

ارزیابی روش شیب آمونیوم سولفات گذرنده از غشا در سامانه لیپیدی برای بهبود

ظرفیت به دام اندازی داروهای آمفی پاتیک با خاصیت بازی ضعیف

بی بی فاطمه حقیرالسادات^۱، قاسم عموعابدینی^{۲*}، سمیرا نادری نژاد^۳، محمدحسن شیخها^۴، زهرا ملائی
بلاسی^۵، عظیم اکبرزاده^۶، بهروز زندیه دولابی^۷

۱. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۵. گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۶. گروه پایلوت بوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۷. گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و آناتومی کاربردی، مرکز تحقیقاتی آکنا، دانشگاه UV آمستردام، هلند.

چکیده

سابقه و هدف: لیپوزوم‌ها امکان بارگیری داروهای لیپوفیل در دولایه فسفولیپیدی و هیدروفیل در فضاهای مایع میانی را فراهم می‌کنند. در تحقیق حاضر، ارزیابی و بررسی خصوصیات نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین به دو روش فعال و غیرفعال از لحاظ میزان بارگذاری و رهایش دارو صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: برای سنتز نانولیپوزوم نسبت مشخصی از دی پالمیتول گلیسرید فسفوریل گلیسرول، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول با یکدیگر ترکیب شدند سپس داروی دوکسوروبیسین به آن به دو روش غیر فعال و فعال در نانولیپوزوم بارگذاری شد. میانگین قطر نانوذرات محاسبه و میزان بارگذاری و رهایش دارو با روش دیالیز بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین اندازه نانوذرات ساخته شده در روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی ۱۳۸/۶ nm و در روش گرادیان pH ۱۰۵/۹ nm به دست آمده است. راندمان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین نانولیپوزومه به ترتیب ۱۵/۶۵ و ۸۹ به دست آمد. رهایش دارو طی ۴۸ ساعت از دارو به ترتیب حدود ۷۸ درصد و ۲۴ درصد به ترتیب در روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیانی در محیط فسفات بافر سالین با pH= ۷/۴ می‌باشد.

بحث: این مطالعه نشان داد با ایجاد ترکیب‌های حساس به pH در ساختار نانوذره می‌تواند رهایش دارو را کنترل کرد که نوعی هدفمندی غیراختصاصی می‌باشد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که اثر دوکسوروبیسین لیپوزومه به روش فعال بیش‌تر از روش غیرفعال است. هم‌چنین فرمولاسیون تهیه شده حساس به pH است.

واژه‌های کلیدی: گرادیان pH، دوکسوروبیسین، لیپوزوم، حساس به pH.

مقدمه

سرطان یعنی رشد بی‌رویه سلول‌ها در ناحیه‌ای از بدن، علی‌رغم این که چه عاملی باعث سرطان شده و چه آسیبی به سلول‌ها رسیده باشد. سلول‌های سالم بدن طبق برنامه منظم رشد می‌کنند، تقسیم می‌شوند و می‌میرند. در دوران جنینی

نویسنده مسئول :

گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، پردیس دانشکده‌های فنی،
دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران.

پست الکترونیکی: amoabedini@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۴

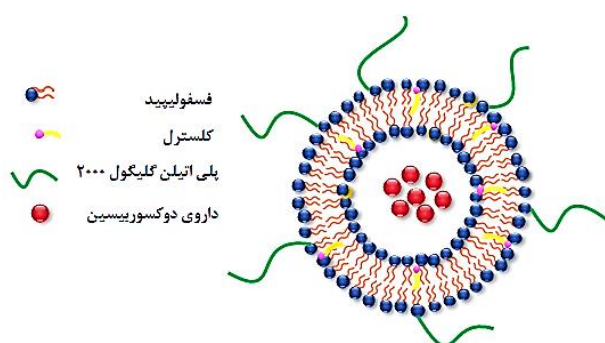
و RNA) در سلول های سرطانی می باشد (۴، ۱۶). به طور خلاصه، دوکسوروبیسین به صورت یک متابولیت ناپایدار اکسیده می شود که طی فرآیندی دوباره به دوکسوروبیسین تبدیل می شود که گونه های فعال اکسیژن را آزاد می کند. گونه های فعال اکسیژن می توانند سبب پراکسیداسیون لیپید، آسیب به غشاء، آسیب به DNA، استرس اکسیداتیو شده و مسیرهای آپوپتوتیک مرگ سلولی را هدف گیری می کند (۱۹). ژن های کاندیدایی که ممکن است این مسیر را تعدیل کنند شامل دو دسته از ژن ها است دسته اول ژن هایی که قادر به واکنش اکسیداسیون بوده و دسته دوم شامل ژن هایی است که قادر به غیرفعال کردن رادیکال های آزاد نظیر گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیداز دسموتاز می باشند. از سوی دیگر دوکسوروبیسین می تواند وارد هسته شده و توپوایزومراز II را مهار کند که منجر به آسیب DNA و مرگ سلولی می شود (۱۹). ژن های کاندید در این بخش از مسیر شامل آنزیم هایی است که در مکانیسم های ترمیم DNA و کنترل سیکل سلولی درگیر هستند (۱۴، ۱۹). لازم به ذکر است که دوکسوروبیسین دارای تعدادی عوارض جانبی نامطلوب است مانند بروز سمیت قلبی که منجر به شاخص درمانی بسیار پایینی می شود (۴).

