar Vesicles) با بار منفی و بدون بار الکتریکی تهیه و به وسیله داروی دوکسوروبیسین پر و اثر آن روی کشت رده سلولی MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفته شد.

## مواد و روش‌ها

**رده سلولی:** در این مطالعه از رده سلولی MDA-MB-231 که رده سلولی سرطان پستان انسان است، به‌عنوان سلول‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت کشت تک‌لایه (Monolayer) تهیه شد. سلول‌ها در ترکیبی از محیط کشت سلولی RPMI و سرم FBS به نسبت ۹۰ به ۱۰ کشت داده شد و پس از انجام سه پاساژ موفقیت‌آمیز آزمایش‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام گرفت.

**دارو:** داروی دوکسوروبیسین به صورت ویال‌های تزریقی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخت شرکت اِبُو (Ebewe) کشور اتریش است.

**مواد مورد استفاده برای تهیه لیپوزوم:** کلسترول، دی‌ستیل فسفات و فسفاتیدیل کولین (لیستین) (شرکت

و گسترش می‌یابند. با هر بار پر شدن کف فلاسک‌ها، سلول‌ها پاساژ داده شده و پس از سه بار پاساژ موفق، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به هر خانه پلیت ۹۶ خانه این استریل به‌منظور انجام آزمایش‌های موردنظر انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت میزان چسبندگی سلول‌ها به کف پلیت بررسی و در صورت کامل بودن آن داروی دوکسوروبیسین آزاد و به‌صورت محصور در لیپوزوم با غلظت‌های مختلف ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه می‌شود. این توضیح لازم است که برای کنترل بهتر نتایج برای هر دوز دارویی یک ردیف سه‌تایی چاهک در نظر گرفته شده و در هر پلیت یک ردیف سه‌تایی به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت [۱۴].

#### روش MTT برای سنجش میزان سمیت سلولی (داروی آزاد و محصور در لیپوزوم بدون بار الکتریکی و دارای بار منفی)

این سنجش در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام پذیرفت. در پایان هر یک از دروه‌ها، محیط RPMI حاوی دارو با دقت از خانه‌های پلیت خارج شده و پس از اضافه کردن دوباره محیط RPMI حاوی FBS به هر چاهک تعداد سلول‌های زنده با این روش مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش تعداد سلول‌های زنده به روش MTT به مقدار ۰/۱ حجم موجود در آن، ماده MTT اضافه شد و سپس پلیت‌ها در انکوباتور دارای دی‌اکسید کربن قرار داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها را از خانه‌ها خارج می‌کنیم. در مرحله بعد به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اسید پروپانویک اضافه می‌شود. اسید پروپانویک موجب حل شدن کریستال‌های موجود در کف هر خانه پلیت می‌شود. بعد از این مرحله میزان جذب نوری با کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت می‌کنیم.

با استفاده از فرمول زیر درصد سلول‌های زنده نسب به گروه کنترل بدون دارو محاسبه می‌گردد:

$$100 \times (\text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل} / \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون})$$

درصد سمیت سلولی از فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

زیگما، آلمان)، کلروفرم (مرک، آلمان)، محلول تریتون X-100 (مرک، آلمان)، کیسه دیالیز (شرکت بیورن، ایران) و پودر گلوکز (مرک، آلمان).

#### مواد مورد استفاده برای انجام کار با سلول و

آزمایش سنجش سمیت سلولی: محلول 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2-5-diphenyl-2-H-tetrazolium (MTT) (زیگما، آلمان) محیط کشت RPMI و FBS (گیبکو، انگلیس)، محلول تریپسین (بهارافشان، ایران)، فلاسک (نانک، دانمارک)، سمپلر در اندازه‌های مختلف ساخت شرکت Biotech، دستگاه‌های انکوباتور، الیزا ریدر (ICN Flow، امریکا)، هود (ژال، ایران)، شیکرو پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی.

