Archive of SID

بررسی اثرات سورفکتانتهای یونی بر غشاء بیولوژیک با استفاده از مدل گلبول قرمز

*دکتر سیدابوالقاسم سجادی طبسی، دکتر داود ممقانی ثانی

* دانشکده داروسازی مشهد، گروه فارماسوتیکس و مرکز تحقیقات دارویی پژوهشکده بوعلی

خلاصه

مواد فعال سطحی از جمله پر مصرف ترین مواد جهت مصارف خانگی و صنعتی بوده و نیز به عنوان مواد جانبی در داروسازی می باشند. از این مواد به عنوان امولسیون کننده، مرطوب کننده و حل کننده درداروسازی استفاده می شود در سالهای اخیر مطالعات زیادی برروی این مواد به عنوان افزایش دهنده جذب (به منظور دارورسانی داروهای کم جذب شونده از راههای غیر تزریقی)، انجام شده است. از جمله موارد محدود کننده مصرف این ترکیبات، اثرات نامطلوب آنها بر غشاء بیولوژیك می باشد. هدف ازاین مطالعه مقایسه دو گروه از سورفکتانتهای یونی از نظر اثرات آنها بر غشاء بیولوژیك با استفاده از گلبول قرمز انسانی بعنوان یك مدل غشائی بود. نتایج نشان داد که بین دو سورفکتانت آنیونی مورد مطالعه، سدیم لوریل سولفات (SLS) نسبت به دی اکتیل سدیم سولفوسوکسینات (DSS) همولیز بیشتری ایجاد نمود. همچنین بین دو سورفکتانت کاتیونی مورد آزمایش، ستریماید (CET) نسبت به بنزالکونیوم کلراید (BNZ) اثرات همولیتیك شدیدتری بروز داد. در مورد کلیه سورفکتانتهای فوق افزایش دما از ۲۵ به ۳۷ درجه موجب افزایش چشمگیری در میزان همولیز گردید. نتایج با استفاده از آزمون T-Student و $P<0/05$ مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

کلمات کلیدی: غشاء، همولیز، گلبول قرمز، سورفکتانتهای کاتیونی، سورفکتانتهای آنیونی

مقدمه

از آنجا که سورفکتانتها به دلایل مختلف در فرمولاسیونهای دارویی بکار می روند (۱۰) بررسی اثرات آنها بر غشاء های بیولوژیك، ضروری به نظر می رسد. به این منظور از گلبول قرمز به عنوان یك مدل مناسب غشایی استفاده شده است (۷). غشاء گلبول قرمز به دلایل گوناگون از جمله سهولت دسترسی به آن و نیز تشابه ساختمانی با دیگر غشاء های بدن از جمله غشاء های مخاطی ، کاربردهای زیادی را در تحقیقات به خود اختصاص داده است (۶و ۹).

مواد فعال سطحی یا سورفکتانتها دارای خواص مشترکی می باشند که شامل جذب سطحی، تشکیل میسل، حل کنندگی، مرطوب کنندگی، کف کنندگی و پخش کنندگی است. ملکول سورفکتانتها دارای دو بخش کاملا" متمایز آبدوست و آبگریز می باشد و بر اساس بار الکتریکی بخش آبدوست آنها را به چهار گروه آنیونی، کاتیونی، غیر یونی و آمفوتریك تقسیم بندی می نمایند (۵).

از کاربردهای سورفکتانتها در داروسازی می توان به استفاده از آنها به عنوان حل کننده، پخش کننده، امولسیون کننده ، مرطوب کننده و اخیرا بعنوان جذب افزا در فرمولاسیون داروهای کم جذب شونده از جمله پپتیدها و پروتئین ها به منظور دارورسانی آنها از راههای غیر تزریقی، اشاره کرد.

