

بررسی اثر ضد میکروبی نانوسوسپانسیون های آزیترومایسین در مقایسه با محلول دارو

مرتضی اذرزاده^۱، هادی ولیزاده^{۱*}، فرزانه لطفی پور^۲، قباد محمدی^۳، پروین ذاکری میلانی^{۴،۵}

^۱مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ^۲دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ^۳مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ^۴دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ^۵مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۱، تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۰

Study of anti-microbial effects of Azithromycin nanosuspensions in comparison with drug solution

Azhdarzadeh M.¹, Valizadeh H.^{*1,2}, Lotfipour F.^{2,3}, Mohammadi G.⁴, Zakeri-Milani P.^{2,5}

¹Reserch Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. ²Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. ³Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. ⁴Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ⁵Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 1 June 2010, Accepted: 12 Oct. 2010

Objectives: Azithromycin is a new macrolide antibiotic with better activity against gram negative bacteria compared to Erythromycin. The purpose of this research was to prepare azithromycin nanosuspension using Poly (lactic-co-glycolic acid) or Eudragit RS 100 polymer and compare the effectiveness of nanosuspensions with drug solutions. **Methods:** Azithromycin nanosuspension was prepared by Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion (MQESD) method. Drug and polymer were dissolved in a water miscible solvent such as acetone. The resulting solution was added to aqueous phase containing two percent of PVA 95000, under homogenization. Nanosuspensions were obtained by migration of solvent from inner to aqueous phase. The microbial culture method was used to compare the effectiveness of nanosuspensions with drug solution. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was used in this study. The inhibition zone diameter of azithromycin was determined by diffusion method in agar medium. The obtained inhibition zone diameters for nanosuspensions were compared to those of azithromycin solution. **Results:** The values pertaining to inhibition zone diameters of nanosuspensions in comparison with those of drug solution were significantly higher, that indicating improved antibacterial activity of the developed formulations ($P < 0.01$). The increased potency of formulated nanosuspensions is perhaps related to some physicochemical properties of nanosuspensions like modified surface characteristics, increased drug adsorption and uptake as well as lower drug degradation. **Conclusion:** Our results indicate that the potency of nanosuspensions is much more than that of drug solution in the same concentration.

Key Words: Nanosuspension, Poly (lactic-co-glycolic acid), Eudragit RS 100, Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion

زمینه و هدف: آزیترومایسین از ماکرولید های جدید است که در مقایسه با اریترومایسین اثر بیشتری روی باکتری های گرم منفی دارد. هدف از این بررسی، فرمولاسیون و تهیه نانوسوسپانسیون های آزیترومایسین توسط پلیمر پلی لاکتیک کولیکولیک اسید (PLGA) و ادراژیت RS ۱۰۰ و بررسی میزان اثربخشی نانوسوسپانسیون نسبت به محلول دارو می باشد. **روش ها:** نانوسوسپانسیون های آزیترومایسین با روش Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion (MQESD) تهیه شدند. دارو و پلیمر در حلال مشترک استون حل شده و به فاز آبی حاوی امولسیون کننده در حال همزدن زیر هموژنایزر افزوده گردید. بدین ترتیب یک شبه امولسیون تشکیل گردید که با انتقال حلال از فاز داخلی به فاز آبی نانو سوسپانسیون حاوی دارو بدست آمد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوسوسپانسیون ها در مقایسه با محلول دارو از روش کشت میکروبی استفاده شد. در این روش از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۶۵۳۸ استفاده شد. قطر هاله های عدم رشد آزیترومایسین در حالت نانوسوسپانسیون با استفاده از روش دیفوزیون در محیط کشت جامد با قطر هاله های عدم رشد محلول آزیترومایسین در غلظت معادل مقایسه گردید. **یافته ها:** قطر هاله عدم رشد نانوسوسپانسیون در مقایسه با محلول دارو افزایش معنی داری یافته بود. این افزایش فعالیت می تواند با بهبود خصوصیات فیزیوشیمیایی نانوسوسپانسیون مانند بهبود خصوصیات سطحی، افزایش تجمع نانوذرات در سطح سلول، افزایش نفوذ نانوذرات به داخل سلول و کاهش تخریب دارو در ارتباط باشد. **نتیجه گیری:** نتایج بیانگر این می باشد که اثربخشی نانوسوسپانسیون در مقایسه با محلول دارو در غلظت های معادل به طور معنی داری بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی: نانوسوسپانسیون، پلی لاکتیک کولیکولیک اسید، ادراژیت RS100، Modified Quasi Emulsion Solvent Diffusion

