

وانادیم شبکه‌ای شده با هیدروژل نانوجندسازه برپایه (CMC-PEG-PLGA) با پوشش سدیم آلزینات به عنوان سامانه انسولین‌رسانی حساس به pH

سید نبی الله حسینی^۱، آسیه عباسی دلویی^{۲*}، سید جواد ضیائی الحق^۳، ایوب سعیدی^۴

۱. دانشجوی دکترا گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۳. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۴. استادیار گروه علوم زیستی در ورزش و سلامت، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: تیر ۹۸ بازنگری: شهریور ۹۸ پذیرش: مهر ۹۸

چکیده: در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های قابل توجهی در به‌کارگیری بسپارهای زیست‌پزشکی به‌عنوان حامل‌های هدفمند برای ره‌ایش دارو، پروتئین و عوامل رشد انجام‌گرفته است. در این پژوهش، هیدروژل‌های نانوجندسازه به‌دلیل تشکیل نانوذرات وانادیم (V) در داخل هیدروژل‌های کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) متورم تهیه شده است. تشکیل نانوذرات وانادیم در هیدروژل‌ها با طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. الگوهای XRD تشکیل نانوذرات وانادیم در بستر هیدروژل را تایید کردند. همچنین، تصاویر SEM نشان دادند که اندازه نانوذرات از ۲۲ تا ۷۴ نانومتر در بستر هیدروژل است. رفتار تورمی هیدروژل نانوجندسازه‌ها در pHهای ۲/۱ و ۷/۴ بررسی شد. هیدروژل‌ها در pH کمتر، جذب آب بهتری از خود نشان دادند. طیف‌های نمونه‌های بارگیری‌شده با دارو، بیانگر آن است که بارگذاری مناسب دارو انجام‌شده است. با بررسی ره‌ایش دارو، مشاهده شد که مقدار ره‌ایش در هیدروژل‌های نانوجندسازه کمتر و با افزایش درصد نانوذرات مقدار ره‌ایش کاهش یافته است. در آزمون سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت، زنده‌ماندن سلول‌ها در گستره ۷۴/۳ تا ۹۶/۰۵٪ در مقایسه با نمونه کنترل (به‌عنوان ۱۰۰٪) بود. در نمونه هیدروژل نانوجندسازه حاوی انسولین پس از ۲۴ ساعت، پایین‌ترین زنده‌ماندن سلولی مربوط به غلظت ۳۱/۲۵ μg/ml انسولین و بیشترین زنده‌ماندن سلولی مربوط به غلظت ۱۰۰۰ μg/ml انسولین با ۲۵/۷٪ سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل بود.

واژه‌های کلیدی: آلزینات، هیدروژل نانوجندسازه، نانوذرات وانادیم، انسولین‌رسانی.

مقدمه

ره‌ایش دارو در بدن با وعده‌های متناوب باعث ایجاد نوساناتی در غلظت دارو در خون (گاهی بین دو حد سمی و درمانی) می‌شوند. این مشکل افزون بر مسائلی مانند درد تزریق و مشکل بلع

دارورسانی هدفمند تلاش برای افزایش تجمع دارویی در محل‌هایی ویژه در زمان مشخص است. سامانه‌های پرکاربرد

[۱۷ و ۱۸]. اصلاح با پلی اتیلن گلیکول (PEG) موجب می شود که نانوذرات از ایمنی جلوگیری کنند و در گردش خون به مدت طولانی ساکن شوند [۱۹]. PLGA، یک هم‌بسیار تشکیل شده از لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید است. PLGA در بدن با آب‌کافت به تکپارهای اندوژن، لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید و پس از آن به آب و کربن دی‌اکسید تبدیل می‌شود. با توجه به وزن مولکولی، PLGA امکان رهش دارو را می‌تواند از یک هفته تا چند ماه به صورت کنترل شده یا پایدار فراهم کند [۲۰]. سامانه‌های ذرات PLGA برای بهبود اثرات درمانی انسولین از راه ریه استفاده شده است. ذرات PLGA انسولین PLGA عوامل متعددی می‌توانند بر مقدار تجزیه PLGA تأثیر بگذارند. برای مثال، وزن مولکولی، طول بلوک‌های لاکتیک و گلیکولیک، نسبت لاکتیک اسید و گلیکولیک، ساختار و ریخت‌شناسی [۲۱] و [۲۲] در داروهای ضدسرطان و پاداکسیدانی [۲۳] برای افزایش جذب دهانی بیشتر انسولین، از PLGA استفاده می‌شود [۲۴]. وانادیم نقش متنوعی در تنظیم و فعالیت‌های کاتالستی و زیستی دارد. نقش اصلی و کلیدی این عناصر در مسیر متابولیسمی کربوهیدرات‌ها مشخص شده است [۲۵]. همچنین، وانادیل سولفات ترشح انسولین وابسته به تحریک گلوکز را تقویت می‌کند. گزارش‌های زیادی در ارتباط با نقش ترکیبات وانادیم در بهبود علائم و تقلید اثرات انسولین وجود دارد [۲۶]. وانادیم می‌تواند با بالابردن حساسیت گیرنده‌های انسولین در بافت‌های بدن، آثار پایین‌آورنده قند خون را آشکار و در صورت کافی بودن زمان، آثار ترمیمی خود را بر پانکراس اعمال کند [۲۷]. آلزینات یک ماده طبیعی به دست آمده از جلبک دریایی قهوه‌ای است. داربست آلزینات در مهندسی بافت کاربرد فراوانی دارد. به‌طور معمول، آلزینات به صورت نمک سدیم به‌کار گرفته می‌شود. ویژگی هیدروژل آلزینات با توالی و ترکیب زنجیره تکپار تشکیل‌دهنده و گرانش‌روی بالای آن تعیین می‌شود [۲۸]. این هیدروژل در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی به‌کار گرفته می‌شود [۲۹]. درشت و ریزدانه‌ای آلزینات در موارد دارویی مانند انسولین و ملاتونین

قرص‌ها توسط برخی از بیماران، موجب توجه به روش‌های مناسب انتقال دارو شده است. طراحی ساختارهای دارویی زیادی با کمک علوم شیمی و کامپیوتر تاکنون انجام شده است که بیش از نیمی از این ساختارها در آب کم محلول هستند. فرموله کردن این ساختارهای کم محلول در آب به دلیل سرعت انحلال پایین و پخش آرام آن‌ها از مشکلات داروسازان است. برای رفع این مشکلات، از نمک‌ها، کمک‌حلال‌ها، حامل‌هایی مانند CMC^۱، PEG^۲، PLGA^۳ و پراکنندگی جامدات استفاده شده است.

