

طراحی و ساخت نانوذرات لیپیدی جامد حاوی کتوتیفن فومارات و ارزیابی خصوصیات ساختاری و بیولوژیکی آن

هاشم اندیشمند^{۱*}، جعفر عزتی‌نژاد دولت‌آبادی^{۲*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۴/۰۱/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) به‌عنوان جایگزینی برای حامل‌های کلئیدی سنتی معرفی شده‌اند و تا حد زیادی می‌توانند محدودیت‌های مرتبط با آن‌ها را پوشش دهند. هدف از این تحقیق، طراحی و ساخت فرمولاسیون جدیدی از نانوذرات لیپیدی بارگذاری شده با کتوتیفن فومارات و ارزیابی خواص ساختاری آن بود.

مواد و روش کار: نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با کتوتیفن فومارات (KT) با استفاده از روش هموزنی‌اسیون گرم-پروپ سونیکاسیون در دمای ۸۰ °C در نسبت ۱:۰/۲:۰/۳:۱ وزنی-وزنی کمپریٹول: کتوتیفن فومارات: تویین ۸۰: پلوکسامر ۴۰۷ تهیه شدند.

یافته‌ها: اندازه ذرات، شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI)، کارایی ریزپوشانی (EE) و ظرفیت بارگذاری (LC) نانوذرات لیپیدی بارگذاری شده با KT در نسبت ۱:۰/۲:۰/۳:۰/۳:۱ وزنی-وزنی کمپریٹول: کتوتیفن فومارات: تویین ۸۰: پلوکسامر ۴۰۷ به ترتیب $41/97 \pm 4/8$ نانومتر، $0/551 \pm 0/06$ ، $2/97 \pm 22/82$ درصد و $12/56 \pm 0/594$ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد که در عرض ۲۴ ساعت، رهایش تجمعی KT برای داروی آزاد و بارگذاری شده در SLNs به ترتیب ۹۴/۸۸ درصد و ۷۳/۰۱ درصد بود. زنده‌مانی سلول‌های A549 تیمار شده با SLNs بارگذاری شده با KT نسبت به داروی آزاد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بهتر بود و SLNs بارگذاری شده با KT سمیت سلولی قابل‌توجهی از خود نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج دستگاه زتاسایزر با نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) که شکل کروی نانوذرات را نشان می‌دهد، مطابقت داشت. مطالعات سمیت سلولی، سمیت کم نانوذرات بارگذاری شده با KT را تأیید کرد. سهولت ساخت نانوذرات لیپیدی جامد، سطح بالای کارایی ریزپوشانی و زیست‌سازگاری مطلوب، از مزایای کلیدی SLNs بارگذاری شده با KT محسوب می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کتوتیفن فومارات؛ ریزپوشانی؛ نانوحامل‌ها؛ نانوذرات لیپیدی؛ رهایش کنترل شده؛ سمیت سلولی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره یازدهم، ص ۹۴۹-۹۳۸، بهمن ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۶۳۳۱۱

Email: ezzatij@tbzmed.ac.ir

مقدمه

مانند امولسیون‌ها، میسل‌ها، لیپوزوم‌ها و نانوذرات پلیمری معرفی شده‌اند و تا حد زیادی می‌توانند محدودیت‌های مرتبط با آن‌ها را برطرف کنند. نانوریزپوشانی داروهای لیپوفیل و هیدروفیل، نفوذ از طریق پوست یا سد مخاطی به دلیل ابعاد نانو، عدم استفاده از حلال‌های آلی در تهیه آن‌ها و سمیت ناچیز از مزایای SLNs است (۴-۱). کتوتیفن فومارات (KT)^۵ به‌طور گسترده به‌عنوان یک عامل ضد حساسیت در کودکان و بزرگسالان استفاده شده است. می‌توان

نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) به‌طور گسترده به‌عنوان حامل‌های دارویی مطلوب در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های متمایز آن‌ها مانند نسبت سطح به حجم بالا، ماهیت جامد و توزیع اندازه ذرات همگن، SLNs را به‌عنوان یک سامانه حامل ایدئال برای کاربردهای دارویی معرفی کرده است. SLNs به‌عنوان جایگزینی برای سایر حامل‌های کلئیدی سنتی

^۱ استادیار گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۴ Solid lipid nanoparticles

^۵ Ketotifen fumarate

گتفوس^۶ (فرانسه) تهیه شد. پلیت‌ها و فلاسک‌های کشت سلولی و رده سلولی سرطان ریه (A549) به ترتیب از شرکت ایواکی (ژاپن) و انستیتو پاستور (ایران) تهیه شدند.

تهیه نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs)

نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با کتوتیفن فومارات با استفاده از روش هموژنیزاسیون گرم-پروب سونیکاسیون ایجاد شدند. کمپریتل ۸۸۸ به‌عنوان لیپید، توین ۸۰ به‌عنوان سورفکتانت و پلوکسامر ۴۰۷ به‌عنوان کوسورفکتانت در ترکیب SLNs استفاده شدند. مخلوط لیپیدی و توین ۸۰ برای تسهیل ذوب، حرارت داده شدند و درحالی‌که دما با استفاده از حمام آب گرم را در ۸۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شده بود، ذرات لیپیدی با استفاده از هموژنایزر (هایدولف، آلمان) با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌طور همگن پراکنده شدند. سپس کتوتیفن فومارات حل‌شده در پلوکسامر ۴۰۷، به‌صورت قطره‌ای به مخلوط اضافه شد. سپس، این ترکیب به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار با پروب سونیکاتور با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز، توان ۲۰۰ وات و دامنه ۷۵ درصد قرار گرفت (هلشر، آلمان). در نهایت نانسوسپانسیون کلوتیدی، سرد شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. SLNs کنترل (بلانک) نیز به روشی مشابه، به‌استثنای افزودن کتوتیفن فومارات، آماده شدند (۱۰-۱۲).

