بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده شیمی

گروه شیمی معدنی

عنوان پایان نامه ارشد

تهیه فرمولاسیون نانو نیوزومی سیلی بینین و بررسی اثربخشی آن بر رده سلولی سرطان سینه T۴۷D

دانشجو: بشرا امیری

اساتید راهنما

دکتر اسماعیل سلیمانی

دکتر عظیم اکبرزاده

استاد مشاور

دکتر محسن چیانی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

بهمن۱۳۹۲

تقدیم به

عموی شهیدم نورالحسین امیری و لاله‌های سرخ سرزمینم که در بیداد دژخیمان و آنش کینه و تجاوز شکفتند و بهاری جاودان برای ایران به ارمغان آوردند. سروهای سرفراز کشورم که در خاک و خون غلتیدند تا میهن اسلامی راست قامت و پایدار باقی بماند.

مقدسترین واژه‌ها در لغت نامه دلم، پدر و مادر مهربانم، مشفق، بردبار و حامیم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت آنها می‌دانم.

همسرم که نشانه لطف الهی در زندگی‌ام.

برادر و خواهرانم همراهان همیشگی و پشتوانه‌های زندگی‌ام.

دوست عزیزم شادی مهران یکتا که در این لحظات پرکشید و تنهایم گذاشت.

تشکر و قدردانی

پروردگار خلق و خداوند کبریا شکر و سپاس و منت و عزت خدای را

رزاق بنده پرور و خلاق رهنما دادار غیب دان و نگهدار آسمان

سپاس خداوند را که باب رحمت بگشود و راه طلب بنمود. در آینه جان‌ها جلوه کرد و از دریچه عقل‌ها برتو افکند. عاشقان را به نکاپو انداخت و عاقلان را شیدا ساخت. سپاس خداوند را که خود را به ما شناسانید و درهای معرفت به روی ما بگشود تا شکرش بر ما واجب گردد. اینک در آغاز یک پایان، پایانی که خود سرمنشا، آغازی نوین است؛

از اساتید گرامیم جناب آقایان دکتر اسماعیل سلیمانی،دکتر عظیم اکبرزاده و دکتر محسن چیانی بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنمایی‌های آنها تامین این پایان‌نامه بسیار مشکل می‌نمود.

از آقایان: دکتر محمد رضا محرابی، دکتر حسن ابراهیمی، دکتر وحید کلی، محمد زارعی و اسحاق نورمحمدی

خانم‌ها: زهرا صفارزاده، مریم فرحناک، جمیله جهانگیری، اعظم اشرفیان و نرگس زمانی

به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند.

از پرسنل محترم دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود و بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران جهت پیشبرد این پایان‌نامه کمال تشکر را دارم.

تـعـهـد نـــامـه

اینجانب **بشرا امیری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد **شیمی معدنی** دانشکده **شیمی** دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **تهیه فرمولاسیون نانو نیوزومی سیلی بینین و بررسی اثربخشی آن بر رده سلولی سرطان سینه T۴۷D** تحت راهنمائی **دکتر اسماعیل سلیمانی و دکتر عظیم اکبرزاده** متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هـیچ جـا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشـد و مقـالات مسـتخرج بـا نـام « دانشـگاه صـنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده اسـت ضـوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

امضای دانشجو: بشرا امیری تاریخ

مـالـکیت نـتـایـج و حق نـشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.**

چکیده

نیوزوم از سیستم‌های دارورسانی نوین با ساختاری دو لایه متشکل از وزیکول‌های غیر یونی میکروسکوپی می‌باشد. در این مطالعه فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم به روش تبخیر فاز معکوس از اختلاط دارو سیلی بینین با کلسترول، پلی اتیلن گلیکول2000 و Span20 با نسبت‌های معین تهیه شد. اندازه قطر ذرات دارو سیلی بینین نانونیوزوم، میزان بارگذاری دارو و درصد کپسوله شدن به ترتیب ۱۹۲/۳ nm و ۲۲٪ و ۹۹٪ بدست آمد. الگوی رهایش دارو از نانونیوزوم با استفاده از روش دیالیز طی ۳۷ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رهایش دارو از فرمولاسیون به آهستگی صورت می‌گیرد. بررسی پایداری فرمولاسیون دارو نشان داد که وزیکول‌های حاوی دارو حداقل در طی یک ماه بررسی انجام شده کاملا پایدار بوده و دارو سیلی بینین به‌صورت نانونیوزوم باقی مانده، از این فرمولاسیون در درمان سرطان سینه با رده سلولی T47D استفاده شد. میزان سمیت دارو سیلی بینین نانونیوزوم به وسیله آزمون MTT محاسبه گردید. میزان IC_{50} دارو سیلی بینین نانونیوزوم بعد از ۴۸ ساعت، ۲۰۳/۵µg/ml نشان‌دهنده اثر بخشی کمتر آن بوده است.

کلمات کلیدی : نیوزوم، سیلی بینین، رده سلولی T47D ، سورفاکتانت غیر یونی، MTT .

مقالات مستخرج

Boshra Amiri, Esmaiel Soleimani, Azim Akbarzadeh, Mohsen Chiani. **"Drug Delivery of Silibinin Using Nonionic Surfactants",** ۱۶th Iranian Chemistry Congress, Yazd University, September ۲۰۱۳, PP ۱۳۹۹.

Boshra Amiri, Azim Akbarzadeh, Mohsen Chiani, Esmaiel Soleimani.**"Preparation of Nanoniosomal Silibinin and Inspection of Its Physico-chemical Properties",**۱۵th Iranian Inorganic Chemistry Conference, Hakim Sabzevari University, September ۲۰۱۳, PP۱۲۳.

.

فهرست

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱) سرطان ۲

۱-۱-۱) سرطان سینه ۳

۱-۱-۲) عوامل مؤثر در بروز سرطان سینه ۳

۱-۱-۳) درمان سرطان سینه ۶

۱-۲) نانوفناوری به منظور تشخیص و درمان سرطان ۶

۱-۳) دارو رسانی نوین ۸

۱-۳-۱) انواع دارورسانی نوین ۹

۱-۳-۲) لیپوزوم ۹

۱-۳-۳) نانوکپسول ۱۲

۱-۳-۴) درختسان ۱۳

۱-۳- ۵) نانو ذرات در دارو رسانی ۱۴

۱-۳-۶) نانوسوسپانسیون ۱۷

۱-۳-۷) نیوزوم ۱۷

۱-۴) مرور ادبیات و تحقیقات گذشته ۲۳

۱-۵) دارو سیلی بینین ۲۵

فصل دوم : مواد و روش

۲-۱) مواد شیمیایی و وسایل مورد نیاز ۳۰

۲-۲) دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده ۳۴

۲- ۳) روش تهیه فرمولاسیون داروی نانو نیوزوم ۳۷

۲-۳-۱) تهیه بافرفسفات (PBS) ۳۷

۲-۳-۲) تهیه فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانو نیوزوم ۳۷
۲-۳-۳) تهیه فرمولاسیون نانونیوزوم شاهد ۳۹
۲-۴) تعیین درصد کپسولاسیون و میزان بارگذاری شده دارو ۴۱
۲- ۵) رهایش دارو ۴۲
۲-۶) کشت سلولی ۴۲
۲-۶-۱) تهیه محیط کشت ۴۲
۲-۶-۲) کشت و پاساژ سلولی ۴۴
۲-۶-۳) فریز کردن سلول ها ۴۶
۲-۷) تکنیک سنجش MTT ۴۸
۲-۷-۱) رنگ آمیزی تریپان بلو (Trypan blue) ۴۸
۲-۷-۲) تعیین تعداد سلول ها ۴۹
۲-۷-۳) نحوه انجام سنجش MTT ۵۰
۲-۷-۳-۱) نحوه انجام تست MTT برای ۴۸ ساعت ۵۱
۲-۷-۳-۲) تعیین IC_{50} دارو سیلی بینین خالص، سیلی بینین نانو نیوزوم و نانو نیوزوم شاهد در رده سلولی T47D ۵۳

فصل سوم : بحث و نتیجه گیری

۳- ۱) بررسی اندازه قطر ذرات، پتانسیل زتا و مورفولوژی دارو سیلی بینین نانو نیوزوم ۵۷
۳-۲) بررسی درصد کپسولاسیون و میزان بارگذاری داروی سیلی بینین نانونیوزوم ۶۱
۳-۳) بررسی رهایش دارو سیلی بینین نانونیوزم ۶۳
۳-۴) بررسی دارو سیلی بینین نانیوزوم برحیات رده سلولی T47D ۶۴
۳-۵) محاسبه IC_{50} دارو بر روی رده سلولی T47D ۶۷
۳-۶) نتیجه گیری نهایی ۶۸
پیشنهادات ۶۹
منـــابع ۷۰

فهرست اختصارات

DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimethyl Solfoxide
FBS	Fetal Bovine Serum
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration
MTT	Dimethylthiazol Diphenyl Tetrazolium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	Poly Dispersity Index
PEG	Poly Ethylene Glycol
SEM	Scanning Electron Microscopy
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱) سرطان

سرطان اختلالی است که به طور عمده تحت تاثیر عواملی از قبیل ژن و محیط است که با رشد و تکثیر خارج از کنترل سلول‌های بدن به وجود می‌آید. در نتیجه منجر به تشکیل توده سلولی به نام «تومور[۱]» می‌گردد. نئوپلاسم[۲] نام دیگر سرطان است، از لحاظ بالینی نئوپلاسم و تومور معادل هم هستند و از لحاظ لغوی نئوپلاسم به معنای رشد جدید می‌باشد[۱]. تومورها بر اساس توانایی یا عدم توانایی تهاجم به سایر بافت‌ها به دو دسته تومورهای خوش‌خیم[۳] و بدخیم[۴] تقسیم می‌شوند. تومورهای خوش خیم سرطانی نیستند و در سایر اندام‌های بدن پراکنده نمی‌شوند. اغلب با جراحی می‌توان آنها را به طور کامل از بافت جدا کرد و بعد آن قابلیت برگشت به حالت قبل را ندارند. تومورهای بدخیم سرطانی هستند، قدرت تهاجم به بافت‌های اطراف را دارند و به آنها آسیب می‌رسانند. این سلول‌ها قادرند از تومور خارج و وارد جریان خون یا سیستم لنفاوی شده و از آنجا به سایر نقاط بدن منتقل شوند. این فرآیند را متاستاز[۵] گویند[۱].

سرطان فرآیندی چند مرحله‌ای است که پیشرفت آن مستلزم چرخه‌های متوالی جهش و انتخاب طبیعی می‌باشد. در همه مراحل پیشرفت سرطان، بروز برخی جهش‌های ژنی، به منظور کمک به افزایش تعداد سلول‌ها ضروری است. سلول‌های تومور جهت دست‌یابی به این امر از سه مسیر:افزایش تقسیم سلولی، کاهش ورود سلول به آپوپتوز[۶] و برخی اختلال درتمایز سلول‌ها استفاده می‌کنند.

امروزه میلیون‌ها نفر مبتلا به سرطان هستند. خطر ابتلا به سرطان با تغییر در شیوه زندگی کاهش می-یابد، مثلاً ترک سیگار و رژیم غذایی مناسب، عوامل مؤثری در کاهش بروز سرطان هستند. تشخیص زود

---

۱ Tumor
۲ Neoplasm
۳ Benign
٤ Malignant
٥ Metastasis
٦ مرگ سلولی

هنگام این بیماری در موفقیت‌آمیز بودن درمان، کاهش میزان مرگ و میر و کاهش هزینه‌های درمان بسیار مؤثر است [۱].

۱-۱-۱) سرطان سینه

سرطان سینه از سرطان‌های شایع در زنان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ۴۰ الی ۴۴ ساله است که به دلیل رشد مهار نشده سلول‌های غیرطبیعی که در نواحی مختلف سینه ایجاد می شود اتفاق می‌افتد. سرطان ممکن است در بافت‌های مختلف سینه مانند مجاری شیر ایجاد شود. میزان مرگ و میر ناشی از سرطان سینه حدود ۱۰تا ۲۰ مورد از هر صد نفر می‌باشد. با وجود افزایش این سرطان و همچنین پیشرفت روش‌های درمان این نسبت همچنان ثابت مانده است[۲].

در اثر سرطان سینه اختلالاتی در عملکرد سلول‌های اپتیلیال[۱] سینه ایجاد می‌شود که این اختلالات منجر به تغییر در ساختار DNA می گردد [۲]. سرطان سینه مانند سایر بیماری‌های سرطان دارای چهار مرحله،کاملاً قابل علاج قطعی است، کلینیکی که بیمار باید تحت درمان‌های خاص و عمدتاً جراحی و شیمی درمانی قرار گیرد، زمانی که بیماری خیلی پیشرفت کرده و کار زیادی نمی‌توان انجام داد.

سرطان سینه دارای رده‌های سلولی مانند T47D و MCF-7 است که این رده‌ها براساس بهداشت جهانی کدگذاری شده‌اند.

۱-۱-۲) عوامل مؤثر در بروز سرطان سینه

عوامل مختلفی در بروز سرطان سینه دخالت دارند مانند سن، ژنتیک، سابقه خانوادگی، دوره‌های قاعدگی، یائسگی، شیردهی و بارداری، مصرف الکل و سیگار، رژیم غذایی چرب و چاقی.

---

[۱] بافت پوششی

۱) سن: شانس ابتلا به سرطان سینه با افزایش سن بالا می‌رود. بروز سرطان سینه در زنان بیشتر از ۵۰ سال حدود ۷۷ درصد است[۳].

۲) ژنتیک: حدود ۵ تا۱۰ درصد از موارد سرطان سینه زمینه ارثی دارند. شایع‌ترین ژن‌های معیوب در این زمینه دو ژن $BRCA_1$و $BRCA_2$ است. اگر شخصی یکی از این ژن‌های ناسالم را به ارث برده باشد، حدود۸۰ درصد بیشتر در معرض ابتلا به سرطان سینه قرار دارد در مقایسه با زنانی که این ژن را ندارند. در سنین پایین‌تر به این نوع سرطان مبتلا می گردند. در زنان دارای این ژن‌های جهش یافته احتمال ابتلا به سرطان تخمدان نیز بیشتر است. از ژن‌های دیگر دخیل در سرطان سینه می توان ژن *ATM* (مسئول ترمیم DNA آسیب دیده است) و ژن *CHEK-2* را نام برد [۳-۵].

۳) سابقه خانوادگی: خطر ابتلا به سرطان سینه در زنی که مادر، خواهر و یا دختر او دچار سرطان سینه شده نسبت به زنی که این شرایط را ندارد بالاتر است. این خطر هنگامی که یکی از اعضاء خانواده او قبل از سن۴۰ سالگی دچار سرطان سینه شود بالاتر است [۴].

۴) دوره های قاعدگی: شروع قاعدگی در سنین پایین‌تر (زیر ۱۲ سال)، خطر نسبی سرطان سینه را تا ۲۰ درصد افزایش می‌دهد. احتمال افزایش خطر سرطان سینه در شروع زودرس اولین قاعدگی ناشی از مدت طولانی‌تر فعالیت تخمدان دارد [۴].

۵) یائسگی: پس از یائسگی سطح استروژن پایین و پروژسترون وجود ندارد و میزان تقسیم سلول‌های سینه بسیار پایین می‌آید. مشاهده شده که یائسگی زودرس و یائسگی توسط جراحی خطر سرطان سینه را کاهش می‌دهد. برداشتن تخمدان دو طرفه قبل از سن ۴۰ سالگی خطر سرطان سینه را تا حدود ۵۰ درصد در مقایسه با یائسگی طبیعی کاهش می‌دهد [۴].

۶) شیردهی و بارداری: برخی مطالعات نشان می‌دهد شیردهی به ویژه اگر ۱/۵ الی ۲ سال ادامه یابد، خطر سرطان سینه را کمی کاهش می‌دهد. زیرا بارداری و شیردهی تعداد چرخه‌های قاعدگی را طی زندگی فرد کاهش می‌دهد[۴].

۷) مصرف الکل: مصرف الکل قطعاً خطر بروز سرطان سینه را افزایش می‌دهد. این خطر با مقدار الکل مصرفی افزایش می‌یابد. در مقایسه با غیر الکلی‌ها، زنانی که ۲ الی ۵ بار در روز الکل می نوشند. ابتلا به بیماری سرطان سینه ۱/۵ برابر افزایش می یابد [۶،۴].

۸) مصرف سیگار: مواد سمی حاصله از دود تنباکو در بافت های چربی سینه ذخیره می شود که مصرف آن برای دوره‌های طولانی می تواند خطر ابتلا به سرطان سینه را افزایش دهد. شیوع این سرطان در میان زنانی که سیگار می‌کشند تقریبا ۳۰ درصد بیشتر از زنانی است که هرگز سیگار نکشیده‌اند[۴].

۹) رژیم غذایی چرب: رژیم غذایی پرچرب خطر سرطان سینه را تا دو برابر افزایش می‌دهد. نه تنها کمیت بلکه کیفیت چربی مصرفی نیز در بروز این بیماری مؤثر است. بر اساس برخی مطالعات ، شیوع سرطان سینه در زنان ژاپنی و زنان اسکیمو علی رغم مصرف بالای چربی، پایین است. زیرا رژیم غذایی زنان اسکیمو حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب امگا ۳ است که فقط در چربی بدن جانوران آبزی یافت می-شود [۴].

۱۰) چاقی: چاقی در تمام تحقیقات به عنوان یک خطر موثر ، به ویژه برای زنان یائسه شناخته شده است. اگرچه تخمدان‌ها بیشترین میزان استروژن را تولید می‌نمایند، بافت چربی نیز مقدار کمی استروژن تولید می‌کند. هرچه بافت چربی بدن بیشتر باشد میزان استروژن تولیدی نیز بالاتر می‌رود و احتمال بروز سرطان سینه افزایش می‌یابد[۶،۴].

۱-۱-۳) درمان سرطان سینه

درمان سرطان شامل مجموعه‌ای از راهکارها برای تخریب، کنترل و یا برداشتن بافت سرطانی اولیه یا پیشرفته است. به طور کلی درمان‌ها به دو دسته موضعی و سیستمیک تقسیم می‌شوند که از طریق جراحی، رادیوتراپی، شیمی درمانی، هورمون درمانی صورت می پذیرد.

۱) درمان موضعی: یا درمان تومور در محل بدون آن که بر روی سایر بخش های بدن اثر بگذارد. درمان-های مانند رادیوتراپی و جراحی از مهار رشد و تکثیر بی رویه بسیاری از سلول‌ها ناتوان هستند.

۲) درمان سیستمیک: شیمی درمانی و هورمون درمانی در این درمان داروهای خوراکی (از راه دهان) یا داروهایی که مستقیماً به گردش خون تزریق می‌شوند، تجویز می گردد تا باعث تخریب و کنترل سلول-های سرطانی در سرتاسر بدن گردند [۱].

