

ساخت فرمولاسیون لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل و مقایسه سمیت آن با پاکلی تاکسل لیپوزومه نشده بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

نویسندگان:

المیرا ربانی^۱، رودابه بهزادی^۲، محمد مجدی زاده^۳، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۴*}

- ۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران
- ۳- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوران فردانگر، پارک علم و فناوری یزد، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران
- ۵- گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.2, Summer 2020

چکیده:

مقدمه: شیمی درمانی یکی از روش‌های رایج در درمان سرطان است که همواره با چالش‌هایی روبرو بوده است. هدف از پژوهش حاضر ساخت نانوحامل‌های حاوی داروی شیمی درمانی پاکلی تاکسل و بررسی سمیت آن بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بود.

روش کار: سه فرمولاسیون از نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل با غلظت‌های متفاوتی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول با استفاده از روش فیلم لایه نازک ساخته شد. سپس با توجه به میزان بارگذاری دارو، یکی از فرمولاسیون‌ها انتخاب و پگیله شد. درصد بارگذاری دارو درون نانولیپوزوم پگیله، الگوی رهائش دارو در شرایط سلول سالم و سرطانی، اندازه و بار سطحی نانو ذرات با استفاده از DLS و شکل ظاهری نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ پویش الکترونیکی بررسی شد. در پایان سمیت سامانه لیپوزومی حاوی دارو و داروی لیپوزومه نشده بر رده سلولی MCF-7 با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: درصد بارگذاری دارو، اندازه، پتانسیل زتا نانوحامل‌های پگیله شده حاوی دارو به ترتیب $90/6 \pm 2/35$ درصد، $49/4$ nm و $46/5 \pm 74/55$ mV بود. رهائش دارو از سامانه لیپوزومی طی ۷۲ ساعت در شرایط سلول سالم و سرطانی آهسته بود. شکل ظاهری نانوذرات صاف و کروی بوده و هیچ برهم کش شیمیایی میان دارو و نانو حامل مشاهده نشد. همچنین داروی پاکلی تاکسل لیپوزومه در مقایسه با داروی لیپوزومه نشده سمیت بیشتری روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان داشت.

نتیجه گیری: با توجه به برخورداری از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب، فرمولاسیون لیپوزومی حاصل از مطالعه حاضر را می‌توان برای انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه سرطان پستان پیشنهاد کرد.

واژه‌گان کلیدی: لیپوزوم، پاکلی تاکسل، سلول‌های MCF-7، سرطان، شیمی درمانی

Pars J Med Sci 2020;18(2):26-40

مقدمه:

اصولی تمامی آن‌ها رشد غیر عادی سلول‌ها است. این بیماری که در پی انباشته شدن جهش‌های سوماتیک ایجاد می‌شود، منجر به افزایش برتری رقابتی گروهی از سلول‌ها می‌شود که با رشد سریع خود، مواد مغذی و اکسیژن را از دسترس سایر سلول‌ها خارج و از

تعداد نهایی سلول‌های بدن تحت تاثیر تعادل میان رشد سلول‌ها، تمایز سلول‌ها و آپوپتوز است که اختلال در تنظیم هر یک از فرآیندهای یاد شده می‌تواند باعث ایجاد تومورهای سرطانی شود. واژه سرطان به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که شاخصه

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران.

پست الکترونیک: Fhaghirosadat@gmail.com

تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۵۰۷۱۵۸

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۴

اصلاح: ۱۳۹۹/۰۴/۲۸

دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۴

در مقیاس صنعتی، کیفیت عالی ساخت، تنوع در اندازه ذره، ترکیب شیمیایی و بار الکتریکی اشاره کرد [۱۷، ۱۶].

هدف از پژوهش حاضر، ابتدا ساخت فرمولاسیون های مختلفی از نانولیپوزوم های حاوی داروی شیمی درمانی پاکلی تاکسل و انتخاب فرمولاسیون بهینه و سپس بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون بهینه شده از منظر بازده بارگذاری دارو، میزان رهایش دارو طی ۷۲ ساعت در شرایط دمایی و اسیدیته سلول سالم و سرطانی، اندازه، بار سطحی ذرات (پتانسیل زتا) و شکل ظاهری بوده است. در نهایت میزان سمیت نانوحامل حاوی دارو بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان نیز سنجیده شده است.

روش کار:

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به روش آزمایشگاهی و با کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1395.10 انجام شده است.

۱- مواد شیمیایی

داروی پاکلی تاکسل به صورت گرید کلینیکال متعلق به شرکت Sigma Aldrich آمریکا، کلسترول و فسفاتیدیل کولین سویا (SPC) متعلق به شرکت Lipoid آلمان، DSPE-PEG2000، کلروفرم و ایزوپروپیل متعلق به شرکت Merck آلمان تهیه شد.

۲- تهیه لیپوزوم های حاوی پاکلی تاکسل

به منظور تهیه نانولیپوزوم های حاوی پاکلی تاکسل از روش هیدراتاسیون لایه نازک استفاده شد که خلاصه آن به شرح ذیل است:

- **ساخت فیلم نازک لیپیدی:** ابتدا فسفولیپید و کلسترول را با نسبت های مولی ارائه شده در جدول ۱، به همراه داروی پاکلی تاکسل در حلال کلروفرم و در دمای $50 \pm 0^\circ\text{C}$ روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل کرده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه شد.

- **هیدراته کردن فیلم نازک لیپیدی:** هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای $60 \pm 0^\circ\text{C}$ انجام شد. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی با توان اولتراسونیک 100 Watt ، فرکانس $5\% \pm 28\text{ KHz}$ و بدون دما برای مدت ۶۰ دقیقه کاهش اندازه داده شدند [۱۸].

رشد آن ها جلوگیری می کند [۱-۳]. سرطان پستان شایع ترین بدخیمی و اولین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان جهان است به گونه ای که در کشور ایالت متحده آمریکا ۲۸ درصد از موارد جدید سرطان و ۱۵ درصد از مرگ و میرهای ناشی از آن در سال ۲۰۱۰ مربوط به این سرطان بوده است [۴]. آمارها نشان می دهد که سرطان پستان در زنان ایرانی ۲۴/۴ درصد بدخیمی ها را شامل می شود و منجر به ۳/۳ مرگ در هر صد هزار نفر می شود [۵، ۶]. پاکلی تاکسل با نام تجاری تاکسول متعلق به خانواده دارویی تاکسان و یکی از مشهورترین داروهای ضد سرطان است که در درمان بسیاری از سرطان ها از جمله، پستان و تخمدان کاربرد دارد [۷، ۸]. این داروی شیمی درمانی برای اولین بار به طور طبیعی از پوست درختی با نام علمی *Taxus baccata L.* استخراج [۹] و در سال های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴ میلادی خاصیت ضد سرطانی آن بر علیه سرطان رحم و پستان، توسط سازمان مدیریت غذا و داروی آمریکا تایید شد [۷]. در سطح مولکولی، تاکسول با اتصال به توبولین های بتا در بخش داخلی میکروتوبول ها، مانع از تبدیل مولکول GTP به GDP شده و ضمن افزایش فرایند پلیمریزاسیون میکروتوبول ها، از دپلیمریزاسیون آن جلوگیری می کند. با عملکرد تاکسول، رفتار ناپایداری دینامیکی میکروتوبول ها دچار اختلال شده و در پی آن سایر اعمال میکروتوبول وابسته به این رفتار از جمله تقسیم سلولی مختل می شود. در واقع، تاکسول چرخه سلولی را در فازهای G1 (نخستین مرحله رشد) یا M (مرحله تقسیم) متوقف کرده و با اختلال در روند طبیعی چرخه سلولی، مانع از رشد و پیشرفت سلول های سرطانی می شود [۹-۱۲].

