

Investigation of the Structural Properties of Dopamine-Loaded Poly(butyl cyanoacrylate) Nanosystem

Fatemeh Jahansooz¹, Bahman Ebrahimi Hosseinzade^{2*},
Ashrafalsadat Hatamian Zarmi², Koorosh Shahpasand³, Elahe
Motamedi⁴

1. Ph.D. Student, Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Assistant Prof., Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran Tel, 021 86093078, P.O. Box: 1439957131
3. Assistant Prof., Department of Brain and Cognitive Sciences, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology (ACECR), Tehran, Iran
4. Assistant Prof., Department of Nanotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with no treatment due to the blood-brain barrier (BBB) existence. However, if dopamine (DA) molecule is able to pass through the BBB, it can be considered as a cure for PD. The aim of this study was to prepare biodegradable nanoparticles (NPs) carrying DA for crossing the BBB, using ion polymerization and solvent. Particle size and size distribution, zeta potential, entrapment efficiency, and in vitro drug release behavior were determined at pH=7. The drug-loaded nanoparticles were found to be spherical with fluffy exterior, average size of 110 nm and zeta potential of -7.61 mV. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy (FTIR) verified polymerization of butyl cyanoacrylate monomers and physical encapsulation of DA in the polymer, poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA). Loading and drug encapsulation efficiencies were 35 and 52 w/v %, respectively, characterized by high performance liquid chromatography (HPLC). The in-vitro drug release profile of DA-loaded PBCA nanoparticles exhibited a gradual release of more than 20 % w/w of the drug after 51 h. Investigation of in-vivo release of fluorescein isothiocyanate from nanocarrier as a model drug for dopamine in brain proved its gradual release using fluorescent microscopy. In this study, PBCA nanoparticles were successfully introduced as a delivery system for the hydrophilic DA, providing a promising approach for improvement of PD.

key words

Poly(butyl cyanoacrylate)
Dopamine
Parkinson's disease
Nanosystem
Polymerization

*To whom correspondence should be addressed:
bahman.ebrahimi@ut.ac.ir

بررسی خواص ساختاری نانوسامانه پلی (بوتیل سیانواکریلات) حاوی دوپامین

فاطمه جهانسوز^۱، بهمن ابراهیمی حسین زاده^{۲*}، اشرف السادات حاتمیان زارمی^۲،
کوروش شاه پسند^۲، الهه معتمدی^۲

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه مهندسی زیستی

۲- استادیار، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه مهندسی زیستی

۳- استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده سلول‌های بنیادی

۴- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، گروه نانوتکنولوژی

چکیده

بیماری پارکینسون نوعی بیماری عصب‌تباهی‌زاست که بدلیل وجود سد خونی- مغزی درمان‌پذیر نمی‌باشد. با این وجود، مولکول دوپامین را می‌توان در صورت عبور از سد خونی- مغزی، به عنوان عامل درمان این بیماری مطرح کرد. هدف از این پژوهش تهیه نانوسامانه زیست‌تخریب‌پذیر حاوی دوپامین برای عبور از سد خونی- مغزی است که در آن از روش پلیمریزاسیون یونی و حلال برای ساخت نانوسامانه و بارگذاری دارو استفاده شد. اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتای نانوسامانه حاوی دارو و همچنین بارگذاری و رهش دارو از سامانه در $pH=7$ ، بدست آمد. نانوذرات حاصل کروی و دارای سطح ناصاف بودند. میانگین اندازه نانوذرات حاوی دارو ۱۱۰ نانومتر با پتانسیل زتا $-7/61$ میلی‌ولت بود. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ انجام پلیمریزاسیون و پوشینه‌دار شدن فیزیکی دارو را در پلیمر تأیید کرد. درصد بارگذاری و پوشینه‌دار شدن دارو در نانوسامانه پلیمری با استفاده از کروماتوگرافی کارا به ترتیب ۳۵ و ۵۲ درصد وزنی حجمی گزارش شد. بررسی‌ها حاکی از رهش بیش از ۲۰ درصد داروی بارگذاری‌شده از نانوسامانه پس از ۵۱ ساعت بود. در نهایت مطالعه رهش درون‌تن مولکول فلورتاب فلورسین ایزوتیوسیانات از نانوحامل توسط میکروسکوپ فلورتاب رهش تدریجی این مولکول را به عنوان الگوی دارویی دوپامین در مغز ثابت کرد. به‌طور کلی تمامی ویژگی‌های ثبت‌شده برای انتقال دوپامین آبدوست به عنوان روش درمانی پارکینسون با نانوسامانه پلیمری پلی (بوتیل سیانواکریلات) مناسب ارزیابی شد.

کلمات کلیدی

پلی (بوتیل سیانواکریلات)

دوپامین

پارکینسون

نانوسامانه

پلیمریزاسیون

*عهده دار مکاتبات:

۱- مقدمه

درمان بیماری‌های عصب‌تبااهی‌زای (Neurodegenerative diseases) تحت تأثیر سد خونی- مغزی، مانند آلزایمر (Alzheimer's disease)، پارکینسون (Parkinson's disease) و اسکروز آمیوتروف جانبی (Amyotrophic lateral sclerosis) به دلیل اختلال در انتقال دارو به مغز ناشی از وجود اتصالات محکم سلول‌های اندوتلیال در سد خونی- مغزی، ناموفق گزارش می‌شود. از این رو داروها و مولکول‌های درمانی که در شرایط آزمایشگاهی برای درمان مناسب گزارش شده‌اند، در بدن موجود زنده نمی‌توانند عامل درمانی محسوب شوند [۱].