۱-۲) نانوفناوری به منظور تشخیص و درمان سرطان

روش معمولی درمان دارویی سرطان، بدین صورت است که ماده مؤثر را وارد بدن می‌کنند و این ماده علاوه بر سلول‌های مریض به سلول‌ها و بافت‌های سالم بدن نیز سرایت می‌کند. این امر، باعث مصرف بسیار بالای دارو می‌شود و مهم‌تر اینکه موجب آسیب رسانی به بافت‌های سالم بدن نیز می‌گردد. محققان با استفاده از نانوفناوری، در حال ساخت کپسول‌های با ابعاد نانومتری هستند که علاوه بر اندازه غیر قابل تصورشان قدرت تشخیص بافت‌های مریض را دارند، دقیقاً روی این بافت‌ها قرار می‌گیرند و داروی لازم را به آنها می‌رسانند، این پدیده را دارورسانی هدفمند[۱] گویند. نانوفناوری همچنین راه را برای ساخت اندامک‌های سازگار با بدن بسیار هموارتر می‌سازد و بسیاری از امراض غیرقابل علاج را درمان‌پذیر خواهد کرد. در مورد درمان سرطان نیز محققان در حال ساخت نانوذراتی هستند که به محض ورود به بدن،

[۱] Targeted drug delivery

بافت‌های سرطانی را حتی اگر به اندازه چند سلول باشند، شناسایی کرده و از بین می‌برند. این امر موجب خواهد شد که بافت‌های سرطانی در همان روزهای ابتدایی شکل‌گیری، شناسایی شده و از بین بروند.

نانوفناوری با تسریع و بالابردن سطح کیفی و کمی تشخیص سرطان با بهره گیری از فناوری حسگرهای زیستی و تکنیک‌های تصویربرداری پزشکی با حساسیت و دقت بالاتر به کمک بیماران آمده است [۷-۹]. چند دلیل عمده جهت بکارگیری نانوفناوری در حوزه تحقیقات سرطان عبارتند از: توانایی در شبیه سازی واکنش با پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در سطح مولکولی یک دانش خوبی از رفتار سلولی را نشان می-دهد، نانوفناوری یک حوزه ای برای تحقیق در پروتئومیکس[۱] نظیر مطالعه ساختار و عملکرد پروتئین ها را فراهم می‌آورد، استفاده از نانو ابزارها برای تعیین اولیه سرطان، بهره‌گیری از مواد نانو ساختار برای تشخیص و درمان سرطان.

انواع نانو داروها در درمان سرطان سینه

از نانو داروهای که در درمان سرطان سینه استفاده می شوند می‌توان به نانولیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌ها که داروی موثره به آنها متصل می گردد اشاره کرد.

الف) نانو لیپوزوم دارو دوکسوروبیسین[۲] : ژیوتا و همکاران داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را در ترکیب سیکلوفسفامید در درمان سرطان سینه مورد بررسی قرار دادند. نتایج بدست آمده نشان دهنده اثربخشی بیشتر دارو دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد داروی دوکسوروبیسین بوده [۱۰].

[۱] سنجش مقایسه‌ای پروتئین‌ها به صورت جامع در یک مقیاس وسیع است.
[۲] Doxorubicin

ب) نانو نیوزوم دارو پاکلی تاکسل[۱]: زارعی و همکاران نانو نیوزوم دارو پاکلی تاکسل را به روش ترزیق اتر تهیه کردند. اثر بخشی آن بر روی سرطان سینه با رده سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت که در مقایسه با محلول دارو پاکلی تاکسل تاثیری بیشتری در از بین بردن سلول های سرطانی داشته است [۱۱].

ج) نانو لیپوزوم دارو آرتیمیزین[۲]: دادگر و همکاران نانو لیپوزوم دارو آرتیمیزین را به روش تبخیر فاز معکوس تهیه کرد. اثر بخشی آن نسبت به محلول دارو آرتیمیزین بر روی سرطان سینه با رده سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت، در نتیجه بر روی این رده سلولی تاثیر بیشتری داشته است[۱۲].

د) نانو لیپوزوم دارو آدریامایسین : چن و همکاران اثر دارو آدریامایسین محصور در لیپوزوم را که از راه-های مختلف بر مدل‌های دارای سرطان سینه تجویز شده بود را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده جذب درصد بالایی از داروی آدریامایسین محصور در لیپوزوم توسط سلول های توموری و اثر بخشی بهتر آن بوده است [۱۳].

۱-۳) دارو رسانی نوین

صنعت داروسازی از نقطه نظر دارورسانی تا کنون از طریق فناوری نانو به دست‌آوردهای چشمگیری رسیده است. در سیستم دارویی قدیم به علت غیر واقعی بودن دوز دارویی بسیاری از آن در دستگاه گوارش، گردش خون و بافت‌های واسط به هدر می‌رفت تا مقدار معین به سلول‌ها یا بافت مورد نظر برسد. این داروهای جذب شده در طول مسیر عوارض جانبی ایجاد می‌کنند. اگر تاثیر دارو در حد خواب آلودگی باشد مزاحمتی برای بیمار ایجاد نمی‌کند، حال آن که در بیماری چون سرطان و دیابت باعث ریزش مو و

[۱] Paclitaxel
[۲] Artemisinin

عوارض بسیاری می‌شود یا تزریق‌های مکرر باعث دردناک شدن بافت‌ها شده و برای بیمار غیر قابل تحمل می‌گردد.

اما سیستم دارورسانی نوین راه حلی برای رفع احتمالی این مشکلات خواهد بود. در این سیستم دارو-رسانی نوین رساندن دارو در زمانی معین و با دوزی کنترل شده به اهداف دارویی خاص صورت می‌پذیرد. این کار به نحو چشم‌گیری ایمن‌تر و بسیار مؤثرتر از پخش دارو در تمام بدن عمل می‌کند. دارورسانی نوین عوارض ناخواسته را کاهش و دوز کمتری را مصرف می‌کند این سیستم دارو رسانی برای این که قادر به رساندن مقدار مورد نیاز دارو در زمان معین به سطح هدف باشند، باید از گذرگاه نانوتکنولوژی عبور کنند [۱۴].

۱-۳-۱) انواع دارورسانی نوین

محصور سازی دارو در لیپوزوم، استفاده از کپسوئید یا پوشش پروتئینی ویروس‌ها، بهره‌مندی از نانوذرات، نانوکپسول‌ها، نانوسرنگ‌های‌سلولی، نانوسوسپانسیون‌ها، درختسان و ماکروملکول‌های خود تجمع دهنده از روش‌های نوین انتقال دارو در بدن هستند که در ادامه به معرفی آنها می‌پردازیم.

۱-۳-۲) لیپوزوم[۱]

لیپوزوم‌ها، وزیکول[۲]های کروی ریزی هستند که از دو لایه فسفولیپید تشکیل می‌شوند. فسفولیپیدهای معمول فسفاتیدیل کولین[۳] است. اسفنگومیلین[۴] و فسفاتیدیل اتانل آمین[۵] نیز در صنایع دارو سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند که برای دستیابی به این لیپوزوم‌ها به طور معمول از منابع طبیعی مثل زرده تخم-

[۱] Liposome
[۲] ریز کیسه
[۳] Phosphatidyl Choline
[۴] Asfngvmylyn
[۵] Phosphatidyl ethanol amine

مرغ ، دانه‌های سویا و مغز دانه‌ها استخراج می‌شوند. این فسفولیپیدها pH خنثی دارند و لیپوزوم حاصله بدون بار است. دیواره دو لایه لیپوزوم از فسفولیپیدهای با بار منفی مثل فسفاتیدیل سرین[۱]، فسفاتیدیل اینوزتیول[۲]، فسفاتیدیل گلیسرول[۳] و فسفولیپیدهای با بار مثبت مثل استئارین آمین[۴] هم تشکیل شده است. فسفولیپیدها در واقع یک سرقطبی دارند که به دو زنجیر هیدروکربنی متصل است. این ساختار دوگانه[۵] سبب می‌شود که در محیط‌های آبی سرهای قطبی به سمت آب و زنجیره‌های هیدروکربنی به سمت داخل جهت گیری کنند. افزودن ترکیباتی مانند کلسترول به ساختار دو لایه سبب افزایش استحکام آنها می‌شود. کلسترول به علت ساختمان فضایی محکمی که دارد از حرکت دم‌های اسیدهای چرب جلوگیری می‌نماید و باعث پایداری دو لایه لیپیدی می‌شود و نشت داروی احاطه شده در لیپوزوم را کاهش می‌دهد.

مزایای لیپوزوم: هدف گیری داروها به مکان‌های آنها در داخل سلول و کاهش سمیت آنهاست.

معایب لیپوزوم: پایداری نسبتاً کمی دارند و داروی به دام افتاده ممکن است نشت کند و ظرفیت حمل دارویی در آنها پایین است [۱۶].

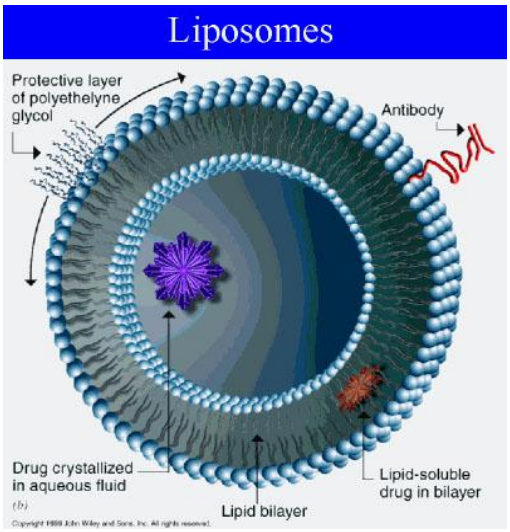
فسفولیپیدها با افزایش دما از حالت منظم «شبه ژل[۶]» به کریستال مایع[۷] تبدیل می‌شوند در این حالت فسفولیپید نظم خود را از دست و میزان نشت دارو از لیپوزوم افزایش می‌یابد. انتشار داروها از دو لایه لیپوزوم در حالت جامد «شبه ژل» در مقایسه با حالت «کریستال مایع» خیلی کمتر است [۱۵].

---

۱ Phosphatidyl serine
۲ Phosphatidyl inositol
۳ Phosphatidyl glycerol
٤ Stearoyl amine
٥ Amphipathic
٦ Gel- likes state
۷ Liquid Crystalline

لیپوزوم ها در زمینه‌های مختلف درمانی به علت عدم سمیت و زیست تجزیه پذیر و ایموژنیسیته[۱] پایین مورد توجه قرار می‌گیرند.

لیپوزوم ها به عنوان حامل جهت کاربرد مطلوب‌تر و بهینه داروها در ژن درمانی، شیمی درمانی سرطان‌ها و سایر درمان‌ها استفاده می‌شود و همچنین به عنوان ترکیبات فعال در فرآورده‌های آرایشی کاربرد دارند. ساختار لیپوزوم در شکل ۱-۱ نشان داده شده، دارای آنتی بادی که در لایه خارجی لیپوزوم برای رسیدن به سلول هدف و دولایه فسفولیپیدی که داروی آبگریز بین این دو لایه و داروی آبدوست در مرکز قرار دارد [۱۵].



شکل ۱-۱- ساختار لیپوزوم

لیپوزوم ها بر حسب اندازه و تعداد لایه‌ها به سه گروه تک لایه کوچک، تک لایه بزرگ و چند لایه تقسیم می‌شوند. وزیکول تک لایه کوچک[۲] (Suv) شامل یک ساختمان دو لایه فسفولیپیدی با اندازه ۲۰-۷۰nm

[۱] خاصیتی که باعث تحریک سیستم ایمنی می شود.
[۲] Small unilamellar vesicles

می‌باشد، وزیکول تک لایه بزرگ[۱] (Luv) با اندازه ۴۰۰nm-۱۰۰ می‌باشد، وزیکول چندلایه[۲] (Mlu) از ۲۰۰nm تا چندین میکرون که شامل دو یا سه ساختمان دو لایهٔ متراکمی می‌باشد[۱۶].

لیپوزوم ها بر اساس بار الکتریکی به دو دسته آنیونی و کاتیونی تقسیم می‌شوند.

۱) آنیونی: که اولین بار توسط نیکولا و همکارانش(۱۹۸۳) برای رهایش DNA استفاده شد. آنها ژن رمزکننده انسولین را درون یک لیپوزوم آنیونی وارد کردند و به موش تزریق نمودند. تزریق سبب کاهش قندخون و افزایش سطح انسولین در موش گردید. عیب این لیپوزوم آن است که صرفاً بر سلول‌های پوششی کبد از طریق ورید موثر هستند تاثیر آنها بر سلول‌های دیگر کمتر است [۱۶].

۲) کاتیونی: این لیپوزوم ها به طور کارآمدی به اسیدهای نوکلئیک که طبیعت آنیونی دارند متصل می-شوند. این لیپوزوم ها را می‌توان به طور وریدی برای هدف گیری اکثر اندام‌ها تجویز کرد [۱۶].

۱-۳-۳) نانوکپسول‌ها

نانوکپسول‌ها، محصول فرآیندی هستند که در آن ذرات ریز مایع یا جامد با یک لایه نازک پیوسته از مواد پلیمری پوشش داده و احاطه شده‌اند[۱۷،۱۵].

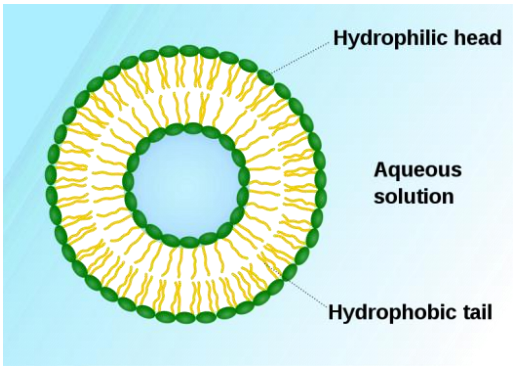
نانوکپسول‌ها در طبیعت نیز ساخته می‌شوند. فسفولیپیدها هنگامی که در یک محیط آبی قرار گیرند خود به خود کپسول‌هایی را تشکیل می‌دهند که قسمت های آب گریز مولکول در درون آنها واقع است و از تماس با آب محافظت می‌شوند.

نانوکپسول‌ها به لحاظ اندازه از محدوده چند میکرومتر تا زیر ابعاد میکرومتری متغیر هستند و در شبکه های سه بعدی پلیمرهای آب دوست و آب گریز وجود دارند [۱۷].

[۱] Larg unilamellar vesicles
[۲] Multilamellar vesicles

نانوکپسول‌ها مهم‌ترین خانواده نانوذرات هستند که در بسیاری از کاربردها از لایه‌های نازک عکاسی تا داروهای مقابله با سرطان استفاده می‌شوند [۱۷].

نانوکپسول‌ها به خاطر خصوصیت ذاتی تمایل به متورم شدن و برگشت سریع به حالت اولیه در اثر پاسخ به عواملی نظیر دما، ترکیب حلال، اسیدیته محلول، نور، فشار، میدان مغناطیسی دارند. افزودنی‌های شیمیایی خاص و میدان الکتریکی جاذبه‌های زیادی را برای ایجاد مواد هوشمند برای کاربردهای زیستی و پزشکی دارند. در شکل۱-۲ ساختار نانو کپسول نشان داده شده، سر آبدوست به سمت بیرون و سر آبگریز به سمت داخل و محلول آبی حاوی دارو است. [۱۷].



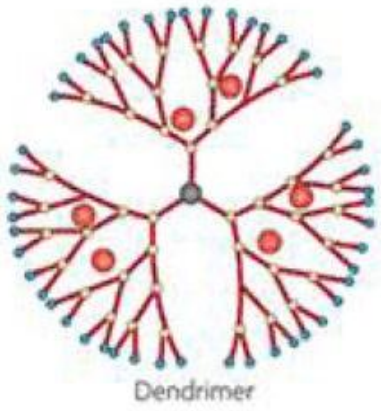
شکل۱-۲- ساختار نانو کپسول

۱-۳-۴) درختسان

دندریمر[۱]ها یا درختسان[۲]ها مولکول‌های بزرگ و پیچیده‌اند که ساختار شیمیایی درختی دارند. آنها مولکول های بزرگ، هم اندازه و هم شکل که معماری سه بعدی منظم و به شدت منشعب دارند. آنها از سه بخش اصلی هسته، شاخه‌ها و گروه‌های انتهایی تشکیل شده‌اند. مفهوم درختسان اولین بار توسط تومالیا در دهه ۱۹۸۰ با پلیمر پلی آمیدو آمین آغاز گردید. دندریمر از واژه یونانی دندروس به معنای

[۱] Dendrimer
[۲] Drkhtsan

درخت و مروس به معنای بخش گرفته شده است و ساختاری مصنوعی یا سنتز شده انشعابی ساخته شده از مونومرهایی با ابعاد نانومتر است. مانند درختان سبز در طبیعت، دندریمرها نیز دارای شاخ و برگ هستند به همین خاطر سطح درونی و بیرونی بسیار زیادی دارند. آنها شاخه، شاخه شده و اندازه‌های مختلفی از حفره‌ها را می‌سازند که فضای داخلی بهترین محل برای نگه‌داری و حمل داروهای درمانی است. دندریمرها درجه کنترل و انعطاف بیشتری برای محل دارو دارند در شکل ۱-۳ ساختار درختسان نشان داده شده است[۱۷].



شکل ۱-۳ - ساختار درختسان

۱-۳- ۵) نانوذرات در دارورسانی

نانوذرات، داروهای حساس را به آنزیم‌های دستگاه گوارش می رسانند و یا آنها را به طور مستقیم از طریق دیواره دستگاه گوارش وارد خون می‌کنند و یا آنها را در محلی مناسب در دیواره رها می‌کنند و به این ترتیب کارآیی دارو را افزایش می دهند. از جمله این داروهای حساس داروهای پپتیدی است. زمانی که به تنهایی وارد دستگاه گوارش می شوند آسیب می‌بینند و کارایی لازم را نخواهند داشت در نتیجه با اتصال به نانو ذرات محافظت می‌شوند.

از جمله نانوذرات به عنوان حامل دارو :

۱) نانوذرات مغناطیسی: که به دلیل خواص مغناطیسی ذاتی که دارند ردیابی آنها از طریق تصویربرداری رزونانس مغناطیسی[۱] (MRI) امکان پذیر است. که کاربرد این نانوذرات در دارو رسانی به صورت:

الف- داروهای شیمی درمانی: که در این مورد به روش‌های مختلفی ممکن است استفاده شود: الف) پیوند یونی بین دارو و نانوذره مغناطیسی. ب) اتصال کووالانسی دارو به نانوذرات مغناطیسی یا با پلیمر پوشش دهنده آن از طریق پیوندهای قابل شکستن برای رهایش داخل سلولی دارو. ج) لیپوزوم و نانوذرات پلیمری حاوی نانوذرات مغناطیسی و دارو، که در این روش نانوذرات مغناطیسی جهت هدایت این سامانه‌ها به محل هدف استفاده می‌شوند.

ب- پپتید درمانی: نانوذرات مغناطیسی را می‌توان به عنوان حامل برای پپتیدهای درمانی نیز بکار برد. باید اندازه نانوذرات مغناطیسی ۲۵-۵۰nm و پوشش مناسب (مانند پلی اتیلن گلیکول که می تواند ورود به داخل سلول را تسهیل کند) داشته باشند.

ج- ژن درمانی

سمیت نانوذرات مغناطیسی به عواملی از قبیل: دوز، ترکیب شیمیایی، راه تجویز، اندازه، میزان تجزیه پذیری، قابلیت انحلال، توزیع زیستی، شیمی سطح، شکل و ساختار آنها بستگی دارد اصلاح سطح این نانوذرات راه اصلی برای به حداقل رساندن اثرات سمی می‌باشد[۱۵].

۲) نانوذرات طلا: این نانوذرات سامانه دارورسانی بسیار خوبی را برای کاربردهای بدنی فراهم می‌کنند که ناشی از اندازه قابل تنظیم ذره، قابلیت اصلاح سطح آنها می‌باشد.

