مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هشتم - پائیز ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

# ارزیابی روش شیب آمونیوم سولفات گذرنده از غشا در سامانه لیپیدی برای بهبود ظرفیت به دام اندازی داروهای آمفی‌پاتیک 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 آکتا، 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 گلیسریو 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 nmو در روش گرادیان pH ۱۰۵/۹nmبه‌دست آمده است. راندمان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین نانولیپوزومه به ترتیب ۱۵/۶۵ و ۸۹ به‌دست 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، علی رغم این که چه عاملی باعث سرطان شده و چه آسیبی به سلول‌ها رسیده باشد. سلول‌های سالم بدن طبق برنامه منظمی 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

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

سلول‌های سالم به سرعت رشد می‌کنند؛ اما این اتفاق فقط تا زمانی رخ می‌دهد که فرد به بلوغ کامل می‌رسد. در دوران بلوغ در بیش‌تر نقاط بدن سلول‌ها زمانی رشد می‌کنند و تقسیم می‌شوند که لازم است سلول‌های تازه را جایگزین سلول‌های فرسوده، مرده یا در حال مرگ کنند. در مواردی هم که بافت‌ها آسیب می‌بینند (زخم، شکستگی)، سلول‌های سالم به سرعت رشد کرده و تقسیم می‌شوند تا بافت آسیب دیده را ترمیم کنند. اما سلول‌های سرطانی برخلاف سلول‌های عادی، نمی میرند بلکه بی‌وقفه رشد می‌کنند، تقسیم می‌شوند و به طور مداوم سلول غیرعادی تولید می‌کنند (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 می‌میرند). سرطان هزاران سال پیش شناسایی شده و بیش از پنجاه سال است که دانشمندان به طور گسترده‌ای در این زمینه تحقیق می‌کنند. اما هنوز دارویی برای درمان سرطان به‌دست 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 متداول‌ترین روش‌های درمان سرطان شیمی‌درمانی است. شیمی‌درمانی متداول، عملکرد اندامک‌های سلولی را مانند میتوکندری مختل نموده و از انجام فعالیت‌های آنزیمی کلیدی ممانعت می‌نماید تا همانندسازی DNA، نسخه برداری از RNA و ترجمه را بلوکه کرده و یا مستقیما به DNA آسیب می‌رساند تا تکثیر سلول‌های سرطانی را متوقف نموده و سمیت را در این سلول‌ها القا نماید (۲). یکی از داروهایی که به طور متداول برای شیمی‌درمانی استفاده می‌شود دوکسوروبیسین است که از آنتی بیوتیک‌های آنتراسایکلین بوده و در محدوده وسیعی از سرطان‌ها به کار برده می‌شود. فعالیت درمانی دوکسوروبیسین شامل فرآیندهای ورود مولکول‌های جدید به ساختار DNA، ممانعت از عملکرد توپوایزومراز II که سبب اختلال در سیستم ترمیم DNA می‌گردد، ایجاد رادیکال‌های آزاد و آسیب ناشی از آن‌ها در غشاهای سلولی، پروتئین‌ها و DNA و در نهایت ممانعت از سنتز اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) در سلول‌های سرطانی می‌باشد (۴، ۱۶). به طور خلاصه، دوکسوروبیسین به صورت یک متابولیت ناپایدار اکسیده می‌شود که طی فرآیندی دوباره به دوکسوروبیسین تبدیل می‌شود که گونه‌های فعال اکسیژن را آزاد می‌کند. گونه های فعال اکسیژن می‌توانند سبب پراکسیداسیون لیپید، آسیب به غشاء، آسیب به DNA، استرس اکسیداتیو شده و مسیرهای آپوپتوتیک مرگ سلولی را هدف گیری می‌کند (۱۹). ژن‌های کاندیدایی که ممکن است این مسیر را تعدیل کنند شامل دو دسته از ژن‌ها است دسته اول ژن‌هایی که قادر به واکنش اکسیداسیون بوده و دسته دوم شامل ژن‌هایی است که قادر به غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد نظیر گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیداز دسموتاز می‌باشند. از سوی دیگر دوکسوروبیسین می‌تواند وارد هسته شده و توپوایزومرازII را مهار کند که منجر به آسیب DNA و مرگ سلولی می‌شود (۱۹). ژن‌های کاندید در این بخش از مسیر شامل آنزیم‌هایی است که در مکانیسم‌های 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 می‌شود (۴).