*Corresponding Author: Hadi Valizadeh, Associate Professor, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of medical sciences, Tabriz, Iran. Email: valizadeh@tbzmed.ac.ir
Tel: +98-411-3392649; Fax: +98-411-3344798

*نویسنده مسئول: هادی ولیزاده، دانشیار، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۶۴۹، شماره: ۰۴۱۱-۳۳۴۴۷۹۸
Email: valizadeh@tbzmed.ac.ir

۱- مقدمه

آزیترومایسین (Elder، هند) و پلیمر PLGA (۵۰:۵۰) (Boehringer Ingelheim، آلمان) و یا ادراژیت RS۱۰۰ (Rohm pharma، آلمان) و حلال (استون، دی کلرومتان، اتانول، آب مقطر دو بار تقطیر و یا مخلوطی از این حلال ها) (Merck، آلمان) بود (جدول شماره ۱). فاز خارجی هم شامل ۴۰ میلی لیتر محلول ۲ درصد PVA (Acros، بلژیک) در آب بود. برای تهیه فاز داخلی دارو و پلیمر در داخل لوله آزمایش ریخته و سپس حلال ها طبق مقادیر نوشته شده در جدول ۱ اضافه شد و سپس مخلوط حاصله در داخل اولتراسون (۳۵ Ultrasonic از Liarre ایتالیا) قرار داده شد تا حل شود و فاز داخلی قطره قطره توسط سرنگ به فاز خارجی زیر دستگاه هموژنایز (HEIDOLPH، TYPE:silent Crusher M، آلمان) با دور ۱۳۰۰۰ rpm اضافه گردید. مدت هموژنیزاسیون ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس نمونه ها جهت خروج حلال فاز داخلی به مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۰ درجه سانتیگراد) به هم زده شدند. بعد از تهیه نانوذرات با سانتریفوژ (Beckman Avanti™ j-25، آمریکا) با ۲۱۰۰۰g رسوب داده شد و بعد از شستشو لیوفیلیزه (Chixt Alpha 1-4، آلمان) گردیدند. نمونه ها برای آزمایش میکروبی در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ پراکنده شدند. در جدول ۱ فرمولاسیون نانوذرات مختلف تهیه شده آورده شده است.

۲-۲: تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات

برای تعیین اندازه ی نانوسوسپانسیون های تهیه شده از دستگاه Laser diffraction particle size analyzer (Shimadzu, SALD-2101، ژاپن) استفاده شد. بدین صورت که نانوسوسپانسیون لیوفیلیزه شده را در آب مقطر پراکنده کرده و سپس اندازه ی ذرات توسط دستگاه تعیین شد که در بخش نتایج اندازه ی ذرات آورده شده است. همچنین مورفولوژی نانوسوسپانسیون توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM) تعیین شد که تصاویر نانوسوسپانسیون ها در بخش یافته ها آورده شده است. با توجه به اینکه در فرمولاسیون های F۱ و F۲ و F۳ مناسب ترین اندازه ی ذره ای حاصل شد، در مطالعات کشت میکروبی از این فرمولاسیون ها استفاده شد.

