مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

اثر نانوذره طلا بر روی خواص هیدروکسی اوره لیپوزومه شده: یک بررسی برون تنی

جواد شهابی[۱]، حسن ابراهیمی شاهم آبادی*[۲]، سید ابراهیم علوی*[۳]، مائده کوهی مفتخری اصفهانی[۳]، مهدی ارجمند[۴]، علی اکبر سیف کردی[۵]، عظیم اکبرزاده[۶]

۱. کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی - گروه مهندسی شیمی- دانشکده فنی و مهندسی- دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- تهران ، ایران و بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳. کارشناس ارشد، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی - گروه مهندسی شیمی- دانشکده فنی و مهندسی- دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- تهران ، ایران
۵. استاد، گروه بیوتکنولوژی - گروه مهندسی شیمی- دانشکده فنی و مهندسی- دانشگاه علوم و تحقیقات تهران- تهران ، ایران
۶. استاد، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانو ذرات امید های زیادی را در دارو رسانی به وجود آورده اند. این حامل ها علاوه بر افزایش کارایی دارو های گوناگون باعث کاهش عوارض جانبی آن ها نیز می گردند. در این مطالعه فرمولاسیون های نانو ذره ای متفاوتی از داروی ضد سرطان هیدروکسی اوره تهیه شد. کارایی فرمولاسیون های تولید شده در محیط کشت سلول نسبت به داروی آزاد بررسی گردید.

مواد و روش ها: از روش تبخیر فاز معکوس برای ساخت لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره استفاده شد. نانو ذرات طلا حاوی اسید آمینه از طریق احیاء نمک کلرواوریک اسید تهیه شدند. این نانو ذرات با DNA استخراج شده از سلول سرطان پستان انسانی MCF-۷ کونژوگه (نانوکونژوگه) گردیدند. نانوکونژوگه با لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره مخلوط شد و نانوکمپلکس مربوطه به وجود آمد. از روش های طیف سنجی نور مرئی- فرابنفش و تفرق دینامیک نور، برای توصیف نانو ذرات استفاده گردید. میزان بارگذاری دارو در لیپوزوم ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری محاسبه شد. جهت بررسی سمیت فرمولاسیون های مختلف از آزمون MTT و سلول MCF-۷ استفاده شد.

یافته ها: میزان بارگذاری دارو در لیپوزوم ها، ۷۰ درصد محاسبه گشت. بیش ترین اندازه مربوط به کمپلکس نانوکونژوگه با ۵۰۲ نانو متر و کم ترین اندازه مربوط به نانو ذره طلا با اندازه ۲۹ نانومتر بود. مشخص شد کارایی دارو در حالت نانو ذره نسبت به داروی آزاد افزایش قابل ملاحظه می یابد. این اثر در غلظت های پایین (<۲۰Mμ) به مخصوص در مورد کمپلکس نانوکونژوگه بیش تر مشهود بود. در کم ترین غلظت دارو (۵ ماکرومولار)، سمیت لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره ۷۰ درصد و کمپلکس نانوکونژوگه ۸۱ درصد تخمین زده شد. این اثر را می توان به افزایش ورود دارو به سلول در نتیجه حضور نانو ذره طلا نسبت داد. داروی آزاد سمیت سلولی ۳۲ درصدی در غلظت ۵ ماکرو مولار و ۸۸ درصدی در غلظت ۲۵۰۰ ماکرو مولار باعث شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد لیپوزوم به عنوان نانو ذره ای مناسب برای هیدروکسی اوره عمل می کند. مشخص شد اثر نانو ذره طلا حائز اهمیت زیاد می باشد. به طوری که در حضور این نانو ذره در کمپلکس، سمیت به میزان چشم گیری افزایش یافت. بر این اساس می توان استفاده از نانو ذره طلا به صورت کمپلکس لیپوزومی برای فرمولاسیون های مختلف دارویی را مد نظر قرار داد. هم چنین به دلیل افزایش کارایی چشم گیر فرمولاسیون کمپلکس نانوکونژوگه تولید شده در این مطالعه، می توان مطالعه های درون تنی مربوطه را با آن آغاز کرد.

کلمات کلیدی: نانو ذرات طلا، لیپوزوم، هیدروکسی اوره، دارو رسانی

نویسنده مسئول
رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی
ایمیل: hasanebrahimi564@yahoo.com
بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران
ایمیل : s.ebrahimalavi@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۰۱/۰۸
تاریخ پذیرش :۱۳۹۲/۰۴/۲۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

