بهینه سازی حامل های لیپیدی نانوساختار بارگذاری شده با کلوزاپین برای افزایش فراهمی زیستی در درمان روان پریشی

داوود محبی آزاد [۱]، گیتا باقری [۲*]

[۱]گروه شیمی دارویی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار، شهریار، ایران
[۲]گروه مهندسی شیمی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار، شهریار، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه تهیه فرمولاسیون آهسته رهش کلوزاپین غیر محلول در آب، با استفاده گلیسرول مونواستئارات اسید بعنوان لیپید جامد، و توئین ۸۰ و تریتون X۱۰۰ بعنوان عامل فعال سطح و همچنین بایو پلیمر کیتوزان جهت کنترل بهتر رهایش دارو است.

در فرمولاسیون بهینه شده از ۵۰ میلی گرم داروی کلوزاپین، ۲۵۰ میلی گرم استئاریک اسید، ۱۶۵ میلی گرم توئین ۸۰ و ۷۰ میلی گرم تریتون X۱۰۰ بعنوان سورفکتانت جهت ایجاد فعالیت سطحی و 12.5 میلی لیتر محلول 0.5 درصد وزنی کیتوزان با وزن ملکولی متوسط مورد استفاده قرار گرفت.

میزان دارو بارگذاری شده در حضور پلیمر کیتوزان در حدود ۸۹/۹ درصد بوده که نسبت به حالت بدون حضور پلیمر کیتوزان 3.3 درصد داروی بیشتری بارگذاری شده است و میزان رهایش دارو در حضور کیتوزان در مدت ۳۰ ساعت ۸۹ درصد حاصل شد و در بازه زمانی ۲۰-۵ ساعت که بازه زمانی موثر دارو می باشد؛ درصد تصحیح شده در حضور کیتوزان حدود ۳۰ تا 40٪ ثبت گردید؛ زیرا حضور گروههای هیدروکسیل و آمین نوع اول در پیکره کیتوزان، اجازه اصلاح شیمیایی آن را به منظور کنترل خواص فیزیکی می دهد و وقتی جزء آبگریزی مانند گلیسرول مونواستئارات با مولکول کیتوزان مزدوج شود، نانوذرات خودتجمعی تشکیل می دهد که قادر به کپسوله کردن دارو و تحویل آن به ناحیه هدف هستند. حضور پلیمر کیتوزان با برخورداری از ویژگی های فیزیک و شیمیایی مناسب، این امکان را به نانوذرات می دهد تا رهایش انفجاری نداشته باشند و دارو بصورت کنترل شده تری آزاد شود.

ایمیل نویسنده مسئول: Bagheri.gita@yahoo.com

1-مقدمه

داروی کلوزاپین (Clozapine) با هسته دی آزپین نامحلول در آب و یکی از انواع داروهای ضد سایکوز و اعصاب و روان می-باشد که به دسته نسل دوم عوامل ضد سایکوز تعلق دارد. این دارو با اثر بر روی گیرنده های دوپامین و سروتونین، باعث تعدیل در انتقال دهنده های مغزی میگردد [1, 2].

کلوزاپین در بیشتر مواقع برای درمان اختلالات روانی مثل اسکیزوفرنی مورد استفاده قرار می گیرد، همچنین به همراه سایر داروها برای درمان افسردگی نیز استفاده می شود. این دارو به کاهش توهم کمک می¬کند تا فرد بتواند با واقعیت ارتباط بهتر و شفاف تری برقرار کند و در زندگی احساس آرامش کرده و فعالیت های روزمره اش را انجام می دهد [3,4]. از جمله داروهایی که گاها بیمار ناگزیر به مصرف دراز مدت آن است می توان به کلوزاپین اشاره داشت که برای درمان تظاهرات اختلالات سایکوتیک و اسکیزوفرنی استفاده میشود. [5]

زمانی که این دارو از طریق روش های سنتی مصرف شود، اختلالاتی از قبیل ایجاد حساسیت مفرط نسبت به دارو در فرد بیمار و یا عدم پایداری مناسب دارو تا زمان رسیدن به سلول های هدف را ایجاد می کند؛ از این رو امروزه طراحی و ایجاد

تاریخ دریافت : ۱۴۰۳/۸/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۴

سامانه های رهایش دارو به صورت کنترل شده در مورد این دارو بسیار حائز اهمیت است چرا که با استفاده از این روش می توان مقدار رهایش دارو را کنترل کرد و غلظت آن را به سطح مورد نظر که همان حد درمانی آن است رساند و ثابت نگه داشت [6,7].

از اوایل سال 1990 که کیتوزان وارد عرصه های دارویی شده است، تحقیقات علمی و صنعتی بسیاری برای ایجاد سامانه جدید با اثرات درمانی مؤثرتر بر پایه این ترکیب در حال انجام می باشد [8]. حضور گروه های هیدروکسیل و آمین نوع اول در پیکره کیتوزان، اجازه اصلاح شیمیایی آن را به منظور کنترل خواص فیزیکی می دهد. بطوری که وقتی جزء آب گریز با مولکول کیتوزان مزدوج می شود، ترکیب دوگانه دوست ایجاد شده ، نانوذرات خودتجمعی تشکیل می دهد که قادر به کپسوله کردن دارو و تحویل آن به ناحیه هدف است [9]. از سوی دیگر برای بهبود دارورسانی هدفمند، نانوذرات لیپیدی جامد نیز در تحقیقات اخیر بسیار مورد توجه قرار می گیرد [10-12]. نانوذرات لیپیدی جامد از چربی های خالص جامد تشکیل شده و این سیستم در مقایسه با سایر سیستم های کلوئیدی مزیت های بیشتری را شامل می شود از جمله: زیست سازگاری مناسب، کنترل آزاد سازی دارو و افزایش در پایداری داروهای واردشده به آنها، [13,14] ضمن آنکه سیستم هاي دارورساني بر پايه نانوذرات ليپيدي جامد باعث آزاد سازي كنترل شده داروها مي شوند و پايداري شيميايي داروهاي به دام افتاده در خود را افزايش مي دهند [15,16].با استفاده از این روش می توان در دسترس بودن کلوزاپین آزاد را افزایش داد تا گیرنده های 5-HT2Aو D2 را در سلول های مغزی درگیر کرده و در نتیجه اثر بخشی دارو را افزایش داد. علاوه بر این، به حداقل رساندن دوز کلوزاپین عوارض جانبی دارو و به تبع آن عدم انتقال دهنده های عصبی را در بیماران اسکیزوفرنی را کاهش می دهد. هدف از این مطالعه استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد در طراحی و بهبود فرآیند آزادسازی کلوزاپین است.