با وجود اثرات درمانی پاکلی تاکسل، استفاده از آن باعث بروز عوارض جانبی از قبیل مهار تولید سلول های مغز استخوان، ریزش مو و مسمومیت عصبی در بیماران می شود [۱۳]. همچنین این دارو دارای نیمه عمر کوتاهی در بدن است و به سرعت متابولیزه می شود به گونه ای که دستیابی به غلظت مورد نیاز در طی دوره های مناسب زمانی، نیازمند استفاده مکرر از دوزهای به نسبت بالای تاکسول خواهد بود که خود می تواند منجر به سمیت بیشتر دارویی شود [۱۴]. استفاده از نانوحامل ها از جمله لیپوزوم، یکی از راه کارهای پیش رو برای افزایش کارایی و کاهش سمیت داروهای شیمی درمانی است [۱۵]. لیپوزوم های نانوحامل های لیپیدی هستند که بر اثر تجمع لیپیدها در محیط های آبی ایجاد می شوند. توانایی این نانوساختارها در کپسوله کردن مقدار زیاد دارو، به حداقل رساندن عوارض جانبی ناخواسته، اثر بخشی بالا و سمیت اندک باعث جلب توجه پژوهشگران به این نانوساختار شده است. از دیگر مزایای نانولیپوزوم ها می توان به سهولت تولید

۳- رسم نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل

و فسفات سالین و محاسبه درصد بارگذاری دارو

به منظور رسم نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل، غلظت‌های مختلفی از استوک پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل به روش سری استاندارد ساخته شد. سپس جذب نوری آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم پاکلی تاکسل (240 nm)، با تکرارهای سه تایی گرفته و به وسیله رسم نمودار استاندارد پاکلی تاکسل، معادله خط آن محاسبه شد [18]. همچنین به منظور رسم نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در بافر فسفات سالین (PBS)، غلظت‌های مختلفی از استوک پاکلی تاکسل در PBS به روش سری استاندارد ساخته شد. سپس جذب نوری آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم پاکلی تاکسل، با تکرارهای سه تایی گرفته شده و سپس با رسم نمودار استاندارد پاکلی تاکسل، معادله خط آن محاسبه شد [18]. برای محاسبه میزان بارگذاری پاکلی تاکسل، ابتدا نانوحامل‌های حاوی پاکلی تاکسل را بعد از کاهش اندازه وارد کیسه دیالیز بشری محتوی بافر فسفات سالین و در دمای 40 C قرار داده شد تا پاکلی تاکسل بارگذاری نشده حذف شود. سپس لیپوزوم‌های دارای پاکلی تاکسل را با نسبت‌های حجمی ۱:۵۰ و ۱:۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف پاکلی تاکسل شکسته و دارو آزاد شود. در مرحله بعد، میزان جذب پاکلی تاکسل انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم پاکلی تاکسل گرفته شد. با توجه به میزان جذب به دست آمده و تطبیق آن با نمودار کالیبراسیون پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل میزان غلظت دارو درون لیپوزوم محاسبه شد. در پایان با استفاده از رابطه (۱)، درصد بارگذاری پاکلی تاکسل در لیپوزوم‌ها محاسبه شد [19].

رابطه (۱)

$$\text{Entrapment Efficiency (\%EE)} = \frac{\text{Encapsulated Drug Concentration}}{\text{Primary used Drug Concentration}} \times 100$$

۴- انتخاب فرمولاسیون مناسب بر اساس میزان

بارگذاری دارو

پس از اندازه‌گیری میزان بارگذاری دارو در تمامی فرمولاسیون‌های ساخته شده در مرحله قبل، فرمولاسیونی که از میزان بارگذاری بالاتری برخوردار بود، انتخاب و با افزودن ۰/۰۹۸ میلی گرم پلیمر پلی اتیلن گلیکول (PEG) به آن و با استفاده از روش فیلم نازک بهینه شد تا از منظر میزان بازده بارگذاری، الگوی رهایش دارو و همچنین آنالیزهای فیزیوشیمیایی و سلولی مورد بررسی قرار گیرد.

۵- بررسی الگوی رهایش داروی پاکلی تاکسل از

سامانه لیپوزومی

رهایش داروی پاکلی تاکسل از لیپوزوم‌ها با روش دیالیز در بافر PBS به مدت ۷۲ ساعت در شرایط مشابه سلول سرطانی (37 °C و pH=5/4) و سلول سالم (37 °C و pH=7/4) مورد سنجش قرار گرفت. برای بررسی وضعیت رهایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نمونه درون کیسه دیالیز منتقل و در فاکون محتوی بافر PBS قرار داده شد. سپس در شرایط دمایی مذکور به هم زده شد و در فواصل زمانی متناوب نسبت به نمونه‌برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز اقدام و به همان نسبت بافر تازه جایگزین شد. میزان جذب نمونه‌های برداشت‌شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و در انتها با بهره‌گیری از معادله خط به دست آمده از نمودار استاندارد دارو در بافر PBS، غلظت دارو در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری و نمودار آن رسم شد [20].

۶- تعیین اندازه و پتانسیل زتا ذرات

اندازه ذرات و پتانسیل زتای ذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر ساخت شرکت مالورن، انگلستان مدل Nano-ZetaSizer ES در دمای اتاق و زاویه ۹۰ درجه اندازه‌گیری شد.

۷- آنالیز سامانه لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل توسط

دستگاه طیف سنجی مادون قرمز

حامل‌های لیپوزومی با سانتریفیوژ از سوسپانسیون جدا و محلول اضافی تبخیر شد. نمونه‌ها با KBr مخلوط شده و در درون پلیت فشرده شدند. طیف FT-IR به منظور بررسی گروه‌های عاملی نانو لیپوزوم‌ها در محدوده طول موج 4000-400 cm⁻¹ برای نمونه‌های جامد، و طیف AT-IR 600-4000 cm⁻¹ برای نمونه‌های مایع، اسکن شد. بدین منظور، طیف فرمولاسیون لیپوزومی فاقد دارو و داروی پاکلی تاکسل اخذ شده و با فرمولاسیون لیپوزومی حاوی دارو مقایسه شد. هدف این مرحله بررسی برهمکنش‌های شیمیایی میان سامانه لیپوزومی و دارو بود [20].

۸- تصویربرداری از سامانه لیپوزومی حاوی پاکلی

تاکسل

مقدار ۲۵ μl از نمونه لیپوزومی روی 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 میکروسکوپ پوشش الکترونیکی (SEM) بررسی شد [20].

۹- رده سلولی و محیط کشت

در این مطالعه از رده سلولی MCF-7 سرطان پستان استفاده شد که از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده بود. سلول‌های این رده سلولی در فلاسک‌های یک بار مصرف کشت سلول در محیط کشت DMEM (Thermofisher – GIBCO (U.S.A غنی شده با Glutamine، ۱۰٪ درصد FBS، در دمای °C ۳۷ با فشار ۵٪ دی اکسید کربن و ۹۵٪ بخار آب کشت داده شد.

۱۰- تعیین سمیت سلولی و بقای سلول

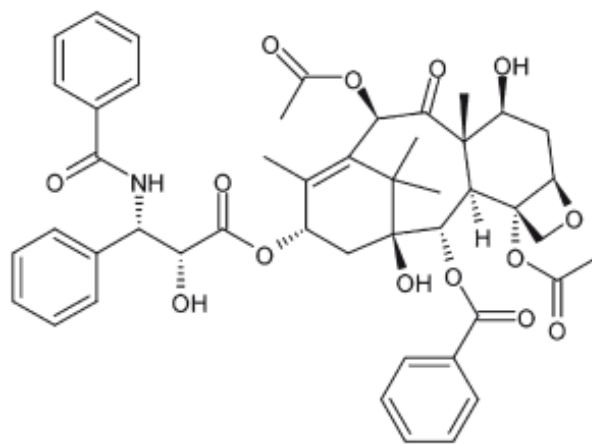
سمیت سلولی با روش MTT برای فرمولاسیون ساخته شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار، سلول‌های MCF-7 سرطان پستان به طور جداگانه با غلظت ۱۰۴ در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با $25 \mu\text{g/ml}$ از لیپوزوم بدون دارو به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند تا میزان سمیت لیپوزوم فاقد دارو بررسی شود. همچنین سلول‌های سرطانی با $25 \mu\text{g/ml}$ از پاکلی تاکسل و $25 \mu\text{g/ml}$

از لیپوزوم‌های حاوی پاکلی تاکسل در پلیت ۹۶ خانه برای ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت زمان تیمارهای مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن، مایع رویی خارج و به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازون مقدار ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه الیزا ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه زیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شد.

۱۰۰٪ میانگین جذب نوری در محیط کشت-میانگین جذب نوری در گروه آزمون
میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل

۱۱- نرم افزارهای مورد استفاده

در پژوهش حاضر انحراف معیار و انحراف از میانگین داده‌های هریک از متغیرها با کمک نرم افزار اکسل محاسبه و نمودارهای مرتبط با رهاش دارو و استاندارد در محیط اکسل رسم شدند.



