خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۸ شماره ۱ بهار ۱۴۰۰ (۶۹-۶۰)

مقاله پژوهشی

مقایسه روش‌های مختلف بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی

آرزو دربندی[۱]، فاطمه یاری[۲]، زهره شریفی[۳]، نگار رضایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

میکروپارتیکل‌های پلاکتی، میکروذرات مشتق از پلاکت می‌باشند. امروزه می‌توان با استفاده از نانو پارتیکل‌ها، بسیاری از محدودیت‌های روش‌های پیشین دارو رسانی در درمان سرطان‌ها را کاهش داد. دوکسوروبیسین، داروی شیمی درمانی موجود برای درمان بسیاری از سرطان‌ها است که دارای خاصیت فلوئورسنت بوده و با ویژگی فلوئورسنت آن، شناسایی می‌شود. هدف از این مطالعه، مقایسه روش‌های مختلف بارگذاری دارو در میکروپارتیکل پلاکتی بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، کنسانتره پلاکتی در روز پنجم از سازمان انتقال خون دریافت گردید. سپس طی چند مرحله سانتریفیوژ، میکروپارتیکل پلاکتی استخراج شد. با استفاده از میکروبیدهای فلوئورسنت یک میکرومتری و آنتی‌بادی ضد CD41 وCD61 ، میکروپارتیکل‌ها به ترتیب تعیین سایز و هویت گردیدند. ۱۰µg دوکسو-روبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی با سه روش انکوباسیون، پپتیدهای نفوذکننده به سلول و سونیکاسیون بارگذاری شد و با استفاده از خاصیت اتو فلوئورسنت دوکسوروبیسین، درصد ورود دارو به میکروپارتیکل با فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

۹۵٪ از جمعیت کل میکروپارتیکل‌ها از نظر سایز در محدوده زیر یک میکرومتر و ۹۲/۳۹٪ و ۸۰/۰۳٪ از این میکروپارتیکل‌ها دارای CD41 و CD61 بودند. میزان نور فلوئورسنتی که به طور میانگین در هر کدام از روش‌های انکوباسیون، سونیکاسیون و CPP محاسبه گردیدند، به ترتیب ۱۱/۳۷ ± ۷۹/۰۹٪ ، ۲۵/۱۲ ± ۴۷/۴۸٪ و ۲۳/۲۴ ± ۵۶/۶۹٪ تعیین شدند.

نتیجه گیری

روش انکوباسیون با بالاترین میانگین داروی لود شده می‌تواند روش مؤثرتری باشد. استفاده از این روش برای بارگذاری دارو در پارتیکل‌ها در مطالعه‌های بالینی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: دوکسوروبیسین، پلاکت‌ها، میکروپارتیکل های مشتق از سلول

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۱

۱- دانشجوی هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD اپیدمیولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز متابولیسم ـ پژوهشکده علوم بالینی غدد ـ پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه‌های علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

مقدمه

میکروپارتیکل پلاکتی(platelet Microparticles) یا به اختصار PMP ، از پلاکت آزاد می‌شود و حاوی انواع مختلفی از پروتئین‌ها، میکروRNA و DNA است. این PMP ، می‌توانند مارکر بسیاری از بیماری‌ها باشند(۱). در شرایط فیزیولوژیک بدن، میکروپارتیکل‌ها از پلاکت‌های فعال شده جوانه می‌زنند.PMP ها در مواردی که نشان‌دهنده بیماری هستند، مارکرهای اختصاصی سطح غشایی آن‌ها مانند فسفاتیدیل سرین دچار تغییرات بعد از ترجمه مانند سیترولیناسیون می‌شوند(۲).PMP فراوان‌ترین(۹۰-۷۰ درصد) میکروپارتیکل‌های خون است که از پلاکت‌های ذخیره شده در بانک خون نیز آزاد می‌شود(۳). روش‌های متعددی برای تشخیص و بررسی خصوصیات میکروپارتیکل‌ها وجود دارد که فلوسیتومتری Gold standard آن‌ها است(۴). سلول‌ها در پاسخ به فعال‌سازی، وزیکول‌های غشای پلاسمایی را آزاد می‌کنند. اگرچه میکروپارتیکل در خون افراد سالم وجود دارد اما بالا رفتن سطح آن با اختلالاتی از جمله سرطان، آترواسکلروز و غیره همراه می‌شود(۳). سیستم‌های دارو رسانی(Drug Delivery System) شامل تکنولوژی و سیستم‌هایی است که بر پایه نانوذرات استوار است و می‌تواند ترکیبات دارویی را در بدن حمل کند(۵). امروزه استفاده از این پارتیکل‌ها می‌تواند محدودیت‌های استفاده از روش‌های پیشین دارو رسانی مانند توزیع و هدف‌گذاری غیر اختصاصی دارو را حل کند. نانو پارتیکل‌ها قادر هستند مدت زمان بیشتری در خون بمانند و محتویات خود را در اختیار سلول‌های توموری قرار دهند. یکی از عوامل مهم که می‌تواند باعث مقاومت دارویی شود، شناسایی ذره‌های دارویی توسط گلیکو پروتئین‌های p است. این عامل وقتی از پارتیکل‌های سازگار با بدن استفاده شود، می‌تواند به حداقل برسد. در نهایت می‌تواند در برداشتن گامی جدید در درمان انواع بیماری‌ها و سرطان‌ها به صورت درمان دارویی شخص محور بسیار حائز اهمیت باشد(۶). دوکسوروبیسین از داروهای شیمی درمانی موجود برای درمان بسیاری از سرطان‌ها است. این دارو در خانواده آنتی‌بیوتیکی آنتراسایکلین قرار می‌گیرد و در حال حاضر برای دسته‌ای از بیماری‌های نئوپلاستیک توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تائید شده است. این دارو که حالت محلول آن دوکسوروبیسین هیدروکلراید نامیده می‌شود، به دلیل وجود گروه کروموفور آنتراسیکلین مرکزی، دارای خاصیت فلوئورسنت بوده و می‌توان با روش‌های تصویربرداری فلوئورسنت آن‌ها را در بافت‌ها ردیابی کرد(۸، ۷).

