شکل لیپوزومی لوامیزول هیدروکلراید

دکتر محمود دوستی، دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دکتر سید محمد جواد صدیقی، دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

LIPOSOMAL LEVAMIZOLE HYDROCHLORIDE

ABSTRACT

Levamizole hydrochloride ($C_{11}H_{12}N_2S.HCl$) is a drug capable of being rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and is also rapidly eliminated from plasma. It has a modulating effect on the immunesystem, and may be used in treatment of parasitic diseases and infections. Because of its toxicity to liver and its rapid clearance from plasma, this drug must be formulated in such a way so as to decrease its necessary dosage and thus its toxic effect on the liver while improving or at least maintaining its present tolerance to desintegrating factors in the surrounding and its ability to efficiently reach its target tissues (the immune system).

Therefore, the liposomal form of levamizole hydrochloride can be helpful in achieving the stated goals.

In this study, first a preparation of a multilayer liposome with hydrophilic coating was done. For this purpose, a mixture of phosphate buffer (sodium and potassium phosphate I,4 mmol, pH=7,4) ethanol and lipid (100 mg phosphatidyl choline, extracted from soya) was used (buffer 200 mg, ethanol 80 mg, lipid 100 mg). Also levamizole hydrochloride with half a solubility in water was used. The above solutions from levamizole containing liposomes under a few cycles of freeze-thawing method (20-60 °C). Ultracentrifugation (45 min, 60.000 rpm) was used to determining rhe extent of drug encapsulation; in this method we can calculate the percent encapsuation using a control. In our method this percentage was calculated to be 92.7%.

چکیده

لوامیزول هیدروکلراید ($C_{11}H_{12}N_2S,HCl$) داروئی است که سریعاً از دستگاه گوارش جذب شده و با سرعت از پلاسما حذف می‌گردد. این دارو به عنوان اصلاح کننده (modulating) سیستم ایمنی، جهت درمان بیماریهای انگلی و عفونتهای انگلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به علت سمیت بالقوه این دارو برای کبد و نیز پاکسازی سریع آن از پلاسما، تهیه فرمی که علاوه بر آزاد سازی آهسته دارو که آن را به طور مؤثرتری به بافت هدف (سلولهای سیستم ایمنی) برساند، ضروری بنظر می‌رسد.

در این مطالعه، در ابتدا ساخت لیپوزوم چند لایه با محصورسازی هیدروفیلیک انجام گرفت. برای تهیه و ساخت لیپوزوم، مخلوطی از بافر فسفات (نمکهای فسفات سدیم و پتاسیم ۱/۴ میلی مول، pH = ۷/۴)، اتانل و لیپید (۱۰۰ میلی گرم فسفاتیدیل کولین یا لسیتین حاصل از سویا) مورد استفاده قرار گرفت (بافر ۲۰۰ میلی‌گرم، اتانل ۸۰ میلی‌گرم، لیپید ۱۰۰ میلی‌گرم) و ثانیاً از داروی لوامیزول هیدروکلراید با حلالیت $\frac{1}{2}$ در آب استفاده گردید. داروی لوامیزول هیدروکلراید به همراه مخلوط فوق در روش برودتی و حرارتی (۲۰°C- و ۶۰°C) به یک لیپوزوم حاوی دارو تبدیل می‌شود. برای تعیین میزان محصور سازی دارو از دستگاه اولتراسانتریفوژ (۴۵ دقیقه، ۶۰۰۰۰rpm) استفاده شد که می‌توان به وسیله یک شاهد درصد محصورسازی دارو را بدین وسیله به دست آورد. در این روش درصد محصورسازی (EF%) لوامیزول هیدروکلراید ۹۲/۷ درصد بود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

مقدمه

مولکولهای آمفی پاتیک در سطح روغن - آب با گروههای قطبی خود در فاز مائی و با گروههای غیر قطبی در فاز روغنی شکل‌گیری خواهند داشت.

