

مطالعه آزمایشگاهی: ارزیابی تجربی سامانه فسفولپیدی حاوی داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید به منظور کاربرد در شیمی درمانی

سید محمد موسوی زاده^۱، مرتضی باغیانی^۱، محمد مجدی زاده^۲،
بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۳*}، سید محمود موسوی زاده^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: روش‌های معمول سرطان درمانی به دلیل داشتن عوارض جانبی با مشکلات فراوانی روبرو هستند، بنابراین استفاده از روش‌های نوین در دارو رسانی به سلول‌های سرطانی ضروری است. در مطالعه حاضر فرمولاسیون نانویی از حامل‌های لپیدی حاوی داروی دوکسوروبیسین سنتز شده و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: پژوهش حاضر نوعی مطالعه تجربی می‌باشد. سامانه لیپوزومی با استفاده از توئین-۲۰، کلسترول و فسفاتیدیل کولین سویا به روش هیدراتاسیون فیلم نازک سنتز شدند. بعد از بارگذاری داروی دوکسوروبیسین درون لیپوزوم‌ها، شاخصه‌های فیزیوشیمیایی نانوسامانه از منظر بازده درون‌گیری، پروفایل رهائش دارو در شرایط مشابه سلول‌های سالم و سرطانی، اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی و طیف IR تعیین گردید.

نتایج: نانو حامل‌های لیپوزومی دارای قطر ۱۳۲/۹nm، انکسپولاسیون ۰/۹۳/۷۱٪ و پتانسیل زتا $mV \pm 0/18 \pm 38/73$ می‌باشد. حداکثر رهائش دارو از نانوسامانه در شرایط $37^\circ C$ ، $pH=7/4$ و $42^\circ C$ ، $pH=5/4$ و $37^\circ C$ ، $pH=5/4$ بعد از گذشت ۷۲ ساعت، به ترتیب، ۳۶/۵۴٪ و ۷۴/۱۸٪ و ۵۵/۹٪ بوده است. بررسی‌های SEM و IR نشان از مورفولوژی کروی و عدم وجود برهم‌کنش شیمیایی میان نانوسامانه و دارو بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سامانه لیپوزومی ضمن برخورداری از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب، تغییری در ماهیت شیمیایی داروی ایجاد نکرده و می‌تواند حاملی مناسب و نیمه هدفمند برای داروی دوکسوروبیسین باشد.

واژه‌های کلیدی: حامل‌های دارویی، لیپوزوم، دوکسوروبیسین، ضد سرطان، رهائش دارو

ارجاع: موسوی زاده سید محمد، باغیانی مرتضی، مجدی زاده محمد، حقیرالسادات بی بی فاطمه، موسوی زاده سید محمود. مطالعه آزمایشگاهی: ارزیابی تجربی سامانه فسفولپیدی حاوی داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید به منظور کاربرد در شیمی‌درمانی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱۱): ۵۶-۹۴۵.

- ۱- کارشناسی علوم آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.
 - ۲- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، شرکت ریز زیست فناوریان فردانگر، مرکز زیست فناوری، پارک علم و فناوری، یزد، ایران.
 - ۳- دکتری نانویوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.
- * (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com، کد پستی: ۸۹۱۵۸۸۳۶۵۷

مقدمه

سرطان بیماری است که به علت وجود نقایص ژنتیکی، در سازوکار و رشد سلولها اختلال ایجاد کرده و باعث تکثیر بی رویه آنها می شود (۱) و ممکن است این روند تکثیر بی رویه سلولها از محل اولیه به سایر بافتها منتقل شده (متاستاز) و بدین صورت با اشغال فضای اضافی و ایجاد مشکل در روند تغذیه و اکسیژن رسانی به سلولهای سالم و یا تخریب بافتهای سالم باعث آسیب بافتی گردد. بررسیهای آماری نشان می دهد که از هر ۱۲/۷ میلیون مورد مبتلای به سرطان، حدود ۷/۶ میلیون مورد، منتهی به مرگ می شود که کشورهای در حال توسعه ۵۶٪ از موارد ابتلا به سرطان و ۶۴٪ از موارد مرگ ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است (۲). همچنین تخمین زده می شود که در سال ۲۰۲۰ سرطان به شایع ترین بیماری دنیا تبدیل خواهد شد و جان حدود ۱۵ میلیون نفر را خواهد گرفت (۳). برای درمان سرطان با توجه به نوع سلول سرطانی، میزان پیشرفت و همچنین وضعیت بیمار از روشهای مختلفی از جمله پرتودرمانی، شیمی درمانی، ژن درمانی و جراحی استفاده می شود که در این بین استفاده از شیمی درمانی به راهکاری غالب بدل گردیده است (۴). در استراتژی شیمی درمانی از داروهای سایتوتوکسیک از جمله دوکسوروبیسین با اثرگذاری مستقیم و غیر مستقیم بر چرخه سلولی استفاده می شود (۵). دوکسوروبیسین متعلق به خانواده آنتی بیوتیکهای آنتراسایکلینی است که در حلالهایی مانند آب، نرمال سالین و متانول محلول و در استون، بنزن، کلروفرم و اتیلن نامحلول است (۶). این داروی موثر در شیمی درمانی تمایل بالایی برای اتصال به DNA دارد که با دخالت فیزیکی در عملکرد آنزیم توپوایزومراز II موجب اختلال در فرایند همانندسازی می گردد و با افزایش تولید رادیکالهای آزاد، مرگ سلولی و آپوپتوز را به همراه دارد (۷). اگرچه استفاده از داروهایی نظیر دوکسوروبیسین در شیمی درمانی، می تواند تا حدودی از پیشرفت سرطان جلوگیری نماید، ولی عوارض جانبی زیاد و بروز مقاومت چندگانه دارویی، استفاده از آنها را در مهار سرطان با چالشی بزرگ روبرو نموده است (۸). از این رو

