

طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی داروی پاکلی‌تاکسل جهت دارورسانی به رده سلولی استئوسارکوما (Saos-2)

محمدجواد پورمحمودیان^۱، سید مهدی کلانتر^۲، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات^{۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: سرطان استخوان یکی از انواع سرطان‌هایی است که استراتژی‌های درمانی فعلی با استفاده از داروهای شیمی‌درمانی موفقیت چشمگیری را همراه نداشته است. استفاده از سامانه‌های نانو نیوزومی در انتقال داروی پاکلی‌تاکسل یکی از رویکردهای جدید هست. پاکلی‌تاکسل داروی ضد سرطان بسیار قوی است که در درمان بسیاری از تومورها کاربرد دارد. در این مطالعه، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی جهت بارگذاری داروی پاکلی‌تاکسل در جهت افزایش بازده دارویی بر روی سلول‌های سرطانی و غلبه بر مشکلات درمان حاضر طراحی و سنتز گردید.

روش بررسی: فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی حاوی داروی ضد سرطانی پاکلی‌تاکسل طراحی و سنتز گردیدند. بدین منظور، فرمولاسیون‌های نیوزومی بر اساس نسبت کلسیترول و سورفتانت‌های مختلف تهیه شدند. سپس فرمولاسیون‌های نیوزومی و اثرات آن‌ها روی بارگذاری دارو و رهایش دارو بررسی و مورد تفسیر قرار گرفتند. سمیت سلولی بر روی رده سلولی سرطان استخوان با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 9 آزمون تست MTT بررسی گردید.

نتایج: فرمولاسیون نیوزومی پگیله با کلسیترول: تونین ۶۰ و نسبت (۲۵:۷۵) دارای بیشترین بازده درون‌گیری پاکلی‌تاکسل٪/۷۴/۸۹٪، سایز ۱۱۵/۴ نانومتر، شارژ سطحی ۱۲/۹۷- میلی‌ولت و با رهایش ۷۹/۸۳٪ بیشترین میزان رهایش تجمعی را داشته و به عنوان فرمولاسیون نهایی و بهینه انتخاب شد. سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی‌تاکسل توانست سمیت بالاتری را بر روی رده سلولی ۲ Saos-2 نسبت به داروی آزاد از خود نشان دهنده. علاوه بر این، این نانوسامانه به تنها یی و بدون دارو اثر سمیت قابل توجهی در رده سلولی فیبروبلاست نرم‌مال نداشت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده از نانو حامل نیوزومی پگیله می‌تواند به عنوان یک استراتژی امیدبخش جهت مطالعات آتی در درمان سرطان استخوان و بهویژه استئوسارکوما، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دارورسانی، استئوسارکوما، نیوزوم پگیله، پاکلی‌تاکسل، مقاومت دارویی چندگانه، HFF، Saos-2

ارجاع: پورمحمودیان محمدجواد، کلانتر سید مهدی، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی داروی پاکلی‌تاکسل جهت دارورسانی به رده سلولی استئوسارکوما (Saos-2). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۱۴۰۱؛ (۳۰) (۴) ۴۷۶۴-۷۷.

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۲- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۳- گروه علوم و فنون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: Fhaghilosadat@gmail.com)، صندوق پستی: ۳۳۱۹۱۸۶۵۱

مقدمه

دور یکدیگر، و نواحی آبدوست آن‌ها، تمایل به تماس با فاز آبی را دارد (۸,۹). اهمیت چنین سیستمی در دارورسانی، قابلیت حمل داروهای آبدوست و آبگریز است به صورت همزمان است، که سبب افزایش حلالیت داروهای آبگریز و کاهش معنی‌دار غلظت مؤثر داروها می‌شود (۱۰). پاکلی‌تاكسل یکی از پراستفاده‌ترین داروهای شیمی‌درمانی هست که در درمان سرطان سینه، تخدمان، ریه و سارکوم کاپوسی استفاده می‌شود؛ هم‌چنین در مطالعات اخیر با استفاده دوز پایین پاکلی‌تاكسل در بیمارهای غیر سرطانی مانند بیماری‌های پوستی، کلیوی، فیبروز کبدی، التهاب، بازسازی آکسون و تنگی عروق کرونر مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱,۱۲). پاکلی‌تاكسل یک داروی آنتی نفوپلاستیک از خانواده داروهای مؤثر بر اسکلت سلولی محسوب می‌شود که ساختار توبولین‌ها را در سلول هدف قرار می‌دهد؛ در ادامه، اثر این دارو با اختلال در آرایش دوک‌های میتوزی و عدم جدا شدن صحیح کروموزوم‌ها از یکدیگر دنبال می‌شود که در نهایت تقسیم سلولی را از مسیر درست خود منحرف می‌سازد (۱۳). در پژوهشی توسط wang در سال ۲۰۰۰ به بررسی اثر پاکلی‌تاكسل بر مرگ سلول‌های سرطانی پرداختند. پاکلی‌تاكسل بالاتصال به میکروتوبول‌ها باعث توقف چرخه سلولی در فاز میتوزی شده که درنهایت منجر به آبیوتوز سلولی می‌شود (۱۴). عالمی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر داروی پاکلی‌تاكسل و کورکومین که در نانو حامل‌های نیوزومی بارگذاری کرده بودند و بررسی اثر هم‌افزایی این سامانه بر روی سلول‌های سرطان سینه پرداختند. یافته‌های آن‌ها یک رویکرد موفقیت‌آمیز در درمان سرطان را نشان داد و حاکی از آن بود که این ترکیب دارویی اثر سایتو توکسیتی قابل ملاحظه‌ای بر روی رده سلولی MCF7 داشته است (۱۵). Bayindir ZS و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی و مقایسه اثر فارماکوکینتیک داروی پاکلی‌تاكسل به وسیله بارگذاری آن در یک حامل نیوزومی در رت‌ها پرداختند. این محققان در تزریق وریدی سامانه دارویی مذکور در رت‌ها، افزایش قابل ملاحظه نیمه‌عمر داروی پاکلی‌تاكسل مشاهده نمودند (۱۶). هدف از مطالعه حاضر، طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی جهت انتقال داروی پاکلی‌تاكسل به رده سلولی ۲ Saos-2 به عنوان مدلی از استئوسارکومای دارای مقاومت