نکته قابل توجه در رابطه با عوامل و روش‌های شیمی‌درمانی متعارف برای سرطان این است که این عوامل و روش‌ها به طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را هدف قرار نمی‌دهند. آن‌ها علاوه بر سلول‌های سرطانی سبب بروز سمیت در سلول‌ها و بافت‌های سالمی می‌شوند که در حال تکثیر سریع می‌باشند مثل مغز استخوان و دستگاه گوارش که البته موجب بروز عوارض جانبی نیز خواهند بود (۲). بنابراین جهت کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی، درمان هدفمند مد نظر قرار گرفت و یا به عبارت دیگر مطلوب این است که عوامل شیمی-درمانی توسعه یابند که بتوانند سلول‌های سرطانی را به طور فعال یا غیرفعال هدف قرار دهند (۱۵). در این راستا استفاده از تکنولوژی نانو در بهبود روش‌های درمانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. نانو پزشکی طی دهه‌های اخیر مزایای قابل توجهی را در درمان سرطان ارائه نموده است (۷،۶، ۱۵) که می‌تواند بر محدودیت‌های عوامل درمانی از طریق افزایش نیمه عمر در گردش خون، بهبود فارماکوکینتیک و افزایش جذب آن‌ها توسط سلول‌های توموری غلبه کند (۱۷). ثابت شده است که سیستم‌های حمل دارو با نانوذرات، راندمان درمانی را در برابر سخت‌ترین چالش‌های سرطان شامل مقاومت دارویی و متاستاز تومور افزایش می‌دهد (۱۷). بنابراین روش-



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

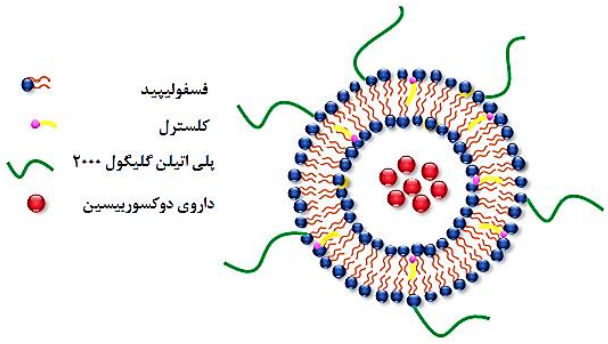
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

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 رسپتورهایی 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 دو لایه لیپیدی از محیط دیگر جدا می‌سازند. صدها دارو شامل عوامل ضدسرطانی و ضدمیکروبی، هورمون‌های پپتیدی، 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 تأئیدیه 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 تأئید 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 حالی‌که 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–Mn2+ در خارج از لیپوزوم است. به خوبی توضیح داده شده است که دوکسوروبیسین تشکیل کمپلکس کیلیت با کاتیون‌های چند بنیانی می‌دهد.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

هم‌چنین ذکر شده است که، دوکسوروبیسین می‌تواند به وسیله گرادیان سیترات یا سولفات، در لیپوزوم بارگذاری شود. در هر دو مفهوم، دوکسوروبیسین در بسته‌های الیاف مانند، درون لیپوزوم رسوب می‌کند (۱۰).

مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی و بررسی خصوصیت‌های نانوحامل‌های 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 روش‌ها

مواد مورد استفاده شامل: دی پالمیتول گلیسریو فسفوریل گلیسرول[1] (Lipoid GmbH- Germany)، کلسترول (Sigma-Aldrich Co, USA)، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ متصل به فسفولیپید (Lipoid GmbH- Germany)، دوکسوروبیسین (sigma, USA)، بافر۷/۴ 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 گلیسریو 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 rpm ۱۵۰، حذف گردید و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. فاز آبی مورد استفاده حاوی داروی دوکسوروبیسین می‌باشد. محلول آبی دوکسوروبیسن با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد به مدت مدت ۴۵ دقیقه تا یک‌ساعت و دور rpm ۱۵۰صورت گرفت. برای کاهش اندازه لیپوزوم‌های MLV و تشکیل SUVاز روش سونیکاسیون استفاده گردید، پروب دستگاه سونیکاسیون در داخل محلول کلوئیدی لیپوزوم‌ها 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 حاویPBS با حجم۱۵۰برابر حجم لیپوزوم به مدت دو ساعت در دمای ۴درجه 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 ۶-۵ سی سی کلرفرم اضافه و حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار، در دمای حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای کلروفرم و با دور تقریبی rpm ۱۵۰، 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 می‌گیرد. ۳سی سی از بافر سولفات آمونیوم به فیلم نازک اضافه شد و به صورت سونیکیت حمامی و همزمان چرخش روتاری به مدت یک ساعت قرار داده‌شد. درهمان دقایق اول مایع شیری رنگ تشکیل شد که همان لیپوزوم‌های MLV می‌باشد. 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 لیپوزوم‌ها از کیسه دیالیز سلولزی (یا معمولی) استفاده شد. لیپوزوم‌ها 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 لیپوزوم‌های تهیه شده پس از ایجاد گرادیان pH

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



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

لیپوزوم‌ها داخل بالن ته گرد ریخته شده و محلول آبی ۱/۵ سی سی داروی دوکسوروبیسن با غلظت یک میلی-گرم بر میلی لیتر به آن اضافه شد. انباشتن دارو توسط روتاری چرخان در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت صورت گرفت. پس از انباشتن دارو به منظور جدا نمودن داروی انباشته نشده، هم‌چنین 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 هم‌چنین پیک اندازه ذرات تعیین گردید. محدوده توزیع اندازه ذرات و هم‌چنین پیک اندازه ذرات با استفاده DLS تعیین می‌شود 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 سانتی‌گراد 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 X-100(۱٪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 به‌دست آمد.

## بررسی نحوه رهایش داروی فرمولاسیون‌های لیپوزومی

برای بررسی روند رهایش دارو از لیپوزوم‌ها در محیط برون‌تن، ابتدا باید محیط انحلالی که بتواند شرایط سینک را برقرار کند، انتخاب می‌شد. بدین منظور طی آزمایشی محلولیت اشباع دوکسوروبیسین در فسفات بافر سالین محاسبه گردید. بعد از تعیین محیط انحلالی مناسب، حجم مشخصیش از لیپوزوم‌های حاوی دوکسوروبیسین هیدروکلراید داخل کیسه دیالیز سلولزی ریخته شده و در دمای ۳۷ °C در ۱۰ میلی‌لیتر از محیط آزادسازی قرار گرفت و در زمان‌های مشخص نمونه برداری صورت گرفت.