فناوری نانو در داروسازی به دنبال استفاده از نانوحاملهای لیپیدی نظیر لیپوزوم می باشد که در سطح مولکولی با بدن وارد تعامل می شوند، تا از این طریق با انتقال دارو به بافت مورد نظر، کارایی درمان را افزایش و عوارض جانبی را کاهش دهد (۹،۱۰). لیپوزومها ساختارهای کروی هستند که از دولایه فسفولیپیدی ساخته شده اند که در هسته مرکزی خود یک فضای آبی را احاطه نموده اند. این حاملها در دهه ۱۹۶۰ توسط الک بنگام (Alec Bangham) کشف شدند (۱۱-۱۳). شباهت لیپوزوم با غشای سلول، سمیت سلولی پایین، تنوع و سهولت روشهای تولید آن، لیپوزوم را به سامانه ای مطلوب در دارورسانی تبدیل کرده است (۱۴). پژوهش حاضر با هدف سنتز نانو لیپوزومهای حاوی دوکسوروبیسین انجام گرفته است که در طی آن، نانوذرات از جهت کارایی درون گیری دارو، رهایش دارو، اندازه ذرات، بارسطحی نانو ذرات، برهم کنش میان دارو و نانو سامانه، مورفولوژی ذرات و رهایش ۷۲ ساعته دارو در pHها و شرایط دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

پژوهش حاضر نوعی مطالعه بنیادی-کاربردی می باشد که به روش تجربی-آزمایشگاهی به انجام رسیده و مراحل آن به شرح ذیل می باشد:

۱- مواد شیمیایی

داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید به صورت ویالهای تزریقی با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر متعلق به شرکت Cell pharm GmbH آلمان و کلسترول، فسفاتیدیل کولین سویا و توتین-۲۰ متعلق به شرکت Merck آلمان، تهیه و خریداری شد.

۲- ترسیم نمودار کالیبراسیون دوکسوروبیسین

به منظور رسم نمودار کالیبراسیون دارو و به دست آوردن معادله خط آن، غلظت های مختلفی از استوک داروی دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل و (Phosphate Buffered Saline) PBS به روش سری استاندارد ساخته شد. سپس جذب نوری آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم دوکسوروبیسین (۴۸۱ nm)، با تکرارهای ۳ تایی (محدوده تابعیت رابطه جذب و غلظت از قانون Beer-Lambart) گرفته

دادن کیسه دیالیز درون یک محیط ایزوله (فالکون استریل و بسته) با تنظیمات یاد شده استیرر شد. نمونه برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز در زمان‌های مشخص صورت پذیرفت. در انتها با بهره‌گیری از معادله کالیبراسیون دوکسوروبیسین در بافر PBS نسبت به محاسبه غلظت‌های آزاد شده دارو در دماهای 37°C و 42°C و رسم نمودار آن در زمان‌های مختلف اقدام گردید (۱۵، ۱۶).

۶- تعیین اندازه نانو ذرات و ضریب پراکندگی و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین
پتانسیل زتای (Zeta-Potential) فرمولاسیون لیپوزومی حاوی دارو و اندازه نانو ذرات حاصل از این فرمولاسیون، با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Malvern Instruments مدل Nano-ZetaSizer ES در دمای اتاق و زاویه 90° اندازه‌گیری گردید.

