

طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی داروی پاکلی تاکسل 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 پاکلی تاکسل یکی از رویکردهای جدید هست. پاکلی تاکسل داروی ضد سرطان بسیار قوی است که در درمان بسیاری از تومورها کاربرد دارد. در این مطالعه، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی جهت بارگذاری داروی پاکلی تاکسل 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 پاکلی تاکسل طراحی و سنتز گردیدند. بدین منظور، فرمولاسیون‌های نیوزومی بر اساس نسبت کلسترول و سورفکتانت‌های 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 کلسترول: توئین ۶۰ و نسبت (۲۵:۷۵) دارای بیشترین بازده درون‌گیری پاکلی تاکسل ۷۴/۸۹٪، سایز ۱۱۵/۴ نانومتر، شارژ سطحی ۱۲/۹۷- میلی‌ولت و با رهایش ۷۹/۸۳٪ بیشترین میزان رهایش جمعی را داشته و به‌عنوان فرمولاسیون نهایی و بهینه انتخاب شد. سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی پاکلی تاکسل توانست سمیت بالاتری را بر روی رده سلولی Saos-2 نسبت به داروی آزاد از خود نشان دهند. علاوه بر این، این نانو سامانه به‌تنهایی و بدون دارو اثر سمیت قابل‌توجهی در رده سلولی فیبروبلاست نرمال نداشت.

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

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

ارجاع: پورمحمودیان محمدجواد، کلانتر سید مهدی، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی داروی پاکلی تاکسل 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: Fhaghirosadat@gmail.com، صندوق پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

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 به‌صورت هم‌زمان است، که سبب افزایش حلالیت داروهای آب‌گریز و کاهش معنی‌دار غلظت مؤثر داروها می‌شود (۱۰). پاکلی‌تاکسل یکی از پرستفاده‌ترین داروهای شیمی‌درمانی هست که در درمان سرطان سینه، تخمدان، ریه و سارکوم کاپوسی استفاده می‌شود؛ هم‌چنین در مطالعات اخیر با استفاده دوز پایین پاکلی‌تاکسل در بیمارهای غیر سرطانی مانند بیماری‌های پوستی، کلیوی، فیبروز کبدی، التهاب، بازسازی آکسون و تنگی عروق کرونر مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱،۱۲). پاکلی‌تاکسل یک داروی آنتی‌نئوپلاستیک 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 پاکلی‌تاکسل بر مرگ سلول‌های سرطانی پرداختند. پاکلی‌تاکسل با اتصال به میکروتوبول‌ها باعث توقف چرخه سلولی در فاز میتوزی شده که در نهایت منجر به آپوپتوز سلولی می‌شود (۱۴). عالمی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر داروی پاکلی‌تاکسل 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 سایتوتوکسیتی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی رده سلولی MCF7 داشته است (۱۵). Bayindir ZS و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی و مقایسه اثر فارماکوکینتیک داروی پاکلی‌تاکسل به‌وسیله بارگذاری آن در یک حامل نیوزومی در رت‌ها پرداختند. این محققان در تزریق وریدی سامانه دارویی مذکور در رت‌ها، افزایش قابل‌ملاحظه نیمه‌عمر داروی پاکلی‌تاکسل مشاهده نمودند (۱۶). هدف از مطالعه حاضر، طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی جهت انتقال داروی پاکلی‌تاکسل به رده سلولی Saos-2 به‌عنوان مدلی از استئوسارکوما دارای مقاومت

تومورهای استخوان یکی از قدیمی‌ترین نوع تومورها در پاتولوژی است و در تمام کشورها با تمام نژادها بروز می‌کند. در ایالت متحده آمریکا، 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 قابل اکتساب پس از تولد در سلول‌های مذکور، عامل اصلی این نوع از بدخیمی است (۳). شیمی‌درمانی از متداول‌ترین 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 به‌عنوان 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، به‌ویژه 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 قابل‌توجه برای درمان موفقیت‌آمیز سرطان به شمار می‌رود (۶). استفاده از نانوسامانه‌ها جهت دارورسانی، راه‌حل جدیدی برای افزایش اثربخشی درمانی داروهای ضد سرطان به دلیل توانایی آن‌ها در انتقال هدفمند و کنترل‌شده 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، به‌عنوان یکی از جدیدترین نانو سامانه‌ها جهت دارورسانی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. نیوزوم‌ها، وزیکول‌هایی هستند که از خود تجمع سورفکتانت‌های غیر یونی در محیط آب، توسط آرایش خودبه‌خودی از طریق میان‌کنش‌های آب‌دوستی-آب‌گریزی شکل می‌گیرند و ساختار دولایه محصور را ایجاد می‌کنند، به‌عبارت‌دیگر در محیط آبی، نواحی آب‌گریز آن‌ها تمایل به تجمع