[۱] Magnetic Resonance Imaging

یکی از مزایای عمده استفاده از نانوذرات طلا، نسبت بالایی سطح به حجم آن است. برای ایجاد سامانه‌های دارورسانی می‌توان دارو را بر سطح نانوذرات طلا بارگیری کرد. این سامانه‌ها را می‌توان برای رساندن عوامل شیمی درمانی به سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار داد.

سمیت در نانوذرات طلا به ترکیب شیمیایی لیگاندهای سطحی بستگی دارد. مثلا نانوذرات اصلاح شده با آمین سمیت کمی نشان می‌دهند و نانو ذرات اصلاح شده با کربوکسیلیک اسید نیز غیر سمی می-باشند[۱۵].

۳) نانوذرات متخلخل سیلیکا: نانوذرات متخلخل سیلیکا اولین بار در سال ۱۹۹۲ سنتز شده و از سال ۲۰۰۱ به عنوان سامانه دارورسانی مورد استفاده قرار گرفته است. سیلیکا دارای ساختار و خصوصیات معین و زیست سازگار برای اهداف دارورسانی است. نتایج تجربی نشان داده است که سیلیکا قادر به نگهداری و رهایش آهسته داروهایی از قبیل آنتی بیوتیک‌ها و تورمیفن[۱] است. بر اساس مطالعات، غلظت-های زیر ۱۰۰ mg/ml نانوذرات سیلیکا متخلخل هیچ گونه سمیتی در انواعی از رده‌های سلولی بررسی شده نشان نمی‌دهد. وقتی غلظت بالای ۲۰۰ mg/ml می‌رسد در بعضی موارد مهار رشد دیده می-شود[۱۵].

مزایای استفاده از نانو ذرات:

۱) نانوذرات به واسطه اندازه کوچکی که دارند می توانند در مویرگ های کوچک نفوذ و موجب تجمع مؤثر دارو در محل‌های هدف شوند.

۲) به کارگیری مواد زیست تخریب پذیر در تهیه نانوذرات می‌تواند موجب رهایش آهسته دارو برای بیشتر از روزها یا حتی هفته ها در محل هدف شود.

[۱] Toremifene

۳) با اصلاح سطح نانوذرات می‌توان توزیع زیستی داروها را بهبود بخشید یا برای دستیابی به دارورسانی هدفمند آنها را با لیگاند متصل کرد[۱۸].

۱-۳-۶) نانوسوسپانسیون

نانوسوسپانسیون‌ها نوعی توزیع کلوئیدی ذرات خالص داروها در اندازه‌های کوچکتر از میکرون می‌باشند که با استفاده از سورفاکتانت پایدار شده‌اند. از نانوسوسپانسیون‌ها برای فرمولاسیون داروهایی که هم در آب و هم در روغن نامحلول هستند نیز می‌توان استفاده کرد. استفاده از فناوری نانوسوسپانسیون‌ها باعث فراهم آوردن امکان استفاده از این داروها بدون نیاز به استفاده از حلال می‌گردد.

از مشکلات این دارورسانی، توزیع ناهمگون ذرات دارویی در قطرات حامل آنها است. نانوسوسپانسیون‌ها این مشکل را با افزایش تعداد ذرات در هر قطره، برطرف می سازند و بدین ترتیب سرعت اثر داروها و میزان جذب آنها افزایش می یابد. از نانوسوسپانسیون‌ها برای انتقال مقادیر زیادی از داروهای کم محلول در آب به مغز همراه با کاهش عوارض جانبی داروها نیز می توان استفاده کرد. نانوسوسپانسیون‌ها روش-های تجویز مختلفی مانند تزریقی، خوراکی، موضعی، ریوی و انتقال هدفمند دارویی دارند. در مجموع نانوسوسپانسیون‌ها نه تنها مشکل حلالیت دارو را برطرف کرده‌اند، بلکه با تغییر خواص دارویی، باعث بهبود کارایی و کاهش عوارض جانبی آنها نیز گردیده‌اند[۱۹].

۱-۳-۷) نیوزوم

نیوزوم‌ها از سیستم‌های دارورسانی نوین هستند. نیوزوم‌ها ساختاری لایه‌لایه دارند که از سورفاکتانت غیریونی آلکیل یا دی آلکیل، پلی گلسیرول اتر و کلسترول تشکیل شده‌اند [۲۰]. وزیکول‌های تشکیل شده بین آب دوست و آب گریز در فرآیند نیوزوم کردن از طریق سورفاکتانت غیریونی از قبیل Span 60 با اضافه کردن کلسترول و اندکی ترکیب آنیونی مانند dicetyl phosphate پایدار می‌گردند[۲۲،۲۱].

اندازه نیوزوم‌ها خیلی کوچک و در مقیاس میکروسکوپی تا نانومتری هستند. نیوزوم ها ساختار شبیه لیپوزوم دارند[۲۰].

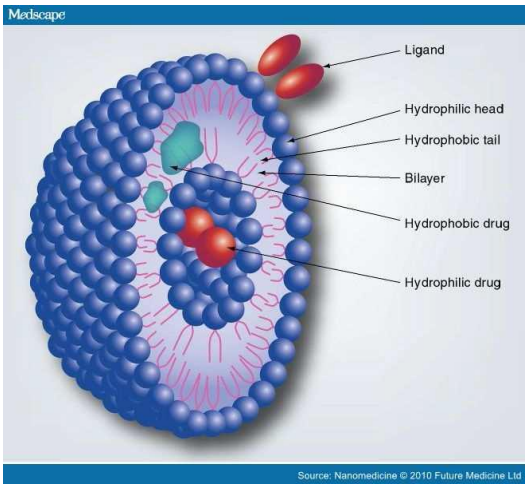
نانونیوزوم‌ها در محیط آزمایشگاه ثبات بیشتری دارند و موجب دوام داروها در فرآیند اثر بخشی آنها می-گردند. هزینه تولید پایین‌تر، ذخیره سازی و نگهداری آسان‌تر و سمیت پایین‌تری دارند[۲۳-۲۵]. نانونیوزوم‌ها زیست سازگار و ساختار انعطاف‌پذیر دارند [۲۵].

نیوزوم از دو ترکیب اصلی کلسترول و سورفاکتانت غیریونی تشکیل شده است. کلسترول جهت استحکام و شکل مناسب نیوزوم و سورفاکتانت غیریونی برای تسهیل در عمل ورود دارو بکار می‌رود.

سورفاکتانت غیریونی مانند Span (۲۰،۴۰،۶۰،۸۰،۸۵) , Tween (۲۰،۴۰،۶۰،۸۰) , Brij (۳۰،۳۵،۵۲،۵۸،۷۲،۷۶) نقش مهمی در تشکیل نیوزوم دارد.

سورفاکتانت‌های غیریونی یک گروه آب‌دوست و یک گروه آب‌گریز دارند[۲۸،۲۷].

استفاده از روش نانونیوزوم باعث افزایش ماندگاری دارو در جریان خون شده و نیاز مصرف دارو را کاهش می‌دهد. نه تنها عوارض جانبی دارو را کاهش می‌دهد، بلکه کارایی درمان را نیز ارتقاء می‌بخشد. در شکل ۱-۴ساختار نیوزوم نشان داده شده، که دارای لیگاند همانند آنتی بادی برای رسیدن به سلول هدف، سر آبدوست به سمت بیرون و سر آبگریز به سمت داخل، دولایه لیپیدی که داروی آبگریز بین این دو لایه و داروی آبدوست در مرکز قرار دارد.



شکل ۱-۴- ساختار نیوزوم

۱-۳-۷-۲) مشخصات نیوزوم

به طور عمده مشخصات نیوزوم شامل اندازه ، مورفولوژی، بار، استحکام، یکنواختی و ظرفیت بارگذاری دارو است.

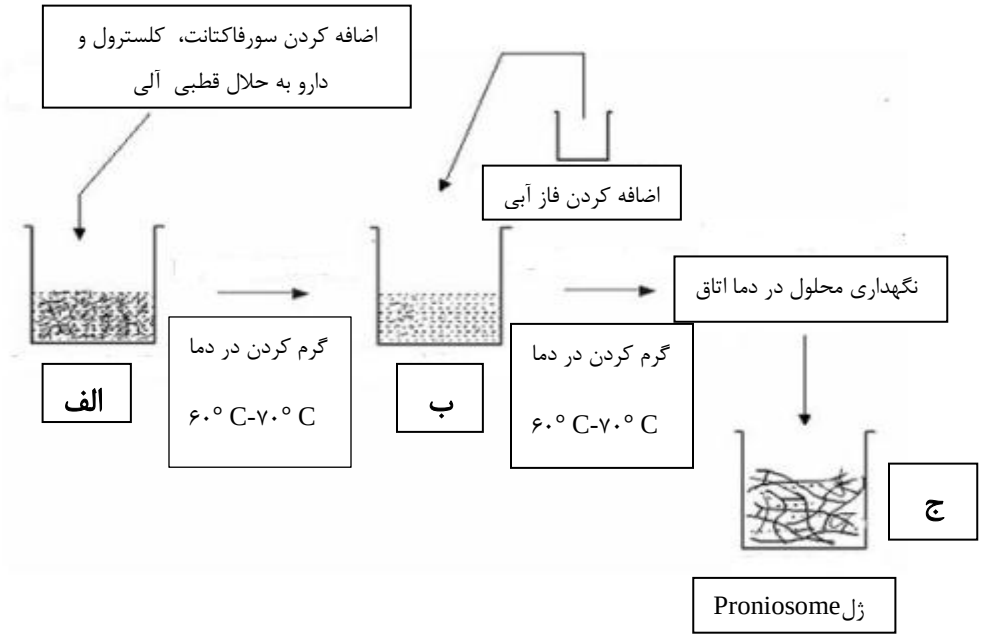
۱-۳-۷-۱) روش‌های تهیه نیوزوم

نیوزوم ها به روش‌های مختلفی مانند Proniosomes ، ترزیق اتر، هیدراته کردن فیلم نازک، فراصوت، میکرو مایع، تبخیر فاز معکوس، حباب، بارگذاری از راه دور تهیه می شوند. در زیر برخی از این روش‌ها شرح داده می‌شود[۲۶،۲۱،۲۰].

۱) روش Proniosomes :

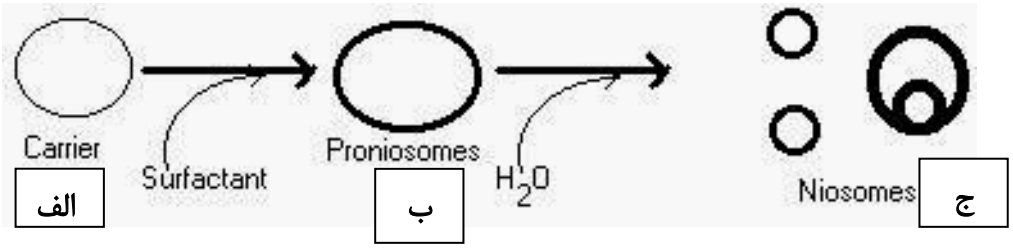
نیوزوم را می توان از روش Proniosomes تهیه کرد. در این روش دارو به فاز آبی اضافه می‌شود و Proniosomes در دما بالاتر از دمای متوسط انتقال فاز سورفاکتانت تحریک می‌شود (شکل‌های ۱-۵ و ۱-۶) [۲۹].

در شکل (۱-۵) سورفاکتانت، کلسترول و دارو به حلال قطبی آلی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دما ۶۰ $^{\circ}$ C -۷۰ $^{\circ}$C گرم می‌شود، سپس به فاز آبی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دما ۶۰ $^{\circ}$ C -۷۰ $^{\circ}$C گرم می-شود و در نهایت در دما اتاق نگهداری و ژل Proniosome تشکیل می‌شود.



شکل۱-۵- مراحل آماده سازی ژل proniosome

در شکل (۱-۶) سورفاکتانت به حامل اضافه و ژل Proniosome تشکیل می‌شود که به آن آب اضافه کرده که در نهایت نیوزوم تشکیل می‌شود.



شکل۱-۶- مراحل تشکیل Proniosomes

۲) روش تزریق اتر[۱]:

در این روش سورفاکتانت به آرامی در دی‌اتیل‌اتر حل و سپس در آب $60^{\circ}C$ نگهداری می‌شود. این مخلوط به داخل محلول آبی دارو تزریق می‌شود. با تبخیر اتر لایه نازکی از وزیکول و در پی آن نیوزوم تشکیل می‌شود. بسته به شرایط استفاده نظیر دما و غلظت قطر وزیکول در محدوده ۱۰۰۰nm-۵۰ است.

۳) تکنیک هیدراته کردن فیلم نازک[۲]:

سورفاکتانت و کلسترول در حلال آلی مانند دی‌اتیل‌اتر، کلروفرم و متانول حل می‌شوند. حلال آلی در دمای اتاق خارج و لایه نازکی در کف تشکیل می‌شود. لایه نازک دوباره هیدراته شده و در فاز آبی $60^{\circ}C$ به آرامی هم‌زده می‌شود. در این فرآیند نیوزوم چند لایه تشکیل می‌شود.

۴) روش فراصوت[۳]:

در این روش محلول دارو در بافر به دو قسمت تقسیم می‌شود و به مخلوط سورفاکتانت/کلسترول در ویال شیشهٔ ۱۰میلی لیتر اضافه می‌شود. مخلوط در $60^{\circ}C$ برای سه دقیقه با استفاده از سونیکاتور با میله تیتانیوم سونیکیت می‌شود و در نتیجه نیوزوم تشکیل می‌شود.

۵) روش میکرو مایع[۴]:

در این روش دو جریان سیال شامل دارو و سورفاکتانت در کانال‌های ریزی با سرعت بالایی با یکدیگر واکنش می‌دهند به گونه‌ای که انرژی در سیستم باقی می‌ماند. در این ناحیه نیوزوم‌هایی تشکیل می‌شود که یکنواختی بهتر و اندازه کوچکی دارند[۲۲].

---

[۱] Enter Injection Method
[۲] Thin Film Hydration Technice
[۳] Sonication Method
[۴] Micro Fiuidization Method

۶) تکنیک تبخیر فازمعکوس[۱]:

کلسترول و سورفاکتانت (۱:۱) در مخلوط اتر و کلروفرم حل شده یک فاز آبی شامل دارو اضافه می‌شود و دو فازی حاصل در دما $^{\circ}C$ ۵-۴ سونیکیت می‌شود. ژل تشکیل شده بعد از اضافه کردن مقدار کمی بافر فسفات (PBS) سونیکیت می‌شود تا مراحل آن کامل گردد. فاز آلی در دما $^{\circ}C$ ۴۰ تحت فشار پایین خارج می‌شود. در نتیجه سوسپانسیون نیوزوم در بافر فسفات رقیق می‌شود و در حمام آب $^{\circ}C$ ۶۰ برای ده دقیقه گرم می‌شود و در نتیجه نیوزوم تشکیل می‌شود.

Raja-Naresh و همکارانش تهیه نیوزوم دارو دیکلوفناک سدیم با استفاده از Tween 85 با این روش گزارش دادند [۳۰].

۷) تکنیک بارگذاری از راه دور[۲]:

در این روش سورفاکتانت و کلسترول در کلروفرم حل شده و سپس حلال خارج می‌شود و لایه نازکی در کف تشکیل می‌شود و این لایه با اسیدسیتریک هیدراته و مخلوط می‌شود و وزیکول چندلایه منجمد شده و سپس از حالت انجماد خارج و سونیکیت می‌شود و به این سوسپانسیون محلول آبی دارو اضافه می‌شود و با دی سدیم فسفات pH=۷ -۷/۲ کنترل می‌شود و این مخلوط در دما $^{\circ}C$ ۶۰ برای ده دقیقه گرم می‌شود و در نتیجه نیوزوم تشکیل می‌شود [۳۱].

[۱] Reverse Phase Evaporation Technique (REV)
[۲] Remote Loading Technique

۱-۳-۷-۳) کاربرد نیوزوم

نیوزوم در لوازم آرایشی، بهداشتی و پزشکی کاربرد دارند. از جمله کاربردهای نیوزوم در پزشکی درمان بیماری‌های سرطانی، حامل داروهای پپتیدی، انتقال پوستی[۱] و چشمی[۲]، حامل هموگلوبین، ضد عفونت[۳]، ضد التهاب[۴]، ایمونولوژی و غیره است [۲۶،۲۱].

۱-۴) مرور ادبیات و تحقیقات گذشته

نانونیوزوم اولین بار در دهه هفتاد در صنعت لوازم آرایشی مورد استفاده قرار گرفت، اما از آن زمان به بعد برای هدفمند کردن دارورسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

Azmin و همکاران فرمولاسیون نیوزوم دارو Methotrexate با AUC بالا تهیه و نشان دادند که فعالیت ضد توموری بیشتری از محلول Methotrexate دارد[۲۱].

Parthasarathi و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که فرمولاسیون نیوزوم دارو vincristine در مقایسه با فرمولاسیون vincristine اثر کشنده توموری بالایی دارد[۲۱].

فرمولاسیون نیوزوم کربوپلاتین (carbo - platin) در مقایسه با محلول دارو، اثر کشنده تومور بالایی در سرطان ریه رده سلولی S -180 موش نشان داد و نیز اثر سمیت آن در مغز کمتر است[۲۱].

فرمولاسیون نیوزوم سدیم دیکلوفناک ۷۰ درصد کلسترول در مقایسه با محلول دارو فعالیت ضد التهابی بهتری دارد و نیز فرمولاسیون نیوزوم دارو Nimesulide و Flurbiprofen در مقایسه با محلول دارو فعالیت ضد التهابی بهتری دارد [۲۱].

---

[۱] Trans dermal drug delivery
[۲] Ophthalmic drug delivery
[۳] Anti- ifective agents
[۴] Anti- inflammatory agents

فرمولاسیون نیوزوم دارو Rifampicin در مقایسه با محلول دارو فعالیت ضد سل[1] بهتری دارد [۲۱].

Dolan و همکاران (۱۹۸۸) اولین مدل حیوانی را برای سیستم وزیکولی (نانونیوزوم و لیپوزوم) طراحی و بر روی موش آزمایش انجام دادند[۳۲].

Fang و همکاران (۲۰۰۱) اثر لیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌ها دارو Enoxacin در نفوذپذیری در پوست مشاهده کردند. آنها همچنین مشاهده کردند که گنجاندن کلسترول در دارو Enoxacin باعث بهبود ثبات دارو شد، اما بار منفی باعث کاهش ثبات خود نانونیوزوم شد[۳۳].

Vyas و همکاران (۲۰۰۵) نانونیوزوم‌ها سورفاکتانت‌های غیر یونی را برای تحویل DNA استفاده کردند. آنها DNA کدگذاری شده آنتی‌ژن سطحی هپاتیتB محصور شده توسط نانونیوزوم‌ها را طراحی کردند [۳۴].

Weihua و همکاران نانونیوزوم‌ها پایدار متشکل از سه لایه Span 80، PEG 400، H_2O را طراحی کردند. مطالعات آنها حاکی از این بود که نانونیوزوم‌ها می توانند بیش از یک سال پایدار بمانند و قطر نانونیوزوم بین ۱۸۰nm- ۱۰۰ بوده است. درصد اجزا ترکیب در تهیه و خلوص نانونیوزوم‌ها تأثیر می گذارد [۳۵].

Donatella و همکاران (۲۰۰۸) نانونیوزوم از (exadecyl- α,w(bis-1-aza-18 crown-6 و Span 80 و کلسترول با نسبت مولی ۲: ۵ :۲ را تهیه و سیستم تحویل FV-5 را طراحی کردند، تا حد زیادی در درمان سرطان پوست کاربرد دارد [۳۶].