#### روش کار

##### تهیه لیپوزوم‌های دارای بار الکتریکی منفی و فاقد بار الکتریکی حاوی داروی دوکسوروبیسین

۱ میلی‌لیتر از محلول دوکسوروبیسین استوک با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را با ۱ میلی‌لیتر محلول گلوکز ۵ درصد مخلوط کرده و غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. دی‌ستیل فسفات، فسفاتیدیل کولین و کلسترول را به نسبت ۱:۲:۱ مولار مخلوط کرده و به آن ابتدا ۳ میلی‌لیتر اتر و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول دوکسوروبیسین با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زیر هود اضافه شد. دی‌ستیل فسفات به دلیل داشتن گروه‌های فسفات به‌عنوان ایجادکننده بار منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طریق مشابه لیپوزوم‌های فاقد بار الکتریکی با مخلوط کردن فسفاتیدیل کولین و کلسترول به نسبت ۱:۱ مولار تهیه شد. تمام این مراحل در شرایط استریل و با استفاده از دستگاه سونیکاتور و روش تبخیر فاز معکوس لیپوزوم‌ها صورت پذیرفت [۱۳].

##### کشت سلول

سلول‌های تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران در فلاسک‌های یک بار مصرف کشت سلول و با محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد بخار آب کشت داده شدند. این سلول‌ها به صورت تک‌لایه کف پلیت چسبیده

و ۳ نشان داده شد و با این بررسی‌ها در غلظت‌های ۵، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم بدون بار الکتریکی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت با رده سلولی موردنظر میزان سمیت سلولی نسبت به داروی آزاد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته، اما در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش چشمگیری مشاهده نشد.

در سه مرحله مذکور، آزمون آماری تی نشان داد، در مقایسه با گروه شاهد، درصد کشندگی دارو در غلظت‌های ۵، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد دارای  $p \leq 0/05$  بوده و در محدوده ۹۵ درصد اطمینان کاهش تعداد سلول‌های گروه‌های هدف نسبت به گروه شاهد معنادار مشاهده شده است.

اثر سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم با بار منفی بر رده سلولی MDA-MB-231 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: در این مرحله همانند دو مرحله قبل داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم با بار منفی با غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دوره زمانی مذکور در مجاورت با رده سلولی MDA-MB-231 در جدول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شد.

با توجه به اطلاعات به دست آمده از جداول مذکور در غلظت‌های ۵، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم با بار منفی در مقایسه با داروی آزاد در دوره زمانی مذکور کاهش یافته که دلیل آن احتمالاً وجود بار منفی در سیتوپلاسم سلول‌های هدف است.

جدول ۱. مقایسه درصد سمیت سلولی حاصل از مجاورت داروی آزاد دوکسوروبیسین، لیپوزوم بدون بار الکتریکی و منفی با رده سلولی MDA-MB-231 بعد از ۲۴ ساعت

I.neg	I.neu	free	Drug forms
			Dose(mg/ml)
۰/۲۰۶	۰/۳۱	۱۳/۹۱	۰/۲
۲۱/۹۷	۲/۸۴	۳۹/۷۸	۰/۵
۳۶/۸۸	۶۲/۷۶	۶۵/۹۲	۱
۴۸/۲۲	۸۷/۵۰	۶۵/۲۰	۲
۵۹/۴۰	۸۸/۳۷	۷۲/۳۴	۵

= درصد سمیت سلولی یا درصد کشندگی

$$\left[ 1 - \frac{\text{عدد جذب نوری}}{\text{میانگین عدد جذب نوری Control}} \right] \times 100$$

برای کارهای آماری در این تحقیق از نرم‌افزار Excel و روش آزمون تی استفاده شد. به طوری که معنادار بودن بر حسب P value همان نسبت test/control و در محدوده  $p \leq 0/05$  بوده است، یعنی در مقادیر پایین‌تر از P value درصد کشندگی بالا را نشان می‌دهد. انتظار ما از نتایج براساس تعداد دفعات تکرار از مقادیر موردنظر بوده است [۱۴].

## نتایج

اثر سمیت داروی آزاد دوکسوروبیسین بر رده سلولی MDA-MB-231 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: بررسی سمیت داروی آزاد دوکسوروبیسین با غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (به ترتیب معادل رقت‌های ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) در دوره زمانی مذکور در مجاورت با رده سلولی MDA-MB-231 در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شد که نتایج نشان می‌دهد در غلظت‌های ۵، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی آزاد دوکسوروبیسین، پس از طی زمان‌های موردنظر اثر سمیت سلولی قابل توجه بوده، اما در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر سمیت سلولی به مقدار قابل توجهی کاهش یافته است.