تصویر ۱ فرمول ساختاری پاکلی تاکسل [۷]

یافته‌ها:**میزان بارگذاری دارو پاکلی تاکسل در سامانه لیپوزومی بهینه شده**

درصد بارگذاری پاکلی تاکسل، با توجه به نمودار استاندارد پاکلی تاکسل (تصویر ۱) و با استناد به رابطه ۱ برای فرمولاسیون‌های A، B و C به ترتیب به میزان 82.95 ± 1.26 ، 86.09 ± 1.15 و 86.1 ± 1.87 درصد محاسبه شد.

همچنین با مقایسه میزان بارگذاری دارو در فرمولاسیون‌های مختلف، نمودار تغییرات میزان بارگذاری دارو بر اساس درصد

کلسترول موجود در ساخت سامانه حاصل از هر فرمولاسیون رسم شد. همان گونه که از نمودار مشخص است با افزایش کلسترول ابتدا میزان بارگذاری دارو با شیب تندی افزایش می یابد به گونه‌ای که با افزایش نسبت کلسترول از ۱۰ به ۲۰ درصد، نزدیک به ۴ درصد به بازده بارگذاری افزوده می شود، ولی در ادامه، این شیب افزایش ملایمی داشته و با افزایش کلسترول از ۲۰ به ۳۰ درصد فقط نزدیک به ۰/۸ درصد به بازده بارگذاری افزوده شده است.

نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز

در طیف FT-IR پاکلی تاکسل (تصویر ۸ ج) پیک‌های شاخص 1733.69 cm^{-1} ، 1644.41 cm^{-1} ، 1456.16 cm^{-1} ، 1341.17 cm^{-1} ، 1249.41 cm^{-1} ، 1100.67 cm^{-1} ، 949.65 cm^{-1} ، 880.96 cm^{-1} دیده می‌شوند که به ترتیب نشان‌دهنده گروه‌های کششی OH الکل، کششی CH_2 آلکان، کششی C=O استر، C=C آلکن، CH_3 آلکان، C-O استر، C-O الکل، هیدروکسیل (OH) و حلقه بنزن هستند. همچنین سامانه لیپوزومی بهینه فاقد پاکلی تاکسل دارای پیک‌های 3443.18 cm^{-1} ، 2978.85 cm^{-1} ، 1644.73 cm^{-1} و 1088.72 cm^{-1} است که به ترتیب مربوط به گروه‌های OH الکل، C-H آلکان، C=C آلکن یا C=O کربونیل و C-O استر هستند (تصویر ۸ ب). مقایسه طیف FT-IR سامانه بدون دارو و حاوی دارو (تصویر ۸ الف) نشان می‌دهد که با بارگذاری داروی پاکلی تاکسل درون سامانه بهینه لیپوزومی پیک جدیدی ایجاد نشده است، بلکه پیک‌های شاخص سامانه لیپوزومی بدون دارو در سامانه حاوی دارو اندکی جابه‌جا شده است، به گونه‌ای که پیک‌های 3443.18 cm^{-1} ، 2978.85 cm^{-1} و 1644.73 cm^{-1} در سامانه بدون دارو با اندکی جابه‌جایی به پیک‌های 3443.35 cm^{-1} ، 2978.81 cm^{-1} و 1643.65 cm^{-1} تغییر یافته‌اند که خود نشان می‌دهد داروی پاکلی تاکسل به خوبی درون سامانه لیپوزومی بارگذاری شده است.

نتایج حاصل از تصویر میکروسکوپ الکترونی

تصویر ۹ سامانه‌های لیپوزومی حاوی دارو و فاقد دارو را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشخص است سامانه لیپوزومی دارای شکل کروی و سطحی صاف است که با بارگذاری دارو درون لیپوزوم‌ها، تغییری در شکل ظاهری نانو سامانه ایجاد نشده و سامانه پایداری ظاهری و شکلی خود را حفظ کرده است.

بررسی سمیت نانو سامانه بهینه لیپوزومی حاوی دارو

بررسی حساسیت سل‌های سرطانی پستان به تیمار این سلول‌ها با لیپوزوم بدون دارو، پاکلی تاکسل و لیپوزوم حاوی پاکلی تاکسل به میزان $25 \mu\text{g/ml}$ و در بازه زمانی ۴۸ ساعت و با استفاده از روش MTT انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که

انتخاب بهترین فرمولاسیون بر اساس میزان**بارگذاری دارو و بهینه نمودن فرمولاسیون منتخب**

با مقایسه میزان بارگذاری دارو در سه فرمولاسیون لیپوزومی A، B و C، فرمولاسیون C به دلیل برخورداری از بارگذاری بالاتر انتخاب شد. سپس این فرمولاسیون با افزودن ۴ درصد پلی اتیلن گلیکول (PEG) مطابق جدول ۲ به فرمولاسیون اولیه، بهینه شد.

محاسبه میزان بارگذاری داروی پاکلی تاکسل در**سامانه لیپوزومی بهینه شده**

درصد داروی پاکلی تاکسل بارگذاری شده در سامانه لیپوزومی بهینه با استناد به نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل مقدار 90.60 ± 2.35 اندازه گیری شد. این بررسی نشان می‌دهد که استفاده از پلیمر PEG در ساخت سامانه لیپوزومی باعث افزایشی نزدیک به ۴ درصد در میزان بارگذاری داروی پاکلی تاکسل درون سامانه لیپوزومی می‌شود.

بررسی پروفایل رهایش داروی پاکلی تاکسل از**سامانه لیپوزومی بهینه شده**

با استفاده از نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در PBS (تصویر ۴)، نمودار رهایش دارو از سامانه لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل در شرایط سلول‌های سالم و سرطانی رسم شد (تصویر ۵). الگوی رهایش دارو از سامانه لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل نشان می‌دهد که رهایش دارو به طور آهسته انجام گرفته است به گونه‌ای که در طی ۷۲ ساعت، حداکثر رهایش دارو در شرایط سلول سالم و سرطانی به ترتیب 26.60 و 34.46 درصد بوده است. همچنین این نمودار نشان می‌دهد که در ساعات اولیه رهایش دارو از سامانه لیپوزومی بیشتر بوده است.

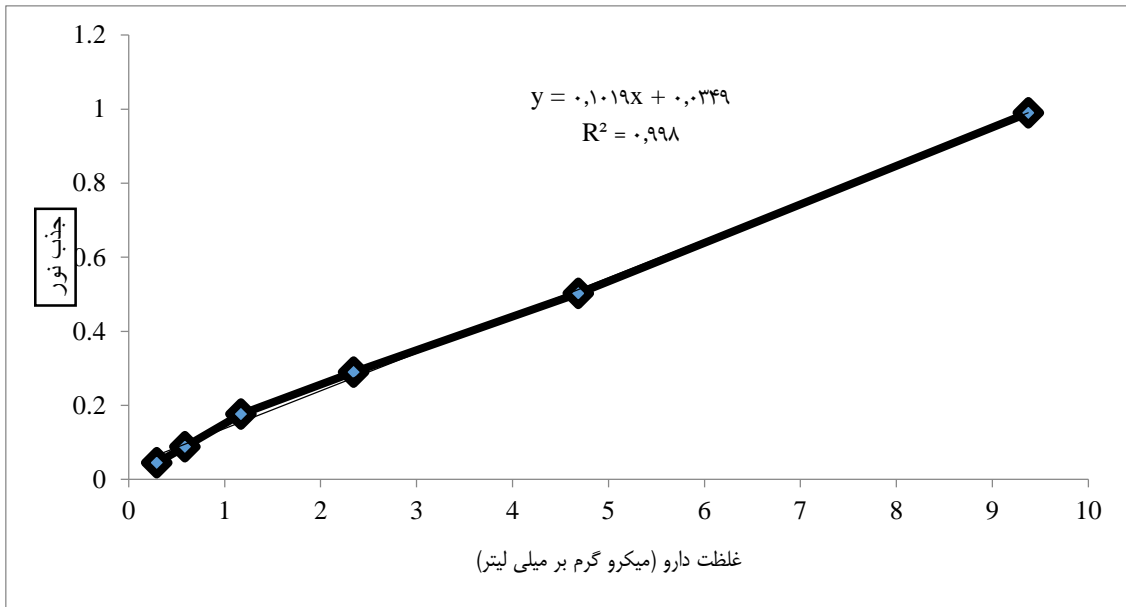
اندازه ذرات و پتانسیل زتا در نانوسامانه پگیله شده**لیپوزومی حاوی پاکلی تاکسل**

اندازه لیپوزوم‌های بهینه شده حاوی پاکلی تاکسل در پژوهش حاضر با استناد به نتایج حاصل از دستگاه DLS، قبل و بعد از بارگذاری دارو به ترتیب 36.8 nm و 49.4 nm است (تصویر ۶ و ۷). افزودن دارو به سامانه لیپوزومی باعث افزایش اندازه سامانه به میزان 2.4 nm شده است.

