

## مقاله تحقیقی

# تهیه نانوذرات مغناطیسی زیست تخریب پذیر حاوی انسولین برای استفاده در دارو رسانی خوراکی

سودابه داوران<sup>۱</sup>، حبیبه رحیمیان<sup>۲\*</sup>

۱. دانشیار شیمی آلی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، تبریز، ایران
۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: حبیبه رحیمیان، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران  
پست الکترونیکی: ailrahim2008@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی- دارویی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۶

## چکیده

هدف از این مطالعه، تهیه نانوذرات مغناطیسی حاوی انسولین است که می‌تواند سبب پایداری این داروی پپتیدی و افزایش جذب خوراکی آن شود. کوپلیمرهای زیست تخریب‌پذیر پلی لاکتید-کو- گلیکولید- پلی اتیلن- گلیکول (PLGA-PEG-PLGA) با روش پلیمریزاسیون حلقه‌گشای مونومرهای لاکتید و گلیکولید در حضور PEG تهیه شده‌اند. ساختار این تری بلاک پلی‌استر- پلی‌ال‌ها توسط FT-IR و H-NMR تعیین شده‌اند. نانوذرات مغناطیسی لود شده با انسولین با استفاده از متد امولسیون دوگانه تبخیر- حلال (w/o/w) تهیه شدند. لود دارو و کارایی انکپسولاسیون به وسیله دستگاه HPLC ارزیابی شدند. اندازه و مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) و نانوذرات مغناطیسی لود شده با دارو، با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی TEM و SEM مطالعه شده‌اند. رفتار آزاد شدن دارو از نانوذرات لود شده با انسولین در شرایط فیزیولوژیکی ( $37^\circ\text{C}$  ,  $\text{pH}=7.2$ ) به صورت *in vitro* مطالعه شده است. نتایج نشان دادند که این سیستم در سرعت کنترل شده با کاهش رهش انفجاری اولیه، منجر به آزاد شدن انسولین می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** زیست تخریب‌پذیر، انسولین، پلی - لاکتید - کو- گلیکولید، نانوذرات مغناطیسی

## مقدمه

نیمه‌عمر دارو در مایعات بدن، به حداکثر رساندن بهره‌دهی درمانی و به حداقل رساندن عوارض جانبی این داروها به عمل آمده است (۵-۲). پلی‌استرهای زیست تخریب‌پذیر پلی‌لاکتید-کو- گلیکولید (PLGA) که توسط FDA تایید شده‌اند، توجه بیشتری را به این منظور به خود اختصاص داده‌اند، اما وارد نمودن ماکرومولکول‌های آب‌دوست مانند پلی‌پپتیدها به داخل این پلیمرها با مشکلاتی از قبیل لودینگ پایین دارو و رهش ناکافی آن از حامل،

یکی از مهم‌ترین داروهای موجود در درمان بیماری دیابت، انسولین است. با توجه به مشکلات عمده اشکال دارویی موجود که اغلب تزریقی هستند، ساخت و طراحی اشکال جدیدتر و راحت‌تر انسولین چندین سال است که مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱).

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای تهیه نانوذرات حامل داروهای پروتئین - پپتید به منظور افزایش پایداری این داروها در شیره گوارشی، افزایش

Kissel و Breitenbach رهش داروی پروتئینی را از میکروسفرهای قابل هیدرولیز حاوی پلیمرهای هیدروفیل نظیر پلی ساکاریدهای پیوندشده با PLA یا PLGA، مورد بررسی قرار دادند. این مطالعات نشان داد که فاز اولیه رهش دارو از ماتریکس‌های زیست تخریب پذیر بر پایه انتشار صورت می گیرد و فاز رهش نهایی، توسط تخریب پذیری و فرسایش پلیمر تخریب پذیر تعیین می شود. به خاطر این ویژگی، اجرای پروفایل رهش پیوسته برای داروهای پروتئینی و پپتیدی از ماتریکس‌های زیست تخریب پذیر مشکل است (۱۹).

Hennink و همکاران، رهش پروتئین‌هایی مانند لیروزیم، ایمونوگلوبین و آلبومین را از هیدروژل‌های دکستران که به صورت فیزیکی از طریق تشکیل کمپلکس فضایی اولیگو L-لاکتید و D-لاکتید اتصال عرضی یافته بودند، بررسی نمودند که با محدودیت‌های زیر همراه بود (۲۰):

- رهش پروتئین‌های با قطر بزرگتر، به عنوان مثال، ایمونوگلوبولین‌ها، توسط انتشار فیزیکی و تخریب پذیری کنترل می شود و از سینتیک درجه صفر تبعیت نمی کنند.

- درصد رهش پروتئین از این سیستم کم است که به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی هیدروژل‌های مورد استفاده، نظیر محتوای آب اولیه و پایداری کمپلکس فضایی بستگی دارد.

- رهش انفجاری اولیه به علت جذب سطحی پروتئین در این سیستم بسیار زیاد است.

برای افزایش جذب خوراکی داروهای پروتئین-پپتید، از روش‌های مختلفی استفاده شده است. به عنوان مثال، از افزایش دهنده‌های جذب خوراکی استفاده می شود (۲۱). اما اغلب عوارض جانبی و توکسیک از جمله اختلال در رشته‌های اکتین، اختلال در اتصالات محکم و اختلال در اتصالات سلولی را نشان می دهند (۲۲).

