دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم–شماره ۱۳۳
اسفند ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸

ارزیابی اثر شارژ سطحی دوکسوربیسین لیپوزومه بر روی سمیت سلولی رده سرطان استخوان (استئوسارکوما)

نویسندگان: بی‌بی‌فاطمه حقیرالسادات[۱]، سمیرا نادری‌نژاد[۲]، قاسم عموعابدینی[۳*]، فاطمه منتظری[۴،۵]، بهروز زندیه دولابی[۶]

۱. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲. گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
٤. مرکز سقط مکرر، موسسه علوم تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد.
۵. گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.
٦. گروه زیست‌شناسی مولکولی و آناتومی کاربردی، دانشگاه وریج، آمستردام، هلند.

* نویسنده مسئول: قاسم عموعابدینی E-mail: amoabedini@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: در پژوهش حاضر فرمولاسیون لیپوزومی پگیله حاوی دوکسوروبیسین به منظور بررسی اثر شارژ سطحی بر روی سمیت سلولی سنتز شد.

مواد و روش‌ها: فرمولاسیون لیپوزومی دوکسوروبیسین حاوی DPPC، Cholesterol و DSPE-mPEG به همراه مقادیر مختلف فسفولیپید کاتیونی DOTAP (صفر، ۲/۵ و ۲۰ درصد) به روش گرادیان pH تهیه شد. نانو ذرات تهیه شده از جهت درصد بارگذاری دارو، سایز ذرات، شاخص پراکندگی، رهایش دارو ۴۸ ساعته و شارژ سطحی مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین اثر سمیت دوکسوروبیسین آزاد و محصور شده بر رده سلولی Saos-2 مقایسه شد.

نتایج: درصد بارگذاری دارو برای هر سه فرمولاسیون بالای ۸۲ درصد است. فرمولاسیون‌ها به صورت مونو دیسپرس می‌باشند و سایز ذرات با کاتیونی شدن کاهش یافته است. پتانسیل زتا از ۲۳- تا ۲۲/۴ + متغیّر بوده و در مدت زمان ۴۸ ساعت، ۴۳ درصد از دارو از لیپوزوم آزاد گشته است. سمیت سلولی دوکسوروبیسین با کپسوله کردن افزایش یافته است. افزایش فسفولیپید کاتیونی باعث کاهش زنده‌مانی سلولی شده است. افزایش سمیت دارویی برای دوکسوربیسین محصور در لیپوزوم کاتیونی هم به خاطر بیش‌تر آهسته رهش بودن سامانه و هم به خاطر سمیت ایجاد شده توسط DOTAP در ساختار است.

نتیجه‌گیری: سمیت دوکسوربیسین با محصورسازی درون لیپوزوم افزایش می‌یابد. این افزایش برای دوکسوربیسین محصور شده درون لیپوزوم کاتیونی بیش‌تر است.

واژگان کلیدی: سرطان استخوان، سمیت سلولی، دوکسوروبیسین، لیپوزوم، رده سلولی Saos-2

مقدمه

سرطان استخوان در کودکان و نوجوانان شایع‌تر است و سرطان استخوان متاستاتیک در بزرگسالان شایع‌تر است. این نوع سرطان از یک ناحیه سرطانی دیگر به استخوان‌ها شیوع می‌یابد (۱). از انواع سرطان استخوان می‌توان به اوستئوسارکوما اشاره کرد که یک تومور بدخیم استخوان‌ساز است که ۷۵ درصد بیماران کم‌تر از ۲۰ سال دارند (۲).

یک گروه از داروهای مورد استفاده در سیستم‌های دارورسانی لیپوزومی که به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته، گونه‌ای از کونیون‌های آنتراسیکلین‌ها به خصوص شامل آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوزید آنتراسیکلین است که به طور مثال، به داروی ضد تومور دوکسوروبیسین اشاره می‌شود دوکسوروبیسین یک عامل شیمی‌درمانی ضد توموری قوی است که در مقابل طیف وسیعی از تومورها مؤثر است (۳) با این حال استفاده از این دارو به فرم محلول به علت عوارض جانبی خطرناک، محدود شده است. سمیت حاد آن شامل ضعف، تهوع، آسیب‌های غیرقابل‌برگشت قلبی است که به خاطر استفاده مکرر این دارو به وجود می‌آید و استفاده این دارو را در درمان‌های طولانی محدود می‌سازد (٤).