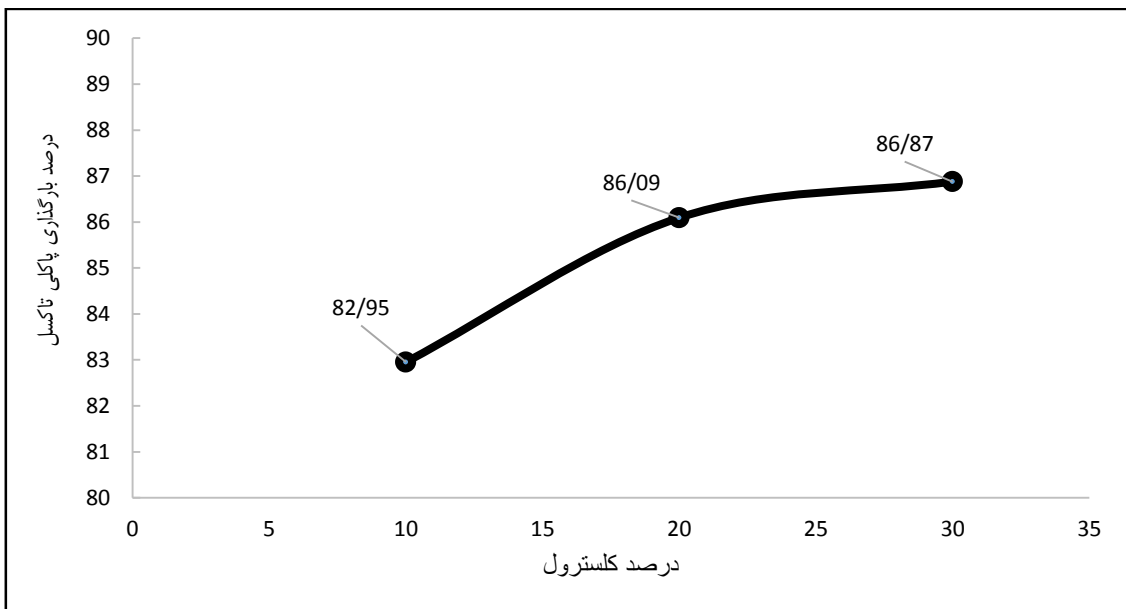
همچنین میزان بار سطحی سامانه دارای دارو 46.74 ± 5.55 میلی ولت است که بیانگر آنیونی بودن سامانه حاوی دارو است (جدول ۳).

تیمار با داروی آزاد به میزان ۶۱/۹۲ درصد است. همچنین بقای بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها بر اثر تیمار با سامانه بدون دارو نشان می‌دهد که این سامانه به تنهایی از سمیت اندکی برخوردار است.

پاکلی تاکسل لیپوزومه برای سلول‌های MCF-7 نسبت به پاکلی تاکسل غیر لیپوزومه از سمیت بالاتری برخوردار است. به بیان دیگر، بر اثر تیمار با نانوحامل حاوی دارو، ۱۷/۴ درصد از سلول‌های سرطانی باقی مانده‌اند، در حالی که این درصد برای



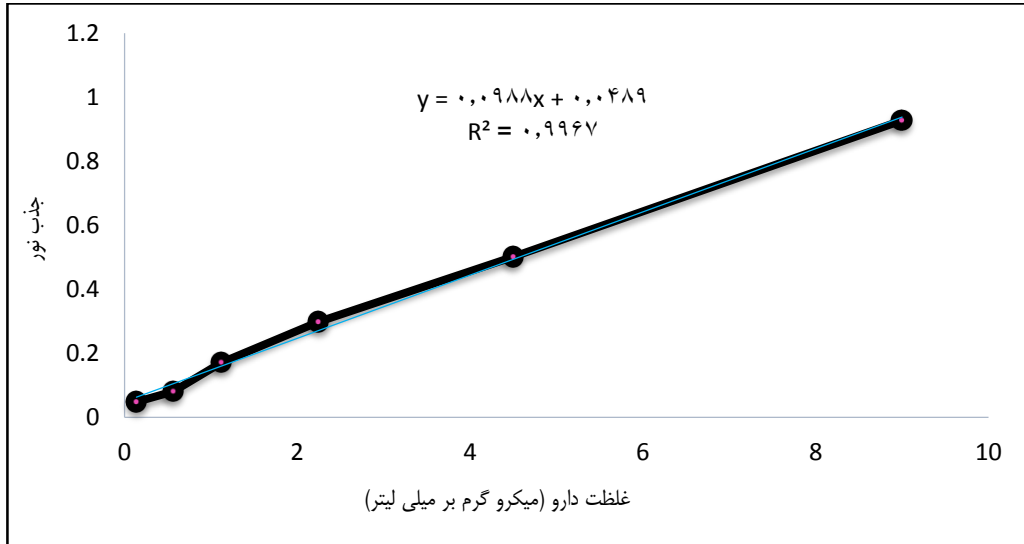
تصویر ۲: نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در ایزوپروپیل



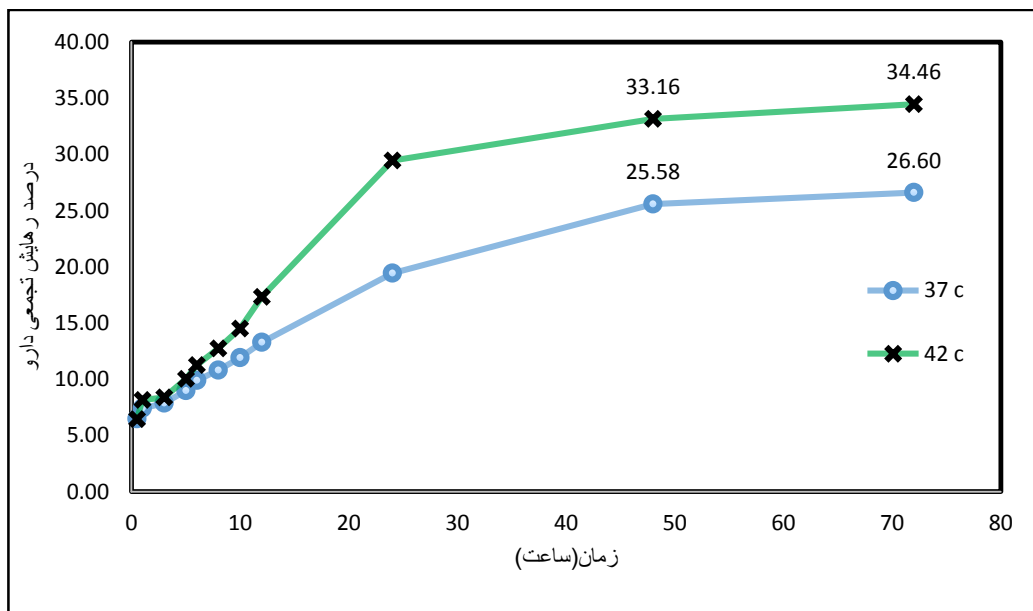
تصویر ۳: تغییرات میزان بارگذاری دارو بر اساس تغییرات درصد کلسترون مورد استفاده در سامانه

