

## تهیه و ارزیابی سامانه تحویل دارو بر پایه پلیمر زیست تخریب پذیر polycaprolactone (PCL) و هیدروژل حاصل از غضروف فیل ماهی (*Huso huso*)

مریم خواجهی<sup>۱</sup>، عبدالمجید حاجی مرادلو<sup>۱\*</sup>، مژگان زندی<sup>۲</sup>، محمد پزشکی مدرس<sup>۳</sup>، عباس زمانی<sup>۴</sup>، شاهین بنکدار<sup>۵</sup>

- ۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۲- گروه زیست پلیمر، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران
- ۳- مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۴- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، همدان، ایران
- ۵- بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۱

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۳۹۹/۶/۳۰

\* نویسنده مسول:

### چکیده

فناوری رهایش کنترل شده داروهای پروتئینی و پپتیدی از ذرات زیست تخریب پذیر به عنوان یک حوزه برجسته جهت غلبه بر مشکلات مرتبط با فرمولاسیون ماکرومولکولها ظهور کرده است. هدف از تحقیق حاضر ساخت میکرو ذرات بارگذاری شده با پروتئین با استفاده از پلیمر زیست تخریب پذیر PCL و هیدروژل حاصل از غضروف فیل ماهی و BSA به عنوان داروی مدل برای داروهای پروتئینی و پپتیدی نظیر GnRH بود. در این مطالعه روش امولسیون دوگانه به عنوان یکی از مناسبترین روشهای تهیه سامانه تحویل دارو برای پروتئینهای محلول در آب انتخاب گردید. در تهیه امولسیون اول از اولتراسونیک و در امولسیون دوم از همزن مکانیکی استفاده گردید. در این مطالعه ۳ گروه شامل گروه ۱ (PCL/hydrogel/BSA)، گروه ۲ (PCL/BSA) و گروه ۳ (PCL/Alginate/BSA) به عنوان سامانه تحویل دارو تهیه گردید. نتایج نشان داد شکل ذرات در همه گروهها کروی بوده و ذرات بصورت منفرد در محیط آبی پراکنده شده بودند. همچنین مقایسه میانگین اندازه ذرات نشان داد ذرات تهیه شده در گروه ۱ بطورمعنی داری نسبت به سایر گروهها اندازه کوچکتری داشتند ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده کارآیی انکپسوله شدن BSA در گروه ۱ به طور معنی داری بالاتر از سایر گروهها بود؛ درحالیکه گروه ۲ کمترین درصد انکپسوله شدن را نشان داد ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده، هیدروژل تهیه شده از غضروف فیل ماهی استفاده شده در گروه ۱ می تواند برای تهیه سیستم تحویل داروهای پروتئینی و پپتیدی پیشنهاد گردد.

**کلید واژه ها:** میکرو پارتیکل، امولسیون دوگانه، هیدروژل، PCL، BSA

### مقدمه

راههای تجویز سنتی دارو تجویز خوراکی یا تزریقی است که داروی خوراکی تجویز شده از روده جذب شده و وارد جریان خون می شود و پس از جذب روده ای به خون و بافت منتقل می شود در حالیکه داروی تجویز شده به روش تزریقی مستقیماً به خون تزریق می شود. با این روشهای تجویز دارو، مولکولها به راحتی در معرض عوامل تجزیه کننده قرار می گیرند (۱). محصولات مبتنی بر بیوتکنولوژی، به ویژه پپتیدها

و پروتئین‌ها نظیر هورمون‌ها و آنالوگ‌های آن‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها و غیره، به علت غیر فعال شدن توسط اسید و پروتئازهای دستگاه گوارش، به راحتی نمی‌توانند به‌روش خوراکی تحویل داده شوند. همچنین به دلیل نیمه عمر بیولوژیکی کوتاه، نیازمند تزریق‌های مکرر هستند. مشکل جدی دیگر در رساندن پروتئین‌ها، بی‌ثباتی ذاتی و فیزیکی آن‌ها است. علاوه بر این، داروها نمی‌توانند مستقیماً به محل عمل مورد نظر خود هدایت شوند (۲). بنابراین راه حل ممکن برای بهبود نیمه عمر بیولوژیکی، حفاظت از پروتئین‌ها در سیستم گردش خون و رهایش طولانی مدت، تحویل کنترل شده پروتئین به‌وسیله پلیمرهای زیست سازگار است (۳،۲).