تومورهای استخوان یکی از قدیمی‌ترین نوع تومورها در پاتولوژی است و در تمام کشورها با تمام نژادها بروز می‌کند. در ایالت متحده امریکا، هرساله بیش از ۸۰۰ نفر مبتلا به این تومورها تشخیص داده می‌شوند (۱). استئوسارکوما شایع‌ترین تومور سرطانی اولیه در استخوان است که بیشتر در کودکان و بالغین جوان شیوع دارد (۲). علت دقیق ایجاد سرطان استخوان مشخص نیست، اما شواهد تحقیقاتی حاکی از آن است که جهش در DNA سلول‌های استخوان و نیز سایر جهش‌های قبل اکتساب پس از تولد در سلول‌های مذکور، عامل اصلی این نوع از بدخیمی است (۳). شیمی‌درمانی از متدائل‌ترین استراتژی‌ها در درمان سرطان است و تقریباً در تمام انواع سرطان‌ها، جایگاه ویژه‌ای دارد (۴). جراحی تومور استخوان تأثیرات زیادی بر کودکان دارد و همواره نیازمند به شیمی‌درمانی به عنوان مکمل درمانی هست، با این وجود این روش بسیار دردناک، فرسایشی و همراه با فشارهای مالی و روحی برای بیمار و اطرافیان وی است. و هم‌چنین روش‌های درمانی مرسوم و فعلی برای استئوسارکوما، به ویژه انواعی که قابلیت متاستاز دارند، اغلب به‌اندازه کافی مؤثر نیستند (۵). علاوه براین، توسعه مقاومت چندگانه دارویی، یکی از موانع عمده‌ای است که در استراتژی شیمی‌درمانی استئوسارکوما به‌طور فزاینده‌ای در حال مشاهده است و یک چالش قابل توجه برای درمان موفقیت‌آمیز سرطان به شمار می‌رود (۶). استفاده از نانوسامانه‌ها جهت دارورسانی، راه حل جدیدی برای افزایش اثربخشی درمانی داروهای ضد سرطان به دلیل توانایی آن‌ها در انتقال هدفمند و کنترل شده دارو به تومورها است و می‌تواند اثرات سیستمیک ناخواسته عوامل شیمی‌درمانی را محدود کند و هم‌چنین مقاومت دارویی را کاهش دهد (۷). در این‌بین، نیوزوم‌ها، به عنوان یکی از جدیدترین نانو سامانه‌ها جهت دارورسانی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. نیوزوم‌ها، وزیکول‌هایی هستند که از خود تجمعی سورفکتانت‌های غیر یونی در محیط آب، توسط آرایش خود به خودی از طریق میان کنش‌های آبدوستی-آبگریزی شکل می‌گیرند و ساختار دولایه محصوری را ایجاد می‌کنند، به عبارت دیگر در محیط آبی، نواحی آبگریز آن‌ها تمایل به تجمع

جذب نوری آن‌ها در طول موج ۲۲۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL 7250, Bio Aquarius, UK) اندازه‌گیری گردید. در نهایت نمودار کالیبراسیون و معادله خط داروی پاکلی‌تاکسل با استفاده از نرمافزار Microsoft Excel ۲۰۱۳ به دست آمد.

سنتر نانو سامانه نیوزومی با داروی پاکلی‌تاکسل از روش آب‌پوشانی لایه‌نمازک جهت ساخت نانو سامانه‌های نیوزومی در این مطالعه استفاده شد (۱۷). به‌طور خلاصه، کلسترول و سورفاکتانت‌های غیر یونی مختلف در کلروفورم حل شد تا ترکیب کلسترول (۰.۲۵٪)-سورفاکتانت (۰.۷۵٪) حاصل شود (جدول ۱). سپس داروی پاکلی‌تاکسل با نسبت دارو (۱)-لیپید (۱۰) به محلول قبلى اضافه شد. پس از همگن شدن محلول حاوی (Heidolph, Germany) کلسترول-سورفاکتانت-دارو در روتاری در دمای ۴۰ °C، حلال از طریق ایجاد خلاً حذف و لایه‌نمازک تشکیل شد. جهت اطمینان از حذف کامل حلال، لایه‌نمازک تشکیل شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C در یخچال قرار گرفت. سپس لایه‌نمازک تشکیل شده با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات گرفت. سپس لایه‌نمازک از اولتراسونیک پروپی (UP200Ht, Hielscher, Germany) در دمای ۴۵ °C به مدت ۶۰ دقیقه هیدراته شد تا سوسپانسیون نیوزومی حاوی پاکلی‌تاکسل به دست آید. برای کاهش اندازه نیوزوم‌های چندلایه و تشکیل نیوزوم‌های کوچک تک لایه از اولتراسونیک پروپی (PBS, pH=7.4) با توان ۶۰ وات، به مدت ۳۰ دقیقه (۱۵ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش) استفاده شد. سپس به‌منظور جداسازی ذرات با اندازه بزرگ‌تر از ۲۰۰ نانومتر و همگن شدن محلول به دست آمده، فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سرسنگی ۰/۲ میکرون انجام شد.

چندگانه دارویی است. در این راستا، نسبت‌های مختلفی از کلسترول و سورفاکتانت‌های مختلف جهت سنتز نانو سامانه‌های نیوزومی مورد استفاده قرار گرفت و میزان بارگیری داروی پاکلی‌تاکسل در نانو سامانه‌های نیوزومی و همچنین میزان رهایش این دارو ارزیابی و تعیین شد. درنهایت میزان سمیت سلوی نانو سامانه نیوزومی بهینه حاوی دارو پاکلی‌تاکسل در مقایسه با داروی پاکلی‌تاکسل به تنها یکی در رده سلوی Saos-2 به عنوان مدلی از استئوسارکوما و رده سلوی فیبروبلاستی نرمال (HFF) از طریق آزمون MTT تعیین شد.

روش بررسی

در مطالعه حاضر، سورفاکتانت‌های غیر یونی (Span40, DSPE-, Tween80, Span60, Span80, Tween60, mPEG(2000)، کیت MTT، پاکلی‌تاکسل و کیسه دیالیز (Aldrich, USA)، کلروفورم، ایزوپروپانول، متابول از شرکت سیگما (Sigma 12000 Da) از شرکت سیگما (Merck, Germany)، محیط کشت DMEM high glucose (Gibco, USA)، سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات سالین (PBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Pen-Strep, 10,000 U/mL -10 mg/mL) EDTA از شرکت زیست‌ایده نوترکیب (ایران) تهیه و استفاده شد. همچنین رده سلوی ۲-Saso از بانک سلوی انسیتو پاستور ایران و رده سلوی فیبروبلاست نرمال (HFF) از بانک سلوول مرکز تحقیقات بیولوژی سلوول‌های بنیادی (یزد، ایران) تهیه گردید.

ترسیم نمودار کالیبراسیون پاکلی‌تاکسل
غاظت‌های مختلف از داروی پاکلی‌تاکسل در ایزوپروپانول و بافر فسفات سالین (PBS) به روش سری استاندارد تهیه شد. سپس

جدول ۱: فرمولاسیون‌های مختلف پاکلی‌تاکسل استفاده شده در مطالعه حاضر.

فرمولاسیون	نسبت لیپید به دارو	کلسترول (%)	توئین ۶۰٪ (%)	توئین ۸۰٪ (%)	اسپن ۶۰٪ (%)	اسپن ۴۰٪ (%)	اسپن ۲۰٪ (%)	توئین ۸۰٪ (%)	توئین ۶۰٪ (%)
.	.	۲۵	۷۵
.	۱۰	۲۵	۷۵
F2	۱۰	۲۵	۷۵
F3	۱۰	۲۵	۷۵
F4	۱۰	۲۵	۷۵
F5	۱۰	۲۵	۷۵

تعیین و انتخاب فرمولاسیون بهینه

انتخاب فرمولاسیون بهینه جهت سنتز نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل بر اساس بیشترین میزان بارگذاری و پروفایل رهایش انتخاب شد. سپس بهمنظور بهبود ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی فرمولاسیون بهینه نیوزومی حاصل (کارایی بارگذاری، پایداری و رهایش پیوسته دارو)، به فرمولاسیون نیوزومی بهینه میزان ۵ درصد DSPE-mPEG(2000) اضافه شد. در آخر فرمولاسیون پگیله حاوی دارو جهت بررسی اندازه، شارژ سطحی، شکل ظاهری و سمیت سلولی موربدرسی قرار گرفت.