جذب نوری آن‌ها در طول موج ۲۲۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL 7250, Bio Aquarius, UK) اندازه‌گیری گردید. در نهایت نمودار کالیبراسیون و معادله خط داروی پاکلیتاکسل با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 به دست آمد.

سنتز نانو سامانه نیوزومی با داروی پاکلیتاکسل

از روش آب‌پوشانی لایه‌نازک جهت ساخت نانو سامانه‌های نیوزومی در این مطالعه استفاده شد (۱۷). به‌طور خلاصه، کلاسترول و سورفکتانت‌های غیر یونی مختلف در کلروفورم حل شد تا ترکیب کلاسترول (۲۵٪) - سورفکتانت (۷۵٪) حاصل شود (جدول ۱). سپس داروی پاکلیتاکسل با نسبت دارو (۱) - لیپید (۱۰) به محلول قبلی اضافه شد. پس از همگن شدن محلول حاوی کلاسترول - سورفکتانت - دارو در روتاری (Heidolph, Germany) در دمای ۴۰ °C، حلال از طریق ایجاد خلأ حذف و لایه‌نازک تشکیل شد. جهت اطمینان از حذف کامل حلال، لایه‌نازک تشکیل‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C در یخچال قرار گرفت. سپس لایه‌نازک تشکیل‌شده با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS, pH=7.4) 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 پروبی (UP200Ht, Hielscher, Germany) 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 دست‌آمده، فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون انجام شد.

چندگانه دارویی است. در این راستا، نسبت‌های مختلفی از کلاسترول و سورفکتانت‌های 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. در نهایت میزان سمیت سلولی نانو سامانه نیوزومی بهینه حاوی دارو پاکلیتاکسل در مقایسه با داروی پاکلیتاکسل به تنهایی در رده سلولی Saos-2 به‌عنوان مدلی از استئوسارکوما و رده سلولی فیبروبلاستی نرمال (HFF) از طریق آزمون MTT تعیین شد.

روش بررسی

در مطالعه حاضر، سورفکتانت‌های غیر یونی (Span40، Span60، Span80، Tween60 و Tween80)، DSPE-mPEG(2000) کلاسترول، کیت MTT، پاکلیتاکسل و کیسه دیالیز (MWCO 12000 Da) از شرکت سیگما (Sigma Aldrich, USA)؛ کلروفورم، ایزوپروپانول، متانول از شرکت مرک (Merck, Germany)؛ محیط کشت DMEM high glucose از شرکت گیبکو (Gibco, USA)، سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات سالین (PBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Pen-Strep, 10,000 U/mL - 10 mg/mL) و تریپسین EDTA از شرکت زیست‌ایده نوترکیب (ایران) تهیه و استفاده شد. همچنین رده سلولی Saos-2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و رده سلولی فیبروبلاست نرمال (HFF) از بانک سلول مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی (یزد، ایران) تهیه گردید.

ترسیم نمودار کالیبراسیون پاکلیتاکسل

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

جدول ۱: فرمولاسیون‌های مختلف پاکلیتاکسل استفاده‌شده در مطالعه حاضر.

فرمولاسیون	نسبت لیپید به دارو	کلاسترول (%)	اسپین ۴۰ (%)	اسپین ۶۰ (%)	اسپین ۸۰ (%)	توئین ۸۰ (%)	توئین ۶۰ (%)
F1	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 به منظور 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 مورد بررسی 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 (DLS) و با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, UK) تعیین گردید. بدین منظور، نمونه‌های رقیق شده با غلظت ۰/۱ mg/ml تهیه و بلافاصله پس از آماده‌سازی، نور پراکنده در دمای اتاق با زاویه ۹۰ 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) با قدرت ۱۰۰ وات صورت گرفت. بدین منظور، ۱۰ 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 به منظور ایجاد رسانایی، پوشش دار شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEG-SEM MIRA3 TESCAN, Czech Republic) تصویربرداری گردید. بررسی اثر سمیت سلولی نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل با