با توسعه صنعت آبی‌پروری، بسیاری از ماهی‌ها در محیط‌های پرورش مصنوعی دچار اختلالات تولید مثلی نظیر عدم زرده سازی، عدم بلوغ نهایی تخمک (FOM: final oocyte maturation)، و یا عدم تخم‌ریزی در مولدین ماده و کاهش در مقدار و کیفیت اسپرم در مولدین نر می‌شوند که توسعه این صنعت را با چالش مهمی روبرو کرده است. اگر چه برخی از این مشکلات با استفاده از دستکاری پارامترهای محیطی (دمای آب، دوره نوری، شوری)، تغییر حجم و عمق مخزن و غیره بهبود می‌یابد اما در بسیاری از ماهیان، تنها راه حل، هورمون‌تراپی است (۴،۵). در دهه‌های گذشته به‌منظور کنترل تولیدمثل ماهیان مهم تجاری، سامانه‌های تحویل پایدار هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH: gonadotropin releasing hormone) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵،۶) که هدف از طراحی این سامانه‌ها، کاهش تکرار مصرف، افزایش اثر دارو و کاهش عوارض ناشی از آن است (۷). سامانه‌های دارورسانی مورد استفاده در آبزیان شامل روش‌های استفاده از کلسترول (۸)، پلیمرهای تجزیه‌پذیر پلی‌لاکتیک‌اسید و پلی‌گلیکولیک‌اسید (۹)، پلیمرهای ترکیبی تجزیه‌ناپذیر اتیلن و ونیل‌استات (۱۰) و ادجوانت فروند (۱۱) می‌باشد. سامانه آهسته رهش می‌تواند برای رهایش آهسته و پایدار هورمون GnRH در طول بازه‌ی زمانی چند هفته‌ای طراحی شود و مهم‌ترین مزیت آن نسبت به تزریق این است که تنها یک بار اعمال می‌شود (۱۲). در دهه‌های اخیر، تهیه میکروذره به روش امولسیون دوگانه (W/O/W) به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌های ساخت سامانه‌ی تحویل داروهای آبدوست، پروتئین‌ها و پپتیدها، مطرح شده‌است (۱۳،۱۴).

در روش امولسیون دوگانه، سه فاز آبی داخلی (حاوی ترکیب فعال)، آلی (حاوی پلیمر آب‌گریز) و آبی خارجی (حاوی پلیمر آبدوست) موجود است که از ترکیب فاز آبی داخلی و فاز آلی امولسیون اولیه (W/O) به‌دست می‌آید. ماحصل فرآیند اختلاط امولسیون اولیه و فاز آبی خارجی با استفاده از اولتراسونیک و یا همگن‌سازی، امولسیون ثانویه (W/O/W) است. طی این فرآیند، حلال آلی تبخیر شده و میکروسفرهای جامد تشکیل می‌شود. این میکروسفرها پس از جمع‌آوری و شستشو قابل استفاده هستند. سیستم امولسیون دوگانه برای انکسوله کردن داروهای آبدوست به منظور به حداقل رساندن کاهش فعالیت دارو در اثر تماس با حلال آلی پیشنهاد شده‌است (۱۵،۱۶). در روش امولسیون دوگانه پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر یکی از کاندیداهای مهم برای کاربرد در فاز آلی هستند که از این میان PCL به علت نفوذپذیری بالا برای بسیاری از داروها و عدم سمیت، گزینه‌ای مناسب برای رهایش کنترل شده محسوب می‌شود. همچنین تخریب این پلیمر نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر آهسته‌تر بوده و برای رهایش طولانی مدت مناسب است (۱۷-۱۹). در ساخت سامانه تحویل دارو برای افزایش کارایی می‌توان از هیدروژل‌ها در تهیه فاز آبی داخلی استفاده کرد. هیدروژل‌ها پلیمرهای شبکه‌ای و آبدوست هستند که در دارورسانی استفاده می‌شوند. منافذ موجود در هیدروژل‌ها باعث می‌شود تا بتوان دارو را به راحتی درون آن‌ها قرار داد و به عنوان یک سامانه دارورسانی به کار برد (۲۰). یکی از منابع تهیه هیدروژل‌های زیست سازگار، ضایعات آبزیان به عنوان منبعی ارزان و در دسترس است. ضایعات آبزیان به ماهیان با ارزش تجاری پایین یا ضایعات حاصل از فرآوری آن‌ها اطلاق می‌شود که عمدتاً شامل سر، پوست، استخوان، غضروف و باله است. در سال‌های اخیر، ضایعات آبزیان به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است (۲۱). بر اساس آمار FAO، میزان تولید کل آبزیان در سال ۲۰۱۸ معادل ۱۷۸/۵ میلیون تن بوده که حدود ۳۵ درصد آن به صورت ضایعات تخمین زده می‌شود. این ضایعات علاوه بر ایجاد آلودگی زیست محیطی سبب هدر رفت منابع عظیمی از ترکیبات زیست فعال می‌گردد که با مدیریت مناسب می‌توان محصولات با ارزش افزوده بالا تولید نمود (۲۲).

هدف از این مطالعه، استفاده از هیدروژل حاصل از غضروف فیل ماهی به عنوان ضایعات حاصل از فرآوری در تهیه سامانه‌ی تحویل دارو بر پایه‌ی پلیمر زیست تخریب‌پذیر پلی‌کاپرولاکتون (PCL: polycaprolactone) در ابعاد میکروذره است که قادر به حمل و آزادسازی مناسب مولکول‌های پروتئینی و پپتیدی نظیر هورمون GnRH باشد. در این مطالعه از داروی آلبومین سرم گاوی (BSA: bovine serum albumin) به عنوان داروی مدل استفاده شده است (۲۳،۲۴).

## مواد و روش‌ها

## تهیه و آماده سازی بافت غضروف

نمونه ضایعات غضروف فیل ماهی از مزرعه پرورش ماهیان خاویاری ساعی واقع در استان مازندران، شهرستان ساری تهیه شده و در ظرف یونولیتی و در حضور یخ در مدت زمان ۵ ساعت به آزمایشگاه سنتز پژوهشکده مهندسی بافت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی منتقل گردید. بافت غضروف با دقت و به کمک اسکالپل از سایر بافت‌ها جدا شده و به قطعاتی با ضخامت ۱ میلی متر تقسیم شدند. نمونه‌ها پس از خشک شدن با دستگاه فریز درایر با استفاده از دستگاه آسیاب بلوطی و در حضور نیتروژن مایع پودر شدند.

