مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۷/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۷

ارزیابی بیولوژیک لتروزول بارشده در نانوکپسول‌های لیپیدی بر روی رده‌ی سلولی MCF-7

دکتر حجت صادقی علی‌آبادی[۱]، ابوالفضل کریمی‌منش[۲]، دکتر ژاله ورشوساز[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مهارکننده‌های آروماتاز از جمله لتروزول با جلوگیری از سنتز استروژن در درمان سرطان‌های سینه‌ی وابسته به استروژن کاربرد دارند، ولی تأثیر آن‌ها روی بافت‌های سالم در کنار بافت‌های سرطانی، عوارضی را در مریض ایجاد می‌کند. طراحی یک روش دارورسانی هدفمند می‌تواند کارایی این داروها را اختصاصی کند. یکی از این روش‌ها فرموله کردن لتروزول در نانوکپسول‌های لیپیدی بود.

روش‌ها: نانوکپسول‌های لیپیدی در اندازه‌ای کمتر از ۱۰۰ نانومتر با استفاده از روش تغییر فاز تهیه شد و با تعیین اندزه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیتی توسط دستگاه زتا سایزر مالورن، ارزیابی گردید. در ادامه اثر سایتوتوکسیک نانوکپسول‌های حاوی لتروزول و لتروزول آزاد، توسط روش MTT بر روی سلول‌های MCF-7، که از سرطان پستان و دارای گیرنده‌ی استروژنی هستند، مقایسه شد.

یافته‌ها: از بین همه‌ی فرمولاسیون‌های طراحی‌شده، فرمول S17O20L1.5W3.5 که دارای اندازه‌ی ذره‌ای ۳/۹ ± ۱۰۰، پتانسیل زتای ۰/۴ ± ۳/۶- اندکس پلی‌دیسپرسیتی ۰/۰۸ ± ۰/۲۸۳ و کارایی بارگیری ۱/۵ ± ۹۶/۶ بود، انتخاب گردید. سمیت سلولی نانوکپسول‌های طراحی شده معادل ۸۰ درصد سمیت سلولی لتروزول و وابسته به دوز بود؛ به طوری که غلظت $^{1}/_{5}$ محلول استوک بیش از ۶۰ درصد و غلظت $^{1}/_{10}$ آن کمتر از ۴۰ درصد از سلول‌ها را کشت.

نتیجه‌گیری: نانوکپسول‌های لیپیدی لتروزول اثربخشی مناسبی علیه سلول‌های سرطانی MCF-7 از خود نشان می‌دهد که قابل قیاس با داروی آزاد لتروزول می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانوکپسول لیپیدی، لتروزول، سرطان سینه، MCF-7، MTT assay

ارجاع: صادقی علی‌آبادی حجت، کریمی‌منش ابوالفضل، ورشوساز ژاله. **ارزیابی بیولوژیک لتروزول بارشده در نانوکپسول‌های لیپیدی بر روی رده‌ی سلولی MCF-7.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۷): ۲۱۷۷-۲۱۶۹

مقدمه

در سرتاسر جهان سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان است. گفته می‌شود در حدود ۱۰ میلیون زن در دنیا از سرطان پستان رنج می‌برند و پیش‌بینی می‌شود ۵ میلیون زن دیگر در دو دهه‌ی آینده به این سرطان مبتلا شوند (۱). سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطانی که در زنان یائسه منجر به مرگ می‌شود نیز شناخته شده است (۲).

* **این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.**

۱- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حجت صادقی علی‌آبادی
Email: sadeghi@pharm.mui.ac.ir

بعد از یائسگی اگر چه تولید استروژن و پروژسترون توسط تخمدان‌ها کاهش می‌یابد، ولی تولید استروژن در بافت‌های محیطی افزایش می‌یابد.

