

سنتز نانوحامل سرازوم و بررسی پایداری و رهایش ترکیب زیست فعال گالیک اسید بارگذاری شده در آن

سید محمدرضا مرتضوی^۱، زهرا واعظی^{۲*}، حسین نادری منش^{۳*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری های بین رشته ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۵، تهران، ایران

Naderman@modares.ac.ir, Zahra.vaezi@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۶

چکیده

بیماری التهاب روده یک بیماری التهابی مزمن در دستگاه گوارش می باشد. علی رغم تلاش های زیاد در چند سال گذشته و همچنین افزایش تعداد بیماران مبتلا، در حال حاضر داروهای محدودی برای مدیریت التهاب روده در دسترس است. طراحی یک روش درمانی بیولوژیکی جدید با استفاده از داروهای زیست فعال طبیعی با عوارض جانبی کمتر و انتقال ایمن تر نسبت به مواد شیمیایی می تواند مفید باشد. در این مطالعه، یک استراتژی جدید برای رهایش کنترل شده گالیک اسید به عنوان یک پلی فنول زیست فعال با اثرات ضد التهابی ارائه شد. این ترکیب زیست فعال در نانوحامل سرازوم سنتزی بارگذاری شده و پایداری آن بررسی شد. بخش لیپید سیلیس دار تشکیل دهنده سرازوم (CFL) از طریق یک واکنش شیمیایی دومارحله ای سنتز شده و سپس سرازوم ها به روش هیدراتاسیون لایه نازک با نسبت های مختلف DPPC:CFL تهیه شدند. خواص فیزیکی شیمیایی و مشخصه یابی نشان می دهد که سرازوم های حاوی گالیک اسید دارای قطر متوسط ۳۳۵ نانومتر و پتانسیل زتای ۲۳- میلی ولت به صورت تک لایه و یکنواخت هستند. سرازوم سنتز شده پایداری ساختاری بیشتری نسبت به لیپوزوم از خود نشان داده و زمان بیشتری در گردش خون می توانند حضور داشته باشند. فرمولا سیون بهینه سامانه سرازوم-گالیک اسید راندمان بارگذاری ۳۴ درصد و رهایش کنترل شده دارو را در محیط های مایع گوارشی از خود نشان می دهد. این نتایج نشان می دهد که سرازوم ها می توانند سامانه تحویل داروی بهتری برای ذخیره سازی طولانی مدت و رهایش قابل کنترل گالیک اسید باشند و کاربردهای قابل توجهی به عنوان حامل تحویل داروی التهاب روده داشته باشند.

کلید واژگان: سرازوم، گالیک اسید، آهسته رهش، التهاب روده، دارورسانی

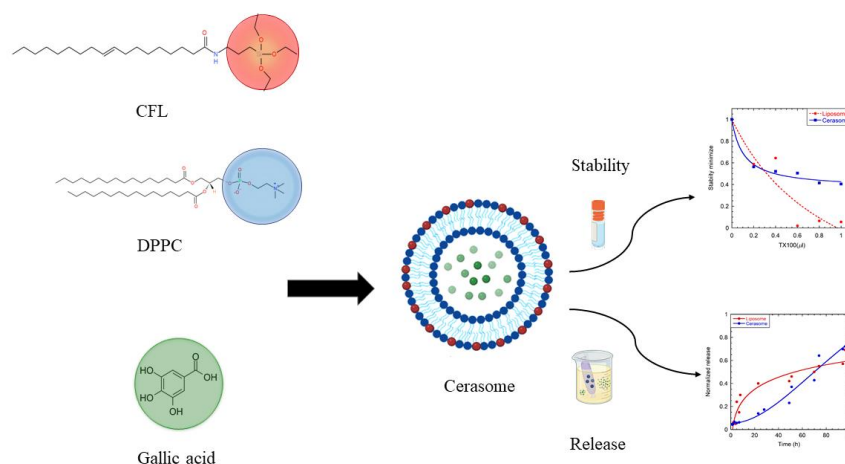
۱- مقدمه

بیماری التهاب روده^۱ (IBD) یک التهاب مخاطی مزمن و اپیزودیک دستگاه گوارشی است که عمدتاً روده بزرگ و ایلئوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد که به دو نوع کولیت اولسراتیو و کرون تقسیم می‌شود. تا به امروز هیچ درمان دائمی برای این بیماری وجود ندارد، اما راهکارهای درمانی مختلف از جمله داروهای شیاف^۲ و عمل جراحی جهت بهبود و کنترل این بیماری استفاده می‌شوند [۱]. اما داروهای شیاف، مانند مزالازین^۳ برای بیماران خوشایند نیست و عوارضی همچون سوءهاضمه و خارج شدن زود هنگام از بدن بدون اثربخشی دارد. علاوه بر این، ترس و فرار از روش تهاجمی جراحی باعث شده است این روش درمانی توسط عده‌ای به تأخیر انداخته شود. بنابراین استفاده از داروهای خوراکی مختلف مانند ۵-آمینو سالیسیلیک اسید^۴ (5-ASA)، کورتیکواستروئیدها^۵، تیوپورین^۶ها می‌توانند بهترین انتخاب برای درمان التهاب روده باشند [۲]. اما مشکل این داروها عدم انتقال هدفمند آنها به سلول‌های التهابی است. به طوری که درصد زیادی از این ترکیبات توسط سیستم ایمنی حذف می‌شوند یا توسط دیگر سلول‌های غیر هدف جذب شده و در قسمت بالایی روده آزاد می‌شوند. بنابراین، برای حل این مشکل استفاده از نانوحامل‌های پایدار و زیست سازگار همچون لیپوزوم پیشنهاد شده است. لیپوزوم‌ها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی مانند، رهاسازی کنترل شده یا هدفمند دارو، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [۳]. با وجود تمام مطالعات انجام شده در این زمینه، لیپوزوم‌ها هنوز به دلیل ناپایداری مورفولوژیکی به پتانسیل کامل خود نرسیده و ماندگاری کمی دارند [۴]. ناپایداری لیپوزوم‌ها می‌تواند به پاکسازی سریع آنها از گردش خون پیش از رسیدن به هدف منجر شوند، به همین دلیل بسیاری از محققان تلاش

