Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم ، شماره بیست و یکم - زمستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بارگذاری داروی سیس پلاتین در نانوذرات لیپوزومی و بررسی کارایی آن روی رده سلولی HepG2 «کارسینومای کبد انسانی »

محمدعلی قنبری[۱]، حسن ابراهیمی شاهم آبادی[۲]، زهرا صفاری [۱]، عظیم اکبرزاده*[۱]

۱. بخش پایلوت بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران – تهران – ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف : سرطـان کبد از کشنده ترین سرطان های دنیـــاست که هر ســاله تعداد زیادی را به کـــام مرگ می کشاند و در حال حاضر ۶ ٪ کل سرطان های جهان را تشکیل می دهد . داروی ضد تومور سیس پلاتین در کنار خاصیت کشندگی بالای سلول های سرطانی ، دارای عوارض جانبی متعدد و بعضی خطرناک است . به همین دلیل به جهت کاهش عوارض جانبی و در کنار آن افزایش کشندگی سلول های سرطانی ، سیستم های دارورسانی در مقیاس نانو پیشنهاد می شود . لیپوزوم یکی از حامل های دارویی مناسب و لیپوزومه کردن یکی از روش های نوین در داروسانی است .

مواد و روش ها : برای تهیه نانولیپوزوم، نسبت مشخصی از لسیتین، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول ۳۳۵۰ با یکدیگر مخلوط شد و سپس داروی سیس پلاتین به آن اضافه شد. میانگین قطر سیس پلاتین نانولیپوزومه شده با استفاده از دستگاه زتا سایز محاسبه شد. به علاوه اثر سایتوتوکسیسیتی داروی نانولیپوزومه شده با استفاده از روشMTT روی رده سلولی HepG2 بررسی گردید و مقدار IC50 توسط برنامه pharm محاسبه شد .

یافته ها: میانگین قطر سیس پلاتین نانولیپوزومه پگیله با کمک دستگاه زتا سایزر اندازه گیری شد که ۴۷۰ نانومتر به دست آمد . مقدار IC50 پس از انجام آزمون MTT افزایش ۳۳ درصدی اثر سایتوتوکسیسیتی نانودارو نسبت به داروی آزاد را نشان داد .

نتیجه گیری : این بررسی نشان داد که اثر سایتوتوکسیسیتی داروی نانولیپوزومه پگیـله شده بیشتر از داروی آزاد می باشد و پیشنهاد می شود این پژوهش روی مدل های حیوانی نیز آزمایش شود .

کلمات کلیدی: سیستم های دارورسانی بر اساس نانو، نانولیپوزوم، سیس پلاتین، رده سلولی , HepG2 آزمون , MTT IC50

مقدمه

از بزرگترین تهدیدکننده های سلامت در نقاط مختلف جهان می توان به بیماری سرطان اشاره کرد (۲)سرطان کبد ششمین سرطان شایع در جهان و یکی از کشنده ترین سرطان های گوارشی است و از آنجا که در مراحل پیشرفته شناسایی می شود چهارمین سرطان کشنده می باشد(۳)علت واقعی ابتلا به سرطان کبد در ایران هنوز شناخته شده نیست ولی ۸۰ ٪ موارد دارای هپاتیت نوع B هستند (۱۳ ، ۱۰) از روش های درمانی رایج برای درمان سرطان می توان به جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی اشاره کرد (۲)

داروی سیس پلاتین یا Platinol از پرکاربردترین دارو های مورد استفاده در درمان سرطان با روش شیمی درمانی می باشد. در سرطان کبد، سر و گردن، ریه، تخمدان، لنفوم، مری، تومور سلول های زایا(Germcelltumor) و به ویژه در سرطان بیضه کاربرد دارد . عوارض جانبی داروی سیس پلاتین شامل ریزش مو ، خشکی پوست ، سرکوب سیستم ایمنی ، سمیت کلیه (nephrotoxicity) ، سمیت اعصاب محیطی(neurotoxicity) ، سمیت گوش (ototoxicity) , می باشد (۲). راه کار های متعددی برای کاهش عوارض جانبی و در عین حال افزایش بازده درمان به کار گرفته شده است .