۲. آلزایمر و پارکینسون شایع‌ترین بیماری‌های عصب‌تبااهی‌زای شناخته شده در قرن اخیر هستند. بیماری پارکینسون در واقع لرزش در وضعیت استراحت است که شیوع آن بیشتر در سنین پیری (۱ تا ۱/۵ درصد جمعیت بالای شصت سال) و در تمام مناطق دنیا یکسان است. در حال حاضر، ال-دوپا بهترین داروی کنترل علائم بیماری پارکینسون محسوب می‌شود. مهم‌ترین ویژگی درمانی آن قابلیت عبور از سد خونی- مغزی و تبدیل به دوپامین توسط آنزیم دوپا- دکربوکسیلاز است. اما استفاده از ال-دوپا با محدودیت‌هایی همراه است که از آن بین می‌توان به عبور کمتر از ده درصدی از سد خونی- مغزی و عوارض جانبی داروی عبور نکرده، نیمه‌عمر کوتاه و مقاومت دارویی بیمار اشاره کرد [۳]. این محدودیت‌ها موجب شد تا تحقیقات علمی جهت درمان دارویی پارکینسون به حل مشکل عبور دوپامین از سد- خونی مغز و رساندن مستقیم دوپامین به بافت هدف معطوف شود. برای عبور دوپامین از سد خونی- مغزی نیاز به طراحی حامل مناسب با قابلیت بارگذاری دوپامین آب‌دوست در آن با بار، وزن مولکولی و خاصیت چربی‌دوستی برای عبور از سد خونی- مغزی [۴] و رهش کنترل‌شده دارو [۵] بود. از نانوسامانه‌هایی که دوپامین در آنها بارگذاری شده است، می‌توان به کیتوسان [۶]، نانوذله PVP/PAA [۷] و میکروگوی پی ال جی ای (PLGA microsphere) [۸]، اشاره کرد. اما استفاده از نانوذله PVP/PAA به عنوان روشی تهاجمی با لزوم قراردادی مستقیم در مغز، کیتوسان به علت بار مثبت سامانه و پی ال جی ای به علت اندازه بزرگ میکروگوی‌ها برای درمان مناسب گزارش نشد. نانوسامانه‌های دیگری مانند لیپوزوم (Liposome) [۹]، کربن نقطه‌ای (Carbon dot) [۱۰] و نانوگرافن اکساید (Nanographene oxide) [۱۱] نیز برای انتقال دوپامین از سد خونی- مغزی بررسی شده‌اند. لیپوزوم‌ها در بدن ناپایدار هستند و کربن نقطه‌ای

و گرافن اکساید نیز سمیت سلولی دارند. در نتیجه تحقیقات به سوی بررسی نانوحامل‌هایی با حداکثر کارایی پیش رفت.

ان بوتیل سیانواکریلات مایعی بی‌رنگ، با بوی تند و چسبنده است که پس از پلیمریزاسیون به پودر سفیدرنگ پلی(بوتیل سیانواکریلات) تبدیل می‌شود. این پلمر به دلیل ویژگی‌هایی مانند زیست‌سازگاری (Biocompatibility)، زیست‌تخریب‌پذیری (Biodegradability)، عدم سمیت و غلبه بر مقاومت چنددارویی (Multi drug resistance) حامل مناسبی برای داروهای ضدسرطان و داروهای است که از سد خونی- مغزی عبور نمی‌کنند [۱۲]. همچنین پلیمر مذکور باعث افزایش نیمه‌عمر دارو در بدن، کاهش سمیت ناشی از غلظت داروی آزاد و کاهش عوارض جانبی دارو و در نهایت عبور دارو از سدهای کاراندازی (Physiologic) بدن می‌شود [۱۳]. این نانوذرات به راحتی انجمادخشک (Lyophilized) و توسط اشعه گاما سترون می‌شوند. روش پلیمریزاسیون بر اساس نوع ماده‌ای که قرار است در آن پوشینه‌دار شود انتخاب شده و بر ویژگی‌های فیزیکی پلیمر تأثیر مستقیم دارد [۱۴]. روش‌های متنوعی شامل پلیمریزاسیون امولسیون، محلولی و رسوبی برای پلیمریزاسیون مونومر ان بوتیل سیانواکریلات معرفی شده است [۱۵، ۱۶]. ماده پایدارکننده مصرفی طی پلیمریزاسیون تأثیر مستقیمی بر اندازه و وزن مولکولی و پتانسیل زتای کلئیدهای پلی(بوتیل سیانواکریلات) دارد. سه پایدارکننده‌ی پلوگرامر ۱۸۸ (Poloxamer ۱۸۸)، توئین ۸۰ (Tween ۸۰) و دکستران (Dextran) برای پلیمریزاسیون ان بوتیل سیانواکریلات کاربرد دارند. ایجاد کلئیدهای ناپایدار توسط توئین ۸۰ در مقایسه با پلوگرامر ۱۸۸ را می‌توان به وزن مولکولی کمتر آن نسبت به پلوگرامر نسبت داد. پلوگرامر ۱۸۸ و توئین ۸۰ به ترتیب منجر به ایجاد ذرات کوچک‌تر با PDI کوچک‌تر و پتانسیل زتای کوچک‌تر شدند در حالی که پتانسیل زتا در اثر استفاده از دکستران بسیار بزرگ‌تر و مثبت‌تر از پلوگرامر ۱۸۸ است [۱۵]. داروهای کلرامبوسیل (Chlorambucil) [۱۳]، اپی‌روبیسیکین (Epirubicin) [۱۷]، سیس‌پلاتین (Cisplatin) [۱۸] و ایتراکونازول (Itraconazole) [۱۹] با استفاده از پایدارکننده‌های مذکور در پلی(بوتیل سیانواکریلات) بارگذاری شده‌اند که به ترتیب میانگین اندازه‌ی ۳۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۴۰۰ نانومتر برای آنها گزارش شده است. هدف از این تحقیق استفاده از روش پلیمریزاسیون مناسب برای ساخت نانو حامل‌های پلیمری با اندازه‌ی میانگین زیر ۱۵۰ نانومتر برای عبور از سد خونی- مغزی بود. همچنین از روش محلولی برای بارگذاری دوپامین در نانوحامل استفاده

شد [۲۰].

۲- تجربی

۲-۱ مواد

مونومر آن بوتیل سیانواکریلات برای تهیه پلی(بوتیل سیانواکریلات) از شرکت آفینیتیکا (اسپانیا) خریداری شد. برای تثبیت و پایداری پلیمر در محلول و جلوگیری از کلوخگی آن از پایدارکننده پلوگزامر ۱۸۸ ساخت شرکت سیگما (آمریکا) استفاده شد. همچنین دوپامین هیدروکلراید به عنوان عامل درمان بیماری، بافر فسفات، ترهالوز دی‌هیدرات با خلوص ۹۹/۵٪ و هیدروکسید سدیم با خلوص بالای ۹۸٪ برای خنثی‌سازی محلول پلیمریزاسیون از سیگما (آمریکا) خریداری شدند. در تمام مراحل آزمایش از آب مقطر یون‌زدوده استفاده شد.