اندازه‌گیری قطر و شاخص توزیع اندازه ذرات

قطر و شاخص توزیع اندازه ذرات، توسط دستگاه تفرق دینامیک نور (DLS)^۷ بر روی نمونه‌ها یک روز پس از آماده‌سازی نمونه‌ها صورت گرفت. اندازه‌گیری‌ها برای تأیید عدم تجمع ذرات تکرار شد. روش تفرق دینامیک نور، یک روش فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در نمونه‌های کلوتیدی و سوسپانسیونی استفاده می‌شود. این روش غیر مخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده^۸ چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود (۱۳).

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)^۸

برای تأیید یافته‌های به‌دست‌آمده از دستگاه DLS، ساختار SLNs بارگذاری شده با کتوتیفن فومارات در فرمولاسیون شماره ۳ با استفاده از یک میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss Leo 906، آلمان) با ولتاژ ۱۲۰ kV موردبررسی قرار گرفت. قبل از آنالیز،

آن را به‌صورت قطره چشم، قرص و شربت برای درمان علائم آلرژیک مصرف کرد. KT به‌عنوان یک تثبیت‌کننده برای ماست سل‌ها عمل می‌کند و مانع از انتشار و یا عملکرد واسطه‌های ماست سل‌ها و همچنین لوکوترین‌ها، هیستامین و متابولیت‌های اسید آراشیدونیک می‌شود. این عمل برای جلوگیری از آسیب بافتی موضعی و اختلال عملکرد چند ارگانی به دنبال ایسکمی^۱ / خون‌رسانی مجدد^۲ (I/R) روده عمل می‌کند (۵-۷). تحقیقات نشان می‌دهد که کتوتیفن فومارات ممکن است به دلیل خواص خود به‌عنوان یک آنتی‌هیستامین که می‌تواند از آزاد شدن واسطه‌های التهابی جلوگیری کند، اثر محافظتی بر روی بافت‌های روده در طول آسیب I/R داشته باشد. در مدل‌های حیوانی I/R روده، نشان داده شده است که کتوتیفن پاسخ التهابی و نشانگرهای استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد، که نشان می‌دهد می‌تواند به حفظ یکپارچگی روده کمک کند. با به حداقل رساندن آشبار التهابی فعال‌شده در طول خون‌رسانی مجدد، کتوتیفن می‌تواند به نتایج بهتری در حوادث ایسکمیک کمک کند. کتوتیفن فومارات با مهار هیستامین، تثبیت ماست سل‌ها و مهار اتوزینوفیل‌ها، به بهبود علائم رینیت آلرژیک کمک می‌کند (۸).

با این وجود، KT منجر به اثرات نامطلوبی مانند خواب‌آلودگی، سردرد، ضراب قلب نامنظم و استفراغ می‌شود (۷، ۹). بنابراین، ریزپوشانی KT با نانوذرات لیپیدی جامد این پتانسیل را دارد که بر این چالش‌ها غلبه کند و فرصت‌های جدیدی برای کاربرد مؤثر ریوی یا موضعی این دارو ایجاد کند.

هدف از این تحقیق، طراحی و ساخت فرمولاسیون جدیدی از نانوذرات لیپیدی بارگذاری شده با کتوتیفن فومارات و ارزیابی خواص ساختاری آن بود. علاوه بر این، در این مطالعه، اثرات سیتوتوکسیک SLNs بارگذاری شده با KT بر سلول‌های سرطانی ریه (A549) از طریق تست‌های MTT^۳ و DAPI^۴ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

کتوتیفن فومارات (KT) از شرکت Sifavitor (میلان، ایتالیا) با خلوص ۹۹ درصد خریداری شد. توین ۸۰، پلوکسامر ۴۰۷ و تریپسین از شرکت سیگما-آلد ریچ (آمریکا) خریداری شدند. سرم جنین گاوی (FBS) و محیط کشت RPMI1640^۵ از شرکت گیبکو (انگلستان) تهیه شد. کمپریتل ۸۸۸ از شرکت

⁶ Gattefosse

⁷ Dynamic light scattering

⁸ Transmission electron microscopy

¹ Ischemia

² Ischemia/Reperfusion Injury

³ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

⁴ 4',6-diamidino-2-phenylindole

⁵ Roswell Park Memorial Institute Medium

نمونه‌ها ۲۰ بار با آب دو بار تقطیر، رقیق شده و برای مشاهده با اورانیل استات رنگ‌آمیزی شدند (۱۴).

کارایی ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری

کارایی ریزپوشانی نمونه‌ها مطابق روش اندیشمند و همکاران با اندکی تغییرات با روش اولترافیلتراسیون با به‌کارگیری فیلتر آمیکون با اندازه منافذ ۳۰ کیلو دالتون (میلی‌پور، آمریکا) به‌صورت نسبت مقدار داروی بارگیری شده در نانوذرات به مقدار کل داروی افزوده شده، تعیین شد (۱۵). ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با آب دیونیزه رقیق شد و به داخل فیلتر آمیکون اضافه شد و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ (مدل یونیورسال، ساخت ایران) به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. از محلول زیرین فیلتر آمیکون (داروی بارگیری نشده) نمونه برداشته شد و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CE 7500، سیسیل، ساخت انگلستان) در طول موج ۳۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نهایتاً، کارایی ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند.

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی بارگیری شده}}{\text{مقدار کل داروی افزوده شده}} = \text{کارایی ریزپوشانی}$$

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی بارگیری شده}}{\text{وزن کل نانوذرات}} = \text{ظرفیت بارگذاری}$$

پایداری فیزیکی

پایداری نانوذرات از نظر ویژگی‌های فیزیکی با اندازه‌گیری متوسط اندازه ذرات و کارایی ریزپوشانی ارزیابی شد و این ارزیابی در یک بازه زمانی ۴ هفته نگهداری در دمای یخچال (۴±۲) درجه سانتی‌گراد انجام شد. داده‌های اندازه ذرات ارائه‌شده، میانگین سه اندازه‌گیری مجزا است و کارایی ریزپوشانی نیز در همان بازه‌های زمانی (روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم) موردبررسی قرار گرفت (۱۶).