تعیین اندازه نانو ذرات و ضریب پراکندگی و پتانسیل زتا نانو نیوزومها

قطر هیدرودینامیک نانو سامانه‌های نیوزومی، شارژ سطحی و میانگین شاخص پراکندگی از طریق تکنیک پراش دینامیکی نور Zetasizer Nano (DLS) و با استفاده از دستگاه زتابایزر (ZS, Malvern Panalytical, UK) تعیین گردید. بدین منظور، نمونه‌های رقیق شده با غلظت 0.1 mg/ml تهیه و بلافارسله پس از آماده‌سازی، نور پراکنده در دمای اتاق با زاویه 90° درجه تشخیص داده شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

تصویربرداری از نانو نیوزومها

بررسی مورفولوژی سطحی نانو سامانه بهینه پگیله شده نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) باقدرت $100,000$ وات صورت گرفت. بدین منظور، $10\text{-}\mu\text{m}$ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی تاکسل بر روی لام شیشه‌ای ریخته شد تا در دمای محیط خشک شده و یک لایه نازک بر روی لام تشکیل گردد. سپس نمونه با یک لایه طلا بهمنظور ایجاد رسانایی، پوشش دار شد FEG-SEM و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (MIRA3 TESCAN, Czech Republic) تصویربرداری گردید. بررسی اثر سمیت سلولی نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل با استفاده از آزمون MTT

بهمنظور پی بردن به مقدار اثربخشی سامانه طراحی شده، میزان کشندگی فرم آزاد داروی پاکلی تاکسل و نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل بر روی رده سلولی Saos-2 و همچنین

حذف داروی آزاد و تعیین درصد بارگذاری دارو در

وزیکولهای نیوزومی

جهت حذف داروی آزاد، سوسپانسیون همگن و فیلتر شده، به درون کیسه دیالیز ریخته شد و کیسه دیالیز به مدت 6 ساعت درون محلول دیالیز (PBS) در دمای 4°C قرار داده شد. هر یک ساعت، محلول دیالیز تعویض شد تا داروی آزاد بارگیری نشده به خوبی حذف گردد. پس از حذف داروی آزاد، سوسپانسیون نیوزومی با نسبت $1:10$ با ایزوپروپانول مخلوط و در دمای اتاق به مدت 1 ساعت انکوبه شد تا با تخریب ساختار نانو سامانه نیوزومی، داروی بارگذاری شده درون آن، آزاد شود. سپس جذب نوری آن را در طول موج 227 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و مقدار دارو با استفاده معادله خط نمودار استاندارد داروی پاکلی تاکسل در ایزوپروپانول تعیین شد. درنهایت بازده بارگذاری دارو با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\frac{\text{میزان داروی درون گیری شده}}{\text{میزان داروی اولیه مورداستفاده شده}} \times 100 = \text{بازده بارگذاری دارو} (\%)$$

بررسی رهایش داروی پاکلی تاکسل از فرمولاسیون‌های

مختلف نانو سامانه‌های نیوزومی

رهایش داروی پاکلی تاکسل از فرمولاسیون‌های مختلف نانو سامانه‌های نیوزومی، با استفاده از دیالیز در PBS به مدت 72 ساعت در دمای 37°C و $\text{pH}=7/4$ مطابق با شرایط فیزیولوژیک بافت نرمال انجام پذیرفت. همچنین جهت شبیه‌سازی شرایط فیزیولوژیک بافت توموری، $\text{pH}=6.5$ و دمای 42°C در نظر گرفته شد. بدین منظور، $10\text{-}\mu\text{l}$ میلی‌لیتر از نیوزوم‌های حاوی دارو، داخل کیسه دیالیز ریخته شد. $1\text{-}\mu\text{l}$ میلی‌لیتر از محلول دیالیز در زمان‌های مشخص جمع‌آوری و بلافارسله با همان میزان از PBS تازه جایگزین شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 227 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد داروی پاکلی تاکسل در PBS ، میزان رهایش تجمعی دارو در مدت زمان‌های مختلف، تعیین گردید.

نتایج

انتخاب فرمولاسیون نیوزومی مناسب

با توجه به این نکته که میزان بارگذاری دارو و نرخ رهایش از اساسی‌ترین جنبه‌های کاربردی نانو حامل‌های دارورسانی محسوب می‌شود، میزان درون‌گیری دارو و پروفایل رهایش فرمولاسیون‌های حاوی داروی پاکلی‌تاکسل مورد بررسی قرار گرفته و فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. بدین منظور، فرمولاسیون‌های مختلف بهمنظور بهدست آوردن فرمولاسیون بهینه میزان بازده بارگذاری و رهایش دارو بررسی شدند (جدول ۲). سرانجام فرمول F5 (توئین ۶۰-کلسترول با نسبت ۷۵:۲۵) به عنوان فرمولاسیون نهایی و بهینه برگزیده شد. در این فرمولاسیون میزان بارگیری دارو ۷۰/۲۷٪ و رهایش تجمعی دارو در مدت زمان ۷۲ ساعت ۷۲/۶٪ اندازه‌گیری شد. با توجه به اثرگذاری پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) برافزايش نیمه‌عمر و پایداری نانو حامل‌های لیپیدی، بهمنظور بهبود ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی (اندازه ذرات، کارایی بارگیری، رهایش دارو و بهبود ورود به سلول) به فرمولاسیون بهینه (F5) رهایش دارو و فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله شده (F6) حاصل شد. در ادامه، بارگیری داروی پاکلی‌تاکسل در این فرمولاسیون ۷۴.۸۹ درصد اندازه‌گیری شد که در حدود دو درصد بیشتر از فرمولاسیون F5 بود.

رهایش داروی پاکلی‌تاکسل از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله در محیط برون تن

جهت بررسی رهایش داروی پاکلی‌تاکسل از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله در هر دو بافت سالم و توموری، شرایط فیزیولوژیک این بافت‌ها شبیه‌سازی شد. بر همین اساس pH=۷/۴ و دمای ۳۷°C برای بافت سالم و pH=۶/۵ و دمای ۴۲°C برای بافت توموری در نظر گرفته شده و الگوی رهایش در هر دو محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس شکل ۵ می‌توان چنین نتیجه گرفت که رهایش دارو از نانو سامانه طراحی‌شده دارای الگوی منظم و با آهستگی و پیوستگی مناسبی در شرایط فیزیولوژیک متفاوت هست.