نکته قابل توجه در رابطه با عوامل و روش های شیمی درمانی متعارف برای سرطان این است که این عوامل و روش ها به طور اختصاصی سلول های سرطانی را هدف قرار نمی دهند. آن ها علاوه بر سلول های سرطانی سبب بروز سمیت در سلول ها و بافت های سالمی می شوند که در حال تکثیر سریع می باشند مثل مغز استخوان و دستگاه گوارش که البته موجب بروز عوارض جانبی نیز خواهند بود (۲). بنابراین جهت کاهش عوارض جانبی شیمی درمانی، درمان هدفمند مد نظر قرار گرفت و یا به عبارت دیگر مطلوب این است که عوامل شیمی درمانی توسعه یابند که بتوانند سلول های سرطانی را به طور فعال یا غیرفعال هدف قرار دهند (۱۵). در این راستا استفاده از تکنولوژی نانو در بهبود روش های درمانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار می باشد. نانو پزشکی طی دهه های اخیر مزایای قابل توجهی را در درمان سرطان ارائه نموده است (۶، ۷، ۱۵) که می تواند بر محدودیت های عوامل درمانی از طریق افزایش نیمه عمر در گردش خون، بهبود فارماکوکینتیک و افزایش جذب آن ها توسط سلول های توموری غلبه کند (۱۷). ثابت شده است که سیستم های حمل دارو با نانوذرات، راندمان درمانی را در برابر سخت ترین چالش های سرطان شامل مقاومت دارویی و متاستاز تومور افزایش می دهد (۱۷). بنابراین روش-

سلول های سالم به سرعت رشد می کنند؛ اما این اتفاق فقط تا زمانی رخ می دهد که فرد به بلوغ کامل می رسد. در دوران بلوغ در بیش تر نقاط بدن سلول ها زمانی رشد می کنند و تقسیم می شوند که لازم است سلول های تازه را جایگزین سلول های فرسوده، مرده یا در حال مرگ کنند. در مواردی هم که بافت ها آسیب می بینند (زخم، شکستگی)، سلول های سالم به سرعت رشد کرده و تقسیم می شوند تا بافت آسیب دیده را ترمیم کنند. اما سلول های سرطانی برخلاف سلول های عادی، نمی میرند بلکه بی وقفه رشد می کنند، تقسیم می شوند و به طور مداوم سلول غیرعادی تولید می کنند (۱۰). هر ساله بیش از دوازده میلیون نفر از مردم سراسر دنیا به این بیماری کشنده مبتلا شده و بیش از هفت میلیون نفر جان خود را از دست می دهند (روزانه بیست هزار نفر از سرطان می میرند). سرطان هزاران سال پیش شناسایی شده و بیش از پنجاه سال است که دانشمندان به طور گسترده ای در این زمینه تحقیق می کنند. اما هنوز دارویی برای درمان سرطان به دست نیامده است. تنها در صورتی که سرطان در مراحل اولیه تشخیص داده شود تا حدودی قابل درمان و کنترل است. در چند سال اخیر با پیشرفت سریع تکنولوژی بسیاری از عوامل مولکولی این بیماری شناخته شده و امید برای یافتن داروهای مؤثرتر افزایش یافته است. اما عواملی که در پیدایش سرطان دخالت مستقیم و یا غیر مستقیم دارند بسیار زیاد و نامحدود است و به همین دلیل درمان کامل سرطان دشوار و در بسیاری موارد غیر ممکن است (۹).

یکی از متداول ترین روش های درمان سرطان شیمی درمانی است. شیمی درمانی متداول، عملکرد اندامک های سلولی را مانند میتوکندری مختل نموده و از انجام فعالیت های آنزیمی کلیدی ممانعت می نماید تا همانندسازی DNA، نسخه برداری از RNA و ترجمه را بلوکه کرده و یا مستقیماً به DNA آسیب می رساند تا تکثیر سلول های سرطانی را متوقف نموده و سمیت را در این سلول ها القا نماید (۲). یکی از داروهایی که به طور متداول برای شیمی درمانی استفاده می شود دوکسوروبیسین است که از آنتی بیوتیک های آنتراسایکلین بوده و در محدوده وسیعی از سرطان ها به کار برده می شود. فعالیت درمانی دوکسوروبیسین شامل فرآیندهای ورود مولکول های جدید به ساختار DNA، ممانعت از عملکرد توپوایزومراز II که سبب اختلال در سیستم ترمیم DNA می گردد، ایجاد رادیکال های آزاد و آسیب ناشی از آن ها در غشاهای سلولی، پروتئین ها و DNA و در نهایت ممانعت از سنتز اسیدهای نوکلئیک (DNA

های پتیدی، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، واکسن‌ها و مواد ژنتیکی درون فازهای آبی یا لیپیدی لیپوزوم‌ها با سایر ترکیب‌ها و خصوصیت‌های متفاوت گنجانده شده‌اند تا انتقال انتخابی را در کاربردهای *in vivo* فراهم نماید (۵). اولین محصول دارویی لیپوزومی داکسیل (Doxil) در واقع لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین می‌باشد. این محصول در سال ۱۹۹۵ تأییدیه اداره دارو و غذای آمریکا (FDA) را برای درمان سرطان‌های دارای مقاومت به شیمی درمانی دریافت نمود (تصویر ۱).



