Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۹۶- ۸۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

تهیه و ارزیابی ویژگی لیپوزوم‌های *اشریشیاکلی* به عنوان یک سیستم دارو رسانی نوین به سلول‌های سرطانی کولون

محمد کارگر*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران، mkargar@jia.ac.ir
سمیه هندالی: دانشجوی دکتری نانوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات فناوری نانو، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران ، handali_s81@yaho.com
اسکندر مقیمی پور: استاد فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات فناوری نانو، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران، moghimipour@yahoo.com
زهرا رمضانی: دانشیار شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات فناوری نانو، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران، zramezani@ajums.ac.ir

چکیده

مقدمه: لیپوزوم‌ها ذرات کروی شکل متشکل از دو لایه فسفولیپیدی و دارای ویژگی محصورسازی داروهای آب دوست و آب گریز هستند. امکان ساخت لیپوزوم‌ها با استفاده از فسفولیپیدهای طبیعی، لیپیدهای سنتزی و یا لیپیدهای باکتریایی وجود دارد. این پژوهش با هدف تولید لیپوزوم‌ها با استفاده از لیپیدهای غشایی باکتری *اشریشیا کلی* و ردیابی آن در رده سلولی HT29 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر به شکل تجربی بر روی *اشریشیاکلی* انجام شد. استخراج لیپید از باکتری *اشریشیاکلی* با استفاده از حلال‌های کلروفرم و متانول انجام شد. برای تهیه ساختارهای نانو از روش لایه نازک و از متیلن‌بلو به عنوان یک مدل دارویی استفاده شد. سپس، اندازه ذرات با دستگاه نانوسایزر تعیین شد. آزادسازی متیلن‌بلو با استفاده از غشای دیالیز ارزیابی شد. همچنین، به منظور ردیابی در سلول‌های سرطانی از کربوکسی فلورسین استفاده شد.

