جهت تهیه نانوسفر های حاوی انسولینPLGA-PEG-PLGAساخت پلیمر حساس به دمای

فرزین هادی زاده[۱] ، الهام خداوردی [۲]، محسن تفقدی [۳]، سمیرا بیضایی[۴]

۱- دانشیار ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- استادیار ، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- دانشیار، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴- دانشجوی داروسازی ، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده

در این مطالعه ابتدا کوپلیمرتری بلاک PLGA-PEG-PLGA به روشring-opening و در میکروویو تهیه شد وخصوصیات ان توسط طیف NMR وکروماتوگرافی نفوذ در ژل (GPC)تعیین گردید.سپس با استفاده از روش آبی و بدون استفاده از حلال آلی نانوسفرهای حاوی انسولین ازاین کوپلیمر تهیه گردید.اندازه نانوسفرها۲۳۰nm ودرصد بارگیری دارو در نانوسفرها ۲۰٪مشخص شد.الگوی رهش دارو از نانوسفرها به مدت ۳ هفته بررسی گردید.ابتدا یک ریلیز اولیه حدود ۳۰٪ مقدار داروی کل وجود داشت و سپس ریلیز یکنواخت و ادامه داری را در طول ۲۱ روز مشاهده شد.برای تعیین عدم تغییر در ساختار انسولین انسولین از معرف ANSاستفاده شد.ولی به دلیل تداخل پیک انسولین با پیک کویلیمر نتوانستیم این عدم تغییرساختار را تعیین کنیم.

کلمات کلیدی: کوپلیمر ، PLGA-PEG-PLGA ، انسولین، نانوسفر

مقدمه و هدف

سامانه های دارو رسانی سنتی ابزار خوبی برای دارورسانی بسیاری از داروها از جمله داروهای پروتئینی و هورمونی نمی باشد همچنین تزریق مکرر این داروها نیاز به یک سیستم اهسته رهش را مطرح می کند.از جمله ایده ال ترین سامانه هایی که تا کنون برای دارو های پپتیدی و پروتیئنی مورد توجه بوده اند پلیمر های تخریب پذیر مانند PLGA بوده است.میکروسفرهاو نانوسفرهای ساخته شده از این پلیمرکه با استفاده از روش های سنتی W/O/Wتهیه می شدند از حلال الی استفاده می شود وذرات تهیه شده دارای رهش اولیه بالایی هستند که دو عیب این روش است.در این مطالعه بر انیم با استفاده از کوپلیمر تری بلاک PLGA-PEG-PLGAنانوذراتی تهیه کنیم که فاقد این دو عیب باشند. یکی ازمهمترین پلی‌مرهای جدید قابل تزریق حساس به دما، کوپلی‌مر تری بلاک PLGA-PEG-PLGA می‌باشد که قابلیت زیست تخریب‌پذیری دارد.(Chen et al.,2005) این پلیمر بصورت کوپلیمر سه قطعه ای با پلی اتیلن گلایکول (PEG MW=1000)و نسبت لاکتاید:گلایکولاید(۳:۱)توسط زنتر در سال ۲۰۰۱ با نام تجاری (Regel) تهیه شد.(Zenteret al.2001) به دلیل وجود قطعه PEGو ابدوستی بیشتر کوپلیمر PLGA-PEG-PLGAتوزیع انسولین در نانوسفرها یکنواخت تر شده ورهش ناگهانی اولیه کاهش میابد. در مطالعه ای که توسط آقای

دکتر افشار و همکاران در تهران صورت گرفت، آزادسازی داروی کلسی تونین بارگیری شده بر روی سیستمهای ژل شونده در محل PLGA-PEG-PLGA بررسی شد و نشان داده شد که این سیستم قادر است به صورت طولانی اثر کلسی تونین را آزاد کند(Ghahremankhani et al. 2007) درمطالعه دیگری که توسط Kimو Kown بر روی میکرسفرهایPLGA-PEG-PLGA حاوی انسولین کریستالیزه شده با زینک با روش متد ابی انجام دادند شاهد یک ریلیز یکنواخت بدون هیچ ریلیز ناگهانی اولیه بودند.(Kim and Kown.2004)

روش کار

تهیه کو پلیمر: ابتدا ۶۰ گرم پلی‌اتیلن گلایکول را در دستگاه راکتور استیل خلأ ریخته و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در حمام روغن،تحت خلأ ۵ میلی‌متر جیوه،حرارت داده شد.

