نانومقیاس
سال دوم | شماره‌ی اول | بهار ۱۳۹۴
www.nanomeghyas.ir

بررسی عوامل موثر بر اندازه نانو ذرات پروتئینی/پلیمری با استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی

هادی بهاری‌فر | امیر امانی*

گروه نانو فناوری پزشکی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

چکیده

یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث می‌شود یک ماده به محدوده نانوفناوری وارد شود کاهش اندازه آن است. کاهش اندازه در مقیاس نانومتری باعث بروز خواص و رفتارهای جدیدی در مواد خواهد شد که شناسایی و کنترل این خواص یکی از مهم‌ترین اهداف نانوفناوری است. هنگامی که یک نانو ذره وارد سیستم گردش خون انسان می‌شود اندازه آن می‌تواند بر عوامل مختلفی مانند زمان ماندگاری ذره در خون، قابلیت تحریک سیستم ایمنی بدن، سرعت حذف توسط سیستم رتیکولواندوتلیال و میزان سمیت موثر باشد. بنابراین شناسایی عوامل موثر بر اندازه نانوذرات و نحوه ارتباط این عوامل با اندازه می‌تواند اطلاعات مفیدی را در جهت طراحی سیستم های مبتنی بر نانو ذرات قابل استفاده در شرایط درون تن در اختیار محققان قرار دهد. در این مطالعه ابتدا نانوذرات آلبومین/ کیتوزان به عنوان مدلی از نانوذرات پروتئینی/ پلیمری با روش خود تجمعی ساخته شدند و سپس تاثیر عوامل مختلف شامل غلظت کیتوزان، pH و زمان واکنش (متغیر های مستقل) بر روی اندازه (متغیر وابسته) نانو ذرات ساخته شده بررسی شد. جهت مطالعه رابطه بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته از روش مدل سازی بوسیله شبکه های عصبی مصنوعی استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد غلظت مواد اولیه مهم‌ترین عامل موثر بر اندازه بوده و دارای رابطه مستقیم با آن می‌باشد. همچنین افزایش pH باعث کاهش و افزایش زمان واکنش باعث افزایش اندک اندازه ذرات می‌شوند. بنابراین برای طراحی و آماده سازی نانوذرات پلیمری پر شده با پروتئین در اندازه‌های دلخواه باید غلظت پلیمر، pH و زمان واکنش را در محدوده‌های معین تنظیم کرد.

واژگان کلیدی: آلبومین، اندازه، شبکه های عصبی مصنوعی، کیتوزان

۱. مقدمه

پلیمرکیتوزان یکی از بهترین پلیمرها برای استفاده به عنوان حامل، جهت انتقال داروها و پروتئین‌ها می‌باشد. این پلیمر پلی ساکاریدی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری می‌باشد به علاوه خواص ضد باکتری هم دارد. از این پلیمر برای رهش داروها و پروتئین‌های زیادی در داخل و خارج از بدن استفاده شده است. نانو ذرات کیتوزان به روش های مختلفی ساخته می‌شود. یکی از ساده ترین روش‌ها برای ساختن نانوذرات کیتوزان روش خود تجمعی می‌باشد که در آن نانوذرات با استفاده از پیوند های غیر کوالان بین کیتوزان و پروتئین مورد نظرساخته می‌شوند [۱، ۲].