داروی دوکسوروبیسین که به طور وسیعی در درمان سرطان‌ها از جمله سرطان استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد، به علل مختلف از جمله سمیت دارو، پایداری کم در سیستم گردش خون و از بین رفتن توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده درون بدن، دارای محدودیت استفاده است (۵).

امروزه تحقیقات موجود در زمینه درمان سرطان به دنبال تهیه حامل‌های دارویی نوین و متفاوت برای یافتن هدف‌های درمانی جدید از قبیل رگ‌های خونی تغذیه‌کننده بافت توموری و توسعه اشکال دارویی هدفمند و اختصاصی هستند. کارایی یک روش درمانی به طور مستقیم به توانایی آن در کشتن سلول‌های سرطانی بستگی دارد به گونه ای که سلول‌های سالم بدن تحت تأثیر قرار نگیرند. در این میان لیپوزوم‌ها بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته اند، زیرا روش تولید آسان‌تری دارند و از طریق لیپیدها و پلیمرهای زیست سازگار نیز قابل تهیه هستند. با توجه به آنکه عروق اطراف بافت توموری نفوذپذیری بیش‌تری نسبت به عروق بافت‌های معمول دارند و نیز به دلیل سرعت رشد بالاتر نیازمند اکسیژن و مواد غذایی بیش‌تری هستند، در نتیجه امکان جذب دارویی بهتری دارند (٦).

لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های دارویی در فرمولاسیون داروهای تزریقی به‌خصوص تزریق وریدی به کار می‌رود. هنگامی‌که قرار است از لیپوزوم به صورت فرآورده تزریقی استفاده شود، اگر اندازه‌ی لیپوزوم نامناسب باشد مویرگ‌ها انسداد پیدا خواهد کرد. سامانه‌های که جهت انتقال دارو مناسب می‌باشند سایزی کم‌تر از ۱۵۰ نانومتر دارند، هم‌چنین نانو ذرات نباید کوچک‌تر از ۵ نانومتر باشند زیرا توسط سیستم کلیه دفع می‌گردند (۷). هنگامی‌که در فرم لیپوزومی به‌کاربرده شود، دارو خواص درمانی مؤثر خود را در برابر تومورهای حیوانی حفظ می‌کند اما به طور قابل‌توجهی با سمیت کم‌تری را سبب می‌شود.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات از قبیل اندازه ذرات و بارسطحی ممکن است بر روی فعل‌وانفعالات با پروتئین‌های پلاسما (اپسونین) و اجزای خونی (هماتوپاتی)، جذب شدن و حذف شدن توسط ماکروفاژها و همچنین رسانش دارو به سلول‌های هدف اثر بگذارد. بار سطحی نانوذرات به واسطه دافعه بارهای مخالف سبب افزایش پایداری و کاهش تجمع ذرات می‌شود. قبلاً ثابت شده است که بار سطحی نانو ذرات سبب یک فاکتور تعیین‌کننده در بازده و مکانیسم جذب سلولی است (۸). گرچه شارژ بهینه (منفی، مثبت یا خنثی) و همچنین دانسیته بار از جهت مدت‌زمان گردش خون، حذف غیراختصاصی نانوذره و رسانش دارو به محل‌های غیراختصاصی به صورت گوناگونی در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است. به عنوان مثال