الگوی رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی الگوی رهایش دارو از نانوذرات در دمای محیط، از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۰ کیلودالتون مطابق روش اندیشمند و همکاران با اندکی اصلاحات استفاده شد (۱۷). بدین‌صورت که ۲ میلی‌لیتر از نانوذرات بارگیری شده با دارو و مقدار معادل داروی آزاد به داخل کیسه‌های دیالیز منتقل شدند و در بشرهای حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات تحت هم زدن در ۲۰۰ دور در دقیقه (به‌طور مجزا) قرار گرفتند. سپس در فواصل زمانی مشخص (۲۴، ۷، ۸، ۶،

۵، ۴، ۳، ۲، ۱ ساعت)، نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری از محیط انکوباسیون استخراج شد و با استفاده از اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۳۰۰ نانومتر (λ_{max}) مقدار داروی رهایش یافته موردبررسی قرار گرفت. شایان‌ذکر است به‌منظور حفظ گرایان غلظت هم‌زمان با برداشت نمونه، همان اندازه بافر فسفات تازه تهیه شده به محیط افزوده شد.

ارزیابی سمیت سلولی

سمیت سلولی به روش MTT بررسی شد. سنجش سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی سرطانی (A549) انجام شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)^۱ غیرفعال شده با حرارت، پنی‌سیلین (۱۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰ µg/ml) در اتمسفر مرطوب رشد کردند. سپس آن‌ها با غلظت‌های مختلف نمونه‌ها (داروی آزاد و داروی ریزپوشانی شده) تیمار شدند. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از زمان تیمار، ۲۰۰ µl معرف MTT در غلظت ۲ µg/ml به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در دمای ۳۷°C و CO₂ ۵ درصد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از استخراج محیط از هر چاه، ماده فورمازان با افزودن ۲۰۰ µl دی متیل سولفوکسید (DMSO)^۲ و ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (۰/۱ مولار گلیسین، ۰/۱ مولار NaCl، pH = ۱۰/۵) حل شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند [۲۸]. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از میکرو پلیتریدر^۳ (بیوتک، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و درصد زنده‌مانی و سمیت سلولی به ترتیب با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (۱۶، ۱۸).

$$\frac{\text{میانگین جذب سلول‌های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب کنترل}} = \text{درصد زنده‌مانی}$$

$$1 - \left[\frac{\text{میانگین جذب سلول‌های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب کنترل}} \right] = \text{درصد سمیت سلولی}$$

سنجش رنگ‌آمیزی DAPI

مطابق روش روچا و همکاران با اندکی تغییرات، رده سلولی A549 در پلیت‌های شش چاهکی (۵ × ۱۰^۴ سلول در هر چاهک) کشت شده و در معرض داروی آزاد، نانوذرات خالی، و نانوذرات بارگیری‌شده با دارو و نیز DMSO ۶ درصد به‌عنوان کنترل مثبت قرار گرفت. سلول‌ها متعاقباً با استفاده از پارافورمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. با تریتون ۱۰۰-X با غلظت ۰/۱ درصد وزنی-حجمی به مدت ۵ دقیقه نفوذپذیر شدند. با بافر فسفات شسته شدند و با

³ Microplate reader

¹ Fetal bovine serum

² Dimethyl sulfoxide

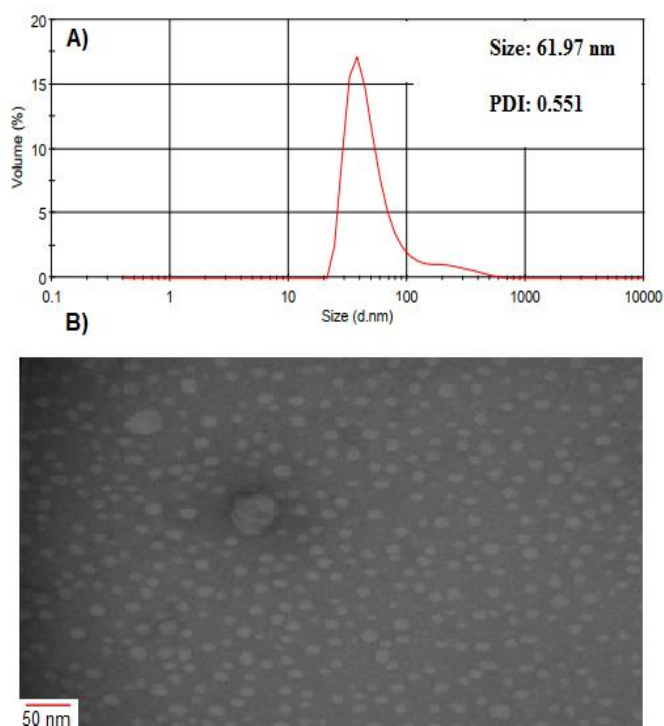
سونیکاسیون در سه فرمولاسیون حاوی مقادیر مختلف داروی کتوتیفن فومارات تولید شدند. جدول ۱ اندازه ذرات، شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI)^۱، کارایی ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری SLNs تهیه شده با مقادیر متفاوت داروی کتوتیفن فومارات را نشان می‌دهد. همچنین در شکل ۱ نمودار توزیع اندازه ذرات و نیز تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری نانوذرات لیپیدی جامد حاوی کتوتیفن فومارات در فرمولاسیون شماره ۳ در نسبت ۱: ۰/۲: ۰/۰۳: ۱ وزنی-وزنی کمپوزیت: کتوتیفن فومارات: توپین ۸۰: پلوکسامر ۴۰۷ نشان داده شده است.