۲-۳: آزمایش میکروبی

۱-۲-۳: فعال سازی باکتریها

در آزمایش از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۶۵۳۸ (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی،

به طور کلی سیستم های جدید دارورسانی نظیر نانو ذرات سبب بهبود اثر بخشی داروها شده اند. مطالعات زیادی بر روی نانو ذرات آنتی بیوتیک های مختلف انجام شده که ثابت می کند سوسپانسیون حاوی این ذرات اثر ضد میکروبی بهتری از خود نشان می دهد (۵-۱). اگر آنتی بیوتیکها به صورت ذرات نانو فرموله شوند نفوذ به بافت عفونی مناسب تر (۶) و اثر ضد میکروبی آنها بیشتر می گردد (۷). نانو ذرات آمفوتریسین B موجب کاهش نفروتوکسیسیته این دارو شده است (۸). نانو ذرات آمپی سیلین در درمان سالمونلا موثرتر از خود دارو بوده اند (۹). نتایج یک پژوهش نشان می دهد که نانو ذرات تهیه شده از سپیروفلوکساسین در مهار عفونت ماکروفاژهای انسانی موثرتر از خود دارو بوده است (۱۰)، همچنین نانو ذرات حاوی آمپی سیلین اثر بسیار خوبی بر روی عفونت لیستریوزیس ایجاد شده در موش های بدون تیموس داشته است (۱۱).

آزیترومایسین از ماکرولید های جدید است که ساختاری مشابه با اریترومایسین دارد. در مقایسه با اریترومایسین اثر بیشتری روی باکتری های گرم منفی دارد. این دارو همچنین اثر خوبی روی باکتری های گرم مثبت و عفونت های ادرازی دارد. آزیترومایسین همچنین فراهمی زیستی خوبی داشته و ضریب توزیع بالا و نیمه عمر طولانی آن باعث شده که مصرف یک بار در روز این دارو در درمان عفونت های میکروبی کافی باشد (۱۲). این خصوصیات منحصر به فرد آزیترومایسین باعث شده که امروزه به عنوان یک آنتی بیوتیک مناسب در درمان عفونت های مختلف مورد توجه خاص پزشکان قرار گیرد. از مجموع تحقیقات انجام گرفته در زمینه نانو ذرات آنتی بیوتیکهای مختلف چنین بر می آید که این نانو ذرات نفوذ بهتری در سلول های فاگوسیت کننده انسانی داشته و بنابراین در درمان این عفونت ها می توانند موثرتر از خود آنتی بیوتیک خالص باشند (۱۳، ۶).

هدف از این پژوهش، فرمولاسیون و تهیه ی نانوسوسپانسیون آزیترومایسین و بررسی میزان اثربخشی نانوسوسپانسیون نسبت به محلول این دارو می باشد.

۲- مواد و روش ها

۱-۲: تهیه نانوسوسپانسیون

جهت تهیه نانوسوسپانسیون از روش MQESD استفاده شد (۱۳). بدین صورت که فاز داخلی شامل

سپس لایه بالایی با غلظتی برابر با نصف نوشته شده بر روی برجسب تهیه شد و بعد از اینکه از اتوکلاو درآورده شدند، وقتی دمایشان به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسید از اینوکولوم باکتریایی به محیط های کشت اضافه شد به طوری که غلظت باکتری ها برابر با 10^6 اگردید و سپس به پلیت ها اضافه گردید. بعد از سرد شدن محیط ها توسط سیلندر چاهک ها در پلیت ها ایجاد شد. (برای هر پلیت ۵ چاهک) در مرحله ی بعد از سری غلظت های تهیه شده از ۴ نمونه ی گفته شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و در نهایت قطر هاله ی عدم رشد برای هر کدام از چاهک ها ثبت گردید. در این آزمایش از پلیت کنترل مثبت (رشد)، یعنی پلیت حاوی محیط کشت و باکتری و پلیت کنترل منفی، یعنی پلیت حاوی محیط کشت بدون باکتری استفاده شد. هر کدام از آزمایشات ۳ بار تکرار شدند.

۴-۲: روش های آماری

برای نشان دادن قطر هاله ی عدم رشد از $mean \pm SD$ استفاده شد و جهت مقایسه ی نتایج حاصل از فرمولاسیون های مختلف با محلول آزیترومايسين و همچنین نتایج بین گروهی از آنالیز SPSS: ANOVA one way استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- توزیع اندازه ذره ای نانوسپانسیون های تهیه شده

اندازه ذره ای نانوسپانسیون تهیه شده بین ۱۰۰ الی ۲۳۰ نانومتر بود که در جدول ۲ اندازه ذره ای آورده شده است. همچنین براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی در شکل ۲ مشاهده می شود که نانوذرات کروی می باشند.