پپتیدهای نفوذکننده به سلول CPP (Cell Penetrating Peptides) پپتیدهایی به شدت کاتیونیک هستند و غالباً غنی از آمینواسیدهای لیزین و آرژنین می‌باشند و خیلی سریع به هر سلولی نفوذ می‌کنند. انواع مختلفی از این پپتیدها وجود دارد که در ۵ کلاس دسته‌بندی می‌شوند. از شایع‌ترین آن‌ها کلاس کاتیونیک است(۱۰، ۹).

مواد و روش‌ها

نوع این مطالعه تجربی بوده و نمونه های کنستانتره پلاکتی به صورت تصادفی از اهداکنندگان انتخاب و پس از ۵ روز قرار گرفتن بر روی انکوباتور شیکر در دمای ۲۰ الی ۲۴ درجه سانتی‌گراد، از سازمان انتقال خون ایران دریافت شدند.

تهیه میکروپارتیکل‌های پلاکتی:

کیسه‌های کنستانتره پلاکتی در روز پنجم پس از خونگیری از اهداکننده، برای جداسازی میکروپارتیکل‌ها استفاده شد. میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روز ۳ تا ۵ نگهداری کیسه‌های کنستانتره پلاکتی به مقدار زیادی در کیسه‌ها تجمع پیدا می‌کنند. محتویات کیسه‌های کنستانتره پلاکتی در زیر هود کلاس دو و تحت شرایط استریل به درون لوله‌های فالکون منتقل شدند و جهت رسوب و جداسازی پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز و سفید، لوله‌های فالکون به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰ و طی دو مرحله در دمای محیط سانتریفیوژ(مدل اپندورف) شدند. سپس سوپرناتانت به لوله‌های مخصوص اولتراسانتریفیوژ منتقل و در دور g۱۶۰۰۰ طی سه مرحله در دمای یخچال (۱۰ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شد که بین هر مرحله میکروپارتیکل‌های رسوب شده با بافر PBS (Phosphate

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

(Buffer Saline استریل شسته شدند. رسوب نهایی در PBS حل شده و جهت تعیین غلظت، ویژگی، سایز، مواجهه با دارو و سلول در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین غلظت میکروپارتیکل‌ها با استفاده از روش برادفورد:

اتصال پروتئین به رنگ کوماسی، فرم آبی رنگ را تثبیت و منجر به تغییر رنگ متناسب با میزان پروتئین می‌شود.

برای خوانش میزان جذب نوری رنگ‌ها در روش برادفورد، از طول موج ۵۹۵nm استفاده می‌شود. برای مواجهه مؤثر و مطلوب میکروپارتیکل‌ها با داروها و رده‌های سلولی، تعیین غلظت میکروپارتیکل‌ها انجام شد. برای تعیین غلظت از استانداردهای با غلظت مشخص BSA(Bovine serum albumin) استفاده گردید. غلظت‌های ۱۵۰۰µg/mL، ۷۵۰ µg/mL، ۳۷۵ µg/mL، ۱۸۷/۵ µg/mL ، ۹۳/۷۵ µg/mL ، ۴۶/۸۷ µg/mL ، ۲۳/۴۳ µg/mL و ۱۱/۷۱ از BSA تهیه شد. ۲۰۰میکرولیتر از معرف برادفورد در چاهک‌ها ریخته شد و متعاقب آن ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های استاندارد تهیه شده و میکروپارتیکل‌های جدا شده به چاهک‌ها اضافه شد.

تعیین سایز میکروپارتیکل‌ها با استفاده از میکروبیدهای کونژوگه با فلوئورسنت:

برای این آزمایش از میکروبیدهای فلوئورسنت (برند molecular probes، کشور آمریکا) با اندازه ۱ میکرومتر استفاده شد. به نمونه‌های میکروپارتیکل با غلظت µg/ml ۱۰۰ ، ۵ میکرولیتر از محلول ۵۰۰ بار رقیق شده میکروبیدهای فلوئورسنت اضافه شد و سپس این نمونه‌ها جهت بررسی اندازه با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (partec CyFlow) استفاده شد.

