سنتز نانولیپوزوم حاوی عصاره چای سبز و داروی دوکسوروبیسین به منظور بررسی سمیت آن بر سلول‌های رده سرطان سینه

محمد توحیدلو[1§]، صنم صادقی محمدی[2§]، زهرا واعظی[3]، مجید تقدیر[4*]، حسین نادری‌منش[5*]

1ـ کارشناسی‌ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2ـ دکتری، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3ـ استادیار، گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری‌های بین‌رشته‌ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4ـ استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
5ـ استاد، گروه بیوفیزیک/نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[§]محمد توحیدلو و صنم صادقی محمدی سهم یکسانی به‌عنوان نویسنده اول دارند

تاریخ دریافت: 1398/12/13 تاریخ پذیرش: 1399/8/6

[*]نویسندگان مسئول:
naderman@modares.ac.ir صندوق پستی دانشگاه تربیت مدرس: 111-14115
taghdir@modares.ac.ir صندوق پستی دانشگاه تربیت مدرس: 111-14115

چکیده:

شیمی‌درمانی به‌عنوان یکی از مؤثرترین و رایج‌ترین روش‌های درمانی سرطان است. مقاومت چند دارویی و عوارض جانبی دارویی از موانع بزرگ بر سر راه یک شیمی‌درمانی موفق به شمار می‌آید. برای مقابله با این محدودیت‌ها و دستیابی به اثربخشی بهتر داروها، درمان ترکیبی مبتنی بر نانوسامانه‌ها یک رویکرد امیدوارکننده را پیشنهاد می‌دهد. هدف این مطالعه، سنتز، مشخصه‌یابی و بررسی اثر هم‌افزایی نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با داروی دوکسوروبیسین و اپی‌گالو کاتچین-3-گالات روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 است. در این مطالعه، نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش بارگذاری غیرفعال و آب‌پوشانی لایه‌نازک تهیه شدند. توزیع اندازه، پتانسیل زتا، میزان بارگذاری، منحنی رهایش دارو و سمیت نانولیپوزوم‌ها بعد از تهیه، اندازه‌گیری شد. میانگین قطر نانولیپوزوم‌ها 0/6± 82/5 نانومتر، بار سطحی آنها 24/2- میلی‌ولت و میزان بارگذاری داروها حدود 80 درصد به دست آمد. تعامل داروی دوکسوروبیسین و اپی‌گالو کاتچین-3-گالات با نانولیپوزوم‌ها از طریق پیوند الکترواستاتیک و واندروالسی بوده و اپی‌گالو کاتچین-3-گالات روی منحنی رهایش دوکسوروبیسین اثر کاهشی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

می‌گذارد درصورتی‌که اختلاف مشاهده‌شده معنادار نیست. داده‌های سمیت نشان می‌دهد استفاده هم‌زمان این دو دارو به افزایش سمیت سلولی منجر می‌شود. نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین در درمان تک‌دارویی با غلظت 5×10^{-3} میکرومولار قادر نیستند زنده‌مانی را به زیر 50 درصد کاهش دهند، اما در ترکیب با اپی‌گالو کاتچین-3-گالات باعث کاهش زنده‌مانی به زیر 50 درصد می‌شود و درنتیجه میزان مصرف داروی شیمیایی دوکسوروبیسین به میزان چشمگیری کاهش می‌یابد. نتیجه آنکه، تجویز هم‌زمان اپی‌گالو کاتچین-3-گالات با دوکسوروبیسین می‌تواند کاندید مناسبی برای شیمی‌درمانی باشد.

کلید واژگان: درمان ترکیبی، اپی‌گالو کاتچین-3-گالات، دوکسوروبیسین، نانولیپوزوم، سرطان سینه

مقدمه

هم‌زمان با کاهش مرگ‌ومیر ناشی از بیماری‌های عفونی، سرطان به یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در بیشتر کشورهای جهان تبدیل شد. بالاترین میزان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان مربوط است به سرطان ریه، سینه، پروستات و روده بزرگ. باوجود تشخیص سریع و درمان سرطان سینه در کشورهای توسعه‌یافته، این بیماری دومین سرطان شایع در بین زنان است که در کشورهای درحال‌توسعه طی چند دهه اخیر به 3 تا 4 برابر رسیده است. برای درمان سرطان از روش‌های متفاوتی نظیر جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی استفاده می‌شود. همچنین داروهای مختلفی برای بهبود وضعیت بیماران تجویز می‌شود که متأسفانه اثرات جانبی بسیاری روی بیماران دارد. ازجمله داروی دوکسوروبیسین (DOX)[1]، یک آنتی‌بیوتیک آنتراسیکلین که در تومورهای جامد استفادهٔ گسترده‌ای دارد. بااین‌حال، استفاده از این دارو محدودیت‌های مختلفی دارد که باعث می‌شوند اثربخشی درمانی آن، ازجمله حلالیت آبی پایین، آسیب برگشت‌ناپذیر به سلول‌های قلبی در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، رهایش غیراختصاصی و مقاومت سلولی کاهش یابد [1]. در دهه‌های اخیر، نانوداروهای مبتنی بر فناوری نانو، راه‌حل‌هایی برای برخی از این محدودیت‌ها ارائه کرده است، ازجمله قراردادن دارو در نانوحامل‌ها برای بهبود حلالیت و افزایش تحویل هدفمند دارو. بااین‌حال، در نانوداروها کاهش سمیت قلبی و مقاومت چنددارویی مشاهده نشد[2, 3]. در این مسیر، به استفاده هم‌زمان از ترکیبات گیاهی برای کاهش اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیز بسیار توجه شده است. ترکیبات پلی‌فنولی یکی از ترکیبات زیست‌فعال مهم در حوزه دارویی است؛ عصاره چای سبز ازجمله این ترکیبات به شمار می‌رود. این ترکیبات طیفی وسیع از اثرات ضد توموری از قبیل القای آپوپتوز، القای تمایز سلولی، ضدرگ‌زایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی دارند و به دلیل زیست‌سازگاری بالا در مقایسه با ترکیبات شیمیایی به آن‌ها بیشتر توجه شده است [4]. اپی‌کاتچین[2]، اپی‌گالوکاتچین[3]، اپی‌کاتچین‌گالات[4] و