یکی از مهم‌ترین موارد استفاده از نانو ذرات، کاربرد آن‌ها برای مقاصد تشخیصی، درمانی و تحقیقاتی در شرایط درون تن می باشد. در هنگام ورود نانو ذرات به سیستم گردش خون، خواص فیزیکی مانند اندازه، شکل و بار سطحی اهمیت زیادی در مشخص کردن سرنوشت ذرات خواهند داشت. خواص فیزیکی بر روی عوامل مختلفی شامل قابلیت فعال سازی سیستم ایمنی بدن، نیمه عمر ماندگاری در سیستم گردش خون، پتانسیل سمیت، قابلیت خروج از عروق خونی و سازگاری خونی ذرات دارد. اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین عوامل در مشخص کردن کیفیت سیستم های رهش دارو می‌باشد زیرا پراکندگی در بدن، کارایی، کلیرانس و فارماکودینامیک دارو توسط اندازه ذرات متاثر می‌شوند. به طور کلی اندازه ذرات باید در حد معینی باشد تا بتواند سیستم مناسبی جهت رهش دارو باشد [۳]. همچنین نشان داده شده است خواص فیزیکی نانوذرات مانند اندازه آن‌ها نقش مهمی در سازگاری سلولی و خونی دارند [۴ و ۵]. Dash و همکارانش نشان دادند اندازه نانوذرات کیتوزان یکی از مهم‌ترین فاکتورها در همولیز، فعال سازی پلاکت‌ها، زمان پاک شدن پلاسما

Archive
www.SID.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۰ | تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۵

* ایمیل مسئول مکاتبات: aamani@tums.ac.ir

از نانوذرات، سازگاری سلولی و قابلیت ورود به سلول می‌باشد [۶]. اندازه نانوذرات به ساختار، طبیعت مواد مورد استفاده و همچنین روش مورد استفاده برای سنتز آن‌ها وابسته می‌باشد [۷].

مطالعات بسیاری بر روی ساخت نانوذرات کیتوزان به عنوان یک حامل معمول برای رهش پروتئین‌ها و پپتیدها و عوامل موثر بر روی آن‌ها وجود دارد. تاثیر متغیرهای ساخت مانند غلظت پروتئین و کیتوزان، pH محلول، سرعت و دمای واکنش به عنوان یک مطالعه (یک متغیر در زمان) بر روی اندازه و بارگیری نانوذرات حاوی هپارین که بوسیله روش ژلاسیون یونی ساخته شده‌اند بررسی شده است [۹-۸]. نانوذرات کیتوزان و انسولین با روش‌های مختلف ساخته شده، سپس متغیرهای موثر بر ساخت مانند غلظت کیتوزان، pH محلول و غلظت انسولین بر روی اندازه و کارایی بارگیری ارزیابی شده است [۱۱-۱۰]. بررسی مطالعات گذشته نشان می‌دهد تاکنون تاثیر عوامل مختلف بر روی نانوذارت ساخته شده به روش خود تجمعی بررسی نشده‌اند [۱۱-۸]. همچنین در مطالعات قبلی تاثیر عوامل موثر بر روی متغیرهای وابسته به صورت کلی بررسی شده‌اند و تاثیر هر متغیر مستقل به تنهایی و با جزئیات بررسی نشده است. از طرف دیگر همان‌طور که در قسمت های قبلی اشاره شد مطالعات انجام شده بر روی تعیین رابطه بین متغیرهای مستقل و وابسته معمولا به صورت یک فاکتور در زمان می باشند [۹-۸]. به این معنی که در هر مطالعه فقط تاثیر یک متغیر مستقل بر روی یک متغیر وابسته بررسی شده و تاثیر مابقی متغیرهای مستقل در نظر گرفته نمی‌شود. در صورتیکه هنگام ساخت نانو ذرات همه متغیر های مستقل به صورت همزمان بر روی متغیرهای وابسته تاثیر می‌گذارند و ممکن است گاهی باعث تقویت اثر یکدیگر و گاهی باعث خنثی نمودن اثر همدیگر بشوند.

از این رو در این مطالعه تاثیر متغیرهای مستقل شامل غلظت کیتوزان، pH محلول و زمان واکنش به صورت همزمان بر روی متغیر وابسته (اندازه) نانو ذرات آلبومین/ کیتوزان ساخته شده به روش خود تجمعی بررسی شده است. مطالعه همزمان متغیرها باعث می‌شود اطلاعات کامل تری از نحوه تاثیر عوامل مختلف بر روی متغیر وابسته بدست آید. هدف از این مطالعه مشخص کردن ارتباط بین عوامل موثر جهت تهیه نانو ذرات در اندازه دلخواه می‌باشد. آلبومین می‌تواند به عنوان مدلی برای مشخص کردن فاکتورهای موثر بر روی اندازه نانوذرات کیتوزان/ پروتئین باشد.

