

سنتز نانوکیتوسان تیولدار به عنوان حامل داروی بی‌پریدین با استفاده از دو کراس لینکر تری پلی فسفات (TPP) و جنیپین و بررسی رهایش و سمیت آنها

فخیمه امینی طولارود پایین^۱، رضا سالاریان^۲، سید مهدی حسینی^{۳*} محمد حسن شاهوی^۴، تمیمه عبادی^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه مازیار، رویان، ایران

۲- استادیار، دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه مازیار، رویان، ایران

۳- استادیار، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری نوین آمل، آمل، ایران

۴- استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی و زیست فناوری، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۵- استادیار، دانشکده مهندسی فناوری های نوین، دانشگاه تخصصی فناوری نوین آمل، آمل، ایران

صندوق پستی ۴۶۱۵۶۶۶۱۶، آمل، ایران

sm.hosseini@ausmt.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

چکیده

دارورسانی نوین از دیرباز با اهدافی مانند کاهش عوارض جانبی، افزایش دسترسی زیستی، انتقال هدفمند داروها و همچنین گذر از سد برخی موانع مانند موانع خونی- مغزی، بدنبال طراحی سامانه های دارورسانی کارآمد است. نانوذرات در زمینه حامل های دارویی بسیار با اهمیت هستند، زیرا توانایی حمل انواع داروها به قسمت های مختلف بدن در زمان مناسب را دارند. در مطالعه حاضر ترکیب نانوذرات کیتوسان تیولدار بارگذاری شده با بی‌پریدین توسط روش ژل یونی با استفاده از دو نوع اتصال دهنده عرضی (TPP و جنیپین) سنتز شده و کارایی آنها بررسی شد. نتایج آنالیز FTIR سنتز موفقیت آمیز مراحل مختلف نانوذرات کیتوسان تیولدار بارگذاری شده با بی‌پریدین را از طریق هر دو کراسلینکر تایید کرد. نتایج تصاویر SEM نشان داد نانوحامل های سنتز شده دارای ساختار نانورد می باشند و نانوحامل دارو سنتز شده با کراسلینکر جنیپین دارای ساختار منظم تر با اندازه ی حدود ۱۵۰ نانومتر و نانوحامل دارو سنتز شده با TPP دارای اندازه ی حدود ۲۰۰ نانومتر است. بررسی نتایج آزمون رهایش دارو نشان داد نانو حامل دارو سنتز شده با کراسلینکر جنیپین رهایش آهسته تری دارد و همچنین تست سمیت سلولی نیز نشان داد نانو حامل دارو سنتز شده با جنیپین سمیت کمتری نسبت به نانو حامل سنتز شده با TPP دارد. با در نظر گرفتن سمیت کمتر و رهایش طولانی مدت تر نانوحامل دارویی سنتز شده با جنیپین نسبت به نانو حامل سنتز شده با TPP، با استفاده از این نانوحامل، زیست دسترسی دارو افزایش می یابد و می تواند به عنوان سیستم دارو رسان مناسب برای انتقال دارو باشد.

کلید واژگان: نانوذرات کیتوسان، ژل یونی، بی‌پریدین، تری پلی فسفات، جنیپین

۱- مقدمه

روش انتقال دارو اثر قابل توجهی بر بازده اثر بخشی دارو و عوارض جانبی آن دارد. علم دارورسانی نوین از دیرباز با اهدافی مانند کاهش عوارض جانبی مصرف، افزایش دسترسی زیستی، انتقال هدفمند داروها و همچنین گذر از سد برخی موانع مانند موانع خونی- مغزی، به دنبال طراحی سامانه های دارورسانی کارآمد است. با وجود پیشرفت های شگرف در این زمینه در دهه های اخیر، سامانه دارورسانی (DDS)^۱ نیازمند بهینه سازی در زمینه کنترل هدفمند دارورسانی می باشد [۱-۳]. از زمان انقلاب صنعتی در سال ۱۹۷۰، فناوری های متفاوتی در زمینه دارورسانی توسعه یافت. پس از آن با پیشرفت سریع سامانه های نوین دارورسانی (NDDS)^۲، راه کارهایی مانند استفاده از میکروذرات، نانوذرات، سامانه های تراپوستی، لیپوزوم ها و روش های متفاوت انتقال دارو به بیمار معرفی شد [۴-۶]. در این میان، استفاده از نانوذرات به عنوان حامل های دارویی در سامانه های مختلف، به دلیل داشتن رهایش کنترل شده دارو، سرعت رهایش سریع تر و اثرگذاری هدفمندتر، عملکرد درمانی داروها را بهبود بخشیده است. نانوذرات در زمینه حامل های دارویی بسیار با اهمیت هستند، زیرا توانایی حمل انواع داروها را به قسمت های مختلف بدن در زمان مناسب را دارند [۷]. پلیمرهای مورد استفاده در نانوذرات به دو صورت آبدوست و آبگریز هستند. نانوذرات بر پایه پلیمرهای آبدوست مانند کیتوسان، گزینه مناسبی برای سامانه های حامل دارو هستند، زیرا علاوه بر توانایی افزایش نفوذپذیری ترکیبات هیدروفیل، ویژگی خون سازگاری دارند. در واقع کیتوسان به عنوان شاخص ترین پلیمر طبیعی می تواند برای آماده سازی نانوذرات زیست تخریب پذیر مورد استفاده

قرار گیرد. این پلیمر از طریق گروه های آمین خود در واکنش های شیمیایی مختلف شرکت می کند [۸-۱۱]. یکی از روش های تهیه نانوذرات کیتوسان، ژل یونی^۳ است؛ در میان روش های مختلف موجود برای تهیه نانوذرات کیتوسان، روش ژل شدن یونی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. ژل شدن یونی روشی غیر سمی است و در آن از حلال آلی استفاده نمی شود و همچنین روشی راحت و قابل کنترل است [۱۲]. اولین بار، کالو^۴ و همکاران، از روش ژل یونی از طریق تعامل با بار مثبت کیتوسان و بار منفی تری پلی فسفات (TPP) برای تهیه نانوذرات کیتوسان استفاده کردند. این روش به علت ساده بودن فرایند و عدم استفاده از حلال آلی، بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. در واقع این روش بر پایه ی میان کنش الکترواستاتیک توسط اتصال دهنده ی عرضی (کراسلینکر)^۵ بین گروه های آمین آزاد کیتوسان و گروه های پلی آنیون مثل TPP^۶ است و باعث تشکیل هیدروژلی از نانوذرات کیتوسان می شود که می توانند برای انکپسوله شدن^۷ و یا رهایش کنترل شده ی دارو و ترکیبات مختلف استفاده می شوند [۱۳]. همچنین استفاده از جنیپین^۸ به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی نیز از دیگر روش های سنتز نانوذرات کیتوسان بوده که برای انکپسوله شدن داروی مورد نظر در سامانه های دارورسانی استفاده می شود [۱۴-۱۸]. یکی از موارد استفاده از نانوذرات پلیمری در پزشکی، اختلالات نوروزنیک مانند بیماری پارکینسون^۹ است. درمان اختلالات نوروزنیک با توجه به محدودیت های سد خونی مغزی که سیستم عصبی مرکزی را احاطه کرده است، بسیار چالش برانگیز است. برای غلبه بر این چالش نانوذرات حاوی دارو باید توانایی عبور از سد خونی مغزی را داشته باشند که نانوذرات کیتوسان

^۵Sodium Tripolyphosphate^۶Encapsulation^۷Genipin^۹ parkinson^۱Drug delivery system^۲New drug delivery system^۳ Ionic gelation^۴Calvo^۴Cross linker

گزینه مناسبی برای این مهم می‌باشند. به‌ویژه زمانی که با تیول اصلاح شوند (کیتوسان تیول‌دار). بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر تغییر در اندازه‌ی کیتوسان، اصلاح سطح کیتوسان با گروه‌های عاملی مثل تیول، بهره‌برداری مناسب‌تری از آن در سامانه‌های دارورسانی ایجاد کرده است. در مطالعه Goyal و همکاران (۲۰۱۵) کیتوزان تیول دار که در آن گروه آمین کیتوزان با اسید تیوگلیکولیک اصلاح شده است، نفوذپذیری دارو را از طریق سد خونی مغزی بهبود بخشیده است [۱۹]. مطالعات متعددی برای سنتر نانوحامل‌های دارو بر پایه کیتوسان انجام شده است که نشان می‌دهد این نانوذرات دارای ظرفیت بارگذاری بالای دارو هستند که می‌توانند برای کپسوله کردن یا وارد کردن دارو در داخل ماتریس ذرات برای جلوگیری از هدررفت و محافظت از دارو در بدن در برابر تخریب^{۱۰} توسط عوامل مختلف مانند آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گیرند و از اثرات جانبی دارو بر بدن پیشگیری می‌کنند. همچنین اجازه می‌دهند تا آزادسازی دارو به‌طور هدفمند و کامل انجام شده و دسترسی زیستی دارو بالاتر رود [۲۰].

