مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید نانو حامل لیپوزوم از لسیتین و بارگذاری داروی سیس پلاتین بر روی آن

علیرضا بزرگ نژاد[۱]، فاطمه باغی*[۲]، عباس زمان پور نیاوران[۳]، عظیم اکبرزاده[۴]، مهدی ارجمند[۵]

[۱] کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی-مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی-مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی-مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۴] استاد، پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۵] دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در پژوهش حاضر، هدف تولید نانولیپوزوم حامل داروی سیس پلاتین بود که برای دارو رسانی هدفمند برای درمان انواع سرطان به کار گرفته می شود، که با درصد بارگذاری مناسب به این مهم دست یافتیم.

مواد و روش ها: لیپوزوم از یک منبع لسیتین استخراج شد و پس از انحلال در بافر فسفات، به منظور بارگذاری سیس پلاتین بر لیپوزوم ساخته شده و تغییر اندازه ذرات به ابعاد نانو محلول در سونیکاتور حمام دار سونیکه شد.

یافته ها: میزان کل پلاتین موجود در محلول سونیکه شده مشخص است. پلاتین موجود در فاز شفاف محلول بعد از فرآیند اولتراسانتریفیوژه به کمک تست جذب اتمی معین می گردد. با کم کردن این دو مقدار از هم به میزان پلاتین موجود در فاز ته نشین دست یافتیم. همچنین با استفاده از دستگاه زتاسایزر اندازه ذرات در ابعاد نانو تایید شد.

نتیجه گیری: لیپوزوم به عنوان یکی از حامل های لیپیدی جدید برای دارورسانی هدفمند جهت درمان انواع سرطان شناخته شده است . برای حذف اثرات جانبی دارو بر سایر سلول ها و رسیدن دوز بالاتری از دارو به سلول هدف داروی ضد سرطان سیس پلاتین در لیپوزوم کپسوله می شود .

کلمات کلیدی: لیپوزوم، سیس پلاتین، دارورسانی هدفمند، بارگذاری

مقدمه

همان طور که بهمن ابراهیمی حسین زاده و همکارانش در سال ۱۳۹۰ (۴) بیان کردند، یکی از اهداف نانو فناوری سوارکردن مولکول‌ها و داروها بر روی مواد حامل (نانو ذره) و سپس فرستادن و رها کردن آن‌ها به درون سلول می‌باشد. دارورسانی هدف دار موضوع جدیدی نیست و تاریخچه آن طبق تحقیقات محمد رضا مظفری و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۶) به اوایل قرن بیستم، هم زمان با طرح گلوله‌ی سحرآمیز از سوی ارلیخ، برمی‌گردد. اما هنوز تهیه و بکارگیری آن برای آزمایش‌های بالینی یک چالش بزرگ است. این چالش شامل پیدا کردن هدف مناسب برای یک بیماری خاص، یافتن دارویی مناسب جهت درمان بیماری مورد نظر و پیدا کردن حاملی مناسب برای رساندن دارو به اندام هدف می‌باشد، به شکلی که این حامل از سیستم ایمنی بدن (که مواد بیگانه را به سرعت از گردش خون حذف می‌کند) در امان باشد. نیما رضایی و همکارانش در سال ۱۳۸۳ این فرآیند را به خوبی تشریح کرده اند (۵). همان طور که بهمن ابراهیمی حسین زاده و همکارانش در سال ۱۳۹۰ نشان دادند (۴) نانو ذرات با پوشش محافظ برای دوری از سیستم ایمنی بدن و لیگاندهایی جهت هدف قرار دادن سلول یا بافت خاص، بسیاری از ویژگی‌های لازم یک گلوله‌ی سحرآمیز

آدرس نویسنده مسئول: گروه مهندسی شیمی – مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ایران
Email: Fatemehbaghi63@gmail.com
/تاریخ دریافت مقاله :۱۳۹۰/۱۲/۰۲۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۰۴/۱۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6]