جولانیو[1] و همکاران گزارش کردند نانوذرات خنثی و یا مثبت با سرعت کمتری نسبت به ذرات منفی حذف می‌شوند؛ که احتمالاً به دلیل تمایل ذرات با شارژ منفی برای یکی شدن با یکدیگر در حضور پروتئین‌ها و یون کلسیم در پلاسمای خون است (۹). بر عکس آن، یاماموتو[2] و همکاران نشان دادند هر دو نانوذره خنثی و منفی مایسل PEG-PDLLA تفاوت چشمگیری در سینتیک حذف خونی نشان نمی‌دهند (۱۰). با این حال مایسل‌های با شارژ منفی، به میزان قابل‌ملاحظه‌ای، جذب غیراختصاصی به وسیله کبد و طحال را در مقایسه با مایسل خنثی کاهش می‌دهند؛ که احتمالاً به خاطر نیروی دافعه بین سطح سلول و بار سطحی مایسل است. نتایج ناسازگار این دو مطالعه همچنین ممکن است به خاطر تفاوت در نوع نانوذره، تنوع در ثبات به دلیل شارژ سطحی و همچنین اندازه ذرات ناهمگون باشد.

پژوهش حاضر با هدف سنتز نانوذرات فسفولیپیدی با شارژهای سطحی خنثی، آنیونی و کاتیونی و بررسی اثر شارژ سطحی نانولیپوزوم‌های بدون دارو و همراه با دارو بر روی سمیت سلولی روی رده سلولی سرطان استخوان انجام گرفت. فرمولاسیون‌ها هم‌چنین از جهت کارایی درون‌گیری دارو، اندازه ذرات و رهایش ۴۸ ساعته مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش ها

رده سلولی و محیط کشت

سلول هدف اوستئوسارکوما رده Saos-2 از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در انکوباتور (ممرت، آلمان) در دمای ۳۷ و تحت شرایط ۵٪CO_2 و ترکیبی از محیط کشت سلولی DMEM و سرم FBS به نسبت ۹۰ به ۱۰ و هم‌چنین پنی‌سیلین و استرپتو مایسین، تریپسین به صورت تک لایه رشد داده شد. سلول مورد نظر در این تحقیق بعد از سه دوره پاساژ موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین ۲۴ ساعت قبل از هر تست سلولی سلول‌ها جهت چسبیدن کف پلیت ۹۶ خانه‌ای، کشت داده شدند.

مواد شیمیایی

دوکسوروبیسین‌هیدروکلراید به صورت ویال‌های تزریقی با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از Ebewe Pharma (Austria) خریداری شد. کلسترول و فسفولیپید کاتیونی DOTAP[3] به ترتیب از شرکت‌های Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) و Avanti Polar Lipids (AL, USA) خریداری شدند. پلی‌اتیلن گلیکول[4] و فسفولیپید DPPC[5] از Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) تهیه شدند. تمامی مواد شیمیایی دیگر و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید انالیتیکال[6] بوده‌اند.

سنتز فرمولاسیون دوکسوربیسین لیپوزومه

دوکسوربیسین لیپوزومه به وسیله روش شیب pH تهیه گردید. به طور خلاصه، DPPC و کلسترول همراه با DSPE-mPEG (2000) در مقادیر مختلف DOTAP (صفر، ۲/۵ و ۲۰ درصد) در کلروفرم در دمای ۵۱ °C حل گردید. هیدراتاسیون با ۱۱۰۰ میکرولیتر آمونیوم سولفات برای ۴۵- ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵°C به وسیله دستگاه روتاری (Heidolph, Germany) انجام گردید. وزیکول‌های تهیه شده سپس به منظور کاهش سایز متوسط سونیکیت شدند. دوکسوربیسین با غلظت (۰/۵ mg/ml) درون لیپوزوم‌های خالی در دمای ۵۵ °C بارگذاری شد.

بررسی درصد انکپسولاسیون

پس از جداسازی داروی آزاد از داروی بارگذاری شده از طریق روش کیسه دیالیز غشای لیپوزومی با حلال ایزوپروپانول شکسته شد و داروی محصور شده از غشا آزاد گردید و میزان جذب نوری محلول حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (model T80+, PG Instruments, United Kingdom) در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

نمودار استاندارد داروی دوکسوربیسین در ایزوپروپانول رسم گردید و کارایی درون‌گیری توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