[۲۱]. Goyal و همکاران (۲۰۱۵) برای افزایش بهره‌وری داروی لوودوپا در درمان پارکینسون، موفق به سنتر نانوحامل لوودوپا با استفاده از کیتوزان تیول‌دار به روش ژل یونی و از طریق کراسلینکر TPP پرداختند، اندازه نانوذرات سنتر شده حدود ۲۲۲ نانومتر بوده است که در نهایت با استفاده از پلورونیک PF127، ژل داخل بینی حساس به دما^{۱۱} تشکیل دادند. نتایج آنالیز برون‌تنی (بافر فسفات و pH ۶/۸) برای نانوحامل سنتر شده در این پژوهش، رهایش مناسب و افزایش فراهمی زیستی لوودوپا را نشان داد [۱۹]. در این راستا، Sharma و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه مشابه دیگری به سنتر نانوحامل لوودوپا با استفاده از کیتوزان به روش ژل یونی و از طریق

کراسلینکر TPP پرداختند. اندازه نانوذرات سنتر شده در این مطالعه حدود ۱۰۰ نانومتر بود. بررسی رهایش داروی لوودوپا از ژل حاوی نانوداروی سنتر شده، در شرایط آزمایشگاهی (بافر فسفات و pH ۶/۴) با استفاده از کیسه دیالیز انجام شد و نتایج بیانگر سنتر موفق آمیز نانوحامل و افزایش کیفیت رهایش نانوحامل بود [۲۲]. از سوی دیگر، Domaratzki و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای به کپسوله سازی و آزادسازی کلادربین^{۱۲} از نانوذرات کیتوزان با استفاده از کراسلینکرهای TPP، جنیپین و گلیوکسال^{۱۳} پرداختند و نتایج آنها نشان داد که سایز نانوذرات حاصل شده با توجه به نوع کراسلینکر و میزان داروی لود شده متفاوت است و انتشار دارو در نانوحامل سنتر شده با کراسلینکر جنیپین طولانی‌تر است. در مطالعه مذکور، اثر سمیت نانوحامل‌های سنتر شده با سه کراسلینکر، بررسی نشده است [۲۳]. Omer و همکاران (۲۰۲۱) برای تهیه نانودارویی از کورکومین با مصرف خوراکی و رهایش آهسته^{۱۴}، از نانوذرات کیتوزان و کراسلینکر TPP استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد نانوداروی سنتر شده به علت بارگذاری مقادیر بالای کورکومین و آهسته رهش بودن آن، می‌تواند گزینه مناسبی برای دارورسانی در شرایط درون‌تنی باشد [۲۴]. Long me و همکاران (۲۰۰۱) به سنتر نانوکیتوسان با دو کراسلینکر جنیپین و گلو تارا لددئید و ارزیابی آنها جهت بررسی قابلیت دارورسانی آن به‌عنوان نانوحامل پرداختند و نتایج آنها بیان داشت که نانوکیتوسان سنتر شده با کراسلینکر جنیپین، سمیت و نرخ تخریب آنزیمی کمتری داشته است و جهت به‌کارگیری به‌عنوان نانوحامل گزینه مناسبی می‌باشد [۲۵]. همچنین از مطالعات دیگری که به بررسی اهمیت جنیپین در سنتر نانوکیتوسان به‌عنوان حامل‌های دارویی پرداختند، می‌توان به Nasrabadi و همکاران (۲۰۲۰) [۲۶]، Ubaid

گزینه مناسبی برای این مهم می‌باشند. به‌ویژه زمانی که با تیول اصلاح شوند (کیتوسان تیول‌دار). بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر تغییر در اندازه‌ی کیتوسان، اصلاح سطح کیتوسان با گروه‌های عاملی مثل تیول، بهره‌برداری مناسب‌تری از آن در سامانه‌های دارورسانی ایجاد کرده است. در مطالعه Goyal و همکاران (۲۰۱۵) کیتوزان تیول دار که در آن گروه آمین کیتوزان با اسید تیوگلیکولیک اصلاح شده است، نفوذپذیری دارو را از طریق سد خونی مغزی بهبود بخشیده است [۱۹]. مطالعات متعددی برای سنتر نانوحامل‌های دارو بر پایه کیتوسان انجام شده است که نشان می‌دهد این نانوذرات دارای ظرفیت بارگذاری بالای دارو هستند که می‌توانند برای کپسوله کردن یا وارد کردن دارو در داخل ماتریس ذرات برای جلوگیری از هدررفت و محافظت از دارو در بدن در برابر تخریب^{۱۰} توسط عوامل مختلف مانند آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گیرند و از اثرات جانبی دارو بر بدن پیشگیری می‌کنند. همچنین اجازه می‌دهند تا آزادسازی دارو به‌طور هدفمند و کامل انجام شده و دسترسی زیستی دارو بالاتر رود [۲۰].

[۲۱]. Goyal و همکاران (۲۰۱۵) برای افزایش بهره‌وری داروی لوودوپا در درمان پارکینسون، موفق به سنتر نانوحامل لوودوپا با استفاده از کیتوزان تیول‌دار به روش ژل یونی و از طریق کراسلینکر TPP پرداختند، اندازه نانوذرات سنتر شده حدود ۲۲۲ نانومتر بوده است که در نهایت با استفاده از پلورونیک PF127، ژل داخل بینی حساس به دما^{۱۱} تشکیل دادند. نتایج آنالیز برون‌تنی (بافر فسفات و pH ۶/۸) برای نانوحامل سنتر شده در این پژوهش، رهایش مناسب و افزایش فراهمی زیستی لوودوپا را نشان داد [۱۹]. در این راستا، Sharma و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه مشابه دیگری به سنتر نانوحامل لوودوپا با استفاده از کیتوزان به روش ژل یونی و از طریق

¹³ Glyoxal

¹⁴ oral delivery and slow release of Curcumin

¹⁰ degradation

¹¹ thermo-reversible gel

¹² cladribine

۲- مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر کیتوسان عامل دار شده با گروه تیوگلیکولیک اسید (TGA)^{۱۵} سنتز، سپس با استفاده از دو نوع از اتصال دهنده‌های عرضی با داروی بی‌پریدین بارگذاری شد و کاربرد آن در رهائش دارو بررسی شد. برای این کار مراحل مشخص در شکل ۱ طی شد.

۲-۱- سنتز کیتوسان عامل دار شده با TGA

برای آماده سازی کیتوسان تیول دار شده، ۲۵۰ میلی‌گرم کیتوسان در ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد به مدت ۳ ساعت بر روی همزن مغناطیسی حل شده و سپس ۵۰ میلی‌گرم کربو دی‌ایمید (EDC) که در ۵ میلی‌لیتر آب حل شده، به ترکیب فوق اضافه شد. به محلول نهایی ۹ میلی‌لیتر TGA افزوده شده و pH محلول با استفاده از NaOH ۳ نرمال به ۵-۴/۵ تنظیم شد تا از تشکیل پیوندهای دی سولفیدی بین زنجیره‌های پلیمری کیتوسان در طی واکنش جلوگیری شود. سپس، محلول به مدت ۳ ساعت تحت همزن مغناطیسی قرار گرفت. شکل ۲ واکنش بین کیتوسان و TGA توسط کربو دی‌ایمید را نشان می‌دهد که کربو دی‌ایمید با فعال کردن گروه کربوکسیل TGA، منجر به تشکیل پیوند کوالانسی با گروه آمین کیتوسان خواهد شد [۱۹، ۳۰].

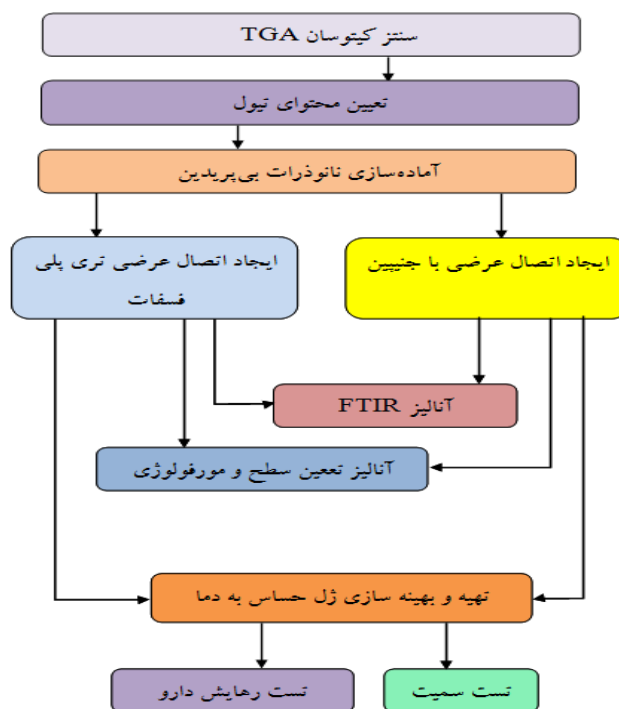
۲-۲- دیالیز نمونه برای آزادسازی گروه تیول پیوند

نشده با کیتوسان

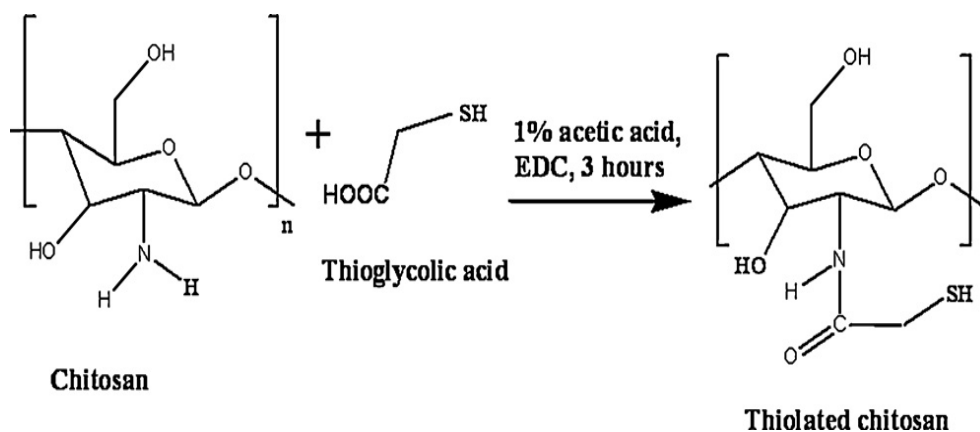
فرایند دیالیز، امکان جدا شدن مولکول‌های کوچک از مولکول‌های بزرگ یا تعویض محیط را فراهم می‌کند. مخلوط واکنش در تاریکی به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. دیالیز نمونه برای خارج شدن تیول‌های پیوند نشده بر روی کیتوسان و جداسازی TGA آزاد موجود در محلول انجام شد.