تمام اندازه‌گیری‌های اندازه ذرات، کارایی ریزپوشانی و میزان رهایش در شرایط آزمایشگاهی در سه تکرار انجام شد. میانگین و انحراف معیار با استفاده از نرم افزار اکسل و در ۲۰۱۰ محاسبه شد.

خصوصیات ساختاری نانوذرات لیپیدی جامد

SLNs حاوی KT با روش هموژنیزاسیون گرم-یوب

شماره	جامد (g) (کمپریتل)	مقدار لیپید	مقدار کتوتیفن	مقدار توین	مقدار پولوکسامر	متوسط اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص توزیع اندازه ذرات	کارایی ریزپوشانی (درصد)	ظرفیت بارگذاری (درصد)
۱	۱	۰/۱۵	۰/۰۳۰	۱	۵۲/۴۸ ± ۳/۶	۰/۳۳۹ ± ۰/۰۲	۶۰/۴۴ ± ۲/۲۶	۹/۰۶ ± ۰/۳۳۹	
۲	۱	۰/۱۷	۰/۰۳۰	۱	۵۵/۹۰ ± ۴/۳	۰/۵۸۱ ± ۰/۰۵	۶۴/۱۰ ± ۳/۳۵	۱۰/۹۰ ± ۰/۵۶۹	
۳	۱	۰/۲۰	۰/۰۳۰	۱	۶۱/۹۷ ± ۴/۸	۰/۵۵۱ ± ۰/۰۶	۶۲/۸۲ ± ۲/۹۷	۱۲/۵۶ ± ۰/۵۹۴	



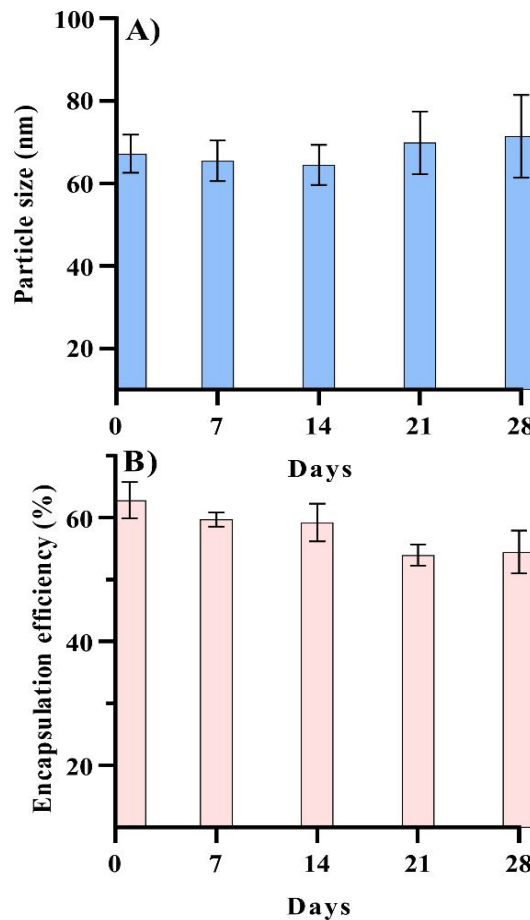
شکل (۱) A: توزیع اندازه نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی کتوتیفن فومارات B: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی کتوتیفن فومارات

¹ Poly dispersity index

پایداری فیزیکی

در طول ۴ هفته نگهداری SLNs حاوی KT در دمای 4 ± 2 درجه سانتی‌گراد، هیچ تغییر قابل توجهی در شفافیت، اندازه ذرات و دو فاز شدگی SLNs بارگذاری شده با KT مشاهده نشد. همچنین کارایی ریزپوشانی نانوسامانه منتخب در طول چهار هفته نگهداری تنها ۸ درصد کاهش داشت. شکل ۲ میزان تغییرات متوسط اندازه و

کارایی ریزپوشانی نانوذرات لیپیدی حاوی KT را در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای 4 ± 2 سانتی‌گراد به توالی یک هفته نشان می‌دهد. مطابق شکل ۲، متوسط اندازه ذرات از $4/8 \pm 61/97$ نانومتر در روز اول به $10/04 \pm 71/35$ نانومتر در روز بیستم هشتم رسید و کارایی ریزپوشانی نیز از $2/97 \pm 62/82$ درصد در روز اول به $3/48 \pm 54/48$ درصد در روز بیست و هشتم رسید.

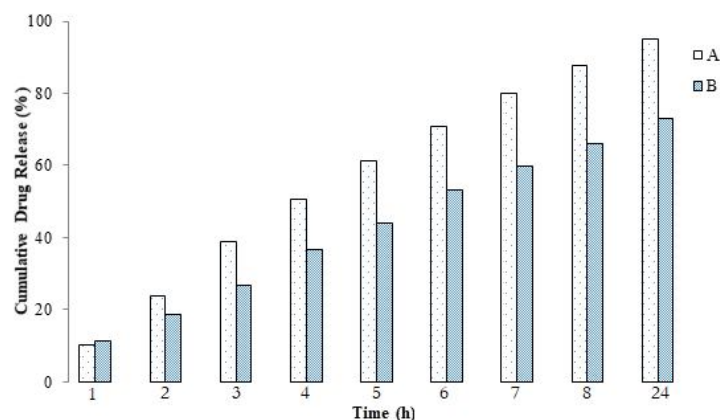


شکل (۲): تغییرات اندازه ذرات (A) و کارایی ریزپوشانی (B) نانوسامانه لیپیدی حاوی کتوتیفن فومارات در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای 4 ± 2 درجه سانتی‌گراد

الگوی رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی

در این قسمت، درصد KT آزاد شده از SLNs در فرمولاسیون شماره ۳ در مقایسه با داروی آزاد محاسبه شد و الگوی رهایش تجمعی دارو در گذر زمان تعیین شد (شکل ۳). نتایج نشان داد که در عرض ۲۴ ساعت، رهایش تجمعی هر دو داروی آزاد و بارگذاری

شده در SLNs روند افزایشی تدریجی را داشته و مقادیر آن‌ها به ترتیب از $10/25$ درصد و $11/24$ درصد در ساعت اول به $94/88$ درصد و $73/01$ درصد در ساعت بیست و چهارم برای داروی آزاد و داروی ریزپوشانی شده رسید.

