مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۲

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده بر روی رده ی سلولی سرطان سینه

سید ابراهیم علوی[۱]، مائده کوهی مفتخری اصفهانی*[۲]، محسن چیانی[۳]، عظیم اکبرزاده[۴]، امیر حیدری نسب[۵]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی شیمی،گروه بیوتکنولوژی
[۲] کارشناس ارشد، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، دانشکده فنی و مهندسی،گروه مهندسی شیمی،گروه بیوتکنولوژی
[۳] کارشناس ارشد، میدان پاستور- خیابان ۱۲ فروردین- انستیتو پاستور ایران-بخش بیوتکنولوژی- پایلوت
[۴] دانشیار، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی- گروه مهندسی شیمی-گروه بیوتکنولوژی
[۵] استاد، میدان پاستور- خیابان ۱۲ فروردین- انستیتو پاستور ایران-بخش بیوتکنولوژی- پایلوت

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سرطان یکی از مخرب ترین بیماری ها در جهان است و سرطان سینه یکی از شایع ترین انوع سرطان در بین زنان می باشد. هیدروکسی اوره از داروهای مهم در شیمی درمانی می باشد که با وجود خواص درمانی در دراز مدت عوارض جانبی متعددی را درپی دارد. این تحقیق با هدف استفاده از فناوری نانوداورسانی به روش لیپوزومه کردن دارو درجهت کاهش عوارض جانبی و افزایش شاخص درمانی انجام گردید.

مواد و روش ها: برای تهیه نانولیپوزوم، نسبت مشخصی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول با یکدیگر ترکیب نموده و سپس داروی هیدروکسی اوره به آن اضافه گردید. میانگین قطر هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده با کمک دستگاه زتا سایزر اندازه گیری شد. همچنین درصد انکپسولاسیون محاسبه شد. الگوی آزادسازی دارو از نانولیپوزوم ها نیز با استفاده از روش دیالیز انجام شد. در نهایت اثر سایتوتوکسیسیتیِ فرمولاسیون تهیه شده با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میانگین قطر هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده و با بازده انکپسوله شده هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه به ترتیب ۴۰۲/۵ نانومتر و ۷۰/۸۳۶ درصد محاسبه گردید. همچنین الگوی آزادسازی دارو از نانولیپوزوم ها به روش دیالیز نشان داد که میزان رهایش دارو از داروی نانولیپوزومه طی ۲۸ ساعت برابر با ۲۵/۸۵٪ می باشد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که اثر سایتوتوکسیسیتی داروی نانولیپوزومه بیشتر از داروی استاندارد می باشد.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، نانوداورسانی، هیدروکسی اوره، لیپوزومه کردن

مقدمه

از بزرگ ترین مشکلات سلامتی در نقاط مختلف جهان می توان به بیماری سرطان اشاره کرد (۴). سرطان سینه شایع ترین نوع سرطان در بین زنان جهان شناخته شده است (۱۵). این بیماری سالانه جان هزاران انسان را می‌گیرد. عوامل موثر بر باروری، محیط زیست، شیوه ی زندگی و فعالیت های بدنی همگی توضیحی بر این روند می باشند (۱۰). سرطان سینه در ایران، رتبه ی اول در سرطان های تشخیص داده شده در میان زنان ایرانی را دارا است (۱۳). متاسفانه در ایران مطالعاتی که ویژگی های بالینی پاتولوژیک، مراحل و توزیع سن این بیماری را نشان دهد بسیار اندک است (۵،۶،۱۲). از روش های درمانی رایج برای درمان سرطان سینه می توان به جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی اشاره کرد (۴). هیدروکسی اوره از جمله داروهای ضد سرطانی می باشد که در درمان بدخیمی های خونی، کم خونی سلول داسی شکل، میلوپروریفلاتیو، سرطان سینه و دیگر بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرد (۸،۹،۱۶). استفاده از هیدروکسی اوره در دراز مدت با واکنش های نامطلوب خونی و پوستی مانند

آدرس نویسنده مسئول : گروه بیوتکنولوژی- گروه مهندسی شیمی- دانشکده فنی و مهندسی-دانشگاه علوم و تحقیقات تهران
Email : maedehkoohi@gamil.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۳۰