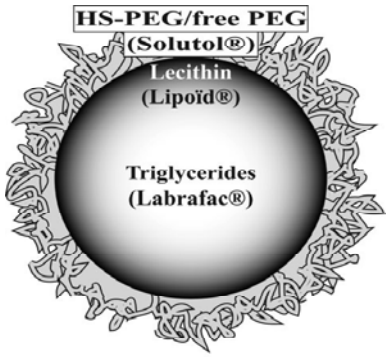
برخی از مطالعات نشان داده‌اند که غلظت استروژن در بافت سالم پستان ۶-۴ برابر سایر بافت‌های بدن است (۳). همچنین بر اساس مطالعات، غلظت استروژن در بافت سرطانی پستان بسیار بالاتر از بافت چربی سالم آن است (۵-۴). بنابراین استروژن تولیدشده توسط بافت سالم و سرطانی پستان، یک عامل بحرانی در تکثیر بافت‌های سرطانی وابسته به استروژن می‌باشد و اگر استروژن از دسترس آن خارج شود، رشد این گونه تومورها متوقف می‌شود (۶). دو روش اصلی برای کاهش میزان استروژن در درمان سرطان پستان وجود دارد: استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی استروژن یا تعدیل‌کننده‌های انتخابی گیرنده‌های استروژنی (Selective estrogen receptor modulators یا SERMs) و استفاده از مهارکننده‌های سنتز استروژن یا مهارکننده‌های آنزیم آروماتاز.

تاموکسی‌فن به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌ی استروژن برای مدت طولانی در درمان سرطان پستان استفاده می‌شد (۷)، اما مطالعات نشان می‌دهد که در بسیاری از موارد مقاومت به تاموکسی‌فن در بافت سرطانی به وجود آمده است. همچنین استفاده از تاموکسی‌فن خطر ابتلا به آندومتریوز را افزایش می‌دهد (۸). امروزه مهارکننده‌های آروماتاز، دسته‌ی جدید دارویی مؤثرتر از تاموکسی‌فن را برای درمان سرطان پستان معرفی می‌کند. لتروزول، یک مهارکننده‌ی غیر استروییدی آروماتاز است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای درمان سرطان پستان وابسته به استروژن، تأیید شده است (۹).

در مطالعه‌ای که Long و همکاران بر روی زمان دو برابر شدن حجم تومور انجام دادند، نشان داده شد که این زمان در گروه شاهد ۴-۳ هفته، تحت تأثیر تاموکسی‌فن ۱۶ هفته، تحت تأثیر تاموکسی‌فن و لتروزول ۱۸ هفته و تحت تأثیر لتروزول به تنهایی ۳۴ هفته بود (۱۰).

مهم‌ترین هدف در شیمی‌درمانی سرطان، کاهش تماس دارو با بافت سالم و فراهم آوردن غلظت درمانی از دارو در بافت سرطانی می‌باشد. دارورسانی هدفمند، امکان درمان اختصاصی و رساندن دارو به بافت هدف را فراهم کرده است. این روش همچنین استفاده از دوز بالا و کاهش عوارض جانبی ناشی از توزیع غیر قابل کنترل دارو را فراهم کرده است. چندین روش برای هدفمند کردن دارورسانی وجود دارد که تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی یکی از این روش‌ها است.

نانوکپسول‌های لیپیدی (Lipidic nanocapsules یا LNCs) اندازه‌ای بین ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر دارند و به عنوان یک ساختار هیبریدی بین نانوکپسول‌های پلیمری و لیپوزوم‌ها شناخته می‌شوند. در مقایسه با لیپوزوم‌ها که در فرایند ساختن آن‌ها از حلال آلی استفاده می‌شود و در مایعات بیولوژیک ناپایدار هستند، فرایند ساخت LNCها بدون به کارگیری حلال صورت می‌گیرد و پایداری بالایی (پایداری فیزیکی تا ۱۸ ماه) را از خود نشان می‌دهند. نانوکپسول‌های لیپیدی حاوی یک هسته‌ی روغنی هستند که با زنجیره‌های تری‌گلیسریدی متشکل از مخلوطی از لیستین و سرفکتانت پگیله شده پوشیده شده‌اند (شکل ۱) (۱۱).