2- بخش تجربی ومواد

تمام مواد استفاده شده در این تحقیق از جمله استئاریک اسید، گلیسرول مونو استئارات، توپین 80، تریتون X100، از نمایندگی-های شرکت آلمانی مرک، سیگما آلدریچ آمریکا تهیه و بدون هرگونه خالص سازی اولیه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین کیسه دیالیز 1 کیلو دالتون از نمایندگی SLS انگلستان در ایران تهیه شد. مواد موثره داروی کلوزاپین نیز از شرکت دارویی سبحان دارو تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. نانوذرات بارگذاری شده با کلوزاپین به نیز بعد از تهیه توسط آنالیزهای اسپکتروفتومتری، پتانسیل زتا، میکروسکوپ الکترونی عبوری، و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز مورد بررسی و شناسایی قرارا گرفت.

آماده سازی نانوذرات لیپید بارگذاری شده با کلوزاپین

به منظور تهیه فرمولاسیون اولیه، از ترکیب درصد مختلفی از چربی های جامد شامل اسید استئاریک (SA)، گلیسرول مونو استئارات (GMS) و سورفکتانت های توئین 80 و تریتون X100 استفاده شد [17]. در این طراحی آزمایش از مخلوط لیپیدهای استئاریک اسید و گلیسرول مونو استئارات و مخلوط دو نوع سورفکتانت (توپین 80 و تریتون X100) استفاده شد. نسبت وزنی سورفکتانت مورد استفاده در حدود 4.7%، نسبت لیپید مورد استفاده 5%، و داروی الانزپین در محدوده 2-1%، زمان هموژنایزر اولترا سونیک 20 دقیقه و زمان سانتریفیوژ نیز 10 دقیقه و با سرعت 5000 دور در دقیقه درنظر گرفته شد.

آماده سازی نانوذرات لیپید بارگذاری شده با کلوزاپین در حضور کیتوزان

برای استفاده از کیتوزان در فرمولاسیون داروی آهسته رهش ابتدا مانند بخش قبلی نمونه آماده سازی شده و در نهایت قبل از مرحله نگه داری در دمای 4 درجه سانتی گراد، محلول نهایی با 12/5 میلی لیتر از محلول 0/5 درصد وزنی کیتوزان با وزن ملکولی متوسط مخلوط شده و سپس به 3/4 pH = رسانده شده و بعد از اضافه شدن به ویال شیشه ای در دمای 4 درجه سانتی گراد نگه داری شد [18].

منحنی استاندارد جذب دارو

برای محاسبه درصد مقدار داروی بارگذاری شده در ماتریس لازم است ابتدا منحنی کالیبراسیون در غلظت های مختلف از الانزپین حل شده در آب و

استیک اسید بدست آمد. برای این منظور ابتدا محلول استانداردی با رقت 100 میکروگرم در میلی لیتر تهیه و محلول هایی با رقت های 1، 2/5، 5، 10، 20، 30، و 40 میکروگرم بر میلی لیتر از دارو با برداشتن حجم مناسب از محلول استاندارد اولیه و رقیق نمودن توسط آب دیونیزه تهیه شد که میزان جذب هر یک از آن ها در طول موج ماکزیمم 262 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. همچنین برای رسم نمودار استاندارد محلول شاهدی شامل 2 میلی لیتر آب دیونیزه و 1 میلی لیتر استیک اسید تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین برای اطلاع از عدم تداخل جذب بین دارو و ماتریس، محلولی شامل استئاریک اسید (mg 125)، گلیسرول مونواستئارات (125 mg)، توئین 80 (117.5 mg)، و تریتون 100 (mg X 117.5) و کیتوزان (12/5 میلی لیتر از محلول 0/5 درصد وزنی کیتوزان) تهیه شد. نهایتا 5 میلی از محل با اانول به حجم 15 میلی لیتر رسانده و جذب محلول با جذب محلول حاوی دارو تطابق داده شد که نهایتا مشخص شد که هیچ تداخل جذبی بین داروو ماتریس وجود ندارد.

تعیین مقدار داروی بارگذاری شده در ماتریس

محتواي دارویی در سیستم ماتریس با رقیق سازي 5 میلی لیتر از محلول نانوذرات در 10 میلی لیتر از اتانول تعیین شد. سپس جذب محلول توسط اسپکتروفتومتر در 265 نانومتر اندازه گیري می گردید. با استفاده از منحنی استاندارد جذب و معادله اي که حاصل شد میزان غلظت محلول و داروي موجود در آن محاسبه شد. معادله 1 برای محاسبه مقدار درصد داروي بارگذاری شده و معادله 2 برای محاسبه ظرفیت بارگذاری مورد استفاده قرار گرفت.

$$EE = \left[\frac{M_i - M_{free}}{M_i}\right] * 100 \qquad \text{معادله1}$$

$$LC = \left[\frac{M_i - M_{free}}{M_r}\right] * 100 \qquad \text{معادله2}$$

در فرمول بالا طبق تعریف Mi مقدار اولیه داروی کلوزاپین، M_{free} مقدار داروی کپسوله نشده بعد از سانتریفیوژ، و M_r مقدار لیپید مورد استفاده برای فرمولاسیون می باشد.