تصویر ۱- شماتیک بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در لیپوزوم

در حال حاضر در حدود ۱۲ داروی مبتنی بر لیپوزوم برای استفاده کلینیکی تأیید شده و تعداد بیش‌تری نیز در مراحل مختلف آزمایش‌های کلینیکی می‌باشند (۵). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که برای بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در لیپوزوم‌ها می‌توان از چندین روش مختلف استفاده نمود که در این مقاله دو روش بارگذاری غیرفعال و بارگذاری فعال مورد آزمایش و بررسی قرار گرفته‌اند. در روش اول بارگذاری دوکسوروبیسین به روش مستقیم انجام می‌شود که در آن دارو در فاز آبی حل می‌شود. در روش دوم، بارگذاری با استفاده از گرادیان pH صورت می‌گیرد. در این روش، درون لیپوزوم اسیدی است، در حالی که مقدار pH بیرونی، در شرایط فیزیولوژیکی تنظیم شده است. دوکسوروبیسین خنثی که با این لیپوزوم‌ها انکوبه شده است، به داخل وزیکول‌ها نفوذ کرده و داخل لیپوزوم، پروتونه می‌شود. دوکسوروبیسین با بار مثبت دیگر نمی‌تواند از میان دولایه عبور کند و درون لیپوزوم به دام می‌افتد. بارگذاری دوکسوروبیسین درون لیپوزوم‌ها به وسیله گرادیان منگنز بر مبنای تشکیل کمپلکس $DXR-Mn^{2+}$ در خارج از لیپوزوم است. به خوبی توضیح داده شده است که دوکسوروبیسین تشکیل کمپلکس کیلیت با کاتیون‌های چند بنیانی می‌دهد.

های درمان سرطان بر پایه نانوتکنولوژی، درمان‌های هدفمند موضعی را فراهم می‌آورد که سبب افزایش تأثیرگذاری، کاهش عوارض جانبی و بهبود کیفیت زندگی بیمار می‌شود (۱۱). استفاده از نانوذرات برای کاربردهای پزشکی یک زمینه تحقیقاتی است که به سرعت در حال رشد می‌باشد. ویژگی‌های بی‌نظیر سیستم‌های حمل بر پایه نانوذرات مزایای استراتژیکی را به درمان‌های صرف مولکولی ارائه می‌دهد اما پیچیدگی‌های جدید موجود در کاربردهای نانوذرات به خصوص در رابطه با هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی باید کشف شوند (۷).

در هدفمندی غیرفعال از ویژگی‌های اختصاصی بیولوژی تومور بهره‌برداری می‌شود که به نانو حامل‌ها اجازه می‌دهد تا به واسطه نفوذپذیری و اثر احتباس افزایش یافته، در تومور تجمع یابند. روش‌های هدفمندی فعال به واسطه درهم آمیختن نانو حامل‌های حاوی عوامل شیمی‌درمانی با مولکول‌هایی ایجاد می‌شوند که این مولکول‌ها می‌توانند به آنتی ژن‌هایی با بیان بالا یا رسپتورهای روی سلول‌های هدف متصل می‌شوند. در استفاده از روش‌های هدفمندی غیرفعال، اولین محصول‌هایی بر پایه لیپوزوم‌ها و پلیمرهای متصل شده به پروتئین‌ها در نیمه دهه ۱۹۸۰ تجاری شدند (۱۵). نانو حامل‌ها از جمله لیپوزوم‌ها در مسیر خود به سمت هدف با سدهای متعددی روبرو می‌شوند مانند سدهای موکوسی و جذب غیر اختصاصی اما به علت وجود رگ‌های خونی رخنه‌دار و کانال‌های لنفاوی ضعیف غیرعملکردی، نانوحامل‌هایی مانند لیپوزوم‌ها می‌توانند تجمع خود را در تومور حفظ کرده و به آن‌ها اجازه می‌دهد تا داروها را در مجاورت سلول‌های تومور آزاد کنند (۱۵).

بنگهام و همکاران در سال ۱۹۹۵ اولین توصیف خود را در خصوص سیستم‌های فسفولیپیدی متورم منتشر کردند که اساس مدل سیستم‌های غشایی را بنا نهاد. در طی چند سال بعد انواعی از ساختارهای دولایه‌ای محصور شامل ساختارهای دولایه منفرد که در ابتدا "bangosome" و سپس "liposome" نامیده شدند، توصیف گردیدند (۱، ۵). استفاده از لیپوزوم‌ها در انتقال دارو به عنوان "گلوله جادویی" به طور گسترده‌ای مطالعه شده است. حامل‌های لیپوزومی دارای تأثیر قوی بر فارماکوکینتیک و هم‌چنین توزیع بافتی داروهای گنجانیده شده می‌باشند (۱۱). در واقع لیپوزوم‌ها اجزای کوچک، کروی و محصور شده‌ای هستند که محیط آبی را به علت وجود دولایه لیپیدی از محیط دیگر جدا می‌سازند. صدها دارو شامل عوامل ضدسرطانی و ضد میکروبی، هورمون-

همچنین ذکر شده است که، دوکسوروبیسین می تواند به وسیله گرادیان سیترات یا سولفات، در لیپوزوم بارگذاری شود. در هر دو مفهوم، دوکسوروبیسین در بسته های الیاف مانند، درون لیپوزوم رسوب می کند (۱۰).

مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی و بررسی خصوصیت های نانوحامل های لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین به دو روش فعال و غیرفعال از لحاظ میزان بارگذاری و رهایش دارو به منظور ارائه یک روش دارورسانی، صورت گرفته است.

روش کار

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده شامل: دی پالمیتول گلیسرید فسفوریل گلیسرول^۱ (Lipoid GmbH- Germany)، کلسترول (Sigma-Aldrich Co, USA)، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ متصل به فسفولیپید (Lipoid GmbH- Germany)، دوکسوروبیسین (sigma, USA)، بافر ۷/۴ PBS (10 mM کیسه دیالیز ۱۲ - ۱۴ کیلودالتون (Spectra/Pore®Dialysis membrane)، فیلتر ۰/۲۲ و ۰/۴۵، میکرومتر اتانول مطلق و آب دیونیزه بوده است.

ساخت لیپوزوم و بارگذاری دارو به روش غیرفعال (تهیه نانو لیپوزوم به روش فیلم نازک)

برای ساخت نانولیپوزوم، فاز لیپیدی شامل دی پالمیتول گلیسرید فسفوریل گلیسرول، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول با نسبت مولی (۳: ۳۸/۲: ۵۸/۸) به ۲ سی سی کلروفرم اضافه و حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار در دمای حدود ۵۵ درجه و با دور تقریبی ۱۵۰ rpm حذف گردید و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. فاز آبی مورد استفاده حاوی داروی دوکسوروبیسین می باشد. محلول آبی دوکسوروبیسین با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر دارو مورد نظر به فیلم لیپیدی اضافه شد. نسبت مولی لیپید به ترکیب دارویی با ۱۰: ۱ انتخاب شد. انباشتن دارو توسط روتاری چرخان در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت و دور ۱۵۰ rpm صورت

گرفت. برای کاهش اندازه لیپوزوم های MLV و تشکیل SUV از روش سونیکاسیون استفاده گردید، پروب دستگاه سونیکاسیون در داخل محلول کلئیدی لیپوزوم ها که داخل ظرف یخ بودند، قرار داده شد. شرایط سونیکه کردن: توان: ۶۰٪ (Amplitude) به مدت ۲۰ دقیقه (۷ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش).

پس از انباشتن دارو به منظور جدا نمودن داروی انباشته نشده، لیپوزوم داخل کیسه دیالیز سلولزی ریخته شده و در بشر حاوی PBS با حجم ۱۵۰ برابر حجم لیپوزوم به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس استیرر شد و برای بررسی میزان بارگذاری و رهایش دارو از روش کیسه دیالیز استفاده شد.

ساخت لیپوزوم و بارگذاری دارو به روش فعال (تهیه نانو لیپوزوم به روش شیب یا گرادیان pH)

در روش دیگری برای ساخت نانولیپوزوم، به فاز لیپیدی ۵-۶ سی سی کلروفرم اضافه و حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار، در دمای حدود ۵۵ درجه سانتی گراد برای کلروفرم و با دور تقریبی ۱۵۰ rpm، حذف گردید و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. همچنین جهت اطمینان از حذف کامل حلال، فیلم نازک لیپیدی چندین دقیقه با گاز نیتروژن هوادهی گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه یخچال قرار می گیرد. ۳ سی سی از بافر سولفات آمونیوم به فیلم نازک اضافه شد و به صورت سونیکیت حمامی و همزمان چرخش روتاری به مدت یک ساعت قرار داده شد. در همان دقایق اول مایع شیری رنگ تشکیل شد که همان لیپوزوم های MLV می باشد. برای کاهش اندازه لیپوزوم- های MLV و تشکیل SUV از روش سونیکاسیون استفاده گردید. به منظور تعویض بافر و در نتیجه ایجاد گرادیان pH بین داخل و خارج لیپوزوم ها از کیسه دیالیز سلولزی (یا معمولی) استفاده شد. لیپوزوم ها داخل کیسه دیالیزی پرورده شده ریخته شد و داخل بافر PBS با حجمی معادل ۱۰۰ برابر حجم لیپوزوم به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استیرر شدند. تعویض PBS با بافر جدید پس از یک ساعت استیرر صورت گرفت. به منظور انباشتن دارو در لیپوزوم های تهیه شده پس از ایجاد گرادیان pH

¹ 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol sodium salt (DPPG)

محاسبه گردید. بعد از تعیین محیط انحلالی مناسب، حجم مشخصی از لیپوزومهای حاوی دوکسوروبیسین هیدروکلراید داخل کیسه دیالیز سلولزی ریخته شده و در دمای 37°C در ۱۰ میلی لیتر از محیط آزادسازی قرار گرفت و در زمانهای مشخص نمونه برداری صورت گرفت.

بررسی مورفولوژی

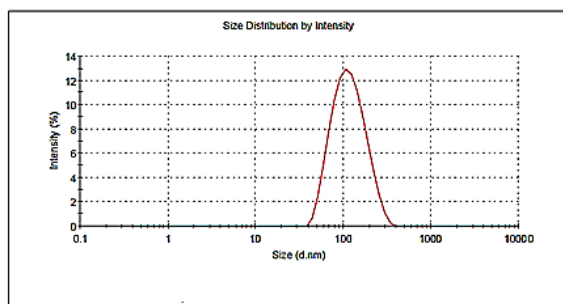
به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده از دستگاه TEM (cryo-TEM, FEI Tecnai 20, type Sphera, Oregon, USA) استفاده شد.