را برآورده می‌سازند. تشابه ساختمان های دو لایه لیپوزوم با غشا سلول و توانایی محدود سازی مواد هیدروفیلیک و لیپوفیلیک بوسیله لیپوزوم و کندی عبور برخی مواد از جدار دو لایه لیپیدی آن ها اساس کاربردهای وسیع این ماده را در تحقیقات درمانی و زیست شناسی پی ریزی کرده است. پیرامون خواص گوناگون لیپوزوم ها محمد رضا مظفری و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در کتاب شان توضیحات بسیار دقیق و مفصلی شرح داده اند (۶). تحقیقات زیادی پیرامون روش های مختلف ساخت لیپوزوم ها و به کارگیری لیپوزوم به عنوان نانو حامل دارویی توسط الهام صالحیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ و فریبا سید زاده در سال ۱۳۸۵ و ایمان محمودی و همکاران در سال ۱۳۹۰ صورت پذیرفته است (۱، ۲، ۳). که گویای اهمیت لیپوزوم ها در مبحث های داروسازی و درمان انواع بیماری ها به ویژه سرطان ها می باشد. مکانیسم های مختلف تاثیر متقابل سلول و لیپوزوم را می توان به صورت ذیل خلاصه کرد.

۱- جذب سطحی :محتویات لیپوزوم در طی دیفیوژن ساده از لیپوزوم خارج می شود در حقیقت لیپوزوم به عنوان یک مخزن پخش عمل می کند که بتدریج محتویات خود را آزاد می کند.

۲- اندوسیتوز: با فرو رفتگی ای که در غشا سلول اتفاق می افتد، لیپوزوم به تدریج داخل سلول بلعیده می شود (این عمل به شدت توسط سلول های ماکروفاژ صورت می گیرد) و پس از ورود لیپوزوم به داخل سلول اطراف آن را لیزوزوم احاطه کرده و آن را منهدم می کند.

۳- تعویض لیپید: چون غشاهای دو لایه سلول و لیپوزوم هر دو از فسفو لیپید تشکیل شده است امکان تعویض لیپید بین غشا ها وجود دارد.

۴- همجوشی: زویرس و همکارانش در سال ۲۰۰۴ اثبات کردند که به علت شباهت ساختار غشایی لیپوزوم با سلول، لیپوزوم به غشا سلولی جوش خورده، اتصال پیدا می کنند (۱۲). در پژوهش حاضر، هدف تولید نانو لیپوزوم حامل داروی سیس پلاتین می باشد که جهت دارو رسانی هدفمند برای درمان انواع سرطان به کار گرفته می شود، که با در صد بارگذاری مناسب داروی سیس پلاتین بر روی نانو حامل لیپوزوم به این مهم دست یافته شد.

مواد و روش ها

تخلیص لیپوزوم: فرآیند تخلیص لیستین از یک منبع ساخت[۱] کشور بلژیک انجام شد. طبق پروتوکل به کار گرفته شده توسط شوارتز و همکارانش در سال ۱۹۹۴ از این منبع مقدار ۲ گرم ژلوز جامد درون یک ارلن اتوکلاو شده ریخته و برای حل کردن آن از ۳۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ استفاده شد (۱۱). برای حل شدن هر چه بهتر ژلوز، ۱۰ میلی لیتر دیگر اتانول ۹۶٪ به آن اضافه گردید. در نهایت برای رسیدن به حلالیت هر چه بیشتر ژلوز در اتانول ۵۰ میلی لیتر اتانول مورد استفاده قرار گرفت. برای حل شدن کامل ژلوز لیستین از روش رابینسون و همکارانش که در سال ۲۰۰۳ به کار گرفته شده است، استفاده شد (۸). به این صورت که تمامی محلول داخل یک بالن شیشه ای ریخته شده و به یک دستگاه مبرد که دارای ورودی و خروجی آب است متصل گردید. مراحل خالص سازی لیستین توسط روتاری حمام دار که به شیر آب جهت ایجاد خلا متصل است انجام گرفت. شرایط مناسب برای خالص سازی این مقدار ژلوز لیستین به صورت دمای $50\ C^o$ و دور ۹۰rpm می باشد.

