مطالعة اثر گراديان pH بر روي درصد بارگيري ليپوزومها با روش اسپکتروفتومتري بوسيلة نوترال رد

افشين محمدي بردبري *
دانشکدة داروسازي دانشگاه علوم پزشکي شيراز
تاريخ دريافت: ۸۵/۵/۲ ، تاريخ پذيرش: ۸۵/۱۰/۱۱

Study of pH gradient on liposomes trapping efficiencie by spectrophotometry: using neutral red

Mohammadi-Bardbori A.*
Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences
Received: 2006/7/24 , Accepted: 2007/1/1

Objectives: The purpose of this study was to establish a new experimental, rapid, simple and cost effective approach to study liposomes. NR (Neutral red) was selected as a model of lipophilic and hydrophilic drug. NR is an indicator of pH and a weak base with pk_a=6.7 which is red while ionized in acidic media but yellow while non-ionized in alkaline media and is used in vital staining. **Methods:** In this study the effects of pH internal (5) and external media (5- 9) on liposomes trapping efficiencies in wavelength of 533nm were examined. **Results:** %EE is (the entrapment efficiency of liposome) increased between (%24-%87) in pH (external media) range 5-9. CBC (CBC, contrast between liposomal compartment for visualized by LM) and EBC (EBC, exchanged between liposomal compartment) and EE were calculated. Liposomes with the internal (pH = 5) and external media (pH = 9) is the most suitable option for staining with NR. No significant correlations were observed among the two index with a 95% coefficient interval (EBC with CBC, r^2 = 0.93, $p<0.05$, and EE with CBC r^2=0.93, $p<0.05$). Significant correlations were also observed among the EBC index and EE index with a 95% coefficient interval (EBC with EE r^2=0.66, $p<0.05$). **Conclusion:** NR accumulates in liposomes in ionized form therefore, giving sharp contrast with the surrounding media of liposomes. This makes them to be visualized by LM (light microscope).
Keywords: *Liposome; Molecular NR; Ionic NR; Trapping efficiency; sphectophotometry.*

زمينه و هدف: معرفي يك روش سريع آسان و مقرون به صرفه براي مطالعة ليپوزومهاست. در اين مطالعه نوترال رد به عنوان مدلي از داروهاي چربي دوست و آب دوست انتخاب شده است. نوترال رد معرف pH و يك باز ضعيف است که در شکل يونيزه (در محيط هاي اسيدي) قرمز رنگ و در فرم ملکولي يا غير يونيزه زرد رنگ است. **روشها:** دراين مطالعه ليپوزومهايي با محيط داخلي pH= ۵ (ثابت) و pH محيط بيروني متفاوت از ۵ تا ۹ طراحي گرديد و ارتباط سه پارامتر EE (خاصيت بارگذاري يا به دام اندازي) EBC (تبادل بين محيط داخلي و خارجي) و CBC (اختلاف فاز بين محيط داخلي و دروني) ليپوزومها مورد بررسي قرار گرفت. يافته ها: درصد بارگذاري ليپوزومها با افزايش pH محيط بيروني ليپوزومها افزايش قابل توجه اي نشان داد (%۷۸-۲۴). در مقايسه سه پارامتر ذکر شده، هيچ تفاوت معني داري (با ضريب اطمينان ۹۵%) بين EBC وCBC ($p<۰/۰۵$, $r^2 = ۰/۹۳$) و EE وCBC ($p<۰/۰۵$, $r^2 = ۰/۹۳$) مشاهده نگرديد. ولي تفاوت معني داري بين EBC و EE مشاهده گرديد ($p<۰/۰۵$, $r^2 = ۰/۶۶$). **نتيجه گيري:** نوترال رد در فرم ملکولي وارد ليپوزوم شده و بعد از يونيزه شدن در محيط اسيدي درون ليپوزوم تجمع مي يابد و همين امر امکان مطالعة آنها را با ميکروسکوپ نوري فراهم مي نمايد همچنين درصد بارگذاري ليپوزومها با افزايش pH محيط بيروني ليپوزومها افزايش قابل توجه اي نشان می دهد.
واژه هاي کليدي: *ليپوزوم، نوترال رد يوني، نوترال رد ملکولي، ظرفيت بدام اندازي، اسپکتروفتومتري.*

*نويسنده مسئول: دکتر افشين محمدي بردبري، دانشيار، دانشکدة داروسازي دانشگاه علوم پزشکي شيراز، تلفن: ۰۷۱۱-۲۴۲۴۱۲۷، نمابر: ۰۷۱۱-۲۴۲۴۱۲۸

**Corresponding Author: Dr. Afshin Mohammadi-Bardbori, Associate Professor, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Tel: 0711-2424127; Fax: 0711-2424128; E-mail: toxicology@sums.ac.ir*

۱- مقدمه

نوترال رد يك معرف pH (pH=۶/۸ قرمز و pH=۸ زرد) است كه براي مطالعات بافت شناسي و رنگ آميزي حياتي كاربرد دارد و با افزايش pH از رنگ قرمز به رنگ زرد تغيير مي يابد (۱).