زیادی برای بهبود پایداری لیپوزوم‌ها می‌کنند. یکی از این نوع تلاش‌ها افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) است که می‌تواند به کاهش شدت سیستم فاگوسیت تک هسته‌ای (MPS) و گردش طولانی مدت نانوحامل کمک کند. اما متأسفانه به دلیل وجود پلی‌اتیلن گلیکول، اثرات سمی جدیدی ظاهر می‌شود و خود نانوحامل باعث بروز التهاب می‌شود [۵، ۶]. در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار یک نوع نانوهیبرید لیپوزوم آلی-معدنی به نام سرازوم معرفی شد که از طریق ترکیبی از واکنشهای سل-ژل طراحی شده است. این مولکول در محیط‌های آبی با ساختار دو لایه لیپوزومی پوشیده شده و شبکه‌های غیرآلی پلی ارگانوسیلوکسان در سطح آن ایجاد می‌شود [۷]. سرازوم‌ها به عنوان یک سیستم جدید دارورسانی، مزایای زیادی دارند. سطح سیلوکسان سرازوم‌ها سبب افزایش قابل توجه پایداری و مقاومت آنها در برابر گرما نسبت به لیپوزوم‌ها شده است. سطح سیلوکسان می‌تواند به طور قابل توجهی منجر به بهبود ثبات سرازوم‌ها در محیط با pH اندکی قلیایی (خون) شود. وجود ساختار دولایه، استحکام و چگالی کلی سرازوم‌ها را در مقایسه با نانوذرات سیلیس بسیار کاهش می‌دهد که انتظار می‌رود پایداری چنین ذراتی در محلول‌های آبی افزایش یابد. سرازوم‌ها را می‌توان با داروهای آب‌دوست، آب‌گریز و همچنین آمفیفیلک بارگذاری کرد. این خصوصیات ۴ مورد از مزایای سرازوم‌ها به عنوان سیستم جدید دارورسانی است. از سوی دیگر، با وجود اثر درمانی داروهای شیمیایی بر سلول‌های التهابی، اثرات جانبی ناخواسته‌ای بر روی سلول‌های سالم هم وجود دارد که پس از مدتی بدن نسبت به دارو مقاوم می‌شود. از این رو ترکیبات زیست فعال طبیعی جدید با خاصیت ضدالتهابی می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشند و یا با اثر هم‌افزایی که ایجاد

^۵ Corticosteroids^۶ Thiopurines^۱ Inflammatory bowel disease^۲ Suppository^۳ Mesalazine^۴ 5-Aminosalicylic acid

لیپیدها، DNA، پروتئین‌ها و آنزیم‌های درگیر در ایجاد رادیکال آزاد جلوگیری کنند. همچنین، نقش پیشگیری در برابر آسیب اکسیداتیو در بیماری التهاب روده را دارند [۱۰]. در این پژوهش گالیک اسید استخراج شده به روش آبی از پوست پسته در نانوحامل‌های سرازوم بارگذاری کرده و سپس پایداری نانوحامل و رهایش گالیک اسید کپسوله شده در محیط روده شبیه سازی شده، مطالعه شد (شکل ۱ نمای شماتیک سرازوم سنتزی و مطالعات انجام شده را نشان می‌دهد).



شکل ۱ شماتیک سنتز نانوحامل سرازوم، بررسی پایداری و رهایش گالیک اسید کپسوله شده

هیدروکلریک اسید، اورانیل استات، پتاسیم برومید، آب مقطر.

۲-۲ سنتز لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم (Cerasome-forming lipid(CFL))

برای سنتز لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم (CFL) ابتدا ۳۰۰ ماکرولتر اسید اولئیک را به وسیله ۱۰ میلی گرم دی سیکلو هگز یل کربودی ایمید (DCC) و ۷ میلی گرم هیدروکسی بنزوتریازول (HOBt) در ۲ میلی لیتر دی

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

اسید اولئیک، ۳- آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES)، دی پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین (DPPC)، دی سیکلو هگز یل کربودی ایمید (DCC)، هیدروکسی بنزوتریازول (HOBt)، تریتون ایکس-۱۰۰ (TX-100)، دی کلرومتان، اتانول، متانول، کلروفرم،

¹ Gallic acid

کامل خشک شده، با پتاسیم برومید مخلوط و فشرده شده و قرصی با قطر ۱ سانتی متر و ضخامت ۱۰۰ میکرون تهیه شد. آزمون رزونانس مغناطیسی هسته پروتون^۳ (HNMR) با دستگاه VARIAN - INOVA 500 MHz، برای مطالعه ترکیب لیپید CFL و اتصال پیوند آمیدی آن به کار گرفته شد. برای آماده سازی نمونه، ۱۰ میلی گرم CFL سنتز شده در حلال $CDCl_3$ حل شد و سپس طیف جذبی تهیه شد. مورفولوژی سرازوم ها با میکرو سکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) بررسی شد. محلول وزیکول روی لام قرار گرفت و سپس روی لام با تقریباً ۱۰ نانومتر طلا پوشانده شده و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (Hitachi S-4160) (FE-SEM) مشاهده شد.

۲-۵ بررسی پایداری سرازوم

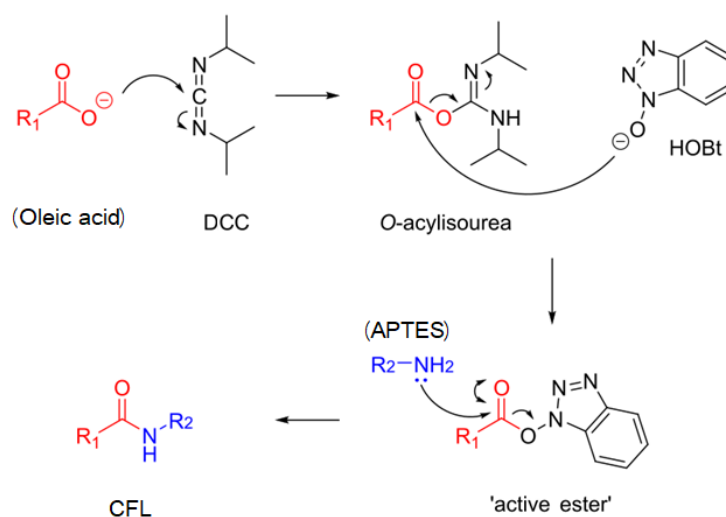
پایداری ساختار غشای سرازومی در مقایسه با لیپوزوم در حضور سورفاکتانت غیر یونی تریتون ایکس-۱۰۰ (TX-100) بررسی می شود.

کلرومتان حل کرده و ۱۵ دقیقه در حالت هم زده قرار داده می شود تا ترکیب استر فعال شود. حال ۵۰۰ میکرولیتر ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) را در ۳ میلی لیتر دی کلرومتان حل کرده و سپس به ترکیب استر فعال اضافه شده و پس از ۲۴ ساعت CFL تشکیل می شود (شکل ۲) [۱۱، ۱۲].

۲-۴ مشخصه یابی لیپیدهای سنتز شده سرازوم و نانوحامل سرازوم

توزیع اندازه و پتانسیل زتای نمونه های سنتز شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زاویه پراکنش ۱۷۳ درجه جهت تعیین اندازه و بار سطحی و شاخص پراکندگی روش پراکندگی دینامیکی نور^۱ (DLS) با دستگاه NanozetaSizer بررسی شدند.

آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز با استفاده از دستگاه مادون قرمز تبدیل فوریه^۲ (FTIR) با دستگاه FT-6300 Japan - JASCO-IR در محدوده 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1} و با درجه وضوح 0.5 cm^{-1} انجام شد. مقدار ۱ میلی گرم از لیپید CFL و سرازوم لیوفلیزه شده و به طور



شکل ۲ تصویر شماتیک سنتز لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم (CFL)

³ Nuclear magnetic resonance spectroscopy

¹ Dynamic light scattering

² Fourier transform infrared spectroscopy

۷-۲ رهایش دارو

رهایش گالیکاسید با استفاده از روش دیالیز بررسی شد. در این سنجش ابتدا سرازوم ها با ۵ نسبت مختلف DPPC:CFL تهیه شدند (۰:۱۰، ۳:۷، ۷:۳، ۱۰:۰) و در کیسه دیالیز حاوی بافر PBS (pH=7.4)، قرار داده شد. سپس، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت حرکت ملایم (۱۲۰ دور در دقیقه) انکوبه شدند و در فواصل زمانی انتخاب شده ۱ میلی لیتر محلول بافر برای بررسی شدت جذب گالیکاسید در ۲۷۲ نانومتر خارج شدند. این سنجش به مدت ۱۴۰ ساعت و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Uv-vis) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (هر آزمایش ۳ بار تکرار شد) [۱۶].

۸-۲ تست سمیت سلولی

رده سلولی Caco-2 در محیطی متشکل از DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱ درصد پین استرپ، در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت ۵ درصد اتمسفر CO2 کشت داده شد که سلول ها به مدت ۲۱ روز رشد کردند. برای ارزیابی سمیت سلولی گالیکاسید کپسوله شده در سرازوم از روش MTT استفاده شد. سلول ها در پلیت ۹۶ خانه با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده اند. سپس، در معرض غلظت های مختلف سرازوم، گالیکاسید و گالیکاسید کپسوله شده در سرازوم در زمان های مشخص (۲۴ و ۷۲ ساعت) قرار گرفتند. سپس، به مدت ۴ ساعت توسط ۲۰ ماکرولیتتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر انکوبه شده و در آخر محیط محلول MTT از نمونه خارج شده و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر نمونه اضافه شد. شدت جذب هر نمونه در طول موج ۴۹۰ نانومتر که متناسب با تعداد سلول های زنده است با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد. در این روش تغییر رنگ زرد به بنفش اساس تمایز بین سلول های زنده و مرده می باشد و مقدار دانسیته نوری هر چاهک

پس از تهیه سرازوم و لیپوزوم، غلظت های مختلف تریتون ایکس-۱۰۰ (۰/۲-۱ میکرومولار) را به حجم ۱ میلی لیتر نانوحامل اضافه کرده و سپس پراکنش ذرات سرازوم و لیپوزوم را در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. همچنین، سنتیک رهایش ترکیب فلورسانسی کپسوله شده در هر دو نانوحامل ارزیابی و پایداری آنها مقایسه شد. ترکیب کورکومین خاصیت آب گریزی دارد و با بارگذاری آن در بخش آب گریز سرازوم و لیپوزوم، سنتیک رهایش در مدت زمان معین با بررسی افزایش شدت نشر فلورسانس در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر ارزیابی شد. به طوری که با اضافه کردن تریتون ایکس-۱۰۰ به نقطه پایانی رهایش از نانوحامل ها منتهی شد [۱۲].

۶-۲ تعیین میزان بارگذاری و کارایی بارگذاری دارو در نانوحامل سرازوم

منحنی کالیبرا سیون گالیکاسید با خوانش جذب در طول موج ۲۷۲ نانومتر در ۷ غلظت مختلف رسم شد. پس از سنتز سامانه به نسبت های مختلف دارو: لیپید (۱:۲۰، ۱:۱۰، ۱:۵۰)، داروی آزاد را از نانوحامل حاوی دارو به روش کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتونی به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه از کپسوله شده ها جدا سازی شد. سپس، ۱۰۰ ماکرولیتتر از سامانه را در ۹۰۰ ماکرولیتتر متانول لیز کرده و جذب گالیکاسید اندازه گیری شده و مقادیر داروی بارگذاری شده و بارگیری شده با استفاده از رابطه ۱ و ۲ محاسبه شد [۱۵]:

رابطه (۱)

$$\text{میزان داروی محبوس شده} \times 100 = \frac{\text{میزان نانوحامل آزاد}}{\text{میزان نانوحامل آزاد} - \text{بازده بارگیری دارو}} \quad (1)$$

رابطه (۲)

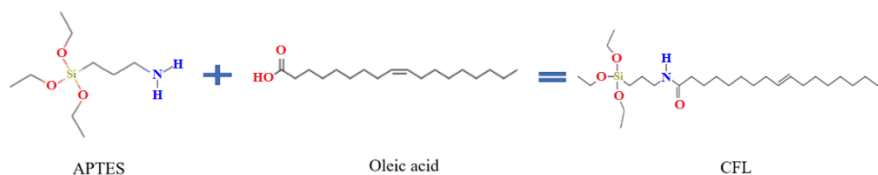
$$\text{میزان داروی محبوس شده} \times 100 = \frac{\text{میزان داروی اولیه}}{\text{میزان داروی اولیه} - \text{بازده بارگذاری دارو}} \quad (2)$$

مشخص کننده میزان این تبدیل رنگ ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های زنده است.

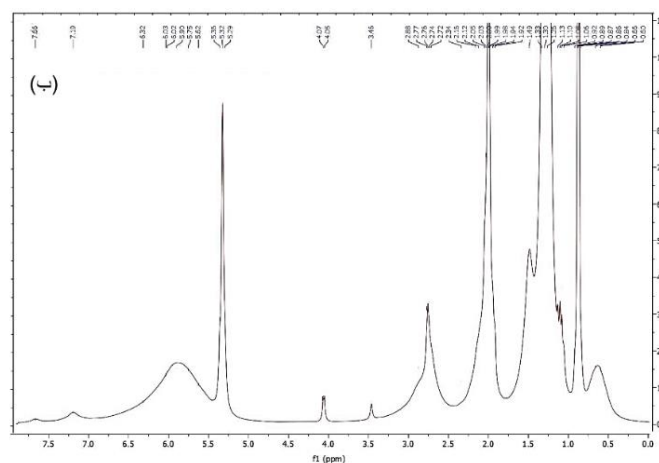
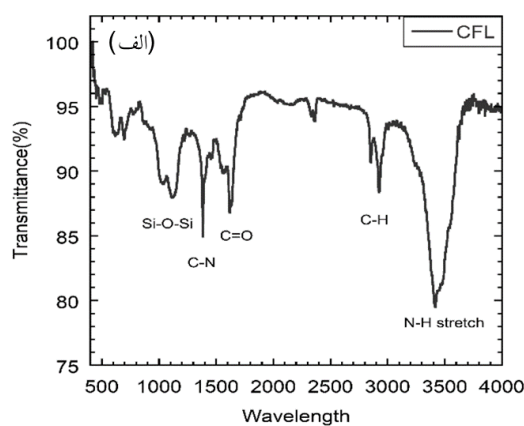
۳- نتایج و بحث

۱-۳ تشکیل سرازوم

دلیل اصلی تشکیل نانوحامل‌های سرازوم ایجاد استحکام مورفولوژی بین زنجیره الکیل آب‌گریز می‌باشد. سرازوم مورد استفاده در این مطالعه از ترکیب فسفولیپید DPPC و لیپید CFL تشکیل شده است (شکل ۳).