استفاده از آزمون MTT

به منظور 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 ۶ ساعت درون محلول دیالیز (PBS) در دمای ۴ °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 ۱ به ۱۰ با ایزوپروپانول مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۱ 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 ۲۲۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار دارو با استفاده معادله خط نمودار استاندارد داروی پاکلی تاکسل در ایزوپروپانول تعیین شد. در نهایت بازده بارگذاری دارو با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{میزان داروی درون‌گیری شده} \times 100 = \frac{\text{بازده بارگذاری دارو} (\%) \times \text{میزان داروی اولیه مورد استفاده شده}}{\text{میزان داروی درون‌گیری شده}}$$

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 ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C و pH=۷/۴ مطابق با شرایط فیزیولوژیک بافت نرمال انجام پذیرفت. همچنین جهت شبیه‌سازی شرایط فیزیولوژیک بافت توموری، pH=۶.۵ و دمای ۴۲°C در نظر گرفته شد. بدین منظور، ۱۰ میلی‌لیتر از نیوزوم‌های حاوی دارو، داخل کیسه دیالیز ریخته شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول دیالیز در زمان‌های مشخص جمع‌آوری و بلافاصله با همان میزان از PBS تازه جایگزین شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۷۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد داروی پاکلی تاکسل در PBS، میزان رهایش تجمعی دارو در مدت‌زمان‌های 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 به منظور به دست آوردن فرمولاسیون بهینه میزان بازده بارگذاری و رهایش دارو بررسی شدند (جدول ۲). سرانجام فرمول F5 (توئین ۶۰-کلسترول با نسبت ۲۵:۷۵) 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) برافزایش نیمه‌عمر و پایداری نانو حامل‌های لیپیدی، به منظور بهبود ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی (اندازه ذرات، کارایی بارگیری، رهایش دارو و بهبود ورود به سلول) به فرمولاسیون بهینه (F5) میزان ۵ درصد PEG به فرم DSPE-mPEG(2000) اضافه گردید و فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله‌شده (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 سلولی Saos-2 و رده سلولی فیبروبلاست نرمال (HFF) از طریق آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های مذکور در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Pen-Strep (در انکوباتور با ۳۷°C، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت) کشت داده شدند. به منظور 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 میکرولیتر 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, Biotek, USA) اندازه‌گیری شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از معادله ذیل محاسبه شد:

درصد زنده‌مانی سلول‌ها

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

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی آماری نتایج از نرم‌افزار Graphpad Prism ورژن ۸، آنالیز ANOVA و آزمون مقایسه میانگین Tukey استفاده شد و سطوح معناداری نتایج برحسب P < 0/05 سنجیده و گزارش گردید. علاوه بر این، رگرسیون غیرخطی جهت تعیین میزان IC50 مورد استفاده قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی

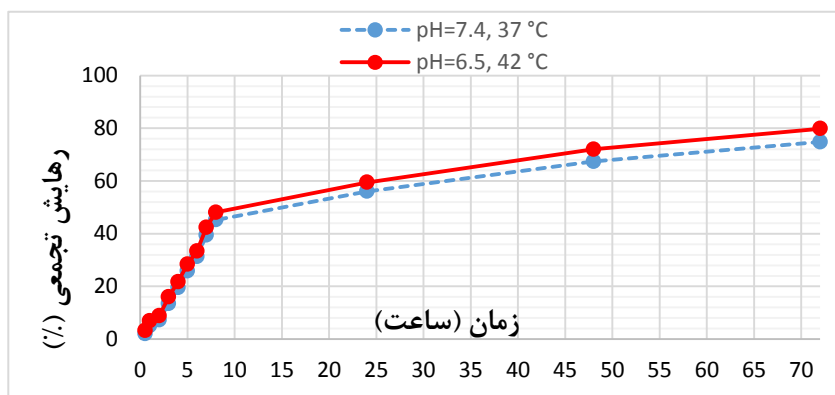
پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد تأیید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1400.086).

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 تولیدشده از نظر اندازه و شکل، توزیع همگنی دارند.