Manosroi و همکاران (۲۰۰۸) نانونیوزوم‌هایی را به وسیله تکنیک دی اکسید کردن بحرانی طراحی کردند. این مطالعه افزایش بازده کپسوله کردن ترکیبات محلول در آب توسط CO_2 و اتانول ۱۰ درصد را نشان می دهد[۳۷].

[1] Antiubercular

Srinivas و همکاران در سال (۲۰۱۰) در مطالعات خود فرمول نانونیوزوم دارو Aceclofenac را گسترش داند. در مطالعات ارزیابی خود اثرات تغییر درصد ترکیبات سورفاکتانت های غیریونی و کلسترول در قابلیت کپسوله شدن، اندازه ذرات و رهاسازی دارو را مورد مطالعه قرار دادند [۳۸].

الناز اصغرخانی و همکاران فرمولاسیون نانونیوزوم آرتیمیزین را به روش‌های تبخیر فاز معکوس و ترزیق اتر تهیه کردند. اندازه نانونیوزوم‌ها در روش ترزیق اتر nm ۳ ± ۲۲۰ و در تبخیر فاز معکوسnm ۵ ± ۲۶۷ بود. روش تبخیر فازمعکوس وزیکول چند لایه و در روش ترزیق اتر وزیکول تک لایه تشکیل می‌دهد زیرا بازده کپسوله شده به روش تبخیر فاز معکوس بیشتر بود. اثر سمیت این فرمولاسیون در مقایسه با محلول دارو آرتیمیزین بر روی سرطان سینه رده سلولی MCF-7 بیشتر است[۳۹].

Alavi و همکاران فرمولاسیون نانو لیپوزوم هیدروکسی اوره را تهیه، اندازه آن nm ۵/ ۴۰۲ محاسبه و اثر سمیت این فرمولاسیون در مقایسه با محلول دارو هیدروکسی اوره بر روی سرطان سینه رده سلولی MCF-7 بیشتر است[۴۰].

Zarei و همکاران فرمولاسیون نانونیوزوم پاکلی تاکسل را با سورفاکتانت های غیر یونی (۲۰,۶۰) Span به روش تبخیر فاز معکوس تهیه، اثر سمیت این فرمولاسیون در مقایسه با محلول دارو پاکلی تاکسل بر روی سرطان سینه رده سلولی MCF-7 بیشتر است[۴۱].

۱-۵) دارو سیلی بینین[۱]

سیلی بینین یک ترکیب ضد سرطانی می‌باشد که در سیلیمارین یافت می‌شود. سیلیمارین یک فلانووئید پلی فنولیک می‌باشد که به صورت عمده از دانه‌های گیاه خارمریم استخراج می‌شود که به طور عمده از سیلی بینین (۹۰ درصد) و مقدار کمی ازترکیبات دیگر از جمله ایزو سیلی بینین، دهیدروسیلی بینین،

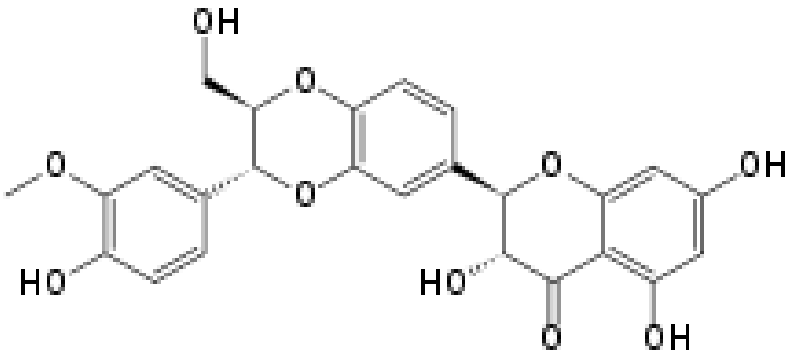
[۱] Silibinin

سیلیدیانین، سیلی کرسیتین و تاکسی فولین تشکیل شده است. بسیاری از مطالعات نشان داده که سیلی بینین و سیلیمارین ترکیبات آنتی اکسیدان قوی هستند. در حدود سه دهه است که این ترکیبات در کشورهای اروپایی به صورت کلینیکی به عنوان ترکیبات ضد سمی کبد[۱] استفاده می‌شود، واخیرا سیلیمارین در آسیا و آمریکا هم استفاده می‌شود. مطالعات طی ده سال گذشته نشان می‌دهد که اثر ضد سرطانی علیه بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان سینه و پروستات را دارد. از این ترکیبات برای معالجه بیماری‌های کبدی نظیر سیروز و مسمومیت‌های کبدی و پیشگیری از سرطان کبد در داروهای نظیر لیورگل، لگامون، مارین دسیتل و غیره استفاده می‌شود[۴۲].

مشخصات دارو سیلی بینین:

وزن ملکولی: gr/mol ۴۴/ ۴۸۲، نقطه جوش: $^{\circ}C$ ۱۷۴- ۱۶۴، پودر زرد رنگ، محلول در: اتیل استات، استون یا مخلوط استون و آب، اتانول یا مخلوط اتانول در آب، متانول یا مخلوط متانول در آب، نیمه عمر دارو ۸-۶ ساعت است.

فرمول شیمیایی: ($C_{25}H_{22}O_{10}$)



[۱] Antihepatotoxic

ساختار فضایی:

هدف: طراحی دارو جدید در درمان سرطان سینه است.

در این مطالعه تلاش بر این است که فرمولاسیون نانونیوزوم سیلی بینین تهیه و اثرات ضد سرطانی آن با فرم معمولی دارو مورد مقایسه و ارزیابی قرار گیرد. نتایج این مطالعه می تواند به هدف گیری دقیق و کاهش مقدار دارو سیلی بینین کمک کند و همچنین باعث افزایش کارآمدی بالینی دارو و کاهش عوارض جانبی آن گردد.

فصل دوم : مواد و روش

در این فصل به شرح روش‌های مورد استفاده ، دستگاه‌ها و مواد لازم برای انجام آزمایشات در این تحقیق پرداخته می‌شود.

۲-۱) مواد شیمیایی و وسایل مورد نیاز

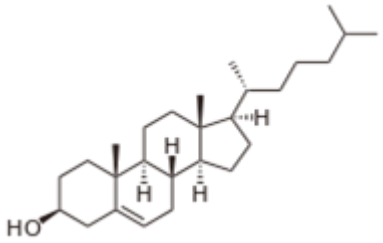
جدول ۲-۱- مواد شیمیایی مورد نیاز برای تهیه دارو سیلی بینین نانونیوزوم

نام ترکیب شیمیایی	شرکت تولید کننده
Silibinin	Sigma Aldrich,USA
Span 20	Sigma Aldrich,USA
کلسترول	Sigma Aldrich,USA
کلروفرم	Merck,Germany
متانول	Merck,Germany
مانیتول	Merck,Germany
پلی اتیلن گلیکول (PEG ۲۰۰۰)	کیمیاگران امروز
بافر فسفات (PBS)	انستیتو پاستور ایران

کلسترول:

کلسترول دارای مشخصات زیر است:

فرمول شیمیایی: ($C_{27}H_{46}O$)



وزن ملکولی: gr/mol ۶۵/ ۳۸۶، دما جوش: $^{\circ}$c ۳۶۰، دما ذوب: $^{\circ}$C ۱۵۰- ۱۴۸، چگالی: gr/cm^3 ۱/۰۵۲، پودر آن بصورت بلورهای سفید رنگ، محلول در : آب، استون، بنزن، کلروفرم، اتانول، اتر، هگزان، ایزوپروپیل، متانول است.

پلی اتیلن گلیکول (PEG) :

پلی اتیلن گلیکول پلیمر تراکمی اتیلن اکساید و آب است . این پلیمر مهم‌ترین نوع تجاری پلی اترها ست. عددی که اغلب اوقات در نام پلی اتیلن گلیکول وجود دارد ، نشان دهنده متوسط جرم مولکولی آنها می باشد. ترکیباتی با جرم مولکولی پایین (تا ۷۰۰)، مایعات بی رنگ ، بی بو ، ویسکوز با نقطه ذوب حدود $^{\circ}$C ۱۰ در حالیکه ترکیبات پلیمریزه شده با جرم مولکولی بیشتر از ۱۰۰۰ نقطه ذوب تا حدود $^{\circ}$C ۶۷ دارند.

پلی اتیلن گلیکول‌ها با جرم مولکولی متفاوت خواص فیزیکی متفاوت وکاربردهای متنوعی دارند، درحالیکه خواص شیمیایی آنها تقریباً شبیه است . پلی اتیلن گلیکول‌ها کاربردهای متنوعی از جمله: چسب ، سرامیک ، شوینده ها و پاک کننده ها دارند .

پلی اتیلن گلیکول دارای مشخصات زیر می‌باشد:

نام آیوپاک : Poly(oxyethylene)

فرمول شیمیایی: $H - (O - CH_2 – CH_2)_n - O$ ، n می تواند مقادیر متفاوتی باشد.

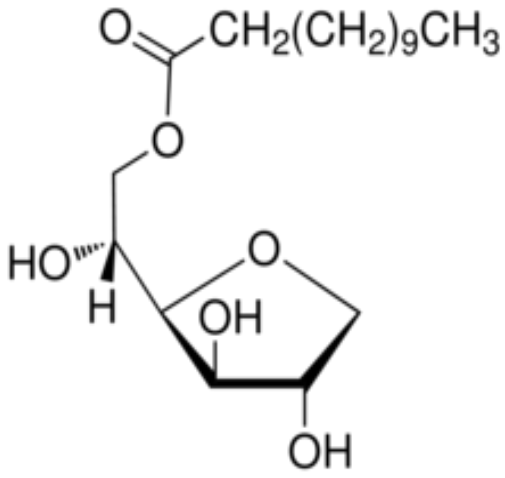
نقطه ذوب: C° ۵۳- ۵۰، پلی اتیلن گلیکول در آب ، متانول ، استون ، تولوئن ، کلرید متیلن ، بنزن ، کلرومتان محلول است و در اتر ، هگزان ، اتیلن گلیکول نامحلول و در دماهای بالاتر در آب حل نمی شود.

Span 20 :

سورفاکتانت غیریونی که بصورت مایع ویسکوز به رنگ زرد قهوه ، بی بو ، غیرسمی است .

ساختار ملکولی آن به صورت: Synonyms: Sorbitan monododecanoate

فرمول شیمیایی: ($C_{18}H_{24}O_6$)



وزن مولکولی: gr/mol ۳۴۶/۴۶، چگالی : gr/cm^3 ۱/۱۲۳، نقطه جوش: $^{\circ}C$ ۵۱۶/۱ در ۷۶۰mmHg، در ایزوپروپانول ، زایلن ، روغن پنبه دانه ، روغن معدنی محلول و در آب نامحلول است.

رده سلولی

T47D : Human ductal breast epithelial tumor cell line (NCB L c203)

رده سلولی مورد استفاده از بانک سلولی ایران خریداری می‌شود.

محیط کشت سلولی

آب مقطر، محیط کشت PRMI 1640 (شرکت Gibco آلمان)، پنی سیلین (شرکت Gibco آلمان)، استرپتومایسین (شرکت Gibco آلمان)، بی کربنات سدیم، شیشه های درب در ابعاد مناسب، مگنت، فیلتر سرسرنگی ۲۲ /۰میکرون، سرنگ ۲۰میلی لیتر.

کشت و پاساژ سلولی

سرم جنین گاوی، تریسپین، بافر فسفات (PBS) ، فلاسک ۲۵T فیلتردار، فالکون[۱] ۱۵-۵۰ میلی لیتر .

منجمد کردن سلول ها

سرم جنین گاوی، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، ویال کرایو[۲].

[۱] ویال درب دار ویژه سانتریفوژ است.

[۲] ویال۱۰ میلی‌لیتری پلاستیکی که توانایی نگهداری در دماهای پایین را دارند.

سنجش MTT

پودر MTT (شرکت SigmaAldricآمریکا)، رنگ تریپان بلو (شرکت SigmaAldric آمریکا) ، نانو نیوزوم شاهد، دارو سیلی بینین نانونیوزوم، دارو سیلی بینین خالص، ایزوپروپانول (شرکت Merck آلمان)، لام نئوبار، پلیت کشت سلول ۹۶ خانه با کف صاف (شرکت Greiner آلمان)، پلیت ۲۴ خانه جهت تهیه رقت سریال (شرکت Greiner آلمان).

۲-۲) دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده

۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی[۱] :

در این تحقیق جهت بررسی ریخت شناسی[۲] ذرات، از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL۳۰ شرکت فیلیپس، ساخت کشور هلند، همچنین دستگاه لایه نشانی طلای از شرکت Bal - Tec کشور سوئیس استفاده شده است.

ابتدا نمونه لیوفیلیزه (پودری) توسط لایه ای از طلا پوشش داده می‌شود. زیرا سطح نمونه هایی که با میکروسکوپ SEM بررسی می‌شوند باید هدایت الکتریکی داشته باشند. برای این منظور مواد غیرهادی با لایه نازکی از طلا ، کربن یا نقره پوشش داده می‌شوند و سپس وارد دستگاه SEM برای عکسبرداری می-شوند.

[۱] Scanning electron microscopy(SEM)
[۲] Morphology

۲- دستگاه زتاسایزر (DLS[۱])

جهت اندازه گیری قطر نانو ذرات و همچنین تعیین بار سطحی آنها از دستگاه زتاسایزر[۲] مدل HSA۳۰۰۰ ساخت شرکت Malvern استفاده شده است.

البته نمونه‌هایی که این دستگاه قادر به انجام آزمایش بر روی آنهاست، باید به حالت کلوئیدی، سوسپانسیون و امولسیون باشند.

۳- طیف سنجی فرابنفش مرئی [۳]

جهت اندارهگیری میزان جذب از اسپکتروفتومتر دو پرتوی UV-Vis مدل 1601 شرکت Shimadzu ساخت کشور ژاپن استفاده شده است.

۴- ترازو

ترازو مورد استفاده TE مدل 214S شرکت Satorius ساخت کشور آلمان می‌باشد.

۵- سانتریفیوژ

از سانتریفیوژ با سرعت بالا [۴]و یخچال دار Tomy مدل GRX-220 ساخت کشور آلمان برای جداسازی نانو ذرات از سوسپانسیون استفاده شده است .

[۱] Dynamic light scattering (DLS)
[۲] Zeta-sizer
[۳] UV-Vis spectroscopy
[۴] High speed refrigerated centrifuge

۶- دستگاه لیوفیلیزه

به منظور تهیه پودر نانو ذرات سنتز شده، از دستگاه لیوفیلیزه Edwardshighvacuum مدل P.2.T.S مجهز به سیستم خلا و فریزر c ۲۰° - استفاده شده است .

۷- همزن فراصوتی [۱]

دستگاه همزن فراصوتی مدل Bandelin electronic شرکت Heinrichstra ساخت کشور آلمان استفاده شده است .

۸- ورتکس [۲]

برای جداسازی رسوب چسبیده به جداره های ظروف آزمایشگاهی از ورتکس ساخت شرکت کیاژن تک ایران استفاده شده است .

۹- pH متر

از دستگاه pH متر شرکت Metrhom مدل 826 ساخت کشور سوئیس برای تنظیم pH استفاده شده است.

۱۰- هیتر و همزن [۳]

به منظور همزدن از دستگاه هیتر همزن مغناطیسی مدل SANA شرکت هور طب ساخت کشور ایران استفاده شده است.

---

[۱] Ultra sonicator
[۲] Vortex
[۳] Heater & Stirrer

۱۱- روتاری / تبخیر

برای خارج کردن حلال از دستگاه روتاری/تبخیرمدل Heizbad WBECO شرکت Heidolph ساخت کشور آلمان استفاده شده است.

۱۲- هموژنایزر

برای همگن کردن و یکنواخت کردن اندازه ذرات از دستگاه مدل Silenct Crusher شرکت Heidolph ساخت کشور آلمان استفاده شده است.

۲- ۳) روش تهیه فرمولاسیون داروی نانونیوزوم

۲-۳-۱) تهیه بافرفسفات (PBS)

برای تهیه محلول بافر،۴۰۰۰ میلی‌گرم سود، ۷۲۰میلی‌گرم $Na_2HPO_4.12H_2O$، ۱۲۰ میلی‌گرم KH_2PO_4 و۱۰۰۰میلی‌گرم کلرید پتاسیم در۵۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و با همزن مغناطیسی کاملا حل می‌شوند. pH محلول حاصل برابر۷/۴ است.

۲-۳-۲) تهیه فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم

از روش تبخیر فاز معکوس برای تهیه نانونیوزوم استفاده می‌شود زیرا روشی ساده که قابلیت تکرارپذیری و بازده خوبی دارد. در این روش ۵۰ میلی‌گرم کلسترول ، ۱۰۰میلی‌گرم دارو سیلی بینین ، ۵۵ میلی‌گرم PEG2000 ، به ۲۰ میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم و متانول (۲:۱) اضافه کرده و سپس یک میلی‌لیتر محلول ۴۰۰میلی‌گرم ، Span20 نیز افزوده و درب ظرف با پارافیلم بسته تا Span اکسید نشود. طی دو ساعت هم‌زدن در نهایت یک محلول زرد کمرنگ بدست می‌آید (شکل۲-۱) .

شکل۲-۱- دارو سیلی بینین نانونیوزوم در حلال

سپس این محلول را به دستگاه روتاری/ تبخیر متصل تا حلال (مخلوط کلروفرم و متانول) به طور کامل خارج شود. دما روتاری / تبخیر $^{\circ}C$ ۵۰ و سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه طی یک ساعت و نیم حلال خارج و سپس یک لایه نازک زرد رنگ در کف ته نشین می‌شود که به آن ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) اضافه کرده و طی سه ساعت هم‌زدن دارو سیلی بینین نانونیوزوم تشکیل می‌شود (شکل۲ - ۲).

شکل ۲ – ۲- دارو سیلی بینین نانونیوزوم در بافرفسفات

۲-۳-۳) تهیه فرمولاسیون نانونیوزوم شاهد

این روش تهیه، مشابه روش تهیه فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم است ولی فاقد دارو سیلی بینین است . یعنی ۵۰ میلی‌گرم کلسترول ، ۵۵ میلی‌گرم PEG2000 به ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم و متانول اضافه و یک میلی‌لیتر محلول ۴۰۰ میلی‌گرم ، Span را به آن اضافه کرده و درب ظرف با پارافیلم بسته و به مدت یک ساعت هم‌زدن درنهایت یک محلول بی رنگ بدست می‌آید (شکل ۲-۳).

شکل ۲-۳- نانونیوزوم شاهد در حلال

سپس محلول را به دستگاه روتاری / تبخیر متصل، دما $^{\circ}C$ ۵۰ و سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه است. درنتیجه بعد از یک ساعت حلال خارج و یک لایه شیری در کف ته نشین شد که به آن ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) اضافه و طی ۴۵ دقیقه هم‌زدن نانونیوزوم شاهد تشکیل می‌شود (شکل ۲-۴).

شکل ۲-۴- نانونیوزوم شاهد در بافرفسفات

تغییر رنگ شاهد از بی رنگ به شیری رنگ نشان دهنده تشکیل نانونیوزوم شاهد است.

