

ساخت و مشخصه‌یابی سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین به منظور اثرگذاری بر سرطان ریه

مجتبی انصاری^{1*}، محمد امین استبرقی²، بی بی فاطمه حقیرالسادات³، محمد طائب پور³

1- دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه میبد، میبد، ایران

2- کارشناسی مهندس پزشکی، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

3- دکتری نانویوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

4- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

* نویسنده مسئول: Ansari@meybod.ac.ir

پذیرش: 1400/7/20

دریافت: 1400/3/25

چکیده

هدف: شیمی درمانی یکی از روش‌های استفاده شده در درمان سرطان است. هدفمند نبودن این روش با عوارض جانبی بسیاری برای بیمار همراه است. استفاده از نانوحامل‌ها از جمله نانولیپوزوم‌ها راهکار بسیار مؤثری در جهت هدفمند کردن شیمی درمانی است. در این مطالعه سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین با هدف اثرگذاری بر سلول‌های سرطان ریه تهیه و ارزیابی شد.

مواد و روش: در این مطالعه آزمایشگاهی، دو سامانه لیپوزومی با استفاده از غلظت‌های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول بروش آب‌پوشانی لایه نازک تهیه شدند. سپس داروی دوکسوروبیسین در سامانه‌ها بارگذاری شد. در ادامه، یکی از سامانه‌ها براساس میزان بارگذاری دارو و الگوی رهایش دارو انتخاب شد. در پایان نیز سامانه منتخب حاوی دارو از منظر اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شکل ظاهری و زیکول‌های لیپوزومی و برهم‌کنش میان دارو و سامانه بررسی شد.

نتایج: سامانه لیپوزومی منتخب حاوی دوکسوروبیسین با بازده انکپسولاسیون 58/89 درصد، اندازه nm 237، شاخص پراکندگی 0/458 و پتانسیل زتا -35/7 mv می‌باشد. رهایش دوکسوروبیسین از لیپوزوم به صورت کنترل شده بوده و هیچ‌گونه فعل و انفعال شیمیایی بین لیپوزوم و دارو مشاهده نشد. همچنین زیکول‌های لیپوزومی کروی و سطحی صاف دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با استفاده از فناوری نانو می‌توان نانولیپوزوم با فرمولاسیون مناسب حاوی دوکسوروبیسین تهیه کرد که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسبی دارد. بنابراین می‌توان این سامانه لیپوزومی را برای پژوهش‌های بعدی مرتبط به سرطان درمانی پیشنهاد کرد.

کلید واژگان: نانولیپوزوم، دوکسوروبیسین، سرطان، شیمی درمانی.

مقدمه

سرطان به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که مشخصه آنها رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیرطبیعی سلول‌های بدن از جایگاه اصلی به مکان‌های دیگر است [1]. مطالعات نشان می‌دهد که سالیانه بیش از 10 میلیون مورد جدید به این بیماری زیانبار اضافه می‌شود و بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود [2؛ 3]. در این میان سرطان ریه، شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در هر دو جنس مرد و زن است به گونه‌ای که 30 درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در مردان و 26 درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان، مرتبط به سرطان ریه است [4؛ 5]. شیوع این سرطان در ایران نیز رو به افزایش است و در میان سایر سرطان‌ها تاکنون توانسته است رتبه پنجم را در ابتدای ایرانیان به سرطان، به خود اختصاص دهد [6]. سرطان ریه، رشد کنترل‌نشده سلول‌های شش است که از یک یا دو شش آغاز می‌شود. این سلول‌های غیرمعمول به سرعت تقسیم می‌شوند و تشکیل تومور می‌دهند. ایجاد سرطان ریه می‌تواند به دو صورت اولیه و ثانویه باشد. شروع سرطان ریه اولیه، از سلول‌های شش است، درحالی‌که سرطان ریه ثانویه نخست در منطقه دیگری از بدن آغاز می‌شود و سپس بر اثر پدیده متاستاز در سایر قسمت‌های بدن پراکنده شده و به شش‌ها می‌رسد [7]. برای درمان سرطان از روش‌های متعددی از جمله شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی استفاده می‌شود [8]. یکی از داروهای استفاده‌شده در شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین است. این دارو آنتی‌بیوتیکی از دسته آنتراسایکلین‌ها است که به‌وسیله استرپتومایسین پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود که در درمان طیف وسیعی از سرطان‌ها کاربرد دارد [9]. پایداری زیاد در رطوبت و دماهای بالا و نیز حلالیت نسبی در

آب از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دوکسوروبیسین به شمار می‌رود [10]. سازوکار اثر دوکسوروبیسین به گونه‌ای است که با مهار آنزیم توپوایزومراز II از همانندسازی DNA جلوگیری می‌کند و به‌این ترتیب مانع تکثیر سلول‌ها می‌شود [10]. این دارو به‌رغم فعالیت آنتی‌بیوتیکی وسیعی که دارد، به دلیل هدفمندنبودن روش شیمی‌درمانی عوارض جانبی متعددی از جمله سمیت قلبی، سرکوب فعالیت مغز استخوان در تولید سلول‌های خونی و مقاومت دارویی دارد که استفاده از آن را با محدودیت‌ها و نگرانی‌هایی همراه کرده است [11؛ 12].

فناوری نانو به دنبال استفاده از نانوحامل‌هایی است که بتواند بر بسیاری از مشکلات پیش روی رسانش دارو به بافت هدف غلبه نماید و دارو را به‌صورت مؤثرتری در اختیار سلول‌های هدف قرار دهد. یکی از این نانوحامل‌هایی که امروزه در نانو پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، لیپوزوم است [13]. لیپوزوم ذرات ریز و کلوئیدی متشکل از دو یا چند غشای لیپیدی است که به‌طور عمده فسفولیپید بوده و هسته مایعی را در مرکز خود احاطه کرده است که در دهه 1960 توسط آلک بنگهام¹ کشف و معرفی شد [14؛ 15]. شباهت لیپوزوم با غشای سلولی، زیست تخریب پذیر بودن، فقدان ایمونوژنیسیته و سمیت پایین و تنوع و سهولت روش‌های تولید آن، لیپوزوم را به‌عنوان سامانه‌ای مؤثر و مطلوب در دارورسانی معرفی کرده است [16]. اگرچه وزیکول‌های لیپوزومی از نظر اندازه طیف گسترده‌ای را شامل می‌شوند، اما جهت انتقال دارو و دارورسانی از لیپوزوم‌هایی با مقیاس نانو (لیپوزوم‌هایی با اندازه کمتر از 200 نانومتر) استفاده می‌شود، زیرا چنین وزیکول‌های لیپیدی شاخصه‌هایی از جمله توانایی عبور از سد‌های پیشرو

1 Alec Bangham

مانند سد خونی، توانایی عبور از فیلترهای جداکننده باکتری و اسپورهای کوکی و جداسازی از این میکروارگانیسم‌ها دارند [16]. با توجه به غیرهدفمند بودن دارورسانی در بیماران سرطانی و عوارض جانبی متعدد مصرف داروها و نیز مزایای زیاد لیپوزوم به‌عنوان حامل دارویی، پژوهش حاضر با هدف ساخت و بررسی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین انجام شده است که در طی آن سامانه لیپوزومی حاوی دارو از منظر درصد بارگذاری دارو، الگوی ره‌ایش دارو، بار سطحی، اندازه، برهم‌کنش میان دارو و سامانه لیپیدی و شکل ظاهری بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد استفاده‌شده در پژوهش

در پژوهش حاضر، داروی دوکسوروبیسین با غلظت 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متعلق به شرکت سل فارم² آلمان، فسفاتیدیل کولین و کلسترول متعلق به شرکت سیگما آمریکا و کلروفورم و ایزوپروپیل متعلق به شرکت مرک آلمان تهیه و خریداری شد.