[1]. Juliano
[2]. Yamamoto
[3]. 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium- propane (chloride salt)
[4]. Distearoyl Phosphoethanolamine (PE 18:0/ 18:0 - PEG2000, DSPE-mPEG 2000)
[5]. 1,2- Dipalmitoyl-sn-glycero-3 phosphocholine
[6]. Analytic grade

رابطه ۱: بازده انکپسولاسیون = $\frac{\text{درصد داروی انکپسوله شده}}{\text{کل دارو}} \times ۱۰۰$

رهایش دارو

به منظور بررسی میزان رهایش دارو از لیپوزوم، مقدار یک میلی‌گرم از محلول لیپوزوم حاوی دارو درون غشاء دیالیز ریخته و در ۱۰ میلی لیتربافر PBS به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه بر روی همزن مغناطیسی با لرزش ملایم شرایط سلولی شبه سازی شد و میزان داروی آزاد شده در بافر PBS با روش اسپکتروفوتومتری در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد رهایش دارو با استفاده از منحنی استاندارد داروی دوکسوربیسین در PBS محاسبه گردید.

اندازه ذرات و شارژ سطحی

با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Worcestershire, UK) میانگین قطر نانو لیپوزوم‌ها و شارژ سطحی تعیین گردید.

زنده‌مانی سلولی

آزمایش MTT که یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی‌رنگ نامحلول انجام می‌شود. در این روش برخلاف سایر روش‌ها مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند؛ حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر، در یک میکروپلیت انجام می‌شوند لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است.

این سنجش در دوره‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام پذیرفت. پلیت‌های حاوی $۱۰^{۴}$ سلول Saos-2 در هر خانه پس از تیمار با نمونه با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، بعد از اتمام این دوره ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۳ ساعت انکوباسیون محلول درون چاهک‌ها به طور کامل دور ریخته شد و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزا ریدر اندازه‌گیری گردید و میزان درصد زنده‌مانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

رابطه ۲: درصد زنده‌مانی سلولی =

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times ۱۰۰$$

به این ترتیب درصد زنده‌مانی سلولی حاصل از داروی دوکسوربیسین آزاد، لیپوزوم بدون دارو دوکسوربیسین محصور شده در لیپوزوم کاتیونی، آنیونی و خنثی تعیین و مقایسه شد.

آنالیز آماری

برای بررسی آماری نتایج از نرم افزار GraphPad Prism ورژن ۷ و روش ANOVA یک‌طرفه استفاده شد و معناداری نتایج برحسب P-value< 0/05 سنجیده شد.

نتایج و بحث

مشخصه یابی فرمولاسیون‌های لیپوزوم حاوی دوکسوربیسین

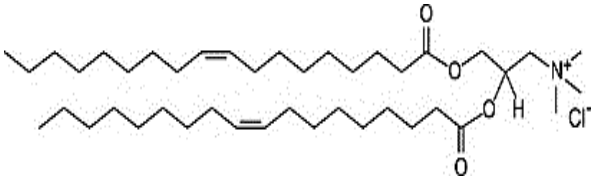
جدول ۱، فرمولاسیون‌های مختلف سنتز شده حاوی مقادیر مختلف فسفولیپید کاتیونی DOTAP را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج با افزایش میزان DOTAP شارژ سطحی نانو ذرات از ۲۳- به ۲۲/۴+ افزایش یافته است.

جدول ۱. مشخصه‌یابی و مقایسه فرمولاسیون لیپوزومی حاوی دکسوربیسین از نظر کارایی محصورسازی، سایز ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی و رهایش ۴۸ ساعته دارو

کد فرمول	درصد DOTAP	سایز ذرات	کارایی محصورسازی دارو	پتانسیل زتا	شاخص پراکندگی	رهایش ۴۸ ساعته
F1	۰	۹۳/۶۱	۸۲/۸۰	-۲۳	۰/۱۷۴	۴۴/۶۸
F2	۲/۵	۹۰/۳۲	۸۳/۷۸	+۰/۷۷۴	۰/۱۵۴	۴۲/۷۶
F3	۲۰	۷۱/۴	۸۹/۱۲	+۲۲/۴	۰/۱۵۹	۴۰/۸۴