شبکه‌های بسیاری سه بعدی با توانایی جذب آب در حدود سه برابر وزن خود، در داروها و زیست‌پزشکی به‌کار گرفته می‌شوند [۱]. به دلیل ساختار شبکه‌ای متخلخل، نسبت تورمی بالا، سمی نبودن، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری، هیدروژل به‌طور گسترده در کاربردهای پزشکی شامل پوشش زخم [۲]، مهندسی بافت [۳] و کنترل دارو [۴ و ۵] به‌کار رفته‌اند. در دهه گذشته نانوچندسازه‌های به دست آمده از پراکنندگی نانوذرات معدنی در بسترهای بسیاری، مورد توجه بوده‌اند [۶ و ۷]. در پژوهش‌های گذشته، ماده‌هایی مانند مس [۸ و ۹]، روی اکسید [۱۰ و ۱۱]، نقره [۱۲] به‌عنوان نانوذره به‌کار گرفته شده‌اند. در پژوهش حاضر، از وانادیم به‌عنوان نانوذره استفاده شده است با این آگاهی که این نانوذره توانایی ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده در بخش الفایپانکراس (مسئول تولید انسولین است) را دارد [۱۳ و ۱۴].

کربوکسی متیل سلولز یک بسیار زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است. کربوکسی متیل سلولز به‌طور گسترده در دارورسانی، ساخت کاغذ [۱۵]، بهبود عملکرد PEG، پوشش خوراکی، ضد عفونی‌کننده‌ها [۱۶ و ۱۷] و غیره کاربرد دارند. PEG به‌عنوان یک سامانه هیدروژلی تزریقی برای پروتئین، DNA و برنامه‌های تحویل دارو به‌طور گسترده بررسی شده است

1. Carboxymethylcellulose

2. Polyethylene glycol

3. Poly(lactic-co-glycolic acid)

در دقیقه به دست آمد. همه نمونه‌های بررسی شده در شکل پودر بودند. ریخت‌شناسی نمونه‌های خشک‌شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل (TESCAN MIRA3) پس از پوشاندن نمونه‌ها با فیلم طلا انجام گرفت.

روش تهیه هیدروژل CMC-PEG-PLGA

ابتدا ۶ گرم CMC در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر هم‌زده شد (۶ ساعت در دمای °C ۵۰). سپس، ۰/۰۵ گرم $VaSO_4$ در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به محلول افزوده شد. سپس، به مدت ۲ ساعت هم‌زده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. در ادامه، در یک ظرف، ۲ گرم PEG (۲۰۰۰ و ۶۰۰۰ با نسبت وزنی یک به یک) در ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل و به آن ۳۵۰ واحد انسولین ریگولار افزوده شد. در ظرف دیگری، ۰/۲ گرم PLGA در ۶ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و اتیل استات (با نسبت دو به یک) در حمام یخ حل و به آن ۳۵۰ واحد انسولین NHP افزوده شد. سپس، محتوی این دو ظرف به محلول نانوچندسازه افزوده شد. پس از آن، ۰/۲ گرم آلژینات در ۲۰ میلی‌لیتر آب در دمای °C ۶۰ حل و به‌عنوان پوشش‌دهنده در مدت ۲ ساعت به آن افزوده شد.

در پایان اتانول‌دی‌آمین (۳ میلی‌لیتر) برای شبکه‌ای شدن هیدروژل نانوچندسازه به آن افزوده شد. هیدروژل به دست آمده با دستگاه خشک‌کن انجمادی، خشک شد. هیدروژل نانوچندسازه تهیه‌شده در داخل یخچال در دمای منفی °C ۵- نگهداری شد. نمونه‌های V1، V2 و V3 به ترتیب شامل غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ از وانادیم بود.

رفتار تورمی

رفتار تورمی هیدروژل‌های نانوچندسازه CMC-PEG-PLGA/V خشک در محلول‌های بافری با pH برابر با ۲/۱ و ۷/۴ در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. به‌طور تقریبی ۰/۱ گرم

استفاده شده است [۳۰]. مهم‌ترین ویژگی آلژینات توانایی تشکیل ژل در محیط معتدل با عواملی مانند یون‌های دو ظرفیتی همانند کلسیم است. آلژینات در تماس با یون کلسیم یک شبکه سه-بعدی تشکیل می‌دهد [۳۱]. در کپسوله کردن مواد غذایی و دارویی می‌توان از آن‌ها استفاده کرد [۳۲ و ۳۳]. انسولین یک پروتئین با وزن مولکولی کم و بار منفی است که به‌طور گسترده برای درمان دیابت به کار گرفته می‌شود [۳۴ و ۳۵].

