

IN VITRO ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗΣ ΣΕ ΑΡΣΟΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

Π. Ζαζανά^{2,*}, Ι. Παπαγεωργίου¹, Σ. Μουρτάς², Σ. Αντιμησιάρη^{1,2}

¹Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο Πάτρας, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής, FORTH/ICE-HT, Πλατάνι Πάτρας, Ελλάδα
(*voulazagana@yahoo.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα **αρσονολιποσώματα** (ARSL, λιποσώματα που φέρουν στη μεμβράνη τους αρσονολιπίδιο, εκτός από φωσφολιπίδιο και χοληστερόλη) έχουν παρασκευασθεί και μελετηθεί ως προς την σταθερότητα τους και την αντικαρκινική τους δράση σε προηγούμενες μελέτες και έχουν επιδείξει σημαντική τοξικότητα έναντι καρκινικών αλλά όχι υγιών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα και ο βαθμός εγκλωβισμού της δοξορουβικίνης (DOX) σε αρσονολιποσώματα και σε αρσονολιποσώματα που περιείχαν ένα λιπιδικό παράγωγο της κουρκουμίνης (TREG), ώστε εν συνεχεία να μελετηθεί αν το σύστημα DOX-loaded/TREG-ARSL λειτουργεί αθροιστικά ή συνεργιστικά.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα **αρσονολιποσώματα** (ARSL, λιποσώματα που φέρουν στη μεμβράνη τους αρσονολιπίδιο, εκτός από φωσφολιπίδιο και χοληστερόλη) έχουν παρασκευασθεί και μελετηθεί ως προς την σταθερότητα τους και την αντικαρκινική τους δράση σε προηγούμενες μελέτες και έχουν επιδείξει τοξικότητα έναντι καρκινικών αλλά όχι υγιών κυττάρων ^[1,2]. Η **δοξορουβικίνη** (DOX), ένα κοινώς χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο της ομάδας των ανθρακυκλινών, παρουσιάζει το μειονέκτημα πως 2% των ασθενών που τη λαμβάνουν εμφανίζουν καρδιομυοπάθεια, που ενδέχεται να οδηγήσει σε καρδιακή ανακοπή και θάνατο. Εγκλωβισμός δοξορουβικίνης σε PEG-λιποσώματα (λιποσώματα επικαλυμμένα με πολυαιθυλενογλυκόλη συζευγμένη με DSPE-λιπίδιο) έχει οδηγήσει σε μείωση της καρδιοτοξικότητας του φαρμάκου ^[3,4]. Η **κουρκουμίνη**, ένα φυσικό φυτοχημικό με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις *in vitro*. [5]

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα και ο βαθμός εγκλωβισμού της DOX σε αρσονολιποσώματα και σε αρσονολιποσώματα που περιείχαν ένα λιπιδικό παράγωγο της κουρκουμίνης (TREG), ώστε εν συνεχεία να μελετηθεί αν το σύστημα DOX-loaded/TREG-arsonoliposomes λειτουργεί αθροιστικά ή συνεργιστικά.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν PEGylated αρσονολιποσώματα και TREG-PEGylated αρσονολιποσώματα. Ακολούθησε φόρτωση της DOX στα ARSL σύμφωνα με τη μέθοδο active loading, κατά την οποία η φόρτωση πραγματοποιείται λόγω διαφοράς στις τιμές του pH εκατέρωθεν της μεμβράνης και ανταλλαγής ιόντων διαμέσου της μεμβράνης των λιποσωμάτων (pH-gradient active loading). Η αναλογία φαρμάκου/λιπιδίου (D/L) διατηρήθηκε ίση με 1/7 (w/w) και μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (40°C και 60°C) και του χρόνου επώασης (15, 30, 60 και 90 λεπτά) στην ικανότητα εγκλωβισμού της DOX στα ARSL. Σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των λιποσωμάτων μετά τη φόρτωση και κατόπιν υπολογίστηκε το % ποσοστό εγκλωβισμού της DOX καθώς και η τελική (πειραματική) αναλογία D/L.

(1)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευάστηκαν PEGylated αρσονολιποσώματα και TREG-PEGylated αρσονολιποσώματα με 1,2-διστεαρόυλ-*sn*-γλύκερο-φωσφατιδυλοχολίνη (DSPC), 1,2-*rac*-διπαλμιτόυλ-αρσονολιπίδιο (Ars), χοληστερόλη (Chol), πολυαιθυλενογλυκόλη συζευγμένη με 1,2-διστεαρόυλ-*sn*-γλύκερο-φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (DSPE-PEG₂₀₀₀) και TREG-λιπίδιο όπου απαιτούνταν, με τη μέθοδο λεπτού υμενίου (thin film method).