بارگذاری داروی سیس پلاتین روی لیپوزوم : ۰/۵ گرم ژلوز لیستین خالص شده و ۶۰ میلی لیتر بافر PBS توسط همزن بعد از گذشتن حدود ۱۵ دقیقه به صورت محلولی یکنواخت در می آمدند. داروی سیس پلاتین به نسبت ۱ به ۱۰۰ (۵ میلی لیتر سیس پلاتین) و به صورت قطره قطره به محلول اضافه شد. بعد از گذشتن حدود ۱۰ دقیقه محلول حاوی سیس پلاتین و لیستین و بافر PBS به رنگ زرد روشن و شفاف در آمد. جهت تکمیل فرآیند بارگذاری داروی سیس پلاتین بر روی حامل لیپوزوم و دست یافتن به ابعاد نانو، ارلن حاوی محلول برای مدت زمان ۱۰ دقیقه درون دستگاه سونیکاتور حمام دار با قدرت ۶۰ وات و فرکانس ۳۰kHz قرار داده شد. بعد از این مرحله حامل های لیپوزومی به ابعاد نانو در آمدند. جهت بررسی مقیاس لیپوزوم تولید شده در ابعاد نانو از دستگاه زتا سایزر استفاده شد. در دستگاه مورد استفاده لیزر، قرمز با طول

۱- ساخت کارخانه Acros در کشور بلژیک و تحت لیسانس امریکا
CAS No: 8002-43-5

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6]

موج ۶۳۳ نانو، متر برای اندازه گیری اندازه متوسط ذرات به کار گرفته شد. با توجه به اعداد خروجی دستگاه، اندازه متوسط نانو ذرات تولید شده لیپوزوم ۷۲,۴۴ نانومتر و پتانسیل زتا معادل ۶۸. ۲۳- میلی ولت حاصل شد.

بررسی میزان بارگذاری سیس پلاتین برلیپوزوم: جهت جداسازی داروی کپسوله شده با لیپوزوم از دستگاه اولترا سانتریفیوژ استفاده شد. رسوب به دست آمده از فرآیند اولترا سانتریفیوژ در واقع ذرات سنگین شامل داروی کپسوله شده توسط نانو حامل های لیپوزوم می باشد. برای دست یابی به درصد بارگذاری سیس پلاتین بر نانو لیپوزوم مقداری از محلول سونیکه شده با وزن مشخص در میکروتیوب های مخصوص اولترا سانتریفوژ ریخته شده و با دور ۴۵۰۰۰rpm و مدت زمان ۴۵ دقیقه اولتراسانتریفیوژ گردید. پس از انجام فرآیند اولتراسانتریفیوژ، محلول درون میکروتیوب ها به صورت دو فازی در آمد. سوپ رویی حاوی در صدی از دارو است که بر روی نانو لیپوزوم بارگذاری نشده است. میزان سیس پلاتین موجود در فاز شفاف رویی با کمک تست جذب اتمی (Atomic Absorption) معین گردید.

یافته ها

محاسبه درصد بارگذاری سیس پلاتین روی نانو لیپوزوم :

برای محاسبه میزان داروی بار گذاری شده روی نانو حامل لیپوزوم، فاز رویی شفاف درون میکروتیوب ها که به عنوان سوپرناتانت و فاز نیمه جامد پایینی به عنوان فاز ته نشین در نظر گرفته می شد. فاز سوپر ناتانت برای تعیین میزان سیس پلاتین موجود در آن به فرآیند جذب اتمی فرستاده شد.

ρ_{PBS}=7.6 g/cm^3

$\rho_{cisplatin}$=3.738 g/cm^3

$\rho_{lecithin}$=1.05 g/cm^3

M_{PBS}=239.3 g/mol

$M_{cisplatin}$=300 g/mol

$M_{lecithin}$=750 g/mol

$V_{lecithin}$=(0.5 g lecithin)/(1.05 (g lecithin)/cm^3)) = 0.47

$$V_{total} = 60 + 5 + 0.47 = 65.47\ ml$$

$$\rho_{solution} = \frac{0.47}{65.47} * 1.05 + \frac{60}{65.47} * 7.6 + \frac{5}{65.47} * 3.738 = 7.247\ g/cm^3$$

$$M_{solution} = \frac{0.47}{65.47} * 750 + \frac{60}{65.47} * 239.3 + \frac{5}{65.47} * 300 = 247.59\ g/mol$$