۲. روش تجربی

کیتوزان با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتن و درجه داستیلاسون ۸۵ درصد از کمپانی سیگما و باقی مواد شیمیایی از شرکت مرک خریداری شده و بدون خالص سازی بیش‌تر استفاده شدند. در این مطالعه ۳۰ نمونه از نانو ذرات تهیه شدند. این ذرات حاوی غلظت های مختلفی از کیتوزان (۰/۵ mg/ml تا ۲/۰) در ۱ درصد اسید استیک وزنی حجمی بودند و pH آن‌ها بین ۴/۵ تا ۶/۰ متغیر بود. برای اندازه‌گیری اندازه‌ی نانو ذرات از زتا سایزر مدل Malvern ساخت کشور انگلیس استفاده شد. تمام نمونه ها بدون هیچگونه رقیق کردن و به صورت سه تایی تعیین مشخصه شدند.

۱.۲. ساخت نانوذرات آلبومین/ کیتوزان

برای ساختن نانوذرات از سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همزن در زمانهای مختلف بین نیم تا دو ساعت استفاده شد. در تهیه نانو ذرات ابتدا نمونه پلیمر با غلظت و pH مورد نظر تهیه شده و سپس آلبومین با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر توسط بورت به صورت قطره قطره به محلول پلیمر در حال چرخش اضافه می‌شد.

۲.۲. مدلسازی به روش شبکه‌های عصبی مصنوعی

شبکه های عصبی مصنوعی یکی از مدل‌های کامپیوتری هستند که با الهام از سیستم اعصاب پستانداران طراحی شده‌اند و به طور معمول برای پیدا کردن ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیرهای وابسته مخصوصا در شرایطی که این ارتباط ها خطی نیستند از آن‌ها استفاده می‌شود. یکی از نرم افزارهای تجاری برای این کار نرم افزار INForm می‌باشد. نتایج خروجی از این نرم افزار را می‌توان با گراف‌های ۳ بعدی نشان داد که این گراف‌ها در حقیقت رابطه بین متغیرهای مستقل و وابسته را نشان می‌دهند. در این گراف‌ها تاثیر دو متغیر مستقل به طور همزمان بر روی یک متغیر وابسته نشان داده می‌شود. اطلاعات ورودی نرم افزار شامل سه متغیر مستقل یعنی غلظت کیتوزان، pH و زمان واکنش و متغیر وابسته اندازه نانو ذرات بود. ۳۰ نمونه نانوذره ساخته شده برای انجام مدلسازی به صورت تصادفی به سه دسته شامل یک گروه برای انجام مدل سازی به نام گروه آموزش حاوی ۲۱ داده، یک گروه برای تست مدل بدست آمده حاوی ۲ داده و یک گروه برای اعتبار سنجی نتایج مدل سازی حاوی ۷ داده تقسیم بندی شدند. ضریب تاثیر این سه گروه توسط نرم افزار محاسبه می‌شود و نتایجی که در آن هر سه این مقادیر به طور هم زمان به

Archive of SID

www.SID.ir

عدد ۱ نزدیک باشند به عنوان مدل مناسب انتخاب می‌شود. نوع آزمون و جزئیات آن‌ها در مدل سازی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. عوامل مشخص شده در جدول قبلا در مطالعات دیگر توضیح داده و بحث شده اند [۱۲].