Αναλυτικότερα, συγκεκριμένες ποσότητες λιπιδίων διαλύθηκαν σε κατάλληλο όγκο οργανικού διαλύτη (CHCl₃) και ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη με τη βοήθεια περιστροφικού εξάτμιστήρα. Κατόπιν, το λεπτό λιπιδικό υμένιο που σχηματίστηκε, ενυδατώθηκε είτε με ρυθμιστικό διάλυμα (στην περίπτωση λιποσωμάτων που δε θα εγκλωβίζαν στη συνέχεια DOX) είτε με διάλυμα θειικού αμμωνίου pH 5.5 (στην περίπτωση που θα ακολουθούσε φόρτωση DOX). Ο όγκος περίσσειας θειικού αμμωνίου απομακρύνθηκε με υπερφυγοκέντρηση και τα λιποσώματα, αφού επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, ήρθαν σε επαφή με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος DOX σε αναλογία φαρμάκου/λιπιδίου = 1/7 (w/w) και το σύστημα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία 40°C για 15, 30, 60 και 90 λεπτά. Το ίδιο σετ πειραμάτων επαναλήφθηκε και στους 60°C.

Μετά το πέρας των χρονικών αυτών διαστημάτων, τα δείγματα υπερφυγοκεντρήθηκαν και η ελεύθερη DOX διαχωρίστηκε από τα DOX-loaded λιποσώματα. Τόσο η εγκλωβισμένη όσο και η ελεύθερη DOX προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά, όπως και το ακριβές λιπιδικό περιεχόμενο των λιποσωμάτων που ελήφθησαν (μέθοδος Stewart).

Υπολογίστηκε, εν συνεχεία, η πειραματική αναλογία φαρμάκου/λιπιδίου (D/L ratio) ως % ποσοστό επί της αρχικής (θεωρητικής) αναλογίας D/L, όπως και το % ποσοστό εγκλωβισμού της DOX στα λιποσώματα προς τη συνολική DOX (% EE, % Encapsulation Efficiency).

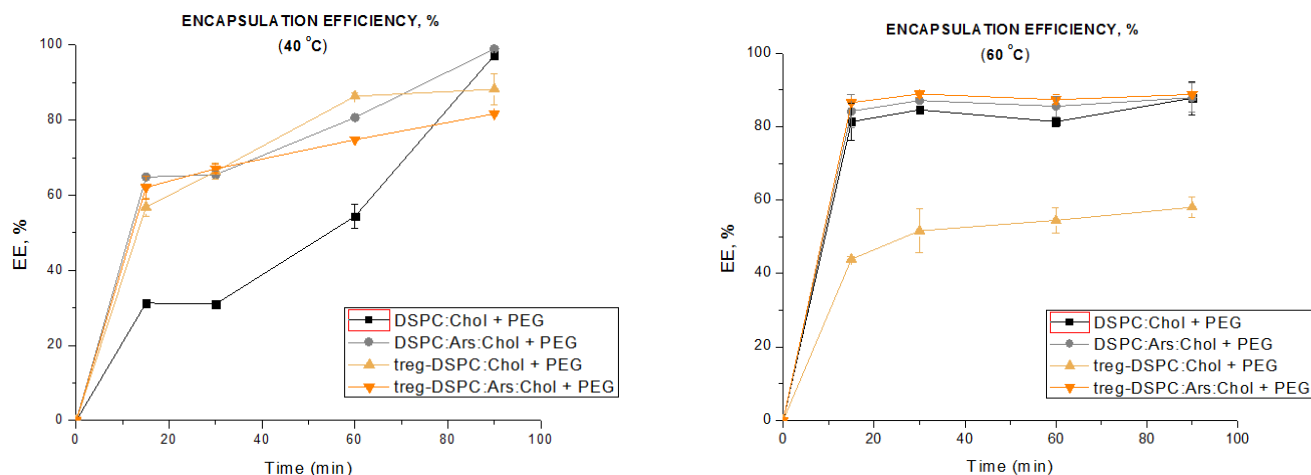
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρατηρήθηκε πως, με τη παραπάνω μέθοδο, επιτυγχάνονται σημαντικά ποσοστά εγκλωβισμού της DOX στα ARSL. Η μέγιστη φόρτωση παρατηρείται μετά από επώαση στους 40°C για τα ARSL (≤ 99%) και στους 60°C για τα TREG-ARSL (≤ 89%).