بررسی پروفایل رهایش داروی الانزپین در حضور و بدون حضور کیتوزان در شرایط برون تنی

بررسی رهایش داروی الانزپین از سامانه نانوذرات لیپیدی جامد توسط روش کیسه دیالیز صورت گرف[19]. در این روش مقدار 20 میلی لیتر از نانوذرات لیپیدی جامد حاوی الانزپین فرموله شده در داخل کیسه دیالیز با Cut-Off 14000 ریخته شد و بعد از بسته شدن در کیسه دیالیز، محتویات کیسه در 200 میلی لیتر محلول بافر فسفات با دمای 37 درجه سانتی گراد و 7/5 = pH قرار گرفت و به مدت 30 ساعت روی شیکر هم زده شد. در ادامه کار در فواصل زمانی مشخص (زمان شروع، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 12، 16، 20،21، 22، 23، 24 و 30 ساعت)، مقدار 2 میلی لیتر از بافر فسفات داخل بشر برداشته شده و از نمونه بافر برداشته شده و سپس با 2 میلی لیتر بافر تازه جایگزین می شود تا شرایط کاملا سینک محیط بهم نخورد و سپس نمونه برداشته شده در طول موج 265 nm با دستگاه اسپکتروفتومتری آنالیز گردید و با استفاده از نمودار کالیبراسیون غلظت داروی کلوزاپین رهایش یافته بدست می آید.

بررسی سایز نانوذرات و شاخص پراکندگی

اندازه هیدرودینامیکی ذرات و شاخص پراکندگی نمونه ها پس از رقت سازی مناسب با آب دیونیزه در 25 درجه سانتی گراد با استفاده از Malvern Zetasizer اندازه گیری شد .(Malvern Instruments Limited, UK)

بررسی پتانسیل زتا ذرات (Zeta Potential) ZP

پتانسیل زتا نمونه ها پس از رقت سازی مناسب با آب دیونیزه در 25 درجه سانتی گراد با استفاده از Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Limited, UK) اندازه گیری شد. پتاسیل زتا عامل تعیین کننده در ارزیابی ثبات پراکندگی سوسپانسیون های کلوئیدی است. در حین آماده سازی نانوذرات یک لایه دوتایی الکتریکی باعث محاصره نانوذرات در محلول می شود، که پتانسیل الکترواستاتیک در این مرز را پتانسیل زتا می گویند. پتانسیل زتا می تواند مثبت و یا منفی باشد که به شیمی ذرات و درجه دامنه بین ذرات در محیط بستگی دارد. پتانسیل زتا بالاتر از 30 میلی ولت و یا کمتر از 30 میلی ولت نشان دهنده پراکندگی پایدار در محیط است.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری Transmission Electron Microscope(TEM)

یکی از مواردی که در مطالعه نانوذرات نقش اساسی ایفا می‌کند، تعیین اندازه آن‌ها می‌باشد. استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری یکی از روش های موثر در تعیین اندازه ذرات می باشد که می تواند اطلاعات کمی و کیفی مفیدی را در اختیار ما قرار دهد.

برای این کار در دمای اتاق، به مقدار مناسب از سوسپانسیون نمونه ها بر روی شبکه مس ریخته و به مدت 30 ثانیه نمونه ها به اسید آغشته شده و سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویر برداری شدند (JEM-2100- Japan) .

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) Fourier transform infrared spectroscopy

طیف سنجی مادون قرمز نانوذرات لیپیدی جامد خشک شده با استفاده از طیف سنج انتشاردر محدوده 500 تا 4000 cm^{-1}انجام شد. (Burker, Tensor 27, Germany)نمونه های تهیه شده با پودر KBr گرد شده و فشار داده می شوند تا گلوله ای با اندازه مناسب حاصل شود.

آنالیز گرماسنجی افتراقی DifferentialScanningCalorimetry (DSC)

آنالیز حرارتی به منظور بررسی خصوصیات کریستال با ذوب نانوذرات لیپیدی حاوی الانزپین با استفاده از دستگاه DSC مدل B202 مورد مطالعه قرار گرفت. در یک پن آلومینیومی مقدار 5 میلی گرم نانوذرات لیپیدی فاقد الانزپین قرار داده و درب آن را با وسیله مخصوص محکم گردید و با کمک سوزن سوراخ کرچکی در مرکز آن ایجاد شد. در پن دیگر نیز اتمسفر به عنوان رفرنس مد نظر قرار گرفت. آنالیز نمونه ها تحت اثر گاز نیتروژن صورت پذیرفت. با توجه به نقطه ذوب نانو ذرات لیپیدی استئاریک اسید، ستیل پالمیتات، پالمیتیک اسید، گلیسرول مونو استئارات و گلسیریل پالمیتو استئارات که به ترتیب در محدوده 69 69، 54، 62، 63-68 و 72 درجه سانتی گراد قرار دارد، دمای دستگاه در محدوده 4 تا 200 درجه سانتیگراد تنظیم شد. در هر دقیقه ۱۰ درجه سانتیگراد دمای کوره افزایش یافت.