شرکت Emisphere technologies نیز یک سری حامل‌های انتقال دهنده را طراحی کرده که به پلی پپتید متصل شده و ساختمان پلی پپتید را به فرم با قابلیت انتقال بالا تبدیل کرده است. این مولکول‌ها جذب داروهای پروتئین-پپتید را افزایش می دهند،

همراه بوده است. با استفاده از روش امولسیون دوگانه، مشکل مربوط به بارگیری ناکافی تا حدود زیادی حل شده است. وارد نمودن بخش‌های آبدوست مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG) به ساختمان PLGA نیز منجر به تولید پلیمرهای حساس به دما و pH شده است (۶). ایراد عمده این سیستم، ماندگاری کم دارو در روده و جریان خون است (۷). کوانکپسولاسیون (coencapsulation) نانومغناطیسی با انسولین در لیپوزوم‌ها یا با میکرونانوپارتیکل‌ها برای دارو رسانی خوراکی استفاده شده تا ماندگاری دارو را افزایش دهد. استفاده از میکرونانوپارتیکل‌های مغناطیسی روش جدیدی برای انتقال روده‌ای انواع داروهاست (۸،۹).

از همان سال‌های ابتدایی بعد از کشف انسولین، راه‌های جایگزین برای تزریق زیرجلدی این دارو مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت که در این میان، تجویز پوستی، خوراکی، از راه بینی و دارو رسانی از راه ریه، بیشتر از بقیه مورد توجه بوده است (۱۰، ۱۱). از بین این روش‌ها، دارورسانی از راه ریه، به مرحله استفاده بالینی رسیده است و از سال ۲۰۰۶، یک فرآورده دارو رسانی انسولین (Exubera) از راه ریه توانست مجوز لازم برای ورود به بازار را از اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) و کمیسیون اروپا (EC) دریافت کند (۱۲). مطالعات نشان می دهند استفاده از Exubera در افراد با بیماری‌های کنترل نشده ریوی، افراد سیگاری و افرادی که بیماری‌های مزمن ریوی مانند آسم دارند، با منع مصرف مواجه است. همچنین، تست عملکرد ریوی به صورت دوره‌ای در طول درمان با این دارو پیشنهاد شده است (۱۳-۱۶). علاوه بر این، شواهدی برای افزایش ایجاد آنتی‌بادی ضدانسولین در انسولین استنشاقی دیده شده است (۱۷، ۱۸).

دارو رسانی خوراکی داروهای پپتیدی در مقایسه با سایر روش‌های تجویز، فواید زیادی به همراه دارد. غیرتهاجمی بودن و عاری بودن از تداخلات ناشی از فرآیندهای استریل‌سازی برای فرآورده‌های تزریقی، سهولت کاربرد و تنظیم راحت غلظت و هزینه کم، سبب مقبولیت بیشتر این روش در مقایسه با روش تزریقی شده است.

انواع نمک‌های مورد استفاده (مثل کلریدها، سولفات‌ها و...) و نسبت  $Fe^{+3}$  و  $Fe^{+2}$ ، pH و قدرت یونی محیط بستگی دارد. محدوده‌های بین ۱۰ تا ۱۰۰، اندازه‌های مطلوب برای این نانوذرات هستند، چون در اندازه‌های بزرگ‌تر از این، ذرات تمایل به آگلومره شدن دارند و پروتئین‌های پلاسما را جذب می‌کنند (۲۶).

در این تحقیق ما سعی کردیم با تهیه نانوذرات مغناطیسی پلیمری هوشمند، بر مشکلات دارورسانی پروتئین-پپتید فائق آمده و فراهمی زیستی این داروها را در مصرف خوراکی افزایش دهیم.

### مواد و روش‌ها

مونومر L-لاکتید (L-lactide) از شرکت Sigma و مونومر گلیکولید (glycolide) از شرکت Purac هلند خریداری شدند. پلی‌اتیلن گلیکول با جرم مولکولی متوسط 2000 (PEG<sub>2000</sub>) و جرم مولکولی 4000 (PEG<sub>4000</sub>)، از شرکت شیمیایی Merck فراهم شده بود. انسولین گاوی مورد نیاز برای پژوهش، از sigma-aldrich خریداری شد. پلی‌وینیل‌الکل (PVA) با جرم مولکولی ۷۲۰۰۰ دالتون، از شرکت Merck و دی‌کلرومتان (DCM) با درجه سنتزی، از شرکت شیمیایی Merck تهیه گردید.  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  و  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  و  $NH_3 \cdot H_2O$  هم از شرکت شیمیایی Merck خریداری شد. ساختمان شیمیایی کopolymerها با استفاده از دستگاه FT-IR (Shimadzu 8400, Japan) و H-NMR (Bruker AC 80, USA) شناسایی شدند. جرم مولکولی و توزیع جرم مولکولی (اندیس دیسپرسیته  $Mw/Mn$ ) به وسیله کروماتوگرافی ژل-تراوا (GPC, Waters 515 HPLC pump, USA) اندازه‌گیری شد. سانتریفوژ Avanti j-25 Beckman مدل (Beckman, Optima, USA) برای جداسازی نانوذرات، مورد استفاده قرار گرفت. فریز درایر (لیوفیلایزر) مدل (USA-Christ Alpha 1, 4) برای خشک کردن نانوذرات پس از سانتریفوژ، به کار گرفته شد. دستگاه pHسنج (Metrphm, pH Meter, 744

اما مکانیسم عمل آن هنوز به درستی مشخص نیست. در مطالعات بالینی، قرص‌های انسولین تولیدی توسط شرکت Emisphere technologies باعث کاهش گلوکز خون بعد از غذا در افراد دیابت نوع II شدند (۲۳). اما افزایش نفوذپذیری داروها از لوله گوارش می‌تواند منجر به تغییرات در غشاء، برای مثال آسیب موکوسی شود، بدون این‌که مستقیماً از تخریب دارو جلوگیری کند.