نتایج: میانگین اندازه ذرات لیپوزوم‌های *اشریشیاکلی* ۳۳۸ نانومتر بود. میزان بارگیری برای لیپوزوم‌های باکتریایی ۲/۸۸± ۵۳/۳۳ درصد و میزان آزادسازی لیپوزوم‌ها پس از ۲۴ ساعت ۰/۰۰± ۹۷/۵۴ درصد بود. لیپوزوم‌ها توانایی انتقال کربوکسی فلورسین به سلول‌های سرطانی را داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش نشان داد که لیپوزوم‌های باکتریایی ویژگی‌های مناسب نانوذرات مانند اندازه ذره‌ای و بارگیری مطلوب را دارند و از این رو امکان استفاده از آن‌ها به عنوان یک سیستم انتقال دارو وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، *اشریشیاکلی*، لایه نازک، محصورسازی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سیستم‌های کلاسیک دارورسانی، دارو به طور عمومی در بدن توزیع می‌شود و سلول‌ها بر اساس موقعیت‌شان نسبت به دارو، بخشی از دارو را از خون می‌گیرند. به این ترتیب بخشی از دارو، بدون استفاده از بدن حذف می‌شود. برای اینکه دارو نقش درمانی مؤثرتری داشته باشد باید به منظور حفظ خواص بیوشیمیایی و زیستی خود در بدن تا رسیدن به محل هدف محافظت شود. از این رو ساخت حامل‌های دارویی با هدف بهبود توزیع داروها در بدن و کاهش عوارض جانبی مورد توجه قرار گرفته است (۱). امروزه از نانو حامل‌های لیپیدی برای انتقال ترکیبات دارویی و واکسن استفاده می‌کنند که نه تنها موجب حفاظت فیزیکی ترکیبات دارو در برابر عوامل مخربی مانند آنزیم‌ها می‌شوند، بلکه به آزادسازی ماده مؤثره در سلول هدف نیز منجر می‌شوند. از طرفی به علت شباهت ساختاری با غشای سلول انتقال ترکیبات به درون سلول امکان‌پذیر است. یکی از این نانو حامل‌ها لیپوزوم‌ها هستند که ذرات کروی متشکل از دو لایه فسفولیپیدی می‌باشند که یک فاز آبی را احاطه می‌کنند (۲ و ۳). استفاده از سامانه‌های لیپوزومی به عنوان یکی از بهترین حامل‌های دارورسان به علت کمبود سمیت، اثر بخشی بالا و بهبود توزیع دارو در بافت‌ها مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (۴ و ۵). این ساختارها می‌توانند هر دو دسته مواد آب دوست و آب گریز را در خود حمل کنند (۶ و ۷). امکان آزادسازی آهسته دارو به دنبال استفاده منتشره و موضعی، انتقال هدفمند دارو، سازگاری زیستی، زیست تجزیه پذیری و کاهش عوارض جانبی از دیگر ویژگی‌های این نانو ذرات است (۸- ۱۱). برای ساخت لیپوزوم‌ها از فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدهای طبیعی (لیپیدهای سویا یا تخم مرغ) یا سنتزی استفاده می‌کنند (۱۲ و ۱۳). اما مهم‌ترین چالش ترکیبات یاد شده هزینه زیاد استخراج یا ساخت آن‌هاست (۱۰). برای سنتز لیپوزوم‌ها می‌توان از لیپید باکتری‌ها نیز استفاده کرد. به علت سهولت دسترسی به میکروارگانیسم‌ها در تمام طول سال، اقتصادی بودن و امکان رشد بر روی سوبستراهای گوناگون، لیپیدهای غشای باکتری‌ها برای تولید لیپوزوم‌ها کاندیدهای مناسبی هستند (۱۴). در مطالعات مختلف پتانسیل کاربردی لیپوزوم‌های باکتریایی به عنوان یک سیستم دارورسانی ارزیابی شده است. در یک بررسی لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن‌های پروتئینی ساخته شده از لیپیدهای *اشریشیاکلی*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *دینوکوکوس ردیودورانس* بررسی شده‌اند. نتایج به دست آمده از مطالعه یاد شده نقش یاورهای (اجوانت‌های) حامل تهیه شده، قدرت تحریک و تولید آنتی‌بادی و پاسخ سلول‌های T را نشان می‌دهد (۱۵). هوآنگ[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۲ پاسخ ایمنی تولید شده در موش‌های واکسینه شده با آنتی‌ژن پروتئینی ویروس سنسشیال تنفسی[2] بارگیری شده در لیپوزوم‌های تهیه شده از باکتری *دینوکوکوس ردیودورانس* و لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید سنتزی دی اولئویل فسفاتیدیل کولین[3] را مقایسه کرده‌اند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که موش‌های واکسینه شده با لیپوزوم‌های این باکتری از حفاظت شایان توجهی در مقایسه با گروه واکسینه شده با لیپوزوم‌های تهیه شده از دی اولئویل فسفاتیدیل کولین علیه این ویروس برخوردار هستند. از این رو نقش لیپوزوم‌ها باکتریایی به عنوان پایه‌ای برای انتقال واکسن و به عنوان یک اجوانت تایید شد (۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از علل اصلی مرگ و میر و نگرانی‌های جامعه پزشکی در جهان بیماری سرطان است. همچنین، با توجه به عوارض جانبی داروهای ضد سرطان پژوهش‌های زیادی برای حل این مشکل در حال انجام است. با ورود نانوتکنولوژی به عرصه علوم دارویی، استفاده از این نانوفناوری همواره مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام پژوهش حاضر، تولید آزمایشگاهی لیپوزوم‌های باکتریایی با استفاده از سویه‌های استاندارد *اشریشیاکلی* به عنوان یک نانو سیستم پایدار برای انتقال دارو به سلول‌های سرطانی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی آن‌هاست.

مواد و روش‌ها

کشت سویه میکروبی: در پژوهش حاضر از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* (ATCC۲۵۹۲۲) تهیه شده از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی ایران استفاده شد. ابتدا کشت اولیه باکتری *اشریشیاکلی* در ۵ سی‌سی محیط نوترینت براث تهیه شد و پس از رسیدن به کدورت معادل با استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) از کشت اولیه به فلاسک حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر نوترینت براث تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (۱۴).

استخراج لیپیدها: برای استخراج لیپید از روش بلای دایر[۴] استفاده شد. برای این منظور مخلوطی از کلروفرم و متانول به نسب ۱:۲ (همگی مربوط به شرکت مرک کشور آلمان) برای استخراج لیپید از *اشریشیاکلی* استفاده شد. ۳/۷۵ میلی‌لیتر از حلال‌ها به ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتریایی اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه ورتکس، ۱/۲۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. سپس، به مدت ۱ دقیقه ورتکس تکرار شد و ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. در نهایت، پس از سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه، فاز زیرین حاوی لیپید به وسیله پیپت پاستور جدا شد. به منظور بررسی میزان استخراج، لیپید استخراج شده در یک بالن ته گرد و در شرایط خلا ریخته شد تا حلال‌ها کاملا تبخیر شود. سپس وزن لیپید محاسبه شد (۱۴).