عوامل جذب افزا (Absorption Enhancers) به ترکیباتی اطلاق می شود که به منظور افزایش عبور داروهای کم جذب شونده از غشاء های مخاطی مثل غشاء اپی تلیال روده یا بینی به فرمولاسیون این داروها اضافه می شوند. در سالهای اخیر اثرات جذب افزایی تعدادی از سورفکتانتهای یونی و غیر یونی مورد مطالعه قرار گرفته است. Gould و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان داده اند که برخی از سورفکتانتهای غیریونی جذب مخاطی داروهای کم جذب شونده را افزایش می دهند. (۳). یکی از مکانیسم های پیشنهاد

www.SID.ir

Archive of SID

شده برای جذب افزایی سورفکتانتها، ایجاد گسستگی نسبی و قابل برگشت در غشاء و در نتیجه افزایش نفوذ پذیری آن است. سورفکتانتهای با فعالیت حل کنندگی قوی مثل Triton X-100 و پلی اکسی اتیلن –۲۳ لوریل اتر علیرغم اینکه قادرند جذب دیگر داروها را به طرز چشمگیری افزایش دهند ولی به دلیل وارد آوردن آسیب شدید و غیر قابل برگشت بر غشاء مخاطی، برای استفاده به عنوان جذب افزا مناسب نیستند.

بنابراین یکی از نکات مهم قبل از مطالعه اثرات جذب افزایی، بررسی شدت اثرات سمی سورفکتانت بر غشاء بیولوژیك است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات غشائی چهار سورفکتانت بر غشاء بیولوژیك بود و از گلبول قرمز انسانی به عنوان یك مدل غشائی استفاده شد.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و معرف ها

ستریماید (فلوکا)، سدیم لوریل سولفات (مرك)، دی اکتیل سدیم سولفوسوکسینات (فلوکا)، بنزالکونیوم کلراید (مرك)، سدیم کلراید، اسید سیتریك، سدیم دی هیدروژن فسفات ۲ آبه (BDH) و کیت معرف دراب کیتز از شیمی دارو خریداری شدند که همگی از نوع آنالیتیکال بودند.

روش آماده سازی نمونه ها

عمل خون گیری از یك فرد داوطلب مرد سالم انجام شد و بلافاصله خون به داخل لوله هپارینه تخلیه گردیده و لوله ها به آرامی تکان داده شدند تا مانع لخته شدن خون گردد و در داخل ظرف یخ نگهداری گردیدند. سپس حدود ۳-۲/۵ گرم از خون را داخل لوله های سانتریفوژ درب دار که قبلا توزین شده بودند ریخته و این لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۲۲۰۰g سانتریفیوژ شدند(Hermle Z 230 A, Germany). مایع روئی و نیز پوشش سفید رنگ سطح گلبولهای قرمز با دقت وکمك پیپت پاستور دور ریخته شده و گلبولهای قرمز ته نشین شده سه بار توسط بافر ایزوتونیك مك ایلوان با pH =۷ شستشو داده شدند و سپس توسط بافر مزبور سوسپانسیونی از گلبول قرمز با هماتوکریت حدود ۱۲٪ تهیه گردید. این سوسپانسیون تا زمان آزمایش در یخچال (حرارت ۴ °C) نگهداری می شد (۳).

بررسی میزان همولیز

درون میکروتیوبهای یکبار مصرف با حجم ۰/۵ ml ، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون خونی در مجاورت حجمهای متفاوتی از محلول ذخیره سورفکتانت تحت آزمایش و بافر با pH =۷ قرار داده شد به نحوی که یك دامنه غلظت از سورفکتانت ایجاد گردید و در دمای ۲۵ °C یا ۳۷ °C و در مدت زمانهای ۱۵، ۳۰ یا ۴۵ دقیقه انکوبه شدند.