محدودیت‌های فوق نشان می‌دهد که هنوز طراحی یک سیستم دارو رسانی خوراکی مناسب برای داروهای پروتئین-پپتید به‌ویژه انسولین، موضوعی چالش برانگیز است. نتایج حاصل از کاربرد هیدروژل‌های زیست تخریب پذیر بیانگر این موضوع است که در طی مراحل اولیه، رهش توسط پدیده انتشار تعیین می‌شود و با تخریب هیدروژل ادامه می‌یابد.

استفاده از بخش‌های هیدروفیل مانند PEG به عنوان یکی از دسته‌های (بلاک) سازنده زنجیر اصلی به فرم دودسته‌ای یا دی بلاک (PLGA-PEG) و یا سه‌دسته‌ای یا تری بلاک (PLGA-PEG-) سبب افزایش نفوذ هیدروفیل به ماتریکس (PLGA) می‌شود. نوع اخیر که معمولاً به صورت ABA نوشته می‌شود، خاصیت هیدروژلی و حساسیت حرارتی جالبی از خود نشان می‌دهد که باعث می‌شود پلیمر در دمای فیزیولوژیک ( $37^{\circ}C$ ) به حالت ژل باشد. تشکیل ژل، منجر به کنترل رهش و ایجاد سیستم‌های آهسته رهش دارویی می‌شود (۲۴، ۲۵). اگر این حساسیت حرارتی با خاصیت مغناطیسی ادغام شود، پلیمری با پاسخ‌پذیری کنترل شده، حاصل می‌شود (۲۵).

برای کاربردهای بیومدیکال، نانوپارتیکل‌های اکسید آهن دارای خاصیت مغناطیسی و اندازه کوچک‌تر از ۱۰۰nm به کار می‌رود. به علاوه، نانوذرات مغناطیسی غیرسمی، سازش پذیر و قابل انتقال به محل‌های هدف‌یابی شده در سیستم‌های دارورسانی هستند (۲۶).

اکسید آهن از طریق متد هم‌رسوبی محلول آب-دار نمک‌های  $Fe^{+2}$  و  $Fe^{+3}$  با افزودن باز، سنتز می‌شوند. کنترل اندازه، شکل و ترکیب نانوذرات، به

مونومرهای حلقوی لاکتید و گلیکولید همراه با پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی مشخص در نسبت-های مولی متفاوت و از پیش تعیین شده (جدول ۱) در یک بالن سه دهانه مجهز به ورودی و خروجی گاز ازت و یک درپوش با قابلیت جابه‌جایی، ریخته شدند. مخلوط مونومرها تا ذوب شدن کامل، توسط حمام روغن سیلیکون تا  $50^{\circ}\text{C}$  حرارت داده شد. در این زمان، جریان گاز بی‌اثر ازت نیز محیط واکنش را از هر گونه رطوبت و اکسیژن پاک‌سازی کرد. سپس به میزان  $0.5/1$  مول درصد کاتالیزور  $\text{Sn (oct)}$  از طریق درپوش به مخلوط اضافه شد. دما بین  $150^{\circ}\text{C}$  -  $130^{\circ}\text{C}$  تنظیم گردید و واکنش تحت هم‌زن مغناطیسی، برای مدت ۱۰-۸ ساعت ادامه یافت.

(Sweden) برای سنجش pH به کار رفت. دستگاه هم‌زن‌سایزر (Edmund Buhler HO 4AP, ) 20000 rpm برای تهیه نانوسوسپانسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه Waters 515 HPLC pump, USA با دتکتور UV-visible 2489، برای تعیین و آشکار کردن انسولین موجود در نانوپار تیکل‌ها استفاده گردید.

سنتز پلی‌استر- پلی‌ال‌های تری‌بلاک پلی- لاکتید-کو-گلیکولید- پلی‌اتیلن‌گلیکول (PLGA-PEG-PLGA)

جدول ۱- شرایط به کار رفته برای تهیه کوپلیمر سه دسته‌ای PLGA-PEG-PLGA

کوپلیمر	نسبت مولی LA:GA	PEG(Mw)	PEG(wt%)
1 P	75:25	2000	5
2 P	75:25	2000	10
3 P	50:50	2000	10
4 P	75:25	4000	5
5 P	75:25	4000	10
6 P	50:50	4000	10

نانوپار تیکل‌های اکسید آهن با روش هم‌رسوبی شیمیایی تهیه شدند. مقدار  $3/1736$  گرم از  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  و  $7/5684$  گرم از  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  در  $320$  ml آب دیونیزه حل می‌شود. این محلول مخلوط به مدت یک ساعت تحت گاز  $\text{N}_2$  در حرارت غیرمستقیم  $80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به‌هم‌زده شد. سپس  $40$  ml  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  به مخلوط تزریق گردید. مخلوط یک ساعت در دمای اتاق سرد شد. پار تیکل-های رسوب داده شده، ۵ بار با آب داغ، شسته و با روش سرریز کردن، جدا شدند.

تهیه نانوپار تیکل‌های مغناطیسی حاوی انسولین از پلیمرهای تهیه شده

برای تهیه نانوپار تیکل‌های حاوی انسولین، از روش اصلاح شده امولسیون دو گانه-تبخیر حلال استفاده شد. ابتدا پودر انسولین در محلول

دمای پلیمریزاسیون در تمام موارد فوق،  $160^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و زمان  $10$  ساعت و کاتالیزور اکتوات قلع با غلظت  $0/05$  wt % بود.