در طول دهه گذشته ليپوزومها به طور وسيعي در رساندن دارو، آنزيم و مواد ژنتيكي به بافتها مورد استفاده قرار گرفته اند (۵-۲). ليپوزومها در سلولهاي سرطاني تجمع مي يابند (۶) بنابراين حامل خوبي در دارو رساني به اين سلولها محسوب مي شوند. همچنين تجمع ليپوزومها در سلول هاي رتيكلواندوتليال مي تواند در رساندن دارو (زيدويدين) بر عليه بيماري مهلك قرن (ايدز) مفيد باشد (۷).

روشهاي مختلفي براي تهيه ليپوزومها وجود دارد اما رايجترين روش هيدراته كردن لاية نازك ليپيدي مي باشد. در اين روش ليپيد و دارو در يك حلال حل شده و حلال تبخير مي شود تا لايه نازكي بدست آيد و سپس آبدهي لايه نازك صورت مي گيرد تا ليپوزومها شكل بگيرند (۱۵). علاوه بر نوع ليپيد، روش تهية ليپوزوم و pH محلول نيز بر ساختمان،اندازه و خصوصيات ليپوزوم مؤثر است (۱و۱۲). در حال حاضر مطالعات زيادي بر روي ليپوزومها براي تهية فرمولاسيونهاي مختلف، اندازة مناسب وبهبود خاصيت بدام اندازي صورت مي گيرد (۱۳) كه اين سيستمها بر اساس شكل لايه بندي، اندازة ذرات و خاصيت به دام اندازي ليپوزومها بوسيلة ميكروسكوپ الكتروني گذاره، ميكروسكوپ جارو كنندة ليزري، تفرق ليزري و التراسانتريفوژ يا روش ديااليز به ترتيب مورد استفاده قرار مي گيرند (۱۴).

در اين مطالعه ليپوزومهاي رنگ آميزي شده با نوترال رد جهت بررسي ميزان بارگذاري ليپوزومها با استفاده از اختلاف pH محيط درونـي و بيروني ليپوزومها و تبادل محيط درونـي و بيروني ليپوزوم با ميكروسكوپ معمولي و اسپكتروفتومتري مورد بررسي قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

۲-۱: مواد

فسفاتيديل كولين (PC) از Avanti Polar Lipid (Alabastar, AL) كلسترول ۹۵% (CHOL) از (Milwaukee) تهية شد بقية مواد مورد استفاده داراي خلوص HPLC بودند.

۲-۲: روش كار

۲-۲-۱: تهية ليپوزوم

تهية ليپوزوم با روش تبخير فاز معكوس در خلاء صورت گرفت (۱۵). تركيبات ليپيدي با فرمولاسيون لسيتين و كلسترول به نسبت مولي ۲ به ۱ در كلروفرم - اتانول با نسبت حجمي ۲ به ۱/۵ ميلي ليتر حل گرديد. حلال اتانول - كلرفرم بوسيلة دستگاه تقطير در خلاء (۱۰۰-۸۰ ميلي بار) به مدت ۱۶ ساعت حذف گرديد. سپس ليپيد خشك شده در بافر فسفات سالين ۴۰ mmol/L و ۱۴۰mmol/L NaCl با غلظت نهايي ليپيد ۳ mmol حل گرديد و به مدت ۶۰ دقيقه در ۶۰°C با همزدن مداوم انكوبه شد.

محلول بافر بسته به نوع آزمايش pH متفاوت است (۹-۵). pH بوسيلة اسيد استيك (۵) و هيدروكسيد سديم ۱/.M تا ۹ رسانده شد. نوترال رد (۰/۰۱ mg/ml) با بافر (pH =۵) به نسبت حجمي ۱:۹ به وسيلة همزدن مداوم مخلوط گرديد و قبل از اينكه فاز آلي توسط تقطير در خلاء حذف گردد به لاية ليپيدي اضافه شد رنگ اضافي ليپوزومها با بافري كه pH آن بسته به نوع ليپوزوم مورد مطالعه متفاوت است (۹-۵) شستشو داده مي شود. مراحل شستشو شامل اضافه كردن بافر و حذف بوسيلة سانتريفوژ است.