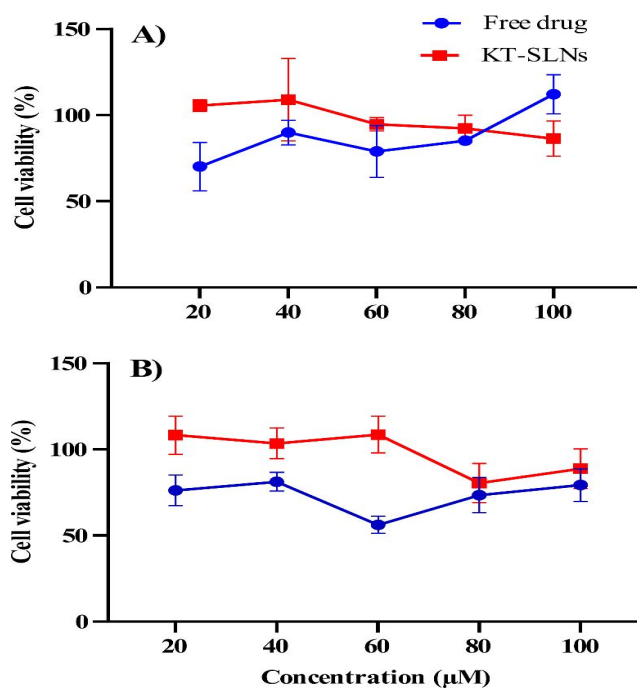


شکل (۳) A: الگوی رهایش کتوتیفن فومارات آزاد از کیسه دیالیز غوطه‌ور در بافر فسفات در مدت‌زمان ۲۴ ساعت (در توالی‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۲۴ ساعت) نگهداری در دمای محیط با سرعت هم زدن ۲۰۰ rpm: B: الگوی رهایش کتوتیفن فومارات ریزپوشانی شده با نانوذرات لیپیدی جامد از کیسه دیالیز غوطه‌ور در بافر فسفات در شرایط مشابه

۴ نشان داده شده است، زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با SLNs بارگذاری شده با KT نسبت به داروی آزاد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بهتر بود.

اثرات SLNs بارگذاری شده با KT بر رشد سلولی

آزمایش MTT برای ارزیابی سمیت KT در مقایسه با SLNs بارگذاری شده با KT مورد استفاده قرار گرفت. همان‌طور که در شکل

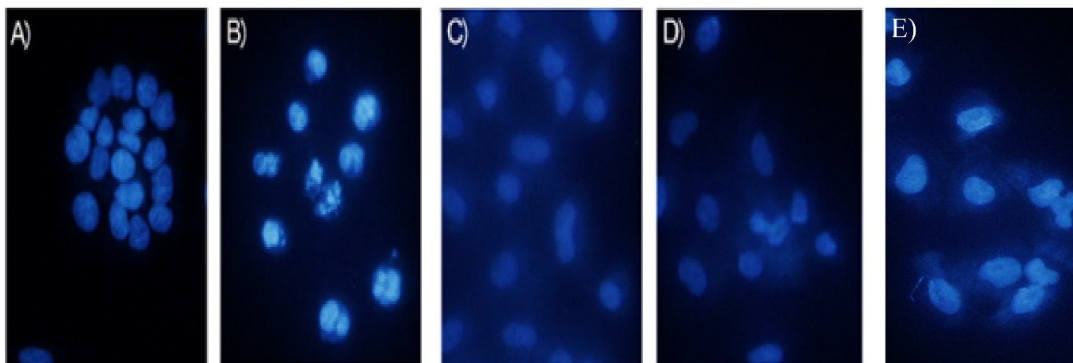


شکل (۴) تأثیر کتوتیفن فومارات (KT) آزاد و نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) بارگذاری شده با KT بر زنده ماندن سلول‌های A549. (A) بعد از ۲۴ ساعت تیمار و (B) بعد از ۴۸ ساعت تیمار. شکل نشان می‌دهد که SLNs بارگذاری شده با KT هیچ‌گونه سمیت سلولی قابل توجهی بر سلول‌های A549 در مقایسه با KT نداشته است.

سنجش رنگ آمیزی DAPI

از طریق رنگ آمیزی DAPI، عدم سمیت هر دو داروی آزاد و ریزپوشانی شده بر روی هسته سلولی تأیید شد. در شکل ۵، نتایج رنگ آمیزی DAPI برای ارزیابی انقباض هسته در سلول های A549 تیمار شده با SLNs، KT، بارگذاری شده با SLNs، KT خالی و

DMSO نشان داده شده است. مطابق شکل ۴، مورفولوژی سلول های رنگ آمیزی شده با DAPI، هیچ تکه تکه شدن آشکاری را در کروماتین نشان نداد و حلقه های DNA درون هسته های سلولی تیمار شده با این مواد، مورفولوژی مشابه سلول های طبیعی تیمار نشده را داشتند.



شکل (۵): تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول های A549 تیمار شده و تیمار نشده که با دی آمینو فنیل ایندول (DAPI) رنگ آمیزی شده اند. (A) سلول های A549 تیمار نشده، (B) سلول های A549 تیمار شده با دی متیل سولفوکساید (DMSO) (C) سلول های A549 تیمار شده با کتوتیفن (KT) آزاد، (D) سلول های A549 تیمار شده با نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) خالی، و (E) سلول های A549 تیمار شده با SLNs بارگذاری شده با KT. شکل نشان می دهد که هیچ قطعه قطعه شدن کروماتین در هسته سلول های تیمار شده با SLNs بارگذاری شده با KT رخ نداده است.

