Iranian Journal of Biomedical Engineering
8 (2015) 385-398, www.ijbme.org
DOI: 10.22041/ijbme.2014.14706

Application of Mesoporous Silica Nanoparticles as a Drug Delivery System for Rivastigmine Hydrogen Tartrate

M. Karimzadeh[1], L. Rashidi[2]*, F. Ganji[3], M. Ahmadi[4], S. Tahmasebi Enferadi[5]

[1]M.Sc Student, Biotechnology Group, Payam Noor University, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Food and Agriculture Department, Research Standard Institute, National Standard Organization of Iran, Karaj, Iran
[3]Asisitant Professor, Biomedical Engineering Group, Chemical Engineering Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4] Asistant Professor, Biotechnology Group, Engineering Department, Payam Noor University, Tehran, Iran
[5] Asistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Receipt in the online submission system 10 July 2015, received in revised form 19 August 2015, accepted 30 August 2015

Abstract

The aim of this research is the preparation of a system based on mesoporous silica nanoparticles (MSN) for delivery of Rivastigmine hydrogen tartrate and investigating of the system cytotoxicity, with or without drugs, on the human brain neuroblastoma cells (SY5Y). Rivastigmine is a hydrophilic and a hydrophobic drug which is used for treatment of Alzimer's disease. In this study MSN were synthesized and characterized by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, x-ray diffraction, N2 adsorption isotherms, and z-potential analysis. Results showed that all MSN were spherical with the same structure. The mean size of nanoparticles was 100±13 nm and the mean diameter of pores was 2.15 nm. The loading capacity and efficiency of rivastigmine hydrogen tartrate were obtained 20.88, and 25%, respectively. Release of rivastigmine from nanoparticles in the simulated gastric and body fluid during 24 h were obtained 70.5 and 79.6%, respectively, which was shown the slightly fast release of rivastigmine in simulated gastric fluid. The cytotoxicity effect of nanoparticles with and without rivastigmine was done by MTT assay on SY5Y cell lines. Results showed that the in vitro rivastigmine release from the nanoparticles containing of it exhibited the more treatment property as free rivastigmine on SY5Y.

Keywords: ***rivastigmine hydrogen tartrate, mesoporous silica nanoparticles, Alzimer disease***

*Corresponding author
Address: Food and Agriculture Department, Research Standard Institute, National Standard Organization of Iran, , P.O.Box: 14155-6139, Karaj, Iran
Tel: *+98-26-32803889*
Fax: *+98-26-88887103*
E-mail: *l.rashidi@standard.ac.ir*

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

مجله مهندسی پزشکی زیستی
دوره ۸، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۳، ۳۹۸-۳۸۵
شناسه دیجیتال: *10.22041/ijbme.2014.14706*

کاربرد نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا به عنوان سامانه حمل داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات

ماه‌منیر کریم‌زاده[۱]، لادن رشیدی*[۲]، فریبا گنجی[۳]، میترا احمدی[٤]، ستار طهماسبی‌انفرادی[٥]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی (بیوتکنولوژی)، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران
[۲]استادیار، گروه غذایی و کشاورزی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، سازمان ملی استاندارد ایران، کرج
[۳]استادیار، گروه مهندسی زیست‌پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[٤]استادیار، گروه مهندسی شیمی (بیوتکنولوژی)، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران
[٥]استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

تاریخ ثبت در سامانه: ۱۳۹٤/٤/۱۹، نسخه اصلاح شده: ۱۳۹٤/٥/۲۸، پذیرش قطعی: ۱۳۹٤/٦/۸

چکیده

این تحقیق با هدف تهیه یک سامانه مبتنی بر نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا (MSN)، برای حمل داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات و بررسی سمیت سلولی این سامانه، با و بدون دارو، روی رده سلول‌های مغزی نوروبلاستوما SY5Y انجام شد. داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات یک داروی آب‌دوست و آب‌گریز است که برای درمان و کنترل بیماری آلزایمر به کار می‌رود. در این تحقیق نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا سنتز شده و شکل و ویژگی‌های ساختاری آن‌ها، پیش و پس‌از بارگذاری با روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه، پراش پرتو ایکس، ایزوترم جذب نیتروژن و آنالیز پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز نشان داد که نانوذرات سنتز شده کروی بوده و ساختار یکسانی دارند. اندازه متوسط نانوذرات ۱۳±۱۰۰ نانومتر و میانگین اندازه روزنه آن‌ها حدود ۲٫۱۵ نانومتر است. میزان بارگذاری داروی ریواستیگمین در روزنه‌های نانوذرات ۲۰٫۸۸ درصد وزنی با بازدهی کپسوله سازی ۲۵ درصد به دست آمد. پروفایل رهایش دارو از این نانوذرات در سیال‌های مشابه بدن و معده طی ۲٤ ساعت، به ترتیب ۷۰٫۵ و۷۹٫٦ درصد به دست آمد که نمایان‌گر رهایش نسبتاً سریع دارو در محیط اسیدی است. بررسی سمیت سلولی این نانوذرات با و بدون دارو، با آزمون MTT روی رده سلول‌های مغزی SY5Y انجام شد. نانوذرات بارگذاری شده با داروی ریواستیگمین خاصیت درمانی بیش‌تری از داروی ریواستیگمین (به تنهایی) روی سلول‌های SY5Y داشتند.

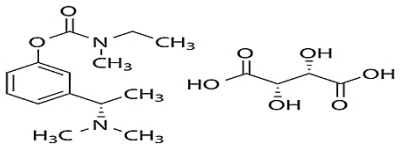
کلیدواژه‌ها: ***ریواستیگمین هیدروژن تارتارات، نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا، بیماری آلزایمر***

***نویسنده مسئول**
نشانی: پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، سازمان ملی استاندارد ایران، کرج، ایران، صندوق پستی: ٦۱۳۹-۱٤۱٥٥
تلفن: ۳۲۸۰۳۸۸۹(۲٦)۹۸+،
دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳(۲٦)۹۸+،
پست الکترونیکی: *l.rashidi@standard.ac.ir*

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

۱- مقدمه

ریواستیگمین دارویی ویسکوز، شفاف، تا حدی محلول در آب (ضریب توزیع ٤٫۲۷)، با وزن مولکولی ۲۵۰٫۳٤ دالتون و pk_a=۸٫۸۹ و فرمول شیمیایی $C_{14}H_{22}N_2O$ است که ساختار شیمیایی آن مطابق شکل (۱) است [۱].



شکل (۱)- ساختار شیمیایی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات

در بدن انسان دو آنزیم کولین‌استراز با نام‌های استیل کولین‌استراز (AChE) و بوتیریل کولین‌استراز (BuChE) وجود دارد که مهار آن‌ها با مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین، مؤثّرترین راه برای درمان بیماری آلزایمر به شمار می‌رود. امّا از آنجا که AChE بیش‌تر در مغز و BuChE بیش‌تر در خون و پلاسما وجود دارد، سازوکار اصلی مبارزه با آلزایمر، مهار AChE است. ریواستیگمین نیمه عمر پایین و مدت زمان عملکرد بالایی دارد و به لحاظ دارویی، مهارکننده هر دو آنزیم استیل کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز است.

این دارو در اولین گام دارو درمانیِ برای سطوحِ خفیف تا متوسطِ بیماری آلزایمر تجویز می‌شود. امّا عوارض جانبی دارو، نظیر اختلالات دستگاه گوارش، سمیت کبدی، ضعف و غیره، با افزایش مقدار مصرفی آن افزایش می‌یابد. از این روی، روش‌های درمانی که بتواند پذیرش بیمار و اثربخشی دارو را افزایش دهد، مورد توجه محققان قرار دارد.

در این میان، استفاده‌از سامانه مناسب حمل دارو به عنوان راهی برای کاهش عوارض جانبی ناشی‌از مهارکننده‌های استیل کولین‌استراز، به ویژه اختلالات گوارشی که برای بیمار هم قابل پذیرش است، انتخاب شایسته‌ای است. هم‌چنین کاربرد این سامانه‌ها در درمان بیماری‌های زوال عقل منجر به افزایش پای‌بندی بیمار به رژیم دارویی تجویز شده و کاهش خطر مصرف مقادیر بالای دارو می‌شود [٤-۲].

نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا، حامل‌های جدیدی در سامانه‌های نوین دارو رسانی هستند و به عنوان حامل چندین دارو برای درمان انواع سرطان به کار رفته‌اند تا سمیت دارو را کاهش و دارو را به طور دقیق در محل اثر تحویل دهند و از اثرهای جانبی دارو روی نقاط دیگر بدن جلوگیری کنند [٦]. استفاده‌از مواد مزومتخلخل سیلیکایی به عنوان سامانه جدیدی برای حمل دارو، نخستین بار در سال ۲۰۰۱ توسط والت ریگی و هم‌کاران پیشنهاد شد. آن‌ها از ایبوپروفن به عنوان یک دارویِ الگو استفاده کرده و این دارو را در شرایط آزمایشگاهی ساکن (بدون هم‌زدن محلول) بارگذاری نمودند [۷]. هم‌چنین جین و هم‌کارانش موفق شدند ذرات سیلیکا را با ابعاد ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانومتر سنتز کرده و پس از عامل‌دار کردن آن، داروی کورکومین را تا ۳۵ درصد در آن بارگذاری نمایند [۸]. در بررسی انجام شده توسط ژانگ و هم‌کارانش، اثر عوامل شیمیایی سطحی مختلف و اندازه حفره‌ها بر بارگذاری و رهایش داروی آب‌گریز تلمیستاران مطالعه شد [۹]. نتایج کار آن‌ها نشان داد که حجم کلی حفره‌ها و قطر آن‌ها عوامل اصلی و کنترل کننده ظرفیت بارگذاری دارو است. هم‌چنین موفق شدند داروی مدل خود را تا ٦۰ درصد روی نانوذرات بارگذاری کنند. مطالعات زیاد انجام شده روی نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا نشان داد که در مقایسه با حامل‌های دارویی با پایه پلیمری، MSN نسبت به حرارت، تنش مکانیکی، pH و هیدرولیز بسیار مقاوم است. هم‌چنین اندازه ذرات نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا از ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر تنظیم شده که می‌تواند منجر به تسهیل آندوسیتوز در سلول‌های حیوانی و گیاهی، بدون سمیت قابل توجه شود [۹ ، ۱۰].

در این پژوهش، نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا به روش حذف الگو سنتز شدند. ساختار و مورفولوژی نانوذرات ساخته شده به وسیله روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه، پراش اشعه ایکس، ایزوترم جذب نیتروژن و آنالیز پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. سپس، نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در محلولی با غلظت‌های مختلف از داروی ریواستیگمین محلول در آب دیونیزه، با روش اختلاط ساده بارگذاری شدند. هم‌چنین میزان بارگذاری این دارو در روزنه‌های نانوذرات و مقدار بازدهی کپسوله کردن دارو محاسبه شد تا غلظت بهینه دارو در آب به منظور بارگذاری داروی ریواستیگمین در نانوذرات به دست آید. نانوذرات

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

حاوی داروی ریواستیگمین نیز به لحاظ ساختار و مورفولوژی مورد آنالیز قرار گرفتند تا ثابت شود که در اثر بارگذاری دارو، ساختار نانوذرات منهدم نشده باشد. رهایش این دارو از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در محیط اسیدی معده و سیال مشابه بدن و نیز در مسیر خوراکی با pHهای مختلف بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ستیل تری میتل آمونیوم بروماید (۹۹٪) (CTAB)، تترا اتوکسی ارتوسیلیکات (TEOS)، کلرید پتاسیم، کربنات هیدروژن سدیم، کلرید سدیم، کلرید منیزیم شش آبه، فسفات هیدروژن پتاسیم سه آبه، سولفات هیدروژن، کلرید کلسیم، تریس هیدروکسی متیل آمینو متان، هیدروکلراید و کلریدریک اسید از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. ریواستیگمین هیدروژن تارتارات از شرکت داروسازی آرتا (ایران) تهیه شد. معرف MTT از شرکت سیگما/آلدریچ (آمریکا) و محلول تریپسین و DMEM از شرکت گیبکو/ بی آر ال (آمریکا) تهیه شد. سیال‌های مشابه معده، روده کوچک، روده بزرگ و سیال مشابه بدن طبق روش کار شرح داده شده توسط رشیدی و هم‌کارانش تهیه شد [۱۱]. تمام مواد شیمیایی به کار رفته برای تهیه سیالات شبیه‌سازی شده با درجه خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. سلول SY5Y از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (ایران) تهیه شد.

۲-۲- تجهیزات

سطح ویژه نانوذرات به روشBET، حجم و اندازه روزنه‌ها به روش BJH (Barrett-Joyner-Halenda)، با دستگاه مایکرومریتیکس ASAP2010 ساخت کشور آمریکا تعیین شد. برای تعیین ویژگی‌های ساختاری نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا از دستگاه XRD مدل فیلیپس مجهز به لامپ مسی (فرانسه) استفاده شد. آزمون FTIR با دستگاه مدل فرانتیر ساخت شرکت پرکین/ المر (آمریکا) به منظور تعیین ساختار شیمیایی نانوذرات، با و بدون دارو، انجام شد. برای بررسی وضعیت مکانی سطح و شکل شناسی ذرات از SEM مدل XL300 ساخت شرکت فیلیپس (هلند) استفاده شد. دستگاه TEM مدل CM120، ساخت شرکت فیلیپس (آمریکا)، برای مشاهده روزنه‌ها و بررسی داده‌های ساختاری روزنه‌ها به کار گرفته شد. دستگاه اسپکتروفتومتر مدل پرکین المر ساخت کشور آمریکا، به منظور بررسی میزان بارگذاری و رهایش دارو از روزنه نانوذرات در محیط‌های شبیه سازی شده استفاده شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- ساخت نانوذرات مزو متخلخل سیلیکا (MSN)

تهیه نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا طی مراحل زیر انجام شد: ابتدا ٤٨٠ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و یون زدایی شده درون ظرف واکنش ریخته شد، سپس ۱ گرم فعال کننده سطح (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) به محتویات ظرف واکنش اضافه و دور همزن در ۵۸۰ rpm تنظیم شد. دمای حمام آب گرم به گونه‌ای تنظیم شد تا دمای محتویات ظرف واکنش به ۸۰ درجه سلسیوس رسیده و در این دما ثابت باقی بماند (با قرار دادن حسگر دما درون ظرف واکنش، دما در هر لحظه کنترل شد). مقدار ۳/۵ میلی لیتر سود ۲ مولار به محتویات درون ظرف واکنش اضافه شد. پس‌از تثبیت دمای درون ظرف واکنش در ۸۰ درجه سلسیوس، ۵ میلی‌لیتر تترا ارتو اتیل سیلیکات به عنوان منبع سیلیکایی به صورت قطره قطره، با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به محتویات درون ظرف افزوده شد. واکنش به مدت ۲ ساعت ادامه یافت. نانوذرات شسته شد و در آون خلأ به مدت یک شبانه روز در دمای ٦٠ درجه سلسیوس خشک شد. سپس فعال کننده سطحی از نانوذرات تهیه شده به روش کلسینه کردن زدوده شد. بدین ترتیب که دمای

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

کوره از ۲۵ تا۵٤۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱ درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش یافت. سپس در این دما به مدت ٦ ساعت نگه داشته شد.