## تهیه هیدروژل و ساخت سامانه تحویل دارو

به منظور تهیه هیدروژل، پودر به دست آمده با غلظت ۱/۵ درصد در حضور آنزیم پپسین که پیشتر در ۰/۱HCl نرمال حل شده بود به مدت ۴۸ ساعت به طور پیوسته استیرر گردید. محلول حاصل با استفاده از ۰/۱NaOH نرمال خنثی شده (pH: ۷/۴) و پس از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به صورت هیدروژل به عنوان حاملی برای دارو مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

به منظور آماده سازی سامانه تحویل دارو از روش امولسیون دوگانه استفاده گردید (۱۴). در این روش، BSA و پلیمرهای PCL و پلی وینیل الکل (PVA: polyvinyl alcohol) مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تهیه امولسیون اولیه (W<sub>1</sub>/O)، ماده BSA با غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر در آب حل شده و به ۰/۵ میلی لیتر هیدروژل اضافه گردید (W<sub>1</sub>). این محلول به عنوان فاز آبی داخلی به فاز آلی (O) که شامل پلیمر PCL ۲/۵ درصد در دی کلرومتان (DCM: dichloromethane) است اضافه گردید. به منظور تهیه این امولسیون، محلول‌ها به مدت ۲ دقیقه با استفاده از اولتراسونیک با توان ۳۵ وات و در حمام یخ با یکدیگر ترکیب شدند. در ادامه به منظور آماده سازی امولسیون ثانویه (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>)؛ محلول ۱ درصد PVA با حل کردن این پلیمر در آب در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد تهیه گردید و امولسیون اولیه به کمک همزن مکانیکی با توان ۸۰۰ دور در دقیقه به محلول PVA اضافه گردید. به منظور تبخیر دی کلومتان، امولسیون ساخته شده به مدت دو ساعت در دمای اتاق استیرر شد. جهت بررسی کارایی انکپسوله شدن BSA، امولسیون در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و سوپرنانتنت جمع آوری گردید. سامانه آماده شده به عنوان گروه اول با گروه ۲ که در فاز آبی داخلی حاوی فقط BSA و گروه ۳ که در فاز آبی داخلی حاوی BSA و آلژینات بود مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱).

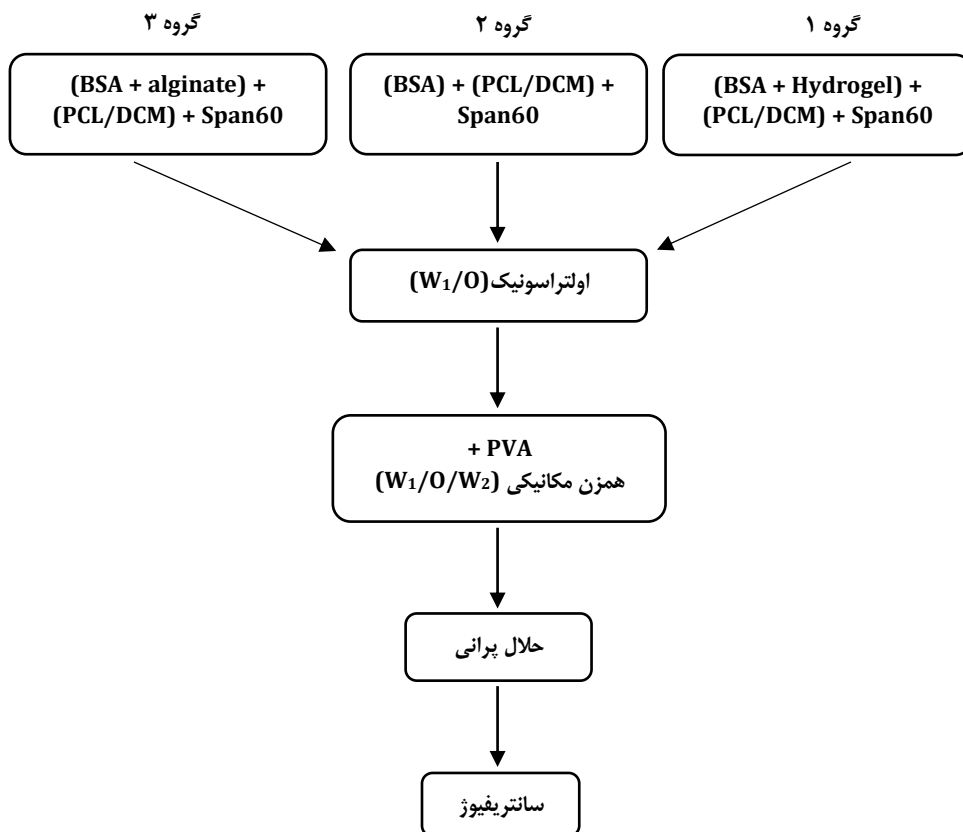
## بررسی مورفولوژی میکروذرات و تعیین درصد کارایی انکپسوله شدن BSA

اندازه و شکل ذرات با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار ImageJ, NIH (32bit) مورد بررسی قرار گرفت. قطر ۱۰۰ عدد از ذرات هر نمونه اندازه گیری شد و با یکدیگر مقایسه شدند.