تهیه لیپوزوم: برای ساخت لیپوزوم‌ها از روش لایه نازک استفاده شد. برای این منظور ۱ درصد متیل‌بلو به عنوان مدل دارویی به لیپیدهای استخراج شده از باکتری اضافه و تبخیر حلال در یک بالن ته گرد با استفاده از دستگاه روتاری (هیدولف، آلمان) انجام شد. بدین ترتیب یک لایه نازک از لیپیدها در ته فلاسک تشکیل شد. سپس، به این لایه نازک ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین با اسیدیته ۷/۴ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه ورتکس شد. یک فرمولاسیون بدون متیل‌بلو نیز به عنوان کنترل تهیه شد (۱۳ و ۱۷).

بررسی اندازه ذره‌ایی لیپوزوم‌ها: اندازه ذره‌ای یک شاخص مهم در تهیه نانوسیستم‌هاست. زیرا پایداری فیزیکی پراکندگی‌های ذرات به اندازه ذره‌ای و توزیع اندازه ذره‌ای بستگی دارد. برای بررسی اندازه ذره‌ای از دستگاه نانوسایزر (اسکتراسکوپ، کره) استفاده شد. برای این منظور از هر نمونه ۲ میلی‌لیتر در محفظه مخصوص ریخته و در دمای آزمایشگاه در برابر اشعه لیزر درون دستگاه قرار داده شد. نتایج به شکل میانگین با دستگاه محاسبه و ثبت شد. همچنین، نمودار توزیع پراکندگی ذرات برای هر نمونه رسم شد. برای هر فرمولاسیون این مرحله سه بار تکرار شد.

میزان بارگیری لیپوزوم‌ها: برای بررسی میزان بارگیری، لیپوزوم‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور

www.SID.ir

Archive of SID

g ۳۰۰۰۰ جمع آوری شدند. سپس، از محلول رویی برای بررسی میزان داروی بارگیری نشده استفاده شد. بدین شکل که ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۶۰ نانومتر ارزیابی و میزان بارگیری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{مقدار داروی بارگیری شده} = \frac{\text{مقدار اولیه دارو} - \text{داروی بارگیری نشده}}{\text{مقدار اولیه دارو}} \times 100$$

بررسی میزان آزاد سازی: برای بررسی میزان آزادسازی از غشای نیترو سلولزی مصنوعی (بتاژن، ایران) و محفظه انتشاری فرانز[5] (ملک طب، ایران) استفاده شد. این محفظه شامل دو بخش، فاز گیرنده با حجم ۲۲ میلی‌لیتر و فاز دهنده با حجم ۵ میلی‌لیتر بود. غشای نیترو سلولزی با cut–off، ۱۲ کیلو دالتون که ۲۴ ساعت قبل از آزمایش در آب مقطر هیدراته شده بود، در بین فاز دهنده و گیرنده جای داده شد. در فاز دهنده ۵ گرم از فرمولاسیون مورد نظر بر روی غشا ریخته و در حمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور برقراری تعادل دمایی، فاز گیرنده با سرعت ۲۰۰ rpm توسط مگنت بهم زده شد. سپس، در فواصل زمانی ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۲۴ ساعت، ۳ میلی‌لیتر از محفظه گیرنده برداشته و هم حجم آن، آب مقطر جایگزین شد. جذب نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۶۶۰ نانومتر بررسی و میزان غلظت در هر زمان محاسبه شد. این آزمون سه بار برای هر نمونه تکرار شد (۱۴).

ردیابی لیپوزوم در سلول‌های سرطانی: برای ردیابی لیپوزوم‌ها از رنگ ۵-۶-کربوکسی فلورسین به عنوان یک نشانگر استفاده شد. لیپوزوم‌ها حاوی ۵-۶-کربوکسی فلورسین مانند روش یاد شده، تهیه شدند. ۱ میلی‌لیتر از فرمولاسیون لیپوزوم‌ها حاوی ۵-۶-کربوکسی فلورسین به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM[6] اضافه شد. سپس، یک میلی‌لیتر از این مخلوط به فلاسک‌های حاوی سلول که محیط شان دور ریخته شده بود، اضافه و در زمان‌های ۱۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس، سلول‌ها سه بار با بافر فسفات شستشو و به وسیله فرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. در نهایت، برای ردیابی از میکروسکوپ فلورسنت (المپیوس، ژاپن) استفاده شد (۱۴).

آزمون آماری: نتایج به شکل Mean±SD نشان داده شدند. همچنین، تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون آماری t دو طرفه انجام شد. مرز معناداری در $Pvalue<۰/۰۵$ قرار داده شد.

