

## شکل لیپوزومی لوامیزول هیدروکلراید

دکتر محمود دوستی، دانشیار گروه یوشیمی 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

Levamisole hydrochloride ( $C_{11}H_{12}N_2 \cdot S.HCl$ ) 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 immunosystem, 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 levamisole hydrochloride can be helpful in achieving the stated goals.

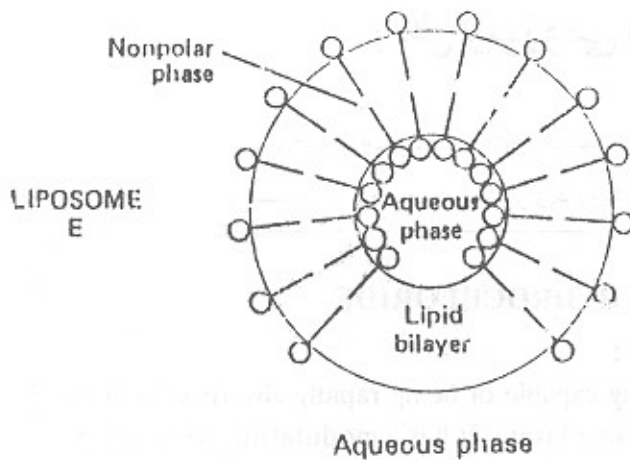
In this study, first a preparation of a multilayer liposome with hydrophilic coating was done. For this purpose, a mixture of phosphate buffer (sodium and potassium phosphate 1,4 mmol, pH=7,4) ethanol and lipid (100 mg phosphatidyl choline, extracted from soya) was used (buffer 200 mg, ethanol 80 mg, lipid 100 mg). Also levamisole hydrochloride with half a solubility in water was used. The above solutions from levamisole containing liposomes under a few cycles of freeze-thawing method (20-60 °C). Ultracentrifugation (45 min, 60.000 rpm) was used to determining the 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

گرم فسفاتیدیل کولین یا لستین حاصل از سویا) مورد استفاده قرار گرفت (بافر ۲۰۰ میلی‌گرم، اتانل ۸۰ میلی‌گرم، لیپید ۱۰۰ میلی‌گرم) و ثانیاً از داروی لوامیزول هیدروکلراید با حلالیت ۱/۲ در آب استفاده گردید. داروی لوامیزول هیدروکلراید به همراه مخلوط فوق در روش برودتی و حرارتی ( $20^{\circ}C$  و  $60^{\circ}C$ ) به یک لیپوزوم حاوی دارو تبدیل می‌شود. برای تعیین میزان محصور سازی دارو از دستگاه اولتراسانتریفوژ (۴۵ دقیقه، ۶۰۰۰۰ rpm) استفاده شد که می‌توان به وسیله یک شاهد درصد محصور سازی دارو را بسدین وسیله به دست آورد. در این روش درصد محصور سازی (EF%) لوامیزول هیدروکلراید ۹۲/۷ درصد بود.

لوامیزول هیدروکلراید ( $C_{11}H_{12}N_2 \cdot S.HCl$ ) دارویی 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 محصور سازی 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

(۹۷۷۷)، میکروسکوپ الکترونی و دستگاه چرخاننده استفاده شده است.



