

Synthesis and optimization of effective dose of niosomal amikacin for antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa*

Fardin Rahimi¹, Mahsa Bahramgour², Ghassem Amoabediny^{2*}, Azam Bagheri Pebdeni¹, Bahman Ebrahimi Hosseinzadeh², Zeynab Amoabediny²

1. Department of Nanobiotechnology, Research Laboratory of Shahed University, Tehran, Iran
2. Department of Biological Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: amoabediny@ut.ac.ir

Citation: Rahimi F, Bahramgour M, Amoabediny Gh, Bagheri Pebdeni A, Ebrahimi Hosseinzade B, Amoabediny Z. Synthesis and optimization of effective dose of niosomal amikacin for antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa*. Daneshvar Medicine 2022; 29(6):86--100. doi: 10.22070/DANESHMED.2021.15391.1145

Abstract

Background and Objective: Niosomes are one of the new drug delivery systems. In this synthesis study, the properties and characteristics of nanosystems loaded amikacin for the aim of slow releasing and antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* were been investigated.

Materials and Methods: The synthesis nanocarriers were characterized by using DLS, zeta potential, SEM images, and FTIR analysis. The percentage of drug loading in the nanosystems were measured. After that, the release rate of the drug was checked. MIC microbiological tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Pseudomonas aeruginosa*. Finally, with MTT method, the toxicity and effectiveness of the system on cell line A549 extracted from lung were evaluated.

Results: In this study, by synthesis and optimization, with the highest loading efficiency of 95.15% at the formulations and the slowest release with a drug release rate of 65.27% in 60 hours to reduce the side effects of amikacin. We were able to increase the antimicrobial activity of amikacin niosomal against *Pseudomonas aeruginosa* and reduce the side effects compared to the free form and have a slower and more continuous release with greater effectiveness on bacteria. Studying this process on the lung cell lines was successful and free-form of amikacin has a more toxic effect than two drug-free and drug-free niosomal systems. Numerous mathematical models, including realistic and experimental/quasi-experimental mechanistic models, have been successfully introduced to quantitatively define drug release mechanisms and play an important role in designing a drug delivery system for drug release diagrams. That reported in results

Conclusion: Achieving optimal conditions for the preparation of nanosystems carrying amikacin and investigating the effect of this system on bacterial agents is an important step in science, research, and economic efficiency.

Keywords: Nanosystem, Niosome, Amikacin, Antibacterial activity, *Pseudomonas aeruginosa*

Received: 14 Aug 2021

Last revised: 07 Dec 2021

Accepted: 19 Dec 2021

سنتز و بهینه سازی دوز موثر آمیکاسین نیوزومی و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر سودوموناس آئروژینوزا

مقاله پژوهشی

نویسندگان: فردین رحیمی^۱، مهسا بهرام گور^۲، قاسم عموعابدینی^{۲*}، اعظم باقری پدنی^۱، بهمن ابراهیمی حسین زاده^۱، زینب عموعابدینی^۲

۱. گروه پژوهشی نانوبیوتکنولوژی و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: amoabediny@ut.ac.ir

*نویسنده مسئول: قاسم عموعابدینی

چکیده

مقدمه و هدف: نیوزوم‌ها یکی از سامانه‌های نوین دارورسانی می‌باشند. در این تحقیق سنتز و ویژگی‌های نانونیوزوم حامل داروی آمیکاسین جهت رهایش پیوسته دارو و اثر ضدباکتریایی آن بر سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است.

مواد و روش‌ها: نانوحامل‌های ساخته شده با استفاده از روش‌های تفرق نوری پویا، پتانسیل زتا، تصاویر SEM و آنالیز FTIR مشخصه‌یابی شدند. در مرحله بعد درصد بارگذاری دارو در نانونیوزوم‌های حاوی دارو اندازه‌گیری شد. پس از آن میزان رهایش دارو بررسی گردید. آزمون‌های میکروبی MIC جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو بر سویه سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت. در نهایت با استفاده از روش رنگ سنجی MTT میزان سمیت و اثربخشی سامانه بر روی رده سلولی A۵۴۹ مستخرج از بافت ریه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در این پژوهش با بهینه‌سازی می‌توان بیشترین راندمان بارگذاری ۹۵/۱۵٪ در بین فرمول‌بندی‌ها و آهسته‌ترین رهایش با درصد رهایش دارو ۶۵/۲۷٪ در ۶۰ ساعت را جهت کاهش عوارض داروی آمیکاسین انجام داد. توانستیم فعالیت ضد میکروبی آمیکاسین نیوزومی را بر سودوموناس آئروژینوزا افزایش و عوارض جانبی آن را نسبت به فرم آزاد کاهش دهیم که رهایش آهسته و پیوسته‌تری با اثرگذاری بیشتر داشته باشد. بررسی این فرایند بر رده سلول‌های ریوی مبتلا به عوامل باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا موفقیت‌آمیز بود و آمیکاسین به فرم آزاد اثر سمیت بیشتری نسبت به دو سامانه نیوزومی فاقد و دارای دارو دارد. مدل‌های ریاضی متعددی شامل مدل‌های مکانیستیک رئالیستیک و تجربی/نیمه تجربی با موفقیت برای تعریف کمی مکانیزم‌های رهایش دارو معرفی شده‌اند و نقش مهمی در طراحی یک سامانه دارورسانی برای نمودار رهایش دارو دارند که نتایج نیز با کمک آن‌ها بررسی شده است.

نتیجه‌گیری: با دستیابی به شرایط بهینه برای تهیه نانو نیوزوم‌های حامل داروی آمیکاسین و بررسی تاثیر این سامانه بر روی عوامل باکتریایی قدم مهمی را در علم و تحقیق، صرفه اقتصادی به دست آوریم.

واژه‌های کلیدی: نانسامانه، نیوزوم، آمیکاسین، فعالیت ضدباکتریایی، سودوموناس آئروژینوزا انجمادی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

مقدمه

نانوحامل‌ها یا سامانه‌های مبتنی برنانوذرات، از تجزیه داروها محافظت کرده و مقادیر قابل توجهی از دارو را در خود جای می‌دهند. همچنین زمان اتصال را طولانی‌تر نموده و دفعات مصرف دارو را کاهش می‌دهند. سامانه‌های دارورسانی باعث کاهش عوارض جانبی دارو و افزایش بازدهی آن می‌گردد (۸). هدف اصلی از طراحی نانوذرات به‌عنوان یک سیستم انتقالی به خاطر کنترل اندازه ذرات، خصوصیات سطحی و رهایش مؤثر و بدون عوارض جانبی آن جهت انتقال عوامل فعال فارماکولوژیکی در طول درمان است (۹).

نیوزوم به عنوان سیستم نوین دارورسانی توسط خودتجمعی سورفاکتانت‌های غیریونی در محیط آبی شکل می‌گیرند. این سامانه به عنوان حامل دارو موجب کاهش سمیت و شاخص‌های درمانی را به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهند. نیوزوم‌ها می‌توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن درون بدن کاسته می‌شود. همچنین باعث می‌شود که نیمه‌عمر دارو در بدن بیشتر شود و موجب می‌شود که به منظور درمان بیماری دوز کمتری از دارو نیاز باشد. این روش به کاهش اثر جانبی دارو و اثرات تخریبی آن روی بافت‌های مختلف منجر می‌شود. هر چند از لحاظ ساختاری به لیپوزوم شباهت دارد، اما مزایای بسیار بیشتری نسبت به آن دارد (۱۰، ۱۱). از جمله مزایای نیوزوم‌ها پایداری بالاتر نسبت به سامانه‌های وزیکولی دیگر، توانایی بارگذاری داروهای آب‌دوست و آب‌گریز و قیمت پایین‌تر است (۱۲، ۱۳). نیوزوم‌ها قادرند انواع مختلفی از داروها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها را در خود به دام بیندازند (۱۴). نیوزوم‌ها عمدتاً حاوی دو نوع ترکیب هستند، سورفاکتانت‌های غیر یونی و افزودنی‌ها. سورفاکتانت‌های غیر یونی لایه وزیکولی را شکل می‌دهند و افزودنی‌ها در تهیه نیوزوم نقش دارند که شامل کلسترول، مولکول‌های باردار و پایدارکننده‌ها هستند (۱۵). کلسترول بخش مهمی از وزیکول است و وجود آن در غشا بر سیالیت و نفوذپذیری دو لایه اثر می‌گذارد. علت استفاده از لیپید باردار در تهیه نیوزوم‌ها، جلوگیری از به هم چسبیدن و تجمع ذرات کلوتیدی است. استفاده از لیپید شارژ دار می‌تواند بر روی راندمان بارگذاری و میزان

