مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره سیزدهم، زمستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر سمیت آرتیمیزینین نانولیپوزومه شده بر رده ی سلولی سرطان سینه

ندا دادگر[۱*]، سید ابراهیم علوی[۲]، مائده کوهی مفتخری اصفهانی[۲]، محسن چیانی[۲]، سپیده ترابی[۳]، عظیم اکبرزاده[۲]

[۱] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۲] بخش نانوبیوتکنولوژی، پایلوت، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران ، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: در سال های اخیر نانوحامل ها تحول شگرفی را در درمان بسیاری از بیماری ها بوجود آورده اند. در میان این نانوحامل ها، لیپوزوم ها از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. آرتیمیزینین از داروهای مورد استفاده در درمان سرطان سینه می باشد. این دارو علاوه بر خواص درمانی دارای عوارض جانبی هم می باشد. به همین دلیل ما با استفاده از لیپوزوم سعی کردیم از عوارض جانبی کم کنیم.

مواد و روش ها: برای تهیه آرتیمیزینین نانولیپوزومه شده نسبت های مشخصی از فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ و آرتیمیزینین با یکدیگر ترکیب گردید. سپس با استفاده از دستگاه زتاسایزر میانگین قطر آرتیمیزینین نانولیپوزومه شده به دست آمد. بازده بارگذاری برای این فرمولاسیون با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بدست آمد. با استفاده از روش دیالیز میزان رهایش آرتیمیزینین از فرمولاسیون تهیه شده طی ۲۴ ساعت بررسی شد. میزان سایتوتوکسیسیتی آرتیمیزینین نانولیپوزومه ی پگیله شده با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میانگین قطر نانولیپوزوم ها ۴۵۵ نانومتر گزارش شد. بازده بارگذاری و میزان رهایش دارو از نانولیپوزوم های پگیله شده برای فرمولاسیون آرتیمیزینین نانولیپوزومه ی پگیله شده به ترتیب ۳/۵±۹۱/۶۲ و ۵/۱۷ درصد گزارش شد. نتایج نشان داد که IC۵۰ فرمولاسیون تهیه شده نسبت به داروی استاندارد مقدار کمتری را داراست.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که با نانولیپوزومه و پگیله کردن داروی آرتیمیزینین میزان سایتوتوکسیتی این دارو نسبت به داروی استاندارد افزایش می یابد.

کلمات کلیدی: نانولیپوزوم، آرتیمیزینین، سرطان سینه، پگیله کردن

مقدمه

فن آوری نانو، انقلابی را در تشخیص و درمان سرطان به وجود آورده است (۱۵). حامل های درمانی مختلفی در مقیاس نانو برای استفاده بالینی مورد استفاده قرار می گیرند. نانو حامل ها باعث افزایش حلالیت دارو، کنترل رهایش دارو، کاهش عوارض جانبی و بهبود توزیع زیستی دارو می شوند (۳). در میان این نانوحامل ها، دارورسانی مبتنی بر چربی(لیپید)، در دهه های اخیر بیشتر مورد توجه بوده است (۱۴). یکی از این حامل های دارویی، لیپوزوم ها می باشد. 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 دولایه لیپیدی می باشد (۸،۱۱). از راه های درمان سرطان سینه می توان به شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی اشاره کرد (۶). یکی از داروهای مورد استفاده در درمان سرطان سینه، آرتیمیزینین می باشد. آرتیمیزینین یک لاکتون ترپن جدا شده از برگ درخت درمنه است (۵،۹). مولکول آرتیمیزین باعث صدمه ی مولکولی و در نهایت می‌تواند منجر به مرگ سلول شود (۱،۵). این دارو علاوه بر خواص درمانی باعث بروز عوارض جانبی در طولانی مدت می شود. یکی از موارد بحث برانگیز در نانودرمانی کاهش و یا حذف کامل عوارض جانبی می باشد. فناوری نانو دارورسانی یکی از روش های مدرن و موفق در کاهش این عوارض می باشد. در این مطالعه به منظور بهبود اثر درمانی و کاهش عوارض جانبی،

آدرس نویسنده مسئول : تهران- دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- دانشکده فنی و مهندسی- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
Email :nedadadgar89@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۲
تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۴

Archive of SID
www.SID.ir

داروی آرتیمیزینین نانولیپوزومه و پگیله شد.

