

بررسی اثر سمیت سلولی آرتمیزینین نانویوزومه بر رده سلول‌های سرطانی سینه

الناز اصغر خانی^۱: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
عظیم اکبرزاده: انستیتو پاستور ایران، بخش پابلوت نانوبیوتکنولوژی
محسن چيانی: انستیتو پاستور ایران، بخش پابلوت نانوبیوتکنولوژی
شیوا ایرانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
سید محمد اطیابی: انستیتو پاستور ایران، بخش پابلوت نانوبیوتکنولوژی
داریوش نوروزیان: انستیتو پاستور ایران، بخش پابلوت نانوبیوتکنولوژی

چکیده

مقدمه: سرطان سینه از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود و سالانه ۷ هزار زن به این سرطان مبتلا می‌شوند. آرتمیزینین دارویی است گیاهی که به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی است و بر سلول‌های طبیعی اثر سویی ندارد. نیوزومه حاملین زیست تخریب‌پذیر، غیرسمی و کارآمدی برای تحویل هدفمند داروها هستند. هدف از این مطالعه تهیه فرمولاسیون نیوزومی داروی آرتمیزینین و بررسی اثر سایتوتوکسیسیته این فرمولاسیون بر روی رده سلول سرطانی سینه انسانی (MCF-7) است.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نیوزومه‌های آرتمیزینین از روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اثر استفاده شد. برای این منظور مقادیر مشخصی از span20، آرتمیزینین و کلسترول در اتانول حل گردید و پس از تبخیر حلال با کمک روتاری اوپوریتور، فاز ژلوزی بدست آمده در بافر فسفات (pH 7.4) حل گردید و سپس به کمک سونیکاتور همگن سازی شد. قطر متوسط نیوزومه‌های آرتمیزینین با دستگاه زتاسایزر اندازه گیری شد. اثر سایتوتوکسیسیته با روش MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: قطر متوسط نیوزومه‌ها در روش تزریق اثر 220 ± 3 و در روش تبخیر فاز معکوس برابر با 267 ± 5 نانومتر تعیین شد. بازده کپسوله شدن دارو روش تزریق اثر $86/3 \pm 2$ و در روش تبخیر فاز معکوس برابر با $92/4 \pm 3$ درصد بدست آمد و اثر سایتوتوکسیسیته (IC50) داروی نیوزومه بر روی سلول‌های سرطانی بیشتر از فرم معمولی دارو بود.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از حامل‌های دارو رسانی مانند نیوزومه‌ها نقش موثری در افزایش کارایی دارو و کاهش دوز مصرفی آن دارد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، سایتوتوکسیسیته، آرتمیزینین، MCF-7.

مقدمه

هدف یک سیستم تحویل دارویی هدفمند، افزایش تحویل دارو در منطقه مورد نظر و کاهش اثر آن بر بافت‌های غیرهدف است به گونه‌ای که یک حالت پایدار را در خون ایجاد کند و یا در بافت هدف، سطحی از درمان را که موثرتر و غیرسمی‌تر باشد و مدت زمان طولانی‌تر را شامل شود را ایجاد کند که در این راستا، طراحی یک دوز مناسب دارویی، عنصر مهم در رسیدن به این هدف هستند (۱). سرطان پستان در کل جهان پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه، معده، کبد و کولون است (۲).

نیوزوم‌ها و زیکول‌های سورفکتانت‌های غیریونی با ساختارهای میکروسکوپی لایه‌لایه هستند که از هیدراتاسیون کلسترول با سورفکتانت‌های غیر یونی در محیط آبی تهیه می‌شوند و از سیستم‌های مهم دارو رسانی می‌باشند. در مقایسه با روش‌های دیگر دارورسانی هدفمند مثل لیپوزوم‌ها، نیوزوم‌ها دارای مزیت‌های زیادی هستند که از آن جمله می‌توان به روش‌های تهیه آسان‌تر، هزینه تولید پایین‌تر، انعطاف پذیری ساختاری و سمیت پایین‌تر به دلیل طبیعت غیر یونی آنها اشاره کرد. علاوه براین نیوزوم‌ها زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیر ایمنی‌زا بوده و با طیف وسیع‌تری در اندازه‌های ۱۰۰-۱۰ نانومتر قابل تهیه هستند. از لحاظ حلالیت، نیوزوم‌ها طیف وسیع‌تری از داروها شامل داروهای هیدروفیل (در داخل یک فاز آبی) و لیپوفیل (در ناحیه به خصوصی در بیرون لایه‌های چربی) را به دام می‌اندازند (۳).