شکل ۱. شکل شماتیک نانوکپسول‌های لیپیدی

به طور معمول، نشت ذرات از اندوتلیوم عروق، با اندازه‌ی ذره‌ای رابطه‌ی عکس دارد و ذرات با اندازه‌ی کمتر از ۲۰۰ نانومتر بیشترین اثر را بر بافت سرطانی دارند (۱۳-۱۲). از طرفی، سیستم لنفاوی بافت سرطانی غیر طبیعی است و باعث تجمع مایع در این بافت می‌شود (۱۴). با توجه به این مطالب اگر نانوذراتی از جنس چربی، با اندازه‌ی ذره‌ای کمتر از ۲۰۰ نانومتر تهیه شود، می‌تواند نشت و نفوذ بهتری به سلول‌های سرطانی داشته باشد. همچنین اندازه‌ی ذره‌ای کمتر از ۲۰۰ نانومتر باعث در امان ماندن ذرات در برابر سیستم ایمنی از جمله ماکروفاژها و فاگوسیت‌های تک هسته‌ای می‌گردد. علاوه بر این، پس از رسیدن به بافت سرطانی با توجه به سیستم لنفاوی غیر طبیعی این بافت، دارو در این بافت تجمع می‌یابد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، تهیه‌ی لتروزول بارشده در نانوکپسول‌های لیپیدی و تأثیر آن بر روی سلول های سرطانی پستان در مقایسه با لتروزول آزاد به منظور ارائه‌ی یک روش دارورسانی هدفمند بود.

روش‌ها

مواد مورد استفاده شامل لتروزول (ایران هورمون، تهران)، مخلوطی از تری‌گلیسریدهای کاپریک و کاپریلیک اسید (Basf chemical company، آلمان)، لسیتین سویا (Degussa، آلمان)، پلی‌اتیلن هیدروکسی استئارات (Basf chemical compani، آلمان)، Nacl، محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، Fetal bovine serum (FBS)، تریپسین، PBS (Phosphate buffered saline) تهیه شده از شرکت Gibco و رده‌ی سلولی MCF-7 (پاستور، تهران) بود.

نانوکپسول‌های لیپیدی با استفاده از روش تغییر فاز تهیه شد. تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی در این روش شامل دو مرحله بود. در مرحله‌ی اول فاز آبی محلول حاوی ۲۵ میلی‌گرم از دارو در ۳ میلی‌لیتر آب به عنوان حلال، ۱۷ درصد از پلی‌اتیلن هیدروکسی استئارات به عنوان سرفکتانت هیدروفیل، میزان ثابت ۰/۰۱ میلی‌گرم سدیم کلراید، ۲۰ درصد از Labrafac به عنوان فاز چربی و ۱/۵درصد از لسیتین به عنوان پایدارکننده در یک بشر تهیه شد و با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به منظور تشکیل امولسیون آب در روغن (W/O)، محلول تشکیل شده روی مگنت استیرر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به هم زده شد و دما به تدریج و با سرعت ۴ سانتی‌گراد در دقیقه از دمای اتاق به دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس به منظور تشکیل امولسیون روغن در آب (O/W) بشر حاوی امولسیون حاصل در درون بشری دیگر حاوی آب با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا دما به ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تقلیل یابد.

برای بار دوم روند فوق‌الذکر تکرار گردید و برای بار سوم دما از ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تقلیل یافت. در مرحله‌ی دوم به منظور شکستن امولسیون حاصل و پایدار نمودن نانوکپسول‌های

تشکیل شده، آب ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به میزان ۳/۵ برابر از حجم کل امولسیون اولیه که معادل ۱۰ میلی‌لیتر بود به محلول با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، اضافه شد.

پس از تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی ارزیابی آن‌ها انجام شد. برای این کار اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی‌دیسپرسیتی توسط دستگاه نانو- زتا سایزر مالورن اندازه‌گیری شد.

همچنین میزان بارگیری دارو در نانوکپسول‌های لیپیدی اندازه‌گیری شد. برای انجام این اندازه‌گیری پس از تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی از هر دیسپرسیون ۱ میلی‌لیتر وارد لوله‌های اپندروف مخصوص اولترا سانتریفوژ شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. حاصل سانتریفوژ به صورت مایع شفاف در بخش زیر، حاوی داروی آزاد بود که در نانوذرات به دام نیفتاده بودند. جذب این مایع زیری در طول موج ۲۴۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک نانوکپسول فاقد دارو نیز تهیه شد و جذب آن در همین طول موج اندازه‌گیری شد. جذب به دست‌آمده از جذب هر نمونه کم شد. این کار به منظور حذف جذب احتمالی هر یک از اجزای دیگر فرمولاسیون بود. سپس با استفاده از معادله‌ی جذب- غلظت در محیط آب، غلظت‌های مربوطه محاسبه شد. این مقدار پس از تبدیل به وزن دارو، داروی آزاد را نشان می‌داد. میزان کل دارویی که در سیستم وارد شده بود ۲/۵ میلی‌گرم بود که با کسر مقادیر به دست‌آمده از مقدار داروی موجود در حجم مورد مطالعه، میزان دارویی بارشده در نانوذرات به دست آمد.