مولکول DOTAP با دارا بودن گروه عاملی مثبت، موجب ایجاد شارژ مثبت در ساختار لیپوزوم می‌شود (شکل ۱). بر طبق نتایج با افزایش میزان DOTAP سایز ذرات کاهش یافته است

بر طبق نتایج شاخص پراکندگی هر سه فرمولاسیون کم‌تر از ۰/۲ است که حاکی از مونو دیسپرس بودن ذرات است. در واقع ذرات با بار همنام یکدیگر را دفع می‌کنند که مانع از تجمع و اگلومره شدن می‌شود.

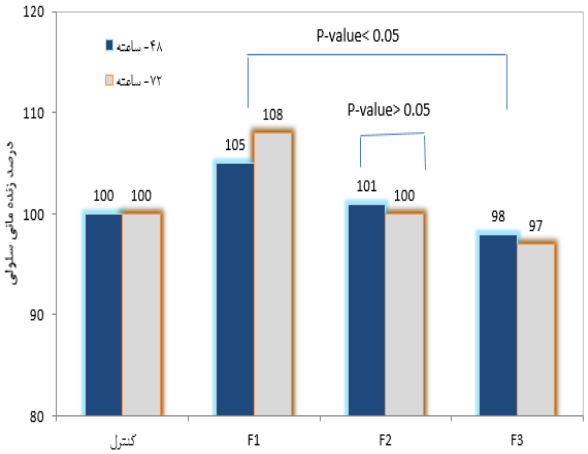


شکل ۱. ساختار مولکولی فسفولیپید کاتیونی DOTAP.

هم‌چنین بر طبق نتایج افزودن DOTAP باعث کاهش رهایش ٤٨ ساعته، بهبود کارایی درون‌گیری دارو و کاهش سایز شده است. در واقع با افزایش DOTAP از صفر تا ۲۰ درصد، میزان کلسترول فرمولاسیون کاهش یافته است. کاهش میزان کلسترول و افزایش ظرفیت بارگیری دارو (فضای لیپید به خاطر افزودن DOTAP) شده است. در واقع کلسترول ساختار کاهش می‌یابد و غشای لیپوزومی نسبت به ورود دارو انعطاف‌پذیرتر می‌شود؛ بنابراین کارایی درون‌گیری دارو افزایش می‌یابد (۱۱,۵). در فرمولاسیون ارائه شده افزودن DOTAP تأثیری معناداری در میزان رهایش دارو نداشته است.

مقایسه سمیت لیپوزوم خالی آنیونی، خنثی و کاتیونی

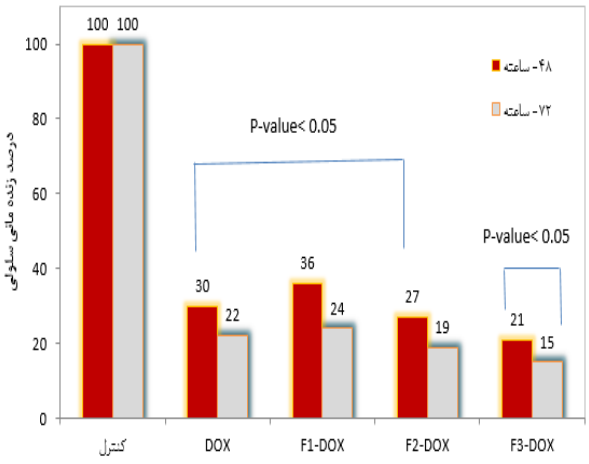
در شکل ۲، فرمولاسیون‌های مختلف بدون داروی، خنثی، کاتیونی و آنیونی بررسی شده است. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید فرمولاسیون آنیونی کم‌ترین سمیت و فرمولاسیون کاتیونی بیش‌ترین سمیت را دارد. این خواص در زمان ۷۲ ساعته نیز تائید شده است. ازآنجاکه ایجاد خاصیت کاتیونی و خنثی وابسته به حضور فسفولیپید DOTAP است، ایجاد سمیت وابسته به حضور این فسفولیپید است. گرچه هر سه فرمولاسیون سمیت مشهودی ندارند که در پژوهش‌های پیشین نیز تائید شده است (۵,۱۲).