از نانوچندسازه انسولین برای رهایش طولانی مدت در صنعت داروسازی می‌توان استفاده کرد [۱، ۳۶ و ۳۷]. با توجه به حقایق یاد شده، ترکیب هیدروژل CMC-PEG-PLGA با نانوذرات وانادیم به‌عنوان یک حامل دارو کاربردهای بسیاری دارد. در این پژوهش، هیدروژل‌های نانوچندسازه جدید CMC-PEG-PLGA/V با تشکیل هم‌زمان نانوذرات وانادیم در بستر هیدروژل CMC-PEG-PLGA تهیه شد. هیدروژل‌ها با طیف-سنجی فروسرخ تبدیل فوریه، پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و اثر غلظت نانوذرات وانادیم بر رفتار تورمی و رهایش دارو در pH‌های متفاوت بررسی شدند.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) با درجه استخلاف ۰/۵۵ تا ۰/۱۰۰ و گرانیوی ۱۵۰۰۰ mPas/s (۱٪ در آب °C ۲۵) از شرکت نیپون (ژاپن) و دی‌اتانول‌دی‌آمین، آلژینات، وانادیم سولفات ($VaSO_4$)، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلی‌لاکتیک اسید -co- گلیکولیک اسید (PLGA)، از مرک آلمان تهیه شد. انسولین از شرکت اکسیر (ایران) تهیه شده است. طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه نمونه‌ها با دستگاه طیف‌سنجی (مدل Aquinox 55 از شرکت بروکر آلمان) در گستره ۴۰۰ تا 4000 cm^{-1} با دقت 0.5 cm^{-1} و با تهیه قرص KBr ثبت شدند. تشخیص و بررسی الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌ها با پراش سنج زیمنس در ۳۵ کیلوولت در گستره 2θ از ۲ تا ۷۰ درجه و سرعت پویش ۱ درجه

به دست آمده با هیدروژل CMC-PEG-PLGA/V/insulin در گستره غلظت از ۳ تا ۱۰۰۰ (µg/ml) برای ۷۲ ساعت در گرمخانه قرارداد شد. پس از آن، سلول‌ها شسته و ۲۰ میکرولیتر واکنشگر MTT^۲ به آن‌ها افزوده شد. محیط با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO در هر لایه جایگزین شد و جذب محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر به دست آمد و سپس با نمودار استاندارد، تعداد سلول‌ها محاسبه شد. برای آزمون سمیت سلولی از هیدروژل نانو چندسازه V3 استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

طیف‌های فروسرخ تبدیل فوریه هیدروژل‌های خالص و نانو چندسازه در شکل ۱ ارائه شده‌اند. در طیف هیدروژل خالص، نوار 3424 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های OH است [۳۸ و ۳۹]. نوار 2885 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی C-H مرتبط با اتم‌های هیدروژن گروه متیل حلقه که ترکیب شدن CMC با PEG و PLGA با پوشش آلژینات را تایید می‌کند. نواری که در ناحیه 1624 cm^{-1} است، نشان‌دهنده نوار جذبی گروه‌های کربونیل موجود در بسپارها است.

هیدروژل نانو چندسازه CMC-PEG-PLGA/V در ۵۰ میلی‌لیتر محلول‌های بافر تهیه شده با pH مناسب در دمای اتاق برای ۴۵۰ دقیقه غوطه‌ور شد تا به حداکثر ظرفیت تورم برسد. رفتار تورمی هیدروژل نانو چندسازه بر پایه معادله ۱ تعیین شد.

$$(1) \quad (SR\%) = \frac{(w_t - w_0)}{w_0} \times 100$$

که در آن، w_0 وزن اولیه نمونه خشک و w_t وزن نمونه متورم است.

رفتار رهائش دارو

رهائش دارو هیدروژل‌ها در pHهای برابر با ۲/۱ و ۷/۴ برای ۲۴ ساعت بررسی شد. در این آزمایش، ۰/۱ گرم هیدروژل نانو چندسازه حامل دارو در ۱۰ میلی‌لیتر محیط رهائش یکسان در دمای 37°C در داخل کیسه دیالیز قرارداد و با سرعت ۶۰ rpm هم‌زده شد. در تعیین زمان اولیه، مقادیر کافی از نمونه‌ها جمع‌آوری و مقدار رهائش دارو با طیف‌سنجی UV تعیین شد. برای نگهداری حجم ثابت، حجم برداشته شده با بافر تازه جایگزین می‌شد. نمونه‌های دارو رهائش شده از هیدروژل‌های نانو چندسازه CMC-PEG-PLGA/V با طیف‌سنجی UV بررسی و مقدار انسولین با نمودار واسنجی^۱ استاندارد تحت شرایط یکسان اندازه‌گیری شد [۳۸]. مقدار بارگذاری دارو در هیدروژل با معادله ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت.

$$(2) \quad \text{مقدار هیدروژل} / \text{مقدار دارو در هیدروژل} = \text{بارگذاری دارو (گرم/گرم)}$$

اندازه‌گیری سمیت سلولی

سمیت سلولی هیدروژل نانو چندسازه CMC-PEG-PLGA/V/insulin در برابر سلول‌های انسان (HT1080) با سنجش MTT انجام شد. به‌طور خلاصه، ۸۰۰۰ سلول / لایه در ۹۶ خانه (در هر چاهک ظرف‌های ۹۶ خانه) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند. سلول‌های