سپس ۱۱۳/۴۶ گرم دی، ال –لاکتاید و ۳۰/۴۸ گرم گلایکولاید (نسبت ۳به۱)توزین و به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه تحت خلأ در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

سپس۰/۰۴ گرم کاتالیزور قلع II به آن اضافه شد و حرارت دادن به مدت ۱۱ ساعت ادامه پیدا کرد. **تهیه نانوسفرها:** محلول ۱,۳۳میلیگرم از انسولین در بافر فسفات PH=7.4به ۱۰۰ میلیگرم از کوپلیمر اضافه شد و در دمای ۴ درجه ۱۲ ساعت انکوبه گردید تا پلیمر داخل سیستم حل شود(محلول ۶,۶٪ کو پلیمر). ۱/۵ سی‌سی محلول فوق که حاوی کوپلیمر ودارو بود ،داخل ml ۵۰ پارافین مایع سرد شده با دمای حدود ۴ درجه ریخته شد. ۱ سی سی از مخلوط اسپان و توئین(۱:۱) به آن اضافه گشت. محلول حاصل توسط هموژنایزر با دور ۳ به مدت ۱ دقیقه هم زده شد.سیستم در حالیکه با دور ۱۲۰۰rpm توسط مگنت هم زده می‌شد دمای محلول به ۳۸ درجه رسانده شد و مدتی در این دما ماند تا از تبدیل سل به ژل کوپلیمر اطمینان حاصل شود.

جمع آوری نانوسفرها:محتویات ظرف به داخل لوله‌های سانتریفوژ انتقال داده شد و با دور rpm ۱۹۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتریفوژ شده وسپس مایع روئی دور ریخته شد.مواد ته‌نشین شده را با اتردوپترول شستشو داده و سپس ۴۰ سی‌سی بافرفسفات ۳۷ درجه به آن اضافه گردید و هم‌زده شد تا نانوسفرها داخل آب پراکنده شوند. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دورrpm۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. به باقیمانده موجود در ظرف، ۲ سی‌سی بافر فسفات (۷/۴) اضافه گردید. سپس ۴۰ میلی‌گرم مانیتول به محلول اضافهو هم‌زده شد. سپس محلولهای حاصل به داخل ویال منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت فریزدرای شد.

آزادسازی دارو: مقداری از پودرفریز درای شده ، طوری که در آن mg۳۰ نانوسفر موجود باشد ، داخل میکروتیوپ ۱/۵ سی‌سی قرار گرفت و روی آن ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۷/۴ اضافه گردید و همزده شد. این عمل برای ۴ نمونه حاوی انسولین و ۴ نمونه خالی انجام گرفت و در کل ۸ نمونه جهت بررسی رهش استفاده شد. سپس این ۸ نمونه به طور افقی در دستگاه شیکر انکوباتور قرار گرفت و دمای آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و دور آن روی درجهٔ ۴ قرار گرفت.

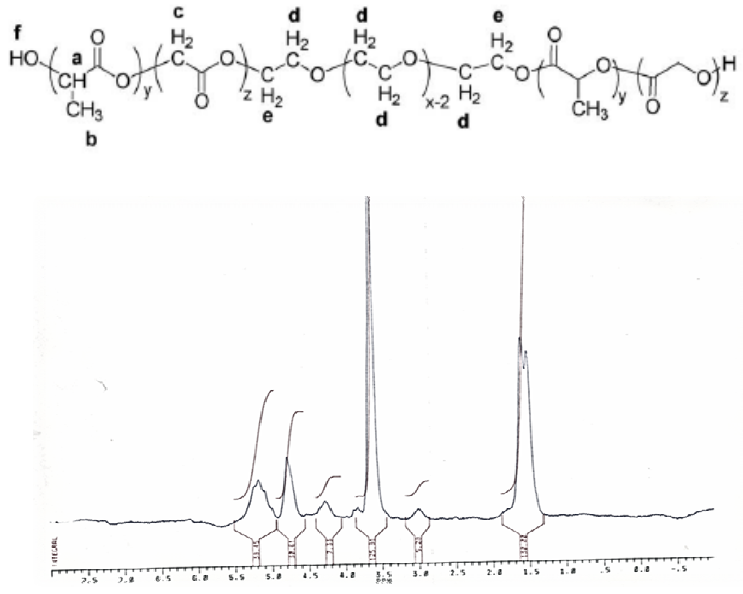
در ساعت‌های ۱، ۶، ۱۲، ۲۴،وسپس هر روز، به مدت ۳۱ روز نمونه‌گیری از هر تیوپ انجام گرفت.و با استفاده از دستگاه فلوریمتر شدت فلورسانس واز روی آن مقدار انسولین آزاد شده در هر زمان محاسبه شد.