شکل ۲. مقایسه زنده‌مانی سلول‌های Saos-2 تیمار شده با فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزوم خالی پس از ٤٨ و ۷۲ ساعته.

افزایش میزان فسفولیپید کاتیونیDOTAP از صفر به ۲۰ درصد سمیت سلولی سامانه را به طور معناداری افزایش داده است. گذر زمان تأثیر معناداری بروی تغییر سمیت سلول‌های تیمار شده با لیپوزوم خالی نداشته است.

مقایسه سمیت دوکسوربیسین آزاد، دوکسوربیسین لیپوزومه آنیونی، خنثی و کاتیونی



شکل ۳. مقایسه زنده‌مانی سلول Saos-2، تیمار شده با داروی آزاد و داروی لیپوزمه شده در فرمول‌های مختلف پس از ٤٨ و ۷۲ ساعت.

لیپوزومه کردن دارو و افزایش میزان فسفولیپید کاتیونی، سمیت سلولی را به طور معناداری افزایش داده است. گذر زمان به طور معناداری سمیت سلولی را افزایش داده است.

بررسی اثر سمیت داروی آزاد دوکسوربیسین در دوره زمانی ٤٨ و ٧٢ ساعته در مجاورت با رده سلولی Saos-2 در شکل ٣ نشان داده شد که نتایج نشان می‌دهد که سمیت داروی آزاد دوکسوروبیسین، پس از طی زمان به طور معناداری (P-value< 0.05) افزایش یافته است. در مقایسه با دوکسوربیسین لیپوزومه، سمیت حاصل از فرمول ٢ و ٣ بیش از فرمول ١ است این اتفاق می‌تواند به دو دلیل باشد کمی بیش‌تر آهسته رهش بودن این دو فرمولاسیون نسبت به فرمولاسیون ١ و همچنین زیست سازگاری کم‌تر لیپوزوم خالی فرمولاسیون ٢ و ٣ است.

افزایش سمیت هر سه فرمولاسیون با گذر زمان، به دلیل آهسته رهش بودن است که منجر به افزایش سمیت است؛ که راه‌حل درمانی پیشنهادی، کاهش دوز داروی مصرفی هم‌زمان با افزایش زمان مجاورت دارو است که باعث کاهش عوارض جانبی دارو می‌شود. هم‌چنین گرچه سمیت فرمولاسیون ١ نسبت به داروی آزاد چه در زمان ٤٨ و چه در زمان ٧٢ ساعته کم‌تر است ولی باید توجه داشت که تنها ٤٠ درصد از داروی دوکسوربیسین طی زمان ٤٨ ساعته آزاد شده است و موجب زنده‌مانی ٣٦ درصد شده است حال آن‌که در مورد داروی آزاد، کل داروی مصرفی موجب ٣٠ درصد زنده‌مانی شده است. این مسئله اهمیت انکسپولیشن دارو که باعث کاهش دوز دارو مصرفی هم‌زمان با تجمع دارو در محل اثر می‌شود را اثبات می‌کند.

بنابراین ثابت می‌شود گرچه فرمولاسیون کاتیونی سمیتی بیش‌تری ایجاد کرده است ولی زیست سازگاری کم‌تری نسبت به دو فرمولاسیون دیگر دارد. بهبود زیست سازگاری فرمولاسیون آنیونی احتمالاً به دلیل ایجاد شارژ منفی فرمولاسیون است که همنام با شارژ سیتوپلاسم است و منجر به دفع سامانه دارویی می‌شود.

نکته قابل توجه دیگر این است که در مقایسه دو فرمولاسیون ١، ٢ و ٣، دو فرمولاسیون ١ و ٢ سایز مشابه یکدیگر دارند که تفاوت معناداری با فرمولاسیون شماره ٣ دارند؛ بنابراین افزایش سمیت فرمولاسیون ٣ تحت تأثیر اندازه ذره نیز است.