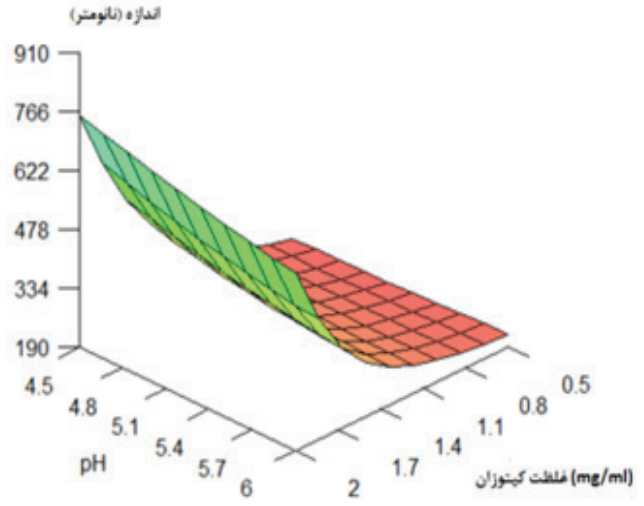
جدول ۱ نوع آزمون و جزئیات آن‌ها در مدل‌سازی

Network Structure	Number of Hidden Layers	۱
	No. of nodes in hidden layer	۴
Back propagation type	Angle Driven Learning	
Back propagation parameters	Momentum factor	۰.۸
	Learning rate	۰.۷
Targets	Maximum iterations	۱۰۰۰
	MS error	۰.۰۰۰۱
	Random seed	۱۰۰۰۰
Smart stop	Minimum iterations	۲۰
	Auto weight	۰.۱۰
	Minimum iterations	ON
	Auto weight	ON
Transfer function	Output	Linear
	Hidden layer	Asymmetric Sigmoid

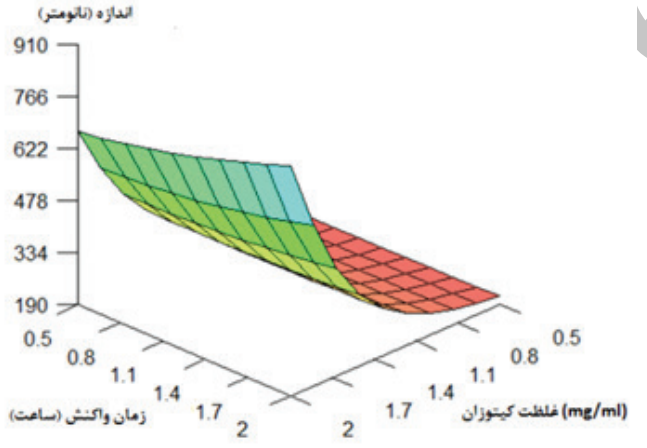
۳. نتایج و بحث

برای آماده سازی نانو ذرات، از روش خود تجمعی استفاده شد. این روش آسان بوده و دارای حداقل تاثیر بر روی مواد موجود در واکنش می‌باشد. پیوند بین آلبومین و کیتوزان از نوع الکترواستاتیک می‌باشد بنابراین مقدار بارهای مخالف روی این دو ماده تاثیر بسزایی در تولید نانو ذرات خواهد داشت. برای ایجاد حداکثر بارها pH در محدوده اسیدی تنظیم شد زیرا آلبومین دارای pL=۴/۷ و کیتوزان دارای pKa=۶/۲ می‌باشد [۱۳]. برای بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر روی اندازه نانو ذرات، در هر گراف مربوط به نتایج، یکی از متغیرهای مستقل در مقدار حد وسط خود نگه داشته شده و تاثیر دو متغیر مستقل دیگر بر روی اندازه ذرات مطالعه شده است. مدل بدست آمده مقادیر ضریب تاثیر را برای گروه آموزش ۰/۹۲ برای گروه تست ۰/۸۹ و برای گروه اعتبار سنجی ۰/۹۴ بدست آورد. این نتایج نشان می‌دهد که کیفیت مدل به دست آمده مطلوب می‌باشد.