Archive of SID
www.SID.ir

هیپرپیگمانتاسیون[1]، رنگدانه ی اسکلرال[2] آلوپسی[3] و آتروفی پوست[4] همراه است (۳،۱۴). روش های مختلفی برای کاهش عوارض جانبی و افزایش بازده درمان بکار گرفته شده است. فن آوری نانو انقلابی در تشخیص و درمان سرطان به وجود آورده است (۱۱). حامل های درمانی در مقیاس نانو برای استفاده بالینی مورد استفاده قرار می گیرند که لیپوزوم یکی از این حامل ها می باشد. لیپوزوم ها وزیکول های دولایه ای فسفولیپیدی و متحدالمرکز هستند که دارای دو ناحیه آبدوست و آبگریز می باشند. داروهای آبدوست در محفظه ی آبی و داروهای آبگریز و دوگانه دوست در فسفولیپیدهای دولایه ای قرار می گیرند (۷). هدف از این مطالعه، نانولیپوزومه کردن داروی هیدروکسی اوره به منظور بهبود شاخص درمانی و کاهش عوارض جانبی آن می‌باشد.

مواد و روش ها

ساخت داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده

برای ساخت نانولیپوزوم، فسفاتیدیل کولین (سیگما) و کلسترول (سیگما) (به نسبت ۱۰ به۱) در ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول (مرک) ۹۸ درصد حل شد (دمای محیط، ۳۰۰ دور بر دقیقه)، تا یک سوسپانسیون شفاف و زرد رنگ حاصل شود. برای ساخت داروی نانولیپوزومه شده، اتانول حاصل با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور (دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، ۹۰ دور بر دقیقه) (ساخت شرکت Heidolph آلمان) حذف شد، سپس به میزان مشخص سرم فیزیولوژی و هیدروکسی اوره (سیگما) (۸ میلی گرم) را به ژلوز حاصل اضافه کرده و مخلوط گردیدند. (دمای محیط، ۲۴ ساعت، ۳۰۰ دور بر دقیقه). برای این فرمولاسیون، کنترلِ بدون دارو نیز تهیه شد. سپس محلول ها به مدت ۵ دقیقه با استفاده امواج صوت هموژنیزه شدند (مدل Bandelin Sonorex Digitec, ۶۰ Hz).

تعیین اندازه نانو ذره

با استفاده از دستگاه زتاسایزر(مدل Malvern Instruments Ltd) میانگین قطر نانولیپوزوم ها اندازه گیری شد.

درصد انکپسولاسیون

جهت بررسی مقدار هیدروکسی اوره ی انکپسوله شده، یک میلی لیتر (۰/۳۲ میلی گرم) از فرمولاسیون هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت زمان ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV – ۱۶۰۱PC شرکت SHI-MADZU) جذب نوری محلول رویی داروی نانولیپوزومه شده در طول موج ۲۱۴ نانومتر سنجیده شد. پس از آن با استفاده از فرمول۱، بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید.

انکپسولاسیون بازده درصد= (شده انکپسوله داروی درصد)/(دارو کل) ×صد

برای رسم منحنی استاندارد غلظت های متفاوتی از هیدروکسی اوره تهیه شد و مقدار جذب با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۱۴ نانومتر سنجیده شد.

بررسی رهایش دارو

برای بررسی رهایش دارو از نانولیپوزوم ها، مقدار ۰/۳۲ میلی گرم از فرمولاسیون هیدروکسی اوره نانولیپوزومه شده، در داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین با pH ۴.۷ ، در حالی که بر روی مگنتیک استایرر قرار داشت، قرار داده شد (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد). سپس میزان داروی آزاد شده در بافر PBS به روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۱۴ نانومتر اندازه گیری و درصد رهایش هیدروکسی اوره با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

پس از کشت رده سلولی MCF-۷ در محیط کشت RPMI (اینویتروژن)، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰۰ سلول MCF-۷ (ساخت انستیتو پاستور ایران) در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت CO_2 ۵٪ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها برداشته شد و غلظت های مختلف از فرمولاسیون داروی

1- Hyperpigmentation
2- Scleral pigmentation
3- Alopecia
4- Skin atrophy
5- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Archive of SID

www.SID.ir

نانولیپوزومه شده و کنترل آن بر روی سلول ها ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه گردید، سپس محلول رویی برداشته و محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون، رنگ ارغوانی (مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول های زنده در ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (مرک) حل شد. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری (اسپکتروفوتومتر مدل Power Eave XS) اندازه گیری و میزان IC۵۰ با استفاده از برنامه pharm محاسبه گردید.

یافته ها

تعیین اندازه ی نانو ذره

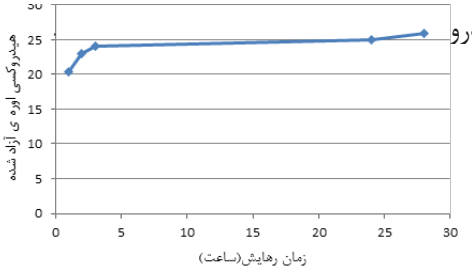
میانگین قطر نانولیپوزوم ها برای نمونه ی هیدروکسی اوره نانولیپوزومه شده ۴۰۲/۵ نانومتر به دست آمد.