1. Doxorubicin (DOX)

2. Epicatechin
3. Epigallocatechin
4. Epicatechingallate

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

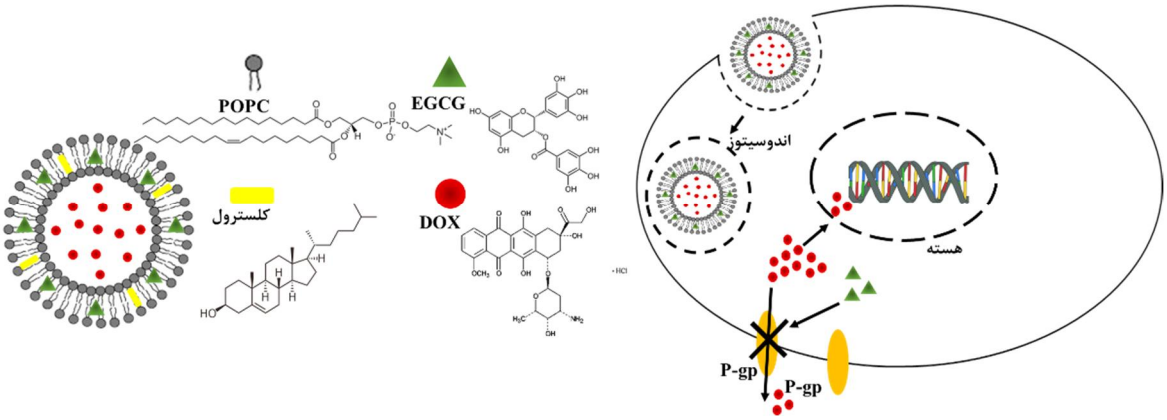
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

اپی‌گالوکاتچین-3-گالات (EGCG)[5] چهار نوع پلی فنول مهم چای سبز هستند که اصلی‌ترین و فعال‌ترین ترکیب از نظر بیولوژیکی در بین آن‌ها اپی‌گالوکاتچین-3-گالات است. این ترکیب به دلیل وجود دو گروه تیپ فنولیک در ساختار مولکولی توانایی زیادی در ازبین‌بردن اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد حاصل از شیمی‌درمانی طولانی‌مدت با دوکسوروبیسین دارد [5]. پمپ پروتئینی P-gp[6] موجود روی غشای سلولی نقشی مهم در میانجی‌گری انتشار داروها به خارج سلول‌های سرطانی بازی می‌کند. افزایش تعداد این پمپ‌ها روی غشای سلول‌های توموری به بروز مقاومت چندداروویی (MDR)[7] منجر می‌شود. بنابراین، برای غلبه بر این مسئله، استراتژی‌های مختلفی برای مهار یا تعدیل فعالیت این پمپ در سلول‌های سرطانی، به‌ویژه در زمینه‌های دارویی و بیوشیمیایی طراحی شده است. یک روش مهم استفاده از مهارکننده‌ها یا تعدیل‌کننده‌های MDR است، که با مسدودکردن پمپ‌های P-gp به افزایش تجمع داروها در سلول‌های سرطانی، افزایش اثربخشی درمانی آن‌ها و درنهایت بازگشت مقاومت در برابر داروهای ضد سرطان منجر می‌شوند (شکل 1) [6]. EGCG خاصیتی دارد که فعالیت این پمپ را مهار می‌کند و موجب تجمع داروی دوکسوروبیسین (DOX) در سلول‌ها می‌شود [7]. درنتیجه درمان ترکیبی[8] EGCG در مقایسه با درمان تک‌دارویی[9] DOX می‌تواند بهترین راهبرد برای غلبه بر سمیت قلبی و همچنین مقاومت چندداروویی ناشی از DOX باشد. نکته مهم دیگر در درمان ترکیبی استفاده از حاملی است که توانایی بارگیری داروهای آب‌گریز و آب‌دوست را داشته باشد. نانولیپوزوم‌ها، ساختارهای خودتشکیل‌شونده ای[10] هستند که در آن‌ها مولکول‌های فسفولیپید در محیط آبی به‌گونه‌ای کنار هم قرار می‌گیرند که یک غشای کروی دولایه را تشکیل می‌دهند. این نحوه جهت‌گیری، امکان بارگیری داروهای آب‌دوست در هسته و داروهای آب‌گریز در پوسته لیپوزوم‌ها را امکان‌پذیر می‌کند. در شرایط فیزیولوژیکی، EGCG آب‌گریز و ناپایدار است و مانند داروی DOX به نانوحامل برای بهبود حلالیت و افزایش پایداری نیاز دارد. در این مطالعه از هیدرو کلرید دوکسوروبیسین استفاده شد که حلالیت آبی آن از داروی دوکسوروبیسین بالاتر است، بنابراین، انتظار می‌رود DOX در هسته و EGCG به دلیل حلالیت پایین در پوسته نانولیپوزوم قرار گیرد (شکل 1). این مطالعه، با هدف سنتز و دست‌ورزی نانولیپوزوم‌های حاوی داروی شیمیایی DOX و عصاره گیاهی EGCG و استفاده از آن به‌عنوان یک داروی مدل با اثر هم‌افزایی و کاربردهای درمانی بررسی شده است.

5. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)
6. P-glycoprotein (P-gp)
7. multidrug resistance (MDR)
8. combination therapy
9. monotherapy
10. self-assembled

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]



شکل 1 تصویر ترسیمی تشکیل نانولیپوزوم حاوی **DOX** و **EGCG** و مکانیسم بازگشت مقاومت در برابر **DOX**

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده فسفولیپیدPOPC[11] و کلسترول از شرکت آوانتی[12]، هیدروکلرید دوکسوروبیسین از شرکت شرکت Ebewe-pharma، EGCG (باخلوص 95 درصد) و نمک MTT[13] از شرکت سیگما[14]، محیط کشت DMEM[15] از شرکت گیبکو[16]، متانول و کلروفرم از شرکت مرک[17] و سلول رده MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

سنتز و مشخصه‌یابی نانولیپوزوم‌ها

مقدار 1 میلی‌مولار از فسفولیپید POPC و 0/5 میلی‌مولار کلسترول و 0/2 میلی‌مولار EGCG در کلروفرم: متانول (به نسبت حجمی 1:1) حل شد و حلال‌های آلی با استفاده از دستگاه تبخیر خلأ (شرکت هیدلف[18] آلمان) و در دمایی بالاتر از دمای گذار لیپیدها لیپیدها به مدت 1 ساعت حذف شدند [8]. لایه نازک لیپیدی حاوی EGCG با محلول PBS[19] pH= 7/4 دارای 0/08 میلی‌مولار داروی DOX آب‌پوشانی شد. به منظور تبدیل لیپوزوم‌های چندلایه (MLV)[20] به لیپوزوم‌های تک‌لایه (LUV)[21] روش منجمد و ذوب‌کردن و اکسترود[22] با غشاهای پلی‌کربناتی 100نانومتری استفاده شد. برای جداکردن داروهای محصورنشده، روش دیالیز با کیسه دیالیز 6-8 کیلودالتونی به مدت 12 ساعت به کار گرفته شد. داروی DOX و EGCG جداگانه اما با غلظتی مشابه در لیپوزوم‌ها محصور شدند. پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی و اندازه لیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر[23]، مجهز به لیزر هلیوم، نئون و زاویه پراکندگی 173 درجه، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. برای بررسی ریخت‌شناسی نانولیپوزوم‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل FE-SEM, Mira 3-XMU استفاده شد.

11.1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC)
12. Avanti polar lipid
13. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
14. Sigma
15. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
16. Gibco
17. Merck
18. Heidolph

19. Phosphate-buffered saline(PBS)
20. multilamellar vesicle (MLV)
21. large unilamellar vesicle (LUV)
22. Extruder
23. Zetasizer Nano-Malvern

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

ارزیابی پایداری نانولیپوزوم‌ها در شرایط آزمایشگاهی[24]

پایداری نانولیپوزوم‌های سنتزی در محلول PBS 7/4 =pH در دو دمای 37 و 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 هفته بررسی شد. بعد از سپری‌شدن بازه زمانی مورد نظر اندازه نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر ارزیابی شد.

محتوی و بازده محصورسازی

برای محاسبه محتوی و بازده محصورسازی از روش طیف‌سنجی فلورسانس و مرئی-فرابنفش استفاده شد. در ابتدا به منظور تعیین مقدار داروی محصورشده، منحنی استاندارد برای داروی DOX (در بیشینه جذب 482 نانومتر) و EGCG (در بیشینه جذب 276 نانومتر) در غلظت‌های معین ترسیم شد. بدین منظور حجم مشخصی از نانولیپوزوم حاوی دارو در حلال آلی متانول حل و به مدت 15-10 ثانیه ورتکس شد. سپس جذب بیشینه آن‌ها اندازه‌گیری شد و با نمودار استاندارد تهیه‌شده در مرحله قبل مقایسه و غلظت دارو در داخل لیپوزوم‌ها محاسبه شد. میزان محتوی و بازده محصورسازی داروها نیز با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شد:

معادله1

$$\text{محتوی محصورسازی}^{25} = \frac{\text{مقدار داروی محصور شده}}{\text{مقدار کل فسفولیپید استفاده شده}} \times 100$$

معادله2

$$\text{بازده محصورسازی}^{26} = \frac{\text{مقدار داروی محصور شده}}{\text{مقدار کل داروی استفاده شده}} \times 100$$

24. *In vitro*
25. Loading Content
26. Loading Efficiency

بررسی رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی الگوی رهایش دارو از نانولیپوزوم‌ها، مقدار 1 میلی‌لیتر از نانولیپوزوم‌های سنتزی در کیسه دیالیز 6-8 کیلو دالتونی ریخته و در 50 میلی‌لیتر بافر فسفات در دمای 37 درجه سانتی‌گراد روی هم‌زن مغناطیسی غوطه‌ور شد. سپس به روش طیف‌سنجی فلورسانس و مرئی فرابنفش و در طول‌موج بیشینه نشر و جذب داروها میزان داروی آزادشده در بازه‌های زمانی مشخص با استفاده از معادله منحنی استاندارد مربوط به هر دارو و معادله 3 تعیین شد. بعد از آن درصد رهایش دارو (معادله 4) و منحنی آن مشخص و رسم شد. البته باید به این نکته توجه کرد که برای بررسی رهایش داروی DOX منحنی استاندارد در بیشینه نشر 590 نانومتر نیز برای این دارو تهیه شد.

معادله3

$$\text{مقدار داروی رها شده} = \frac{\text{غلظت داروی رهاشده} \times \text{فاکتور رقت} \times \text{حجم محلول}}{1000}$$

معادله4

$$\text{درصد رهایش دارو} = \frac{\text{مقدار داروی رها شده}}{\text{مقدار کل داروی بارگذاری‌شده}} \times 100$$

کشت سلولی

سلول‌های رده MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط DMEM با 10درصد سرم جنین گاوی[27]، 1درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین، تحت گاز دی‌اکسید کربن 5درصد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. وقتی تراکم سلول‌ها به 80 الی

27. Fetal Bovine Serum (FBS)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

90درصد رسید با استفاده از آنزیم تریپسین –EDTA بازکشت داده شدند.

جذب درون‌سلولی

سلول‌های MCF-7 با تراکم 5000 سلول در هر چاهک پلیت 96 خانه در 100 میکرولیتر محیط DMEM کامل و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و تحت دی‌اکسید کربن 5درصد کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت نانولیپوزوم‌ها به چاهک‌ها افزوده و پس از 6 ساعت انکوبه‌کردن، جذب درون‌سلولی نانولیپوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس معکوس (Olympus IX81، شرکت Olympus، توکیو، ژاپن) مشاهده شد.

آزمون زنده‌مانی سلول‌ها

سلول‌های MCF-7 -با تراکم و شرایطی که ذکر شد- کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت، محیط رویی سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از فرمولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی دارو و غلظت‌های مختلف داروی آزاد جایگزین و به مدت 48 ساعت در شرایط ذکرشده انکوبه شد. همچنین، بعد از سپری‌شدن زمان مورد نظر محلول رویی با 100 میکرولیتر محلول نمک MTT (0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جایگزین و پس از 4 ساعت انکوباسیون، خارج و کریستال‌های ارغوانی رنگ (مربوط به تشکیل کریستال فورمازان) در سلول‌های زنده در 100 میکرولیتر DMSO[28] حل و جذب در طول‌موج 570 نانومتر، اندازه‌گیری و میزان IC_{50}[29] با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism محاسبه شد.

28. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
29. half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

نتایج و بحث

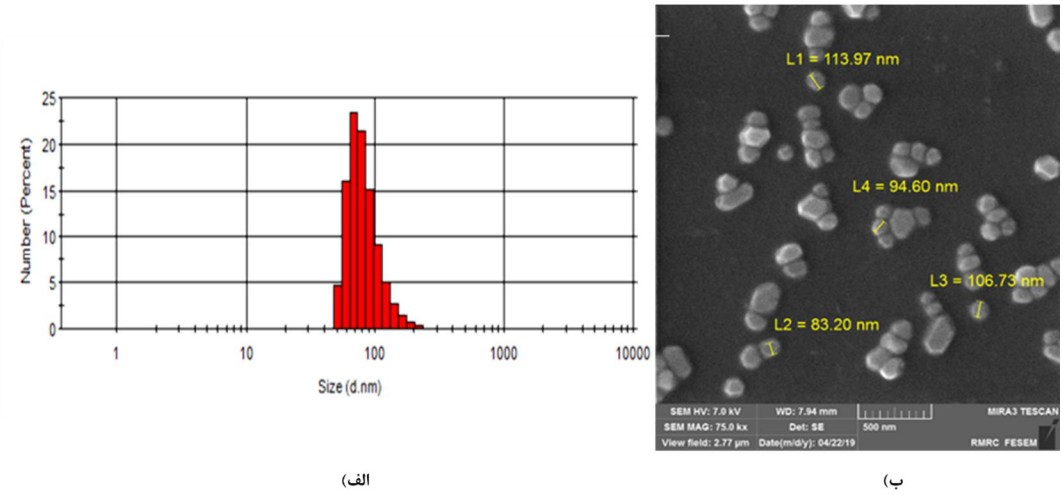
تشکیل نانولیپوزوم‌ها و پایداری آن‌ها

با توجه به اینکه نانولیپوزوم‌ها ساختارهای خودتشکیل‌شونده‌ای می‌باشند برای تأیید سنتز نانولیپوزوم‌ها، ریخت‌شناسی و میانگین قطر آن‌ها با استفاده از دو روش میکروسکوپ الکترونی روبشی[30] و دستگاه زتاسایزر بررسی (شکل 2) و مشخصات آن‌ها در جدول 1 جمع‌آوری شد.