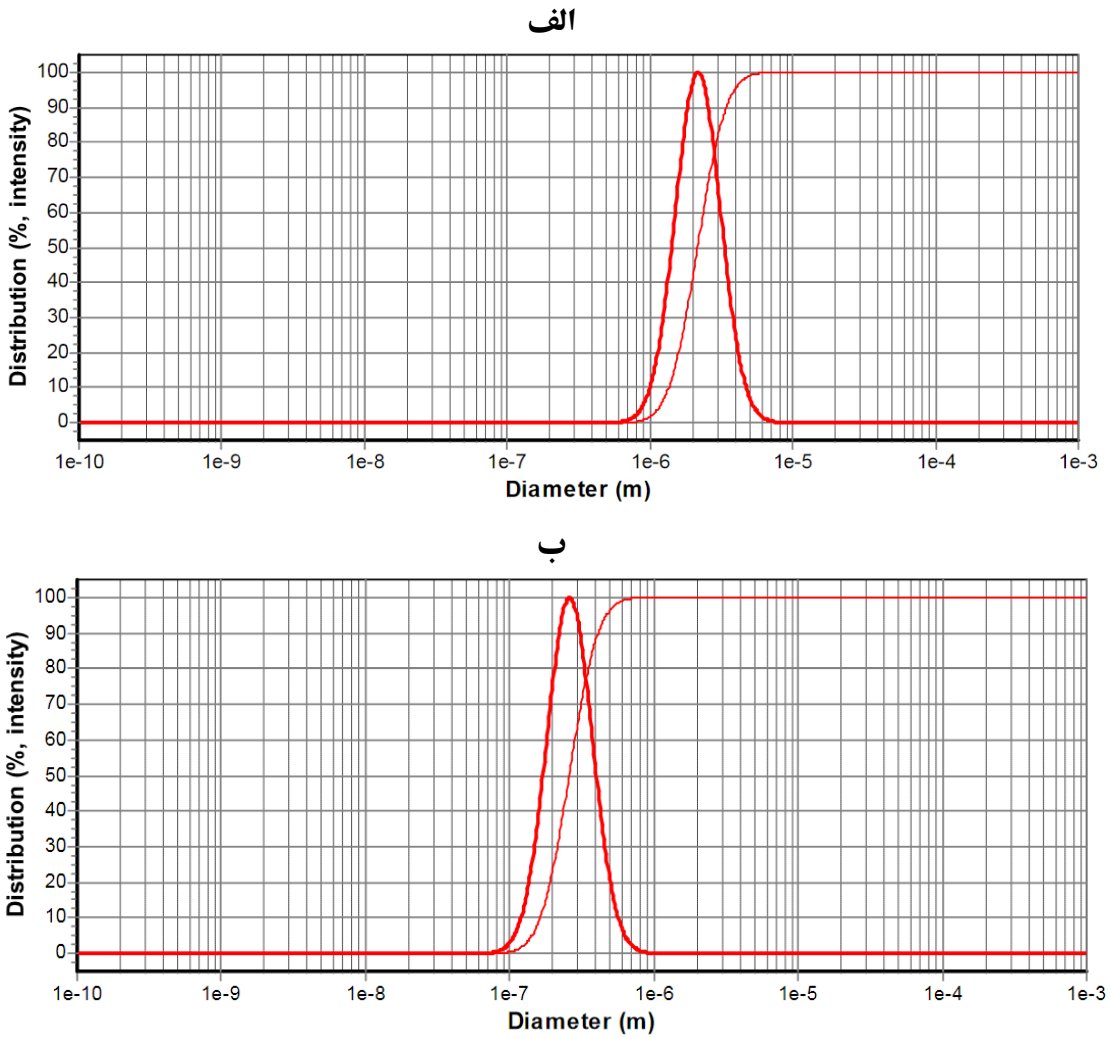
نتایج

میزان استخراج لیپید: حدود ۱۰۰ میلی گرم لیپید از هر ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت *اشریشیاکلی* به دست آمد.

ارزیابی اندازه ذره‌ای لیپوزوم ها: در شکل ۱ (الف و ب) توزیع اندازه ذره‌ای با استفاده از دستگاه نانو سایزر نشان داده شده است. میانگین اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی* قبل از سونیکه شدن (استفاده از امواج فراصوت)، ۱۴۴۶ نانومتر بود. اما پس از سونیکه شدن به مدت ۱۵ دقیقه، اندازه ذره‌ای به ۳۳۸ نانومتر کاهش پیدا کرد (شکل ۱ ب) ($Pvalue < ۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- توزیع اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپیدهای *اشریشیاکلی* حاوی متیلن‌بلو الف) قبل از سونیکه شدن و ب) بعد از سونیکه شدن