مواد و روش ها

مواد

آرتیمیزین، فسفاتیدیل کولین، کلسترول، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ (PEG ۲۰۰۰) و محلول MTT [1](۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از شرکت سیگما[2] خریداری شد. محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از شرکت اینویتروژن[3] خریداری شد. اتانول و ایزوپروپانول از شرکت مرک[4] و سلول MCF۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

تهیه داروی نانولیپوزومه و پگیله

فسفاتیدیل کولین، کلسترول و PEG ۲۰۰۰ (نسبت ۱:۵:۱۴) در مقدار مشخصی اتانول ۹۸٪ حل شد (دمای محیط، ۴۰۰ دور بر دقیقه). سپس ۱ میلی گرم آرتیمیزین اضافه و با کمک همزن مغناطیسی مخلوط گردید (دمای محیط، ۱۵ دقیقه، ۳۰۰ دور بر دقیقه). اتانول، به کمک روتاری اواپوراتور (شرکت هیدلف[5] آلمان) تبخیر گردید و ژلوز حاصله در ۱۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید. سپس فرمولاسیون تهیه شده به مدت ۵ دقیقه سونیکه (Bandelin Sonorex Digitec، ۶۰ هرتز) شد.

اندازه گیری نانوذرات

یک میلی گرم از فرمولاسیون تهیه شده در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید و پس از اندازه گیری جذب آن در ۶۳۰ نانومتر، میانگین قطر نانولیپوزوم ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Malvern Instruments Ltd) سنجیده شد.

بازده انکپسولاسیون

برای محاسبه مقدار داروی محصور شده، یک میلی گرم از فرمولاسیون تهیه شده با سرعت ۵۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV – ۱۶۰۱PC شرکت SHIMADZU) جذب نوری سوپرناتانت فرمولاسیون تهیه شده در طول موج ۱۹۵ نانومتر سنجیده شد. پس از آن با استفاده از فرمول۱، بازده انکپسولاسیون محاسبه شد.

فرمول ۱

$$\frac{\text{مقدار واقعی داروی محصور شده}}{\text{مقدار تئوری داروی محصور شده}} \times 100$$

بررسی رهایش دارو

برای بررسی الگوی رهایش دارو از فرمولاسیون نانولیپوزومه ی پگیله، مقدار ۱ میلی گرم از فرمولاسیون تهیه شده، درکیسه دیالیز ریخته شد و در ۲۵ میلی لیتر بافر PBS با pH ۷.۴ در حالی که بر روی مگنتیک استایرر قرار داشت، قرار داده شد (دمای محیط، ۴۸ ساعت). سپس میزان داروی آزاد شده در بافر PBS طی بازه های زمانی مختلف به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۱۹۵ نانومتر اندازه گیری و درصد رهایش دارو با استفاده از منحنی استاندارد دارو به دست آمد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی

پس از کشت رده سلولی MCF۷، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول بود در چاهک های پلیت 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 برداشته و غلظت های مختلف از فرمولاسیون آرتیمیزینین نانولیپوزومه و پگیله شده و کنترل آن و همچنین داروی آرتمیزینین استاندارد بر روی سلول ها ریخته شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه شد. پس از آن محلول رویی را بیرون ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از 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 حل شد. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری (اسپکتروفوتومترمدل Power Eave XS) و میزان IC_{50} با استفاده از برنامه pharm محاسبه گردید.

1 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
2 Sigma
3 Invitrogen
4 Merck
5 Heidolph

Archive of SID

www.SID.ir

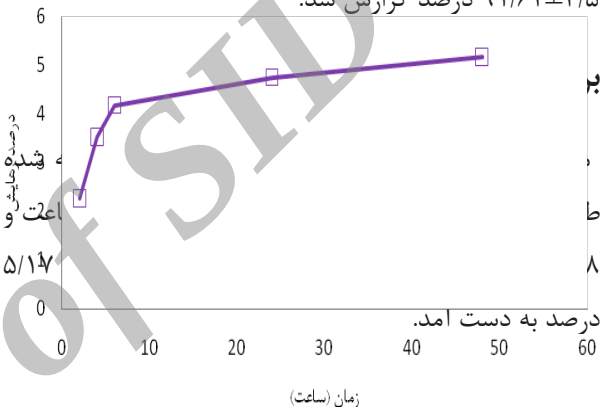
یافته ها

اندازه گیری نانوذرات

میانگین قطر آرتمیزینین نانولیپوزومه ی پگیله با استفاده از دستگاه زتاسایزر ۴۵۵ نانومتر بدست آمد.