میزان سمیت نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلوالی Saos-2 و رده سلوالی فیبروبلاست نرمال (HFF) از طریق آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های مذکور در محیط Pen-DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Strep (در انکوباتور با ۳۷°C، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت) کشت داده شدند. بهمنظور انجام آزمون MTT، سلول‌ها با تراکم ۱۰^۴ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس سلول‌ها با حجم یکسانی از محیط کشت تازه (گروه کنترل)، محیط کشت تازه به همراه غلظت‌های مختلف نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله بدون دارو، نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی‌تاکسل (NiO-PTX) و پاکلی‌تاکسل آزاد (Free-PTX) (گروه تیمار) و در تکرارهای چهارتایی به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از آن، میزان ۱۰ میکرومیتر از محلول MTT با غلظت ۵mg/ml به چاهک‌ها اضافه گردید و پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط چاهک‌ها کاملاً دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید. در انتها، جذب نوری در طول موج ۵۷۰nm با استفاده از میکروپلیت‌ریدر (ELx800, Bioteck, USA) اندازه‌گیری شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از معادله ذیل محاسبه شد:

$$\frac{(\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری نمونه})}{(\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری کنترل})} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

بهمنظور بررسی آماری نتایج از نرم‌افزار Graphpad Prism ورژن ۸، آنالیز ANOVA و آزمون مقایسه میانگین استفاده شد و سطوح معناداری نتایج بر حسب P < 0.05> سنجیده و گزارش گردید. علاوه بر این، رگرسیون غیرخطی جهت تعیین میزان IC50 مورد استفاده قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی

پرپوپزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد تائید شده است (کد اخلاق ۱۴۰۰.۰۸۶). IR.SSU.MEDICINE.REC.1400.086

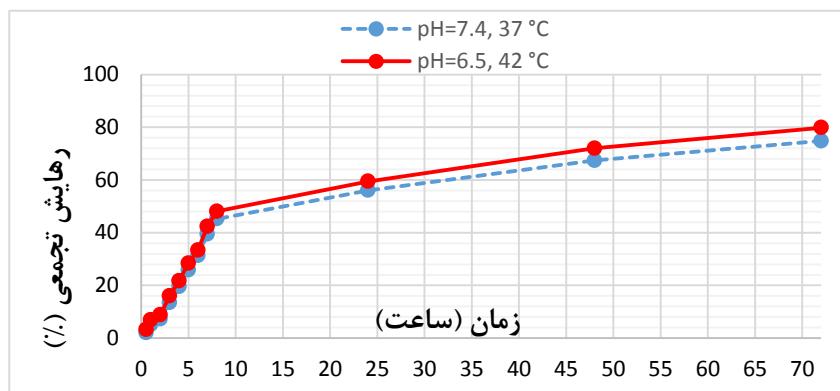
بررسی شکل ظاهری نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی تاکسل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با توجه به تصویر نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۴)، نانو سامانه‌ها وزیکولی و کروی بوده و سطح وزیکول‌ها صاف و هموار هستند. علاوه بر این، این تصویر نشان می‌دهد نانو سامانه‌های تولید شده از نظر اندازه و شکل، توزیع همگنی دارند.

اندازه شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا

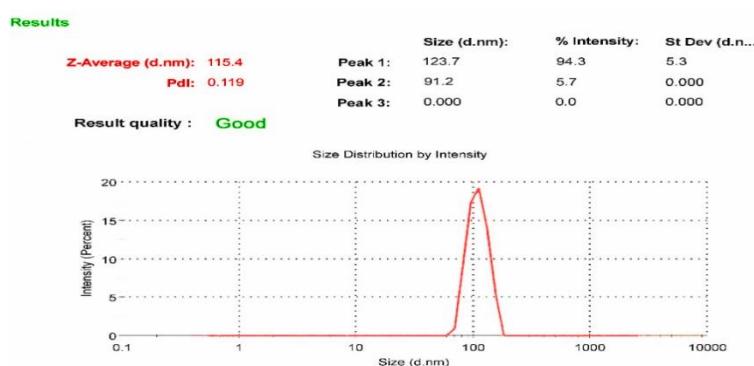
بر اساس نتایج، نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل میانگین سایز $115/4$ نانومتر و شارژ سطحی $-12/97$ - میلی ولت داشت و میزان شاخص پراکندگی آن (PDI) $0/119$ بود. این نتایج در شکل‌های ۲ و ۳ (به ترتیب سایز، PDI و شارژ سطحی) قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۲: بازده بارگیری دارو (EE%) و رهایش دارو (R%) در فرمولاسیون‌های نیوزومی منتخب حاوی داروی پاکلی تاکسل

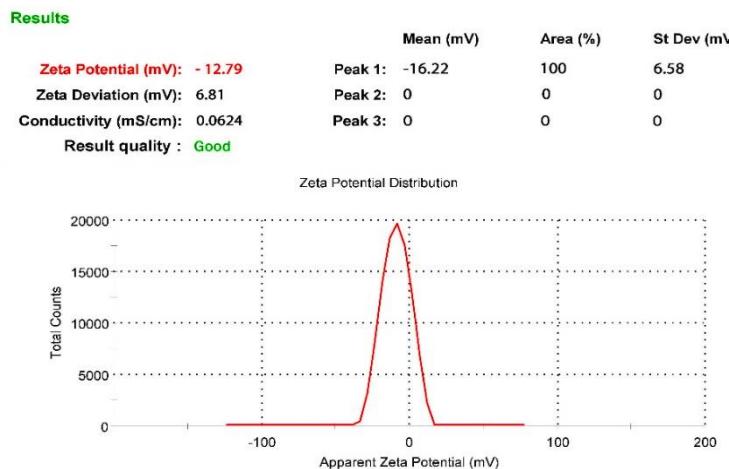
فرمولاسیون	بارگیری دارو (%) ($\pm SD$)	درصد رهایش (%)				
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
F1	$60/2 \pm 1/3$	۵۰/۴	۳۳/۵	۱۶/۱	۳۳/۵	۱۶/۱
F2	$66/54 \pm 1/5$	۴۹/۵	۳۲/۷	۱۷/۸	۳۲/۷	۱۷/۸
F3	$58/1 \pm 0/8$	۴۲/۳	۲۹	۱۲/۳	۲۹	۱۲/۳
F4	$62/7 \pm 0/7$	۴۹/۱	۳۱/۷	۱۵/۱	۳۱/۷	۱۵/۱
F5	$70/27 \pm 1/3$	۵۴/۸	۳۶/۱	۱۹/۳	۳۶/۱	۱۹/۳



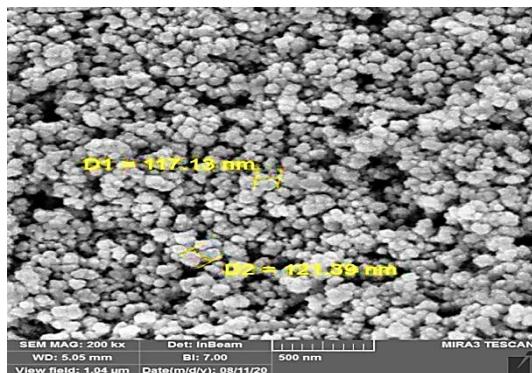
شکل ۱: رهایش پاکلی تاکسل از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله (فرمولاسیون F6)



شکل ۲: سایز و شاخص پراکندگی (PDI) نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل



شکل ۳: توزیع بار و شارژ سطحی نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلیتاسکسل

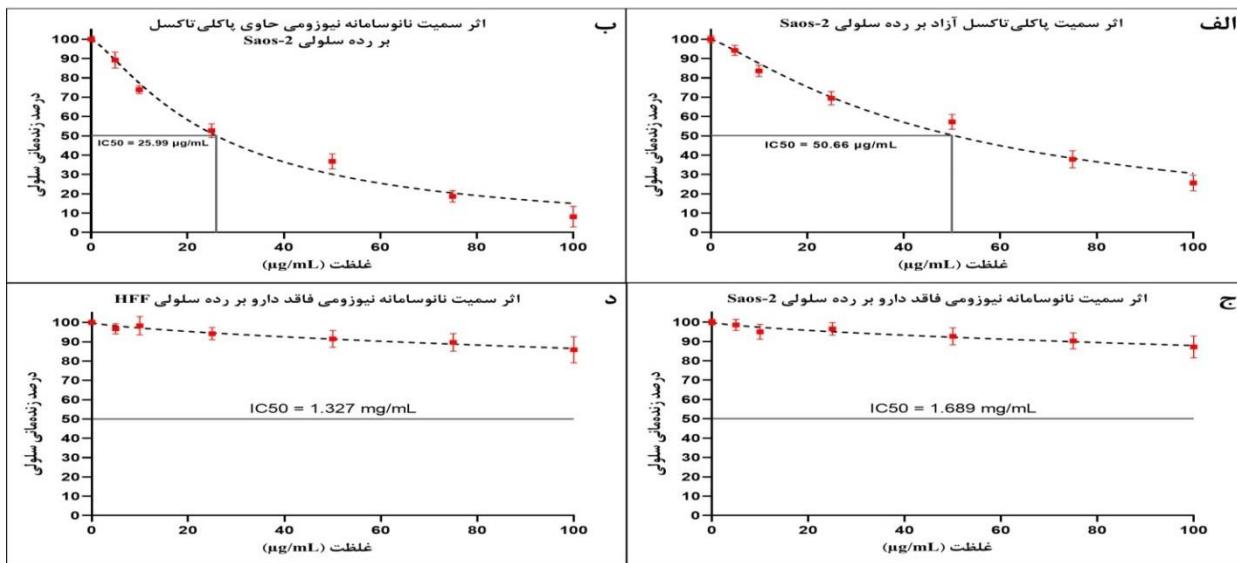


شکل ۴: تصاویر SEM از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلیتاسکسل.

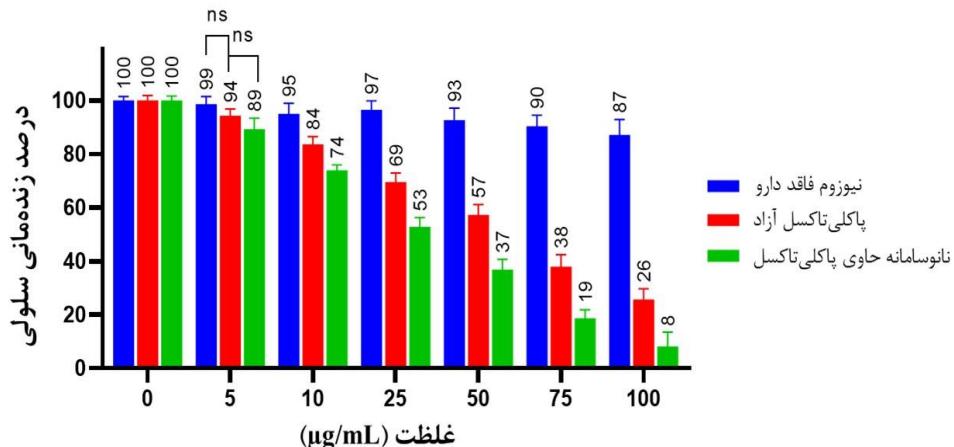
از خود نشان می‌دهند، به طوری که IC₅₀ نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی HFF و Saos-2 به ترتیب ۱/۶۸۹ و ۱/۳۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد و حداکثر غلظتی که از این نانو سامانه در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت، مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که بیش از ۱۰ برابر کمتر از میزان IC₅₀ آن بوده است (شکل ۵-ج و ۵-د). علاوه بر این، بررسی آماری نتایج حاصل از MTT نشان داد که نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلیتاسکسل، اثر سمیت بیشتری نسبت به فرم آزاد این دارو در تمامی غلظت‌های مورداستفاده، به جز غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، داشته است ($P < 0.01$). شکل ۶.

آزمایش سمیت سلولی به روش MTT

نتایج سمیت سلولی حاصل از آزمون MTT نشان داد که هر دو فرم آزاد و نیوزومی داروی پاکلیتاسکسل دارای اثر سمیت در رده سلولی سرطان استئوسارکوما (Saos-2) است (شکل ۵-الف و ۵-ب)، که نشان‌دهنده این موضوع است که فرم نیوزومی داروی پاکلیتاسکسل دارای سمیتی در حدود ۱/۹۴ برابر بیشتر از فرم آزاد این دارو است. از طرف دیگر، بر اساس نتایج، نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله فاقد دارو، در غلظت‌های مورداستفاده اثر سمیت ناچیزی هم در رده سلولی HFF و Saos-2 داشته است.



شکل ۵: نتایج حاصل از آزمون MTT. الف: اثر سمیت و میزان IC50 پاکلی تاکسل آزاد بر رده سلولی Saos-2. ب: اثر سمیت و میزان IC50 نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل بر رده سلولی Saos-2. ج: اثر سمیت و میزان IC50 نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو بر رده سلولی Saos-2. د: اثر سمیت و میزان IC50 نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی HFF.



شکل ۶: نمودار اثر سمیت فرم آزاد داروی پاکلی تاکسل، فرم نیوزومی ان و نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی Saos-2. نتایج حاصل از آزمون ANOVA دوطرفه و مقایسه میانگین Tukey نشان داد که بهجز غلفت ۵ میکروگرم در میلی لیتر، در تمامی غلفت‌های دیگر، اثر سمیت در فرم‌های مختلف تیمار دارای تفاوت معنادار در سطح $P < 0.01$ است (ns=عدم وجود تفاوت معنادار).

مبتنی بر فناوری نانو در دنیای امروز، دروازه جدید و امیدبخشی در حوزه تشخیصی و درمانی به روی ما گشوده است. استفاده از نانو داروها از طریق افزایش دسترسی پذیری و جذب دارو، کاهش پاکسازی دارو از جریان خون به دلیل اندازه کوچک و اصلاح سطحی ذرات (پگیلاسیون)، می‌تواند کارایی و هدفمندی استفاده از داروهای شیمی‌درمانی را به طور مؤثری افزایش دهد (۱۹). به همین منظور در مطالعه حاضر، جهت دارورسانی داروی پاکلی تاکسل به رده سلولی Saos-2

بحث

استئوسارکوما، یکی از شایع‌ترین سرطان‌های بدین خیم استخوان است که بیشتر نوجوانان بین ۱۰ تا ۲۴ سال را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). در استراتژی‌های درمانی، شیمی‌درمانی می‌تواند میزان انتشار این سرطان را بسیار کاهش دهد، با این وجود، ظهور مقاومت چندگانه دارویی در این نوع از سرطان، کارآمدی داروهای شیمی‌درمانی را به طور قابل توجهی کاهش داده است (۶). از طرف دیگر، روش‌های دارورسانی