۲-۲-۲- تعیین مقدار بهینه بارگذاری داروی ریواستیگمین

نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای تهیه شده در محلولی حاوی غلظت معینی از ریواستیگمین هیدروژن تارتارات در آب دیونیزه، بارگذاری شد. بدین منظور، ابتدا غلظت‌های مختلفی از ریواستیگمین هیدروژن تارتارات (۱۰،۲۰،۳۰،٤۰،۵۰،٦۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در آب تهیه شد. سپس به هر بالن ته‌گرد ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات اضافه شد. یک مگنت درون هر بالن انداخته و هریک از غلظت‌های تهیه شده از ریواستیگمین، به ظرف معین آن اضافه شد. دهانه هر بالن بسته شده و دور هر بالن با ورقه آلومینیوم پوشانده شد و روی هم‌زن با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲٤ الی ٤۸ ساعت هم زده شد. پس‌از گذشت ۲٤ و ٤۸ ساعت، نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه رویی هر بالن با توجه به غلظت افزوده شده به هر بالن در ظرفی جدا شد و برای آنالیز میزان بارگذاری در یخچال نگه داری شد. نانوذرات بارگذاری شده در آون خلأ با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت خشک شدند. بدین ترتیب که پس‌از پایان یافتن زمان بارگذاری، تمامی فاز رویی صاف و در یک ظرف جمع‌آوری شد. یک میلی لیتر از مایع صاف شده را تا حجم۵۰ میلی‌لیتر رقیق و با دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب داروی ریواستیگمین موجود در فاز رویی در طول موج ۲٦۳ نانومتر به دست آمد. با منحنی کالیبراسیون داروی ریواستیگمین در آب یون‌زدایی شده، درصد بارگذاری و درصد بازدهی بارگذاری داروی ریواستیگمین در نانوذرات سیلیکا، به ترتیب، از رابطه‌ی (۱-الف) و (۱-ب) محاسبه شدند.

(۱-الف)

$$\text{درصد بارگذاری دارو} = \frac{\text{وزن داروی موجود در محلول بارگذاری شده} - \text{وزن داروی موجود در محلول صاف شده}}{\text{وزن نانو ذرات مزو متخلخل} + \text{دارو}} \times ۱۰۰$$

(۱-ب)

$$\text{درصد بازدهی بارگذاری دارو} = \frac{\text{وزن داروی بارگذاری شده در نانو ذرات مزو متخلخل}}{\text{وزن اولیه دارو در محلول تهیه شده برای بارگذاری}} \times ۱۰۰$$

۲-۲-۳- بارگذاری نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در غلظت بهینه از داروی ریواستیگمین

بدین منظور ابتدا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (غلظت بهینه) داروی ریواستیگمین در آب تهیه شد. سپس درون یک بالن ته گرد ۱۰۰ میلی‌گرم از نانوذره وزن شد. یک مگنت درون بالن انداخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ریواستیگمین درآب تهیه شده و به ظرف اضافه شد. دهانه بالن بسته شده، دور بالن با ورقه آلومینیوم پوشانده و آن را روی همزن قرار داده تا با دور ۱۵۰rpm به مدت ۲٤ ساعت هم‌زده شود. پس از گذشت ۲٤ ساعت، نمونه توسط سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه صاف شد. نمونه در آون خلأ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک شد. نمونه پودری نانوذرات با و بدون دارو، با استفاده از دستگاه وزن‌سنجی‌گرمایی مورد تحلیل قرار گرفت تا میزان کاهش وزن نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا به علاوه دارو در گرمای مورد نظر به دست آمده و به این وسیله مقدار ریواستیگمین بارگذاری شده تخمین زده شود. این نانوذرات برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲-٤- تعیین سینتیک رهایش ریواستیگمین از نانوذرات بارگذاری شده در سیال‌های شبیه‌سازی شده

پیش‌از بررسی سینتیک رهایش داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات در سیال‌های شبیه‌سازی شده، منحنی کالیبراسیون این دارو در هریک از سیال‌های شبیه‌سازی شده به دست آمد.

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

به منظور بررسی سینتیک رهایش ریواستیگمین از نانوذرات، در هریک از سیال‌های شبیه‌سازی شده مشابه معده (SGF با pH ۱٫۲) و بدن (SBF با pH ۷٫٤)، ابتدا ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات بدون دارو، به دقت وزن شده و درون یک ویال ۲ میلی‌لیتری در دار ریخته شد (شاهد)، در ویال دیگری ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات بارگذاری شده با دارو ریخته شد (نمونه). سپس، ۲ میلی‌لیتر از محیط رهایش به هریک از ویال‌ها اضافه شد. نمونه و شاهد در حمام آب شیکردار رفت و برگشتی با دور ۹۰ الی ۱۰۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. نمونه‌برداری در فواصل زمانی معین، با روش رهایش تجمعی انجام شد. بدین ترتیب که ویال‌ها از حمام خارج شده، درون سانتریفیوژی با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس، لایه‌رویی ویال‌ها با دقت زیاد خارج شده و جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۰٦ نانومتر در سیال مشابه بدن و در طول موج ۲۰۵ نانومتر در سیال مشابه معده با درنظر گرفتن شاهد با ۳ بار تکرار خوانده شد.

برای بررسی سینتیک رهایش دارو در مسیر خوراکی، از آنجا که حداکثر زمان ماندگاری ماده غذایی در معده ۲ ساعت است، لذا در شروع آزمایش ۲ میلی‌لیتر از محیط مشابه معده به هریک از ویال‌ها اضافه شد. در فواصل زمانی ۰٫۵ و ۱٫۵ نمونه‌برداری انجام شد و جذب نمونه‌ها با در نظر گرفتن شاهد در طول موج ۲۰۵ نانومتر خوانده شد. پس‌از گذشت مدت زمان ۲ ساعت، محیط سیال مشابه روده کوچک (SIF با pH ۸٫٦) به ویال‌ها اضافه شد. نمونه‌برداری طی مدت زمان ۳ ساعت (مدت زمان ماندگاری ماده غذایی در روده کوچک) در فواصل زمانی ۰٫۵ الی ۱ ساعت انجام شد. پس‌از سانتریفیوژ و جداسازی لایه‌رویی، جذب نمونه با در نظر گرفتن شاهد آن در طول موج ۲۰٦ نانومتر خوانده شد.

با توجه به آن که پس از ۳ ساعت، ماده غذایی به مدت زمان ۲۰ الی ۳۰ ساعت در روده بزرگ قرار می‌گیرد، نمونه‌برداری هر ۲ الی ۳ ساعت یک‌بار درمحیط مشابه روده بزرگ (SCF با pH ۷٫٤) انجام شد. جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۰٦ نانومتر و با در نظر گرفتن شاهد خوانده شد.

در تمام مراحل، پس‌از هر بار نمونه‌برداری از ویال‌های حاوی نانوذرات، به سرعت ۲ میلی‌لیتر از محیط تازه به هر یک از آن‌ها اضافه شد و ویال‌ها دوباره درون حمام بن ماری قرار داده شدند. این آزمون برای هریک از انواع نانوذرات بارگذاری شده با دارو همراه با شاهد، حداقل ۳ بار تکرار شد.

۲-۲-۵- آزمون سمیت روی سلول‌های SY5Y تیمار شده با نانوذرات و داروی ریواستیگمین

برای سنجیدن اثر سمیت نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا (با و بدون دارو) روی سلول‌های SY5Y، ابتدا سلول‌های تومور مغزی نوروبلاستوما SY5Y در فلاسک T75 کشت داده شدند تا تعداد سلول‌ها به حد نصاب برسد. سپس، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها با بافر فسفات حاوی EDTA دو بار شست‌وشو داده شدند. ۵ میکرولیتر تریپسین اضافه شد و فلاسک درون گرم‌خانه قرار داده شد تا سلول‌ها از کف فلاسک جدا شوند. مقدار ۵ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم اضافه شد تا اثر تریپسین خنثا شود. محتوای درون فلاسک در فالکون ریخته و سانتریفیوژ شد. پس‌از سانتریفیوژ، لایه رویی دور ریخته شد و دوباره به سلول‌ها محیط کشت حاوی سرم اضافه شد. پس‌از چند بار پی‌پتاژ، تعلیق یکنواخت سلولی تشکیل می‌شود. اطراف پلیت با ورقه آلومینیوم پوشانده شد و پلیت برای سنجش سمیت سلولی دوباره درون گرم‌خانه قرار داده شد. پس‌از گذشت ۳ ساعت پلیت از گرم‌خانه خارج شد و لایه رویی هر چاهک دور

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

ریخته شد، به طوری کـه بلورهـای فورمـازان در تـه هـر چاهک باقی بماند. سپس، به هر چاهـک ۲۰۰ میکرولیتـر حلال دی‌میتل‌سولفوکساید اضافه شـد، تـا بلورهـا در آن حل شوند. ۱۰ میکرولیتر از نمونه برداشته شد و روی لام شمارش ریخته و زیر میکروسکوپ تعداد سلول‌ها در ١٦ خانه مربعی شکل لام شمارش شد. سپس، تعداد سلول‌ها تخمین زده شد. سلول‌هـا در سـه پلیـت ٩٦ چـاهکی بـه تعداد ١٠٤×١ سلول در هر چاهک کشت داده شد. حجـم تعلیق سلولی در هر چاهک معادل ۱۰۰ میکرولیتر بود.

