بسم الله الرحمن الرحيم

٤٥٩٤٧

تقدیم به پدر و مادرم

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
۱۳۸۲/۴/۲۰

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکدهٔ داروسازی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع:

بررسی کارآیی لیپوزوم‌های پایدار شده با PVP در موش بزرگ آزمایشگاهی (Rat)

اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر طیبه تولیت

سرکار خانم دکتر معصومه جرجانی

نگارش:

محسن محبی

٤٥٩٤١

سال تحصیلی: ۸۲-۱۳۸۱

شماره پایان‌نامه: ۴۳۳۵

با تقدیر و تشکر از اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر تولیت

سرکار خانم دکتر جرجانی

که از آغاز تا انجام این پایان‌نامه از رهنمودهای علمی ایشان بهره‌مند بوده‌ام

و با قدردانی از:

دیگر استادان و کارکنان آزمایشگاههای صنعتی و بیوفارماسی (دانشگاه تهران) و فارماکولوژی (دانشگاه شهید بهشتی) که در مراحل مختلف کار مرا یاری کرده‌اند.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

دیباچه

چکیده ۲

طرح مسأله و هدف ۳

بخش اول – کلیات

پیشگفتار ۷

آشنایی با انواع لیپوزوم ۹

لیپوزوم‌های معمولی (CLs) ۱۰

لیپوزوم‌های SSL (نسل دوم لیپوزوم‌ها) ۱۳

پلیمرهای مورد استفاده در LCLs یا SSLs ۱۷

مکانیسم عمل PEG و PVP (و سایر پلیمرهای مشابه) ۱۷

مزایای لیپوزوم‌های SSL ۱۸

مواردی از برتری‌های SSLs ۱۸

بخش دوم – روش‌های تهیه لیپوزوم

تهیه لیپوزوم‌ها ۲۱

۱ – تهیهٔ MLV ۲۳

۲ – تهیه LUVs ۲۵

۳- تهیه SUVs ۲۸

بخش سوم – فارماکوکینتیک لیپوزوم‌ها و مواد اصلی مورد استفاده

فارماکوکینتیک فرآورده‌های لیپوزومی ۳۳

کینتیک آزاد شدن محتویات لیپوزوم در بافت‌ها ۳٤

اثر متقابل لیپوزوم با سلول ۳۵

فارماکوکینتیک لیپوزومهای تزریق وریدی ۳۹

تأثیر نوع و ترکیب لیپوزومی بر فارماکوکینتیک ٤۳

مواد اصلی مورد استفاده در این مطالعه و نقش آنها ٤٦

فهرست مطالب

عنوان صفحه

بخش چهارم - مواد و روشها

مواد مورد استفاده ٥٥

وسایل مورد استفاده ٥٦

١- ساخت محلول تزریقی تئوفیلین ٥٧

٢- ساخت تئوفیلین لیپوزومی ٥٧

٣- تعیین میزان محصورسازی لیپوزوم‌ها ٦٠

٤- تزریق شکل‌های لیپوزومی و محلول ساده تئوفیلین به rat ٦٢

٥- تهیه نمونه‌های سرمی ٦٣

٦-آماده سازی نمونه‌ها وHPLC ٦٤

٧- تعیین غلظت سرمی دارو برای نمونه‌های مورد آزمایش ٦٦

بخش پنجم - یافته‌ها و نتایج

آنالیز داده ٧٤

بحث ٨٨

اثر اندازه و همگنی آن ٩١

اثر تغییرات روی پلیمر هیدروفیل ٩٢

چکیده انگلیسی ٩٤

منابع ٩٥

فهرست اشکال و جداول

عنوان | صفحه

تصویر۱-۱ طرح نمادین یک لیپوزوم تک‌لایه ۱٤
تصویر ۲-۱ مراحل تهیه لیپوزوم‌های معمولی ۲۲
تصویر ۲-۲ فرآیند تبخیر حلال برای تهیه لیپوزوم ۲٦
تصویر ۳-۱ رابطهٔ بین پایداری لیپوزوم‌ها و کلیرانس آنها ٤٤
تصویر ۳-۲ لسیتین‌های α و β ٤٦
تصویر ۳-۳ فرمول بسته و ساختمانی کلسترول ٤۹
تصویر ۳-٤ فرمول بسته و ساختمانی PVP ٥۰
تصویر ۳-٥ فرمول بسته و ساختمانی و مشخصات تئوفیلین ٥۲
دیاگرام ٤-۱ مراحل استخراج فسفولیپید خام ٥۸
دیاگرام ٤-۲ مراحل استخراج لسیتین از فسفولیپید خام ٥۹
دیاگرام ٤-۳ مراحل آماده سازی نمونه‌های سرمی ٦٥
تصویر ٥-۱ منحنی استاندارد UV تئوفیلین ٦۸
تصویر ٥-۲ کروماتوگرام‌ها ٦۹
تصویر ٥-۳ کروماتوگرام‌ها ۷۰
تصویر ٥-٤ کروماتوگرام‌ها ۷۱
تصویر ٥-٥ منحنی کالیبراسیون تئوفیلین در سرم rat ۷۲
جدول ٥-۱ غلظت‌های سرمی تئوفیلین در ساعات مختلف پس از تزریق ۷۳
جدول ٥-۲ مقادیر پارامترهای محاسبه شده برای سه فرمولاسیون ۷٥
جدول ٥-۳ آزمون آنالیز واریانس ۷٦
جدول ٥-٤ آزمون آنالیز واریانس ۷۷
جدول ٥-٥ آزمون آنالیز واریانس ۷۸
تصویر ٥-٦ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) یک ساعت پس از تزریق وریدی ۷۹
تصویر ٥-۷ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) سه ساعت پس از تزریق وریدی ۸۰
تصویر ٥-۸ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) پنج ساعت پس از تزریق وریدی ۸۱
تصویر ٥-۹ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) هفت ساعت پس از تزریق وریدی ۸۲
تصویر ٥-۱۰ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) ۲٤ ساعت پس از تزریق وریدی ۸۳