تعیین ساختمان شیمیایی پلیمرهای تهیه شده ساختار پلیمر سنتز شده، با طیف‌سنجی H-NMR و دستگاه FT-IR تایید گردید و وزن مولکولی متوسط وزنی و عددی پلیمرها با روش کروماتوگرافی نفوذ زلی (GPC) مجهز به آشکارگر ضریب شکست مولکولی روی دو ستون Styrogel HR4E 7.8300mm و Styrogel HR3E 7.8mm. 300mm که به صورت سری بسته شده بودند، اندازه‌گیری شد.

سنتز نانوپار تیکل‌های مغناطیسی ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

رویی، جدا و با HPLC آنالیز گردید تا مقدار انسولین رهش یافته از نانوپارتیکل‌ها تعیین شود.

### مطالعه پایداری دمایی انسولین

پایداری حرارتی انسولین، بر اساس روش مندرج در منابع علمی اندازه‌گیری شد (۲۷). حدود ۱ گرم از سوسپانسیون حاوی انسولین لود شده با نانوپارتیکل‌های مغناطیسی در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نانوپارتیکل‌ها جمع‌آوری و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. در فاصله‌های زمانی ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ ساعت، نمونه برداری صورت گرفت و ۱ ml بافر PBS اضافه شد و در ۴۰°C به مدت ۲۴ ساعت ذخیره گردید تا انسولین از نانوپارتیکل‌ها جدا شود. بعد، نمونه‌ها سانتریفیوژ شد و مایع رویی صاف گردید و توسط HPLC آنالیز شد تا مقدار انسولین باقی‌مانده در نمونه‌ها برآورد شود.

### نتایج

#### راندمان و جرم مولکولی کوپلیمرهای سه-دسته‌ای PLGA-PEG-PLGA

پلیمرهای خطی PLGA به کمک واکنش پلیمریزاسیون گشایش حلقه از مونومرهای لاکتید و گلیکولید و در حضور پلی‌اتیلن گلیکول و اکتوات‌قلع به عنوان کاتالیزور، به صورت کوپلیمر PLGA-PEG-PLGA مطابق با جدول ۲ تهیه شدند.

#### مشخصات طیفی کوپلیمر سه‌دسته‌ای PLGA-PEG-PLGA

ساختمان شیمیایی کوپلیمر به وسیله H-NMR و با استفاده از حلال کلروفرم دوتریه (CDCl<sub>3</sub>) بررسی گردید. تصویر ۱، طیف H-NMR پلیمر سنتز شده را نشان می‌دهد. پیک ناحیه  $\delta = 3/6$  ppm نشان‌دهنده -CH<sub>2</sub>- پلی‌اتیلن گلیکول، پیک ناحیه  $\delta = 4/8$  ppm مربوط به -CH<sub>2</sub>- گلیکولید، و پیک ناحیه  $\delta = 5/2$  ppm مربوط به

HCL ۰/۰۱N حل شد و با افزودن محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار، در pH=4 تنظیم شد و به محلول دی‌کلرومتان حاوی پلیمر و نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> اضافه گردید و بعد از یکبار هموژنیزه کردن در دور ۲۰۰۰۰ rpm و به مدت ۶۰ ثانیه، امولسیون اولیه w/o تشکیل شد. این امولسیون به محلول آبی پلی‌وینیل‌الکل (PVA) اضافه شد و برای بار دوم تحت هموژنایزر در دور ۲۰۰۰۰ rpm و به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفت. بعد از تشکیل امولسیون دوم w/o/w حلال آلی تحت خلاء تبخیر گردید و نانوذرات حاصل، به وسیله سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شدند. محلول رویی نانوپارتیکل‌ها جدا گردید و به منظور آزمایش‌های بعدی، نگهداری شد.

#### تعیین میزان انسولین بارگذاری شده در نانوپارتیکل‌های مغناطیسی

برای تعیین مقدار انسولین بارگذاری شده در نانوپارتیکل‌ها، غلظت انسولین باقی‌مانده در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به وسیله دستگاه HPLC با دکتور UV در طول موج ۲۲۰ nm و با فاز متحرک شامل استونیتریل ۳۳ درصد، متانول ۵ درصد و بافر فسفات با pH=7/4 (۰/۶۲) و فاز ساکن Nocleozid C18 ساخت کارخانه Fenomenex اندازه‌گیری شد و کارایی انکپسولاسیون (EE%: encapsulation efficiency) محاسبه گردید.

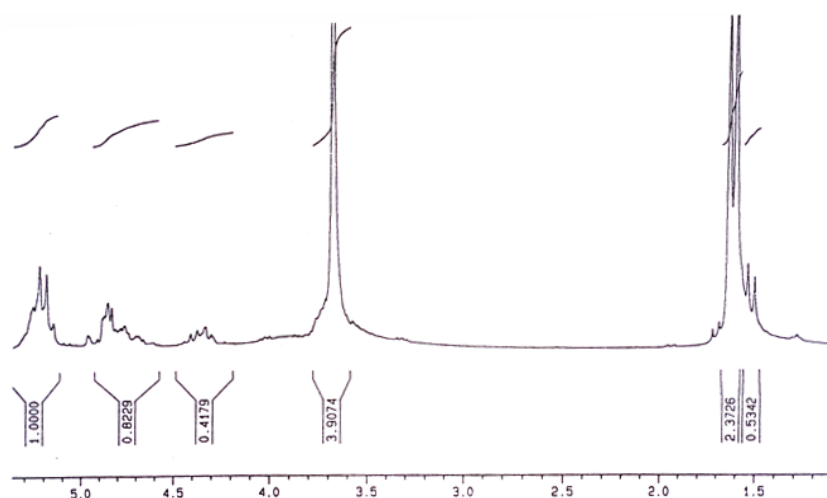
#### مطالعات *in vitro* روی نانوپارتیکل‌های تهیه شده

مطالعات ره‌ایش با مقادیر معینی از نانوپارتیکل‌های انکوبه شده در ۲۰ ml از PBS ۰/۱ مولار با (pH=7.4) در ۳۷°C با استفاده از شیکر انکوباتور (Heidolph, Unimax 1010 Germany) انجام گرفت. در فاصله‌های زمانی معین، ۲۰ میکرولیتر نمونه با سمپلر برداشته شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع

CH- موجود در لاکتید است. لذا ایجاد پلیمر با ساختمان مشخص، اثبات می‌گردد.