و همکاران (۲۰۱۸) [۲۷] و Khatun و همکاران (۲۰۱۸) [۲۸] اشاره کرد. همه مطالعات ذکر شده در بالا، مشخص کردند که سنتز نانوحامل دارو با استفاده از هر دو کراسلینکر موفقیت‌آمیز بوده است و بارگذاری دارو در نانوذرات کیتوسان موجب افزایش کیفیت دارورسانی شده است. از سویی دیگر بررسی منابع نشان داده است که ایجاد اتصالات عرضی در کیتوسان از طریق TPP، موجب ایجاد سمیت جزئی در سلول‌ها، دانسیته‌ی کراسلینک کردن نسبتاً پایین و همچنین کریستالی شدن اندک در پلیمر می‌شود. از طرفی دیگر، کراسلینک کیتوسان به وسیله‌ی جنپین به صورت خود به خودی و با نسبت مولی بسیار کمتر از TPP انجام می‌شود. همچنین، جنپین کاملاً گیاهی بوده (استخراج شده از عصاره گیاه دارویی گاردنیا (*Gardenia jasminoides*) و فرایند استخراج و خالص سازی دقیق‌تری نسبت به TPP دارد [۲۹]. ولی در مطالعات موجود، مقایسه‌ای بین نانوحامل سنتز شده با کراسلینکر TPP و جنپین انجام نشده است. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی سامانه دارورسانی بر پایه پلیمر کیتوسان حاوی داروی بی‌پریدین برای درمان بیماری پارکینسون است. لذا در مطالعه حاضر، ترکیب نانوذرات کیتوسان تیول‌دار بارگذاری شده با بی‌پریدین، توسط روش ژل یونی با استفاده از دو نوع اتصال دهنده‌ی عرضی TPP و جنپین سنتز شده و سپس با استفاده از پلورونیک PF127، ژل تو دماغی حساس به دما از هر دو نانوحامل تشکیل شد و کارایی آنها بررسی شد. در واقع هدف اصلی در این مطالعه این بوده که با ارزیابی همزمان دارورسانی نانوحامل سنتز شده با دو کراسلینکر TPP و جنپین، علاوه بر مقایسه صحیح آنها در کیفیت دارورسانی، اثر سمیت آنها نیز مقایسه شد.

¹⁵TGA: Thioglycolic acid



شکل ۱ مراحل طی شده در مطالعه حاضر



شکل ۲ کیتوسان و عامل دار شدن آن با TGA [۳۱]

نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند تا از اکسیداسیون گروه‌های دی‌سولفیدی جلوگیری شود [۳۰].

۲-۲-۱- اندازه‌گیری میزان تیول بر روی کیتوسان عامل دار شده با TGA

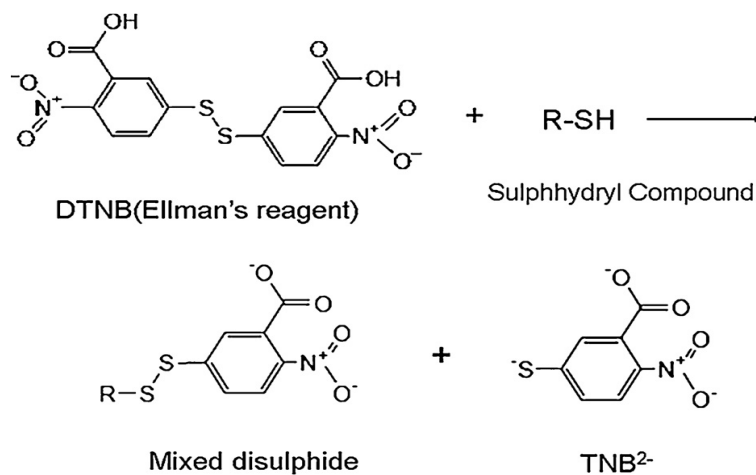
محلول‌های پلیمری در کیسه‌های دیالیز ۱۲ کیلو دالتون در برابر ۵ میلی‌مولار HCl در اتاق تاریک با دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز تحت هم‌زدن مداوم دیالیز شدند. همچنین، ۲ بار دیگر با NaCl ۱ درصد برای کاهش تعاملات یونی و مجدداً تکرار فرایند دیالیز با ۵ میلی‌مولار HCl به مدت ۲ روز انجام شد. در طی دیالیز

می‌باید که می‌توان از روی شدت رنگ ایجاد شده و با استفاده از منحنی کالیبراسیون پی به میزان تیول موجود در کیتوسان برد. لذا نمودار منحنی کالیبراسیون با استفاده از غلظت‌های مشخصی از TGA تشکیل شده است (شکل ۳).

۲-۳- ایجاد اتصالات عرضی برای بارگذاری داروی بی‌پریدین

در این مطالعه برای سنتز نانوحامل دارو، از دو کراسلینکر جنیپین و TPP میزان ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان تیول‌دار در دو بشر مجزا با حجم ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد و تحت هم‌زدن مغناطیسی قرار گرفتند. سپس، ۶۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌پریدین به محلول‌های پلیمری فوق اضافه شد.

برای اندازه‌گیری مقدار تیول موجود در کیتوسان تیول‌دار شده، از روش واکنشگر المان^۱ استفاده شد. برای این کار ۲۰ میلی‌گرم از پودر ۵،۵-دیتیوبیس (۲-نیتروبنزوئیک اسید)^۲ به اختصار DTNB. DTNB در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ترکیب شده، ۲۵۰ میکرولیتر از کیتوسان عامل‌دار شده با TGA با ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DTNB در ۲۲۵۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات حل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر میزان جذب نمونه خوانش شد [۱۹]. در این روش، DTNB با سولفورهای آزاد موجود در سطح کیتوسان واکنش داده و ترکیبی از دی‌سولفیدها و 2-nitrobenzoic acid (TNB) حاصل می‌شود. با تولید TNB، رنگ محلول از شفاف به سمت زردی تغییر



شکل ۳ نشان دادن واکنش با روش المان [۳۱]

کراسلینکر) حل شده در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه به صورت قطره قطره به بشر دیگر اضافه شد [۳۲، ۳۳]. هر دو بشر درون ظرف یخ قرار گرفته و به مدت ۳ دقیقه با دامنه ۶۰ وات تحت التراسونیک پروب قرار گرفتند [۱۹].

۲-۳-۱- بررسی بارگذاری داروی بی‌پریدین در درون نانو حامل کیتوسان TGA

برای ایجاد اتصالات عرضی و به دام انداختن دارو در نانوذرات کیتوسان با TPP، ۲۰ میلی‌گرم TPP (نسبت ۳ به ۱ کیتوسان به کراسلینکر) حل شده در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه به یکی از بشرها به صورت قطره قطره اضافه شد [۳۱]. همچنین، برای ایجاد فرایند مذکور با کراسلینکر جنیپین، ۱۰ میلی‌گرم جنیپین (نسبت ۶ به ۱ کیتوسان به

^۲ ۵،۵'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

^۱ Ellman's reagent

سنتر نانوکیتوسان تیول دار ... امینی طولارود پایین و همکاران

داروی مصرف شده با دستگاه طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت با استفاده از رسم منحنی کالیبراسیون و با توجه به معادله‌ی زیر، میزان داروی بارگذاری شده به دست آمد [۲۲].

$$\text{میزان داروی بارگذاری شده} = \frac{\text{مقدار دارو در محلول فوقانی سانتریفیوژ} - \text{مقدار کل داروی اضافه شده}}{\text{مقدار کل داروی اضافه شده}} \times 100$$

میزان و نحوه‌ی رهایش دارو از نانو حامل کیتوسان TGA در شرایط آزمایشگاهی و به صورت برون‌تنی (In vitro drug release studies) و با روش کیسه دیالیز (dialysis bag method) بررسی شد. برای این کار ۷ میلی‌لیتر از ژل حساس به دما از هر دو نمونه (کراسلینک شده با TPP و جنپین) درون دو کیسه دیالیز به شکل مجزا ریخته شد. کیسه دیالیز درون بشر در ۱۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با PHهای ۶/۸ و ۸/۳ غوطه ور شد. از محلول داخل هر بشر ۳ میلی‌لیتر در زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴، ۱۶۸ و ۱۹۰ ساعت، نمونه‌برداری شد و برای ثابت نگه داشتن غلظت کل به همان مقدار محلول بافر فسفات به سامانه اضافه شد. سرانجام، غلظت داروی آزاد شده با استفاده از نمونه‌های جمع‌آوری شده، توسط دستگاه طیف‌سنجی ماوراء بنفش- مرئی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد [۱۹، ۲۲].

۲-۶-۱- محاسبه درصد رهایش دارو

بر اساس قانون بیر لامبرت، با رقیق کردن دارو و تهیه محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف آن، می‌توان جذب محلول‌های دارو را در طول موج مورد نظر به دست آورده و منحنی کالیبراسیون را رسم کرد. برای این کار، ابتدا میزان جذب داروی بی‌پریدین با غلظت‌های مختلف (غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۷۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و با رسم منحنی "غلظت دارو- جذب"، معادله‌ی کالیبراسیون به دست آمد. سپس با جای گذاری اعداد جذب به دست آمده

جهت اندازه‌گیری میزان بارگذاری داروی بی‌پریدین در درون نانو حامل کیتوسان TGA، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی و همچنین مقدار کل

۲-۴- تهیه و بهینه‌سازی ژل حساس به دما^۱

آماده‌سازی ژل پلورونیک به‌عنوان ژل حساس به دما به خوبی شناخته شده است. برای آماده‌سازی ژل پلورونیک از روش آب سرد^۲ و مقادیر بهینه مطالعه‌ی Goyal و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. برای این کار F-127 (۲۰ درصد) در ۵ میلی‌لیتر فسفات بافر با pH = ۵ مخلوط شد. محلول پلورونیک به‌طور جزئی حل شده که در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری شد تا محلول همگن شفاف تولید شود. سپس، مقدار ۲۵ میلی‌گرم از نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با بی‌پریدین به محلول پلورونیک اضافه شده و به مدت ۲۰ ثانیه تحت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و ژل پلورونیک تشکیل شده است [۱۹، ۲۲].

۲-۵- شناسایی ویژگی‌های نانوحامل داروی سنتر شده

برای بررسی مراحل مختلف سنتر نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با بی‌پریدین، از آنالیز طیف سنجی عبوری مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده طول موج 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1} با تهیه قرص KBr با نسبت ۱ به ۱۰۰ نمونه به KBr استفاده شد. همچنین مورفولوژی ایجاد شده و اندازه‌ی نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با بی‌پریدین، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۴، بررسی شد.