تعیین منشاء و خصوصیات میکروپارتیکل‌های پلاکتی:

برای تایید منشا میکروپارتیکل‌ها از مارکرهای سطحی و اختصاصی پلاکت‌ها استفاده گردید. CD41 (از شرکت بیولژند کشور آمریکا و کونژوگه به ماده فلوئورسنت FITC) و CD61 (از شرکت داکو کشور دانمارک و کونژوگه به ماده فلوئورسنت FITC)، یکی از بهترین گزینه‌هاست. برای این کار غلظت میکروپارتیکل‌ها را به ۱۰۰µg/mL رسانده و ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد CD41 و CD61 کونژوگه شده با فلوئورسنت به آن اضافه شد و نیم ساعت در یخچال انکوباسیون انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری تایید منشا انجام گرفت. برای اطمینان و کنترل این که آنتی‌بادی استفاده شده به صورت اختصاصی به مارکر سطحی چسبیده است و چسبندگی غیر اختصاصی با ناحیه FC مارکر نداشته، از isotype control استفاده شد.

بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل پلاکتی:

دوکسوروبیسین برند Tocris از کشور انگلستان خریداری شد و غلظت‌های مختلف میکروپارتیکل (۵۰ µg/mL ، ۱۰۰ µg/mL ، ۱۵۰ µg/mL ، ۲۰۰ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL) با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (۲۰ µg/mL ، ۱۰ µg/mL ، ۵ µg/mL ، ۱ µg/mL) با روش‌های مختلف به شرح زیر با هم مواجه شدند. در این مرحله غلظت بهینه شده برای مواجهه دارو با میکروپارتیکل مشخص گردید که در هر سه روش ثابت بوده و در ادامه توضیحات هرروش ذکر شده است.

بارگذاری دارو با روش انکوباسیون:

استفاده از این روش از رایج‌ترین روش‌های مورد استفاده برای بارگذاری دارو بر روی پارتیکل‌ها و ذرات مختلف می‌باشد. میکروپارتیکل‌های پلاکتی با غلظت ۱۵۰ µg/mL با دوکسوروبیسین با غلظت ۱۰ µg/mL به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی و با دور ۱۰۰ rpm انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها با دور g ۱۶۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی خارج شد و با PBS شستشو شد. پلت نهایی برای بررسی فلوسیتومتری جمع‌آوری شد.

بارگذاری دارو با روش CPP :

محلول CPP

برای ساخت پلیمر آرژنین حاوی مولکول‌های داروی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

دوکسوروبیسین، ۳۰ میلی‌گرم آرژنین که وزن مولکولی ۱۷۴/۲ داشت را در ۶ میلی‌لیتر PBS حل کرده و مقدار ۵ میکرولیتر گلوتارآلدئید به آن اضافه کرده و ۱/۵ ساعت در تاریکی با هم مخلوط شدند و بعد در کیسه‌های دیالیز ۳۰۰۰ دالتون دیالیز گردیدند و محیط آن دو بار تعویض شد که مونومرهای موجود در کیسه دیالیز خارج شود و تنها پلی‌مرهای آرژنین باقی ماندند. در ادامه، ۲۵ میکرولیتر از محلول داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۵۰۰µg/mL را اضافه کرده و سپس مقدار ۲ میلی‌گرم از پودر گلایسین اضافه شده و انکوباسیون، دیالیز انجام گردید.

میکروپارتیکل‌های پلاکتی با غلظت ۱۵۰ µg/mL با داروی کونژوگه شده به CPP به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی و با دور ۱۰۰ rpm مواجه شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۱۶۰۰۰ g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی خارج شد و PBS ریخته و یک بار با همان شرایط ذکر شده شستشو و سانتریفیوژ انجام شد. پلت نهایی برای بررسی فلوسیتومتری جمع آوری گردید.

بارگذاری دارو با روش سونیکاسیون :

میکروپارتیکل‌های پلاکتی با غلظت ۱۵۰ µg/mL با دوکسوروبیسین با غلظت ۱۰ µg/mL، ۶ چرخه ۲۰٪ آمپلیتیود که هر چرخه ۳ دقیقه (۳۰ ثانیه روشن/۳۰ ثانیه خاموش) طول می‌کشد، سونیکه شدند و بین هر چرخه ۲ دقیقه زمان کولینگ در نظر گرفته شد و پس از آن نمونه سونیکه شده ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه نمونه‌ها با دور ۱۶۰۰۰ g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی خارج شد و PBS ریخته و یک بار با همان شرایط ذکر شده شستشو و سانتریفیوژ شد. پلت نهایی برای بررسی فلوسیتومتری جمع‌آوری شد.

نحوه جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

تمامی آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار شده و نتایج حاصل از بررسی‌های اصلی پروژه شامل فلوسیتومتری برای ثبت میزان نور فلوئورسنت ساطع شده، جمع‌آوری و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند.

