

## *Doxorubicin and Doxorubicin-loaded Nanoliposome Triggers Hepatocyte Cells Senescence through Accumulation of Inflammatory Factors and Activation of P53*

Nazanin Rahmian<sup>1</sup>,  
Abbas Mohammadpour<sup>2</sup>,  
Abouzar Bagheri<sup>3</sup>,  
Mohammad Shokrzadeh<sup>4</sup>,  
Morteza Eskandani<sup>5</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD in Cell and Molecular Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry and Medical Genetics, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Biomedicine Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received December 5, 2021 ; Accepted December 29, 2021)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Induction of cellular senescence is indicative of new strategy to prevent abnormal proliferation of cancer cells. Doxorubicin (DOX) is gaining attention for its neoplasia suppressive and inhibitory properties, but its clinical utility is limited due to irreversible effects on non-target cells/tissues. In this way, nanoliposomal structures were developed in drug delivery systems with minimal systemic side effects. The biological role of doxorubicin-loaded nanoliposome (NLDX) in inflammation, a prerequisite for the onset of senescence, is unclear. This study was designed to evaluate the function of P53 and senescence-associated inflammatory markers during NLDX clearance in normal tissue of the liver.

**Materials and methods:** This experimental study included three groups of Wistar rats; DOX (0.75, 0.5, and 0.1 mg/kg/BW) and LDOX (0.1, 0.05, 0.025 mg/kg/BW) groups, and a control group. Liver tissues were studied for inflammatory markers evaluation and Real-Time PCR was performed to investigate the level of P53 expression.

**Results:** Data showed that NLDX at 0.1 mg/kg/BW could significantly induce senescence in rat liver tissue by remarkable increase in expression level of P53 ( $P < 0.05$ ) and senescence-related inflammatory markers, including TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, interleukin -1, and interleukin-6 compared with a similar dose of DX ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** This research provides sufficient evidence of increased senescence in rat liver tissue caused by NLDX compared with DOX during liver excretion.

**Keywords:** Doxorubicin, Doxorubicin-loaded nanoliposome, senescence, hepatotoxicity, inflammation, P53

**J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (205):17-28 (Persian).**

\* **Corresponding Author: Mohammad Shokrzadeh and Morteza Eskandani** - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran and Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Biomedicine Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (E-mail: mslamuk@yahoo.com, eskandanim@tbzmed.ac.ir)

## دوکسوربیسین و نانولیپوزوم دوکسوربیسین القا کننده ی پیری در سلول های هیپاتوسیت از طریق انباشت عوامل التهابی و فعال سازی P53

نازنین رحمانیان<sup>1</sup>  
عباس محمدپور<sup>2</sup>  
ابوذر باقری<sup>3</sup>  
محمد شکرزاده<sup>4</sup>  
مرتضی اسکندانی<sup>5</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** القای پیری سلولی به عنوان یک استراتژی جدید برای جلوگیری از تکثیر غیرطبیعی سلول های سرطانی به کار می رود. دوکسوربیسین به علت خواص سرکوبگرانه و مهارکننده نوپلازی مورد توجه است، اما دسترسی بالینی آن به علت اثرات غیر قابل برگشت بر روی بافت غیر هدف محدود شده است. به این ترتیب، ساختارهای نانولیپوزومی در سیستم های تحویل دارو با حداقل عوارض جانبی سیستمیک توسعه یافتند. نقش بیولوژیکی لیپوزومال دوکسوربیسین در التهاب، پیش نیاز برای شروع پیری نامشخص است. این مطالعه به منظور بررسی عملکرد P53 و نشانگرهای التهابی مرتبط با پیری در طول دفع نانو لیپوزوم دوکسوربیسین در بافت نرمال کبد طراحی گردید.

**مواد و روش ها:** گروه های مورد مطالعه در این مطالعه تجربی، شامل دوکسوربیسین (0/1، 0/5، 0/75) و نانولیپوزوم دوکسوربیسین (0/1، 0/5، 0/25) میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش و گروه کنترل بودند. بافت های کبد به منظور ارزیابی نشانگرهای التهابی مورد مطالعه قرار گرفتند و تکنیک Real time PCR برای بررسی بیان P53 استفاده شد.

**یافته ها:** داده ها نشان داد که دوز 0/1 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش نانو لیپوزوم دوکسوربیسین به طور معناداری باعث افزایش پیری در بافت کبد موش های صحرایی از طریق افزایش بیان ژن P53 ( $P < 0/05$ ) و مارکرهای التهابی مرتبط با پیری شامل TNF- $\alpha$ ، NF- $\kappa$ B، اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 ( $P < 0/01$ ) نسبت به دوز مشابه در دوکسوربیسین، گردید. **استنتاج:** در این مطالعه شواهد کافی برای افزایش القای پیری در بافت کبد رت از طریق نانولیپوزومال دوکسوربیسین نسبت به دوکسوربیسین در هنگام دفع کبدی فراهم گردید.