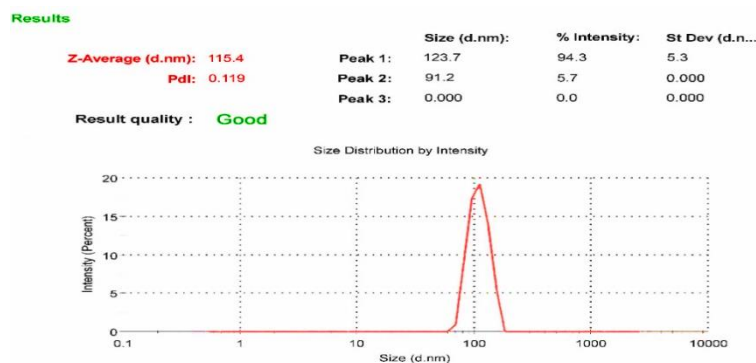
اندازه شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا بر اساس نتایج، نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل میانگین سایز ۱۱۵/۴ نانومتر و شارژ سطحی ۱۲/۹۷- میلی ولت داشت و میزان شاخص پراکندگی آن (PDI) ۰/۱۱۹ بود. این نتایج در شکل‌های ۳ و ۲ (به ترتیب سایز، PDI و شارژ سطحی) قابل مشاهده می‌باشند.

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

فرمولاسیون	بارگیری دارو (%) (± SD)	درصد رهایش (۸ ساعت)	درصد رهایش (۲۴ ساعت)	درصد رهایش (۴۸ ساعت)	درصد رهایش (۷۲ ساعت)
F1	۶۰/۲±۱/۳	۱۶/۱	۳۳/۵	۵۰/۴	۶۷/۱
F2	۶۶/۵۴±۱/۵	۱۷/۸	۳۲/۷	۴۹/۵	۶۶/۷
F3	۵۸/۱±۰/۸	۱۲/۳	۲۹	۴۳/۳	۵۷/۵۶
F4	۶۲/۷±۰/۷	۱۵/۱	۳۱/۷	۴۹/۱	۶۵/۳
F5	۷۰/۲۷±۱/۳	۱۹/۳	۳۶/۱	۵۴/۸	۷۲/۶

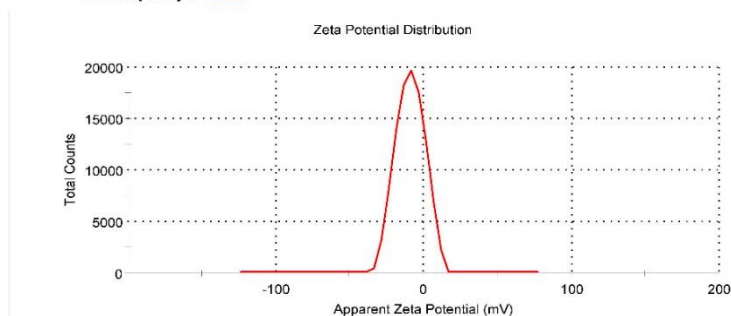


شکل ۱: رهایش پاکلی تاکسل از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله (فرمولاسیون F6)

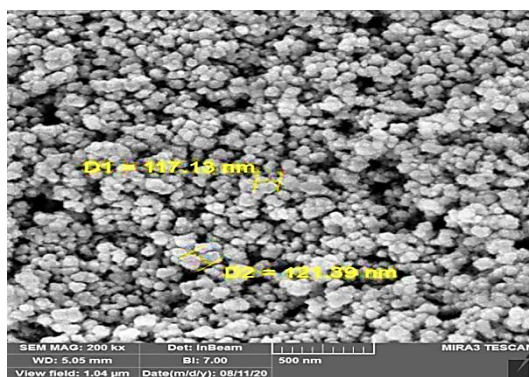


شکل ۲: سایز و شاخص پراکندگی (PDI) نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل

Results		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-12.79	Peak 1: -16.22	100	6.58
Zeta Deviation (mV):	6.81	Peak 2: 0	0	0
Conductivity (mS/cm):	0.0624	Peak 3: 0	0	0
Result quality : Good				