رسم نمودار استاندارد داروی دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین (PBS) به‌منظور رسم نمودار کالیبراسیون، نخست سری رقت‌های مختلف دوکسوروبیسین در حلال ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین تهیه شد. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هریک از رقت‌ها اندازه‌گیری شدند. سپس با استفاده از مقدار جذب به‌دست‌آمده، نمودار استاندارد دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل و PBS رسم شد [17].

ساخت نانولیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین نانولیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین به روش آب‌پوشانی لایه نازک و با نسبت‌های مولی جدول 1 تهیه شد. در این مرحله نخست فاز لیپید (فسفاتیدیل کولین و کلسترول) در حلال کلروفورم حل شد. سپس کلروفورم موجود فاز آلی حاصل به‌وسیله دستگاه روتاری در دمای 45 درجه و چرخش 150 دور در دقیقه حذف شده و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. بعد از تبخیر کامل کلروفورم و تشکیل فیلم نازک، همچنین برای اطمینان از حذف کامل حلال، فیلم نازک لیپیدی چندین دقیقه با گاز نیتروژن هوادهی شد و به مدت 24 ساعت نیز در دمای 4 درجه یخچال قرار گرفت. سپس عمل هیدراته‌کردن با افزودن مقدار مناسب داروی دوکسوروبیسین و PBS طی مدت 45 دقیقه و در دمای 50 درجه و چرخش 150 دور در دقیقه بر دستگاه روتاری انجام شد. سپس نانوذرات سنتز شده به‌وسیله سونیکیت حمامی برای مدت یک ساعت کاهش اندازه داده شد و با فیلتر 0/4 و 0/2 میکرومتر فیلتر شد [18].

جدول 1 فرمولاسیون‌های لیپوزومی برای ساخت سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین

نام فرمول	لیپید/ دارو	فسفاتیدیل کولین (%)	کلسترول (%)	غلظت اولیه دارو (mg/ml)
F1	15	70	30	0/5
F2	15	60	40	0/5

پتانسیل زتای³ فرمولاسیون لیپوزومی، شاخص پراکندگی⁴ و اندازه آنها، با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت تجهیزات مالورن طرح نانو زتا سایزر⁵ در دمای اتاق و زاویه 90 اندازه‌گیری شد.

آنالیز نانولیپوزوم سنتز شده به وسیله دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز

برای این منظور حامل‌های لیپوزومی با سانتیفریوژ از سوسپانسیون جدا شده و محلول اضافی تبخیر شد. نمونه‌ها با KBr مخلوط شده و در درون پلیت فشرده می‌شوند. طیف FT-IR به منظور بررسی گروه‌های عاملی نانو لیپوزوم در محدوده عدد موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های جامد و طیف $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های مایع، اسکن شد. به این منظور طیف سامانه لیپوزومی فاقد دارو گرفته شده و با فرمولاسیون نهایی مقایسه می‌شود.

بررسی مورفولوژی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

میکروسکوپ نیروی اتمی یا میکروسکوپ نیرویی پوششی یک نوع از میکروسکوپ پروب پوششی با وضوح تصویر خیلی بالا است. اطلاعات با «حساس» کردن یا «لمس» سطح با یک پروب مکانیکی جمع‌آوری می‌شود.

مورفولوژی نانولیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین مقدار 25 میکرولیتر از نمونه لیپوزومی بر یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل‌ها (زبری، شکل، صافی و توده‌ای شدن) با استفاده از دستگاه SEM⁶ با قدرت 100 وات بررسی شد. (جدول 2)

3 Zeta-Potential

4 Polydispersity Index

5 Nano-ZetaSizer ES

6 Scanning electron microscope

سنجش میزان بارگذاری دارو در نانولیپوزوم در این مرحله نانولیپوزوم‌های حاوی دارو پس از کاهش اندازه به کیسه دیالیز منتقل شده و به مدت یک ساعت دیالیز انجام شد تا داروهایی که در سامانه لیپوزومی قرار نگرفته‌اند، حذف شوند. به منظور بررسی میزان بارگذاری دارو در نانولیپوزوم، لیپوزوم‌های ساخته شده با نسبت حجمی 20:1 با ایزوپروپیل مخلوط شد تا دیواره لیپیدی اطراف دارو شکسته شود و دارو رها شود. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتری در طول موج ماکزیمم دوکسوروبیسین (480 نانومتر) میزان داروی خارج شده از سامانه محاسبه شد. در نهایت با استفاده از نمودار استاندارد دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل و رابطه (1) میزان انباشتگی دارو به دست آمد [19].

$100 \times$ کل داروی استفاده شده / مقدار داروی

محصول شده = بازده درون‌گیری

رابطه (1)

بررسی روند رهایش دارو از نانولیپوزوم

بررسی پروفایل رهایش دوکسوروبیسین از سامانه لیپوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز انجام شد. در این روش مقدار مشخصی از لیپوزوم حاوی داروی دوکسوروبیسین در کیسه دیالیز ریخته شد و در کنار بافر PBS در شرایط مشابه سلول نرمال (دمای 37 درجه و $\text{pH} = 7.4$) قرار گرفت و در فاصله‌های زمانی مشخص نمونه‌برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز انجام شد و مقدار جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی و با استفاده از معادله کالیبراسیون دوکسوروبیسین در PBS، نمودار رهایش داروی دوکسوروبیسین از سامانه لیپوزومی رسم شد [18].