ایران) استفاده شد. باکتری لیوفیلیزه براساس پروتکل الحاقی سازنده (پژوهشکده بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات علمی و صنعتی ایران) فعال گردید. ابتدا به منظور نگهداری و استفاده های بعدی از باکتری فعال شده، استوک حاوی ۲۰٪ گلیسرول تهیه و در فریزر ۲۰- نگهداری گردید. باکتری فعال مجددا در محیط نوترینت براث (HIMEDIA، هندوستان) کشت داده شد (۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش) و سپس از کلنی های رشد یافته اینوکولوم باکتریایی ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید.

۲-۳-۲: تهیه سری غلظت های آزیترومايسين

در آزمایش انجام شده از ۴ نمونه استفاده شد: (۱) محلول آزیترومايسين در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ (نمونه کنترل) (۲) محلول آزیترومايسين و پلیمر در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ (۳) سوسپانسیون نانوذرات در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵ حاوی نسبت های ۱:۱ و ۲:۱ و ۳:۱ آزیترومايسين به پلیمر (۴) نانوذرات فاقد دارو در سدیم هیدروکساید با pH برابر ۸/۵. برای انجام آزمایش از نمونه های اشاره شده ابتدا استوک تهیه شد و سپس به سری غلظت ها اضافه گردید. غلظت ها برای آزمایش طوری انتخاب شدند که محدوده غلظتی موثر برای استافیلوکوکوس اورئوس در برگرفته شود (۱۴). برای تهیه سری غلظت ها از روش رقیق سازی متوالی استفاده شد.

۳-۳-۲: آماده سازی محیط های کشت حاوی باکتری و اضافه کردن آزیترومايسين

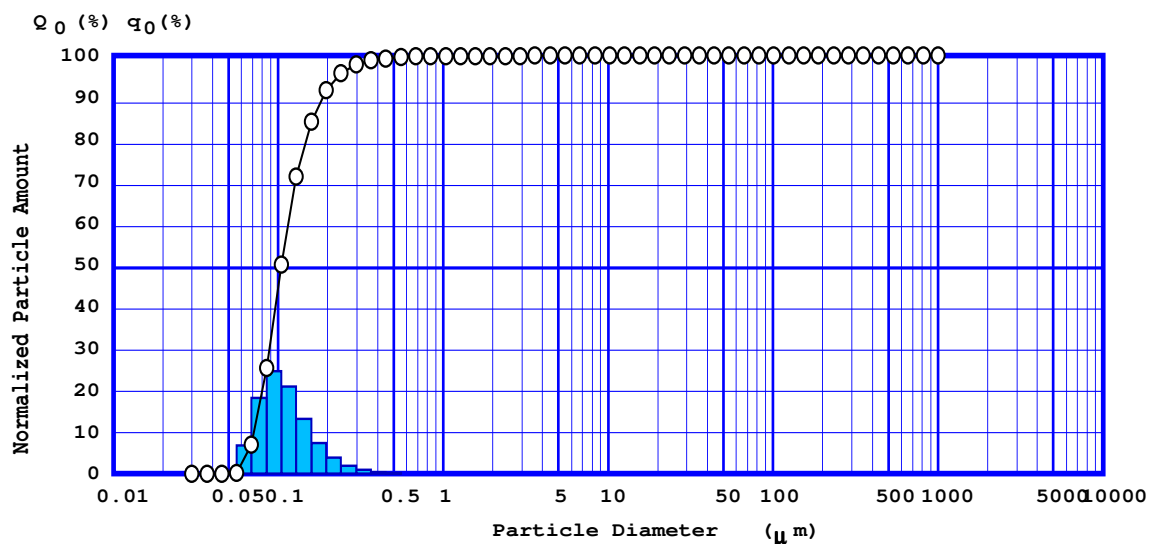
برای انجام آزمایشات از Antibiotic assay Medium استفاده شد. پلیت های تهیه شده حاوی محیط ۲ لایه بودند. لایه زیرین براساس دستورالعمل نوشته شده بر روی برجسب تهیه شد و سپس توسط سدیم هیدروکساید ۱۰ مولار pH آن در حدود ۸/۵ تنظیم شد (۱۵) و بعد از اینکه توسط اتوکلاو استریل شدند به پلیت ها اضافه گردید و