برای تعیین سمیت سلولی از روش MTT استفاده گردید و اثر سایتوتوکسیک لتروزول آزاد و نانوکپسول‌های حاوی لتروزول بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) ارزیابی و مقایسه شد. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با غلظت $۱۰^{۴} \times ۵$ سلول در میلی‌لیتر در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (به جز ردیف اول که جهت نمونه‌ی بلانک منظور شده بود) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد تا سلول‌ها در فاز رشد قرار بگیرند. پس از ۲۴ ساعت محلول رویی چاهک‌ها دور ریخته شد و به هر ردیف پلیت ۹۶ خانه، مواد به شرح ذیل اضافه گردید:

۱- ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل جهت نمونه‌ی بلانک به ردیف اول که فاقد سلول بود.

۲- ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل جهت شاهد منفی به ردیف دوم که دارای سلول بود.

۳- ۲۰ میکرولیتر از محلول آبی لتروزول با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر همراه ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به ردیف سوم اضافه شد تا غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لتروزول، به عنوان شاهد مثبت، حاصل گردید.

۴- ۲۰ میکرولیتر نانوکپسول لیپیدی حاوی ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لتروزول به همراه ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به ردیف چهارم اضافه شد تا غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لتروزول به دست آمد.

۵- ۲۰ میکرولیتر نانوکپسول لیپیدی فاقد دارو به همراه ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت جهت شاهد

نمونه‌ی ردیف چهارم اضافه گردید.

۶- ۲۰ میکرولیتر نانوکپسول لیپیدی حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لتروزول به همراه ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت به ردیف ششم اضافه شد تا غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لتروزول حاصل شد.

۷- ۲۰ میکرولیتر نانوکپسول‌های لیپیدی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لتروزول به همراه ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت به ردیف هفتم اضافه شد تا غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از لتروزول به دست آمد.

سپس پلیت به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شد. 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 انکوباسیون محلول درون چاهک‌ها به طور کامل دور ریخته شد و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و بعد از پیپتاژ کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط ELISA قرائت شد.

آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین جذب‌ها تعیین گردید و از طریق فرمول زیر درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید:

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{میانگین جذب بلانک} - \text{میانگین جذب های‌چاهک نمونه}}{\text{میانگین جذب بلانک} - \text{میانگین جذب کنترل منفی}} \times 100$$

برای تعیین فرمولاسیون بهینه در این مطالعه از نرم‌افزار Design-expert و برای آنالیز داده‌های کشت سلولی از روش ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌داری با $P < ۰/۰۵$ مشخص شد.

به عنوان شاهد لتروزول آزاد با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و نانوذرات لیپیدی در سه غلظت ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی سلول‌های MCF-7 به کار رفت. جهت مقایسه، نانوذرات بلانک فاقد دارو هم با رقت مشابه نانوذرات حاوی دارو به کار رفتند. نمونه‌ی بلانک مربوط به هر فرمولاسیون، کلیه‌ی مواد فرمولاسیون به جز دارو را شامل می‌شد.