بحث

خصوصیات ساختاری نانوذرات لیپیدی جامد

مطابق جدول ۱، میزان تفاوت ها در خصوصیات ساختاری سه فرمولاسیون ناچیز بود. متوسط اندازه ذرات در هر سه فرمولاسیون کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود و نیز کارایی ریزپوشانی هر سه آن ها بیشتر از ۶۰ درصد به دست آمد. با این حال فرمولاسیون شماره ۳ در نسبت ۱:۰/۲:۰/۰۳:۱ وزنی-وزنی کمپریتنول: کتوتیفن فومارات: توبین ۸۰: پلوکسامر ۴۰۷ به دلیل ظرفیت بارگذاری بیشتر (۵۹۴ ± ۰/۵۹۴) نسبت ۱۲/۵۶ درصد) و همچنین PDI قابل قبول (۰/۵۵۱ ± ۰/۰۶) نسبت به دو فرمولاسیون دیگر ترجیح داده شد و به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب گردید و سایر آزمایش ها نظیر بررسی الگوی رهایش و سمیت سلولی بر روی این فرمولاسیون صورت گرفت. چنین به نظر می رسد که نسبت مذکور احتمالاً به تعادل بهتری بین لیپید و سورفکتانت منجر شده و PDI را کاهش داده است. مطابق جدول ۱ مقادیر پایین PDI، حاکی از توزیع یکنواخت اندازه ذرات بود. شایان ذکر است، هنگامی که مقدار PDI کمتر از ۰/۱ باشد، نمونه حاوی نانوذرات آماده شده را می توان به عنوان مونو دیسپرس^۱ در

نظر گرفت و نیز محدوده قابل قبول PDI ۰/۷ - ۰/۰۸ است (۲۰، ۲۱). نتایج بررسی ساختار SLNs با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) حاکی از این بود که SLNs بارگذاری شده با دارو، ذراتی با شکل کروی در ابعاد نانومتری دارند (شکل ۱). میانگین اندازه ذرات به دست آمده از دستگاه TEM کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود که با یافته های دستگاه زتا سایزر^۲ همسو بود.

پایداری فیزیکی

در طول چهار هفته پایش متوسط اندازه ذرات نانوسامانه تهیه شده، تغییر معنی داری مشاهده نشد ($p \text{ value} > ۰/۰۵$) که حاکی از پایداری مطلوب فرمولاسیون ارائه شده برای ریزپوشانی کتوتیفن فومارات بود. از طرفی کاهش تقریباً ۸ درصدی در کارایی ریزپوشانی SLNs را می توان به انتقال کریستالی ناشی از دما و شرایط نگهداری لیپید اشباع نسبت داد که قابل چشم پوشی هست (۲۲، ۲۳). به نظر می رسد، دمای پایین توانسته است از تجمع ذرات جلوگیری کند، اما انتقال کریستالی جزئی را نتوانسته کاملاً مهار کند. نتایج این مطالعه همسو با نتایج مطالعات پیشین بود. عزتی نژاد و همکاران

² Zeta sizer

¹ Monodisperse

شده قرار نگرفت و این فرمولاسیون دارویی به عنوان یک فرمولاسیون زیست سازگار معرفی گردید (۳).

سنجش رنگ آمیزی DAPI

به طور معمول در طول آپوپتوز سلولی، شکاف DNA و تکه تکه شدن کروماتین رخ می دهد. با توجه به عدم وجود سمیت سلولی و عدم تکه تکه شدن DNA در سلول های تیمار شده، می توان استنباط کرد که سامانه حامل طراحی و تهیه شده می تواند به عنوان یک سامانه مطلوب برای رهایش هدفمند و کنترل شده KT معرفی و استفاده شود. علاوه بر این، ماهیت لیپیدی و ابعاد در محدوده نانو سامانه تهیه شده، مانع از تخریب آن ها توسط ماکروفاه ها می شود که می تواند منجر به افزایش تأثیر دارو در درمان علائم آلرژیک به دلیل کاهش تخریب ذرات و ماندگاری طولانی مدت KT شود (۱۰، ۱۱).

نتیجه گیری

SLNs بارگذاری شده با KT به طور مؤثر با استفاده از روش هموژنیزاسیون گرم-پروب سونیکاسیون تهیه شدند. این SLNs ویژگی های قابل توجهی از جمله کارایی ریزپوشانی بالا، بارگذاری قابل توجه دارو و الگوی رهایش داروی مناسب را نشان دادند. نانوسامانه حامل تهیه شده، ذرات در ابعاد نانو را با توزیع باریک نشان داد. علاوه بر این، نتایج آزمایش MTT و سنجش رنگ آمیزی DAPI، ایمنی و عدم سمیت SLNs بارگذاری شده با دارو را نسبت به سلول های A549 تأیید کرد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که نانوسامانه لیپیدی ارائه شده برای ریزپوشانی و رهایش کنترل شده کتوتیفن فومارات، پتانسیل جایگزینی برای محصولات سنتی مورد استفاده در درمان علائم آلرژیک (داروهای ریزپوشانی نشده) را داراست. شایان ذکر است هر چند این مطالعه روی سلول های سرطانی انجام شد، سمیت کم احتمالاً در سلول های سالم نیز حفظ می شود و باهدف کاهش عوارض KT هم راستاست. در نهایت چنین به نظر می رسد که این مطالعه این پتانسیل را دارد که افق جدیدی را پیش روی پژوهشگران برای ارائه سامانه های حامل مناسب به منظور رسانش هدفمند و رهایش کنترل شده داروهای ضدالتهاب و حساسیت، از جمله در کاربردهای ریوی یا موضعی باز کند. پیشنهاد می شود در مطالعات آینده، تأثیر نانوسامانه تهیه شده بر روی رده های سلولی مختلف اعم از نرمال و سرطانی مورد بررسی قرار گیرد.