شکل ۳ تصویر شماتیک اجزای لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم (CFL)



شکل ۴ الف) آنالیز اسپکتروسکوپی FT-IR پیوند آمیدی و شبکه سیلوکسان لیپید CFL. ب) طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته (H NMR) لیپید CFL.

سنتز نانو حامل ... ----- مرتضوی و همکاران

می‌شود، گروه متیلن از گروه ۳-آمینوپروپیل به ترتیب در ۳/۴ پی‌پی‌ام (CH_2 متصل به N)، و ۰/۶ پی‌پی‌ام (CH_2 متصل به Si) نشان داده می‌شوند که در نتیجه اتصال بین این دو ترکیب با پیوند آمیدی (H , NHCO ، ۶ پی‌پی‌ام) نشان داده‌شد.

۲-۳ بررسی ویژگی‌های سرازوم

برای بررسی قطر هیدرودینامیکی سرازوم‌های سنتز شده و پتانسیل زتای آن‌ها از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) استفاده شد که جدول ۱ و شکل ۵، سایز و زتای سرازوم‌ها را نشان می‌دهد. قطر هیدرودینامیکی حدود ۱۵۰-۳۵۰ نانومتر و شاخص پراکندگی آن ۰/۲۶۳ به دست آمد.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود استفاده از لیپید CFL با تشکیل مایسل سرازوم ۱۴۵ نانومتر همراه است، همچنین سنتز نانوحامل با استفاده از فسفولیپید DPPC سبب تشکیل لیپوزوم‌های با سایز ۲۵۰ نانومتر شده که با اضافه کردن درصد‌های مختلف CFL، سرازوم‌هایی با سایز بزرگ‌تری مشاهده می‌شود. این نتایج حاکی از آن است که با افزایش درصد CFL سایز نانوحامل افزایش می‌یابد.

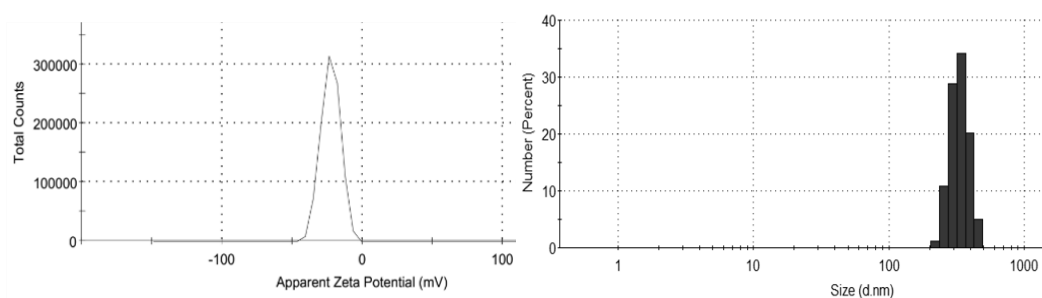
همچنین سرازوم پتانسیل زتای منفی‌تری نسبت به لیپوزوم دارد، زیرا در لیپوزوم بار الکتریکی خنثی فسفولیپید DPPC بار کمی روی سطح ایجاد می‌کند. در مقابل سرازوم‌ها دارای پتانسیل زتا ۲۳/۱- میلی‌ولت بودند که نشان می‌دهد قسمت‌های تری‌اتوکسی سیلان CFL، هیدرولیز شده و دارای بار منفی‌تری هستند.

CFL از یک زنجیره آلکیل به نام اسید اولئیک و یک شبکه سیلوکسان در سر آب‌دوست خود به نام APTES تشکیل شده است، که وجود اسید اولئیک در دم آب‌گریز لیپید باعث انعطاف‌پذیری نانوحامل می‌شود و APTES در سر آب‌دوست لیپید که گروه سیلانول آن به دلیل ناپایداری در هوا توسط گروه‌های اتوکسی پوشیده شده و وجود سیلیس در سطح آن، باعث افزایش پایداری نانوحامل و جلوگیری از تجزیه زودهنگام نانو حامل می‌شود. این دو ترکیب به‌وسیله پیوند آمیدی به هم متصل می‌شوند که این اتصال آمیدی در دستگاه طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) بررسی شد. (شکل ۴)

همان‌طور که در طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (شکل ۴ الف) مشاهده شد، باند کششی N-H , C-H , C=O , C-N به ترتیب در 1400 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} اتصال پیوند آمیدی اسید اولئیک و APTES و باند 1100 cm^{-1} اختصاص یافته به سر آب‌دوست لیپید را نشان داده است که می‌تواند اتصال اسید اولئیک و APTES اثبات کند. همچنین، برای تایید این ادعا به بررسی طیف HNMR پرداختیم. مطابق (شکل ۴ ب) طیف HNMR اسید اولئیک که برخی سیگنال‌های مشخصه زنجیره‌های اشباع شده گروه متیلن CH_2 را نشان می‌دهند در حدود ۱/۳ پی‌پی‌ام می‌باشد. همچنین، اسید اولئیک دارای یک پیوند دوگانه بین کربن‌های ۹ و ۱۰ است که هر کدام به یک هیدروژن آلفینیک منفرد با سیگنالی در حدود ۵/۳ پی‌پی‌ام به خوبی از بقیه سیگنال‌ها جدا می‌شوند. طیف APTES گروه متیلن اتوکسی در حدود ۴/۱ پی‌پی‌ام ظاهر

جدول ۱ بررسی پتانسیل زتا و سایز نانوحامل‌های لیپوزوم و سرازوم با نسبت‌های ۱۰:۰، ۷:۳، ۵:۵، ۳:۷.

۰:۱۰	۳:۷	۵:۵	۷:۳	۱۰:۰	DPPC:CFL
$145/4 \pm 16/2$	$334/5 \pm 20/6$	$319/4 \pm 15/5$	$264/11 \pm 8$	$250/2 \pm 19$	سایز (نانومتر)
$-38/4 \pm 3$	$-23/1 \pm 5/2$	$-23/4 \pm 1/2$	$-15/5 \pm 4$	$-3/18 \pm 1/3$	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)
$0/140 \pm 0/012$	$0/216 \pm 0/029$	$0/263 \pm 0/016$	$0/334 \pm 0/02$	$0/312 \pm 0/024$	شاخص پراکندگی



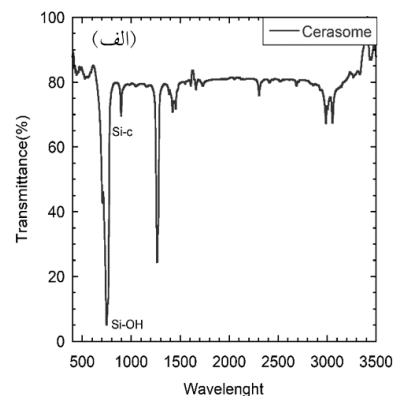
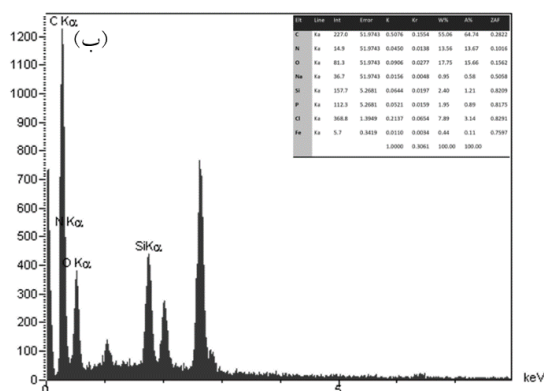
شکل ۵ نمودار سایز و پتانسیل زتا نانوحامل سرازوم نسبت ۵:۵