مقدمه

استفاده از نانو ساختارهای چند عملکردی در پزشکی با استقبال روز افزونی رو به رو است. پیشرفت های اخیر در مهندسی و فناوری منجر به تولید انواع مختلف نانو ساختار ها شده است. از آن ها می توان نقاط کوانتومی، نانو پوسته ها، نانو ذرات طلا، نانو ذرات پارامغناطیس، نانو لوله های کربنی و سیستم های با اساس لیپیدی را نام برد (۶). این ترکیب ها باعث کاهش عوارض جانبی و افزایش کارایی عوامل شیمی درمانی می شوند (۱۵). هم چنین از آن ها با هدف عبور از موانع زیستی، حفاظت از دارو و رها کردن دُز بهینه استفاده می شود (۴). استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل دارو از دو ویژگی این مواد نشات می گیرد، اول این که نانو ذرات به دلیل اندازه کوچک شان می توانند از طریق مویرگ های بسیار ریز درون سلول های مورد نظر نفوذ کنند و در نتیجه باعث تجمع کارآمد دارو در جایگاه های هدف در بدن شوند، دیگر این که استفاده از مواد زیست تخریب پذیر برای تهیه نانو ذرات باعث انتشار پایدار و یکنواخت دارو در جایگاه هدف برای یک دوره چند روزه یا چند هفته می شود (۲۲). لیپوزوم ها به عنوان حامل های رایج دارویی استفاده می شوند. بعضی از آن ها مثل دوکسیل (Doxil) به وسیله FDA تایید شده است (۸). لیپوزوم ها ساختار های وزیکولی فسفولیپیدی هستند که از یک دم آب گریز و یک سر آب دوست تشکیل شده اند. به دلیل خاصیت آمفی پاتیک می توانند مولکول های دارویی محلول در آب را در فاز داخلی و مولکول های محلول در چربی را در غشاء آب گریز خود کپسوله کنند (۱).

بهبود نسل آینده حامل های دارویی لیپوزومی شامل رهش قابل کنترل و آشکارسازی آن ها از طریق اضافه کردن مولکول های عملیاتی قابل اجرا است. منظور از مولکول های عملیاتی مولکول هایی است که نسبت به دما یا pH حساس هستند یا اینکه قابلیت آشکار سازی دارند (۱۲). در حیطه پزشکی نانو ذرات طلا نیز به دلیل خواص فیزیکی – شیمیایی وابسته به اندازه و شکل، مولکول های عملیاتی مورد توجه ای هستند (۲،۵). از آن ها در کاربردهای گوناگون مثل تنظیم داخل سلولی بیان ژن، شیمی درمانی و دارو رسانی استفاده می شود. لیپوزوم ها روشی موثر برای تحویل داخل سلولی نانو ذرات ریز طلا هستند. جذب سلولی نانو ذرات طلا با استفاده از لیپوزوم ها به عنوان حامل تقویت می شود. هم چنین اتصال آسان لیگاندها به سطوح لیپوزوم های حاوی نانو ذره طلا، امکان هدف گیری فعال این حامل ها را فراهم آورده است (۱۴). سه نوع کمپلکس لیپوزوم- نانو ذره طلا وجود دارد. نوع اول نانو ذره طلا در داخل لیپوزوم قرار می گیرد. این نوع از کمپلکس از طریق احیاء یون های طلا در حضور یک احیاء کننده ساخته می شوند (۲۵). از این نوع برای بررسی توزیع درون تنی لیپوزوم استفاده می شود (۸). عمل احیاء ممکن است بر روی فعالیت دارو اثر منفی بگذارد. در نوع دوم از این نوع کمپلکس، نانو ذرات طلا در غشاء لیپیدی حضور دارند (۱۷). اما از آنجائی که ضخامت دو لایه لیپیدی تنها ۴ نانو متر است، به همین دلیل در این نوع تنها تعداد محدودی نانو ذره طلا می توانند در غشاء ادغام شوند. کمپلکس سوم یک لیپوزوم تغییر یافته با نانو ذرات طلا در سطح است. این نوع از کمپلکس از طریق ترکیب یک سوسپانسیون لیپوزومی با نانو ذره طلا به آسانی به دست می آید (۲۳). هیدروکسی اوره یک داروی ضد سرطان است. استفاده از این دارو در درمان اختلال های میلوپرولیفراتیو و سرطان پستان رایج است (۱۱،۱۹). این دارو به موازات خاصیت ضد سرطانی دارای عوارض جانبی می باشد. خواب آلودگی، تهوع، استفراغ و اسهال جزء عوارض جانبی آن محسوب می شود. هم چنین یبوست، موکوزیتیس، کم اشتهایی، ورم مخاط دهان و لثه (stomatitis)، سمیت مغز استخوان، ریزش مو، تغییرات پوستی، تغییر آنزیم های کبدی، کراتینین و اوره خون عوارض جانبی دیگری می باشند که به این دارو نسبت می دهند (۱۱). بر اساس همین مشاهده ها تصمیم گرفته شد تا با استفاده از فناوری نانو از این دارو فرمولاسیونی تهیه گردد تا کارایی دارو افزایش یابد. کمپلکس ساخته شده از طریق ترکیب سوسپانسیون لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره با نانو ذرات طلای خالص و نانوکونژوگه به دست آمد. همان گونه که انتظار می رفت میزان سمیت دارو در حالت نانو ذره نسبت به داروی آزاد افزایش قابل ملاحظه ای نشان داد. اما نکته جالب در این بین نقش نانو ذره طلا بود. به طوری که در صورت حضور این نانو ذره در فرمولاسیون، سمیت به میزان قابل ملاحظه ای به خصوص در غلظت های پایین افزایش یافت.