۲-۲ روش کار

۲-۲-۱ تهیه پلی(بوتیل سیانواکریلات) خالص

در این پژوهش، برای انتقال نانوحامل پلی(بوتیل سیانواکریلات) به درون مغز نیاز به اندازه کمتر از دوپست نانومتر بود که، بهترین روش دست‌یابی به این هدف، پلیمریزاسیون یونی بود. ابتدا ۱۰ سی‌سی محلول اسید کلریدریک یک درصد را روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده و عامل پایدارکننده پلوگزامر ۱۸۸ را به مقدار ۳ درصد وزنی به حجمی به آن افزوده و پس از انحلال، مونومر قطره قطره و به مقدار ۱ درصد وزنی به حجمی افزوده شد. سرعت هم‌زن در حدود ۲۰۰ دور بر دقیقه تنظیم و محلول شیری‌رنگ پس از چهار ساعت اختلاط به‌دست آمد. در ادامه، محلول با pH ۶/۵ با هیدروکسید سدیم ۱ درصد، خنثی شد (۶/۵ - pH=). برای تکمیل پلیمریزاسیون، محلول مورد نظر به مدت دو ساعت دیگر بر روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. در این مرحله، محلول کلوئیدی شیری‌رنگ حاوی نانوحامل با اندازه ی ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر به‌دست آمد. در ادامه، برای تخلیص نانوحامل از دستگاه فراگریزانه (Hermle) (Ultracentrifuge آلمان مدل ۳۶ HK) با سرعت ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت استفاده و سپس محصول سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. مخلوط حاصل در دستگاه خشک‌کن انجمادی در حضور ۱ درصد وزنی به حجمی ترهالوز دی‌هیدرات به پودر تبدیل شد [۲۰].

۲-۲-۲ بارگذاری دوپامین در پلیمر

بارگذاری مولکول آب‌دوست دوپامین در سامانه ی پلیمری آب‌گریز پلی(بوتیل سیانواکریلات) با روش متداول پلیمریزاسیون یونی درجا امکان‌پذیر نیست. در نتیجه بارگذاری پس از تهیه ی نانوحامل خالص انجام شد. به این منظور، با استفاده از هم‌زن مغناطیسی، ۱۰

سی‌سی محلول ۱ درصد وزنی به حجمی پلی(بوتیل سیانواکریلات) در استون و ۱۰ سی‌سی محلول ۱ درصد وزنی به حجمی دوپامین در آب به مدت نیم‌ساعت در فراصوت (Wisc) (Ultrasonic cleaner، کره جنوبی مدل WUC-AO6H) و حمام آب یخ قرار داده شد. در نهایت با قرار دادن محلول در آون خلاء در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار ساعت، پودر پلیمر بارگذاری‌شده با دوپامین به دست آمد. در نهایت با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Micro digital، کره جنوبی) غلظت دوپامین بدست آمد [۱۸].

۲-۲-۳ تخلیص نانوحامل PBCA حاوی دوپامین از دوپامین آزاد

برای تخلیص دوپامین آزاد از دوپامین بارگذاری‌شده در پلیمر پلی(بوتیل سیانواکریلات) از کیسه دیالیز ۱۲۰۰۰ دالتون با منافذ ۲۵ آنگستروم شرکت میلی پور استفاده شد. سامانه تهیه‌شده به مدت یک ساعت با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق در انکوباتور قرار داده و دوپامین آزاد استخراج شد [۱۳].

۲-۲-۴ طیف‌سنجی فروسرخ

برای اطمینان از پلیمریزاسیون مونومر آن بوتیل سیانواکریلات از دستگاه طیف‌سنج فروسرخ تبدیل فوریه استفاده شد. در طیف‌سنجی فروسرخ (Thermo, AVATAR آمریکا) براساس جذب تابش، جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. طیف‌سنجی مونومر و پلیمر بر قرص‌های برمید پتاسیم (KBr) با ۶۴ پویش در محدوده عدد موجی بین ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر با توان تفکیک ۲ بر سانتی‌متر انجام شد.

۲-۲-۵ بررسی خصوصیات نانوحامل حاوی دارو

۲-۲-۵-۱ ریخت‌شناسی

به منظور ریخت‌شناسی (بررسی مورفولوژی) نمونه‌های نانوحامل پلی(بوتیل سیانواکریلات) فاقد و حاوی دوپامین، ابتدا نمونه‌ها روی پایه نقره توسط نوارچسب‌های دوطرفه رسانا چسبانده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با طلا به ضخامت ۱۵ نانومتر پوشش‌دهی شدند. تصاویر در بزرگنمایی‌های متفاوت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی گسیل میدانی (Field emission scanning electron microscope) (CamScan MV2300) تهیه شد. میانگین اندازه‌ی نانوذرات و شکل نانوذرات فاقد و حاوی دارو بررسی شد [۱۷].

۲-۲-۵-۲ اندازه‌گیری اندازه و پتانسیل زتای ذرات

اندازه و بار سطحی (پتانسیل زتای) نانوذرات فاقد و حاوی دوپامین با دستگاه پراکندگی پویای نور (ZS۹۰ انگلیس) اندازه‌گیری شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها یک سی‌سی از هر نمونه به مدت ۱۲۰ ثانیه با زاویه

۹۰ درجه در معرض گاز هلیوم- نئون (۵ میلی ولت) با سه تکرار قرار گرفت [۱۷].

۲-۲-۳ بررسی توزیع اندازه‌ی نانوذرات

توزیع اندازه نانوذرات با بررسی محلول نانوذرات طی دو مرحله تقطیر در $pH=7$ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه زتاسایزر (ZEN ۳۶۰۰ انگلیس) انجام شد [۱۷].

۲-۲-۶ بررسی میزان داروی بارگذاری‌شده در پلیمر و میزان داروی پوشینه‌دارشده درون پلیمر
پلیمر حاوی دارو به مدت ۲۰ دقیقه در لوله آمیکون با فیلتر ۳ کیلودالتون در گریزان (Centrifuge) با سرعت ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه در دما ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. غلظت دارو آزادشده در رومانند (Supernatant) از طریق HPLC با ستون Shimpack CLC-ODS5 μm (150mm $\times$ 4.6mm i.d) و فاز مایع 0.02mol·L- CH₃OH و KH_2PO_4 1 و جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و بررسی جذب در ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد. برای تعیین میزان غلظت دوپامین، جذب در فرمول ($R^2=0.9981$, -0.0047) جایگزین و غلظت دارو محاسبه شد. با استفاده از فرمول‌های زیر، میزان بارگذاری دارو در نانوسامانه‌ی پلی(بوتیل سیانواکریلات) به‌دست آمد.

$$\% \text{ بارگذاری در نانو سامانه پلیمری} = \frac{\text{وزن دوپامین در نانو سامانه}}{\text{وزن نانو سامانه}} \times 100$$

$$\% \text{ پوشینه‌دار شدن دوپامین در نانو سامانه پلیمری} = \frac{\text{وزن دوپامین در نانو سامانه}}{\text{وزن دوپامین}} \times 100$$

۲-۲-۷ رهش دوپامین از نانوذرات پلی(بوتیل سیانواکریلات) در شرایط برون‌تنی

برای بررسی رهش دوپامین از درون نانوذرات پلیمری، ابتدا نانوذرات حاوی حجم مشخصی از دارو در کیسه دیالیز ۱۲۰۰۰ دالتون میلی‌پور به مدت یک ساعت در انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور جداسازی دوپامین پوشینه‌دارنشده قرار داده شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت دو نمونه دوپامین و نانوذرات حاوی دوپامین در کیسه دیالیز حاوی دو سی‌سی بافر فسفات با $pH=7$ قرار گرفتند و کیسه دیالیز در بشر حاوی ۲۰ سی‌سی بافر فسفات قرار داده شد. در زمان‌بندی‌های مشخص ۳۰ دقیقه تا ۷۲ ساعت، یک سی‌سی از محلول درون بشر جدا شد و یک سی‌سی بافر فسفات تازه به بشر افزوده شد. پس از مشاهده میزان جذب نمونه، طبق منحنی واسنجی (Calibration) غلظت دوپامین، غلظت دوپامین رهش‌ده از سامانه به‌دست آمد. در نهایت منحنی رهش دوپامین خالص و دوپامین پوشینه‌دار شده در نانوسامانه‌ی پلیمری ترسیم شد [۱۷].

۲-۲-۸ بررسی عبور و رهش نانوسامانه از مغز با استفاده از فلوروسین ایزوتیوسیانات به عنوان مدل دارویی

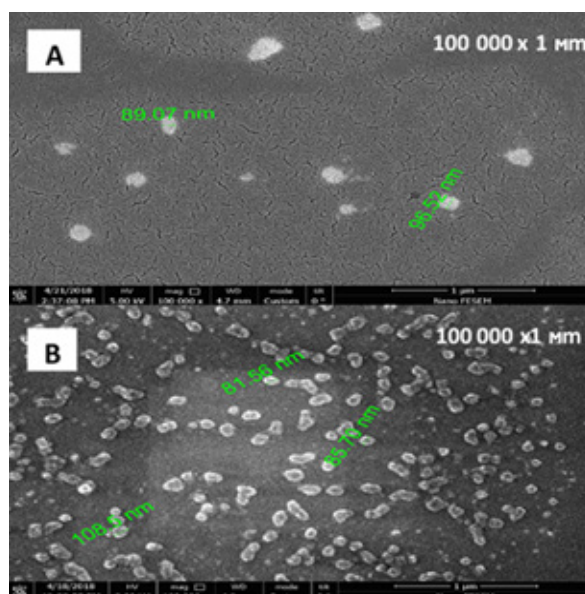
در این بررسی تجربی، سه سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزن 225.0 ± 5.0 گرم، از حیوانخانه دانشکده داورسازی دانشگاه تهران خریداری شد. موش‌ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس، در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. آب و غذا به اندازه کافی در اختیار آن‌ها قرار داشت. آزمایشها با تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان و با توجه به راهنمای استفاده و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتشرشده توسط مؤسسه ملی سلامت ایالات متحده (NIH Publications 1996 revised 23-80 No) انجام پذیرفت.

ابتدا به روش پلیمریزاسیون یونی در نانوسامانه پلیمری پلی(بوتیل سیانواکریلات) خالص تهیه شد و سپس برای بارگذاری یک میلی‌گرم رنگ فلورتاب در ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلیمر در یک میلی‌گرم استون مخلوط شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نانوسامانه بارگذاری‌شده با فلوروسین ایزوتیوسیانات به مدت ۳۰ دقیقه با توئین ۸۰، انکوبه و پوشش‌دهی شد که اثر مستقیم در نفوذ نانوسامانه پلیمری حاوی رنگ به مغز و عبور از سد خونی- مغزی داشت. سپس کلونیدها به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰۰ دور بر دقیقه در گریزان قرار داده شدند تا رنگ بارگذاری‌نشده جداسازی شود. ۵ میکروگرم سامانه پلیمری حاوی رنگ فلورتاب در میلی‌لیتر حلال به رت ویستار ۲۵۰ گرمی تزریق شد و پس از بیهوش کردن رت در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰، ۱۱۵ و ۱۲۰ دقیقه و ۱۷ ساعت پس از تزریق، عبور رنگ از مغز با استفاده از میکروسکوپ فلورتاب فلوویژن (FluVision) تصویربرداری شد [۲۱].

۲-۳ نتایج و بحث

۲-۳-۱ ریخت‌شناسی

خصوصیات ریخت‌شناسی نانوسامانه‌های پلیمری فاقد و حاوی دارو با میکروسکوپ الکترونی پوششی گسیل میدانی بررسی شد و در شکل ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق میانگین اندازه‌ی ذرات پلیمر ۹۰ نانومتر در حالی که در اغلب مطالعات بالای صد و پنجاه نانومتر گزارش شده است [۲۰]. همچنین اندازه‌ی نانوسامانه پلیمری حاوی دارو کمی بزرگ‌تر از نانوسامانه فاقد دارو بود و میانگین اندازه‌ی نانوذرات به ۱۱۰ نانومتر رسید. شکل ذرات فاقد دارو تقریباً کروی و سطح آنها صاف اما سطح ذرات حاوی دارو ناصاف بود که به اتصالات سطحی دارو به نانوسامانه پلیمری نسبت داده شد. در شکل ۱- (A و B) به ترتیب نانوسامانه‌های کروی فاقد دارو با میانگین اندازه‌ی ۹۰ نانومتر و سطح صاف و نانوسامانه‌های پلی(بوتیل سیانواکریلات) حاوی دوپامین



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی الکترونی پوششی از نانوسامانه‌های پلی(بوتیل سیانواکریلات) (A) خالص (فاقد دارو) و (B) حاوی دارو با بزرگنمایی صد هزار
Figure 1. FESEM images of (A) neat (without DA) and (B) DA-loaded PBCA NPs with the magnification of 100k

NH در دوپامین مشاهده نشد [۲۳]. قله‌های مربوط به پیوند CO استری و COC در پلیمر به ترتیب در ۱۷۵۰ و 1250 cm^{-1} نشانگر بارگذاری موفقیت آمیز دارو در پلیمر پلی(بوتیل سیانواکریلات) بود [۲۳].

۲-۳-۴ بررسی درصد بارگذاری دارو و رهش دوپامین از نانوسامانه پلیمری

پاهوجا و همکاران [۲۴] با استفاده از روش کروماتوگرافی کارا، دوپامین موجود در ناحیه استریاتوم مغز رت را سنجیدند که روش دقیقی برای محاسبه غلظت در حد میکرولیتر است. در پژوهش جاری بر اساس نتایج طیف‌نورسنجی و خواندن جذب دوپامین در ۲۸۰ نانومتر، غلظت دارو اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی واسنجی، میزان بارگذاری و پوشینه‌داری‌سازی دارو در نانوسامانه پلی(بوتیل سیانواکریلات) به ترتیب ۳۰ و ۴۷ درصد گزارش شد. همچنین نتایج آزمون کروماتوگرافی کارا میزان بارگذاری و پوشینه‌داری‌سازی دارو را به ترتیب ۳۵ و ۵۲ درصد نشان داد. در نهایت میانگین بارگذاری و پوشینه‌دار شدن دارو در یک میلی‌گرم پلیمر ۳۲/۵ و ۴۹/۵ درصد گزارش شد. بنابراین ۱/۶۵ میلی‌گرم و ۰/۸۱ میلی‌گرم از پنج میلی‌گرم اولیه دارو به ترتیب در نانوسامانه بارگذاری و پوشینه‌دار شد. نتایج بارگذاری دوپامین در پلیمر مذکور با توجه به شرایط خاص بارگذاری در مقایسه با داروهای آب‌گریز که معمولاً بیشتر از ۵۰ تا ۹۰ درصد بارگذاری دارند، کمتر گزارش شد [۱۳، ۱۴، ۱۷].

نانوسامانه‌ی حاوی دارو با استفاده از کیسه دیالیز ۱۲ کیلودالتون و با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت یک ساعت از دوپامین آزاد تخلیص شد. سپس رهش دارو در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

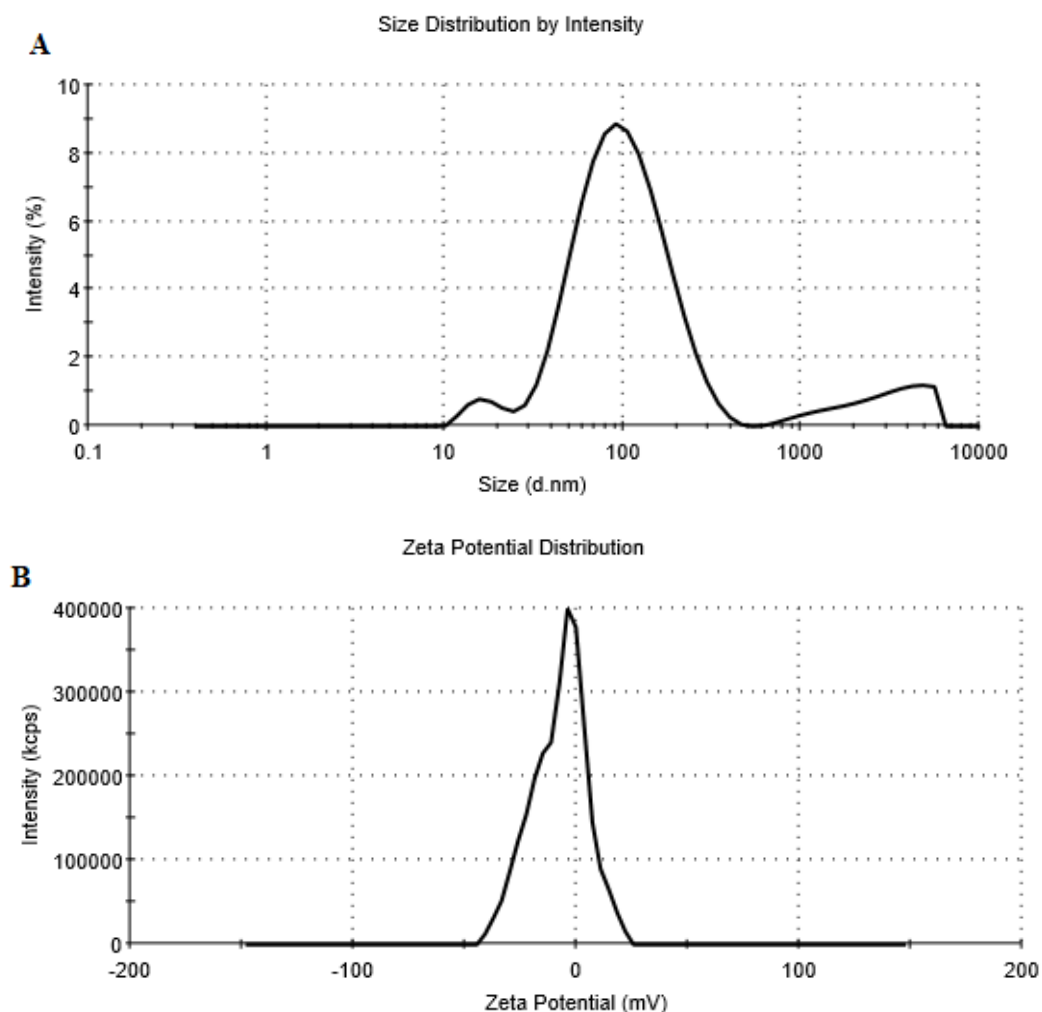
مشاهده می‌شوند.

۲-۳-۲ توزیع اندازه و پتانسیل زتا نانوسامانه پلی(بوتیل سیانواکریلات)

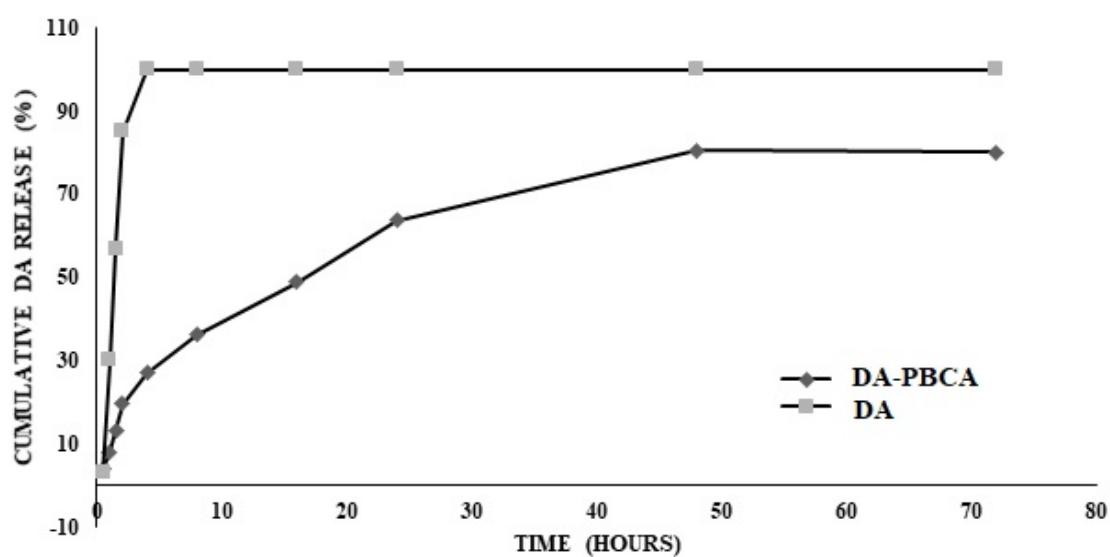
نتایج بررسی و ارزیابی محلول بافر فسفات حاوی نانو سامانه پلیمری پلی(بوتیل سیانواکریلات) (به میزان یک سی‌سی) با پراکندگی پویای نور بیانگر میانگین اندازه‌ی ذرات حاوی دارو برابر با ۹۰ نانومتر و مؤید نتایج میکروسکوپی الکترونی پوششی گسیل میدانی بود. بررسی توزیع اندازه ذرات، شاخص بس‌پراکندگی (Polydispersity index) را برابر با ۰/۳۶ نشان داد. پتانسیل زتا ذرات به میزان ۷/۶۱- میلی‌ولت به‌دست آمد. این در حالی است که برای عبور نانوسامانه از مغز معمولاً از نانوسامانه‌های دارای بار سطحی مثبت مانند نانوسامانه‌های پوشش‌داده‌شده با کیتوسان [۶] و پی‌ال‌جی ای [۲۱] استفاده می‌شود که بار سطحی مثبت در بدن سمی است. بنابراین، برتری نانوسامانه پلی(بوتیل سیانواکریلات) با بار سطحی منفی نسبت به سایر نانوسامانه‌ها با قابلیت عبور از سد خونی-مغزی تأیید شد.

۲-۳-۳ بررسی ساختاری نانوسامانه حاوی دارو

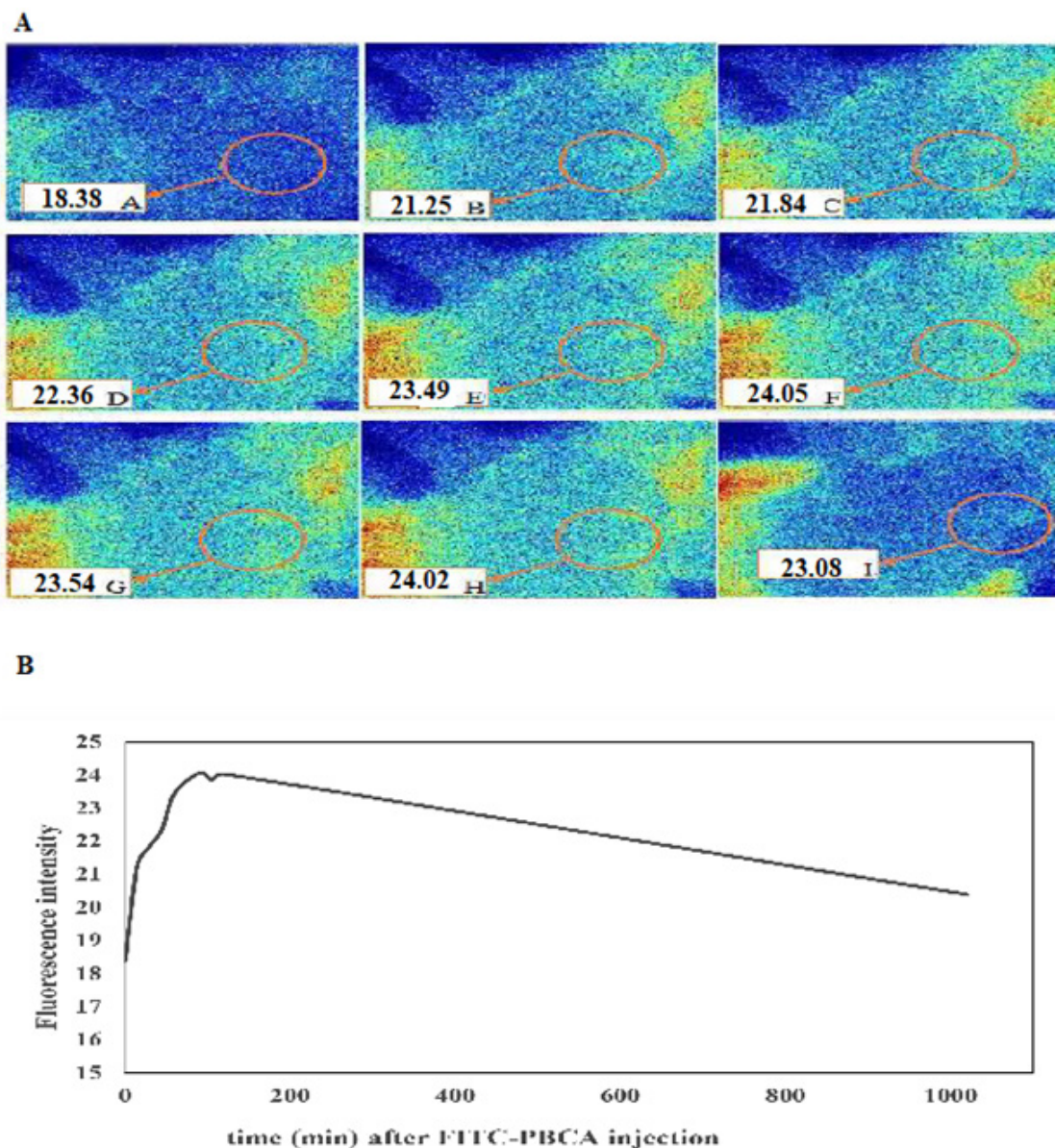
نتایج حاصل از آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ برای مونومر و نانوسامانه‌ها نشان داده شده است. مقایسه طیف تبدیل فوریه فروسرخ مونومر و ذرات پلی(بوتیل سیانواکریلات) وقوع پلیمریزاسیون را ثابت کرد. قله 2200 cm^{-1} مربوط به پیوند CN در مونومر آن بوتیل سیانواکریلات بود [۲۲]. این قله در پلیمر حاوی دارو بسیار ضعیف و نشانگر آن است که CN مونومر در پلیمریزاسیون نقش نداشته است. این در حالی است که در پلیمر فاقد دارو قله 3042 cm^{-1} مربوط به پیوند



شکل ۲. نتایج آزمون پراکندگی پویای نور برای ذرات پلی(بوتیل سیانواکریلات) حاوی دوپامین: (A) اندازه ذرات و (B) پتانسیل زتا
Figure 2. DLS results for DA-loaded PBCA sample: (A) particle size and (B) zeta potential



شکل ۳. مقایسه درصد رهش دوپامین آزاد و پلیمر بارگذاری شده با دوپامین بر حسب زمان
Figure 4. Free dopamine and DA-loaded PBCA release from dialysis membrane versus time



شکل ۴. رهش شبه‌دارو از نانوذرات بارگذاری‌شده با فلورسین ایزوتیوسیانات (A) تصاویر میکروسکوپی فلورتابی و (B) شدت فلورتابی بر حسب زمان

In-vivo release of the pseudo drug from FITC-loaded PBCA: (A) Fluorescence microscopy images and (B) Fluorescence intensity versus time

با سر تراشیده به منظور کاهش اثر خودفلورتابی (Autofluorescence) موی رت، اولین تصویربرداری با میکروسکوپ فلورتاب در دقیقه ۱۵ انجام شد و سپس هر پانزده دقیقه و نیم ساعت به ترتیب به مدت ۳ ساعت و ۱۷ ساعت بعد تصویربرداری تکرار شد. زمان‌های تصویربرداری در لحظه صفر به عنوان نمونه شاهد قبل از تزریق (الف)، ۱۵ دقیقه بعد از تزریق (ب)، ۳۰ دقیقه (پ)، ۴۵ دقیقه (ت)، ۶۰ دقیقه (ج)، ۹۰ دقیقه (د)، ۱۱۵ دقیقه (ه)، ۱۲۰ دقیقه (ر) و ۱۷ ساعت (ز) بود. رت طی این مدت بیهوش بود و هیچ نوع حرکت سر نداشت که ضریب خطا بسیار کاهش یافت. رهش طی این مدت بارز بود و حداکثر رهش در ۹۰

بررسی شد. جذب داروی آزادشده از نانوسامانه در محلول بافر فسفات ثبت و با استفاده از فرمول منحنی واسنجی دوپامین در بخش ۲-۲-۶ محاسبه و درصد رهش دارو مشخص شد. رهش دوپامین از پلیمر بارگذاری‌شده با دوپامین و دوپامین آزاد از کیسه دیالیز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد در شانزده ساعت اول، ۲۰ درصد دوپامین بارگذاری‌شده در نانوسامانه‌ی پلیمری رهش دارد. همچنین رهش تدریجی از نانوسامانه از فرمول هیگچی پیروی کرد.

۳-۲-۵ بررسی رهش درون‌تنی شبه‌داروی فلورسین ایزوتیوسیانات از نانوسامانه پلیمری

پس از تزریق ۶ میلی گرم بر کیلوگرم وزن رت ویستاری

دقیقه پس از تزریق مشاهده شد اما رهش به صورت تدریجی در هفده ساعت پس از تزریق نیز مشهود بود (شکل ۴). گائو و همکاران [۲۵] با بارگذاری فلورسین ایزوتیوسیانات در نانوذرات سیلیکا رهش تدریجی از نانوسامانه را از طریق میکروسکوپ فلورتاب نشان دادند. برای بررسی رهش درون تن فلورسین ایزوتیوسیانات از پلی(بوتیل سیانواکریلات) نیز می توان به تحقیق فوق استناد کرد.

۴-۲ نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوسامانه های کلئیدی پلی(بوتیل سیانواکریلات) خالص به روش پلیمریزاسیون یونی و فراگریزانه و با استفاده از عامل پایدارکننده پلوگرامر ۱۸۸ تهیه شد. این مطالعه در سه بخش شامل تهیه ی کلئیدهای پلیمری، بارگذاری دوپامین در نانوسامانه ها و بررسی ویژگی های ظاهری و شیمیایی نانوسامانه حاوی دارو برای آماده سازی تزریق انجام گرفت. به دلیل بارگذاری صفر داروی آب دوست دوپامین در پلیمر با استفاده از پلیمریزاسیون یونی در جای مونومر آن بوتیل سیانواکریلات، بارگذاری آن در نانوسامانه آب گریز به روش محلولی انجام شد. نتایج آزمون های طیفسنجی تبدیل فوریه فروسرخ، رهش با کیسه دیالیز در انکوباتور و کروماتوگرافی کارا نشان دادند که پلیمریزاسیون مونومر آن بوتیل سیانواکریلات و تهیه کلئیدهای پلی(بوتیل سیانواکریلات) قابل استفاده در مصارف پزشکی با موفقیت انجام شده است. همچنین دوپامین آب دوست در نانوسامانه پلیمری حداقل به میزان ۲۵ درصد بارگذاری شده بود و در نهایت دوپامین با قابلیت رهش از نانوسامانه پلیمری در مدت ۷۲ ساعت، رهش بیش از پنجاه درصدی را در ۲۴ ساعت اولیه نشان داد. نتایج مربوط به بررسی رهش درون تن نانوذرات حاوی داروی مدل نشان دهنده عبور سامانه از مغز و رهش تدریجی مولکول فلورتاب طی ۱۶ ساعت بود. همچنین بررسی ویژگی ظاهری نانوسامانه پلی(بوتیل سیانواکریلات) فاقد و حاوی دارو با میکروسکوپ الکترونی پویشی نشان داد که میانگین اندازه ی ذرات به ترتیب ۹۰ و ۱۲۰ نانومتر بود و ذرات به ترتیب به صورت کروی صاف و کروی ناصاف مشاهده شدند. پتانسیل زتای نانوذرات حاوی دارو ۷/۶۱- میلی ولت به دست آمد که برای عبور پلیمر از سد خونی- مغزی مناسب بود. همچنین شاخص بس پراکندگی نانوذرات ۰/۳۶ به دست آمد که می تواند مناسب و ایده آل باشد.