برای محاسبه ی نسبت تعداد ذرات سیس پلاتین به تعداد ذرات محلول در ابتدای فرآیند بارگذاری خواهیم داشت:

$$\frac{5}{65.47}\frac{ml\ cisplatin}{ml\ solution} * \frac{ml\ solution}{7.247\ g} *$$

$$\frac{247.59\ g\ solution}{6.02*10^{23}\ particle\ solution} * \frac{mg\ cisplatin}{ml\ cisplatin} * \frac{g\ cisplatin}{10^3\ mg\ cisplatin}$$

$$* \frac{6.02*10^{23}\ particle\ cisplatin}{300\ g\ cisplatin} = 8.6 * 10^{-6}\ \frac{particle\ cisplatin}{particle\ solution}$$

برای قابل استفاده شدن جواب به دست آمده از دستگاه جذب اتمی می بایست نتیجه به دست آمده از دستگاه برای ذرات سیس پلاتین مورد نظر باز نویسی شود.

عدد خروجی از فرآیند جذب اتمی با توجه به احتمال اینکه پلاتین شناسایی شده همان پلاتین های موجود در ترکیب سیس پلاتین می باشد، باز نویسی شد.

$$Cisplatin \rightarrow Cl_2H_6N_2Pt$$

$$PBS \rightarrow NaCl + KCl + Na_2HPO_4.2H_2O + KH_2PO_4$$

$$Pt\ presence\ in\ Cisplatin\ compound\ Probability = \frac{2}{4} * \frac{6}{13} * \frac{2}{2} * \frac{1}{1} = 0.23$$

$$Atomic\ Absorption\ Result = 29\ ppm = 29 * 10^{-6}\ \frac{particle\ platin}{particle\ solution}$$

$$Modified\ Atomic\ Absorption\ Result = 0.23 * 29\ ppm = 6.67 * 10^{-6}\ \frac{particle\ platin}{particle\ solution}$$

$$Cisplatin\ presence\ in\ sediment\ phase = 8.6 * 10^{-6} - 6.67 * 10^{-6} = 1.93 * 10^{-6}\ \frac{particle\ cisplatin}{particle\ solution}$$

میزان اولیه سیس پلاتین به کار گرفته شده معادل ۸/۶ ppm می باشد. سیس پلاتین بارگذاری شده روی نانو لیپوزوم بعد از فرآیند بارگذاری نیز معادل ۱,۹۳ppm است. بنا بر این درصد بارگذاری سیس پلاتین روی نانو حامل لیپوزوم عبارت است از :

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6]

$$Loading\ Percentage = 22.44\ \%$$

بحث

نتایج به دست آمده از این تحقیق که از مهم ترین آن ها دست یافتن به درصد بارگذاری ۲۲/۴ درصد می باشد با توجه به نتایج سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه توسط پتر و همکاران در سال ۱۹۹۸، آبرا روبرت و همکاران در سال ۱۹۹۹و پتل و همکاران در سال ۲۰۰۴ که به ترتیب به درصد های بارگذاری ۲۱٪ و ۱۸٪ و۳۱٪ دست یافته اند، بسیار منطقی و قابل اتکا می باشند (۷ ، ۱۰،۹). چراکه نانو حامل به کار گرفته شده در این تحقیق از ابعاد کوچک تری نسبت به نانو حامل های لیپیدی تحقیقات ذکر شده برخوردار است و این اندازه کوچک تر موجب نفوذ هر چه بیشتر داروی بارگذاری شده به درون سلول مورد نظر می گردد. در این تحقیق در فرآیند بارگذاری سیس پلاتین بر روی نانو لیپوزوم از بافر فسفات استفاده شده است در حالی که در برخی از پژوهش ها از حلال های آلی مانند استون استفاده شده است که همین امر موجب متمایز شدن این تحقیق نسبت به سایر پژوهش ها و حذف اثرات جانبی استفاده از حلال های آلی می گردد. استفاده از لیپوزوم به عنوان حامل دارو مزیت دیگری نیز دارد و آن سازگار بودن ساختار لیپوزوم با بدن انسان به دلیل تشابه ساختمان های دو لایه لیپوزوم با غشا سلول و توانایی محدود سازی مواد هیدروفیلیک و لیپوفیلیک بوسیله لیپوزوم و کندی عبور برخی مواد از جدار دو لایه لیپیدی لیپوزوم می باشد که همین امر موجب می شود تا داروی بار گذاری شده بر روی لیپوزوم هنگامی که وارد بدن می شود سیستم دفاعی بدن به آن واکنشی نشان نداده و در نتیجه دارو پایداری بیشتری در بدن انسان داشته باشد. با توجه به منابع موجود جهت تولید لیپوزوم که بسیار در دسترس و مقرون به صرفه اند، انتظار می رود کاربرد های این حامل دارویی مفید و ارزشمند هر چه بیشتر به سمت تولیدات صنعتی پیش برود. می توان توسط نانو حامل لیپوزوم دارو های موجود برای درمان انواع سرطان را کپسوله کرده و موجب افزایش پایداری و اثر بخشی آن ها شد. از مهم ترین فواید کپسوله کردن دارو توسط نانو حامل لیپوزوم کاهش اثرات سوء دارو بر سلول های سالم بدن بیمار می باشد که به نحوی می توان آن را دارو رسانی هدفمند با کمک نانو حامل لیپوزوم نامید. امید است با به کارگیری شیوه های نوین دارو سازی از جمله کپسوله کردن انواع دارو های سرطان .به تولید نسل جدیدی از دارو ها با کارآیی هرچه بیشتر رسید