آزمون آماری تی نشان داد، در مقایسه با گروه شاهد، تمامی غلظت‌های مورد بررسی به جز غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت دارای  $p \leq 0/05$  بوده و در محدوده ۹۵ درصد اطمینان، کاهش تعداد سلول‌های گروه‌های هدف نسبت به گروه کنترل معنادار بوده است.

اثر سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم بدون بار الکتریکی بر رده سلولی MDA-MB-231 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: بررسی‌ها در این مرحله همانند مرحله قبل داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم بدون بار الکتریکی با غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در دوره زمانی مذکور در مجاورت با رده سلولی MDA-MB-231 نیز در جدول ۱، ۲

جدول ۲. مقایسه درصد سمیت سلولی از مجاورت داروی آزاد دوکسوروبیسین و لیپوزوم بدون بار الکتریکی با رده سلولی MDA-MB-231 بعد از ۴۸ ساعت

I.neg	I.neu	free	Drug forms
			Dose(mg/ml)
۲۱/۰۳	۰/۷۰۸	۱۳/۰۱	۰/۲
۳۷/۴۵	۷/۵۸۳	۲۰/۱۴	۰/۵
۴۵/۹۹	۶۳/۱۹	۴۵/۲۳	۱
۶۳/۶۳	۹۰	۷۳/۶۷	۲
۶۷/۴۸	۹۱/۷۰	۷۹/۴۱	۵

جدول ۳. مقایسه درصد سمیت سلولی حاصل از مجاورت داروی آزاد دوکسوروبیسین و لیپوزوم بدون بار الکتریکی با رده سلولی DA-MB-231 بعد از ۷۲ ساعت

I.neg	I.neu	free	Drug forms
			Dose(mg/ml)
۵/۲۶۰	۲۹/۰۷	۲/۳۷	۰/۲
۲۴/۱۶	۱۴/۰۱	۲۹/۲۸	۰/۵
۴۰/۵۲	۵۹/۱۳	۶۵/۶۷	۱
۶۵/۷۲	۹۲/۴۱	۷۴/۹۲	۲
۷۵/۵۶	۹۳/۴۰	۷۹/۹۰	۵

جدول ۴. مقایسه درصد سمیت سلولی حاصل از مجاورت داروی آزاد دوکسوروبیسین و لیپوزوم بدون بار الکتریکی با رده سلولی DA-MB-231 بعد از ۷۲ ساعت

I.neg	I.neu	free	Drug forms
			Dose(mg/ml)
۵/۲۶۰	۲۹/۰۷	۲/۳۷	۰/۲
۲۴/۱۶	۱۴/۰۱	۲۹/۲۸	۰/۵
۴۰/۵۲	۵۹/۱۳	۶۵/۶۷	۱
۶۵/۷۲	۹۲/۴۱	۷۴/۹۲	۲
۷۵/۵۶	۹۳/۴۰	۷۹/۹۰	۵

بصیر ملک‌پور و همکاران (۱۶، ۱۵، ۱۲). این مطالعات به‌خصوص بر روی داروی دوکسوروبیسین (دارویی از دسته آنتراسیکلین‌ها بوده و آنتی‌بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود) متمرکز شده است. آنتراسیکلین‌ها (دوکسوروبی‌سین، دانوروبی‌سین، ایداروبی‌سین و اپی‌روبی‌سین) آنتی‌بیوتیک‌های ضدنئوپلاست با گستره وسیعی از کاربردهای بالینی هستند. دوکسوروبی‌سین بر علیه تعدادی از انواع تومورها (مانند سارکوماها و کارسینوماها) وارد عمل می‌شود. این دارو همچنین در مورد بدخیمی‌های خونی (لوکمی، لنفوما و مالتیپل میلوما) نیز کاربرد دارد [۱۷]. در سال ۱۹۹۶، دیمتری کِروپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولوپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در محیط زنده طراحی کردند که نتایج حاصل در ساخت ایمنولوپوزوم‌های حاوی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۰۱، کِرالد (Cerald) و همکاران کاهش میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را روی قلب نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم داشت [۱۸]. در سال ۲۰۰۱ رام (Rom.E) و همکاران در دانشکده داروسازی دانشگاه کالیفرنیا، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را به سمت سلول‌های حاوی مارکرهای سطحی CD44 مورد هدف‌گیری قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر واضح دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم بر علیه سلول‌های بیان‌کننده CD44 بوده است [۱۹]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ که رام و همکاران در دانشگاه کالیفرنیا انجام دادند، سینتیک تأثیر داروی دوکسوروبیسین آزاد و محصور در لیپوزوم را روی سلول‌های ملانوما مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. در سال ۲۰۰۵، چن (Chen) و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم با اندازه کوچک را که از طرق مختلف بر مدل‌های منتشر شده سرطان پستان تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که درصد بالایی از