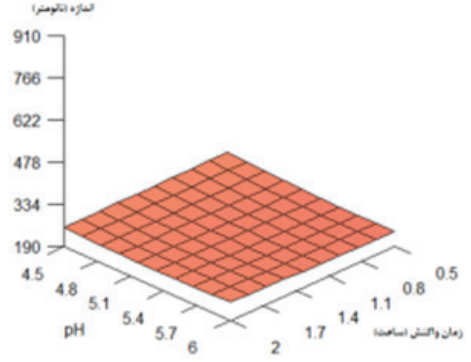
شکل ۱ تاثیر غلظت کیتوزان و pH بر روی اندازه ذرات، هنگامی که زمان واکنش در مقدارحد وسط خود ثابت نگه داشته شده است را نشان می‌دهد. جزئیات نشان می‌دهند غلظت کیتوزان دارای تاثیر مستقیم ولی غیر خطی بر روی اندازه نانو ذرات است. افزایش غلظت کیتوزان باعث افزایش تعداد مولکول‌های در دسترس در روش خودتجمعی می‌باشد. بنابراین با توجه به اینکه در روش خود تجمعی باید شرایط واکنش به تعادل برسد و انرژی آزاد به حداقل مقدار خود برسد، با افزایش غلظت کیتوزان اندازه نانو ذرات بزرگتر می‌شود تا بتواند از این طریق انرژی آزاد را کاهش دهد. به علاوه در غلظت های بالاتر احتمال تجمع پلیمر و افزایش اندازه ذرات بالاتر می‌رود. این نتیجه در توافق با نتایج مطالعات



شکل ۱ تاثیر غلظت و pH روی اندازه ذرات



شکل ۲ تاثیر زمان واکنش و غلظت روی اندازه ذرات



شکل ۳ تاثیر زمان واکنش و pH روی اندازه ذرات

Archive of SID
www.SID.ir

قبلی می‌باشد [۱۴]. افزایش pH باعث کاهش اندکی در اندازه ذرات می‌شود. تاثیر زمان واکنش و غلظت کیتوزان روی اندازه نانو ذرات در مقدار حد وسط pH در شکل ۲ نشان داده شده است.

دقت در شکل ۲ نشان می‌دهد که افزایش زمان واکنش باعث افزایش اندک اندازه ذرات می‌شود. افزایش pH از ۴/۵ به ۶ باعث افزایش بار منفی پروتئین می‌شود و این عامل باعث می‌شود تا برهمکنش آلبومین با کیتوزان بیش‌تر شده و اندازه ذرات اندکی کوچکتر می‌شود. همان‌طور که اشاره شد افزایش زمان واکنش باعث افزایش اندک اندازه ذرات می‌شود. این روند می‌تواند به خاطر افزایش امکان شرکت مولکولهای آزاد محلول در واکنش باشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند معمولا افزایش زمان واکنش باعث رشد نانو ذرات و افزایش اندازه آن‌ها می‌شود [۱۵]. به همین دلیل در آماده سازی نانوذرات معمولا در شرایط خاصی واکنش را متوقف می‌کنند تا اندازه ذرات رشد نکند.

نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که تاثیر غلظت بر روی اندازه همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده بود مهم‌ترین عامل موثر بر روی اندازه نانو ذرات می‌باشد. تاثیر بسیار اندک pH و زمان واکنش در مقایسه با غلظت بر روی اندازه در شکل ۳ نیز نشان داده شده است. شکل ۳ مشخص می‌کند در صورتی که غلظت کیتوزان در محدوده خاصی تنظیم و ثابت باشد، تغییر دو متغیر مستقل دیگر یعنی زمان واکنش و pH نمی تواند چندان بر روی اندازه ذرات بدست آمده تاثیر گذار باشد. بنابراین برای تغییر اندازه نانو ذرات پروتئین / پلیمری تغییر غلظت مواد اولیه مهم‌ترین و تاثیر گذارترین عامل می باشد [۱۵-۱۴].

۴. نتیجه‌گیری

مشخص کردن ارتباط عوامل موثر در ساختن نانو ذرات کیتوزان/آلبومین با اندازه ذرات هدف این مطالعه بود. نتایج نشان دادند غلظت پلیمر دارای بیش‌ترین تاثیر بر روی اندازه می‌باشد. همچنین تنظیم pH بین pL پروتئین و pKa کیتوزان برای بهینه کردن اندازه ضروری است و کاهش زمان واکنش می‌تواند باعث کاهش اندازه شود. به طور کلی تاثیر گذارترین عامل برای تغییر اندازه در این ذرات تغییر غلظت مواد اولیه می باشد.