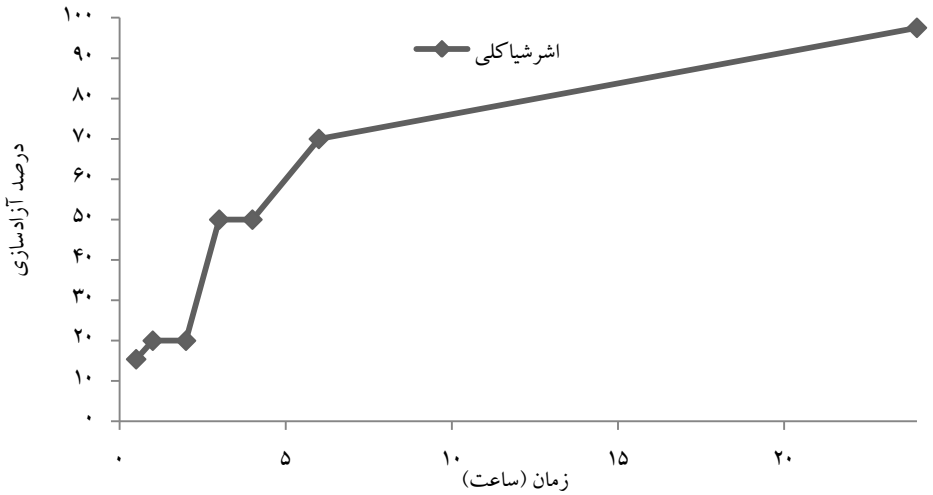
میزان بارگیری لیپوزوم‌ها: میزان بارگیری لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی*، ۲/۸۸± ۵۳/۳۳ درصد محاسبه شد.

میزان آزادسازی لیپوزوم ها: میزان آزادسازی لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی* از غشای نیتروسلولزی در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت به ترتیب، ۰/۰۱± ۱۵/۴، ۰/۰۰± ۲۰، ۰/۰۰± ۲۰، ۰/۰۰± ۵۰، ۰/۰۲± ۵۰، ۰/۰۰± ۷۰ و ۰/۰۱± ۹۷/۵۴ درصد بود (شکل ۲). نتایج نشان داد که ۵۰ درصد متیلن‌بلو در ۴ ساعت اول آزاد شده است.

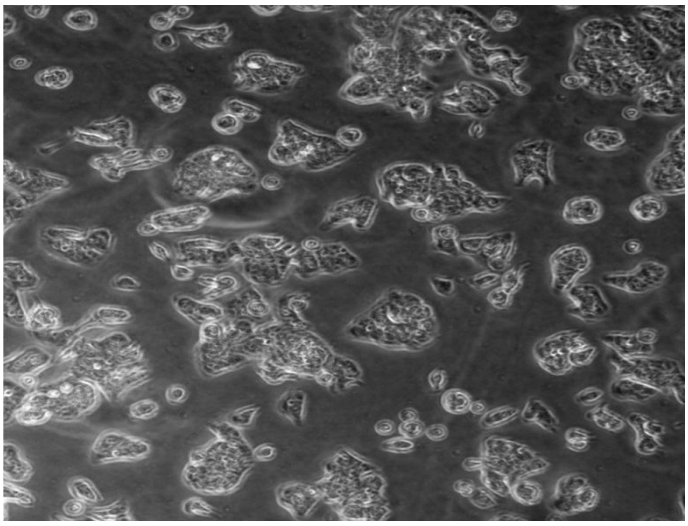
ردیابی لیپوزوم‌ها در سلول‌های سرطانی: تصاویر کشت سلولی مربوط به سلول‌های HT29 قبل از مجاورت با لیپوزوم‌های حاوی کربوکسی فلورسین در شکل ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین سیگنال حاصل از نفوذ لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی* حاوی کربوکسی فلورسین در ۱۵ دقیقه اول بود (شکل ۴) و پس از ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه تشعشع رنگ فلورسنت کم شد.

www.SID.ir

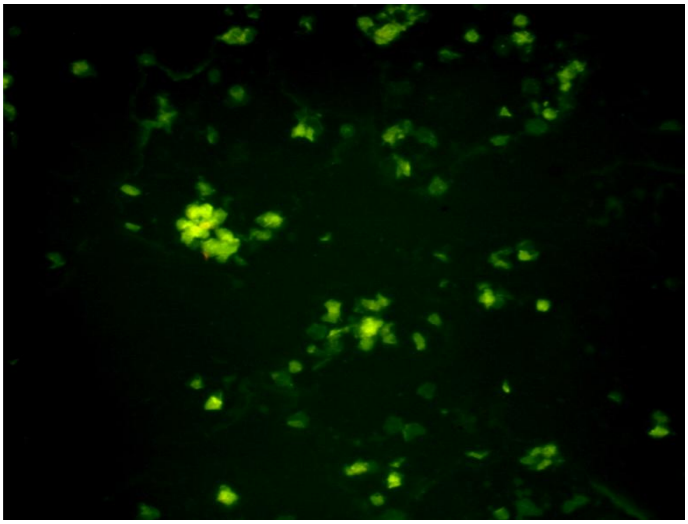
Archive of SID



شکل ۲- میزان آزادسازی متیلن‌بلو از لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی*