مواد و روش ها

مواد

ایزوپروپانول و اتانول از شرکت مرک خریداری شد. کلسترول، هیدروکسی اوره، فسفاتیدیل کولین، اسید کلروآئوریک (H[AuCl۴])، آسپارتیک اسید و MTT از شرکت سیگما خریداری گردید. پلی اتیلن گلیکول (۳۵۰۰) از شرکت کیمیاگران امروز (Kimiagaran Emrooz Chemical Ind. Iran) تهیه شد. محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از شرکت Invitrogen خریداری شد. سلول MCF-۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. آب استفاده شده در سرتاسر مطالعه آب مقطر بود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

ساخت نانوذره لیپوزومی پگیله و حاوی هیدروکسی اوره

برای ساخت نانو ذره لیپوزومی حاوی هیدروکسی اوره، ترکیبات لسیتین/کلسترول/پلی اتیلن گلیکول (به نسبت ۵۰۰ /۲۵/۵۰ میلی گرم) در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۸ درصد (حمام آب گرم، ۴۰ ^{o}C) ریخته شد و بر روی استیرر (IKA-Werke, Germany) به هم زده شد (۳۰۰ rpm، یک ساعت). پس از مخلوط شدن کامل، سوسپانسیونی همگن و زرد رنگ حاصل شد. اتانول با استفاده از دستگاه روتاری (Heidolph, Schwabach, Germany) تحت شرایط خلاء (۹۰ rpm، ۵۰ ^{o}C) حذف شد. سپس ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (pH ۷.۲) و هیدروکسی اوره (۲۰ میلی گرم) به ژلوز حاصل اضافه شد و با استفاده از استیرر مانند شرایط بالا به هم زده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه گردید (۶۰ Hz، Bandelin Sonorex Digitec). هم چنین این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (DIAX ۹۰۰ Heidolph, Germany)، هموژن (۷۵۰۰ rpm) شد.

تعیین بارگذاری دارو

برای بررسی مقدار داروی بارگذاری شده، سوسپانسیون لیپوزومی حاوی دارو با سرعت ۲۱۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد (GRX-۲۲۰ high speed refrigerated centrifuge, TOMY, Saitama, Japan). سوپرناتانت حاصل جدا گردید. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-۱۶۰۱PC) جذب نوری سوپرناتانت در طول موج ۲۱۵ نانومتر سنجیده شد. پس از آن با استفاده از فرمول زیر، میزان بارگذاری دارو محاسبه گردید.

$$\text{درصد کپسولاسیون} = \frac{\text{هیدروکسی اوره موجود در سوپرناتانت}(mg) - \text{هیدروکسی اوره اولیه}(mg)}{\text{هیدروکسی اوره اولیه}(mg)} \times 100$$

جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت های متفاوتی از هیدروکسی اوره تهیه و مقدار جذب با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۱۵ نانومتر سنجیده شد.

کونژوگه کردن نانوذره طلا به DNA

نانوذرات طلا با استفاده از روش آمده در منبع (۱۱) ساخته شد. DNA ژنومی از سلول MCF-۷ بر اساس روش قبلی استخراج گردید (۱۸). DNA حاصله (۱۰۰ ماکرولیتر و ۳۰ g/mlμ) با نانوذره طلا (۲ ml و ۱۰ mM) انکوبه شد. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت بر روی هم زن صورت گرفت (۱۰۰rpm و دمای اتاق). جهت تایید کونژوگاسیون از اسپکتروفتومتری استفاده شد.

تهیه کمپلکس نانوذره طلا و نانوکونژوگه

به حجم مشخصی از سوسپانسیون لیپوزومی حاوی دارو، نانوکونژوگه اضافه شد. به طوری که در پایان، غلظت نانو ذرات طلا در سوسپانسیون برابر با ۱۰۰ ماکرومولار رسید. سپس عمل ورتکس (Vortex Instrument, IKA, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. هم چنین به مدت ۲۰ دقیقه عمل سونیکاسیون انجام شد. در مورد کمپلکس نانو ذره طلا، همین فرایند و با همین غلظت نانو ذره طلا صورت گرفت (۱۰).

توصیف نانوذرات تولیدی از نظر اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتا

به منظور توصیف نانو ذرات حاصل از نظر اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتا از دستگاه زتاسایزر (nano-Zs Zen ۳۶۰۰, Malvern instruments UK) استفاده گردید.