**واژه های کلیدی:** دوکسوربیسین، نانولیپوزوم دوکسوربیسین، پیری، سمیت کبدی، التهاب، P53

### مقدمه

سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است که بشر همواره در پی راه حلی مناسب برای درمان آن درگیر و درمان بدخیمی ها صورت گرفته است. با این حال،

**مؤلف مسئول:** محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر 17 جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی  
E-mail: mslamuk@yahoo.com  
**و مرتضی اسکندانی - تبریز:** مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی  
E-mail: eskandanim@tbzmed.ac.ir

1. دانشجوی دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  2. دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  3. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  4. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  5. استادیار، مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی، موسسه زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- تاریخ دریافت: 1400/9/14 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/9/28 تاریخ تصویب: 1400/10/8

علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار در این زمینه، برخی از مسائل کلیدی که عمدتاً بر اساس سمیت سیستمیک می‌باشند منجر به شکست روش‌های مورد استفاده شده است. در طی سال‌های اخیر بسیار مشهود و آشکار شده است که تنها توسعه داروهای جدید در دارو درمانی برای نیل به پیشرفت‌های بالا در این زمینه کافی نیست. بر این اساس، یافتن سازوکار مناسب جهت کاهش سمیت دارویی در استراتژی طراحی دارو، به منظور کم‌ترین اثر جانبی بر بافت‌های سالم مورد توجه قرار گرفته است.

دوکسوروبیسین با نام تجاری آدریامايسين، یک ترکیب آنتی‌نوپلاستیک از دسته آنتراسیکلین‌ها است که طیف فعالیت ضد توموری وسیعی دارد (1). دوکسوروبیسین برای درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها مانند، سرطان پستان، مثانه، تخمدان، تیروئید، معده، ریه، استخوان، مغز مورد استفاده قرار گرفته است (2-9). با این وجود، عوارض جانبی زیاد آن در بالین موجب باریک شدن ایندکس درمانی آن شده است. آسیب‌کبدی یکی از عوارض جانبی بسیاری از داروهای ضد سرطان است. در طی درمان با دوکسوروبیسین، مقادیر زیادی از این دارو با غلظت بالا در کبد تجمع یافته و متابولیزه می‌شود که به همین دلیل کبد به عنوان یکی از اندام‌های آسیب‌پذیر در هنگام درمان با دوکسوروبیسین شناخته شده است. به طوری که تقریباً 40 درصد از بیماران پس از درمان توسط دوکسوروبیسین از آسیب‌کبدی برگشت‌ناپذیر رنج می‌برند (10). از این رو اقدامات زیادی برای کاهش این عوارض انجام گرفت که ضمن حفظ خاصیت درمانی، توکسیسیته آن در سلول‌های نرمال کاهش پیدا کند که می‌توان به محصور نمودن دوکسوروبیسین در داخل سامانه‌های ذره‌ای چون لیپوزوم‌ها اشاره کرد (11-14). هدف اصلی در این سیستم‌ها، دارو رسانی به بافت هدف و رهش کنترل شده با توجه به نیازهای ویژه درمان می‌باشد. امروزه فرمولاسیون‌های لیپوزومی دوکسوروبیسین که با نام‌های تجاری Doxil و Caelyx در بازار دارویی عرضه می‌شوند، پس از تزریق وریدی با مکانیسم EPR

(Enhanced Permeation and Retention effect) در تومور تجمع می‌یابند (15). مطالعات بر روی سازوکار اثرگذاری دوکسوروبیسین نشان داده است که این دارو با توجه به غلظت دارو و نوع رده سلولی می‌تواند پاسخ‌های سلولی متفاوتی مانند، پیری سلولی، آپوپتوز، نکروز، توقف چرخه سلولی، فاجعه میتوزی و تمایز را القا کند (16). Cellular senescence یا مکانیسم توقف رشد فیزیولوژیکی در نتیجه‌ی دارو درمانی سرطان، به عنوان یک مکانیسم جدید سرکوب تومور اخیراً مورد توجه قرار گرفته است (17، 18). تحقیقات حاکی از آن است که ترشح senescence-associated secretory phenotype (SASP) نقش اصلی را در بروز پیری در سلول‌های تحت درمان با عوامل ضد سرطانی ایفا می‌کند، که این فاکتور از طریق ارزیابی مارکرهای التهابی شامل فاکتور هسته‌ای کاپا-Nuclear factor kappa-light-chain-1 (NF- $\kappa$ B) enhancer of activated B cells، فاکتور نکروز تومور، اینترلوکین-1، اینترلوکین-6 قابل بررسی است (19). بنابراین، عوامل التهابی یکی از شرکت‌کنندگان موثر در شروع پیری است که ترشح بیش از حد آن منجر به فعال‌سازی و بیان ژن P53 می‌شود که نقش مهمی در سلول به منظور توقف چرخه سلولی، آپوپتوز، پیری یا ترمیم DNA دارد (20-22). اگرچه پیری سلولی از طریق سرکوب فعالیت تکثیر در بافت‌های توموری به‌عنوان یک مزیت محسوب می‌شود، ولی این سلول‌ها از لحاظ متابولیکی فعال هستند و نقش مهمی در توسعه مقاومت به داروهای ضد سرطانی، عود تومور و متاستاز دارند (23، 24). به‌علاوه، سلول پیر می‌تواند با ترشح فاکتورهای SASP بر سلول‌های نرمال مجاور تومور نیز اثر گذاشته و آن‌ها را هم درگیر کنند (25). با مرور کلی مطالعات متعدد در زمینه‌ی کاهش آسیب‌های ناشی از دوکسوروبیسین، در این مطالعه، با در نظر گرفتن دو پارامتر مهم، دوز تجمعی دارو در ارگان هدف و مدت زمان درمان، دوکسوروبیسین و فرمولاسیون نانولیپوزوم دوکسوروبیسین، از جهت توکسیسیته و پیری القا شده