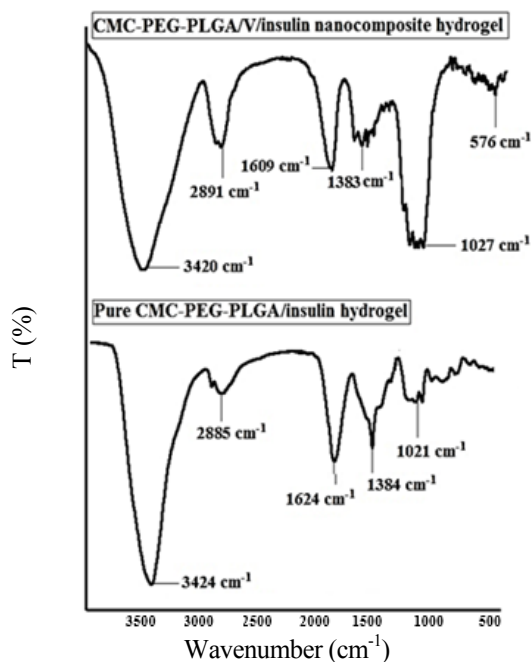
1. Calibration

2. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

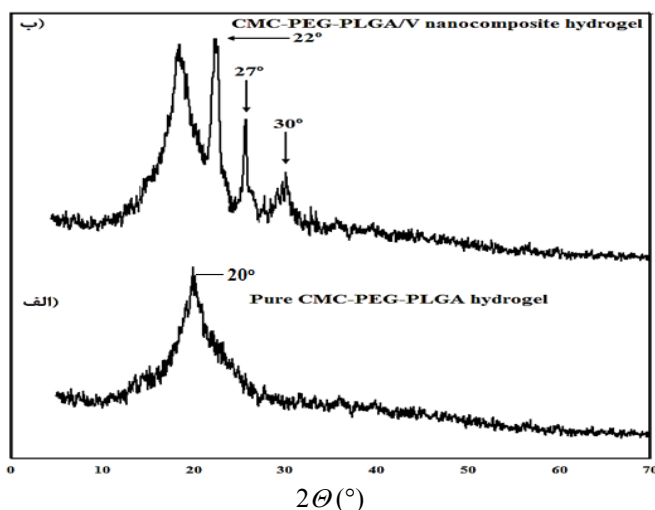
نواری که در ناحیه 1384 cm^{-1} وجود دارد، مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های کربوکسیلات است. نوار جذبی در 1021 cm^{-1} به ارتعاش‌های کششی C-O بر ساختار پلی‌ساکارید نسبت داده شده است [۴۰]. در طیف فروسرخ تبدیل فوریه هیدروژل نانوچندسازه، نوار موجود در 1609 cm^{-1} مربوط به هیدروژل نانوچندسازه وانادیم است. در مقایسه با طیف هیدروژل خالص، نوارهای اضافی در هیدروژل نانوچندسازه در ناحیه 400 cm^{-1} تا 700 cm^{-1} وجود دارد که به پیوندهای اکسیژن-فلز (V-O) ترکیب شده در هیدروژل مربوط است.

بررسی الگوهای پراش پرتو ایکس

الگوهای پراش پرتو ایکس هیدروژل خالص و هیدروژل نانوچندسازه وانادیم در گستره 2θ بین 2° تا 30° در شکل ۲ نشان داده شده است. یک پیک پهن در 20° درجه وجود دارد که مربوط به شبکه‌های بسیاری است. در الگوی نانوچندسازه وانادیم، پیک‌هایی در 22° ، 27° و 30° درجه مشاهده می‌شود که مربوط به تشکیل نانوذرات وانادیم در ساختار هیدروژل است [۹ و ۱۱].



شکل ۱ طیف فروسرخ تبدیل فوریه هیدروژل خالص و هیدروژل نانوچندسازه

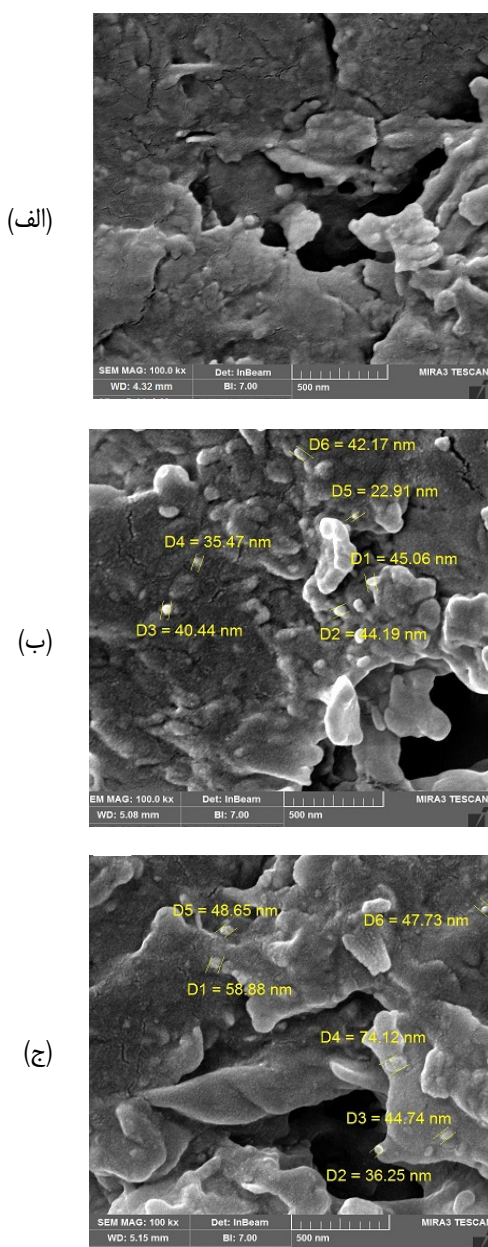


شکل ۲ الگوهای پراش پرتو ایکس (الف) هیدروژل CMC-PEG-PLGA خالص و (ب) هیدروژل نانوچندسازه CMC-PEG-PLGA/V

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

ریخت‌شناسی سطحی یکی از مهم‌ترین عامل‌ها در تعیین رفتار رهایش دارو از هیدروژل‌ها است. برهم‌کنش‌های سطحی بسپارها و نانوذرات وانادیم می‌تواند ریخت‌شناسی سطحی هیدروژل‌های نانوپندسازه را تغییر داده و سرعت رهایش را تحت تاثیر قرار دهد. ریخت‌شناسی و اندازه ذرات و ساختار هیدروژل نانوپندسازه حاوی نانوذرات با تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام شد.

در شکل ۳-الف، یک سطح شفاف و یکنواخت از هیدروژل خالص مشاهده شده است. از طرف دیگر، در شکل‌های ۳-ب و ج یک سطح منقبض شده از هیدروژل نانوپندسازه حاوی نانوذرات وانادیم را نشان می‌دهند که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات وانادیم با اندازه ذرات ۲۲ تا ۴۴ و ۳۶ تا ۷۴ نانومتر هستند که به ترتیب مربوط به هیدروژل نانوپندسازه حاوی نانوذرات وانادیم با غلظت‌های ۰/۰۱ (V1) و ۰/۰۳ (V3) مولار هستند. وجود نانوذرات وانادیم داخل شبکه‌های بسیار به قرار گرفتن یون‌های وانادیم، بر سطح هیدروژل متورم نسبت داده می‌شود. همچنین، با توجه به تفسیر طیف جذبی هیدروژل نانوپندسازه موردنظر، با افزایش غلظت، اندازه و تجمع ذرات بیشتر می‌شود.