Srinivas و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعات خود فرمول نیوزومال aceclofenac را گسترش داد. جهت بهتر کردن امکان دسترسی در مطالعات ارزیابی خود اثرات تغییر ترکیب سورفکتانت‌های غیریونی و کلسترول را در ظرفیت کپسوله شدن، اندازه ذرات و رهاسازی دارو را مورد مطالعه قرار دادند. برای این کار از مدل Peppas استفاده کردند (۴).

آرتیمیزینین دارای گروه لاکتون پراکسید در ساختار خود است و تصور می‌شود زمانی که پراکسید در ساختار ماده‌ای باشد در تماس با غلظت بالای آهن (مثل سلول‌های سرطانی) باعث رهاسازی گونه‌های اکسیژن فعال و ناپایدار شدن مولکول می‌شود و سلول‌های سرطانی به دلیل کمبود آهن از بین می‌روند (۵).

پ. سینگ و همکاران (۲۰۰۴) القا آرتیمیزینین بر روی سلول‌های سرطانی انسان را بررسی کردند. در مقایسه با سلول‌های نرمال، سلول‌های سرطانی سطح سلولی بیشتری برای گیرنده‌ها دارند. آنها آهن را به کمک پروتئین‌های گیرنده آهن می‌گیرند. پس سلول‌های سرطانی بیشتر تحت تاثیر کمبود آهن قرار گرفته و نابود می‌شوند (۶).

یانگ لی و همکاران (۲۰۰۱) اثرات ضد سرطانی مشتقات آرتیمیزینین در فاز G1 چرخه سلولی بررسی کردند. با اصلاح ساختار آرتیمیزینین یک سری مواد جدید کشف کردند که این مشتقات شامل گروه‌های سیانو و آریل است که تاثیرات قوی بر علیه رشد سلول‌های کشت شده P388 سرطان خون موشی و A549 سرطان ریه انسانی بدخیم داشتند. این فعالیت‌ها با تجمع در فاز G1 سلول‌های سرطان خون موشی باعث مرگ آنها گردید (۷). به همین دلیل از ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای متعدد استخراج شده از این گیاه که دارای فعالیت ضد سلولی (سایتوتوکسیک) و ضد تومور هستند استفاده می‌شود. از دیگر اثرات آرتیمیزینین و مشتقات آن، فعالیت آنها بر علیه سلول‌های سرطانی سینه است که دارای اثر کشندگی انتخابی است (۸). تحقیقات جدید در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که آرتیمیزینین به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی است. در حالی که بر سلول‌های طبیعی اثر سویی ندارد (۹).

هری لای و همکاران (۲۰۰۶) پتانسیل آرتیمیزینین را در جلوگیری از رشد سرطان سینه در موش مطالعه کردند که با یک دوز خوراکی (۵۰ mg/kg) از ۷ و ۱۲ دی متیل بنزن آنترازن که به عنوان القا کننده سرطان سینه است، استفاده شد. در این بررسی یک گروه از موش‌ها که با آرتیمیزینین ۰/۰۲ درصد خوراک داده شده با گروه شاهد که با پودر ساده تغذیه شده بودند مقایسه و نشان داده شد که آرتیمیزینین باعث کاهش سرطان در مقایسه با شرایط کنترل شد (۱۰).

منابع محدود تهیه و روش‌های پیچیده استخراج آرتیمیزین و مقرون به صرفه نبودن این روش‌ها سبب شده تا در پی یافتن راههایی برای کاهش هزینه و اثر بخشی بهتر این دارو باشیم مطالعه حاضر با هدف نیوزومه کردن

آرتمیزینین، بهینه سازی فرمولاسیون و بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی آن است.