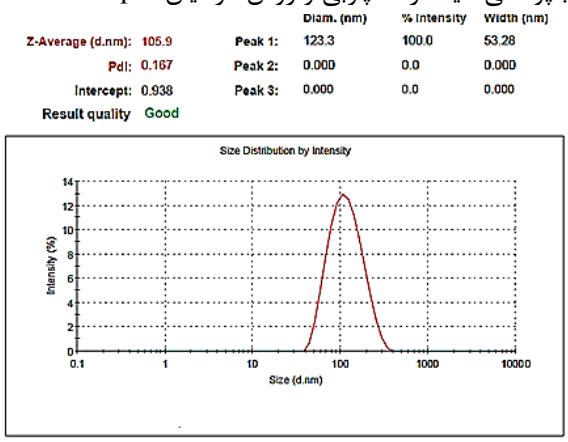
## بررسی مورفولوژی

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

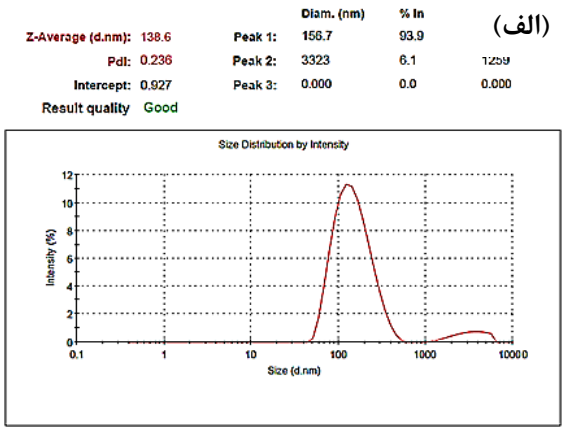
# یافته‌ها

## تعیین اندازه نانولیپوزوم‌ها

همان‌گونه که در تصویر ۲ نشان‌داده شده است، میانگین اندازه نانوذرات ساخته شده در روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی ۴/۹ nm ± ۱۳۸/۶ و در روش گرادیان pH ۳/۸ nm ± ۱۰۵/۹ به دست آمده است. توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش یکنواخت بوده و برابر ۰/۱ ± ۰/۲۳۶ و ۰/۰۴ ± ۰/۱۶۷ به ترتیب در روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیان pH هست.




(الف)






[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

**(ب)**

تصویر۲- مقایسه اندازه و توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده با استفاده از روش گرادیان pH (الف) و آب‌پوشانی لایه نازک چربی (ب)، محور افقی قطر هیدرودینامیکی ذرات برحسب نانومتر و محور عمودی شدت می‌باشد.

## بررسی پتانسیل زتا

در جدول ۱ پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی و گرادیان pH آورده شده است. نتایج حاکی از تفاوتی چشم‌گیر در میزان پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده با استفاده از هر دو روش نمی‌باشد.

## بررسی میزان داروی بارگذاری شده

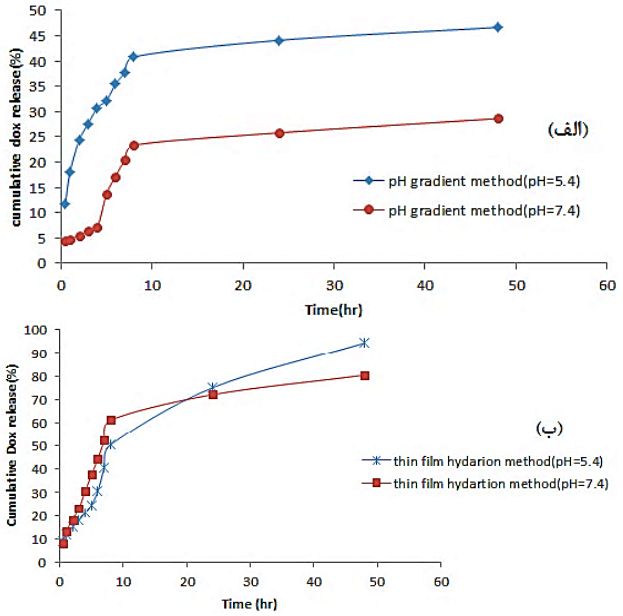
در جدول ۱ مقدار داروی بارگذاری شده با استفاده از هر دو روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی و گرادیان pH نشان داده شده است. مقدار داروی بارگذاری شده به روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی برابر ۸/۶۵ ± ۱۵/۶۵٪ و مقدار داروی بارگذاری شده به روش گرادیان pH برابر است با ۴/۳۵ ± ۸۹ ٪. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، روش گرادیان pH دارای راندمان بارگذاری بسیار بالاتری از روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی است. به طورکلی داروهای آب‌دوست دارای راندمان بارگذاری پایینی در روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی هستند. مولکول‌های کوچک دوکسوروبیسین تنها با روش گرادیانی قابلت بارگذاری مؤثر در لیپوزوم‌ها را دارد.