درصد انکپسولاسیون

درصد انکپسولاسیون با توجه به منحنی استاندارد دارو محاسبه شد. با توجه به فرمول بازده بارگذاری (فرمول۱)، مقدار داروی انکپسوله نشده محاسبه شد و با توجه به مقدار اولیه دارو در هر میلی لیتر از فرمولاسیون تهیه شده، درصد داروی انکپسوله شده برای داروی لیپوزومه شده ۷۰/۸۳۶ بدست آمد.

بررسی رهایش دارو

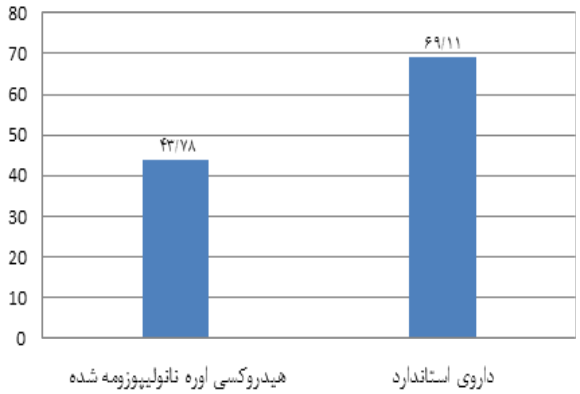
مقدار هیدروکسی اوره ی آزاد شده از فرمولاسیون دارویی تهیه شده در بافر PBS طی بازه های زمانی ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۲۴ ساعت و ۲۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد. مقدار داروی آزاد شده در بافر PBS برای فرمولاسیون هیدرو



منحنی۱- میزان رهایش هیدروکسی اوره از فرمولاسیون هیدروکسی اوره لیپوزومه شده در بافر PBS.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده در غلظت های مختلف به کمک روش MTT بررسی شد که نتایج در نمودار۲ آورده شده است.



نمودار۱- مقادیر IC۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر) برای فرمولاسیون های هیدروکسی اوره ی نانولیپوزومه شده و هیدروکسی اوره استاندارد.

بحث

دارورسانی هدفمند نوعی از درمان نوین برای درمان انواع بیماری ها است و بخشی از آن مبتنی بر دارورسانی با استفاده از نانوحامل های لیپیدی است. یکی از انواع این نانوحامل، لیپوزوم است. در سال ۱۹۹۶ نتایج پژوهش دیمیتری کرپوتین و همکاران منجر به ساخت ایمونولیپوزوم های حاوی داروهای ضد سرطان شد (۱). در سال ۲۰۰۱، کرالد و همکاران میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را نسبت به داروی دوکسوروبیسین استاندارد بر روی قلب مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم به مقدار قابل توجهی کمتر است (۱۱). در سال ۲۰۱۲ چی چانگ چانگ و همکاران در پژوهش خود که اثر داروی کرکومینوئید[1] لیپوزومه شده را بر روی رده های سلولی MCF-۷ و MDA-MB-۴۳۵S و MDA-MB-۲۳۱ بررسی کردند، به این نتیجه رسیدند که مقدار IC۵۰ داروی کرکومینوئید لیپوزومه شده از داروی لیپوزومه نشده کمتر است، بنابراین با لیپوزمه کردن این دارو، درصد زنده مانی سلول های سرطانی کاهش یافت (۲). در پژوهش کنونی، آزمایش