شکل ۳- سلول‌های HT29 قبل از مجاورت با لیپوزوم‌های حاوی کربوکسی فلورسین



شکل ۴- سلول‌های HT29 پس از ۱۵ دقیقه مجاورت با لیپوزوم‌های *اشریشیاکلی* حاوی کربوکسی فلورسین

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

انتقال کنترل شده دارو به بدن، یکی از پژوهش‌های مورد توجه صنعت داروسازی است. با روش‌های متداول مصرف خوراکی و تزریقی دارو، امکان توزیع دارو در سراسر بدن و بروز عوارض جانبی دارو وجود دارد. همچنین، برای دست یابی به یک اثر خاص نیاز به مصرف مقادیر زیادی از دارو هست. توانایی لیپوزوم‌ها در کپسوله کردن مقدار زیاد دارو، به حداقل رساندن عوارض جانبی ناخواسته، اثر بخشی بالا و سمیت پایین توانسته‌است علاقه پژوهشگران را جلب کنند. این نانو ذرات کاربردهای ویژه‌ای در زمینه‌های پزشکی از جمله تصویربرداری، درمان بیماری‌ها، هدفمند کردن انتقال داروها و کنترل آزاد شدن داروها دارند. لیپوزوم‌ها را می‌توان از فسفولیپیدهای طبیعی (تخم مرغ یا سویا)، لیپیدهای سنتزی یا از لیپیدهای باکتریایی تهیه کرد. به علت سهولت دسترسی به میکروارگانیسم‌ها در تمام طول سال، اقتصادی بودن و امکان رشد روی سوبستراهای گوناگون، لیپید باکتری‌ها برای تولید لیپوزوم‌ها کاندیدهای مناسبی هستند.

نتایج حاصل از بررسی اندازه ذره‌ای نشان داد که پس از سونیکه کردن، اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌های باکتریایی از ۱۴۴۶ نانومتر به ۳۳۸ نانومتر کاهش پیدا می‌کند. همچنین، اسپروت[۷] و همکارانش در سال ۲۰۰۴ برای کاهش اندازه ذره‌ای آرکئوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها تهیه شده از *هالوفراکس ولکانی*، *پلانوکوکوس* و *باسیلوس فیرموس* نیز از سونیکاتور استفاده کردند. در پژوهش یاد شده اندازه ذره‌ای به ترتیب به ۱۲۰، ۹۱ و۹۲ نانومتر کاهش پیدا کرده بود (۱۹). با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که سونیکه کردن یکی از عوامل مهم در کاهش اندازه ذره‌ای باشد و از طرفی کاهش اندازه ذره‌ای یکی از راهکارهای مهم برای افزایش حلالیت داروهای کم محلول در آب است (۲۰). کاهش اندازه ذره‌ای باعث افزایش نفوذ داروهای محصور شده در لیپوزوم‌ها به درون لایه‌های عمقی پوست نیز می‌شود (۲۱). در مطالعات دیگری گزارش شده است که زمان سونیکه کردن نیز در کاهش اندازه ذره‌ای اهمیت دارد. در یک بررسی با افزایش زمان سونیکه شدن از ۳۰ دقیقه به یک ساعت، اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌ها از ۹۶۹ نانومتر به ۶۷۷ نانومتر رسیده بود (۲۲).