بعد از تهیه محلول نانونیوزوم دارو و شاهد هر کدام طی ۵ دقیقه تحت فراصوت و هموژن قرار گرفته که باعث همگن شدن نسبی وزیکول‌ها و شانس به دام افتادن دارو در وزیکول بیشتر می‌گردد. سپس ۴۸ ساعت محلول ها در یخچال در دمای $^{\circ}C$ ۸-۴ برای رسیدن به تعادل قرار داده می‌شود.

در مرحله بعد جهت تعیین اندازه ، پتانسیل زتا ۲ قطره از محلول اصلی نانونیوزوم دارو و شاهد در دو ویال جداگانه ریخته و به هرکدام ۲ میلی لیتر بافر فسفات اضافه کرده و ۵ دقیقه تحت فراصوت قرار گرفته و هموژن می‌شود، تا محلول یکنواخت حاصل شود. سپس جذب محلول در طول موج ۶۳۰nm اندازه‌گیری می‌گردد.

برای لیوفیلیزه کردن (پودر کردن) ، ابتدا ۶۰۰ میلی‌گرم مانیتول به عنوان محافظت کننده سرما در آب مقطر حل کرده و به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دارو و شاهد اضافه و سپس نمونه‌ها داخل فریزر در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- به مدت دو ساعت قرار می‌گیرند، سپس طی ۴۸ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار داده می‌شوند. در نهایت نمونه‌ها در دمای $^{\circ}C$ ۴ نگهداری می‌شوند .

۲-۴) تعیین درصد کپسولاسیون و میزان بارگذاری شده دارو

طی یک ماه مقدار یک میلی‌لیتر از محلول نیوزوم حاوی دارو و محلول شاهد در دو ویال جداگانه قرار گرفته و ۴۵ دقیقه با سانتریفوژ یخچالدار با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ تا محلول روی رسوب شفاف شود. سپس این محلول شفاف در ویال‌های دیگر قرار می‌گیرد. اما اگر محلول روی رسوب شفاف نبود، حالت کلوئیدی در یخچال طی ۱۵ دقیقه قرار داده تا در اثر سرما رسوب دهد. آن را دوباره سانتریفوژ، سپس جذب آنها در طول موج جذبی سیلی بینین ۲۹۰nm اندازه گیری می‌شود. سپس با توجه به معادله خط که معادله منحنی استاندارد است (رابطه ۲-۱) غلظت مجهول دارو بدست می‌آید . منحنی استاندارد : دارو سیلی بینین را در غلظت‌های مختلف تهیه کرده و جذب آنها در طول موج ۲۹۰nm اندازه گیری می‌شود تا منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت نمونه‌ها بدست آید.

درصد کپسولاسیون یا به دام اندازی[۱] و میزان بارگذاری[۲] دارو با توجه به غلظت‌های بدست آمده و روابط ۲-۲ و ۲-۳ تعیین می‌شود[۲۶،۲۰].

معادله منحنی استاندارد : $y = ۰/۰۲۰۱x + ۰/۰۹۰۸$ (رابطه۲-۱)

$y =$ جذب $\quad x =$ غلظت دارو

$$\%EE = \frac{\text{مقدار کل دارو اولیه} - \text{مقدار دارو آزادکپسوله نشده}}{\text{مقدار کل دارو اولیه}} \times ۱۰۰$$

(رابطه ۲-۲)

$\%EE =$ بازده کپسوله

[۱] Entrapment
[۲] Loading

(رابطه ۲-۳) ۱۰۰× مقدار دارو کپسوله شده = میزان بارگذاری دارو

مقدار حامل استفاده شده

مقدار کلسترول و سورفاکتانت غیریونی + مقدارحامل

۲- ۵) رهایش دارو

رهایش دارو با کیسه دیالیز سنجیده می‌شود. جنس کیسه دیالیز از سلولز با غشا انتخاب پذیرکه باید همیشه خیس باشد و برای این منظور در محلول حاوی سدیم آزاید ۰/۱ درصد نگهداری می‌شود .

مقدار یک میلی‌لیتر از محلول اصلی و شاهد به طور جداگانه در کیسه‌های دیالیز قرار داده و این کیسه‌هارا در دو مزورجداگانه حاوی ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷ قرار داده می شود و هر مزور دارای مگنت است و به مدت سه روز هم‌زده می‌شود و در این مدت در ساعت‌های مختلف مقدار ۲ میلی‌لیتر آن به ویال‌های منتقل و در نهایت جذب آنها اندازه گیری می‌شود. سپس با توجه به معادله منحنی کالیبراسیون در ساعات مختلفی‌که بافرفسفات برداشته (زمان) و غلظت رهایش‌دارو برحسب‌درصد تعیین می‌شود[۲۶].

۲-۶) کشت سلولی

۲-۶-۱) تهیه محیط کشت

۲-۶-۱-۱) سرم جنین گاوی (FBS[۱])

سلول‌ها در محیط کشت نیازمند مخلوط پیچیده از مواد غذایی و نیز سایر ترکیبات لازم برای رشد می-باشند. محیط کشت از اجزایی با اثرات رشدی مشخص تشکیل شده، با این وجود حضور سرم جنین گاوی به عنوان ترکیبی ارزان و دسترس دارای ترکیبات ضروری رشد مناسب سلول‌ها می تواند محیط مناسب-تری را برای رشد سلول‌های کشت شده فراهم نماید. سرم، بخشی به جا مانده از خون است که پس از

[۱] Fetal Bovine Serum

انعقاد و رسوب اجزا سلولی آن تشکیل شده و شامل ترکیبات بسیار پیچیده از پروتئین‌های پلاسما ، فاکتورهای رشد ، هورمون‌ها و غیره می‌باشد . در کشت اغلب سلول‌ها حدود ۱۰ الی ۲۰ درصد محیط کشت از جنس سرم جنین گاوی می‌باشد.

سرم جنین گاوی خریداری شده به صورت منجمد می‌باشد که بعد از ذوب کردن، آن را در دمای $^{\circ}C$ ۵۶ قرار داده در اثر این عمل آلودگی‌های احتمالی حذف می‌گردند. سپس به مدت نیم ساعت در دما اتاق قرار می‌گیرد تا دما آن کاهش یابد. در نهایت آن را در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- فریزر نگهداری می‌شود.

۲-۶-۱-۲) تریپسین

از دیرباز تریپسین قابل دسترس ترین آنزیم برای جداسازی سلول‌های چسبیده از بستر و یا جداسازی بافت‌ها بوده است. زیرا بسیاری از سلول‌ها را تخریب نمی‌کند و بر بسیاری از بافت‌ها موثر است. برای ساخت محلول ۰/۲۵ گرم تریپسین ، ۰/۰۵ گرم EDTA به ۱۰ میلی‌لیتر آب اضافه و هم‌زده تا حل گردند و سپس pH آن را در ۸ تنظیم و آن را در دمای $^{\circ}C$ ۴ در درون یخچال نگهداری نموده و در پاساژ[۱] سلولی استفاده می‌نمایند .

۲-۶-۱-۳) روش تهیه محیط کشت سلولی

پایه همه محیط های کشت یکسان است و شامل آمینو اسیدهای ضروری ، ویتامین‌ها ، املاح و معرف‌های رنگی می‌باشد. و تفاوت آنها در تنوع یا میزان آمینو اسیدهای موجود می‌باشد و با توجه به تنوع سلولی، هر سلول محیط کشت مخصوص به خود دارد. RPMI1640 ، محیط اختصاصی برای بیشتر سلول‌ها می-باشد و ۶۰ تا ۷۰درصد رده‌های سلولی موجود با این محیط سازگار شده‌اند.

[۱] تکثیر

جهت تهیه این محیط کشت ۴ /۱۰ گرم از پودر RPMI1640 را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل کرده و سپس مقدار ۲ گرم بی کربنات سدیم به آن اضافه و طی ۶۰ دقیقه هم زدن محلول ارغوانی شفاف حاصل می‌گردد.

در مرحله بعد جهت جلوگیری از رشد باکتریایی به محیط پنی‌سیلین به میزان۱۰۰واحد و استرپتومایسین ۱۰۰mg/ml اضافه می‌شود. جهت استریل کردن محیط کشت از فیلتر سرسرنگی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون و قطرکل ۳۰ میلی‌متر استفاده می‌گردد. منافذ این فیلتر ریز و اجازه عبور به مایکوپلاسما[۱] و قارچ را نمی‌دهد . این دو دسته از میکرو ارگانیسم‌ها مهم‌ترین آلوده کننده های محیط کشت هستند. در نهایت محیط کشت فیلتر شده به مدت یک شبانه روز در دمای$^{\circ}C$ ۴ (درون یخچال) نگهداری می‌گردد، در این حالت اگر باکتری موجود باشد رشد کرده و محیط را کدر می‌نماید.

۲-۶-۲) کشت و پاساژ سلولی

۲-۶-۲-۱) نحوه کشت سلول

سلول‌های مورد مطالعه در محیط RPMI1640 حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی و در انکوباتوری با دمای $^{\circ}C$ ۳۷ که حاوی ۵ درصد گاز CO_2، کشت داده می‌شوند. از آن جایی که آنتی بیوتیک‌ها بر بیان ژن‌ها اثر می‌گذارند بهتر است احتمال آلودگی را کاهش داد . آلودگی باکتریایی سلول‌ها را از کف جدا کرده و محیط سلول‌ها را کدر می‌نماید. درحالی که در اثر آلودگی قارچی هیف[۲] تولید می‌گردد و به صورت تکه‌های کلونی مانند دیده می‌شود . آلودگی با قارچ بسیار خطرناک است زیرا نمونه‌های حاوی

[۱] یک نوع ویروس

[۲] رشته‌های قارچی

قارچ با تولید اسپور[1] تمام محیط کشت‌های موجود در انکوباتور را آلوده می‌نمایند. بنابراین به محض مشاهده قارچ باید فلاسک را از انکوباتور خارج نمود .

سلول‌ها در زمان رشد متابولیت‌های[2] اسیدی تولید می‌کنند که باعث تغییر رنگ تدریجی محیط کشت از ارغوانی به زرد می‌گردد. به همین دلیل معمولاً هر۲۴ الی ۴۸ ساعت یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌گردد. سلول‌ها سیگنال‌های[3] رشدی به درون محیط کشت آزاد می‌نمایند که تخلیه کامل آنها به همراه محیط کشت ، استرس و فشار زیادی به سلول‌ها وارد می‌کند و در پی آن الگوی بیان ژن‌ها[4] تغییر می‌کند، هنگام تعویض محیط کشت ۱۰ تا ۲۰ درصد محیط در فلاسک نگهداری می‌شود. در ادامه، محیط کشت تازه هم دما با محیط کشت قبلی به آرامی و از سمتی که سلول‌های چسبیده به کف آسیبی نبینند به فلاسک حاوی سلول اضافه می‌گردند. به این ترتیب عمل تعویض محیط انجام می‌پذیرد.

۲-۶-۲-۲) نحوه پاساژ سلولی

ضمن پاساژ سلولی، سلول‌ها را با هدف افزایش تعداد سلول‌ها از یک جایگاه به جایگاه دیگر منتقل می-نمایند. هنگامی که تمامی سطح بستر توسط سلول‌ها پوشیده و یا تراکم سلولی بیش از ظرفیت بستر گردد. سلول ها می‌بایست به ظروف دیگری انتقال داده شوند . به این فرآیند پاساژ سلولی گفته می‌شود . بسته به اینکه سلول‌ها از نوع سوسپانسیونی (معلق) یا چسبنده باشند ، پاساژ متفاوت است. سلول‌های سوسپانسیونی را از فلاسک به درون فالکون ریخته و پس از سانتریفوژ، مایع روی آن را دور ریخته و رسوب سلولی را به فلاسک حاوی محیط کشت تازه انتقال می‌دهند. اما در مورد سلول‌های چسبنده ، برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک از تریپسین استفاده می‌کنند. لازم به ذکر است که دمای تریپسین

---

[1] گرده

[2] مواد حاصل از واکنش متابولیسمی.

[3] تنش

[4] تبدیل اطلاعات و کدهای ژنتیکی به پروتئین های که عملکرد خاصی را در سلول بر عهده دارند.

در هنگام استفاده باید $37\ ^{\circ}C$ باشد. به همین منظور و برای استفاده بعد از خارج کردن از یخچال آن را در بن ماری (حمام آب) می گذارند. جهت انجام پاساژ سلولی ، در ابتدا محیط کشت روی فلاسک‌ها را بطور کامل تخلیه کرده و سپس دو تا سه میلی لیتر تریپسین ۰/۲۵ درصد به آنها اضافه کرده و طی ۳ تا ۵ دقیقه در این وضعیت نگه داشته تا سلول‌ها بطور کامل از کف فلاسک جدا شوند .

تریپسین اتصالات سلولی را می‌شکند و باعث جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک و شناور شدن آنها می-گردد . در استفاده از تریپسین باید دقت شود ، اگر زودتر از زمان مناسب تریپسین خارج گردد تعدادی از سلول‌ها جدا نشده و متصل به کف فلاسک باقی می‌مانند و این مسئله سبب کاهش بازدهی می‌شود . اگر بیشتر از زمان مناسب تریپسین در فلاسک باقی بماند سبب تغییر شکل پروتئین‌های سطح سلولی می-گردد. در نتیجه سلول‌ها نمی توانند به فلاسک جدید بچسبند . بعد از گذشت مدت زمان مناسب و برای خنثی کردن اثر تریپسین محیط کشت سرم دار را به فلاسک اضافه نموده و به آرامی پیپتاژ[1] می‌کنیم . سوسپانسیون بدست آمده به فالکون منتقل کرده با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. بعد از سانتریفوژ مایع روی آن را دور ریخته و رسوب سلولی را به همراه محیط کشت تازه به فلاسک جدید انتقال می‌یابد. لازم به ذکر است که سلول‌های چسبنده پس از جدا شدن از کف فلاسک به صورت سوسپانسیون درآمده و به راحتی قابل انتقال هستند . برحسب تعداد سلول‌ها می توان حداقل دو و حداکثر چهار فلاسک سلولی جدید بدست آورد.

۲-۶-۳) فریز کردن سلول‌ها

اساس روش: بدون نیاز به کشت مداوم سلول‌ها می‌باشد . درحال حاضر راه‌های متعددی برای کاهش آسیب به سلول‌ها در طی انجماد ، پیشنهاد شده است . مهم‌ترین نکته در موفقیت این فرآیند انجماد

[1] پروخالی کردن پیپت.

سریع و ذوب آهسته سلول‌ها است. بطور کلی سلول‌ها باید با سرعت سرد گشته و به آهسته و در فاصله زمانی ۳ الی ۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ ذوب گردند . نگهداری در ازت مایع ، موفق‌ترین روش جاری در نگهداری سلول‌های کشت شده است . سلول‌های مورد استفاده برای انجماد می بایست از توان حیاتی بیش از ۹۰ درصد برخوردار بوده و کاملاً عاری از انواع آلودگی های میکروبی، ویروسی و غیره باشند.

۲-۶-۳-۱) نحوه منجمد کردن سلول‌ها

مراحل منجمد کردن سلول مانند مراحل پاساژ سلولی است، اما باید با کمک تریپسین همه سلول‌ها به طور کامل از کف فلاسک جدا گردند. سپس به رسوب سلولی حاصل از سانتریفوژ (یک الی ۱/۵میلی‌لیتر) محلولی با نام محلول کرایو اضافه می‌شود. محلول کرایو شامل ۹۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰درصد DMSO است . DMSO، حلالی قوی که در فرآیند انجماد سلولی در نقش یک محافظت کننده باعث جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ و آسیب به سلول‌ها می‌گردد . DMSO، حلال بسیار خوبی است ولی باید توجه داشت که برای سلول‌ها بسیار سمی است و در استفاده از آن باید مراقب بود. سپس ویال‌های کرایو به مدت دو ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- قرار گرفته و پس از آن طی ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۷۰- نگهداری ، و پس از آن نمونه‌های موجود را به تانک ازت انتقال می‌یابد. این عمل باید به گونه‌ای انجام گیرد که سلول‌ها ، کوتاهترین زمان ممکن را خارج از فریزر بگذرانند. زیرا افزایش دمای ویال باعث آسیب به سلول-های موجود و کاهش درصد سلول‌های زنده می‌گردد. با انتقال به مخزن ازت مایع، این سلول‌ها برای مدت طولانی قابل نگهداری می‌باشند .

۲-۶-۳-۲) ذوب کردن سلول‌های منجمد شده

جهت کشت مجدد (دفریز کردن) سلول‌های منجمد شده ویال کرایو حاوی سلول منجمد از تانک ازت به بن ماری (حمام آب) $^{\circ}C$ ۳۷ منتقل می‌گردد. در هنگام خارج کردن ویال رعایت احتیاط و استفاده از

وسایل ایمنی نظیر دستکش و عینک بسیار ضروری است، زیرا در صورت بسته نشدن کامل در ویال، ممکن است ازت مایع ، به درون ویال نفوذ کرده و در هنگام ذوب موجب انفجار گردد. پس از ذوب شدن، محتویات داخل ویال کرایو را به فالکون انتقال داده و بر روی آن محیط کشت بدون سرم جنین گاوی می‌ریزند. در اثر این کار DMSO رقیق شده و نمی‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. سپس سانتریفوژ با ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه انجام می‌گیرد روند فوق دوباره تکرار می‌شود، تکرار این عمل سبب از بین رفتن کامل اثر DMSO می‌گردد . در نهایت سلول‌ها همراه با محیط کشت تازه که دارای ۱۰ الی ۲۰ درصد سرم جنین گاوی هستند به فلاسک کشت سلول منتقل می‌شوند . در این مرحله سلول‌ها در زیر میکروسکوپ کروی ولی با رشد در محیط مناسب شکل اصلی خود را باز می‌یابند . مثلاً اگر سلول-های مورد مطالعه سلول‌های اپیتلیالی باشند بعد از رشد به کف فلاسک چسبیده و دوکی شکل می‌گردند. بعد از ۱۶ الی ۱۸ ساعت در صورت چسبیدن سلول‌های چسبیده به کف فلاسک ، محیط آن را تعویض می‌نمایند تا سلول‌های دفریز شده که بسیار حساسند در معرض محیط کشت و سرم جنین گاوی تازه قرار گیرند و همچنین اثر DMSO باقیمانده که به ندرت وجود دارد، خنثی گردد .

۲-۷) تکنیک سنجش[۱] MTT

۲-۷-۱) رنگ آمیزی تریپان بلو (Trypan blue)

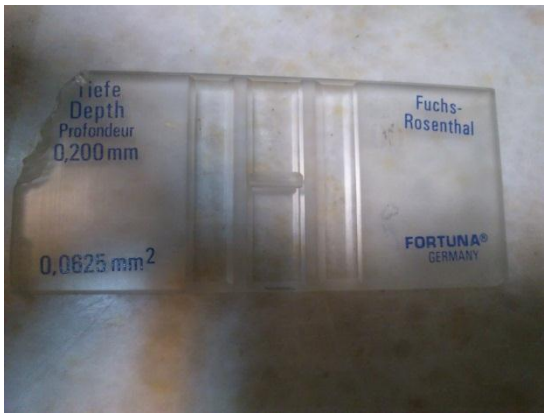
برای تعیین نسبت سلول‌های زنده از این رنگ استفاده می‌شود. با توجه به مسئله جذب رنگ تریپان بلو توسط سلول‌های مرده که غشاء آنها آسیب دیده است ، رنگ به آسانی به درون آنها نفوذ کرده و این سلول‌ها به رنگ آبی در می‌آیند ؛ در جایی که سلول‌های زنده شفاف و بی رنگ باقی می‌مانند .