محدودیت ها

از محدودیت های این مطالعه می توان به محدودیت بودجه تحقیقاتی و نیز خارج از سرویس بودن برخی دستگاه های آنالیزی

نانوحامل های لیپیدی ساختاریافته (NLC)^۱ حاوی کتوتیفن فومارات را تهیه کردند و پایداری آن را در طول یک ماه نگهداری در دمای یخچالی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوسامانه تهیه شده در طول یک ماه به لحاظ ساختاری پایدار بود و تفاوت اندازه ذرات در روزهای مختلف با روز اول معنی دار نبود ($p > 0.05$).

الگوی رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی

مطابق شکل ۳، نرخ انتشار SLNs بارگذاری شده با KT کمتر از KT آزاد بود. نتایج به دست آمده حاکی از تأثیر قابل توجه نانوذرات فرموله شده بر الگوی رهایش بهتر دارو به دلیل پایداری بالا بود. چنین به نظر می رسد که با ریزپوشانی KT با SLNs می توان دوز دارو و عوارض جانبی دارو را کاهش داد. علاوه بر این، نمایه آزادسازی آهسته تر KT ریزپوشانی شده ممکن است اثربخشی و ماندگاری دارو را در محل فعال افزایش دهد (۴). نتایج این بخش نیز هم سو با نتایج مطالعات پیشین بود (۲۴).

سمیت سلولی SLNs بارگذاری شده با KT

سمیت کم پیش نیاز کاربرد نانوسامانه های حامل مختلف در علوم پزشکی است (۲۵). مطابق شکل ۴، SLNs بارگذاری شده با KT مانع رشد رده سلولی A549 نشده و سمیت سلولی قابل توجهی از خود نشان نداد و با افزایش غلظت نمونه ها از ۲۰ تا ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ ، درصد زنده ماندن سلول ها کاهش چندانی نیافت و لذا می توان این فرمولاسیون دارویی را به عنوان یک فرمولاسیون دارویی زیست سازگار معرفی کرد. شایان ذکر است در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مطابق انتظار سمیت سلولی کتوتیفن نانوریزپوشانی شده کمی بیشتر از کتوتیفن آزاد بود. به طور کلی چنین به نظر می رسد که ریزپوشانی ترکیبات با خواص دارویی در قالب نانوسامانه های حامل لیپیدی باعث ورود آسان تر آن ها به داخل سلول ها می شود. از طرفی، به دلیل متابولیسم سریع و غیرطبیعی سلول های سرطانی نسبت به سلول های سالم (۹ برابر سریع تر از سلول های سالم)، آن ها مواد زیادی را از محیط اطراف خود جذب می کنند (۲۶). این امر باعث جذب بیشتر نانوذرات توسط سلول های سرطانی و همچنین آسیب پذیری بیشتر آن ها به ترکیبات دارویی در مقایسه با ترکیبات دارویی ریزپوشانی نشده می شود. نتایج مطالعه کنونی با نتایج مطالعات پیشین همسو بود. عزتی نژاد و همکاران تأثیر نانوذرات لیپیدی ساختار یافته حاوی کتوتیفن را بر زنده ماندن سلول های A549 بررسی کردند. نتایج نشان داد که زنده ماندن رده سلولی A549 تحت تأثیر کتوتیفن در هر دو فرم آزاد و ریزپوشانی

^۱ Nano structure lipid carrier

دارای کد پژوهان ۷۳۹۹۲ است، انجام شده است.

تضاد منافع:

هیچیک از نویسندگان تضاد منافع ندارند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.VCR.REC.1403.098 است و تمام ملاحظات اخلاقی رعایت شده است.

نظیر میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) موجود در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز اشاره کرد که مجبور به انتقال نمونه‌ها به مراکز تحقیقاتی شهرهای دیگر شدیم.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به سبب حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

حمایت مالی:

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که

References:

- Brugè F, Damiani E, Marcheggiani F, Offerta A, Puglia C, Tiano L. A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. *Int J Pharm* 2015;495(2):879-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.033>
- Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Omid Y. Solid lipid-based nanocarriers as efficient targeted drug and gene delivery systems. *TrAC Trends Anal Chem* 2016;77:100-8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.016>
- Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Hamishehkar H, Eskandani M, Valizadeh H. Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;117:21-8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.055>
- Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Hamishehkar H, Valizadeh H. Development of dry powder inhaler formulation loaded with alendronate solid lipid nanoparticles: solid-state characterization and aerosol dispersion performance. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(9):1431-7. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.956111>
- Asawa A, Simpson KH, Bonds RS. Ketotifen use in a patient with fire ant hypersensitivity and mast cell activation syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015;114(6):443-6. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.03.009>
- Guerrero S, Muñiz E, Teijón C, Olmo R, Teijón JM, Blanco MD. Ketotifen-Loaded Microspheres Prepared by Spray-Drying Poly (D,L-Lactide) and Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Polymers: Characterization and In Vivo Evaluation. *J Pharm Sci* 2008;97(8):3153-69. <https://doi.org/10.1002/jps.21241>
- Jeong H-J, Jung J, Kim M-G, Kim H-M. Evaluation on Efficacy of Modern Medicine Ketotifen Using Traditional Delivery Science Acupuncture in Allergic Animal Models. *J Drug Deliv Sci Technol* 2014;24(2):234-40. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50038-X](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50038-X)
- Zi-qing H, Xiao-liang G, Pin-jie H, Jing W, Ning S, Wan-ling G. Influence of ketotifen, cromolyn sodium, and compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 2008;8:1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-42>
- El-Haggar SM, Farrag WF, Kotkata FA. Effect of ketotifen in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2015;29(3):427-32. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.01.013>
- Patil-Gadhe A, Pokharkar V. Pulmonary targeting potential of rosuvastatin loaded nanostructured

- lipid carrier: Optimization by factorial design. *Int J Pharm* 2016;501(1-2):199-210.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.080>
11. Beloqui A, Solinis MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Prést V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine* 2016;12(1):143-61.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
 12. Eskandani M, Nazemiyeh H. Self-reporter shikonin-Act-loaded solid lipid nanoparticle: Formulation, physicochemical characterization and geno/cytotoxicity evaluation. *Eur J Pharm Sci* 2014;59:49-57.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.009>
 13. Andishmand H, Hamishehkar H, Mohammadifar MA, Babazadeh A, Taghvimi A, Tabibiazar M. A colon targeted delivery system for resveratrol enriching in pH responsive-model. *Pharm Sci* 2017;23(1):42-9.
<https://doi.org/10.15171/PS.2017.07>
 14. Arana L, Salado C, Vega S, Aizpurua-Olaizola O, Arada Idl, Suarez T, et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;135:18-26.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.020>
 15. Andishmand H, Tabibiazar M, Mohammadifar MA, Hamishehkar H. Pectin-zinc-chitosan-polyethylene glycol colloidal nano-suspension as a food grade carrier for colon targeted delivery of resveratrol. *Int J Biol Macromol* 2017;97:16-22.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.087>
 16. Ramalingam P, Yoo SW, Ko YT. Nanodelivery systems based on mucoadhesive polymer coated solid lipid nanoparticles to improve the oral intake of food curcumin. *Food Res Int* 2016;84:113-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.031>
 17. Andishmand H, Yousefi M, Jafari N, Azadmard-Damirchi S, Homayouni-Rad A, Torbati M, et al. Designing and fabrication of colloidal nano-phytosomes with gamma-oryzanol and phosphatidylcholine for encapsulation and delivery of polyphenol-rich extract from pomegranate peel. *Int J Biol Macromol* 2023;128501.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128501>
 18. Garg NK, Tyagi RK, Singh B, Sharma G, Nirbhavane P, Kushwah V, et al. Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1. *Int J Pharm* 2016;499(1-2):301-20.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.061>
 19. da Rocha MCO, da Silva PB, Radicchi MA, Andrade BYG, de Oliveira JV, Venus T, et al. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. *J Nanobiotechnol* 2020;18:1-20. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00604-7>
 20. Yousefi M, Andishmand H, Assadpour E, Barzegar A, Kharazmi MS, Jafari SM. Nanoliposomal delivery systems of natural antibacterial compounds; properties, applications, and recent advances. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2023;1-14.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2170318>
 21. Hamishehkar H, Bahadori MB, Vandghanooni S, Eskandani M, Nakhband A, Eskandani M. Preparation, characterization and anti-proliferative effects of sclareol-loaded solid lipid nanoparticles on A549 human lung epithelial cancer cells. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018;45:272-80.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.02.017>
 22. Luo Y, Chen D, Ren L, Zhao X, Qin J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Control Release* 2006;114(1):53-9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.010>
 23. Butani D, Yewale C, Misra A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids Surf B Biointerfaces*

- 2016;139:17-24.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.032>
24. Dolatabadi JEN, Azami A, Mohammadi A, Hamishehkar H, Panahi-Azar V, Saadat YR, et al. Formulation, characterization and cytotoxicity evaluation of ketotifen-loaded nanostructured lipid carriers. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018;46:268-73.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.017>
25. Patil-Gadhe A, Kyadarkunte A, Patole M, Pokharkar V. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers: Part II Pulmonary drug delivery and in vitro-in vivo aerosol performance. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88(1):169-77.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.007>
26. Khorrami S, Zarepour A, Zarrabi A. Green synthesis of silver nanoparticles at low temperature in a fast pace with unique DPPH radical scavenging and selective cytotoxicity against MCF-7 and BT-20 tumor cell lines. *Biotechnol Rep* 2019;24:e00393.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00393>

DESIGNING AND FABRICATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES CONTAINING KETOTIFEN FUMARATE AND EVALUATION OF ITS STRUCTURAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

Hashem Andishmand^{1,2}, Jafar Ezzati Nazhad Dolatabadi^{3*}

Received: 24 January, 2025; Accepted: 25 March, 2025

Abstract

Background & Aims: Solid lipid nanoparticles (SLNs) have been introduced as an alternative to other traditional colloidal carriers, and they can largely overcome the limitations associated with them. The aim of this research was to design and manufacture a new formulation of lipid nanoparticles loaded with ketotifen fumarate and evaluate its structural properties.

Materials & Methods: Solid lipid nanoparticles loaded with ketotifen fumarate (KT) were prepared using the hot-probe sonication homogenization method at 80 °C in a weight-weight ratio of 1:0.2:0.03:1 Compritol:ketotifen fumarate:Tween 80:Pluronic 407.

Results: Particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE), and loading capacity (LC) of SLNs loaded with KT in a ratio of 1:0.2:0.03:1 w/w Compritol:ketotifen fumarate:Tween 80:Pluronic 407 were obtained as 61.97±4.8 nm, 0.551±0.06, 62.82±2.97%, and 12.56±0.594%, respectively. The results showed that within 24 hours, the cumulative release of KT for free and loaded drug in SLNs was 94.88% and 73.01%, respectively. The survival of A549 cells treated with SLNs loaded with KT was better than that of the free drug after 24 and 48 hours, and SLNs loaded with KT did not show significant cytotoxicity.

Conclusion: The results of the Zetasizer were consistent with the results of the transmission electron microscopy (TEM) images, which showed the spherical shape of SLNs in nanoscale dimensions. Cytotoxicity studies confirmed the low toxicity of KT-loaded SLNs. Ease of fabricating SLNs, a high level of EE, and favorable biocompatibility were the advantages of SLNs loaded with KT.

Keywords: Ketotifen fumarate, Encapsulation, Nanocarriers, Lipid-based nanoparticles, Controlled release, Cytotoxicity

Address: Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: +984133367914

Email: ezzatij@tbzmed.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2025; 35(11): 949 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Assistant professor, Department of Food Hygiene and Safety, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

² Research Center for Food Hygiene and Safety, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

³ Associate professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)