۲-۶- بررسی رهایش داروی بی‌پریدین از نانو حامل کیتوسان TGA

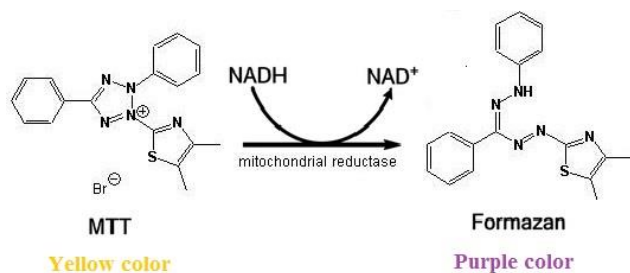
³Fourier transform infrared spectroscopy

⁴Scanning electron microscope (SEM)

¹Thermo-reversible gel

²Cold water

درون سلولی می‌تواند بین سلول زنده و مرده تمایز قائل شود [۳۴]. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب و زرد رنگ است که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز (سوکسینات) موجود در میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیر محلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود (شکل ۴). هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. پس از انحلال این رسوب در حلال مناسب، میزان دانسیته‌ی نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری می‌شود. تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلول تا خواندن نتایج با اسپکتروفتومتر و همچنین تفسیر این تست در یک میکرو پلیت انجام شده است.



شکل ۴ احیا رنگ تترازولیوم (MTT) توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای بنفش رنگ فورمازان در سلول‌های زنده [۳۵]

محیط حاوی MTT را حذف و برای حل شدن کریستال‌های فورمازان، ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه کرده و پلیت‌ها تکان داده شدند و نهایتاً جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر (Eliza Reader) در ۵۷۰ نانومتر خوانش شد و به کمک منحنی استاندارد، داده‌ها تفسیر و براساس منحنی غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر) گزارش شدند. درصد سلول‌های زنده یا میزان بقای سلولی در بررسی سمیت سلولی، بر اساس رابطه زیر محاسبه شد [۳۵]:

$$100 * \frac{\text{جذب متوسط نمونه های تیمار شده}}{\text{جذب متوسط نمونه های کنترل}} = \text{درصد سلول های زنده}$$

از نمونه‌های جمع‌آوری شده در فواصل زمانی مختلف (بر حسب ساعت) در معادله‌ی خط کالیبراسیون، غلظت داروی آزاد شده از نانوحامل‌های سنتز شده به دست آمد. با استفاده از میزان غلظت داروی آزاد شده درصد رهایش داروی بی‌پریدین بر حسب زمان محاسبه شد [۲۲].

۲-۷- تست سمیت سلولی (MTT)

برای بررسی اثر سمیت سلولی نانوداروی سنتز شده به طریق برون‌تنی (in vitro cytotoxicity)، بر روی رشد، تکثیر و زنده‌مانی سلول‌ها (Viability)، از روش رنگ سنجی^۱ MTT استفاده شد که با تاثیر بر روی اندامک‌های

در مطالعه حاضر سلول‌های عصبی رده‌ی PC12 که از موسسه انستیتو پاستور تهیه شدند، برای اندازه‌گیری زیست‌سازگاری و سمیت نمونه‌ها استفاده شد. در هر چاهک ظرف‌های ۹۶ خانه، حدود ۵۰۰۰ سلول از رده سلولی مورد نظر را کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس، سلول‌های هر خانه، با نانوداروهای کراسلینک شده با TPP و جنیپین (غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در چهار بازه‌ی زمانی ۱، ۳، ۵ و ۷ روز انکوبه شدند. پس از تیمار در مدت زمان‌های مشخص شده، محیط سلول‌ها را تعویض کرده و ترکیب MTT را به سلول‌ها اضافه کرده و برای ۳ ساعت و در تاریکی در انکوباتور قرار گرفتند. سپس،

^۱ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

۳-۱ بررسی میزان تیول در کیتوسان عامل دار شده با

TGA

همانطور که در بالا ذکر شد، به کارگیری معرف Elmans و واکنش آن با تیول موجود در کیتوسان عامل دار شده، منجر به تولید محصول رنگی قابل اندازه گیری با اسپکتروفتومتر شد که مقدار تیول موجود در کیتوسان با استفاده از منحنی کالیبراسیون تهیه شده از غلظت های ۰/۰۵ تا ۰/۲۵ میلی مولار TGA بررسی شد (شکل ۵). نتایج آنالیز فوق بیانگر میزان ۰/۱۱۸ میلی مول تیول در هر میلی گرم از پلیمر کیتوسان عامل دار شده می باشد.

۳-۲ بررسی آنالیز طیف مادون قرمز (FTIR)

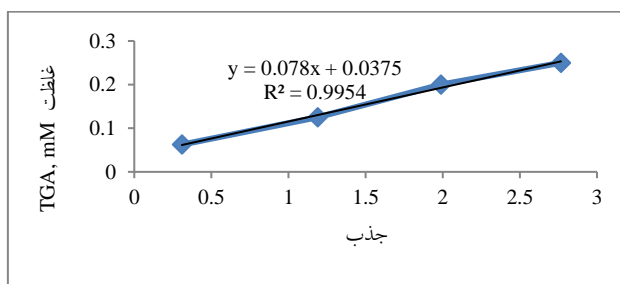
از آنجا که هر پیوند طول موج معینی از طیف مادون قرمز را جذب می کند، طول موجی که در آن پیک، نمایان شده است، بیانگر جذب آن طول موج با گروه های عاملی معدنی یا آلی مشخص روی سطح ماده ی مورد نظر است. در شکل ۶ طیف a و b به ترتیب مربوط به کیتوسان و کیتوسان سولفوردار (تیول) شده^۲ می باشد که طیف های^۱ ۶۰۰ cm⁻¹ و ۶۱۷ مربوط به ارتعاشات خمشی OH- در کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده می باشد. پیک جذبی پهن در محدوده ۳۰۰۰-۳۵۰۰ cm⁻¹ مربوط به کشش OH- و NH₂- است که با همپوشانی کردند [۳۷، ۳۸].

۲-۸- بررسی زنده مانی سلول با رنگ آمیزی

دابی (DAPI)

محلول دابی^۱ (DAPI) یک محلول آماده مصرف حاوی رنگ فلور سنت برای رنگ آمیزی DNA سلول است. این ترکیب شیمیایی به نقاط غنی آدنین و تیمین در ساختار DNA دورشته ای و سالم متصل می شود و در محدوده ی UV، رنگ فلوئوروسنت از خود ساطع می کند و به رنگ آبی قابل مشاهده است. در واقع سلولی که دارای DNA دورشته ای است، سلول سالم بوده و در نتیجه می توان گفت که این رنگ سلول های زنده را رنگ آمیزی می کند. از این رنگ معمولاً به عنوان رنگ آمیزی بستر یا زمینه استفاده می شود. برای مطالعات و تحلیل چرخه سلولی (Cell Cycle analysis) و مشاهده هسته سلول ها کاربرد دارد. برای بررسی تاثیرات غلظت های استفاده شده از تیمار TPP و جنیپین بر روی سلول های عصبی رده ی PC12، سلول ها، پس از کشت با غلظت های مختلف از تیمار TPP و جنیپین، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از طی این زمان سلول ها در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI قرار گرفتند و سپس تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول ها با میکروسکوپ فلوروسنت بررسی شد [۳۶].

۳- نتایج و بحث



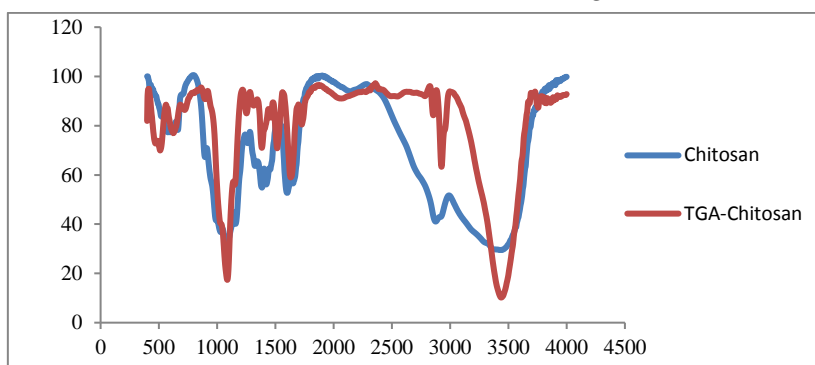
شکل ۵ منحنی کالیبراسیون TGA

^۲CS-TGA

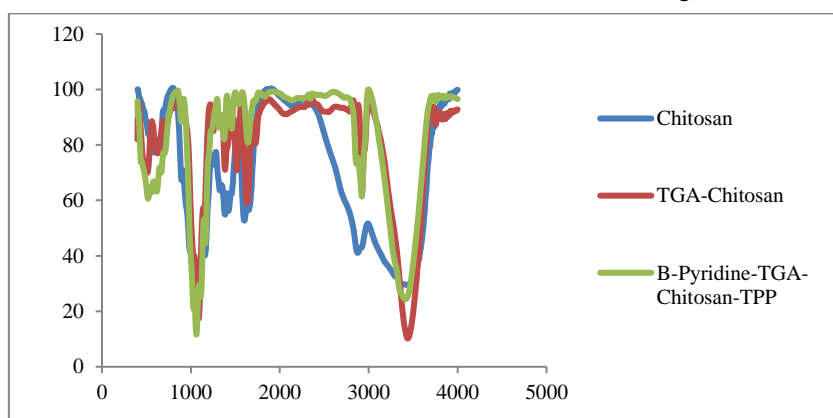
^۱ 4',6-diamidino-2-phenylindole

و ۱۶۳۱^{-۱} مربوط به ارتعاش خمشی NH₂ (آمید II) در حلقه کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده است [۴۱]؛ که پس از عامل دار شدن با TGA از شدت آن کاسته شده است. با این حال، طیف اصلی که در محدوده ۱۶۶۵^{-۱} در کیتوسان سولفور دار شده مشاهده می شود، مربوط به تشکیل پیوند کوالانسی بین آمین کیتوسان و کربوکسیل TGA بوده و منجر به ایجاد گروه آمیدی نوع اول (amide I) می باشد. از سوی دیگر طیف محدوده ۵۰۰-۴۵۰^{-۱} cm مربوط به ارتعاش کششی گروه سولفوری S-H و طیف محدوده ۱۲۴۵^{-۱} cm مربوط به ارتعاش کششی گروه سولفوری S-C در کیتوسان سولفور دار شده می باشد [۱۹]. مجموعه تغییرات فوق دال بر سنتز موفقیت آمیز کیتوسان سولفور دار شده می باشد.

