

ارزیابی سمیت سلولی نانومیسل‌های هدفمند گالاکتوزیله‌ی پلورونیک F127/L122 بارشده با دوکسوروبیسین بر سلول‌های HepG2

دکتر ژاله ورشوساز^۱، دکتر فرشید حسن‌زاده^۲، دکتر حجت صادقی علی‌آبادی^۳، ندا کلانتری^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از جمله مهم‌ترین گیرنده‌هایی که در بیماری هپاتوسلولار کارسینوما بیان بالایی پیدا می‌کنند، می‌توان به گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین اشاره کرد. با آراستن سیستم‌های حامل دارویی به لیگاندهای اختصاصی این گیرنده می‌توان اتصال آن‌ها را با سلول و در نتیجه جذب آن‌ها را به سلول‌های هپاتوما افزایش داد. این کار سبب کاهش عواض دارو در اندام‌های غیر هدف و افزایش اثربخشی دارو می‌شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی سمیت میسل‌های مخلوط هدفمند گالاکتوزیله‌ی پلورونیک F127 و پلورونیک L122 بارشده با دوکسوروبیسین بر رده‌ی سلولی HepG2 بود.

روش‌ها: ابتدا مشتق گالاکتوزیله‌ی پلورونیک F127 سنتز شد. نانومیسل‌های حاوی دوکسوروبیسین به روش انحلال مستقیم تهیه گردید. نانومیسل‌های هدفمند گالاکتوزیله‌ی بهینه سازی‌شده بر اساس اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیتی و کارایی بارگیری و رهش دوکسوروبیسین از نانومیسل‌ها جهت مطالعه‌ی سمیت بر روی رده‌ی سلولی HepG2 با روش MTT به کار برده شد.

یافته‌ها: نانومیسل‌های بهینه دارای اندازه‌ی ذره‌ای $197/9 \pm 0/2$ نانومتر، پتانسیل زتای $18/6$ میلی‌ولت، اندکس پلی‌دیسپرسیتی $0/058 \pm 0/308$ ، کارایی بارگیری $0/3 \pm 78/3$ درصد و رهش ۳ ساعته‌ی داروی $0/5 \pm 32/5$ درصد بودند. این نانومیسل‌های بارشده با دوکسوروبیسین در غلظت‌های $0/2$ ، $0/8$ ، 3 و 6 میکرومول به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) دارای سمیت سلولی بیشتری در مقایسه با نانومیسل‌های غیر هدفمند و داروی آزاد بودند.

نتیجه‌گیری: نانومیسل‌های مخلوط هدفمند گالاکتوزیله‌ی پلورونیک F127 و L122 حاوی دوکسوروبیسین اثربخشی بیشتر و اختصاصی‌تری علیه سلول‌های سرطانی HepG2 نسبت به نانومیسل‌های غیر هدفمند و داروی آزاد از خود نشان می‌دهند.

واژگان کلیدی: نانومیسل‌های هدفمند مخلوط، دوکسوروبیسین، هپاتوسلولار کارسینوما، HepG2، MTT assay

ارجاع: ورشوساز ژاله، حسن‌زاده فرشید، صادقی علی‌آبادی حجت، کلانتری ندا. ارزیابی سمیت سلولی نانومیسل‌های هدفمند گالاکتوزیله‌ی پلورونیک F127/L122 بارشده با دوکسوروبیسین بر سلول‌های HepG2. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۲۱): ۲۴۸۲-۲۴۹۲

حال توسعه در حال افزایش است (۱). در بیشتر نمونه‌ها این بیماری به دلیل سیروز کبدی ایجاد می‌شود (۲). متأسفانه اغلب بیماران زمانی متوجه

مقدمه

کارسینوم هپاتوسلولار یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در سطح جهان می‌باشد و شیوع آن در کشورهای در

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۸۹۳۷۶۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ژاله ورشوساز

بیماری خود می‌شوند که بیماری به مرحله‌ی آن سوی درمان شفا بخش یعنی جراحی یا ریشه‌کنی می‌رسد و تنها راه، درمان علامتی و تسکینی است.

بر خلاف مطالعات بر روی بیشتر بدخیمی‌های دیگر، اثر شیمی‌درمانی سیستمیک هرگز در کارسینوم هپاتوسلولار اثبات نشده است. با وجود این که تأثیرگذاری اثبات شده برای دوکسوروبیسین دیده نشده است، اما بعضی از پزشکان آن را به عنوان درمان ممکن برای کارسینوم پیشرفته‌ی هپاتوسلولار پذیرفته‌اند (۳). دوکسوروبیسین و دیگر آنتراسیکلین‌ها باعث تضعیف مغز استخوان می‌شوند که البته این عامل ممکن است سبب محدود شدن دوز قابل مصرف دارو شود.