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS26 انجام شد و طبیعی بودن توزیع متغیرها با استفاده از آزمون کلموگروف – اسمیرنوف محاسبه شد. جهت تحلیل و مقایسه میانگین داده‌ها در بیشتر از دو گروه از آزمون One Way Anova و Tukey Post Hoc Test استفاده شد. ضمناً $p\leq ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

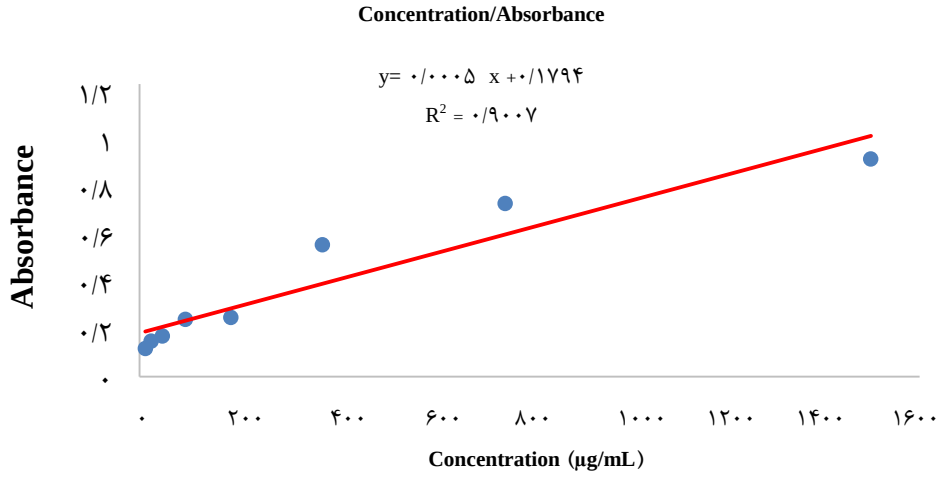
نمودار استاندارد از خواندن جذب نوری رقت‌های مختلف BSA تهیه شده و در ادامه با استفاده از این نمودار، غلظت میکروپارتیکل‌های جدا شده بر حسب میکروگرم در هر میلی‌لیتر محاسبه شد. غلظت میکروپارتیکل‌های پلاکتی که از ۷ کیسه کنستانتره پلاکتی جدا شده بود، µg/mL ۱۸۰۰، ۱۵۰۰µg/mL، ۷۰۰µg/mL، ۳۰۰۰µg/mL، µg/mL ۲۵۰۰، ۱۰۰۰µg/mL و ۴۵۰۰µg/mL تعیین شد (نمودار ۱).

در ادامه برای تعیین سایز میکروپارتیکل‌ها با استفاده از میکروبیدهای کونژوگه با فلوئورسنت، قسمت R1 ، میکروپارتیکل‌های به دست آمده از کنسانتره پلاکتی می‌باشد که ۹۵٪ کل جمعیت میکروپارتیکل‌ها از لحاظ سایز از میکروبیدهای فلوئورسنت که در قسمت R1 مشخص شده است، کوچکتر است و در محدوده پایین‌تر از یک میکرومتر قرار گرفته است(نمودار ۲). در این مطالعه از کل جمعیت میکروپارتیکل پلاکتی استفاده شده و اقدام به جداسازی اندازه خاصی از آن‌ها نشد.

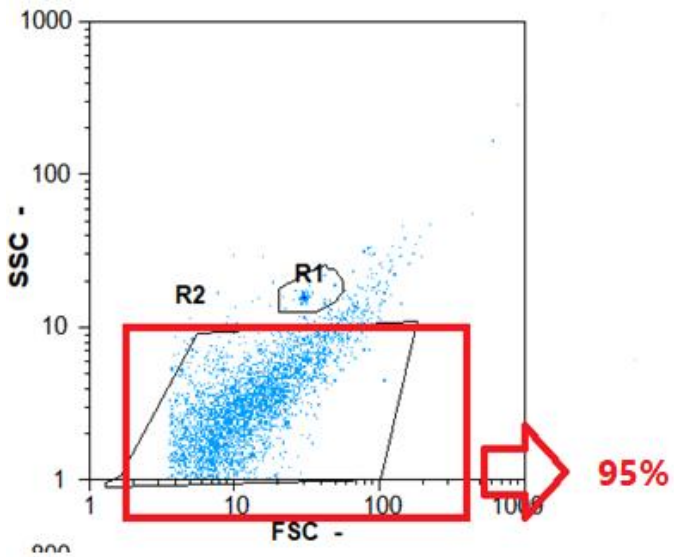
در ادامه، میکروپارتیکل‌های پلاکتی با آنتی‌بادی ضد CD41 و CD61 تیمار شدند. در مقایسه با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل، ۹۲/۳۹٪ و ۸۰/۰۳٪ از آن‌ها به ترتیب دارای این آنتی‌ژن پلاکتی بودند. در نمودار ۳ قسمت A ، R1 نشان‌دهنده جمعیت میکروپارتیکل‌های پلاکتی بوده و شکل C و D به ترتیب نشان‌دهنده جمعیت میکروپارتیکل‌های پلاکتی رنگ شده با Anti CD41 و Anti CD61 می‌باشد که با ماده فلوئورسنت FITC کونژوگه شده‌اند.