نیوزوم‌ها را از سیستم ایمنی میزان ببهود بخشیده و فیلتراسیون کلیوی را کاهش می‌دهد؛ بنابراین نیمه عمر بیشتری در شرایط درون تن (vivo in) بروز می‌دهد (۲۷). پگیله شدن هم‌چنین PDI نیوزوم‌ها را کاهش داده و سبب بهبود پایداری نیوزوم‌ها می‌گردد و از طریق کاهش PDI، تراکم و تجمع نانو سامانه به صورت توده را کاهش می‌دهد (۲۸). به عنوان مثال، هونگ و همکاران در مطالعه‌ای به منظور افزایش DPCC، پایداری سامانه لیپوزومی از فسفولیپیدهای مختلف DSPE و EggPC/CH به همراه PEG استفاده کردند که افزایش قابل توجه پایداری سامانه را در هنگام استفاده از PEG در سطح نانوذره گزارش کردند (۲۹). از طرف دیگر، اندازه نانوذره، از عوامل بسیار مهم و تأثیرگذار در تجمع دارو در سایت تومور، بازده درمان، تراوش‌پذیری از رگ‌ها و پایداری نانو حامل‌ها است (۳۰) به طوری که نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده‌اند حامل‌هایی با اندازه کوچک‌تر، ارائه‌کننده هدف‌گیری و تجمع بهتری در سایت عمل بوده‌اند (۳۱). در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی‌تاکسل دارای قطر هیدرودینامیکی با متوسط اندازه ۱۱۵/۴ بوده است که هم‌راستا با مطالعات پیشین است و هم‌چنین اندازه مطلوبی محسوب می‌شود (۱۷,۳۲,۳۳). Hnog Sook و همکاران در سال ۲۰۱۵ به منظور افزایش پایداری EggPC/CH سامانه لیپوزومی از فسفولیپیدهای مختلف DSPE، DPCC و Sook استفاده کردند که افزایش قابل توجه پایداری سامانه را در هنگام استفاده از PEG در سطح نانوذره مشاهده کردند (۲۹). در مطالعه‌ای که توسط Bayindir و همکاران انجام شد، الگوی رهایش پاکلی‌تاکسل از فرمولاسیون نیوزومی بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد الگوی رهایش پاکلی‌تاکسل از فرمولاسیون نیوزومی حاوی تؤین ۶۰ و کلسترول موجب رهایش ابتدایی سریع دارو در فاز اول خواهد شد. با این وجود رهایش دارو در فاز دوم، آهسته‌تر دنبال می‌شود (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط Manosroi و همکارانش انجام شد اثر وجود کلسترول را در فرمولاسیون نیوزومی حاوی تؤین ۶۰ بررسی کردند. نتایج نشان داد که

به عنوان مدلی از استئوسارکوما، از نانو سامانه‌های نیوزومی استفاده شد. نیوزوم‌ها، به دلیل ویژگی‌های منحصر به‌فردی که دارند، امروزه در استراتژی‌های دارورسانی مبتنی بر فناوری نانو بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و مطالعات بسیاری در استفاده از این نانو سامانه‌ها در دارورسانی سرطان تاکنون صورت گرفته است (۲۰-۲۳). در مطالعه حاضر، از فرمولاسیون‌های مختلف با نسبت ۷۵:۲۵ کلسترول به سورفتانت جهت ساخت نانو سامانه‌های نیوزومی استفاده شد. در همین راستا سورفتانت‌های اسپن ۴۰ (فرمول ۱)، اسپن ۶۰ (فرمول ۲)، اسپن ۸۰ (فرمول ۳)، تؤین ۸۰ (فرمول ۴) و تؤین ۶۰ (فرمول ۵) مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات نشان داده‌اند که اسپن‌ها، گروه سر یکسان و زنجیره آلکیل متفاوت دارند که با افزایش طول زنجیره آلکیل میزان لود افزایش می‌یابد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز، میزان لود فرمولاسیون دو با اسپن ۶۰ (زنジره آلکیل ۱۸ کربنی) از فرمولاسیون یک با اسپن ۴۰ (زنジره آلکیل ۱۶ کربنی) بیشتر بوده است. با این حال اسپن ۸۰ با زنجیره آلکیل ۱۸ کربنی، میزان لود کمتری نشان را داد (Span60 > Span40 > Span80). این امر می‌تواند به این دلیل باشد که اسپن ۸۰ گروه اشباع‌نشده در ساختار خود دارد (۲۵). در مورد تؤین نیز این قاعده صادق است، با وجود اینکه تؤین ۶۰ و تؤین ۸۰ هر دو ۱۸ کربن در زنجیره آلکیل خود دارند، فرمولاسیون حاوی تؤین ۸۰ به دلیل وجود گروه اشباع نشده در ساختار خود لود کمتری را از خود نشان داد (Tween60 > Tween80). استفاده از سورفتانت تؤین ۶۰ در فرمولاسیون‌های استفاده‌شده در کنار کلسترول موجب ایجاد وزیکول‌های پایدار شد که تمایل غشای نانو سامانه را به مولکول‌های هیدرووفوب افزایش می‌دهد. از سوی دیگر فرمولاسیون تهیه‌شده از تؤین ۶۰ در مقایسه با فرمولاسیون تهیه‌شده از اسپن ۶۰ میزان رهایش مطلوب‌تری را نشان داد که با سایر پژوهش‌ها نیز هم‌راستا است (۲۶). در ادامه با اضافه کردن ۵٪ فسفولیپید پگیله (DSPE-mPEG(2000) به فرمول ۵، افزایش پایداری و بازده بارگیری مشاهده شد. مطالعات متعدد نشان داده است که پگیله‌شدن، پوشاندن و پنهان کردن

توئین ۶۰ و کلسترول موجب رهایش ابتدایی سریع دارو در فاز اول خواهد شد، با این وجود رهایش دارو در فاز دوم، آهسته‌تر دنبال می‌شود (۱۶). علاوه بر آنچه ذکر گردید، نتایج آزمون MTT نشان داد که نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی تاکسل به طور قابل توجهی در افزایش سمیت داروی پاکلی تاکسل در عین کاهش غلظت داروی استفاده شده، مؤثر عمل کرده است به طوری که IC₅₀ نانو سامانه حاوی دارو در حدود ۱/۹۴ برابر بیشتر از مقدار IC₅₀ دارو بود، در حالیکه نانو سامانه فاقد دارو سمیت قابل توجهی چه در رده سلولی سلطانی Saos-2 و چه در رده سلولی نرمal HFF نداشت. این موضوع در کنار کاهش نسبت لیپید به دارو (L/D) به کاررفته در فرمولاسیون‌های نیوزومی که تنها ۱۰٪ بوده است، نشان می‌دهد میزان داروی مورداستفاده نسبت به مطالعات پیشین کاهش پیدا کرده است (۳۷-۳۵). به عبارت دیگر، با استناد به نتایج حاصل از تست‌های سلولی می‌توان ادعا نمود این پژوهش توانسته دوز مؤثر دارو را کم و در عین حال، خواص دارویی و درمانی آن را حفظ نماید.

کارایی بارگذاری دارو تحت تاثیر طول زنجیره آلکیل سورفتانت غیر یونی و مقدار کلسترول به کار برد شده در تهیه وزیکول‌ها بستگی دارد. مشخص شد که تویین ۶۰ بدون حضور کلسترول امکان تشکیل نیوزوم را ندارد و با اضافه کردن کلسترول، نیوزوم با حداکثر بارگذاری دارو تشکیل می‌شود. به علاوه مشخص شد که سورفتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل ۱۸ کربن مانند تویین ۶۰ کارایی بارگذاری بالاتری نسبت به سورفتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل ۱۲ کربن مانند تویین ۲۰ دارد (۳۴). به طور خلاصه در مطالعه حاضر فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله (فرمول ۶) حاوی توئین ۶۰ و کلسترول و DSPE-mPEG(2000) با نسبت (۷۵:۲۵:۵) از چند جهت دارای ویژگی‌های مطلوبی بود، از جمله: قطر کوچک، رهایش کنترل شده دارو و بازده درون‌گیری بالا (جدول ۳). این نتایج با مطالعه که توسط باینده و همکاران انجام شد مطابقت دارد، در آن مطالعه الگوی رهایش پاکلی تاکسل از فرمولاسیون نیوزومی بررسی و مشخص شد الگوی رهایش پاکلی تاکسل از فرمولاسیون نیوزومی حاوی