یکی از عوارض این دارو کاردیوتوکسیسیته است و با این که دوکسوروبیسین در درمان بسیاری از سرطان‌ها مؤثر می‌باشد، استفاده از آن به دلیل بروز این عارضه که منجر به افزایش کاردیومیوپاتی می‌شود، محدود شده است (۴).

دارورسانی هدفمند به سلول‌های خاص یک استراتژی موفق برای افزایش اثرات درمانی و به حداقل رساندن عوارض داروها می‌باشد. دارورسانی هدفمند را می‌توان از طریق فرایندهای تشخیصی خاص شامل شناسایی لیگاند-گیرنده و آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، مانند انتقال از طریق حامل، انجام داد. این شناسایی بر اساس تفاوت‌های بیان مولکولی مابین سلول‌های بیمار و سلول‌های سالم قرینه‌ی آن‌ها می‌باشد (۵).

از جمله مهم‌ترین گیرنده‌هایی که در این بیماری بیان بالایی پیدا می‌کنند، می‌توان به گیرنده‌های ترانسفرین، فولات، رتینویک اسید، آنتی‌بادی‌های

ضد آنتی‌ژن‌های سطحی این سلول‌ها و گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین اشاره کرد (۸-۶، ۲). به خصوص گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین در چندین رده از سلول‌های هپاتومای انسانی بیان زیادی دارند و می‌توان با آراستن سیستم‌های حامل دارویی نانوذره‌ای به آن‌ها، اتصال آن‌ها را با سلول و در نتیجه جذب آن‌ها را به سلول‌های هپاتوم افزایش داد. این گیرنده‌ها با تراکم بسیار زیاد و به مقدار ۵۰۰۰۰۰ عدد روی هر سلول وجود دارند (۹-۱۲) و نه تنها می‌توانند به لیگاندهای حاوی گالاکتوز وصل شوند بلکه عمل ایترنالیزه کردن سیستم را به درون اندوزوم‌ها نیز انجام می‌دهند (۱۳). پس از ایترنالیزه شدن کمپلکس گیرنده-لیگاند، گیرنده بار دیگر به سطح سلول باز می‌گردد (۱۴).

برای هدف‌دار نمودن این سیستم دارورسانی برای کبد، یکی از روش‌ها گالاکتوزیله کردن است. Lu و همکاران پلورونیک F68 را در چند مرحله گالاکتوزیله نمودند (۱۵). این روش به دلیل حضور گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین بر سطح سلول‌های کبدی و اتصال آن‌ها به پلورونیک گالاکتوزیله مؤثر واقع می‌شود. Zhang و همکاران نیز پلی‌فسفورامیدات را سنتز کردند و به عنوان یک حامل هدف‌دار شده برای انتقال ژن به کبد مورد ارزیابی قرار دادند (۱۶).

در مطالعات اخیر، سیستم‌های دارورسانی نانوذرات حاوی عوامل ضد سرطان به دلیل رفتار تجمعی منحصر به فرد خود در محل تومور، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند و افزایش اثر Electron paramagnetic resonance (EPR) به عنوان مکانیسم شاخص برای پروفایل توزیع زیستی

روش‌ها

تهیه‌ی نانومیسل‌های مخلوط هدفمند حاوی

دوکسوروبیسین: جهت تهیه‌ی نانومیسل‌ها به روش

انحلال مستقیم، ابتدا پلورونیک F127 گالاکتوزیله تهیه شد. به این صورت که جهت اتصال عامل هدفمندکننده‌ی لاکتوبیونیک اسید به پلورونیک F127، ابتدا لازم بود تا پلورونیک فعال‌شده با کربونیل دی‌ایمیدازول (F127-CDI) تهیه شود. برای این کار، ۱۵ گرم معادل ۱/۲ میلی‌مول F127 در ۳۶ سی‌سی THF (Tetrahydrofuran) خشک حل شد و قطره قطره در طول ۵ ساعت توسط قیف چکاننده تحت نیتروژن و در دمای اتاق، به ۱/۹۴۰ گرم معادل ۱۲ میلی‌مول کربونیل دی‌ایمیدازول حل شده در ۳۶ سی‌سی THF خشک، افزوده گردید.

بعد از به اتمام رسیدن قطرات، مخلوط به مدت دو ساعت دیگر روی Stirrer نگاه داشته شد. سپس، محلول تحت خلأ به حجم کمی تغلیظ شد و پس از آن، اتیل اتر به عنوان ضد حلال به میزان اضافه به آن افزوده گردید تا رسوب سفید رنگی حاصل گردید. این رسوب توسط فیلتراسیون تحت خلأ جمع‌آوری گردید و ۱۱/۴ گرم (۷۶ درصد) پودر سفید رنگ بعد از خشک شدن به دست آمد.