مناسب‌ترین روش درمان عفونت‌های باکتریایی انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارایی و اثربخشی بالاست. به دلیل ایجاد ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وسیله باکتری‌ها در طی زمان و در مناطق جغرافیایی مختلف از یک سو و تغییر الگوی حساسیت باکتری‌ها نسبت به آن‌ها از سوی دیگر، انتخاب آنتی‌بیوتیکی مناسب برای درمان، به یک چالش تبدیل شده است (۱). عفونت‌های بیمارستانی از سه جنبه ابتلا، مرگ‌ومیر و زیان‌های اقتصادی حائز اهمیت هستند. درمان عفونت‌های بیمارستانی با توجه به مقاومت اغلب سویه‌های میکروبی بسیار مشکل و به علت طولانی شدن زمان بستری بیماران، پرهزینه است. سودوموناس آئروژینوزا نوعی باکتری هوازی و گرم منفی است که در افراد با سطح ایمنی کاهش‌یافته منجر به بروز عفونت‌های فرصت‌طلب با میزان مرگ‌ومیر بالا می‌شود. این نوع از باکتری‌ها جزء بیشترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه است که نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۲). دستگاه تنفسی شایع‌ترین محل برای لانه‌گزینی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. این ارگانسیم رتبه‌ی اول را به عنوان پاتوژن مسبب پنومونی مربوط به دستگاه تنفس مصنوعی دارد که در عرض ۲۴ الی ۴۸ ساعت بر روی دستگاه کلونیزه می‌شود. گزارشات آمار مرگ‌ومیر ۷۰ الی ۸۰ درصد را با توجه به سختی تشخیص و درمان نشان می‌دهد. این باکتری دلیل اصلی عفونت مزمن راه‌های هوایی در افراد مستعد به عفونت مانند سیستمیک فیبروزیس و بیماری برونشیت مزمن می‌باشد (۳، ۴). این دارو از گروه آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدها و جز داروهای آب‌دوست است. این آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت‌های مختلف جدی ناشی از باکتری‌های گرم منفی هوازی و یا گرم مثبت هوازی از جمله بیماری فیبروز کیستیک، عفونت‌های بیمارستانی (عفونت‌های ریوی و مجاری ادراری)، سل (توبرکلوز) و مننژیت مصرف می‌شود (۵). رایج‌ترین مشکلات محدودکننده این دارو در استفاده پزشکی ایجاد مسمومیت کلیوی و شنوایی و فلج اعصاب عضلات و افزایش مقاومت باکتری‌ها بوده است (۶، ۷).

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات

مواد استفاده شده در این پژوهش عبارتند از توپین ۶۰، توپین ۸۰، سدیم تترابورات (بوراکس)، اتانول ۹۶٪، دی متیل سولفوکساید، آگار، مولر هیتون برات، کلروفرم که از شرکت مرک و کلسترول، پنی سیلین استرپتومایسین، آمیکاسین سولفات، دیس اتیل فسفات، RPMI، MTT از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شدند. حلال های مورد استفاده کلروفرم و DMSO در این مطالعه با درجه خلوص بالا استفاده شدند. سویه سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 2785) و رده سلول ریه A549 نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش نیز عبارتند از تبخیرکننده دوار (IKA-RV10 آلمان)، اولتراسونیکیت پروب دار (میزونیکس S84000 ایران)، شیکر و انکوباتور (IKA آلمان)، سانتریفیوژ یخچال دار (Hermle آلمان)، اسپکتروفتومتر (UV-VIS WPA آمریکا)، میکروسکوپ نوری (Olympus BH-2 ایتالیا)، دستگاه زتاسایز (DLS Malvern zen3600 انگلستان)، دستگاه FT-IR و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM Kyky-fm3200 چین).

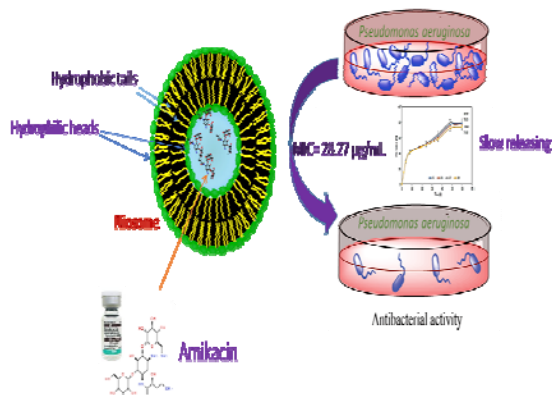
آزمون میکروسکوپ الکترونی پویشی

به منظور مطالعه نانوساختارهای از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. برای انجام این آزمون از دستگاه Scanning electron microscope SEM مدل Kyky-fm3200 ساخت کشور چین استفاده شد. در ابتدا مقداری از نمونه نیوزومی با فرمولاسیون های متفاوت F3 و F8 بر روی قطعاتی از گرید قرار گرفته و کل مجموعه گرید و نمونه با چسب دو طرفه نقره هادی پوشانده شد. سپس کل سطح آنها با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده شده و برای تصویربرداری از دستگاه SEM با ولتاژ ۲۶ کیلو ولت و بزرگنمایی ۴۰ هزار برابر مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه و سنتز نانونیوزوم های حاوی آمیکاسین

در این پژوهش از روش هیدراسیون لایه نازک برای ساخت نیوزوم های حاوی آمیکاسین استفاده شده است. در این روش ابتدا سورفکتانت و کلسترول با حضور دیس اتیل فسفات و در غیاب آن در حلال آلی درون یک بالن ته گرد

فراهمی زیستی دارو نیز مؤثر باشد (۱۵). در سپتامبر ۲۰۱۸ لیپوزوم استنشاقی حامل آمیکاسین توسط FDA برای درمان بیماری ریوی ناشی از باکتری مایکوباکتریوم آویوم^۱ در یک جمعیت کوچک بیماران مبتلا به بیماری که به درمان سنتی پاسخ نمی دهند، تایید شد (۱۶). علل اصلی استفاده از سیستم های وزیکولی از جمله نیوزوم و لیپوزوم برای داروهای آنتی بیوتیک، رهایش پیوسته و آهسته و کنترل شده دارو، کاهش دوز مورد نیاز و یا احتمال تجویز یک دوز بیشتر با کاهش عوارض جانبی، افزایش حساسیت باکتری به سیستم وزیکولی حامل دارو به وسیله آنزیم های بازدارنده، کاهش مقاومت باکتریایی و کاهش رشد باکتری و در واقع باعث افزایش اثربخشی دارو در طی درمان می شوند. نیوزومها بر لیپوزومها به دلیل ثبات و پایداری شیمیایی و هزینه کمتر و مقرون به صرفه بودن، ترجیح داده می شوند (۱۷). در پژوهش حاضر ضمن تهیه فرمولاسیون نیوزومی، برای اولین بار غلظت بهینه داروی آبدوست آمیکاسین جهت بارگذاری درون نانوذرات نیوزومی، الگوی رهایش دارو، شاخص پراکندگی، سایز و میزان درونگیری دارو ارزیابی شده است. در شکل ۱ تصویری از قرارگیری داروی آمیکاسین درون ساختار نانونیوزوم و فعالیت آنتی باکتریالی آن دیده می شود. در ادامه علاوه بر بررسی سمیت نانوحامل بر روی رده سلول های ریوی، فعالیت ضدباکتریایی آن بر باکتری پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا نیز مورد سنجش قرار گرفته است.