یافته ها

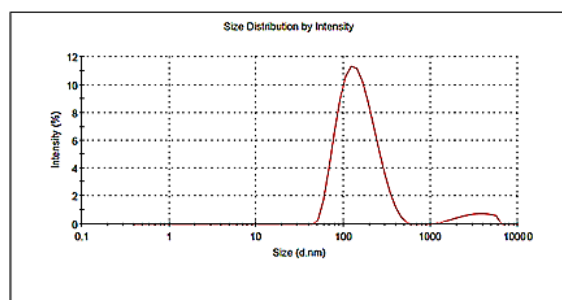
تعیین اندازه نانولیپوزومها

همان گونه که در تصویر ۲ نشان داده شده است، میانگین اندازه نانوذرات ساخته شده در روش آب پوشانی لایه نازک چربی $4/9 \pm 138/6 \text{ nm}$ و در روش گرادیان pH $3/8 \pm 105/9 \text{ nm}$ به دست آمده است. توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش یکنواخت بوده و برابر $0/1 \pm 236/0$ و $0/4 \pm 167/0$ به ترتیب در روش آب پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیان pH هست.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 105.9	Peak 1: 123.3	100.0	53.28
PdI: 0.167	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



	Diam. (nm)	% In
Z-Average (d.nm): 138.6	Peak 1: 155.7	93.9
PdI: 0.236	Peak 2: 3323	6.1
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0
Result quality Good		



لیپوزومها داخل بالن ته گرد ریخته شده و محلول آبی ۱/۵ سی سی داروی دوکسوروبیسین با غلظت یک میلی- گرم بر میلی لیتر به آن اضافه شد. انباشتن دارو توسط روتاری چرخان در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت صورت گرفت. پس از انباشتن دارو به منظور جدا نمودن داروی انباشته نشده، هم چنین میزان بارگذاری و رهایش دارو از روش کیسه دیالیز استفاده شد.

تعیین سایز و محدوده توزیع اندازه نانو

لیپوزومها

با استفاده از دستگاه نانو سایزر محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات تعیین گردید. محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده DLS تعیین می شود که بدین منظور از دستگاه نانو سایزر Brookhaven Instruments Corp استفاده گردید.

تعیین پتانسیل زتای نانو لیپوزومها

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزومها با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری گردید. برای تعیین بار سطحی از ۱۵۰۰ میکرولیتر نمونه با غلظت ۰/۱ mg/ml استفاده گردید.

بررسی میزان انباشتگی دوکسوروبیسین داخل

لیپوزوم

به منظور بررسی میزان دوکسوروبیسین انباشته شده، لیپوزومهای تهیه شده با نسبت ۱ به ۹ با محلول تریتون $100 \times (1\% \text{ W/V})$ در آب مخلوط شده و جذب UV آنها در طول موج ۴۸۰ نانومتر تعیین و در نهایت غلظت داروی دوکسوروبیسین با توجه به معادله نمودار استاندارد به- دست آمد.

بررسی نحوه رهایش داروی فرمولاسیونهای

لیپوزومی

برای بررسی روند رهایش دارو از لیپوزومها در محیط برون تن، ابتدا باید محیط انحلالی که بتواند شرایط سینک را برقرار کند، انتخاب می شود. بدین منظور طی آزمایشی محلولیت اشباع دوکسوروبیسین در فسفات بافر سالین

(ب)

تصویر ۲- مقایسه اندازه و توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده با استفاده از روش گرادیان pH (الف) و آب پوشانی لایه نازک چربی (ب)، محور افقی قطر هیدرودینامیکی ذرات برحسب نانومتر و محور عمودی شدت می باشد.

بررسی پتانسیل زتا

در جدول ۱ پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش آب پوشانی لایه نازک چربی و گرادیان pH آورده شده است. نتایج حاکی از تفاوتی چشم گیر در میزان پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش نمی باشد.

بررسی میزان داروی بارگذاری شده

در جدول ۱ مقدار داروی بارگذاری شده با استفاده از هر دو روش آب پوشانی لایه نازک چربی و گرادیان pH نشان داده شده است. مقدار داروی بارگذاری شده به روش آب پوشانی لایه نازک چربی برابر $8/65 \pm 15/65\%$ و مقدار داروی بارگذاری شده به روش گرادیان pH برابر است با $4/35 \pm 89\%$. همان گونه که مشاهده می شود، روش گرادیان pH دارای راندمان بارگذاری بسیار بالاتری از روش آب پوشانی لایه نازک چربی است. به طور کلی داروهای آب دوست دارای راندمان بارگذاری پایینی در روش آب پوشانی لایه نازک چربی هستند. مولکول های کوچک دوکسوروبیسین تنها با روش گرادیانی قابلیت بارگذاری مؤثر در لیپوزوم ها را دارد.