۲-۲-۲: مشاهده ليپوزوم ها با ميكروسكوپ نوري

فتوگرافي به وسيلة فتوميكروگراف Leitz با بزرگنمائي ۴۰ × ۳/۵ × ۴ صورت گرفت. اختلاف رنگي كه ناشي از تفاوت pH درون و بيرون ليپوزومها ست ما را قادر مي‌سازد كه به سادگي ليپوزومها را با ميكروسكپ نوري مشاهده كنيم.

۲-۲-۳: تعيين درصد به دام اندازي ليپوزومها با روش اسپكتروفتومتري

مقدار بدام اندازي ليپوزومها (EE) بوسيله جداسازي مقدار بار نشده با اولترا سانتريفوژ و تعيين غلظت با روش اسپكتروفتومتري صورت گرفت.

در اين روش ابتدا به ml ۰/۵ از سوسپانسيون ليپوزومي ۴/۵ ميلي ليتر بافر اضافه گرديد و به مدت ۲ ساعت در rpm ۴۰/۰۰۰ و دماي ۴ درجة سانتيگراد سانتريفوژ گرديد، نوترال رد بارگذاري شده بوسيلة ليپوزوم ها از رابطة زير محاسبه گرديد.

$$EE=Qt-Qs/Qt$$

كه در آن EE مقدار بارگذاري شده، Qt مقدار نوترال رد اضافه شده و Qs مقدار نوترال ردي است به وسيلة سنجش اسپتروفتومتري در طول موج ۵۳۳ نانومتر از جذب سوپرناتانت بدست آمد. براي كاليبراسيون از غلظت‌هاي مختلف نوترال استفاده گرديد.

۲-۲-۴: آناليز داده ها

تمام داده ها به صورت ميانگين ± انحراف معيار (SEM) از ۶ نمونه انجام شد و براى آنالیز آمارى از ANOVA به همراه آزمون Student - Newman Kules استفاده گرديد. همه محاسبات بوسيله كامپيوتر با بكار گيرى نرم افزار SPSS انجام گرفت.

۳- نتایج

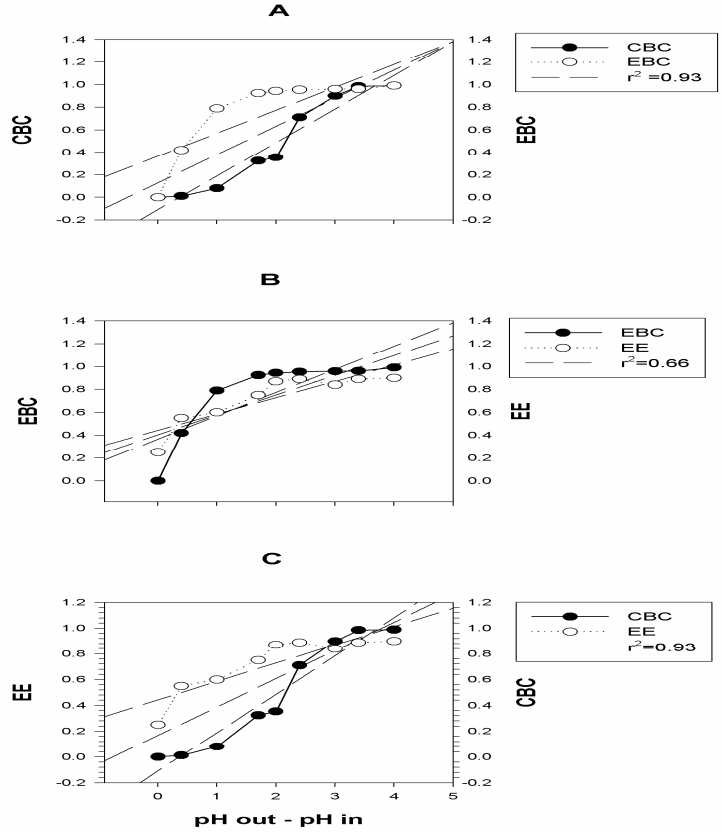
در ایـن مطالعـه بـــر طبـق قـانون هندرسـون – هاسـلباخ: Pka-PH =Log protonated NR / Unprotonated NR ابتـدا درصـد پروتونه (یـوني) و غیـر پروتونـه (ملکـولي) نـوترال رد محاسبه گردید (جدول ۱) بوسیلة فرمول زیر اختلاف فاز بـین دو محـیط بیروني و دروني لیپوزوم (CBC) بدست آمد.