بازده انکپسولاسیون

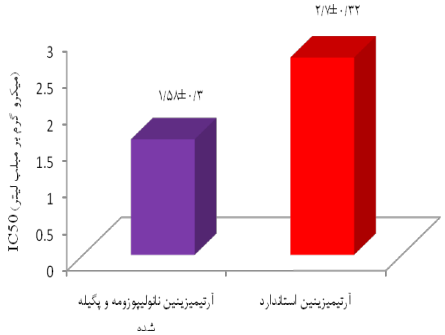
جهت بدست آوردن بازده انکپسولاسیون (EE٪) فرمولاسیون آرتمیزینین نانولیپوزومه ی پگیله با توجه به فرمول ۱ مقدار آرتمیزینین انکپسوله نشده بدست آمد، که با توجه به مقدار داروی اولیه درصد داروی انکپسوله شده به دست آمد که ۹۱/۶۲±۳/۵ درصد گزارش شد.



شکل ۱: الگوی رهایش آرتمیزینین از فر مولاسیون داروی نانولیپوزومه ی پگیله

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی

میزان سمیت دارو در غلظت های مختلف بر اساس تکنیک MTT بررسی شد. مقدار IC۵۰ برای فرمولاسیون داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده و داروی استاندارد با استفاده از برنامه ی Pharm بدست آمد که نتایج در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل۳: مقادیر IC۵۰ (µg/ml) برای فرمولاسیون های داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده و داروی استاندارد

بحث

در چند دهه ی اخیر تلاش گسترده ای در جهت درمان سرطان سینه شده است. یکی از داروهای کاربردی در درمان سرطان ها آرتیمیزین است. بررسی ها نشان داده است که استفاده روزانه آرتیمیزین می تواند در پیشگیری و یا جلوگیری از توسعه سرطان سینه کمک کند (۷). آرتیمیزین می تواند از طریق مکانیسم های مختلف بر رشد سرطان اثرگذار باشد که یکی از این مکانیسم‌ها باعث مرگ سلول های پیش سرطانی و در مکانیسم دیگر به طور مستقیم باعث مرگ سلول های سرطانی می شود (۶). این دارو به دلیل داشتن اثرات آنتی آنژیوژنیک، ضد التهابی، ضد متاستاز و اثر مهارکنندگی رشد، کاندید مورد توجهی برای استفاده در شیمی درمانی است (۷). تکنولوژی لیپوزوم پگیله شده یک رویکرد جدید برای بهبود خواص فارماکوکینتیکِ پروتئین های درمانی است. لیپوزوم های پگیله شده به عنوان حامل های با پروتئین غیرکووالان متصل شده، اما با ویژگی بالا در سطح خارجی استفاده می شوند. بر خلاف روش هایی مثل جهش زایی، پگیلاسون مستقیم، یا همجوشی به پروتئین حامل، تکنولوژی لیپوزوم پگیله توالی اسید آمینه ی یک پروتئین را تغییر نمی‌دهد و دلبستگی کووالانسی عامل های برقراری ثبات را ایجاد نمی کند (۴). در سال ۲۰۰۵، چن و همکاران اثر آدریامایسین محصور در لیپوزوم را از طرق مختلف بر مدل های منتشر شده ی سرطان سینه تجویز شده بودند، مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دهنده ی جذب درصد بالایی از آدریامایسین محصور در لیپوزوم توسط سلول های توموری بود و همچنین نتایج نشان داد که میزان توکسیسیته ی دارو به شدت افزایش یافته است (۳). در سال ۲۰۰۱، کرالد و همکاران میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین محصور شده در لیپوزوم را نسبت به داروی دوکسوروبیسین آزاد بر روی قلب مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد سمیت قلبی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم به مقدار قابل توجهی کاهش یافت (۱۲). بررسی ها نشان داده شده است که داروهای پگیله شده مدت طولانی تری را در گردش خون به صورت پایدار باقی می مانند (۱۰). در این مطالعه اثر سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون آرتمیزینین نانولیپوزومه ی پگیله مورد بررسی قرار گرفت. پس از ساخت لیپوزوم ها به روش