از سوی دیگر، ماهیت و دانسیته بار سطحی سرازوم‌ها به دلیل نیروهای دافعه بیشتر از تجمع وزیکول‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه پایداری کلوئیدی بیشتر خواهد بود. همچنین، بار سطحی بالاتر از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر مکانیسم و میزان برهم‌کنش‌های سلول با سرازوم است که باعث افزایش برهم‌کنش و تحویل بهتر ترکیب زیست‌فعال گالیک اسید به سلول می‌شود. شکل ۵ نمودار سایز و پتانسیل زتا نانوحامل سرازوم نسبت ۵:۵ را نشان می‌دهد.

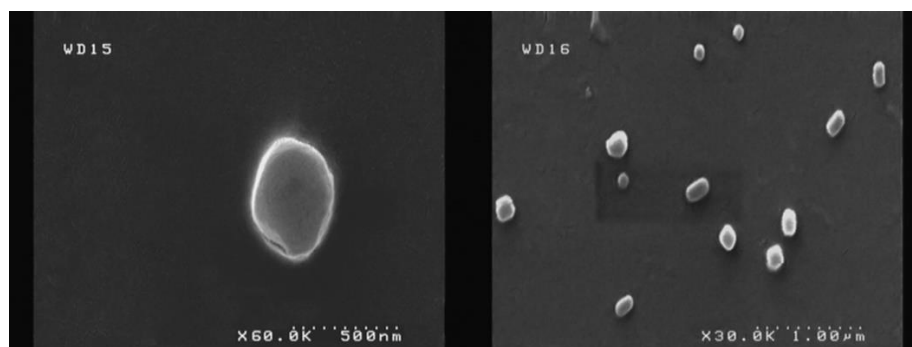
حضور گروه سیلیس در ساختار سرازوم باعث افزایش سایز هیدرودینامیکی نسبت به لیپوزوم می‌شود اما برای بررسی دقیق‌تر تشکیل پیوندهای سیلوکسان در سرازوم از آزمون مادون قرمز تبدیل فوریه استفاده شد. مطابق شکل (۶ الف) باندهای کششی اختصاص داده شده به گروه‌های

ترکیب عنصری نمونه با استفاده از طیف‌سنجی پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX) آنالیز شد. مقادیر انرژی پرتو ایکس به‌دست‌آمده شکل ۵ از نمودار EDX، با مقادیر انرژی پرتو ایکس استاندارد هر عنصر مقایسه شد و حضور عنصر سیلیس با درصد وزنی ۲/۴ درصد گزارش شد که این گزارش تأییدیه مبنی بر تشکیل سرازوم می‌باشد (شکل ۶ ب).

از سوی دیگر، ماهیت و دانسیته بار سطحی سرازوم‌ها به دلیل نیروهای دافعه بیشتر از تجمع وزیکول‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه پایداری کلوئیدی بیشتر خواهد بود. همچنین، بار سطحی بالاتر از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر مکانیسم و میزان برهم‌کنش‌های سلول با سرازوم است که باعث افزایش برهم‌کنش و تحویل بهتر ترکیب زیست‌فعال گالیک اسید به سلول می‌شود. شکل ۵ نمودار سایز و پتانسیل زتا نانوحامل سرازوم نسبت ۵:۵ را نشان می‌دهد.



شکل ۶ الف) آنالیز اسپکتروسکوپی FT-IR پیوند آمیدی و شبکه سیلوکسان سرازوم. ب) توزیع فراوانی اتم‌ها در سرازوم.



شکل ۷ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (FE-SEM) سرازوم با نسبت ۵:۵.

نور آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) بررسی شد. پخش نور توسط ذرات موجود در محیط سوپانسیون باعث کدورت سیستم حاصل می شود که میزان آن به تعداد و اندازه ذرات کلوئیدی موجود در فاز مایع، تفاوت در ضریب انعکاس ذرات، محیط سوپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد. کدورت محلول حاوی سرازوم یا لیپوزوم با افزایش غلظت سورفکتانت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری و میزان پراکنده سازی نور در دو حالت مقایسه شد.

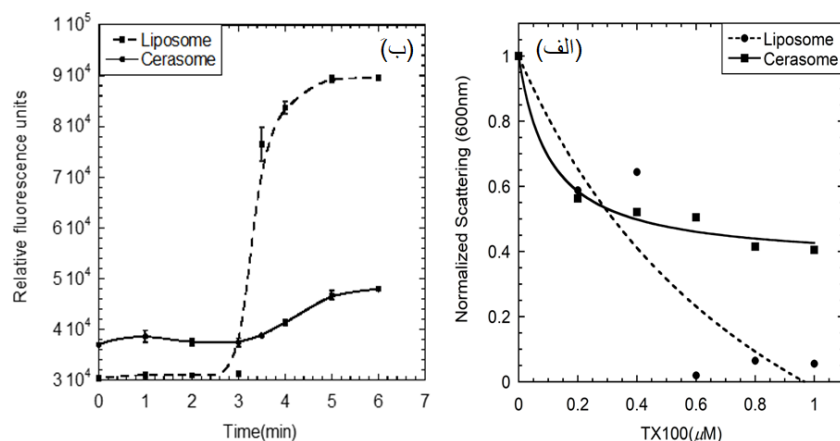
در شکل ۸ الف، حضور سرازوم یا لیپوزوم تنها باعث کدورت یا پراکنندگی بالای نور تابیده شده می شود و با تیترا سورفکتانت به محلول ها میزان پایداری نانوحامل در برابر متلاشی شدن و ترکیدن کاهش می یابد. لیپوزوم در برابر افزایش غلظت سورفکتانت به سرعت از هم پاشیده شد و شدت پراکنش آن ها (جذب ظاهری) کاهش یافت، اما همین عمل در سرازوم با مقاومت بیشتری مشاهده شد. این آزمایش با بررسی سنتیک رهایش رنگ هیدروفوب فلورسانسی کورکومین بارگذاری شده در بخش آب گریز نانوحامل مجدداً انجام شد.

همان طور که در شکل (۸ ب) قابل مشاهده است، در دو دقیقه ابتدای آزمایش شدت فلورسانس رنگ از هر دو نانوحامل یکسان است.

در بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (FE-SEM) مشاهده شد که سرازوم نسبت ۵:۵ می تواند مورفولوژی اصلی خود را حتی در ولتاژ نسبتاً بالا حفظ کند. مورفولوژی سرازوم ها تقریباً کروی با سطح صاف بوده که دارای پراکندگی اندک، اندازه یکنواخت و قطر متوسط آن ها تقریباً ۳۳۰ نانومتر می باشد که مطابق با قطر هیدرودینامیک تعیین شده توسط روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) می باشد (شکل ۷).