جدول ۲- بهره پلیمریزاسیون و جرم مولکولی متوسط کوپلیمرهای سه‌دسته‌ای PLGA-PEG-PLGA

پلیمر	راندمان پلیمریزاسیون (%)	Mw (دالتون)	Mn (دالتون)	Mw/Mn	دمای زلی شدن (°C)
1 P	74.5	5845	4175	1.4	36.5
2 P	63.2	6813	3785	1.8	38
3 P	51.5	4513	2149	2.1	40.2
4 P	58.3	8271	4353	1.9	37
5 P	42.6	9343	3737	2.5	41.5
6 P	38.3	4218	1507	2.8	43



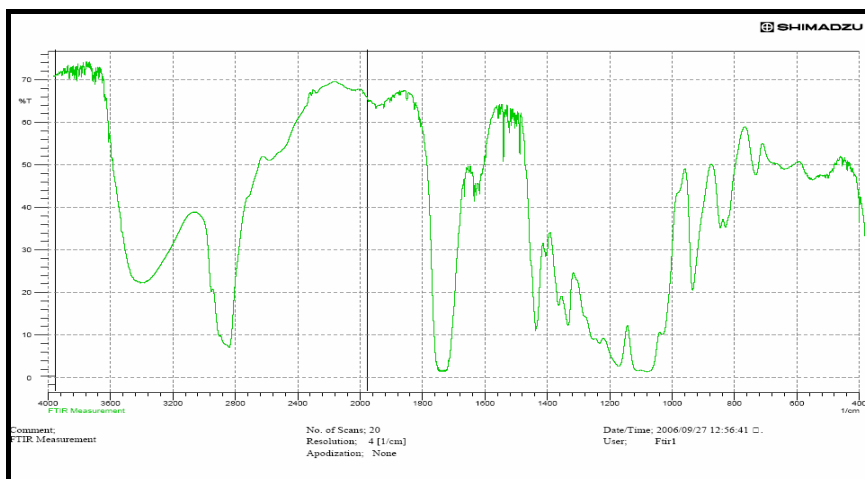
تصویر ۱- طیف H-NMR از پلیمر خطی PLGA-PEG. پیک ناحیه  $\delta = 3/6$  ppm نشان‌دهنده  $\text{CH}_2$ -پلی‌اتیلن‌گلیکول، پیک ناحیه  $\delta = 4/8$  ppm مربوط به  $\text{CH}_2$ -گلیکولید، پیک ناحیه  $\delta = 5/2$  ppm مربوط به CH- موجود در لاکتید است.

### خواص فیزیکی و شیمیایی نانوپارتیکل‌های مغناطیسی لود شده با انسولین

از بین ۶ پلیمر سنتز شده، دو کوپلیمر که با خلوص بیشتر و حساسیت دمایی نزدیک به دمای فیزیولوژیک ( $P_1$  و  $P_2$ ) به دست آمده بودند، برای لودینگ انسولین انتخاب شدند و به نانوذرات حاوی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و انسولین تبدیل شدند. خواص فیزیکوشیمیایی ذرات حاصل، از جمله اندازه ذرات و بهره انکسپولاسیون تعیین گردید. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

در طیف FT-IR تصویر ۲، باندهای جذبی مشخص این نوع کوپلیمرها نواحی 3000-2840  $\text{cm}^{-1}$  (ارتعاشات  $\text{CH}$ -پلی‌اتیلن‌گلیکول): -1765  $\text{cm}^{-1}$  (پیوند کربونیل استری): -1300  $\text{cm}^{-1}$  (پیوند  $\text{C-C-O}$ ): -1150-1085  $\text{cm}^{-1}$  (پیوند اتری  $\text{C-O-C}$ ) هستند.

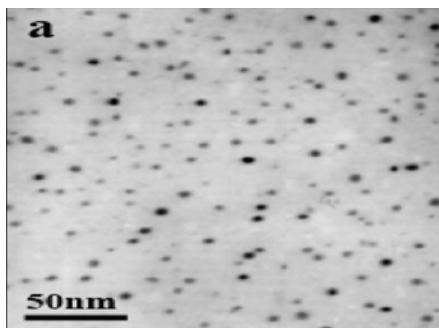
وجود این باندهای جذبی نشان می‌دهد که پلیمر خالص شده نهایی، دارای بلک‌های PLGA و PEG است. گروه‌های اسیدی انتهای زنجیرهای پلیمری نیز در حوالی  $3000-3100\text{cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود.



تصویر ۲ - طیف FT-IR کوپلیمر تری‌بلاک PLGA-PEG-PLGA. نواحی  $3000-2840 \text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات CH پلای اتیلن گلیکول):  $1765-1750 \text{ cm}^{-1}$  (پیوند کربونیل استری):  $1300-1090 \text{ cm}^{-1}$  (پیوند C-O-C):  $1150-1085 \text{ cm}^{-1}$  (پیوند اتری C-O-C) را نشان می‌دهد.