در روش انکوباسیون برای بررسی میزان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی، ۵ بار مواجهه در دوزهای مختلف صورت گرفت

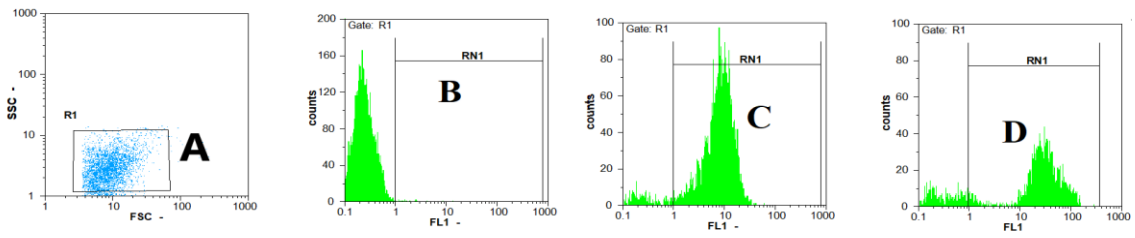
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]



نمودار ۱: نمودار استاندارد رقت‌های محلول BSA

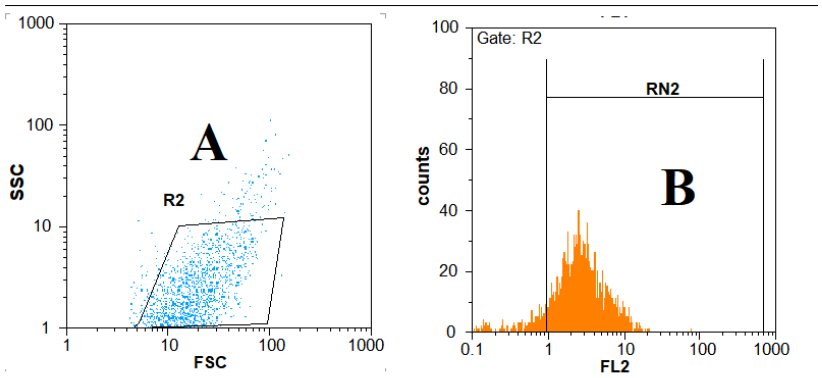


نمودار ۲ : محدوده R1 میکروبیدهای فلوئورسنت را نشان می‌دهد و محدوده R2 میکروپارتیکل‌هایی که از نظر سایز زیر یک میکرومتر هستند نشان داده شده است.

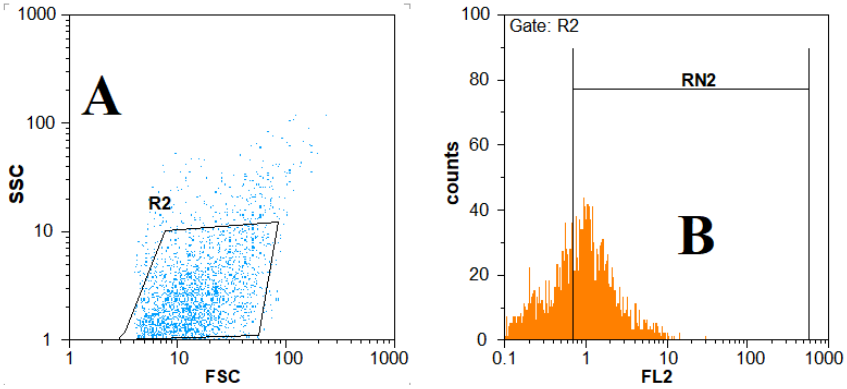


نمودار ۳ : تعیین منشاء میکروپارتیکل‌های پلاکتی با فلوسیتومتری. شکل A نشان‌دهنده گیت جمعیت می‌باشد، شکل B نمونه ایزوتایپ کنترل را نشان می‌دهد و شکل C میکروپارتیکل‌های پلاکتی که با آنتی CD41 همراه است، شکل D میکروپارتیکل‌های پلاکتی که با آنتی CD61 همراه است و محدوده مثبت مشخص نموده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]



نمودار ۴ : میزان بارگذاری دارو در روش انکوباسیون. قسمت A نشان‌دهنده گیت جمعیتی و B نشان‌دهنده میزان نور فلوئورسنت ساطع شده (۸۶/۶۳٪) داروی بارگذاری شده با روش انکوباسیون در یکی از نمونه‌های میکروپارتیکل پلاکتی می‌باشد.

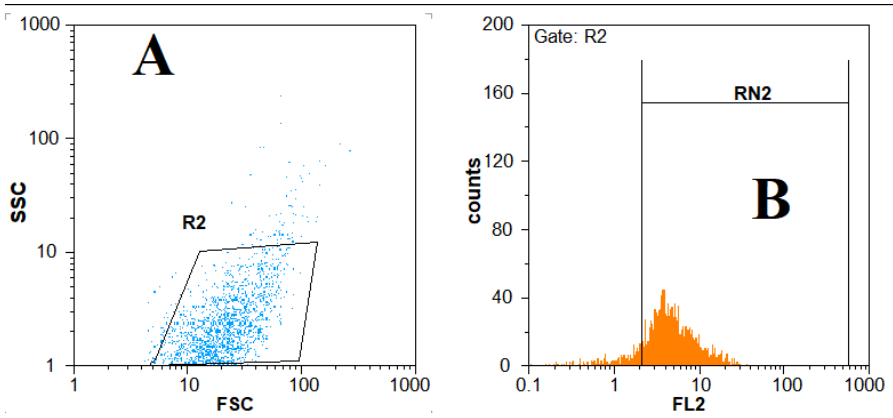


نمودار ۵ : میزان بارگذاری دارو در روش سونیکاسیون. قسمت A: نشان‌دهنده گیت جمعیتی و شکل B نشان‌دهنده میزان نور فلوئورسنت ساطع شده(۶۲/۰۳٪) داروی بارگذاری شده با روش سونیکاسیون در یکی از نمونه‌های میکروپارتیکل پلاکتی می‌باشد.