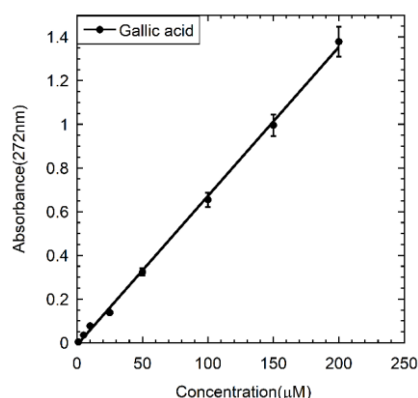
۳-۳ بررسی پایداری سرازوم

پایداری لیپوزوم ها به عنوان سیستم های انتقال دارو بسیار حائز اهمیت است. حامل های دارویی با پایداری بالا نه تنها از رهایش زود هنگام دارو جلوگیری می کنند، بلکه باعث افزایش اثر درمانی و کاهش عوارض جانبی می شوند. باین حال، لیپوزوم های معمولی به دلیل سیالیت بالای غشای دولایه آنها، ثبات کلوئیدی ضعیفی در برابر ذخیره سازی و رهایش سریع داروهای محلول در آب نشان داده اند که این امر نیاز به تهیه نانو حامل های لیپوزومی جدید با افزایش پایداری برای رهایش دارو با کنترل بیشتر است. میزان پایداری سرازوم های سنتزی در مقایسه با لیپوزوم به کمک سورفکتانت تریتون ایکس-۱۰۰ که یک سورفکتانت غیر یونی به عنوان عامل حل کننده و زیکول های دولایه لیپیدی می باشد که اندازه گیری پراکنش



شکل ۸. نمودار مقایسه پایداری سرازوم و لیپوزوم توسط الف) طیف پراکندگی نانوحامل‌ها (۶۰۰ نانومتر)؛ ب) نشر فلورسانس کورکومین کپسوله شده در نانوحامل‌ها (۵۲۰ نانومتر).

غلظت‌های مجهول آن تهیه و معادله خط رگرسیون $y = 0.0068277X + 0.010196$ ($R^2 = 0.99936$) و ضریب تعیین (شکل ۹). سپس، سرازوم حاوی گالیک اسید در نسبت‌های مختلف دارو به سرازوم (۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰) سنتز کرده و گالیک اسید آزاد و کپسوله نشده به روش کیسه دیالیز (۱۲ کیلوالتونی) به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد.



شکل ۹. نمودار کالیبراسیون گالیک اسید

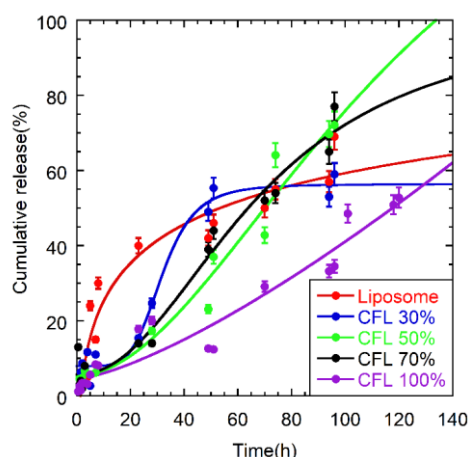
سپس، حجم مشخصی از سرازوم حاوی گالیک اسید با متانول به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد. غلظت داروهای موجود با احتساب فاکتور رقت به کاررفته و با کمک

اما با اضافه کردن غلظت مشخصی از سورفکتانت در دقیقه سوم آزمایش، تفاوت فاحشی در شدت فلورسانس ایجاد می‌شود. نانوحامل سرازوم نشر کمتری نسبت به لیپوزوم از خود نشان داده است که ناشی از رهايش کمتر ترکیب فلورسانس بارگذاری شده می‌باشد و به همین جهت در مواجهه با سورفکتانت پایداری بیشتری دارد. نتایج بیانگر این است که تشکیل شبکه سیلوکسان بر روی سطح سرازوم باعث القا یک بی‌نظمی در لیپیدهای غشاء سرازوم می‌شود، که این تغییر کاهش انتقال فاز لیپیدی را به همراه دارد. در حضور تریتون ایکس-۱۰۰ برای سرازوم، فاز پارامترهای انتقال در مقایسه با پارامترهای بدون تریتون ایکس-۱۰۰ تغییر چندانی نداشتند که نشان می‌دهد مولکول‌های تریتون به ندرت به سرازوم نفوذ می‌کنند تا وزیکول‌های حاوی زنجیره‌های آلکیل را مختل کنند، از این جهت می‌تواند یک نانوحامل مناسب جهت دارورسانی باشد.

۳-۴ محاسبه بارگذاری و کارایی بارگذاری گالیک اسید از نانو حامل

برای تعیین میزان بارگذاری و کارایی بارگذاری دارو در سرازوم، ابتدا نمودار استاندارد گالیک اسید برای تعیین

پلاتو رسید. در خصوص سرازوم ۵۰ درصد و ۷۰ درصد که رفتاری شبیه هم از خود نشان داده و حدود ۱۰ درصد دارو خود را در ۲۴ ساعت اول و ۵۰ درصد دارو بارگذاری خود را پس از ۷۲ ساعت آزاد می‌کند که کند بودن روند آزادسازی در این نانوحامل در مقایسه با لیپوزوم به دلیل حضور شبکه سیلوکسان در سطح و سیالیت کمتر غشا سرازوم می‌باشد. وجود چنین شبکه‌های پلی سیلوکسان هیدرولیز شده سرازوم می‌تواند نفوذپذیری غشا را کاهش دهد و کانال‌های انتشار دارو را مسدود کند و تا حدی مسئول آزادسازی پایدارتر گالیک‌اسید از سرازوم باشد.



شکل ۱۰ نمودار رهائش گالیک‌اسید در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۴.

نمودار استاندارد تعیین شد. جدول ۲ نتایج حاصل از میزان بارگذاری و کارایی بارگذاری را با استفاده از رابطه ۱ و ۲ نشان می‌دهد که در نتیجه نسبت ۱:۱۰ بازده بالاتری از خود نمایش داده و برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

۳-۵ سینتیک رها سازی گالیک‌اسید کپسوله شده در سرازوم

رها سازی گالیک‌اسید از نانوحامل تهیه شده در فواصل زمانی مشخص و در مدت‌زمان ۱۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. در صد تجمعی گالیک‌اسید رها شده مطابق شکل ۱۰ تعیین شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در نانوحامل لیپوزوم در ساعات اولیه رهائش انفجاری را نشان داد و حدود ۴۰ درصد از گالیک‌اسید بارگذاری شده در ۲۴ ساعت اول رها می‌شود و نمودار آن به پلاتو می‌رسد که به دلیل ناپایداری و سیالیت بیشتر غشا نانوحامل لیپوزومی در مقایسه با نانوحامل سرازومی بسیار سریع‌تر انجام می‌شود. اما نانوحامل سرازوم با ۱۰۰ درصد CFL پس از ۲۴ ساعت حدود ۵ درصد داروی خود را رها کرده است و پس از گذشت ۱۴۰ ساعت به پلاتو نرسید. همچنین، سرازوم با ۳۰ درصد CFL، رفتاری شبیه لیپوزوم از خود نشان داد و پس از ۲۴ ساعت حدود ۵۰ درصد گالیک‌اسید خود را آزاد کرده و پس از ۴۸ ساعت به

جدول ۲ درصد بازده بارگذاری و بارگیری سرازوم در نسبت‌های مختلف دارو: لیپید.