مواد و روش‌ها

آرتمیزینین، span20، span60، کلسترول و محلول MTT(0.5 mg/ml) مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیگما آلدیج، ایزوپروپانول و اتانول از شرکت مرک و محیط کشت RPMI 1640 از شرکت Invitrogen خریداری و رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

روش‌ها:

رسم منحنی استاندارد آرتمیزینین:

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی (0.312-0.5 mg/ml) از آرتمیزینین استاندارد تهیه گردید و جذب آنها در طول موج ۱۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به غلظت‌های مورد استفاده و جذب متناظر آنها، منحنی استاندارد به کمک نرم افزار اکسل رسم و معادله آن جهت تعیین غلظت‌های مجهول مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فرمولاسیون نیوزومی آرتمیزینین:

برای تهیه نیوزوم‌های آرتمیزینین از دو روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اتر استفاده شد و از سورفکتانت و کلسترول و دارو در غلظت‌های مختلف استفاده گردید.

تهیه فرمولاسیون نیوزومی به روش تبخیر فاز معکوس:

فرمولاسیون‌های متفاوت نیوزومی با استفاده از این روش که اولین بار توسط Azmine در ساب ۱۹۸۵ توضیح داده شده است تهیه شدند. نسبت‌های مختلفی از سورفکتانت‌های Span20، span60، کلسترول و دارو در اتانول حل و سپس فاز حلال توسط دستگاه روتاری تحت شرایط خلاء و در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد با چرخش ۹۰ دور در دقیقه، جدا گردید. ژلوز باقیمانده به کمک بافر فسفات و درحالی‌که بر روی همزن مغناطیسی (۳۷ درجه سانتیگراد، ۳۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، هیدراته گردید. جهت همگن‌سازی اندازه ذرات، سوسپانسیون نیوزومی سونیکه (با توان ۳۵ وات به مدت ۵ دقیقه) گردید و سپس جهت انجام آزمایشات در یخچال قرار گرفت (۱۱).

تهیه فرمولاسیون نیوزومی به روش تزریق اتر:

فرمولاسیون‌های متفاوت نیوزومی با استفاده از این روش که اولین بار توسط Bigham و Deanmer در سال ۱۹۷۶ ارائه شد، تهیه گردید. مانند روش قبل غلظت‌های متفاوتی از سورفکتانت، کلسترول و دارو تهیه شده و در مقدار مناسبی دی اتیل اتر حل شد سپس قطره قطره به داخل محلول بافر فسفات سالین (10mM pH 7.4) که بر روی همزن مغناطیسی (۵۰-۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، تزریق گردید (۱۱، ۱۲ و ۱۳).

تعیین اندازه وزیکول‌های نیوزومی:

بررسی قطر و پتانسیل زتای نیوزوم‌های آرتمیزینین با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Zen 3600, Malvern Instrument Ltd, Malvern Worcestershire, UK) تعیین گردید.

درصد کپسوله شدن:

سنجش میزان انکپسوله شدن بطور غیرمستقیم و با استفاده از سانتیفریوژ (۱۷۰۰۰g، ۶۰ دقیقه، ۴ درجه سانتیگراد) انجام شد به این ترتیب که مقدار مشخصی از فرمولاسیون نیوزومی دارو سانتیفریوژ گردید و رسوب بدست آمده نیز دوبار با فسفات بافر سالین شسته شد و مقدار داروی آزاد در مایع فوقانی اندازه‌گیری و سپس با استفاده از معادله زیر بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید.

معادله ۱:

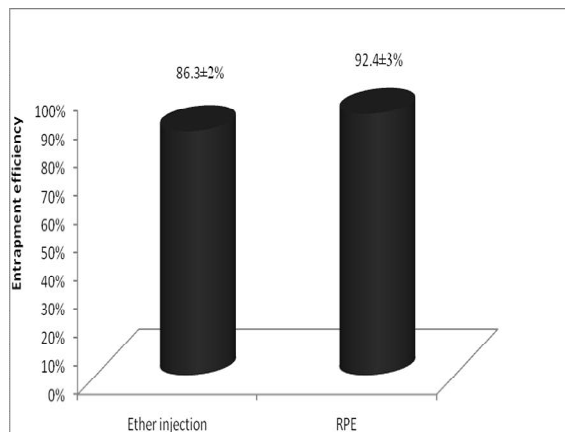
$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی محبوس شده}}{\text{مقدار کل دارو}} = \text{بازده انکپسولاسیون}$$