۷- آنالیز نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین، توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز
هدف این مرحله بررسی برهم‌کنش‌های شیمیایی میان سامانه لیپوزومی و دارو است. برای این منظور حامل‌های لیپوزومی با سانتریفیوژ از سوسپانسیون جدا شده و محلول اضافی تبخیر گردید. نمونه‌ها با KBr مخلوط شده و در درون پلیت فشرده می‌شوند. طیف FT-IR به منظور بررسی گروه‌های عاملی نانو لیپوزومی در محدوده طول موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های جامد، و طیف FT-IR $600-4000\text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های مایع، اسکن گردید. بدین منظور طیف FT-IR داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید گرفته شده و با طیف FT-IR حاصل از فرمولاسیون نهایی (سامانه حاوی دارو) مقایسه می‌گردد.

۸- تصویربرداری از نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین
مقدار $25\ \mu\text{l}$ از نمونه لیپوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین را بر 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 Scanning Electron Microscope (SEM) با قدرت $100\ \text{Watt}$ بررسی گردید.

شده و سپس نمودار کالیبراسیون رسم و معادله خط و ضریب رگرسیون آن محاسبه گردید (۱۵).

۳- ساخت لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین

ابتدا $27/69\ \text{mg}$ از فسفولیپید فسفاتیدیل کولین سویا، $2/4$ از کلسترول و $250\ \mu\text{l}$ از توئین-۲۰ در حلال کلروفرم و در دمای 45°C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل به همراه داروی دوکسوروبیسین، طی مدت 45 دقیقه و در دمای 50°C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی با فرکانس $5\% \pm 28\ \text{KHz}$ برای مدت 60 دقیقه کاهش سایز داده شد (۱۶).

۴- تعیین درصد بارگذاری دارو در لیپوزوم

برای این منظور ابتدا لیپوزوم‌ها را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری محتوی بافر PBS و در دمای 4°C قرار داده شد تا دوکسوروبیسین آزاد و انکپسوله نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های ساخته شده را با نسبت‌های حجمی $1:10$ و $1:20$ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف دوکسوروبیسین شکسته شود و دارو آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب دوکسوروبیسین انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم دوکسوروبیسین ($481\ \text{nm}$) محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد لود دوکسوروبیسین در لیپوزوم محاسبه گردید (۱۶).

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

رابطه (۱)

۵- بررسی روند رهایش دارو از نانولیپوزوم‌های حاوی

به منظور شبیه‌سازی رهایش دارو از حامل در محیط *in vivo* از PBS و دمای 37°C و 42°C در pHهای $7/4$ و $5/4$ استفاده شد، تا به توان شرایط سینک درون‌تنی را برقرار ساخت. در ادامه مقدار $1\ \text{mL}$ از محلول لیپوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین درون کیسه دیالیز قرار گرفت. سپس با قرار

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر در پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام شده است (کد اخلاق SSU.MEDICINE.REC.1397.168211).

نتایج

بررسی بازده درون گیری و الگوی رهائش دارو در نانولیپوزوم های حاوی دوکسوروبیسین

بازده درون گیری دارو درون سامانه لیپوزومی با استفاده از معادله خط دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل (نمودار ۱) و رابطه ۱، ۹۳/۷۱ درصد محاسبه گردید. همچنین با استناد به معادله خط دوکسوروبیسین در بافر PBS (نمودار ۲)، نمودارهای رهائش دارو در شرایط سلول سالم و شرایط سلول سرطانی طی ۷۲ ساعت رسم گردید که نتایج آن در جدول ۱ مشخص شده است. همان طور که در نمودارهای رهائش مشخص است (نمودار ۳)، الگوی رهائش دارو در شرایط مختلف دمایی و اسیدیته، دارای دو فاز می باشد که در فاز نخست به دلیل اختلاف غلظت زیاد دارو

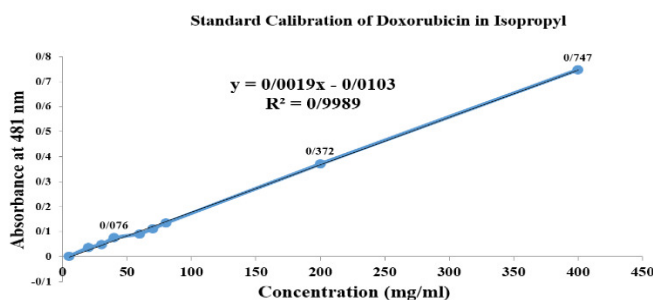
میان لیپوزوم و بافر، رهائش دارو با شدت بیشتری انجام شده است و با گذشت زمان و به دلیل کم شدن این اختلاف غلظت، در فاز دوم، از میزان رهائش دارو کاسته شده و شیب نمودار رهائش دارو، کند گردیده است. همچنین بررسی الگوی رهائش دارو نشان می دهد که حداکثر رهائش دارو در شرایط سلول سالم نسبت به سلول های سرطانی، کمتر می باشد که بر اساس آن می توان اطمینان حاصل نمود که داروی دوکسوروبیسین، در سایت توموری تحویل داده می شود و فرمول مورد مطالعه در این پژوهش می تواند به عنوان یک نانوسامانه نیمه هدف مند، سلول های سالم را از دسترس دارو دور نگه دارد.