جدول ۱. فرمولاسیون نانوذرات استفاده شده

فاز خارجی	فاز داخلی		نسبت دارو به			فرمولاسیون
	پلیمر (mg)	دارو (mg)	حلال (ml)	پلیمر	فرمولاسیون	
PVA ٪۲ (ml)	PLGA	دارو (mg)	آب	اتانول	استون	
۴۰	۰	۲۵	۰	۰	۲/۵	F۱
۴۰	۰	۵۰	۰	۰	۲/۵	F۲
۴۰	۰	۷۵	۰	۰	۲/۵	F۳
۴۰	۷۵	۰	۰/۲	۱/۵	۰/۵	F۴
۴۰	۷۵	۰	۰/۲	۱	۱	F۵
۴۰	۶۶	۰	۰	۰/۵	۱/۵	F۶
۴۰	۶۶	۰	۰	۰	۱/۵	F۷

جدول ۲. میانگین اندازه ی ذره ای فرمولاسیون های ۱، ۲ و ۳

فرمولاسیون	میانگین اندازه ی ذره ای (nm)
۱:۱AZI:PLGA (F1)	231 ± 5 (۳۶) ^a
۱:۲AZI:PLGA (F2)	202 ± 7 (۲۸) ^a
۱:۳AZI:PLGA (F3)	185 ± 4 (۲۱) ^a

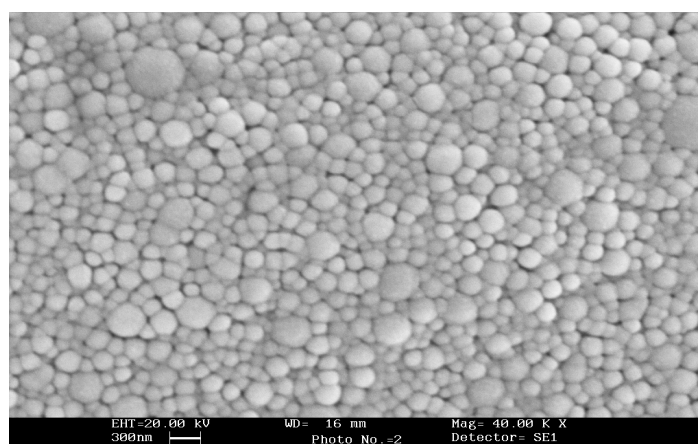
^a Polidispersity.

شکل ۱. نمودار توزیع اندازه ذره ای فرمولاسیون F1

نازکی از طلا در حد انگستروم توسط دستگاه پاشش طلا (Gold Sputtering) و در حضور پلاسمای آرگون پوشش داده شد. سپس عکسبرداری از سطح آنها توسط دستگاه اسکن میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت.