بررسی میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون های مختلف دارو و داروی آزاد

به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی هیدروکسی اوره و مقایسه اثر آن ها با فرمولاسیون های مربوطه، از سلول MCF-۷ و آزمون MTT استفاده شد (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

از آزمون تی- استودنت برای آنالیز داده ها استفاده گردید. مقادیر P-value≤۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

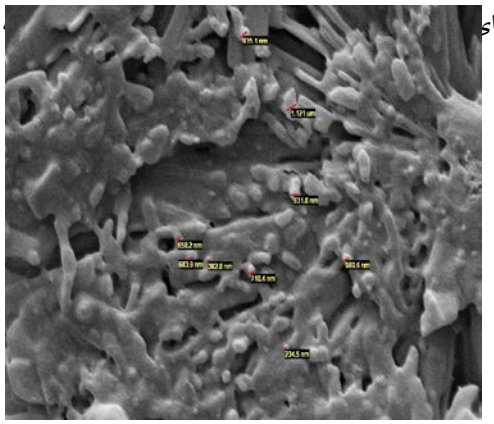
یافته ها

اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتای فرمولاسیون های نانوذره ای مختلف

نانو ذره لیپوزومی شاهد و حاوی دارو با موفقیت ساخته شدند (شکل-۱).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]



شکل- ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو ذره لیپوزومی بارگذاری شده با هیدروکسی اوره (بزرگنمایی ×۲۵۰۰)

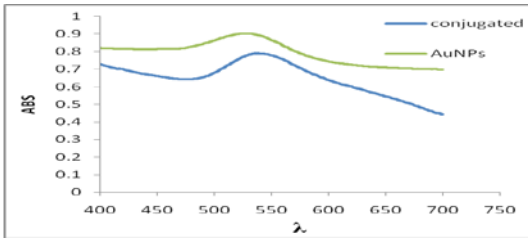
مخلوط سازی لیپوزوم حاوی دارو با نانو ذره طلا و نانوکونژوگه منجر به تشکیل دو کمپلکس حاوی دارو گردید. در بین فرمولاسیون های متفاوت کم ترین اندازه و توزیع اندازه مربوط به نانو ذرات طلا بود که به ترتیب ۳۵ نانومتر و ۰/۲۳ محاسبه گشت. اما کونژوگاسیون این نانوذره به DNA باعث افزایش چشم گیر اندازه گردید. بیش ترین اندازه مربوط به کمپلکس نانوکونژوگه بود. این مقدار ۵۰۲ نانومتر محاسبه گشت. پتانسیل زتای تمامی فرمولاسیون ها منفی محاسبه گشت. کم ترین پتانسیل زتا را نانوکونژوگه نشان داد که برابر با ۱۵- میلی ولت بود. بیشترین پتانسیل زتا مربوط به کمپلکس نانوکونژوگه بود که برابر با ۳۸- میلی ولت محاسبه گشت. هم چنین بر اساس نتایج حاصل میزان توزیع اندازه در همه فرمولاسیون ها مناسب برآورد شد. کم ترین توزیع اندازه را نانو ذرات طلا و بیش ترین توزیع را نانو ذرات لیپوزومی شاهد نشان دادند. همان گونه که در جدول-۱ نتایج نشان داده شده است، خواص نانو ذرات بر اساس نوع فرمولاسیون، تغییرات قابل ملاحظه یافته است.

خواص / فرمولاسیون	اندازه (نانومتر)	توزیع اندازه	پتانسیل زتا (میلی ولت)
لیپوزوم شاهد	۴۷۳	۰/۴۶	-۲۱
لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره	۳۵۱	۰/۳۸	-۲۵
نانوذرات طلا	۳۵	۰/۲۳	-۳۰
نانوکونژوگه	۳۰۵	۰/۳۳	-۱۵
کمپلکس لیپوزوم حاوی دارو + نانوکونژوگه	۵۰۲	۰/۴۱	-۳۸

جدول-۱ فرمولاسیون های مختلف تهیه شده و خواص آن ها

بررسی تایید کونژوگاسیون نانوذرات طلا به DNA

نتایج حاصل از طیف سنجی بوسیله اسپکتروفتومتری نور مرئی – ماوراء بنفش موید انجام کونژوگاسیون بود (شکل-۱).



شکل-۱ طیف سنجی مربوط به نانوذرات طلا (رنگ سبز) ونانوکونژوگه (رنگ آبی).

همانگونه که تصویر نشان می دهد دو طیف مختلف به دست آمده است که رنگ سبز مربوط به نانوذرات طلا و رنگ آبی مربوط به نانوکونژوگه می باشد.

بازده بارگذاری دارو

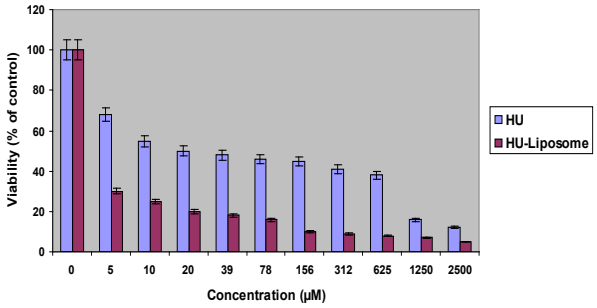
بازده بارگذاری با توجه به منحنی استاندارد هیدروکسی اوره محاسبه شد. درصد داروی بارگذاری شده ۷۰ درصد تخمین زده شد.