30. scanning electron microscope (SEM)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]



الف) ب)

شکل 2 الف میانگین قطر نانولیپوزوم؛ ب- تصویر SEM

جدول 1 میانگین قطر، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌های سنتزی

دارو	میانگین اندازه (نانومتر)	پتانسیل زتا (میلی ولت)	شاخص پراکندگی
-	66/9 ±3/6	-7/7	0/142
دوکسوربیسین	74/5 ± 6/3	-17/8	0/145
چای سبز	73/7 ± 5/2	-14/6	0/119
(دوکسوروبیسین: چای سبز)	82/5 ±4/8	-24/2	0/169

برای دستیابی به کارایی بالا و تحویل هدفمند داروها در سامانه‌های دارورسانی، پایداری در شرایط فیزیولوژیکی اهمیت بسیاری دارد. برای این منظور و بعد از سپری‌شدن بازه زمانی 1 تا 4 هفته در دمای 4 و 37 درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها از نظر اندازه ذرات بررسی شدند. میانگین اندازه ذرات برای نانولیپوزوم‌ها بعد از سپری‌شدن زمان در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بدون تغییر می‌ماند، این درحالی‌است که اندازه همان ذرات در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت 3 هفته افزایش نشان داد و رسوب دارویی نیز مشاهده شد (جدول 2). نتایج حاکی از آن است که پایداری نانولیپوزوم‌ها تا حد زیادی وابسته به دما است.

جدول 2 پایداری نانولیپوزوم‌های سنتزی در دمای 4 و 37 درجه سانتی‌گراد

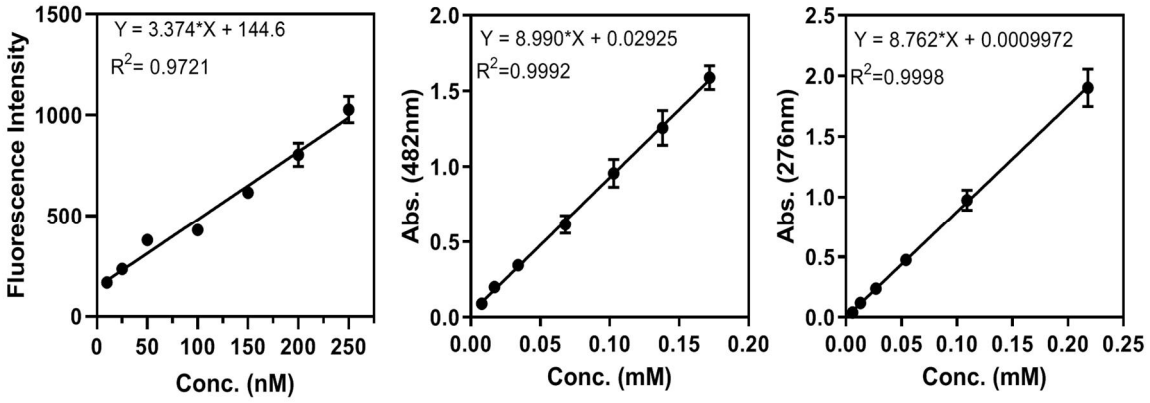
زمان (هفته)	میانگین اندازه (نانومتر)	
	4 درجه سانتی‌گراد	37 درجه سانتی‌گراد
1	82/5 ± 6	89/5 ±4
2	84/3 ± 3	94/3 ±6
3	87/4 ± 2	104/3±7
4	89 ± 3	119/8±9

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

محتوی و بازده محصورسازی

برای به‌دست‌آوردن بازده و محتوی محصورسازی داروها در نانولیپوزوم‌ها ابتدا منحنی استاندارد برای هریک از داروها در بیشینه جذب و نشر رسم شد (شکل 3)، سپس با استفاده از رابطه 1 و 2 این میزان دارو محاسبه و نتایج در (جدول 3 الف، ب) خلاصه شد. این نتایج نشان می‌دهد که داروی DOX با موفقیت در نانولیپوزوم محصور شده و EGCG تأثیر چندانی روی محصورسازی DOX نداشته است.