فناوری نانو انقلابی در تشخیص و درمان سرطان به وجود آورده است(۱) . 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 متحدالمرکزی هستند که دارای دو ناحیه آب دوست و آب گریز می باشند. داروهای

نویسنده مسئول:
بخش پایلوت بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران – تهران – ایران

پست الکترونیکی: azimakbarzadeh1326@gmail.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۰۷/۱۴
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۱۰/۰۷

www.SID.ir

Archive of SID

آب دوست در محفظه آبی و داروهای آب گریز و دوگانه دوست در فسفولیپیدهای دولایه ای قرار می گیرند(۵)

هدف از این مطالعه، نانولیپوزومه و پگیله کردن داروی سیس پلاتین به منظور بهبود شاخص درمانی آن می باشد.

مواد و روش ها

مواد

ایزوپروپانول و اتانول از شرکت مرک خریداری شد. کلسترول، لسیتین و محلول MTT (۰/۵میلی گرم بر میلی لیتر) از شرکت سیگما خریداری گردید. داروی سیس پلاتین به صورت ویال حاوی محلول ساخت کشور کره استفاده شد. محیط کشتRPMI1640از شرکتInvitrogenخریداری شد. رده سلولیHEPG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

ساخت داروی نانولیپوزومه ی پگیله شده

برای ساخت نانوپیپوزوم ، مقادیر ۰/۲ گرم لسیتین ، ۰/۰۵۸ گرم کلسترول ، ۰/۰۷۲۵ گرم پلی اتیلن گلیکول ۳۳۵۰ به صورت دقیق توزین شد ، سپس در ۳۰ میلی لیتر اتانول ۹۸ % حل شد و ۲ ساعت روی هیتر قرار داده شد تا فرآیند حل شدن کامل شود. وقتی نمونه ها کامل حل شد از روی استیرر برداشته شد و جهت استخراج حلال آلی (اتانل)، در دستگاه روتاری اوپراتور – در شرایط دمایی ۵۰ درجه سانتی گراد با دور ۹۰ دور بر دقیقه – قرار داده شد. پس از خروج کامل الکل مقداری از آن برداشته شد و ۲/۸ میلی لیتر داروی سیس پلاتین و ۸/۱۱ میلی لیتر PBS به باقی مانده آن اضافه شدو با قرار دادن آن بر روی شیکر ، اجازه داده شد تا به طور کامل ژلوز حاصل شده در بافر فسفات حل گردد. پس از حل شدن کامل نمونه ها در بافر، سوسپانسیون کلوئیدی شکل به مدت ۵ دقیقه در حمام سونیک قرار داده شد (مدلBandelinSonorexDigitec, 60Hz)تا اندازه نانولیپوزوم ها کاهش یافته و بازده بارگذاری دارو افزایش یابد سپس به داخل ویال های شیشه ای منتقل شد.برای این فرموالسیون، کنترلِ بدون دارو نیز تهیه شد.

تعیین اندازه نانو ذره

با استفاده از دستگاه زتاسایزر (مدلMalvernInstrumentsLtd) میانگین قطر نانولیپوزوم ها اندازه گیری شد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو

صد میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰۰ سلولHepG2در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و در انکوباتور دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و تحت ۵٪CO2 به مدت۲۴ ساعت قرار داده شد ، سلول ها مجدد رشد کرده و به ته چاهک ها بچسبند.

حال باید آماده سازی نمونه ها انجام شود. بدین جهت از فرمولاسیون لیپوزومی شاهد و بارگذاری شده با دارو، و هم چنین از نمونه داروی آزاد سیس پلاتین ، غلظت مشخصی برداشته و جهت رقیق سازی توسط محیط کشت، نمونه ها به پلیت های ۲۴ خانه ای منتقل شد . حال ۳ نمونه شاهد، حاوی دارو و داروی آزاد هم غلظت می باشند. سپس در پلیت های ۲۴ خانه ای از هر نمونه به نسبت ۲ : ۱ با محیط کشت رقیق سازی انجام داده شد . عمل رقیق سازی ۱۰ بار انجام شد. پس از آن، پلیت ۹۶ خانه ای شامل سلول سرطانی و محیط کشت از انکوباتور خارج شد .