3- تجزیه و تحلیل نتایج

بررسی سایز نانوذرات و شاخص پراکندگی

نتایج حاصل از آنالیز پراکندگی دینامیکی نور برای نانوذرات فرموله شده بطور خلاصه در جدول1. ارایه شده است. میانگین اندازه ذره و توزیع آن یکي از مهم ترین پارامترهاي مرتبط با کیفیت است که سایر خواص ماکروسکوپي مواد را تحت تأثیر قرار مي دهد. ذرات بزرگتر مي توانند عامل ناپایداري فیزیکي نانو ذرات باشند. داده هایی جدول 1. نشان می دهد که از نظر شاخص پراکندگی فرمولاسیون R-1 شاخص پراکندگی کمتری در مقایسه با سایر فرمولاسیون ها دارد. همچنین بعد از فرمولاسیون R-1، کمترین شاخص مربوط به فرمولاسیون R-5 می باشد. علیرغم پایین ترین مقدار شاخص پراکنندگی برای فرمولاسیون R-1، فرمولاسیون R-5 بعنوان ترکیب درصد بهینه انتخاب شد. چرا که این فرمولاسیون در مقایسه با فرمولاسیون R-1 از اندازه ذرات کوچکتری برخوردار بود. این انتخاب نشان از اهمیت سایز ذرات و شاخص پراکنندگی نانو حامل ها می باشد چرا که تعیین اندازه ذرات، بهترین شناساگر پایداري مي باشد که در ارزیابي نانوذرات مورد استفاده قرار گیرد. عموما می‌توان خصوصیات یک سوسپانسیون را با درک چگونگی برهمکنش میان نانوذرات لیپیدی جامد با یکدیگر شناسایی نمود. در برخی موارد لازم است برای جدا نگه داشتن ذرات از یکدیگر و ممانعت از تجمع آن‌ها، نیز دافعه بین ذرات به حداکثر مقدار ممکن گاهی نیز هدفی کاملا متفاوت دنبال می‌شود و با حذف یا کاهش نیروهای دافعه، تشکیل توده‌های بزرگ، تسریع شده و عمل صاف شدن آسان‌تر می‌شود. اکثر نانوذرات لیپیدی مایعات حاوی کاتیون‌ها و آنیون‌ها یعنی اتم‌های با بارهای مثبت و منفی هستند. موقعی که ذرات باردار در یک مایع معلق شوند، یون‌های با بار مخالف به سمت ذرات معلق جذب می‌شوند. یعنی نمونه با بار منفی، یون‌های مثبت را از مایع به سمت خود جذب کرده و بر عکس نمونه با بار مثبت، یون‌های منفی را از مایع به سمت خود جذب می‌کند. یون‌های نزدیک سطح ذره، شدیدا جذب شده در حالی که یون‌های دورتر، پیوند سستی خواهند داشت که لایه نفوذ

نامیده می‌شود. غلظت بالای یون‌های موجود در نزدیکی سطح به تدریج و با دور شدن از سطح لیپیدها کاهش یافته و این عمل تا ایجاد تعادل با یون‌های با بار مخالف در محلول ادامه می‌یابد. به طور مشابه و به دلیل نیروی دافعه لیپید منفی، کاهش غلظت یون‌های منفی نیز در نزدیکی سطح ایجاد شده و غلظت این یون‌ها با افزایش فاصله زیاد می‌شود. لایه نفوذ به عنوان یک محیط باردار در اطراف ذره مجسم می‌شود. چگالی بار در هر نقطه از سطح برابر با اختلاف بین غلظت یون‌های مثبت و منفی در آن نقطه است. چگالی بار در نزدیکی لیپید دارای بیشترین مقدار بوده و با افزایش فاصله به صورت تدریجی حذف می‌شود که در این منطقه غلظت یون‌های مثبت و منفی تقریبا با هم برابر می‌شود. منفی بودن پتانسیل زتا حاکی از این می باشد که نانو ذرات تهیه شده آنیونی می باشد که سمیت کمتری برای سلول را ایجاد می کند-21].
22]

میزان داروی کلوزاپین بارگذاری شده در بافت نانوذرات لیپیدی

برای محاسبه میزان داروی بارگذاری شده ابتدا نمودار استاندارد محلول دارو در آب رسم شد و رابطهٔ خطی بین غلظت (C) و جذب (A) با ضریب همبستگی (R2 : 0.9965) بدست آمد. با استفاده از روابط ذکر شده در قسمت روش ها و اندازه گیري هاي مختلف، میزان بازده بارگذاري دارو در روش هاي مختلف مطابق جدول 1 بدست آمد. همانطور که از اطلاعات این جدول مشخص است، فرمولاسیون R-5 که بعنوان فرمولاسیون بهینه سازی انتخاب شده، .86.6% بازده بارگذاري را دارا می باشد.

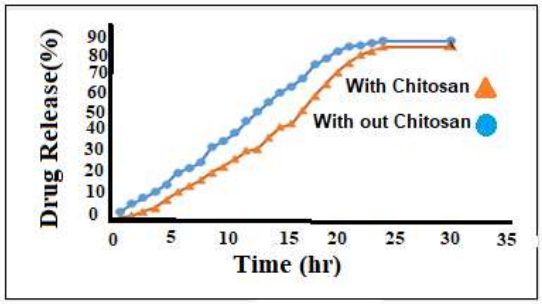
در ادامه با اصلاح این روش و استفاده از پلیمر کیتوزان در حین آماده سازی نانوذرات بازده بارگذاري دارو به اندازة چشمگیري افزایش یافت که نشان دهندة کارآمد بودن اصلاحات اعمال شده می باشد. با اصلاحات انجام شده در روش داروي کلوزاپین با بازده نسبتاً بالایی 89.9% در داخل نانوذرات بارگذاري شد که این داده نیز کارآمد بودن اصلاحات اعمال شده در این روش را نشان می دهد.