شکل ۱. قرارگیری داروی آمیکاسین درون نانوساختار نیوزوم و افزایش خاصیت ضدباکتریایی آن بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا با رهایش پیوسته

^۱ Mycobacterium avium

محلول آمیکاسین به فرم آزاد و نیز نانو نیوزوم‌های فاقد آمیکاسین به اضافه آمیکاسین به فرم آزاد همانند روش ذکر شده در بالا عمل شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده های آماری با استفاده از آزمون t -test برای مقایسه تفاوت بین گروه ها انجام شد و $P < 5$ درصد معنی دار در نظر گرفته شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و مقادیر میانگین گزارش شدند. کیفیت مناسب با استفاده از R^2 و تحلیل رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم افزار MATLAB (نسخه ۷/۸) انجام شد. (۲۰). انحراف استاندارد نسبی و میزان دقت محاسبه شد. برای تعیین میزان به دام افتادن دارو و رهاسازی دارو، محلول‌های استاندارد در محدوده غلظتی تهیه شد و با طیف‌سنجی UV در مقدار مشخصه I_{max} با استفاده از منحنی استاندارد داروها که در شرایط مشابه اندازه‌گیری گردید، آنالیز شدند.

نتایج

بررسی ویژگی‌های سامانه ی نیوزومی حامل آمیکاسین

ابتدا لازم است سامانه نیوزومی حاوی آمیکاسین مشخصه‌یابی شود. توزیع اندازه، پتانسیل زتا و مورفولوژی سامانه نیوزومی حاوی آمیکاسین بررسی می‌شود. در جدول ۱ در بخش نامگذاری فرمول، Sur:Chol:DCP به ترتیب نوع سورفکتانت، نسبت مولی کلسترویل به سورفکتانت و استفاده یا عدم استفاده از DCP در فرمول بندی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش مقدار سورفکتانت از ۳۷/۵ مول به ۵۰ مول (از نسبت کلسترویل به سورفکتانت ۱:۱ به ۱:۰/۵) و کاهش مقدار کلسترویل از ۳۷/۵ مول به ۲۵ مول (در حضور و فاقد DCP) اندازه نانو نیوزوم‌ها کاهش پیدا کرده است (به جز فرمول بندی F1 و F3) و حضور DCP در فرمول بندی باعث افزایش سایز شده است (به جز فرمول بندی F3).

حل می‌شوند. پس از تبخیر حلال آلی، فیلم لایه نازک تشکیل شده و سپس با آب مقطر هیدراته می‌گردد (۱۸).

اختلاط فاز لیپیدی و تشکیل فیلم نازک

برای تهیه نانو سامانه نیوزومی آمیکاسین، مقادیر مورد نیاز از سورفکتانت و کلسترویل و دیس اتیل فسفات (Sur:Chol:DCP) با توجه به با نسبت‌های مولی و جرمی مختلف پس از توزین به بالن اضافه شدند. مقدار پنج میلی‌لیتر حلال آلی کلروفرم به بالن افزوده شد. بالن حاوی مواد به تبخیرکننده دوار وصل شد و با توجه به اینکه دمای جوش کلروفرم حدود ۶۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای حدود ۵۰ درجه و با دور rpm 150 به مدت ۴۵ دقیقه حذف گردید و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد.

خالص سازی نانو نیوزوم‌ها از داروی آزاد

برای جداسازی داروی آزاد از نانو نیوزوم‌های حاوی آمیکاسین از لوله سانتریفیوژی آمیکون با فیلتر KDa50 استفاده شد و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار تحت شرایط rpm 5000 و چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده، در نهایت داروی آزاد جداسازی و در قسمت پایین لوله آمیکون جمع می‌گردد (۱۹).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده به روش میکرو دیالوشن

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری محلول نانو نیوزومی حاوی و فاقد آمیکاسین و فرم آزاد آن، از روش رقیق‌سازی متوالی استفاده گردید. یک میلی‌لیتر محلول نانو نیوزومی حاوی آمیکاسین (غلظت ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت اضافه شد و سریال رقت آن آماده شد. سپس سوسپانسیون باکتری سودوموناس آئروژینوزا که کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند برابر بود آماده گردید. به هر کدام از لوله‌های فوق یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه و همگی لوله‌ها با محیط کشت مولر هینتون براث به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک لوله فاقد دارو و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، و سپس لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. غلظت MIC در اولین لوله‌ای که شفاف بود مشخص گردید، و برای تعیین MIC

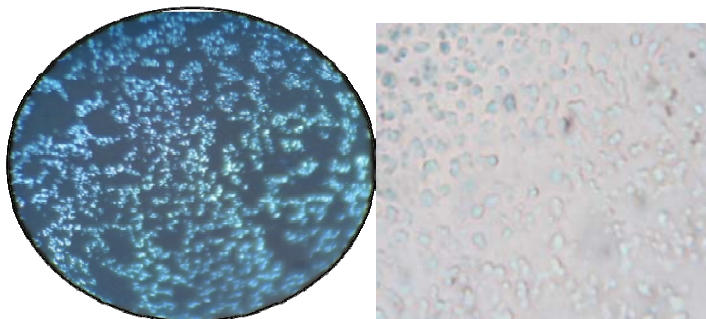
جدول ۱. اندازه، پتانسیل زتا و پراکندگی نانونیوزوم‌های حاوی آمیکاسین با ۸ فرمول مختلف

فرمول بندی	نسبت مولی Sur:Chol:DCP	وزن مولی (میکرومول) Sur:Chol:DCP	توین ۶۰ (میلی‌گرم)	توین ۸۰ (میلی‌گرم)	Cho (میلی‌گرم)	DCP (میلی‌گرم)	زتا پتانسیل (میلی ولت)	اندازه (نانومتر)	شاخص پلی‌دیسپرسی
F1	1:0.5:0	50:25:5	65.59	-	9.67	2.73	-13.5	143	0.26
F2	1:0.5:0	25:50:0	65.59	-	9.67	-	-7.86	92.5	0.68
F3	1:1:0.1	37.5:37.5:37.5	49.19	-	14.50	2.05	-12.1	117	0.25
F4	1:1:0	37.5:37.5:0	49.19	-	14.50	-	-9.7	146	0.26
F5	1:0.5:0.1	50:25:5	-	65.5	9.67	2.73	-14.5	120	0.21
F6	1:0.5:0	25:50:0	-	65.5	9.67	-	-10	78.6	0.47
F7	1:1:0.1	37.5:37.5:37.5	-	49.1	14.50	2.05	-16.5	142	0.16
F8	1:1:0	37.5:37.5:0	-	49.1	14.50	-	-10.1	137	0.18

مورفولوژی

بارگذاری شده با آمیکاسین بعد از کاهش سایز با سونیکیت پروب‌دار، توسط میکروسکوپ SEM مورد آنالیز قرار گرفت.