اندازه و پتانسیل زتا ذرات نانوسامانه لیپوزومی

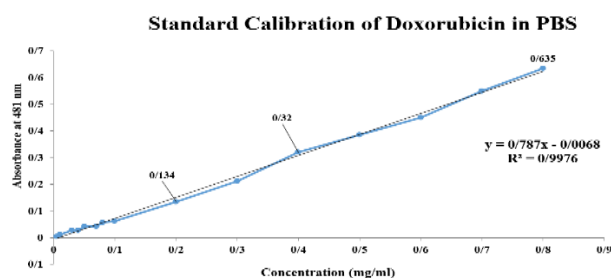
داده های به دست آمده از دستگاه DLS، اندازه نانوذره حاوی دوکسوروبیسین را ۱۳۲/۹ nm (تصویر ۱) و میزان شارژ سطحی (پتانسیل زتا) برای سامانه لیپوزومی را، mV ۳۸/۷۳±۰/۱۸- نشان می دهد (تصویر ۲).

جدول ۱: حداکثر رهائش داروی دوکسوروبیسین از نانوسامانه لیپوزومی طی ۷۲ ساعت

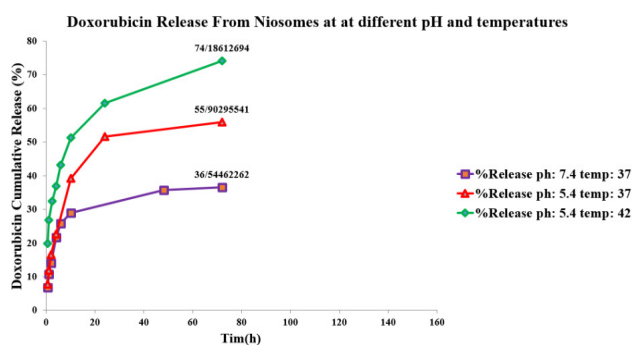
شرایط رهائش دارو	حداکثر رهائش در ۷۲ ساعت (%)
pH = ۷/۴ و ۳۷ ° C (سلول سالم)	۳۶/۵۴٪
pH = ۵/۴ و ۳۷ ° C	۵۵/۹۰٪
pH = ۵/۴ و ۴۲ ° C (سلول سرطانی)	۷۴/۱۸٪



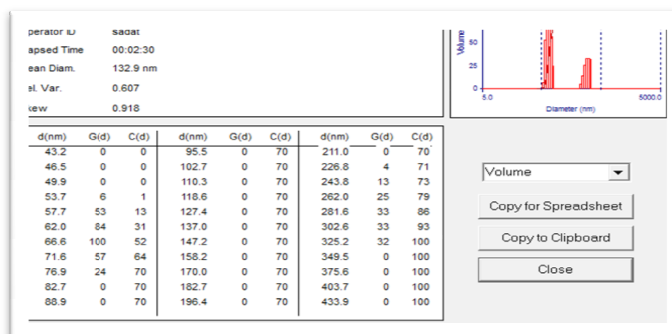
نمودار ۱: نمودار کالیبراسیون داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید در ایزوپروپیل



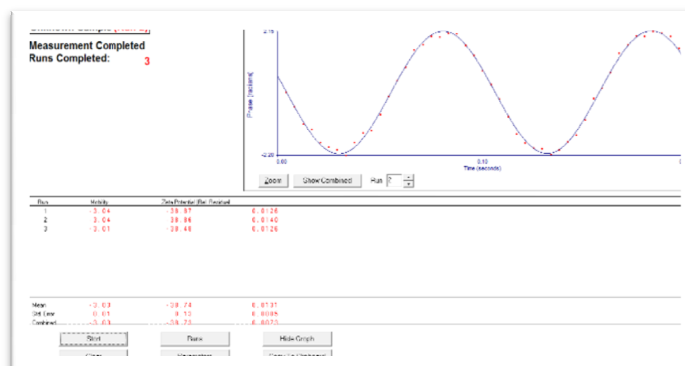
نمودار ۲: نمودار کالیبراسیون داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید در PBS



نمودار ۳: پروفایل رهایش دوکسوروبیسین در شرایط دمایی و اسیدیته مختلف از سامانه لیپوزومی



تصویر ۱: اندازه ذرات سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین



تصویر ۲: توزیع بار سطحی (پتانسیل زتا) سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین

مشخصه گروه آلکین وجود دارد. همان طور که مشاهده می شود هیچ پیک شاخصی از داروی دوکسوروبیسین در طیف لیپوزوم حاوی دارو مشاهده نمی شود که این موضوع نشان می دهد، دوکسوروبیسین درون لیپوزوم به خوبی قرار گرفته است و میان سامانه و دارو برهم کنش شیمیایی وجود ندارد.