یکنوع از پراکندگی‌های مولکولهای آمفی پاتیک ساختمانهای دو لایه (bilayer) صفحه‌ای می‌باشد.چنانچه پراکندگی‌های دو لایه را در فاز مائی با روشهای مناسب به اشکال کروی تبدیل کنیم، بخشی از فاز مائی در داخل محفظه کروی محصور می‌شود.این نوع پراکندگی وزیکولی از ترکیبات آمفی پاتیک در فاز مائی لیپوزوم نامیده می‌شود (شکل ۱).فسفا تیدیل کولین (لستین)، فسفا تیدیل سرین، فسفاتیدیل گلیسرول و کاردیولیپین مهمترین لیپیدهای به کار گرفته شده برای ساخت لیپوزومها می‌باشد.به دلیل باز جذب شدید لیپوزومها بوسیله ماکروفاژها، داروی لوامیزول هیدروکلراید به منظور ارائه به عملکردهای سیستم ایمنی، بخصوص ماکروفاژها (۱) و متعاقباً افزایش اثر تنظیم‌کننده سیستم ایمنی (immunomodulating) این دارو، به نحو مؤثری و به میزان ۹۰ درصد با استفاده از دو نوع لیپید مختلف محصورسازی شد.

Bangham و همکارانش برای اولین بار این ساختارهای لیپیدی را مطرح کردند (۲).لیپوزومها در انواع تک دو لایه (uni lamellar) و چند دو لایه (multi lamellar) با اندازه‌های میکروسکوپی چند دهم میکرون تا چند ده میکرون در تحقیقات زیست شناسی به عنوان مدل غشاء سلولی در مهندسی ژنتیک به عنوان حامل ارائه دهنده ژنها و در داروسازی با اهداف مختلف ذیل مورد استفاده واقع شده‌اند:

الف) افزایش فراهم‌زیستی داروها به منظور کاهش دوز مورد نیاز برای ایجاد اثر درمانی مطلوب

ب) کاهش سمّیت دارو از طریق کاهش غلظت داروی آزاد و یا متابولیت آن در خون و بافتهای بدن

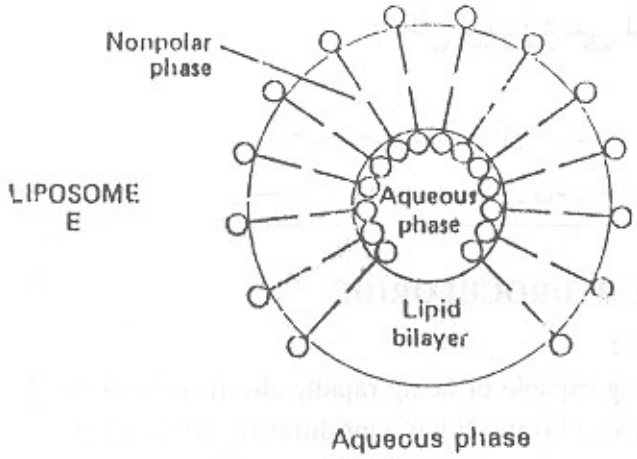
ج) رساندن دارو به بافتهای خاصی همانند کبد، طحال، بافتهای سرطانی و در نتیجه اختصاصی نمودن اثر دارو

د) محافظت دارو در برابر عوامل مخرب

در این بررسی انجام شده، محصور سازی هیدروفیلیک (برای داروهای کاملاً محلول در آب) به وسیله کرومات پتاسیم که دارای حلالیت بالایی در آب می‌باشد مورد ارزیابی قرار گرفته است.در بخش دیگر کارها لوامیزول هیدروکلراید با حلالیت ۱ به ۳ در آب به میزان بیش از ۹۰ درصد در لیپوزومهای MLV محصور شده‌اند.

مواد و وسایل

در کارهای انجام شده از لستین سویا و لستین تخم مرغ (۵۳۳۱ - Merck)، اتانل ۹۹٪، کرومات پتاسیم، لوامیزول هیدروکلراید (کارخانه پورسینا)، تریتون ۱۰۰ - X، بافرفسفات (PBS)، اولتراسانتریفوژ (Beckman - TL)، کیسه دیالیز (۹۷۷۷)، میکروسکوپ الکترونی و دستگاه چرخاننده استفاده شده است.