۲-۳: نتایج حاصل از بررسی شکل ذره ای

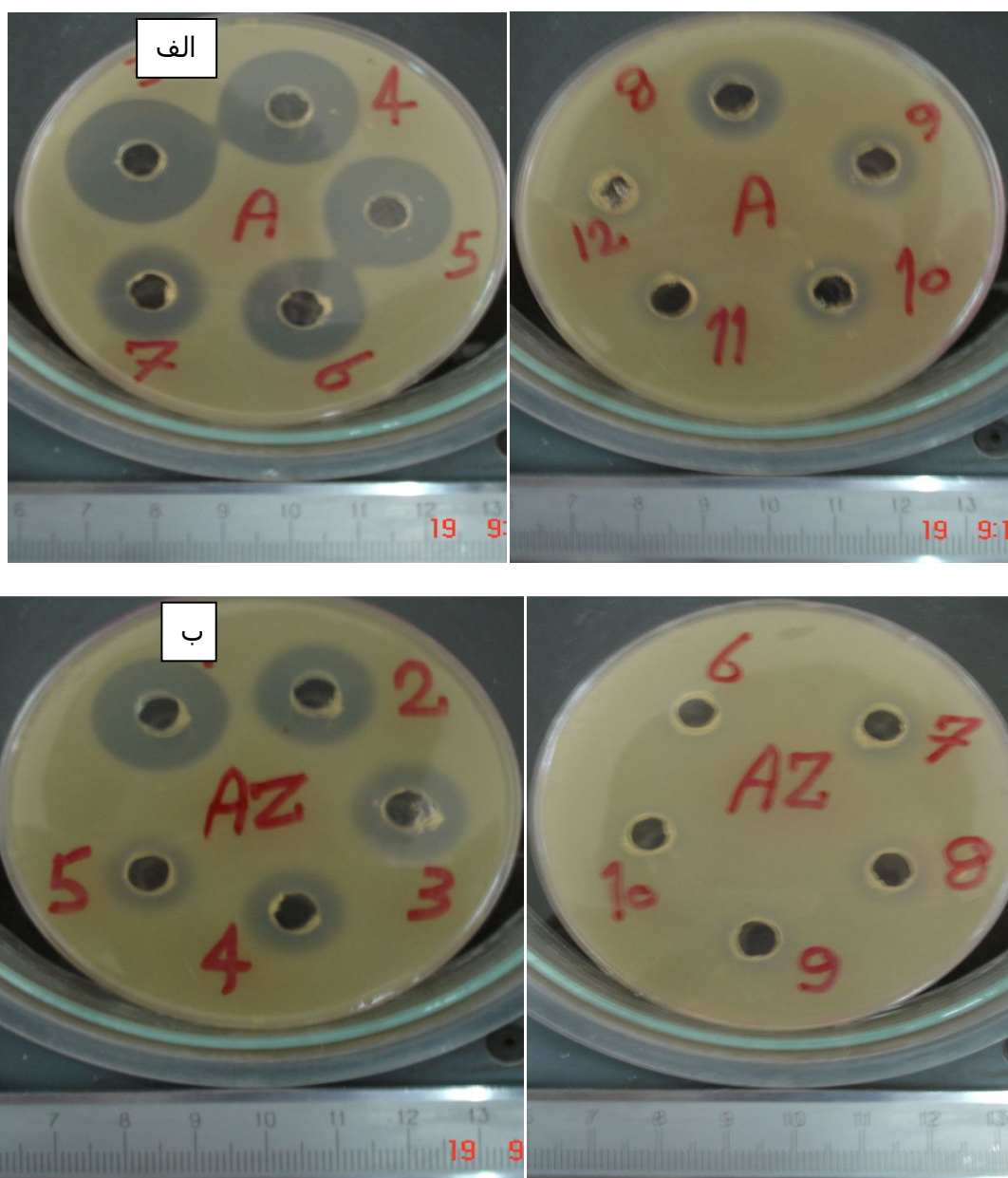
برای بررسی اندازه ذره ای ابتدا نمونه ها بر روی دیسک های آلومینیومی قرار گرفتند. جهت هدایت پذیری چنین نمونه های نارسانایی، سطح نمونه ها با لایه



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات حاوی آزیترومایسین فرمولاسیون F1 با بزرگنمایی ۴۰ برابر

فرمولاسیون های F₂ و F₃ مشابه فرمولاسیون F₁ بود. همانطور که مشاهده می شود در غلظت های برابر نانوسپانسیون قطر هاله عدم رشد بزرگتری نسبت به محلول دارو دارد.