تعیین اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا

نانولیپوزوم حاوی دارو

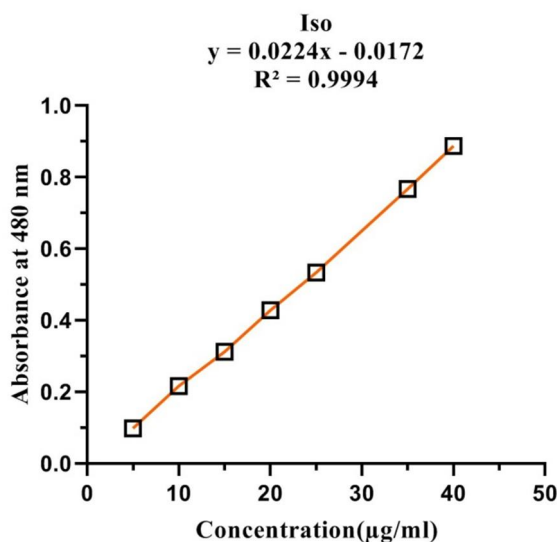
نتایج

جدول 1 بررسی فرمولاسیون بهینه

Formula	Type	L/D	EE (%)	Release (%)	Size(nm)	PDI	Zeta Potential(mv)
F1*	Liposome	15	58.89±1.05	55.75±1.6	273	0.45±0.01	-35.7±2
F2	Liposome	15	55.74±2.13	89.65±3.2	*	*	*

در ایزوپروپیل (شکل 1) و رابطه 1 برای فرمولاسیون F₁،
58/89 درصد و برای فرمولاسیون F₂ 55/74 درصد
محاسبه شد.

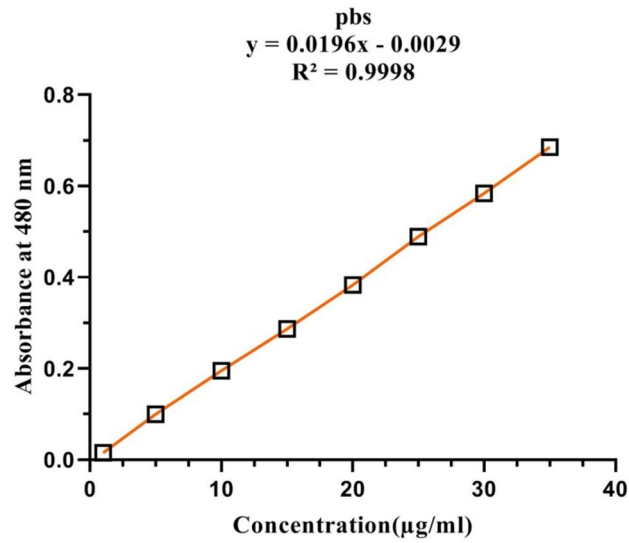
بررسی میزان بازده انکپسولاسیون
میزان بارگذاری دوکسوروبیسین در نانوحامل لیپوزومی با
استفاده از معادله خط نمودار کالیبراسیون دوکسوروبیسین



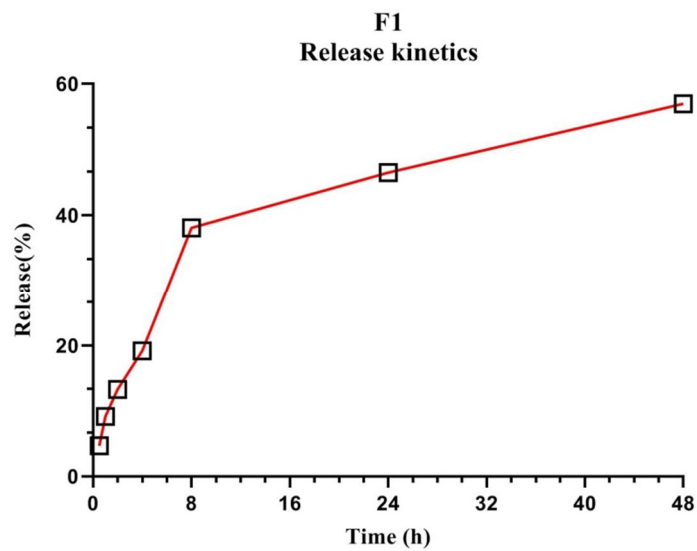
شکل 1 نمودار استاندارد دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل

F₂ به ترتیب برابر 55/75 و 89/65 درصد است.
براساس الگوی رهائش می‌توان بیان کرد که برای
فرمولاسیون F₁ لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین در
شرایط فیزیولوژیک رهائش کنترل‌شده و آهسته دارند
درحالی‌که در فرمولاسیون F₂ رهائش دارو به‌صورت
سریع است.

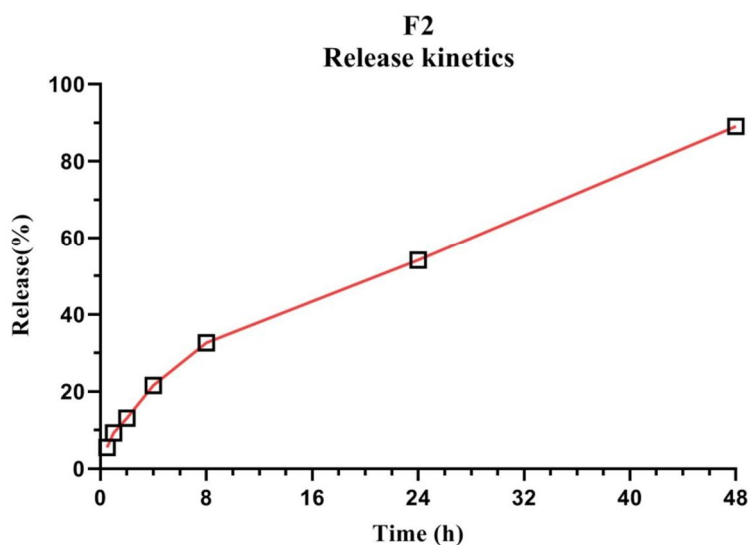
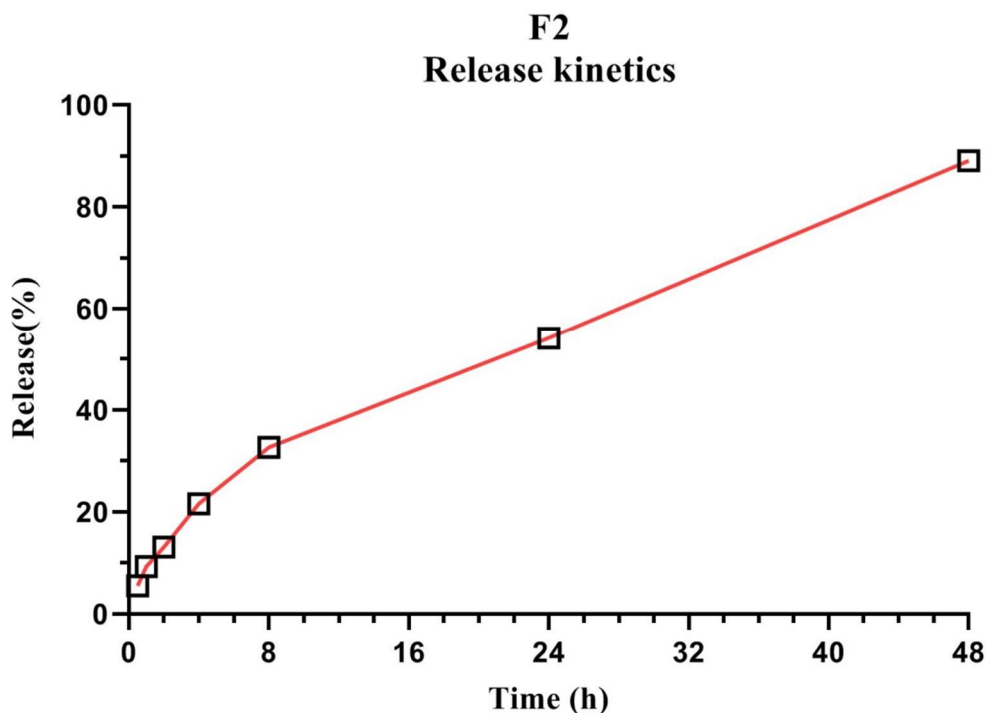
بررسی رهائش دوکسوروبیسین از نانولیپوزوم
میزان رهائش دوکسوروبیسین از نانولیپوزوم با توجه به
نمودار کالیبراسیون دوکسوروبیسین در PBS محاسبه شد
(شکل 2) و الگوی رهائش برای فرمولاسیون‌های F₁ و
F₂ رسم شد (شکل‌های 3 و 4). نمودارهای رهائش دارو
نشان می‌دهد که حداکثر مقدار دارو آزادشده از
نانولیپوزوم در مدت 48 ساعت برای فرمولاسیون‌های F₁