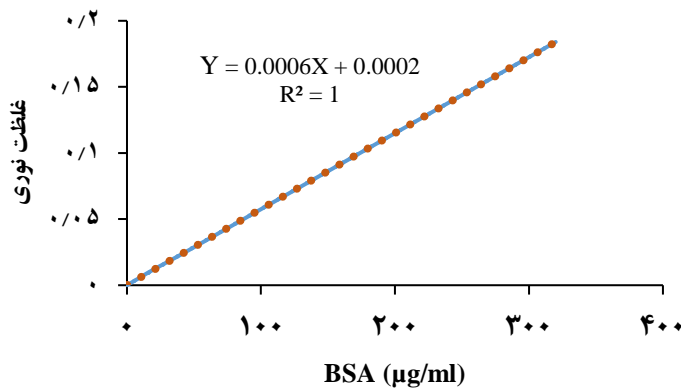
پس از تبخیر DCM، امولسیون به دست آمده سانتریفیوژ شده و مقدار ماده انکپسوله نشده موجود در سوپرنانتنت، با استفاده از روش Lowry و همکاران (۲۶) اندازه گیری شد. کارایی انکپسوله شدن BSA بر اساس میزان ماده رها شده در سوپرنانتنت محاسبه گردید. در این روش از BSA با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد (شکل ۲).

## آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 20 و Graph Pad Prism 5 استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها در سه تکرار و با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.



شکل ۱) دیاگرام آماده سازی میکروذرات بر اساس روش امولسیون دوگانه



شکل ۲) غلظت‌های مختلف BSA به عنوان استاندارد جهت تعیین مقدار کارآیی ماده انکپسوله شده در میکروذرات

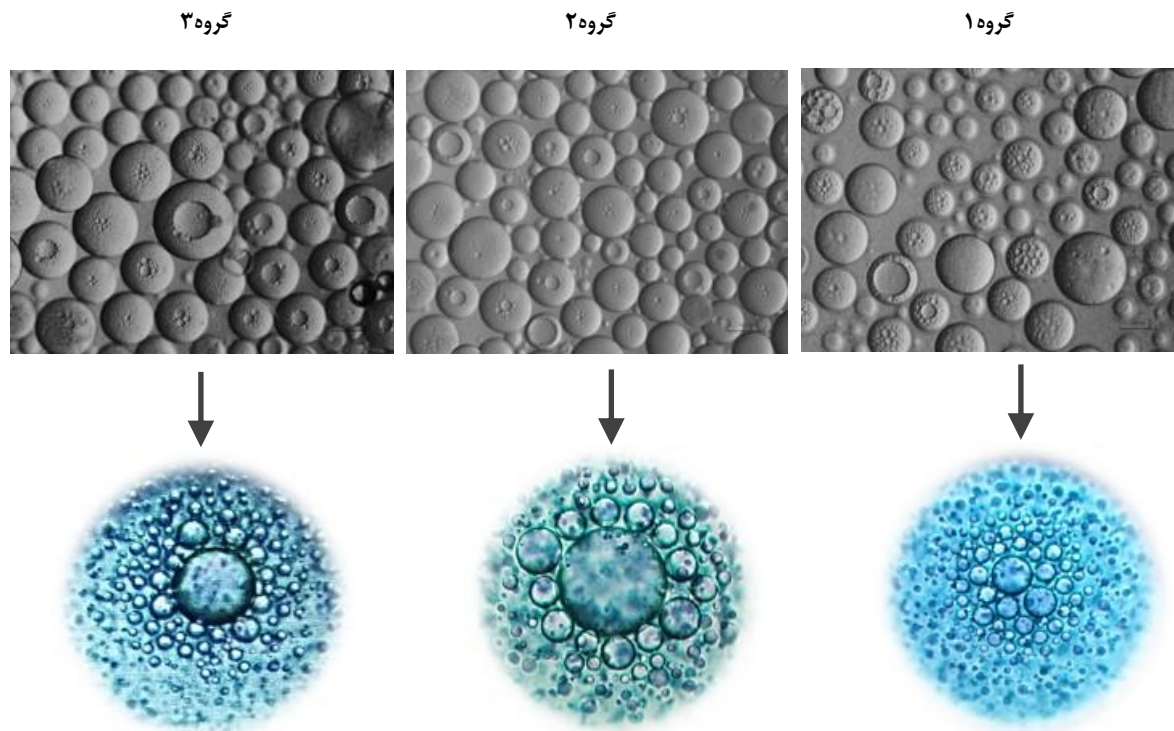
## نتایج

انتخاب روش کپسول سازی معمولاً با توجه به ویژگی‌های حلالیت دارو تعیین می‌شود. در این مطالعه، فرآیند امولسیون دوگانه انتخاب شد زیرا از نظر پایداری پروتئین نسبت به سایر روش‌های مخلوط کردن ارجحیت دارد. در این مطالعه، اندازه و شکل میکروذرات تهیه شده به روش امولسیون دوگانه و درصد کارآیی انکپسوله شدن BSA مورد بررسی قرار گرفت.