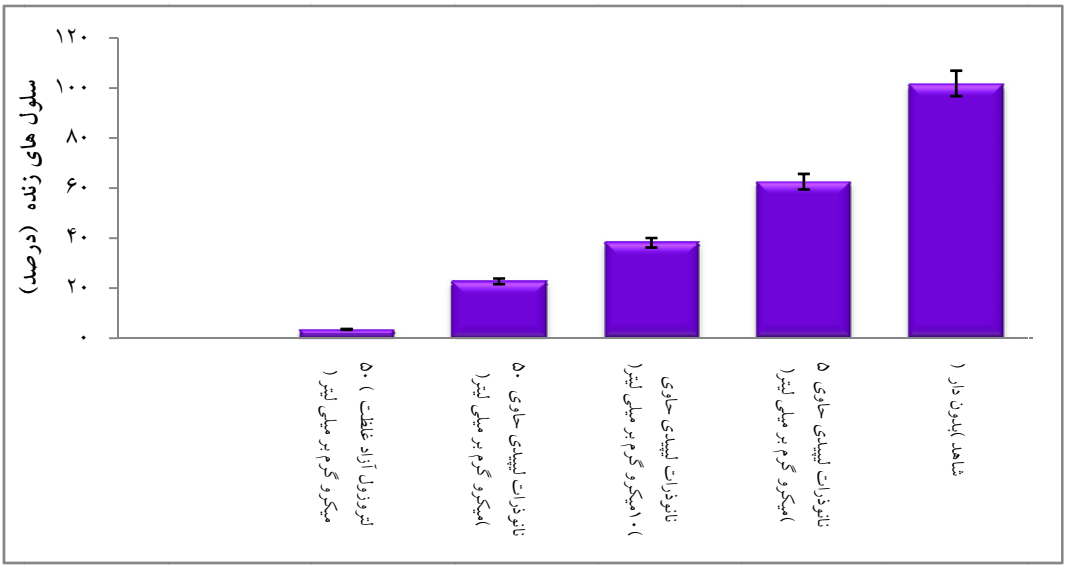
یافته‌ها

فرمولاسیون بهینه‌ی به دست‌آمده S17O20L1.5W3.5 بود (S = Solutol، O = Oil phase، L = lecithin، W = cold water). میانگین و انحراف معیار اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی‌دیسپرسیتی و کارایی بارگیری به دست آمده برای نانوکپسول‌های فرمولاسیون بهینه پس از ۳ بار اندازه‌گیری، به ترتیب ۳/۸۸۹ ± ۱۰۰، ۰/۴۴۹ ± ۳/۶۱-، ۰/۰۸۲ ± ۰/۲۸۳ و ۱/۵۳ ± ۹۶/۶ نانومتر به دست آمد.

این فرمولاسیون تهیه شده با اندکس پلی‌دیسپرسیتی پایین (۰/۲۸۳) یکنواختی بالایی در اندازه‌ی ذره‌ای داشت. همچنین لتروزول در نانوکپسول‌های لیپیدی به میزان خیلی بالا بارگیری شده بود، که این به دلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی لتروزول و حلالیت بالای آن در چربی بود.

سمیت سلولی لتروزول آزاد همراه با غلظت‌های مختلف از نانوکپسول‌های لیپیدی حاوی لتروزول بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 به روش MTT بررسی گردید که نتایج آن در شکل ۲ آمده است.

همان گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود، لتروزول آزاد با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حدود ۹۶ درصد سلول‌ها را کشت. همچنین نانوذرات لیپیدی با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز باعث مرگ حدود ۸۰ درصد از سلول‌ها شد که کارایی



شکل ۲. نتایج مربوط به تعیین درصد سلول‌های زنده به روش MTT

بالای نانوذرات لیپیدی را در متوقف ساختن رشد سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد. همچنین نانوذرات حاوی ۱۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتراز دارو نیز به ترتیب حدود ۶۲ و ۳۸ درصد از سلول‌ها را کشتند.

با توجه به شکل ۲، فرمولاسیون بلانک که فاقد دارو بود، هیچ اثر سمی بر سلول‌ها نداشت که این نشان‌دهنده‌ی ایمن بودن نانوذرات بود.

بحث

یکی از مهم‌ترین عوامل در مورد نانوذرات لیپیدی که می‌تواند به نفوذ دارو بر سلول ها و دارورسانی هدفمند و تجمع دارو در بافت هدف اثر بگذارد، اندازه‌ی ذره‌ای آن‌ها است. بنابراین دقت در اندازه‌ی ذرات برای تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی بسیار مهم است. نشان داده شده است که با افزایش محتوای لیپید، ذرات درشت تری همچون میکروذرات تشکیل می‌شوند که دارای پراکندگی اندازه‌ی ذره‌ای وسیع‌تری نیز می‌باشند. این امر به نظر می‌رسد که در اثر تجمع ذرات لیپیدی ایجاد شده باشد (۱۶-۱۵).

عامل مهم دیگر در تهیه‌ی نانوکپسول‌های لیپیدی، بارگیری دارو به میزان قابل قبول در نانوکپسول‌ها می‌باشد. میزان بارگیری دارو در نانوکپسول های لیپیدی به چند عامل بستگی دارد. یکی از این عوامل خصوصیات فیزیکوشیمیایی دارو است. داروها با لیپوفیلیسیته‌ی بالا، بیشتر در لیپید ذوب شده حل می‌شوند. در نتیجه طی فرایند امولسیون سازی میزان بیشتری از دارو وارد هسته ی لیپیدی نانوکپسول‌ها می‌شود.