[۱] Dimethylthiazol Diphenyl Tetrazolium Bromide

برای تهیه رنگ ۰/۴ گرم از پودر تریپان بلو به محلول آبی محتوی ۰/۹گرم کلرید سدیم ، ۰/۰۶ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم به بافر فسفات pH برابر ۷/۴ اضافه می‌شود.

۲-۷-۲) تعیین تعداد سلول‌ها

این کار با شمارش سلول‌ها توسط لام نئوبار[۱] (شکل ۲-۵) صورت می‌گیرد .



شکل ۲-۵- تصویرلام نئوبار

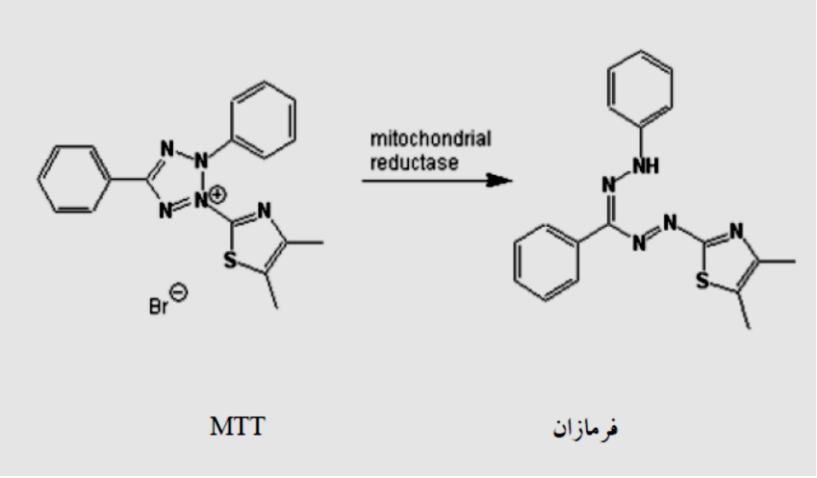
برای شمارش سلول‌ها ، سلول‌های موجود در چهار مربع گوشه‌های قسمت لام نئوبار را شمارش نموده و بر اساس استفاده از رنگ تریپان بلو سلول‌های زنده شفاف و سلول‌های مرده به رنگ آبی دیده می‌شوند و بدین ترتیب سلول‌های زنده شمارش می‌گردند و طبق رابطه ۲-۴ تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه گردید :

(رابطه ۲-۴) تعداد سلو ل‌ها در هر میلی‌لیتر = میانگین تعداد کل سلول‌ها در ۴ مربع لام نئوبار × ۵۰۰۰ × حجم محیط × فاکتور رقت

[۱] هموسایتومتر

۲-۷-۳) نحوه انجام سنجشMTT

روش‌های متعددی جهت سنجش غیرمستقیم میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها وجود دارد . اغلب این روش‌ها میزان فعالیت یک آنزیم سلولی را درون سلول زنده اندازه گیری می‌کنند . یکی از شناخته شده-ترین این روش‌ها آزمون MTT است . تست MTT ، آزمون آزمایشگاهی و کمی است برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلول‌ها در مواجه با عوامل مختلف و تعیین میزان سمیت این عوامل هنگامی که بر روی سلول‌ها اثر داده می‌شوند . در واقع از این تکنیک برای تعیین میزان سمیت یک داروی خاص کمک می-گیرند . این تکنیک اولین بار توسط موسمان در سال ۱۹۸۳ مورد استفاده قرار گرفت . اساس روش بر پایه توانایی آنزیم ردوکتاز میتوکندری سلول‌های زنده در احیاء و تبدیل حلقه های تترازولیوم MTT زرد رنگ به بلورهای نامحلول بنفش رنگ فرمازان است که قادر به عبور از غشاء سلول نیستند. سپس این بلورها توسط ایزوپروپانول به فرم محلول درمی‌آیند[۴۳]. ضمن انجام تست MTT واکنشی مطابق شکل ۲-۶ در سلول‌های زنده رخ می‌دهد .



شکل ۲-۶- واکنشی که ضمن انجام تست MTT در سلول‌های زنده رخ می‌دهد.

تراکم نوری محلول حاصل را می توان با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری یا الایزا[1] و در طول موج ۵۳۰nm اندازه گیری کرد. با توجه به اینکه واکنش احیاء که در بالا مطرحگردید تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد که دارای آنزیم رودکتاز فعال هستند ، مقدار عددی بدست آمده توسط این تکنیک بطور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده در ارتباط است . در این سنجش میزان فرمازان تولید شده توسط سلول-های تیمار شده با یک عامل خاص را با میزان فرمازان تولید شده توسط سلول‌های کنترل که تیمار خاصی دریافت نکرده‌اند مقایسه می‌نمایند و از این مقایسه میزان اثر آن عامل خاص را روی مرگ و مهار رشد سلول‌ها تعیین می‌نمایند . در این سنجش هرچه میزان جذب خوانده شده نسبت به حالت کنترل کمتر باشد؛ می‌توان نتیجه گرفت که تعداد سلول‌های زنده کم شده و مهار رشد سلول‌ها تعیین می‌نمایند و مهار رشد بیشتری صورت گرفته است.

۲-۷-۳-۱) نحوه انجام تست MTT برای ۴۸ ساعت

روز اول :

در تست MTT سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه ای کاشته می‌شوند ، با توجه به اینکه خانه‌های این پلیت‌ها کوچک است و همچنین نمی‌توان سلول‌های کاشته شده در این خانه‌ها را ضمن انجام آزمایش پاساژ داد و برای جلوگیری از رشد زیاد سلول‌ها ، درصد سرم جنین گاوی محیط را که بطور معمول ۱۰ درصد است به ۵ یا ۲/۵ درصدکاهش می‌یابد. در اولین مرحله سلول‌ها با کمک تریپسین از فلاسک جدا شد (مراحل مشابه پاساژ سلولی است) ولی در انتها به جای استفاده از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی یکی میلی‌لیتر محیط کشت حاوی پنج درصد سرم جنین گاوی به رسوب سلولی اضافه کرده و پیپتاژمی-شود . از این سوسپانسیون سلولی ۱۰ میکرولیتر برداشته و به آن۱۰ میکرولیتر تریپان بلو (این رنگ به غشاء سلول‌های مرده وارد گردیده ولی سلول‌های زنده آن را جذب نمی‌نمایند) اضافه می‌شود، سپس بر

[1] Eliza Reader

روی لام نئوبار قرار داده و سلول‌ها شمارش می‌شود. شمارش سلولی که در روز اول انجام می‌گیرد بسیارمهم و حساس است. چون باید به نحوی صورت گیرد که تعداد مساوی از سلول‌ها در همه خانه‌ها وارد شود.

در ادامه ، سوسپانسیون سلولی طوری رقیق می‌گردد که در هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت پنج درصد سرم جنین گاوی که حاوی ۱۰۰۰۰ سلول است ریخته شود .

روز دوم :

در این روز از دارو سیلی بینین خالص و سیلی بینین نانونیوزوم و نانونیوزوم شاهد غلظت‌های برحسب (میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت تازه تهیه می‌شود . سپس محیط کشت را تخلیه نموده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته و اضافه می‌شود.

روز چهارم :

در روز چهارم پلیت مخصوص ۴۸ ساعته خوانده می‌شود برای خواندن پلیت ۴۸ ساعته ، ابتدا جهت تهیه محلول MTT با غلظت mg/ml ۰/۵ , ۵۰ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰۰میلی‌لیتر بافر فسفات ، حل می-شود . پودر MTT را می توان تا ۲ سال در $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری کرد ولی در حالت محلول حداکثر تا یک ماه می‌توان آن را در یخچال حفظ کرد. در مرحله بعد محیط کشت داخل چاهک‌ها را خارج کرده و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده اضافه می‌گردد. پلیت را به مدت سه ساعت در انکوباتور در دما $۳۷^{\circ}C$ قرار داده، بعد از طی این مدت از انکوباتور خارج کرده، محیط سلول تخلیه و سپس برای حل نمودن فرمازان تولید شده به هر خانه ۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه نموده و پلیت را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته می‌شود تا فرمازان به خوبی حل گردد (شکل ۲-۷). در مرحله بعد جذب را به کمک دستگاه Elisa Reader و در طول موج ۵۳۰nm اندازه گیری می‌شود.

شکل ۲-۷- پلیت تست MTT بعداز ۴۸ ساعت

میزان سمیت و درصد بقاء رده‌های سلولی کشت داده شده با دارو سیلی بینین و سیلی بینین نانونیوزم با استفاده از روابط ۲-۵ و ۲-۶ محاسبه می‌گردد[۴۴].

(رابطه ۲-۵) درصد سمیت[۱] سلولی = ۱ - میانگین جذب سلول های هر نمونه / میانگین جذب سلول های شاهد × ۱۰۰

(رابطه ۲-۶) درصد بقا[۲] سلولی = ۱۰۰ - درصد سمیت سلولی

۲-۷-۳-۲) تعیین IC_{50} دارو سیلی بینین خالص، سیلی بینین نانونیوزوم و نانونیوزوم شاهد در رده سلولی T47D

جهت تعیین دوز ۵۰ درصد کشندگی مواد سمی بر روی رده سلولی ذکر شده، تمامی نتایج بدست آمده (درصد سمیت) از نمونه ها و کنترل تست MTT با استفاده از نرم افزار

Pharm (Pharmacologic Calculation System Statistical Package, Springer-Verlage, USA)

بررسی شد و میزان دقیق IC_{50} مربوطه تعیین می‌گردد.

[۱] Cytotoxicity
[۲] Viability

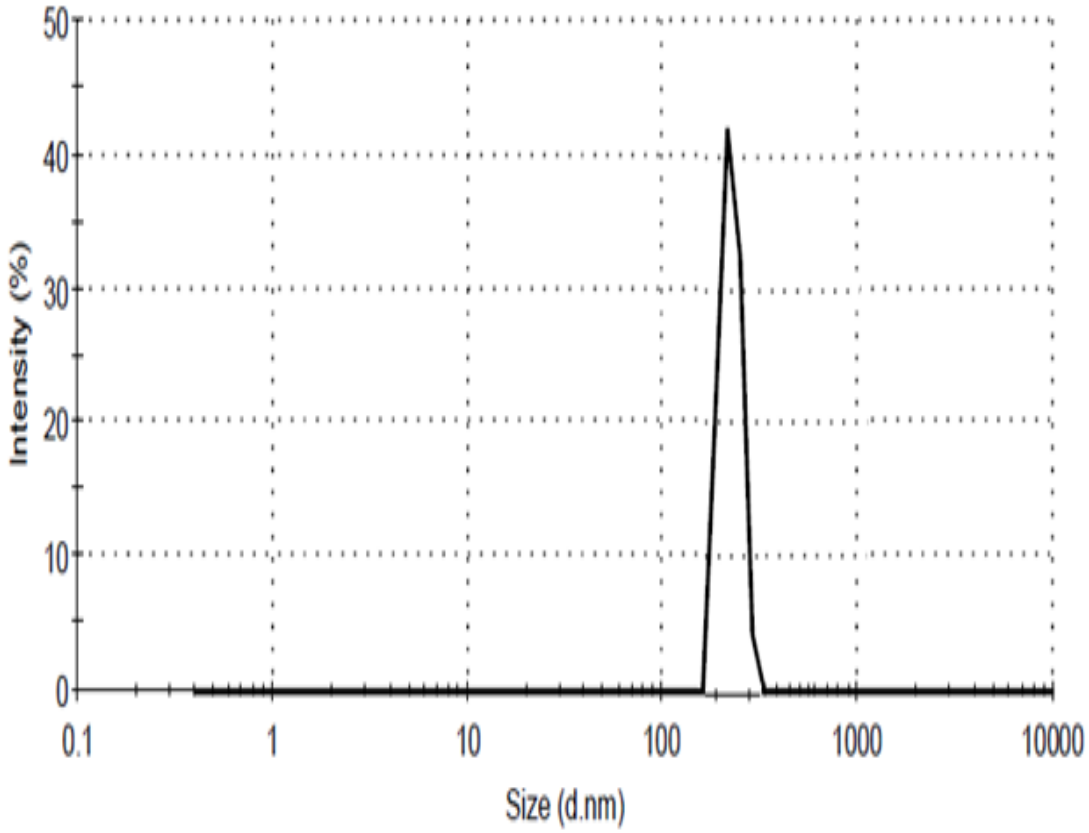
فصل سوم : بحث و نتیجه گیری

نیوزوم یکی از سیستم‌های دارورسانی نوین، دارای ساختار لایه‌لایه در اندازه میکروسکوپی که از سورفاکتانت غیر یونی و کلسترول تشکیل شده است. روش تبخیر فاز معکوس ساده‌ترین روش تهیه آن با قابلیت تکرارپذیری بالا می باشد. در این روش از پلی اتیلن گلیکول و کلسترول به منظور افزایش پایداری نیوزوم استفاده می شود.

در این مطالعه دارو سیلی بینین که یک دارو ضد سرطانی است با روش تبخیر فاز معکوس نانونیوزوم می-شود. در ابتدا دارو سیلی بینین ،پلی اتیلن گلیکول 2000 ، کلسترول ، Span 20 در مخلوط حلال متانول و کلروفرم را در بافر فسفات حل کرده و در نتیجه داروی سیلی بینین نانونیوزوم تشکیل می‌شود، نانونیوزوم شاهد که فاقد دارو سیلی بینین است به همین روش تهیه گردید. رهایش دارو، میزان بارگذاری، درصد کپسولاسیون و سمیت دارو سیلی بینین نانونیوزوم روی سرطان سینه با رده سلولی T47D مورد بررسی قرار گرفت. جهت اثبات تهیه دارو سیلی بینین نانونیوزوم و نانونیوزوم شاهد از داده‌های زتاسایزر، پتانسیل‌زتا استفاده می‌گردد.

۳- ۱) بررسی اندازه قطر ذرات، پتانسیل زتا و مورفولوژی دارو سیلی بینین نانونیوزوم

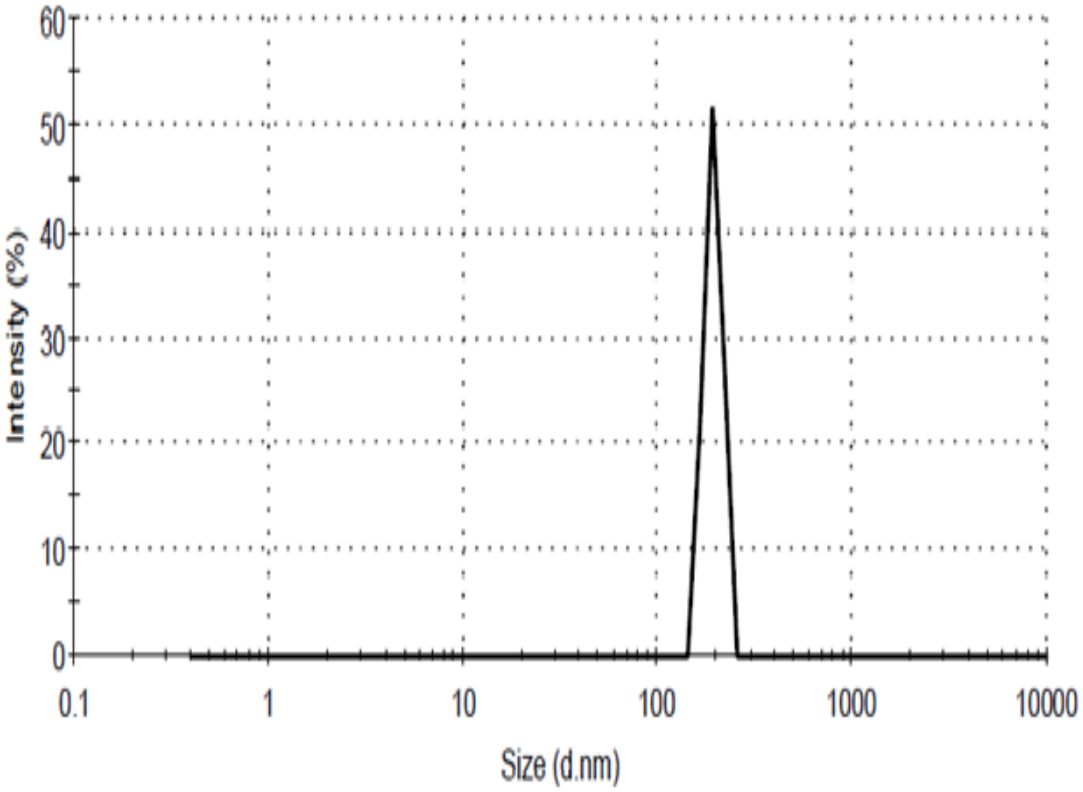
اندازه قطر ذرات و پتانسیل زتا نانونیوزوم شاهد به وسیله دستگاه زتا سایزر اندازه گیری می‌شود، که به ترتیب برابر ۱۷۶/۸nm و ۲۳/۸ mv- تعیین گردید (شکل۳-۱).



شکل۳-۱- مربوط به اندازه قطر ذرات نانونیوزوم شاهد

(شدت پیک =Intensity، اندازه قطر ذرات =Size)

اندازه قطر ذرات و پتانسیل زتا دارو سیلی بینین نانونیوزوم به ترتیب برابر ۱۹۲/۳ nm و۲۳/۶ mv- تعیین گردید (شکل ۳-۲).