در بافت نرمال کبد در هنگام دفع دارو به لحاظ اثرات جانبی، بررسی گردید.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، دوکسوروبیسین از شرکت GMBH (Munich, Germany) خریداری شد. نانولیپوزوم دوکسوروبیسین پگیله تزریقی با سایز 80-90 نانومتر، با محتوای لیپیدی 16 میلی گرم بر میلی لیتر و با میانگین غلظت دوکسوروبیسین 2 میلی گرم بر میلی لیتر از شرکت Exir Nano Iran, Sina Co تهیه گردید. کیت الایزا برای ارزیابی  $TNF-\alpha$ ،  $NF-\kappa B$ ،  $IL-1$  و  $IL-6$  از Diacalone (Besançon, France) خریداری شد. کیت جداسازی RNA و کیت سنتز CDNA از (Sybr Green PCR و RnAlater™ و Roche (Switzerland) master mix از Qiagen (Hilden, Germany) خریداری شد. پرایمر به سفارش از شرکت Bioneer، Korea و DNase از Sigma-Aldrich (GmbH, Munich, Germany) تهیه شد.

### طراحی مطالعه

موش های صحرایی نر ویستار (وزن 200 - 250 گرم) از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (ir.mazums.rec.1399.7010) به دست آمد. پس از 14 روز، موش ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول و گروه دوم به ترتیب دوکسوروبیسین و نانولیپوزوم دوکسوروبیسین به صورت داخل صفاقی و گروه کنترل، نرمال سالین دریافت کردند. موش ها هر روز وزن شدند. براساس مطالعات پیشین دوز تجمعی دوکسوروبیسین 16-15 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش گزارش شده است (27,26,20). با در نظر گرفتن این موضوع و این که مدت تجویز دارو در طول 6 هفته تجویز (معادل 30 روز تزریق) می باشد، دوز انتخابی دارو 0/5 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش در نظر گرفته شد تا در طی 30 روز دوز تجمعی

15 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش حاصل شود. همچنین، یک دوز بالاتر و یک دوز پایین تر نیز مورد مطالعه قرار گرفت (0/75 و 0/1 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش). براساس مقالات دوز تجمعی نانولیپوزوم دوکسوروبیسین حدود 2-0/06 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش گزارش شده است (28,20). دوز انتخابی فرم لیپوزومال میلی گرم بر کیلوگرم 0/05 (معادل 0/1 دوز دارو) در نظر گرفته شد که در طول 6 هفته تجویز (معادل 30 روز تزریق) دوز تجمعی معادل 1/5 میل گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش حاصل شد. برای فرم لیپوزومال نیز یک دوز بالا تر و یک دوز پایین تر مورد مطالعه قرار گرفت (0/025 و 0/1 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش).

### جمع آوری نمونه

موش ها با کتامین/زایلازین (60/6 میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس نمونه های خون جمع آوری شدند و به منظور جداسازی سرم به مدت 10 دقیقه در 800 g سانتریفیوژ گردیدند. در مرحله ی بعد پس از خارج کردن بافت کبد، با بافر فسفات سرد (PBS)، در pH 7/4 شستشو داده شد. بافت های کبدی با هموژنایزر دستی شیشه ای هموژن گردید. هموژن بافتی در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای 4 درجه ی سانتی گراد، با سرعت 2000g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. از سوپرناتانت هموژن بافتی در سایر مراحل استفاده شد.

### روش ارزیابی فاکتور نکروز تومور ( $TNF-\alpha$ )

غلظت  $TNF-\alpha$  با استفاده از کیت الایزا با توجه به دستورالعمل سازنده کیت اندازه گیری شد. به طور خلاصه، 50 میکرولیتر  $anti-Rat\ TNF-\alpha$  biotinylated به چاهک ها اضافه شد، سپس به آرامی با 100 میکرولیتر نمونه ی هموژن بافت کبدی و استاندارد رقیق شده مخلوط شد و 3 ساعت در دمای اتاق ( $24 \pm 2$  درجه سانتی گراد) انکوباتور شد. صفحات سه بار شسته شدند و بعد استاندارد ها و streptavidin-HRP (100 میکرولیتر)

اضافه شد. در نهایت، جذب توسط اسپکتروفتومتر ثبت شد.

#### روش ارزیابی بیان ژن P53

به منظور بررسی بیان ژن P53 از متد Quantitative real-time PCR استفاده شد. قبل از جداسازی RNA، نمونه‌های همگن کبد با محلول Rnaler در دمای 20- درجه سانتی‌گراد انکوباتور شدند. Total RNA با استفاده از کیت و با توجه به دستورالعمل سازنده کیت جداسازی شد. کیفیت و غلظت RNA جدا شده در A260 با استفاده از ترمو فیشر nanodrop (Waltham, MA, USA) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (29). cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA تهیه شد و کیفیت آن با استفاده از nanodrop مورد بررسی قرار گرفت. Quantitative real-time PCR با استفاده از سیستم Roche Light Cycler TM (Mannheim, Germany) همان‌طور که قبلاً شرح داده شد، انجام گردید (20). تجزیه و تحلیل نسبی سطح mRNA با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  انجام شد (30). پرایمرها با استفاده از Allele ID 7.5 طراحی شده‌اند که در جدول شماره 1 ذکر شده‌اند.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای بکار رفته در qPCR

Amplicon size (bps)	Sequence (5'-3')	Target gene
183	Forward: ATGGAGGATTCACAGTCGGA Reverse: TTCCTCTGGGCCTTCTAACAA	p53
199	Forward: GCCTTCCTCTCTGGGTAT Reverse: GATCTTGATCTTCATGGTGCTA	$\beta$ -actin

#### تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه 6)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز One-way ANOVA برای مقایسه‌های چندگانه مورد استفاده قرار گرفت و برای مقایسه تفاوت بین گروه‌های مختلف از آنالیز Tukey post-hoc استفاده شد. مقدار P کم‌تر از 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

در چاهک‌های مربوطه اضافه شدند. پس از 30 دقیقه زمان انکوباسیون، صفحات دوباره سه بار شسته شدند و TMB (100 میکرولیتر) و اسیدسولفوریک (100 میکرولیتر) اضافه شدند. واکنش با افزودن محلول متوقف اسید سولفوریک (50 میکرولیتر) متوقف شد و جذب در 450 نانومتر در اسپکتروفتومتر میکرو پلیت اتوماتیک (Shimadzu, Kyoto, Japan) اندازه‌گیری شد.

#### روش ارزیابی فاکتور هسته ای کاپا B (NF- $\kappa$ B)

غلظت NF- $\kappa$ B با استفاده از کیت الیزا با توجه به دستورالعمل سازنده کیت اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، 40 میکرولیتر نمونه هموژن بافت کبدی، 10 میکرولیتر آنتی‌بادی NF- $\kappa$ B، 100 میکرولیتر streptavidin-HRP و 50 میکرولیتر استاندارد در چاه‌های مربوطه اضافه شد. صفحات 5 بار با بافر شستشو شسته شدند. سپس، 50 میکرولیتر از محلول‌های کروموزن A و B به آرامی اضافه شد و بعد از 10 دقیقه، واکنش توسط 50 میکرولیتر اسید سولفوریک متوقف شد و جذب در 450 نانومتر اندازه‌گیری گردید.

#### روش اندازه‌گیری اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6

غلظت اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 در نمونه‌های هموژن بافت کبدی با استفاده از کیت الیزا و با توجه به دستورالعمل سازنده کیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌طور خلاصه، 100 میکرولیتر آنتی‌بادی تشخیصی به چاهک‌ها اضافه شدند. پس از انکوباسیون (16 تا 24 ساعت)، صفحات سه بار شسته شدند و استانداردها و نمونه‌ها اضافه شدند. سپس دوباره صفحات شسته شدند و 100 میکرولیتر از آنتی‌بادی Biotin-conjugate anti-rat اضافه شد و انکوباسیون گردید. پس از 60 دقیقه، چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو شسته شدند و با 100 میکرولیتر سوبسترا انکوباتور گردیدند. پس از 15 دقیقه، 50 میکرولیتر محلول اسید فسفریک 1 مولار به منظور توقف واکنش

## یافته ها

### بیان ژن P53

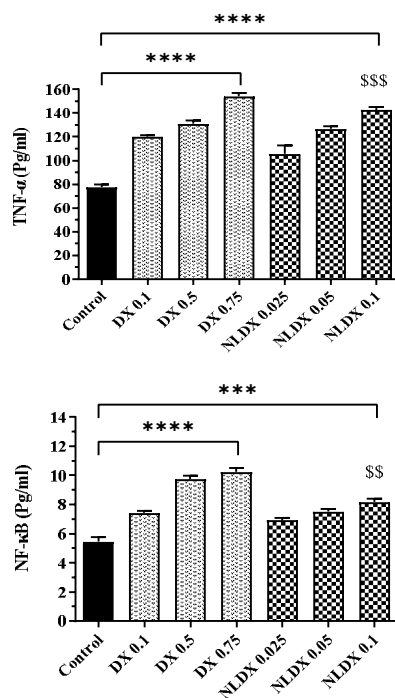
ژن P53 یک مارکر مولکولی وابسته به پیری است که در پیری سلولی بیش از حد بیان می شود. طبق نمودار شماره 1، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با استفاده از Real-Time PCR سطح بیان ژن P53 در بافت های تحت درمان با دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است ( $P < 0/0001$ ). افزایش بیان در دوز مشابه (0/1 میلی گرم بر کیلوگرم) در گروه لیپوزومال دوکسوریسین در مقایسه با دوکسوریسین به طور معنی داری بالاتر بود ( $P < 0/05$ ). داده ها حاکی از آن است که نانولیپوزوم دوکسوریسین می تواند مارکر مولکولی مرتبط با پیری را در بافت نرمال کبد تنظیم کند و منجر به پیری سلولی، حتی بیش تر از دوکسوریسین شود.

تاثیر دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین بر

فاکتور های التهابی در بافت کبد

نتایج  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  در بافت کبد

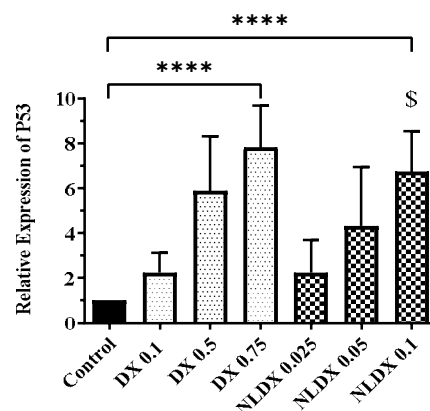
سایتوکاین های التهابی  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  از فاکتور های مهم دخیل در فرایند پیری می باشند که با استفاده از کیت های مربوطه میزان آن ها تعیین گردید. نتایج نشان دهنده ی افزایش قابل توجه در سطح  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  در گروه های تحت درمان دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین در مقایسه با گروه کنترل است ( $P < 0/001$ ) است (نمودار شماره 2). این نتایج حاکی از آن است که سایتوکاین های التهابی  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  در دوز مشابه (0/1 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن موش) در گروه نانولیپوزوم دوکسوریسین نسبت به دوکسوریسین به طور معنی داری افزایش یافته است ( $P < 0/01$ ).