شکل 2 نمودار استاندارد دوکسوروبیسین در PBS



شکل 3 نمودار رهایش داروی دوکسوروبیسین از سامانه لیپوزومی F₁



شکل 4 نمودار رهایش داروی دوکسوروبیسین از سامانه لیپوزومی F₂

اندازه و پتانسیل زتا لیپوزوم‌های درون‌گیری‌شده دوکسوروبیسین با استفاده از دستگاه نانو سایزر (DLS) به صورت سه بار تکرار اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات قبل از بارگذاری دارو 139,7 نانومتر و 0/211 است (شکل 5) و متوسط اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات بعد از بارگذاری دارو

بنابراین با استناد به درصد انکپسولاسیون و اثر غلظت کلسترول بر کارایی انکپسولاسیون و الگوی رهایش دارو دوکسوروبیسین، فرمولاسیون F₁ به منظور انجام سایر مراحل آزمایش و آنالیزهای بعدی انتخاب شد. اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای ذرات سازنده حاصل از فرمولاسیون F₁

دوکسوروبیسین به ترتیب $-15/3$ و $-35/7$ میلی ولت است (شکل های 6 و 7 و 8).

به ترتیب 327,3 نانومتر و 0/458 است که نشان می دهد ذرات به طور یکنواخت پراکنده شده است. همچنین میانگین پتانسیل زتا سطح نانولیپوزوم فاقد حاوی

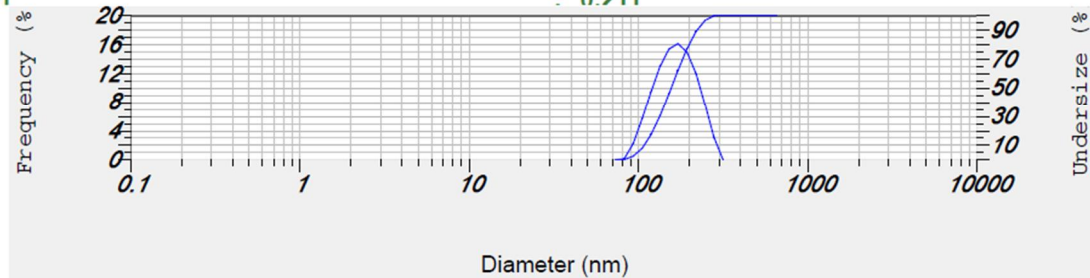
Cumulant Operations

Z-Average

: 139.7 nm

PI

: 0.211



شکل 5 اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات برای سامانه لیپوزومی F_1 فاقد دارو (A)

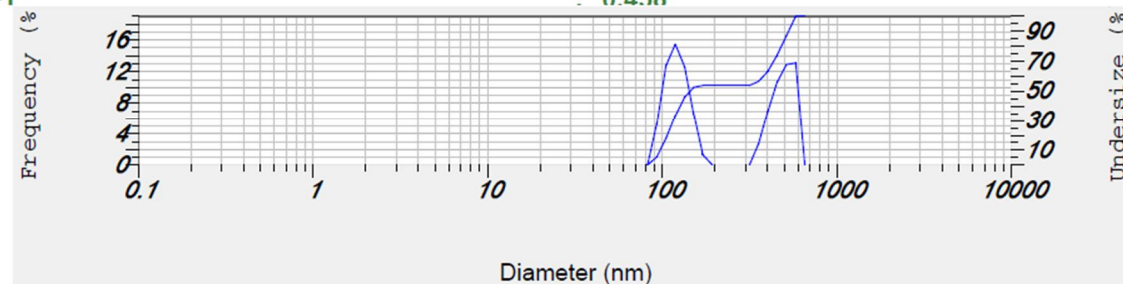
Cumulant Operations

Z-Average

: 237.3 nm

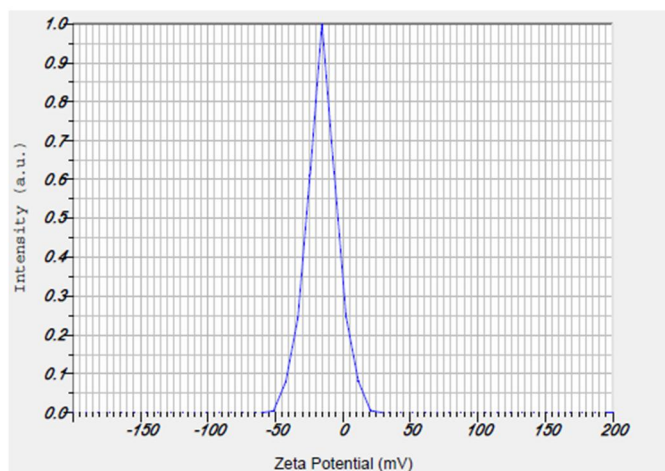
PI

: 0.458



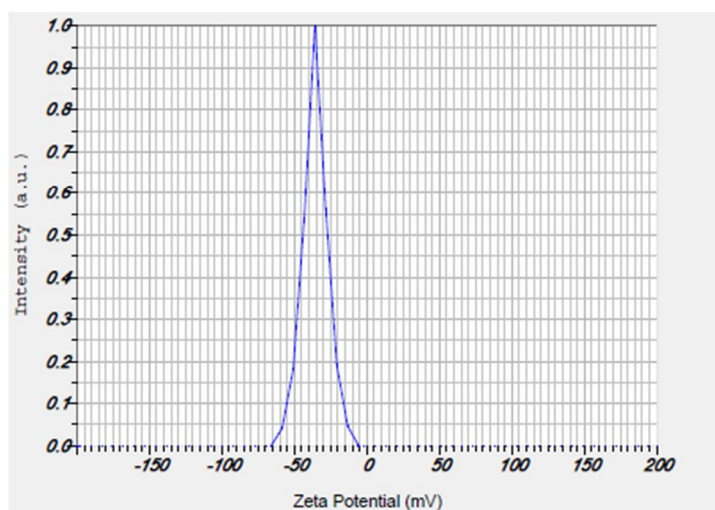
شکل 6 اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات برای سامانه لیپوزومی F_1 حاوی دارو (B)