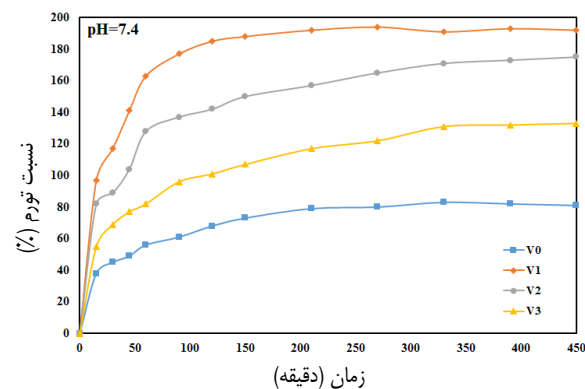
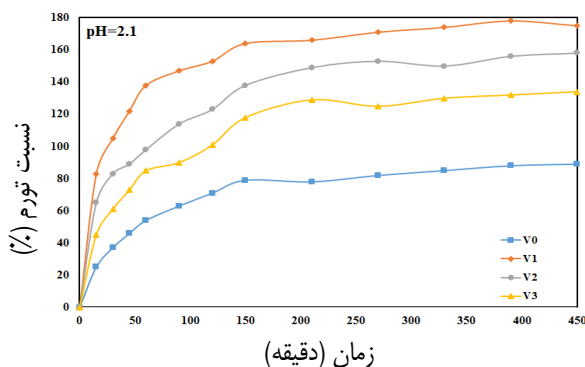
شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی هیدروژل‌های CMC-PEG-PLGA خالص (الف)، CMC-PEG-PLGA/V1 (ب) و CMC-PEG-PLGA/V3 (ج)

نانوذرات وانادیم باردار منجر به نفوذ آب بیشتر در ساختار هیدروژل، برای تنظیم فشار اسمزی یونی ایجاد شده می‌شود و در نهایت، تورم هیدروژل به دست می‌آید [۸ و ۹]. افزون‌براین، تشکیل نانوذرات وانادیم در شبکه هیدروژل می‌تواند منجر به گسترش شبکه هیدروژل و افزایش حفره‌ها و فضای خالی بین شبکه‌ها شود که نتیجه آن جذب بیشتر آب است. با افزایش مقدار نانوذرات وانادیم از نمونه V1 مولار به V2 و V3 مولار، مقدار تورم هیدروژل‌های نانوجندسازه کاهش می‌یابد. این روند می‌تواند به دلیل عملکرد نانوذرات وانادیم به عنوان پیوند عرضی در مقادیر بالاتر نانوذرات وانادیم باشد [۳۹].

بررسی رفتار رهائش دارو

برای بررسی رهائش دارو بافرهای با pH برابر با ۲/۱ و ۷/۴ به کار گرفته شد. مقدار ۰/۱ گرم از هر نمونه حاوی دارو در ۲۰ میلی‌لیتر بافر ریخته و به مدت ۲۴ ساعت رهائش بررسی شد. در هر بازه زمانی، جذب داروی آزاد شده با دستگاه طیف‌سنجی اندازه‌گیری و مقادیر جذب با معادله واسنجی در بافرهای ۲/۱ و ۷/۴ به صورت درصد داروی آزاد شده به دست آمد. جدول ۱، مقادیر انسولین ترکیب شده به عنوان یک داروی خالص و کسر رهائش دارو در نانوجندسازه را نشان می‌دهد. نمودارهای داروی آزاد شده نسبت به زمان برای نمونه‌های هیدروژل نانوجندسازه حاوی نانوذرات وانادیم در شکل ۵ ارایه شده است. با بررسی رهائش دارو از هیدروژل نانوجندسازه و هیدروژل خالص مشاهده می‌شود که مقدار رهائش در هیدروژل‌های نانوجندسازه کمتر است. همچنین، با افزایش غلظت نانوذرات در بستر هیدروژل، مقدار رهائش کاهش می‌یابد. وجود نانوذرات با کاهش تحرک زنجیرهای بسپارها و دارو ایجاد مسیر طولانی‌تر برای دارو برای خروج از هیدروژل و ورود به محیط رهائش، موجب کاهش سرعت رهائش دارو از هیدروژل نانوجندسازه می‌شوند [۷۰، ۷۱ و ۲۷]. با این وجود، در محیط اسیدی گروه کربوکسیل CMC و PLGA و گروه الکولات در PEG به شکل یونیده نشده هستند. این عوامل ممکن است موجب ایجاد

شکل ۴ رفتار تورمی هیدروژل‌های نانوجندسازه حاوی نانوذرات وانادیم را در pHهای ۲/۱ و ۷/۴ نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تورم هیدروژل‌ها در pH برابر با ۷/۴ بالاتر از مقدار اندازه‌گیری شده در pH برابر با ۲/۱ است. در pH برابر با ۷/۴، گروه‌های کربوکسیل درشت‌مولکول‌های بسپارهای مربوط، در محیط آب تفکیک و به بار منفی یون‌های کربوکسیلات تبدیل می‌شود و در نتیجه، دافعه الکترواستاتیک بین زنجیرهای بسپارها بالاتر رفته و توانایی جذب آب بیشتر می‌شود [۱۵ و ۴۱].