1 - Curcuminoid

Archive of SID
www.SID.ir

هایی جهت سنجش میزان سایتوتوکسیسیتی سلولی داروی هیدروکسی اوره به فرم استاندارد و مقایسه آن با شکل لیپوزومه ی دارو با روش MTT طراحی و اجرا شد. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر لیپوزوم ها با استفاده از دستگاه زتاسایز، اندازه ذرات را در ابعاد نانو تایید کرد. همچنین بررسی میزان بارگذاری دارو نشان داد که مقدار انکپسولاسیون هیدروکسی اوره نانولیپوزومه شده ۷۰/۸۳۶٪ می باشد که در حد قابل قبولی می باشد. برای اینکه الگوی داروی آزاد شده در زمان های مختلف مشخص شود از روش دیالیز استفاده شد. نانوذرات فرمولاسیون تهیه شده برای انتشار هیدروکسی اوره انکپسوله شده تحت شرایط in vitro مشخص شد (نمودار ۱). آزاد سازی هیدروکسی اوره از نانوذرات شامل فاز اولیه انتشار سریع و در ادامه ی آن فاز انتشار کند بود. با توجه به نمودار ۱ می توان گفت که بیشترین میزان رهایش دارو در ۲ ساعت اول رخ داده است. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از نانولیپوزوم ها نقش بسزایی را در رهایش دارو دارد، زیرا دارو زمان بیشتری را صرف عبور از لایه های فسفولیپیدی می کند. اثر سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون داروی نانولیپوزومه شده با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش فرمولاسیون نانولیپوزومی فاقد دارو، اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی MCF-۷ نشان نداد. نتایج نشان داد که داروی نانولیپوزومه شده مقدار IC۵۰ کمتری را نسبت به نمونه ی هیدروکسی اوره استاندارد دارد و این بدان معنی است که میزان توکسوسیتیه دارو افزایش یافته است.

تشکر و قدردانی

تمامی مراحل آزمایشگاهی در بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. بدینوسیله از جناب آقای سهیل قاسمی و خانم ها شقایق امیری، مهدیه تقوی و مریم فرحناک که با تمام وجود همکاری لازم را داشته اند، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

(1) Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K, Tkaczuk K, Park YC, Lee LW. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared with Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. J Clin Oncol. 2001; 19(5):1444-54.

(2) Chang CC, Yang WT, KO SY, HSU YC, Liposomal Curcuminoids for Transdermal Delivery: Iontophoresis Potential for Breast Cancer Chemotherapeutics. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2012; Vol. 7:59 - 71

(3) Daoud MS, Gibson LE, Pittelkow MR. Hydroxyurea Dermopathy: a Unique Lichenoid Eruption Complicating Long-term Therapy with Hydroxyurea. J Am Acad Dermatol. 1997; 36(2 Pt 1):178-82.

(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) Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast Cancer in Iran: a Review of 903 Case Records. Public Health. 2000; 114(2):143-5.

(6) Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast Cancer in Iran: Results of a Multi-Center Study. Asian Pac J Cancer Prev. 2004; 5(1):24-7.

(7) Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. Sterically Stabilized Anti-HER2 Immunoliposomes: Design and Targeting to Human Breast Cancer Cells In Vitro. Biochemistry. 1997; 36(1):66-75.

(8) Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Bass EB, Segal JB. Systematic Review: Hydroxyurea for the Treatment of Adults with Sickle Cell Disease. Ann Intern Med. 2008; 148(12):939-55.

(9) Meo A, Cassinerio E, Castelli R, Bignamini D, Perego L, Cappellini MD. Effect of Hydroxyurea on Extramedullary Haematopoiesis in Thalassaemia Intermedia: Case Reports and Literature Review. Int J Lab Hematol. 2008; 30(5):425-31.

(10) Pathy NB, Yip CH, Taib NA, Hartman M, Saxena N, Iau P, Bulgiba AM, Lee SC, Lim SE, Wong JE, Verkooijen HM; Singapore-Malaysia Breast Cancer Working Group. Breast cancer in a Multi-Ethnic Asian Setting: Results from the Singapore-Malaysia Hospital-Based Breast Cancer Registry. Breast. 2011; 20 Suppl 2:S75-80.

(11) Riaz M. Liposomes Preparation Methods. Pak J Pharm Sci. 1996; 9(1):65-77.

(12) Rezaianzadeh A, Peacock J, Reidpath D, Talei A, Hosseini SV, Mehrabani D. Survival Analysis of 1148 Women Diagnosed with Breast Cancer in Southern Iran. BMC Cancer. 2009; 9:168.

(13) Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer Occurrence in Iran in 2002, an International Perspective. Asian Pac J Cancer Prev. 2005; 6(3):359-63.

(14) Sirieix ME, Debure C, Baudot N, Dubertret L, Roux ME, Morel P, Frances C, Loubeyres S, Beylot C, Lambert D, Humbert P, Gauthier O, Dandurand M, Guillot B, Vaillant L, Lorette G, Bonnetblanc JM, Lok C, Denoeux JP. Leg ulcers and Hydroxyurea: Forty-One Cases. Arch Dermatol. 1999; 135(7):818-20.

(15) Vo AT, Millis RM. Epigenetics and Breast Cancers. Obstet Gynecol Int. 2012; 2012:602720.

(16) Zaccaria E, Cozzani E, Parodi A. Secondary Cutaneous Effects of Hydroxyurea: Possible Pathogenetic Mechanisms. J Dermatolog Treat. 2006; 17(3):176-8.

Archive of SID

www.SID.ir