جدول ۲: درصد مولی ترکیبات سازنده فرمول بهینه

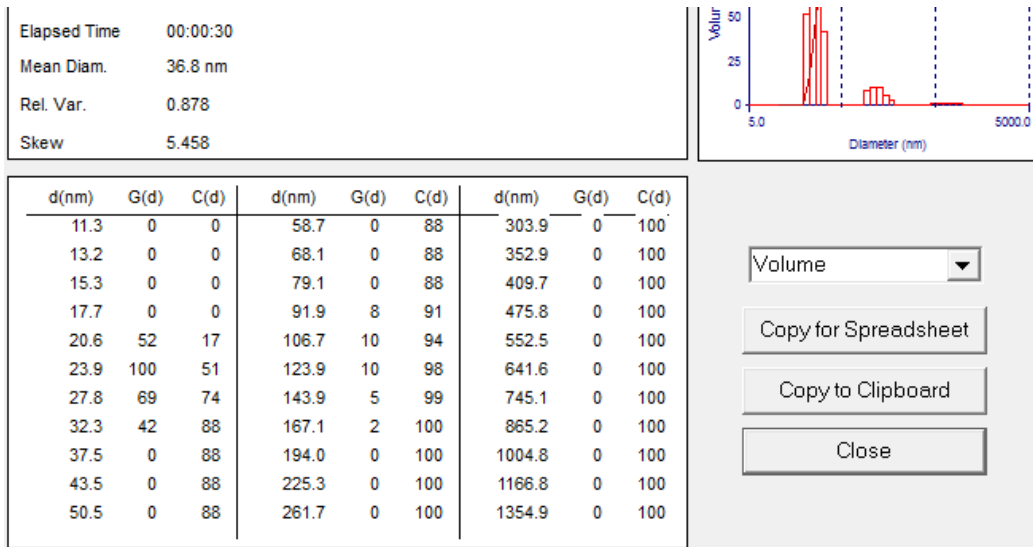
کد فرمول	SPS(mg)	کلسترول(mg)	PEG(mg)	SPC %	کلسترول %	PEG %	نسبت لیپید به دارو (L/D)
C بهینه	۰٫۰۵۹۶	۰٫۰۰۳۲	۰٫۰۰۹۸	۸۶٫۴	۹٫۶	۴	۱۵



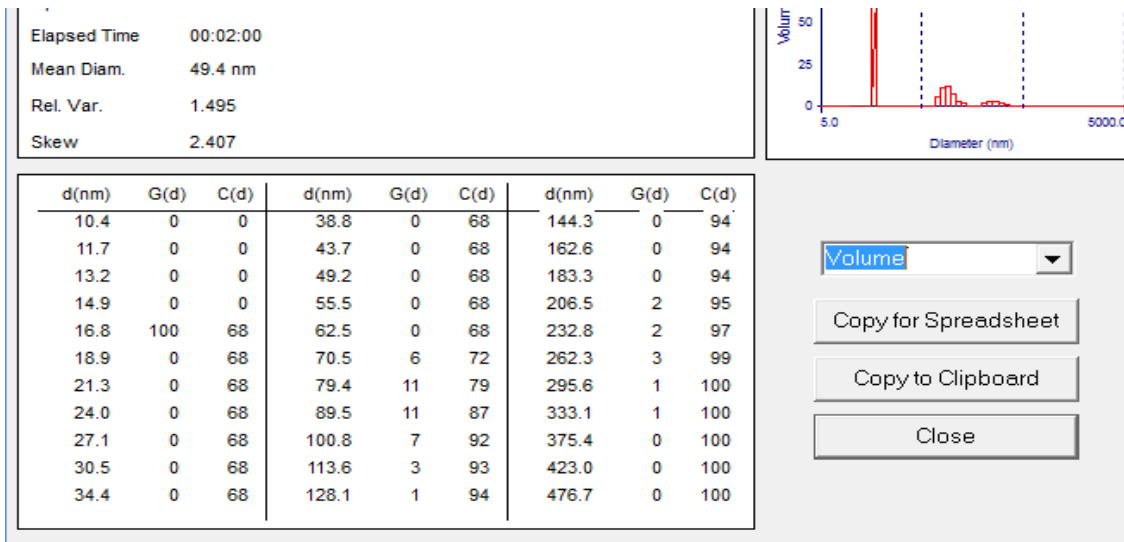
تصویر ۴: نمودار استاندارد پاکلی تاکسل در بافر فسفات سالین (PBS)



تصویر ۵: نمودار رهایش داروی پاکلی تاکسل از سامانه لیپوزومی بهینه در شرایط سلول سرطانی و سالم



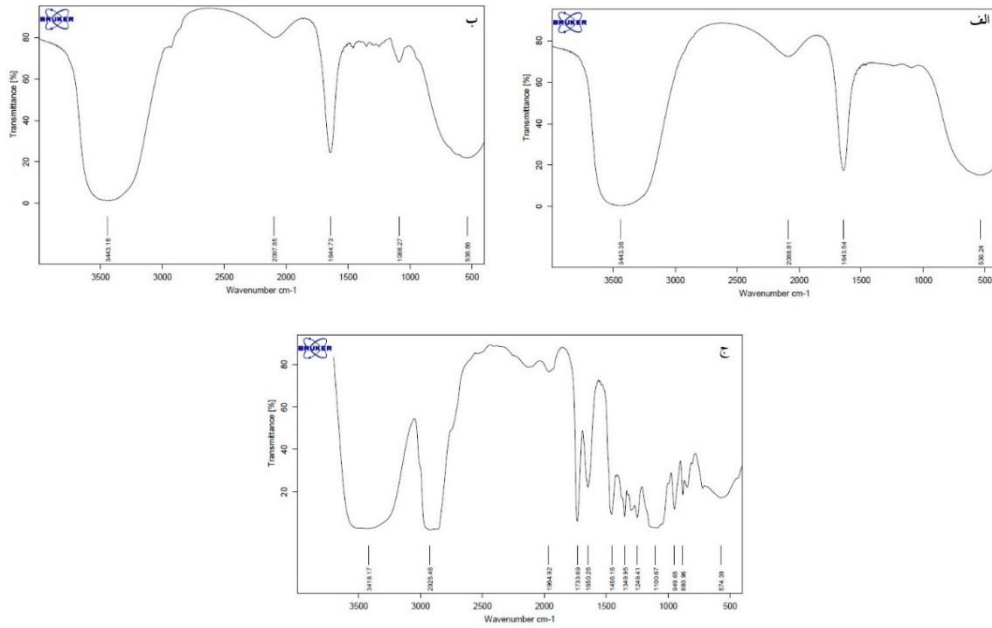
تصویر ۶: اندازه سامانه لیپوزومی قبل از بارگذاری دارو



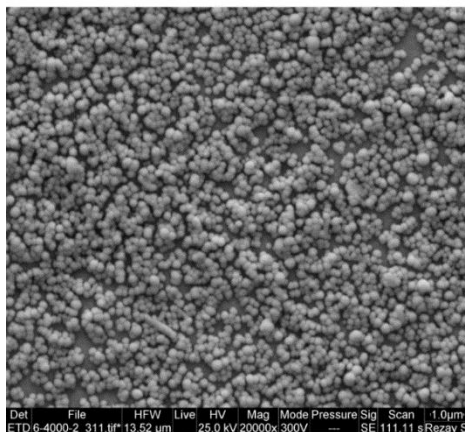
تصویر ۷: اندازه سامانه لیپوزومی بعد از بارگذاری دارو

جدول ۳: پتانسیل زتا (بار سطحی) نانو سامانه حاوی پاکلی تاکسل

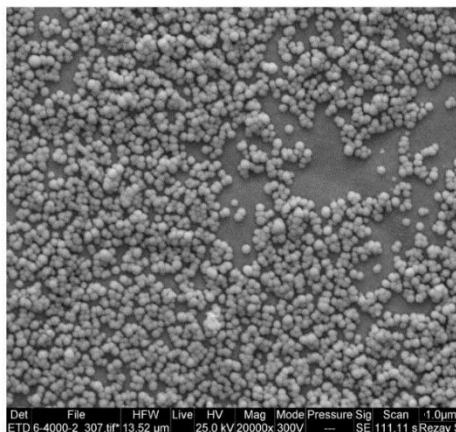
Run Number	پتانسیل زتا (mV)	میانگین (mV)	انحراف استاندارد
۱	-۴۱,۱۹	-۴۶,۷۴	۵±,۵۵
۲	-۵۲,۲۹		



تصویر ۸: نمودار طیف FT-IR داروی پاکلی تاکسل (ج)، سامانه لیپوزومی فاقد دارو (ب)، سامانه لیپوزومی حاوی دارو (الف)