جدول ۳: مشخصات کلی نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی تاکسل

فرمولاسیون	توئین ۶۰ (%)	کلسترول (%)	DSPE-mPEG(2000) (%)	بازده بارگیری (± SD) (%)	محیط در رهایش تجمعی	در محیط توموری (٪) (ساعت)	شاخص قطر	پتانسیل زتا
F6	۷۱/۲۵	۲۳/۷۵	۵	۷۴/۸۹±۱/۶	۷۴/۷۶	۷۹/۸۳	۱۱۵/۴	-۱۲/۷۹

همچون نیوزوم به دلیل شباهت ساختاری با غشای سلول و بدن انسان، موانع عبور از رگ‌های خونی و بافت‌های متعدد را پشت سر می‌گذارد. همچنین تحويل داروهای شیمیایی مانند پاکلی تاکسل درون یک فضای محصور شده و کروی در مقیاس نانو عوارض سیتوکوکسیتی آن را برای سلول‌های سالم تا حد زیادی کاهش می‌دهد. در این مطالعه، نانو سامانه نیوزومی طراحی و ساخته شد که علاوه برداشت اندازه کوچک و قطر هیدرودینامیکی مناسب، مورفولوژی کروی و پایداری شیمیایی

نتیجه‌گیری

استفاده از نانو حامل‌های دارویی به عنوان رویکردی مؤثر برای تحويل هوشمند دارو در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده است. طی این سال‌ها استفاده از نانو حامل‌هایی که دارورسانی را به صورت غیر هدفمند و یا هدفمند به سلول‌های سلطانی تحويل نماید، با موفقیت‌های چشمگیری همراه بوده است. استفاده از سیستم‌های دارورسانی بر پایه سورفتانت‌ها

مطالعات برونتنی در مدل‌های آزمایشگاهی، به عنوان یک کاندید درمانی امیدبخش مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای محمد جواد پور‌ محمودیان دانشجو کارشناسی ارشد زیست‌فناوری پزشکی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi بزد هست که در مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پرديس بين‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi يزد انجام گرفت. صمیمانه از استاد و مسئولین محترم این مرکز در خصوص تسهیل بهره‌مندی از فضای آزمایشگاهی و دستگاهی تشکر می‌گردد.

حامي مالي: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

و شاخص پراکندگی مناسب، قادر به بارگیری و رهایش داروی پاکلیتاسکسل با کارایی بالا بودند. علاوه بر این، نانو سامانه نیوزومی طراحی و ساخته شده با موفقیت توانست داروی موردنظر را به صورت مؤثر به سلول‌های سرطانی تحويل دهد و علی‌رغم میزان کمتر دارو در مقایسه با داروی آزاد، در این سلول‌ها توانست سمیت بیشتری ایجاد نماید. هم‌چنین اصلاح سطحی نانو حامل با پلی‌اتیلن گلیکول علاوه بر ایجاد پایداری نانو سامانه و کاهش شاخص پراکندگی آن در مطالعه حاضر، می‌تواند در مطالعات درون‌تنی نیز به عنوان یک عامل برتری دهنده نسبت به داروی آزاد مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. بنابراین با توجه به اینکه نانو سامانه حاضر در شرایط حاکم بر سلول‌های سرطانی به صورت نیمه هدفمند عمل نموده، می‌توان چنین پیشنهاد نمود سامانه مذکور قابلیت این را دارد تا در

References:

- 1-Grimer R, Athanasou N, Gerrard C, Judson I, Lewis I, Morland B, et al. *UK Guidelines for the Management of Bone Sarcomas*. Sarcoma 2010; 2010.
- 2-Ottaviani G, Jaffe N. *The Epidemiology of Osteosarcoma*. Pediatr Adolesc Osteosarcoma 2009; 3-13.
- 3-Weber K, Damron TA, Frassica FJ, Sim FH. *Malignant Bone Tumors*. Instr Course Lect 2008; 57: 673-88.
- 4-Lin PP, Patel S. *Osteosarcoma*. In: Bone Sarcoma. Springer 2013; 75-97.
- 5-Zhang Y, Yang J, Zhao N, Wang C, Kamar S, Zhou Y, et al. *Progress in the Chemotherapeutic Treatment of Osteosarcoma*. Oncol Lett 2018; 16(5): 6228-37.
- 6-Li S, Sun W, Wang H, Zuo D, Hua Y, Cai Z. *Research Progress on the Multidrug Resistance Mechanisms Of Osteosarcoma Chemotherapy And Reversal*. Tumor Biol 2015; 36(3): 1329-38.
- 7-Majidinia M, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Rahimi M, Mihanfar A, Karimian A, Safa A, et al. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Recent Progress in Nanotechnology and New Horizons*. IUBMB Life 2020; 72(5): 855-71.
- 8-Chen S, Hanning S, Falconer J, Locke M, Wen J. *Recent Advances in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Fabrication, Characterization, Pharmaceutical and Cosmetic Applications*. Eur J Pharm Biopharm 2019; 144: 18-39.
- 9-Mohammadi M, Haghilosadat BF, Ehsani R, Yazdian F, Rashedi H, Jahanizadeh S, et al. *Synthesis, Characterization and Evaluation of Liponiosome Containing Ginger Extract as a New Strategy for*