مراجع

[1] A. Anitha, V. V. D. Rani, R. Krishna, V. Sreeja, N. Selvamurugan, S. V Nair, H. Tamura, and R. Jayakumar, "Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles," *Carbohydr. Polym.*, vol. 78, no. 4, pp. 672–677, 2009.

[2] N. Nafee, S. Taetz, M. Schneider, U. F. Schaefer, and C.-M. Lehr, "Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 173–183, 2007.

[3] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.

[4] M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, J. Simak, J. B. Hall, J. Semberova, S. H. De Paoli Lacerda, and S. E. McNeil, "Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets in vitro," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 382–393, 2011.

[5] M. Prach, V. Stone, and L. Proudfoot, "Zinc oxide nanoparticles and monocytes: impact of size, charge and solubility on activation status," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 266, no. 1, pp. 19–26, 2013.

[6] B. C. Dash, G. Réthoré, M. Monaghan, K. Fitzgerald, W. Gallagher, and A. Pandit, "The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility," *Biomaterials*, vol. 31, no. 32, pp. 8188–8197, 2010.

[7] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, and F. Delie, "Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–9, 2008.

[8] Z. Liu, Y. Jiao, F. Liu, and Z. Zhang, "Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 83, no. 3, pp. 806–812, 2007.

Archive of SID
www.SID.ir

[9] M. A. Shahbazi and M. Hamidi, "The impact of preparation parameters on typical attributes of chitosan-heparin nanohydrogels: particle size, loading efficiency, and drug release," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 39, no. 11, pp. 1774–1782, 2013.

[10] Z. Ma, H. H. Yeoh, and L. Lim, "Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles," *J. Pharm. Sci.*, vol. 91, no. 6, pp. 1396–1404, 2002.

[11] X. Huang, Y.-Z. Du, H. Yuan, and F.-Q. Hu, "Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 3, pp. 368–373, 2009.

[12] A. Amani, P. York, H. Chrystyn, and B. J. Clark, "Factors affecting the stability of nanoemulsions—use of artificial neural networks," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 37–45, 2010.

[13] H. Katas and H. O. Alpar, "Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery," *J. Control. release*, vol. 115, no. 2, pp. 216–225, 2006.

[14] N. Mohammadpour Dounighi, R. Eskandari, M. R. Avadi, H. Zolfagharian, A. Mir Mohammad Sadeghi, and M. Rezayat, "Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system," *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 44–52, 2012.

[15] N. S. Singh, R. S. Ningthoujam, L. R. Devi, N. Yaiphaba, V. Sudarsan, S. D. Singh, R. K. Vatsa, and R. Tewari, "Luminescence study of Eu3+ doped GdVO4 nanoparticles: Concentration, particle size, and core/shell effects," *J. Appl. Phys.*, p. 104307, 2008.

Archive of SID

www.SID.ir

Nanoscale
| Vol 2 | No.1 | Spring 2015 |
www.nanomeghyas.ir

Investigation of Effective Factors on Size of Polymer/Protein Nanoparticles: an Artificial Neural Networks Study

H. Baharifar | A. Amani*

Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Size is one of the most important physical factors of nanoparticles (NPs). The size of the NPs can be effective in application of particles, especially in designing of drug delivery systems. NPs size could regulate blood half life, immunogenicity and toxicity of them. So determination factors affecting the size can be very helpful in various applications. In this study the influence of various factors, including chitosan concentration, pH and reaction time (as independent variables), on the self-assembled NPs were investigated. Artificial neural networks were used to study the relationship between the independent and dependent variables. The results showed that chitosan concentration is the most important factor and has a direct effect on size. pH and reaction time have slight effect on size. Increasing pH would decrease the size but increasing pH would lead to increasing size. In total for preparation of chitosan/albumin NPs in desired size, polymer concentration, pH and reaction time must be adjusted.

Archive of SID

Keywords

albumin, size, artificial neural networks, chitosan.

*Correspondent Author Email: aamani@tums.ac.ir

www.SID.ir