نمودار شماره 2: تاثیر دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین بر

فاکتور های التهابی  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  در بافت کبد

نتایج به صورت  $mean \pm SD$  (تعداد نمونه = 8) گزارش شد. گروه کنترل نرمال سالیان دریافت کردند. \* نشان دهنده ی اختلاف معنی دار با گروه کنترل است.  $0/001 < P < 0/0001$ ،  $0/001 < P < 0/0001$  نشان



نمودار شماره 1: تاثیر دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین بر

تغییرات بیان ژن p53 در بافت کبد

نتایج به صورت  $mean \pm SD$  (تعداد نمونه = 8) گزارش شده است. گروه کنترل نرمال سالیان دریافت کردند. \* نشان دهنده ی اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ( $P < 0/0001$ ). \$ نشان دهنده اختلاف معنی دار در دوز های یکسان دوکسوریسین و لیپوزومال دوکسوریسین (0/1 میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن موش) است ( $P < 0/05$ ).

با گروه کنترل است.  $P < 0/001$ ،  $***P < 0/01$ ،  $**P < 0/01$ . نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در دوزهای یکسان دوکسوربیسین و لپوزومال دوکسوربیسین (0/1 میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن موش) است ( $P < 0/001$ ،  $SSP < 0/01$ ).

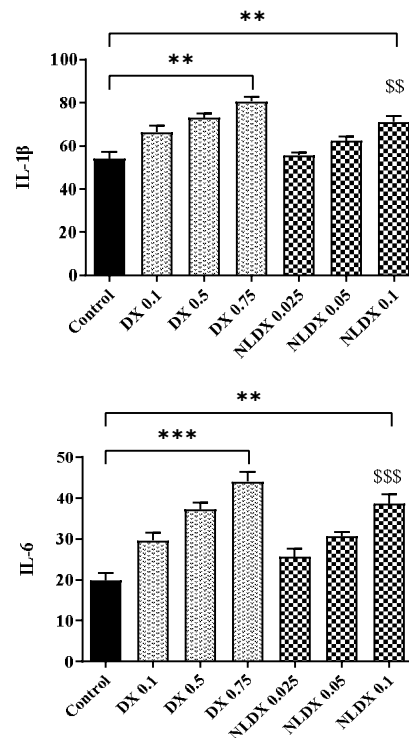
دهنده اختلاف معنی‌دار در دوزهای یکسان دوکسوربیسین و لپوزومال دوکسوربیسین (0/1 میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن موش) است ( $P < 0/001$ ،  $SSP < 0/01$ ).

نتایج اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 در بافت کبد

سطح سایتوکاین‌های اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 در گروه کنترل و درمان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد که غلظت اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 در گروه‌های تحت درمان با دوکسوربیسین و لپوزومال دوکسوربیسین به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است ( $P < 0/01$ ) (نمودار شماره 3). افزایش سطح این سایتوکاین‌ها در دوز مشابه (0/1 میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن موش) در گروه لپوزومال دوکسوربیسین در مقایسه با دوکسوربیسین به‌طور معناداری بالاتر بود ( $P < 0/01$ ).

## بحث

پیری ناشی از درمان‌های ضد سرطانی، شرایطی را به‌وجود می‌آورد که سلول‌ها توانایی تکثیر شدن خود را از دست می‌دهند درحالی‌که هنوز از لحاظ متابولیکی فعال هستند. اخیراً پیری سلولی به عنوان یک مکانیزم سرکوب‌کننده تومور مورد توجه قرار گرفته است (31، 32). تحقیقات مختلف، وقوع پیری سلولی را به‌عنوان یک مکانیزم مهم در پاسخ به نئوپلاستی تایید کرده است (31). اعتقاد بر این است که شرکت‌کنندگان اصلی در پیری شامل گونه‌های فعال اکسیژن، واسطه‌های التهابی شامل اینترلوکین-1، اینترلوکین-6،  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  است (17، 20). این فاکتورها در نهایت منجر به فعال شدن ژن P53 می‌شوند. P53 نقش اصلی را در تصمیم سلول برای پیری سلولی ایفا می‌کند (33، 34). دوکسوربیسین به عنوان یک عامل ضد نئوپلاستی می‌تواند پاسخ‌های التهابی را تحریک کند و موجب توقف چرخه سلولی از طریق نشانگرهای پیری شود (37-35). آسیب کبدی یکی از عوارض جانبی بسیاری از داروهای ضد سرطان است، در طی درمان با دوکسوربیسین، مقادیر زیادی از این دارو با غلظت بالا در کبد تجمع یافته و متابولیزه می‌شود و به همین دلیل کبد به‌عنوان یکی از اندام‌های آسیب‌پذیر در هنگام درمان با دوکسوربیسین شناخته شده است. به‌طوری‌که تقریباً 40 درصد از بیماران پس از درمان توسط دوکسوربیسین از آسیب کبدی برگشت‌ناپذیر رنج می‌برند (10). علاوه بر آسیب کبدی، عوارض جانبی زیاد دیگری نیز موجب باریک شدن ایندکس درمانی آن شده است (16). از این رو اقدامات زیادی برای کاهش این عوارض انجام گرفته است که می‌توان به محصور نمودن دوکسوربیسین در داخل سامانه‌های ذره‌ای