جدول ۳- خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات حاوی انسولین.

فرمولاسیون	نوع پلیمر	انسولین (wt%)	اندازه ذرات (nm)	بهره‌ی انکپسولاسیون (%)
1 F	1 P	10	290±41.5	76.3
2 F	1 P	5	150±25.6	54.2
3 F	4 P	10	190±21	63.4
4 F	4 P	5	120±16	48.5



تصویر ۳ - بررسی مورفولوژیک نانوپار تیکل‌های آماده شده: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نانوذرات مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

تصویر ۵ تصویر برش عرضی نانوپار تیکل‌های حاوی انسولین و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (فرمولاسیون F<sub>2</sub>) را نشان می‌دهد. به وضوح پیداست که نانوذرات، حالت core-shell دارند و نانوذرات مغناطیسی آهن که در هسته ذره قرار گرفته‌اند، توسط غشایی از پلیمر احاطه شده‌اند.

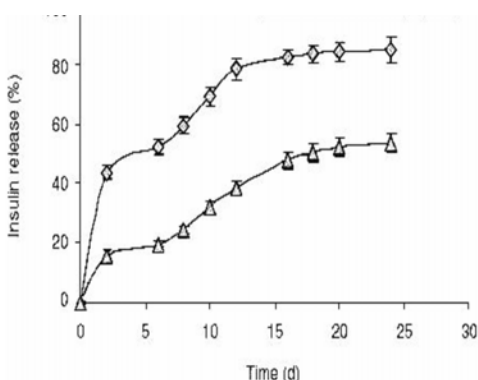
### نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپی

به منظور بررسی مورفولوژی سطحی نانوپار تیکل‌های حاوی انسولین، از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و جهت تعیین اندازه دقیق ذرات، از روش PSA استفاده شد. تصویر ۳ تصاویر TEM نانوذرات مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  خالص را نشان می‌دهد. تصویر معلوم می‌کند که اندازه نانوذرات کوچک‌تر از ۵۰ nm است که برای این پژوهش، ایده‌آل است.

تصویر ۴، تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات حاوی انسولین تهیه شده از فرمولاسیون F<sub>1</sub> را نشان می‌دهد. وارد شدن  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  به عنوان هسته‌ی مرکزی نانوپار تیکل‌ها باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود. اندازه ذرات در جدول ۲ مشخص شده است. اندازه‌گیری بهره انکپسولاسیون نشان داد که استفاده از  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در تهیه نانوپار تیکل درصد لود انسولین را افزایش می‌دهد که می‌تواند به علت وجود اثرات متقابل بین انسولین و گروه‌های عاملی OH- در  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  باشد.

## مطالعات *in vitro* رهش انسولین از نانوپار تیکل‌ها

تصویر ۶، پروفایل رهش انسولین از فرمولاسیون F<sub>1</sub> در pH خنثی که بیشترین بهره انکیپسولاسیون انسولین را دارد (~۷۰٪) نشان می‌دهد. رهش انسولین از نانوپار تیکل‌ها آهسته و پس از حدود ۲۵ روز، ۸۲ درصد دارو (در غیاب Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و حدود ۴۰ درصد انسولین (در حضور Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) آزاد می‌شود.



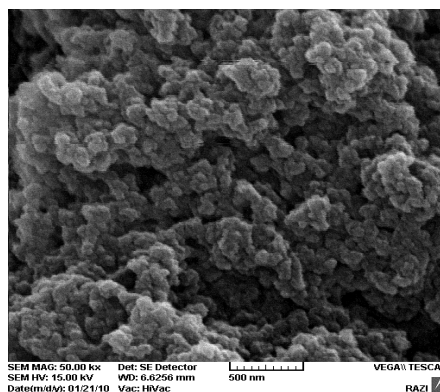
تصویر ۶ - پروفایل رهش انسولین از نانوپار تیکل‌ها در pH=7.2 از فرمولاسیون F<sub>1</sub> همراه با Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Δ) و بدون Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (◇).

این پروفایل رهش نشان می‌دهد که وارد نمودن Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> در فرمولاسیون، در مقایسه با فرمولاسیون‌های مشابه، منجر به دو اثر قابل ملاحظه در پروفایل رهش انسولین می‌شود:

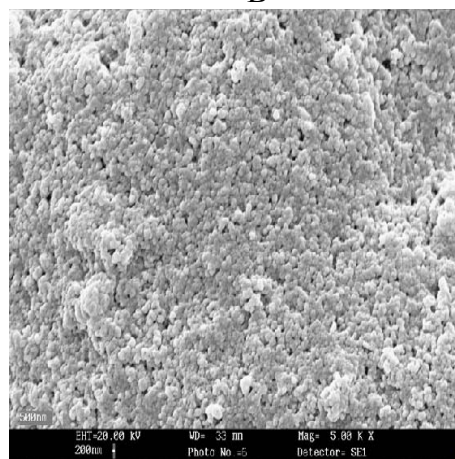
- (۱) تهیه‌ی سیستم آهسته رهش.
  - (۲) کاهش رهش انفجاری (کمتر از ۲۰ درصد پس از ۲ روز).
- این نتایج مطابق با یافته‌های قبلی است (۲۵، ۲۸، ۲۹).