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است که بدین وسیله از زحمات و مساعدت های مسئولین این بخش و جناب آقای مهندس جوادیان مسئول محترم انجام فرآیند جذب اتمی بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران سپاسگزاری می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6]

منابع

(۱) ابراهیمی حسین زاده ب، عباسی ع، شکی ح،کوچکی ا، افشاری ح، محمدی یزدی س، فناوری نانو در پزشکی، دارورسانی و سلامت و کاربردهای آن، اول، برد ، ۱۳۹۰، ۲۵-۷۰

(۲) رضایی ن، آقا محمدی ا، پورپاک ز، محمودی م، دستگاه ایمنی بدن و عوامل بیماری زا ،دوم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۳، ۱۰-۵۱.

(۳)سید زاده ف . بررسی و معرفی لیپوزوم‌ها به عنوان حاملان دارو . ششمین همایش ملی دانشجویی مهندسی شیمی و پنجمین همایش ملی دانشجویی مهندسی نفت .اصفهان،دانشکده فنی دانشگاه صنعتی اصفهان.، ۱۱۲۸،۱۳۸۵ -۱۱۲۱.

(۴) صالحیان الف، محمدآبادی م، مظفری م، شجاعی باغینی م. روش های ساخت و مکانیسم تشکیل وزیکول های لیپیدی. دومین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی.کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۱۳۸۸. ۱۶۶-۱۵۹.

(۵) محمودی الف، اریانا م، اعتمادی ع، بازیار م. کاربرد نانوتکنولوژی در داروسازی و لیپوزوم ها، سیستم های نوین دارورسانی در مقیاس نانو. همایش کاربرد نانوتکنولوژی در صنایع نفت و پتروشیمی. ماهشهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماهشهر، ۱۳۹۰، ۳۲-۲۸.

(۶) مظفری م ر،خسروی ک، نانو مواد و نانو سامانه ها برای کاربرد های زیست پزشکی، اسپرینگر، اول ۲۰۰۶، ۱۹۰-۵۸.

(7) Abra Robert M ,Reis K. Hydrophobic Cis-Platinum Complexes Efficiently Incorporated into Liposomes, SP Inc., US5178876 US Patent, 1999.

(8) Patel SS, Bandwar RP.Fluorescence Methods for Studying the Kinetics and Thermodynamics of Transcription Initiation. Meth Enzymol, 2004; 370:668-686.

(9)Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F. Krammer PH, Kumar S,The Death Receptors in Apoptosis: Biology and Mechanisms Results and Problems in Cell Differentiation, Heidelberg, Springer-Verlag,1998، 23; 25-63

(10) Robinson A, Cranage MP, Hudson M, Vaccine Protocols, Humana, 2003, chapter7,;101-110.

(11) Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS and Muller RH Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery. Production, Characterization and Sterilization. J Cont Release, 1994; issue 3: 83-96

(12)Zweers ML, Engbers GH, Grijpma DW ,Feijen J. In Vitro Degradation of Nanoparticles Prepared from Polymers Based on DL-Lactide, Glycolide and Poly(Ethylene Oxide). J Cont Release, 2004;Issue 3: 347-356.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.9.6] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]