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

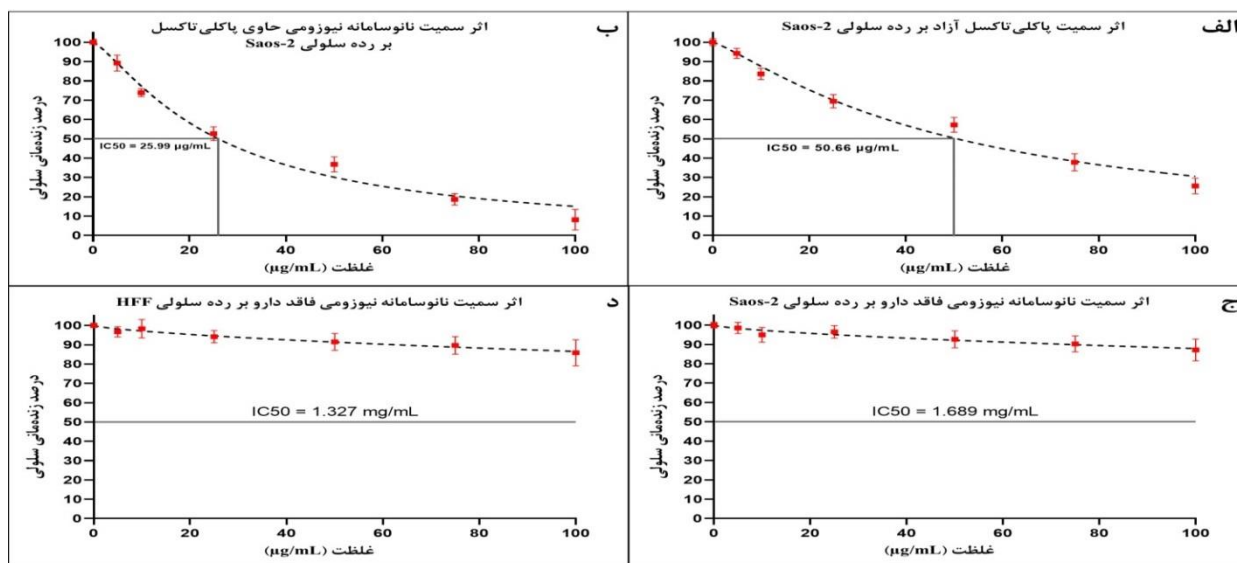


شکل ۴: تصاویر SEM از نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی پاکلی تاکسل.

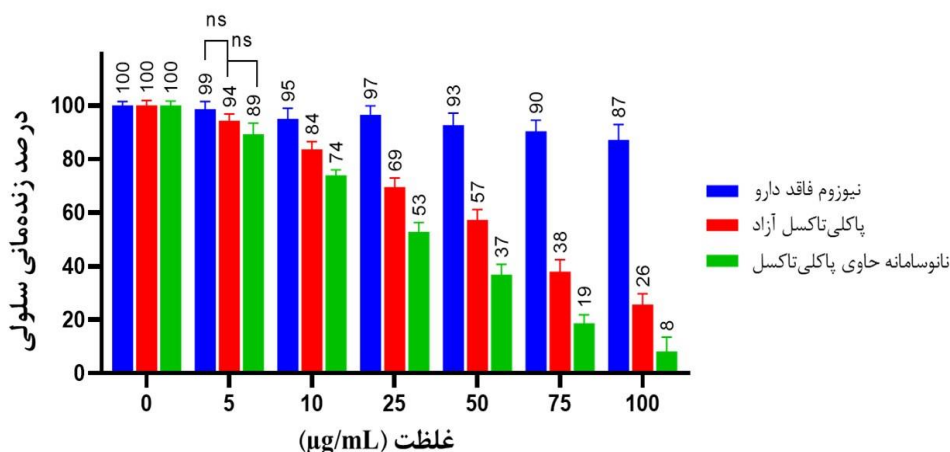
از خود نشان می‌دهند، به طوری که IC50 نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی Saos-2 و HFF به ترتیب ۱/۶۸۹ و ۱/۳۲۷ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد و حداکثر غلظتی که از این نانو سامانه در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت، مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده که بیش از ۱۰ برابر کمتر از میزان IC50 آن بوده است (شکل ۵-ج و ۵-د). علاوه بر این، بررسی آماری نتایج حاصل از MTT نشان داد که نانو سامانه نیوزومی حاوی پاکلی تاکسل، اثر سمیت بیشتری نسبت به فرم آزاد این دارو در تمامی غلظت‌های مورد استفاده، به جز غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر، 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 پاکلی تاکسل دارای اثر سمیت در رده سلولی سرطان استئوسارکوما (Saos-2) است (IC50=50.66 $\mu\text{g/ml}$ برای فرم آزاد پاکلی تاکسل و IC50=25.99 $\mu\text{g/ml}$ برای فرم نیوزومی) (شکل ۵-الف و ۵-ب)، که نشان دهنده این موضوع است که فرم نیوزومی داروی پاکلی تاکسل 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 مورد مطالعه اثر سمیت ناچیزی هم در رده سلولی Saos-2 و HFF