مطالعه رها سازی دارو به صورت برون تنی:

مطالعه رهایش دارو از وزیکول‌های نیوزومی با استفاده از روش انتشار دینامیکی از غشا دیالیز انجام شد. به این ترتیب که مقدار معینی از فرمولاسیون نیوزومی دارو در داخل کیسه دیالیزی ریخته و سپس این کیسه دیالیز را داخل ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات سالین (10mM pH 7.4) قرار داده و سپس بر روی یک همزن مغناطیسی (۳۷ درجه به مدت ۳۲h با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه) قرار می‌دهیم. در فواصل زمانی مختلف مقدار دو میلی لیتر از بافر اطراف کیسه را برداشته شده و توسط همان مقدار بافر تازه جایگزین می‌کنیم و سپس جذب نوری آرتمیزینین را در نمونه‌ها بدست آمده در طول موج ۱۹۵ نانومتر اندازه‌گیری

درصد انکپسولاسیون:

درصد انکپسولاسیون با توجه به منحنی استاندارد و به کمک معادله ۱، محاسبه گردید. درصد داروی انکپسوله شده برای داروی نیوزومه شده به روش تزریق اتر $86.3 \pm 2\%$ و برای داروی نیوزومه شده به روش تبخیر فاز معکوس $92.4 \pm 3\%$ درصد بدست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد کپسوله شدن برای نمونه‌های آرتیمیزینین نیوزومه تهیه شده به روش تزریق اتر برای شکل سمت چپ و روش تبخیر فاز معکوس برای شکل سمت راست

بررسی رهایش دارو:

مقدار آرتیمیزینین آزاد شده از فرمولاسیون دارویی تهیه شده در بافر فسفات طی بازه‌های زمانی ۱، ۲، ۳، ۲۴ و ۳۲ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمد. مقدار داروی آزاد شده در بافر فسفات برای فرمولاسیون آرتیمیزینین نانونیوزومه به دو روش تزریق اتر (رنگ آبی) و تبخیر فاز معکوس (رنگ قرمز) در منحنی ۲ نشان داده شده است.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیته دارو:

میزان سایتوتوکسیسیته فرمولاسیون آرتیمیزین نیوزومه شده و آرتیمیزینین استاندارد در غلظت‌های مختلف به کمک روش MTT بررسی شد که نتایج در نمودار ۲ آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

همان‌گونه که می‌دانید روش معمولی درمان دارویی سرطان، بدین صورت است که ماده موثر را وارد بدن می‌کنند و این ماده علاوه بر سلول‌های سرطانی به دیگر سلول‌ها و بافت‌های بدن نیز تاثیر می‌کند. این امر، باعث مصرف بسیار بالای دارو شده و مهم‌تر اینکه موجب آسیب

کرده و به کمک منحنی استاندارد میزان رهایش دارو در زمان‌های مختلف تعیین می‌گردد.

بررسی سمیت سلولی دارو:

صد میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰۰ سلول MCF-7 را در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط $5\% \text{ CO}_2$ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها را برداشته و غلظت‌های مختلف از فرمولاسیون نانونیوزومه دارو، کنترل آن و داروی استاندارد را بر روی سلول‌ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه شد، سپس محلول رویی را برداشته و محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه می‌کنیم و پس از ۳ ساعت انکوباسیون، رنگ ارغوانی (مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول‌های زنده در صد میکرولیتر ایزوپروپانول حل شده و جذب آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود (اسپکتروفوتومتر مدل Power Eave XS) و میزان IC_{50} با استفاده از برنامه pharm محاسبه شد.