میزان بارگیری متیلن‌بلو در لیپوزوم‌های تهیه شده از لیپید *اشریشیاکلی* با روش لایه نازک ۲/۸۸± ۵۳/۳۳ درصد بود. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، ۵۰ درصد از متیلن‌بلو در ۴ ساعت اول از لیپوزوم‌ها آزاد شده بود و ۵۰ درصد بقیه تا ۲۴ ساعت بعد آزاد شد. در یک فرمول مناسب از داروسانی باید میزان آزادسازی دارو آهسته باشد. نتایج پژوهش حاضر نیز آزادسازی مطلوب ترکیب رنگی جایگزین دارو را در مدت ۲۴ ساعت نشان داد. گوپتا[۸] و همکاران در سال ۲۰۰۸، پتانسیل کاربردی لیپوزوم‌های باکتریایی تهیه شده به وسیله لیپید *اشریشیاکلی* برای انتقال مولکول‌ها به سلول‌های سرطانی را با استفاده از روش انجماد و ذوب برای تهیه لیپوزوم و متیلن‌بلو به عنوان یک مدل دارویی ارزیابی کردند. نتایج پژوهش یاد شده نشان داد که میزان بارگیری در این شرایط ۰/۱۱ ± ۹۱/۰۹ درصد است (۱۴). اما میزان بارگیری در مطالعه حاضر ۲/۸۸± ۵۳/۳۳ درصد بود. این احتمال وجود دارد که با تغییر در روش ساخت لیپوزوم‌ها امکان دست‌یابی به درصد بالایی از محصورسازی وجود داشته باشد. همچنین، این پژوهشگران نشان دادند که لیپوزوم‌های باکتریایی توانایی انتقال مولکول‌ها به سلول‌های سرطانی را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لیپوزوم‌های باکتریایی قادر به انتقال کربوکسی فلورسین به سلول‌های سرطانی رده HT29 هستند. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود پس از مجاورت سلول‌ها با لیپوزوم‌های *اشریشیاکلی*، در ۱۵ دقیقه اول بیش‌ترین سیگنال فلورسانس دریافت شد. اما شدت سیگنال پس از مدت زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه کمتر شد. این مسأله نشان دهنده نفوذ کمتر نشانگر پس از گذشت زمان است. این نتایج با یافته‌های گوپتا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ که از لیپوزوم‌های *اشریشیاکلی* برای انتقال رنگ کربوکسی فلورسین به سلول‌های سرطانی هلا استفاده کردند، مطابقت دارد. این پژوهشگران نشان دادند که در مدت زمان ۱۵ دقیقه بیش‌ترین سیگنال ایجاد می‌شود و پس از مدت زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه شدت سیگنال کاهش می‌یابد. آن‌ها نشان دادند که لیپوزوم‌ها در ۱۵ دقیقه اول گرماگذاری، جذب سلول‌ها می‌شوند و کاهش سیگنال و تشعشع با گذشت زمان احتمالاً به علت تجزیه لیپوزوم‌ها پس از جذب درون سلولی و رقیق شدن رنگ فلورسنت در درون سلول‌هاست (۱۴).

استفاده از علم نانوتکنولوژی در زمینه پزشکی و داروسازی توانسته پنجره امیدی در درمان بسیاری از بیماری‌ها را مقابل پژوهشگران باز کند. لیپوزوم‌ها به عنوان سامانه‌های نوین داروسازی توانسته‌اند بخش وسیعی از پژوهش‌ها را به خود اختصاص دهند. نتایج حاصل از این بررسی امکان استفاده از لیپوزوم‌ها حاصل از پروکاریوت‌ها را به عنوان یک نانوسیستم انتقال دارو در پی داشت. تولید لیپوزوم‌های کم هزینه‌تر و موثرتر برای انتقال داروها، واکسن‌ها و ژن‌ها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. در نهایت، امید است که از یک سیستم نانو دارورسانی ساخته شده از لیپید باکتری‌های بتوان در درمان انواع بیماری‌ها به ویژه سرطان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از مرکز تحقیقات نانو فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای حمایت‌های مالی و اجرایی تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Drabu S., Khatri S., Babu S. Dendrimer: nanopharmaceuticals for drug delivery. *Research Journal of Pharmaceuticals Biological Chemical Sciences* 2010; 1: 464-71.

(2) Cabral ECM., Zollner RL., Santana MHA. Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. *Brazilian Journal of Chemical Engineering;* 2004; 21 (2): 137- 46.

(3) Ghanbarzadeh S., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013; 3 (1): 25- 9.

(4) Paolo DD., Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D., Loi M., Ponzoni M., *et al*. Drug delivery systems: application of liposomal anti-tumor agents to neuroectodermal cancer treatment. *Tumori* 2008; 94: 245- 52.

(5) Goyal P., Goyal K., Kumar SGV., Singh A., Katare OP., Mishra DN. Liposomal drug delivery systems– clinical applications. *Acta Pharm* 2005; 55 (1): 1- 25.

(6) Weiner N., Martin F., Riaz M. Liposomes as a drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1989; 15 (10): 1523- 54.

(7) Moghimipour E., Kargar M., Ramezani Z., Handali S. Archaeosome made from lipids extracted of *Acidianus brierleyi* as a new drug delivery system. *J of Pure and Applied Microbiology* 2014; 8 (2): 957- 64.

www.SID.ir

Archive of SID

(8) Stark B., Pabst G., Prassl R. Long- term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze- drying: effect of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 41 (3- 4): 546- 55.

(9) Bouwmeester H., Dekkers S., Noordam MY., Hagens WI., Bulder AS., Heer C., *et al*. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 53 (1): 52- 62.

(10) Khalili M., Akbarzadeh A., Chiani M., Torabi S. The effect of nanoliposomal and PE Gylated nanoliposomal forms of 6-gingerol on breast cancer cells. *Research Journal of Recent Sciences* 2013; 2 (5): 29-33.