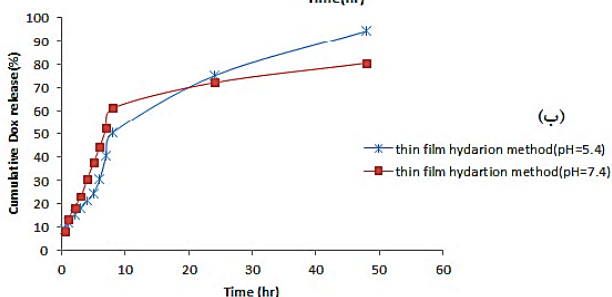
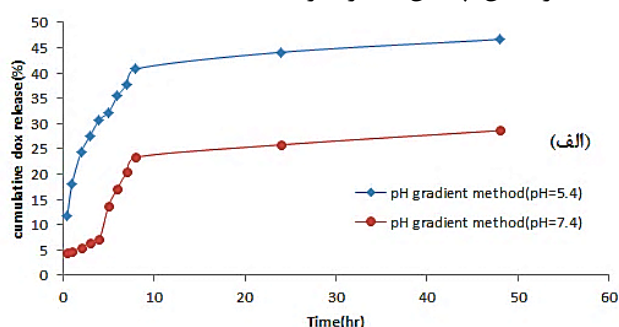
جدول ۱- اندازه، پتانسیل زتا و راندمان بارگذاری نانولیپوزوم های ساخته شده به روش آب پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیان pH

روش تهیه لیپوزوم	درصد بارگذاری دارو	سایز (نانومتر)	پتانسیل زتا (میلی ولت)
هیدراتاسیون لایه نازک	$8/65 \pm 15/65$	$138/6 \pm 4/9$	-۲/۶۶
گرادیان pH	$4/35 \pm 89$	$105/9 \pm 3/8$	-۳/۷

بررسی رهایش دارو

مقدار داروی دوکسوروبیسین آزاد شده از فرمولاسیون دوکسوروبیسین نانولیپوزوم در بافر PBS با pH خنثی و ۵/۴ و در طی بازه های زمانی ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۴ ساعت، ۶ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد دوکسوروبیسین محاسبه شد. الگوی رهایش دارو مطابق تصویر ۳ برای دو روش می باشد. این نمودار نشان می دهد که حداکثر مقدار

داروی آزاد شده از لیپوزوم ها در مدت ۴۸ ساعت به ترتیب حدود ۷۸ درصد و ۲۴ درصد به ترتیب در روش آب پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیانی در محیط فسفات بافر سالین با $pH=7/4$ می باشد. شایان توجه هست با اسیدی کردن بافر داروی آزاد شده از لیپوزوم های ساخته شده به روش گرادیانی به میزان چشم گیری افزایش یافته است به طوری که پس از ۴۸ ساعت مقدار داروی آزاد شده در بافر فسفات سالین اسیدی برابر ۴۶ درصد شده است. مقدار رهایش دارو از لیپوزوم های ساخته شده به روش آب پوشانی لایه نازک چربی با تغییر pH محیط رهایش چندان تغییر نکرده است.



تصویر ۳- نمودار رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات ساخته شده به روش گرادیان pH (الف) و روش آب پوشانی لایه نازک چربی (ب) در بافر خنثی و اسیدی

تصویر برداری cryo-TEM از نانو لیپوزوم حاوی

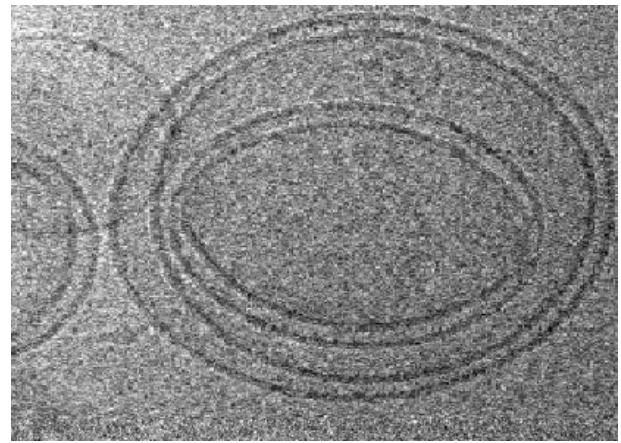
دوکسوروبیسین

دو لایه بودن غشاء و ساختار بیضی گونه نانو لیپوزوم های حامل دارو در تصویر ۴ گرفته شده با میکروسکوپ الکترونیکی انتقالی (cryo-TEM) (با توان ۱۵۰ کیلو ولت) به طور کامل قابل رؤیت است.

جهت همجنس بودن با غشای سلولی بسیار مورد توجه هستند.

مولکول DPPG یک فسفولیپید سنتزی است که شباهت زیادی با فسفاتیدیل کولین دارد. زنجیره های آسیل در طول فسفولیپید خنثی DPPG تقریباً ۱۵ کربن است که زنجیره ای سخت و غیرقابل انعطاف است. این موضوع نشأت دارو را در مراحل آماده سازی لیپوزوم های حاوی دارو کاهش می دهد؛ در نتیجه بازده درون گیری نهایی افزایش می یابد و رهایش دارو به صورت آهسته پیش می رود. هم چنین دمای انتقال DPPG بالاتر از 37°C بوده است بنابراین نیمه عمر لیپوزوم های سنتز شده با DPPG داخل بدن طولانی تر است.