Zeta Potential (Mean) : -15.3 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000119 cm²/Vs



شکل 7 پتانسیل زتای سامانه لیپوزومی F_1 فاقد دارو (A)

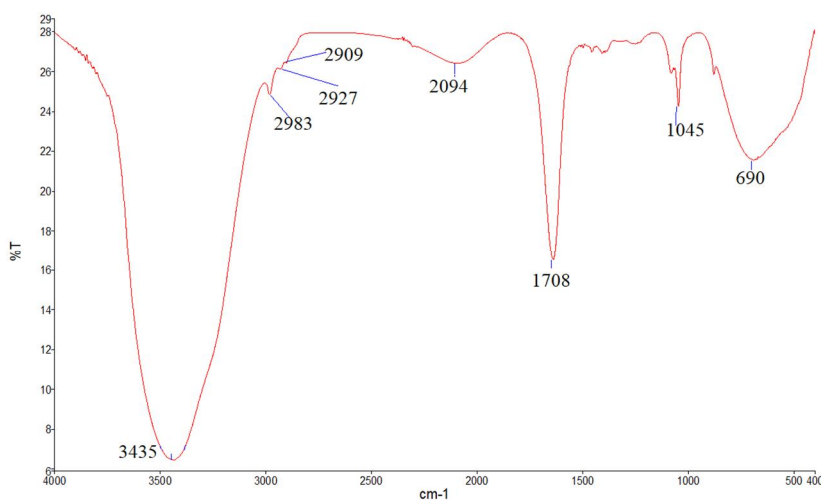
Zeta Potential (Mean) : -35.7 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000277 cm²/Vs



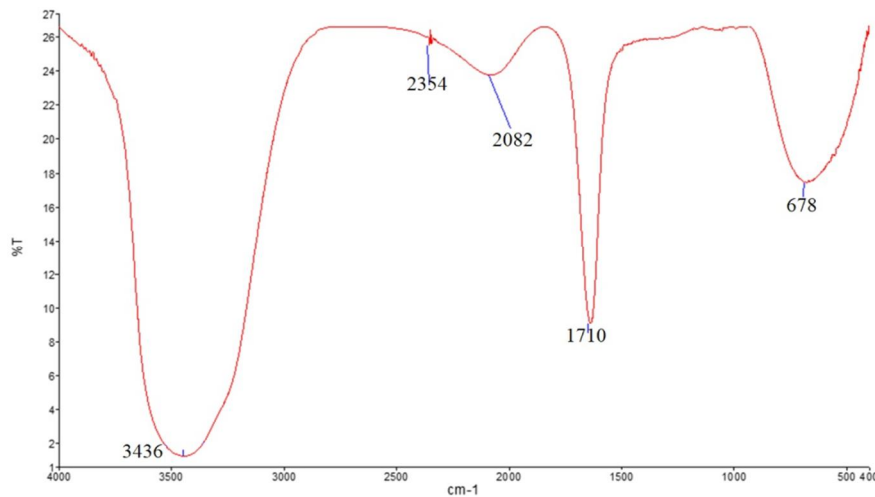
شکل 8 پتانسیل زتای سامانه لیپوزومی F₁ حاوی دارو (B)

که مربوط به گروه C-O است، مشاهده می‌شود. همان‌طور که در طیف FT-IR لیپوزوم حاوی دارو مشخص است (شکل 10)، با بارگذاری داروی دوکسوروبیسین درون سامانه لیپوزومی، اندکی جابه‌جایی در مکان پیک‌ها نسبت به طیف FT-IR لیپوزوم فاقد دارو دیده می‌شود، ولی پیک جدیدی ایجاد نشده است که خود گواهی بر بارگذاری دارو درون لیپوزوم و عدم برهم‌کنش میان سامانه لیپیدی و داروی دوکسوروبیسین می‌باشد.

بررسی برهم‌کنش میان دارو و سامانه لیپوزومی حاصل از فرمولاسیون F₁ در طیف FT-IR سامانه لیپوزومی فاقد دارو (شکل 9) پیک شاخص 3435/9 cm⁻¹ که مشخصه گروه عاملی OH، پیک‌های 2983/05 cm⁻¹ و 2927/3 cm⁻¹ و 2909/3 cm⁻¹ که مشخصه ارتعاش کششی CH₃، پیک 1708 cm⁻¹ که مشخصه ارتعاش کششی پیوند C=O، 690/02 cm⁻¹ که مشخصه گروه عاملی آلکن‌ها با پیوند دوگانه C=C و پیک‌های موجود در ناحیه 1000 تا 1300



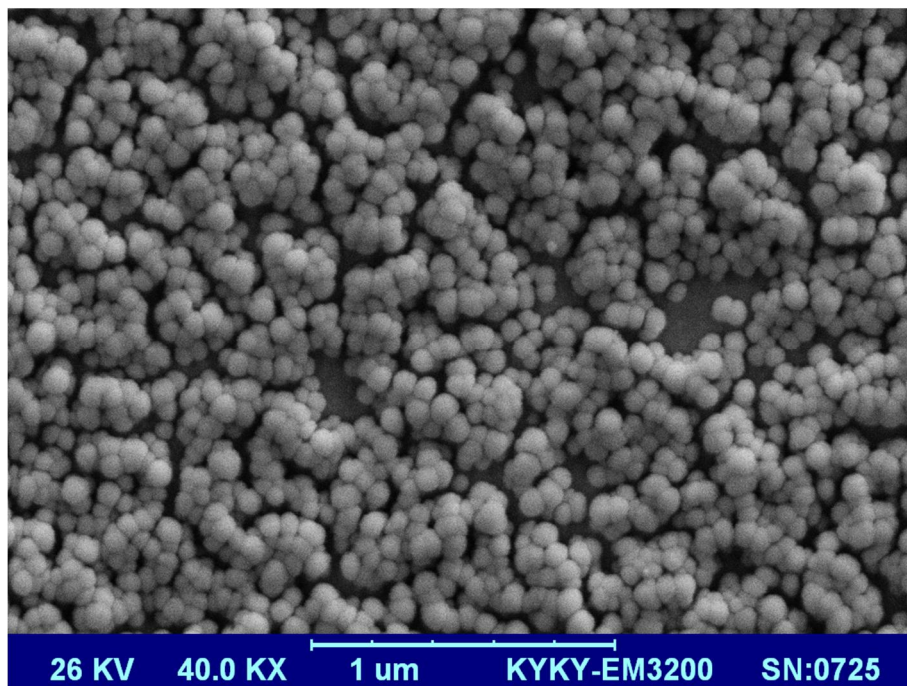
شکل 9 طیف FTIR سامانه لیپوزومی بدون دارو