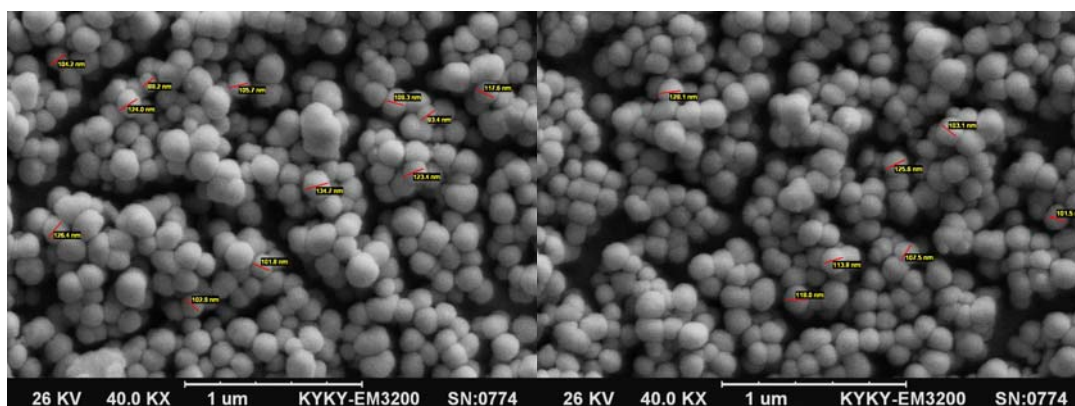
در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری از فرمول‌بندی F3، نیوزوم‌های MLV قبل از کاهش سایز با سونیکیت پروب‌دار قابل مشاهده می‌باشد که در شکل ۲ ارائه گردیده است. ظاهر مورفولوژیکی نانونیوزوم



شکل ۲. عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری از نیوزوم‌های بزرگ MLV حاوی آمیکاسین (فرمول‌بندی F3): میکروسکوپ فاز کنتراست (سمت راست) و زمینه روشن (سمت چپ)

نمونه F3 به عنوان نمونه بهینه بین فرمول‌بندی‌هایی که در آن‌ها از توین ۶۰ استفاده شده است و نمونه F8 به عنوان نمونه بهینه بین فرمول‌بندی‌هایی که در آن‌ها از توین ۸۰ استفاده شده است برای تصویربرداری انتخاب شدند. تصاویر گرفته شده با SEM (با توان ۲۶ کیلو ولت و بزرگنمایی ۴۰ هزار برابر) مطابق شکل ۳ نشان می‌دهد که هر دو نانونیوزوم اشکال کروی، سطحی صاف و ساختاری یکنواخت دارند و اندازه نانونیوزوم‌ها زیر ۱۵۰

نانومتر است که با نتایج حاصل از روش DLS مطابقت دارد. با توجه به مورفولوژی مناسب نانوساختارها که نشان از سنتز مناسب آنها دارد، با کمک تصاویر میکروسکوپ SEM و با استفاده از نرم افزار ایمیج جی، اندازه نانوذرات نیز اندازه‌گیری شد که قطر آنها در شکل بر حسب نانومتر وارد شده است.

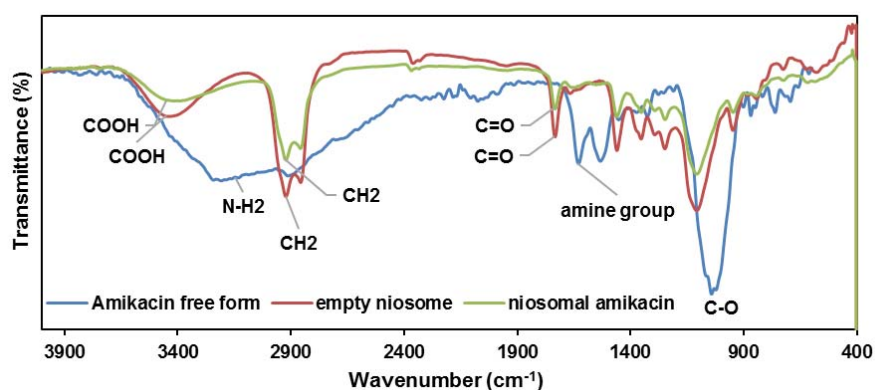


شکل ۳. تصاویر SEM (الف) فرمول‌بندی F3، (ب) فرمول‌بندی F8

بررسی طیف سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز

در شکل ۴ طیف FT-IR سه نمونه آمیکاسین سولفات، نیوزوم خالی، و داروی بارگذاری شده در ساختار نیوزوم انجام شد. پیک مشخصه داروی آمیکاسین سولفات مربوط به گروه آمینی نوع اول و دوم می‌باشد. ارتعاشات خمشی آمین نوع دوم در گستره $1540-1650\text{ cm}^{-1}$ و ارتعاشات کششی NH_2 در بالاتر از 3000 cm^{-1} جذب دارد. پیوند C-O در حلقه فنولی در ناحیه $1300-1050\text{ cm}^{-1}$ ظاهر می‌شود. همانطور که در شکل ۴-۱۶ الف مشاهده می‌شود پیک متوسط در ناحیه 1631 cm^{-1} ارتعاشات خمشی گروه آمین اول و دوم و پیک 3209 cm^{-1} ارتعاشات کششی گروه‌های NH_2 و پیک متوسط در 1024 cm^{-1} ارتعاشات خمشی درون صفحه‌ای حلقه آروماتیک را نشان می‌دهد. شکل ۳ ب و ج ساختار نیوزوم و آمیکاسین بارگذاری شده در نیوزوم را نشان می‌دهد. پیک موجود در ناحیه 2890 cm^{-1} حاکی از ارتعاشات

کششی پیوند CH_2 در ساختار توپین‌ها می‌باشد. ارتعاشات قوی گروه کربوکسیل در 3445 cm^{-1} و پیوند قوی کربونیل C=O در طول موج 1702 cm^{-1} ظاهر شده‌اند. همانگونه که انتظار می‌رفت تفاوت چندانی در پیک حاصل نشده و اثری از تعامل بین آمیکاسین و نیوزوم به چشم نمی‌خورد. خصوصاً عدم حضور پیک در $1650-1540\text{ cm}^{-1}$ خود گواهی است بر اینکه آمیکاسین در داخل نیوزوم محصور شده است و به صورت شیمیایی پیوندی با نیوزوم برقرار نکرده است. جهت بررسی عدم اتصال دارو روی سطح نیوزوم، پیک‌های مختلف جذبی از نمونه‌های نیوزوم خالی با نیوزوم حاوی دارو مقایسه گردید. نتایج نشان داد پیک‌های جذبی حاصل از سطح نیوزوم خالی با پیک‌های جذبی حاصل از سطح نیوزوم حاوی دارو مشابه می‌باشد که این نتایج عدم اتصال دارو روی سطح نانو نیوزوم را مشخص نمود.



شکل ۴. طیف FT-IR آمیکاسین آزاد (آبی)، نیوزوم خالی (قرمز) و نیوزوم حاوی آمیکاسین (سبز)

بارگذاری آمیکاسین در نانویوزوم‌ها

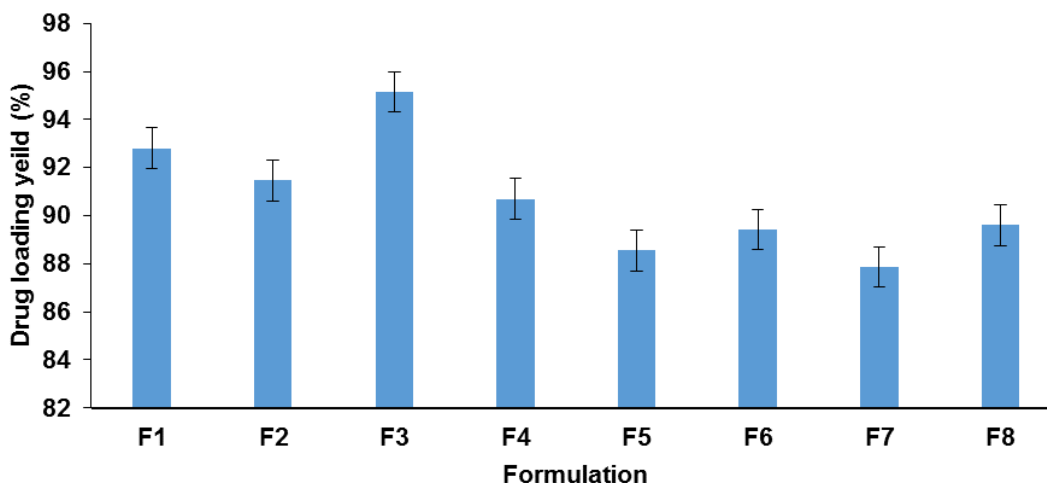
فرمول‌های نیوزومی آمیکاسین هر کدام با سه ساخت برای بدست آوردن بارگذاری دقیق آمیکاسین تهیه و مقدار بارگذاری برای هر کدام بوسیله دستگاه اسپکتوفتومتری UV بررسی و محاسبه شد. راندمان بارگذاری دارو با استفاده از رابطه ۱ بدست آمد. که در آن R راندمان بارگذاری، Df مقدار داروی آزاد شده و Du کل مقدار داروی استفاده شده است.