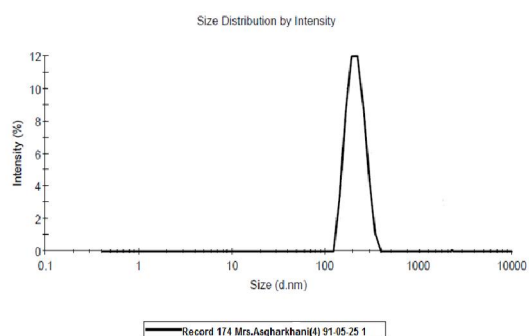
آنالیز آماری

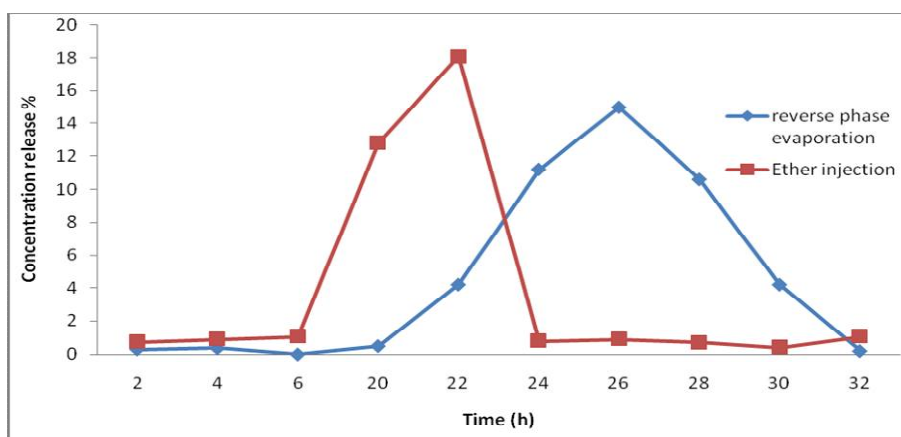
نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD , $n=3$) بیان شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز گردید. در $p < 0.05$ اختلاف معنی دار اعلام شد.

نتایج

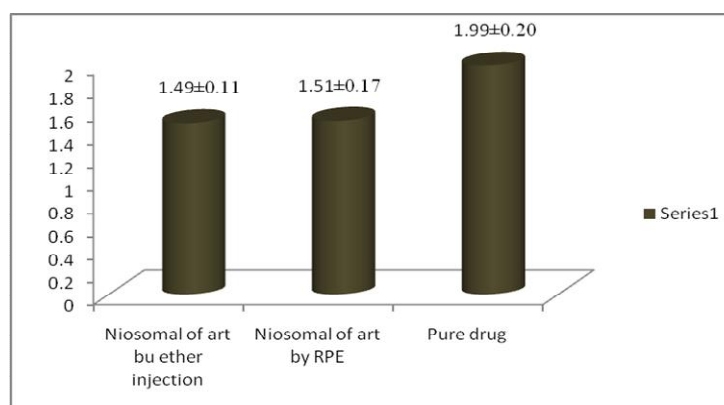
تعیین اندازه نانو ذره:

میانگین قطر نانونیوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر برای نمونه آرتیمیزین نانو نیوزومه به روش تزریق اتر 220 ± 3 نانومتر و روش تبخیر فاز معکوس 267 ± 5 نانومتر بدست آمد.





منحنی ۲: منحنی رهائش آرتیمیزین در بافر PBS با استفاده از کیسه دیالیز. منحنی آبی مربوط به روش تبخیر فاز معکوس و منحنی قرمز مربوط به روش تزریق اتر است.



نمودار ۲: مقادیر IC50 (برحسب میکروگرم در میلی لیتر) برای فرمولاسیون آرتیمیزین نیوزومه شده به دو روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اتر و داروی استاندارد فاقد نیوزوم

انکپسولاسیون فرمولاسیون نیوزومی به روش تبخیر فاز معکوس نسبت به روش تزریق اتر اشاره کرد (نمودار ۱). همچنین در بررسی الگوی آزاد شدن دارو از نیوزومها این پدیده محسوس خواهد بود. در بررسی اثر سایتوتوکسیسیته فرمولاسیونهای تهیه شده مشاهده شد که نیوزومهای فاقد دارو (کنترل) به تنهایی اثری بر رده سلولی MCF-7 نداشتند و تاثیر فرمولاسیون نیوزومه شده بسیار بیشتر از داروی خالص نیوزومه نشده است (IC50 آن کمتر بود). در واقع اثر سایتوتوکسیسیته آنها تفاوت کاملاً معنی داری با یکدیگر نشان می دهد. تمام این نتایج متاثر از نقش حامل های دارو رسانی (نیوزوم) در انتقال بهتر دارو و بهبود عملکرد آن است. همان طور که انتظار می رفت فرمولاسیون نیوزومی آرتیمیزین باعث افزایش شاخص درمانی و کاهش دوز مصرفی آن می شود. با کاهش دوز مصرفی دارو، هزینه درمانی کاهش می یابد و