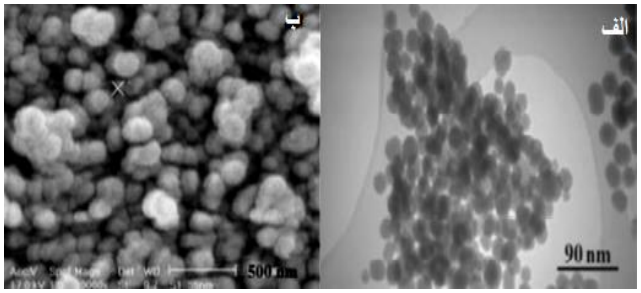
پلیت‌ها در گرم‌خانه قرار داده شد. پس‌از گذشـت ٢٤ سـاعت، غلظـت‌هـای مختلـف ۱، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم از نانوذرات بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT) در محیط کشت بدون سرم تهیـه شـد. پـس‌از ۲۰ دقیقـه فراصـوت دهـی حـدود ۱۰۰ میکرولیتر از هریـک از غلظـت‌هـای تهیـه شـده بـه سـه چاهک (سه تکرار) در هر پلیت اضافه شد. به سه چاهک تنها محیط کشت بدون سرم به عنوان کنترل اضـافه شـد. دوباره پلیت‌ها درون گـرم‌خانـه قـرار داده شـدند. پـس‌از گذشت ٢٤ ساعت یک پلیـت از گـرم‌خانـه خـارج شـد. سـپس، بـه هـر چاهـک ۲۰ میکرولیتـر معـرف MTT در تاریکی اضافه شد. پـس‌از حـل شـدن بلورهـا در حـلال مزبور، پلیت را در دستگاه الایزا قرار داده و میزان جـذب در هر چاهک در ٦٠٠-٥٩٥ نانومتر خوانـده شـد. پلیـت دوم در زمان ٤٨ ساعت و پلیت سوم در زمان ۷۲ سـاعت از گرم‌خانه خـارج شـد و تمـامی مراحـل قبـل بـرای آن تکرار شد. بـدین ترتیـب آزمـون سـمیت در غلظت‌هـای مختلف نانوذرات و در زمان‌های مختلف با سه بار تکـرار انجام شد. میزان درصد توانایی زنـده مانـدن سـلول‌هـا از رابطه‌ی (۲) محاسبه شد [۲۳].

$$\text{درصد توانایی زنده ماندن سلول} = \left[\frac{\text{جذب در چاهک حاوی سلول‌های تیمار شده با نانوذرات سیلیکایی}}{\text{جذب در چاهک حاوی سلول به تنهایی (شاهد)}}\right] ۱۰۰ \qquad (۲)$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ریخت شناسی نانوذرات تهیه شده

شکل (۲) تصاویر SEM و TEM نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا را نشان می‌دهد. تصاویر نمایانگر ساختاری کروی، سطح صاف و یک‌نواخت نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای سنتز شده است. تصویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهد که اندازه نانوذرات به دست آمده در محدوده ٤٠ تا ۱۱۰ نانومتر با متوسط اندازه ذرات ۱۳± ۱۰۰ نانومتر است.



شکل (۲)- تصاویر (الف) TEM و (ب) SEM از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای سنتز شده

۳-۲- ساختار نانوذرات تهیه شده

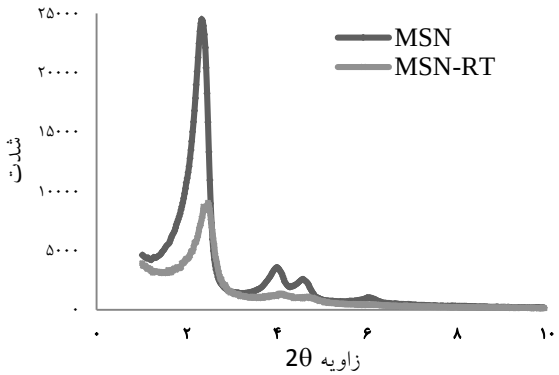
الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا (MSN) در زوایای پایین صفر تا ده انجام شد. نتایج در شکل (۳) نشان داده شده‌است. در الگوی پراش اشعه ایکس مربوط به تمامی ساختارهای شش وجهی مزومتخلخل سیلیکا، چهار اوج مربوط به یک پراش قوی (۱۰۰) و سه پراش ضعیف‌تر (۱۱۰)، (۲۰۰) و (۲۱۰) دیده شد که خود بیان‌گر آن است که سـاختـار به دست آمـده متـعـلق به خـانـواده MCM-41 نوع نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا است [۱۲].

شدت پراش قوی (۱۰۰) در هنگام بارگذاری کاهش یافته و حتّا پراش‌های ضعیف (۱۱۰)، (۲۰۰) و (۲۱۰) در نگاره نانوذرات بارگذاری شده با ریواستیگمین MSN-RT بسیار ضعیف و حتّا قابل مشاهده نیست.

نتایج این تحلیل نیز تاییدکننده حفظ ساختار شش وجهی نانوذرات پس‌از بارگذاری با ریواستیگمین بوده و در حقیقت

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

با بارگذاری ریواستیگمین و پرشدن روزنه‌ها از ریواستیگمین، ضخامت دیواره روزنه‌ها و مقدار زاویه (2Θ) نسبت به نانوذرات بارگذاری نشده افزایش یافته‌است.



شکل (۳)- نگاره‌های XRD نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT)

۳-۳- تعیین مقدار اندازه، حجم، توزیع و مساحت روزنه نانوذرات تهیه شده

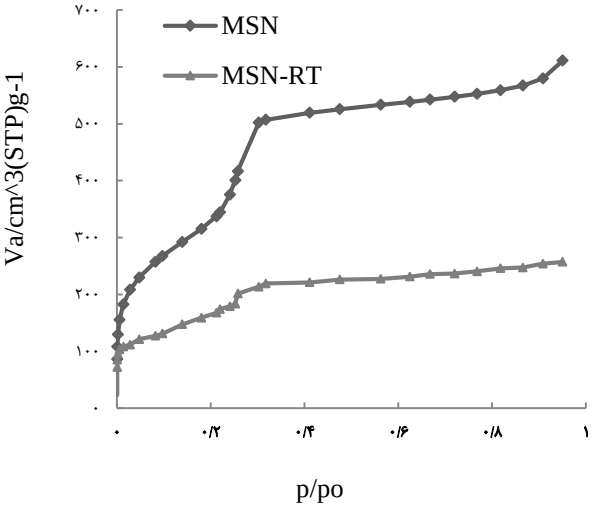
ذرات MSN و MSN-RT با روش ایزوترم جذب و دفع نیتروژن BET بررسی شدند. بدین وسیله اندازه روزنه‌ها، حجم و مساحت روزنه، و مساحت سطح ویژه نانوذرات به دست آمد.

نتایج حاکی‌از آن است که بر اثر بارگذاری ریواستیگمین درون روزنه‌های نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا، مقادیر قطر روزنه‌های نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا از ۲٫۱۵ به ۲ نانومتر، و مساحت سطح ویژه با روش BET، از ۱۰۲۶٫۶۰ به ۷۵۸٫۵٤ مترمربع بر گرم و حجم روزنه های محاسبه شده با روش BJH، از ۰٫۸۳۲۰ به ۰٫۳۸۵۰ سانتی‌متر مکعب بر گرم کاهش یافته‌است (جدول۱).