فهرست اشکال و جداول

عنوان | صفحه

تصویر ۵-۱۱ مقایسهٔ غلظتهای سرمی تئوفیلین (µg/ml) سی ساعت پس از تزریق وریدی ۸٤

تصویر ۵-۱۲ نمودار غلظت پلاسمایی تئوفیلین برای سه فرمولاسیون ۸۵

تصویر ۵-۱۳ مقایسه میانگین نیمه عمرها ۸۵

تصویر ۵-۱٤مقایسه میانگین AUC (0-∞) ۸٦

تصویر ۵-۱۵ مقایسه میانگین‌های AUC (0-last point) ۸٦

تصویر ۵-۱٦ مقایسه میانگین‌های AUC(0-7hr) ۸۷

تصویر ۵-۱۷ مقایسه میانگین‌های Ke ۸۷

Abbreviations

CH	Cholesterol
CL	Clearance
CLs	Conventional liposomes
DCP	Dicetyl phosphate
ddI	dideoxyinosine
DMPC	Dimyristoyl phosphatidyl choline
DPPA	Dipalmitoyl phosphatidic acid
DPPC	Dipalmitoyl phosphatidyl choline
DPPG	Dipalmitoyl phosphatidyglycerol
DSPC	Distearyl phosphatidyl choline
IL2	Interlukin-2
LUVs	Large unilamellar vesicles
LCLs	Long circulating liposomes
MLVs	Multilamellar vesicles
MPS	Mononuclear phagositic system
PA	Phosphatidic Acid
PC	Phosphatidyl choline
PE	Phosphatidyl ethanolamine
PG	Phosphatidyl Glycerol
PI	Phosphatidyl inositol
PEG	Polyethylene glycol
PVA	Polyvinylalcohol
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RES	Reticuloendothelial System
REV	Reverse phase Evaporation vesicles
SLs	Stealth liposomes
SSL	Sterically stabilized liposomes
SM	Sphingomyelin
Tc	Transition temprature

دیباچه:

- چکیده
- طرح مسأله و هدف

چکیده

هدف اصلی این پایان نامه ارزیابی میزان پایداری لیپوزوم‌های با پوشش pvp در مقایسه با لیپوزوم‌های بدون پوشش (معمولی) درحیوان آزمایشگاهی (Rat) بوده است.

ابتدا لسیتین، فسفولیپید اصلی سازندهٔ غشای لیپوزوم از زردهٔ تخم‌مرغ استخراج گردید. لیپوزوم‌های معمولی MLV (با سایز 25 nm تا 4 μm) و غشای دولایه متشکل از لسیتین و کلسترول به نسبت مولی ۲ به ۱ به روش آب پوشانی لایه نازک تهیه شدند. لیپوزوم‌های pvp دار از طریق افزودن pvp (با نسبت وزنی مساوی با فسفولیپید) به مواد فوق‌الذکر به همان روش بدست آمدند. تئوفیلین به عنوان داروی مدل در روند ساخت در لیپوزوم‌ها گنجانده شد.

سپس ۳ گروه Rat (n=6) بطور تصادفی انتخاب شدند و هر گروه بطور مستقل یکی از فرمولاسیون‌های محلول تزریقی، لیپوزوم معمولی و لیپوزوم pvp دار را از راه تزریق وریدی دریافت کردند. دوز تئوفیلین برای هر ۳ گروه یکسان و برابر 8 mg/kg بود. سطح سرمی دارو در زمان‌های مختلف بوسیله HPLC تعیین و نمودار غلظت – زمان، نیمه عمر، AUC,Ke برای هر حیوان محاسبه گردید.