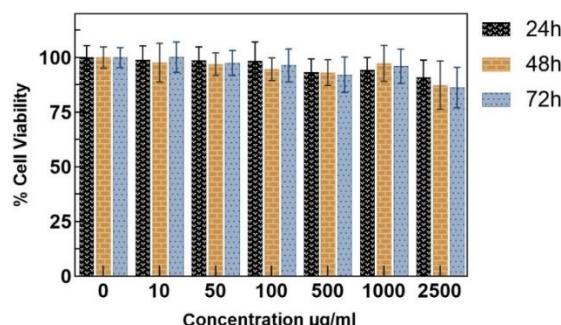
دارو: لیپید	۱:۵	۱:۱۰	۱:۲۰
بازده بارگذاری %	۳۱±۳/۵	۳۴±۵/۵	۳۹/۵±۳/۲
بازده بارگیری %	۶/۸۸±۰/۷	۳/۷۸±۰/۶	۲/۱۹±۰/۲

تغییر فعالیت میتوکندریایی با استفاده از مشتقات نمک تترازولیوم مشخص می‌شود. نانوحامل‌های سرازوم در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی بر روی رده سلولی Caco-2 سمیت نشان نداده است. به عبارت دیگر، سرازوم‌ها بر

۳-۶ بررسی سمیت سلول‌ها در محیط برون تنی

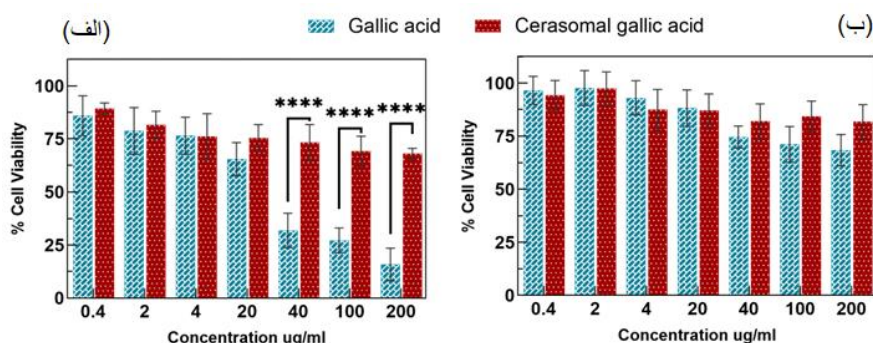
یکی از پارامترهای نشان دهنده سمیت سلولی، میزان فعالیت متابولیسمی ناشی از فعالیت میتوکندریایی، سیتوکرومی سلول‌های زنده یا آنزیم‌های سلولی می‌باشد.

فعالیت متابولیسمی میتوکندری و متابولیسمی کلی سلول بی تأثیر می‌باشند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱ بررسی سمیت نانوحامل سرازوم بر روی رده سلولی Caco-2.

پس از اطمینان از عدم سمیت سرازوم فاقد دارو، سمیت گالیک‌اسید کپسوله شده در سرازوم و همچنین گالیک‌اسید



شکل ۱۲ مقایسه سمیت سلولی گالیک‌اسید آزاد و گالیک‌اسید کپسوله شده در سرازوم با استفاده از آزمون MTT برای رده سلولی Caco2 در (الف) ۷۲، (ب) ۲۴ ساعت (غلظت گالیک‌اسید آزاد = غلظت گالیک‌اسید کپسوله شده).

است. همچنین، در مطالعات گذشته از نانوذره سیلیکا برای انتقال داروهای کورتیکواستروئید مانند بودزوناید^۱ به سلول‌های التهابی روده استفاده شده است. اما سیلیس به دلیل چگالی و سمیت بالا می‌تواند برای مخاط روده اثرات جانبی داشته باشد. بنابراین، نانوحامل سرازوم سنتز شده در این مطالعه علاوه بر سازگاری بالا، چگالی پایین و رهایش آهسته دارو برای سلول‌های هدف التهابی روده،

لیپید سنتز شده سرازوم (CFL) مورد استفاده در پژوهش‌های سایر محققین بر پایه ترکیبات شیمیایی مانند دی‌هگزادسیل آمین، سوکسینات دی‌هیدرات، بروموهگزادکان، برمودودکان می‌باشد [۱۰، ۱۴، ۱۷]. اما در این پژوهش از ترکیب طبیعی اسید اولئیک استفاده شد که علاوه بر سنتز آسان‌تر نسبت به سایر روش‌ها، سبب بهبود زیست سازگاری و افزایش انعطاف پذیری حامل شده

¹ Budesonide

مناسبی جهت دارورسانی به سلول‌های التهابی روده باشد. با این حال، پیشنهاد می‌شود که مشاهده جذب سلولی در شرایط آزمایشگاهی و سنجش توزیع بافت در داخل بدن مورد بررسی قرار گیرد.

۵- منابع

- [1] Z. Vaezi et al. 2022. "Hemoglobin bio-adhesive nanoparticles as a colon-specific delivery system for sustained release of 5-aminosalicylic acid in the effective treatment of inflammatory bowel disease," *Int. J. Pharm.*, vol. 616, no. January, p. 121531.
- [2] F. Magro, G. Cordeiro, A. M. Dias, and M. M. Estevinho. 2020. "Inflammatory Bowel Disease – Non-biological treatment," *Pharmacol. Res.*, vol. 160.
- [3] S. Sadeghi Mohammadi, Z. Vaezi, B. Shojaedin-Givi, and H. Naderi-Manesh. 2019. "Chemiluminescent liposomes as a theranostic carrier for detection of tumor cells under oxidative stress," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1059, pp. 113–123.
- [4] X. Wang, F. Li, S. Liu, and M. T. Pope. 2005. "New liposome-encapsulated-polyoxometalates: Synthesis and antitumoral activity," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 99, no. 2, pp. 452–457.
- [5] C. Allen et al. 2002. "Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol)," *Biosci. Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 225–250.
- [6] X. Yue and Z. Dai, 2014. "Recent advances in liposomal nanohybrid cerasomes as promising drug nanocarriers," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 207, no. 1, pp. 32–42.
- [7] K. Katagiri, "1999_chemistry letters_1st.pdf," *Chem. Lett.*
- [8] K. A. B. S. H. Lone, Shakeel-U-Rehman. 2016. "Methyl Esters as Effective Antioxidants," *Drug res*, no. 2194–9379, pp. 4–10.
- [9] N. Nayeem and A. SMB. 2016. "Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development," *J. Appl. Pharm.*, vol. 08, no. 02, pp. 8–11.
- [10] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. DiLabio, 2001. "Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 6, pp. 1173–1183.
- [11] K. Katagiri, M. Hashizume, K. Ariga, T. Terashima, and J. I. Kikuchi. 2007. "Preparation and characterization of a novel organic-inorganic nanohybrid 'cerasome' formed with a liposomal membrane and silicate surface," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 13, no. 18, pp. 5272–5281.