جدول (۱)- نتایج تحلیل ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن روی نانوذرات بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT)

نمونه	S_{BET} مساحت سطح ویژه ($m^2\ g^{-1}$)	BJH حجم روزنه ($cm^3\ g^{-1}$)	قطر روزنه (nm)	BJH مساحت روزنه ($m2\ g^{-1}$)
MSN	۱۰۲٦٫٦۰	۰٫۸۳۲	۲٫۱۵	۱۱۷۸٫۹۰
MSN-RT	۷۵۸٫۵٤	۰٫۳۸۵	۲	۸۱۳٫۹۵

نمودارهای ایزوترم جذب نیتروژن نانوذرات MSN و MSN-RT در شکل (٤) نشان داده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد که در اثر بارگذاری داروی ریواستیگمین میزان جذب و واجذب کاهش یافته که این امر می‌تواند بر اثر پرشدن روزنه‌ها به وسیله‌ی نفوذ دارو رخ داده باشد.



شکل (٤)- نمودار ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن نانوذرات بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT)

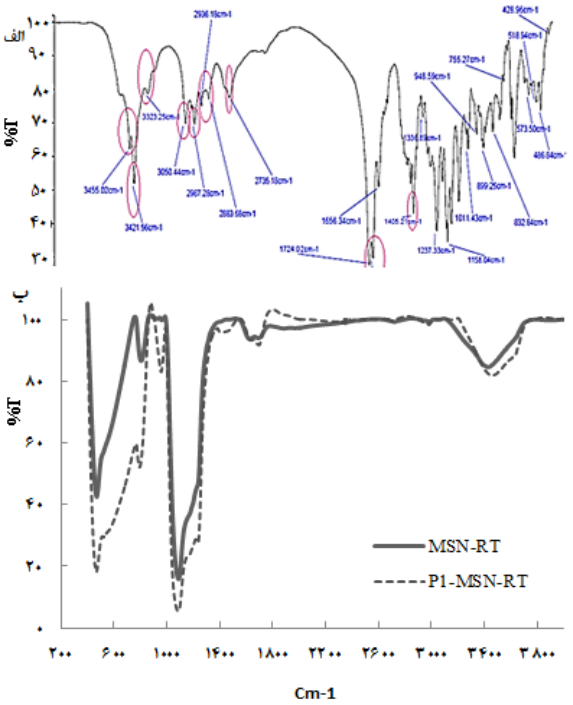
۳-٤- جزییات ساختار نانوذرات تهیه شده

شکل (۵) نگاره‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه داروی ریواستیگمین و نانوذرات MSN و MSN-RT را نشان می‌دهد. از بارزترین شاخصه‌های داروی ریواستیگمین هیدوژن تارتارات به گروه‌های استری و آمین نوع سوم در ساختار دارو و گروه‌های کربوکسیل و هیدورکسی در ساختار هیدروژن تارتارات می‌توان اشاره کرد.

شکل (۵-الف) طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه داروی ریواستیگمین را نشان می‌دهد. طول موج‌های ۳٤۵۵، ۳٤۲۱ و ۳۳۳۲ cm^{-1} به ترتیب، مربوط به جذب چند برابرِ طول موجِ C=O، جذب کششی N-H تشکیل شده بین دارو و هیدروژن تارتارات و جذب O-H مربوط به هیدروژن تارتارات و جذب کششی پیوند C=C در حلقه آروماتیکی دارو است. اوج ثبت شده در محدوده‌ی طول موج‌های ۲۹۸۷، ۳۰۵۰، ۲۹۳٦ و ۲۷۳۵ cm^{-1} مربوط به جذب کششی پیوند C-H است. اوج ثبت شده در محدوده‌ی

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

طول موج $1724\ cm^{-1}$ مربوط به جذب کششی پیوند C=O در گروه استری دارو و گروه کربوکسیل هیدروژن تارتارات است. اوج ثبت شده در محدوده‌ی طول موج $1405\ cm^{-1}$ مربوط به جذب کششی پیوند C=C در حلقه آروماتیکی دارو است.



شکل (۵)- نگاره‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه؛ الف) داروی ریواستیگمین؛ ب) نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT)

شکل (۵-ب) طیف مربوط به نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای بدون دارو و بارگذاری شده با دارو را نشان می‌دهد. پیوندهای جذبی که در محدوده ۳۰۰۰ تا ۳۷۵۰ cm^{-1} وجود دارند، نمایانگر بسامد ارتعاش کششی گروه‌های سیلانولی هستند که در اثر بارگذاری داروی ریواستیگمین شدت آن‌ها کاهش یافته‌است. هم‌چنین پیوندهای ۴۵۲٫۵۸ و ۸۰۳٫۰۸ cm^{-1} به ترتیب به پیوند Si-OH و کشش متقارن Si-OH نسبت داده شده‌است که شدت این اوج‌ها در نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای بارگذاری شده با داروی ریواستیگمین افزایش یافته و تا حدودی شیفت پیدا کرده‌است. این اوج‌ها در اثر ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین گروه عاملی هیدروکسی و آمینی دارو، با گروه عامل O-H نانوذرات افزایش یافته‌اند. درحالی که پیوند $1629\ cm^{-1}$ که به ارتعاشات پیوند Si-OH نسبت داده شده با بارگذاری دارو، کمی شیفت و کاهش یافته‌است. هم‌چنین اوج مربوط به $1495.95\ cm^{-1}$ که در طیف نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای با دارو مشاهده می‌شود، نمایانگر حضور پیوند N-H دارو و اتصال گروه عامل آمینی به گروه‌های سیلانول روی سطح نانوذرات است

۳-۵- مقدار بهینه بارگذاری دارو در نانوذرات

نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا با مقدار ثابتی در مجاورت غلظت‌های مختلف تهیه شده از انحلال داروی ریواستیگمین در آب قرار داده شدند و در دو زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت میزان بارگذاری دارو در نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل‌از این بررسی در جدول (۲) آورده شده‌است. نتایج حاکی‌از آن است که حداکثر بارگذاری دارو در نانوذارت طی ۲٤ ساعت و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ریواستیگمین در آب حاصل شده‌است.

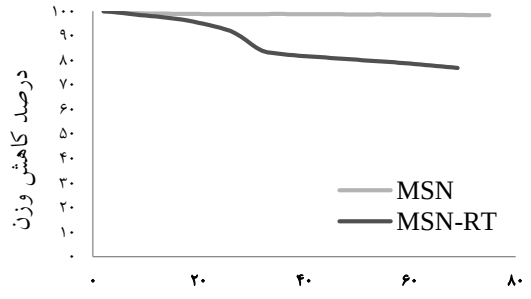
جدول (۲)- درصد بارگذاری و بازدهی کپسوله سازی دارو در نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا، در غلظت‌های مختلف و زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت

غلظت دارو (mg/ml)	بارگذاری دارو (٪)		بازدهی بارگذاری دارو (٪)	
زمان (ساعت)	۲٤	٤۸	۲٤	٤۸
۱۰	۵٫۷۰	۵٫٦۰	٦٫۸٤	٦٫۷۰
۲۰	۱۲٫۰۰	۱۲٫۱۰	۱٤٫٤۰	۱٤٫۵۲
۳۰	۱۷٫۷۰	۱۷٫۹۰	۲۱٫۰۰	۲۱٫٤۸
٤۰	۲۰٫۰۰	۲۰٫۰۰	۲٤٫۰۰	۲٤٫۰۰
۵۰	۲۰٫۸۸	۲۰٫۷۰	۲۵٫۰۰	۲٤٫۸۰
٦۰	۲۰٫۷۰	۲۰٫۸٦	۲٤٫۸۰	۲۵٫۰۰

شکل (٦) نمودار وزن‌سنجی‌گرمایی نانوذره بارگذاری شده در محلول ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول داروی ریواستیگمین را در مقایسه با نانوذره بدون دارو نشان می‌دهد. با توجه به دمای تخریب داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات که در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس رخ می‌دهد، می‌توان دریافت که میزان بارگذاری این دارو حدود ٪۲۰٫۸۸

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

(وزنی/وزنی) است که با مقدار به دست آمده در دستگاه اسپکتروفتومتر مطابقت دارد.