سپاسگزاری

در پایان نویسندگان مقاله از پارک علم و فناوری دانشگاه تهران به دلیل حمایت مالی با شماره گرنت ۱۵۰۰۶۲ برای انجام هرچه بهتر این پژوهش، تشکر و قدردانی

مراجع

- [1] K. Seppi et al., «Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review» *Movement Disorders*, vol. 34, no. 2, pp. 180-198, 2019.
- [2] S. D. Süßmuth, K. Landfester, H. Tumani, A. C. Ludolph, and J. Brettschneider, «Unsolved Medical Problems: Blood-brain barrier in neurodegenerative diseases: perspectives for Nanomedicine» *European Journal of Nanomedicine*, vol. 2, no. 1, pp. 39-47, 2009.
- [3] M. Wu, E. Dellacherie, A. a. Durand, and E. Marie, «Poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization (1): Dextran-based surfactants» *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 69, no. 1, pp. 141-146, 2009.
- [4] J. A. Obeso and W. Olanow, «Continuing efforts to obtain continuous delivery of levodopa» *Movement disorders*, vol. 26, no. 12, pp. 2149-2150, 2011.
- [5] Q. You et al., «Major effects on blood-retina barrier passage by minor alterations in design of polybutylcyanoacrylate nanoparticles» *Journal of drug targeting*, vol. 27, no. 3, pp. 338-346, 2019.
- [6] A. Trapani et al., «Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery» *International journal of pharmaceutics*, vol. 419, no. 1-2, pp. 296-307, 2011.
- [7] E. R. Rashed, H. A. Abd El-Rehim, and M. A. El-Ghazaly, «Potential efficacy of dopamine loaded-PVP/PAA nanogel in experimental models of Parkinsonism: Possible disease modifying activity» *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, no. 5, pp. 1713-1720, 2015.
- [8] C. Fan and D.-A. Wang, «Novel Gelatin-based Nano-gels with Coordination-induced Drug Loading for Intracellular Delivery» *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 32, no. 9, pp. 840-844, 2016.
- [9] M. Qu et al., «A brain targeting functionalized liposomes of the dopamine derivative N-3, 4-bis (pivaloyloxy)-dopamine for treatment of Parkinson's disease» *Journal of controlled release*, vol. 277, pp. 173-182, 2018.
- [10] M. S. Khan, S. Pandey, A. Talib, M. L. Bhaishare, and H.-F. Wu, «Controlled delivery of dopamine hydrochloride using surface modified carbon dots for neuro diseases» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 134, pp. 140-146, 2015.
- [11] E. Masoudipour, S. Kashanian, and N. Maleki, «A targeted drug delivery system based on dopamine functionalized nano graphene oxide» *Chemical Physics Letters*, vol. 668, pp. 56-63, 2017.
- [12] M. G. Han, S. Kim, and S. X. Liu, «Synthesis and degradation behavior of poly (ethyl cyanoacrylate)» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 93, no. 7, pp. 1243-1251, 2008.
- [13] G. G. Yordanov, Z. A. Bedzhova, and C. D. Dushkin, «Preparation and physicochemical characterization of novel chlorambucil-loaded nanoparticles of poly (butylcyanoacrylate)» *Colloid and Polymer Science*, vol. 288, no. 8, pp. 893-899, 2010.
- [14] F. Hansali, M. Wu, D. Bendedouch, and E. Marie, «n-Butyl cyanoacrylate miniemulsion polymerization via the phase inversion composition method» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 393, pp. 133-138, 2012.
- [15] N. Voigt, P. Henrich-Noack, S. Kockentiedt, W. Hintz, J. Tomas, and B. A. Sabel, «Surfactants, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles» *European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 87, no. 1, pp. 19-29, 2014.
- [16] J.-J. Yao et al., «Novel polymeric biomaterial poly (butyl-2-cyanoacrylate) nanowires: synthesis, characterization and formation mechanism» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 175, pp. 454-462, 2019.
- [17] G. Yordanov, A. Evangelatov, and R. Skrobanska, «Epirubicin loaded to pre-polymerized poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 107, pp. 115-123, 2013.
- [18] N. Haghazari, H. Mohammadi, M. J. Mokhtari, C. Karami, and S. Ghasemi, «Synthesis and In vitro Cytotoxicity of a novel efficient Cisplatin-loaded poly N-butyl cyanoacrylate» *INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL*

EDUCATION AND RESEARCH, vol. 50, no. 1, pp. 190-197, 2016.

[19] A. Ćurić, J. P. Möschwitzer, and G. Fricker, «Development and characterization of novel highly-loaded itraconazole poly (butyl cyanoacrylate) polymeric nanoparticles» European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, vol. 114, pp. 175-185, 2017.

[20] H. E. Shahmabadi et al., «Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma» Tumor Biology, vol. 35, no. 5, pp. 4799-4806, 2014.

[21] L. Rigon et al., «Targeting Brain Disease in MPSII: Preclinical Evaluation of IDS-Loaded PLGA Nanoparticles» International journal of molecular sciences, vol. 20, no. 8, p. 2014, 2019.

[22] T. López et al., «Treatment of Parkinson's disease: nanostructured sol-gel silica-dopamine reservoirs for controlled drug release in the central nervous system» International journal of nanomedicine, vol. 6, p. 19, 2011.

[23] M. Bagad and Z. A. Khan, «Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles for oral delivery of quercetin: preparation, characterization, and pharmacokinetics and biodistribution studies in Wistar rats,» International journal of nanomedicine, vol. 10, p. 3921, 2015.

[24] R. Pahuja et al., «Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats» ACS nano, vol. 9, no. 5, pp. 4850-4871, 2015.

[25] H. Guo et al., «Hollow mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of fluorescent dye» Chemistry Central Journal, vol. 5, no. 1, p. 1, 2011.