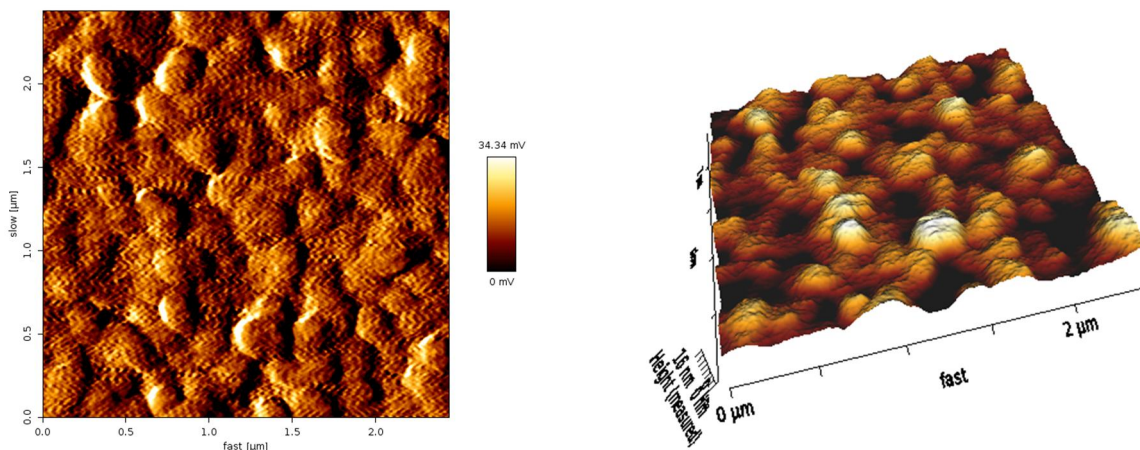
شکل 10 طیف FTIR سامانه لیپوزومی حاوی دارو

می‌شود که نانوحامل لیپیدی حاوی دارو مورفولوژی همگن، یکنواخت و کروی دارد. براساس تصویر اندازه نانولیپوزوم‌های به‌دست‌آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی با اندازه‌های به‌دست‌آمده از راه تفرق نور پویا تقریباً تطابق داشته است.

بررسی مورفولوژی نانولیپوزوم حاصل از فرمولاسیون F_1 شکل 11 و 12 مورفولوژی نانولیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین را به ترتیب زیر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی (AFM) نشان می‌دهد. براساس این تصویر مشخص



شکل 11 تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سامانه لیپوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین حاصل از فرمولاسیون F_1



شکل 12 تصویر میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی از سامانه لیپوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین حاصل از فرمولاسیون F

بحث

سرطان، یکی از مشکلات مهم در بخش سلامت در جهان است. بروز سرطان روزبه‌روز در حال افزایش است. یکی از سرطان‌های مهلک که بخش زیادی از مرگ‌ومیر سالیانه در جهان را به خود اختصاص می‌دهد، سرطان ریه است. برای درمان این بیماری راهکارهای متعددی از جمله شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی وجود دارد. داروی دوکسوروبیسین نوعی داروی ضد سرطان است که در روش شیمی‌درمانی از آن استفاده می‌شود و در درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان ریه استفاده می‌شود. استفاده از دوکسوروبیسین عوارض جانبی متعددی دارد که مهم‌ترین آن سمیت قلبی است. بنابراین استفاده از این دارو با مشکلات و نگرانی‌هایی همراه شده است. پیشرفت فناوری نانو انقلاب عظیمی را در زمینه داروسازی و دارورسانی هدفمند ایجاد کرد. به‌منظور کاهش عوارض ناشی از مصرف دوکسوروبیسین از فناوری نانو استفاده می‌شود و دارورسانی به بدن بیمار به‌صورت هدفمند انجام می‌شود. برای این کار از حامل‌ها استفاده می‌شود که یکی از این حامل‌ها نانولیپوزوم‌ها هستند. دارورسانی با کمک نانولیپوزوم‌ها به بدن باعث کاهش عوارض جانبی مصرف این دارو و افزایش راندمان این دارو می‌شود. در این پژوهش بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در داخل لیپوزوم به‌منظور افزایش پایداری دارو در جهت رسانش به سلول‌های سرطانی ریه

انجام شده است. استفاده از نانولیپوزوم‌ها برای انتقال داروی دوکسوروبیسین به سلول‌های سرطانی ریه نقش مهمی در پایداری این دارو در بدن و دارورسانی صحیح در بدن ایفا می‌کند. استفاده از کلسترول در بهینه‌سازی فرمولاسیون لیپوزومی تأثیر بسیار بالایی دارد. به‌طورکلی مقدار کلسترول موجود در ساختار لیپوزومی از عوامل مؤثر بر کارایی بارگیری و رهایش دارویی لیپوزوم است، به‌طوری‌که کلسترول در غلظت‌های پایین، نفوذپذیری غشایی را می‌افزاید و در غلظت‌های بالا با محدود کردن آزادی حرکت زنجیره آسیلی فسفولیپید غشایی، منجر به کاهش انعطاف‌پذیری ساختار دولایه‌ای و کاهش آزادسازی دارو می‌شود [20]. بنابراین انتظار می‌رود کلسترول در غلظت‌های بالاتر با توجه به پایداری بیشتر غشای لیپوزومی احتمال نشت دارو طی فرایند آماده‌سازی لیپوزوم کاهش پیدا کرده و در نتیجه درصد بارگیری دارویی افزایش پیدا کند. باین‌حال رهایش انفجاری و غیرقابل قبولی را نشان می‌دهد. براساس این گفته درصد بارگیری در فرمولاسیون‌های حاوی 40 درصد کلسترول در فرمول (F2) بیشتر از فرمول F1 بوده است، این نکته در حالی است که درصد بارگیری در لیپوزوم حاوی 30 درصد کلسترول کمتر شده، اما سستیک رهایش قابل قبولی را نشان داده است. در مراحل بهینه‌سازی، تغییرات پتانسیل زتا نیز زیر نظر گرفته شد. از منظر تئوریک، مقادیر بزرگ منفی یا مثبت (مقدار عددی کمتر از 30