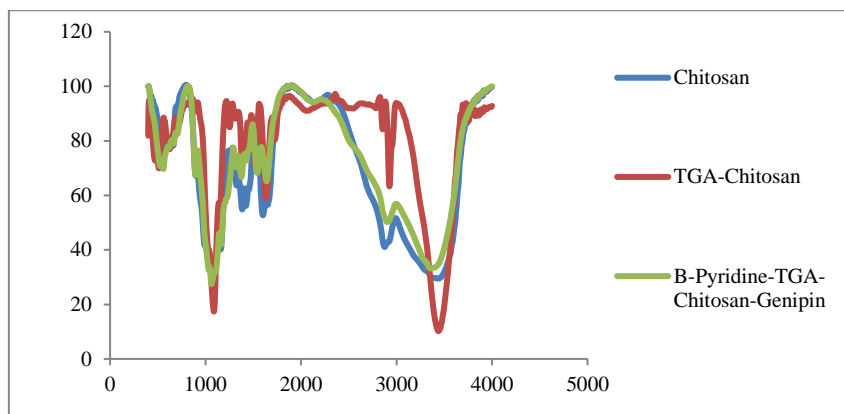
یک باند پهن دیگر نیز در محدوده ۲۸۸۵^{-۱} و ۲۹۳۱^{-۱} cm وجود دارد که مربوط به ارتعاشات کششی -CH می باشد [۳۸]؛ که پس از عامل دار شدن با TGA شدت آن افزایش یافته است. پیک ناحیه ۱۰۸۰^{-۱} cm مربوط به ارتعاش کششی C-O در گروه الکی C-OH کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده می باشد [۳۹، ۴۰]. که در مقایسه با کیتوسان شدت این پیک در کیتوسان سولفور دار شده به دلیل پیوند با TGA افزایش یافته است. همچنین، ارتعاش کششی نامتقارن مربوط به C-O-C (اتصال گلیکوسیدی بین مونومرهای کیتوسان) در محدوده ۱۱۸۰^{-۱} و ۱۱۹۰^{-۱} cm در کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده مشاهده می شود. ارتعاش کششی C-N (آمید III) در محدوده جذب ۱۳۸۰^{-۱} cm برای کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده مشاهده می شود. از سوی دیگر، طیف جذب ۱۶۰۰^{-۱} cm



شکل ۶ طیف FTIR مربوط به کیتوسان و کیتوسان سولفور دار شده



شکل ۷ طیف FTIR مربوط به کیتوسان، کیتوسان سولفور دار شده و نانوکیتوسان بارگذرای شده با داروی بی پیریدین با استفاده از کراسلینگر TPP



شکل ۸ طیف FTIR مربوط به کیتوسان، کیتوسان سولفور دار شده و نانوکیتوسان بارگذاری شده با داروی بی‌پیریدین با استفاده از کراسلینگر جنیپین

می‌باشند؛ در صورتی که نانوحامل دارو سنتز شده با کراسلینگر جنیپین دارای ساختار نسبتاً یکنواخت برنجی شکل با اندازه متوسط حدود ۱۵۰ نانومتر می‌باشند (شکل ۹ (b)). از آنجا که در سامانه دارو رسانایی، اندازه ذرات نقش مهمی دارند، می‌توان بیان کرد که کراسلینگر جنیپین گزینه مناسب‌تری برای سنتز نانوحامل بی‌پیریدین می‌باشد.

۳-۴- منحنی کالیبراسیون با غلظت‌های مختلف داروی بی‌پیریدین

با استفاده از غلظت‌های متفاوت داروی بی‌پیریدین میزان جذب دارو در طول موج ۲۸۰ نانومتر مطابق با شکل ۱۰ به دست آمد. با توجه به معادله خط این منحنی، بازده بارگذاری بی‌پیریدین درون نانو حامل کیتوسان TGA و همچنین پرو فایل‌های ر هایش داروی بی‌پیریدین از نانو حامل کیتوسان TGA رسم شد.

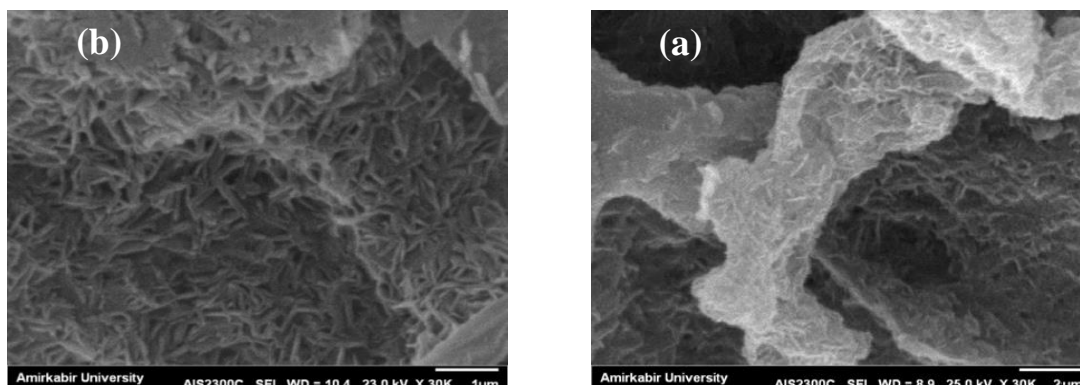
پس از لود شدن دارو درون کیتوسان سولفور دار شده با استفاده از کراسلینگرهای TPP (شکل ۷) و جنیپین (شکل ۸)، افزایش شدت پیک در محدوده‌های 1065 cm^{-1} (C-O)، کاهش شدت پیک در محدوده 2931 cm^{-1} (C-H) و 1641 cm^{-1} (O) و همچنین به وجود آمدن پیک‌های جدید در ناحیه $500-600\text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده‌ی لود شدن موفقیت آمیز داروی بی‌پیریدین در کیتوسان سولفور دار شده می‌باشد.

۳-۳ بررسی تصاویر SEM

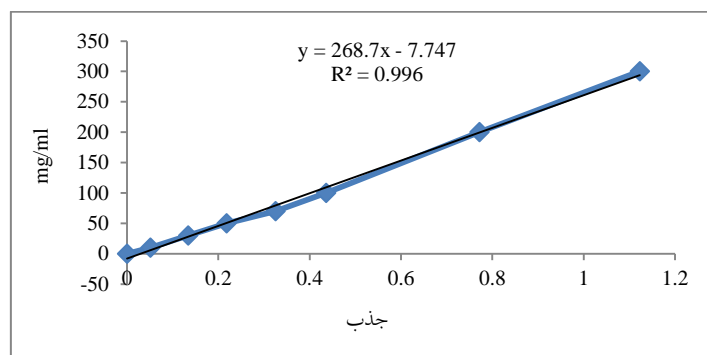
شکل ۹ (a و b) تصاویر میکروسکوپی SEM از نانوکیتوسان بارگذاری شده با داروی بی‌پیریدین حاصل از دو کراسلینگر TPP و جنیپین را نشان می‌دهد که از نظر شکل و ساختار سطحی و اندازه نانوذرات مقایسه شدند.

همانطور که در شکل ۹ (a) مشاهده می‌شود، نانوحامل دارو سنتز شده با کراسلینگر TPP دارای ساختار آگلومرت شده برنجی شکل^{۲۵} و با اندازه متوسط حدود ۲۰۰ نانومتر

²⁵nanorods shape



شکل ۹ تصویر SEM نانوحامل دارو سنتز شده با کراسلینکر TPP (a) و کراسلینکر جنپین (b)



شکل ۱۰ منحنی کالیبراسیون داروی بی‌پریدین (غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو)

با توجه به رهایش دارو در محیط بینی و وجود pH های متفاوت در مخاط بینی، آزمون رهایش در محیط آزمایشگاهی (برون‌تنی) در pH های ۶/۸ و ۸/۳ انجام شد. همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود، بخش اعظم رهایش دارو در طی ۲۴ ساعت انجام شده است و رهایش دارو از همان ابتدا به آرامی و از طریق مکانیسم انتشار (diffusion mechanism) از نانوذرات انجام می‌شود و انتشار انفجاری (burst release) وجود ندارد. به‌طور کلی، رهایش دارو برای نانوحامل سنتز شده با هر دو کراسلینکر پایدار بوده (constant release) که نشان می‌دهد نانوحامل سنتز شده، بخوبی داروی مورد مطالعه را در خود جای داده است و همچنین قرار گرفتن نانودارو در درون ژل نیز

۳-۵- بازده بارگذاری بی‌پریدین در درون نانو حامل

کیتوسان TGA

با استفاده از رسم منحنی کالیبراسیون، محاسبه‌ی مقدار داروی مصرف شده و داروی بارگذاری نشده انجام شد و با توجه به روابطی که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، بازده بارگذاری دارو مطابق زیر به‌دست آمد:

= میزان داروی بارگذاری شده با کراسلینکر جنپین

$$\frac{60-27}{60} \times 100 = 55\%$$

= میزان داروی بارگذاری شده با کراسلینکر TPP

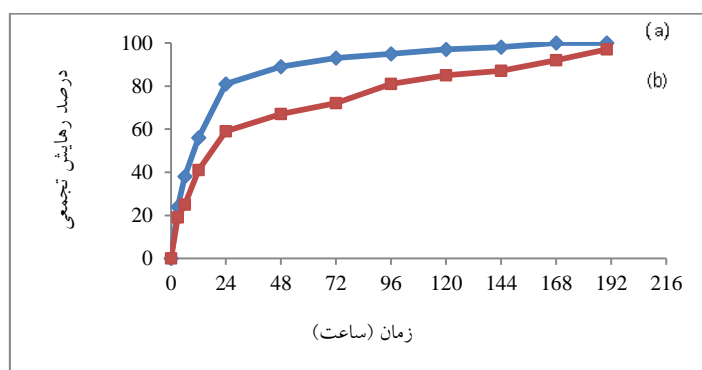
$$\frac{60-31}{60} \times 100 = 48\%$$

۳-۶- بررسی رهایش دارو از نانوکیتوسان بارگذرای

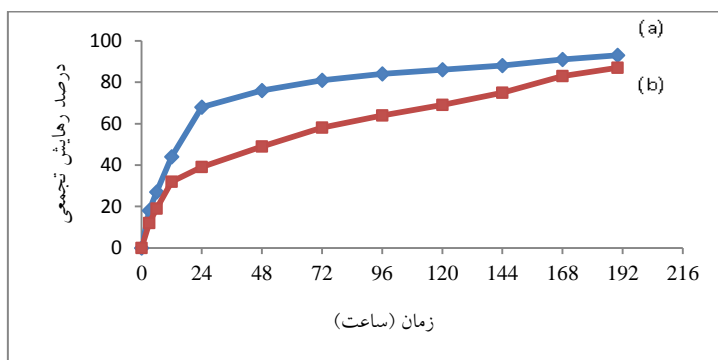
شده با داروی بی‌پریدین

در نانوحامل سنتز شده با کراسلینکر جنپین، وجود پیوندهای کوالانسی قوی اضافی در سطح نانوحامل سنتز شده می‌باشد. ضمن اینکه فاز دوم انتشار دارو از نانوحامل، در واقع حاصل از تخریب (degradation) نانوحامل و انتشار دارو به بیرون از آن می‌باشد و طبق نمودار مشخص است که در مورد نانوحامل سنتز شده با کراسلینکر جنپین، این استحکام در ساختار نانوحامل به مدت طولانی تری حفظ می‌شود که نتیجه مشابهی با مطالعه Domaratzki و همکاران (۲۰۱۲) نیز به دست آمده است [۲۳].

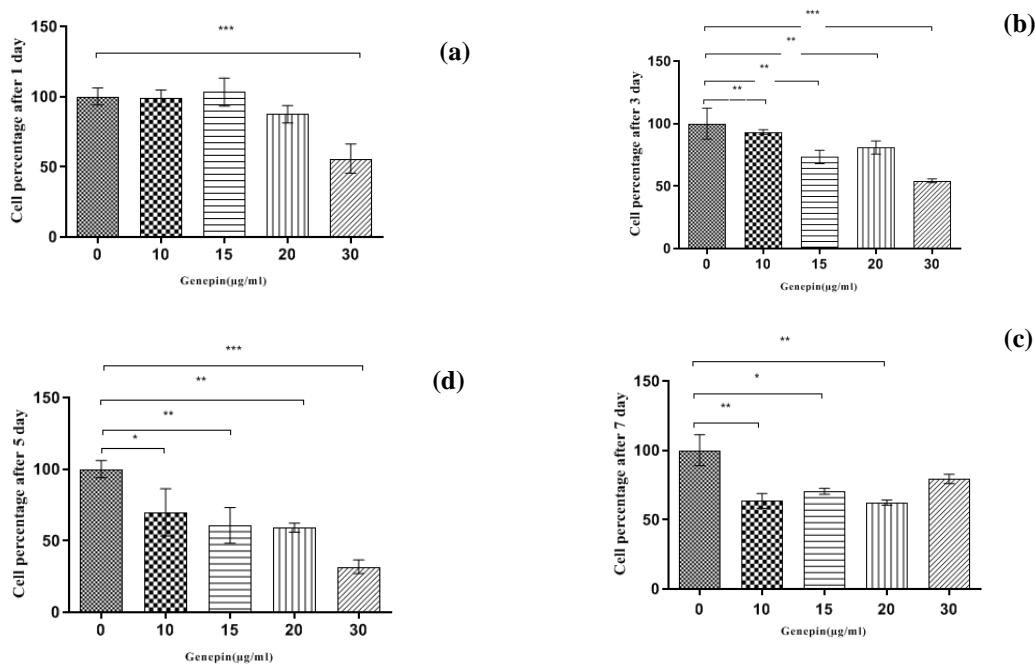
در ایجاد این انتشار پایدار (که به واسطه افزایش فراهمی زیستی دارو یکی از مزیت‌های مهم نانوحامل سنتز شده می‌باشد)، کمک می‌کند که در مطالعات دیگر که به سنتز نانوحامل داروی لوودوپا با استفاده از کیتوسان تیولدار پرداختند نیز نتایج مشابه حاصل شد [۱۹، ۲۲]. در مقایسه بین دو نانوحامل، مقدار رهایش در نانوحامل سنتز شده با کراسلینکر جنپین آهسته‌تر بوده که این موضوع به‌ویژه برای مواقعی که به رهایش آهسته دارو و دریافت دز طولانی مدتی از دارو نیاز می‌باشد بسیار مناسب است و نشان از برتری این نانوحامل نسبت به نانوحامل سنتز شده با TPP است (شکل‌های ۱۱ و ۱۲). دلیل رهایش آهسته‌تر



شکل ۱۱ رهایش دارو از نانوکیتوسان بارگذرای شده با داروی بی‌پریدین در pH= ۶٫۸: a) کراسلینکر (TPP) و b) کراسلینکر جنپین



شکل ۱۲ رهایش دارو از نانوکیتوسان بارگذرای شده با داروی بی‌پریدین در pH= ۸٫۳: a) کراسلینکر (TPP) و b) کراسلینکر جنپین



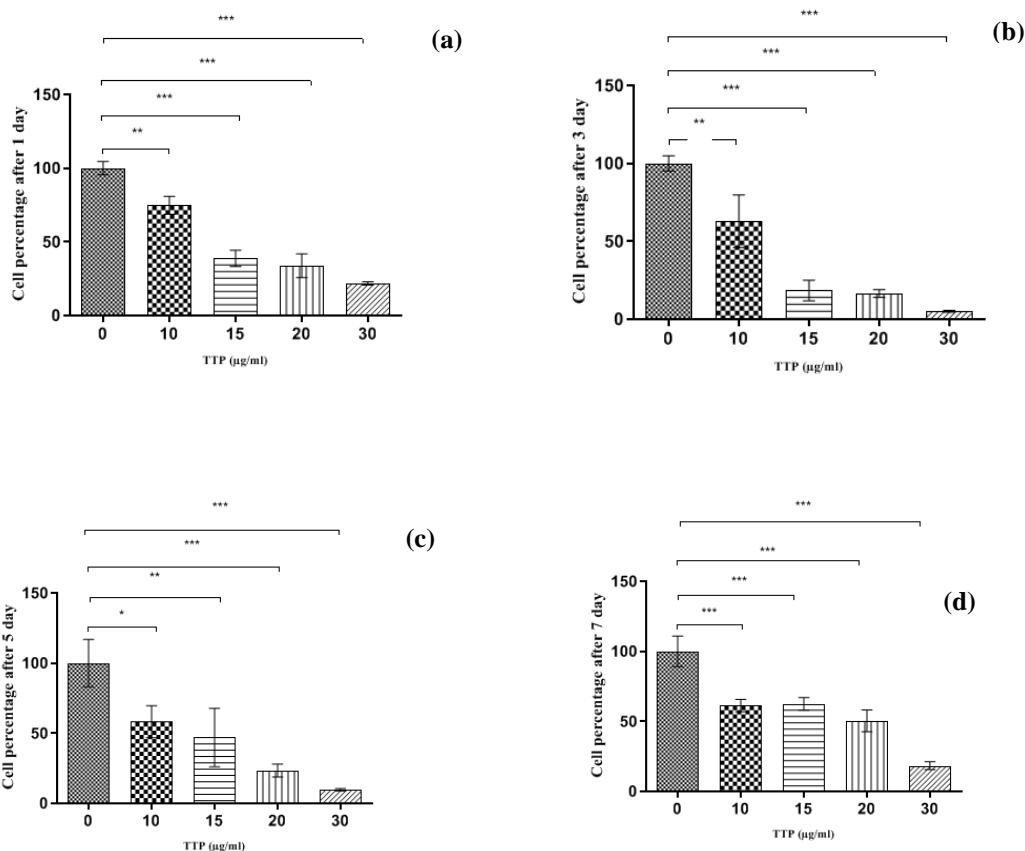
شکل ۱۳ بررسی سمیت داروی بی پیریدین با غلظت‌های مختلف با کراسلینکر جنیپین (a روز اول (b روز سوم (c روز پنجم (d روز هفتم و همکاران (۲۰۱۵) کیتوسان کراسلینک شده با جنیپین

استخراج شده از عصاره گونه گاردنیا (*Gardenia jasminoides*) و با هدف ایجاد پشתיبانی از کشت سلول های جدید مربوط به قرنیه‌ی انسان، سنتز شد و نتایج تست سمیت آن هیچگونه رابطه معنی داری مبنی بر سمی بودن برای کیتوسان کراسلینک شده با جنیپین را نشان نداده است [۳۲].

اگرچه مطالعات متعدد نشان داده است که استفاده از TPP به عنوان کراسلینکر مناسب در سنتز نانوحامل‌ها دارای سمیت پایین می‌باشد [۲۴, ۴۲, ۴۳]، اما در مطالعه حاضر در مقایسه با جنیپین، دارای سمیت یالاتری است. از سویی دیگر، نتایج بررسی MTT در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نانوداروی سنتز شده در غلظت‌های پایین‌تر، اثر سمیت کمتری بر روی سلول‌ها داشته است. بنابراین، اثر سمی خود دارو را نمی‌توان نادیده گرفت. مطالعات نشان داده است که به کارگیری دارو به طور مستقیم و بدون پوشش می‌تواند اثر سمی بیشتری نسبت به حالت بارگذاری شده ی آن داشته باشد [۴۴].