رابطه ۱

$$R = \frac{D_u - D_f}{D_u} \times 100\%$$

با توجه به شکل ۵ در فرمول‌بندی‌هایی که از سورفکتانت توپین ۶۰ استفاده گردیده است. DCP باعث افزایش

راندمان بارگذاری شده است. در حضور DCP در نسبت مولی ۱:۱ توپین ۶۰ به کلسترول راندمان بارگذاری بیشتری نسبت به نسبت مولی ۱:۰/۵ توپین ۶۰ به کلسترول دارد. در حالی که در فرمول‌بندی‌هایی که از سورفکتانت توپین ۸۰ استفاده گردیده است DCP باعث کاهش راندمان بارگذاری شده است. در حضور DCP در نسبت مولی ۱:۱ توپین ۸۰ به کلسترول راندمان بارگذاری کمتری نسبت به نسبت مولی ۱:۰/۵ توپین ۸۰ به کلسترول دارد. این نشان دهنده این است که ساختار نیوزوم‌هایی که توپین ۸۰ دارند با DCP پایدار نمی‌شوند. فرمول‌بندی F3 با نسبت مولی ۱:۱:۰/۱ دارای بیشترین راندمان بارگذاری در مقایسه با بقیه می‌باشد.



شکل ۵. نمودار میله‌ای راندمان بارگذاری دارو در نیوزوم در ۸ فرمول‌بندی مختلف (میله‌ای‌های روی نمودار میزان خطا در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند)

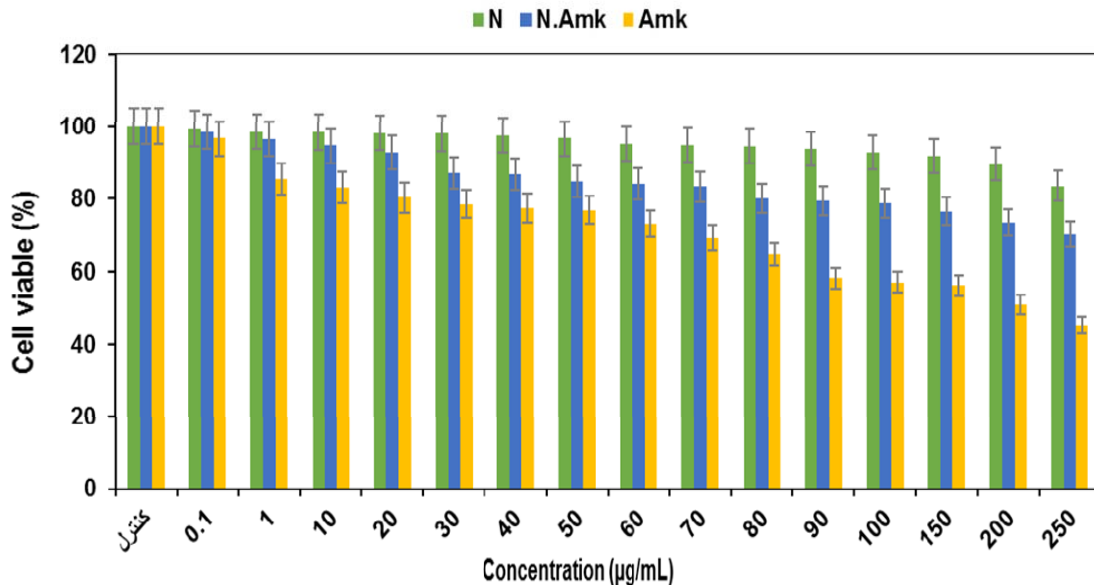
بررسی سمیت سلولی

بررسی اثر دهی نیوزوم‌های آمیکاسینی بر روی فعالیت رده سلولی ریه A549 در بازه ۴۸ ساعت انجام شد و نتایج بر اساس روش رنگ سنجی MTT بدست آمد. تغییرات در فعالیت سلول‌ها در پلیت کشت سلولی تیمار شده توسط غلظت‌های مختلف نانویوزوم‌های حاوی دارو را شاهد بودیم. با توجه به غلظت‌های مختلف از نانوحامل‌ها که رقت‌سازی آماده شد، از غلظت‌های کمتر به غلظت‌های بیشتر، سمیت سلولی افزایش پیدا کرده و درصد بقاء سلول‌ها کاهش یافت. در شکل ۶ درصد بقاء سلولی نیوزوم فاقد دارو بر روی رده سلولی A549 نیز نشان داده

شده است که در کمترین غلظت، ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء ۹۹/۴۳۲ می‌باشد که با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء به تدریج به ۸۳/۵۰۴ رسیده است. قابل توجه است که نمودار شیبی بسیار کند و حالت نزولی دارد در نتیجه سامانه‌ی نیوزوم خالی (فاقد دارو) اثر سمیت قابل توجهی ندارد زیرا اثر سمیت خیلی ناچیز است و درصد بقاء سلولی نیوزوم حاوی داروی آمیکاسین بر روی رده سلولی A549 نشان داده شده است که در کمترین غلظت، ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء ۹۸/۵ می‌باشد که با افزایش غلظت از

۰/۱ به ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء به تدریج به رابطه ۲ ۷۰/۳۳۵ رسیده است. مقدار بقای سلولی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد، که در آن A^* درصد بقاء سلولی، AS جذب هر نمونه و AC جذب نمونه کنترل می باشد.

$$A^* = \frac{A_2}{A_0} \times 100\%$$



شکل ۶. درصد بقاء سلولی فرم آزاد آمیکاسین (Amk)، نیوزوم حاوی آمیکاسین (N.Amk) و نیوزوم خالی (N) در رده سلولی A549، (میله‌ای‌های روی نمودار میزان خطا در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند)

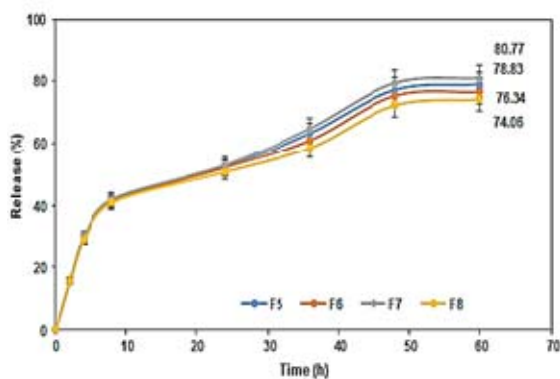
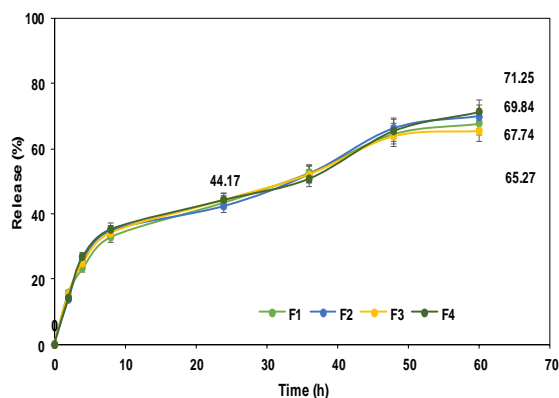
آزمون تعیین حساسیت

نتایج MIC داروی آمیکاسین بر روی سویه سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. برای سنجش اثرات ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد، نیوزوم حاوی آمیکاسین با فرمول‌بندی F3 و نیوزوم خالی در فرمول‌بندی F3 از محیط کشت مولر هیتون برات استفاده شد. در نیوزوم حاوی آمیکاسین ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر غلظت داروی بارگذاری شده در نیوزوم با فرمول‌بندی F3 است که در زمان ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون، تنها ۴۴/۱۷٪ آن رهاش یافته و با باکتری‌ها در تماس می‌باشد. پس غلظت MIC حقیقی برابر ۲۸/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