گذشته برابری داشته و قابل قبول است. پژوهش‌هایی که در مورد داروهای محصورشده در لیپوزوم انجام گرفته است، نشان می‌دهد که این محصولات می‌تواند کاربرد بالینی در درمان انواع بیماری‌ها داشته باشد و به‌زودی این داروهای محصور در نانولیپوزوم‌ها تولید خواهند شد [23]. در مطالعه‌ای که کرالد و همکاران در سال 2001 بر داروی دوکسوروبیسین انجام دادند، داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را نسبت به دوکسوروبیسین آزاد به‌منظور کاهش سمیت قلبی بررسی کردند. نتایج، نشان از کاهش سمیت قلبی دوکسوروبیسین در حالت محصور در لیپوزوم است [24]. در مطالعه‌ای که مای تان و همکارانش در سال 2010 انجام دادند، داروی دوکسوروبیسین را در میکروذرات کیتوزان - دکستران سولفات محصور کردند و کارایی آن را در درمان سرطان استئو سارکوما بررسی کردند. نتیجه این پژوهش نشان داد که دوکسوروبیسین محصورشده دارای اثرات ضد سرطانی چشمگیری است [25]. فبیری و همکاران در سال 2016، نانوذرات لیپوزومی حاوی سیس پلاتین برای اثرگذاری بر HepG2 کارسینوما کبد انسانی تهیه کردند. نتایج نشان داد که انکپسولاسیون دارو نسبت به فرم آزاد آن کارایی بیشتری دارد [26]. در سال 2017، نادری‌نژاد و همکاران موفق به ساخت لیپوزوم‌های حاوی کورکومین به‌منظور اثرگذاری بر سرطان استخوان شدند که نتایج پژوهش آنها نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های حاوی کورکومین نسبت به کورکومین لیپوزوم‌نشده، آثار ضد سرطانی بالاتری دارد [27]. مجدی‌زاده و همکاران سال 2018، موفق به تهیه سامانه لیپوزومی آهسته رهش حاوی اسانس نعناع فلفلی با اندازه $247 \pm 13/9$ nm پتانسیل زتای $-34/54$ mV، شاخص پراکندگی $0/32$ و درصد بارگذاری $61/38$ شدند (17). در سال 2018، بهرامی بنان و همکاران، سامانه نیوزومی حاوی دوکسوروبیسین با اندازه ذرات $160/37$ nm، پتانسیل زتای $-58/11$ و درصد بارگذاری $94/18$ تهیه و گزارش کردند که حداکثر رهش دارو از این سامانه آهسته رهش

میلی‌ولت) برای پتانسیل زتای ذرات به دلیل بیشتربودن میزان دافعه الکترواستاتیک، به معنای پایداری کلئوئیدی بالاتر است ولی از نقطه نظر زیست‌شناختی، ذرات دارای پتانسیل زتای منفی یا مثبت بیش از حد بالا در معرض شناسایی و پاکسازی از بدن قرار دارند. به‌طور معمول پتانسیل زتای مابین -30 تا 5 میلی‌ولت برای سیستم‌های نانومدیكال مطلوب در نظر گرفته می‌شود، چون پتانسیل زتای بیشتر سلول‌ها منفی بوده و در این محدوده مقداری قرار دارد. اهمیت پتانسیل زتای منفی در این است که مانع برهم‌کنش‌های غیراختصاصی با اجزای خونی شده و بنابراین خطر اوپسونیزاسیون و پاکسازی به‌وسیله سیستم ایمنی را کاهش می‌دهد [21]. در سال 2008 ازکان و همکاران نشان دادند که در اثر تیمار سلول‌های سرطان پستان mcf-7 (که پتانسیل زتای -20 میلی‌ولت داشتند) با نانوذرات دارای پتانسیل زتای -13 میلی‌ولت، پتانسیل زتای سلول‌ها پس از 30 دقیقه منفی‌تر شد و به -24 میلی‌ولت کاهش پیدا کرد. پس از 4 ساعت به -25 میلی‌ولت رسید و پس از تیمار 24 ساعته به $-26,3$ میلی‌ولت بیشتر کاهش یافت. آنها در نهایت نتیجه گرفتند که این تغییرات در منفی‌تر شدن پتانسیل زتای سلول‌ها بر اثر اتصال و تجمع نانوذرات دارای بار منفی بر سطح غشای پلاسمایی سلول‌ها رخ داده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گزاره آنها نیز اتصال نانوذرات به سلول‌ها را تأیید کرده و نشان داد که علاوه بر این، نانوذرات به‌واسطه وزیکول‌هایی از راه اندوسیتوز وارد سلول‌های MCF-7 می‌شوند. آنها همچنین مشاهده کردند که فرایند اندوسیتوز نانوذرات دارای بار منفی به داخل سلول‌هایی با بار سطحی منفی که به‌طور منطقی به دلیل دافعه الکترواستاتیک نباید ممکن باشد، می‌تواند توسط برخی پروتئین‌ها میانجی‌گری شود. بنابراین بار منفی نانوذرات در محدوده مقداری نزدیک به بار سطحی سلول‌های هدف می‌تواند برای برداشت سلولی آنها مطلوب باشد [22]. در این مطالعه پتانسیل نانوذرات لیپوزومی سنتز شده -15 میلی‌ولت بوده که با مطالعات

لیپوزومی حاوی مذکور برای بررسی بیشتر در پژوهش‌های درمان سرطان پیشنهاد می‌شود.

منابع

- [1] Pecorino L. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*: Oxford University Press, USA; 2016.
- [2] Cheong I, Zhou S. Tumor-specific liposomal drug release mediated by liposomase. *Methods in enzymology*. 2009;465:251-65.
- [3] Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology*. 2017;3(4):524-48.
- [4] Liu C, Wen Z, Li Y, Peng L. Application of ThinPrep bronchial brushing cytology in the early diagnosis of lung cancer: a retrospective study. *PLoS One*. 2014;9(4):e90.163
- [5] Kumar V, Abbas A, Aster J. *Environmental and nutritional diseases*. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 9th ed Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. 2015;433.
- [6] Hosseini M, Naghan PA, Karimi S, SeyedAlinaghi S, Bahadori M, Khodadad K, et al. Environmental risk factors for lung cancer in Iran: a case-control study. *International journal of epidemiology*. 2009;38(4):989-96.
- [7] Krishnaiah V, Narsimha G, Chandra NS. Diagnosis of lung cancer prediction system using data mining classification techniques. *International Journal of Computer Science and Information Technologies*. 2013;4(1):39-45.
- [8] Taghavi Holagh A, Aabednatanzi H, Badalzadeh R, Ghazalian F. The effect of Troxerutin combined with high intensity interval training on heart injury and expression of antioxidant genes in doxorubicin-induced