نتایج حاصله نشان دادند که نیمه عمر سرمی و سطح زیر منحنی غلظت– زمان داروی مدل در لیپوزوم‌های pvp دار به طور معنی‌داری نسبت به لیپوزوم معمولی افزایش پیدا کرده‌اند. در حالی که داروی گنجانده شده در لیپوزوم معمولی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با شکل آزاد دارو در پارامترهای فوق از خود نشان نمی‌دهد. با توجه به اینکه پلیمرهای آبدوست با ایجاد یک ابر هیدروفیل بر روی غشای دولایه لیپوزوم‌ها، آنها را ازدسترس سلول‌های فاگوسیتیک پنهان می‌کنند و همچنین مانع از بهم چسبیدن لیپوزوم‌ها می‌گردند، این نتایج به خوبی تاثیر پوشش PVP در طولانی

کردن نیمه عمر که در مطالعات برون‌تن اثبات شده است را مورد تأئید قرار می‌دهد. بنابراین امکان استفاده از PVP (مانند سایر پلیمرهای رایج از قبیلPVA و PEG) را در ساخت لیپوزوم‌های SSL می‌توان مدنظر قرار داد. اگرچه در این مورد به تحقیقات مفصل‌تر و دقیق‌تری نیاز است.

طرح مسأله و هدف

یکی از معیارهای عمده در طراحی سیستم‌های داروسازی وریدی که از لیپوزوم‌ها (یا سایر میکروپارتیکل‌ها و نانوپارتیکل‌ها) بهره می‌گیرند طولانی بودن نیمه عمر در گردش آنها و ممانعت از شناسایی و جمع‌آوری آنها بوسیله سیستم ایمنی بدن است.

امروزه فرآورده‌های لیپوزومی در طب بالینی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند و کاربردهای درمانی آنها با توجه به مزیت‌ها و خصوصیاتی که دارند رو به گسترش است.

فرمولاسیون‌های اولیه لیپوزومی به سرعت بوسیلهٔ ماکروفاژها شناسایی و از گردش خون حذف می شدند و نیمه عمر کوتاه آنها مانع کاربرد بالینی آنها می شد. تلاش‌های محققین در جهت رفع این نقیصه در اواخر دههٔ ۸۰ میلادی به بار نشست. در خلال این بررسی‌ها آشکار شد که گنجاندن درصد کوچکی از گلیکولیپیدهای خاص و یا پلیمرهای آبدوست در ساختمان لیپوزوم، اثر چشمگیری بر افزایش زمان حضور آن در گردش خون دارد. این نسل جدید از لیپوزوم‌ها به علت پنهان ماندن از سیستم شناسایی و فاگوسیتوز بوسیله RES (که ناشی از ایجاد ممانعت فضایی به هنگام واکنش با پروتئین‌های پلاسما و رسپتورهای سطحی سلول‌ها می‌باشد) قادرند مدت بسیار طولانی را نسبت به لیپوزوم‌های معمولی[1] درگردش خون باقی بمانند و همچنین اثر تجمعی در بافت‌های دچار عفونت یا هایپرپلازی از خود نشان دهند.

این ویژگی‌ها نخست باعث تهیه فرآورده‌های تزریقی آهسته رهش گردید و بتدریج در میان سایر اشکال دارویی مانند فرآورده‌های موضعی یا استنشاقی راه خود را باز کرد.

1- Conventional Liposomes

در حال حاضر پژوهش برای آشکار شدن سازوکارهایی که منجر به افزایش نیمه عمر لیپوزوم‌ها می‌شوند و یافتن راه‌های جدید و پلیمرهای مختلف به این منظور ادامه دارد. موادی که به منظور طولانی اثرکردن لیپوزومها مورد استفاده واقع شده اند عمدتاً عبارتند از مونوگانلگلیوزید GM_1، فسفاتیدیل اینوزیتول (PI)، پلی اتیلن گلیکول، پلی‌وینیل پیرولیدن و مشتقات آن، پلی وینیل الکل، پلی لاکتیک اسید و....

بیشترین مطالعات بر روی استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول در ساختار لیپوزوم‌های طولانی اثر انجام شده که تاکنون موثرترین ماده بوده است، اما تحقیق در جهت آزمودن پلیمرهای دیگر در جهت افزایش کارآیی و سازگاری زیستی یا سهولت دسترسی و مقرون به صرفه بودن در جریان می باشد چنانکه ساخت فرآوردهٔ تئوفیلین لیپوزومی که بوسیله پلی‌وینیل‌پیرولیدون بصورت *«فضا پایدار»*[1] درآمده در آزمایشگاه صنعتی این دانشکده قبلاً انجام شده و کارآیی آن بصورت *برون تن*[2] مورد ارزیابی قرار گرفته است [۱]. در پایان نامه حاضر در جهت تکمیل مطالعات فوق الذکر، کارآیی *درون تن*[3] لیپوزومهای حاوی تئوفیلین که بوسیله PVP پایدار شده اند مورد ارزیابی قرار گرفته و بدین منظور، تزریق وریدی فراوردهٔ لیپوزومی *فضا پایدار* (با پوشش PVP) حاوی تئوفیلین به موش صحرایی (Rat) و سنجش غلظت‌های سرمی دارو و مقایسه آن با غلظت های همزمان حاصله از محلول تزریقی تئوفیلین و لیپوزومهای معمولی حاوی تئوفیلین، انجام شده است.

1. Sterically Stabilized
2. invitro
3. invivo

بخش اول:

کلیات

- آشنایی با انواع لیپوزوم‌ها
- لیپوزوم‌های معمولی (CL)
- لیپوزوم‌های (SSL) یا (LCL)