بررسی رهاش آمیکاسین از سامانه نیوزومی در محیط برون تن

الگوی رهاش آمیکاسین از نیوزوم در محیط برون تن با استفاده از لوله فیلتری آمیکون و انجام عمل سانتریفیوژ

تحت شرایط دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور 5000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه برای جداسازی داروی آزاد صورت گرفت. سپس با اسپکتوفتومتری درصد داروی رهاش یافته محاسبه شد. بررسی میزان رهاش دارو از سامانه نیوزومی در ساعت‌های مشخص (۲، ۴، ۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۶۰ ساعت) در طی ۳ روز ترسیم شد. فرمول‌بندی F3 T60,1,DCP با بیشترین راندمان بارگذاری ۹۵/۱۵٪ در بین سایر فرمول‌بندی‌ها و آهسته‌ترین رهاش با درصد رهاش دارو ۶۵/۲۷٪ درصد در ۶۰ ساعت در بین سایر فرمول‌بندی‌ها، با اندازه ۱۱۷ نانومتر و پراکندگی ۰/۲۵۸ پتانسیل زتا ۱۲.۱-mv- به عنوان فرمول‌بندی بهینه انتخاب گردید.



شکل ۷. نمودار رهائش آمیکاسین از سامانه نیوزومی که در فرمول‌بندی آن از توپین ۶۰ (الف) و توپین ۸۰ (ب) استفاده شده است (میله ای های روی نمودار میزان خطا در سطح ۵ درصد را نشان می دهند).

آزادسازی کنترل شده بر اساس مدل درجه صفر پیروی می‌کند. در جدول ۳ مشاهده می‌شود که رهائش آمیکاسین بارگذاری شده در نیوزوم از الگوی آزادسازی کنترل شده در ۸ ساعت اول به خوبی از مدل هیگوجی پیروی می‌کند. هیگوجی رهائش دارو را به عنوان یک فرایند نفوذی بر پایه قانون فیک که وابسته به مجذور زمان است توصیف می‌کند. رهائش آمیکاسین بارگذاری شده در نیوزوم از الگوی آزادسازی کنترل شده از ساعت ۸ تا ۶۰ از مدل درجه صفر مطابق جدول ۴ پیروی می‌کند.

مدل‌های ریاضی متعددی شامل مدل‌های مکانیستیک رئالیستیک و تجربی/نیمه تجربی با موفقیت برای تعریف کمی مکانیزم های رهائش دارو معرفی شده‌اند و نقش مهمی در طراحی یک سامانه دارورسانی برای نمودار رهائش دارو داشته‌اند. بررسی رفتار رهائش آمیکاسین از نیوزوم با فرمول‌بندی متفاوت به طور خلاصه در جدول ۲ ارائه شده است. الگوی رهائش هر یک از فرمول‌بندی براساس مدل درجه صفر، درجه یک، هیگوجی و پپاس مورد بررسی قرار گرفت. در جدول ۲ مشاهده می‌شود که رهائش آمیکاسین بارگذاری شده در نیوزوم از الگوی

جدول ۲. ضرایب تعیین مدل‌های ریاضی و توان‌های رهائش دارو برای هر فرمول‌بندی در ۶۰ ساعت

مدل سینتیکی	فرمول بندی	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
درجه صفر	R^2	۰/۹۰	۰/۸۹	۰/۸۷	۰/۸۸	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۸۷	۰/۸۵
	K_0	۰/۹۸	۱/۰۰	۰/۹۴	۰/۹۹	۱/۱۵	۱/۱۱	۱/۱۹	۱/۰۶
درجه یک	R^2	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۳
	K	-۰/۰۵	-۰/۰۶	-۰/۰۵	-۰/۰۶	-۰/۰۶	-۰/۰۶	-۰/۰۶	-۰/۰۶
هیگوجی	R^2	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۶
	K_H	۱/۶۷	۱/۶۶	۱/۶۸	۱/۶۸	۱/۶۸	۱/۶۸	۱/۶۷	۱/۶۷
کورسمایر پپاس	R^2	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۶
	K_p	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴
	n	۰/۹۴	۰/۹۴	۰/۹۳	۰/۹۴	۰/۹۴	۰/۹۶	۰/۹۷	۰/۹۶

جدول ۳. ضرایب تعیین مدل‌های ریاضی و توان‌های رهایش دارو برای هر فرمول‌بندی در ۸ ساعت اول

مدل سیتیکی	فرمول بندی	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
درجه صفر	R^2	۰/۹۲	۰/۹۳	۰/۹۲	۰/۹۲	۰/۹۴	۰/۹۴	۰/۹۴	۰/۹۴
	K_0	۳/۸۹	۴/۲۴	۴/۰۸	۴/۳۱	۵/۱۱	۵/۰۱	۵/۱۴	۵/۰۲
درجه یک	R^2	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۵۹	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۰
	K	-۰/۶۱	-۰/۶۲	-۰/۶۱	-۰/۶۲	-۰/۶۴	-۰/۶۴	-۰/۶۴	-۰/۶۴
هیگوچی	R^2	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸
	K_H	۱/۵۰	۱/۴۹	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۲	۱/۵۲	۱/۵۳	۱/۵۲
کورسمایر پپاس	R^2	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۸
	K_{kp}	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۵
	n	۱/۳۹	۱/۴۱	۱/۴۰	۱/۴۱	۱/۴۵	۱/۴۴	۱/۴۵	۱/۴۴

جدول ۴. ضرایب تعیین مدل‌های ریاضی و توان‌های رهایش دارو برای هر فرمول‌بندی از ساعت ۸ تا ۶۰

مدل سیتیکی	فرمول بندی	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
درجه صفر	R^2	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۷
	K_0	۰/۷۱	۰/۷۳	۰/۶۴	۰/۷۲	۰/۷۷	۰/۷۴	۰/۸۱	۰/۶۸
درجه یک	R^2	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۹۶	۰/۹۶	۰/۹۶	۰/۹۷
	K	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۱
هیگوچی	R^2	۰/۹۶	۰/۹۱	۰/۹۶	۰/۹۱	۰/۹۴	۰/۹۵	۰/۹۴	۰/۹۳
	K_H	۳۹/۰۵	۴۸/۶۹	۶۷/۸۵	۵۷/۲۱	۹۴/۸۳	۱۰۵/۹۴	۷۹/۶۴	۱۵۴/۶۹
کورسمایر پپاس	R^2	۰/۹۶	۰/۹۱	۰/۹۵	۰/۹۱	۰/۹۴	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۳
	K_{kp}	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۲۵	۰/۲۷	۰/۲۴	۰/۲۸
	n	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۴	۰/۳۰

بحث

داروی درون نانوذره بر روی این سویه ها بوده است که پس از بررسی های مختلف در زمان های متعدد این تاثیر تعیین شد.

