

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 واعظی³، مجید تقدیر^{4*}، حسین نادری منش^{5*}

- 1- کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 2- دکتری، گروه نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 3- استادیار، گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری‌های بین‌رشته‌ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 4- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 5- استادیار، گروه بیوفیزیک/نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- §محمد توحیدلو و صنم صادقی محمدی سهم یکسانی به‌عنوان نویسنده اول دارند

تاریخ پذیرش: 1399/8/6

تاریخ دریافت: 1398/12/13

*نویسندگان مسئول:

صندوق پستی دانشگاه تربیت مدرس: 14115-111

naderman@modares.ac.ir

صندوق پستی دانشگاه تربیت مدرس: 14115-111

taghdir@modares.ac.ir

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 $82/5 \pm 0/6$ 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 اندروالسی بوده و اپی‌گالو کاتچین-3-گالات روی منحنی رهایش دوکسوروبیسین اثر کاهشی

می‌گذارد در صورتی که اختلاف مشاهده شده 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 در نتیجه 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. با وجود تشخیص سریع و درمان سرطان سینه در کشورهای توسعه‌یافته، این بیماری دومین سرطان شایع در بین زنان است که در کشورهای در حال توسعه 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. از جمله داروی دوکسوروبیسین (DOX)¹، یک آنتی‌بیوتیک آنتراسیکلین که در تومورهای جامد استفاده گسترده‌ای دارد. با این حال، استفاده از این دارو محدودیت‌های مختلفی دارد که باعث می‌شوند اثربخشی درمانی آن، از جمله 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، از جمله قراردادن دارو در نانوحامل‌ها برای بهبود حلالیت و افزایش تحویل هدفمند دارو. با این حال، 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 از جمله این ترکیبات به شمار می‌رود. این ترکیبات طیفی وسیع از اثرات ضد توموری از قبیل القای آپوپتوز، القای تمایز سلولی، ضد رگ‌زایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضدباکتریایی دارند و به دلیل زیست‌سازگاری بالا در مقایسه با ترکیبات شیمیایی به آن‌ها بیشتر توجه شده است [4]. اپی‌کاتچین²، اپی‌گالوکاتچین³، اپی‌کاتچین‌گالات⁴ و

2. Epicatechin
3. Epigallocatechin
4. Epicatechingallate

1. Doxorubicin (DOX)

بارگیری داروهای آب‌گریز و آب‌دوست را داشته باشد. نانولیپوزوم‌ها، ساختارهای خودتشکیل‌شونده ای¹⁰ 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 سنتر 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.

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 از بین بردن اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد حاصل از شیمی‌درمانی طولانی‌مدت با دوکسوروبیسین دارد [5]. پمپ پروتئینی P-gp⁶ 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 چنددارویی (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 در نهایت 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]. در نتیجه درمان ترکیبی⁸ EGCG در مقایسه با درمان تک‌دارویی⁹ DOX می‌تواند بهترین راهبرد برای غلبه بر سمیت قلبی و همچنین مقاومت چنددارویی ناشی از DOX باشد. نکته مهم دیگر در درمان ترکیبی استفاده از حاملی است که توانایی

5. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

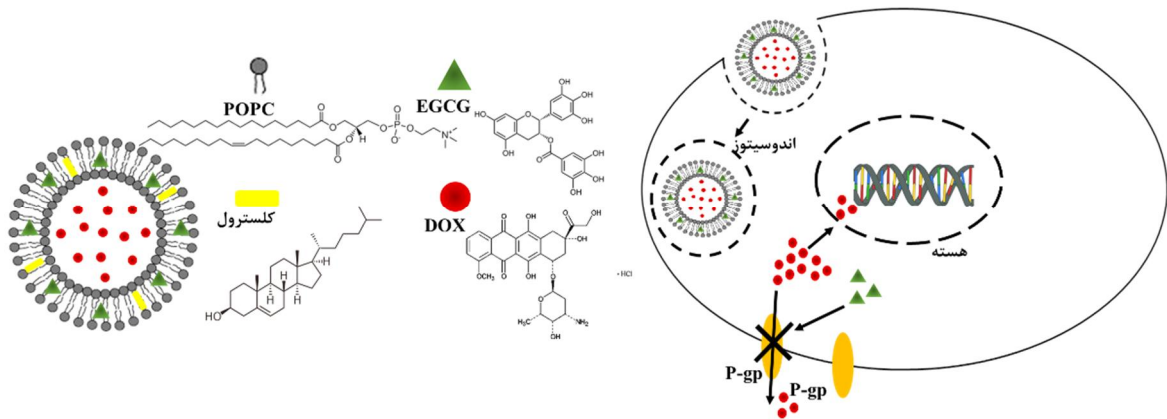
6. P-glycoprotein (P-gp)