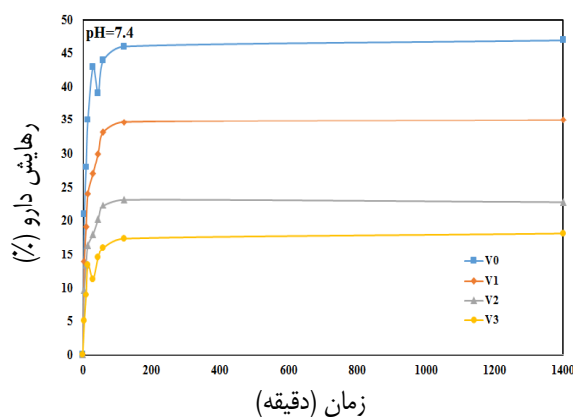
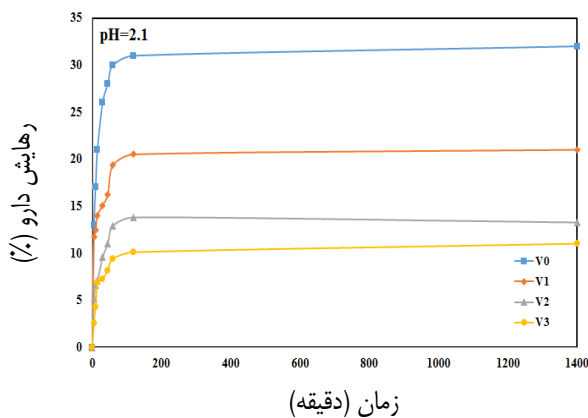


شکل ۴ رفتار تورمی هیدروژل‌های نانوجندسازه وانادیم در pHهای ۲/۱ و ۷/۴

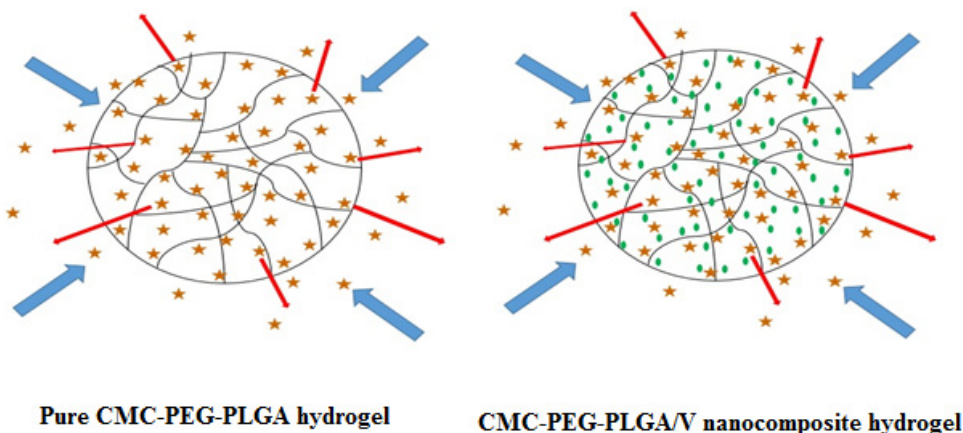
همچنین، هیدروژل نانوجندسازه حاوی وانادیم تورم بیشتری نسبت به هیدروژل خالی نشان می‌دهد که به دلیل وجود نانوذرات وانادیم با اندازه، ریخت‌شناسی و بار سطحی متفاوت است.

هیدروژل CMC-PEG-PLGA یونیده و منجر به افزایش دافعه الکترواستاتیک بین گروه‌های باردار و افزایش فشار اسمزی می‌شود. سازوکار رهائش دارو از هیدروژل‌های نانوچندسازه CMC-PEG-PLGA/V در شکل ۶ نشان داده شده است.

هیدروژل CMC-PEG-PLGA نامحلول با رهائش دارو شود. بنابراین، رهائش انسولین از آن هیدروژل‌ها ممکن است با سازوکار نفوذ بستر کنترل شده توصیف شود. با این حال، در بافر فسفات با pH برابر با ۷/۴ گروه‌های کربوکسیلیک اسید بر زنجیره‌های



شکل ۵ رفتار رهائش دارو هیدروژل‌های نانوچندسازه CMC-PEG-PLGA حاوی غلظت‌های متفاوت نانوذرات وانادیم در pHهای ۲/۱ و ۷/۴



شکل ۶ سازوکار رهائش دارو هیدروژل CMC-PEG-PLGA خالص و هیدروژل نانوچندسازه CMC-PEG-PLGA/V

زنده ماندن سلولی مربوط به غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ انسولین و بیشترین زنده ماندن سلولی مربوط به غلظت $1000 (\mu\text{g/ml})$ انسولین با $25/7\%$ سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل بود. در غلظت‌های $3/9.06$ تا $15/625 \mu\text{g/ml}$ هیچ‌گونه سمیت سلولی مشاهده نمی‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که نانوذرات وانادیم (V3) موجب زنده ماندن سلول‌ها و افزایش سلول‌ها در عرض 24 ساعت و رشد و تکثیر سلول‌های باقی‌مانده می‌شود.

نتیجه‌گیری

هیدروژل‌های نانوجندسازه CMC-PEG-PLGA حاوی نانوذرات وانادیم با روش سنتز درجا تهیه شدند. رفتار تورمی آن‌ها در pHهای $2/1$ و $7/4$ و کاربرد آن‌ها به عنوان حامل دارو بررسی شد. الگوهای پراش پرتو ایکس و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی تشکیل نانوذرات را نشان داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات با اندازه 22 تا 74 نانومتر به طور یکنواخت در شبکه هیدروژل پخش شدند. نتایج رفتار تورم نشان داد که مقدار جذب آب هیدروژل‌ها تحت تاثیر pH محیط و غلظت نانوذرات است و وجود نانوذرات موجب افزایش تورم در هیدروژل‌ها می‌شود. با بررسی نمودار رهائش دارو از هیدروژل‌های نانوجندسازه و هیدروژل خالص مشاهده شد که مقدار رهائش در هیدروژل‌های نانوجندسازه کمتر است و با افزایش غلظت نانوذرات مقدار رهائش کمتر می‌شود. در آزمون سمیت سلولی پس از 24 ساعت، زنده ماندن سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل (به عنوان 100%) در گستره $74/3\%$ تا $96/05\%$ بود. در نمونه هیدروژل نانوجندسازه حاوی انسولین، پایین‌ترین زنده ماندن سلولی پس از 24 ساعت مربوط به غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ انسولین و بیشترین زنده ماندن سلولی مربوط به غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ با $25/7\%$ سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل بود.