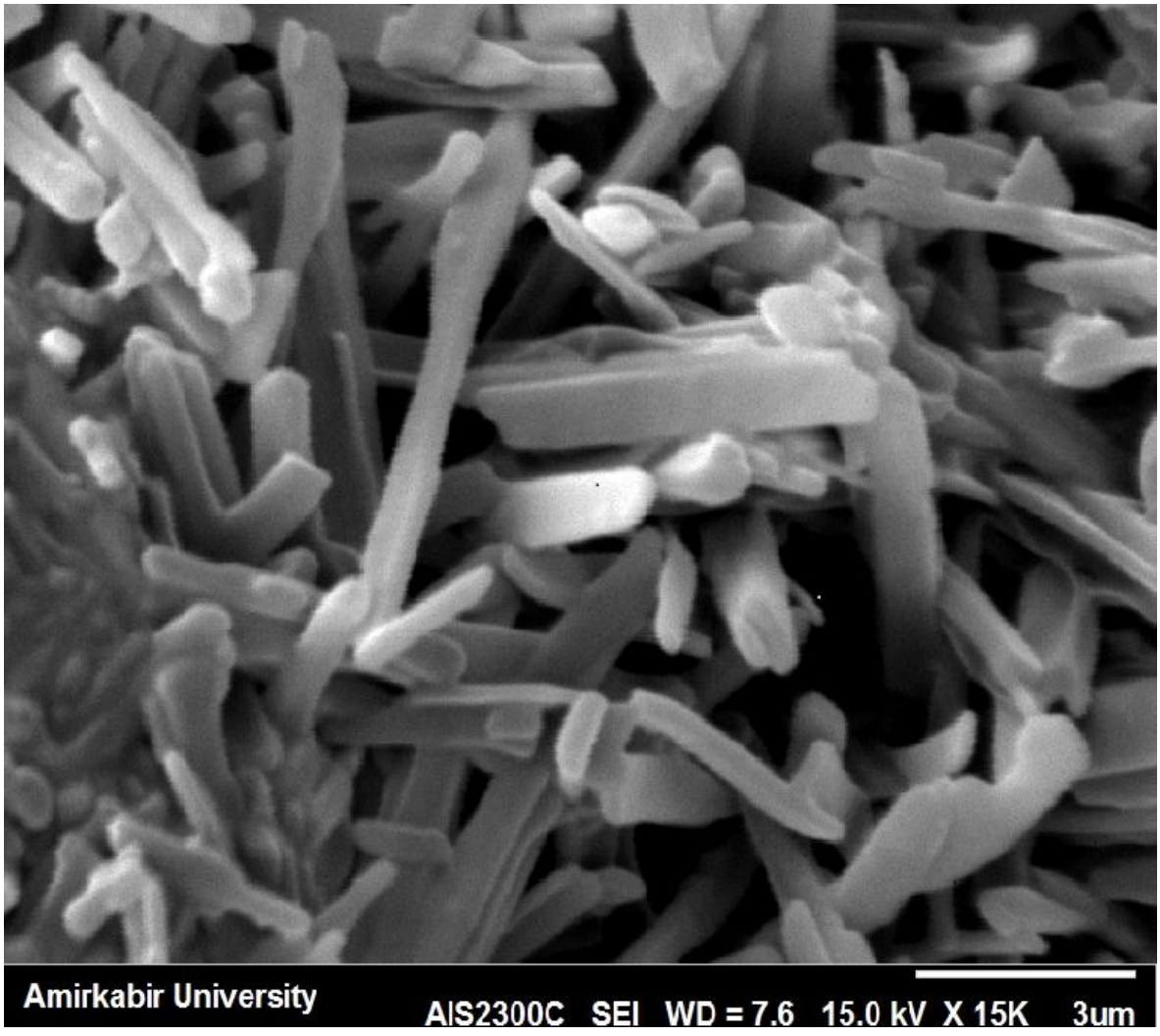
شکل۳-۲- مربوط به اندازه قطر ذرات دارو سیلی بینین نانونیوزوم

(شدت پیک =Intensity، اندازه قطر ذرات =Size)

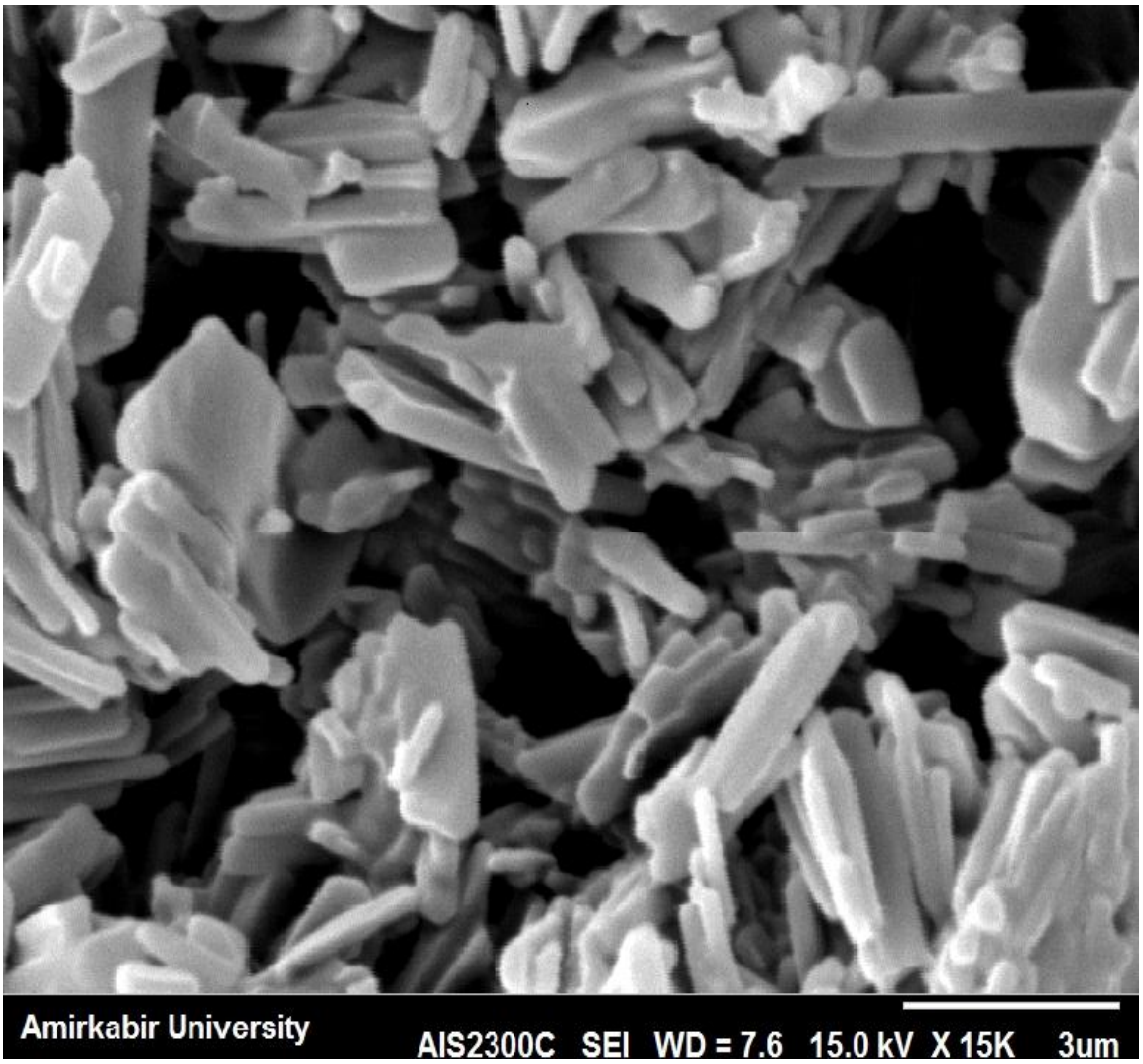
همانطور که ملاحظه می‌شود اندازه قطر ذرات نانونیوزوم شاهد و دارو سیلی بینین نانونیوزوم زیر ۳۰۰nm است. در نتیجه دارو سیلی بینین نانونیوزوم تشکیل شده است زیرا نانو داروهای با اندازه زیر ۳۰۰ nm به علت افزایش نفوذپذیری عروق بافت توموری، برای ورود به بافت توموری مناسب هستند[۴۵].

پتانسیل زتا نانونیوزوم شاهد و دارو سیلی بینین نانونیوزوم هر دو در یک محدوده و کمتر از ۳۰mv – می‌باشند در نتیجه به علت بزرگ بودن نیروی دافعه بین ذره‌ها، در هنگام حل شدن در حلال از به هم چسبیدن ذره‌ها جلوگیری می‌کند و سیستم کلوئیدی پایداری بیشتری پیدا می‌کند [۴۶].

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانو نیوزوم شاهد و دارو سیلی بینین نانو نیوزوم به ترتیب در شکل‌های ۳-۳ و ۳-۴ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نانونیوزوم‌ها دارای ساختار کشیده با سطوح صاف هستند.



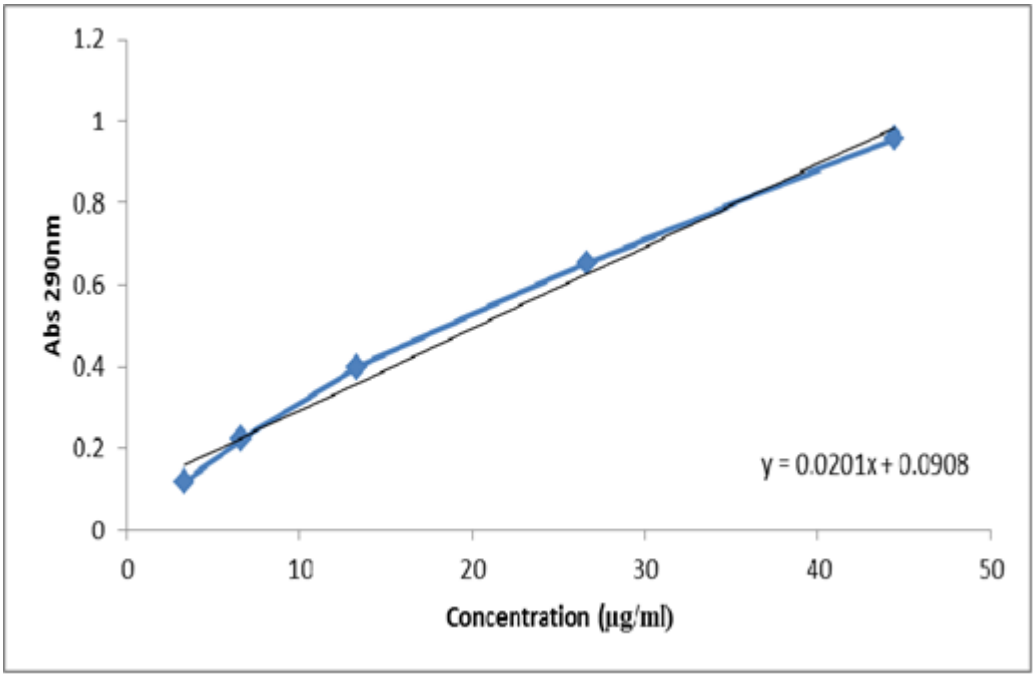
شکل ۳-۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانونیوزوم شاهد



شکل ۳-۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی دارو سیلی بینین نانونیوزوم

۳-۲) بررسی درصد کپسولاسیون و میزان بارگذاری دارو سیلی بینین نانونیوزوم

منحنی استاندارد دارو سیلی بینین خالص در غلظت‌های مختلف در شکل ۳- ۵ نشان داده شده است، که یک شاخص برای تعیین غلظت مجهول است.

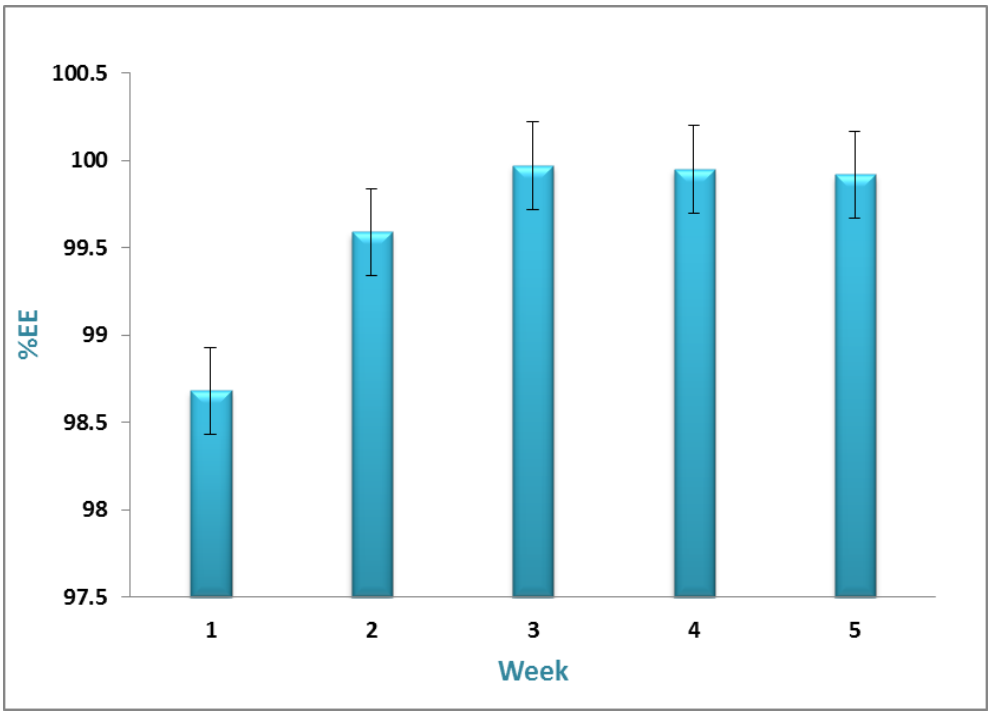


شکل ۳- ۵- منحنی استاندار دارو سیلی بینین خالص

(غلظت = Concentration، جذب = Abs)

درصد کپسولاسیون یا به دام‌اندازی[۱] دارو سیلی بینین نانونیوزوم شده با استفاده از روابط ۲-۱و۲-۲ محاسبه و نتایج آن در نمودار ۳-۱ آورده شده است. از داده‌های درصد کپسولاسیون می‌توان دریافت که دارو پایدار است، زیرا درصد کپسولاسیون بعد ازیک ماه تغییر چندانی نکرده است. پایداری شاخصی است که نشان می‌دهد فرمولاسیون جدید در دما $^{\circ}C$ ۸- ۴یخچال پایداری خود را حفظ کرده و تجزیه نشده و به فرم نانونیوزوم باقی مانده است.

[۱]. Entrapment



نمودار ۳-۱- درصد پایداری داروی سیلی بینین نانو نیوزوم برحسب هفته‌های بارگذاری شده

(بازده کپسوله = EE ٪، هفته = Week)

میزان بارگذاری دارو سیلی بینین نانونیوزوم شده با استفاده از رابطه ۲-۳ محاسبه و نتایج آن در جدول ۳-۱ آمده است. میزان بارگذاری دارو نسبتی بین مقدار دارو احاطه شده و میزان حامل و جهت بررسی پایداری دارو است. همانطور که مشاهده می‌شود در طول یک ماه تغییر چندانی نکرده در نتیجه دارو پایدار است.

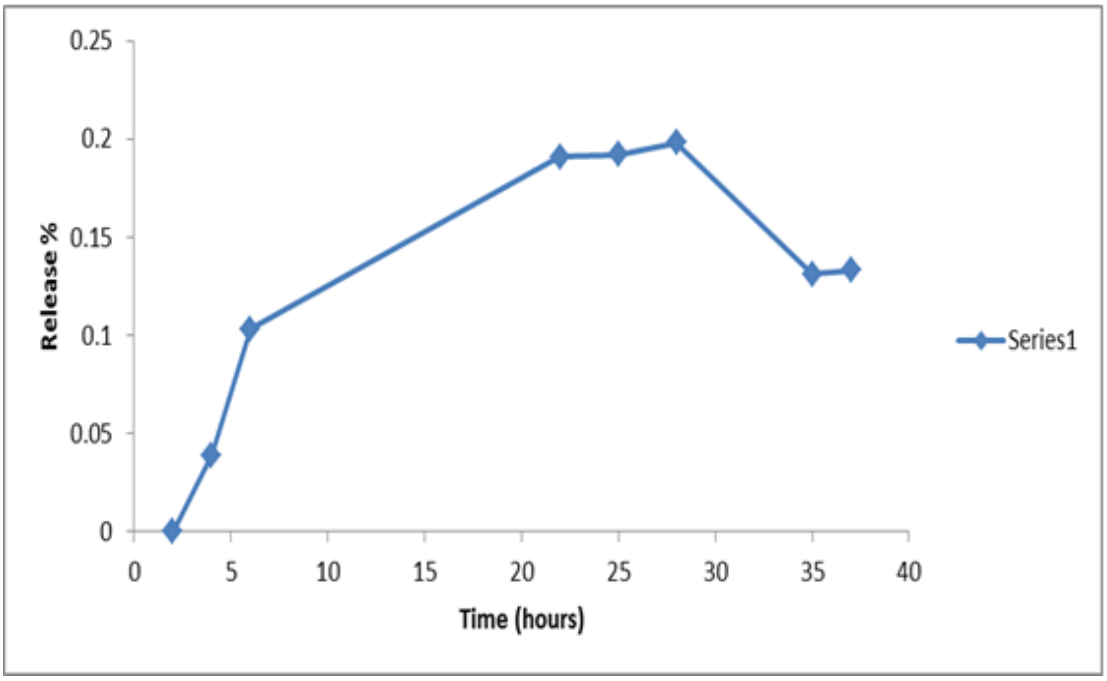
جدول ۳-۱ میزان بارگذاری دارو

هفته	میزان بارگذاری
هفته اول	۲۱%
هفته دوم	۲۲%
هفته سوم	۲۲%
هفته چهارم	۲۲%

۳-۳) بررسی رهایش[۱] دارو سیلی بینین نانونیوزم

در بررسی رهایش دارو، نمودار درصد غلظت دارو رها شده بر حسب زمان در نمودار ۳-۲ نشان داده شده است. این نمودار آزاد شدن دارو از وزیکول نانونیوزوم در محیط برون تنی را نشان می‌دهد که آزاد شدن دارو در ابتدا سیر صعودی داشته و در نهایت روند آزاد شدن دارو از وزیکول به صورت آرام و یکنواخت صورت گرفته است.

[۱] Release

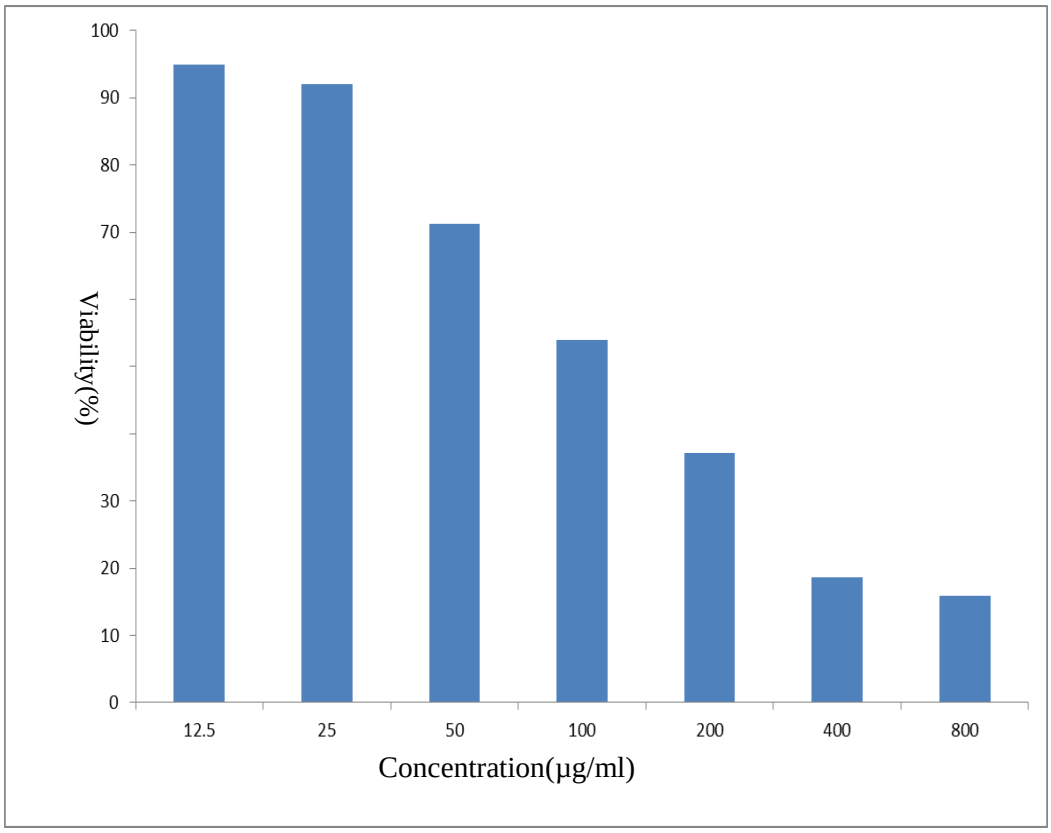


نمودار ۳-۲- رهایش دارو برحسب در صد غلظت دارو رها شده

(درصد رهایش = Release%، زمان = Time)