۳-۳: نتایج حاصل از بررسی قطر هاله عدم رشد در شکل ۳، پلیت های مربوط به قطر هاله عدم رشد در فرمولاسیون F₁ (شکل الف) و نمونه محلول آزیترومایسین (شکل ب) آورده شده است. نتایج قطر هاله عدم رشد



شکل ۳. پلیت کشت استافیلوکوکوس اورئوس در محیط Antibiotic assay حاوی (الف) نانوسپانسیون فرمولاسیون F₁ (ب) محلول آزیترومایسین با غلظت های

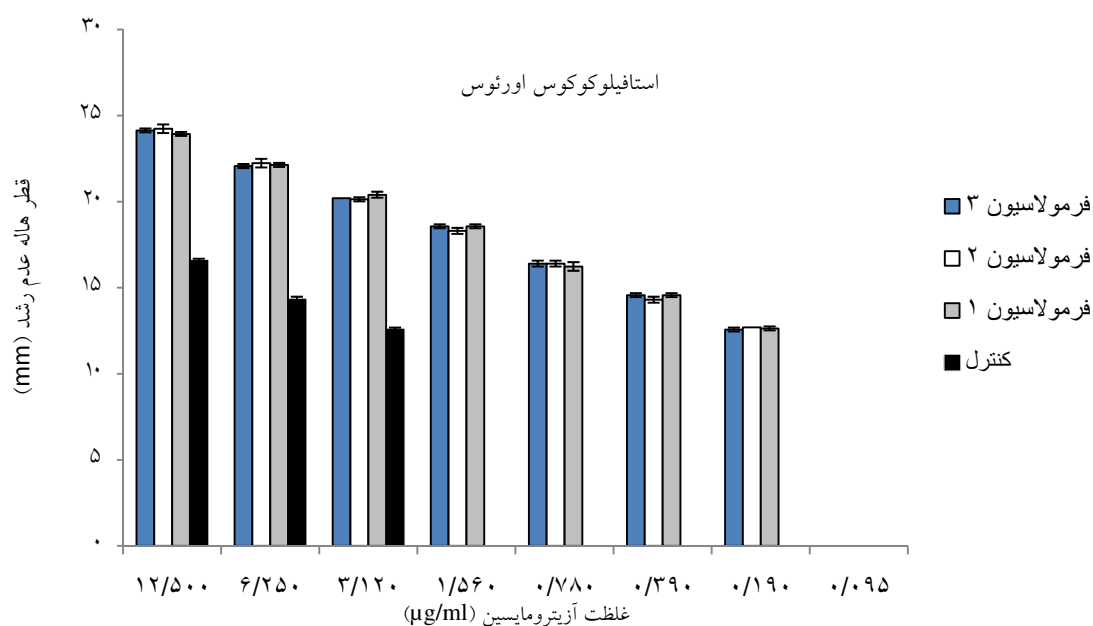
(۱) غلظت ۵۰ (۲) غلظت ۲۵ (۳) غلظت ۱۲/۵ (۴) غلظت ۶/۲۵ (۵) غلظت ۳/۱۲ (۶) غلظت ۱/۵۶ (۷) غلظت ۰/۷۸ (۸) غلظت ۰/۳۹ (۹) غلظت ۰/۱۹

(۱۰) غلظت ۰/۰۹۵ (۱۱) غلظت ۰/۰۴۸

۳-۴: قطر هاله ی عدم رشد نانوسوسپانسیون و محلول آزیترومایسین

در شکل ۴ قطر هاله ی عدم رشد نانوسوسپانسیون و نمونه کنترل (محلول) آزیترومایسین برای استافیلوکوکوس اورئوس

آورده شده است. آزمایش برای هر کدام از نمونه ها سه بار تکرار شده است. همچنین آزمایش برای نانوسوسپانسیون فاقد دارو و پلیمر خالص دارو نیز انجام شد که این نمونه ها فاقد قطر هاله ی عدم رشد بودند.