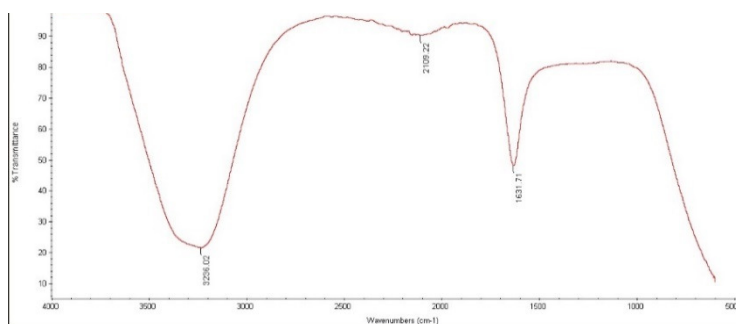
بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوسامانه لیپوزومی

تصویر میکروسکوپ الکترونی (تصویر ۵)، حکایت از این واقعیت دارد که نانو سامانه حاوی داروی دوکسوروبیسین ضمن برخورداری از ویژگی های ظاهری مطلوب، وزیکولی و کروی بوده و سطح وزیکول ها صاف و هموار هستند.

نتایج بررسی طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) نانوسامانه

لیپوزومی

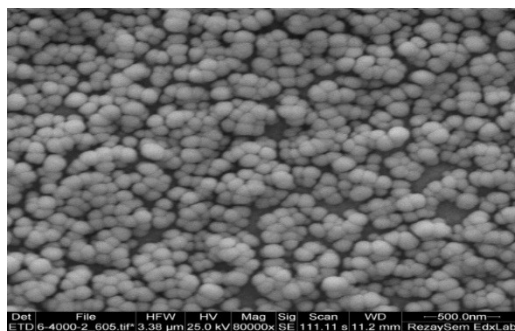
بررسی طیف FT-IR برای دوکسوروبیسین هیدروکلراید (تصویر ۳)، پیک های شاخص $1631/71 \text{ cm}^{-1}$ ، $3226/02 \text{ cm}^{-1}$ و $2109/02 \text{ cm}^{-1}$ را نشان می دهد، که پیک $3226/02 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه کربوکسیل، پیک $1631/71 \text{ cm}^{-1}$ مشخص کننده گروه عاملی C=O و پیک $2109/22 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه آمین می باشد. هم چنین در طیف FT-IR مربوط به سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین (تصویر ۴)، پیک های شاخص $3452/10 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه الکی OH و $2925/92 \text{ cm}^{-1}$



تصویر ۳: طیف FT-IR داروی دوکسوروبیسین



تصویر ۴: طیف FT-IR نانو سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین



تصویر ۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سامانه لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین

بحث

پژوهش حاضر ضمن ساخت نانو سامانه لیپوزومی حاوی داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین به بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن می‌پردازد که نتایج آن نشان می‌دهد که این نانو سامانه لیپیدی دارای راندمان انکپسولاسیون ۹۳/۷۱ درصد و رهایش کنترل شده دارو در شرایط سلول‌های سالم و سرطانی می‌باشد. آنالیز نانو ذره با دستگاه DLS تأیید می‌کند که فرمولاسیون لیپوزومی دارای اندازه ۱۳۲/۹ nm و پتانسیل زتای $0/18mV \pm 38/73$ است.

همچنین بررسی طیف FT-IR و تصویر میکروسکوپ روبشی از سامانه مذکور نشان‌دهنده این امر است که داروی دوکسوروبیسین با نانوحامل لیپوزومی برهم‌کنش شیمیایی نداشته است و نانو ذرات حاصل ضمن برخورداری از اندازه و توزیع مناسب، دارای شکل کروی و سطحی صاف می‌باشند. تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی نانوحامل‌های لیپیدی انجام گرفته است که بخشی از آن اشاره می‌شود. رسولیان بروجنی و همکاران در سال ۲۰۱۱، نانوذرات حاوی داروی Oxaliplatin به‌روش رسوب‌دهی نانو تهیه و مورد ارزیابی قرار دادند که در طی این پژوهش درصد بارگذاری دارو و اندازه نانوذرات حاصل را به ترتیب ۳۶ درصد و ۱۹۴ nm گزارش نمودند (۱۷). تفاوت در نوع نانو ذره، روش ساخت نانو ذره و نوع داروی بارگذاری شده، از جمله عواملی هستند که باعث اختلاف نتایج میان پژوهش بروجنی و پژوهش حاضر شده است. علوی و همکاران در سال ۲۰۱۳، نانو لیپوزوم‌های حاوی هیدروکسی اوره به منظور اثرگذار بر سرطان سینه تهیه نموده که طی آن، راندمان انکپسولاسیون ۷۰/۸۳۶ درصد، اندازه ۴۰۲/۵ نانومتر و میزان رهایش ۲۸ ساعت ۲۸/۸۵ درصد را برای این نانوحامل گزارش کردند (۱۸). اندازه ذرات کوچک‌تر، بررسی ۷۲ ساعته رهایش دارو و راندمان انکپسولاسیون بالاتر از جمله برتری‌های پژوهش حاضر نسبت به پژوهش علوی می‌باشد. Fang و همکاران در سال ۲۰۱۳، نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین تهیه نموده که اندازه ذرات حاصل را ۵۰-۷۰ درصد بارگذاری دارو را ۲۱ تا ۵۱ درصد گزارش نموده‌اند (۱۹). علوی و همکاران در سال ۲۰۱۴، نانوحامل‌های