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، و 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 آن و نانو سامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی Saos-2. نتایج حاصل از آزمون ANOVA دوطرفه و مقایسه میانگین Tukey نشان داد که به جز غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر، در تمامی غلظت‌های 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 دسترس پذیری و جذب دارو، کاهش پاک‌سازی دارو از جریان خون به دلیل اندازه کوچک و اصلاح سطحی ذرات (پگیلیسیون)، می‌تواند کارایی و هدفمندی استفاده از داروهای شیمی‌درمانی را به‌طور 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 بدخیم 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 به‌طور قابل توجهی کاهش داده است (۶). از طرف دیگر، روش‌های دارورسانی

نیوزوم‌ها را از سیستم ایمنی میزبان بهبود بخشیده و فیلتراسیون کلیوی را کاهش می‌دهد؛ بنابراین نیمه‌عمر بیشتری در شرایط درون‌تن (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 به‌صورت توده را کاهش می‌دهد (۲۸). به‌عنوان مثال، هونگ و همکاران در مطالعه‌ای به‌منظور افزایش پایداری سامانه لیپوزومی از فسفولیپیدهای مختلف DPCC، DSPE و EggPC/CH به همراه PEG استفاده کردند که افزایش قابل‌توجه 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) به‌طوری‌که 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 و همکاران در سال ۲۰۱۵ به‌منظور افزایش پایداری سامانه لیپوزومی از فسفولیپیدهای مختلف DSPE، DPCC و EggPC/CH به همراه PEG استفاده کردند که افزایش قابل‌توجه 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 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). در مطالعه‌ای که توسط Manosroi و همکارانش انجام شد اثر وجود کلسترول را در فرمولاسیون نیوزومی حاوی توئین ۶۰ بررسی کردند. نتایج نشان داد که

به‌عنوان مدلی از استئوسارکوما، از نانو سامانه‌های نیوزومی استفاده شد. نیوزوم‌ها، به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی 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 سورفکتانت جهت ساخت نانو سامانه‌های نیوزومی استفاده شد. در همین راستا سورفکتانت‌های اسپن ۴۰ (فرمول ۱)، اسپن ۶۰ (فرمول ۲)، اسپن ۸۰ (فرمول ۳)، توئین ۸۰ (فرمول ۴) و توئین 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 (زنجیره آلکیل ۱۸ کربنی) از فرمولاسیون یک با اسپن ۴۰ (زنجیره آلکیل ۱۶ کربنی) بیشتر بوده است. باین‌حال اسپن ۸۰ با زنجیره آلکیل ۱۸ کربنی، میزان لود کمتری نشان را داد ($\text{Span}60 > \text{Span}40 > \text{Span}80$). این امر می‌تواند به این دلیل باشد که اسپن ۸۰ گروه اشباع‌نشده در ساختار خود دارد (۲۵). در مورد توئین نیز این قاعده صادق است، باوجود اینکه توئین ۶۰ و توئین ۸۰ هر دو ۱۸ کربن در زنجیره آلکیل خود دارند، فرمولاسیون حاوی توئین ۸۰ به دلیل وجود گروه اشباع نشده در ساختار خود لود کمتری را از خود نشان داد ($\text{Tween}60 > \text{Tween}80$). استفاده از سورفکتانت توئین ۶۰ در فرمولاسیون‌های استفاده‌شده در کنار کلسترول موجب ایجاد وزیکول‌های پایدار شد که تمایل غشای نانو سامانه را به مولکول‌های هیدروفوب افزایش می‌دهد. از سوی دیگر فرمولاسیون تهیه‌شده از توئین 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، آهسته تر دنبال می شود (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 سرطانی Saos-2 و چه در رده سلولی نرمال HFF نداشت. این موضوع در کنار کاهش نسبت لیپید به دارو (L/D) به کاررفته در فرمولاسیون های نیوزومی که تنها ۱۰٪ بوده است، نشان می دهد میزان داروی مورداستفاده نسبت به مطالعات پیشین کاهش پیدا کرده است (۳۵-۳۷). به عبارت دیگر، با استناد به نتایج حاصل از تست های سلولی می توان 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 سورفکتانت غیر یونی و مقدار کلسترول به کار برده شده در تهیه وزیکول ها بستگی دارد. مشخص شد که توئین ۶۰ بدون حضور کلسترول امکان تشکیل نیوزوم را ندارد و با اضافه کردن کلسترول، نیوزوم با حداکثر بارگذاری دارو تشکیل می شود. به علاوه مشخص شد که سورفکتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل ۱۸ کربن مانند توئین ۶۰ کارایی بارگذاری بالاتری نسبت به سورفکتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل ۱۲ کربن مانند توئین ۲۰ دارد (۳۴). به طور خلاصه در مطالعه حاضر فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله (فرمول ۶) حاوی توئین ۶۰ و کلسترول و فسفولیپید پگیله (DSPE-mPEG(2000 با نسبت (۷۵:۲۵:۵) از چند جهت دارای ویژگی های مطلوبی بود، از جمله: قطر کوچک، رهایش کنترل شده دارو و بازده درون گیری بالا (جدول ۳). این نتایج با مطالعه که توسط باینیدر 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 دارو (% (± SD)	رهایش در مجموعی در محیط نرمال (۷۲ ساعت)	رهایش تجمعی در محیط ۷۲ توموری (ساعت)	قطر هیدرودینامیکی	شاخص پتانسیل ذرات پراکندگی
F6	۷۱/۲۵	۲۳/۷۵	۵	۷۴/۸۹±۱/۶	۷۴/۷۶	۷۹/۸۳	۱۱۵/۴	۰/۱۱۹