سپس، برای تهیه‌ی پلورونیک F127 که دارای پایانه‌ی آمینه است و مرحله‌ی بعدی برای اتصال عامل هدفمندکننده‌ی لاکتوبیونیک اسید به پلورونیک F127 می‌باشد، محصول واکنش قبل در ۳۶ سی‌سی THF حل شد و توسط قیف چکاننده تحت نیتروژن و در دمای اتاق در طول ۳ ساعت به ۱۷ سی‌سی اتیلن دی‌آمین افزوده شد. سپس اجازه داده شد تا مخلوط در آن شرایط در طول شب واکنش دهد.

منحصر به فرد آن‌ها تلقی می‌شود (۱۷).

سیستم‌های دارورسانی بر اساس لیپوزوم‌ها، ذرات نانو و میسل‌های پلیمری وجود دارد که میسل‌های پلیمری به خاطر ساختار منحصر به فرد و ویژگی‌هایشان بیشتر مورد توجه بوده و در مطالعات کلینیکی داروهای ضد سرطان به کار رفته است (۱۸). میسل‌های پلیمری ساختمان پوسته هسته‌ای دارند که امکان اختلاط داروهای نامحلول در آب را فراهم آورده، از غیر فعال شدن دارو در محیط بیولوژیک ممانعت به عمل می‌آورد. به واسطه‌ی اندازه‌ی ذره‌ای کوچک آن‌ها (که زیر ۱۰۰ نانومتر است)، این سیستم‌ها مزایای فراوانی از خود نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به توانایی هدفمند نمودن داروها، زمان گردش طولانی و سهولت تولید آن‌ها اشاره نمود (۱۹). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که استفاده از یک نوع پلورونیک در تهیه‌ی میسل‌ها می‌تواند به طور مؤثر زمان گردش خونی و توزیع بافتی دارو را افزایش دهد، اما پایداری و میزان بارگیری دارو در آن‌ها پایین است (۲۰).

دیده شده است که مخلوط دو نوع پلورونیک، هم میزان داروی بارگیری شده را افزایش می‌دهد و هم سمیت سلولی را در سلول‌های سرطانی نوع MCF7 نسبت به زمانی که از یک نوع پلورونیک استفاده شده است، می‌افزاید (۲۱).

مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی میسل‌های هدفمند گالاکتوزیله‌ی تهیه‌شده از پلورونیک L122/F127 بارشده با دوکسوروبیسین در رده‌ی سلولی HepG2 در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد جهت ارایه یک روش دارورسانی هدفمند به انجام رسید.

ارزیابی نانوذرات: پس از تهیه‌ی نانومیسسل‌ها، اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیته توسط دستگاه نانو-زتا سایزر مالورن اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان دوکسوروبیسین بارگیری‌شده، از میسل‌های تهیه‌شده مقدار ۴۰۰ میکرولیتر به وسیله‌ی یک سمپلر یک میلی‌لیتری برداشته شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع شفاف حاصل جداسازی، به نسبت ۱ به ۱۰ با آب دیونیزه رقیق‌سازی شد (در سه نمونه) و جذب آن در طول موج ۲۴۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش اندازه‌گیری شد.

یک نمونه حاوی میسل ولی بدون دارو به عنوان بلانک تهیه شد و مراحل بالا در شرایط یکسان برای آن تکرار شد و جذب آن در همین طول موج اندازه‌گیری شد. مقدار جذب به دست‌آمده از جذب نمونه‌ی حاوی داروی مربوط کم شد. این کار به منظور حذف جذب احتمالی هر یک از اجزای دیگر فرمولاسیون بود. با استفاده از معادله‌ی جذب - غلظت در محیط آب مقطر میزان داروی آزاد و از روی آن داروی بارگیری‌شده محاسبه شد. کارایی بارگیری دارو در نانوذرات و درصد بارگیری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Y = 0.0402x - 0.0088 \quad \text{معادله ی جذب - غلظت در محیط آب مقطر}$$

اندازه‌گیری سرعت رهش دارو از نانوذرات:

قطعات غشای دیالیز با منفذ (Cut off) ۱۲۰۰۰ دالتون (آمریکا، Viskase, Membra-Cel) به اندازه‌ی ۱۰ سانتی‌متر به مدت ۲۴ ساعت در آب دیونیزه قرار داده شد تا بر اثر جذب آب بافت، غشای دیالیز از هم باز

بعد از واکنش، اتیلن دی‌آمین واکنش نداده با تقطیر در خلأ خارج شد و به باقی‌مانده‌ی اتیل اتر اضافه افزوده گردید تا رسوب سفید رنگی حاصل شود؛ این رسوب با فیلتراسیون تحت خلأ جمع‌آوری و در THF حل گردید و دوباره دی‌اتیل اتر برای رسوب‌گیری افزوده شد. این کار ۲ بار تکرار شد تا کوپلیمر آمینه‌شده حاصل شود. در این مرحله ۱۰/۱۴ گرم رسوب سفید به عنوان محصول آمینه‌شده حاصل شد. سپس، در مرحله‌ی پایانی تهیه‌ی پلورونیک F127 گالاکتوزیله ۱۰/۱۴ گرم محصول مرحله‌ی قبل به همراه ۷/۳۷ گرم لاکتوبیونیک اسید و ۶/۱۴ گرم سدیم سیانوبورهیدرات در یک بالن محتوی ۷۰ سی‌سی بافر سدیم بورات ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 9.4$ افزوده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت نیتروژن قرار گرفت.

