Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

دانشور
پزشکی

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

وصول: ۸۸/۱۰/۱۵
آخرین اصلاحات: ۸۸/۱۲/۲۲
پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۷

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

بصیر ملک‌پور[۱]، دکتر محمدرضا جلالی‌ندوشن[۲]، صادق منصوری*[۱]، دکتر رضا حاجی‌حسینی[۳]، محسن میرزائی[٤] و داوود جمالی[٥]

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
٤- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد واحد بروجرد
٥- کارشناس ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده مسئول: صادق منصوری
Email: mansouri@shahed.ac.ir

چکیده

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

مواد و روش‌ها: لیپوزوم‌های حاوی بار الکتریکی منفی با اختلاط ترکیبات دستیل فسفات، کلسترول و فسفاتیدیل کولین (۱:۲:۱) و فاقد بار الکتریکی از ترکیب فسفاتیدیل کولین- کلسترول (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 ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با آزمون تی مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

نتایج: نظر به این‌که سمیت سلولی در غلظت ٥ میلی‌گرم بر میلی لیتر دارو در زمان‌های مذکور در لیپوزوم‌های بدون بارالکتریکی به ترتیب ۸۸/۳۷، ۹۱/۷ و ۹۳/٤ درصد و در غلظت و زمان مشابه برای داروی آزاد ۷۲/۳٤، ۷۹/٤۱ و ۷۹/۹ درصد به‌دست 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 ٥۹/٤۰، ٦۷/۲۸ و ۷٤/٥٦ درصد به‌دست 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 دارا 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

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 به‌وجود می‌آید. سرطان پستان، دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان بعد از سرطان ریه است [٤-۲]. همچنین این سرطان بالاترین میزان بروز را در بین سرطان‌ها دارا است [۲]. در سال ۲۰۰٤ میلادی، حدود ۲۱٦۰۰۰ مورد سرطان پستان مهاجم و ٤۰۰۰۰ 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 ۲٤٤۹۸ زن مبتلا به سرطان، سرطان پستان ۵۹۸۱ (۲٤/٤۱ درصد) بیشترین میزان را به‌خود اختصاص داده است [٦].

ناهمگونی بافت‌های توموری پستان و فشار درونی آن‌ها موجب کاهش پاسخ مطلوب به داروهای ضدسرطان و نیز افزایش سمیت داروهای تجویزشده باعث محدود شدن دوز دارویی تجویزشده می‌شود [۵]. از روش‌های جدید دارو درمانی استفاده از حاملین دارویی یا سیستم انتقال دارو (Drug Delivery) و لیپوزوم‌های حاوی دارو است [۲،٤،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 به‌کار برد [۳،٤،٦،۷].

داروی دوکسوروبیسین که به‌طور وسیعی در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد، به دلایل مختلف از جمله سمّیت 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 به‌عمل آمده است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰٦ شارام و همکاران در دانشگاه پنجاب هند انجام دادند، لیپوزوم‌ها به‌عنوان سیستم انتقال دارو در سرطان پستان مورد بررسی قرار داده شد، به‌طوری‌که نتایج حاصل بیان‌کننده نقش مهم داروهای محصورشده در لیپوزوم‌های نشان‌دارشده با آنتی بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های سلول‌های توموری در تشخیص و درمان این سرطان است [۸]. همچنین در سال ۱۹۹٦، دیمیتری کِرپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران در مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولیپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در شرایط آزمایشگاهی (Invitro) طراحی کردند که نتایج حاصل در طراحی ایمنولیپوزوم‌های حاوی داروی‌های ضدسرطان مورد استفاده قرارگرفته شد [۹]. محصور کردن داروی دوکسوروبیسین (Doxorubicin) در لیپوزوم می‌تواند از اثرات سمی آن کاسته و در ضمن کارآیی 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 به‌وسیله داروی دوکسوروبیسین پر و اثر آن روی کشت رده سلولی MDA-MB-231 مورد بررسی قرارگرفته 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 قرارگرفت. سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به‌صورت 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 موردنظر روی آن‌ها انجام گرفت.

دارو: داروی دوکسوروبیسین به‌صورت ویال‌های تزریقی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخت شرکت اِبِوِ (Ebewe) کشور اتریش است.