جدول۱- اندازه، پتانسیل زتا و راندمان بارگذاری نانولیپوزوم‌های ساخته شده به روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی و روش گرادیان pH

| روش تهیه لیپوزوم | درصد بارگذاری دارو | سایز ( نانومتر) | پتانسیل زتا (میلی ولت) |
|---|---|---|---|
| هیدراتاسیون لایه نازک | ۸/۶۵ ± ۱۵/۶۵ | ۴/۹ ± ۱۳۸/۶ | -۲/۶۶ |
| گرادیان pH | ۴/۳۵ ± ۸۹ | ۳/۸ ± ۱۰۵/۹ | -۳/۷ |

## بررسی رهایش دارو

مقدار داروی دوکسوروبیسین آزاد شده از فرمولاسیون دوکسوروبیسین نانولیپوزومه در بافر PBS با pH خنثی و ۵/۴ و در طی بازه‌های 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 می‌باشد. این نمودار نشان می‌دهد که حداکثر مقدار داروی آزاد شده از لیپوزوم‌ها در مدت ۴۸ ساعت 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. شایان توجه هست با اسیدی کردن بافر داروی آزاد شده از لیپوزوم‌های ساخته شده به روش گرادیانی به میزان چشم‌گیری 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 لیپوزوم‌های ساخته شده به روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی با تغییر pH محیط رهایش چندان تغییر نکرده است.




تصویر۳- نمودار رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات ساخته شده به روش گرادیان pH (الف) و روش آب‌پوشانی لایه ناک چربی (ب) در بافر خنثی و اسیدی

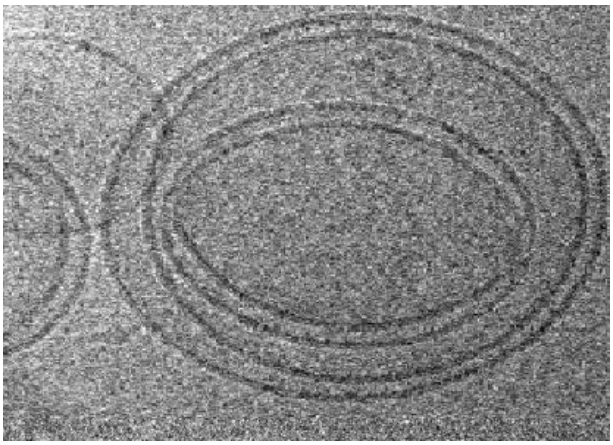
## تصویر برداری cryo-TEM از نانو لیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین

دو لایه بودن غشاء و ساختار بیضوی‌گونه نانو لیپوزوم‌های حامل دارو در تصویر۴ گرفته شده با میکروسکوپ الکترونیکی انتقالی (cryo-TEM) (با توان ۱۵۰ کیلو ولت) به طور کامل قابل رؤیت است.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]