جدول 1. فرمولاسیون تهیه شده برای یافتن شرایط بهینه

Run	Drug %	SA:GMS	Tween 80:Triton X100	PS (nm)	PDI	EE (%)	LC (%)
R-1	100	250:0	50:185	474.29	0.283	80.00	35.32
R-2	50	0:250	50:185	251.87	0.311	81.70	17.76
R-3	75	125:125	60:175	261.27	0.319	88.00	28.70
R-4	100	250:0	70:165	262.02	0.327	90.35	39.29
R-5	50	0:250	70:165	225.00	0.282	86.60	18.82
R-6	50	125:125	60:175	390.32	0.332	89.20	17.07
R-7	100	125:125	60:175	430.12	0.372	80.15	34.85

پروفایل رهایش دارو از نانوذرات لیپیدی در حضور و عدم حضور کیتوزان

سرعت رهایش دارو از ویژگی های مهم و کاربردی برای معرفی یک حامل مناسب می باشد. بعد از تایید مشخصات نانوذرات لیپیدی حامل داروی کلوزاپین سرعت رهایش و پروفایل رهایش دارو از بافت نانو حامل لیپیدی در حضور و عدم حضور کیتوزان مورد بررسی قرارگرفت. نمودار مربوط به رهایش دارو در هردو حالت در مدت زمان 30 ساعت در شکل 1 ارایه شده است.



شکل 1. مقایسه پروفایل رهایش کلوزاپین در حضور و عدم حضور کیتوزان

با توجه به پروفایل رهایش دارو نمودار 1 ساعت اول حدود 5% از دارو آزاد شده، با همین روند رهایش دارو ادامه یافته که بعد از یک ساعت حدود 5% از دارو آزاد شده است که نشان دهنده آن است که سامانه طراحی شده توانسته تا حد زیادی از رهایش انفجاری دارو جلوگیری کند و بعد از 24 ساعت 85% از کل دارو بارگذاری شده آزاد شده است. آزاد سازی بعد از گذشت 30 ساعت حدود 90 درصد می باشد که نشان از ثابت ماندن رهایش دارو بعد از 30 ساعت می باشد.

در ادامه برای بهبود بیشتر فرمولاسیون کلوزاپین در حضور نانو ذرات لیپیدی و کاهش سرعت رهایش دارو مخصوصا در زمان اولیه ورود دارو به بدن در فرمولاسیون بهینه شده R-5 از بایو پلیمر کیتوزان استفاده شد. با توجه به پروفایل رهایش دارو نتایج بدست آمده نشان از بهبود سرعت رهایش دارو در مدت زمان 30 ساعت می باشد بطوری که میزان داروی رهایش یافته از سطح بستر نانوذرات لیپیدی در ساعت اول در حدود 2 درصد می باشد که از این نظر نشان از مدت زمان کافی برای رسیدن دارو به بافت مورد نظر و شروع رهایش می باشد. به عبارتی رهایش دارو در ساعات اولیه بصورت انفجاری نبوده است. در ادامه نیز رهایش دارو با سرعت مناسبتری صورت گرفته است بطوری که بعد از گذشت 30 ساعت 89 درصد از کل داروی بارگذاری شده از بستر نانوذرات لیپیدی آزاد شده است.

مقایسه هر دو پرو فایل نشان می دهد که در حضور کیتوزان علیرغم افزایش میزان داروی بارگذاری شده، میزان دارو آزاد شده در مقایسه با فرمولاسیون بدون حضور کیتوزان بعد از 30 ساعت حدود 3 درصد نسبت به کل داروی بارگذاری شده کمتر می باشد و در بازه زمانی 20-5 ساعت که بازه زمانی موثر دارو می باشد؛ درصد تصحیح شده در حضور کیتوزان حدود 30 تا 30% است که نشان دهنده کارایی سامانه طراحی شده می باشد.

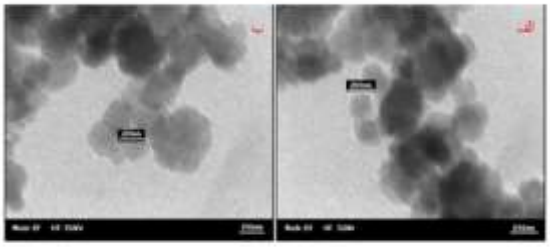
حضورکیتوزان این امکان را به نانوذرات می دهد تا رهایش انفجاری نداشته باشند و دارو بصورت کنترل شده تری از سطح نانو ذرات رهایش یابد. کیتوزان بدلیل داشتن گروه های آمینی می تواند در محیط اسیدی در آب حل شده و حضور گروههای هیدروکسیل و آمین نوع اول در پیکره کیتوزان، اجازه اصلاح شیمیایی آن را به منظور کنترل خواص فیزیکی می دهد. وقتی جزء آبگریز با مولکول کیتوزان مزدوج شود، ترکیب دوگانه دوست ایجاد شده ممکن است نانوذرات خودتجمعی تشکیل دهد که قادر به کپسوله کردن دارو و تحویل آن به ناحیه هدف هستند [9].

آنالیز پتانسیل زتا نانوذرات لیپیدی حاوی کیتوزان

در نهایت از نانو ذرات لیپیدی فرموله شده در حضور کیتوزان اندازه گیری پتانسیل زتا انجام گرفت که ازنظر بار نیز نتایج نشان می دهد که کیتوزان موجب تصحیح بار نانوذرات شده است. پتانسیل زتا برای نمونه R-5 در حضور کیتوزان، 14.4میلی ولت می باشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که نانوذرات با بار مثبت نسبت به نانوذرات با بارمنفی و یا خنثی جذب مناسبتری توسط مغز دارند.