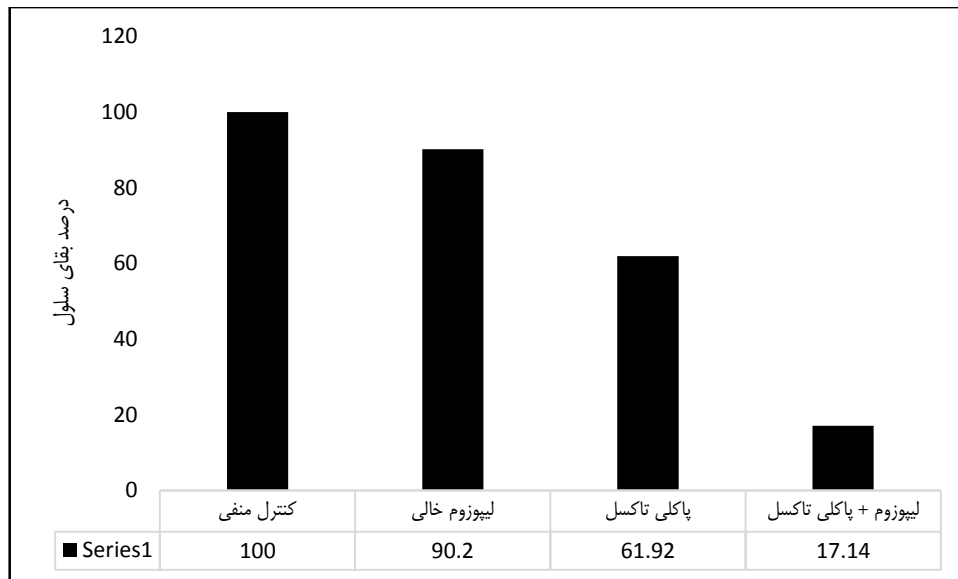


سامانه بدون دارو



سامانه با دارو

تصویر ۹: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سامانه نیوزومی حاوی دارو و فاقد دارو



تصویر ۱۰: نمودار سمیت سامانه لیپوزومی حاوی داروی پاکلی تاکسل و سامانه لیپوزومی فاقد دارو بر رده سلولی MCF-7

بحث:

PEG در ساختمان سامانه حاوی دارو باشد. به گونه‌ای که برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد افزایش کلاسترول به دلیل زیاد کردن سیالیت غشا باعث افزایش رهایش دارو و نیز استفاده از PEG باعث کاهش میزان رهایش می‌شود [۲۱، ۱۹].

میزان بارگذاری دارو درون سامانه‌های لیپیدی یکی از شاخص‌های مهم است که عوامل مختلفی بر آن موثر است. یکی از این عوامل تاثیرگذار، درصد مولی کلاسترول موجود در ساختمان لیپوزوم است. پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزایش میزان کلاسترول در ساختار لیپوزوم ابتدا با شیب تند باعث افزایش درصد بارگذاری دارو می‌شود، ولی در ادامه شیب افزایش ملایم‌تر خواهد شد. علت این پدیده به ماهیت و ویژگی‌های کلاسترول بر می‌گردد. در واقع حضور کلاسترول با غلظت‌های مولی پایین در غشا باعث افزایش پایداری و استحکام غشا شده و کاهش گسیختگی و فروپاشی آن شده و بدین ترتیب از نشت دارو به بیرون غشا جلوگیری شده و بازده بارگذاری افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، در صورتی که افزایش میزان کلاسترول موجود در غشا از حد معینی بیشتر شود، میزان سیالیت غشا افزایش یافته و در نتیجه میزان نفوذپذیری آن زیاد شده که باعث کاهش بازده بارگذاری دارو خواهد شد [۲۱-۲۳]. پژوهش‌های مختلفی از جمله پژوهش حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷، ساسانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ و شاهی و همکاران در سال ۲۰۱۹، به نتایجی مشابه نتیجه پژوهش حاضر در مورد تاثیر کلاسترول بر میزان بارگذاری دارو دست یافته‌اند [۱۹-۲۱]. یکی دیگر از عوامل مهم در پایداری نانوذرات میزان پتانسیل زتا است که در این پژوهش برای سامانه لیپوزومی اندازه‌گیری شده است. افزایش میزان پتانسیل زتا باعث

طراحی یک فرمولاسیون بهینه در ابتدا برای رسیدن به اهداف نهایی یک پروژه، پس از انتخاب روش مناسب، در سنتز یک نانوحامل بهینه با خصوصیات مطلوب و مطابق با استانداردهای علمی دنیا، از ضروریات مطالعاتی است که در ساخت نانوحامل‌ها صورت می‌پذیرد. در پژوهش حاضر، سامانه لیپوزومی بهینه حاوی داروی ضد سرطان پاکلی تاکسل ساخته شد که دارای بار سطحی منفی و اندازه ذرات ۴۹/۴ نانومتر می‌باشد. داروی پاکلی تاکسل به خوبی درون سامانه بارگذاری شده و برهمکنش شیمیایی با نانو سامانه ایجاد نکرده است. همچنین این نانو حامل دارویی ضمن برخورداری از شکل ظاهری کروی و صاف، دارای رهایش آهسته در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی و سالم می‌باشد. نتایج آزمون MTT نیز نشان می‌دهد که داروی پاکلی تاکسل بارگذاری شده نسبت به داروی آزاد دارای سمیت بیشتری بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان است.

از نکات قابل تامل در پژوهش حاضر، بیشتر بودن میزان رهایش دارو از نانولیپوزوم در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم است. این تفاوت ناشی از اختلاف دمایی و اسیدیته سلول سرطانی و سالم است که منجر به نشت بیش‌تر دارو از لیپوزوم در شرایط سلول سرطانی شده است. این واقعیت می‌تواند این اطمینان را ایجاد کند که داروی پاکلی تاکسل در سایت توموری به میزان بیش‌تری تحویل داده می‌شود و با تحویل کم‌تر این دارو به سلول‌های سالم، این سلول‌ها را از اثرات جانبی داروی پاکلی تاکسل به صورت موثرتری محافظت می‌کند. همچنین رهایش آهسته دارو از لیپوزوم در پژوهش حاضر، می‌تواند ناشی از غلظت مولی مناسب کلاسترول و حضور پلیمر

افزایش پایداری نانوذرات می شود. علت این افزایش، افزایش بار سطحی است که خود باعث افزایش نیروی دافعه کولونی بین نانوذرات شده و از تجمع و به هم چسبیدگی نانوذرات می کاهد. در پژوهش حاضر نیز نانوذره لیپوزومی بهینه دارای بار منفی نسبتاً بالایی بودند که به افزایش پایداری این حامل دارویی منجر شده است. وجود بار سطحی منفی در نانوذرات در پژوهش حاضر نیز به طور عمده به SPC به کار رفته در ساختار لیپوزوم مرتبط است که خود یک امولوسیفایر آنیونی است و سبب افزایش بار منفی نانوحامل می شود [۲۴-۲۶].

تاکنون پژوهش‌های متعددی روی حامل‌های لیپوزومی انجام شده است که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. رسولیان بروجنی در سال ۲۰۱۱ نانوذرات حاوی داروی اگزالی پلاتین به روش رسوب دهی نانو تهیه و مورد ارزیابی قرار داد. در این پژوهش درصد بارگذاری دارو و اندازه نانوذرات حاصل به ترتیب ۳۶ درصد و ۱۹۴ نانومتر گزارش شده است [۲۷]. تفاوت در نوع نانوذره، روش ساخت نانوذره و نوع دارو از جمله عواملی هستند که باعث اختلاف نتایج بین پژوهش بروجنی با پژوهش حاضر شده است. هرچند ساخت نانسامانه‌ای با اندازه کوچکتر و درصد بارگذاری بالاتر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش رسولیان بروجنی است.

علوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانولیپوزوم‌های حاوی هیدروکسی اوره به منظور اثر گذاری بر سرطان پستان تهیه کردند که راندمان بارگذاری، اندازه و میزان رهائش ۲۸ ساعته برای آن به ترتیب برابر با ۷۰/۸۳۶ درصد، ۴۰۲/۵ نانومتر و ۲۸/۸۵ درصد بود [۲۸]. رهائش آهسته تر، اندازه ذرات کوچکتر و بارگذاری بالاتر از جمله برتری‌های پژوهش حاضر نسبت به این پژوهش است.

فانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین تهیه کردند که اندازه ذرات حاصل ۷۰-۵۰ نانومتر و درصد بارگذاری دارو ۲۱ تا ۵۱ درصد گزارش شده است [۲۹]. درصد بارگذاری بالاتر، اندازه ذرات کوچکتر، بررسی ۷۲ ساعته رهائش دارو و بررسی سمیت نانسامانه حاوی دارو بر سلول‌های سرطانی از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش فانگ است. کوهی مفتخری در سال ۲۰۱۴ نانولیپوزوم‌های پگیله‌ی حاوی داروی پاکلی تاکسل تهیه کردند که این نانسامانه‌های حاوی دارو دارای میزان بارگذاری ۹۱/۳ درصد، حداکثر رهائش داروی ۵۳/۵ درصد طی ۳۰ ساعت در شرایط مشابه سلول سالم و اندازه ۴۲۱/۴ نانومتر بود. همچنین میزان سمیت نانوذرات حاوی داروی پاکلی تاکسل نسبت به داروی آزاد بر رده MCF-7 بیش تر بوده است [۳۰]. رهائش آهسته تر، اندازه ذرات کوچک تر و بررسی رهائش دارو در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی طی ۴۸

ساعت از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش کوهی مفتخری است. همچنین در پژوهش حاضر نانولیپوزوم ساخته شده به صورت کامل تری مورد بررسی‌های فیزیوشیمیایی قرار گرفته است و سامانه حاوی دارو از منظر اندازه، رهائش دارو، میزان بارگذاری دارو و سمیت آن بر رده MCF-7 بر خلاف پژوهش کوهی مفتخری از جنبه‌های دیگری نظیر بار سطحی (پتانسیل زتا)، رهائش دارو در دو دما و در دو pH مختلف، آزمون FT-IR و SEM نیز بررسی شده است.

آلیان و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین به روش شیب گرادیان تهیه و اندازه ذرات حاصل را ۱۱۰ نانومتر و بازده احتیاس دارو درون لیپوزوم‌ها را ۹۰ درصد گزارش کرده‌اند [۳۱]. اختلاف در روش ساخت و نوع نانوذره مورد استفاده از جمله تفاوت پژوهش آلیان و پژوهش حاضر است.

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ داروی دوکسوروبیسین را با هدف اثرگذاری بر سرطان استخوان درون حامل‌های لیپوزومی بارگذاری کردند که نانو سامانه‌های ساخته شده ضمن برخورداری از بارگذاری ۸۹ درصد، دارای اندازه‌ای در حدود ۱۲۶ نانومتر بودند. حداکثر رهائش داروی دوکسوروبیسین در مدت ۴۸ ساعت در این پژوهش، ۴۶ درصد بود [۳۲].

نادری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷ ویزیکول‌های نیوزومی حاوی کورومین تهیه کردند که دارای اندازه‌ای معادل ۲۴۲ نانومتر، درصد بارگذاری ۹۵/۲ درصد، پتانسیل زتای ۳۸- میلی ولت و شاخص پراکندگی ۰/۱۷ و حداکثر رهائش دارو در طی ۹۶ ساعت ۴۳/۸۷ درصد بود [۳۳].

شیرزاد و همکاران در سال ۲۰۱۷ ضمن بارگذاری ماده سیس پلاتین با درصد بارگذاری ۹۸ درصد درون نانولیپوزوم، پتانسیل زتا، اندازه و شاخص پراکندگی ذرات را به ترتیب، ۱۸/۱- میلی‌ولت، ۱۰۰ نانومتر و ۰/۴ گزارش کردند [۳۴].

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانولیپوزوم‌های حاوی داروی دوکسوروبیسین به دو روش شیب گرادیان و لایه نازک تهیه کردند که بازده بارگذاری دارو، اندازه و رهائش دارو در مدت ۴۸ ساعت برای حالت شیب گرادیان به ترتیب، ۸۹ درصد، ۱۰۵/۹ نانومتر و ۲۴ درصد و برای حالت لایه نازک به ترتیب، ۱۵/۶۵ درصد، ۱۳۸/۶ نانومتر و ۷۸ درصد بود [۳۵].

در سال ۲۰۱۷ نادری نژاد و همکاران نانولیپونیزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین تهیه و سمیت آن را بر رده‌های سلولی KG-1 مغز استخوان، Saos-2 استئوسارکوما و MG-63 استیوبلاست سنجیده و گزارش کردند که دوکسوروبیسین بارگذاری شده باعث کاهش بیشتر بقای سلول‌های سرطانی نسبت به شکل آزاد این دارو می‌شود [۳۶].

پژوهش بهرامی بنان نزدیک است، هرچند تولید نانوحامل‌های کوچک‌تر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش بهرامی بنان است.

شاهی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیوزومی حاوی دوکسوروبیسین با استفاده از DOTAP تهیه کردند که به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان احتباس، ۹۲/۵۹ نانومتر، ۳/۵- میلی ولت و $۹۱/۸ \pm ۰/۴۳$ درصد بود [۱۹]. تفاوت در نوع سامانه حامل دارو و تفاوت در مواد تشکیل دهنده سامانه از جمله دلایل اختلاف نتایج پژوهش شاهی با پژوهش حاضر است.

نتیجه‌گیری:

اگرچه سامانه‌های لیپیدی حاوی پاکلی تاکسل در پژوهش‌های دیگری نیز طراحی و ساخته شده‌اند، ولی پژوهش حاضر دارای مزایای متعددی از جمله، بررسی چند فرمولاسیون با نسبت مولی متفاوتی از ترکیبات، بهینه کردن و بررسی اثر PEG بر درصد بارگذاری دارو، مقایسه اندازه و شکل ظاهری نانوسامانه قبل و بعد از بارگذاری دارو، ساخت سامانه‌های حاوی دارو با اندازه‌ی زیر ۵۰nm و بررسی برهمکنش سامانه لیپوزومی و دارو بعد از بارگذاری دارو است که به صورت جامع در بسیاری از پژوهش‌ها بررسی نشده‌اند. با این وجود، پژوهش حاضر مانند بسیاری از پژوهش‌های دیگر خالی از ضعف و چالش نبوده است. عدم بررسی رهایش دارو از سامانه لیپوزومی در دماها و pHهای مختلف، عدم استفاده از پلاسماي خون به جای بافر فسفات سالین، عدم بررسی و مقایسه سمیت مقادیر متفاوت از لیپوزوم حاوی دارو و داروی آزاد بر رده سلولی، عدم بررسی سامانه ساخته شده روی مدل حیوانی از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر است که رفع آن‌ها به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود.

تعارض در منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۸ فرمولاسیون‌هایی از لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین تهیه کردند که درصد بارگذاری در همه فرمولاسیون‌ها بالای ۸۲ درصد و پتانسیل زتای از ۲۳- تا $۲۲/۴+$ متغیر بوده است. همچنین نتایج این پژوهش حاکی از آن است که در مدت ۴۸ ساعت، ۴۳ درصد دارو از لیپوزوم‌ها آزاد شده است [۳۷]. پتانسیل زتای بالاتر و رهایش کنترل شده‌تر از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات و همکاران است.

مجدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸ نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی تهیه کردند که وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس با اندازه $۱۳/۳۹ \pm ۲/۷$ نانومتر، $۶۱/۳۸ \pm ۲/۷$ درصد میزان راندمان احتباس، پتانسیل زتا $۰/۷۴ \pm ۳۴/۵۴$ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی $۰/۰۱ \pm ۰/۳۲$ بود [۱۸]. تفاوت‌ها در ماهیت ماده بارگذاری شده، دمای مورد استفاده برای ساخت نانوذرات و درصد مولی مواد استفاده شده از جمله مواردی هستند که نتایج پژوهش حاضر را نسبت به پژوهش مجدی‌زاده متمایز کرده است. ساسانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ هیبریدهای لیپونیوزومی حاوی کورکومین تهیه کردند که به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان احتباس، $۱۴۷/۵$ نانومتر، $-۸/۹$ میلی ولت و $۱/۸۵ \pm ۹۸/۱۲$ درصد بود [۲۰].

بهرامی بنان در سال ۲۰۱۸ ضمن ساخت سامانه‌های نیوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین ارزیابی میزان سمیت آن را بر رده KG-1 مغز استخوان گزارش کردند که وزیکول‌های نیورومی حاصل به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان انکسپولاسیون، $۱۶۰/۳۷ \pm ۲/۶۵$ نانومتر، $-۵۸/۱۱$ میلی‌ولت $۹۴/۱۸$ درصد بود. همچنین این پژوهش نشان داد که داروی دوکسوروبیسین بارگذاری شده نسبت به داروی آزاد دوکسوروبیسین، سمیت بیشتری بر رده سلولی KG-1 دارد [۳۸]. نتایج پژوهش حاضر چه از نظر ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و چه از نظر مقایسه سمیت سامانه حاوی دارو با داروی آزاد به نتایج

References:

1. Parsa N. Molecular and Cellular Basis of Human Cancer. Journal of Cell & Tissue. 2012; 2(4): 365-376
2. Hadavand-Mirzaei Z, Irani S, Atyabi F. Comparison of cytotoxicity of chitosan- docetaxel nanoparticles and docetaxel anticancer drug on MDA-MB-231 breast cancer cells. Razi Journal of Medical Sciences. 2016; 23(144): 1-18.
3. Pecorino Lauren. Molecular biology of cancer mechanism, targets and therapeutics. 3th ed. United Kingdom: Oxford University Press; 2012:
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 2010; 68(1): 7-30.
5. Radmard AR. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med 2010; 13: 143-6 .
6. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol 2009; 20(3): 556-63.
7. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer. BioMed research international. 2015; 2015(1): 1-21.