شکل شماره ۱- اساس ساختارهای لیپوزومی

### روش کار

به منظور تهیه لیپوزومهای MLV و ۸۰ میلی گرم اتانل را به یک لوله پلاستیکی درب دار منتقل می‌کنیم سپس ۱۰۰ میلی گرم لستین سویا افزوده می‌شود. به لستین حل شده در اتانل، به ۲۰۰ میلی گرم از بافر فسفات با  $\text{pH} = 7/4$  که حاوی ۷/۷۷ میلی گرم کرومات پتاسیم است اضافه می‌شود. مخلوط فوق‌الذکر در درجه حرارت  $60^{\circ}\text{C}$  برای مدت چند دقیقه قرار می‌گیرد و سپس در دوره‌های انجماد مختلف  $20^{\circ}\text{C}$  -  $0^{\circ}\text{C}$  و  $20^{\circ}\text{C}$  سرد می‌شود. به مخلوط پرولیپوزوم تهیه شده، قطره قطره از بافر PBS با سرعت ۵-۱۰ قطره در دقیقه افزوده می‌گردد. تا حجم نهایی 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 نهایی میلی لیتر ۱۰ می‌رسانیم. میزان جذب کرومات موجود در لیپوزومها با دستگاه اسپکتروفتومتر 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 (۱۰۰/۸۰/۲۰۰) و (۲۰۰/۱۶۰/۴۰۰) از بافر حاوی دارو، اتانل و لیپید: در مخلوط پرولیپوزومی به کار گرفته شد. غلظت وزنی لوامیزول هیدروکلراید ۶۰ میلی گرم دارو در ۲۰۰ میلی گرم بافر در نظر گرفته شد. در روش ساخت تنها از یک دوره بروندی  $20^{\circ}\text{C}$  - 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  $20^{\circ}\text{C}$  و در ۶۰,۰۰۰ rpm سانتیفریوژ می‌شود. یک نمونه لیپوزومی نیز به عنوان شاهد بدون دارو تحت اولتراسانتریفوژ با شرایط فوق قرار گرفت. با استفاده از محلول

### 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.

یکسوع 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 کاردیولپین 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 تنظیم کننده 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 سمیت 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 ۲ در آب به میزان بیش از ۹۰ درصد در لیپوزومهای MLV محصور شده‌اند.

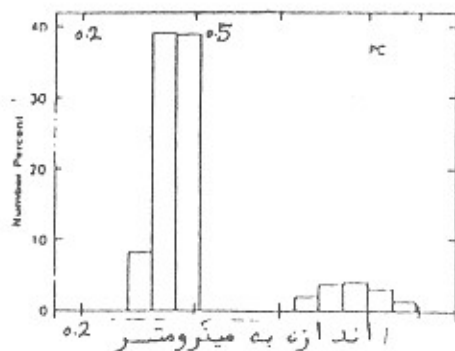
### مواد و وسایل

در کارهای انجام شده از لستین سویا و لستین تخم مرغ (۵۳۳۱ - Merck)، اتانل ۹۹، کرومات پتاسیم، لوامیزول هیدروکلراید (کارخانه پورسینا)، تریتون ۱۰۰ - X، بافر فسفات (PBS)، اولتراسانتریفوژ (Beckman - TL)، کیسه دیالیز

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

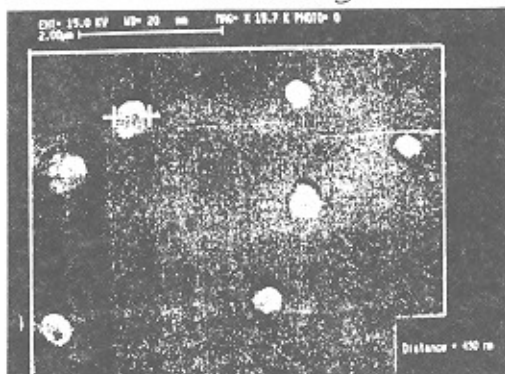
بافر حاوی دارو: اتانل نلستین	%EF
۱۰۰:۸۰:۲۰۰	٪۹۲/۷
۲۰۰:۱۶۰:۴۰۰	٪۹۳
۱۰۰:۸۰:۲۰۰	٪۹۲/۲
۲۰۰:۱۶۰:۴۰۰	٪۹۲/۹

از نظر خصوصیات فیزیکی، سوسپانسیون لیپوزومی تهیه شده دارای چگالی متوسط ۱/۰۲ می باشد. پدیده رسوب گذاری در مورد لیپوزومها به خوبی دیده می شود. رسوب ایجاد شده در ته لوله به راحتی قابلیت پراکندگی را نشان می دهد. 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 ذره ای را برای لیپوزومها نشان می دهد. بیشترین فراوانی اندازه ذره ای میکرومتر ۰/۵/۱ می باشد.



نمودار شماره (۲): توزیع اندازه ذره ای لیپوزومی ساخته شده از فسفا تبدیل کولین (لستین)

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



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

رویی میزان داروی محصور شده در لیپوزوم اندازه گیری شد و با استفاده از آن میزان داروی محصور شده محاسبه گردید.