CBC=%p (%p, percentage of protonated NR) in-%Pout /%P total

مقدار محاسبه شده براي لیپوزومهایي با pH دروني ۵ و pH بـیرون ۵ الي ۹ نشان داده شده است (جدول ۱). نشان داده شـد کـه بـراي لیپوزومهاي با pH درونـي ۵ و بیرونـي ۷/۴ ایـن مقـدار ۷ و بـراي لیپوزومهـایي بـا pH بیرونـي ۹ و درونـي ۵ ایـــن مقـدار ۰/۹۸ مي‌باشد. همچنین مي‌توان مقـدار تبـادل نـوترال رد بـین دو محـیط دروني و بیروني لیپوزوم را بـــا فرمول زیـر محاسبه کرد:

EBC = %up (%UP, percentage of unprotonated NR) out - %up in / %up total.

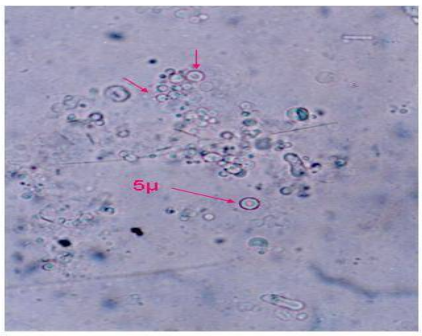
بـراي لیپوزوم هایي بـا pH درونـي ۵ و بیرونـي ۷/۴ مقـدار EBC برابر با ۹۵ /. و براي لیپوزوم هایي بـا pH درونـي ۵ و بیرونـي ۹ معادل ۰/۹۶ است. ارتباط بیـــــن CBC و EBC و EE بـــــا ضـریب اطمینـان ۹۵% محاسبـــــه گردیـــد هیـــچ تـــفاوت معنـي‌داري در مقـــایـــسه EBC بـــــا CBC (r^2 = ۰/۹۳ , p<۰/۰۵) و EE بـــا CBC (r^2 = ۰/۹۳ , p<۰/۰۵) مـشاهده نـــــگردید امـا اخـتلاف معنـي‌داري بـین EBC و EE (r^2 = ۰/۶۶ , p<۰/۰۵) مـــشاهده گردیـــــــد شکل ۱ C, B, A.



شکل۱: (B,A و C). ارتباط بین سه شاخص (CBC, EBC and EE) با ضریب اطمینان ۹۵%

جدول۱: درصد نوترال رد پروتونه و غير پروتونه در محيط دروني و بيروني ليپوزومها، CBC ، EBC و EE نشان داده شده است.

pH in	pH out	%p in	%p out	%up in	%up out	CBC	EBC	EE
5	5	98.04	98.04	1.95	1.95	0.000	0.000	0.25
5	5.4	98.04	95.23	1.95	4.77	.0114	0.419	0.55
5	6	98.04	83.36	1.95	16.6	0.080	0.789	0.6
5	6.7	98.04	50	1.95	50	0.324	0.924	0.75
5	7	98.04	33.44	1.95	66.5	0.354	0.943	0.87
5	7.4	98.04	16.6	1.95	83.36	0.710	0.954	0.75
5	8	98.04	4.78	1.95	95.2	0.900	0.959	0.84
5	8.4	98.04	1.56	1.95	98.43	0.986	0.961	0.89
5	9	98.04	.49	1.95	99.5	0.990	0.990	0.90



شكل ۲: ليپوزومهايي كه داراي pH دروني ۵ و pH بيروني ۹ مي باشند با بزرگنمائي ٤٠ × ٣/٥ × ٤٠ بـوسيلة فتوميكروگراف Leitz عكسبرداري شده اند. اغلب داراي انـدازه اي از ۰/۵ ميكرومتر تا ۱۰ ميكرومتر بوده اند (متوسط ٤ ميكرومتر).

۴- بحث

نوترال رد يك باز ضعيف با Pka = ۶/۷ مي‌باشد. هنگـامي كـه pH محيط مساوي با ۶/۷ باشد ۵۰ % آن به صورت يونيزه و ۵۰ % بـه صورت غير يونيزه در مي آيد. از خصوصيات منحصر به فرد ايـن معرف تغيير رنگ آن مي‌باشد، بطوريكـه در شـكل مولكـولي زرد رنگ و در فرم يوني قرمز رنگ است.