نمودار شماره 3: تاثیر دوکسوربیسین و نانولپوزوم دوکسوربیسین بر سایتوکاین‌های التهابی اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 در بافت کبد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  (تعداد نمونه = 8) گزارش شد. گروه کنترل نرمال سالیین دریافت کردند. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار

همچون لیپوزوم‌ها اشاره کرد (14-11). هدف اصلی در این سیستم‌ها، دارورسانی به بافت هدف و رهش کنترل شده با توجه به نیازهای ویژه درمان است (38). در این مطالعه مقایسه‌ی دو داروی دوکسوریسین و فرم لیپوزومال آن، از دیدگاه القای فرایند پیری در ارگان کبد موش صحرایی در هنگام دفع دارو مورد بررسی قرار گرفت، تا بتوان در تحقیقات آینده با نگاهی دقیق تر، به منظور حفاظت سلول‌های هپاتوسیت کبدی در برابر پیری، نتایج شیمی درمانی را بهبود بخشید. بررسی‌ها نشان می‌دهد که روند پیری اغلب با فعال شدن مارکرهای التهابی همراه است (39،40). شواهد زیادی وجود دارد که تاییدکننده‌ی ارتباط بین افزایش سن با فاکتور هسته‌ای NF-κB (از مدیاتورهای التهابی) می‌باشد، طوری که این فاکتور سبب اختلال در عملکرد اندوتلیال در سالمندان می‌شود (41). NF-κB یک تنظیم کننده ی اصلی در پروسه‌ی التهاب می‌باشد و بیان بسیاری از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر TNF-α، اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 را القا می‌کند (42). اغلب مطالعات اینترلوکین-6 را به‌عنوان سایتوکاین پیری گزارش کرده‌اند (43،44). در این مطالعه نقش دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین بر القای عوامل التهابی، که پیش نیاز برای شروع پیری است، در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین باعث واکنش التهابی قبل از شروع پیری در سلول‌های هپاتوسیت می‌شود. تجزیه و تحلیل دقیق نشان داد که بافت‌های تحت درمان با نانولیپوزوم دوکسوریسین به طور قابل ملاحظه‌ای ترشح سیتوکاین‌های التهابی مانند اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 را تغییر می‌دهد. یافته‌ها در این مطالعه نشان داد که تجویز نانولیپوزوم دوکسوریسین منجر به افزایش مقدار اینترلوکین-1 و اینترلوکین-6 نسبت به دوکسوریسین در دوزهای مشابه شد. علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در سطح NF-κB در تمام دوزهای دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین

مشاهده شد که تاییدکننده‌ی فعال شدن عوامل رونویسی توسط آنتراسیکلین است. اگر چه نتایج نشان داد که دوکسوریسین به طور قابل ملاحظه‌ای سطح NF-κB را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد ( $P < 0/0001$ )، با این حال، تجویز نانولیپوزوم دوکسوریسین افزایش معناداری بر القاء NF-κB در دوز مشابه (0/1 میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به دوکسوریسین نشان داد ( $P < 0/01$ ). مطالعات حاکی از آن است که افزایش انتشار NF-κB منجر به فعال شدن TNF-α می‌شود (45) نتایج مطالعه حاضر نیز همسو با این مطالعات بود و نشان دهنده‌ی روند افزایش سطح TNF-α در هپاتوسیت‌های تحت درمان با نانو لیپوزوم دوکسوریسین است. این افزایش در گروه‌های تحت درمان با نانولیپوزوم دوکسوریسین نسبت به حیوانات تحت درمان با دوکسوریسین در دوزهای مشابه بالاتر بود ( $P < 0/001$ ) که نشان می‌دهد نانولیپوزوم دوکسوریسین اثرات مضر بیش تری بر هپاتوسیت‌ها دارد. باید توجه داشت که حضور طولانی مدت فاکتورهای التهابی باعث پیری مزمن می‌شود و آثار مخرب ناشی از آن می‌تواند حتی منجر به نقص بافتی شود. برای مثال اثر التهاب مزمن بر روند پیری سلول‌های بنیادی مغز می‌تواند بیماری آلزایمر را در پی داشته باشد (46،47). در این مباحث اینترلوکین-1، اینترلوکین-6، TNF-α و NF-κB تنظیم کننده اصلی فون‌تپ‌های ترشحی مرتبط با پیری پیش‌التهابی (pro-inflammatory senescence-associated secretory phenotype) هستند (19،48،49). تحقیقات نشان می‌دهد که این عوامل در نهایت منجر به فعال شدن P53 می‌شود که نقش اصلی را در پیری سلولی دارد (50). در این مطالعه، بافت‌های کبدی تحت درمان با دوکسوریسین و نانولیپوزوم دوکسوریسین سطح بالاتری از بیان ژن را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. همچنین بیان بالاتر ژن P53 در فرم لیپوزومال دوکسوریسین نسبت به دوکسوریسین در دوزهای مشابه مشهود است ( $P < 0/01$ ). جالب است که سلول‌های غیر سرطانی کاردیومیوسیت در معرض با دوکسوریسین و

تایید می‌کند که نانولیپوزوم دوکسوروبیسین پیری سلولی را بیش‌تر از دوکسوروبیسین در کبد افزایش می‌دهد.