پلیمر PEG مورد استفاده در سطح حامل های لیپوزومی، پلیمری زیست سازگار، غیرآنتی ژنیک و در مقابل پروتئین مقاوم است و می تواند زمان چرخش ذرات را در خون افزایش دهد. در تحقیقی، PEG دار کردن لیپوزوم حامل یک داروی ضد تومور، زمان نیمه عمر دارو را در پلاسما تا هشت برابر افزایش داده است. پگیله کردن پایداری نانوذرات را داخل بدن بهبود می بخشد. پگیله کردن، درون گیری داروی آبدوست را (بخاطر افزایش میزان فضای مائی) و اندازه قطر متوسط (به علت ممانعت فضایی) را افزایش می دهد، رهایش دارو را کاهش و نانو ذره را پایدارتر می کند. هم چنین به دلیل افزایش ممانعت فضائی، شاخص پراکندگی کاهش می یابد و مانع آگلومره شدن ذرات می شود. زوکر و همکاران در سال ۲۰۱۲، بارگذاری کارآمد و موثر دو داروی تپوتکان و وین کریستین در داخل سامانه لیپوزومی پگیله شده برپایه گرادیان آمونیم سولفات به عنوان نیروی محرکه بارگذاری را بررسی نمودند. به طور خاص از افتراق اشعه ایکس محلول برای مطالعه ساختار لیپوزوم با بدون لیپو پلیمر پیوند زده شده و هم چنین دو دارو بارگذاری شده در داخل و خارج فاز آبی استفاده کردند (۲۰). در نهایت تعیین خصوصیت های سامانه طراحی شده گام مهمی است که برای حمایت مطالعه های بالینی آینده می باشد و برای اطمینان از این که



تصویر ۴- تصویر میکروسکوپی عبوری از نانوذرات لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین

بحث

سرطان همواره یکی از اساسی ترین مشکل های جوامع بشری بوده است. شایع ترین روش درمانی، شیمی درمانی است که به تنهایی و یا با شیوه های درمانی دیگر استفاده می شود. دوکسوروبیسین، دارویی از دسته آنتراسیکلین ها بوده و آنتی بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می شود. دوکسوروبیسین علیه تعدادی از انواع تومورها وارد عمل می شود، که اثر ضد سرطانی را با مهار توپوایزومراز II انجام می دهد. شیوه های شناسایی و درمانی در سرطان در حال بهبود یافتن است. نانو فناوری یک حوزه میان رشته ای بوده و کاربردهای وسیعی در بیولوژی سرطان مانند شناسایی تومور، کشف نشانگرهای زیستی سرطان و گسترش درمان های جدید دارد. این رشته به سرعت در حال تکامل و گسترش می باشد.

لیپوزوم، یک وزیکول^۲ دو لایه ای فسفولیپیدی که یک فضای آبی را در برگرفته است. ضخامت دو لایه لیپیدی ۳ تا ۶ نانومتر است. لیپوزوم ها به دلیل داشتن خصوصیت آمفی پاتیک^۳، می توانند دارورسانی داروهای آبدوست و چربی دوست را انجام دهند. لیپوزوم ها از مولکول های دوگانه دوست به نام فسفولیپیدها تشکیل شده اند. لیپوزوم ها وزیکول های زیست سازگار و غیر سمی هستند که از

² Vesicle
³ amphipathic

محصول لیپوزومی مورد نظر خصوصیت های زیستی مناسبی از فرمولاسیون حاوی دارو را دارد. کلسترول مولکولی است که جهت افزایش پایداری درون-تن به فرمولاسیون نانو ذره افزوده می شود کلسترول هم-چنین به دلیل زیست سازگاری با بدن، به فرمولاسیون نانو ذره افزوده می شود. زنجیر کلسترول، سفت و محکم است و باعث افزایش پایداری ساختار نانو ذره می شود و بازده درون گیری را افزایش می دهد. کلسترول دارای دو رویکرد متفاوت در غلظت های مختلف دارد. کلسترول در غلظت ها بالا مانع تحرک زنجیره ها می شود و باعث می شود غشا سخت باشد و ورود دارو با محدودیت روبرو باشد و در همین حال نشت دارو در مراحل آماده سازی هم کم-تر باشد هم چنین رهایش نیز آهسته تر و سیستم پایدار باشد. کلسترول در غلظت پایین و کم تر از نسبت مولی ۰/۵ گرچه غشا انعطاف پذیرتر است و ورود دارو هنگام درون گیری افزایش می یابد ولی نشت دارو در حین آماده سازی نیز کاهش می یابد که همین مساله درصد انکپسولیشن نهایی را کاهش می دهد و رهایش دارو را نیز افزایش می دهد.

رهایش آهسته دارو در مقادیر بالاتر pH رخ می دهد. پروفایل رهایش دارو در pH ۵/۴ که متناسب با سطح pH در سلول های اندوزومال می باشد، سریع تر است و مدل ارائه شده مدل مناسبی جهت رسانش کنترل شده دارو در بافت سرطانی است. هم چنین می توان این گونه استنباط کرد که فرمولاسیون جدید لیپوزومی حساس به pH است و می تواند به عنوان یک هدفمندی غیرفعال برای تحویل-دهی به سلول های اندوزومی عمل کند، در حالیکه در شرایط فیزیولوژیک، رهایش کم دارو اتفاق می افتد. سلول های سرطانی دچار کمبود اکسیژن هستند که شرایط هیپوکسی نام دارد. این شرایط منجر به کاهش pH درون سایت سرطانی می شود. فرمولاسیون پیشنهاد شده به خاطر خاصیت حساس به pH می تواند از آسیب رسیدن به سلول های سالم جلوگیری کند و بیشترین آسیب به سلول سرطانی برسد. افزایش سرعت رهایش در pH های