شکل شماره ۱ـ اساس ساختارهای لیپوزومی

روش کار

به منظور تهیه لیپوزومهای MLV و ۸۰ میلی‌گرم اتانل را به یک لوله پلاستیکی درب‌دار منتقل می‌کنیم سپس ۱۰۰ میلی‌گرم لستین سویا افزوده می‌شود.به لستین حل شده در اتانل، به ۲۰۰ میلی‌گرم از بافر فسفات با pH= ۷/۴ که حاوی ۷/۷۷ میلی‌گرم کرومات پتاسیم است اضافه می‌شود.مخلوط فوق‌الذکر در درجه حرارت ۶۰°c برای مدت چند دقیقه قرار می‌گیرد و سپس در دوره‌های انجماد مختلف ۲۰°c -۰°c و ۲۰°c سرد می‌شود.به مخلوط پرولیپوزوم تهیه شده، قطره قطره از بافر PBS با سرعت ۱۰-۵ قطره در دقیقه افزوده می‌گردد.تا حجم نهائی مخلوط به ۱۰ میلی لیتر رسانده شود.۱ میلی لیتر از نمونه لیپوزومی تشکیل شده در کیسه دیالیز قرار داده با ۱۵۰ برابر حجم آن از بافر PBS دیالیز می‌کنیم.نمونه لیپوزومی دیالیز شده را به وسیله دترژنت تریتون لیز نموده به حجم نهائی میلی لیتر ۱۰ می‌رسانیم.میزان جذب کرومات موجود در لیپوزومها با دستگاه اسپکروفتومتر UV اندازه‌گیری می‌شود و میزان کرومات محصور شده محاسبه می‌گردد.این روش قبلاً با ۶- کربوکسی فلوروسین انجام شده است (۳).به منظور تهیه لیپوزومهای MLV حاوی داروی لوامیزول دو نسبت (۲۰۰/۸۰/۱۰۰) و (۴۰۰/۱۶۰/۲۰۰) از بافر حاوی دارو، اتانل و لیپید: در مخلوط پرولیپوزومی به کار گرفته شد.غلظت وزنی لوامیزول هیدروکلراید ۶۰ میلی‌گرم دارو در ۲۰۰ میلی‌گرم بافر در نظر گرفته شد.در روش ساخت تنها از یک دوره برودتی ۲۰°c- استفاده گردید.به منظور محاسبه میزان داروی محصور شده، میلی لیتر ۱۰ از نمونه لیپوزومی فوق در سه لوله مخصوص دستگاه اولتراسانتریفوژ تقسیم می‌گردد و برای مدت ۴۵ دقیقه در ۲۰°c و در ۶۰،۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شود.یک نمونه لیپوزومی نیز به عنوان شاهد بدون دارو تحت اولتراسانتریفوژ با شرایط فوق قرارگرفت.با استفاده از محلول

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

روبی میزان داروی محصور نشده در لیپوزوم اندازه‌گیری شد و با استفاده از آن میزان داروی محصور شده محاسبه گردید.

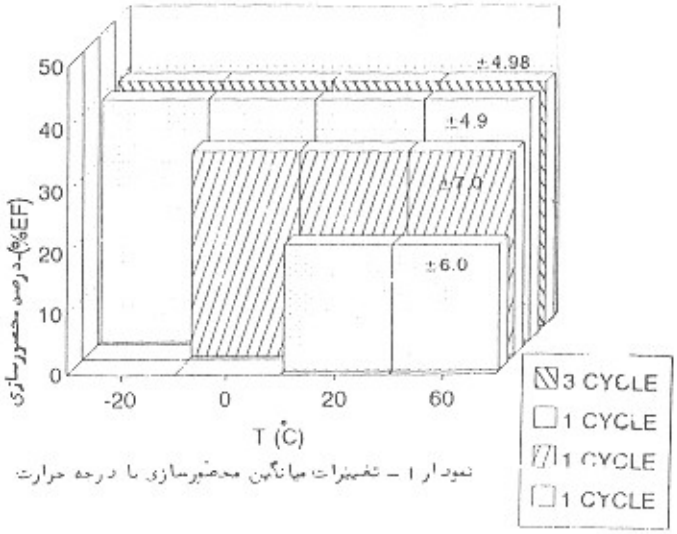
نتایج

با اندازه‌گیری میزان محصورسازی (EF%) کرومات پتاسیم برای لیپوزومهای MLV در دوره‌های پرودتی ۲۰°c، ۰°c، -۲۰°c و استفاده از تنها یک دوره حرارتی ۶۰°c مطابق جدول ۱، برای کرومات بهترین میزان محصورسازی مربوط به دوره حرارتی ۶۰°c و پرودتی -۲۰°c می‌باشد.افزایش تعداد دوره‌ها از ۱ دوره به ۳ دوره تغییری در میزان محصورسازی به دنبال نخواهد داشت.