برای خارج کردن لاکتوبیونیک اسید واکنش نداده، از غشای دیالیز با Cut off ۸۰۰۰ دالتون استفاده شد و محلول حاصل از واکنش، به مدت ۷۲ ساعت تحت دیالیز قرار گرفت. محصول بعد از دیالیز فریز درای گردید. سپس مقدار ۸ میلی‌گرم دوکسوروبیسین به همراه مقایر مشخص با نسبت‌های ۲۰ درصد از پلورونیک L122 و ۸۰ درصد F127 گالاکتوزیله (در ۱۰۰ میلی‌گرم از مخلوط دو پلیمر) در ۱۵ سی‌سی آب دیونیزه حل گردید و با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد روی Stirrer قرار گرفت و بعد از ۶۰ دقیقه به هم خوردن به مدت ۲ دقیقه نیز توسط پروب سونیکیتور (Sonicator probe) سونیکه گردید (Sonicate) تا میسل‌ها تشکیل شوند (۲۲). جهت تهیه‌ی بلانک تمامی مراحل پیش‌گفته منهای افزودن دارو تکرار شد.

شاهد منفی که حاوی ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی بود، ۲۰ میکرولیتر از محلول دوکسوروبیسین آزاد، ۲۰ میکرولیتر از محلول نانومیسل‌های پلورونیک F127 گالاتوزیله و پلورونیک L122 بار شده با دوکسوروبیسین (DoxF127-Gal/L122)، ۲۰ میکرولیتر از محلول نانومیسل غیر گالاتوزیله F127 و پلورونیک L122 بار شده با دوکسوروبیسین (DoxF127/L122)، ۲۰ میکرولیتر از محلول نانومیسل تنها (DoxF127) و ۲۰ میکرولیتر از محلول نانومیسل دوکسوروبیسین بار شده در پلورونیک F127 تنها (DoxL122) با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۸، ۰/۳ و ۰/۶ میکرومولار و هر غلظت در ۴ چاهک کنار هم افزوده شد.

در پلیت دیگری نیز برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته، انواع میسل‌های فوق اما بدون دارو به عنوان بلانک به همان منوال افزوده گردید. بلانک حالات پیش گفته به ترتیب با نشانه‌های F127، F127/L122، F127-gal/L122 و L122 در مطالعه نام برده شد.

سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفت؛ بعد از اتمام این مدت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۳ ساعت دیگر انکوباسیون، محلول درون چاهک‌ها به طور کامل دور ریخته و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد و بعد از پیتاژ کردن، جذب چاهک‌ها به کمک دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. کلیه‌ی مراحل فوق ۳ بار تکرار گردید.

شود و امکان وارد کردن محلول در آن فراهم گردد (۲۳). مقدار ۳ میلی‌لیتر از فرمولاسیون میسلی تهیه‌شده‌ی داخل غشا ریخته و دو سر غشا بسته شد و در ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH = ۷/۴) حاوی ۲ درصد توین ۲۰ قرار گرفت، تا سرعت رهش داروی بارگیری‌شده در میسل‌ها بررسی گردد.

نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی Stirrer با دور ۴۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و در فواصل زمانی مشخص از محیط بافر فسفات نمونه‌گیری شد و جذب آن در طول موج ۴۹۹/۴ نانومتر تعیین شد و نمودار رهش در برابر زمان نانومیسل‌ها رسم شد.

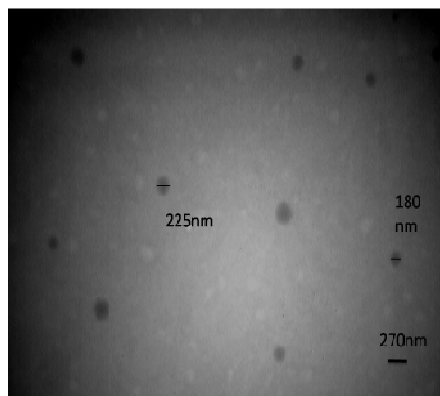
تهیه‌ی عکس میکروسکوپی TEM

(Transmission electron microscopy): مقدار مناسب از نانودیسپرش بر روی یک گرید مسی با مش ۳۰۰ و روکش کربنی قرار داده و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. سپس تصاویر با ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی ۸۰ کیلوولت و با بزرگ‌نمایی‌های مختلف تهیه شدند.