تصویر۴- تصویر میکروسکوپی عبوری از نانوذرات لیپوزومی حاوی دوکسوروبسیسین

## بحث

سرطان همواره یکی از اساسی‌ترین مشکل‌های جوامع بشری بوده است. شایع‌ترین روش درمانی، شیمی‌درمانی است که به تنهایی و یا با شیوه‌ای درمانی دیگر استفاده می‌شود. دوکسوروبیسین، دارویی از دسته آنتراسیکلین‌ها بوده و آنتی بیوتیکی است که توسط استرپتومایسس پیوستیوس واریته کاسیوس تولید می‌شود. دوکسوروبیسین علیه تعدادی از انواع تومورها وارد عمل می‌شود، که اثرضد سرطانی را با مهار توپوایزومراز II انجام می‌دهد. شیوه‌های شناسایی و درمانی در سرطان در حال بهبود یافتن است. نانو فناوری یک حوزه میان رشته‌ای بوده و کاربردهای وسیعی در بیولوژی سرطان مانند شناسایی تومور، کشف نشانگرهای زیستی سرطان و گسترش درمان‌های جدید دارد. این رشته به سرعت در حال تکامل و گسترش می‌باشد.

لیپوزوم، یک وزیکول[2] دو لایه‌ای فسفولیپیدی که یک فضای آبی را در برگرفته است. ضخامت دو لایه لیپیدی ۳ تا ۶ نانومتر است. لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن خصوصیت آمفی‌پاتیک[3]، می‌توانند داورسانی داروهای آب‌دوست و چربی‌دوست را انجام دهند. لیپوزوم‌ها از مولکول‌های دوگانه‌دوست به نام فسفولیپیدها تشکیل شده‌اند. لیپوزوم-ها وزیکول‌های زیست سازگار و غیر سمی هستند که از جهت هم‌جنس بودن با غشای سلولی بسیار مورد توجه هستند.

مولکول DPPG یک فسفولیپید سنتزی است که شباهت زیادی با فسفاتیدیل کولین دارد. زنجیره‌های آسیل در طول فسفولیپید خنثی DPPG تقریبا ۱۵ کربن است که زنجیره‌ای سخت و غیرقابل انعطاف است. این موضوع نشت دارو را در مراحل آماده‌سازی لیپوزوم‌های حاوی دارو کاهش می‌دهد؛ در نتیجه بازده درون گیری نهایی افزایش می‌یابد و رهایش دارو به صورت آهسته پیش می‌رود. هم‌چنین دمای انتقال DPPG بالاتر از $37\ ^{\circ}C$ بوده است بنابراین نیمه عمر لیپوزوم‌های سنتز شده با DPPG داخل بدن طولانی‌تر است.

پلیمر PEG مورد استفاده در سطح حامل‌های لیپوزومی، پلیمری زیست‌سازگار، غیرآنتی‌ژنیک و در مقابل پروتئین مقاوم است و می‌تواند زمان چرخش ذرات را در خون افزایش دهد. در تحقیقی، PEG دار کردن لیپوزوم حامل یک داروی ضدتومور، زمان نیمه عمر دارو را در پلاسما تا هشت برابر افزایش داده است. پگیله کردن پایداری نانوذرات را داخل بدن بهبود می‌بخشد. پگیله کردن، درون‌گیری داروی آبدوست را (بخاطر افزایش میزان فضای مائی) و اندازه قطر متوسط (به‌علت ممانعت فضایی) را افزایش می‌دهد، رهایش دارو را کاهش و نانو ذره را پایدارتر می‌کند. هم‌چنین به دلیل افزایش ممانعت فضائی، شاخص پراکندگی کاهش می‌یابد و مانع اگلومره شدن ذرات می‌شود. زوکر و همکاران در سال ۲۰۱۲، بارگذاری کارآمد وموثر دو داروی تپوتکان و وین‌کریستین 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 هم‌چنین دو دارو بارگذاری شده در داخل و خارج فاز آبی استفاده کردند (۲۰). در نهایت تعیین خصوصیت‌های سامانه طراحی شده گام مهمی است که برای حمایت مطالعه‌های بالینی آینده می‌باشد و برای اطمینان از این‌که

[2] Vesicle
[3] amphipathic



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

محصول لیپوزومی مورد نظر خصوصیت‌های زیستی مناسبی از فرمولاسیون حاوی دارو را دارد.