تعیین عدم تغییر در ساختار انسولین با معرف ANS : در این روش غلظت ۱ میکرومولار انسولین اولیه و انسولین‌های رهش یافته از هیدروژل به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت محلول ۲ میکرومولار از معرف ANS قرار گرفتند و پس از این مدت طیف فلورسانس در طول موج λ_{ex} =۳۷۵nm و در محدوده λ_{em}=۴۰۰-۶۰۰nm گرفته شد. طیف فلورسانس انسولین در حضور ANS قبل و بعد از رهش از هیدروژل با هم مقایسه می‌شوند، هرگونه تغییر در شدت و طول موج نشر ANS می‌تواند ناشی از تغییر ساختمانی، که به نوبه خود حاصل تغییر ساختمان این مولکول است باشد.

نتایج

شناسایی کوپلیمر :طیف حاصل از1H NMR مربوط به کوپلیمر سنتز شده را در شکل ۱ مشاهده می کنید.بوسیله طیف، وزن مولکولی کوپلیمر ساخته شده و نسبت لاکتاید به گلی کولاید را می توان محاسبه نمود ، در این طیف: (a) CH لاکتاید (b) CH3 لاکتاید (c) CH2

گلایکولاید (d و e) CH2پلی اتیلن گلایکول و (f) OH گلایکولاید می باشد و این داده ها با نتایج GPC مقایسه گردید.



شکل۱- طیف H NMRکوپلی مر تری بلاک PLGA-PEG-PLGA: (a) CH لاکتاید (b) CH3 لاکتاید (c) CH2 گلایکولاید (d و e) CH2 پلی اتیلن گلایکول و (f) OH گلایکولاید

نسبت وزن مولکولی محاسبه شده با GPC به عدد مولکولی محاسبه شده با NMR برابر با ۱/۴۴ بود که نشان دهنده پلی دیسپرسیته مناسب بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه داده های GPC و NMR

کوپلیمر	NMR		GPC		
	Mn[a]	LA/GA[b]	Mn[c]	Mw[d]	Mw/Mn[e]
	۱۱۱۶- ۱۰۰۰- ۱۱۱۶	۲ /۹	۳۲۹۰/۳	۴۷۴۳/۷	۱/۴۴

a)عدد متوسط وزن مولکولی که توسط NMR تعیین شده است. b)نسبت مولی لاکتیک اسید به گلایکولاید که توسط NMR تعیین شده است. c)عدد متوسط وزن مولکولی که توسط GPC تعیین شده است.d) متوسط وزن مولکولی که توسط GPC تعیین شده است.e)Polydispersity که توسط GPC تعیین شده است

با استفاده از دستگاه پارتیکل اندازه انالایزر انداره نانوسفرها ۲۲۰ نانومتر تعیین شد . تصویر اندازه نانوسفرها: میکروسکوپ نوری این نانوسفرها در شکل ۲ نمایش داده شده است.

شکل ۲-تصویر نانوسفرهای حاوی انسولین با استفاده از میکروسکپ نوری (بزرگنمایی ۴۰۰)

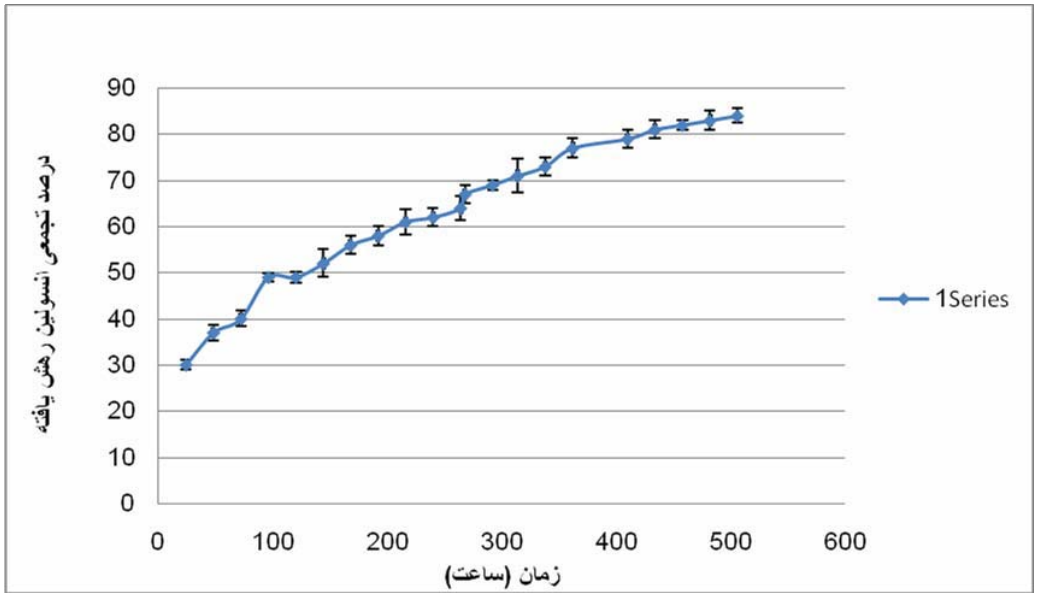
تعیین در صد انکپسولاسیون انسولین: برای این منظور با استفاده از روش براد فورد استفاده شد.جذب نمونه های حاوی انسولین ونمونه های بدون انسولین ،که توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت شده بود ،از هم کم شد. ومقدارانسولین انکپسوله شده در نمونه ها بدست **امد (جدول ۲)** .

جدول۲:درصد انکپسولاسیون انسولین

درصد انکپسولاسیون	مقدار انسولین اولیه	مقدار انکپسوله شده	تفاوت جذب نمونه های باوبدون انسولین	جذب نمونه فاقد انسولین	جذب نمونه حاوی انسولین
20%	2mg	0.4mg	0.256	1.039	1.295

روند آزادسازی انسولین

نمونه های گرفته شده برای تعیین مقدار انسولین رهش یافته در هر زمان ، با خواندن جذب هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر در طول موج λ_{ex}=280nm وλ_{em}=303nm و با استفاده از نمودار استاندارد جذب در برابر غلظت انسولین ، تعین غلظت شدند و درصد تجمعی داروی ازاد شده محاسبه شد و در یک نمودار رسم گردید(شکل ۳).



شکل ۳ :نمودار درصد تجمعی انسولین ازاد شده در برابر زمان (ساعت)

بحث و نتیجه گیری:

نتایج حاصل از NMRو GPCمولکولی بدست امده از این دوروشnmr(۳۲۳۲)و GPC(۳۲۹۰) به هم نزدیک می باشد ونسبت لاکتاید/گلایکولاید هم (۲,۹)نزدیک به نسبت واقعی ۳میباشد. اندازه نانوسفرهای ساخته شده حدود ۲۳۰nmمیباشد و به طور مطلوبی جزذرات با اندازه نانوسفر قرار می گیرد.درصد انکپسولاسیون ۲۰٪ بدست امد . روند آزاد سازی دارو از یک روند پیوسته و کاملی در طول ۳ هفته پیروی میکند.منتها در روز اول شاهد یک ریلیز ناگهانی اولیه در حدود ۳۰٪مقدار کل انسولین لود شده بودیم که ناشی از داروی بر سطح قرار گرفته است.علت انست که انسولین در بافرفسفات ۷,۴ محلول می باشد.هنگام تبدیل سل به ژل نانوسفرها اندکی منقبض می شوند و باعث خروج اب سیستم می شود که داروی محلول در اب بر سطح قرار می گیرد.رهش ادامه دار دارو نتیجه انتشار دارو از خلال ماتریکس پلیمری ونیز تخریب پلیمر میباشد.در پایان ۳ هفته بیش از ۸۵٪ دارو ازاد شده است. در نتیجه می توان سیستم های اهسته رهش از این کوپلیمر تهیه نمود .به دلیل زیست تخریب پذیر بودن لاشه کوپلیمر نیاز به بیرون اوردن ندارد. تعیین ساختار انسولین به دلیل باقی ماندن برخی ذرات در نمونه علی رغم سانتریفوژ با دور بالا و چسبیدن این ذرات به معرف ANSوایجاد یک پیک تداخلی امکان پذیر نبود.

منابع:

Zentner GM, Rathi R, Shih C, McRea JC, Seo MH, Oh, H, Rhee BG, Mestecky J, Moldoveanu Z, Morgan M Weitman S. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. J. Control. Release2001;72(1–3):203–215.

Ghahremankhani AA, Dorkoosh F, Dinarvand R. PLGAPEG PLGA tri-block copolymers as an in-situ gel forming system for calcitonin delivery. Polym. Bull. 2007;59(5): 637–646.

Chen S, Pieper R, Webster DC, Singh J. Triblock copolymers Synthesis, characterization, and delivery of a model protein. Int. J. Pharm. 2005;288(2):207–218:

Kim S, biodegradabletriblock copolymer microspheres based on thermosensitive sol-gel transition,pharmaceuticalresearch,vol 21,no.2,2004.

,