میزان سمیت سلولی فرآورده های مختلف

در ابتدا مشخص شد نانوذره لیپوزومی فاقد دارو در غلظت هایی بالاتر از غلظت های حاوی دارو هیچ گونه سمیتی بر روی سلول اعمال نمی کند و کاملاً سالم است. هم چنین مشخص شد میزان سمیت دارو در تمامی فرمولاسیون ها نسبت به داروی آزاد بیشتر است (شکل-۵). هرچند در حداکثر غلظت استفاده شده یعنی ۲۵۰۰ ماکرومولار، سمیت هر سه فرمولاسیون نانوذره ای حاوی دارو یعنی لیپوزوم حاوی دارو (شکل-۲) و دو کمپلکس نانودارو تقریباً یکسان تخمین زده شد اما در حداقل غلظت، این فرمولاسیون کمپلکس نانوکونژوگه بود که به میزان قابل ملاحظه ای افزایش سمیت نشان داد. نکته جالبی در مورد هر دو فرمولاسیون کمپلکس نانودارو مشاهده شد. به این صورت که میزان سمیت متناسب با کاهش غلظت دارو کاهش یافت. اما در غلظت های کمتر از ۸۰ ماکرومولار برای کمپلکس نانوذره طلا (شکل-۳) و ۴۰ ماکرومولار برای کمپلکس نانوکونژوگه (شکل-۴)، میزان سمیت برخلاف کاهش غلظت، دوباره سیر صعودی نشان داد. لازم به ذکر است در این غلظت ها در کمپلکس نانوکونژوگه، غلظت نانو ذره طلا تقریباً برابر با ۱/۵ ماکرو مولار و در کمپلکس نانو ذره طلا برابر با ۳ ماکرو مولار بود.

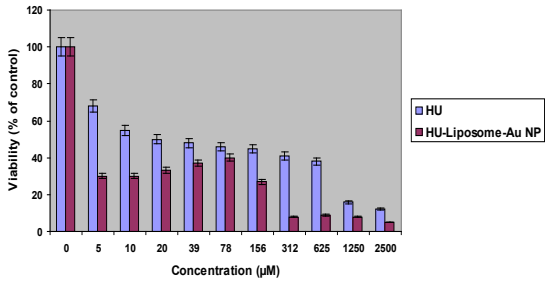
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]



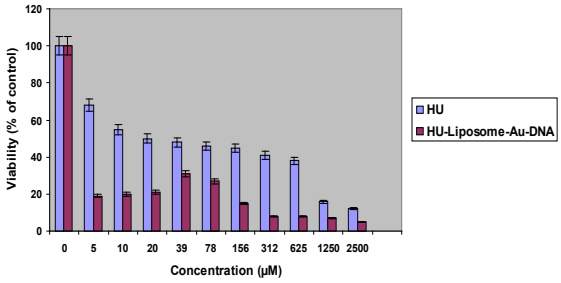
شکل-۲ اثرات سایتوتوکسیسیتی هیدروکسی اوره و هیدروکسی اوره بارگذاری شده بر روی لیپوزوم بر روی سلول MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت میانگین ± ۵ درصد خطا از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است.

همان گونه که شکل نشان می دهد میزان سمیت سلولی دارو در حالت بارگذاری شده بر روی نانو ذره نسبت به داروی آزاد به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافته است.



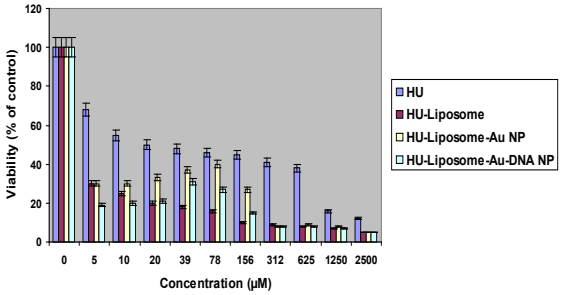
شکل-۳ اثرات سایتوتوکسیسیتی هیدروکسی اوره و هیدروکسی اوره بارگذاری شده بر روی کمپلکس نانو ذره طلا بر روی سلول MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت میانگین ± ۵ درصد خطا از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است.

در این شکل نیز افزایش کارایی دارو در حالت نانو ذره نسبت به حالت آزاد مشاهده می شود. سمیت سلولی متناسب با کاهش غلظت دارو کاهش یافت. این وضعیت تا غلظت حدود ۸۰ ماکرو مولار ادامه داشت. اما در غلظت های پایین تر از ۸۰ ماکرومولار دارو (حدود ۳ ماکرومولار نانو ذره طلا)، میزان سمیت برخلاف کاهش غلظت دارو، افزایش یافت.