۳-۵- نتایج تست MTT

سمیت کمتر نانودارو یکی از ملزومات مهم و اصلی برای کاربردهای دارویی (biomedical applications) آن محسوب می‌شود. برای بررسی اثر داروی بی‌پیریدین با دو کراسلینکر جنیپین و TPP از سلول‌های PC12 استفاده شد و زنده‌مانی سلول‌ها در چهار بازه‌ی زمانی ۱، ۳، ۵ و ۷ روز بررسی شد. بررسی و آنالیز هر نمونه با سه بار تکرار انجام شد و آنالیز آماری P-Value برای مشخص کردن تغییرات معنی دار با نمونه کنترل انجام شد. در شکل‌های ۱۳ و ۱۴ ($P < 0/05$) با یک ستاره و ($P < 0/01$) با دو ستاره و ($P < 0/001$) با سه ستاره در نمودارها مشخص شده است. در واقع P-Value کمتر، نشان دهنده‌ی معنی داری بیشتر داده‌ها بوده و بیان می‌کند که نمونه‌های مورد بررسی با نمونه‌ی کنترل تفاوت بیشتری دارد و اثر سمیت دارو نیز بیشتر می‌شود. نتایج این تست نشان داده است که نانوکیتوسان حاوی بی‌پیریدین سنتز شده با کراسلینکر جنیپین، سمیت کمتری نسبت به نانوداروی سنتز شده با کراسلینکر TPP داشته است. در این ارتباط، در مطالعه Li



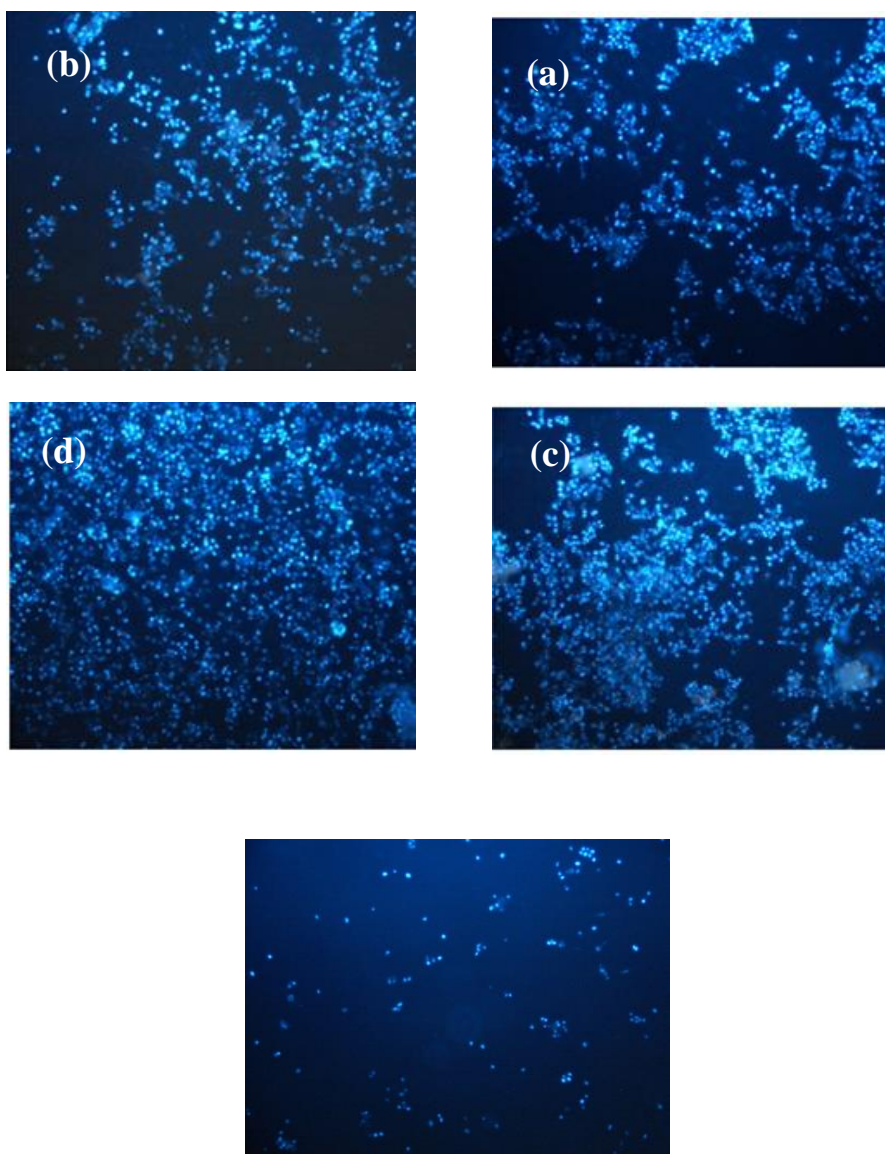
شکل ۱۴ بررسی سمیت داروی بی‌پیریدین با غلظت‌های مختلف با کراسلینکر TPP (a) روز اول (b) روز سوم (c) روز پنجم (d) روز هفتم

۳-۶- تغییرات زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI

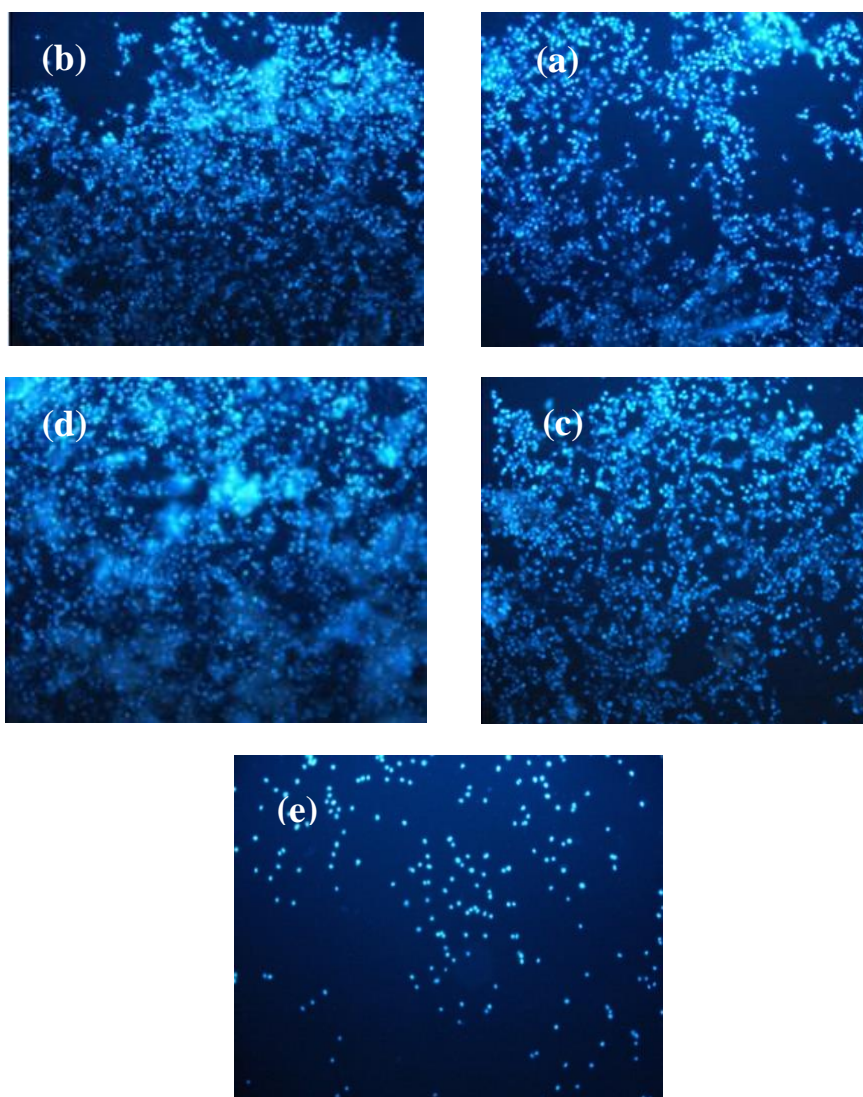
بررسی زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI، با نتایج حاصل از تست MTT مطابقت داشته است. نتایج رنگ‌آمیزی DAPI نشان داده است که در واقع سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانو داروی بی‌پیریدین با دو کراسلینکر جنیپین و TPP، دچار تغییرات متفاوتی شدند؛ به طوری که در غلظت‌های بالاتر دارو، در پس زمینه رنگ آبی فلورسنت، نقاط روشن فراوان‌تری در مورد سلول‌های آسیب دیده رخ داد که نشان‌دهنده اثر توکسیک بیشتر در این غلظت‌ها می‌باشد. در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر دارو، اثرات توکسیک کمتری مشاهده

از سوی دیگر، به‌طور کلی با گذشت زمان، از میزان زنده‌مانی سلول‌ها کاسته شده است، اما از محدوده‌ی زمانی ۵ روز به بعد، مجدداً برخی از سلول‌ها زنده‌مانی طبیعی خود را به‌دست آوردند. Csaba و همکاران (۲۰۰۹) طی مطالعه‌ای برای بررسی نانوذرات کیتوزان به عنوان نانوحامل‌های انتقال ژنی، به کپسوله کردن اسیدهای نوکلئیک مختلف (پلاسمید DNA و الیگونوکلوئوتیدهای کوتاه) در نانوذرات کیتوزان با تکنیک ژل یونی پرداختند، که نتایج مشابهی مشاهده شد [۴۲]. در مطالعه حاضر، میزان این بازماندگی برای نانوحامل سنتز شده با جنیپین به‌طور چشمگیری بیش از نانوحامل سنتز شده با TPP می‌باشد.

می شود. از سویی دیگر، تصاویر رنگ آمیزی DAPI نشان می دهد که با توجه به نقاط روشن کمتر در نانودارو با کراسلینکر جنیپین (شکل ۱۵)، اثرات توکسیک کمتری نسبت به نانودارو با کراسلینکر TPP (شکل ۱۶) وجود دارد.