رساندن به بافت های مجاور بدن نیز می شود. از آنجایی که آرتیمیزین یک ماده طبیعی گیاهی است عوارض کمتری نسبت به مواد شیمیایی دارد اما محدودیت هایی از جمله پاکسازی سریع توسط ماکروفاژها یا آنزیم های لیپاز و متابولیزاسیون سریع توسط کبد و ... که مدت زمان گردش خونی را کاهش می دهد. در روش های جدید نانو تکنولوژی مانند دارو رسانی از الگوی پیروی می شود که سبب تغییر مشخصات دارو می گردد. مشخصاتی مثل جذب دارو، زمان رهایی دارو، میزان لازم آن، زمان دفع آن، ایمنی آن و در نهایت سبب افزایش اثر درمانی و ایمنی شده و بیماران نیز در استفاده از این دسته از داروها راحت تر و سالم تر هستند.

از مقایسه دو روش با توجه به قطر نیوزومها معلوم شد که روش تبخیر فاز معکوس منجر به ایجاد وزیکول های چند لایه و روش تزریق اتر وزیکول های تک لایه را تشکیل می دهد. در تایید این مطلب می توان به بالاتر بودن بازده

عوارض جانبی از جمله اثر سمیتی آن کاهش یافته است (نمودار ۲).

در مطالعه رهایش دارو مشاهده می‌شود که الگوی آزاد شدن دارو از فرمولاسیون نیوزومه کندتر صورت گرفته و این نتیجه حاکی از پایداری بالای فرمولاسیون نیوزومه نسبت به داروی خالص است. از میان دو روش تهیه نیوزومها رهایش دارو از نیوزومهای تهیه شده به طریق

تبخیر فاز معکوس آهسته‌تر از روش تزریق اتر است که این به دلیل تشکیل وزیکول‌های تک لایه به دلیل تبخیر سریع‌تر حلال در روش تزریق اتر نسبت به روش تبخیر فاز معکوس که وزیکول‌های چند لایه ایجاد شده است. دارو مسافت بیشتری را طی می‌کند و به آهستگی رهایش پیدا کرده مدت زمان گردش خونی آن افزایش می‌یابد.

References

1. Zawang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine* 2012; 63:185-98.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. *The Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
3. Paolino D, Muzzalupo R, Ricciardi A, Celia C, Picci N, Fresta M. *Biomed. Microdevices* 2007; 9: 421-33.
4. Singh NP, Lai H. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* 2004; 24: 2277-80.
5. Cabello CM, Lamore SD, Bair WB 3rd, Qiao S, Azimiran S, Lesson JL, Wondrak GT (2011). The redox antimalarial dihydroartemisinin targets human metastatic melanoma cells but not primary melanocytes with induction of NOXA-dependent apoptosis. *Invest. New Drugs*. doi:10.1007/s10637-011-9676-7. PMID 21547369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547369>
6. Gong Y, Gallis BM, Goodlett DR, Yang Y, Lu H, Lacoste E, Lai H, Sasaki T. Effects of transferrin conjugates of artemisinin and artemisinin dimer on breast cancer cell lines, *Pub med* 2013.
7. Brunner CS. Product Genesis Report, Challenges and Opportunities in Emerging Drug Delivery Technologies. United States, product genesis journal 2004; 1-5.
8. Peng CA, Ferreira JFS, Wood AJ. Direct analysis of Artemisinin from *Artemisia annua* L. using highperformance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector. *J Chromatogr A* 2006;1133: 254-8.
9. Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds 2005.
10. Navaratnam V, Mansor SM, Sit NW, Grace J, Li Q, Oliario P. Pharmacokinetics of artemisinin type compounds. *Clin Pharmacokinet* 2000; 39: 255-70.
11. Vyas SP, Khar RK. Targeted and Control Drug Delivery. CBS Publishers and Distributors, New Delhi 2002; 1(6): 249-76.
12. Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson AJ. *Pharm. Pharmacol* 1985; 37: 863-8.
13. Rogerson A, Cummings J, Willmott N, Florence ATJ. *Pharm. Pharmacol* 1988; 40: 337-42.