از آنجا که سلول های HepG2، به ته چاهک ها چسبیده بودند، مایع روئی خارج شده و در نتیجه سلول های سرطانی در چاهک ها باقی ماندند. حال نمونه های حاضر در پلیت های ۲۴ خانه ای، به پلیت ۹۶ خانه ای حاوی سلول سرطانی، انتقال داده شد . سپس پلیت ۹۶ خانه ای به مدت ۲ شبانه روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت پلیت ۹۶ خانه ای از انکوباتور خارج شده و محلول روئی آن خارج شده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر یک از چاهک ها منتقل گردید. جهت تهیه محلول، MTT با غلظت۵ ،۰/mg/ml ۵۰ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰۰ میلی لیترPBS حل گردید .

سپس پلیت ۹۶ خانه ای مجدد به انکوباتورCO2در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. پس از مدت زمان ۳ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج شده و مایع روئی خارج گردید. سپس جهت حل نمودن فرمازان تولید شده به هر یک از چاهک های حاوی سلول، ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و پلیت را سی دقیقه در دمای اتاق نگاه داشته تا فرمازان به خوبی حل گردد. سپس توسط دستگاه ElisaReader و در طول موج ۵۴۰ نانومتر، میزان جذب اندازه گیری شد .

میزان سمیت و درصد بقاء رده سلولی کشت داده شده با سیس پلاتین و نانو ذرات شاهد و بارگذاری شده، توسط روابط زیر حاصل می شود:

$$\%Viability = ۱ - \frac{meanabsorbaceofdrugtreatedcells}{meanabsorbanceofnegativecontrol} \times ۱۰۰$$

%Cytotoxicity = 100- % Viability

میزانIC50با استفاده از برنامهpharmمحاسبه گردید.

لازم به ذکر است ، مراحل کشت سلول و آزمون MTT سه بار تکرار

www.SID.ir

Archive of SID

شد و نتایج این پژوهش میانگین این سه آزمون می باشد .

آنالیز آماری

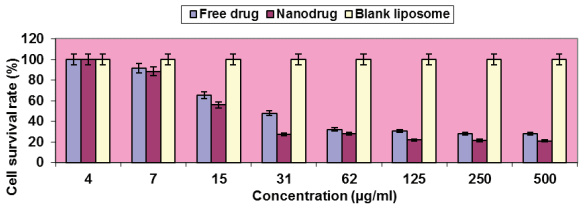
اطلاعات حاصل از مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد آنالیز قرار گرفت و مقادیر $P < ۰/۰۵$ با اهمیت تلقی گردید.

یافته ها

تعیین اندازه ی نانو ذره

میانگین قطر نانولیپوزوم ها برای نمونه ی حاوی سیس پلاتین ۴۷۰ نانومتر محاسبه شد.

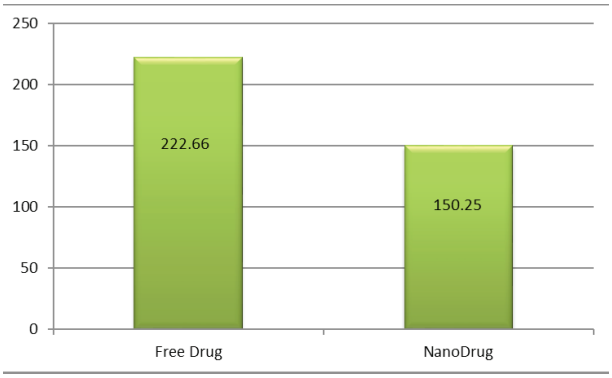
بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو



نمودار (۱): اثرات سایتوتوکسیسیتی دارو و نانوداروی حاوی سیس پلاتین بر روی سلول HepG2 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت میانگین ± ۵ درصد خطا از سه آزمون مستقل بیان شده است.

مقایسه مقدار IC50 فرمولاسیون های لیپوزومی پگیله حاوی دارو با داروی آزاد

نتایج بدست آمده توسط برنامه pharmیعنی تعیین دقیق مقدار IC50 داروی آزاد نسبت به نانو دارو در نمودار شماره ۲ آمده است.