طبيعي است كه اين رنگ فقط در حالت غيـر يـونيزه يـا ملكـولي قادر به عبور از غشاء هاي بيولوژيك وليپوزوم ها است. بـا ورود به درون ارگانل‌ها و ليپوزوم ها در pH اسيدي به فـرم يـونيزه در مي آيد ودر آنجا تجمع مي يابد.

مي‌توان نشان داد كه در درون ليپوزومهايي با pH دروني ۵ مقـدار ۹۸/۰۴ % از نوترال ردي كه وارد محيط درونـي مـي‌شـود بـه دام مي‌افتد و حدود ۱/۹۵ % قـادر بـه برگـشت از محـيط درونـي بـه فضاي بيروني ليپوزوم مي‌باشـد. فارماكوكنتيـك داروهـاي حمـل شده بوسيلة ليپوزومها وابسته به خواص فيزيكوشيميائي ليپوزومها است بازهاي ضعيفي ماننـد دوگسورويبـسين و وينكريـستين كـه شكلهاي يوني و غير يوني دارند مي توانند به طور موثري با تغيير گراديـان pH در ليپوزومهـا بـه دام انداختـه شـوند (۸). عملكـرد

لیپوزومها به صورت مستقیم وابسته به pH و دما است (۱۱-۱۰).

۵- نتیجه گیری

در ایـــن مطالعـــه بـــراي عکـــسبرداري از لیپوزومهـــا، ۱۰µl از سوسپانسیون لیپوزومي بر روي اسـلاید قـرار داده شـد و بوسـیلة میکروسکوپ نوري خصوصیات آنها مورد مطالعه قرار گرفت. که در این مطالعه اندازة لیپوزومهـا از µ ۰/۵ تـا µ ۱۰ (متوسـط µ ۴) متفاوت بوده و اغلب شکل کروي داشتند.

بعضي از وزیکولها حالت تجمع را نشان دادند که این امر ممکـن اسـت بـه دلیـل اثـر تثبیـت کننـدگي کلـسترول بـــــــر روي غشاءهاي بیولوژیك باشد که بعضي از محققین نیز به این موضوع اشاره کرده‌اند (۱۷).

6- References:

1. budavari S. The Merck Index, 12th, Whitehouse station, NJ: Merck & Co. U.S.A., 1996.
2. Allen T.M. Liposomal drug delivery curr. Opin. Colloid Interface. Sci., 1996, 1, 645-651.
3. Mastrobattista E., Koning G.A., Storm G. Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. Adv. Drug Delive.Rev., 1999,40, 103-127.
4. Maruyama K. In vivo targering by liposome. Biol. Pharm. Bull., 2000, 23, 791-799.
5. Reddy J.A., Low P.S. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers.Crit. Rev. Ther. Drug, 1998, 15, 587-627.
6. Jain R.K. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review, cancers, 1987, 47, 3039-3051.
7. Jain N. Yang., G. Tabibi., E.S. Yalkowsky, S.H. Solubilization of NSC-639829. Int. J. Pharm., 2001, 225, 41-47.
8. Harrigan P.R., Wong K.F., Redelmeier T.E.J., Wheeler J., Cullis P.R. Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients. Biochim. Biophys. Acta., 1993, 149, 329 – 338.
9. Choi M.J., Han H.S., Kim H. pH-sensitive liposomes containing polymerized phosphatidylethanolamine and fatty acid. J. Biochem., 1992,112, 694-699.
10. Banghham A.D., Standish M.M., Watkin S.J.C. J. Diffusion o9f univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.Mol. Biol., 1965, 13, 238-252.
11. Mozafari M.R., Reed C.J., Rostron C., Kocum C., Piskin E.Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: A preliminary investigation. Cell. Mol. Biol. Lett., 2002, 7, 923-927.
12. Aurora T.S., Cummins L.W., Haines H.Z. Preparation and characterization of monodisperse unilamellar phospholipid vesicles with selected diameters of from 300 to 600 nm.. Biochim.Biophys. Acta., 1985, 820,250-258.
13. Brand M.: a technological approach. Biotechnology Annual Review, 2001, 759-85.
14. L´opez-Pinto J.M., Gonz´alez-Rodr´ıguez M.L., Rabasco A.M. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int J Pharm., 2005, 298, 1-12.
15. Moscho A., Orwar O., Chiu D.T., Modi B.P., Zare R.N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996, 93, 1443-7.
16. Coderch L., Oliva M., Pons M., Maza Ade. la. Manich., A.M. Parra., J.L. The Effect of Liposomes on Skin Barrier Structure. Int. J. Pharm., 1996, 139, 197–203.