در شرایط سلول نرمال 38/38 درصد است [28]. در سال 2018، ساسانی و همکاران، موفق به ساخت سامانه لیپیدی هیبرید شده‌ای از لیپوزوم و نیوزوم (لیپونیوزوم) حاوی کورکومین با اندازه ذرات 147/5 nm، پتانسیل زتای $-8/9$ mV و درصد بارگذاری 98/12 شدند [29]. شاهی و همکاران سال 2019، سامانه نیوزومی بهینه شده‌ای از دوکسوروبیسین تهیه و گزارش کردند که این سامانه نیوزومی دارای درصد بارگذاری دارو 91/8، اندازه ذرات 92/59 nm، پتانسیل زتای $-3/5$ mV و شاخص پراکندگی 0/196 می‌باشد. همچنین حداکثر ره‌ایش دارو از این سامانه طی 48 در شرایط سلول نرمال ساعت 62/3 درصد گزارش شده است [18]. موسوی‌زاده و همکاران در سال 2019، سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین با هدف اثرگذاری بر سرطان ریه تهیه و گزارش کردند که این سامانه لیپوزومی اندازه ذرات 132/9 nm، پتانسیل زتای $-38/73$ mV و درصد بارگذاری 93/71 درصد دارد. همچنین حداکثر ره‌ایش دارو از این سامانه طی 72 ساعت در شرایط سلول نرمال 36/54 درصد گزارش شده است [19].

نتیجه‌گیری

داروهای شیمی‌درمانی به‌صورت گسترده در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود. استفاده از این داروها به دلیل هدفمند نبودن دارورسانی، عوارض جانبی و مشکلاتی را برای بیماران به وجود می‌آورد. بنابراین استفاده از سیستم دارورسانی هدفمند برای درمان این بیماران که عوارض جانبی را به حداقل برساند، امری ضروری است. در پژوهش حاضر ضمن ساخت دو سامانه لیپوزومی حاوی داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین، منتهی به فرمولاسیون لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین با مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی مناسب از جمله ره‌ایش آهسته، آنیونی، درصد درونگیری بالا، عدم برهم‌کنش شیمیایی سامانه و دارو و شکل ظاهری مناسب شد. بنابراین سامانه

potential in cancer cells temperature and acidity. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 15;26(10):879-94.

[19] Baghiani M, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2019.

[20] Momo F, Fabris S, Stevanato R. Interaction of fluoxetine with phosphatidylcholine liposomes. *Biophysical chemistry*. 2005;118(1):15-21.

[21] Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255-64.

[22] Zhang Y, Yang M, Portney NG, Cui D, Budak G, Ozbay E, et al. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical microdevices*. 2008;10(2):321-8.

[23] 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? *Biotechnology advances*. 2011;17-402:(4)29;

[24] Dua J, Rana A, Bhandari A. Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*. 2012;3(2):14-20.

[25] Tan ML, Friedhuber AM, Dunstan DE, Choong PF, Dass CR. The performance of doxorubicin encapsulated in chitosan-dextran sulphate microparticles in an osteosarcoma model. *Biomaterials*. 2010;31(3):541-51.

[26] Ghanbari M, Ebrahimi Shaham Abadi H, Saffari Z & Akbarzadeh Khiyavi A. Pegylated nanoliposome New Cellular & Molecular Biotechnology Journal. 2016;6(21):35-40.

[27] Naderinezhad S, Haghirsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad A, Esmaili Z, Akbarzade A. Synthesis of biodegradable and

cardiac toxicity in male rats. *Daneshvar Medicine*. 2021;29(2):79-90.

[9] McEvoy G. Snow, ED, eds. AHFS: drug information Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists. 2008.

[10] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*. 2000;256(1):42-9.

[11] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2014;10(4):853.

[12] Barenholz Y, Gabizon A. Liposome/doxorubicin composition and method. Google Patents; 1990.

[13] Mirahmadi N, Babaei M, Vali A, Dadashzadeh S. Effect of liposome size on peritoneal retention and organ distribution after intraperitoneal injection in mice. *International journal of pharmaceutics*. 2010;383(1-2):7-13.

[14] Keller BC. Liposomes in nutrition. *Trends in food science & technology*. 2001;12(1):25-31.

[15] Moghimipour E, Kouchak M, Bahmandar R. Nano-liposomes as new Drug Delivery Carriers. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2013;12(5):467-483.

[16] Sirisha V, BhavaniHarika I, Sruthi B, Namrata M, Kirankumar P, Kiran Y, et al. Liposomes-the potential drug carriers. *J Pharm*. 2012;2(5):26-38.

[17] Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU_Journals*. 2018;25(11):853-64.

[18] Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high

line KG-1. Journal of Payavard Salamat. 2018;12(4):309-23.

[29] Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. A new study on synthesize and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. SSU_Journals. 2018;26(6):528-41.

self-assembled anionic nano-carrier: Novel approach for improvement of Curcumin-delivery to bone tumors cells & Mathematical modeling of drug-release kinetic. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2017;7(27):77-84.

[28] Bahrami-Banan F, Sheikhha MH, Ghasemi N, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Preparation and study of nano-niosomes containing doxorubicin and evaluation of its toxicity on acute myeloblastic leukemia cell

Construction and characterization of a doxorubicin-containing liposomal system for effecting lung cancer

Mojtaba Ansari^{1*}, Mohammad Amin Estabraghi², Bibi Fatemeh Haghirosadat³,
Mohammad Taebpour⁴

1-Associate professor, Department of Biomedical Engineering, Meybod University, Meybod, Iran

2-Department of Biomedical Engineering, University of Science and Art, Yazd, Iran

3-Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences,
Yazd, Iran

4-School of Paramedical Sciences, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences,
Yazd, Iran

* Corresponding Author: ansari@meybod.ac.ir

Received: 2021/6/15

Accepted: 2021/10/12

Abstract

Chemotherapy is one of the methods used in the treatment of cancer. Not being targeted has many side effects for the patient. The use of nano-carriers, including nano-liposomes, is a very effective way to target chemotherapy. In this study, a liposomal system containing doxorubicin was designed and evaluated for its effect on lung cancer cells.

In this in vitro study, two liposomal systems were prepared by the method of thin-film hydration and using different concentrations of phosphatidylcholine and cholesterol. Doxorubicin was then loaded into the systems. Finally, one of the systems was selected based on the drug loading rate and drug release pattern. At the end, the selected drug delivery system in terms of particle size, zeta potential, liposomal vesicle appearance, and the interaction between the drug and the system was investigated.

The selected liposomal system contains doxorubicin with an encapsulation efficiency of 58.89%, size of 273 nm, dispersion index of 0.458 and zeta potential of -35.7 mv. Doxorubicin release from liposomes was controlled and no chemical interaction was observed between liposomes and referees. Liposomal vesicles are also spherical and have a smooth surface.

The results of this study show that nano-liposomes can be prepared with appropriate formulation containing doxorubicin using nanotechnology. Which has good physicochemical properties. Therefore, this liposomal system can be recommended for further cancer-related research.

Keywords: Nano Liposomes, Doxorubicin, Cancer, Chemotherapy