همچون نیوزوم به دلیل شباهت ساختاری با غشای سلول و بدن انسان، موانع عبور از رگ های خونی و بافت های متعدد را پشت سر می گذارد. هم چنین تحویل داروهای شیمیایی مانند پاکلی تاکسل درون یک فضای محصور شده و کروی در مقیاس نانو عوارض سیتوتوکسیتی آن را برای سلول های سالم تا حد زیادی کاهش می دهد. در این مطالعه، نانو سامانه نیوزومی طراحی و ساخته شد که علاوه برداشتن اندازه کوچک و قطر هیدرودینامیکی مناسب، مورفولوژی کروی و پایداری شیمیایی

نتیجه گیری

استفاده از نانو حامل های دارویی به عنوان رویکردی مؤثر برای تحویل هوشمند دارو در سال های اخیر بسیار مورد توجه بوده است. طی این سال ها استفاده از نانو حامل هایی که دارورسانی را به صورت غیر هدفمند و یا هدفمند به سلول های سرطانی تحویل نماید، با موفقیت های چشمگیری همراه بوده است. استفاده از سیستم های دارورسانی بر پایه سورفکتانت ها

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

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای محمدجواد پورمحمدیان دانشجو کارشناسی ارشد زیست‌فناوری پزشکی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد هست که در مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام گرفت. صمیمانه از اساتید و مسئولین محترم این مرکز در خصوص تسهیل بهره‌مندی از فضای آزمایشگاهی و دستگای تشکر می‌گردد.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

و شاخص پراکندگی مناسب، قادر به بارگیری و رهایش داروی پاکلیتاکسل با کارایی بالا بودند. علاوه بر این، نانو سامانه نیوزومی طراحی و ساخته‌شده با موفقیت توانست داروی موردنظر را به‌صورت مؤثر به سلول‌های سرطانی تحویل 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 به‌عنوان 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 به‌صورت نیمه هدفمند عمل نموده، می‌توان چنین پیشنهاد نمود سامانه مذکور قابلیت این را دارد تا در

References:

- 1-Grimer R, Athanasou N, Gerrand 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, Haghrosadat BF, Ehsani R, Yazdian F, Rashedi H, Jahanizadeh S, et al. *Synthesis, Characterization and Evaluation of Liposome 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-Garbusenko 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-Haghiralsadat 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, Haghirsadat F, Jafari 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, Aboe-Mehrizi F, Haghirsadat 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-Haghiralsadat 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 System Containing 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