بررسی سمیت سلولی به روش MTT (با

استفاده از ۳-(۴،۵-دی‌متیل تiazول-۲-yl)-۵،۲-دی‌فنیل تترازولیم بروماید): ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^4 سلول در میلی‌لیتر به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه (به جز یک ردیف جهت نمونه‌ی بلانک که تنها حاوی ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت بود) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، 5 CO_2 درصد و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد تا سلول‌ها در فاز رشد قرار بگیرند. بعد از ۲۴ ساعت، به غیر از ردیف بلانک که فقط محیط کشت خالی بود و ردیف

تصویر میکروسکوپ TEM تهیه شده از نانوذرات بهینه در شکل ۲ آمده است. این شکل گویای شکل کروی میسل‌های حاصل می‌باشد. اندازه‌ی ذره‌ای در محدوده‌ی نتایج دستگاه اندازه‌گیری سایز ذرات بود.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ TEM

(Transmission electron microscopy) تهیه شده از

نانومیسل‌های مخلوط پلورونیک F127 گالاکتوزیله/پلورونیک L122

در شکل ۳، درصد سلول‌های HepG2 زنده باقی‌مانده در گروه‌های مختلف نانومیسل‌های گالاکتوزیله و غیر هدفمند مخلوط دو پلورونیک بارشده با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین، هر کوپلیمر به تنهایی، که با دارو بار شده است، و نیز بلانک هر یک از این میسل‌ها دیده می‌شود.

این شکل نشانگر آن است که درصد سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین آزاد بیشتر از درصد سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین بارشده در نانومیسل‌های ساخته شده از مخلوط پلورونیک‌های L122 و F127 گالاکتوزیله است. با توجه به تحلیل آماری این تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

میسل‌های غیر هدفمند نیز به طور معنی‌داری سمیت کمتری نسبت به میسل‌های گالاکتوزیله نشان می‌دهند ($P < 0.05$).

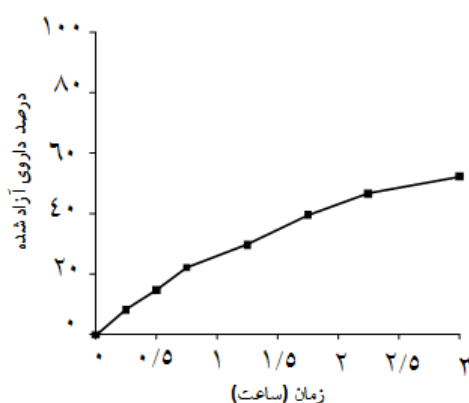
درصد سلول‌های زنده در هر نمونه با معادله‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{Cell survival\%} = \frac{\text{Mean of each group} - \text{mean of blank}}{\text{mean of negative control} - \text{mean of blank}} \times 100$$

یافته‌ها

برای نانومیسل‌های فرمولاسیون بهینه، میانگین اندازه‌ی ذره‌ای برابر با $197/9 \pm 2/1$ نانومتر، پتانسیل زتا مساوی $18/6 \pm 6/4$ میلی‌ولت و اندکس پلی‌دیسپرسیویتی به میزان $0/308 \pm 0/058$ محاسبه شد. همچنین، کارایی بارگیری $78/3 \pm 0/3$ و میزان داروی آزاد شده تا ۳ ساعت $32/5 \pm 0/5$ درصد به دست آمد.

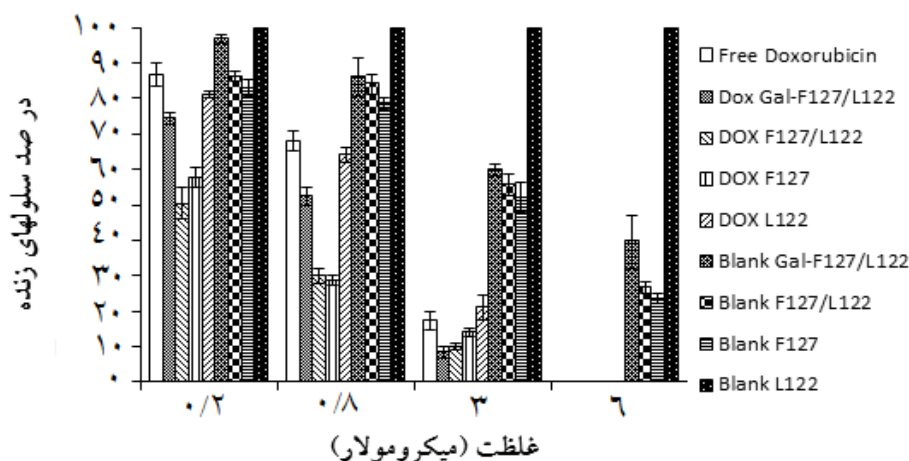
نتایج حاصل از سه مرتبه تکرار بررسی میزان آزادسازی دارو از نانومیسل‌های بهینه محاسبه شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. ملاحظه می‌شود که الگوی آزادسازی دوکسوروبیسین از میسل‌های گالاکتوزیله، کند شده بوده و پس از ۳ ساعت، نزدیک به ۵۰ درصد دارو از نانومیسل‌ها با کینتیک درجه‌ی صفر آزاد شده است.