جدول شماره (۱): مقادیر میانگین محصورسازی برای دوره‌های پرودتی حرارتی مختلف

انحراف معیار	٪میانگین محصورسازی	دوره	انجماد°C	ذوب °C	//////
±۶	۲۰/۹۷	۱	۲۰	۶۰	الف
±۷	۳۳/۵۸	۱	۰	۶۰	ب
±۴/۹	۳۹/۱۲	۱	-۲۰	۶۰	ج
±۴/۹۸	۳۹/۵۶	۳	-۲۰	۶۰	د

نمودار ۱ تغییرات میانگین محصورسازی کرومات در لیپوزومهای MLV را با درجه حرارت نشان می‌دهد.



نمودار ۱ ـ تغییرات میانگین محصورسازی با درجه حرارت

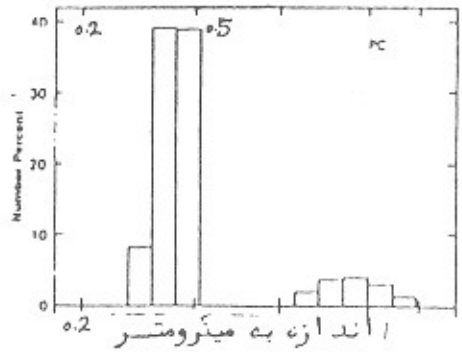
نمودار شماره (۱): تغییرات میانگین محصورسازی با درجه حرارت

در تهیه لیپوزومهای دارویی از دو نوع لستین سویا و لستین تخم‌مرغ و در دو نسبت متفاوت استفاده شده است.میزان محصورسازی (EF%) داروی لوامیزول هیدروکلراید بسیار بالا و بیش از ۹۰ درصد برای نسبت‌های متفاوت و انواع مختلف می‌باشد (جدول ۲).

جدول شماره (۲): درصد محصورسازی لوامیزول هیدروکلراید برای دو نوع لستین سویا و تخم‌مرغ

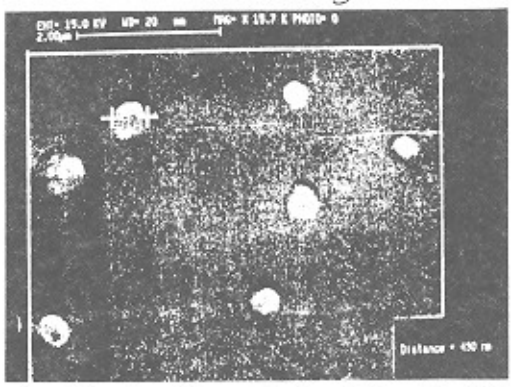
%EF	باقر حاوی دارو:اتانل:لستین
٪۹۲/۷	۱۰۰:۸۰:۲۰۰
٪۹۳	۲۰۰:۱۶۰:۴۰۰
٪۹۲/۲	۱۰۰:۸۰:۲۰۰
٪۹۲/۹	۲۰۰:۱۶۰:۴۰۰

از نظر خصوصیات فیزیکی، سوسپانسیون لیپوزومی تهیه شده دارای چگالی متوسط ۱/۰۲ می‌باشد.پدیده رسوب‌گذاری در مورد لیپوزومها به خوبی دیده می‌شود.رسوب ایجاد شده در ته لوله به راحتی قابلیت پراکندگی را نشان می‌دهد.به وسیله اولتراسانتریفوژ در ۶۰،۰۰۰ rpm و به مدت زمان ۱ ساعت و ۲۰°c دو دسته متفاوت لیپوزومها از نظر اندازه جدا شدند.نمودار ۲ توزیع اندازه ذره‌ای را برای لیپوزومها نشان می‌دهد. بیشترین فراوانی اندازه ذره‌ای میکرومتر ۰/۵μ می‌باشد.