الف) ب) ج)

شکل 3 الف نمودار استاندارد نشر غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین؛ ب- نمودار استاندارد جذب غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین؛ ج- نمودار استاندارد جذب غلظت‌های مختلف EGCG

جدول 3 الف میزان بارگذاری دارو در لیپوزوم‌ها

غلظت (میلی‌مولار)	دوکسوروبیسین	EGCG*	دوکسوروبیسین (+EGCG)
دارو قبل از بارگذاری	0/086	0/218	0/086
دارو بعد از بارگذاری	0/075	0/137	0/056
فسفولیپید قبل از بارگذاری	1/05	1/05	1/05

جدول 3 ب کمیت‌های بارگذاری

کمیت (درصد)	دو کسوروبیسین	EGCG*	دوکسوروبیسین (+EGCG)
بازده محصورسازی	87/20	62/84	65/12
محتوی محصورسازی	27/27	49/81	20/36

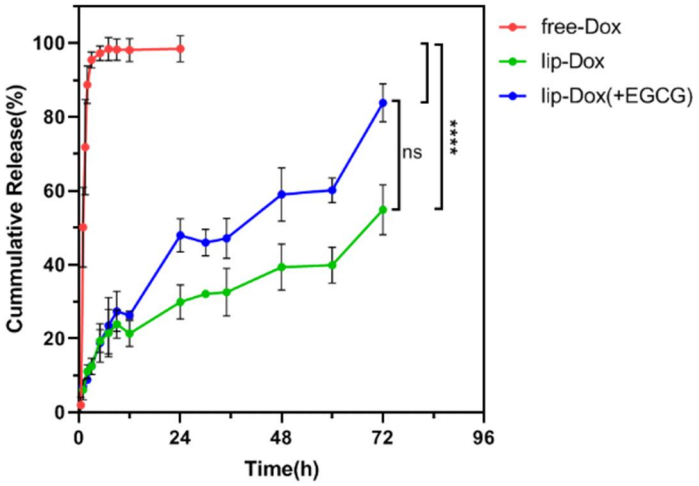
*EGCG: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

بررسی رهایش دارو

رهایش دارو از نانولیپوزوم‌ها به عوامل مختلفی ازجمله ترکیب، روش سنتز، نوع دارو و شرایط محیط (دما و pH) بستگی دارد. شکل 4 میزان رهایش دارو به درون بافر فسفات را در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و pH 7/4 در طی 72 ساعت، با سه تکرار نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رود با گذشت زمان غلظت DOX در بافر برای هر دو نمونه لیپوزوم افزایش می‌یابد و منحنی رهایش به‌دست‌آمده برای هر دو نمونه نسبت به داروی آزاد به‌صورت آهسته و کند است و لیپوزومه‌کردن دارو باعث می‌شود سرعت رهایش نسبت به دوکسوروبیسین آزاد به‌صورت معنادار کاهش یابد. از سویی دیگر، مقایسه رهایش داروی دوکسوروبیسین بین دو لیپوزوم بیانگر این مطلب است که باوجود کاهش سرعت رهایش داروی دوکسوروبیسین در حضور EGCG ولی این روند کاهشی از نظر آماری معنادار نیست.



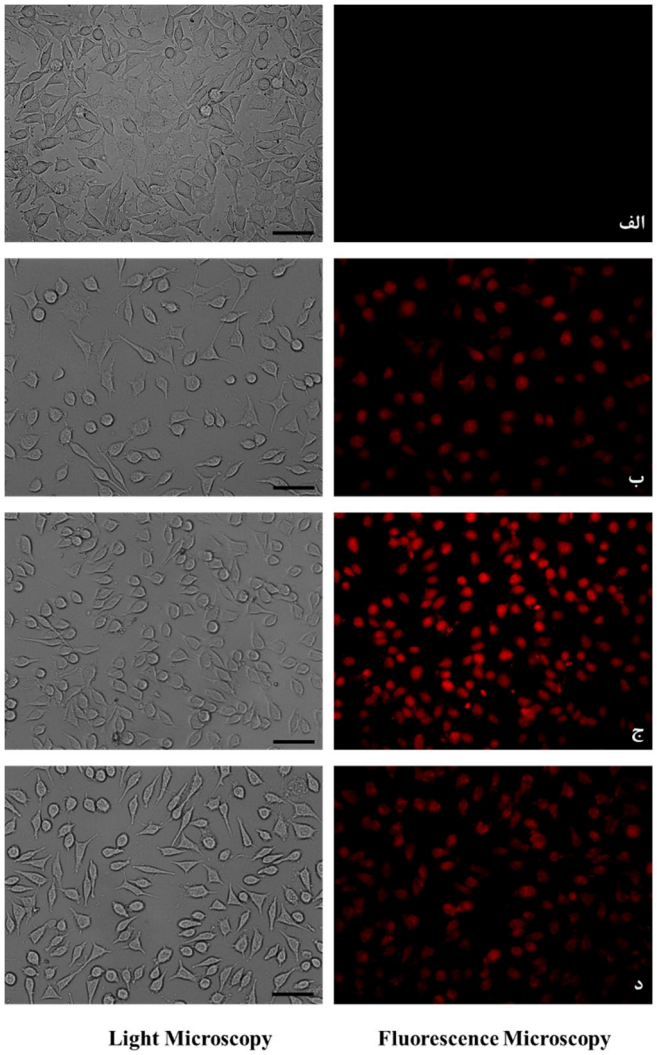
شکل 4 رهایش داروی دوکسوروبیسین به‌صورت آزاد و لیپوزومه شده