7. multidrug resistance (MDR)

8. combination therapy

9. monotherapy

10. self-assembled



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

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده فسفولیپید¹¹POPC و کلسترول از شرکت آوانتی¹²، هیدروکلرید دوکسوروبیسین از شرکت شرکت Ebewe-pharma EGCG (با خلوص 95 درصد) و نمک MTT¹³ از شرکت سیگما¹⁴، محیط کشت DMEM¹⁵ از شرکت گیبکو¹⁶، متانول و کلروفرم از شرکت مرک¹⁷ 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 هیدلف¹⁸ آلمان) و در دمایی بالاتر از دمای گذار لیپیدها

لیپیدها به مدت 1 ساعت حذف شدند [8]. لایه نازک لیپیدی حاوی EGCG با محلول PBS¹⁹ 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 اکسترو²² با غشاهای پلی‌کربناتی 100 نانومتری 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 زتاسایزر²³، 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- از 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

بررسی رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی
 برای بررسی الگوی رهایش دارو از نانولیپوزومها، مقدار
1 میلی لیتر از نانولیپوزومهای سنتزی در کیسه دیالیز **6-8**
 کیلو دالتونی ریخته و در **50** میلی لیتر بافر فسفات در
 دمای **37** درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی غوطه‌ور
 شد. سپس به روش طیف‌سنجی فلورسانس و مرئی
 فرابنفش و در طول موج بیشینه نشر و جذب داروها میزان
 داروی آزاد شده 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.

معادله 3

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

معادله 4

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

کشت سلولی

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

27. Fetal Bovine Serum (FBS)

ارزیابی پایداری نانولیپوزومها در شرایط آزمایشگاهی²⁴
 پایداری نانولیپوزومهای سنتزی در محلول PBS **7/4**
 pH= در دو دمای **37** و **4** درجه سانتی گراد به مدت **4**
 هفته بررسی شد. بعد از سپری شدن 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 **10-15** 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:

معادله 1

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

معادله 2

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

24. *In vitro*

25. Loading Content

26. Loading Efficiency

نتایج و بحث

تشکیل نانولیپوزومها و پایداری آنها

با توجه به اینکه نانولیپوزومها ساختارهای خودتشکیل شونده‌ای می‌باشند برای تأیید سنتز نانولیپوزومها، ریخت‌شناسی و میانگین قطر آنها با استفاده از دو روش میکروسکوپ الکترونی روبشی³⁰ و دستگاه زتاسایزر بررسی (شکل 2) و مشخصات آنها در جدول 1 جمع‌آوری شد.

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

جذب درون سلولی

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 5 درصد کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت نانولیپوزومها به چاهکها افزوده و پس از 6 ساعت انکوبه کردن، جذب درون سلولی نانولیپوزومها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس معکوس (Olympus IX81، شرکت Olympus، توکیو، ژاپن) مشاهده شد.