آنالیز میکروسکوپ الکترنی عبوری

تصاویر TEM نانو ذرات لیپیدی فرموله شده با داروی کلوزاپین بدون حضور پلیمر کیتوزان و نیز در حضور کیتوزان در شکل2. ارایه شده است. همانطورکه مشاهده می شود بدون حضور نانو ذرات سایز اندازه ذرات برای فرمولاسیون R-5 در حدود 230 نانو متر می باشد. اما در حضور پلیمر کیتوزان سایز بدست آمده برای نانوذرات لیپیدی پوشش داده شده با کیتوزان در حدود 200 نانومتر نشان داده شده است. بطور کلی کیتوزان با بهبود سایز نانوذرات باعث رهایش کنترل شده¬ای در فرمولاسیون نانوذرات لیپیدی با داروی کلوزاپین شده است. نانوذرات کیتوزان، با اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بزرگ، خواص فیزیکی-شیمیایی بهتری نسبت به حالت توده متناظر دارند. به همین دلیل نانوکامپوزیت های بر پایه کیتوزان به عنوان حامل، خواص بهتری نسبت به پلیمر خالص ارائه می دهند.

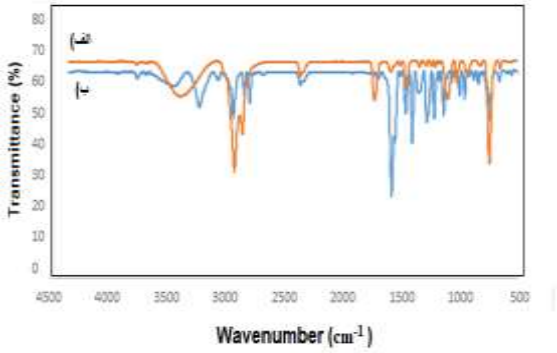


شکل2. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از سطح نانوذرات الف) بدون حضور کیتوزان، ب) در حضورکیتوزان

در هردوحالت فرمولاسیون R-5 بدون حضور و در حضور پلیمر کیتوزان مشاهده می شود که شکل نانو ذرات تقریبا کروی می باشد. کروی بودن نانو ذرات این امکان را فراهم می سازد تا دارو بصورت کنترل شده تری آزاد گردد چرا که نانو ساختارهای کروی کمترین تماس را با محیط آبی فاز پراکنده نسبت به سایر اشکال نانوذرات دارند.

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نانو ذرات لیپیدی

در ادامه برای تایید حضور داروی کلوزاپین در داخل بافت نانوذرات چربی فرموله شده از نانوذرات تهیه شده در فرمولاسیون R-5 طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز گرفته شد. مقایسه طیف مادون قرمز داروی کلوزاپین و فرمولاسیون R-5 بخوبی حضور مواد موثره کلوزاپین را در داخل فرمولاسیون تائید می کند (شکل 3 الف، ب).

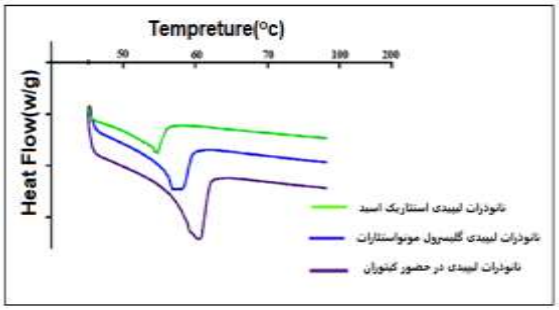


شکل3 -آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز الف) کلوزاپین، ب) نانوذرات لیپیدی حامل کلوزاپین

حضور نوار کششی پهن در نواحی 3400 cm^{-1} در شکل 3. حضور گروه های NH کلوزاپین را در فرمولاسیون نهایی تایید می کند. نوار کششی در 2984 cm^{-1}، 2888، 2834، 2738 مربوط به کشش C-H آلیفاتیک بر روی ساختار کلوزاپین و همچنین کیتوزان و سایر اجزای فرمولاسیون می باشد. نوار کششی cm^{-1} در 1584مربوط به گروه پیوند دوگانه کربن-کربن C=C کلوزاپین می باشد. همچنین نوار کششی در 1470 cm^{-1}مربوط به گروه پیوند دوگانه کربن-نیتروژن C=N کلوزاپین می باشد.

آنالیز گرماسنجی افتراقی

نتایج آزمون DSC کلیه فرمولاسیونها در شکل 4 نشان داده شده است. مطابق نتایج می توان گفت نقطه ذوب فیکوسیانین در دمای 195 درجه سانتی گراد می باشد. نقطه ذوب چربی خالص اسید استئاریک، گلیسرول مونو استئارات نیز به ترتیب 69 و 65 درجه سانتی گراد بود. نتایج نشان داد نقطه ذوب SLNهای تهیه شده در مقایسه با چربی خالص کمتر و دارای اختلاف معنی دار می باشد($P<0/05$)، این کاهش می تواند به دلیل تغییر در ساختار چربی باشد. در نتایج DSC مربوط به نمونه های SLN یک شیفت ملایم به سمت چپ مشاهده شد که علت اصلی، تغییرات ساختاری و تبدیل شدن ماده به نانوذره می باشد.



شکل 4- نمودار آنالیز حرارتی نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با کلوزاپین

در کلیه نمودارهای DSC حاوی الانزپین پس از آغاز حرارت دهی از دمای محیط تا ۲۰۰ درجه هیچ گونه پیکی مشاهده نشد که این امر مبین انحلال الانزپین در لیپیدهای ذوب شده و تغییر ساختار کریستالی آن به صورت آمورف می باشد. زیرا اگر الانزپین درون ساختار شبکه لیپیدی قرار نمی گرفت و فرایند ساخت فرمولاسیون ها به درستی انجام نمی شد در زمان خشک کردن انجمادی احتمال

قرارگرفتن الانزپین روي سطح نانوذرات بالا بود. نانوذرات لیپیدی در حضورکیتوزان با بهبود ساختار نانوذرات، موجب افزایش مقاومت حرارتی نانوذرات شده است.