بررسی جذب و سمیت سلولی

برای ارزیابی ظرفیت اندوسیتوز داروی DOX سلول‌های MCF-7 به مدت 6 ساعت با داروی DOX آزاد و نانولیپوزوم‌های حاوی DOX و DOX-EGCG انکوبه شدند. همان‌طور که در شکل 5 نشان داده شده است، شدت فلورسانس DOX در سیتوپلاسم سلول‌های تیمارشده با نانولیپوزوم‌های DOX-EGCG نسبت به DOX آزاد زیاد است. این امر نشان‌دهنده افزایش ظرفیت اندوسیتوز با نانولیپوزوم‌ها و نقش EGCG در مهار پمپ P-gp و درنهایت انباشت DOX در سلول‌هاست.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]



شکل 5 الف تصویر میکروسکوپ فلورسنت معکوس سلول‌های **MCF-7** (نوار مقیاس 100 میکرومتر) بدون تیمار دارویی؛ ب- بعد از تیمار با داروی **DOX** آزاد؛ ج- نانولیپوزوم **DOX**؛ د- و نانولیپوزوم **EGCG-DOX**

علاوه بر این میزان سمیت داروها در غلظت‌های مختلف بر اساس تکنیک MTT بررسی شد و مقدار IC_{50} برای نانولیپوزوم‌ها و داروهای آزاد با استفاده از برنامه Graphpad prism به دست آمد. نتایج موجود در جدول 4 بیانگر مهار رشد وابسته به غلظت داروی آزاد و لیپوزومه پس از 72 ساعت است، همچنین ترکیب توأم EGCG-DOX می‌تواند سلول‌های MCF-7 را به DOX حساس کند و تجمع DOX را در سلول‌ها افزایش دهد.

جدول 4 سمیت وابسته به غلظت در سلول‌های **MCF-7** پس از انکوبه‌کردن با داروی **DOX** آزاد، نانولیپوزوم **DOX** و نانولیپوزوم **EGCG-DOX**

نوع دارو	IC_{50} داروی آزاد (میکرومولار)	IC_{50} داروی محصورشده (میکرومولار)
دوکسوروبیسین	0/24	0/03
EGCG	152	126/1
دوکسوروبیسین - EGCG	0/074	0/026

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

نتیجه‌گیری و بحث

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی از EGCG و DOX می‌تواند اثر سمیت سلولی DOX را روی رده سلولی MCF-7 تقویت کند. درحالی‌که غلظت 0/05 میکرومولار دوکسوروبیسین قادر نبود درصد زنده‌مانی سلول‌ها را به زیر 50درصد ببرد، استفاده از آن به همراه 0/1 میکرومولار EGCG درصد زنده‌مانی سلول‌ها را به زیر 50درصد کاهش داد. اهمیت این مطالعه را از دو جنبه می‌توان بررسی کرد: یکی غلبه بر مقاومت دارویی که طبق تحقیقات، درمان ترکیبی با داروهایی با مسیرهای اثربخشی متفاوت روشی نویدبخش برای حل این مشکل است و دیگری کاهش عوارض جانبی داروها با کاهش مقدار موردنیاز آن‌ها. شایان ذکر است که از مشکلات مهم مربوط به دوکسوروبیسین، مقاومت دارویی و عارضه آسیب به میوکارد وابسته به دوز است [9]. این مطالعه نشان می‌دهد که EGCG قادر است سمیت سلولی دوکسوروبیسین را افزایش دهد به‌طوری‌که در غلظت کمتر از IC_{50} موجب مرگ نیمی از جمعیت سلولی شد. تحقیقات نشان می‌دهد EGCG دارای فعالیت‌های زیستی ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدچاقی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، آنتی‌موتاژنز، ضدالتهابی و ضدسرطانی است [10]. این دارو با چندین مکانیسم خاصیت ضدسرطانی دارد: تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی، القا آپوپتوز، کاهش متیلاسیون DNA، رگ‌زایی و متاستاز و... [11]. Tsai و همکارانش در تحقیق خود بیان کردند که EGCG موجب می‌شود آپوپتوز از طریق اتصال به گیرنده‌های لامینین در سلول‌های سرطان پروستات و نه سلول‌های نرمال القا شود [12]. در مطالعه دیگری Gu و همکارانش اثر EGCG را روی سلول‌های سرطان سینه و عروق توموری آن بررسی کردند. EGCG با مهار HIF-1α ، NFκB و بیان VEGF رشد تومور، تکثیر، مهاجرت و رگ‌زایی را مهار می‌کند [13]. مطالعه‌ای که در سال 2010 انجام شد از اثرات مفید درمان ترکیبی EGCG و DOX در درمان سرطان پروستات از طریق مهار رشد سلول‌های PC-3ML خبر می‌دهد [14]. ترکیب EGCG و HDHA-DOX-NPs نیز باعث بروز آپوپتوز در کارسینومای آسیت اریشیخ (EAC) می‌شود، درواقع EGCG فعالیت ضدسرطانی HDHA-NPs را افزایش می‌دهد [15]. به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب EGCG و DOX باعث افزایش مرگ سلولی در سلول‌های رده MCF-7 می‌شود. این داده‌ها ضمن تأیید پژوهش‌های پیشین، اثربخشی هم‌زمان این دو دارو را به‌عنوان یک رژیم شیمی‌درمانی جدید پیشنهاد کرده است. بنابراین، برای استفاده از این ترکیب جدید در مدل حیوانی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در کنار انجام سایر مطالعات و بررسی های تکمیلی الزامی می‌باشد.