لیپوزومی پگیله شده محتوی هیدروکسی اوره تهیه نمودند که اندازه، درصد بارگذاری و رهایش ۲۸ ساعته این نانو سامانه را به ترتیب، ۳۳۸/۲ نانومتر، ۶۴/۲۱۲ درصد و ۲۱/۷۱ درصد بیان نموده‌اند (۲۰). کوهی مفتخری اصفهانی در سال ۲۰۱۴، نانولیپوزوم‌های پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل تهیه نمودند که این نانو سامانه‌های دارویی دارای انکپسولاسیون ۹۵/۲ درصد و اندازه در مقیاس نانویی بودند (۲۱). بررسی پروفایل رهایش در شرایط دمایی و اسیدیته مختلف طی ۷۲ ساعت، انکپسولاسیون بالاتر و اندازه ذرات کوچک‌تر از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش‌های علوی و همکاران و کوهی مفتخری و همکاران می‌باشد.

Alyane و همکاران در سال ۲۰۱۶، نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین به روش شیب گرادیان تهیه نمودند که اندازه ذرات حاصل ۱۱۰ nm و بازده درون‌گیری دارو درون لیپوزوم‌ها را ۹۰ درصد گزارش کردند (۲۲). 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 انکپسولاسیون ۸۹ درصد، دارای سایزی در حدود ۱۲۶nm بودند. حداکثر رهایش داروی دوکسوروبیسین در مدت ۴۸ ساعت در این پژوهش، ۴۶ درصد بوده است (۲۳). همچنین Hghiralsadat و همکاران در سال ۲۰۱۷، فرمولاسیون جدیدی برای تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین پیشنهاد نمودند که سایز متوسط وزیکول‌ها، بازده درون‌گیری، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتای فرمول پیشنهاد شده به ترتیب ۹۳/۶۱، ۸۲/۸٪، ۰/۱۴ و ۲۳- میلی ولت بوده‌اند (۲۴). نتایج پژوهش‌های حقیرالسادات و همکاران در سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ با توجه به شباهت نوع نانو ذره، بسیار نزدیک به پژوهش حاضر می‌باشد. نادری‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، وزیکول‌های نیوزومی حاوی کورمومین تهیه نمودند که دارای سایزی معادل ۲۴۲ nm، راندمان انکپسولاسیون ۹۵/۲ درصد، پتانسیل زتای ۳۸- میلی ولت و شاخص پراکندگی ۰/۱۷ بودند. این پژوهش نشان می‌دهد که حداکثر رهایش دارو در طی ۹۶ ساعت ۴۳/۸۷ درصد است (۲۵). نتایج پژوهش نادری‌نژاد و

آمده از پژوهش ساسانی و همکاران از نقطه نظر اندازه، راندمان انکپسولاسیون و نوع بار سطحی نانو ذره به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک بوده است که به نظر می‌رسد که این تشابه نتایج در دو پژوهش، به دلیل استفاده از نانوسامانه لیپیدی و روش ساخت یکسان می‌باشد.

بهرامی بنان در سال ۲۰۱۸، ضمن ساخت سامانه‌های نیوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین ارزیابی میزان سمیت آن را بر رده KG-1 مغز استخوان گزارش نمودند که وزیکول‌های نیورومی حاصل به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان انکپسولاسیون، $160/37 \pm 2/65$ نانومتر، $58/11$ میلی‌ولت و $94/18$ درصد می‌باشد و میزان سمیت داروی انکپسوله نسبت به داروی آزاد بر رده KG-1 بیشتر بوده است (۲۹). نتایج پژوهش بهرامی بنان به دلیل تشابه در روش ساخت و استفاده از سامانه لیپیدی جهت رسانش دارو از نقطه نظر راندمان انکپسولاسیون، بار سطحی و اندازه به نتایج پژوهش حاضر نزدیک می‌باشد.