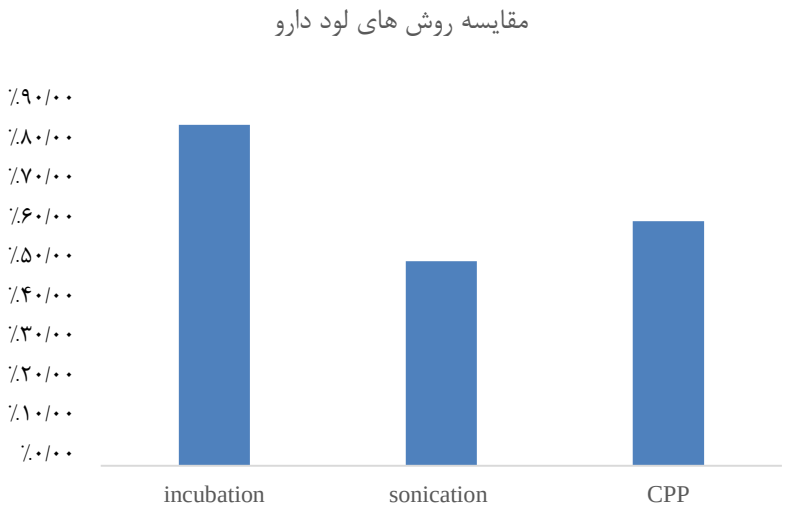
که میزان نور فلوئورسنت در مقایسه با نمونه میکروپارتیکلی که هیچ دارویی نداشته، سنجیده شد که میانگین نتایج ۱۱/۳۷ ± ۷۹/۰۹ بود. نور فلوئورسنت ساطع شده در یکی از نمونه‌های مورد مطالعه در شکل نشان داده شده(نمودارهای ۴، ۵ و ۶). در روش سونیکاسیون برای بررسی میزان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی، ۵ بار مواجهه در دوزهای مختلف صورت گرفت که میزان نور فلوئورسنت در مقایسه با نمونه میکروپارتیکلی که هیچ دارویی نداشته، سنجیده شد و میانگین نتایج ۲۵/۱۲ ± ۴۷/۴۸ بود. در روش CPP ، برای بررسی میزان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی، ۵ بار مواجهه در دوزهای مختلف صورت گرفت و میزان نور فلوئورسنت در مقایسه با نمونه میکروپارتیکلی که هیچ دارویی نداشته، سنجیده شد و میانگین نتایج ۲۳/۲۴ ± ۵۶/۶۹ بود.

میانگین داروی بارگذاری شده در سه روش گفته شده به صورت نمایش داده شده در نمودار زیر می‌باشد(نمودار ۷). به ترتیب بالاترین میزان داروی بارگذاری شده در روش انکوباسیون، سپس CPP و در نهایت روش سونیکاسیون است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]



نمودار ۶ : میزان بارگذاری دارو در روش CPP قسمت A نشان‌دهنده گیت جمعیتی و قسمت B نشان‌دهنده میزان نور فلوئورسنت ساطع شده (۸۵/۹۷٪) داروی بارگذاری شده با روش CPP در یکی از نمونه‌های میکروپارتیکل پلاکتی می‌باشد.



نمودار ۷: مقایسه روش‌های لود دارو در میکروپارتیکل‌های پلاکتی نشان‌دهنده مؤثرتر بودن روش انکوباسیون در مقایسه با دو روش سونیکاسیون و CPP می‌باشد.

بحث

شباهت ساختاری و عملکردی میکروپارتیکل‌های مشتق از سلول از قبیل میکروپارتیکل‌های پلاکتی با نانو ساختارهای سنتتیک و پلیمری که در دارو رسانی استفاده می‌شوند، این ایده را ایجاد کرد که بتوان از این میکروپارتیکل‌ها برای دارو رسانی در بیماری‌های مختلف مانند سرطان و عفونت‌های ویروسی استفاده نمود. طبیعی بودن منشاء این میکروپارتیکل‌ها می‌تواند بسیاری از اثرات جانبی و سمیت‌های سیستم‌های دارو رسانی سنتتیک و پلیمری را برطرف کند. این مطالعه جهت بررسی کاربرد استفاده از میکروپارتیکل‌های پلاکتی به عنوان حامل داروی دوکسوروبیسین با روش‌های مختلف بارگذاری شامل: انکوباسیون، سونیکاسیون و CPP انجام گردید. با توجه به نتایج به دست آمده از فلوسیتومتری، میزان شدت نور فلوئورسنت داروی دوکسوروبیسین در روش‌های انکوباسیون، سونیکاسیون و CPP به ترتیب ۱۱/۳۷ ± ۷۹/۰۹ درصد، ۲۵/۱۲ ± ۴۷/۴۸ درصد و ۲۴/۲۳ ± ۵۶/۶۹ درصد گزارش شدند.