بحث

استفاده از نانوذرات لیپیدی بدلیل ماهیت و ویژگی که دارند در بسیاری از فرمولاسیون های داروهای برای دارورسانی هدفمند مشاهده می گردد[22]. از ویژگی های بارز نانو لیپیدها قرار گرفتن در دسته حامل های بیوپلیمری می باشد که می توانند بصورت کنترل شده باعث رهایش دارو شده و نیز از تجزیه دارو در سایر نقاط بدن جلوگیری کنند. با توجه به اهمیت نانوذرات لیپیدی برای استفاده در دارورسانی هدفمند در این پژوهش سامانه آهسته رهش داروی کلوزاپین با استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

در پژوهش پیشرو که توسط گروه تحقیقاتی ما صورت گرفته، در فرمولاسیون نهایی برای رهایش آهسته کلوزاپین که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت از 50 میلی گرم داروی کلوزاپین، 250 میلی گرم گلیسرول مونواستئارات، 165 میلی گرم توئین 80 و 70 میلی گرم تریتون X100 بعنوان سورفکتانت جهت ایجاد فعالیت سطحی و 12.5 میلی لیتر محلول 0.5 درصد وزنی کیتوزان استفاده شد. استفاده از کیتوزان در مقایسه با نمونه بدون کیتوزان این امکان را فراهم آورد تا دارو بصورت کنترل شده تری در مدت زمان 30 ساعت آزاد گردد. میزان دارو بارگذاری شده در حضور پلیمر کیتوزان در حدود 89.9 درصد می باشد که نسبت به حالت بدون حضور پلیمر کیتوزان 3.3 درصد داروی بیشتری بارگذاری شده است (در غیاب کیتوزان میزان داروی بارگذاری شده 86.6 درصد می باشد).

میزان رهایش دارو در حضور کیتوزان در مدت 30 ساعت 89 درصد بوده که نسبت به عدم حضور کیتوزان 3 درصد کمتر می¬باشد و در بازه زمانی 5-20 ساعت، درصد تصحیح شده در حضور کیتوزان حدود 30تا 40% است. به عنوان مثال بعد از 14 ساعت، درصد رهایش بدون حضور و با حضور کیتوزان به ترتیب 61% و 43% و بعد از 16 ساعت 69%و50% بوده است که نشان دهنده تاثیر حضور کیتوزان در فرمولاسیون است. همچنین حضور کیتوزان از رهایش انفجاری دارو در زمان ورود دارو به بدن جلوگیری کرده است.

نتایج این پژوهش نشان که که سامانه نانوذرات لیپیدی جامد در حضور پلیمر کیتوزان با برخورداری از ویژگی های فیزیک و شیمیایی مناسب، حامل مناسب برای رسانش داروی کلوزاپین بوده که می تواند با رهایش کنترل شده ای باعث آزاد سازی دارو در بافت مورد نظر گردد.

نتیجه گیری

سامانه های دارورسانی و رهایش هدفمند دارو به منظور کاهش عوارض جانبی و انتشار کنترل شده دارو، رو به توسعه است. که از این میان نانوذرات لیپیدی و پلیمر کیتوزان حامل های مناسبی برای عمده داروها به شمار می آیند. از ویژگی های بارز نانو لیپیدها وکیتوزان قرار گرفتن در دسته حامل های بیوپلیمری می باشند که می توانند بصورت کنترل شده باعث رهایش دارو شده و نیز از تجزیه دارو در سایر نقاط بدن جلوگیری کنند.

با توجه به اهمیت نانوذرات لیپیدی و پلیمر کیتوزان برای استفاده در دارورسانی هدفمند در این پژوهش سامانه آهسته رهش داروی کلوزاپین با استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد به همراه پلیمر کیتوزان تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که افزایش اندازه ذرات با افزایش انرژی سطحی، سبب کاهش تجمع لیپیدها و عدم تشکیل توده ها می شود که کارایی فرمولاسیون ها را به شدت افزایش می دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشگاه آزاد واحد شهر یار اعلام می دارند.

4. منابع

[1]. Jamadar S. Rao GK. Optimizing clozapine-loaded nanostructured lipid carriers through central composite design for enhance bioavailability in antipsychotic therapy. Analytical Chemistry Letters.2022, 16:143-57. DOI:10.1080/22297928. 2024.2331143

[2]. Patel AD. Modi CD. Thakkar VT. Rana HB. Chavda DD. Development and Characterization of Lipid Nanoparticles Loaded with Antipsychotic Drugs using Central Composite Design. Current Nanomedicine.2024, 14: 155-68. DOI: 10.2174/ 0124681873270830231101205139

[3]. Bhana N. Foster RH. Olney R. Plosker GL Olanzapine. Drugs.2001, 61: 111-61. DOI: 10.2165/00003495-200161010-00011

[4]. Davis M. P. Sanger G. J. The Benefits of Olanzapine in Palliating Symptoms. Curr Treat Options Oncol.2021, 22: 1-20. DOI: 10.1007/s11864-020-00804-1.

[5]. Pervaiz F. Saba A. Yasin H. Buabeid M. Noreen S. Khan AK. Murtaza G. Fabrication of solid lipid nanoparticles-based patches of paroxetine and their ex-vivo permeation behaviour. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.2023, 31:108-19. DOI: 10.1080/21691401.2023.2179631.