گرچه به‌کارگیری DOTAP در فرمولاسیون باعث کاهش زنده‌مانی سلولی و به عبارتی زیست سازگاری فرمولاسیون شده است ولی توسعه فرمولاسیون همراه با دارو و ژن برای مقابله با مقاومت چندگانه دارویی، نیازمند تهیه فرمولاسیون با شارژ مثبت است که با بهینه‌سازی میزان این فسفولیپید در فرمولاسیون می‌توان هم‌زمان هم به فاکتور زیست سازگاری و هم به کاتیونی بودن دست‌یافت.

ملک‌پور و همکاران در پژوهشی در سال ١٣٨٨، اثر سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم خنثی و با بار منفی را با یکدیگر مقایسه نمودند. نتایج پژوهش نشان داد که سمیت سلولی دوکسوروبیسین لیپوزومه با بار سطحی منفی کم‌تر از حالت بدون بار الکتریکی است. با توجه به اینکه در پژوهش مذکور سمیت سلولی لیپوزوم خالی گزارش نشده است؛ نمی‌توان نتیجه گرفت که تغییر در سمیت سلولی وابسته به تغییر در شارژ سطحی است یا تغییر در نوع ماده افزودنی به فرمولاسیون است. چراکه ممکن است با جایگزینی دی ستیل فسفات با ماده دیگر ایجادکننده همین میزان شارژ سطحی، روند دیگری در نتایج سمیت مشاهده شود. آن‌ها همچنین نشان دادند سمیت سلولی دوکسوروبیسین در اثر انکپسولاسیون افزایش می‌یابد. در مقایسه با پژوهش حاضر، تفاوت در میزان سمیت دوکسوروبیسین لیپوزومه ممکن است به دلیل تغییر رده سلولی مورد بررسی، تفاوت در خواص فیزیکوشیمیایی سامانه‌ها، عدم گزارش سمیت سامانه بدون دارو و تفاوت در غلظت تیمار باشد (١٣).

همچنین شیائو[1] و همکاران در سال ٢٠١١ در بررسی سمیت سلولی تیمار شده با نانو ذرات مایسلی یافتند که برای ذرات با بار الکتریکی منفی در غلظت‌های مختلف (٠/٤ و ١ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هیچ‌گونه سمیتی سلولی مشاهده نشد. در حالی که ذرات با شارژ مثبت سمیت سلولی وابسته به دانسیته بار را نشان دادند و با افزایش دانسیته بار مثبت، سمیت سلولی افزایش یافته است (٨).

[1]. Xiao

در تحقیقات آتی بررسی محدوده وسیع‌تری از غلظت فسفولیپید کاتیونی به منظور یافتن حداکثر میزان فسفولیپید کاتیونی بدون ایجاد سمیت در سامانه پیشنهاد می‌گردد. ارزیابی زیست‌سازگاری سامانه با روش‌های دیگر نیز پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، این مطالعه فرمولاسیون‌های لیپوزومی مختلف کاتیونی، خنثی و آنیونی پگیله حاوی دوکسوربیسین را پیشنهاد می‌دهد که به طور موفقیت‌آمیزی داروی دوکسوربیسین را با کارایی بیش از ۸۲٪ محصور کرده است و آهسته رهش است. سایز نانو ذرات کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر و به صورت مونودیسپرس می‌باشند. میزان دوز دارویی برای درمان سرطان را کاهش می‌دهد و شاخص درمانی را همراه با بهبود اثرات سمیت سلولی بروی رده سلولی Saos-2 استئوسارکوما افزایش داده است. هم‌چنین آزمون سمیت سلولی تائید کرد که با افزایش فسفولیپید کاتیونی DOTAP سمیت سلولی نانوذره افزایش یافته است.