## پایداری حرارتی انسولین موجود در نانوپار تیکل‌ها

پایداری حرارتی انسولین موجود در نانوذرات در ۶۰ درجه سانتی‌گراد با انسولین آزاد به عنوان شاهد (محلول انسولین ۰/۱ درصد در PBS) مقایسه می‌شود. در تصویر ۷، نمونه کنترل، فوراً تخریب می‌شود (حدود ۴۵ درصد بعد از ۲ ساعت). انسولین لود شده

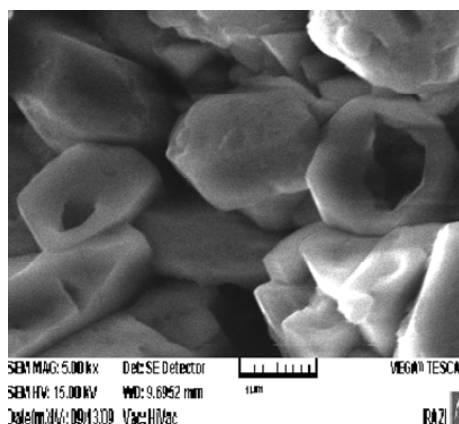


B



A

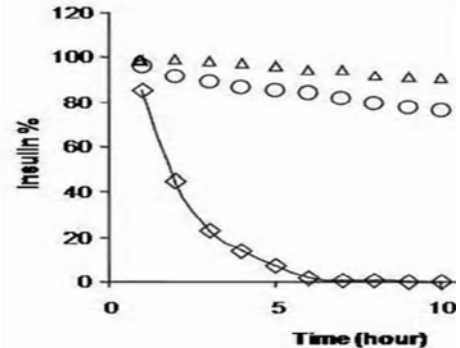
تصویر ۴ - تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نانوپار تیکل‌های حاوی انسولین تهیه شده از فرمولاسیون F<sub>1</sub> بدون Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) و با Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (B).



تصویر ۵ - تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM). برش عرضی نانوذرات حاوی Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> و انسولین تهیه شده از فرمولاسیون F<sub>2</sub>.



در نانوذرات پایدار باقی می ماند و ۸۵ درصد یا بیشتر بعد از ۱۲ ساعت آشکار می شود. همه نمونه های نانوذرات، توانایی مناسب محافظت انسولین را نشان می دهند.



تصویر ۷ - پایداری دمایی انسولین در نانوپارتیکل ها از فرمولاسیون F<sub>1</sub> در غیاب Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (O) و در حضور Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Δ) و در مقایسه با انسولین آزاد (◇) در ۶۰°C با loading دارویی ۵ درصد.

### بحث

با افزایش درصد PEG از ۵ به ۱۰ درصد بهره پلیمریزاسیون کاهش می یابد. این اثر، به جرم مولکولی PEG بستگی ندارد (مقایسه ی P<sub>1</sub> و P<sub>2</sub> و مقایسه ی P<sub>4</sub> با P<sub>5</sub> (جدول ۲)). اثر مستقیم بین افزایش درصد مولی PEG و افزایش جرم مولکولی مشاهده می شود. وقتی درصد مولی PEG از ۵ به ۱۰ درصد افزایش می یابد، جرم مولکولی پلیمر نهایی نیز افزایش پیدا می کند.

کاهش نسبت مولی LA/GA در P<sub>6</sub> و P<sub>3</sub> از ۳ به ۱ (نسبت به P<sub>1</sub> و P<sub>2</sub>) منجر به کاهش راندمان پلیمریزاسیون و کاهش جرم مولکولی پلیمر (Mw) (جدول ۲) می شود.

از آن جایی که برخی از میسل های پلیمری در دمای بدن به صورت هیدروژل در می آیند، استفاده از فرمولاسیون هیدروژل زیست تخریب پذیر و حساس به حرارت، تکنیک جالبی جهت طراحی سیستم های تحویل رسانی دارویی است. ضمناً به نظر می رسد

استفاده از افزایش دهنده های جذب جدیدتر و با کمیت کمتر هنوز می تواند زمینه تحقیقی مهمی در ارتباط با دارورسانی خوراکی داروهای پروتئین-پپتید باشد. بر این اساس، در این پروژه اقدام به طراحی نوعی هیدروژل حساس به دما با قابلیت لودینگ بالای انسولین با استفاده از افزایش دهنده جذب Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> شده است که در عین حال می تواند در مطالعات *in vivo* به عنوان سیستم هدفمند انسولین نیز مورد استفاده قرار گیرد و منجر به تهیه نوعی سیستم On-Off یا Switch on از انسولین باشد و از حساسیت هم زمان حرارتی-مغناطیسی سیستم بهره مند شود.

مجموعه نتایج نشان می دهد که استفاده از این سیستم دارورسانی، درصد لودینگ انسولین را افزایش داده است. اندازه نانوذرات مغناطیسی لود شده، حدود ۲۰۰-۳۰۰ است. افزایش بهره انکپسولاسیون انسولین تا حوالی ۷۷ درصد برای فرمولاسیون F<sub>1</sub> از موارد مهم این روش لودینگ به شمار می آید که در نتایج گزارش شده قبلی مشاهده نمی شود. وارد نمودن زنجیره های پلی اتیلن گلیکول با جرم مولکولی و درصد وزنی مناسب می تواند منجر به ارتقاء درصد لودینگ دارو در مقایسه با سایر روش های گزارش شده باشد. احتمالاً استفاده از نانوذرات مغناطیسی به عنوان افزایش دهنده جذب همچنین توانسته است درصد لودینگ انسولین را نیز افزایش دهد. همچنین، با تغییر برخی پارامترهای فرمولاسیون می توان اندازه ذره های را نیز کاهش داد و تا ۱۲۰ nm رساند.

### تقدیر و تشکر

از ستاد نانو ریاست جمهوری برای کمک مالی پروژه و اعضاء مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل انجام این پروژه تحقیقاتی در این مرکز سپاسگزاری می کنم.