شکل -۴ اثرات سایتوتوکسیسیتی هیدروکسی اوره و هیدروکسی اوره بارگذاری شده بر روی کمپلکس نانوکونژوگه بر روی سلول MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت میانگین ± ۵ درصد خطا از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه گردید.

در اینجا نیز کاهش سمیت سلولی متناسب با کاهش غلظت دارو در کمپلکس نانوکونژوگه مشاهده گردید. این وضعیت تا غلظت حدود ۴۰ ماکرومولار اتفاق افتاد. در غلظت های پایین تر از ۴۰ ماکرومولار دارو (غلظت های کمتر از ۲ ماکرومولار طلا)، میزان بقاء برخلاف کاهش غلظت دارو، کاهش معنی داری نشان داد.



شکل-۵ مقایسه اثرات سایتوتوکسیسیتی هیدروکسی اوره (آبی)، هیدروکسی اوره بارگذاری شده بر روی نانوذره لیپوزومی (قرمز)، کمپلکس نانوذره طلا (زرد) و کمپلکس نانوکونژوگه (سبز) بر روی سلول MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

نتایج به صورت میانگین ± ۵ درصد خطا از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه گردید. همان گونه که شکل نشان می دهد هر سه فرمولاسیون نسبت به داروی آزاد سمیت بیشتری دارند. در حداکثر غلظت دارویی (۲۵۰۰ ماکرومولار) میزان سمیت هر سه فرمولاسیون نانو ذره یکسان است اما در غلظت های کمتر از ۲۰ ماکرو مولار، این کمپلکس نانوکونژوگه است که بیش ترین سمیت را اعمال می کند.

بحث

مشکلات اکثر سیستم های دارو رسانی رایج شامل زیست دسترسی ضعیف دارو، پایداری پایین در محیط درون تنی، انحلال پذیری ناچیز دارو و جذب پایین روده ای می باشد. هم چنین ضعف در هدفمند سازی دارو و تحویل پیوسته آن به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