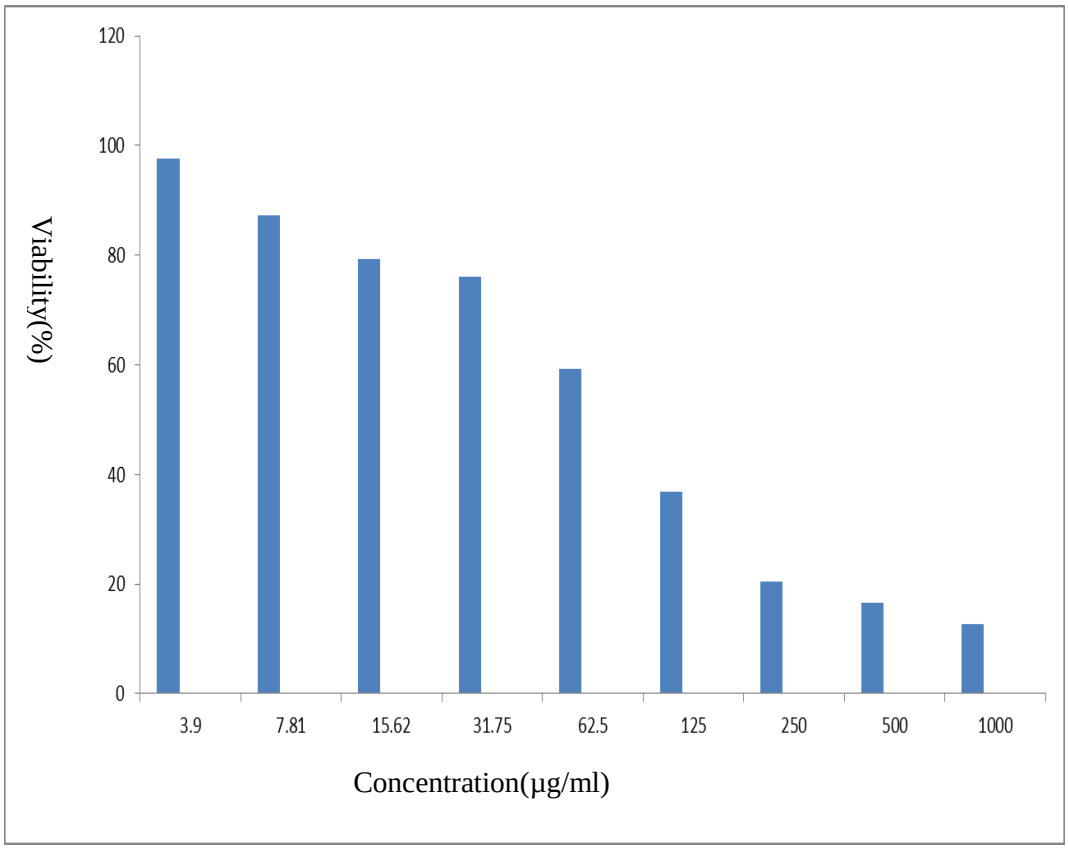
۳-۴) بررسی دارو سیلی بینین نانیوزوم برحیات رده سلولی T47D

تیمار سلول‌های T47D با غلظت‌های مختلف از دارو سیلی بینین خالص و دارو سیلی بینین نانونیوزوم طی ۴۸ ساعت که سبب کاهش بقاء سلول گردیده در نمودار ۳-۳ و ۳-۴ نشان داده شده است.



نمودار ۳-۳- درصد بقاء سلول برحسب غلظت دارو سیلی بینین نانونیوزوم

(Concentration = غلظت، Viability٪ = درصد بقا)



نمودار ۳-۴- درصد بقاء سلول برحسب غلظت دارو سیلی بینین خالص

(غلظت = Concentration، درصد بقا = Viability٪)

همانطور که در هر دو نمودار مشاهده می‌شود با افزایش غلظت دارو درصد بقا سلول کاهش می‌یابد. در این نمودارها میزان تاثیرگذاری فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم بر سلول ارزیابی می‌شود. به این صورت که دارو سیلی بینین نانونیوزوم نسبت به دارو سیلی بینین خالص چقدر کشندگی دارد، با شاخصی به نامIC_{50} بیان می شود. هر چقدر میزان IC_{50} کمتر نشان دهنده، کار آمد بودن فرمولاسیون است.

نانونیوزوم شاهد فاقد کشندگی سلول زیرا فاقد دارو سیلی بینین است.

۳-۵) محاسبه IC_{50} دارو بر روی رده سلولی T47D

پس از تیمار سلول های T47D با غلظت‌های مختلف از دارو سیلی بینین خالص و دارو سیلی بینین نانونیوزوم شده طی ۴۸ ساعت با استفاده از نرم افزار pharm میزان IC_{50} محاسبه که نتایج در جدول ۳- ۵ نشان داده شده است.

جدول ۳-۵- IC_{50} دارو سیلی بینین خالص و دارو سیلی بینین نانونیوزوم

رده سلولی T47D	IC_{50}
دارو سیلی بینین خالص	$۸۶/۱ \pm ۵ \frac{\mu g}{ml}$
دارو سیلی بینین نانونیوزوم	$۲۰۳/۵ \pm ۱۰ \frac{\mu g}{ml}$

چون IC_{50} دارو سیلی بینین نانونیوزوم بیشتر از دارو سیلی بینین خالص است درنتیجه دارو سیلی بینین نانونیوزوم شده اثر بخشی کمتری بر روی رده سلولی T47Dسرطان سینه دارد. و این امکان وجود دارد که این دارو روی رده های دیگر سلول سرطان سینه اثربخشی بهتری داشته باشد.

۳-۶) نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه ما دارو سیلی بینین را بصورت نانونیوزوم درآوردیم. نانونیوزوم یکی از روش‌های دارورسانی نوین می‌باشد. برای تهیه فرمولاسیون نانونیوزوم سیلی بینین از روش تبخیر فاز معکوس استفاده گردید. اندازه قطر ذرات دارو سیلی بینین نانونیوزوم حدود ۱۹۲/۳nm با دستگاه زتاسایزر اندازه گیری گردید که در محدوده نانو داروها بود. درصد کپسوله شدن دارو حدود ۹۹ درصد و میزان بارگذاری دارو حدود ۲۲درصد محاسبه شد که تایید کننده احتباس دارو در وزیکول است. رهایش دارو نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده رهایش آهسته دارو نسبت به کنترل آن بود. شکل نانونیوزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید که نانونیوزوم‌ها دارای ساختار کشیده با سطوح صاف بودند. بررسی پایداری فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم نشان داد که وزیکول‌های حاوی دارو حداقل در طی یک ماه بررسی انجام شده کاملا پایدار بوده و دارو سیلی بینین به صورت نانونیوزوم باقی مانده است. در بررسی سمیت دارو با آزمون MTT میزان IC_{50} دارو سیلی بینین نانونیوزوم نسبت به دارو سیلی بینین خالص بر روی سرطان سینه با رده سلولی$T47D$ به ترتیب برابر با ۲۰۳/۵µg/ml و ۸۶/۱µg/ml بدست آمد. این نتیجه که بصورت IC_{50} بیان می شود حاکی از اثربخشی کمتر داروی سیلی بینین نانونیوزوم نسبت به دارو سیلی بینین خالص می باشد.

پیشنهادات

- بررسی فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم تهیه شده در مدل حیوانی.
- بررسی فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم در سایر رده‌های سلول‌های سرطان سینه و مقایسه آنها با یکدیگر.
- بررسی اثر خاصیت ضد سرطانی ایزومرهای دیگر سیلی بینین موجود در سیلیمارین.
- تهیه فرمولاسیون دارو سیلی بینین نانونیوزوم با مخلوطی از سور فاکتانت‌های غیریونی.

منـــابع

[۱] باقرپور س. ک، (۱۳۹۲)، پایان نامه ارشد:" بررسی سمیت نانو ذرات پلی بوتیل سیانوآکریلات شاهد و بارگذاری شده با سیس پلاتین در محیط کشت سلولی "، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی بابل.

[۲] درویش دماوندی م، (۱۳۸۶)، رساله دکترا:" بررسی میزان تغییرات مقاومت سلول های T47D مقاوم به تاموکسیفن در اثر القا بیان آنزیم NOS توسط پنتو باربیتال یا مهار آن توسط سایمیتیدین"، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

[۳] Armstrong K, Eisen A, Weber B. (۲۰۰۰) **New England Journal of Medicine**, ۳۴۲, PP ۵۶۴-۵۷۱.

[۴] عنصری خ، رعناپور س، (۱۳۹۰)، " سرطان سینه در زنان و نقش فاکتور های محیطی در ایجاد آن"، **مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی**، دوره اول، شماره٤، ص ۵۹-۷۰.

[۵] Ford D, Easton D F, Peto J. (۱۹۹۵) **American Jounarl of Human Genetics**, ۵۷, PP ۱۴۵۷-۱۴۶۲.

[۶] Singletary S E. (۲۰۰۳) **Journal Annals of Surgrey**,**۲۳۷**, PP ۴۷۴-۴۸۲.

[۷] Hale P S, Ford M J, Maddox L M, Shapter J G, Voelcker N H, Waclawik E R.

(۲۰۰۵) **Journal of Chemical Education**, ۸۲, PP ۷۷۵-۷۷۸.

[۸] Juzenas P, Chen W, Sun Y P, Coelho M A N, Generalov R, Generalova N, Christensen I L. (۲۰۰۸) **Advanced Drug Delivery Reviews**, ۶۰, PP۱۶۰۰-۱۶۱۴.

[۹] Kratz F. (۲۰۰۸) **Journal of Controlled Release**, ۱۳۲, PP ۱۷۱-۱۸۳.

[۱۰] Giotta F, Lorusso V, Maiello E, Filippelli G, Valerio M R, Caruso M, Verderame F , Lattorre A, Colucci G. (۲۰۰۷) **Annals of Oncology**, ۱۸, PP ۶۶-۶۹.

[۱۱**]** Zarei M, Norouzian D, Chiani M, Ebrahimi H, Mohammadi M, Akbarzadeh A.

(۲۰۱۳ **) International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharm Research**, ۲, PP ۳۳۶-۳۴۲.

[۱۲**]** Dadgar N, Norouzian D, Chiani M, Ebrahimi H, Mehrabi S M, Farhangi A, Akbarzadeh A. (۲۰۱۳ **) International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharm Research**, ۲, PP ۳۵۰-۳۵۵.

[۱۳**]** Chen J H, Ling R, Yao Q, Li Y, Chen T, Wang Z, Li K Z. (۲۰۰۵ **) Endocrine Related Cancer**, ۱۲, PP ۹۳-۱۰۰.

[۱۴**]** توحید پور م، دراجی س. الف، للهی س. م، (۱۳۸۴)، **" نانوداروهادرداررورسانی (نوین)** "، چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران ، کرمان ، ص۳۲۴.

[۱۵] ملائکه نیکوئی ب، حنفی بجد م. ی، عاقبتی ت، مصلایی ن، (۱۳۹۰) **" سامانه دارو رسانی با اندازه نانو"** ، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحات ۴۸، ۹۵، ۹۶،۱۰۰-۱۰۲، ۱۰۸، ۱۶۵-۱۶۳، ۱۷۴-۱۷۳، ۱۷۸، ۱۸۲،۱۸۶-۱۸۴، ۱۹۸.

[۱۶**]** لولکارنی گ، (۱۳۸۵) **"بیوتکنولوژی و کاربردهای آن در داروسازی"**، فرامرزی م. ع، قاسمی ی، زرینی غ. ر، محقق زاده ع، نفیسی ورچه ن ، انتشارات راه کمال، تهران، صفحات ۷۵، ۲۶۳، ۲۶۴.

[۱۷**]** سلیمی ح، طاهری س. م. ی، احمدوند ع، (۱۳۸۹) **" آشنایی با فناوری نانو۱"** ،انتشارات احمدوند ع، تهران، صفحات ۸۵،۸۷، ۸۹.

[۱۸**]** عوادی م. ر، ناطقیان ن، درانی م، موثقیان س، میر محمد صادقی ع، رفیعی تهرانی م، (۱۳۹۰) **" فناوری نانو ذره در دارورسانی"** ، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ص۱۷۳.

[۱۹**]** کسری کرمانشاهی ر ، حسین خانی ب ، (۱۳۸۵) **"نانو بیوتکنولوژی (از دیدگاه میکروبیولوژی)"** ، انتشارات دانشگاه اصفهان، ص۱۲۸.

[٢٠] Abhinav K, Lal P J, Amit J, Vishwabhan S. (٢٠١١) **International Research Journal of Pharmacy,** ٢, PP ٦١-٦٥.

[٢١] Mujoriya R, Dhamande K, Bodla R B. (٢٠١١) **International Journal of Applied Pharmaceutics**, ٣, PP ٧-١٠.

[٢٢] Verma A K, Bindal M. (٢٠١١) **Indian Journal of Novel Drug Delivery**, ٣, PP ٢٣٨-٢٤٦.

[٢٣] Donatella P, Muzzalupo R, Ricciardi A, Celia C, Picci N, Fresta M. (٢٠٠٧) **Biomedical Microdevices**, ٩, PP ٤٢١-٤٣٣.

[٢٤] Hofland H E J, Bouwstra J A, Verhoef J C, Buckton G, Chowdry B Z, Ponec M, Junginger H E. (١٩٩٢) **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, ٤٤, PP ٢٨٧-٢٩٤.

[٢٥] Malhotra M, Jain N K. (١٩٩٤) **Journal Indian Drugs**, ٣١, PP ٨١-٨٦.

[٢٦] Pola Chandu V, Arunachalam A, Jeganath S, Yamini K, Tharangini K, Chaitanya G.

(٢٠١٢) **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, ٢,

PP ٢٥-٣١.

[٢٧] Hu C, Rhodes D G. (١٩٩٩) **International Journal of Pharmaceutics** , ١٨٥, PP ٢٣-٣٥.

[٢٨] Yoshioka T, Sternbergb B, Florence A T. (١٩٩٤) **International Journal of Pharmaceutics**,١٠٥, PP ١-٦.

[٢٩] Sudhamani T, Priyadarisini N, Radhakrishnan M. (٢٠١٠) **International Journal of PharmTech Research**, ٢, PP ١٤٤٦-١٤٥٤.

[٣٠] Raja-Naresh R A, Chandrashekhar G, Pillai G K, Udupa N. (١٩٩٤) **Indian Journal of Pharmacology,** ٢٦, PP ٤٦-٤٨.

[۳۱] Chauhan S, Luorence M J. (۱۹۸۹) **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, ۴۱, PP ۱-۶.

[۳۲] Dolan T F, Hunter C A, Coombs G H, Baillie A J. (۱۹۸۸) **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, ۴۰, PP ۱۶۱-۱۶۵.

[۳۳] Fang J Y, Hong C T, Chiu W T, Wang Y Y. (۲۰۰۱) **International Journal of Pharmaceutics**, ۲۱۹, PP ۶۱-۷۲.

[۳۴] Vyas S P, Singh R P, Jain S, Mishra V, Mahor S, Singh P, Gupta P N, Rawat A, Dubey P. (۲۰۰۵) **International Journal of Pharmaceutics**, ۲۹۶, PP ۸۰-۸۶.

[۳۵] Weihua H, Tianqing L. (۲۰۰۷) **Physicochemical & Engineering Aspects**, ۳۰۲,

PP ۳۷۷-۳۸۲.

[۳۶] Donatella P, Cosco D, Muzzalupo R, Trapasso E, Picci N, Fresta M. (**۲۰۰۸**) **International Journal of Pharmaceutics**, **۳۵۳**, PP **۲۳۳-۲۴۲**.

[۳۷] Manosroi A, Chutoprapat R, Abe M, Manosroi J. (۲۰۰۸) **International Journal of Pharmaceutics**, ۳۵۲, PP ۲۴۸-۲۵۵.

[۳۸] Srinivas S, Anand Kumar Y, Hemanth A , Anitha M. (۲۰۱۰) **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, ۵, PP ۲۴۹- ۲۵۴.

[۳۹] اصغرخانی الف، اکبرزاده ع، چیانی م، ایرانی ش، اطیابی س. م، نوروزیان د، (۱۳۹۱)" بررسی اثر سمیت سلولی آرتیمیزین نانو نیوزومه بر روی رده سلول های سرطانی سینه"، **مجله بیماری‌های پستان ایران**، دوره ۵ ، شماره۴، ص۸-۱۲.

[۴۰] Alavi S E, Esfahani M M K, Chiani M, Heidarinasab A , Akbarzadeh A.

(۲۰۱۳) **New Cellular and Molecular Biotechnology Journal**, ۳, PP ۶۳-۶۷.

[۴۱] Zarei M, Norouzian D, Honarvar B, Mohammadi M, Ebrahimi H, Akbarzadeh A.

(۲۰۱۳) **Pakistan Journal of Biological Sciences**, ۱۶, PP ۲۹۵-۲۹۸.

[۴۲] مختاری م. ج، (۱۳۸۶)، پایان نامه ارشد:" بررسی اثر سیلی بینین استخراج شده از گیاه خار مریم (Silybu marinum) بر روی ژن **KAI1** به عنوان ژن مهار کننده متاستازی در سلول‌های سرطان (PC-3)"، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران.

[۴۳] Mosmann T. (۱۹۸۳) **Journal of Immunological Methods**, ۶۵, PP ۵۵-۶۳.

[۴۴]مختاری م. ج، شکر گزار م. ع، معتمد ن، اکبر زاده ع، مومنی م، کامیاب الف، عدالت ر، آذری ش، امان زاده الف، (۱۳۸۹) " افزایش بیان ژن CD82 در رده سلولی PC-3 سرطان پروستات تیمار شده با سیلی بینین "، **مجله علوم پزشکی مدرس** ، دوره ۱۳، شماره ۳ ، ص ۴۱-۵۲.

[۴۵] Mansour H M, Rhee Y S, Wu X. (۲۰۰۹) **International Journal of Nanomedicine**, ۴, PP ۲۹۹-۳۱۹.

[۴۶] Zhang Y, Yang M, Porteny N G, Cui D, Budak G, Ozbay E, Ozkan M. (۲۰۰۸) **Biomed Microdevices**, ۱۰, PP ۳۲۱-۳۲۸.

Abstract:

Niosome is a novel drug delivery systems. Are non-ionic vesicles are microscopic structure of two layers. In this study, silibinin nanoniosomal drug formulation, by reverse-phase evaporation method of mixing the drug with a cholesterol, silibinin, polyethylenglycol2000 and Span20 certain proportions were prepared.The diameter of niosomal silibinin drug nanoparticles, drug loading and encapsulation percent being respectively 192/3nm, 22% and 99%. The pattern of drug delivery vesicles using over 37 hours of dialysis were studied. The results showed that the drug release from the formulation takes place slowly. Investigate the stability of the drug formulation showed that vesicles containing medications for at least one month during the study, and was quite stable. And Drug Silibinin to form nanoniosomal vesicles remains. The formulations in the treatment of breast cancer cell line T47D was used. Drug toxicity of niosomal silibinin by MTT assay was calculated. The amount of drug IC_{50} niosomal silibinin after 48h, 203/5μg/ml, indicating it is less effective.

Keywords: Niosomal vesicles, Silibinin, Cell line T47D, Nonionic surfactants, MTT.

Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry Sciences

Preparation of Nanoniosomal formulation of Silibinin and evaluation of its Efficacy in T47D breast cancer Cell line

Supervisors:
Dr. Esmaiel Soleimani
Dr. Azim akbarzadeh

Advisor:
Dr. Mohsen chiani

By
Boshra Amiri

February 2013