ویژگی‌های نیوزومی-آمیکاسین

نیوزوم های تک لایه کوچک SUV به علت عمل سونیکاسیون همگی اشکال کروی، سطحی صاف و

در مطالعه حاضر هدف، تولید و بهینه سازی یک نانوحاملی به نام نیوزوم بوده که جهت انتقال اختصاصی به بافت هدف و کاهش سمیت داروی آمیکاسین صورت گرفته است و اثر بخشی داروی بارگذاری شده آمیکاسین بر روی باکتری سودوموناس مستخرج از بافت ریه انسان بوده است و نحوه اثر بخشی، میزان دوز و مدت زمان تاثیر

پراکندگی (عدم تجمع) نیوزومها انجام شد، به طوری که بلافاصله بعد سنترسوسپانسیون نیوزومی دارو، برای فرمول بندی F3 اندازه ذرات ۱۱۷ نانومتر و پراکندگی ۰/۲۵۸ به دست آمده بودند که این نشان می دهد اندازه و پراکندگی در مقایسه با گذشت ۳ هفته تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشتند و رهايش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۳ هفته تنها مقدار ناچیز ۳/۴۸٪ بود. پس می‌توان نتیجه گرفت که نیوزومها ساختار پایداری دارند. راندمان بارگذاری فرمول‌بندی‌هایی که در آنها توپین ۶۰ استفاده گردیده بیشتر از فرمول‌بندی‌های که در آنها توپین ۸۰ استفاده گردیده بود، می‌باشد. وجود زنجیره طولانی آلکیلی در توپین ۶۰ باعث بالابودن راندمان بارگذاری آن می‌باشد. توپین ۸۰ دارای یک زنجیره غیراشباع می‌باشد که وجود باند دوگانه، باعث خمیدگی زنجیره گشته و بنابراین غشای توپین ۸۰ نفوذ بیشتری نسبت به توپین ۶۰ دارد و این علت بارگذاری کمتر توپین ۸۰ نسبت به توپین ۶۰ می‌باشد. کلسترول از جمله افزودنی‌ها در تشکیل نیوزوم می‌باشد که باعث تهیه نیوزوم پایدار می‌گردد. کلسترول باعث پایداری دولایه غشا، جلوگیری از نشت دارو و کند کردن روند نفوذ مواد محصور در هسته آبی نیوزوم می‌شود. کلسترول از تغییر فاز ژل به فاز لیپیدی مایع در سیستم‌های نیوزومی جلوگیری می‌کند که این موجب جلوگیری از نشت دارو از نیوزوم می‌گردد و راندمان بارگذاری افزایش می‌یابد (۲۲).

سامانه ی نیوزوم حاوی داروی آمیکاسین نسبت به سامانه‌ی نیوزوم فاقد دارو اثر سمیت بیشتری دارد و درصد بقاء سلولی داروی آمیکاسین به فرم آزاد که در کمترین غلظت، ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء ۹۶/۶۴ می باشد که با افزایش غلظت از ۰/۱ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقاء به تدریج از ۹۶/۶۴ به ۴۵/۲۶۷ کاهش یافته است. در نتیجه آمیکاسین به فرم آزاد اثر سمیت بیشتری نسبت به دو سامانه ذکر شده دارد. هم چنین نتایج نشان می‌دهد که MIC دارو در فرم نیوزومی آمیکاسین نسبت به فرم آزاد کاهش یافته است و اثر ضد میکروبی فرم نیوزومی به کندی و دیرتر از فرم آزاد صورت می‌گیرد و در فرم نیوزومی، کلیه دارو محصور در نیوزوم با باکتری وارد واکنش نمی‌شوند.

ساختاری همگن و یکنواخت دارند و چون اندازه ذرات کوچکتر شده است انرژی سطح افزایش یافته و پایداری کاهش می یابد و در نهایت ذرات به هم نزدیک تر شده و تمایل به تشکیل توده خواهند داشت. هرچه اندازه کوچکتر باشد عبور از غشا راحت تر است ولی در مقابل داروی کمتری در داخل سامانه به دام می افتد و در نتیجه بازده به دام انداختن دارو کاهش می یابد. از طرفی با کاهش اندازه نیوزوم ها انرژی سطحی آن ها افزایش می یابد و پایداری آن ها کاهش یافته و در نهایت برای کاهش انرژی سطحی تجمع کرده و تشکیل توده می دهند که کارایی آن ها به شدت کاهش می یابد. شاخص دیسپرسی (پراکندگی)، شاخص استاندارد برای سنجش میزان پراکندگی توزیع ذرات است و میزان پراکندگی سایز ذرات محاسبه می شود. به‌طور کلی هر چه توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تر باشد، نانوذرات خواص همگن‌تری را ارائه می‌دهند. از لحاظ ترمودینامیکی سورفکتانت باعث می شوند نیروی های فضایی و نیروهای دافعه الکترواستاتیک بر جاذبه واندروالس غلبه کنند و ذرات یکدیگر را دفع و مانع به هم چسبیدن و کلوخه شدن می گردد و باعث پایداری ذره می شود بدین منظور سایز ذره کاهش می یابد. اندازه نانونیوزومها را می‌توان با وزن مولکولی توپین ۶۰ و توپین ۸۰ که به ترتیب برابر ۱۳۱۱/۷ و ۱۳۰۹ گرم بر مول و کلسترول ۳۸۶/۶۵ گرم بر مول است مرتبط دانست. فرمول‌بندی‌هایی که شامل توپین ۶۰ می‌باشند نسبت به فرمول‌بندی شامل توپین ۸۰ اندازه بزرگتری دارند. زنجیره آلکیلی طولانی در توپین ۶۰ و توپین ۸۰ باعث ایجاد وزیکول‌های درشت می‌گردد (۲۱). پتانسیل زتا تابع عواملی از قبیل اندازه، نوع ذرات، pH و سایر عوامل مؤثر بر لایه ها است. کاهش پتانسیل زتا موجب کاهش اختلاف پتانسیل بین فاز پخش شده و محیط اطراف آن می‌گردد که عامل اصلی دافعه بین نانوذرات است. با توجه به جدول ۱ فرمول‌بندی F7 با بزرگترین پتانسیل زتا بیشترین پایداری و F2 با کوچکترین پتانسیل زتا کمترین پایداری را دارند. برای بررسی پایداری نیوزوم بعد از گذشت ۳ هفته از تولید سوسپانسیون نیوزومی حاوی دارو در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. با تعیین میزان نشت دارو از داخل نیوزومها و بررسی عدم تغییر قابل توجه اندازه و

بار در این پروژه نیوزومال شده است. علت این که چرا تاکنون نیوزومال نگشته است را میتوان این گونه بیان کرد که استفاده از سامانه های دارویی از جمله لیپوزوم و نیوزوم بیشتر برای داروهای ضدسرطان کار شده است. داروهای آنتی باکتریال در مقایسه با داروهای ضدسرطان از توجه کمتری برخوردار بوده اند. اولین محصول لیپوزومال حامل آمیکاسین در سال ۲۰۱۸ تولید شده است، این لیپوزوم استنشاقی حامل آمیکاسین توسط FDA برای درمان بیماری ریوی ناشی از باکتری مایکوباکتریوم آویوم در یک جمعیت کوچک بیماران مبتلا به بیماری که به درمان سنتی پاسخ نمی دهند، تأیید شد. امید می رود که در سال های آتی سامانه نیوزومال هم به مرحله تولید محصول برسد. مقرون به صرفه بودن سامانه نیوزومال حامل آمیکاسین از جمله علت های اصلی استفاده از سیستم های وزیکولی از جمله نیوزوم و لیپوزوم برای داروهای آنتی بیوتیک، رهایش پیوسته و آهسته و کنترل شده دارو، کاهش دوز مورد نیاز و یا احتمال تجویز یک دوز بیشتر با کاهش عوارض جانبی، افزایش حساسیت باکتری به سیستم وزیکولی حامل دارو به وسیله آنزیم های بازدارنده، کاهش مقاومت باکتریایی و کاهش بازرشد باکتری می گردند و در کل باعث افزایش اثربخشی دارو در طی درمان می شوند. نیوزوم ها بر لیپوزوم ها به دلیل ثبات و پایداری شیمیایی و هزینه کمتر و مقرون به صرفه بودن، ترجیح داده می شوند (۱۶).