### نتایج

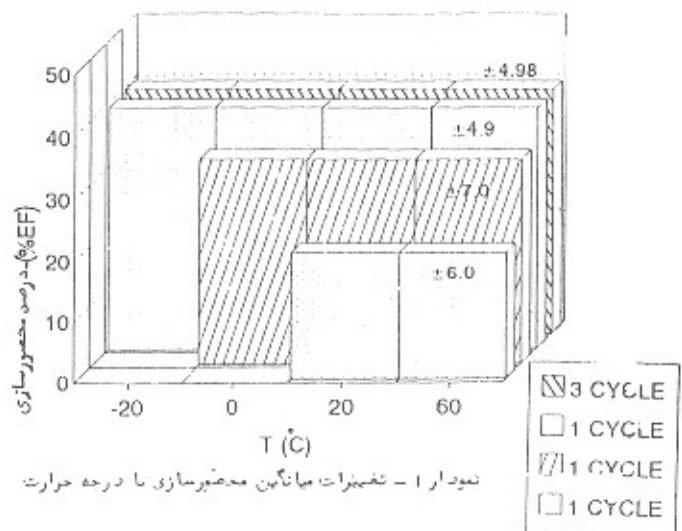
با اندازه گیری میزان محصورسازی (%EF) کرومات پتاسیم برای لیپوزومهای MLV در دوره های پرودتی ۲۰°C، ۰°C، ۲۰°C - و استفاده از تنها یک دوره حرارتی ۶۰°C مطابق جدول ۱، برای کرومات بهترین میزان محصورسازی مربوط به دوره حرارتی ۶۰°C و پرودتی ۲۰°C - می باشد. افزایش تعداد دوره ها از ۱ دوره به ۳ دوره تغییری در میزان محصورسازی به دنبال نخواهد داشت.

جدول شماره (۱): مقادیر میانگین محصورسازی برای

دوره های پرودتی حرارتی مختلف

انحراف معیار	% میانگین محصورسازی	دوره	انجماد °C	ذوب °C	تکرار
±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 می دهد.



نمودار ۱ - 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 تخم مرغ و در دو نسبت متفاوت استفاده شده است. میزان محصورسازی (%EF) داروی لوامیزول هیدروکلراید بسیار بالا و بیش از ۹۰ درصد برای نسبت های متفاوت و انواع مختلف می باشد (جدول ۲).

### 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  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $20^{\circ}\text{C}$  در سه دوره، هیچ کدام با یکدیگر اختلاف معنی داری را نشان نمی دهند و لیکن میانگین محصور سازی مورد الف مربوط به نقطه برودتی  $20^{\circ}\text{C}$  با همه موارد دیگر اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

از آنجا که دمای تغییر فاز soy-lecitin در محدوده صفر تا  $10^{\circ}\text{C}$  تخمین زده می شود هنگامی که مخلوط پرولیپوزومی سرمای  $20^{\circ}\text{C}$  یا می گذراند، لستین مذکور هنوز به دمای تغییر فاز خود نرسیده است و لذا انقباض لیپید به منظور محصور سازی کافی نیست. حدس زده می شود نیروی ایجاد شده به وسیله مرحله انجماد که باعث انقباض لیپید می شود باعث محصور سازی است. هنگامی که درجه حرارت  $20^{\circ}\text{C}$  انتخاب می گردد، دما را نزدیک به دمای تغییر فاز قرار داده ایم. در نتیجه انقباض لیپید کاملتر و محصور سازی نیز میزان بالاتری را نشان می دهد. با عبور کردن درجه حرارت انجماد از محدوده دمای تغییر فاز (ج، د)

توانایی محصور سازی 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 تخم مرغ در دو غلظت متفاوت از لیپید (۲۰۰، ۱۰۰ میلیگرم) محصور سازی شد. لوامیزول هیدروکلراید دارای حلالیت ۲:۱ در آب می باشد 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 محصور سازی را می توان به امتزاج مناسب مولکولهای دارو در لستین نسبت دهیم. به هر حال استفاده هایی که از اثر تنظیم کننده سیستم ایمنی این دارو در کمک درمانی سرطانها (۴)، آرتزیت روماتوئید (۵)، مسلولین ریوی (۶) و ... می شود، 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

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

\* \* \*