ساختار شیمیایی فاز چرب عامل دیگری است که اثر زیادی در بارگیری دارو در نانوذرات دارد (۱۷). برای مثال لیپیدهایی با فضای محدود در شبکه‌ی کریستالی، همچون تری‌گلیسرید، باعث جدا شدن دارو از ماتریکس لیپیدی در طی مرحله ی ساخت می‌شوند (۱۸). برای بهبود این مشکل می‌توان از مخلوط مونو و دی گلیسریدها استفاده کرد که فضای کافی برای به دام افتادن دارو در شبکه‌ی کریستالی را

فراهم می‌کنند.

تفاوت نقطه‌ی ذوب دارو و لیپید به کاررفته در تهیه‌ی نانوکپسول‌ها از عوامل دیگر مؤثر بر میزان بارگیری است. داروهایی که نقطه‌ی ذوب بالاتری نسبت به لیپید به کار رفته دارند، طی مرحله ی امولسیون سازی و سرد کردن سریع تر به فرم جامد در می‌آیند و در ماتریکس لیپیدی به دام می‌افتند (۱۹).

با توجه به نتیجه‌ی به دست آمده از این مطالعه، کارایی بارگیری برای لتروزول حدود ۹۶ درصد است. این میزان بارگیری در نانوکپسول های لیپیدی به دلیل ویژگی لیپوفیل بودن لتروزول می‌باشد. همچنین نقطه‌ی ذوب لتروزول بالای ۱۸۰ درجه‌ی سانتی گراد می‌باشد که در مقایسه با فاز چرب به کاررفته که نقطه‌ی ذوب آن کمتر از ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است، زودتر به شکل جامد در می آید و در ماتریکس لیپیدی به دام می‌افتد.

اهمیت ویژه‌ی فرمولاسیون‌هایی که با پایه‌ی چربی تهیه شده‌اند، نقش فسفولیپیدها در جلوگیری از تجزیه دارو در دستگاه گوارش است. همچنین استفاده ازفرمولاسیون‌های لیپیدی جذب لنفاوی و انتقال لنفاوی را افزایش می‌دهد و از طرفی عوارض جانبی ناخواسته را کاهش می‌دهد(۲۰).

Lamprecht و Benoit ارتباط میان نانوکپسول‌های لیپیدی و گلیکوپروتئین P را که در تنظیم فعالیت ATPase نقش دارد، اثبات کرده اند (۲۱). این ارتباط باعث مهار پمپ گلیکوپروتئین P و کاهش عملکرد ماکروفاژها در برابر نانو کپسول های لیپیدی و ماندگاری بیشتر نانوکپسول‌ها در سیستم گردش خون می‌شود.

همچنین، نانوکپسول‌های لیپیدی به واسطه‌ی داشتن اندازه‌ی ذره‌ای در حد نانو و سطح پوشیده از سرفکتانت PEG، برای مقابله با مقاومت های دارویی وابسته به گلیکوپروتئین P به کار می‌روند.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، نانوکپسول‌های لیپیدی فاقد دارو هیچ اثر سایتوتوکسیکی بر سلول های MCF-7 نداشتند. این مسأله نشان‌دهنده‌ی ایمن بودن نانوکپسول‌ها است. با توجه به این ویژگی برای تسریع درمان می‌توان دوزهای بالای لتروزول را در این نانوکپسول‌ها بارگیری کرد و به صورت هدفمند به بافت سرطانی پستان رساند.

نتیجه‌گیری

تهیه‌ی نانوذرات لیپیدی لتروزول می‌تواند اثربخشی مناسب و قابل قیاس با لتروزول آزاد، علیه سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) از خود نشان دهد. به علاوه، کاربرد این نانوذرات لیپیدی می‌تواند دارو را به صورت هدفمند به بافت سرطانی هدایت نماید و کمتر سراغ سلول‌های سالم برود.