پس از پایان انکوباسیون میکروتیوبها به مدت ۳۰ ثانیه و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند (Hettich Micro Rapid, Germany). سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مایع روئی را برداشته و۳ میلی لیتر معرف دراب کینز به آنها افزوده و پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu uv/vis 160A, Japan) خوانده شد. شاهد مثبت و شاهد منفی شامل ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون خونی و ۲۰۰ میکرولیتر می باشند. برای بدست آوردن درصد همولیز در هر نمونه، میزان جذب آن نمونه بر میزان جذب کنترل مثبت (همولیز کامل) تقسیم و عدد حاصل درصد ضرب می شود (۳و۸).

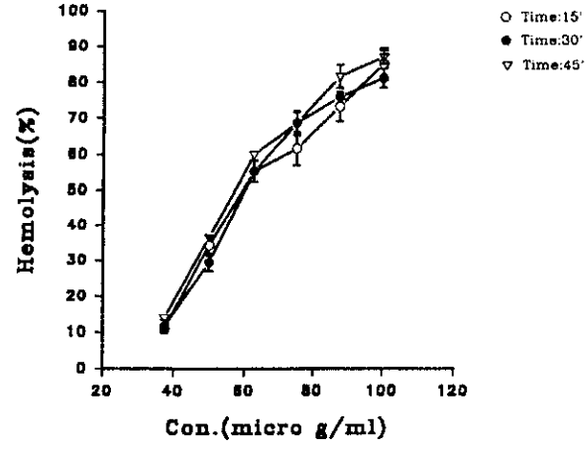
نتایج

نتایج به صورت میانگین درصد همولیز در برابر غلظت گزارش شده است. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و در هربار سه نمونه مورد آزمایش قرار گرفت (n= ۹). از آزمون T-student test جفت شده برنامه آماری سیگما پلات با $P < ۰/۰۵$ جهت محاسبات آماری استفاده گردید.

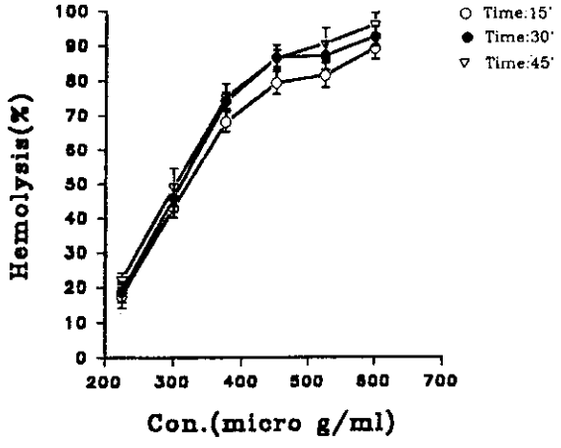
نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ اثرات همولتیك چهار سورفکتانت مورد آزمایش را بصورت درصد همولیز در برابر غلظت در دمای ۳۷ °C و زمانهای انکوباسیون ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه نشان می دهند. هر نقطه از نمودارها معرف میانگین درصدهای همولیز حاصل از ۹ بار تکرار آزمایش بوده و خطوط انحراف معیار