سپاسگزاری

از سرکار خانم فاطمه حکیمیان، پژوهشگر مرکز بیوفیزیک و بیوشیمی دانشگاه تهران جهت همکاری‌های علمی تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Ta HT, Dass CR, Choong PFM, Dunstan DE. Osteosarcoma treatment: state of the art. Cancer Metastasis Review 2009;28(1-2):247–63.
2. Boer JP De. Towards targeted treatment for osteosarcoma. VU University Medical Center 2014.
3. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2013;65(2):157–70.
4. Fateme Haghiralsadat, Ghasem Amoabediny, Mohammad Hasan Sheikhha, Tymour Forouzanfar, Marco N Helder BZ. A novel approach on drug delivery: Investigation of new nano-formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcomas cell lines. Cell Journal 2017;19(Supplement 1, Spring):55–65.
5. Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. Chemical Biology & Drug Design 2017;90(3):368–79.
6. Fateme Haghiralsadat, Ghasem Amoabediny, Samira Naderinezhad, Marco N Helder, Elham Akhoundi Kharanaghi BZ-D. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (noisome, solid lipid, liposome) nanoparticles: a comprehensive review. Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials 2017;1–18.
7. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. Nanomedicine Nanotechnology, Biology and Medicine 2005;1(3):193–212.
8. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. Biomaterials 2011;32(13):3435–46.
9. Juliano RL, Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. Biochemical and Biophysical Research Communications 1975;63(3):651–8.
10. Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Long-circulating poly (ethylene glycol)–poly (d, l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. Journal of Controlled Release 2001;77(1):27–38.

11. **Ohvo-rekila H, Ramstedt B, Leppima P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Progress in Lipid Research 2002;41(1):66-97.**

12. **Haghiralsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, et al. A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol [Internet]. Taylor & Francis; 2017 4;1–9.**

13. **Malekpour B, Jalalinadoushan M , Mansouri S , Hadjihosseini R , Mirzaei M, Jamali D. Comparison of the Killing Effect of Free, Negative and Neutral Charged Liposomal Doxorubicin on Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231). Daneshvar Medicine 2010, 17(85): 63-70.**

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
25th Year, No.133
February- March 2018

Evaluation of the effects of surface charge on cytotoxicity of liposomal doxorubicin on bone cancer cell line (osteosarcoma)

Bibi Fatemeh Haghiralsadat[1,2], Samira Naderinezhad[3], Ghasem Amoabediny[2,3*], Fateme Montazeri[4,5], Behrouz Zandieh Doulabi[6]

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Department of Nano Biotechnology, Research Center for New Technologies in Life Science Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.
4. Recurrent Abortion Center, Reproductive Science Institute, Yazd Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran.
5. Department of Molecular Genetics, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
6. Department of Oral Cell Biology and Functional Anatomy, Vrije University, Netherlands.

*** Corresponding Author e-mail: amoabediny@ut.ac.ir**

Abstract

Background and Objective: In the present study, PEGylated liposomal formulation containing doxorubicin was synthesized in order to study the effects of surface charge on its cytotoxicity.

Materials and Methods: Liposomal doxorubicin containing DPPC, cholesterol and phospholipid DSPE-mPEG with various amounts of cationic phospholipid, DOTAP, (0, 5.2 and 20%) was prepared by pH gradient method. Prepared nanoparticles were evaluated in term of percentage of drug loading, particle size, polydisparity index, 48-hour drug release, and surface charge. The cytotoxicity of free and entrapped doxorubicin on Saos-2 cell lines was also compared.

Results: The percentages of drug loading for all three formulations were higher than 82 percent. All formulations were monodisperse. The particle size was reduced by increasing cationic properties of particles. The zeta-potential varied from -23 to + 22.4, and 43% of the drug was released from the liposome during 48 hours**.** Cytotoxicity of doxorubicin increased with encapsulation. Addition of cationic phospholipid reduced cell survival.

Conclusion: Increasing cytotoxicity of doxorubicin loaded into cationic liposomes is due to the more sustained-release of the system and also the toxicity created by DOTAP in the structure. Cytotoxicity of doxorubicin improved by entrapping it into liposomal vesicles. Doxorubicin loaded into cationic liposome shows highest toxicity**.**

Keywords: Bone cancer, Cell toxicity, Doxorubicin, liposome, Saos-2 cell line

Received: 21/12/2017
Last revised: 10/02/2018
Accepted: 17/02/2018