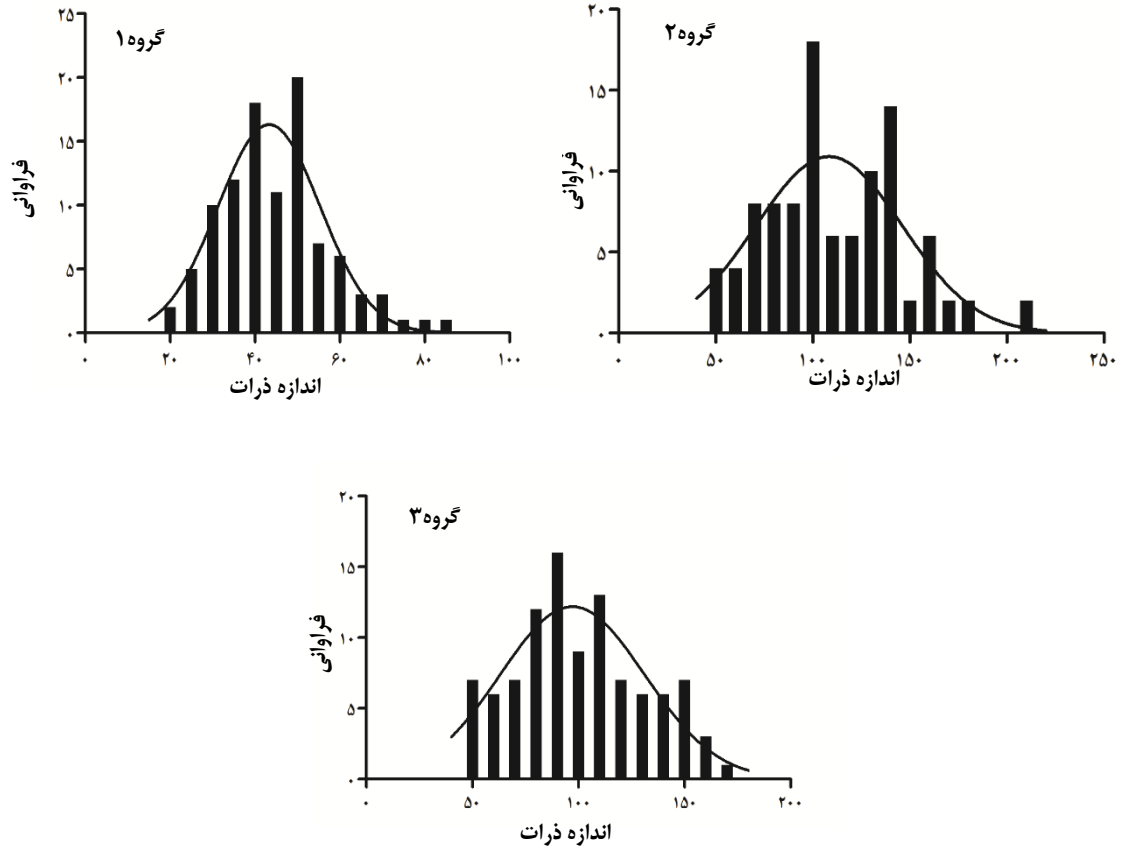
## بررسی مورفولوژی میکروذرات

مورفولوژی میکروذرات به دست آمده از سه فرمولاسیون مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. تصاویر نشان داد میکروذرات تهیه شده کروی شکل بوده و به صورت منفرد در محیط پراکنده شده بودند و هیچ گونه حالت کلوخه ای (conglomerate) مشاهده نشد. همانطور که در تصویر مشاهده می شود فاز آبی داخلی با استفاده از اولتراسونیک به صورت ذرات کوچکتر در ذرات بزرگتر PCL محبوس شده بودند. ذرات محبوس شده حاوی BSA بوده که با تجزیه شدن پلیمر PCL به تدریج آزاد می گردند.

بررسی قطر ذرات توسط تصاویر میکروسکوپی و نرم افزار ImageJ, NIH نشان داد بیشترین توزیع اندازه ذرات برای گروه ۱ در محدوده ۱۸ تا ۸۴ میکرومتر بوده است. همچنین این پارامتر در گروه ۲ و ۳ به ترتیب در محدوده ۴۷ تا ۲۱۸ میکرومتر و ۴۶ تا ۱۷۰ میکرومتر بود. در نتیجه متراکم ترین و باریک ترین دامنه پراکندگی ذرات مربوط به فرمولاسیون گروه ۱ مشاهده شد (شکل ۳). قطر ذرات در گروه اول زیر ۱۰۰ میکرومتر بود در حالیکه در گروه ۱ و ۲، قطر حدود ۵۰ درصد از میکروذرات زیر ۱۰۰ میکرومتر تعیین گردید. بر اساس داده های به دست آمده، میانگین قطر ذرات در گروه ۱ تا ۳ به ترتیب  $13 \pm 45/2$ ،  $35 \pm 112/14$  و  $30 \pm 100/6$  میکرومتر بود که در گروه ۱ بطور معنی داری کوچکتر از سایر گروه ها بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱). همانطور که مشاهده گردید کمترین و بیشترین میانگین ذرات به ترتیب مربوط به گروه ۱ و ۲ بود (شکل ۳).



شکل ۳) مورفولوژی ذرات فاز آبی داخلی محبوس شده در میکروذرات PCL (بزرگنمایی  $400\times$ ).