شکل ۱. میزان آزادسازی دارو از نانومیسل‌های بهینه‌ی پلورونیک

گالاکتوزیله‌ی F127 و پلورونیک L122

نتایج هر نقطه مربوط به میانگین سه بار تکرار است. مقادیر انحراف معیار به دلیل کوچک بودن روی منحنی قابل رؤیت نیست.



شکل ۳. درصد زنده ماندن سلول‌ها در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در رده‌ی سلولی HepG2

انحلال مستقیم برای تهیه‌ی نانومیسل‌های مذکور استفاده گردید. یافته‌ها نشان داد که نانومیسل‌های تهیه‌شده اندازه‌ی مناسب $197/9 \pm 2/1$ نانومتر و اندکس پلی‌دیسپرسیته $0/308 \pm 0/058$ داشتند که به معنی یکنواختی خوبی در توزیع سایز آن‌ها بود.

این میسل‌ها دارای $18/6 \pm 6/4$ میلی‌ولت پتانسیل زتا بودند که مؤید پایداری آن‌ها به واسطه‌ی القای شارژ الکتریکی مناسب سطحی در آن‌ها بود. همچنین ذرات دارای کارایی بارگیری متوسط $78/3 \pm 0/3$ درصد دوکسوروبیسین بودند.

کارایی رهش در ۳ ساعت $32/5 \pm 0/5$ درصد بود. این میزان نشان‌دهنده‌ی رهش مناسب و در مجموع کارآمد دارو از نانومیسل‌های بهینه تهیه شده است. تصویر TEM هم سایز مناسب و شکل یکنواخت ذرات را به خوبی نشان می‌دهد. این یکنواختی به معنی تشکیل مناسب ذرات است.

کاهش MTT به عنوان یک آزمایش تعیین فعالیت کاهندگی میتوکندریایی سلول‌های کشت شده، می‌باشد. MTT ماده‌ای زرد کم‌رنگ است که وقتی با

بحث

دوکسوروبیسین از خانواده‌ی آنتراسایکلین‌ها و با نام تجاری آدریامایسین در انواع سرطان به کار می‌رود. عوارض جانبی متعددی برای این دارو ذکر شده است که از میان آن‌ها می‌توان به کاردیوتوکسیسیته به عنوان مهم‌ترین عارضه اشاره کرد. این عارضه حتی می‌تواند تا حد نارسایی احتقانی قلبی مرحله‌ی چهارم پیشرفت کند و جزء عوامل مهم محدودکننده‌ی درمان است (۱). بنابراین اگر بتوانیم به طریقی دارو را به صورت هدفمند و اختصاصی به سلول‌های مبتلای کبد برسانیم، علاوه بر کاهش این عوارض جانبی می‌توانیم اثر دارو را افزایش دهیم و دوز کلی کمتری از آن را به کار ببریم.

با قرار دادن دارو در حاملی با سایز نانو می‌توانیم برداشت آن را توسط سلول‌ها افزایش دهیم. این حامل را با به کارگیری دو پلورونیک F127 گالاتوزیله (به منظور هدفمند نمودن حامل برای رده‌ی سلولی HepG₂ که دارای گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین می‌باشند) و پلورونیک L122 تهیه کردیم. در این مطالعه از روش

این موضوع را تأیید می‌کند. برابر بودن تقریبی سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در میسل‌های تهیه شده با پلورونیک F127 به تنهایی و دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در میسل‌های تهیه‌شده با پلورونیک‌های F127 و L122 نیز مؤید این موضوع بود. به علاوه میسل‌های غیر هدفمند نیز به طور معنی‌داری سمیت کمتری نسبت به میسل‌های گالاتوزیله نشان دادند.

این روش به دلیل حضور گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین بر سطح سلول‌های کبدی و اتصال آن‌ها به پلورونیک گالاتوزیله مؤثر واقع می‌شود. قیام کاظمی و همکاران برای هدف‌دار کردن سیستم دارویی نسبت به سلول‌های سرطانی کبد و افزایش اثر هدایت به این رده‌ی سلولی، PEI (پلی‌اتیلن ایمین) را با دو لیگاند هدف‌دارکننده‌ی گالاتوز و فولیک اسید کونژوگه نمودند (۲۵). آن‌ها مشاهده کردند که اثر هدایت این کوپلیمر کونژوگه‌شده در رده‌ی سلولی HepG₂ به طور معنی‌داری نسبت به دو رده‌ی سلولی KB و HEK293 افزایش یافته است (۲۵).

در مطالعه‌ی دیگری، Lu و همکاران یک غشای PVDF (پلی‌وینیلیدن دی‌فلوراید) را با پلورونیک گالاتوزیله F68 (با لاکتوبیونیک اسید) به وسیله‌ی اتصال بین PVDF و قطعه‌ی پلی‌پروپیلن اکسید موجود در پلورونیک F68 پوشاندند و مشاهده کردند که این غشا می‌تواند پیش‌ماده‌ی مناسبی برای کشت سلول‌های کبد باشد (۱۵).