بصیر ملک‌پور و همکاران (۱۶، ۱۵، ۱۲). این مطالعات به‌خصوص بر روی داروی دوکسوروبیسین (دارویی از دسته آنتراسیکلین‌ها بوده و آنتی‌بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود) متمرکز شده است. آنتراسیکلین‌ها (دوکسوروبی‌سین، دانوروبی‌سین، ایداروبی‌سین و اپی‌روبی‌سین) آنتی‌بیوتیک‌های ضدنئوپلاست با گستره وسیعی از کاربردهای بالینی هستند. دوکسوروبی‌سین بر علیه تعدادی از انواع تومورها (مانند سارکوماها و کارسینوماها) وارد عمل می‌شود. این دارو همچنین در مورد بدخیمی‌های خونی (لوکمی، لنفوما و مالتیپل میلوما) نیز کاربرد دارد [۱۷]. در سال ۱۹۹۶، دیمتری کِروپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولوپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در محیط زنده طراحی کردند که نتایج حاصل در ساخت ایمنولوپوزوم‌های حاوی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۰۱، کِرالد (Cerald) و همکاران کاهش میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را روی قلب نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم داشت [۱۸]. در سال ۲۰۰۱ رام (Rom.E) و همکاران در دانشکده داروسازی دانشگاه کالیفرنیا، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را به سمت سلول‌های حاوی مارکرهای سطحی CD44 مورد هدف‌گیری قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر واضح دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم بر علیه سلول‌های بیان‌کننده CD44 بوده است [۱۹]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ که رام و همکاران در دانشگاه کالیفرنیا انجام دادند، سینتیک تأثیر داروی دوکسوروبیسین آزاد و محصور در لیپوزوم را روی سلول‌های ملانوما مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. در سال ۲۰۰۵، چن (Chen) و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم با اندازه کوچک را که از طرق مختلف بر مدل‌های منتشر شده سرطان پستان تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که درصد بالایی از

بصیر ملک‌پور و همکاران (۱۶، ۱۵، ۱۲). این مطالعات به‌خصوص بر روی داروی دوکسوروبیسین (دارویی از دسته آنتراسیکلین‌ها بوده و آنتی‌بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود) متمرکز شده است. آنتراسیکلین‌ها (دوکسوروبی‌سین، دانوروبی‌سین، ایداروبی‌سین و اپی‌روبی‌سین) آنتی‌بیوتیک‌های ضدنئوپلاست با گستره وسیعی از کاربردهای بالینی هستند. دوکسوروبی‌سین بر علیه تعدادی از انواع تومورها (مانند سارکوماها و کارسینوماها) وارد عمل می‌شود. این دارو همچنین در مورد بدخیمی‌های خونی (لوکمی، لنفوما و مالتیپل میلوما) نیز کاربرد دارد [۱۷]. در سال ۱۹۹۶، دیمتری کِروپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولوپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در محیط زنده طراحی کردند که نتایج حاصل در ساخت ایمنولوپوزوم‌های حاوی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۰۱، کِرالد (Cerald) و همکاران کاهش میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را روی قلب نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم داشت [۱۸]. در سال ۲۰۰۱ رام (Rom.E) و همکاران در دانشکده داروسازی دانشگاه کالیفرنیا، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را به سمت سلول‌های حاوی مارکرهای سطحی CD44 مورد هدف‌گیری قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر واضح دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم بر علیه سلول‌های بیان‌کننده CD44 بوده است [۱۹]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ که رام و همکاران در دانشگاه کالیفرنیا انجام دادند، سینتیک تأثیر داروی دوکسوروبیسین آزاد و محصور در لیپوزوم را روی سلول‌های ملانوما مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. در سال ۲۰۰۵، چن (Chen) و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم با اندازه کوچک را که از طرق مختلف بر مدل‌های منتشر شده سرطان پستان تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که درصد بالایی از