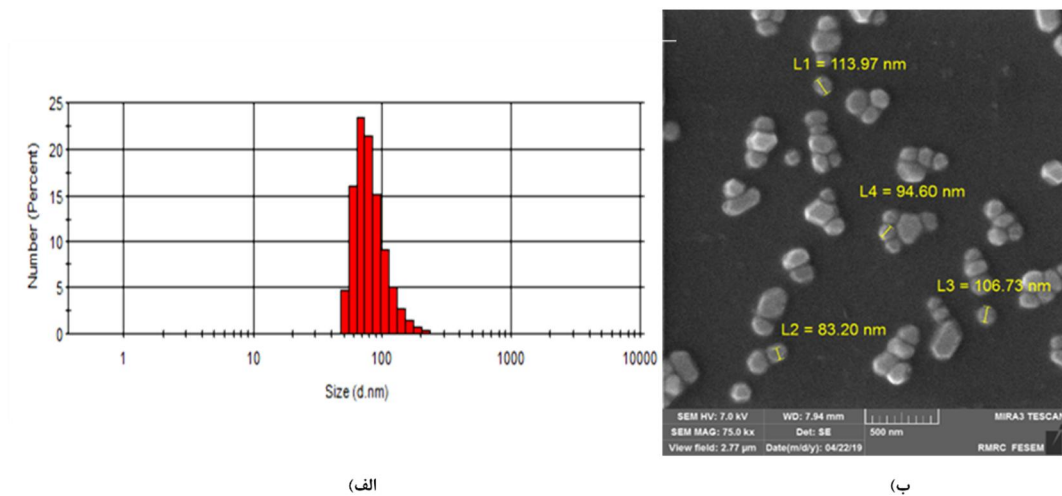
آزمون زنده‌مانی سلولها

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 ذکر شده انکوبه شد. همچنین، بعد از سپری شدن 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 DMSO²⁸ حل و جذب در طول موج 570 نانومتر، اندازه‌گیری و میزان IC₅₀²⁹ با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism محاسبه شد.

30. scanning electron microscope (SEM)

28. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

29. half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)



شکل 2 الف میانگین قطر نانولیپوزوم؛ ب- تصویر SEM

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

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

سپری شدن زمان در دمای 4 درجه سانتی گراد بدون تغییر می‌ماند، این درحالی است که اندازه همان ذرات در دمای 37 درجه سانتی گراد 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.

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 سپری شدن بازه زمانی 1 تا 4 هفته در دمای 4 و 37 درجه سانتی گراد نمونه‌ها از نظر اندازه ذرات بررسی شدند. میانگین اندازه ذرات برای نانولیپوزوم‌ها بعد از

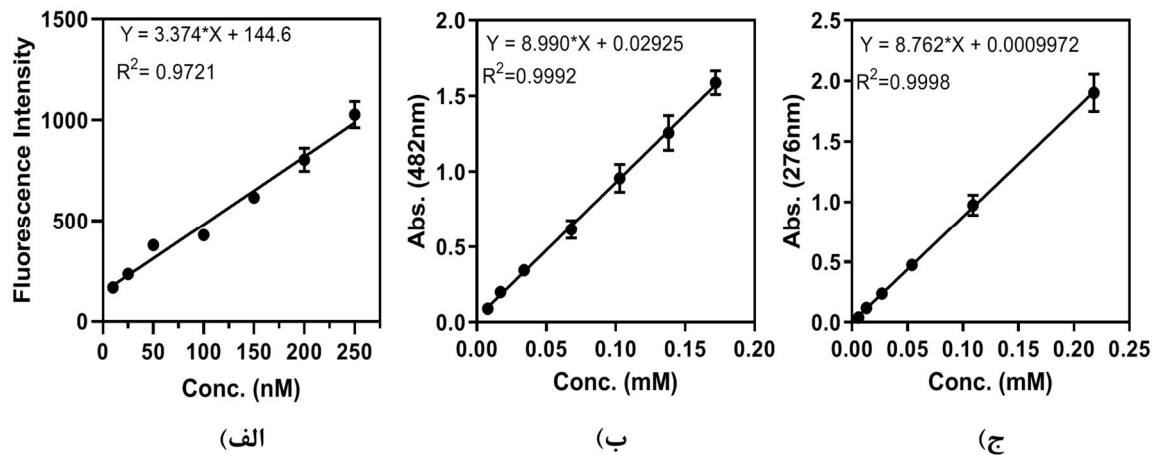
جدول 2 پایداری نانولیپوزوم‌های سنتزی در دمای 4 و 37 درجه سانتی گراد

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

محتوی و بازده محصورسازی

برای به دست آوردن 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 می دهد که داروی DOX با موفقیت در نانولیپوزوم محصور شده و EGCG تأثیر چندانی روی محصورسازی DOX نداشته است.