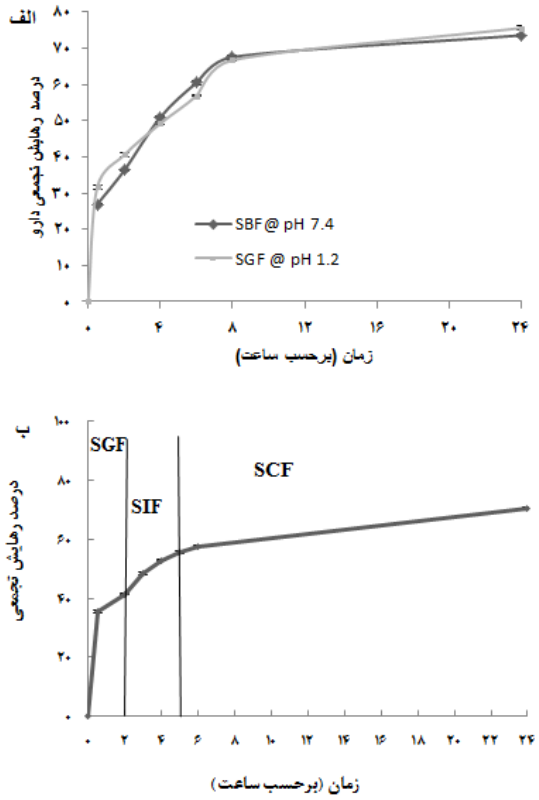


شکل (٦)- نمودار وزن سنجی گرمایی نانوذره بدون دارو (MSN) و حاوی دارو (MSN-RT)

۳-٦- سینتیک رهایش ریواستیگمین از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در سیال‌های شبیه‌سازی شده

رهایش دارو از نانوذرات مزو متخلخل سیلیکا در سیال‌های مشابه معده (PH ۱٫۲) و مشابه بدن (PH ۷٫٤) (شکل۷-الف) و در مسیر خوراکی (pHهای ۱٫۲، ٦٫۸، ۷٫٤) (شکل۷-ب) بررسی شد. همان طور که در شکل (۷) دیده می‌شود، رهایش ناگهانی داروی ریواستیگمین طی نیم ساعت اولیه از نمونه MSN-RT، به ترتیب، در سیال مشابه معده، بدن و مسیر خوراکی ۳۱٫۵، ۲٦٫۸ و ۳۳ درصد است و پس‌از گذشت ۲٤ ساعت میزان رهایش داروی ریواستیگمین از MSN-RT، به ترتیب به ۷۹٫٦، ۷۰٫۵ و ۷۵ درصد رسیده‌است. میزان رهایش ریواستیگمین از MSN-RT، پس‌از گذشت ۲ ساعت در سیال مشابه معده به ٤۱٫۳ و پس‌از گذشت ۵ ساعت در سیال مشابه روده کوچک به ٦۵ و پس‌از گذشت ۲٤ ساعت در سیال مشابه روده بزرگ به ۷۵ درصد رسیده‌است (شکل۷-ب). رهایش ریواستیگمین از این سامانه طی ٦ روز به حدود ۹۱٫۸ درصد در سیال مشابه معده (شکل۷-الف) و ۸۱٫۵ درصد در سیال مشابه بدن (شکل۷-ب) رسیده‌است.

بررسی پروفایل رهایش دارو از این نانوذرات نشان داد که سرعت رهایش در سیال مشابه معده اندکی سریع‌تر از سیال مشابه بدن است. با توجه به نتایج زتا پتانسیل، داروی ریواستیگمین در pHهای ۱٫۲ و ۷٫٤ به ترتیب دارای بار ٦+ و ۲۱- است. درحالی که نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در همان pHها به ترتیب دارای بار ۳+ و ۱۰- هستند. بنابراین، در محیط اسیدی بار مثبت دارو بیش از بار مثبت در سطح نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا است و بار منفی داروی ریواستیگمین در محیط قلیایی به نحو قابل توجهی بیش‌تر از بار منفی نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا است.



شکل (۷)- نمودارهای رهایش تجمعی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا؛ الف) سیال‌های مشابه معده (SGF) و مشابه بدن (SBF)؛ ب) مسیر خوراکی

ریواستیگمین هیدروژن تارتارات محلول در آب، اتانول و متانل بوده و میزان pKa آن حدود ۸٫۸۵ است. بنابراین، طبیعی است که در محیط اسیدی و قلیایی نیروی دافعه الکترواستاتیکی بین دارو و نانوذرات ایجاد شده که باعث رهایش دارو در هر دو محیط می‌شود. امّا نتایج نمایانگر رهایش سریع‌تر دارو در محیط اسیدی است. به دلیل اینکه در شرایط اسیدی مقادیر زیادی پروتون در محیط وجود دارد که موجب پروتونه شدن گروه‌های عامل دارو (کربونیل، آمین، و هیدروکسی) و گروه هیدورکسیل نانوذرات شده و تمایل به

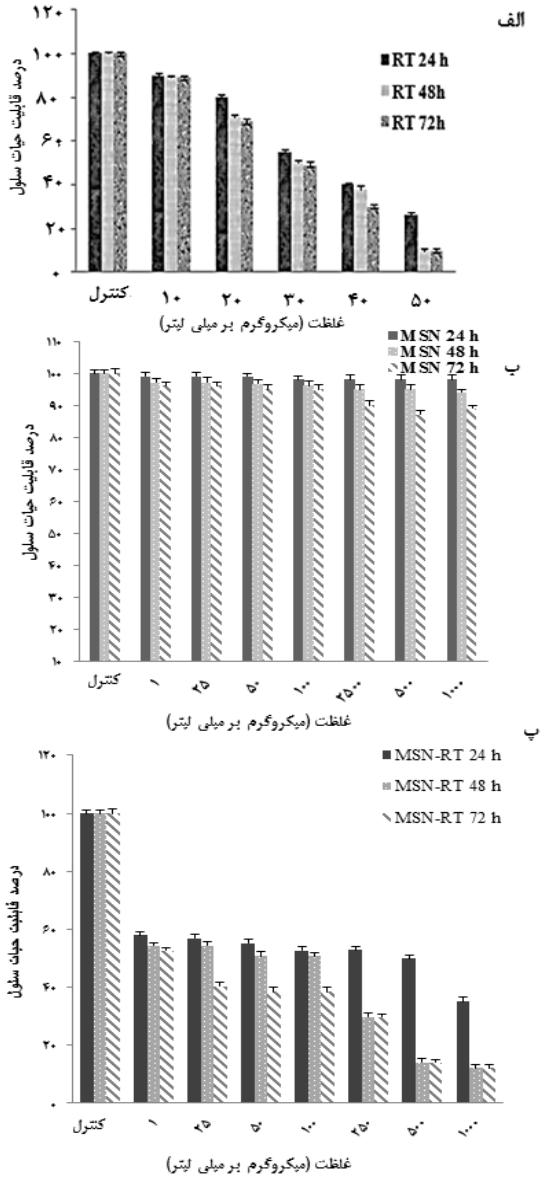
© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

برهم‌کنش‌های جذبی دربین نانوذرات و دارو کم‌تر صورت می‌گیرد. بنابراین، انتظار می‌رود رهایش در محیط اسیدی سریع‌تر باشد. دلیل دیگر، رهایش سریع دارو در شرایط اسیدی این است که احتمال دارد در شرایط سوپراسیدی به جای اینکه دارو وارد برهم‌کنش‌های (جذبی) با نانوذرات شود، با خود دارو وارد برهم‌کنش شود و به دلیل پیوند هیدروژنی بین دو مولکول دارو، باعث بزرگ‌تر شدن مولکول شده و رهایش سریع دارو را موجب شود. در شرایط خنثا احتمال برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک نظیر پیوندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل نانوذرات و گروه‌های عامل دارو (گروه کربونیل، آمین، و هیدروکسیل) وجود دارد که منجر به رهایش کندتر دارو در محیط خنثا نسبت به محیط اسیدی خواهد شد.