8. Rasaneh S, Salehi-Zahabi S. The effect of chitosan nanoparticles containing paclitaxel on destruction of breast cancer cells. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences*. 2016; 4(4): 311-17.
9. Priyadarshini K, Keerthi AU. Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*. 2012; 2(7):139-41.
10. Barbuti A, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers*. 2015; 7(4):2360-71.
11. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014; 25(18):2677-81.
12. Horwitz SB. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 1994; 5:S3-6.
13. Yari Khosroshahi A, Habibi Khaniani B, Naghdibadi H. Review on taxol as the most important anticancer natural drug. *JMP*. 2006; 2 (18): 1-10
14. Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunagaran D, Anto RJ. Sensitization of Taxol-Induced Apoptosis by Curcumin Involves Down-Regulation of Nuclear Factor-KappaB and the Serine/Threonine Kinase Akt and is Independent of Tubulin Polymerization. *J Biol Chem*. 2005; 280(8):6301-8.
15. Koohi Moftakhari Esfahani M, Alavi S E, Heidarinasab A, Chiani M, akbarzadeh A. Making paclitaxel nanoliposomal and evaluating its effect on the MCF-7. *NCMBJ*. 2013; 3 (10) :67-71
16. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2006; 5(1):561-73.
17. Hoseinizadeh MJ. An overview of the most important mechanisms and systems of targeted drug delivery. *Scientific research applied biology*. 2016; 6(21): 17-28
18. Majdzadeh 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 nanoliposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU_Journals*. 2018 Feb 15;25(11):853-64.
19. Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. *SSU_Journals*. 2019 Jan 15;26(10):879-94.
20. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. A new study on synthesize and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU_Journals*. 2018 Oct 15;26(6):528-41.
21. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, Forouzanfar T. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *Chemical biology & drug design*. 2017 Sep;90(3):368-79.
22. Ghanbarzadeh B, Pezeshky A, Hamishehkar H, Moghadam M. Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2016; 12(2): 261-75.
23. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in lipid research*. 2002 Jan 1;41(1):66-97.
24. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):265-73.
25. Zhao W, Song Zhuang X-RQ. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *International journal of nanomedicine*. Dove Press; 2011;6:3087.
26. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Elsevier; 2010;148(2):135-46.
27. Rasoulilian-broujeni M, Najafi S, Hojati-emami S, Dehghan mohammad mehdi. Preparation and evaluation of nanoparticles containing oxaliplatin for target drug release at the site of breast tumor. *Iran J Breast Dis*. 2011;4(3):33-43.
28. Alavi SE, Koohi-moftakhar-esfahani M, Akbarzadeh A. Evaluating the effect of nanoliposomal hydroxyurea urea on the breast cancer cell line. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal*. 2013; 3: 63-7.
29. Fang Y, Wu X, Chen J, Dang S, Jiang D, Chen M, et al. Preparation and Characterization of mPEG Modified Magnetic Long-Circulating Doxorubicin Hydrochloride Liposomes. *Adv Mater Res*. 2013; 661:87-90.
30. Alyane M, Barratt G, Lahouel M. Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells. *SAUDI Pharm J*. 2016; 24(2):165-75.
31. Haghirsadat BF, Amouabedini G, Sheikhha MH, Mohammadnezhad MJ, Nadernezhad S, Malaei-balasi Z, et al. New Approach for the Synthesis, Entrapment of Hydrophilic Drugs and Evaluation of Physico-Chemical Characteristics of PH-sensitive Nano-Liposome: Improving Therapeutic Efficacy of Doxorubicin in Order to Treatment Bone Tumor and Reducing the Side Effects. *J Shaeed Sdoughi Univ Med Sci Yazd*. 2016; 24(10):780-9.
32. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *Chem Biol Drug Des*. 2017; 90(3):368-79.
33. Naderinezhad S, Haghirsadat BF, Amouabedini G, Naderinezhad A, Esmaeili Z, Akbaezadeh A. Synthesis of biodegradable and self-assembled anionic nano-carrier: Novel approach for improvement of Curcumin- delivery to bone tumors cells & Mathematical modeling of drug-release kinetic. *New Cell Mol Biotechnol J*. 2017; 7(27):77-84.
34. Shirzad M, Jamehbozorgi S, Aghabozorg H, Akbarzadeh A. Drug Delivery of Pegylated Nanoliposomal Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Line A2780CP: in vitro Study. Vol. 7, *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal*. 2017; 7: 77-84.
35. Haghirsadat BF, Amouabedini G, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Malaei-balasi Z, Akbarzadeh A, et

- al. An evaluation of the transmembrane ammonium sulfate gradients method in lipid system to improve trapping capacity of amphipathic weak. *New Cell Mol Biotechnol J.* 2017;7(28):49–60
36. Naderinezhad S, Amouabedini G, Haghirsadat F. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers. *RSC Adv.* 2017; 7(1):30008–19.
37. Haghirsadat BF, Nadernezhad S, Amoabediny G, Montazeri F, Zandieh-doulabi B. effects of surface charge on cytotoxicity of liposomal Doxorubicin on bone cancer cell line. *Daneshvar Med.* 2018; 25(133):19–26.
38. Bahrami-Banan F, Hasan Sheikhha M, Ghasemi N, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Preparation and Study of Nano-Niosomes Containing Doxorubicin and Evaluation of its Toxicity on Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line KG-1. *Journal of Payavard Salamat.* 2018 Nov 15;12(4):

Fabrication of liposomal formulation containing paclitaxel and comparison of its toxicity with non-liposomal paclitaxel on MCF-7 breast cancer cell line

Rabani E¹, Behzadi R², Majdizadeh M³, Haghirsadat BF^{4,5*}

Received: 2020.02.13

Revised: 2020.07.18

Accepted: 2020.08.25

1. MSc. Department of Biology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran
3. MSc. Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran
4. Assistant Professor, Medical nanotechnology & tissue engineering research center, Yazd reproductive sciences institute, Shahid Sadoughi University of medical sciences, Yazd, Iran
5. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.2, Summer 2020

Abstract:

Pars J Med Sci 2020;18(2):26-40

Introduction:

Chemotherapy is one of the most common methods in cancer therapy that has always faced challenges. The aim of the present study was to develop nano-carriers containing paclitaxel chemotherapy drug and to investigate its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line.

Materials and Methods:

Three formulations of liposomal nano-carriers containing paclitaxel with different concentrations of phosphatidylcholine and cholesterol were fabricated using the thin film method. Then according to the loading rate of drug, one of the formulations was selected and pegylated. Percentage of drug loading into pegylated nano-liposomes, drug release pattern in healthy and cancerous cell conditions, size and surface charge of nanoparticles (using DLS) and morphology of nanoparticles (using SEM) was evaluated. At the end, the toxicity of liposomal system containing drug and non-liposome drug on MCF-7 cell line was evaluated by MTT assay.

Result:

The results showed that drug loading percentage, size, zeta potential of pegylated nano-carriers containing the drug were $90/6 \pm 2/35\%$, $49/4\text{nm}$ and $-46/74 \pm 5/55\text{mV}$, respectively. Release of the drug from the liposomal system is slow within 72 hours in normal and cancerous cell conditions. The morphology of the nanoparticles was smooth and spherical, and no chemical interaction was observed between the drug and the nano-carrier. Paclitaxel liposomal also had more toxicity to MCF-7 cell line breast cancer than non-liposomal drug.

Conclusion:

Based on the results, the liposomal formulation of this study can be recommended for further research in breast cancer with respect to its physicochemical properties.

Keywords: Liposome, Paclitaxel, MCF-7 Cells, Neoplasm, Chemotherapy

* Corresponding author Email: Fhaghirsadat@gmail.com