### منابع مورد استفاده

1. - برترام ج، کاتزونگ. ۱۳۸۳. فارماکولوژی پایه و بالینی. ترجمه ملک اعلائی، علیرضا فتح‌الهی. انتشارات نسل فردا، تهران. جلد دوم، ویراست نهم ۲۰۰۴، ص. ۸۶۹-۸۷۸.
2. Carino, G. P., Mathiowitz, E., 1999. Oral insulin delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35: 249-257.
3. Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X., Kissel, T., 2000. Biodegradable nano-particle for oral delivery of peptides: Is there a role for polymers to affect mucosal uptake. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 147-160.
4. Del, F., Blanco-perieto, M., 2005. Polymeric particulars to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 10: 65-80.
5. D-lie, F., 1998. Evaluation of nano and micro-particles uptake by the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 34: 221-233.
6. Qiao, M., Chen, D., 2005. Injectable biodegradable temperature sensitive PLGA-PEG-PLGA copolymers: Synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer based hydrogeles. *International Journal of Pharmaceutics* 294: 103-112.
7. Butoescu, N., Seemayer, C. H. A., Palmer, G., Guerne, P., Gabay, C., Doelker, E., Jordan, O., 2009. Magnetically retainable microparticles for drug delivery to the joint: efficacy studies in an antigen-induced arthritis model in mice. *Arthritis Research & Therapy* 11: 34-39.
8. Chen, H. M., Langer, R., 1997. Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles. *Pharm Res* 14: 537-540.
9. Cheng, J. J., Teply, B. A., Jeong, S. Y., Yim, C. H., Ho, D., Sherif, I., 2006. Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs. *Pharm Res* 23: 557-564.
10. Hein, R. J., 2005. Unlocking the opportunity of thigh glycaemic control. *Promise ahead: The role of inhaled insulin in clinical practice. Diabetes, Obesity and Metabolism* 7: 19-23.
11. Korytkowski, M., 2002. When oral agents fail: Practical barriers to starting insulin. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 26: 18-24.
12. AL-tabakha, M. M., Arida, A. I., 2008. Recent-challenges in insulin delivery system: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70: 278-286.
13. Skyler, J. S., 2007. Two-year safety of inhaled human insulin (Exubera) in adult patient with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 30: 579-585.
14. Quattrin, T., Blanger, A., Bohanon, N. J., Schwartz, S. L., 2004. Efficacy and safety of inhaled insulin (Euxbra) compared with subcutaneous insulin therapy in patient with type 1 diabetes: result of 6-month, randomized comparative trial. *Diabetes Care* 27: 2622-2627.
15. Hollander, P. A., 2004. Efficacy and safety of inhaled insulin (Euxbra) compared with subcutaneous insulin therapy in patient with type 2 diabetes: result of 6-month, randomized comparative trial. *Diabetes Care* 27: 2356-2362.
16. Barnet, A. H., 2004. Euxbra inhaled insulin: A Review *International Journal of Clinical Practice* 58: 394-401.
17. Heise, T., 2005. The effect of insulin antibodies on the metabolic action of inhaled and subcutaneous insulin: A prospective randomizes pharmacodynamic study. *Diabetes Care* 28: 2161-2169.
18. Fineberg, S. E., Kawabeta, T., Finco-kent, D., liu, C., Krasner, A., 2005. Antibody response to inhaled insulin in patient with type 1 and type 2 diabetes. An analysis of initial phase II and III inhaled insulin (Euxbra) trials and a to year extension trial. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 3287-3294.
19. Breitenbach, A., Li, Y., Kissel, T., 2000. Branched biodegradable polyesters for parenteral drug delivery systems. *J Controlled Release* 64: 167-178.
20. Jong, S. J., Eerdenbrugh, B., Nostrum, C. F., Kettenes-van, J. J., Hennink, W. E., 2001. Physically cross-linked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and

- protein release behavior. *J Controlled Release* 71: 261-275.
21. Shaji, J., Patole, V., 2008. Protein and peptide drug delivery: Oral approaches. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70: 269-277.
  22. Sood, A., Panchagnula, R., 2001. Peroral route: An opportunity for protein and peptide drug delivery. *Chemical Reviews* 101: 3275-3303.
  23. Kapitza, C., 2005. Reduction of post prandial blood glucose excursions by an optimized formulation of oral insulin. ADA 65 scientific sessions, p: 418-sitted by: sadrzade N, Glembourtt MJ, Stevenson CL. 2007. Peptide drug delivery strategies for the treatment of diabetes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96: 1925-1954.
  24. Jeong, B., Bae, Y. H., Kim, S. W., 2000. Drug release from biodegradable injectable thermo-sensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolimers. *Journal of Controlled Release* 63: 155-163.
  25. Liu, T., Hu, S., Liu, D., 2009. Biomedical nanoparticle carriers with combine thermal and magnetic responses. *J Nanotoday* 4: 52-65.
  26. Gupta, A. K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26: 3995-4021.
  27. Wigley, P. M., Landono, J. H., Scott, M. D., Wood, S. H., Shipp, J. C., Waldman, R. H., 1971. Insulin across respiratory mucosa by aerosol delivery. *Diabetes* 20: 552-556.
  28. Jianjun, C. H., Benjamin, A., Teply, S., Yoon, J., Christopher, H., Yim, D., 2006. Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs. *Pharmaceutical Research* 23: 34-38.
  29. Zhang, J. X., Chen, D., Wang, S. J., 2005. Optimizing double emulsion process to decrease the burst release of protein from biodegradable polymer microspheres. *J Microencapsul* 22: 413-422.