www.SID.ir

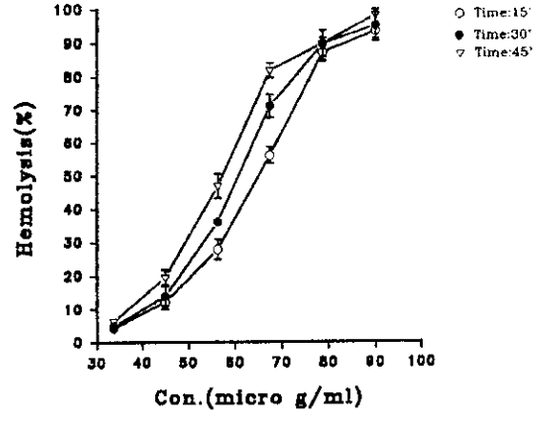
Archive of SID



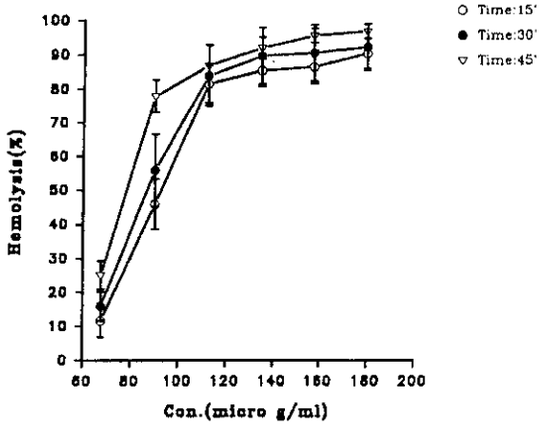
نمودار ۱: اثرات همولیتیک سدیم لوریل سولفات (SLS) بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۳۷°C با سه زمان ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه و در محیط بافر ایزوتونیک pH =۷، هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار (n =۹) می باشد.



نمودار ۳: اثرات همولیتیک دی اکتیل سدیم سولفو سوکسینات (DSS) بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۳۷°C با سه زمان ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه و در محیط بافر ایزوتونیک pH =۷ ، هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار (n =۹) می باشد.



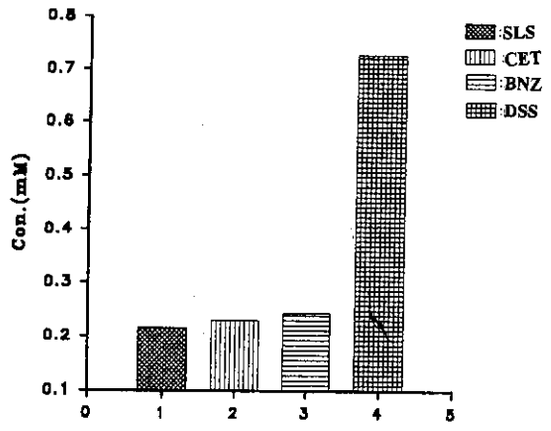
نمودار ۲: اثرات همولیتیک ستریماید (CET) بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۳۷°C با سه زمان ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه و در محیط بافر ایزوتونیک pH =۷ ، هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار (n =۹) می باشد.



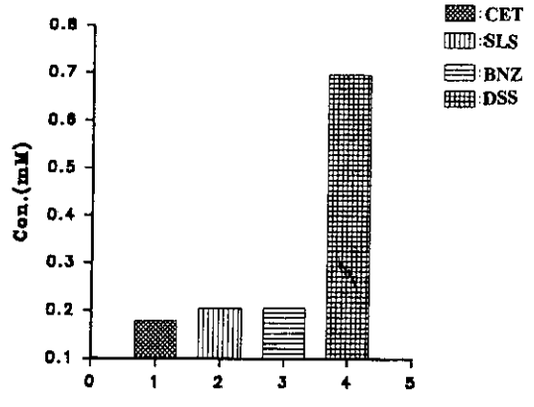
نمودار ٤: اثرات همولیتیک بنزالکونیوم کلراید (BNZ) بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۳۷°C با سه زمان ۱۵، ۳۰ و ٤٥ دقیقه و در محیط افر ایزوتونیک pH =۷ ، هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار (n =۹) می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵: مقایسه غلظتهای چهار سورفکتانت مورد آزمایش جهت ایجاد ۵۰٪ همولیز بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۲۵°C و زمان انکوباسیون ۳۰ دقیقه در محیط بافر ایزوتونیک pH =۷،



نمودار ٦: مقایسه غلظتهای چهار سورفکتانت مورد آزمایش جهت ایجاد ۵۰٪ همولیز بر روی گلبول قرمز انسانی در دمای ۳۷°C و زمان انکوباسیون ۳۰ دقیقه در محیط بافر ایزوتونیک pH =۷،

نیز رسم شده اند که البته برخی از نقاط درون علائم قرار گرفته اند. همانگونه که از نمودارها پیداست افزایش غلظت سورفکتانت باعث افزایش درصد همولیز می شود . همچنین با توجه به نتایج حاصل از تستهای آماری انجام گرفته مشخص گردید که افزایش زمان انکوباسیون موجب افزایش معنی دار ($P< ۰/۰۵$) در اثرات همولتیك سورفکتانتهای مورد آزمایش می گردد.