جایگاه هدف جزء چالش های دیگر سیستم های دارو رسانی محسوب می شود. علاوه بر این، پایین بودن کارایی درمان، عوارض جانبی و نوسان های پلاسمایی دارو موانع دیگری در ارتباط با این سیستم ها می باشد. استفاده از نانو فناوری در دارو رسانی راه کاری مناسب برای غلبه بر این چالش ها است. در این فناوری نانو ساختارها مورد استفاده قرار می گیرند. به طورعمومی نانو ساختارها قادرند داروهای کپسوله شده در خود را از تجزیه هیدرولیتیکی و آنزیمی در دستگاه گوارش حفظ کنند. هم چنین حجم گسترده ای از دارو ها را به نواحی مختلف بدن به منظور رهش پیوسته تحویل دهند (۹،۱۶،۲۱). لیپوزوم ها یکی از نانو ذرات مورد مطالعه در مبحث دارو رسانی می باشد (۶). در این مطالعه با روش تبخیر فاز معکوس لیپوزوم های حاوی هیدروکسی اوره مطلوب ساخته شد. لیپوزوم های حاصل از خواص مناسب برخوردار بودند. اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتای آن ها در محدوده مطلوبی قرار داشت. هم چنین این لیپوزوم ها از نظر پایداری مورد بررسی قرار گرفتند. به این صورت که ۲ ماه پس از ساخت، سوسپانسیون حاصل دوباره به وسیله زتاسایزر مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد اندازه نسبت به روز ساخت تغییر قابل ملاحظه ای نکرده است. هم چنین مشخص شد اثر سونیکاسیون و هموژناسیون بر روی اندازه لیپوزوم ها بنیادی است. به طوری که اندازه آن ها بعد از سونیکاسیون و هموژناسیون تقریباً به یک چهارم کاهش می یابد. میزان بارگذاری داروی هیدروکسی اوره بر روی این لیپوزوم ها در محدوده مطلوب ۷۰ درصد برآورد شد. در بخش دیگری از این مطالعه نانو ذرات طلا ساخته شدند. نانو ذرات طلای حاصل تقریباً کوچک بودند. پس از کونژوگاسیون به DNA اندازه آن ها به میزان چشم گیری افزایش یافت. نسبت به داروی آزاد تمامی فرمولاسیون ها سمیت بیش تری اعمال کردند. این امر می تواند نشان دهنده رهش تاخیری دارو از این فرمولاسیون ها باشد. سمیت سلولی به موازات کاهش غلظت دارو در فرمولاسیون های مختلف کاهش یافت. این امر تا غلظت ۸۰ ماکرو مولار برای کمپلکس نانو ذره طلا و ۴۰ ماکرو مولار برای کمپلکس نانوکونژوگه صادق بود. در غلظت های پایین تر از این مقادیر، میزان سمیت در این دو کمپلکس برخلاف کاهش غلظت دارو دوباره افزایش یافت. تفاوت این دو کمپلکس نسبت به لیپوزوم حاوی دارو به وجود نانو ذره طلا و نانوکونژوگه برمی گردد. بنابراین می توان این افزایش سمیت را برخلاف کاهش غلظت دارو به نوعی به حضور این نانو ذره در کمپلکس نسبت داد. مشخص شد به غلظت خاصی از نانو ذره طلا در کمپلکس نیاز است تا حداکثر کارایی کمپلکس اعمال شود. از آنجائی که این غلظت بسیار پایین بود به طوری که در این دو کمپلکس کمتر از ۳ ماکرومولار تشخیص داده شد، بنابراین این مزیت را فراهم می کند که متناسباً غلظت داروی مورد نیاز نیز کاهش یابد. به احتمال زیادی جهت تفسیر این موضوع وجود دارد. می توان احتمال داد ورود نانو ذره طلا به سلول یا تعامل آن با سلول در این غلظت افزایش می یابد، که خود پیامدهای بعدی را باعث می شود به این صورت که باعث افزایش ورود دارو به سلول می گردد. در غلظت های پایین این اثر اتفاق افتاد. این امکان وجود دارد که در این غلظت ها نانو ذره طلا به صورت تک پراکنده در می آید و فعالیت خود را بهتر اعمال می کند. هم چنین بر اساس مطالعه Mady MM و همکاران مشخص شده که نانو ذره طلا باعث تغییرهای ساختاری در لیپوزوم می شود. به این صورت که اضافه شدن نانو ذره طلا باعث افزایش سیالیت لیپوزوم می گردد (۱۴). این تغییرات ساختاری به وسیله Park SH و همکارانش نیز گزارش شده است (۲۰). علاوه بر این در مطالعه دیگریCoradeghini R و همکارنش نشان دادند که نانو ذرات طلا فعالیت ساختاری فیلامنت سلول را تغییر می دهند (۲۷). روی هم رفته می توان این گونه تعبیر کرد که وجود نانو ذره طلا در کمپلکس نانوکونژوگه اثرهای مثبت بر روی کارایی کمپلکس اعمال می کند که این اثرها در غلظت های پایین نانو ذره طلا مشهودتر است. احتمالاً بار منفی DNA باعث تثبیت پایداری و تک پراکندگی بیشتر این نانو ذرات می گردد. هم چنین بر اساس نتایج پتانسیل زتای به دست آمده، تمامی فرمولاسیون های نانوذره ای حاصل از پایداری مطلوب برخوردار بودند. زیرا اگر تمامی ذرات در سوسپانسیون دارای بار مثبت یا منفی بالا باشند همدیگر را دفع می کنند و به صورت کلوخه در نمی آیند (۱۸). به مانند مطالعه Mady MM، در این مطالعه نیز برای ساخت لیپوزوم از لسیتین استفاده شد. علاوه بر این ما نیز مانند Mady MM و همکارانش نشان دادیم که اضافه شدن نانو ذره طلا به لیپوزوم باعث منفی تر شدن پتانسیل زتا می گردد (۱۴). این عمل باعث می شود سوسپانسیون به صورت پایدار باقی بماند. نکته دیگری که در مورد فرمولاسیون های حاصل حائز اهمیت بود، حضور پلی اتیلن گلیکول در فرمولاسیون های مختلف است. پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش پایداری آن ها در خون و از این طریق افزایش کارایی آن ها می گردد (۲۶). درآخر نتایج مطالعه نشان داد نانو ذره لیپوزومی به عنوان نانو حامل مناسب برای هیدروکسی اوره عمل می کند. قرارگیری نانو ذره طلا بر سطح لیپوزوم حاوی هیدروکسی اوره باعث افزایش کارایی دارو گردید. نکته جالب این که سمیت کمپلکس حاوی نانو ذره طلا در غلظت های پایین این نانو ذره افزایش چشم

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

گیر یافت. در نتیجه استفاده از نانو ذره طلا به شکل کمپلکس لیپوزومی برای فرمولاسیون های مختلف دارویی را می توان مد نظر قرار داد. نکته دیگری که از این مطالعه می توان نتیجه گرفت این است که لیپوزوم ها علاوه بر داروی هیدروکسی اوره، می توانند به عنوان یک راهکار اساسی برای تحویل نانو ذرات طلا جهت کاربردهای درمانی و تشخیصی عمل کنند. هم چنین به دلیل افزایش کارایی چشم گیر فرمولاسیون کمپلکس نانوکونژوگه تولید شده در این مطالعه، می توان مطالعه های درون تنی مربوطه را با آن آغاز کرد.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد وجود نانو ذرات طلا در فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکسی اوره باعث افزایش کارایی دارو می گردد، به مخصوص وقتی این اثر بیش تر اهمیت پیدا می کند که در غلظت های پایین نانو ذره طلا، این اثر مشاهده گردید. استفاده از نانو ذرات طلا در فرمولاسیون های مختلف لیپوزومی حاوی دارو توصیه می گردد. هم چنین براساس نتایج حاصل از مطالعه می توان آزمایش های درون تنی را با فرمولاسیون حاصل آغاز کرد.