(شکل ۴)

شکل ۴) نمودار هیستوگرام توزیع قطر ذرات میکروذرات حاصل از امولسیون دوگانه

**تعیین درصد کارایی انکپسوله شدن BSA در میکروذرات**

درصد انکپسوله شدن BSA در میکروذرات برای همه گروه‌ها تعیین شد و نتایج حاصل در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد کارایی انکپسوله شدن BSA در میکروذرات گروه ۱ نسبت به گروه ۲ و ۳ به طور معنی داری بهتر بوده است ( $p < 0.05$ ). گروه ۱ (۵۳/۸٪) و ۲ (۲۷/۲٪) به ترتیب بیشترین و کمترین درصد کارایی را نشان دادند.

جدول ۱) کارایی انکپسوله شدن BSA و میانگین اندازه ذرات

گروه ۳	گروه ۲	گروه ۱	
۲۷/۲ ± ۳ <sup>b</sup>	۲۲ ± ۲ <sup>c</sup>	۵۳/۸ ± ۲ <sup>a</sup>	کارایی انکپسوله شدن BSA (%)
۱۰۰/۶ ± ۳۰ <sup>a</sup>	۱۱۲/۱۴ ± ۳۵ <sup>a</sup>	۴۵/۲ ± ۱۳ <sup>b</sup>	میانگین اندازه ذرات

حروف کوچک غیر مشترک در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار است ( $\alpha = 0.05$ , Mn = SD).

## بحث

در مطالعه حاضر تهیه میکروذره به روش امولسیون دوگانه به عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌های ساخت سامانه‌ی تحویل داروهای آب‌دوست، پروتئین‌ها و پپتیدها مورد بررسی قرار گرفت که از BSA به عنوان داروی مدل استفاده گردید (۱۴،۱۵،۲۷). در دهه‌های گذشته سامانه‌های تحویل پایدار مانند هورمون GnRH بر پایه پلیمرهای زیست تخریب پذیر نظیر poly lactic-co-glycolic acid و polyanhydrides مورد بررسی قرار گرفته است که در این سامانه‌ها رهایش هورمون همزمان با تخریب پلیمر صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی در زمینه استفاده از پلیمر زیست تخریب پذیر PCL و هیدروژل حاصل از ضایعات آبیان به روش امولسیون دوگانه در ساخت سامانه تحویل هورمون GnRH مشاهده نشده است لذا سامانه مورد مطالعه می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای بررسی میزان رهایش کنترل شده هورمون GnRH در روند تکثیر ماهیان نظیر ماهیان خاویاری و کپور ماهیان پیشنهاد گردد (۵). Mylonas و همکاران با استفاده از میکروذره بر پایه پلیمر زیست تخریب پذیر (اسید چرب و سبسیک اسید) میزان رهایش هورمون GnRH را در ماهی باس مخطط (*Morone saxatilis*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) بررسی کرده و بعد از دو هفته، ۱۰۰ درصد اوولاسیون را در ماهیان تحت آزمایش مشاهده کردند (۲۸). در ساخت سامانه تحویل دارو برای افزایش کارایی می‌توان از هیدروژل‌ها در تهیه فاز آبی داخلی استفاده کرد. هیدروژل‌ها پلیمرهای شبکه‌ای هستند که منافذ موجود در آن‌ها باعث می‌شود دارو را به راحتی درون آن‌ها قرار گرفته و به عنوان یک سامانه دارورسانی به کار روند (۲۹). امروزه با گسترش صنعت فرآوری آبیان، ضایعات حاصل از فرآوری نیز رو به افزایش است. این ضایعات که منبع عظیمی از ترکیبات زیست فعال هستند در مقادیر قابل توجهی دور ریز می‌شوند که علاوه بر هدر رفت منابع زیستی ارزشمند، آلودگی محیط زیست را نیز به همراه دارند. در این مطالعه یک راهکار نوین و کاربردی برای استفاده از این ضایعات که تولید هیدروژل از ضایعات غضروف ماهی خاویاری به منظور استفاده در سامانه تحویل دارو است پیشنهاد شده است. دلیل این انتخاب بررسی پتانسیل هیدروژل حاصل از ضایعات آبیان در تولید سامانه تحویل دارو است.

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، اندازه ذرات در گروه ۱ که حاوی هیدروژل بود کوچکتر از اندازه ذرات در گروه ۳ حاوی آلژینات بوده و اندازه ذرات در این گروه نیز کمتر از گروه ۲ بوده است. این نتیجه می‌تواند به دلیل افزایش ویسکوزیته فاز داخلی آبی بوده باشد که در گروه ۱ بیشتر از گروه ۳ و ۲ بوده است. این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیق Ogawa و همکاران (۳۰،۳۱) همخوانی دارد که اظهار داشتند افزایش ویسکوزیته اولین امولسیون و به تبع آن پراکندگی تشدید شده فاز آبی داخلی در فاز آلی منجر به کاهش اندازه قطره ذرات در مرحله دوم امولسیون شد.