۳-۷- آزمون سمیت روی سلول‌های SY5Y تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده

سمیت داروی خالص (ریواستیگمین هیدروژن تارتارات) و سامانه انتخابی (نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا با و بدون دارو) به وسیله انجام آزمون MTT روی سلول‌های SY5Y مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های SY5Y در مجاورت غلظت‌های مختلفی از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا و بارگذاری شده آن‌ها با داروی ریواستیگمین (۱ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و هم‌چنین داروی ریواستیگمین به تنهایی (از غلظت ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت قرار گرفتند. با استفاده از شکل (۸-الف)، مقدار IC_{50} داروی ریواستیگمین هیدورژن تارتارات روی سلول‌های SY5Y محاسبه و به ترتیب در حدود ۳۰، ٤٠ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، طی زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت تخمین زده شد. ارزیابی سمیت ریواستیگمین خالص روی سلول‌های SY5Y (شکل۸-الف) نشان داد که داروی ریواستیگمین روی این سلول‌ها خاصیت درمانی دارد. زیرا توانایی زنده ماندن این سلول‌ها با افزایش غلظت ریواستیگمین در محیط کاهش یافت.



شکل (۸)- توانایی زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف؛ الف) داروی ریواستیگمین (RT)؛ ب) نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا (MSN)؛ پ) نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا بارگذاری شده با داروی ریواستیگمین (MSN-RT) در زمان‌های گرم‌خانه گذاری ٢٤، ٤٨، ٧٢ ساعت

شکل (۸-ب) نشان می‌دهد که بقای سلول‌های SY5Y در مجاورت غلظت‌های مختلف از نانو ذرات بدون دارو پس از گذشت ٢٤ الی ٤٨ ساعت، بیش از ۹۵ درصد بود، اما پس از گذشت ٧٢ ساعت مشاهده شد که توانایی زنده ماندن سلول‌ها در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندکی کاهش یافته‌است. این کاهش را می‌توان به کمبود مقدار مواد مغذی درنتیجه‌ی تکثیر سلول‌های SY5Y نسبت داد.

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

در سلول‌های SY5Y مجاور شده با نانوذرات بارگذاری شده با داروی ریواستیگمین مشاهده شد که با افزایش غلظت نانوذرات و میزان غلظت داروی ریواستیگمین رها شده در محیط، طی گذشت زمان، مقدار توانایی زنده ماندن سلول‌ها کاهش می‌یابد. به عنوان مثال، میزان کاهش توانایی زنده ماندن سلول‌های SY5Y در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا حاوی دارو، به ترتیب، به ۵۰، ۱٤ و ۱٤ درصد پس‌از گذشت زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت رسید. درنتیجه با گذشت زمان گرم‌خانه‌گذاری، کاهش توانایی زنده ماندن سلول‌های SY5Y بیش‌تر شد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان دریافت که داروی ریواستیگمین رها شده از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا همان خاصیت درمانی داروی ریواستیگمین خالص و کپسوله نشده را حفظ کرده‌است. همچنین در هنگام رهایش دارو از نانوذرات مشاهده شد که اثر سمیت ریواستیگمین رها شده روی سلول‌های سرطانی SY5Y، هم‌ارز یا بیش‌تر از اثر سمیت ریواستیگمین خالص روی سلول‌های مورد نظر است.

به طور مثال، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات بارگذاری شده، درصد توانایی زنده ماندن سلول طی ۲٤ ساعت، ۵۲٫۷ درصد است و در این غلظت نانوذرات بارگذاری شده حاوی ۲۰ میکروگرم داروی ریواستیگمین بودند.

میزان کاهش توانایی زنده ماندن سلول در مجاورت غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی ریواستیگمین به تنهایی، پس‌از گذشت ٤۸ ساعت، به ۵۱ درصد رسید که نشان می‌دهد داروی محبوس شده در نانوذرات اثر سمیت بیش‌تری دارد و سامانه سیلیکای مزومتخلخل باعث پایداری بیش‌تر دارو شده که می‌تواند سرعت در انحلال و رسیدن به سطوح زیستی را افزایش داده که نتیجه آن سرعت بخشی به اثر درمانی و بهبود قابلیت زیستی آن‌ها خواهد بود.

همان طور که در مقالات گزارش شده‌است، داروی ریواستیگمین هیدروزن تارتارات یک داروی جاذب رطوبت است و تجزیه می‌شود. این دارو و قابلیت زیست دسترس پذیری مناسبی ندارد، لذا تنها ۱٫۵ تا ٦ میلی‌گرم آن ازطریق خوراکی در درمان مؤثّر خواهد بود. این دارو طی هیدرولیز کولین‌استراز حذف می‌شود. بنابراین، کپسوله کردن این دارو از عوارض ناشی‌از غیرفعال شدن آن و عوارض جانبی داور روی سلول‌های سالم مناطق مختلف بدن جلوگیری خواهد کرد. ازسوی دیگر، کپسوله کردن این دارو منجر به افزایش قابلیت تحمل بیمار نسبت به دُز دریافتی آن می‌شود. در سال-های اخیر تلاش زیادی برای بارگذاری این دارو در حامل‌های مختلف شده‌است [۱].

در سال ۲۰۱۲ داروی ریواستیگمین در نانوذرات کیتوسان به وسیله روش انعقاد یونی بارگذاری شد تا مقدار دریافت دارو توسط سلول‌های مغزی را ازطریق بینی افزایش دهد [۱۳]. میزان بازدهی کپسوله سازی دارو بسته به نسبت پلیمر به دارو از ۷۵٫۱ الی ۸۵٫۳ درصد متغییر بود و میزان بارگذاری از ٤۳٫۳۷ الی ۵۸٫۱۸ درصد بود. نتایج حاکی از آن بود که طی ۱ ساعت اولیه بیش‌از ۳۰ درصد از دارو در محیط بافر فسفات رها شد و پس‌از گذشت ۲٤ ساعت بیش از ۸۹ درصد از دارو رها شده بود. در پژوهش دیگر از لیپوزوم‌ها برای کپسوله کردن این دارو استفاده شد، میزان درصد بازدهی کپسوله کردن بیش از ۸۰ درصد تخمین زده شده و میزان رهایش دارو ازین سامانه طی ٦ ساعت اولیه بیش از ۵٦ درصد بود [۱٤].

در سال ۲۰۰۸ از اولئوزل‌ها برای حمل داروی ریواستیگمین استفاده شد. براساس نتایج حاصل شده کم‌ترین رهایش دارو طی ۲٤ ساعت، و در حدود ۱۵ درصد مشاهده شد [۱۵].

در سال ۲۰۱٤ نیز نانوذرات مایع جامد (SLN) برای حمل داروی ریواستیگمین استفاده شد که میزان بارگذاری دارو ۸٦ درصد و رهایش آن در محیط قلیایی کند بود [۱٦]. هم‌چنین داروی ریواستیگمین در نانوذرات آلبومین سرم انسانی بارگذاری شده و میزان رهایش دارو از این نانوذرات ۵۵٫٦ درصد طی ۱۲ ساعت، در محیط قلیایی بود [۱۷]. نانوذرات با سطح پلیمری پگیله شده در سال ۲۰۰۷ تهیه شد، و برای بارگذاری داروی ریواستیگمین به کار گرفته شد [۱۸]. داروی ریواستیگمین در نانوذرات کیتوسان، توسط سیمار و هم‌کارانش با حلال اتانول به مقدار ۸۲٪ بارگذاری شد [۱۹]. میزان بارگذاری داروی ریواستیگمین در نانوذرات پلیمری

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

(PBCA)، و نانوذرات پلیمری (PLGA) [۲۰] و در نانوذرات پلیمری الاکتید دیپسی‌پپتید [۲۱] با حلال‌های آلی مانند: استونیتریل و استون به ترتیب، ۵۷٫۳، ۷٤٫٤، ٦۰٫۷ درصد گزارش شده‌است.