سپاسگزاری

این مطالعه به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شد. بدین وسیله از تمامی همکاران تشکر می گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

منابع

1. Al-Jamal WT, Kostarelos K. Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic application. Nanomedicine, 2007; 2 (1):85-98.
2. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. Chem Rev, 2005; 105 (4):1025–102.
3. Coradeghini R, Gioria S, García CP, Nativo P, Franchini F, Gilliland D, Ponti J, Rossi F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. Toxicol Lett, 2013; 217 (3):205-16.
4. Costantino L, Boraschi D. Is there a Clinical Future for Polymeric Nanoparticles as Brain-Targeting Drug Delivery Agents? Drug Discov Today, 2012; 17 (7-8) :367-78.
5. Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem Rev, 2004; 104 (1): 293–346.
6. Devika B. Chithrani, Michael Dunne, BASc, James Stewart, MASc, Christine Allen, David A. Jaffray. Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2010; 6 (1): 161–169.
7. Hong K, Friend DS, Glabe CG, Papahadjopoulos D. Liposomes containing colloidal gold are a useful probe of liposome-cell interactions. Biochim Biophys Acta, 1983; 732 (1):320–323.
8. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomed, 2006; 1 (3): 297–315.
9. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50: 147-60.
10. Kojima C, Hirano Y, Kono K. Chapter 7 - Preparation of complexes of liposomes with gold nanoparticles. Methods Enzymol. 2009; 464:131-45.
11. Liebelt EL, Balk SJ, Faber W, Fisher JW, Hughes CL, Lanzkron SM, Lewis KM, Marchetti F, Mehendale HM, Rogers JM, Shad AT, Skalko RG, Stanek EJ. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of hydroxyurea. , 2007; 80 (4) :259-366.
12. Liu X, Huang G. Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013; 8 (6), 319–328.
13. Maryam Farahnak Zarabi, Ali Farhangi, Samaneh Khademi Mazdeh, Zahra Ansarian, Davod Zare, Mohammad Reza Mehrabi, Azim Akbarzadeh. Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Aspartic Acid and Their Conjugation with FVIII Protein and FVIII Antibody. Ind J Clin Biochem. 2013; doi: 10.1007/s12291-013-0323-2.
14. Mohsen Mahmoud Mady, Mohamed Mahmoud Fathy, Tareq Youssef, Wafaa Mohamed Khalil. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. Physica Medica, 2012; 28 (4):288-95.
15. Mozafari M.R.: Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy, 2006; 237: 1-12.
16. Nimesh S, Manchanda R, Kumar R, Saxena A, Chaudhary P, Yadav V, Mozumdar S, Chandra R. Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles. Int J Pharm, 2006, 323 (1-2): 146-52.
17. Paasonen L, Laaksonen T, Johans C, Yliperttula M, Konttun K, Urtti A. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. J Control Release, 2007; 122 (1):86–93.
18. Paolino D, Fresta M, Sinha P, Ferrari M. Drug delivery systems. In: Webester JG, editor. Encyclopedia of medical devices and instrumentation. 2nd ed. USA. John Wiley and Sons, 2006; 437-95.
19. Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006; 48 (2):112-8.
20. Seyed Ebrahim Alavi, Maedeh Koohi Moftakhari Esfahani, Fatemeh Alavi, Fatemeh Movahedi,

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

Azim Akbarzadeh. Drug Delivery of Hydroxyurea to Breast Cancer Using Liposomes. Ind J Clin Biochem, 2012: 12-29. doi: 10.1007/s12291-012-0291-y.

21. Soppimath K, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Controlled Release, 2001; 70 (1-2): 1-20.
22. Vinogradov SV, Bronich TK, Kabanov AV. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54 (1) :135–47.
23. Volodkin DV, Skirtach AG, Mohwald H. Near-IR remote release from assemblies of liposomes and nanoparticles. Angew Chem Int Ed Engl, 2009; 48 (10):1807–9.
24. William M. Strauss. Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. Current Protocols in Molecular Biology, 1998, 221-223.
25. Wu G, Mikhailovsky A, Khant HA, Fu C, Chiu W, Zasadzinski JA. Remotely triggered liposome release by near-infrared light absorption via hollow gold nanoshells. J Am Chem Soc. 2008; 130 (26):8175–7.
26. Xu Wang, Lily Yang, Zhuo (Georgia) Chen, Dong M. Shin. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. CA Cancer J Clin, 2008; 58 (2):97–110.
27. Zarei M, Norouzian D, Chiani M, Ebrahimi H, Mohammadi M, Akbarzadeh A. Advantages of paclitaxel -loaded nanoniosomes to nanoliposomal formulation: An in vitro study. Int J Life Sci Biotechnol Pharm, 2013; 2:335-42.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.4.8]