بالا به خاطر افزایش نفوذ پذیری غشا، افزایش حلالیت داروها و افزایش حلالیت دارو درون لیپوزوم است. روش گرادیان آمونیوم سولفات گذرنده از غشا شامل بار گذاری دارو پس از تشکیل لیپوزوم است که برای افزایش راندمان درون گیری داروهای آب دوست و دوگانه دوست استفاده می شود. لیپوزوم تهیه و پس از آن دارو را با شیب یون برای تسهیل جذب دارو به داخل لیپوزوم لود می شود. این روش مزیت های مختلفی از قبیل به دام افتادن ماکزیمم میزان دارو، نسبت بالای چربی به دارو، مقرون به صرفه بودن است. در این تکنیک فاز آلی با اجزای محلول به صورت یک لایه نازک تبخیر می شود سپس با اسید سیتریک و یا سولفات آمونیوم هیدراته و سپس کاهش سایز سونیکیت می شود تا وزیکول های چند لایه شکل گیرند. به این سوسپانسیون محلول آبی دارو اضافه می-شود.

در این پژوهش به کار گیری این روش ضمن تأثیر مثبت در درون گیری دارو بر روی خصوصیت های سطحی نانو ذرات از جمله شارژ و سایز هم تأثیر می گذارد. نکته جالب این است که فرمولاسیون تهیه شده با این روش نوین بیش تر وابسته و حساس به pH است.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد که اثر دوکسوروبیسین لیپوزومه به روش فعال بیش تر از روش غیرفعال است. مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی و بررسی خصوصیت های نانوحامل-های لیپوزومی حاوی دوکسوروبیسین به دو روش فعال و غیرفعال از لحاظ میزان بارگذاری و رهایش دارو به منظور ارائه یک روش دارورسانی، صورت گرفته است. نتایج این پژوهش در مقایسه با پژوهش های مشابه نشان داده است که روش اتخاذ شده در مقاله حاضر به صورت مؤثری در کاهش سایز نانو ذرات و بهبود درصد درون گیری دوکسوروبیسین مفید بوده است (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه نتایج پژوهش های پیشین با مقاله حاضر

درصد بارگذاری دارو	سایز (نانومتر)	منبع
۵۱-۲۱ %	۷۰-۵۰	فنگ و همکاران (۲۰۱۳) (۸)
۹۸-۲۸ %	۱۳۴-۱۲۸	شاهین و همکاران (۲۰۱۲) (۱۶)
۹۰ %	۱۱۰	الیان و همکاران (۲۰۱۶) (۳)

سپاسگزاری

از خانم راحله احسانی، پژوهشگر مرکز بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، واحد بین الملل، یزد، ایران، جهت همکاری علمی سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Allen, T.M., Cullis, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 36–48.
2. Arora, A., Scholar, E.M., 2005. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 971–979.
3. Alyane, M., Barratt, G., Lahouel, M., 2016. Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells. *Saudi Pharm. J.* 24, 165–175.
4. Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O., 2012. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 206–212.
5. Chang, H.-I., Yeh, M.-K., 2012. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine* 7.
6. Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., Ribas, A., 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067–1070.
7. Doane, T.L., Burda, C., 2012. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2885–2911.
8. Fang, Y., Wu, X.G., Chen, J., Dang, S.C., Jiang, D.L., Chen, M., Xie, J.M., 2013. Preparation and Characterization of mPEG Modified Magnetic Long-Circulating Doxorubicin Hydrochloride Liposomes. *Adv. Mater. Res.* 661, 87–90. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.661.87
9. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), pp.E359-E386.
10. Fritze, A., Hens, F., Kimpf, A., Schubert, R., Peschka-süss, R., 2006. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient 1758, 1633–1640. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.028
11. Kennedy, L.C., Bickford, L.R., Lewinski, N.A., Coughlin, A.J., Hu, Y., Day, E.S., West, J.L., Drezek, R.A., 2011. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* 7, 169–183.
12. Lodish, H., 2008. *Molecular cell biology*, 6th ed. Macmillan, New York.
13. Maruyama, K., 2011. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 161–169.
14. Oakman, C., Moretti, E., Galardi, F., Santarpia, L., Di Leo, A., 2009. The role of topoisomerase II α and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat. Rev.* 35, 662–667.
15. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760. doi:10.1038/nnano.2007.387
16. Shahin, M., Soudy, R., El-Sikhry, H., Seubert, J.M., Kaur, K., Lavasanifar, A., 2013. Engineered peptides for the development of actively tumor targeted liposomal carriers of doxorubicin. *Cancer Lett.* 334, 284–292.
17. Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B., Liu, P.P., 2011. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz* 36, 296–305.
18. Sun, R., Liu, Y., Li, S.-Y., Shen, S., Du, X.-J., Xu, C.-F., Cao, Z.-T., Bao, Y., Zhu, Y.-H., Li, Y.-P., 2015. Co-delivery of all-trans-retinoic acid and doxorubicin for cancer therapy with synergistic inhibition of cancer stem cells. *Biomaterials* 37, 405–414.

19. Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., Altman, R.B., 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 440.
20. Zucker, D., Andriyanov, A. V, Steiner, A., Raviv, U., Barenholz, Y., 2012. Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy. *J. Control. release* 160, 281–289.