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین به منظور افزایش شاخصه‌های درمانی آن و در نتیجه عملکرد بهتر دارو در شرایط حاکم بر محیط سلول‌های سرطانی، درون سامانه‌های لیپوزومی بارگذاری شده است. هر چند بررسی سمیت و آزمایش‌های درون تنی و برون تنی این سامانه آنیونی حاوی دوکسوروبیسین قبل از هرگونه استفاده بالینی از آن ضروری است. با استناد به نتایج این مطالعه، فرمولاسیونی برای ساخت نانوسامانه لیپوزومی پیشنهاد شد که ضمن برخورداری از الگوی رهایش کنترل شده در شرایط سلول سالم و سرطانی، دارای شاخصه‌های فیزیکوشیمیایی مطلوب از جمله، بار الکتریکی سطحی منفی، میزان درون پوشانی بالا و اندازه‌ای در حدود 130 nm است که می‌تواند به‌عنوان ترکیبی ضد توموری پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل طرح تحقیقاتی تصویب و اجرا شده در دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

همکاران علیرغم تفاوت در نوع نانو ذره، از نقطه نظر میزان درون‌گیری دارو و شارژ سطحی ذرات بسیار نزدیک به پژوهش حاضر می‌باشد. شیرزاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، ضمن انکپسولاسیون ماده سیس پلاتین با درصد بارگذاری ۹۸ درصد درون نانولیپوزوم، پتانسیل زتا، اندازه و شاخص پراکندگی ذرات را به ترتیب، $18/1$ میلی‌ولت، 100 نانومتر و $0/4$ گزارش کردند (۲۶). حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانولیپوزوم‌های حاوی داروی دوکسوروبیسین به دو روش شیب گرادیان و لایه نازک تهیه نمودند که بازده درون‌گیری، اندازه و رهایش دارو در مدت ۴۸ ساعت برای نانولیپوزوم حاصل از شیب گرادیان به ترتیب، 89 درصد، $105/9$ nm و 24 درصد و برای نانولیپوزوم‌های حاصل از لایه نازک به ترتیب، $15/65$ درصد، $138/6$ nm و 78 درصد بوده است (۱۶).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۸ فرمولاسیون‌هایی از لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین تهیه کردند که درصد انکپسولاسیون در همه فرمولاسیون‌ها بالای 82 درصد و پتانسیل زتای فرمولاسیون‌های مختلف تهیه شده از 23 - تا $22/4$ متغیر بوده است. هم‌چنین این پژوهش گزارش می‌دهد که در مدت ۴۸ ساعت، 43 درصد دارو از لیپوزوم‌ها آزاد شده است (۲۷). مجدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی تهیه نمودند که وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس دارای اندازه $13/39 \pm 2/7$ ، 247 ، $61/38 \pm 2/7$ درصد میزان راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا $34/54 \pm 0/74$ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی $0/01 \pm 0/32$ بوده‌اند (۱۵). به نظر می‌رسد که علیرغم استفاده از سامانه لیپوزومی و روش ساخت مشابه، به دلیل تفاوت در نوع ماده انکپسوله شده در پژوهش مجدی‌زاده و پژوهش حاضر، نتایج حاصل از دو پژوهش یاد شده از نقطه نظر بازده انکپسولاسیون و اندازه نانو سامانه با همدیگر متفاوت شده‌اند. ساسانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، هیبریدهای لیپونیزومی حاوی کورکومین تهیه نمودند که به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان احتباس، $147/5$ نانومتر، $8/9$ میلی‌ولت و $1/85 \pm 98/12$ درصد می‌باشد (۲۸). نتایج به‌دست

همکاری علمی در نگارش مقاله تشکر می‌شود.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

می‌باشد و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. هم‌چنین
بدین‌وسیله از زحمات جناب آقای بهادر مقیمی به پاس

References:

- 1-Dos Santos N, Cox KA, McKenzie CA, van Baarda F, Gallagher RC, Karlsson G, Bally MB. *pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol*. Biochimica ET Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes 2004; 1661(1): 47-60.
- 2- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. CA: A Cancer J Clinicians 2011; 61(2): 69-90.
- 3-Parkin DM. *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol 2001; 2(9): 533-43.
- 4-Tinsley R. Harrison, Braunwald E. *Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008.
- 5-Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD. *Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA*. Nature 1972; 235(53): 17-19.
- 6-Kaufmann SH, Earnshaw WC. *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy*. Exp Cell Res 2000; 256(1): 42-9.
- 7-Jain D. *Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives*. J Nucl Cardiol 2000; 7(1): 53-62.
- 8-Figg WD, McLeod HL. *Handbook of anticancer pharmacokinetics and pharmacodynamics*. New Jersey; Humana Press Inc 2004.
- 9-Karewicz A, Bielska D, Loboda A, Gzyl-Malcher B, Bednar J, Jozkowicz A, et al. *Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives*. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2013; 109(1): 307-16.
- 10- Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM, Dadashzadeh S. *Effect of liposome size on peritoneal retention and organ distribution after intraperitoneal injection in mice*. Int J Pharm 2010; 383(1): 7-13.
- 11- Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. *Application of liposomes in medicine and drug delivery*. Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol 2016; 44(1): 381-91.
- 12- Cheraghi M, Negahdari B, Daraee H, Etemadi A. *Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review*. Biomed Pharmacother 2017; 86(1): 316-23.
- 13- Mansoori MA, Agrawal S, Jawade S, Khan MI. *A review on liposome*. IJARBP 2012; 2(4): 453-64.
- 14- Allen TM, Hansen CB, de Menezes DEL. *Pharmacokinetics of long-circulating liposomes*. Adv Drug Deliv Rev 1995; 16(2): 267-84.
- 15- Majdizadeh M, Zarchi SR, Movahedpour AA, Malmir HS, 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.* JSSU 2018; 25(11): 853-64. [Persian]
- 16- 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.* NCMBJ 2017; 7(28): 49-60. [Persian]
- 17- Rasouljan-broujeni M, Najafi S, Hojati-Emami S, Dehghan MM. *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. [Persian]
- 18- Alavi SE, Koohi-moftakhar-esfahani M, Akbarzadeh A. *Evaluating the effect of nanoliposomal hydroxyurea urea on the breast cancer cell line.* New Cellular & Molecular Biotech J 2013; 3(11) : 63-7. [Persian]
- 19- 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.
- 20- Alavi SE, koohi-moftakhari-esfahani M, Akbarzadeh A. *Cytotoxic activity of pegylated nanoliposomal hydroxyurea in MCF-7 cell line.* NCMBJ 2014; 4(13): 33-6. [Persian]
- 21- Koohi Moftakhari Esfahani M, Alavi SE, Akbaezadeh A, Ghasemi S, Saffari Z, et al. *Drug delivery of pegylated nanoliposomal paclitaxel to breast.* New Cell Mol Biotechnol J 2014; 13(8): 1195-98. [Persian]
- 22- 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.
- 23- 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.* JSSU Med Sci 2016; 24(10): 780-9. [Persian]
- 24- 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.
- 25- 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.
- 26- Shirzad M, Jamehbozorgi S, Akbarzadeh A,

- Aghabozorg H. *Drug Delivery of Pegylated Nanoliposomal Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Line A2780CP: in vitro Study*. New Cellular & Molecular Biotech J 2016; 15(3): 77-84. [Persian]
- 27- 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. [Persian]
- 28- Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. *A new study on synthesise and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy*. SSUJ 2018; 26(6): 528-41. [Persian]
- 29- 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*. J Payavard Salamat 2018; 12(4). [Persian]

Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy

Seyed Mohammad Moosavi zadeh¹, Morteza Baghiani¹, Mohammad Majdizadeh²,
Bibi Fatemeh Haghirsadat^{*3}, Seyed Mohamoud Moosavi zadeh¹

Original Article

Introduction: Common cancer treatment methods have many side effects. Therefore, the use of new methods for drug delivery to cancer cells is necessary. In the present study, nano formulations of lipid carriers containing doxorubicin have been synthesized and its physicochemical properties have been investigated.

Methods: The present study was an experimental study. The liposomal systems were synthesized by the method of thin-film hydration and using Tween-20, cholesterol and soybean phosphatidylcholine. After loading Doxorubicin drug into the liposomes, physicochemical properties of nano-carriers were determined from the perspective of encapsulation efficiency, drug release profile under healthy and cancerous cells condition, hydrodynamic diameter, zeta potential, morphology and IR spectra.

Results: The liposomal system had 132.9 nm in diameter, the encapsulation 93.74% and -38.73±0.18mV zeta potential. The maximum release of drug from the nano-carrier under conditions 37°C, pH=7.4 and 42°C, pH=5.4 and 37°C, pH=5.4 after 72 hours was 36.54% and 74.18% and 55.9% respectively. SEM and IR assessments revealed spherical morphology and the absence of chemical interaction between nano-carrier and drug.

Conclusion: The result of this research indicates that the liposomal system, having the appropriate physicochemical properties, has not changed the chemical nature of drug and thus can be a suitable and semi-targeted carrier for doxorubicin.

Keywords: Drug Carriers, Liposome, Doxorubicin, Anti-cancer, Drug Liberation.

Citation: Moosavi zadeh SM, Baghiani M, Majdizadeh M, Haghirsadat F, Moosavi zadeh SM. **Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(11): 945-56

¹Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

²Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran

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

*Corresponding author: Tel: 09132507158, email: Fhaghirsadat@gmail.com