### سپاسگزاری

این مطالعه مربوط به پایان‌نامه به‌شماره طرح 3311 مرکز تحقیقات علوم دارویی می‌باشد. بدین‌وسیله پژوهشگران مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران که در اجرای این مطالعه ما را یاری نمودند، ابراز می‌دارند.

نانولیپوزوم دوکسوروبیسین نیز این افزایش بیان را نشان می‌دهند (20). در برخی مطالعات بیان شده است که P53 نقش بسزایی در ایجاد پیری و القای آسیب به DNA با ایجاد نقص در طول تلومرها دارد (51،52). به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که درمان با فرم لیپوزومال دوکسوروبیسین ممکن است منجر به پیری در سلول‌های هپاتوسیت کبدی در شرایط *in vivo* از طریق فعالسازی عوامل التهابی و افزایش بیان P53 شود. این داده‌ها نقش نشانگرهای التهابی در پیری را برجسته می‌کند و همچنین

### References

- Singal P, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Mol Cell Biochem* 2000; 207(1-2): 77-86.
- Tung N, Arun B, Hacker MR, Hofstatter E, Toppmeyer DL, Isakoff SJ, et al. TBCRC: 031 Randomized phase II study of neoadjuvant cisplatin versus doxorubicin-cyclophosphamide in germline BRCA carriers with HER2-negative breast cancer (the INFORM trial). *J Clin Oncol* 2020; 38(14): 1539-1548.
- Fávaro WJ, de Souza JG, Ferreira LA, de Jesus MB, Durán M, Bockelmann PK, et al. Hybrid graphene oxide as carrier of doxorubicin: cytotoxicity and preliminary *in vivo* assays against bladder cancer. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2020; 11(2): 025016.
- Pignata S, Scambia G, Villanucci A, Naglieri E, Ibarbia MA, Brusa F, et al. A European, observational, prospective trial of trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-sensitive ovarian cancer. *The Oncologist* 2021; 26(4): e658-e668.
- Su X, Liu J, Zhang H, Gu Q, Zhou X, Ji M, et al. Lenvatinib promotes the antitumor effect of doxorubicin in anaplastic thyroid cancer. *Onco Targets and Ther* 2020; 13: 11183.
- Matsumura Y, Gotoh M, Muro K, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol* 2004; 15(3): 517-525.
- Zhang L, Wang S, Yang Z, Hoshika S, Xie S, Li J, et al. An aptamer-nanotrain assembled from six-letter DNA delivers doxorubicin selectively to liver cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020; 59(2): 663-668.
- Kamba SA, Ismail M, Hussein-Al-Ali SH, Ibrahim TAT, Zakaria ZAB. *In vitro* delivery and controlled release of doxorubicin for targeting osteosarcoma bone cancer. *Molecules* 2013; 18(9): 10580-10598.
- Carvalho SM, Leonel AG, Mansur AA, Carvalho IC, Krambrock K, Mansur HS. Bifunctional magnetopolymersomes of iron oxide nanoparticles and carboxymethylcellulose conjugated with doxorubicin for hyperthermo-chemotherapy of brain cancer cells. *Biomaterials Science* 2019; 7(5): 2102-2122.

10. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry* 2009; 16(25): 3267-3285.
11. Kumar S, Kumari P, Singh R. *Emerging Nanomaterials for Cancer Therapy*. Shokala A. *Nanoparticles in Medicine*: Springer; 2020, 25-54.
12. Savani M, Murugan P, Skubitz KM. Long-term cure of soft tissue sarcoma with pegylated-liposomal doxorubicin after doxorubicin and ifosfamide failure. *Clin Sarcoma Res* 2019; 9(1): 1.
13. Luo D, Carter KA, Razi A, Geng J, Shao S, Giraldo D, et al. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release. *Biomaterials* 2016; 75: 193-202.
14. Shmeeda H, Amitay Y, Gorin J, Tzemach D, Mak L, Stern ST, et al. Coencapsulation of alendronate and doxorubicin in pegylated liposomes: a novel formulation for chemioimmunotherapy of cancer. *J Drug Target* 2016; 24(9): 878-889.
15. Bolkestein M, de Blois E, Koelewijn SJ, Eggermont AM, Grosveld F, de Jong M, et al. Investigation of factors determining the enhanced permeability and retention effect in subcutaneous xenografts. *J Nucl Med* 2016; 57(4): 601-607.
16. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(7): 440-446.
17. Shokrzadeh M, Bagheri A, Ghassemi-Barghi N, Rahmanian N, Eskandani M. Doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoliposome induce senescence by enhancing oxidative stress, hepatotoxicity, and in vivo genotoxicity in male Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2021; 394(8): 1803-1813.
18. Karabicici M, Alptekin S, Karagonlar ZF, Erdal E. Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133- nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7. *Mol Oncol* 2021; 15(8): 2185-2102.
19. Marques L, Johnson AA, Stolzing A. Doxorubicin generates senescent microglia that exhibit altered proteomes, higher levels of cytokine secretion, and a decreased ability to internalize amyloid  $\beta$ . *Exp Cell Res* 2020; 395(2): 112203.
20. Fallah M, Mohammadi H, Shaki F, Hosseini-Khah Z, Moloudizargari M, Dashti A, et al. Doxorubicin and liposomal doxorubicin induce senescence by enhancing nuclear factor kappa B and mitochondrial membrane potential. *Life Sci* 2019; 232: 116677.
21. Rahmanian N, Shokrzadeh M, Eskandani M. Recent advances in  $\gamma$ H2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair. *DNA Repair* 2021; 108: 103243.
22. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF- $\kappa$ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; 404(6780): 892-897.
23. Angelini PD, Fluck MFZ, Pedersen K, Parra-Palau JL, Guiu M, Morales CB, et al. Constitutive HER2 signaling promotes breast cancer metastasis through cellular senescence. *Cancer Research* 2013; 73(1): 450-458.
24. Capparelli C, Guido C, Whitaker-Menezes D, Bonuccelli G, Balliet R, Pestell TG, et al. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis, via glycolysis and ketone production. *Cell cycle* 2012; 11(12): 2285-2302.