نتایج حاصل از تعیین درصد کارایی انکپسوله شدن BSA نشان داد بالاترین درصد کارایی در گروه ۱ مشاهده شد. این نتیجه به چند دلیل می‌تواند حاصل گردد. اولین دلیل می‌تواند ویسکوزیته بالای فاز آبی داخلی باشد که باعث به دام افتادن هرچه بیشتر دارو در حفرات هیدروژل شده و از طرف دیگر خاصیت آبدوستی هیدروژل باعث شده BSA موجود در فاز آبی داخلی گروه ۱ به مقدار بیشتری حبس گردد. همچنین پیوندهای یونی برقرار شده بین گروه‌های آمینی هیدروژل و گروه‌های کربوسیل BSA باعث حبس شدن بیشتر BSA در گروه اول گردیده است (۳۲). در ساخت میکروذره به روش امولسیون دوگانه همواره مقداری از دارو در سطح ذرات و ماتریس پلیمری قرار می‌گیرد که این میزان تحت عنوان رهایش انفجاری (burst) در ساعات اولیه پس از تهیه امولسیون در داخل فاز آبی خارجی آزاد می‌شود (۱۴،۳۳) و هر چه میزان داروی بیشتری در ذرات تشکیل شده طی روند ساخت امولسیون اولیه حبس شود، میزان آزادسازی کمتر خواهد بود. Anseth و همکاران در مطالعه‌ای هیدروژل تخریب پذیر بر پایه پلی وینیل الکل و پلی اتیلن گلیکول را با هدف استفاده در سامانه تحویل دارو و مهندسی بافت بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد ساختار شبکه‌ای هیدروژل تهیه شده قابلیت استفاده به عنوان حامل دارو را دارد زیرا ماهیت شبکه ای این ساختارها باعث به دام افتادن دارو شده و بدین ترتیب کارایی بالاتری در رسانش دارو به اندام هدف دارند (۳۴).

## نتیجه گیری

قرار دادن دارو در یک حامل ذرات می‌تواند از آن در برابر تخریب در شرایط برون تنی و درون تنی محافظت کند و بدینوسیله می‌تواند انتشار را کنترل و امکان هدف گیری را فراهم کند. PCL می‌تواند برای تهیه میکرو و یا نانوذرات حاوی BSA و یا داروهای پروتئینی و پپتیدی به

روش امولسیون دوگانه مورد استفاده قرار گیرد و کاربرد هیدروژل‌ها در فاز داخلی آبی می‌تواند به افزایش کارایی این سیستم کمک کند. با توجه به اینکه هیدروژل به کار رفته در گروه یک باعث افزایش درصد کارایی انکپسوله شدن BSA شده است بنابراین استفاده از این نوع هیدروژل برای تهیه سیستم تحویل داروهای پروتئینی و پپتیدی پیشنهاد می‌شود. امروزه با توجه به گسترش پرورش ماهیان به صورت مصنوعی و امکان تکثیر آن‌ها در شرایط اسارت، استفاده از سامانه موجود به عنوان حامل ترکیبات آبدوست تهیه شده با روش امولسیون دوگانه به منظور رسانش هورمون GnRH جهت همزمانی فرایند تکثیر در مولدین پیشنهاد می‌شود. در مطالعات آتی می‌توان جهت رهاش هورمون GnRH از این سامانه استفاده کرده و کارایی آن را در تکثیر مولدین در شرایط درون تنی مورد بررسی قرار داد.

**تشکر و قدردانی:** از سرکار خانم مهندس اعظم کافی به جهت همکاری در تهیه سامانه تحویل دارو قدردانی می‌گردد.

**تاییدیه اخلاقی:** این مقاله در زمان ارسال برای این نشریه در هیچ نشریه ایرانی یا غیر ایرانی در حال بررسی نبوده و تا تعیین تکلیف قطعی در این نشریه برای هیچ نشریه ایرانی یا غیر ایرانی دیگری ارسال نخواهد شد.

**تعارض منافع:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**سهم نویسندگان:** مریم خواجوی، پژوهشگر اصلی/نگارنده (۳۵٪)؛ عبدالمجید حاجی مرادلو، پژوهشگر اصلی/روش شناس (۱۵٪)؛ مژگان زندی، پژوهشگر اصلی/روش شناس (۱۵٪)؛ محمد پزشکی، پژوهشگر اصلی/روش شناس/تحلیلگر نتایج (۱۵٪)؛ عباس زمانی، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۱۵٪)؛ شاهین بنگدار، پژوهشگر کمکی (۵٪).

**منابع مالی:** هزینه این تحقیق از محل تامین اعتبار پایان نامه دکتری تامین شده است.

## منابع

1. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol.* 2004; 113:151–170.
2. Mukherjee B, Santra K, Pattnaik G, Soma G. Preparation , characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. *Int J Nanomedicine.* 2008;3:487–496.
3. Hermes RS, Narayani R. Polymeric alginate films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules. *Trends biomater artif organs.* 2002;15:54–56.
4. Benetti DD, Partridge GJ, Stieglitz J. Overview on status and technological advances in tuna aquaculture around the world. In *Advances in tuna aquaculture.* Elsevier Inc.; 2016. 1–19 p.
5. Zohar Y, Mylonas CC. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish.* 2001;10:463–491.
6. Forniés MA, Mañanós E, Carrillo M, Rocha A, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture.* 2001;202:221–234.
7. Ganji F, Vasheghani-Farahani E. Hydrogels in controlled drug delivery systems. *Iran Polym J.* 2009;18:63–88.
8. Crim LW, Evans DM. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol Reprod.* 1983;29:137–142.
9. Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm Res.* 1994; 11:1143–1147.