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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

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

مواد مورد استفاده برای انجام کار با سلول و آزمایش سنجش‌سمیت 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، الایزا 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 میلی گرم بر میلی لیتر 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 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 دی اکسید کربن قرار داده شد. پس از گذشت ٤ ساعت پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده و محیط حاوی MTT را از خانه‌ها خارج می‌کنیم. در مرحله بعد به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اسید پروپانوئیک اضافه می‌شود. اسید پروپانوئیک موجب حل شدن کریستال‌های موجود در کف هر خانه پلیت می‌شود. بعد از این مرحله میزان جذب نوری با کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت می‌کنیم.

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

۱۰۰ × (میانگین جذب نوری در گروه کنترل / میانگین جذب نوری در گروه آزمون)

درصد سمیت سلولی از فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

= درصد سمیت سلولی یا درصد کشندگی

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

برای کارهای آماری در این تحقیق از نرم‌افزار Excel و روش آزمون تی استفاده شد. به‌طوری‌که معنادار بودن بر حسب P value همان نسبت test/control و در محدوده p≤۰/۵ 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 [۱٤].

نتایج

اثر سمیت داروی آزاد دوکسوروبیسین بر رده سلولی MDA-MB-231 پس از ۲٤، ٤۸ 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 به‌جز غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر و در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت دارای p≤۰/۵ 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 ۲٤، ٤۸ 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 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 ۲٤، ٤۸ 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≤۰/۵ 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 ۲٤، ٤۸ 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 داده‌شد.

با توجه به اطلاعات به‌دست 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 ۲٤ ساعت

Drug forms / Dose(mg/ml)	free	l.neu	l.neg
۰/۲	۱۳/۹۱	۰/۳۱	۰/۲۰٦
۰/۵	۳۹/۷۸	۲/۸٤	۲۱/۹۷
۱	٦۵/۹۲	٦۲/۷٦	۳٦/۸۸
۲	٦۵/۲۰	۸۷/۵۰	٤۸/۲۲
۵	۷۲/۳٤	۸۸/۳۷	۵۹/٤۰

جدول ۲. مقایسه درصد سمیت سلولی از مجاورت داروی آزاد دوکسوروبیسین و لیپوزوم بدون بار الکتریکی با رده سلولی MDA-MB-231 بعد از ٤٨ ساعت

Drug forms / Dose(mg/ml)	free	l.neu	l.neg
۰/۲	۱۳/۰۱	۰/۷۰۸	۲۱/۰۳
۰/۵	۲۰/۱٤	۷/۵۸۳	۳۷/٤۵
۱	٤۵/۲۳	٦۳/۱۹	٤۵/۹۹
۲	۷۳/٦۷	۹۰	٦۳/٦۳
۵	۷۹/٤۱	۹۱/۷۰	٦۷/٤۸

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

Drug forms / Dose(mg/ml)	free	l.neu	l.neg
۰/۲	۲/۳۷	۲۹/۰۷	۵/۲٦۰
۰/۵	۲۹/۲۸	۱٤/۰۱	۲٤/۱٦
۱	٦۵/٦۷	۵۹/۱۳	٤۰/۵۲
۲	۷٤/۹۲	۹۲/٤۱	٦۵/۷۲
۵	۷۹/۹۰	۹۳/٤۰	۷۵/۵٦

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 ٤۰ تا ٤٤ 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 سمی دارو، افزایش زمان چرخش دارو و در نهایت بهبود اثر نهایی دارو در درمان یا کنترل بیماری است [۱۲،۱۵،۱٦]. 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. دوکسوربی‌سین 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 ۱۹۹٦، دیمیتری کِرپوتین (Dimitri Kirpotin) و همکاران از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه کالیفرنیا ایمنولیپوزوم‌هایی را برای اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پستان انسانی در محیط زنده طراحی کردند که نتایج حاصل در ساخت ایمنولیپوزوم‌های حاوی داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۰۱، کرالد (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 ۲۰۰٤ 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، چِن (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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

آدریامایسین محصور در لیپوزوم توسط سلول‌های توموری جذب شده و میزان توکسوسیتیه دارو به‌شدت افزایش یافته است. همچنین هیچ‌گونه 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 به‌عنوان سیستم انتقال دارو در سرطان پستان مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل بیان‌کننده نقش مهم داروهای محصور شده در لیپوزوم‌های نشاندار شده با آنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های سلول‌های 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 به‌عنوان خط اول درمان سرطان پستان مورد بررسی دادند که در این تحقیق نیز نتایج به‌دست آمده نشان از کاهش سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد آن داشته است [۲۲].