به منظور مقایسه اثرات همولتیك چهار سورفکتانت تحت بررسی غلظتی از هریك از سورفکتانتها که باعث ۵۰٪ همولیز شده بود تعیین و در نمودار های ۵ (۲۵ درجه سانتی گراد) و ۶ (۳۷ درجه سانتی گراد) نشان داده شده است.

بحث

هر چند که مراحل ایجاد همولیز توسط مواد فعال سطحی تاکنون به خوبی شناخته نشده است ولی حدس زده می شود که شامل فرآیندهای زیر باشد:

۱- جذب ملکولهای سورفکتانت بر روی سطح سلول

۲- نفوذ ملکولهای سورفکتانت به داخل غشاء سلولی

۳ - ایجاد تغییرات در ساختار غشاء سلولی - افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی

۵- افزایش تدریجی پدیده اسموتیك و در نهایت تخریب دیواره سلولی و ایجاد همولیز.

بر اساس مراحل فوق دو اثر از سورفکتانتها در مطالعات همولتیك مشاهده می گردد، افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی و لیز سلولی. سورفکتانتهایی که موجب همولیز می گردند غشاء سلولی را به هموگلوبین نفوذ پذیر می کنند که این عمل در دامنه غلظتی خاصی از سورفکتانت اتفاق می افتد و در پایین تر از این غلظتها اثرات همولتیك مشاهده نمی شود. در این مرحله غشاء سلولی به ملکولهای با وزن کم نفوذ پذیر می گردد.

تخریب حاصل از سورفکتانت، نتیجه شکسته شدن غشاء بوسیله تغییرات ساختاری ملکولهای موجود در ترکیب غشاء سلولی می باشد، متعاقب این تغییرات نفوذ پذیری غشاء سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

به ماکرو ملکولها همانند ملکولهای کوچك افزایش می یابد(۲). این اثر در واقع مبنای استفاده از سورفکتانتها به عنوان جذب افزا (Absorption enhancer) می باشد. در این مطالعه اثرات همولتیك سورفکتانتها با افزایش دما افزایش می یافت. لازم به یادآوری است که یکی از صفات ویژه دو لایه چربی غشاء (Lipid bilayer) آن است که حالت مایع و سیال دارد. بنابراین بخشهایی از غشاء عملا می توانند در سطح غشاء از یك نقطه به نقطه دیگر جریان یابند و این حالت مایع به علت فسفولیپیدهای موجود در غشاء ایجاد می شود که در دماهای پایین تر از دمای فیزیولوژیك به فرم ژل تبدیل می شوند. در نتیجه غشاء مستحکم تر و منظم تر شده و مقاومت آن افزایش می یابد و به همین علت در دمای ۲۵ °C میزان همولیز نسبت به دمای ۳۷ °C کمتر است چون با افزایش دما سیالیت (Fluidity) غشاء و در نتیجه نفوذ پذیری آن بیشتر می شود و بر میزان همولیز افزوده می گردد(۲). همچنین مشاهده شد که با افزایش غلظت، میزان همولیز در مورد هر چهار سورفکتانت افزایش می یابد این امر را می توان بر اساس قانون اول فیك توضیح داد. بر اساس این قانون سرعت عبور یك ماده از غشاء با اختلاف غلظت در طرفین آن متناسب است (۱). به عبارت دیگر غلظت سورفکتانت درون غشاء در ارتباط با غلظت سورفکتانت در محیط است و در صورت افزایش آن افزایش می یابد و اگر غلظت به حد خاصی برسد موجب تخریب غشاء سلول می گردد و اثرات همولتیك بروز می نمایند (۲).