شکل ۱۵ تصاویر میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی فلوئورسنت با رنگ آمیزی DAPI بترتیب با غلظت های ۱۰ (a)، ۱۵ (b)، ۲۰ (c) و ۳۰ (d) میلی گرم بر میلی لیتر داروی بی پریدین با کراسلینکر جنیپین به همراه کنترل (e)



شکل ۱۶ تصاویر میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی فلوئورسنت با رنگ آمیزی DAPI بترتیب با غلظت های ۱۰ (a) ، ۱۵ (b) ، ۲۰ (c) و ۳۰ (d) میلی گرم بر میلی لیتر نانوحامل داروی بی پریدین با کراسلینکر TPP به همراه کنترل (e)

کراسلینکر جنیپین کوچکتر از نانوحامل سنتز شده با کراسلینکر TPP بوده است که این اندازهی ریزتر می تواند

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش نانوکیتوسان تیولدار با استفاده از دو کراسلینکر TPP (سنتزی) و جنیپین (طبیعی) و زیست سازگار با منشا گیاهی) برای بارگذاری داروی بی پریدین سنتز شدند. میزان داروی بارگذاری شده در نانوکیتوسان تیولدار با استفاده از کراسلینکر جنیپین بیشتر از کراسلینکر TPP بوده و همچنین سایز نانوحامل سنتز شده با

در عبور از سد و موانع سلولی، بسیار موثر باشد. نتایج آنالیزها نشان دهندهی برتری نانوحامل سنتز شده با جنیپین در تست رهایش (بواسطه رهایش طولانی مدت تر) و تست سمیت (سمیت کمتر) نسبت به نانو حامل سنتز شده با TPP می باشد.

منابع

- [15] Wassmer, S., et al., Chitosan microparticles for delivery of proteins to the retina. *Acta biomaterialia*, 2013. 9(8): p. ۷۸۶۴-۷۸۵۵.
- [16] Sadeghi, M., F. Ganji, and S.M. Taghizadeh, Preparation and Optimization of Labeled Chitosan Nanoparticles and Evaluation of their Release from Transdermal Drug Delivery System. *IRANIAN JOURNAL OF POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY (PERSIAN)*, (online), 2015. 28(4): p. 333-344.
- [17] Kumar, S., et al., Preparation and characterization of indomethacin loaded ionically crosslinked microspheres using chitosan. *Der Pharmacia Lett.*, 2012. 4: p. 33-41.
- [18] Tripathy, S., et al., Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. *International journal of pharmaceuticals*, 2012. 434(1-2): p. 292-305.
- [19] Goyal, S. and S. Arora, IN-SITU NASAL GEL OF LEVODOPA FOR BRAIN TARGETING USING CHITOSAN-THIOGLYCOLIC ACID CONJUGATE AND MUSK KETONE BY EFFLUX TRANSPORT MODULATION. 2015.
- [20] Md, S., et al., Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013. 48(3): p. 393-405.
- [21] Garbayo, E., E. Ansorena, and M.J. Blanco-Prieto, Drug development in Parkinson's disease: from emerging molecules to innovative drug delivery systems. *Maturitas*, 2013. 76(3): p. 272-278.
- [22] Sharma, S., S. Lohan, and R. Murthy, Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 2014. 40(7): p. 869-878.
- [23] Domaratzki, R.E. and A. Ghanem, Encapsulation and release of cladribine from chitosan nanoparticles. *Journal of applied polymer science*, 2013. 128(3): p. 2173-2179.
- [24] Omer, A.M., et al., Formulation of quaternized aminated chitosan nanoparticles for efficient encapsulation and slow release of curcumin. *Molecules*, 2021. 26(2): p. 449.
- [25] Mi, F.L., et al., In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001. 12(8): p. 835-50.
- [26] Nasrabadi, M., A. Morsali, and S.A. Beyramabadi, An applied quantum-chemical model for genipin-crosslinked chitosan (GCS) nanocarrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. 165 :p. 1229-1240.
- [1] Mehta, P., Dry powder inhalers: a focus on advancements in novel drug delivery systems. *Journal of drug delivery*, 2016. 2016.
- [2] Mincea, M., A. Negulescu, and V. Ostafe, Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review. *Rev. Adv. Mater. Sci*, 2012. 30(3): p. 225-242.
- [3] Kaparissides, C., et al., Recent advances in novel drug delivery systems. *Journal of Nanotechnology online*, 2006. 2: p. 1-11.
- [4] Xiao, Y., et al., Sorafenib and gadolinium co-loaded liposomes for drug delivery and MRI-guided HCC treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. 141: p. 83-92.
- [5] Hasan, A.S., et al., Reduction of the in vivo burst release of insulin-loaded microparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015. 30: p. 486. ۴۹۳-
- [6] Petkar, K.C., et al., Nanostructured materials in drug and gene delivery: a review of the state of the art. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2011. 28(2).
- [7] Singh, R. and J.W. Lillard Jr, Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 2009. 86(3): p. 215-223.
- [8] Kamaly, N., et al., Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 2016. 116(4): p. 2602-2663.
- [9] Luo, Y. and Q. Wang, Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 2014. 64: p. 353-367.
- [10] Abd Elgadir, M., et al., Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of food and drug analysis*, 2015. 23(4): p. 619-629.
- [11] Naskar, S., K. Kuotsu, and S. Sharma, Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of drug targeting*, 2019. 27(4): p. 379-393.
- [12] Fonseca-Santos, B. and M. Chorilli, An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. 77: p. 1349-1362.
- [13] Fernández-Urrusuno, R., et al., Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 1999. 16(10): p. 1576-1581.
- [14] Rostami, E., Progresses in targeted drug delivery systems using chitosan nanoparticles in cancer therapy: A mini-review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020. 58: p. 101813.

- [35] Kamiloglu, S., et al., Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 2020. 1(3): p. 332-3.۴۹
- [36] Kapuscinski, J., DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 1995. 70(5): p. 220-233.
- [37] Sankararamkrishnan, N., et al., Removal of hexavalent chromium using a novel cross linked xanthated chitosan. *Bioresource Technology*, 2006. 97(18): p. 2377-2382.
- [38] Gupta, A., S.R. Vidyarthi, and N. Sankararamkrishnan, Studies on glutaraldehyde crosslinked xanthated chitosan towards the removal of mercury (II) from contaminated water streams. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 2015. 14(5).
- [39] Peng, X., et al., Effective biosorption of patulin from apple juice by cross-linked xanthated chitosan resin. *Food Control*, 2016. 63: p. 140-146.
- [40] Chen, A., et al., Carbon disulfide-modified magnetic ion-imprinted chitosan-Fe (III): a novel adsorbent for simultaneous removal of tetracycline and cadmium. *Carbohydrate polymers*, 2017. 155: p. 19-27.
- [41] Bagheri, M., et al., Application of chitosan-citric acid nanoparticles for removal of chromium (VI). *International journal of biological macromolecules*, 2015. 80: p. 431-444.
- [42] Csaba, N., M. Köping-Höggård, and M.J. Alonso, Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *Int J Pharm*, 2009. 382(1-2): p. 205-14.
- [43] Ta, Q., et al., Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021. 160: p. 105765.
- [44] Sadigh-Eteghad, S., et al., Effects of Levodopa loaded chitosan nanoparticles on cell viability and caspase-3 expression in PC12 neural like cells. *Neurosciences Journal*, 2013. 18(3): p. 281-283.
- [27] Ubaid, M. and G. Murtaza, Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 2018. 114: p. 1174-1185.
- [28] Khatun, B., et al., Genipin crosslinked curcumin loaded chitosan/montmorillonite K-10 (MMT) nanoparticles for controlled drug delivery applications. *Journal of microencapsulation*, 2018. 35(5): p. 439-453.
- [29] Muzzarelli, R.A., et al., Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine drugs*, 2015. 13(12): p. 7314-7338.
- [30] Shahnaz, G., et al., Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: bioavailability and pharmacokinetic characterization. *International journal of pharmaceuticals*, 2012. 428(1-2): p. 164-170.
- [31] Anitha, A., et al., Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 2011. 83(1): p. 66-73.
- [32] Li, Y.-H., et al., Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015. 126: p. ۲۴۴-۲۳۷.
- [33] Zhang, Y., Y. Yang, and T. Guo, Genipin-crosslinked hydrophobic chitosan microspheres and their interactions with bovine serum albumin. *Carbohydrate polymers*, 2011. 83(4): p. 2016-2021.
- [34] Barahuie, F., et al., Sustained release of anticancer agent phytyc acid from its chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug-delivery system. *International journal of nanomedicine*, 2017. 12: p. 2361.

Synthesis of thiolated nanochitosan as a carrier of biperidine using two cross linkers Tripolyphosphate (TPP) and Genipine and evaluation of their release and toxicity

Fakhimeh Amini Toolarud Payin¹, Reza Salarian², Seyed Mehdi Hosseini³, Sanaz Khammar⁴, Mohammad Hassan Shahavi⁵

1-Master graduated, Faculty of Medical Engineering, Maziar University, Royan, Iran

2-Assistant Professor, Faculty of Medical Engineering, Maziar University, Royan, Iran

3-Assistant Professor, Faculty of Medicinal Plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

4-Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

5-Assistant Professor, Faculty of Engineering Modern Technologies, Amol University of Special Modern Technologies (AUSMT), Amol, Iran

sm.hosseini@ausmt.ac.ir

Receipt: 2021/05/31

Accepted: 2022/04/26

Abstract

Modern science in drug delivery systems has long been paid to effectively design drug delivery systems, to reduce side effects, increasing bioavailability, targeted drug delivery, and passing through blood-brain barriers. Nanoparticles are very important as carriers because they carry different types of drugs to different parts of the body at the right time. In the present study, thiolated nano chitosan loaded with Biperiden was synthesized by ion gel method using two types of crosslinkers (tripolyphosphate and genipin) and their efficiency was investigated. FTIR analysis confirmed the successful synthesis of various stages of thiolated nano chitosan loaded with Biperiden by both crosslinkers. SEM images showed that as-synthesized nano-carriers have a nanorod structure and nanocarriers crosslinked by genipin had a more regular structure with a size of about 150 nm than nanocarrier crosslinked by TPP with a size of approximately 200 nm. In vitro drug release and cytotoxicity studies showed nano-carriers crosslinked by genipin have had a higher release and less cytotoxicity than nanocarriers crosslinked by TPP. Considering the lower toxicity and delayed release of nanoparticles synthesized with genipine than nanocarriers synthesized with TPP, the use of this nanocarrier increases the bioavailability of the drug and can be used as a suitable drug delivery system.

Keywords: Chitosan nanoparticles, ion gel method, Biperiden, Tripolyphosphate, Genipin