تشکر و قدردانی

هزینه‌ی انجام این مطالعه از طریق طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردیده است. نویسندگان از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاه فارماسیوتکس و کشت سلولی دانشکده‌ی داروسازی اصفهان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. Mutat Res 2005; 591(1-2): 247-63.
2. Arora A, Potter JF. Aromatase inhibitors: current indications and future prospects for treatment of postmenopausal breast cancer. J Am Geriatr Soc 2004; 52(4): 611-6.
3. Szymczak J, Milewicz A, Thijssen JH, Blankenstein MA, Daroszewski J. Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause. Steroids 1998; 63(5-6): 319-21.
4. van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. Cancer Res 1985; 45(6): 2900-6.
5. Blankenstein MA, van de Ven J, Maitimu-Smeele I, Donker GH, de Jong PC, Daroszewski J, et al. Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 1999; 69 (1-6): 293-7.
6. Miller WR. Estrogens and endocrine therapy for breast cancer. In: Miller WR, editor. Estrogen and breast cancer. Austin, TX: RG Landes Co; 1996. p. 125-50.
7. Vogel VG. Reducing the risk of breast cancer with tamoxifen in women at increased risk. J Clin Oncol 2001; 19(18 Suppl): 87S-92S.
8. Brown K. Breast cancer chemoprevention: risk-benefit effects of the antioestrogen tamoxifen. Expert Opin Drug Saf 2002; 1(3): 253-67.
9. Cohen MH, Johnson JR, Li N, Chen G, Pazdur R. Approval summary: letrozole in the treatment of postmenopausal women with advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2002; 8(3): 665-9.
10. Long BJ, Jelovac D, Handratta V, Thiantanawat A, MacPherson N, Ragaz J, et al. Therapeutic strategies using the aromatase inhibitor letrozole and tamoxifen in a breast cancer model. J Natl Cancer Inst 2004; 96(6): 456-65.
11. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. Pharm Res 2002; 19(6): 875-80.
12. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. Cancer Res 1995; 55(17): 3752-6.
13. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. Cancer Res 2000; 60(16): 4440-5.
14. Jain RK. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. Annu Rev Biomed Eng 1999; 1: 241-63.
15. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. Eur J Pharm Sci 2003; 18(1): 55-61.
16. Lippacher A, Muller RH, Mader K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. Int J Pharm 2001; 214(1-2): 9-12.
17. Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(6): 427-43.
18. Zur Muhlen A, Mehnert W. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded Solid Lipid Nanoparticles. Pharmazie 1998; 53(8): 552-5.
19. Jenning V, Gohla SH. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). J Microencapsul 2001; 18(2): 149-58.
20. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, et al. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. Pharm Res 2010; 27(8): 1469-86.
21. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. J Control Release 2006; 112(2): 208-13.

Journal of Isfahan Medical School Received: 26.10.2012

Vol. 30, No. 217, 3rd Week, February 2013 Accepted: 27.12.2012

Biological Effects of Letrozole-Loaded Lipid Nanocapsules on MCF-7 Cell Line

Hojjat Sadeghi Aliabadi PhD[1], Abolfazl Karimimanesh[2], Jaleh Varshosaz PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Aromatase inhibitors such as letrozole inhibit the synthesis of estrogens and help in the treatment of estrogen-dependent breast cancer. Using letrozole-loaded lipid nanocapsules (LNCs) as site directed drugs may help in the treatment of these tumors.

Methods: LNCs were prepared by triglycerides, lecithin and polyethylene glycol in water phase inversion method. Prepared LNCs had particle size of less than 100 nm and were characterized with their particle size, zeta potential, and polydispersity index by Malvern Zeta-Sizer. LNCs were tested against MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma cell line). They were compared with free letrozole in terms of cytotoxicity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Findings: S17O20L1.5W3.5, with particle size of 100 ± 3.4 nm, zeta potential of -3.6 ± 0.4, polydispersity of 0.283 ± 0.08, and loading efficiency of 96.6 ± 1.5, was the optimum formulation. Cytotoxicity of the prepared LNCs was 80% of that of free letrozole. This effect was concentration-dependent, i.e. cell survivals in stock solutions of 50 µg/ml, 10 µg/ml, and 5 µg/ml were 20%, 40%, and 60%, respectively.

Conclusion: LNCS can be used as a selective formulation against cancer cells. Their cytotoxic effect is comparable to free letrozole.

Keywords: Lipid nanocapsules, Letrozole, Breast cancer, MCF-7, MTT assay

Citation: Sadeghi Aliabadi H, Karimimanesh A, Varshosaz J. **Biological Effects of Letrozole-Loaded Lipid Nanocapsules on MCF-7 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(217): 2169-77

* This paper is derived from a Pharm D thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Pharm D Student, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hojjat Sadeghi Aliabadi PhD, Email: sadeghi@pharm.mui.ac.ir