در این پژوهش از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا با خاصیت سطح هیدروفیلی برای بارگذاری داروی ریواستیگمین با ویژگی هیدروفیلی و هیدروفوبی استفاده شد. هم‌چنین از حلال آب برای بارگذاری داروی ریواستیگمین هیدروژن تارتارات استفاده شد که برخلاف حلال‌های استفاده‌شده برای بارگذاری این دارو در نانوحامل‌های تحت بررسی پیشین، هیچ نوع سمیتی ندارد. این نانوحامل قادر به بارگذاری ۲۰٫۸۸ درصد از این دارو بود. درحالی که میزان بازدهی کپسوله کردن دارو ۲۵ درصد بود. نتایج حاکی‌از پروفایل رهایش تقریباً مشابه این دارو از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا حاوی دارو در محیط اسیدی و قلیایی است و این رهایش کند صورت می‌گیرد. لذا این دارو که مدت ماندگاری آن در محیط آبی حدود ٦ ساعت است [۱]، در محیط اسیدی معده و در محیط قلیایی خون حفاظت می‌شود. گزارش‌ها حاکی‌از آن است که این نانوذرات اثر سمی روی سلول‌های سالم ندارند. هم‌چنین روی سلول‌های سرطانی هم تأثیر سمی ندارند [۲۲، ۲۳].

نتایج به دست آمده از این پژوهش نمایانگر آن است که نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای حاوی داروی ریواستیگمین به شکل مؤثّرتری روی سلول‌های SY5Y عمل کرده است. درحالی که داروی ریواستیگمین آزاد با دُز بالاتر می‌تواند همان اثر را روی این سلول‌ها داشته باشد.

٤- نتیجه‌گیری

نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا را می‌توان به عنوان نانوحامل‌های مناسبی برای کنترل رهایش داروی ریواستیگمین در محیط اسیدی معده و یا محیط قلیایی خون به کار برد. نتایج حاکی‌از عملکرد مؤثّر نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای حاوی دارو نسبت به دارو تنها روی سلول‌های آلزایمر بود. ازسوی دیگر، دیده شد که این نانوذرات موجب شده تا سلول‌ها بیش‌تر وارد فاز مرگ سلولی شوند. هم‌چنین کاربرد این نانوذرات منجر به افزایش پایداری شیمیایی دارو شده است. ازسوی دیگر، این نانوحامل را می‌توان با یک گروه عامل مناسب دیگر پوشش داد تا میزان بارگذاری دارو افزایش یابد. درنهایت، نانوذرات مزومتخلخل سیلیکای حاوی داروی ریواستیگمین را می‌توان برای مصرف خوراکی به صورت قرص فشرده پیشنهاد داد.

۵- سپاس‌گزاری

با سپاس فراوان از سازمان ملی استاندارد ایران، پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، و هم‌کاران محترم این سازمان سرکار خانم مهندس زهرا غلامی و سرکار خانم مهندس سارا نانوازاده که در به ثمر رسیدن این پژوهش صمیمانه هم‌کاری کردند.

٦- مرجع‌ها

[1] Site of Alzheimer's Association: http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp.

[2] D. Sherita McLamore, Exelon® patch (Revastigmine) Transdermal Delivery System, *Chem rev NDA*: 22-083. Novartis. HFD-120.

[3] A. L. Chan, Y. W. Chien, S. Jin Lin, "Transdermal delivery of treatment for Alzheimer's disease: development, clinical performance and future prospects" *Drug Aging* 25, 761-775, 2008.

[4] P. Sozio, L. S. Cerasa, L. Marinelli, A. Di Stefano, "Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease" *Neuropsychiatr Dis Treat* 8, 361-8, 2012.

[5] M. Vallet Regi, A. Rámila, R. P. del Real, J. Pérez Pariente, "A New Property of MCM-41: Drug Delivery System" *Chem Mater* 13, 308-11, 2001.

[6] A. Bayu, D. Nandiyanto, S. G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, "Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters" *Micropor Mesopor Mat* 120, 447-453, 2009.

[7] M. Vallet-Regi, F. Balas, D. Arcos, "Mesoporous materials for drug delivery" *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 7548-58, 2007.

[8] D. Jin, K. W. Park, J. H. Lee, K. Song, "The selective immobilization of curcumin onto the internal surface of mesoporous hollow silica particles by covalent bonding and its controlled release" *J Mater Chem* 21, 3641-3645, 2011.

[9] Y. Zhang, Z. Zhi, T. Jiang, J. Zhang, Z. Wang, S. Wang, "Spherical mesoporous silica

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org

nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan" *J Control Release* 145, 257-63, 2010.

[10] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, "Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells*" J Amer Chem Soc* 128, 14792-3, 2006.

[11] L. Rashidi, E. Vasheghani-Farahani, K. Rostami, F. Ganji, M. Fallahpour, "Mesoporous silica nanoparticles with different pore sizes for delivery of pH-sensitive gallic acid" *Asia-Pac J Chem Eng* 9, 845–853, 2014.

[12] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins" *J Am Chem Soc* 129**,** 8845-8849, 2007.

[13] M. Fazila, S. Md, S. Haque, M. Kumar, S. Baboota, J. K. Sahni, J. Ali, "Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting" *Eur J Pharm Sci*, 47, 6-15, 2012.

[14] K. Arumugam, G. S. Sundararajan, S. R. Mallayasamy, R. K. Averineni, M. S. Reddy, N. Udupa, "A study of rivastigmine liposomes for delivery into the brain through intranasal route" *Acta Pharm* 58, 287-297, 2008.

[15] A. Vintiloiu, M. Lafleur, G. Bastiat, J. Leroux,"In Situ-Forming Oleogel Implant for Rivastigmine Delivery" *Pharm Res* 25**,** 845-852, 2008.

[16] R. Makkar, P. Singh, C.C. Danta, V. Kakkar, I. P. Kaur, P. Piplani, "Newly Synthesized Acetylcholinesterase Inhibitors for Alleviating Alzheimer's Disease using Solid Lipid Nanoparticles" *Curr Drug Therap* 9, 111-123, 2014.

[17] A. M. Avachat, Y. M. Oswal, K. N. Gujar, R. D. Shah, "Preparation and Characterization of Rivastigmine Loaded Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles" *Cur Drug Deliv* 11, 359-70, 2014.

[18] E. F. Craparo, G. Pitarresi, M. L. Bondi, M. P. Casaletto, M. Licciardi, G. Giammona, "A nanoparticulate drug-delivery System for rivastigmine: physico-chemical and in vitro Biological Characterization" *Macromol Biosci* 8, 247-59, 2008.

[19] K. Simar preet, R. Rekha, H. Afzal, K. Sarita, **"**Preparation and Characterization of Rivastigmine Loaded Chitosan Nanoparticles" *J Pharm Sci Res* 3, 1227-32, 2011.

[20] S. A. Joshi, S. S. Chavhan, K. K. Sawant, "Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies" *Eur J Pharm Biopharm* 76**,** 189-99, 2010.

[21] K. Pagar, P. Vavia, "Rivastigmine-L-lactide-depsipeptide Polymeric Nanoparticles" *Sci Pharm* 81, pp 86585, 2013.

[22] L. Rashidi, E. Vasheghani-Farahani, M. Soleimani, A. Atashi, K. Rostami, F. Gangi, "A cellular uptake and cytotoxicity properties study of gallic acid-loaded mesoporous silica nanoparticles on Caco-2 cells*" J Nanopart Res* 16, 1-9, 2014.

[23] O. Vijaykumar, V. F. Joe, B. A. Vishwanath, "Formulation and evaluation of rivastigmine loaded polymeric nanoparticles*" J Chem Pharm Res* 6, pp 556, 2014.

[۲٤] ل. رشیدی، «تهیه نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا برای رهایش پاداکساینده‌های طبیعی در سلول‌های Caco-2»، پایان‌نامه دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۹۲.

© Copyright 2016 ISBME, http://www.ijbme.org