منابع

1. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems.* Journal of pharmacy and pharmacology, 2013. **65**(2): p. 157-170.

2. Cheng, T., et al., *Green tea catechin-based complex micelles combined with doxorubicin to overcome cardiotoxicity and multidrug resistance.* Theranostics, 2016. **6**(9): p. 1277.

3. Hu, Y.-P., N. Henry-Toulme, and J. Robert, *Failure of liposomal encapsulation of doxorubicin to circumvent multidrug resistance in an in vitro model of rat glioblastoma cells.* European Journal of Cancer, 1995. **31**(3): p. 389-394.

4. Yang, C.S., et al., *Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance.* Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(6): p. 429.

5. Li, W., et al., *A major green tea component, (−)-epigallocatechin-3-gallate, ameliorates doxorubicin-mediated cardiotoxicity in cardiomyocytes of neonatal rats.* Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(16): p. 8977-8982.

6. Navarro, G., et al., *P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

12. Tsai, L.-C., et al., *EGCG/gelatin-doxorubicin gold nanoparticles enhance therapeutic efficacy of doxorubicin for prostate cancer treatment.* Nanomedicine, 2016. **11**(1): p. 9-30.

13. Gu, J.-W., et al., *EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1α and NFκB, and VEGF expression.* Vascular cell, 2013. **5**(1): p. 9.

14. Stearns, M.E., et al., *Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice.* The American journal of pathology, 2010. **177**(6): p. 3169-3179.

15. Ray, L., P. Kumar, and K.C. Gupta, *The activity against Ehrlich's ascites tumors of doxorubicin contained in self assembled, cell receptor targeted nanoparticle with simultaneous oral delivery of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate.* Biomaterials, 2013. **34**(12): p. 3064-3076.

overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. Nanomedicine, 2012. **7**(1): p. 65-78.

7. Jodoin, J., M. Demeule, and R. Béliveau, *Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2002. **1542**(1-3): p. 149-159.

8. Sesarman, A., et al., *Co-delivery of curcumin and doxorubicin in PEGylated liposomes favored the antineoplastic C26 murine colon carcinoma microenvironment.* Drug delivery and translational research, 2019. **9**(1): p. 260-272.

9. Chatterjee, K., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy.* Cardiology, 2010. **115**(2): p. 155-162.

10. Friedman, M., *Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas.* Molecular nutrition & food research, 2007. **51**(1): p. 116-134.

11. Xiang, L.-P., et al., *Suppressive effects of tea catechins on breast cancer.* Nutrients, 2016. **8**(8): p. 458.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Synthesis of nanoliposomes containing green tea Catechin and doxorubicin to evaluate its toxicity on breast cancer cells

Mohammad Tohidlou[§1], Sanam Sadeghi-Mohammadi[§2], Zahra Vaezi[3], Majid Taghdir[4]*, Hossein Naderi-Manesh[5]*

1-Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2-Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3-Bioactive compounds Department, Interdisciplinary Science and Technologies Faculty, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran

4-Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5-Biophysics-Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[§] Mohammad Tohidlou and Sanam Sadeghi Mohammadi are equally as the first author

Accepted: 2020/10/27 Received: 2020/1/3

*Corresponding authors: taghdir@modares.ac.ir naderman@modares.ac.ir

Abstract:

Chemotherapy is one of the most effective and common treatments for cancer. Multi-drug resistance and drug side effects are one of the major obstacles to successful chemotherapy. To address these limitations and achieve better drug efficacy, nanosystem-based combination therapy offers a promising approach. This study aimed to synthesize, characterize, and investigate the synergistic effect of nanoliposomes loaded with doxorubicin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on MCF-7 breast cancer cell lines. In the present study, nanoliposomes were prepared by passive loading and thin-film hydration. The characterization of nanoliposomes such as size distribution, zeta potential, the loading rate, drug release profile, and toxicity were measured. The mean diameter of nanoliposomes was 82.5±0.6 nm, their surface charge was -24.2 mV and drug loading was about 80%. The interaction of doxorubicin and EGCG with nanoliposomes was mediated by electrostatic and van der Waals bonds and EGCG has a deceasing effect on the doxorubicin release profile but the observed differences are not significant. The toxicity and viability data indicate that the simultaneous use of these two drugs

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]

increased the toxicity of the cells. Nanoliposomes containing doxorubicin were not able to reduce viability to below 50% in monotherapy with 5×10^{-3} μM. While, the amount of viability dramatically reduced to below 50%, in combination with EGCG, resulting as combination chemotherapy. Consequently, the concomitant administration of EGCG with doxorubicin may be a suitable candidate for chemotherapy.

Keywords: Combination therapy, Epigallo-catechin 3-gallate, Doxorubicin, Nanoliposome, Breast cancer

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.7.2]