بصیر ملک‌پور و همکاران (۱۶، ۱۵، ۱۲). این مطالعات به‌خصوص بر روی داروی دوکسوروبیسین (دارویی از دسته آنتراسیکلین‌ها بوده و آنتی‌بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود) متمرکز شده است. آنتراسیکلین‌ها (دوکسوروبی‌سین، دانوروبی‌سین، ایداروبی‌سین و اپی‌روبی‌سین) آنتی‌بیوتیک‌های ضدنئوپلاست با گستره وسیعی از کاربردهای بالینی هستند. دوکسوروبی‌سین بر علیه تعدادی از انواع تومورها (مانند سارکوماها و کارسینوماها) وارد عمل می‌شود. این دارو همچنین در مورد بدخیمی‌های خونی (لوکمی، لنفوما و مالتیپل میلوما) نیز کاربرد دارد [۱۷]. در سال ۱۹۹۶، دیمتری کِروپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولوپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در محیط زنده طراحی کردند که نتایج حاصل در ساخت ایمنولوپوزوم‌های حاوی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۰۱، کِرالد (Cerald) و همکاران کاهش میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را روی قلب نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم داشت [۱۸]. در سال ۲۰۰۱ رام (Rom.E) و همکاران در دانشکده داروسازی دانشگاه کالیفرنیا، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را به سمت سلول‌های حاوی مارکرهای سطحی CD44 مورد هدف‌گیری قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر واضح دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم بر علیه سلول‌های بیان‌کننده CD44 بوده است [۱۹]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ که رام و همکاران در دانشگاه کالیفرنیا انجام دادند، سینتیک تأثیر داروی دوکسوروبیسین آزاد و محصور در لیپوزوم را روی سلول‌های ملانوما مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. در سال ۲۰۰۵، چن (Chen) و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم با اندازه کوچک را که از طرق مختلف بر مدل‌های منتشر شده سرطان پستان تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که درصد بالایی از

## بحث

به دلایل قابل قبول هیچ سرطانی برای خانم‌ها مانند سرطان پستان نگران‌کننده نیست [۱]. این سرطان در زنان شایع‌ترین سرطان بوده و بیشترین میزان مرگ مربوط به آن در سن ۴۰ تا ۴۴ سالگی است [۵، ۲]. سرطان پستان بعد از سرطان ریه به عنوان دومین سرطان عامل مرگ معرفی شده است. سرطان پستان از تکثیر بدخیم و بی‌رویه سلول‌های اپی‌تلیال پوشاننده مجاری یا لوبول‌های موجود در پستان به‌وجود می‌آید. سرطان پستان بالاترین میزان بروز را در بین سرطان‌ها دارا است [۲].

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در رابطه با بهبود اثربخشی داروی‌های مورد مصرف در سرطان پستان انجام شده است. یکی از زمینه‌هایی که تاکنون پاسخ خوبی به این تحقیقات داده است، استفاده از لیپوزوم‌ها در پوشش این داروها، افزایش غلظت دارو در محل اثر، کاهش اثرات

در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر پس از گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت (۷۴/۹ درصد) نسبت به میزان سمیت سلولی دارو بعد با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت (۷۲/۳ درصد) بوده است که با توجه به سمیت دوزهای بالای دارو می توان همزمان با کاهش غلظت دارو برای کاهش اثرات جنبی مضر آن مدت زمان مجاورت دارو را افزایش داد.