25. Ohtani N. Deciphering the mechanism for induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP) and its role in ageing and cancer development. *J Biochem* 2019; 166(4): 289-295.
26. Segredo MPdF, Salvadori DF, Rocha NS, Moretto FF, Correa C, Camargo E, et al. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33(7): 748-760.
27. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow D, Singal P. Probulcol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 1995; 91(1): 10-15.
28. Goldberg SN, Girnan GD, Lukyanov AN, Ahmed M, Monsky WL, Gazelle GS, et al. Percutaneous tumor ablation: increased necrosis with combined radio-frequency ablation and intravenous liposomal doxorubicin in a rat breast tumor model. *Radiology* 2002; 222(3): 797-804.
29. Niehof M, Hildebrandt T, Danov O, Arndt K, Koschmann J, Dahlmann F, et al. RNA isolation from precision-cut lung slices (PCLS) from different species. *BMC Res Notes* 2017; 10(1): 121.
30. Ji S, Zheng Z, Liu S, Ren G, Gao J, Zhang Y, et al. Resveratrol promotes oxidative stress to drive DLC1 mediated cellular senescence in cancer cells. *Exp Cell Res* 2018; 370(2): 292-302.
31. Wang Z, Li Y, Wu D, Yu S, Wang Y, Chan FL. Nuclear receptor HNF4 $\alpha$  performs a tumor suppressor function in prostate cancer via its induction of p21-driven cellular senescence. *Oncogene* 2020; 39(7): 1572-1589.
32. Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11(7): 503-511.
33. Behiry S, Rabie A, Kora M, Ismail W, Sabry D, Zahran A. Effect of combination sildenafil and gemfibrozil on cisplatin-induced nephrotoxicity; role of heme oxygenase-1. *Ren Fail* 2018; 40(1): 371-378.
34. Cámara-Lemarroy CR, Cordero-Perez P, Ibarra-Hernandez JM, Muñoz-Espinosa LE, Fernandez-Garza NE. Gemfibrozil attenuates the inflammatory response and protects rats from abdominal sepsis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2015; 9(3): 1018-1022.
35. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J pharm pharmacol* 2013; 65(2): 157-170.
36. D'Ambrosio L, Touati N, Blay JY, Grignani G, Flippot R, Czarnecka AM, et al. Doxorubicin plus dacarbazine, doxorubicin plus ifosfamide, or doxorubicin alone as a first-line treatment for advanced leiomyosarcoma: A propensity score matching analysis from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer* 2020; 126(11): 2637-2647.
37. Qu Y, Niu T, Liu Z, Chu B, Zhang L, Qian Z. Recent progress of doxorubicin nanomedicine in hematologic malignancies. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* 2017; 9(12): 1861-1874.
38. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K, Dizaj SM. Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2019; 111: 666-675.
39. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- $\kappa$ B in aging and disease.

- Aging Dis 2011; 2(6): 449-465.
40. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- $\kappa$ B activity. *Genes Dev* 2007; 21(24): 3244-3257.
  41. Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- $\kappa$ B. *J Appl Physiol* 2008; 105(4): 1333-1341.
  42. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004; 39(5): 687-699.
  43. Dobbs R, Charlett A, Purkiss A, Dobbs S, Weller C, Peterson D. Association of circulating TNF- $\alpha$  and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurologica Scandinavica* 1999; 100(1): 34-41.
  44. Ebersole J, Steffen M, Gonzalez-Martinez J, Novak M. Effects of age and oral disease on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(7): 1067-1075.
  45. Abd El-Aziz TA, Mohamed RH, Pasha HF, Abdel-Aziz HR. Catechin protects against oxidative stress and inflammatory-mediated cardiotoxicity in adriamycin-treated rats. *Clin Exp Med* 2012; 12(4): 233-240.
  46. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(Suppl\_1): S4-S9.
  47. Straub RH, Schradin C. Chronic inflammatory systemic diseases: an evolutionary trade-off between acutely beneficial but chronically harmful programs. *Evol Med Public Health* 2016; 2016(1): 37-51.
  48. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* 2012; 24(4): 835-845.
  49. van Vliet T, Varela-Eirin M, Wang B, Borghesan M, Brandenburg SM, Franzin R, et al. Physiological hypoxia restrains the senescence-associated secretory phenotype via AMPK-mediated mTOR suppression. *Mol Cell* 2021; 81(9): 2041-2052.
  50. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules* 2020; 10(3): 420.
  51. Campisi J, Di Fagagna FDA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8(9): 729-740.
  52. Hsieh J-K, Kletsas D, Clunn G, Hughes AD, Schachter M, Demoliou-Mason C. p53, p21WAF1/CIP1, and MDM2 involvement in the proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20(4): 973-981.