نمودار شماره (۲): توزیع اندازه ذره‌ای لیپوزومی ساخته شده از فسفا تیدیل کولین (لستین)

شکل ۲ تصویر این لیپوزومها را که به وسیله میکروسکوپ الکترونی با بزرگ نمایی ۱۵۷۰۰ گرفته شده است، نشان می‌دهد.



شکل شماره (۲): لیپوزومهای چند لایه حاوی لوامیزول هیدروکلراید با بزرگنمایی ۱۵۷۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

بحث و نتیجه گیری

با انجام محاسبه آماری، اختلاف میانگینهای به دست آمده را از نظر معنی دار بودن مورد بررسی قرار دادیم (آزمون t)، میانگینهای محصور سازی ب ،ج ،د (جدول ۱) به ترتیب مربوط به نقاط انجماد ۰°C، ۰°C - ۲۰°C - ۲۰°C - در سه دوره، هیچ کدام با یکدیگر اختلاف معنی داری را نشان نمی دهند و لیکن میانگین محصورسازی مورد الف مربوط به نقطه برودتی ۲۰°C با همه موارد دیگر اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

از آنجا که دمای تغییر فاز soy-lecitin در محدوده صفر تا ۱۰°C- تخمین زده می شود هنگامی که مخلوط پرولیپوزومی سرمای ۲۰°C را می گذراند، لستین مذکور هنوز به دمای تغییر فاز خود نرسیده است و لذا انقباض لیپید به منظور محصورسازی کافی نیست. حدس زده می شود نیروی ایجاد شده به وسیله مرحله انجماد که باعث انقباض لیپید می شود باعث محصورسازی است. هنگامی که درجه حرارت ۰°C انتخاب می گردد، دما را نزدیک به دمای تغییر فاز قرار داده ایم. در نتیجه انقباض لیپید کاملتر و محصورسازی نیز میزان بالاتری را نشان می دهد. با عبور کردن درجه حرارت انجماد از محدوده دمای تغییر فاز (ج،د) توانایی محصورسازی چندان افزوده نمی شود.

لوامیزول هیدروکلراید در لیپوزومی MLV با روش پرولیپوزومی به میزان بالاتر از ۹۰ درصد با استفاده از دو نوع لستین با منبع سویا و تخم‌مرغ در دو غلظت متفاوت از لیپید (۲۰۰،۱۰۰ میلیگرم) محصورسازی شد. لوامیزول هیدروکلراید دارای حلالیت ۲:۱ در آب می‌باشد و لیکن در اتانل به مراتب حلالیت بهتری دارد.

علیرغم اینکه در روش ساخت در مقایسه با لیپوزوم حاوی کرومات تغییری داده نشده است، علت این افزایش محصورسازی را می توان به امتزاج مناسب مولکولهای دارو در لستین نسبت دهیم. به هر حال استفاده‌هایی که از اثر تنظیم کننده سیستم ایمنی این دارو در کمک درمانی سرطانها (۴)، آرتریت روماتوئید (۵)، مسلولین ریوی (۶) و... می‌شود، ما را بر آن داشت تا فرم لیپوزومی لوامیزول هیدروکلراید را به منظور ارائه به ماکروفاژها تهیه کنیم. به امید اینکه ادامه این راه و انجام آزمایشات in vivo و بالینی نتایج مؤثرتری را به دنبال داشته باشد.

مراجع

1. Allen T.M.et al. Biochemica et biophysica Acta. 1991: 1061: 56-64.
2. Bangham et al. J.Mol.Biol. 1965; 13: 238-62.
3. Perrett.S et al.J.Pharm.pharmacol. 1991; 43 3: 154-60.
4. Spreafico.F:Drugs. 1980: 20 (2): 105-116 (29 ref).
5. Huskisson.E.C et al. Drugs.1980: 20(2): 100-149 (a review).
6. Singh.A.N et al.J.Ass. Phynsn India. 1983: 31: 405.

* * *

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]