پس از تهیه لیپوزوم های بدون بار الکتریکی و با بار منفی، پر کردن چاهک ها با داروی دوکسوروبیسین و در نهایت مجاورت آن ها با سلول های مورد نظر انجام گرفت. نتایج به دست آمده در این بخش از این جهت قابل توجه بوده که علاوه بر افزایش توان کشندگی دارو به صورت محصور در لیپوزوم های بدون بار الکتریکی و کاهش اثر کشندگی در لیپوزوم های با بار منفی، این تئوری را که احتمال سطح خارجی این سلول ها دارای بار منفی است، مطرح و تقویت می کند. در این مرحله نیز زمان مجاورت لیپوزوم های بدون بار الکتریکی و بار منفی در مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد که پس طی این سه دوره زمانی، میزان درصد سمیت سلولی داروی محصور در لیپوزوم بدون بار الکتریکی برای غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۸۸/۳۷، ۹۱/۷ و ۹۳/۴ درصد به دست آمد که تفاوت افزایش قابل توجهی را نسبت به میزان سمیت سلولی دارو به حالت آزاد نشان داد، اما میزان درصد سمیت سلولی داروی محصور در لیپوزوم با بار منفی برای غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۵۹/۴، ۶۷/۲۸ و ۷۴/۵۶ درصد به دست آمد که کاهش قابل توجهی در مدت زمان کمتری نسبت به داروی آزاد داشته و همان طور که قبلاً بیان شد، احتمالاً به دلیل وجود بار منفی در سطح سلول لیپوزوم مورد نظر (با بار منفی) اثربخشی دارو کمتر شده است.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق که برای اولین بار در ایران به انجام رسیده است و مقایسه آن با پروژه های مشابه، بهبود تأثیر این دارو به شکل لیپوزوم بدون بار الکتریکی تأیید شد و به نظر می رسد می توان از لیپوزوم ها (گویچه هایی که توانایی محصور کردن مواد مختلف

آدریامایسین محصور در لیپوزوم توسط سلول های توموری جذب شده و میزان توکسوسیتیه دارو به شدت افزایش یافته است. همچنین هیچ گونه اثری از آلرژی و اثرات سمی محلی مشاهده نشد [۲۱]. علاوه بر این، در یک پروژه تحقیقاتی که در سال ۲۰۰۶ شارام و همکاران در دانشگاه پنجاب هند انجام دادند، لیپوزوم را به عنوان سیستم انتقال دارو در سرطان پستان مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل بیان کننده نقش مهم داروهای محصور شده در لیپوزوم های نشاندار شده با آنتی بادی ها علیه آنتی ژن های سلول های توموری در تشخیص و درمان سرطان پستان بوده است [۸]. در سال ۲۰۰۷، جیوتا (Giotta) و همکاران، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را در ترکیب با سیکلوفسفامید به عنوان خط اول درمان سرطان پستان مورد بررسی دادند که در این تحقیق نیز نتایج به دست آمده نشان از کاهش سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد آن داشته است [۲۲].

در این پروژه تحقیقاتی، آزمایش هایی برای سنجش میزان سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین به فرم آزاد و مقایسه آن با شکل لیپوزوم دارو (لیپوزوم با بار منفی و بدون بار الکتریکی) در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجرا شد. در ابتدا در غلظت های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر از داروی آزاد تهیه و در دوره های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول های سرطانی MDA-MB-231 (یکی از رده های سرطان پستان) در معرض دارو قرار گرفت. همان گونه که از قبل هم پیش بینی می شد، با توجه به مؤثر بودن این دارو در تخریب سلول های سرطانی پستان اکنون به عنوان یک داروی انتخابی برای درمان این بیماری مورد استفاده قرار می گیرد.

داروی مذکور به فرم آزاد دارای اثر سمی خوبی بر این رده سلول داشته و پس از ۷۲ ساعت ۷۹/۹ درصد سلول های سرطانی در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از بین رفتند. بدیهی است با انجام آزمایش ها روند سمیت سلولی این دارو با طولانی تر شدن زمان و در غلظت بالای دارو افزایش یافته، به طوری که در غلظت مشابه بعد از ۲۴ ساعت، ۷۲/۳ درصد سلول ها و پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت ۷۹/۴ درصد از سلول های این رده از بین رفتند. نکته قابل توجه در این مرحله، برتری میزان اثربخشی دارو

حیوان آزمایشگاهی که به صورت آزمایشگاهی مبتلا به توده سرطانی می شود، انجام شده تا افزایش میزان اثربخشی یا کاهش آن در شرایط داخل بدن موجود زنده بررسی شود.