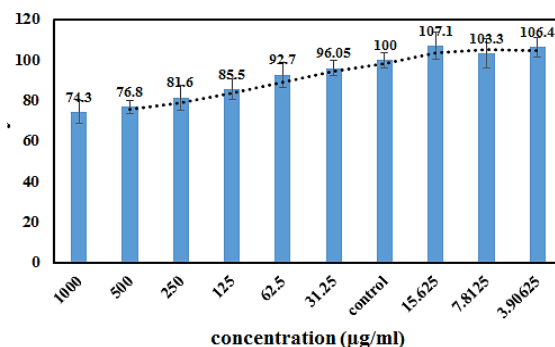
جدول 1 مقدار بارگذاری دارو و رهائش دارو هیدروژل‌های نانوجندسازه

CMC-PEG-PLGA/V

نمونه	V0	V1	V2	V3
مقدار بارگذاری دارو (گرم/گرم)	0.00949	0.00835	0.00763	0.00739
رهائش دارو در 1400 دقیقه در pH برابر با 2/1	32	21	13/28	11/02
رهائش دارو در 1400 دقیقه در pH برابر با 7/4	46/09	35/01	22/85	18/16

کارایی درمانی نمونه‌های CMC-PEG-PLGA/V/insulin

سمیت انسولین بارگذاری شده بر هیدروژل نانوجندسازه (CMC-PEG-PLGA/V/insulin) بر سلول‌های HT1080 با سنجش MTT در مدت 24 ساعت طول عمر سلولی، تعیین شد. نتایج به دست آمده در شکل 7 نشان داده شده است.



شکل 7 آزمون پایداری MTT سلول‌های HT1080 تیمار شده با هیدروژل نانوجندسازه CMC-PEG-PLGA/V/insulin در گستره غلظت 3 تا $1000 \mu\text{g/ml}$ در مدت 24 ساعت

این شکل به روشنی نشان می‌دهد که هیدروژل نانوجندسازه CMC-PEG-PLGA/V بارگذاری شده با انسولین موجب کاهش قابل توجهی در مقدار زنده ماندن سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت دارو شده است. پس از 24 ساعت، زنده ماندن سلول‌ها در گستره $74/3\%$ تا $96/05\%$ ، در مقایسه با نمونه کنترل به عنوان 100% بود. در نمونه V3، پس از 24 ساعت، پایین‌ترین

مراجع

- [1] Jafari, B.; Rafie, F.; Davaran, S.; *BioImpacts* 1(2), 135-143, 2011.
- [2] Capanema, N.S.V.; Mansur, A.A.P.; De Jesus, A.C.; Carvalho, S.M.; De Oliveira, L.C.; Mansur, H.S.; *Int J Biol Macromol.* 106, 1218-1234, 2018.
- [3] Fathi, M.; Barar, J.; Aghanejad, A.; Omid, Y.; *BioImpacts* 5(4), 159-164, 2015.
- [4] Nokhodchi, A.; Raja, S.; Patel, P.; Asare-Addo, K.; *BioImpacts* 2(4), 175-187, 2012.
- [5] Javanbakht, S.; Pooresmaeil, M.; Namazi, H.; *Carbohydr Polym.* 208, 294-301, 2019.
- [6] Aloisi, G.G.; Costantino, U.; Latterini, L.; Nocchetti, M.; Camino, G.; Frache, A.; *J Phys Chem Solids.* 67, 909-914, 2006.
- [7] Zare-Akbari, Z.; Farhadnejad, H.; Furughi-Nia, B.; Abedin, S.; Yadollahi, M.; Khorsand-Ghayeni, M.; *Int J Biol Macromol.* 93, 1317-1327, 2016.
- [8] Yadollahi, M.; Gholamali, I.; Namazi, H.; Aghazadeh, M.; *Int J Biol Macromol.* 73, 109-114, 2015.
- [9] Gholamali, I.; Hosseini, S.N.; Alipour, E.; Yadollahi, M.; *Starch/Stärke.* 71, 1800118-1800120, 2019.
- [10] Yadollahi, M.; Farhoudian, S.; Barkhordari, S.; Gholamali, I.; Farhadnejad, H.; Motasadizadeh, H.; *Int J Biol Macromol.* 82, 273-278, 2016.
- [11] Namazi, H.; Hasani, M.; Yadollahi, M.; *Int J Biol Macromol.* 126, 578-584, 2019.
- [12] Hebeish, A.; Hashem, M.; Abd El-Hady, M.M.; Sharaf, S.; *Carbohydr Polym.* 92, 407-413, 2013.
- [13] Cam, M.C.; Rodrigues, B.; McNeill, J.H.; *Eur J Endocrinol.* 141, 546-554, 1999.
- [14] Thompson, K.H.; Orvig, C.; *J Inorg Biochem.* 100, 1925-1935, 2006.
- [15] Yadollahi, M.; Gholamali, I.; Namazi, H.; Aghazadeh, M.; *Int J Biol Macromol.* 74, 136-141, 2015.
- [16] Mitikka-Eklund, M.; Halttunen, M.; Melander, M.; Ruuttunen, K.; Vuorinen, T.; *Int J Biol Macromol.* 1, 423-439, 1999.
- [17] Namazi, H.; Toomari, Y.; Abbaspour, H.; *BioImpacts* 4(4), 175-182, 2014.
- [18] Erkan, N.; Dogruyol, H.; Gunlu, A.; Genc, I.Y.; *J Food Health Sci.* 1(1), 33-49, 2015.
- [19] Lee, J.I.; Kim, H.S.; Yoo, H.S.; *Int J Pharm.* 373, 93-99, 2009.
- [20] Tan, L.; Liu, Y.; Ha, W.; Ding, L.S.; Peng, S.L.; Zhang, S.; Li, B.J.; *Soft Matter.* 8, 5746-5749, 2012.
- [21] Ebrahimnezhad, Z.; Zarghami, N.; Keyhani, M.; Amirsaadat, S.; Akbarzadeh, A.; Rahmati, M.; Mohammad Taheri, Z.; Nejati-Koshki, K.; *BioImpacts* 8(4), 321, 2018.
- [22] Fu, B.X.; Hsiao, B.S.; Chen, G.; Zhou, J.; Koyfman, I.; Jamiolkowski, D.D.; Dormier, E.; *Polym.* 43(20), 5527-5534, 2002.
- [23] Hurrell, S.; Cameron, R.E.; *Biomaterials* 23(11), 2401-2409, 2002.
- [24] Florence, A.T.; *Pharm Res.* 14(3), 259-266, 1997.
- [25] Tobio, M.; Sanchez, A.; Vila, A.; Soriano, I.; Evora, C.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J.; *Colloids Surf B Biointerfaces.* 18(3-4), 315-323, 2000.
- [26] Soveid, M.; Dehghani, G.A.; Omrani, G.R.; *Archives of Iranian Medicine* 16(7), 408-411, 2013.
- [27] Bolkent, S.; Yanardag, R.; Tunali, S.; *Diabetes Research and Clinical Practice* 70, 103-109, 2005.
- [28] Mortazavi, P.; Aghaei Meybodi, M.; Poosty, I.; Hoseiny, S.; *J comp Pathobiology.* 11(3), 1389-1396, 2014.
- [29] Lee, K.Y.; Mooney, D.J.; *Prog Polym Sci.* 37(1), 106-126, 2012.
- [30] Li, X.; Feng, J.; Zhang, R.; Wang, J.; Su, T.; Tian, Z.; *J Biomed Nanotechnol.* 12(5), 948-961, 2016.
- [31] Shapiro, L.; Cohen, S.; *Biomaterials* 18(8), 583-590, 1997.
- [32] Capannesi, C.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Parenti, A.; *Food Chem.* 71(4), 553-562, 2000.
- [33] Gonzalez-Pujana, A.; Orive, G.; Pedraz, J.L.; Santos-Vizcaino, E.; Hernandez, R.M.; *Alginate*