[6]. Prabhakar P. Banerjee M. Nanotechnology in Drug Delivery System: Challenges and Opportunities, J. Pharm. Sci. & Res .2020, 12: 492-498. DOI: https://doi.org/10.31838/ijpr/2020. SP1.242.

[7]. Park K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. Journal of Controlled Release.2014, 190: 3-8. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.054

[8]. Bernkop-Schnürch A. Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2012, 81(3):463-9. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.007.

[9]. Pawar SD, Gawali K, Kulhari H, Murty US, Kumar P. Amoxapine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles with Superior Preclinical Pharmacokinetics for Better Brain Delivery: LC-MS/MS and GC-MS Analysis. ACS Chemical Neuroscience. 14, 1388-98, 2023. DOI: 10.1021/acschemneuro.2c00673.

[10]. Shrestha H, Bala R, Arora S. Lipid-based drug delivery systems. Journal of pharmaceutics. 2014;2014:1-10. DOI: 10.1155/2014/801820.

[11]. Chime SA, Onyishi IV. Lipid-based drug delivery systems (LDDS): Recent advances and applications of lipids in drug delivery. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2013;7(48):3034-59. DOI: 10.5897/AJPPX2013.0004.

[12]. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Dubey SK, Puri A, Patel RJ, et al. Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting. Journal of Controlled Release. 2020;321:372-415. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.02.020.

[13]. Shah N. Gohil D. Patel S. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs): A Modern Versatile Drug Delivery Vehicle. Nanocarriers: Drug Delivery System. 2021, 107-24. DOI:10.1007/978-981-33-4497-6_4.

[14]. Ammar HO. Ghorab MM. Saleh MS. Ghoneim AM. Olanzapine Mesoporous Nanostructured Lipid Carrier: Optimization, Characterization, In Vivo Assessment and Physiologically based

carriers for topical delivery of tretinoin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2012, 93:36-40. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.051.
[19]. Patel MN. Lakkadwala S. Majrad MS. Injeti ER. Gollmer SM. Shah ZA. Characterization and evaluation of 5-fluorouracil-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification technique. Aaps Pharmscitech. 2014,15(6):1498-508. DOI: 10.1208/s12249-014-0168-x.
[20]. Mirchandani Y. Patravale V. B. Brijesh S. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs. Journal of Controlled Release. 2021, 335: 457-464. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.032.
[21]. Basha S. K. Dhandayuthabani R. Muzammil M. S, Kumari V. S. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery. Materials Today: Proceedings.2021, 36: 313-324. DOI:10.1016/j.matpr.2020.04.109
[22]. Akbari J. Nokhodchi A, Farid D. Adrangui M. Siahi-Shadbad MR. Saeedi M. Development and evaluation of buccoadhesive propranolol hydrochloride tablet formulations: effect of fillers. Il Farmaco,.2004, 59: 155-61. DOI: 10.1016/j. farmac. 2003.11.011.
Pharmacokinetic Modeling. IEEE Transactions on NanoBioscience. 2021/10.1080 . DOI:10717544 2022.2115164.
[15]. Akbari J. Enayatifard R. Saeedi M. Saghafi M. Influence of hydroxypropyl methylcellulose molecular weight grade on water uptake, erosion and drug release properties of diclofenac sodium matrix tablets. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2011,10(5):535-41. DOI:10.4314/tjpr.v10i5.1.
[16]. Enayatifard R. Saeedi M. Akbari J. Tabatabaee YH. Effect of hydroxypropyl methylcellulose and ethyl cellulose content on release profile and kinetics of diltiazem HCl from matrices. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2009, 8:(5). DOI: 10.4314 /tjpr.v8i5.48086.
[17]. Rigon RB. Gonçalez ML. Severino P. Alves DA. Santana MH. Souto EB. Solid lipid nanoparticles optimized by 22 factorial design for skin administration: Cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018, 171:501-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.065.
[18]. Ridolfi DM. Marcato PD. Justo GZ. Cordi L. Machado D. Durán N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as

Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with clozapine to increase bioavailability in the treatment of psychosis

Davood Mohebbi Azad[1], Gita Bagheri[2]*

[1]Department of Pharmaceutical Chemistry, Shahriar Branch, Islamic Azad University, Shahriar, Iran.

[2]Department of Chemical Engineering, Shahriar Branch, Islamic Azad University, Shahriar, Iran.

Abstract

The aim of this study is to prepare a slow release formulation of clozapine insoluble in water, using glycerol monostearate acid as a solid lipid, and Tween 80 and Triton 100X as surface active agents, as well as the biopolymer chitosan for better drug release control. In the optimized formulation, 50 mg of clozapine, 250 mg of stearic acid, 165 mg of Tween 80 and 70 mg of Triton 100X as surfactants to create surface activity, and 12.5 ml of a 0.5% by weight solution of chitosan with an average molecular weight were used. The amount of drug loaded in the presence of chitosan polymer was about 89.9%, which is 3.3% more drug loaded than in the case without chitosan polymer, and the drug release rate in the presence of chitosan was 89% within 30 hours, and in the period of 5-20 hours, which is the effective period of the drug; The corrected percentage in the presence of chitosan was recorded as about 30 to 40%; because the presence of hydroxyl and primary amine groups in the chitosan structure allows its chemical modification to control its physical properties, and when a hydrophobic component such as glycerol monostearate is coupled to the chitosan molecule, it forms self-assembled nanoparticles that are capable of encapsulating the drug and delivering it to the target area. The presence of chitosan polymer, with its appropriate physical and chemical properties, allows the nanoparticles to not have explosive release and to release the drug in a more controlled manner.

Keywords: Clozapine, slow release, glycerol monostearate, chitosan.