از جمله داروها را دارند) به عنوان پوشش برای داروهای خطرناک شیمیایی که دارای اثرات مخرب جانبی بسیار زیادی بوده استفاده کرد و اثربخشی این داروها را افزایش داد. پیشنهاد می شود، تحقیق فوق در شرایط داخل بدن

## منابع

1. Kumar V., Abbas A., Fausto N. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 7<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
2. Kasper Dennis L., Braunwald E., Fauci Anthony S., Hauser Stephan L., Longo Dan L., Jameson J. Harrison's principles of internal medicine. 16<sup>th</sup>ed, New York 2005. Vol.1
3. Scott James R., Gibbs Roland S., karlan Beth Y., Hancy Arthur F. Danforth's obstetrics and gynecology. 9<sup>th</sup> Ed, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003. VOL 2
4. Berek J. Novak's gynecology. 13<sup>th</sup>ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins, 2002.
5. Azizi F., Hatami H., Janghorbani M. epidemiology and control prevalent diseases in iran. *eshtiagh publication*. 2002; 201-205.
6. Harris JR, Lippman Marc E, Marrow monich, Osborne C. Kent. Disease of breast. 2nd ed. Philadelphia. Lippmatt Williams and Willkins, 2000.
7. Decherney AH, Nathan L. Current obstetrics and gynecology diagnosis and treatment. 9<sup>th</sup> Ed. New York: McGraw- Hill; 2003.
8. Sharam, G. Antbousi, S. Ehrhardt, C. & Ravi Kumar, M. N. V.. Liposome as targeted drug delivery systems in treatment of breast cancer. *Jornal of drug targeting*. 2006; 14(5): 301-310.
9. Dimitri K., John W. Park, kellung Hong. Sterucally stabilized anti-HER2 immunoliposomes Design and targeting to human Breast cancer cells in vitro. *Biochemistry*, 1996; 36(1), 66-75.
10. Ann P., Clark R.P., Pharm D. Liposome as drug delivery system cancer practice. 1998; 6(4): 251-256.
11. Wang G. Liposomes as Drug Delivery Vehicles. Binghe Wang, Teruna Siahaan, Richard A. Soltero. Drug Delivery: Principles and Applications. A John Wiley & Sons Inc. 2005; pp. 411-442.
12. Bourges JL. Touchard, E. Kowalczyk, L. Berdugo, M. Thomas- Doyle A. Bochot A. Gomez A., Azan F. Gurny R. Behar- Cohen F. Drug delivery systems for intraocular applications. *J Fr Ophtalmol.*, 2007; 30(10): 1070-88.
13. Szoka F. Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 1978; 75(9): 4194-8.
14. Ghazanfari T., Naseri M., Raminfar A. Anti cancer effect of ACA2 on stomach adeno carcinoma cell line (AGS). *Daneshvar, Shahed University*. 2005.
15. Tyrrell D.A., Heath D., Colley C.M., Ryman B.E. New aspects of lipsomes. *Biochem. Biophys. Acta*. 1979; 457, 259-302.
16. Gary E., Kildsig O. Targeted drug carriers: biological activity of the N-acetyl cystein liposome system. *Anal. Biochem.* 1984; 102:331-6.
17. McEvoy G., Snow K. AHFS drug information. *American society of health system pharmacists. Bethesda*. 2008.
18. Cerald B. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome- encapsulated Doxorubicin compared with conventional Doxorubicin in randomized, multicente trial of mefustatic Breast cancer. *Journal of oncology* 2001; p: 1444-1454.

19. Rome E. Eliaz and Francisc. Sazoka, Jr. Liposomes-encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A strategy to kill CD44-overexpressing Tumor Cells. *Cancer Research* 2001; G1: 2592-2601.
20. Rom E. Eliaz, Shlomo Nir, cornelia, and Francis C., Jr. Determination and modeling of cancer cell killing by Doxorubicin an Doxorubicin encapsulated in targeted liposomes. *Cancer Research* 2004; G4: 711-718.
21. Chen J-H. Ling, R. Yao, Q. Li, Y. Chen, T. Wang. Z and Li, K-Z. Effect of small-sized liposomal Adriamycin administered by various routes on a metastatic breast cancer model. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12 93-100.
22. Giotta F. Lorusso, V. Maiello, E. Filippelli, G. Valerio, M. R. Caruso, F. Liposomal-encapsulated Doxorubicin plus cyclophosphamide as first-line therapy in metastatic breast cancer: a phase II multicentric study. *Annals of Oncology*, 2007; 18 (Supplement 6): 66-69.

Archive of SID