نمودار (۲) : مقایسه مقدار IC50 فرمولاسیون های لیپوزومی پگیله حاوی دارو با داروی آزاد

بحث

داروررسانی هدفمند نوعی از درمان نوین برای درمان انواع بیماری ها است، بخشی از دارو رسانی هدفمند مبتنی بر داروررسانی با استفاده از نانوحامل های لیپیدی است. یکی از انواع این نانوحامل، لیپوزوم است. سیستم‌های دارو رسان لیپوزومی دارای دو ویژگی تحویل غلظت‌های بالای دارو و اجرای هدفمند داروررسانی به سلول می‌باشند. همانند دیگر سیستم‌های داروررسانی، استفاده از لیپوزوم‌ها علاوه بر منفعی که دارد، دارای مضراتی نیز می‌باشند. لیپوزوم‌ها می‌توانند هر دوی داروهای آب دوست و آب گریز را در خود جای دهند، چراکه آن ها درای دولایه آب گریز و هسته داخلی آب دوست هستند. از دیگر مزایای آن می‌توان به سهولت تهیه و حلالیت بالای آن اشاره کرد. هرچند که اشباع کامل سیستم ایمنی و برهم‌کنش با لیپوپروتئین‌ها، نمونه‌هایی از اثرات سمی و مضر آن ها است.

در سال ۱۹۹۶ نتایج پژوهش دیمیتری کرپوتین و همکاران منجر به ساخت ایمونولیپوزوم های حاوی داروهای ضد سرطان شد (۳). در مطالعه ای زو پی و همکارانش سیس پلاتین را بر نانوذرات حاوی سیس پلاتین حساس به pH با هسته پلی ۲[- (ان، ان – دی اتیل آمینو) اتیل متاکریلات] (PDEA) از کوپلیمر PDEA–بلوک – پلی (اتیلن گلیکول) (PEG -PDEA) سنتز کردند. آن ها از نانوذرات با هسته پلی (ε- کاپرولاکتون) (PCL) ساخته شده از کوپلیمر PCL– بلوک –PEG به عنوان مقایسه استفاده کردند. مطالعات سایتوتوکسیسیتی نشان داد نانوذرات سیس پلاتین/ PEG -PDEA سمیت سلولی بیشتری نسبت به سیس پلاتین آزاد و سیس پلاتین کونژوگه شده به ذرات PCL اعمال کرد. (۶)

کیم جی اچ و همکارانش در مطالعه ای نانوذرات گلیکول چیتوزان اصلاح شده با کولانیک اسید ساختند. با استفاده از یک روش دیالیز سیس پلاتین را بر نانوذرات بارگذاری کردند. نانوذراتی با اندازه ۳۰۰ – ۵۰۰ نانومتر به دست آمد. مطالعه های سایتوتوکسیسیتی نشان داد نانوذرات حاوی دارو در محیط برون تنی نسبت به داروی آزاد سمیت کم تری اعمال کردند. این امر به رهش پایین دارو از نانوذرات نسبت داده شد (۳) پدیده ای که در مطالعه های دیگر نیز گزارش شده است، مبنی بر اینکه حامل های پلیمری حاوی دارو سمیت سلولی کم تری نسبت به داروی آزاد دارند (۲)در این مطالعه میسل های پلیمری از کوپلیمر آمفی فیلیک پلی (۲-اتیل – ۲-اکسازولین) و (ε کاپرولاکتون) ساخته شدند و داروی ضد سرطان پاکلیتاکسل بر روی آن ها بارگذاری شد. نانو داروی حاصل نسبت به داروی آزاد سایتوتوکسیسیتی کم تری در محیط آزمایشگاه نشان داد. (۲)

در مطالعه دیگری هاملرس آی اچ، سیس پلاتین را در نانوذرات لیپوزومی بارگذاری کردند و کارایی آن را علیه رده های مختلف سلولی مورد بررسی قرار دادند. آن ها از لیپیدهای قطبی ۱،۲ – دی ال اوئیل – اس ان – گلیسرو – ۳ – فسفوکولین و ۱،۲- دی ال

www.SID.ir

Archive of SID

اوئیل – اس ان – گلیسرو – ۳ – فسفوسرین در ساختار لیپوزوم ها استفاده کردند. نشان دادند که خاصیت ضدتوموری نانودارو نسبت به داروی آزاد در بسیاری از رده های سلولی افزایش یافت. (۵)