- and Their Biomedical Applications 13, 67-100, 2017.
- [34] Silva, C.M.; Ribeiro, A.J.; Figueiredo, I.V.; Gonçalves, A.R.; Veiga, F.; Int J Pharmaceut. 311(1-2), 1-10, 2006.
- [35] Hua, Q.; Protein Cell. 1, 537-551, 2010.
- [36] Gurramkonda, C.; Polez, S.; Skoko, N.; Adnan, A.; Gäbel, T.; Chugh, D.; Swaminathan, S.; Khanna, N.; Tisminetzky, S.; Rinas, U.; Microb Cell Fact. 9, 31, 2010.
- [37] Kamari, Y.; Ghiaci, P.; Ghiaci, M.; Mat Sci Eng C. 75, 822-828, 2017.
- [38] Barkhordari, S.; Yadollahi, M.; Namazi, H.; J Polym Res. 21(6), 1-9, 2014.
- [39] Farhoudian. S.; Yadollahi, M.; Namazi, H.; Int Biol Macromol. 82, 837-843, 2016.
- [40] Yadollahi, M.; Namazi, H.; Aghazadeh, M.; Int J Biol Macromol. 79, 269-277, 2015.
- [41] Zakhireh, S.; Mahkam, M.; Yadollahi, M.; Jafarirad, S.; J Polym Res. 21, 398-404, 2014.

Vanadium cross-linked CMC-PEG-PLGA based on nanocomposite hydrogel with sodium alginate coating as a pH-sensitive insulin delivery system

Seyyed Nabiollah Hosseini¹, Asieh Abbassi Dolavi^{2,*}, Seyed Javad Zia-e-Haq³, Ayyub Saeedi⁴

1 .Ph.D student in Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Unit, Islamic Azad University, Amol, Iran

2 .Assistant Prof. of Sport Physiology, Department of Sport Physiology Unit Ayatollah Amoli, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3 .Assistant Prof. of Sport Physiology, Department of Sport Physiology, Shahroud Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

4 .Assistant Prof. of Life Sciences in Sport and Health, Department of Life Sciences in Sport and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Abstract: In recent years, significant advances have been made in the use of biomedical polymers as targeted carriers for the release of drugs, proteins, and growth factors. Vanadium (V) nanocomposite hydrogels were prepared in this study due to the formation of vanadium nanoparticles inside the swollen CMC hydrogels. The formation of vanadium (V) nanoparticles in hydrogels has been studied using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction patterns (XRD), scanning electron microscopy (SEM) experimental techniques. The XRD patterns analysis confirmed the formation of vanadium nanoparticles in a hydrogel matrix, and scanning electron microscopy micrographs also showed that the size of the nanoparticles was from 22 to 74 nm in the hydrogel matrix. The swelling behavior of nanocomposite hydrogels was studied at pH of 2.1 and 7.4. Hydrogels have shown better water absorption in less pH. Fourier transform infrared spectroscopy indicates the interaction between polysaccharides and the samples taken from the drug indicate that the drug-loaded peaks were loaded appropriately. With the release of drug from nanocomposite and pure hydrogel hydrogels, it was observed that its release rate in nanocomposite hydrogels was lower and the amount of its release decreased with increasing percentage of nanoparticles. In the cytotoxicity test after 24 h, the cell viability was in the range of 74.35% -96.05% (compared with the control sample, which was 100%). In the hydrogel nanocomposite sample containing insulin had the lowest cell viability of insulin 31.25 µg/ml after 24 h and it had the highest cell viability at 1000 (µg/ml) concentration with 25.7% cell cytotoxicity compared to the control group.

Keywords: CMC, PEG, PLGA, Alginate, Nanocomposite hydrogel, Vanadium nanoparticles, Insulin delivery.