- Potent Antifungal Formulation.** J Clust Sci 2020; 31(5): 971-81.
- 10-**Kazi KM, Mandal AS, Biswas N, Guha A, Chatterjee S, Behera M, et al. *Niosome: A Future of Targeted Drug Delivery Systems.* J Adv Pharm Technol Res 2010; 1(4): 374.
- 11-**Weaver BA. *How Taxol/Paclitaxel Kills Cancer Cells.* Mol Biol Cell 2014; 25(18): 2677-81.
- 12-**Liggins RT, Burt HM. *Polyether-Polyester Diblock Copolymers for the Preparation of Paclitaxel Loaded Polymeric Micelle Formulations.* Adv Drug Deliv Rev 2002; 54(2): 191-202.
- 13-**Horwitz SB. *Taxol (Paclitaxel): Mechanisms of Action.* Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 1994; 5: S3-6.
- 14-**Wang T, Wang H, Soong Y. *Paclitaxel Induced Cell Death: Where the Cell Cycle and Apoptosis Come Together.* Cancer Interdiscip Int J am Cancer Soc 2000; 88(11): 2619-28.
- 15-**Alemi A, Zavar Reza J, Haghirsadat F, Zarei Jaliani H, Haghi Karamallah M, Hosseini SA, et al. *Paclitaxel and Curcumin Coadministration in Novel Cationic PEGylated Niosomal Formulations Exhibit Enhanced Synergistic Antitumor Efficacy.* J Nanobiotechnology 2018; 16(1): 1-20.
- 16-**Sezgin Bayindir Z, Beşikci A, Yüksel N. *Paclitaxel-Loaded Niosomes for Intravenous Administration: Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Rats.* Turkish J Med Sci 2015; 45(6): 1403-12.
- 17-**Alemi A, Reza JZ, Haghirsadat F, Jaliani HZ, Karamallah MH, Hosseini SA, et al. *Paclitaxel and Curcumin Coadministration in Novel Cationic PEGylated Niosomal Formulations Exhibit Enhanced Synergistic Antitumor Efficacy.* J Nanobiotechnology 2018; 16(1): 1-20.
- 18-**Yuan Y, Song J-X, Zhang M-N, Yuan B-S. *A Multiple Drug Loaded, Functionalized Ph-Sensitive Nanocarrier as Therapeutic and Epigenetic Modulator for Osteosarcoma.* Sci Rep 2020; 10(1): 1-11.
- 19-**Bu H, Gao Y, Li Y. *Overcoming Multidrug Resistance (MDR) in Cancer by Nanotechnology.* Sci China Chem 2010; 53(11): 2226-32.
- 20-**Shaker DS, Shaker MA, Hanafy MS. *Cellular Uptake, Cytotoxicity and In-Vivo Evaluation of Tamoxifen Citrate Loaded Niosomes.* Int J Pharm 2015; 493(1-2): 285-94.
- 21-**Xu Y-Q, Chen W-R, Tsosie JK, Xie X, Li P, Wan J-B, et al. *Niosome Encapsulation of Curcumin: Characterization and Cytotoxic Effect on Ovarian Cancer Cells.* J Nanomater 2016; 2016.
- 22-**Uchegbu IF, Double JA, Kelland LR, Turton JA, Florence AT. *The Activity of Doxorubicin Niosomes Against an Ovarian Cancer Cell Line and Three in Vivo Mouse Tumour Models.* J Drug Target 1996; 3(5): 399-409.
- 23-**Sharma V, Anandhakumar S, Sasidharan M. *Self-Degrading Niosomes for Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs: An Efficient Carrier for Cancer Multi-Drug Delivery.* Mater Sci Eng C 2015; 56: 393-400.
- 24-**Yoshioka T, Sternberg B, Florence AT. *Preparation and Properties of Vesicles (Niosomes) of Sorbitan Monoesters (Span 20, 40, 60 and 80) and a Sorbitan Triester (Span 85).* Int J Pharm 1994; 105(1): 1-6.
- 25-**Roque L, Fernández M, Benito JM, Escudero I.

- Stability And Characterization Studies of Span 80 Niosomes Modified with CTAB in the Presence of NaCl.** Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 2020; 601: 124999.
- 26-**Akbari V, Abedi D, Pardakhty A, Sadeghi-Aliabadi H. **Release Studies on Ciprofloxacin Loaded Non-Ionic Surfactant Vesicles.** Avicenna J Med Biotechnol 2015; 7(2): 69.
- 27-**Garбуzenko O, Barenholz Y, Priev A. **Effect of Grafted PEG on Liposome Size and on Compressibility and Packing of Lipid Bilayer.** Chem Phys Lipids 2005; 135(2):117-29.
- 28-**Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan HA, et al. **Pegylated Liposomes: Immunological Responses.** Sci Technol Adv Mater 2019; 20(1): 710-24.
- 29-**Hong M-S, Lim S-J, Lee M-K, Kim YB, Kim C-K. **Prolonged Blood Circulation of Methotrexate by Modulation of Liposomal Composition.** Drug Deliv 2001; 8(4): 231-7.
- 30-**YANG L, HU R. **The Size of Liposomes: A Factor which Affects their Targeting Efficiency to Tumors [J].** Foreign Med Sci (Section Pharmacy) 2007; 3.
- 31-**Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. **Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems.** Pharmaceutics 2018; 10(2): 1-17.
- 32-**Haghitalsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad S, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-Doulabi B. **Preparation of Pegylated Cationic Nanoliposome-Sirna Complexes for Cancer Therapy.** Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol 2018; 46(Sup1): 684-92.
- 33-**Hemati M, Haghitalsadat F, Jafary F, Moosavizadeh S, Moradi A. **Targeting Cell Cycle Protein in Gastric Cancer with CDC20siRNA and Anticancer Drugs (Doxorubicin and Quercetin) Co-Loaded Cationic Pegylated Nanoniosomes.** Int J Nanomedicine 2019; 14: 6575.
- 34-**Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. **Characterization of Vesicles Prepared with Various Non-Ionic Surfactants Mixed with Cholesterol.** Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2003; 30(1-2): 129-38.
- 35-**Aboeepoor S, Dehghani Ashkezari M, Aboee-Mehrizi F, Haghitalsadat BF, Nikoonahad Lotfabadi N. **Designing and Characterizing Nano-Carriers Containing Nepeta Persica Extract and their Effect on Bone Cancer.** Horiz Med Sci 2020; 26(2): 142-55.
- 36-**Haghitalsadat BF, Naderinezhad S, Amoabediny G, Montazeri F, Zandieh Doulabi B. **Evaluation of the Effects of Surface Charge on Cytotoxicity of Liposomal Doxorubicin on Bone Cancer Cell Line (Osteosarcoma).** Daneshvar Med Basic Clin Res J 2020; 25(6): 19-26.
- 37-**Alsadat BFH, Amirpour Z, Nafisi B. **Development of Slow Release Berberine-Containing Nanoliposome for Delivery to Bone Cancer Cells Saos2.** Iran J Pediatr Hematol Oncol 2020.

Design, Synthesis and Characterization of Nano niosomal Delivery system Containing paclitaxel drug for Drug Delivery to Osteosarcoma Cell Line (Saos-2)

Mohammad Javad Pourmahmoudian¹, Seyed Mahdi Kalantar², Bibi Fatemeh Haghirsadat^{†3}

Original Article

Introduction: Osteosarcoma is the most common type of bone cancer which current chemotherapy treatment strategies have not been very successful due to multiple drug resistance and diverse side effects. The use of nano niosomal delivery system as a drug delivery is one of the new approaches to overcome these limitations. Paclitaxel is an anti-cancer chemotherapy drug used in the treatment of various types of cancers. In this study, various niosomal formulations was designed and synthesized to load Paclitaxel to increase drug efficiency on Saos-2 cell line and overcome the problems of the present treatment..

Methods: Various neosomal formulations containing paclitaxel anti-cancer drug were designed and synthesized. For this purpose, neosomal formulations were prepared based on the ratio of different cholesterol and surfactants. Niosomal formulations and their effects on drug loading and drug release were then studied and interpreted. Cytotoxicity on Saos-2 cell line was assessed using GraphPad Prism 9 MTT test software.

Results: PEGylate's niosomal formulation with cholesterol: Tween 60 and ratio (25:75) has the highest paclitaxel insertion efficiency of 74.89%, size 115.4 nm, surface charge of -12.97 mV and the release 79.83%. This formulation had the highest cumulative release and was considered as a final and optimal was selected. Optimal PEGylate's niosomal system containing paclitaxel was able to show higher toxicity on Saos-2 cell line than free drug. Moreover, this nanosystem alone and without drug had no significant toxicity effect in normal fibroblast cell line (HFF).

Conclusion: The findings of this study indicate that the use of PEGylated niosomal nanocarriers can be used as a promising strategy for future studies in the treatment of bone cancer, especially osteosarcoma.

Keywords: Drug Delivery, Osteosarcoma, Niosome, PEGylation, Paclitaxel, Saos 2, HFF.

Citation: Pourmahmoudian M.J, Kalantar S.M, Haghirsadat F. **Design, Synthesis and Characterization of Nano Niosomal Delivery SystemContaining paclitaxel Drug for Drug Delivery to Osteosarcoma Cell Line (Saos 2).** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(4): 4764-77.

^{1,2}Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 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: Fhaghirosadat@gmail.com