با توجه به اینکه DSS نسبت به SLS دارای گستردگی فضایی بیشتری است میزان نفوذ پذیری آن در غشاء سلولی کمتر از SLS است و بهمین علت غلظت بیشتری از DSS نسبت به SLS مصرف گردیده تا همان اندازه اثرات همولتیك ایجاد نماید. لازم به ذکر است که هر دو سورفکتانت دارای گروه یونی تقریبا مشابه می باشند بنابراین می توان نتیجه گرفت که افزایش طول زنجیره غیر قطبی و شاخه دار شدن موجب کاهش نفوذ پذیری و کاهش اثرات همولیتیك می گردد.

مقایسه اثرات همولتیك CET و BNZ از دو جهت قابل بررسی است، اول گروه یونی و دوم زنجیره خطی غیر قطبی. در پدیده همولیز هر چه میزان شارژ الکتریکی یك سورفکتانت بیشتر باشد قدرت همولتیك آن از سورفکتانت دیگری با طول زنجیره غیر قطبی مشابه بیشتر است. گروه یونی CET حاوی آمونیوم بروماید و گروه یونی BNZ ، آمونیوم کلراید می باشد و به علت بیشتر بودن شارژ الکتریکی آمونیوم کلراید انتظار می رود که این سورفکتانت در مقایسه با CET دارای قدرت همولتیك بیشتری باشد. اما با توجه به ساختار شیمیایی CET مشخص می گردد که این ماده یك ترکیب خطی است و می تواند به راحتی به درون غشاء سلول نفوذ نماید در حالی که BNZ در ساختمان خود دارای یك گروه حلقوی حجیم است که نفوذ آن را به داخل غشاء محدود می نماید. با توجه به نتایج تحقیق حاضر ستریماید دارای قدرت همولتیك بیشتری است که نتایج بدست آمده تایید کننده این استنتاج می باشند.

نتیجه گیری کلی

نتایج کلی حاصل از این مطالعه عبارتند از:

۱- SLS، DSS، CET و BNZ همگی دارای اثرات تخریب کننده غشایی با درجات مختلف می باشند.

۲- افزایش غلظت سورفکتانتها موجب افزایش میزان همولیز می گردد.

۳- با توجه به اینکه برخی از این ترکیبات بعنوان ماده کمکی یا محافظ (BNZ و CET) در فرمولاسیون های داروئی و یا بعنوان دارو (DSS) استفاده می شوند بایستی اثرات تخریب غشائی آنها را مد نظر داشت.

منابع

۱. حسن زاده خیاط، محمد. بیوفارماسی و کنتیك داروها، جلد اول، انتشارات علوم پزشکی مشهد، مشهد، ۱۳۷۱، ۶۲-۶۱

2. Bielawaski J., 1990, Two types of hemolytic activity of detergents, Biochim Biophys Acta, 1035: 214-217.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Gould L., 1996, Some factors influencing the effect of surface active agents on membranes., Ph.D. Thesis, Department of Pharmacy, King's College London, University of London, UK
4. Muranishi S., 1990, Absorption Enhancers, Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys. ,7(4): 1-34.
5. Porter M.R. (ed), Handbook of Surfactants, Chapman & Hall, London, 1994, 126-168.
6. Richard L. G., Bithell C.T., Foerster J., Athens W.J. and Lukenns N.J., The Erythrocte , in: Wintrobe's Clinical Hematology, Lea & Febiger, Pennsylvania, 1993, 103 –109.
7. Robertis F. A. and Robertis E. M. H., Cell and molecular biology in: Cell Membrane, Saunders, London, 1995, 239-245.
8. Schrier S. L., 1985, Red cell membrane, Biol. Clin. Hem., 14(1): 1-10.
9. Scott Swenson E. and Curatolo W.J., 1992, Means to enhance penteration, Adv. Drug Del. Rev., 8: 68–70.