همچنین، Zhang و همکاران پلی‌فسفورامیدات را با درجات مختلف جانشینی گالاتوزیله نمودند و به عنوان ناقل ژن هدفمند شده برای هپاتوسیت‌ها مورد

سلول‌های زنده انکوبه می‌شود و در اثر سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ تولید می‌کند. بنابراین میزان تولید فورمازان بیانگر تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. به این معنی که هر چه این رنگ پررنگ‌تر باشد، نشان‌دهنده‌ی تولید فورمازان بیشتر و در نتیجه تعداد سلول زنده‌ی بیشتری است. میزان رنگ تولیدشده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین می‌شود (۲۴).

در این مطالعه، درصد سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین آزاد بیشتر از درصد سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در نانومیسسل‌های ساخته‌شده از مخلوط پلورونیک‌های F127 و L122 گالاتوزیله بود که با توجه به تحلیل آماری این تفاوت معنی‌دار بود. این تفاوت بین دوکسوروبیسین آزاد و دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در میسل‌های ساخته‌شده از پلیمر L122 و پلیمر غیر گالاتوزیله‌ی F127 بیشتر شد؛ یعنی توکسیسیتی دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در پلورونیک F127 غیر گالاتوزیله بیشتر شد که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این باشد که گالاتوزیله کردن F127 می‌تواند از توکسیسیتی ذاتی آن بکاهد.

در نمونه‌های بلانک هم درصد سلول‌های زنده‌ی پلورونیک گالاتوزیله‌ی F127 بیشتر از درصد سلول‌های زنده در پلورونیک F127 غیر گالاتوزیله بود که این تفاوت هم معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان داد که پلورونیک L122 هیچ اثر کشندگی نداشت (۱۰۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند). برابر بودن تقریبی درصد سلول‌های زنده در دوکسوروبیسین آزاد و دوکسوروبیسین بارگیری‌شده در پلورونیک L122

دوکسوروبیسین برای سلول‌های کبدی در بیماری مبتلا به کارسینوم هیاتوسلولار در مقایسه با دوکسوروبیسین آزاد می‌باشند.

این سیستم حامل دارویی با کاهش عوارض سیستمیک، به ویژه سمیت قلبی، و نیز با کاهش دوز به واسطه‌ی هدفمند شدن، نویدبخش درمان مناسب‌تر بیماران می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

ارزیابی فرار دادند (۱۶). آن‌ها مشاهده کردند که بیان ژن در سلول‌های HepG₂ افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ی حاضر نیز این روش به علت حضور گیرنده‌های آسیالوگلیکوپروتئین بر سطح سلول‌های کبدی و اتصال آن‌ها به پلورونیک گالاکتوزیله‌ی F127 مؤثر واقع شد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که نانومیسل‌های مخلوط بارگیری‌شده با دوکسوروبیسین حاصل از پلورونیک گالاکتوزیله‌ی F127 و پلورونیک L122 سیستم حامل دارورسانی مناسبی برای هدفمند شدن

References

1. Barraud L, Merle P, Soma E, Lefrancois L, Guerret S, Chevallier M, et al. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *J Hepatol* 2005; 42(5): 736-43.
2. Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(10 Pt 1): 3679-83.
3. Edeline J, Raoul JL, Vauleon E, Guillygomac'h A, Boudjema K, Boucher E. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: a retrospective study. *World J Gastroenterol* 2009; 15(6): 713-6.
4. Cai S, Thati S, Bagby TR, Diab HM, Davies NM, Cohen MS, et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *J Control Release* 2010; 146(2): 212-8.
5. Weili Q, Bochu W, Peng L, Lichun Y, Pengyu S. Improved nanoparticles preparation and drug release for liver targeted delivery. *Iran J Med Hypotheses Ideas* 2009; 3: 15.
6. Terada T, Iwai M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *J Control Release* 2006; 111(3): 333-42.
7. Managit C, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Uptake characteristics of galactosylated emulsion by HepG2 hepatoma cells. *Int J Pharm* 2005; 301(1-2): 255-61.
8. Managit C, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Effect of galactose density on asialoglycoprotein receptor-mediated uptake of galactosylated liposomes. *J Pharm Sci* 2005; 94(10): 2266-75.
9. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 531-54.
10. Schwartz AL, Rup D, Lodish HF. Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. *J Biol Chem* 1980; 255(19): 9033-6.
11. Fallon RJ, Schwartz AL. Asialoglycoprotein receptor phosphorylation and receptor-mediated endocytosis in hepatoma cells. Effect of phorbol esters. *J Biol Chem* 1988; 263(26): 13159-66.
12. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209(4455): 497-9.
13. Ashwell G, Morell AG. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1974; 41(0): 99-128.
14. Ciechanover A, Schwartz AL, Lodish HF. Sorting and recycling of cell surface receptors