نتیجه گیری

در این پژوهش با سنتز و بهینه سازی می توان با بیشترین راندمان بارگذاری ۹۵/۱۵٪ در بین فرمول بندی ها و آهسته ترین رهایش با درصد رهایش دارو ۶۵/۲۷٪ درصد در ۶۰ ساعت را جهت کاهش عوارض داروی آمیکاسین انجام داد. نتایج تأیید کننده این مساله هستند که فرمولاسیون نیوزومی بهینه آهسته رهش می باشد و به صورت کنترل شده داروی آمیکاسین از سامانه رها می شود. آمیکاسین درون نیوزوم با غلظت MIC 28.27 میکروگرم بر میلی لیتر دارای فعالیت ضدباکتریایی موثر و قابل توجهی بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا است. همچنین غلظت بهینه دارو نسبت به سایر غلظت های مورد مطالعه

مدت زمان طولانی برای رهایش دارو نشان دهنده رهایش کند آمیکاسین از سامانه نیوزومی بوده است. نمودارهای رهایش در شکل حاکی از آن است که فرمول بندی هایی که توپین ۶۰ در آن ها استفاده گردیده نسبت به فرمول بندی هایی که توپین ۸۰ در آن ها استفاده گردیده است، رهایش کندتری دارند. این را می توان با این واقعیت توضیح داد که نیوزوم هایی با سورفکتانت با طول زنجیر بلندتر، رهایش کندتری دارند (۲۳). از نتایج آشکار است که افزایش نسبت کلسترول از ۰/۱ : ۰/۵ : ۱ به ۰/۱ : ۱ : ۱ (DCP : کلسترول : توپین ۶۰) باعث کاهش انتشار دارو از نیوزوم های (فرمولاسیون F3 و F1) می گردد که مطابق با توانایی کلسترول در برقراری پایداری غشا نیوزوم می باشد (۲۴). کلسترول از انتقال فاز ژل به مایع در سیستم های نیوزومی جلوگیری می کند (۲۲)، و این باعث نشت کمتر نیوزوم می گردد (۲۵). در نتیجه انتظار می رود انتشار داروی آمیکاسین به دام افتاده در منطقه آنگریز نیوزوم (غشا) در مدت طولانی رخ دهد. برخلاف نتایج قبلی، افزایش نسبت کلسترول از ۰/۵ : ۱ : ۱ (کلسترول : توپین ۶۰) باعث افزایش انتشار دارو از نیوزوم های بدون DCP (فرمولاسیون F4 و F2) می گردد. در رهایش دارو از نیوزوم های تهیه شده با توپین ۸۰ برخلاف توپین ۶۰، افزایش نسبت کلسترول از ۰/۱ : ۰/۵ : ۱ به ۰/۱ : ۱ : ۱ (DCP: کلسترول: توپین ۸۰) باعث افزایش انتشار دارو از نیوزوم های (فرمولاسیون F7 و F5) می گردد و افزایش نسبت کلسترول از ۰/۵ : ۱ : ۱ به ۱ : ۱ : ۱ (کلسترول: توپین ۸۰) باعث کاهش انتشار اهداف اصلی بررسی سامانه نیوزومی آمیکاسین در این تحقیق عبارت اند از: ساخت نیوزوم ها و بارگذاری داروی آمیکاسین، دستیابی به شرایط بهینه برای تهیه نیوزوم های حاوی آمیکاسین با اندازه مناسب و حداکثر داروی محصور شده با تغییر دادن پارامترهای نسبت کلسترول بر سورفکتانت، نوع سورفکتانت و استفاده وعدم استفاده از دیس اتیل فسفات در سنتز نانونیوزوم، افزایش اثرگذاری و بررسی فعالیت ضد میکروبی آمیکاسین نیوزومی و کاهش عوارض جانبی آمیکاسین نیوزومی نسبت به فرم آزاد است. در این تحقیق سعی بر آن شد که بعضی از زوایای سامانه نانویی نیوزوم-آمیکاسین با تأثیر بر روی رده سلول ریه روشن گردد. آمیکاسین برای اولین

نیوزوم با باکتری وارد واکنش نمی‌شوند که نشان از رهائش آهسته داروست.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

در پژوهش حاضر کمترین مقدار می باشد که هم از نظر اقتصادی بهینه است و هم رهائش کنترل شده و فعالیت ضدباکتریایی مناسبی دارد. MIC دارو در فرم نیوزومی آمیکاسین نسبت به فرم آزاد کاهش یافته است و اثر ضد میکروبی فرم نیوزومی به کندی و دیرتر از فرم آزاد صورت می‌گیرد و در فرم نیوزومی، کلیه دارو محصور در

منابع

1. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007;6:4.
2. Delissalde F, Amabile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004;24(4):405-8.
3. Sharp PM, Saenz CA, Martin RR. Amikacin (BB-K8) treatment of multiple-drug-resistant *Proteus* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1974;5(5):435-8.
4. Brzozowski M, Krukowska Ż, Galant K, Jursa-Kulesza J, Kosik-Bogacka D. Genotypic characterisation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients of different hospitals and medical centres in Poland. *BMC Infectious Diseases* 2020;20(1):693.
5. Taber SS, Pasko DA. The epidemiology of drug-induced disorders: the kidney. *Expert Opinion on Drug Safety* 2008;7(6):679-90.
6. Beauchamp D, Labrecque G. Aminoglycoside nephrotoxicity: do time and frequency of administration matter? *Current Opinion in Critical Care* 2001;7(6):401-8.
7. Rougier F, Claude D, Maurin M, Sedoglavic A, Ducher M, Corvaisier S, et al. Aminoglycoside nephrotoxicity: modeling, simulation, and control. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47(3):1010-6.
8. Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto A, Sardaryan G, Kurumunda R, et al. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61(4):859-68.
9. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2008;83(5):761-9.
10. Abdelbary G, El-gendy N. Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(3):740-7.
11. Valeria Shakhova VB, Elena Kastarnova و Vladimir Orobets, Elena Grudeva. Niosomes: a promising drug delivery system. *E3S Web of Conferences* 2020;175:07003.
12. Makeshwar KB, Wasankar SR. Niosome: a Novel Drug Delivery System. *Asian Journal of*

- Pharmaceutical Research
2013;3(1):16-20.
13. G DB, P VL. Recent advances of non-ionic surfactant-based nano-vesicles (niosomes and proniosomes): a brief review of these in enhancing transdermal delivery of drug. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020;6(1):100.
 14. Khan A, Sharma PK, Visht S, Malviya R. Niosomes as colloidal drug delivery system: a review. *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery* 2011;2(1):15-21.
 15. Chandu VP, Arunachalam A, Jeganath S, Yamini K, Tharangini K, Chaitanya G. Niosomes: a novel drug delivery system. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences* 2012;2(1):25-31.
 16. Sultan A, Jers C, Ganief TA, Shi L, Senissar M, Köhler JB, et al. Phosphoproteome Study of *Escherichia coli* Devoid of Ser/Thr Kinase YeaG During the Metabolic Shift From Glucose to Malate. *Frontiers in Microbiology* 2021;12.
 17. Mohamad EA, Fahmy HM. Niosomes and liposomes as promising carriers for dermal delivery of *Annona squamosa* extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020;56:e18096.
 18. Agarwal R, Katare O, Vyas S. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;228(1):43-52.
 19. Xu X, Costa AP, Khan MA, Burgess DJ. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2012;434(1):349-59.
 20. Vidakovic B. *Statistics for bioengineering sciences: with MATLAB and WinBUGS Support*. Springer Science & Business Media 2011;2nd edn:623.
 21. Gianasi E, Cociancich F, Uchegbu IF, Florence AT, Duncan R. Pharmaceutical and biological characterisation of a doxorubicin-polymer conjugate (PK1) entrapped in sorbitan monostearate Span 60 niosomes. *International Journal of Pharmaceutics* 1997;148(2):139-48.
 22. Cable C. *An examination of the effect of surface modifications on the physicochemical and biological properties of non-ionic surfactant vesicles*: University of Strathclyde 1990.
 23. Devaraj GN, Parakh S, Devraj R, Apte S, Rao BR, Rambhau D. Release studies on niosomes containing fatty alcohols as bilayer stabilizers instead of cholesterol. *Journal of Colloid and Interface Science* 2002;251(2):360-5.
 24. Betageri G, Parsons D. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 1992;81(2-3):235-41.
 25. Rogerson A, Cummings J, Florence AT. Adriamycin-loaded niosomes: drug entrapment, stability and release. *Journal of Microencapsulation* 1987;4(4):321-8.