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

جدول 3 الف میزان بارگذاری دارو در لیپوزومها

غلظت (میلی مولار)	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

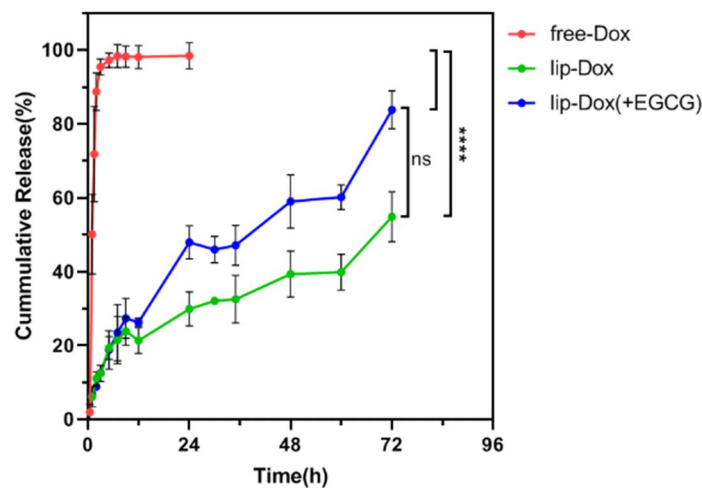
کمیتهای (درصد)	دو کسوروبیسین	دو	EGCG*	دوکسوروبیسین (EGCG+)
بازده محصورسازی	87/20	62/84	65/12	20/36
محتوی محصورسازی	27/27	49/81	20/36	20/36

*EGCG: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

بررسی رهایش دارو

رهایش دارو از نانولیپوزوم‌ها به عوامل مختلفی از جمله 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 به دست آمده برای هر دو نمونه

نسبت به داروی آزاد به صورت آهسته و کند است و لیپوزومه کردن دارو باعث می‌شود سرعت رهایش نسبت به دوکسوروبیسین آزاد به صورت 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.

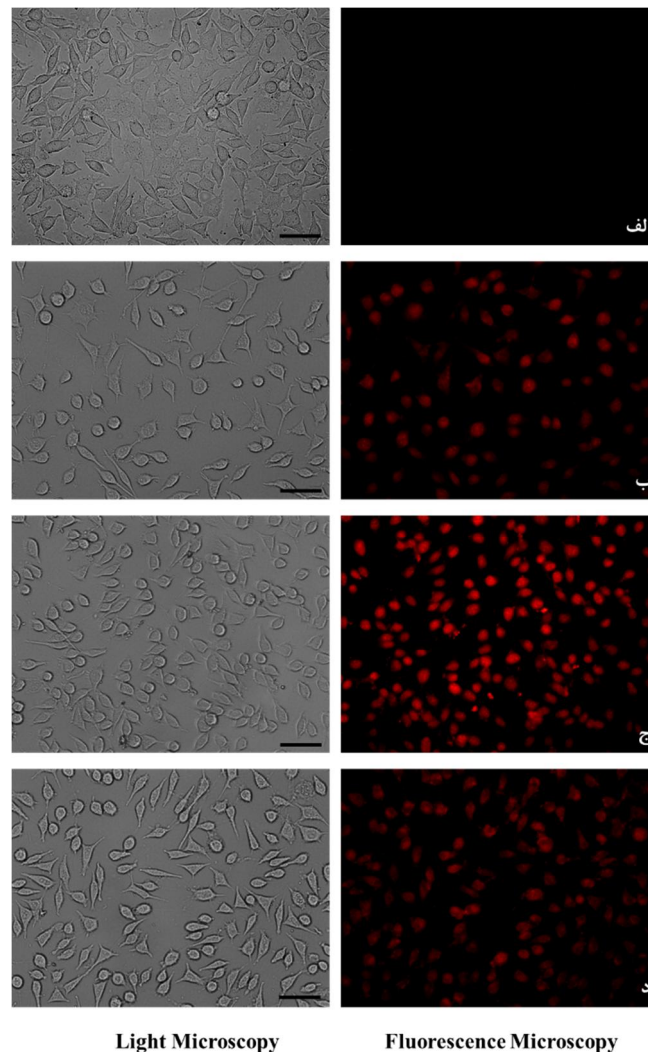


شکل 4 رهایش داروی دوکسوروبیسین به صورت آزاد و لیپوزومه شده

بررسی جذب و سمیت سلولی

برای ارزیابی ظرفیت اندوسیتوز داروی DOX سلول‌های MCF-7 به مدت 6 ساعت با داروی 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 تیمار شده 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 در نهایت انباشت DOX در سلول‌هاست.



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

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.

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

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

EGCG-DOX

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

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 50 درصد ببرد، استفاده از آن به همراه 0/1 میکرومولار EGCG درصد زنده‌مانی سلول‌ها را به زیر 50 درصد 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 IC₅₀ موجب مرگ نیمی از جمعیت سلولی شد. تحقیقات نشان می‌دهد EGCG دارای فعالیت‌های زیستی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدچاقی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، آنتی‌موتازنز، 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 لاینین 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-1 α ، NF κ B 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 بررسی‌های 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*

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-1 α and NF κ B, 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.
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.

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 Vaezi³, 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 decreasing 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

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