10. Mylonas CC, Fatira E, Karkut P, Papadaki M, Sigelaki I, Duncan NJ. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture*. 2015;448:44-53.
11. Vazirzadeh A, Hajimoradloo A, Esmaeili HR, Akhlaghi M. Effects of emulsified versus saline administration of GnRH $\alpha$  on induction of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 2008;280:267-269.
12. Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E, Fostier A, Breton B. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH- $\alpha$  pellet. *Aquaculture*. 2000;181:241-255.
13. Malik DK, Baboota S, Ahuja A, Hasan S, Ali J. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv*. 2007;4:141-151.
14. Lamprecht A, Ubrich N, Pe MH. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int J Pharm*. 2000;196:177-182.
15. Neumann SM, Wittstock N, van der Schaaf US, Karbstein HP. Interactions in water in oil in water double emulsions: Systematical investigations on the interfacial properties and emulsion structure of the outer oil in water emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Asp*. 2018;537:524-531.
16. Schugens C, Laruelle N, Nihant N, Grandfils C, Jérôme R, Teyssié P. Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation. *J Control Release*. 1994;32:161-176.
17. Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:229-242.
18. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int J Pharm*. 2004;278:1-23.
19. Loureiro M V., Vale M, Galhano R, Matos S, Bordado JC, Pinho I, Marques AC. Microencapsulation of isocyanate in biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) capsules and application in monocomponent green adhesives. *ACS Appl Polym Mater*. 2020;
20. Khoee S, Kardani M. Hydrogels as controlled drug delivery carriers. *Polymerization*. 2013;2:16-27 (in Persian).
21. Caruso G. Fishery Wastes and By-products: A resource to be valorised. *J Fish*. 2015;9:80-83.
22. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
23. Varanko A, Saha S, Chilkoti A. Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;
24. Qiu J, Xu J, Xia Y. Nanobottles for Controlled release and drug delivery. *Adv Healthc Mater*. 2020;2000587:1-11.
25. Wu J, Ding Q, Dutta A, Wang Y, Huang YH, Wenga H, et al. An injectable extracellular matrix derived hydrogel for meniscus repair and regeneration. *Acta Biomater*. 2015;16:49-59.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:256-275.
27. Te ZY, Yeoh WH, Shahidan MA, Shahidan NN. A Study on Chitosan Coated Polycaprolactone (Ch-PCL) microspheres prepared via double emulsion solvent evaporation method. *Mater Sci Forum*. 2020;1010:541-548.
28. Mylonas CC, Tabata Y, Langer R. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone ( GnRH ), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J Control Release*. 1995;35:23-34.

29. Vashist A, Vashist A, Gupta YK, Ahmad S. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. *J Mater Chem B*. 2014;2:147–166.
30. Filipović N, Veselinović L, Ražić S, Jeremić S, Filipič M, Žegura B, et al. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres for prolonged release of selenium nanoparticles. *Mater Sci Eng C*. 2019;96:776–789.
31. Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, Yashli T ST. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. *Chem Pharm Bull*. 1988;36:1095–103.
32. Gao H, Wang YN, Fan YG, Ma JB. Synthesis of a biodegradable tadpole-shaped polymer via the coupling reaction of polylactide onto mono(6-(2-aminoethyl)amino-6-deoxy)- $\beta$ - cyclodextrin and its properties as the new carrier of protein delivery system. *J Control Release*. 2005;107:158–173.
33. Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*. 2004;27:1–12.
34. Anseth KS, Metters AT, Bryant SJ, Martens PJ, Elisseeff JH, Bowman CN. In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *J Control Release*. 2002;78:199–209.

## Preparation and characterization of drug delivery system based on biodegradable polymer polycaprolactone (PCL) and hydrogel from beluga (*Husohuso*) cartilage

Maryam Khajavi<sup>1</sup>, Abdolmajid Hajimoradloo<sup>1\*</sup>, Mojgan Zandi<sup>2</sup>, Mohamad Pezeshki-Modaress<sup>3</sup>, Abbas Zamani<sup>4</sup>, Shahin Bonakdar<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>2</sup>Department of Biomaterials, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran.

<sup>5</sup>National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

### ABSTRACT

Controlled delivery technology of protein/peptide drugs from biodegradable particles has emerged as one of the eminent areas to overcome problems related to macromolecules formulation. The goal of the present study was to develop protein-loaded micro-particles using biodegradable polymer, polycaprolactone (PCL) and hydrogel from beluga cartilage. Bovine serum albumin (BSA) was used as a model for protein/ peptide molecules such as GnRH. The double emulsion (W/O/W) technique was selected as one of the most appropriate methods for preparing a drug delivery system for soluble proteins in water. The first emulsion was prepared using ultrasonic and the mechanical agitator was used for achieving the second emulsion. The hydrogel prepared by enzymatic digestion was used in the first aquatic solution. At the present investigation, three groups were considered as the drug delivery system: G1; (PCL/hydrogel/BSA), G2; (PCL/BSA) and G3; (PCL/Alginate/BSA). Findings showed that the morphology of particles was spherical and non-conglomerated in all groups. The comparison of average particle size among groups was also indicated that the particles.

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 21 June 2020

Accepted: 1 September 2020

ePublished: 20 September 2020

### KEYWORDS

Micro-particle, Double emulsion, Hydrogel, PCL, BSA

\* Corresponding Author:

Email address: [a\\_hajimoradloo@gau.ac.ir](mailto:a_hajimoradloo@gau.ac.ir)

Tel: +981732251701

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513