در این پروژه تحقیقاتی، آزمایش‌هایی 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 غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی آزاد تهیه و در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 (یکی از رده‌های سرطان پستان) در معرض دارو قرار گرفت. همان‌گونه که از قبل هم پیش‌بینی می‌شد، با توجه به مؤثر بودن این دارو در تخریب سلول‌های سرطانی پستان اکنون به‌عنوان یک داروی انتخابی برای درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

داروی مذکور به فرم آزاد دارای اثر سمی خوبی بر این رده سلول داشته و پس از ۷۲ ساعت ۷۹/۹ درصد سلول‌های سرطانی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از بین رفتند. بدیهی است با انجام آزمایش‌ها روند سمیت سلولی این دارو با طولانی‌تر شدن زمان و در غلظت بالای دارو افزایش یافته، به‌طوری که در غلظت مشابه بعد از ۲۴ ساعت، ۷۲/۳ درصد سلول‌ها و پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت ۷۹/۴ درصد از سلول‌های این رده از بین رفتند. نکته قابل توجه در این مرحله، برتری میزان اثربخشی دارو در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت (۷۴/۹ درصد) نسبت به میزان سمیت سلولی دارو بعد با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت (۷۲/۳ درصد) بوده است که با توجه به سمیت دوزهای بالای دارو می‌توان همزمان با کاهش غلظت دارو برای کاهش اثرات جنبی مضر آن مدت زمان مجاورت دارو را افزایش داد.

پس از تهیه لیپوزوم‌های بدون بار الکتریکی و با بار منفی، پر کردن چاهک‌ها با داروی دوکسوروبیسین و در نهایت مجاورت آن‌ها با سلول‌های موردنظر انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده در این بخش از این جهت قابل توجه بوده که علاوه بر افزایش توان کشندگی دارو به‌صورت محصور در لیپوزوم‌های بدون بار الکتریکی و کاهش اثرکشندگی در لیپوزوم‌های با بار منفی، این تئوری را که احتمال سطح خارجی این سلول‌ها دارای بار منفی است، مطرح و تقویت می‌کند. در این مرحله نیز زمان مجاورت لیپوزوم‌های بدون بار الکتریکی و بار منفی در مدت زمان‌های 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۸۸/۳۷، ۹۱/۷ و ۹۳/۴ درصد به‌دست 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۵۹/۴، ۶۷/۲۸ و ۷۴/۵۶ درصد به‌دست آمد که کاهش قابل توجهی در مدت زمان کمتری نسبت به داروی آزاد داشته و همان‌طور که قبلاً بیان شد، احتمالاً به‌دلیل وجود بار منفی در سطح سلول لیپوزوم موردنظر (با بار منفی) اثربخشی دارو کمتر شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق که برای اولین بار در ایران به انجام رسیده است و مقایسه آن با پروژه‌های مشابه، بهبود تأثیر این دارو به شکل لیپوزوم بدون بار الکتریکی تأیید شد و به نظر می‌رسد می‌توان از لیپوزوم‌ها (گویچه‌هایی که توانایی محصور کردن مواد مختلف

ازجمله داروها را دارند) به‌عنوان پوشش برای داروهای خطرناک شیمیایی که دارای اثرات مخرب جانبی بسیار زیادی بوده استفاده کرد و اثربخشی این داروها را افزایش داد. پیشنهاد می‌شود، تحقیق فوق در شرایط داخل بدن حیوان آزمایشگاهی که به‌صورت آزمایشگاهی مبتلا به توده سرطانی می‌شود، انجام شده تا افزایش میزان اثربخشی یا کاهش آن در شرایط داخل بدن موجود زنده بررسی شود.

منابع

1. Kumar V., Abbas A., Fausto N. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 7th 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. 16th ed, *New York* 2005. Vol.1

3. Scott James R., Gibbs Roland S., karlan Beth Y., Hancy Arthur F. Danforth's obstetrics and gynecology. 9th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003. VOL 2

4. Berek J. Novak's gynecology. 13th 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, Obsorne 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. 9th 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. Sterically 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. Kowalczuk, L.Berdugo, M. Thomas- Doyle A. Bochot A. Gomez A., Azan F. Gurny R. Behar- Cohen F. Drug delivery systems for intraoccular 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:40 IRST on Friday February 23rd 2018

19. Rome E. Eliaz and Francisc. Sazoka, Jr. Liposomes-encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A strategy to kill CD44-overexpressing Tumor Cells. *Cancer Reasearch* 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. Giotta1 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.