ژانگ ایکس و همکارانش سیس پلاتین را در نانوذرات لیپوزومی بارگذاری کردند . سپس سایتوتوکسیسیتی آن را در محیط آزمایشگاه بر روی سلول سرطان ریهA549مورد بررسی قرار دادند. آن ها مشاهده کردند که سایتوتوکسیسیتی نانودارو ۲/۳۵ برابر نسبت به حالت آزاد افزایش یافته است. آن ها از روش تبخیر فاز معکوس برای ساخت نانوذرات استفاده کردند و هم چنین در ساختار لیپوزوم آن ها، ترکیب پلی اتیلن گلیکول – ا، ۲- دی استروئیل – اس ان – گلیسرو – ۳ – فسفواتانول آمین وجود داشت. به عبارتی نانو ذرات آن ها پگیله بود. (۸)

در مطالعه دیگری که به ونسیله جونیور ای دی سی و همکارانش انجام شد، سیس پلاتین در نانوذرات لیپوزومی مخفی حساس به pH کپسوله شد. سپس سایتوتوکسیسیتی نانودارو بر روی سلول A549 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد سایتوتوکسیسیتی ۱/۳۴ برابر نسبت به داروی آزاد افزایش یافته است. (۸)

نتیجه گیری

در پژوهش ما، آزمایش هایی جهت سنجش میزان سایتوتوکسیسیتی سلولی داروی سیس پلاتین به فرم آزاد و مقایسه آن با شکل لیپوزومه ی دارو با روشMTTطراحی و اجرا شد. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر لیپوزوم ها با استفاده از دستگاه زتاسایز، اندازه ذرات را در ابعاد نانو تایید کرد.

اثر سایتوتوکسیسیتی فرموالسیون داروی نانولیپوزومه شده با روشMTTمورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش فرمولاسیون نانولیپوزومی فاقد دارو، اثر سایتوتوکسیسیتی بر رویHepG2نشان نداد. نتایج نشان داد که داروی نانولیپوزومه شده مقدارIC50کم تری را نسبت به نمونه ی استاندارد سیس پلاتین دارد . پس از تفسیر نتایج حاصله از آزمون MTT و برنامه Pharm به این نتیجه رسیدیم که میزان سایتوتوکسیسیتی دارو به مقدار ۳۳ درصد افزایش داشته است .

سپاسگزاری

تمامی مراحل آزمایشگاهی در بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. بدین وسیله از استاد فرزانه جناب پروفسور دکتر عظیم اکبرزاده و هم چنین از آقای دکتر حسن ابراهیمی شاهم آبادی و سرکار خانم زهرا صفاری که همکاری نمودند تشکر و قدردانی می کنم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Ana-Maria Florea and Dietrich BüsselbergCisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects . Cancers 2011, 3, 1351-1371; doi:10.3390/cancers3011351

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 liposomeencapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. J ClinOncol. 2001; 19(5):1444-54.

CarvalhoJúnior AD, Vieira FP, Melo VJ, Lopes MT, Silveira JN, Ramaldes GA, Garnier-Suillerot A, Pereira-Maia EC, Oliveira MC. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-

Cheon Lee S1, Kim C, Chan Kwon I, Chung H, Young Jeong S. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(epsilon-caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. J Control Release. 2003 May 20;89(3):437-46.

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.

Hamelers IH, Staffhorst RW, Voortman J, de Kruijff B, Reedijk J, van Bergen en Henegouwen PM, de Kroon AI. High cytotoxicity of cisplatinnanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. Clin Cancer Res. 2009 Feb 15;15(4):1259-68.

Kim JH1, Kim YS, Park K, Lee S, Nam HY, Min KH, Jo HG, Park JH, Choi K, Jeong SY, Park RW, Kim IS, Kim K, Kwon IC. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. J Control Release. 2008 Apr 7;127(1):41-

Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. Sterically stabilized antiHER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. Biochemistry. 1997; 36(1):66- 75.

Merat S, Malekzadeh R, Rezvan H, Khatibian M. Hepatitis B in Iran. Arch Iranian Med 2000;3:192-201. 4-Shamszad M, Farzadegan H. Hepatitis B related cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Iran. J Irn Med Council 1982;8:238

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: Cancer J Clin2005;55:74-108

Riaz M. Liposomes preparation methods. Pak J Pharm Sci. 1996; 9(1):65-77.

Xu P1, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Zhan Y, Isaak DD, Radosz M, Shen Y. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles.Biomacromolecules. 2006

Zhang X1, Yang H, Gu K, Chen J, Rui M, Jiang GL. In vitro and in vivo study of a nanoliposomal-cisplatin as a radiosensitizer. Int J Nanomedicine. 2011;6:437-44.

www.SID.ir