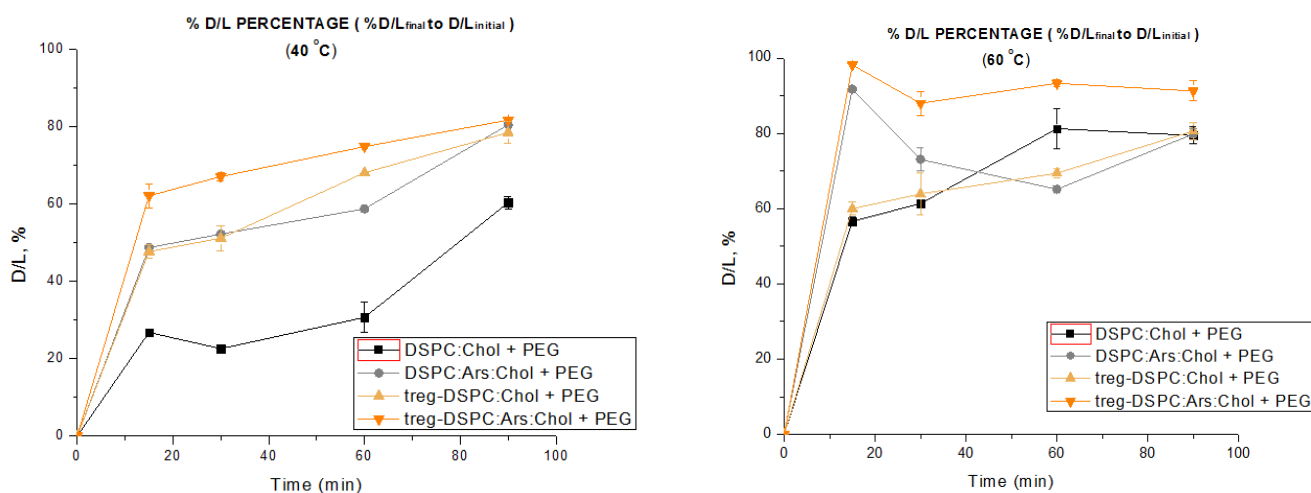
Όσον αφορά στη διάρκεια της επώασης, και στις δυο περιπτώσεις λιποσωμάτων, ο εγκλωβισμός της DOX είναι υψηλότερος μετά από 90 λεπτά επώασης, αν και φαίνεται πως στους 60°C, από τα πρώτα 15 λεπτά, ήδη εγκλωβίζονται σχετικά υψηλότερα ποσά DOX συγκριτικά με τους 40°C.

Στους 40°C, ο βαθμός εγκλωβισμού αυξάνεται σταδιακά και ομαλά από τα 15 πρώτα λεπτά (τιμές περίπου 60%) μέχρι τα 90 λεπτά (όπου αγγίζει σε κάποιες περιπτώσεις το 99%), κινούμενος σε χαμηλότερα επίπεδα μόνο για το control non-Ars λιπόσωμα. Στους 60°C, ο βαθμός εγκλωβισμού προσεγγίζει τιμές περίπου 80% μέσα στα πρώτα 15 λεπτά και αγγίζει το 89% μετά από 90 λεπτά επώασης.

Σχετικά με τη σύσταση των λιποσωμάτων, παρατηρείται πως τα ARSL, εγκλωβίζουν σημαντικά ποσοστά DOX είτε περιέχουν TREG είτε όχι, σε αντίθεση με τα non-Ars λιποσώματα τα οποία είτε καθυστερούν να εγκλωβίσουν υψηλά ποσοστά DOX (control non-Ars στους 40°C), είτε δεν εγκλωβίζουν DOX σε βαθμό παρόμοιο με τα αντίστοιχα ARSL (TREG-non-Ars στους 60°C).



Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση του % βαθμού εγκλωβισμού της DOX σε ARSL και TREG-ARSL, καθώς και τα αντίστοιχα control non-Ars λιποσώματα μετά από επώαση στους 40°C (αριστερά) και τους 60°C (δεξιά) συναρτήσει του χρόνου.



Σχήμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση του % D/L για ARSL και TREG-ARSL, καθώς και τα αντίστοιχα control non-Ars λιποσώματα μετά από επώαση στους 40°C (αριστερά) και τους 60°C (δεξιά) συναρτήσει του χρόνου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη μέθοδο active loading, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά εγκλωβισμού DOX σε TREG και non-TREG αρσονολιποσώματα, γεγονός που καθιστά τις μελέτες τοξικότητας των DOX-loaded ARSL έναντι καρκινικών κυττάρων, απαραίτητες.

Αμφότεροι οι παραπάνω τύποι αρσονολιποσωμάτων μελετούνται επί του παρόντος σε σχέση με τη κυτταροτοξικότητά τους και τα πρώτα αποτελέσματα μπορούν να χαρακτηριστούν ενδιαφέροντα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Καινοτόμα Συστήματα για ΣΤΟχευμένη και ελεγχόμενη χορήγηση ΦΑΡμάκων ή/και Απεικονιστικών ουσιών-[ΣΥΣΤΟΦΑΡ]», και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση 2014-2020» (κωδικός έργου: MIS 5004447).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zagana P, et al. (2009) Arsonoliposome interaction with cells in culture. Effect of pegylation and lipid composition. *J Mol Nutr Food Res* 53:592–599
- [2] Gortzi O, et al. (2002) Arsonoliposomes, a Novel class of arsenic-containing liposomes: effect of palmitoyl-arsonolipid-containing liposomes on the viability of cancer and normal cells in culture. *Pharm Res* 19:79–86
- [3] Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y., 2003. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 419–436.
- [4] Rahman, A.M., Yusuf, S.Y., Ewer, M.S., 2007. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int. J. Nanomed.* 2, 567–583
- [5] Usta M, Wortelboer HM, Vervoort J, Boersma MG, Rietjens IM, vanBladeren PJ, et al. Human glutathioneS-transferase-mediated glutathione conjugation of curcumin and efflux of these conjugates in Caco-2cells. *Chem Res Toxicol* 2007;20:1895-902.