سمیتی بر روی سلول‌های مخاط روده نشان نداده و تا حد زیادی از عوارض جانبی گالیک‌اسید بر روی سلول‌های غیرالتهابی روده جلوگیری می‌کند. ترکیبات مغناطیسی، آمونیوم بی‌کربنات، داروهای سرطانی مانند دوکسوروبین، پاکلی تاکسل در نانوحامل سرازوم بارگذاری و برای اهداف مختلف استفاده شده است [۱۳، ۱۸، ۱۹]. در پژوهش حاضر، ترکیب زیست‌فعال گالیک‌اسید برای اولین بار در نانوحامل سرازوم بارگذاری شده تا تأثیراتی مانند سازگاری بیشتر، کاهش عوارض جانبی و مقاومت دارویی در روده مشاهده شود. در مطالعه دیگری Karatas، از این ترکیب بر روی نانوحامل‌های مختلف مانند لیپوزوم برای بررسی کاهش التهاب استفاده کرد [۲۰]. در مطالعه دیگری که توسط کَلپ و همکاران انجام گرفت، از گالیک‌اسید با حامل سدیم آلزینات برای درمان سرطان کلون استفاده شده است [۲۱]. همچنین، از نانوحامل‌های مختلفی از جمله، پلیمر، طلا، نقره، روی و مواردی دیگر برای انتقال گالیک‌اسید استفاده شده است. اما این حامل‌ها مشکلات متعددی از جمله بارگذاری کم، سمیت بالا، عدم زیست تخریب پذیری و عدم پایداری را از خود نشان دادند. در حالی که در پژوهش حاضر با استفاده از سرازوم، توانستیم به اهدافی چون بارگذاری مناسب گالیک‌اسید، رهایش آهسته و هدفمند و پایداری بالا به همراه سازگاری بالا دست یابیم.

۶- نتیجه‌گیری

نانوحامل هیبریدی آلی-معدنی به نام سرازوم از یک ساختار دولایه لیپوزومی و یک پوشش سیلیکات در سطح برخوردار است. این نانو حامل پایداری فیزیکی و شیمیایی بیشتری نسبت به لیپوزوم نشان می‌دهد که رهایش دارویی آهسته‌تر و جلوگیری از تجزیه دارو را شامل می‌شود. همچنین، سرازوم می‌تواند مدت‌زمان بیشتری در گردش خون باقی بماند و دارو خود را به‌صورت پایدارتر و آهسته‌تر از لیپوزوم آزاد کند. در نتیجه سرازوم می‌تواند کاندید

2019. "Hybrid Cerasomes Composed of Phosphatidylcholines and Silica Networks for the Construction of Vesicular Materials with Functionalized Shells," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 2, no. 12, pp. 7549–7558.
- [18] S. Sun et al. 2019. "Bubble-manipulated local drug release from a smart thermosensitive cerasome for dual-mode imaging guided tumor chemophotothermal therapy," *Theranostics*, vol. 9, no. 26, pp. 8138–8154.
- [19] D. V. Pryazhnikov, O. O. Efanova, and I. V. Kubrakova. 2019. "Cerasomes containing magnetic nanoparticles: synthesis and gel-filtration chromatographic characterization," *Mendeleev Commun.*, vol. 29, no. 2, pp. 226–228.
- [20] O. Karatas and F. Gevrek. 2019. "Gallic acid liposome and powder gels improved wound healing in wistar rats," *Ann. Med. Res.*, vol. 26, no. 12, p. 2720.
- [21] A. G. Sagdicoglu Celep, A. Demirkaya, and E. K. Solak. 2020. "Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer," *Curr. Appl. Phys.*
- [12] M. Hashizume, S. I. Kawanami, S. Iwamoto, T. Isomoto, and J. I. Kikuchi. 2003. "Stable vesicular nanoparticle 'Cerasome' as an organic-inorganic hybrid formed with organoalkoxysilane lipids having a hydrogen-bonding unit," *Thin Solid Films*, vol. 438–439, no. 03, pp. 20–26.
- [13] Z. Cao, Y. Ma, X. Yue, S. Li, Z. Dai, and J. Kikuchi. 2010. "Stabilized liposomal nanohybrid cerasomes for drug delivery applications," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 29, pp. 5265–5267.
- [14] X. Liang et al. 2013. "Design and synthesis of lipidic organoalkoxysilanes for the self-assembly of liposomal nanohybrid cerasomes with controlled drug release properties," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 19, no. 47, pp. 16113–16121.
- [15] Y. Jin, X. Yue, Q. Zhang, X. Wu, Z. Cao, and Z. Dai. 2012. "Cerasomal doxorubicin with long-term storage stability and controllable sustained release," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 9, pp. 3372–3380.
- [16] Z. Cao, X. Yue, Y. Jin, X. Wu, and Z. Dai. 2012. "Modulation of release of paclitaxel from composite cerasomes," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 98, pp. 97–104.
- [17] D. Zhang, H. R. Culver, and C. N. Bowman.

Synthesis of Cerosome nanoparticles and investigation of the stability and the release of loaded-Gallic acid as bioactive compound

Seyed Mohammad Reza Mortazavi¹, Zahra Vaezi^{2*}, Hossein Naderi-Manesh^{1*}

1. Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Bioactive compounds, Faculty of Interdisciplinary Science and Technologies, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

naderman@modares.ac.ir, Zahra.vaezi@modares.ac.ir

Receipt: 2022/04/18

Accepted: 2022/06/27

Abstract

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract. Despite numerous endeavors over the past few years, as well as an increase within the number of patients with the disease, there are currently limited medications available to manage intestinal inflammation. Designing a new biological treatment using natural bioactive medications with fewer side effects and more secure transmission than chemical compounds could be advantageous. In this study, a new strategy for the controlled release of Gallic acid as a bioactive polyphenol with anti-inflammatory impacts was proposed. This bioactive compound was loaded on a Cerosome nanocarrier and its stability was investigated. Cerosome-forming lipid (CFL) was synthesized through a two-step chemical reaction and then the Cerosomes were prepared by thin layer hydration by distinctive proportions of DPPC: CFL mole ratio. Cerosome with a mean diameter of 335 nm and zeta potential of -23 mV were homogeneous. The optimal formulation of the Cerosomal gallic acid system shows 34% loading and controlled release of the medication in gastrointestinal fluid environments. Structural stability was systematically evaluated by physicochemical characterization methods, and Cerasomes showed greater stability than liposomes and could be present longer in the bloodstream. These results indicate that Cerasomes can be a better medication delivery system for long-term storage and controllable release of gallic acid and have remarkable applications as carriers of intestinal inflammation drug delivery.

Key words: Cerosome, Gallic acid, Sustained release, Inflammatory Bowel Disease, Drug delivery