- and endocytosed ligands: the asialoglycoprotein and transferrin receptors. *J Cell Biochem* 1983; 23(1-4): 107-30.
15. Lu HF, Lim WS, Wang J, Tang ZQ, Zhang PC, Leong KW, et al. Galactosylated PVDF membrane promotes hepatocyte attachment and functional maintenance. *Biomaterials* 2003; 24(27): 4893-903.
16. Zhang XQ, Wang XL, Zhang PC, Liu ZL, Zhuo RX, Mao HQ, et al. Galactosylated ternary DNA/polyphosphoramidate nanoparticles mediate high gene transfection efficiency in hepatocytes. *J Control Release* 2005; 102(3): 749-63.
17. Yoo HS, Park TG. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *J Control Release* 2004; 100(2): 247-56.
18. Xiangyang X, Ling L, Jianping Z, Shiyue L, Jie Y, Xiaojin Y, et al. Preparation and characterization of N-succinyl-N'-octyl chitosan micelles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 55(2): 222-8.
19. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release* 2001; 73(2-3): 137-72.
20. Bromberg L, Temchenko M, Hatton TA. Dually responsive microgels from polyether-modified poly (acrylic acid): swelling and drug loading. *Langmuir* 2002; 18(12): 4944-52.
21. Wang Y, Li Y, Wang Q, Wu J, Fang X. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel-loaded pluronic P105/L101 mixed polymeric micelles. *Yakugaku Zasshi* 2008; 128(6): 941-50.
22. Liu J, Lee H, Allen C. Formulation of drugs in block copolymer micelles: drug loading and release. *Curr Pharm Des* 2006; 12(36): 4685-701.
23. Varshosaz J, Soheili M. Production and in vitro characterization of lisinopril-loaded nanoparticles for the treatment of restenosis in stented coronary arteries. *J Microencapsul* 2008; 25(7): 478-86.
24. Zhuang H, Zheng JP, Gao H, De YK. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(5): 951-7.
25. Ghiamkazemi S, Hajiabedin M, Amanzadeh A, Amini T, Dinarvand R, Amini M, et al. Folate - galactose - targeted delivery of fluoresceine isothiocyanate as a drug model prepared by Fol-Peg-G-Pei-Gal conjugate as a novel carrier. *Int J Pharm Res* 2011; 3(2): 20-6.

Cytotoxic Effects of Targeted Galactosylated Pluronic F127/PluronicL122 Nano-Sized Micelles Loaded with Doxorubicin in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line

Jaleh Varshosaz PhD¹, Farshid Hassanzadeh PhD², Hojjat Sadeghi Aliabadi PhD³,
Neda Kalantari⁴

Original Article

Abstract

Background: Asialoglycoprotein receptors are among the most important over-expressed receptors in hepatocellular carcinoma (HepG2). Decorating drug carrier to specific ligands of these receptors can enhance their absorption to cells and elevate their permeability to hepatoma cells. This can reduce the side effects of the drug in nonspecific tissues and enhance drug efficiency. The aim of the present work was to evaluate the cytotoxicity of doxorubicin-loaded mixed micelles of galactosylated Pluronic F127/L122 on HepG2 cells.

Methods: Galactosylated Pluronic F127 was synthesized. Doxorubicin-loaded nano-sized micelles were prepared by direct dissolution method. Based on particle size, zeta potential, polydispersity index, loading efficiency and release efficiency of doxorubicin from nano-sized micelles, optimized micelles were used for cytotoxicity test on HepG2 cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay.

Findings: The optimum targeted nano-sized micelles had particle size of 197.9 ± 2.1 nm, zeta potential of 18.6 mv, polydispersity index of 0.308 ± 0.058 , loading efficiency of $78.3 \pm 0.3\%$, and drug release efficiency of $32.5 \pm 0.5\%$ (until the third hour). Nano-sized micelles loaded with doxorubicin in concentrations of 0.2, 0.8, 3, 6 μM caused significantly higher cytotoxicity compared to non-targeted nano-sized micelles and free doxorubicin.

Conclusion: Mixed targeted nano-sized micelles of galactosylated Pluronic F127 and Pluronic L122 loaded with doxorubicin showed more efficiency and specificity to toxicity against HepG2 cells than non-targeted nanoparticles and free drug.

Keywords: Targeted mixed nano-sized micelles, Doxorubicin, Hepatocellular carcinoma, HepG2, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay

Citation: Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi H, Kalantari N. Cytotoxic Effects of Targeted Galactosylated Pluronic F127/PluronicL122 Nano-Sized Micelles Loaded with Doxorubicin in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. J Isfahan Med Sch 2013; 30(221): 2482-92

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 389379 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Student of Pharmacy, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Jaleh Varshosaz PhD, Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir