

بررسی سینتیکی رهایش دارو در سیستم های نانو دارورسان با استفاده از روش مدل

سازی سخت چند متغیره

بهناز عبدوس^۱، سیده مریم سجادی^{۱*}، لیلا مأمی^۲

^۱ دانشکده شیمی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

^۲ بخش نانوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۲۴

تاریخ تصحیح: ۹۴/۰۳/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۱۷

چکیده:

رهایش دارو از نانو دارورسان، تعیین کننده ی اصلی اثر بیولوژیکی آن است. در نتیجه، ارزیابی سینتیک این فرایند از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در مطالعه حاضر، رهایش داروی کورکومین (این به عنوان داروی هدف انتخاب می شود) از نانو دارورسان سیلیکا با تکنیک FT-IR مانیتور می شود. در زمان های مختلف داده های چند متغیره IR ثبت می گردد که این داده با استفاده از روش کمومتریکسی چند متغیره مدل سازی سخت آنالیز می گردد. در این روش پیشنهادی، ثابت سرعت سینتیک رهایش دارو بدون داشتن غلظت اولیه دارو تعیین می گردد، به علاوه با انحراف استاندارد ثابت سرعت محاسبه می گردد.

واژگان کلیدی: سیستم های نانو دارو رسان، ثابت سرعت، کورکومین، روش مدل سازی سخت چند متغیره

۱- مقدمه

در دهه های اخیر، پیشرفت های مهم در ساخت دارو برای انواعی از بیماری ها، موجب پیشرفت در فهم خواص فیزیکوشیمیایی مولکول های دارو و پیشرفت در تشخیص مکانیسم های جذب سلولی که به استراتژی های درمانی وسیع و موثری منجر می شود، شده است. سیستم دارورسانی هدفمند قابلیت حمل دوزهای موثری از دارو به سلول های بافت هدف را داراست. موفقیت این دستاورد به توانایی در ساخت حامل های زیست سازگار بستگی دارد که اجازه بارگیری زیاد مولکول های دارو بدون رهاسازی زود هنگام محموله بارگیری شده قبل از رسیدن به مقصد، را می دهد. یکی از ویژگی های موثری که می توانند به عنوان سیستم های انتقال دارو به کار روند این است که بایستی زیست سازگار باشند.

ماده سیلیکا با ساختار و خصوصیات سطحی مشخص، به عنوان ترکیب زیست سازگار شناخته شده است. سیلیکا نانو ذره ای معدنی است که اغلب در موارد بیولوژیکی استفاده می شود. برای کنترل فرایند آزادسازی، سیلیکا قادر به ذخیره و آزادسازی تدریجی داروهایی مثل آنتی بیوتیک ها است [۱].

رهایش دارو از نانو ذرات دارویی، تعیین کننده ی اصلی اثر بیولوژیکی آن است. در نتیجه، ارزیابی سینتیک رهایش دارو از اهمیت ویژه ای در این زمینه برخوردار است. استفاده از مدل های سینتیکی اغلب در توضیح مکانیسم انتشار، مفید است که به نوبه خود می تواند در کنترل رهایش دارو مورد استفاده قرار گیرد. یکی دیگر از مزایای سینتیک، نشان دادن چندین اطلاعات رهایش با یک یا دو پارامتر می باشد. علاوه بر این یک پارامتر سینتیکی می تواند برای مطالعه اثرات فاکتورهای فرمولاسیون روی رهایش دارو برای بهینه سازی و همچنین کنترل رهایش استفاده شود [۲ و ۳].

در این مطالعه، هدف تعیین ثابت سرعت سینتیک رهایش دارو با استفاده از تکنیک FT-IR و روش کمومتریکسی مدل سازی سخت چند متغیره (Multivariate Hard Modelling Method) می باشد [۴]. از نانو ذره سیلیکا به عنوان حامل و کورکومین به عنوان داروی هدف استفاده شد. در اینجا توانمند بودن روش کمومتریکسی به کار برده شده در آنالیز داده چند متغیره IR نشان داده خواهد شد. بر اساس دانش ما تا کنون گزارشی در باره تعیین ثابت سینتیک در سیستم نانودارورسانی به روش چند متغیره پاسخ وجود ندارد. در این روش علاوه بر ثابت سرعت انحراف استاندارد آن نیز محاسبه می گردد.

۲- روش کار و دستگاه

برای بارگذاری کورکومین به سطح عاملدار منافذ نانو حامل مزو متخلخل سیلیکا، ۲.۲۳ گرم کورکومین را در استون حل و قطره قطره به ۱ گرم از نانو حامل اضافه کرده و به مدت ۴۳ ساعت تحت اتمسفر بی اثر نگه داشته می شود. در نهایت، جامد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شود. سپس، جامد جمع آوری شده، کاملاً با ۳۰ میلی لیتر اتانول شسته شده و سپس تحت خلا خشک شده تا کورکومین بارگذاری شده بدست آید.

به منظور ارزیابی کارایی کورکومین بارگذاری شده، محلول های شستشو جمع آوری شده و محتوای کورکومین باقی مانده با استفاده از اشعه ماوراء بنفش اندازه گیری می شود. محتوای بارگذاری (LC%) و کارایی بارگذاری (LE%) کورکومین را می توان به شرح زیر محاسبه کرد:

$$\text{CUR loading content (\%)} = \frac{\text{Weight of SF in MSN}}{\text{Weight of MSN}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{CUR loading efficiency (\%)} = \frac{\text{Weight of SF in MSN}}{\text{Weight of Free SF}} \times 100 \quad (2)$$

پروفایل آزمایشگاهی رهایش دارو بدین صورت بدست خواهد آمد: ۰.۰۵ گرم از کورکومین بارگذاری شده در یک کیسه دیالیز ریخته شد و در ۵۰۰ میلی لیتر مول بافر pH=۱.۲ قرار داده شد. آزمون رهایش در ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از حمام آب مرتعش، انجام شد. نمونه برداری در ۱۰، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت انجام شد و در هر زمان طیف FT-IR با استفاده از دستگاه تنسور ۲۵ (کمپانی بروکر، آلمان) ثبت گردید.

۳- تئوری

۳-۱- آنالیز داده‌های حاصل از فرایندهای سینتیکی

در مطالعات سینتیک برای آنالیز داده‌ها در دو راه اساسا متفاوت برای استخراج اطلاعات وجود دارد:

۱- آنالیز بر پایه مدل (مدل‌سازی سخت)

۲- آنالیز بدون مدل (مدل‌سازی نرم)

در مدل‌سازی نرم بدون هیچ فرضی درباره مدل گونه‌ها در سیستم مورد مطالعه و با فرض‌های عمومی نظیر غیر منفی بودن پروفایل‌ها و ... داده مورد بررسی به پروفایل‌های خالص اجزاء تفکیک می‌شود. از مزایای این روش عدم نیاز به داشتن اطلاعات درباره داده‌ها می‌باشد. به عنوان مثال در یک فرایند سینتیکی نیازی به دانستن مدل سینتیکی نمی‌باشد. اما اشکال این روش این است که جواب منحصر به فرد برای پروفایل‌های تفکیک شده به دست نمی‌آید بلکه یک ناحیه جواب تعیین می‌گردد که به اصلاح دارای ابهام چرخشی (Rotational Ambiguity) می‌باشد.

۳-۱-۱- مدل‌سازی سخت چند متغیره

داده‌های سینتیکی و تعادلی معمولاً به‌طور کمی توسط یک مدل شیمیایی توصیف می‌شوند. مدل شیمیایی در اینجا به معنی یک تابع ریاضی است که به عنوان مثال، برای واکنش سینتیکی، مدل درجه اول یا درجه دوم می‌باشد و به‌طور کمی به وسیله یک یا چند پارامتر توصیف می‌شود.

در مدل‌سازی سخت، هدف به‌دست آوردن پارامترهای اساسی فرایند است که این پارامترها ثابت سرعت در مطالعات سینتیکی و ثابت تعادل در بررسی‌های تعادلی می‌باشند. این ثابت‌ها بسیار با ارزش هستند چون با استفاده از اینها می‌توان رفتار شیمیایی یک سیستم را تحت شرایط متفاوت پیشبینی کرد و سیستم‌های متفاوت را با هم مقایسه کرد. به همین دلیل گزارشات زیادی درباره تعیین آنها وجود دارد. در مدل‌سازی سخت علاوه بر تعیین پارامترها، بسته به ماهیت داده‌ها می‌توان

اطلاعات اضافی از سیستم به دست آورد برای مثال اگر طیف جذبی در طول فرایند به دست آید، امکان تعیین طیف جذب مولی برای همه گونه های واکنش دهنده وجود دارد.

در مدل سازی سخت، بهترین مجموعه از پارامترها برای یک مدل ویژه و یک داده ویژه تعیین می شود. به عبارت دیگر پارامتر(ها) به داده(های) اندازه گیری شده برازش می شوند. ایده برازش داده ها این است که داده محاسبه شده ای پیدا کند، D_{calc} ، که تا آنجا که ممکن است به داده واقعی نزدیک باشد. این داده های محاسبه شده به وسیله مدل و مجموعه ای از پارامترها تعیین می شوند. تفاوت بین داده های اندازه گیری شده (D_{meas}) و داده های محاسبه شده، باقیمانده، E نامیده می شود:

$$D_{meas} = D_{calc}(\text{Model}, \text{Parameters}) + E \quad (3)$$

به طور کلی، برازش داده ها به عمل تعیین پارامترهایی برای یک مدل خاص گفته می شود که به ازای آن پارامترها، داده های محاسبه شده تا آنجا که ممکن است به مقادیر اندازه گیری شده نزدیک باشد. گزینه های مختلفی برای تعیین کیفیت برازش وجود دارد. یکی از بهترین گزینه ها مجموع مربع باقیمانده ها می باشد.

$$ssq = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J e_{ij}^2 \quad (4)$$

ترکیب کردن معادلات (۱-۵) و (۱-۶) به وضوح نشان می دهد که ssq یک تابعی از پارامترها، مدل و البته خود داده ها است.

$$ssq = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J e_{ij}^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (d_{ij,meas} - d_{ij,calc})^2 = f(\text{model}, \text{parameters}) \quad (5)$$

پارامترهایی که مدل شیمیایی را توصیف می کنند معمولاً غیر خطی هستند ولی پارامترهایی که غلظت ها را به داده های اندازه گیری شده ارتباط می دهند عموماً خطی می باشند. در مورد اندازه گیری های جذبی چند متغیره، این پارامترها ماتریس Y هستند، که شامل جذب های مولی می باشند و همان طور که در معادله زیر نشان داده شده است:

$$D_{calc} = X(\text{Parameters})Y^T + E \quad (6)$$

پارامترهای خطی می توانند به یک معادله دقیق برازش شوند، که هیچ فرآیند تکرار شونده ای (Iterative process) مورد نیاز نیست، در حالی که پارامترهای غیرخطی به یک الگوریتم تکرار شونده احتیاج دارند که با حدس های اولیه شروع می شود، و در یک تعداد تکرار، و زمان معقول به سمت حل بهینه همگرا می شود.

به طور کلی هسته اصلی در برازش داده، محاسبه پروفایل غلظتی همه گونه های واکنش کننده می باشد که با استفاده از پارامترهای غیرخطی و مدل شیمیایی محاسبه می شوند و سپس پارامترهای خطی با انجام حداقل مربعات طبق معادله (۸) به دست می آیند.

این باعث می‌شود که SSQ فقط به عنوان تابعی از پارامترهای غیرخطی محاسبه شود یعنی پارامترهای خطی به صورت موثری حذف می‌شوند.

$$\mathbf{X} = f(\text{model}, \text{parameters}) \quad (7)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}^+ \mathbf{D}_{meas} \quad (8)$$

$$\mathbf{E} = \mathbf{D}_{meas} - \mathbf{X}\mathbf{Y}^T = \mathbf{D}_{meas} - \mathbf{X}\mathbf{X}^+ \mathbf{D}_{meas} \quad (9)$$

$$ssq = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J e_{ij}^2 = f(\text{Model}, \text{Parameters}) \quad (10)$$

بدین ترتیب پارامترهای غیرخطی بهینه، محاسبه می‌شوند.

مزیت‌های روش سخت این است که فقط تعداد کمی پارامتر بهینه می‌شود و جواب‌های منحصر به فرد به دست می‌آید. اما در این روش مدل همه گونه‌ها باید شناخته شده باشد. یعنی با استفاده از این روش نمی‌توان داده‌هایی را که شامل اجزاء ناشناخته یا اجزائی نظیر کاهش پیش‌زمینه که هیچ مدل شیمیایی برای توصیف آن وجود ندارد، به کار برده شود.

۴- بحث و نتایج

۴-۱- مکانیسم رهایش دارو

مکانیسم‌های متعددی برای سرعت رهایش دارو گزارش شده است که سینتیک مرتبه اول یکی از مدل‌های پیشنهادی متداول می‌باشد. در سیستم نانودارورسانی مطالعه شده در این کار، در مرحله بارگذاری، داروی کورکومین با نانوذره مزوپروس سیلیکای عامدار شده کمپلکس می‌دهد [۵] و در هنگام رهایش دارو، این کمپلکس با ثابت سرعت مشخصی به مواد اولیه یعنی دارو و نانوذره تبدیل می‌گردد. پروفایل غلظتی محصولات بر اساس مدل مرتبه اول بدین صورت تعریف می‌گردد:

$$C_{\text{complex}} = c_0 e^{-kt} \quad (11)$$

$$C_{\text{drug}} = c_0 (1 - e^{-kt}) \quad (12)$$

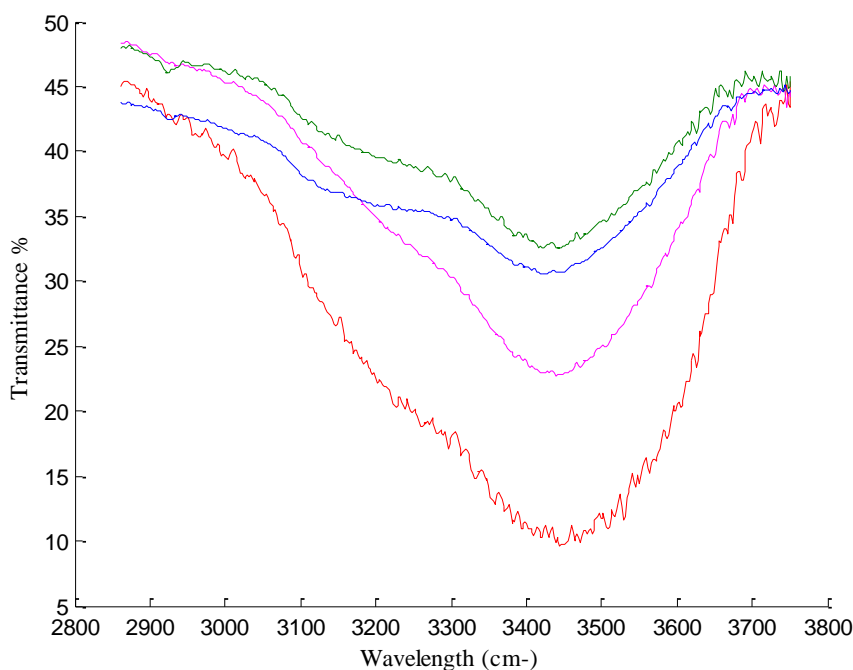
در اینجا k و c_0 به ترتیب ثابت سرعت و غلظت اولیه داروی بارگذاری شده بر روی نانوذره می‌باشند.

همانطور که در بخش تئوری توضیح داده شد در روش مدل سازی سخت پارامترهای خطی در طی بهینه سازی حذف می‌شود، بنابراین در مدل سینتیکی درجه اول که برای رهایش دارو در نظر گرفته شد غلظت اولیه یک پارامتر خطی است و میتواند بهینه سازی آن در فرایند مدل سازی حذف شود. لذا در معادلات بالا مقدار غلظت اولیه یک در نظر گرفته می‌شود. با تعیین ثابت سرعت پروفایل نرمال شده غلظتی اجزاء به دست می‌آید.

۴-۲- ماتریس داده و پردازش اولیه داده

در بررسی رهایش دارو در چهار زمان داده FT-IR ثبت گردید که در شکل ۱ نشان داده شده است. به منظور پردازش و آنالیز داده توسط نرم افزار Matlab ابتدا طیف های مربوط به زمان های مختلف در یک ماتریس با ابعاد (۴×۴۶۲) مرتب شدند که ۴ تعداد زمان و ۴۶۲ تعداد طول موج می باشند.

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود طیف های IR نویزی هستند و نیاز به هموار شدن (Smoothing) دارند. برای داده ای نویزی روش های مختلف کاهش نویز نظیر ساویتسکی گلی (Savitzky-golay) [۶]، کالمن فیلترینگ (Kalman Filtering) [۷] و میانگین متحرک (Moving average) [۸] وجود دارد که در این کار از میانگین متحرک استفاده شد.

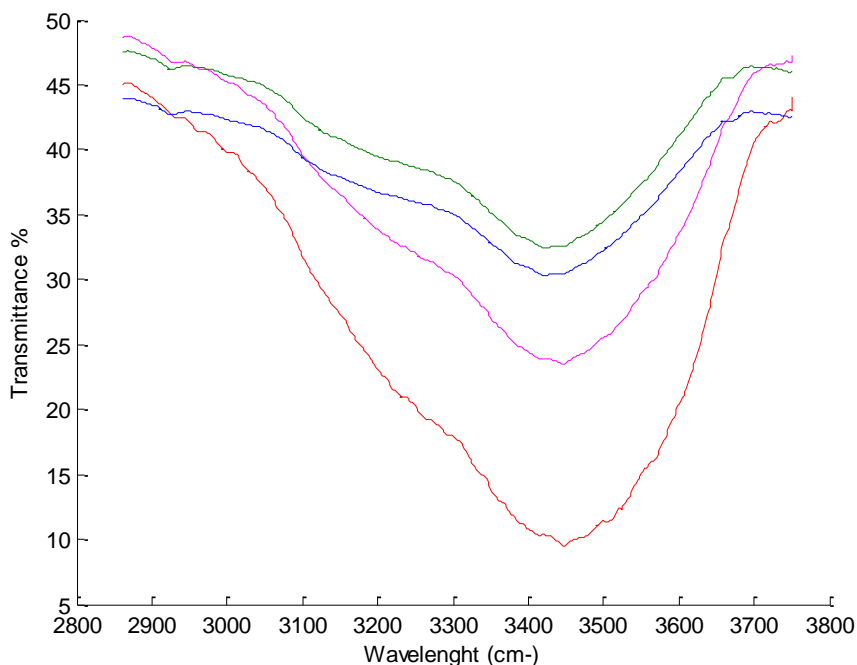


شکل ۱. داده های FT-IR در زمانهای مختلف رهایش دارو

۴-۲-۱- روش میانگین متحرک

در این روش یک پنجره با تعداد فرد داده انتخاب می شود. میانگین داده در این پنجره محاسبه می گردد جایگزین نقطه مرکزی پنجره می شود. این پنجره در طول داده ها یکی یکی شیفست می کند و در هر شیفست میانگین گیری و جایگزین مرکز

شده تکرار می شود که این فرایند عدم یکنواختی موجود در داده ها را از بین می رود. کاهش نویز داده های IR با تکنیک میانگین متحرک در شکل ۲ نشان داده شده است که در اینجا پنجره شامل ۹ نقطه می باشد.

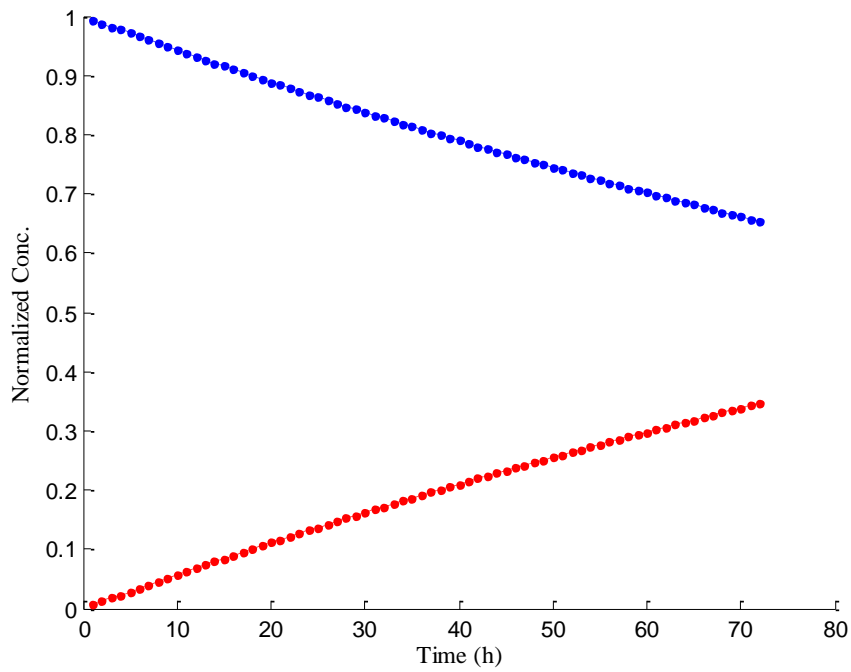


شکل ۲. داده های هموار شده FT-IR در زمانهای مختلف رهایش دارو

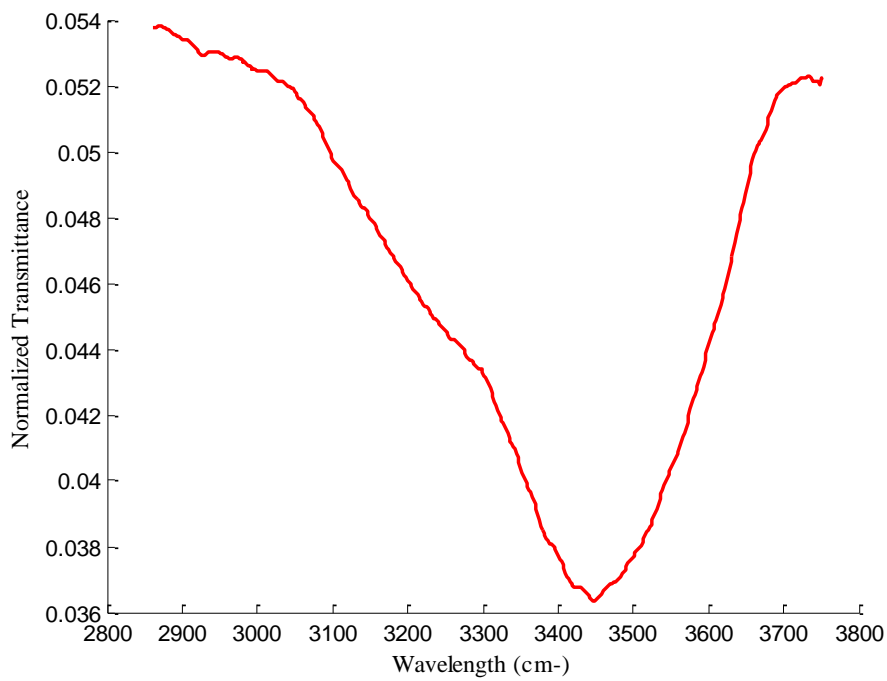
۴-۳- آنالیز داده های هموار شده توسط روش مدل سازی سخت چند متغیره

بر اساس تحقیق انجام شده توسط مامنی و همکارانش [۵]، در ناحیه $3700-3000 \text{ cm}^{-1}$ طیف مربوط به کمپلکس نانودارورسان و کورکومین با هم همپوشانی دارند که چون فقط از کیسه دیالیز کورکومین خارج می شود طیف های مشاهده شده مربوط به دارو می باشد. از آنجا که داده ها دارای نویز زیادی می باشد ابتدا هموار شده (شکل ۲) و سپس با روش مدلسازی سخت آنالیز شد. در فرایند برازش از تکنیک نیوتون گوس لونبرگ مارکوارد (NG-LM) استفاده شد. پروفایل غلظتی نانوذره و داروی رها شده در شکل ۳، و پروفایل طیفی خالص مربوط به دارو در شکل ۴ نشان داده شده اند.

ثابت سینتیک محاسبه شده $0.0059(h^{-1})$ با انحراف استاندارد 2.5×10^{-5} می باشد.



شکل ۳. پروفایل غلظتی مربوط به کورومین (رنگ قرمز) و کمپکس دارو-نانوسیلیکا (رنگ آبی) در سیستم رهایش دارو



شکل ۴. پروفایل طیفی مربوط کورومین در سیستم رهایش دارو

۵- نتیجه گیری

در این تحقیق، سینتیک رهایش دارو در سیستم نادرورسان مورد بررسی قرار گرفت. داروی کورکومین به عنوان داروی هدف در نظر گرفته شد و رهایش آن از نانوسیلیکا که حامل دارو بود در فواصل زمانی مختلف با تکنیک FT-IR مانیتور شد. داده های جمع آوری شده نویزی بودند که با استفاده از روش میانگین متحرک طیف ها هموار گردید. از تکنیک چند متغییره مدل سازی سخت برای آنالیز داده جهت تعیین ثابت سرعت رهایش دارو استفاده شد. بر اساس مدل درجه اول ثابت سینتیک (h^{-1}) 5.9×10^{-5} با انحراف استاندارد (h^{-1}) 2.5×10^{-5} به دست آمد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های مالی دانشگاه سمنان برای انجام پروژه تشکر و قدردانی می نمایند.

۶- مراجع

- [1] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60** (2008) 1278-1288.
- [2] M. Barzegar-Jalali, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **11** (2008) 167-177.
- [3] T. Gafourian, A. Safari, K. Adibkia, F. Parviz, A. Nokhodchi, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96** (2007) 3334-3351.
- [4] M. Maeder, A. D. Zuberbu'hler, *Anal. Chem.* **62** (1990) 2220.
- [5] L. Ma'mani, S. Nikzad, H. Kheiri-manjili, S. al-Musawi, M. Saedi, S. Askarlou, A. Foroumadi, A. Shafiee, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **83** (2014) 646-654.
- [6] S. M. Wolfrum and N. J. A. Van Veen, *Journal of Chemometrics*, **2** (1988) 203-209.
- [7] H. C. Smit, *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, **90** (1985) 441-450.
- [8] P. Gemperline, *Practical Guide to Chemometrics*, 2006, Second Edition.