(11) Moghimipour E., Kargar M., Handali S. Archaeosomes as means of nano- drug delivery. *Reviews in Medical Microbiology* 2014; 25: 40- 5.

(12) Khosravi- Darani K., Mozafari MR. Nanoliposome Potentials in Nanotherapy: a Concise Overview, *International Journal of Nanotechnology and Nanoscience* 2010, 6 (1): 3- 13.

(13) Chetanachan P., Akarachalanon P., Worawirunwong D., Dararutana P., Bangtrakulonoth A., Bunjop M., *et al*. Ultrastructural characterization of liposome using transmission electron microscope. *Advanced Materials Research;* 2008; 55 (57): 709- 11.

(14) Gupta V., Gupta R., Grover R., Khanna R., Jangra V., Mittal A. Delivery of molecules to cancer cells using liposomes from bacterial culture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2008; 8 (5): 2328- 33.

(15) Sprott GD., Larocque S., Cadotte N., Dicaire CJ., McGee M., Brisson JR. Novel polar lipids of halophilic eubacterium planococcus H8 and archaeon Haloferax volcanii. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1633 (3): 179- 88.

(16) Huang Y., Anderson R., Enhanced immune protection by a liposome-encapsulated recombinant respiratory syncytial virus (RSV) vaccine using immunogenic lipids from *Deinococcus radiodurans. Vaccine* 2002; 20: 1586- 92.

(17) Mohammadi- Samani S., Montaseri H., Jamshidnejad M. Preparation and evaluation of cyproterone acetate liposome for topical drug delivery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 5 (4): 199-204.

(18) Moghimipour E., Ramezani Z., Handali S.Solid lipid nanoparticles as a delivery System for Zataria multiflora essential oil: formulation and characterization. *Current Drug Delivery;* 2013; 10 (2): 151- 7.

(19) Sprott GD., Dicaire CJ., Gurnani K., Deschatelets LA., Krishnan L. Liposome adjuvants prepared from the total polar lipids of Haloferax volcanii, Planococcus spp. and *Bacillus firmus* differ in ability to elicit and sustain immune responses. *Vaccine* 2004; 22 (17- 18): 2154- 62.

(20) Luo Y., Chen D., Ren L., Zhao X., Qin J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetin´s oral bioavailability. *Journal of Controlled Release* 2006; 114 (1): 53- 6.

(21) Chen Y., Wu Q., Zhang Z., Yuan L., Liu X., Zhou L. Preparation of curcumin- loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics, *Molecules* 2012; 17 (5): 5972- 87.

(22) Moghimipour E., Handali S. Utilization of thin film method for preparation of celecoxib loaded liposomes**.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2012; 2 (1): 93- 8.

[1]- Huang
[2]- Respiratory syncytial virus
[3]- Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)
[4]- Bligh- Dyer
[5]- Franz diffusion cell
[6]- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
[7]- Sprott
[8]- Gupta

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

Preparation and Characterization of *Escherichia coli* Liposomes as a New Drug Delivery System to Colon Cancer

Mohammad Kargar *
Associate Professor of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, mkargar@jia.ac.i
Somayeh Handali
PhD student in Pharmaceutical Nanotechnology, Nanotechnology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran, handali_s81@yahoo.com
Eskandar Moghimipour
Professor of Pharmaceutics, Nanotechnology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran, moghimipour@yahoo.com
Zahra Ramezani
Associate professor of Analytical chemistry, Nanotechnology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran, zramezani@ajums.ac.ir

Abstract

Introduction: Liposomes are spherical vesicles composed of concentric phospholipid bilayers that can entrap hydrophilic, hydrophobic drugs. Liposomes can be prepared from natural phospholipids, synthetic lipids or bacterial lipids. The aim of this study was to formulate liposome from bacterial lipids and evaluate physicochemical properties.

Materials and methods: This study was performed experimentally on *E.coli*. The lipids were extracted from *E.coli.* using chloroform and methanol. Film method was used for preparing nano-systems and methylene blue was used as a drug model. Then their particle sizes were determined using particle sizer. The release methylene blue was carried out using dialysis membrane. Also, trailing them in cancer cells was evaluated by using carboxyfluorescein.

Results: The average particle size of *E.coli.* liposomal was 338 nm. Encapsulation efficiency was 53.33 ± 2.88% and the value of release after 24 h was 97.54% ± 0.00. Liposomes could deliver the carboxyfluorescein to cancer cells.

Discussion and conclusion: The results of this study demonstrated that bacterial liposome has probably a suitable nano-particle such as particle size and desirable loading and it is possible to use them as drug delivery system.

Key words: Liposome, *E.coli.*, Film layer, Encapsulation

* Corresponding author
Received: February 9, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014

www.SID.ir