برای مقایسه این ۳ روش مختلف لود دارو با استفاده از آزمایش آماری Anova می‌توان گفت، به طور کلی میان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

روش‌های مختلف انجام شده اختلاف معناداری وجود دارد($p\leq$ ۰/۰۰۵). استفاده از روش انکوباسیون برای لود دارو به دلیل بالاتر بودن درصد میانگین به دست آمده از فلوسیتومتری، می‌تواند روش مؤثرتری باشد.

نتایج حاصل از مطالعه‌هایی که در آن از ذره‌های پلاکتی به عنوان حامل داروی دوکسوروبیسین استفاده شده است نشان داده که استفاده از پلاکت به عنوان حامل این دارو توانایی توکسیسیتی بالاتر برای بافت و سلول‌های سرطانی و در عین حال کاردیوتوکسیسیتی کمتر برای بیماران را دارد(۱۳-۱۱). مطالعه‌هایی نیز از پلاکت به عنوان حامل دارو استفاده کردند که برای اختصاصی تر شدن تحویل دارو به سلول‌های سرطانی و بافت هدف، پلاکت‌ها را با آنتی‌بادی ضد CD22 کونژوگه نمودند(۱۴). در مطالعه‌های جدیدی که انجام شده، میکروپارتیکل‌های پلاکتی به عنوان فاکتور مهم در بازسازی کبد استفاده شده که میکروپارتیکل‌های پلاکتی با تنظیم مسیر اتوفاژی و افزایش تکثیر سلول‌های هپاتوسیت، در این مسیر نقش خود را ایفا می‌کنند(۱۵). در مطالعه‌های دیگری که اخیراً انجام داده شده، برای کنترل عوارض انفارکتوس حاد میوکاردی که در آن اینترلوکین-1ß نقش اصلی را در آسیب و مرگ سلول‌های میوکاردی دارد، از میکروپارتیکل‌های پلاکتی همراه با آنتی بادی ضد IL-1ß استفاده کردند و نشان دادند که این میکروپارتیکل‌ها می‌توانند عامل مهمی در سم‌زدایی و ترمیم سلولی در زمان انفارکتوس حاد میوکاردی باشند(۱۶). در این مطالعه برای اولین بار مقایسه روش‌های مختلف لود دارو در میکروپارتیکل‌های پلاکتی به منظور یافتن روش مؤثرتر برای بارگذاری دارو، انجام شد. در مطالعه‌های پیشین بیشتر مواقع از روش انکوباسیون برای لود دارو استفاده شده است و مواردی نیز گزارش شده که از سایر روش‌های لودینگ مانند استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول، الکتروپوریشن و غیره برای لود دارو بر روی میکروپارتیکل‌ها استفاده شده است(۱۸، ۱۷). نتایج مطالعه‌های انجام شده در این مقاله در مقایسه با روشی که از پلاکت به عنوان حامل و از روش انکوباسیون برای بارگذاری دارو استفاده شده بود، در یک راستا قرار داشتند(۱۹، ۱۴، ۱۱). اگر چه در مطالعه‌ای که از میکروپارتیکل‌های پلاکتی به عنوان حامل داروهای ضد ویروسی HIV-1 استفاده شد، روش سونیکاسیون در بارگذاری آن داروها دارای اثرگذاری بالاتری بوده است(۲۰). در توجیه این اختلاف می‌توان بیان کرد که با توجه به این که از سل لاین‌ها و داروهای متفاوت استفاده شده است، میزان لود شدن دارو در میکروپارتیکل‌ها می‌تواند متفاوت باشد.

نتیجه‌گیری

در نهایت مطالعه صورت گرفته نشان می‌دهد که استفاده از روش انکوباسیون می‌تواند روش مؤثرتری برای لود داروی دوکسوروبیسین در میکروپارتیکل‌های پلاکتی باشد. پیشنهاد می‌شود که استفاده از این روش در مطالعه‌های بالینی و آزمایشگاهی بر روی سایر داروها با همراهی با میکروپارتیکل‌های پلاکتی جهت اثرگذاری بیشتر، مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه ارشد کارشناسی ارشد آرزو دربندی با کد اخلاق IR.timi.rec.1397.036 می‌باشد که در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و با حمایت مالی این مؤسسه انجام شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

References:

1- Chen F, Liao Z, Peng D, Han L. Role of Platelet Microparticles in Blood Diseases: Future Clinical Perspectives. Ann Clin Lab Sci 2019; 49(2): 161-70.
2- Boilard E, Duchez AC, Brisson AJCoih. The diversity of platelet microparticles. Curr Opin Hematol 2015; 22(5): 437-44.
3- Varon D, Shai E. Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. Discov Med 2009; 8(43): 237-41.
4- Dumaswala U, Greenwalt TJT. Human erythrocytes shed exocytic vesicles *in vivo*. Transfusion 1984; 24(6): 490-2.
5- Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, *et al*. Drug delivery systems: An updated review. Int J Pharm Investig 2012; 2(1): 2-11.
6- Cho K, Wang X, Nie S, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clin Cancer Res 2008; 14(5): 1310-6.
7- Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. Mol Pharm 2010; 7(6): 1959-73.
8- Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. Drug Discov Today 2017; 22(2): 270-81.
9- Pooga M, Langel L. Synthesis of cell-penetrating peptides for cargo delivery. In: Howl J. Peptide Synthesis and Applications. Methods in Molecular Biolog, vol 298. USA: Humana Press; 2005. p. 77-89.
10- Jin E, Zhang B, Sun X, Zhou Z, Ma X, Sun Q, *et al*. Acid-active cell-penetrating peptides for *in vivo* tumor-targeted drug delivery. J Am Chem Soc 2013; 135(2): 933-40.
11- Xu P, Zuo H, Chen B, Wang R, Ahmed A, Hu Y, *et al*. Doxorubicin-loaded platelets as a smart drug delivery system: An improved therapy for lymphoma. Sci Rep 2017; 7: 42632.
12- Kailashiya J, Gupta V, Dash DJO. Engineered human platelet-derived microparticles as natural vectors for targeted drug delivery. Oncotarget 2019; 10(56): 5835-46.
13- Sarkar S, Alam MA, Shaw J, Dasgupta AK. Drug delivery using platelet cancer cell interaction. Pharm Res 2013; 30(11): 2785-94.
14- Xu P, Zuo H, Zhou R, Wang F, Liu X, Ouyang J, *et al*. Doxorubicin-loaded platelets conjugated with anti-CD22 mAbs: a novel targeted delivery system for lymphoma treatment with cardiopulmonary avoidance. Oncotarget 2017; 8(35): 58322-37.
15- Xu Y, Li W, Liang G, Peng J, Xu XJJoCB. Platelet microparticles-derived miR-25-3p promotes the hepatocyte proliferation and cell autophagy via reducing B-cell translocation gene 2. J Cell Biochem 2020 Jul 21.
16- Li Z, Hu S, Huang K, Su T, Cores J, Cheng K. Targeted anti–IL-1β platelet microparticles for cardiac detoxing and repair. Sci Adv 2020; 6(6): eaay0589.
17- Tang J, Su T, Huang K, Dinh PU, Wang Z, Vandergriff A, *et al*. Targeted repair of heart injury by stem cells fused with platelet nanovesicles. Nat Biomed Eng 2018; 2(1): 17-26.
18- Mehryab F, Rabbani S, Shahhosseini S, Shekari F, Fatahi Y, Baharvand H, *et al*. Exosomes as a next-generation drug delivery system: An update on drug loading approaches, characterization, and clinical application challenges. Acta Biomater 2020; 113: 42-62.
19- Wu YW, Huang CC, Changou CA, Lu LS, Goubran H, Burnouf T. Clinical-grade cryopreserved doxorubicin-loaded platelets: role of cancer cells and platelet extracellular vesicles activation loop. J Biomed Sci 2020; 27(1): 1-16.
20- Soleymani S, Yari F, Bolhassani A, Bakhshandeh H. Platelet microparticles: An effective delivery system for anti-viral drugs. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2019; 51: 290-6.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021;18 (1): 60-69

Original Article

Comparison of different techniques for loading doxorubicin in platelets microparticles

Darbandi A.[1], Yari F.[1], Sharifi Z.[1], Rezaie N.[2]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Platelet microparticles are microvesicles derived from platelets. Today, with the use of nanoparticles in cancer treatments, many limitations of traditional drug delivery methods are reduced. Doxorubicin, a chemotherapeutic drug available for the treatment of many cancers, has fluorescent properties and can be detected by fluorescent imaging in tissues. Aim of this study is to compare different drug loading methods into platelet microparticles.

Materials and Methods

In this experimental study, the platelet concentrates were taken on their fifth day from Iranian Blood Transfusion Organization. Then platelet microparticles were extracted from those concentrated platelets in several centrifugation stages. Fluorescent microbeads with one-micrometer size and anti-CD41/61 antibody were used to determine the size and identity of microparticles, respectively. Doxorubicin was loaded at 10 µg/ml on platelet microparticles using three methods of incubation, cell-penetrating peptide, and Sonication. Using the auto-fluorescence property of Doxorubicin, the rate of drug loading on platelet microparticles was measured by flow cytometry method.

Results

In terms of size, 95% of the total population of microparticles was less than one micrometer. The expression levels of CD41 and CD61 were 92.39% and 80.03%, respectively. The average fluorescence light intensities calculated in each of the incubation, sonication, and CPP methods were determined to be 79.09% ± 11.37, 47.48% ± 25.12, and 56.69% ± 23.24, respectively.

Conclusions

As the incubation method has higher loading percentage, it could be an effective method for loading drug in platelet microparticles. Furthermore, the use of this method can be considered for clinical studies.

Key words: Doxorubicin, Platelets, Cell-derived microparticles

Received: 19 Sep 2020
Accepted: 21 Sep 2020

Correspondence: Yari F., PhD of Immunology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052237; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *f.yari@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]