کلسترول مولکولی است که جهت افزایش پایداری درون-تن به فرمولاسیون نانو ذره افزوده می‌شود کلسترول هم-چنین به دلیل زیست سازگاری با بدن، به فرمولاسیون نانوذره افزوده می‌شود. زنجیر کلسترول، سفت و محکم است و باعث افزایش پایداری ساختار نانوذره می‌شود و بازده درون‌گیری را افزایش می‌دهد. کلسترول دارای دو رویکرد متفاوت در غلظت‌های مختلف دارد. کلسترول در غلظت‌ها بالا مانع تحرک زنجیره‌ها می‌شود و باعث می-شود غشا سخت باشد و ورود دارو با محدودیت روبرو باشد و درهمین حال نشت دارو در مراحل آماده سازی هم کم-تر باشد هم‌چنین رهایش نیز آهسته‌تر و سیستم پایدار باشد. کلسترول در غلظت پایین و کم‌تر از نسبت مولی ۰/۵ گرچه غشا انعطاف‌پذیرتر است و ورود دارو هنگام درون‌گیری افزایش می‌یابد ولی نشت دارو در حین آماده سازی نیز کاهش می‌یابد که همین مساله درصد انکپسولیشن نهایی را کاهش می‌دهد و رهایش دارو را نیز افزایش می‌دهد.

رهایش آهسته دارو در مقادیر بالاتر pH رخ می‌دهد. پروفایل رهایش دارو در pH ۵/۴ که متناسب با سطح pH در سلول‌های اندوزومال می‌باشد، سریع‌تر است و مدل ارائه شده مدل مناسبی جهت رسانش کنترل شده دارو در بافت سرطانی است. هم‌چنین می‌توان این‌گونه استنباط کرد که فرمولاسیون جدید لیپوزومی حساس به pH است و می‌تواند به عنوان یک هدفمندی غیرفعال برای تحویل-دهی به سلول‌های اندوزومی عمل کند، در حالیکه در شرایط فیزیولوژیک، رهایش کم دارو اتفاق می‌افتد. سلول-های سرطانی دچار کمبود اکسیژن هستند که شرایط هیپوکسی نام دارد. این شرایط منجر به کاهش pH درون سایت سرطانی می‌شود. فرمولاسیون پیشنهاد شده به خاطر خاصیت حساس به pH می‌تواند از آسیب رسیدن به سلول‌های 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 درون‌گیری داروهای آب‌دوست و دوگانه دوست استفاده می‌شود. لیپوزوم تهیه و پس از آن دارو را با شیب یون برای تسهیل جذب دارو به داخل لیپوزوم لود می‌شود. این روش مزیت‌های 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 می‌شود سپس با اسید سیتریک و یا سولفات آمونیوم هیدراته و سپس کاهش سایز سونیکیت می‌شود تا وزیکول‌های چند لایه شکل گیرند. به این سوسپانسیون محلول آبی دارو اضافه می-شود.

در این پژوهش به‌کار گیری این روش ضمن تأثیر مثبت در درون‌گیری دارو بر روی خصوصیت‌های سطحی نانو ذرات از جمله شارژ و سایز هم تأثیر می‌گذارد. نکته جالب این است که فرمولاسیون تهیه شده با این روش نوین بیش‌تر وابسته و حساس به pH است.

## نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که اثر دوکسوروبیسین لیپوزومه به روش فعال بیش‌تر از روش غیرفعال است. مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی و بررسی خصوصیت‌های 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 پژوهش‌های مشابه نشان داده است که روش اتخاذ شده در مقاله حاضر به صورت مؤثری در کاهش سایز نانو ذرات و بهبود درصد درون‌گیری دوکسوربیسین مفید بوده است (جدول ۲).

جدول۲- مقایسه نتایج پژوهش‌های 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) |



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

## سپاسگزاری

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

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

## 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 IIα 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.


[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

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.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.28.6.0 ]
[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-06 ]