Archive of SID
www.SID.ir

تبخیر فاز معکوس میانگین قطر نانوذرات اندازه گیری شد، که نتایج حاصل از آن اندازه ی لیپوزوم ها را در ابعاد نانو تایید کرد (۱۳). همچنین چون پلی اتیلن گلایکول ماهیت آبدوستی و نفوذ پذیری بالایی دارد، به لایه های لیپوزمی نفوذ کرده و آن ها را به هم فشرده می‌سازد بنابراین نانوذرات ساخته شده نسبت به لیپوزوم، از قطر کمتری برخوردار می باشند. همانطور که نتایج نشان داد میزان قابل توجهی از آرتیمیزینین درون نانولیپوزوم ها محصور شدند. همچنین به نظر می رسد از آنجا که پلی اتیلن گلایکول، نانولیپوزوم محتوی آرتیمیزینین را می پوشاند، خروج دارو را کندتر کرده و باعث می شود ماندگاری دارو بیشتر شود. همچنین پلی اتیلن گلایکول داروهای نامحلولی مانند آرتیمیزینین را به صورت محلول در می آورد که این امر سبب افزایش انکپسولاسیون می گردد. اثر سیتوتوکسیک فرمولاسیون تهیه شده با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فرمولاسیون نانولیپوزومه ی پگیله IC_{50} ی کمتری را نسبت به داروی استاندراد دارد و این نشان دهنده ی آن است که سمیت فرمولاسیون تهیه شده نسبت به فرم استاندارد دارو بیشتر است. برای توجیه این پدیده می توان گفت که پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش پایداری و کم شدن رهایش دارو می شود.

سپاسگذاری

تمامی مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. بدینوسیله از جناب آقای سهیل قاسمی و خانم زهرا صفاری که با تمام وجود همکاری لازم را داشته اند، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. Biointerphases. 2007; 2 (4): 17-71.
2. Chen JH, Ling R, Yao Q, Li Y, Chen T, Wang Z, Li KZ. Effect of Small-Sized Liposomal Adriamycin Administered by Various Routes on a Metastatic Breast Cancer Model. Endocr Relat Cancer, 2005; 12 (1):93-100.
3. Dass CR, Choong PF. Carrier-Mediated Delivery of Peptidic Drugs for Cancer Therapy. Peptides. 2006; 27 (11): 3020- 3028.
4. Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in Blood and Enhanced Uptake by Tumors. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988; 85: 6949-6953.
5. 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.
6. Lai H, Singh NP. Oral Artemisinin Prevents and Delays the Development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-Induced Breast Cancer in the Rat. Cancer Lett. 2006; 231 (1): 43-48.
7. Lai HC, Singh NP, Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. Invest New Drugs. 2012.
8. Latif N, Bachhawat BM. Liposomes in Immunology. J Biosci, 1984; 6:491– 502.
9. Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. Developments in Liposomal Drug Delivery Systems. Expert Opin Biol Ther. 2001; 1 (6): 923- 947.
10. Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T. Anticancer Properties of Artemisinin Derivatives and Their Targeted Delivery by Transferrin Conjugation. Int J Pharm, 2008; 354 (1-2): 28-33.
11. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. Nature Nanotechnology, 2007; 2: 751-760.
12. Riaz M. Liposomes preparation methods. Pak J Pharm Sci, 1996; 9 (1):65-77.
13. Woodley JF. Liposomes for Oral Administration of Drugs. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1985; 2 (1):1-18.
14. Xiang L, Yan Z, Wang G, Liu W, Tang K, Liao Z. Relative Expression of Genes Involved in Artemisinin Biosynthesis and Artemisinin Accumulation in Different Tissues of Artemisia Annua. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2012; 37 (9): 1169-1173.
15. 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. International Journal of Nanomedicine. 2010; 5: 581-91.

Archive of SID

www.SID.ir