

Design and preparation of Chitosan/Alginate nanoparticles containing BSA and In-vitro release study

Nazli Kashani Javid¹, Nasser Mohammadpour², Sepideh Arbabi Bidgoli³

¹ Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Razi Vaccine and Sera Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

³Department of Toxicology–Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Nanoparticles have received more and more attention in the vaccine and drug delivery systems field due to their specific properties. In particular, alginate and chitosan have been known as the most promising nano-carriers. The present study aimed to develop alginate/chitosan nanoparticles as a carrier of BSA to Study In-vitro release condition.

Materials and methods: The nanoparticles were produced by the ionic gelation method in mild conditions and the aqueous environment, which leads to the production of particles with favorable size, shape, high entrapment efficiency, and controlled release characteristics.

Results: The synthesized nanoparticles of 60 nm in diameter and -32mv in zeta potential were considerably unparalleled and characterized by SEM, FTIR, and DSC. Nanoparticles resembled a spherical shell, smooth morphology, and homogeneous structure shown by SEM images. FTIR and DSC analyses confirmed conformational changes. Entrapment efficiency and loading capacity were 92% and 74%, respectively, via indirect method. The In-vitro BSA release profile and mechanism of BSA release from the nanoparticles were studied under simulated physiological conditions for various incubation periods. An initial burst effect revealed the release profile, followed by a continuous and controlled release phase.

Conclusion: Our results indicated the prepared nanoparticles could be appropriate for the convenient delivery of the desired drugs.

Keywords: *Nanoparticles, Chitosan, Alginate, BSA, Release.*

Cited as: Kashani Javid N, Mohammadpour N, Arbabi Bidgoli S. Design and preparation of Chitosan/Alginate nanoparticles containing BSA and In-vitro release study. *Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch* 2024; 34(3): 227-236.

Correspondence to: Nasser Mohammadpour

Tel: +98 9128000252

E-mail: nasser_mohammadpour@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0001-6684-5004

Received: 5 Dec 2023; **Accepted:** 27 Feb 2024

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۲۲۷ تا ۲۳۶

طراحی و تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی BSA و مطالعه انتشار آن در شرایط *in-vitro*

نازلی کاشانی جاوید^۱، ناصر محمدپور دونیقی^۲، سپیده اربابی بیدگلی^۳

^۱ گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
^۲ موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
^۳ گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات به دلیل ویژگی‌های خاصی که دارند، در زمینه سیستم‌های واکسن و دارورسانی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور خاص، آلژینات و کیتوزان به عنوان امیدوارکننده‌ترین نانوحامل‌ها شناخته شده‌اند. هدف مطالعه حاضر، طراحی و تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی BSA و مطالعه انتشار آن در شرایط *in-vitro* بود.

روش بررسی: نانوذرات با روش ژل سازی یونی در شرایط ملایم و در محیط آبی تهیه شدند که منجر به حصول ذرات با اندازه و شکل مطلوب، راندمان به دام افتادن بالا و ویژگی‌های رهایش کنترل شده، شد.

یافته‌ها: نانوذرات سنتز شده با قطر ۶۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۳۲- mV به طور قابل توجهی امیدوارکننده بودند و با روش‌های FTIR، SEM، DSC رزیابی شدند. نانوذرات همانند یک پوسته کروی، دارای مورفولوژی سطح صاف و ساختار همگن بودند که توسط تصاویر SEM نشان داده شد. آنالیزهای FTIR و DSC تغییرات ساختاری را تایید کردند. میزان کارایی احتباس و ظرفیت بارگذاری به ترتیب ۹۲٪ و ۷۴٪ به روش غیرمستقیم به دست آمد. مشخصات آزادسازی BSA و مکانیسم آن تحت شرایط فیزیولوژیکی شبیه‌سازی شده و در شرایط *in-vitro* برای دوره‌های آنکوباسیون مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. انتشار در ابتدا بسیار سریع و به دنبال آن یک فاز رهاسازی مداوم و کنترل شده را نشان داد. نتیجه‌گیری: نتایج به ما نشان داد که نانوذرات تهیه شده می‌توانند برای رسانش BSA مقبول باشند؛ لذا می‌توان آن را کاندیدای مناسب برای رسانش داروهای مختلف معرفی کرد.

واژگان کلیدی: نانوذرات، کیتوزان، آلژینات، BSA، آزادسازی.

مقدمه

نانو در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی جایگاه ویژه‌ای دارد و استفاده از این تکنولوژی در درمان، پیشگیری و تصویربرداری هر روز در حال افزایش است. نانوذرات می‌توانند داروها یا بیومولکول‌ها را در ساختار داخلی خود به دام ببندازند و یا بر روی سطح بیرونی خود جذب کنند. در حال حاضر نانوذرات به طور گسترده جهت عرضه داروها، پلی‌پپتیدها، پروتئین‌ها، واکسن‌ها، اسید نوکلئیک‌ها، ژن‌ها و غیره استفاده می‌شوند (۲). اخیراً استفاده از نانوذرات به عنوان حامل‌های رسانش آنتی‌ژن در واکسن توجه محققین را به خود جلب کرده است. نانوذرات با به دام انداختن آنتی‌ژن در ساختار خود می‌توانند روشی نوین جهت رسانش آنتی‌ژن ارائه

فناوری نانو توانایی کار در سطوح اتمی، مولکولی و سوپرمولکولی (در مقیاس ۱-۱۰۰ نانومتر) است، به منظور درک ساخت و استفاده از ساختار، دستگاه و سیستم‌هایی که بطور بنیادین دارای خواص و عملکردهای جدیدی هستند و این خصوصیات از ساختار کوچک آنها ناشی می‌شود (۱). فناوری

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ناصر محمدپور دونیقی (email: nasser_mohammadpour@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0001-6684-5004

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۸

زیادی را به منظور سیستم رسانش نوین واکسن به خود جلب کرده‌اند (۶).

کیتوزان، یک پلی ساکارید زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با فعالیت ایمونولوژیک است که به عنوان چسبنده زیستی و جذب افزای موثر عمل می‌کند. همچنین به عنوان یک پلیمر نویدبخش جهت تشکیل سیستم های رسانش واکسن مورد توجه است (۷). ساختار کیتوزان اولین بار در سال ۱۹۳۶ با استفاده از پراش اشعه‌ی ایکس توسط کلارک و اسمیت بدست آمد. اما با وجود یافته های بدست آمده، حدود ۶۰ سال بعد، یعنی در سال ۱۹۹۷ تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت و بیش از ۲۰ سال است که اهمیت آن به عنوان یک حامل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۸).

اولین بار در سال ۱۹۸۰، از آلزینات با هدف انکپسوله کردن استفاده شد. بعد از آن تحقیقات روی توسعه و کاربردهای مختلف ذرات آلزینات ادامه داشتند (۹). آلزینات یک پلی ساکارید آنیونی محلول در آب است و تحت شرایط ملایم در حضور یک کاتیون دو ظرفیتی (Ca^{2+} ، Sr^{2+} ، Cu^{2+} و Zn^{2+}) می‌تواند اتصالات عرضی ایجاد کند. دارای خاصیت چسبندگی زیستی است و بنابراین ماندگاری دارو را افزایش می‌دهد. به علت تنوع خواص، آلزینات جهت توسعه‌ی سیستم های رسانش دارو مورد استفاده قرار گرفته است.

آلزینات به واسطه گروه‌های آنیونی کربوکسیلیک خود با گروه‌های کاتیونی آمینوی کیتوزان واکنش می‌دهد و ذرات کیتوزان-آلزینات را تشکیل می‌دهد (۱۰). هدف کلی از این تحقیق تهیه نانوذرات کیتوزان/آلزینات حاوی BSA به عنوان یه پروتئین مدل در دستیابی به سیستم رسانش نوین بود.

مواد و روشها

تهیه نانوذرات کیتوزان/آلزینات

برای تهیه نانوذرات کیتوزان/آلزینات از روش ژل سازی یونی (Ionotropic gelation) استفاده شد. ابتدا ۸ میلی لیتر محلول کلسیم کلرید به عنوان کراس لینکر به صورت قطره قطره به فاز مایه، سدیم آلزینات، تحت شرایط همزدن در دمای اتاق افزوده و طی یک ساعت هموژناسیون نانوذرات آلزینات حین همزدن تشکیل شدند. سپس ۴ میلی لیتر محلول کیتوزان تهیه شده در محلول اسیداستیک را داخل بورت ریخته و به صورت قطره قطره به نانوذرات تشکیل شده اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت هموژناسیون نانوذرات کیتوزان آلزینات به دست آمدند. جهت

کنند که ممکن است مقدار تیترا آنها به محض تزریق به سرعت کاهش پیدا کند و یا پاسخ ایمنی موضعی و کوتاه مدت ایجاد کنند (۳). نانوذرات در جهت رسیدن به دوز درمانی مناسب از طریق هدفمندسازی، ایجاد پروفایل رهایش آهسته دارو و محافظت درون سلولی ترکیبات درمانی از تخریب و یا خروج به کار می‌رود (۴). در حال حاضر تحقیقات در مورد سیستم رسانش دارویی نانوذرات بر ۴ مورد تمرکز دارد: (الف) انتخاب و ترکیب مواد حامل برای به دست آوردن سرعت مناسب رهایش دارو، (ب) اصلاح سطحی نانوذرات برای بهبود توانایی هدف گیری آنها، (ج) بهینه سازی آماده سازی نانوذرات برای افزایش قابلیت رسانش دارو، کاربرد آنها در کلینیک و امکان تولید در مقیاس صنعتی، (د) بررسی In-vivo جهت درک برهمکنش نانوذرات با خون و هدف قرار دادن بافت‌ها و ارگان‌ها.

مواد پلیمری که برای تهیه‌ی نانو ذرات جهت رسانش دارو استفاده می شوند، باید زیست سازگار و زیست تخریب پذیری خوبی داشته باشند. برای این منظور، بسیاری از مواد پلیمری استفاده شده است. در میان آنها، پلی ساکاریدها محبوب ترین مواد پلیمری برای تهیه نانو ذرات جهت رسانش دارو هستند. پلی ساکاریدها، پلیمرهای مونوساکاریدها هستند که در طبیعت، دارای منابع مختلفی از جمله منشاء جلبک (به عنوان مثال آلزینات)، منشاء گیاهی (به عنوان مثال پکتین)، منشاء میکروبی (مانند دکستران) و منشاء حیوانی (مانند کیتوزان) هستند. پلی ساکاریدها دارای تعداد زیادی از گروه های فعال، طیف گسترده ای از وزن مولکولی، ترکیب‌های شیمیایی متفاوت که به تنوع آنها در ساختار و خواص کمک می‌کنند، هستند. پلی ساکاریدها را می‌توان به دو گروه پلی الکترولیت ها و غیر پلی الکترولیت‌ها تقسیم کرد: گروه اول شامل پلی ساکارید های مثبت (کیتوزان) و پلی ساکاریدها با بار منفی (آلزینات، هپارین، اسید هیالورونیک، پکتین و ...) است. پلی ساکاریدها بسیار پایدار، ایمن، غیر سمی، هیدروفیل و زیست تخریب پذیر هستند. علاوه بر این، پلی ساکاریدها منابع فراوانی در طبیعت دارند و هزینه پردازش آنها کم است. بسیاری از پلی ساکارید های طبیعی دارای گروه‌های هیدروفیلی مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و آمینو هستند که می‌توانند پیوندهای غیر کووالانت با بافت‌های بیولوژیکی ایجاد کنند (۵).

کیتوزان و آلزینات جزو پلیمرهای طبیعی هستند که به علت خواص زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و چسبندگی زیستی و البته خاصیت یآوری قابل قبول، توجه محققین

کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل را به وسیله دسیکاتور کاملا رطوبت‌گیری کرده (زیرا مولکول‌های آب در محدوده‌ی مادون قرمز پیک‌های پهنی ایجاد می‌کنند) و سپس در هاون عقیق گذاشته و به صورت پودر درآمدند. بعد از آن با KBr مخلوط شده (۹۵٪ KBr + ۵٪ نمونه)، زیر دستگاه پرس قرار گرفته و در نهایت قرص تهیه شده جهت آنالیز در دستگاه قرار گرفت.

بررسی رفتار حرارتی نانوذرات

جهت توصیف رفتار حرارتی نانوذرات کیتوزان/آلژینات در حالت شاهد و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل BSA، از آنالیز (DSC: Differential Scanning Calorimetry) گرماسنجی روبشی تفاضلی استفاده شد. در این تکنیک چگونگی تغییر خواص حرارتی نمونه به‌عنوان تابعی از دما، بطور پیوسته اندازه‌گیری می‌شود در حالی که با یک نمونه مرجع تحت یک برنامه‌ی دمایی کنترل شده باشند (۱۴).

محاسبه‌ی درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگیری و کارایی احتباس

درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگیری و کارایی احتباس نانوذرات براساس روش غیر مسقیم و معادلات زیر محاسبه شد (۱۵). با توجه به وزن خشک ذرات و مقدار پروتئین انکپسوله شده در نانوذرات که از اختلاف بین مقدار کل پروتئین اولیه و میزان پروتئین انکپسوله نشده در سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین بدست آمد و قبلا با تست بردفورد مطالعه شده بود.

(الف)

$$\text{Nanoparticle yield(\%)} = \frac{\text{weight of nanoparticles}}{\text{weight of polymer and drug fed initially}} \times 100$$

(ب)

$$\text{Loading capacity(\%)} = \frac{\text{weight of drug in nanoparticles}}{\text{weight of nanoparticles}} \times 100$$

(ج)

پروفایل انتشار BSA

از بافر فسفات سالین با pH= ۷/۲ جهت بررسی میزان انتشار پروتئین از نانوذرات استفاده گردید. تیمورسال ۰/۰۱ درصد به عنوان نگهدارنده به بافر اضافه شد. ۱ میلی گرم نانوذرات خشک‌شده

$$\text{Entrapment efficiency(\%)} = \frac{\text{weight of drug in nanoparticles}}{\text{weight of drug fed initially}} \times 100$$

حاوی پروتئین به تعدادی لوله‌ی در پیچ‌دار منتقل و سپس به هر لوله ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط شیکر انکوباسیون با دور ۷۵ rpm

تنظیم pH محلول‌های اولیه از هیدروکریک اسید و سود استفاده شد. فاکتورهایی را که جهت بهینه‌سازی سنتز نانوذرات با شرایط مطلوب دنبال کردیم عبارت بودند از: غلظت آلژینات، غلظت کیتوزان، سرعت هم‌زدن، pH، مدت زمان هم‌وزناسیون، اندازه مگنت و شکل ظرف آزمایش.

تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان پروتئین مدل

به منظور تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان پروتئین مدل، در بدو امر محلول ۲ درصد BSA آماده (۱۱) و ۳/۲ میلی‌لیتر از آن به محلول سدیم آلژینات اضافه شد. سپس کراس لینکر به صورت قطره قطره افزوده گردید. یک ساعت هم‌وزناسیون انجام شد. پس از تشکیل نانوذرات آلژینات حاوی BSA، محلول کیتوزان اضافه و بعد از یک ساعت هم‌وزناسیون در درمای اتاق و تحت شرایط هم‌زدن نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به دست آمدند.

اندازه ذره‌ای و بار سطحی نانوذرات

بار سطحی و میانگین اندازه‌ی ذرات توسط تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (DLS: Dynamic light scattering) اندازه‌گیری شد. تعیین پتانسیل زتا براساس اصول الکتروفورتیک نانوذرات در سوسپانسیون‌های آبی رقیق شده است (۷) (۱۲). بار سطحی ذرات در تمام مراحل تولید ذرات از اهمیت زیادی برخوردار است چراکه کارایی مراحل مختلف به طور مستقیم به ایجاد تعاملات الکترواستاتیک بستگی دارد (۱۳). در تکنیک پراکندگی نور دینامیکی برهمکنش نور با ماده بررسی می‌شود، شدت نور پراکنده شده با زمان تغییر کرده و می‌توان از آن در تعیین میانگین اندازه‌ی ذرات در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده کرد.

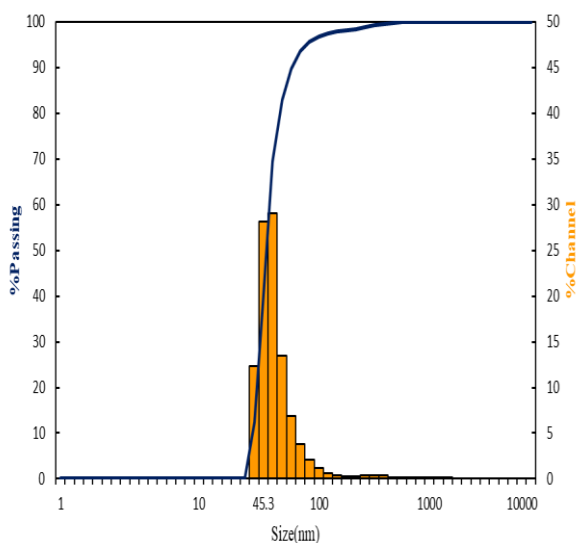
بررسی مورفولوژی و خصوصیات ظاهری نانوذرات

از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جهت ارزیابی مورفولوژی نانوذرات کیتوزان/آلژینات شاهد و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل استفاده شد. بدین صورت که مقداری از نمونه سوسپانسیون تهیه‌شده از نانوذرات را بر روی ورق آلومینیوم ریخته و پس از خشک‌شدن کامل، یک لایه‌ی نازک طلا بوسیله فرآیند sputtering روی آن نشاند، سپس در دستگاه قرار داده و نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (۴).

بررسی ساختار و پیوندهای شیمیایی نانوذرات

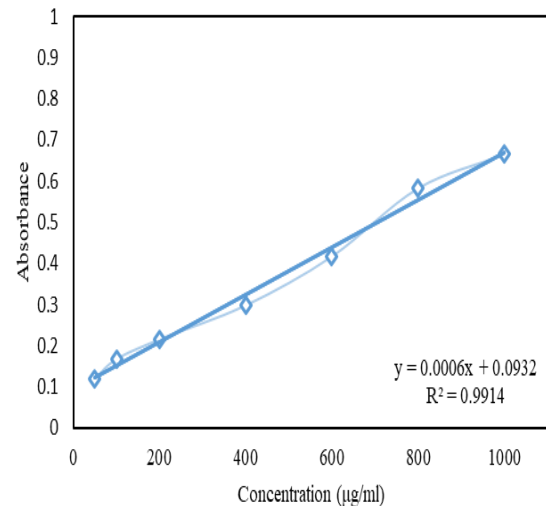
ساختار نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه‌شده در این پژوهش توسط FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) مدل Thermo-Nicolet مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه‌شده‌ی شاهد و سپس نانوذرات

صورت جداگانه بهینه می شد، نتایج تشکیل نانوذرات آلژینات با اندازه بیشتر از ۱۰۰ نانومتر بدست آمد. نهایتاً با افزایش سرعت همزدن تا ۲۰۰۰ دور در دقیقه، تغییر شکل یا اندازه ظرف و آهنربا، نانوذرات آلژینات مناسب با اندازه متوسط ۴۵ نانومتر تولید شدند. (شکل ۲) با توجه به این نتایج، گام بعدی برای سنتز نانوذرات کیتوزان/آلژینات برداشته شد. غلظت‌های مختلف کیتوزان آزمایش شدند. نانوذرات کیتوزان/آلژینات بهینه با غلظت آلژینات ۳٪ w/v، غلظت کراسلینکر ۱٪ w/v، غلظت کیتوزان ۱٪ w/v و سرعت هم زدن ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به دست آمد. کاتیون‌های کلسیم در ابتدا با آلژینات با بار منفی از طریق ژلسازی یونی به هم متصل شدند تا اولین پوسته را تشکیل دهند و سپس کیتوزان با رقابت با کلسیم برای ایجاد پیوند متقابل با آلژینات، پوششی محکمتر را تشکیل داد. میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان/آلژینات و کیتوزان/آلژینات حاوی BSA ۳۰ و ۶۰ نانومتر به دست آمد (شکل‌های ۳ و ۴). افزودن کیتوزان باعث کاهش میانگین اندازه ذرات نانوذرات کیتوزان/آلژینات شد. به نظر می رسد که پیوند متقابل بین آلژینات و کیتوزان احتمالاً کشش سطحی را تغییر داده است که در نتیجه منجر به انقباض سطحی و کاهش اندازه ذرات نانوذرات می شود. درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگذاری و کارایی احتباس برای BSA بر اساس معادلات (الف)، (ب) و (ج) به ترتیب ۸۰٪، ۷۴٪ و ۹۲٪ تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده کارایی به دام افتادن بالاتری نسبت به مقدار گزارش شده توسط Sarmiento و سرایی بود. شکل ۵ مراحل اجرا شده را به ترتیب برای تهیه و نگهداری نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA نشان می‌دهد.



شکل ۲: توزیع اندازه نانوذرات آلژینات در حالت بهینه

قرار داده شد. در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت، سه یا یک لوله را برداشته و با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی را برداشته و غلظت BSA به روش لوری اندازه‌گیری (شکل ۱) و با توجه به مقدار پروتئین اولیه بارگیری شده درصد آن محاسبه شد (۴).

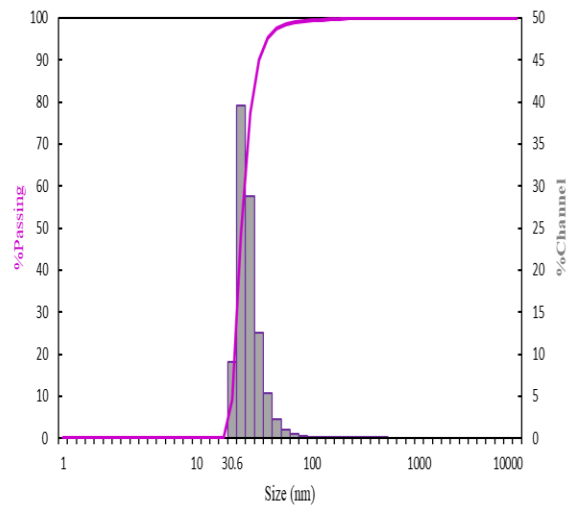


شکل ۱: منحنی استاندارد نمونه BSA روش لوری

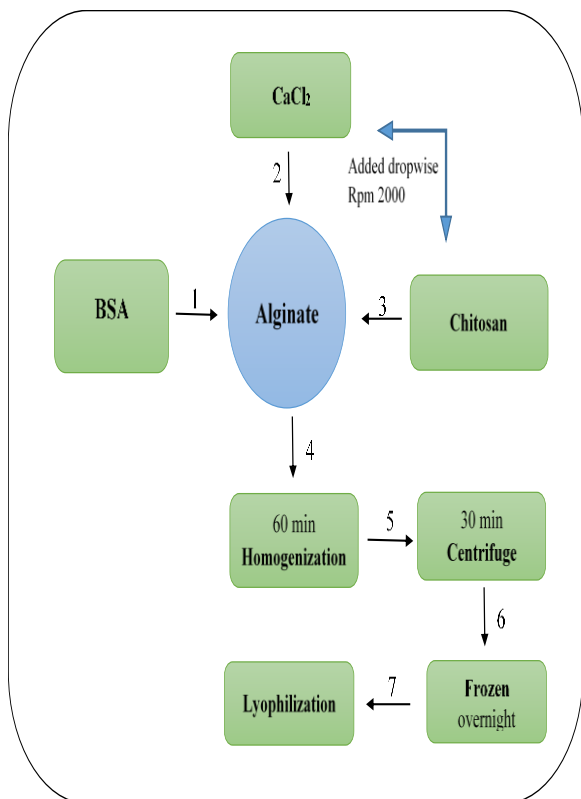
یافته‌ها

دو پلیمر طبیعی آلژینات و کیتوزان در این مطالعه جهت توسعه یک نانو حامل برای تحویل BSA، انتخاب شدند. مشخص شد که نانوذرات کیتوزان/آلژینات به راحتی با غلظت‌های نسبتاً کم پلیمر و کراسلینکر تشکیل می شوند. کاهش حلالیت پلیمر به دلیل ژل سازی یونی در حالی که کلرید کلسیم به محلول آلژینات در محیط آبی اضافه می شود، رخ می دهد. اگر غلظت کلرید کلسیم خیلی کم یا زیاد باشد، تشکیل ژل به درستی انجام نخواهد شد. با حضور کلسیم، برهمکنش یونی در همان زنجیره آلژینات رخ می‌دهد. مرحله بعدی فرآیند تهیه نانوذرات، پوشش نانوذرات آلژینات با بیوپلیمر کیتوزان بود. بر اساس آزمایش‌های اولیه، عوامل اصلی مؤثر بر اندازه و ویژگی‌های مورفولوژیکی نانوذرات عبارتند از غلظت پلیمرها و کراسلینکر، سرعت افزودن کراسلینکر، سرعت همزن، زمان همگن‌سازی، شکل ظرف و اندازه‌ی مگنت. هدف از مطالعه‌ی ما تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات کروی با سطح صاف با اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود. در ابتدا، نانوذرات از طریق یک پروتکل توصیف شده توسط Sarmiento و همکاران تهیه شدند (۱۶)، اما نتایج نشان داد که نمودار توزیع اندازه بیش از یک پیک دارد. بنابراین روش سنتز نانوذرات به روش سرایی و همکاران تغییر کرد (۱۱) که نانوذرات آلژینات به

که در ساختار کیتوزان وجود دارد. پیک نزدیک به cm^{-1} ۱۳۸۰ ناشی از ارتعاشات کششی -NH آمید در ناحیهی اثرانگشت طیف است. کشش متقارن C-O-C حوالی cm^{-1} ۱۰۸۰ قابل مشاهده است. پیک cm^{-1} ۶۱۳ بعلت ساختار ساکاریدی کیتوزان است (۱۷). در طیف FTIR مربوط به آلژینات پیک پهن محدودهی cm^{-1} ۳۲۰۰-۳۴۵۰ متعلق به ارتعاشات کششی -OH و پیوند هیدروژنی بین مولکولی است. نزدیک اعداد موجی cm^{-1} ۱۷۰۰-۱۴۰۰ ارتعاشات کششی کربونیل آمیدی مشاهده می‌شود.

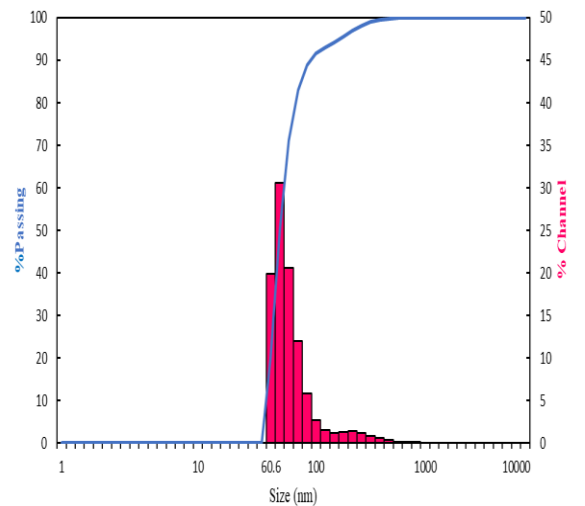


شکل ۳: توزیع اندازه ذره نانوذرات کیتوزان/آلژینات در حالت بهینه



شکل ۵. مراحل سنتز نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

پیک‌های کربوکسیل ارتعاشات کششی متقارن نزدیک cm^{-1} ۱۶۱۸ و ارتعاشات کششی نامتقارن در cm^{-1} ۱۴۱۷ قابل مشاهده است. پیک مشخص در محدودهی cm^{-1} ۱۰۲۸ نشان‌دهندهی حلقه‌ی کربوهیدرات است (۱۸). در طیف FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات نیز پیک‌های آلژینات بعد از واکنش با کیتوزان از cm^{-1} ۱۶۱۸ به cm^{-1} ۱۶۰۳ و از cm^{-1} ۱۴۱۷ به cm^{-1} ۱۴۲۱ شیفت پیدا کرده‌اند. همان طور که در شکل مقایسه‌ای مشخص است، پیک‌های کیتوزان نیز تغییراتی بعد از برهمکنش با آلژینات نشان داده‌اند. پیک آمیدی در cm^{-1} ۱۶۰۳ و cm^{-1} ۱۴۲۱ singlet شده است. علاوه بر این شدت پیک‌ها بعد از برهمکنش کاهش پیدا کرده است. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که برهمکنش موثری



شکل ۴: توزیع اندازه ذره نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

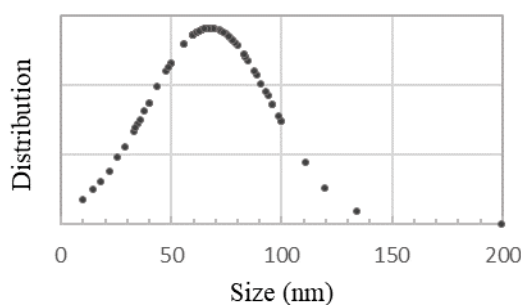
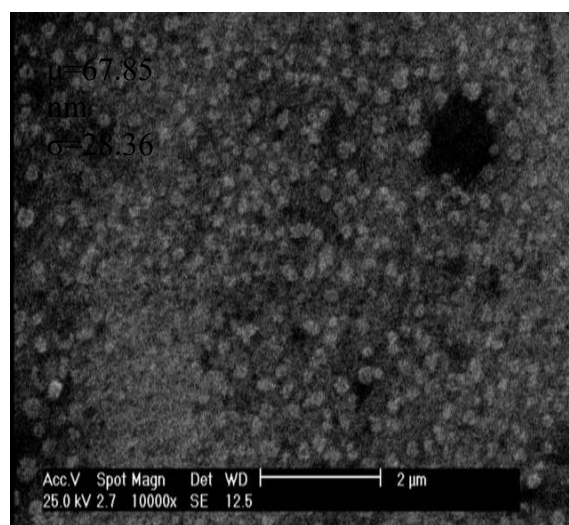
بحث

مورفولوژی نانوذرات توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. تصویر و نمودار توزیع سایز ذرات در شکل ۶ نشان داده شده است. متوسط سایز و انحراف معیار محاسبه شده به ترتیب ۶۷/۸۵ و ۲۸/۳۶ نانومتر گزارش شد. بیشتر ذرات به شکل منظم با سطح صاف بودند. علاوه بر این، نانوذرات گسسته و بدون هیچ گونه تجمعی هستند.

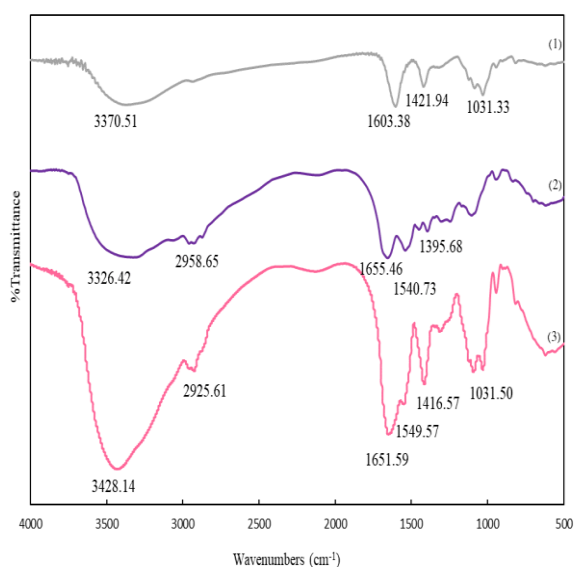
در شکل ۷ طیف FTIR مربوط به کیتوزان، آلژینات و نانوذرات کیتوزان/آلژینات نشان داده شده است. چند پیک شاخص در طیف FTIR مربوط به کیتوزان وجود دارد. پیک پهن در محدوده‌ی جابه‌جایی cm^{-1} ۳۲۰۰-۳۴۵۰ که مربوط به گروه‌های آمین و هیدروکسیل (ارتعاشات کششی -OH و پیوند هیدروژنی بین مولکولی) می‌باشد. پیک در محدوده‌ی cm^{-1} ۲۹۱۸ به علت ارتعاشات کششی -OH است. پیک cm^{-1} ۱۶۵۶ مربوط به کربونیل آمیدی است

شکل ۸ شکل مقایسه ایی پیک های FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات، BSA و نانوذرات آلژینات-کیتوزان حاوی BSA را به تصویر کشیده است. سه پیک شاخص در طیف FTIR مربوط به BSA وجود دارد. یک پیک قوی در محدوده 1655 cm^{-1} پیوند آمید I و کربونیل، آمید II نزدیک 1540 cm^{-1} که متعلق به پیوند کششی C-N و خمشی N-H در آمیدهای نوع دوم است و نهایتاً پیوند خمشی C-H که نزدیک 1395 cm^{-1} اتفاق می افتد که گاهی پیوند آمید III نامیده می شود. پیک پهن مربوط به ارتعاشات کششی OH- قابل مشاهده است با پیوندهای کششی متقارن و نامتقارن N-H که با شانه‌ی تیزتری روی آن قرار دارند. پیک‌های کوچکتری در محدوده 1000 cm^{-1} تا 2958 cm^{-1} دیده می شود که به پیوند کششی C-H در ترکیبات آلیفاتیک اختصاص داده می شود (۱۹). در طیف FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات-BSA مشاهده می شود که تغییراتی در پیک‌های شاخص BSA پس از بارگیری توسط نانوذرات کیتوزان/آلژینات ایجاد شده است. بدین صورت که بعد از بارگیری توسط نانوذرات کیتوزان/آلژینات از 1655 cm^{-1} به 1549 cm^{-1} و 1655 cm^{-1} به 1540 cm^{-1} ، از 1651 cm^{-1} به 1549 cm^{-1} و 1395 cm^{-1} به 1416 cm^{-1} شیفت پیدا کرده اند. بعلاوه همان طور که در شکل مقایسه‌ای مشخص است شدت این پیک‌ها بعد از بارگیری تغییراتی به همراه داشته است.

بین پلیمرها بعد از مخلوط شدن و تشکیل نانوذرات ناشی از بارهای مخالف آلژینات و کیتوزان وجود دارد، چراکه پیک‌های گروه‌های مولکولی مسئول برهمکنش یونی، تغییر کرده‌اند.

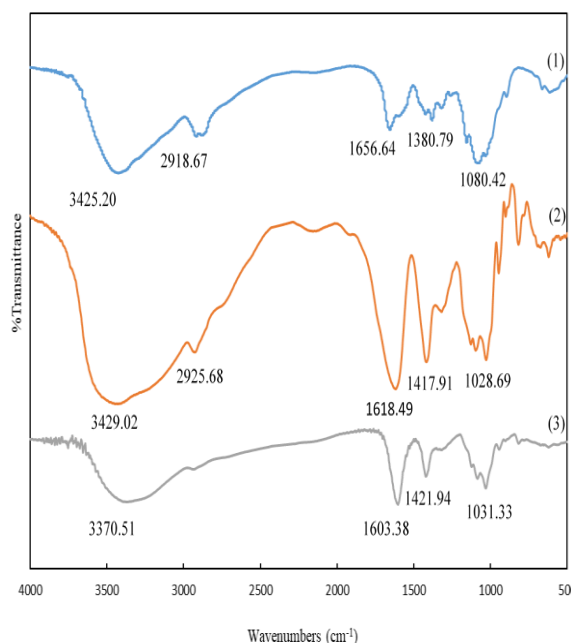


شکل ۶: تصویر SEM نانوذرات کیتوزان/آلژینات-BSA



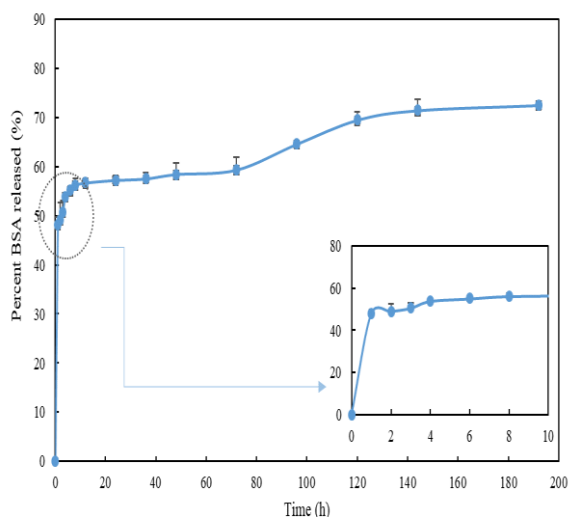
شکل ۸. مقایسه‌ی طیف‌های FTIR (۱) نانوذرات کیتوزان/آلژینات، (۲) BSA و (۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

ترموگرام‌های بدست آمده توسط DSC در شکل ۹ رسم شده است. اختلاف بین ترموگرام‌های مربوط به نانوذرات



شکل ۷. مقایسه‌ی طیف FTIR (۱) کیتوزان، (۲) آلژینات و (۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات

ساعت را نشان داد. حداکثر انتشار (۷۰٪) پس از ۱۹۶ ساعت مشهود است. این مرحله ممکن است مربوط به رهاسازی BSA از هسته نانوذرات و تجزیه آهسته آنها باشد. داده‌های انتشار نشان داد که نانوذرات کیتوزان/آلژینات از BSA محافظت می‌کنند، ویژگی‌های زیست سازگار و زیست تخریب پذیری دارند و انتشار مواد بارگیری شده را محدود می‌کند.

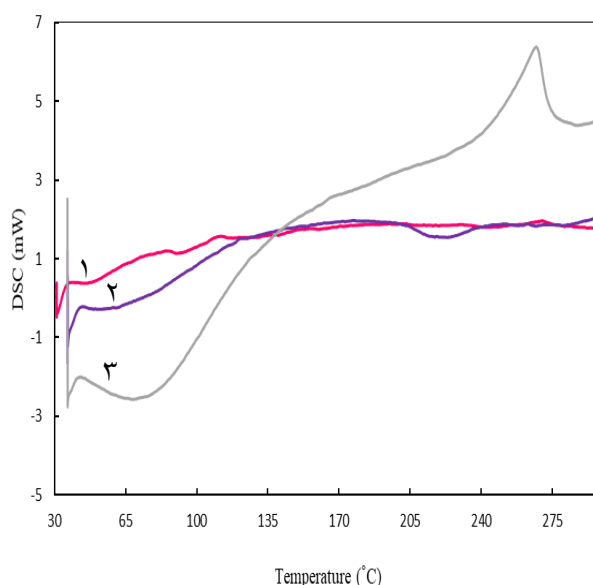


شکل ۱۰. پروفایل آزادسازی BSA از نانوذرات کیتوزان/آلژینات

نتیجه گیری

در این پژوهش نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان یک سیستم نوین واکسن رسانی هدفمند مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از روش ژل سازی یونی برای ساخت نانوذرات استفاده شد که در آن از حلال آلی استفاده نمی‌شود و روش بسیار آسان و ساده‌ای است و کمترین تنش به سیستم حین ساخت وارد می‌شود به این صورت که کلسیم کلرید به عنوان کراس‌لینکر قطره قطره به محلول آلژینات افزوده شد. نانوذرات کیتوزان/آلژینات بهینه با اضافه شدن کیتوزان در مرحله بعدی حاصل و بررسی شد. نانوذرات حاصل شده در هر مرحله از لحاظ اندازه و بار سطحی مورد بررسی قرار گرفتند. که نتایج نشان داد ذرات دارای میانگین اندازه زیر ۲۵۰ نانومتر هستند. با توجه به اینکه بهینه اندازه ذرات برای برداشت توسط سیستم ماکروفاژی و تحریک سیستم ایمنی، زیر ۳۰۰ نانومتر می‌باشد (اگرچه ذرات تا ۵ میکرون هم می‌توانند توسط این سیستم فاگوسیت شوند) (۲۱)، می‌توان نتیجه گرفت که این ذرات دارای کارایی لازم برای رسانش هر محموله‌ای به سیستم ایمنی را دارا می‌باشند.

کیتوزان/آلژینات، BSA و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به صورت جداگانه را با تفاوتی که در پیک‌های اندوترمیک وجود دارد و جابه‌جایی دمایی که در پیک‌های تجزیه‌ی اگزوترمیک مشخص شده، نشان می‌دهد. پیک‌های اندوترمیک مربوط به از دست دادن آب گروه‌های آب‌دوست پلیمر می‌باشد، درحالی که پیک‌های اگزوترمیک نتیجه‌ی تخریب پلی‌الکترولیت‌ها به دلیل دهیدراته شدن، دپلمریزاسیون و واکنش‌های پیرولیتی است (۲۰). ترموگرام نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA در مقایسه با BSA به تنهایی متفاوت بود که احتمالاً ترکیبی از دو نتیجه جداگانه را نشان می‌دهد. این بدان معنی است که یک تغییری در ترکیبات ذرات رخ داده است.



شکل ۹. مقایسه نمودارهای آنالیز حرارتی (۱) BSA، (۲) نانوذرات کیتوزان/آلژینات-BSA و (۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات

پروفایل انتشار تجمعی BSA از نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه شده در شرایط in-vitro مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱۰ مشخص است، پروفیل رهاسازی در چند ساعت اول یک رهاسازی اولیه انفجاری را نشان می‌دهد و سپس وارد فاز رهاسازی مداوم و پایدار می‌شود. نانوذرات الگوی رهایش انفجاری را تقریباً ۵۰ درصد نشان دادند که دلیل آن جدا شدن BSA هایی که به طور آزاد در سطح نانوذرات قرار داشتند و همچنین انتشار مولکول‌های BSA نزدیک به سطح نانوذرات بود. این مشاهدات با نتایج Sarmiento و همکارانش مطابقت معقولی دارد. این پروفایل رهایش در ادامه یک رهایش کنترل شده در عرض ۱۴۴

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که نانوذرات از کارایی محبوس‌سازی بالایی برخوردارند که این موضوع با توجه به مصرف کمتر BSA و استفاده‌ی حداکثر از آن اهمیت خاصی دارد. علاوه بر این رهش BSA از نانوذرات از یک روند آهسته پیروی می‌کند. نتایج نشان می‌داد که در طی ۱۹۶ ساعت حدود ۷۰ درصد از کل BSA آزاد شده است. که این خود می‌تواند یک مزیت برای سیستم آنتی‌ژن‌رسانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همراهی شرکت داروسازی مصون دارو که امکانات آزمایشگاهی را برای انجام این پروژه مهیا نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Roco MC. Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:337–46.
- Ahirrao SP, Gide PS, Shrivastav B, Sharma P. Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Res Rev J Pharm Nanotechnol* 2014;2:1–6.
- Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:1–13.
- Naser M, Rezvan Y, Hossein Z. A New Antigen Delivery Vehicle Candidate: Orthochirus iranus Scorpion Venom Entrapped in Chitosan Nanoparticles. *Br J Pharm Res* 2015;7:264–75.
- Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1650–62.
- K. Garg N, Mangal S, Khambete H, K. Sharma P, K. Tyagi R. Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2010;4:114.
- Borges O, Borchard G, Verhoef JC, De Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm* 2005;299:155–66.
- Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The good, the bad and the ugly" of chitosans. *Mar Drugs* 2016;14:99.
- Paques JP, Van Der Linden E, Van Rijn CJM, Sagis LMC. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;209:163–71.
- Garrait G, Beyssac E, Subirade M. Development of a novel drug delivery system: Chitosan nanoparticles entrapped in alginate microparticles. *J Microencapsul* 2014;31:363–72.
- Saraei F, Mohamadpour Dounighi N, Zolfagharian H, Moradi Bidhendi S, Khaki P, Inanlou F. Design and evaluate alginate nanoparticles as a protein delivery system. *Arch Razi Inst* 2013;68:139–46.
- Loquercio A, Castell-Perez E, Gomes C, Moreira RG. Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans-cinnamaldehyde Entrapment. *J Food Sci* 2015;80:N2305–15.
- Gazori T, Khoshayand MR, Azizi E, Yazdizade P, Nomani A, Haririan I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydr Polym* 2009;77:599–606.
- Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;68:513–25.
- Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:483-507.
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res* 2007;24:2198–206.
- Mirzaei F, Dounighi NM, Avadi MR, Rezayat M. A new approach to antivenom preparation using chitosan nanoparticles containing echiscarinatus venom as a novel antigen delivery system. *Iran J Pharm Res* 2017;16:858–67.
- Sarmiento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. *Int J Pept Res Ther* 2006;12:131–8.

19. Oudemans TFM, Boon JJ, Botto RE. FTIR and solid-state ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy of charred and non-charred solid organic residues preserved in roman iron age vessels from the Netherlands. *Archaeometry* 2007;49:571–294.
20. Zohuriaan MJ, Shokrolahi F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polym Test* 2004;23:575–9.
21. Hickey AR, Wenger TL, Carpenter VP, Tilson HH, Hlatky MA, Furberg CD, et al. Digoxin Immune Fab therapy in the management of digitalis intoxication: Safety and efficacy results of an observational surveillance study. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:590–8.
22. Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:1095–107.