شکل ۴: قطر هاله ی عدم رشد نانوسوسپانسیون و نمونه کنترل (محلول) آزیترومایسین در پلیت استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۳: آنالیز آماری قطر هاله عدم رشد نانوسوسپانسیون ها در مقایسه با محلول دارو در غلظت برابر

Conc.(µg/ml)	(J) Formulation	Mean Difference (I-J)	Std. Error [†]	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
۱۲/۵	F۱	-۷/۳۶۶۶*	۰/۱۳۱۲۳	۰/۰۰۰	-۷/۸۲۵	-۶/۹۰۸۳
	F۲	-۷/۶۶۶۶*	۰/۱۳۱۲۳	۰/۰۰۰	-۸/۱۲۵	-۷/۲۰۸۳
	F۳	-۷/۵۶۶۶*	۰/۱۳۱۲۳	۰/۰۰۰	-۸/۰۲۵	-۷/۱۰۸۳
۶/۲۵	F۱	-۷/۸۳۳۳*	۰/۱۴۱۴۲	۰/۰۰۰	-۸/۳۲۷۳	-۷/۳۳۹۴
	F۲	-۷/۹۳۳۳*	۰/۱۴۱۴۲	۰/۰۰۰	-۸/۴۲۷۳	-۷/۴۳۹۴
	F۳	-۷/۷۶۶۶*	۰/۱۴۱۴۲	۰/۰۰۰	-۸/۲۶۰۶	-۷/۲۷۲۷
۳/۱۲	F۱	-۷/۸۳۳۳*	۰/۰۹۷۱۸	۰/۰۰۰	-۸/۱۷۲۸	-۷/۴۹۳۹
	F۲	-۷/۵۶۶۶*	۰/۰۹۷۱۸	۰/۰۰۰	-۷/۹۰۶۱	-۷/۲۲۷۲
	F۳	-۷/۶۳۳۳*	۰/۰۹۷۱۸	۰/۰۰۰	-۷/۹۷۲۸	-۷/۲۹۳۹

*. The mean difference is significant at 0.05 level.

[†]Standard Error

۴- بحث

۴-۱: مکانیسم تشکیل نانوذرات

بر اساس تحقیقات اخیر (۱۷،۱۸) مشخص شده است که نانوذرات حاوی پلیمر PLGA می توانند بر روی سطح استافیلوکوکوس اورئوس جذب سطحی شوند. البته در صورتی که پلیمر بار مثبت (ادراژیت) داشته باشد، با توجه به اینکه اکثر باکتری ها دارای بار سطحی منفی می باشند میزان این جذب سطحی به مراتب بیشتر خواهد شد. جذب سطحی نانوذرات بر روی باکتری ها می تواند به علت جاذبه الکتروستاتیک باشد. بنابراین بسته به ویژگیهای ساختاری دیواره ی سلولی باکتری مورد نظر، نانوذرات حاوی PLGA می توانند با باکتری مورد نظر واکنش داده و جذب سطحی باکتری گردیده و متعاقباً رهش دارو از نانوذرات منجر به افزایش غلظت دارو و در نتیجه نفوذ دارو به داخل باکتری و افزایش غلظت و فعالیت ضد باکتریائی آن گردد (۱۹).

به علت اندازه ی زیر میکرونی نانوذرات، این ذرات به راحتی به داخل بافت ها نفوذ می کنند که این امر منجر به رسیدن ماده ی دارویی به میزان مناسب به محل هدف در بدن می شود، پس نانوذرات در مقایسه با میکروذرات برداشت (uptake) داخل سلولی به مراتب بیشتری دارند و می توانند از لایه زیر مخاطی نفوذ کنند، در صورتی که میکروذرات در لایه ی اپیتلیال باقی می مانند. بنابراین در صورت استفاده به صورت درون تنی باز هم اثربخشی نانوذرات می تواند افزایش یابد (۲۰).

در مورد آزادسازی دارو نیز می توان گفت که دارو توسط دیفوزیون از ماتریکس پلیمری آزاد می شود و یا ماتریکس پلیمری دگراده می شود و دارو آزاد می شود که دگراداسیون پلی مر بستگی به ترکیب کوپلیمر و وزن مولکولی آن دارد (۲۱،۲۲).

PVA رایج ترین امولسیفایری است که برای تهیه ی نانوذرات PLGA استفاده می شود زیرا باعث تشکیل ذرات یکنواخت و ریزتر می شود و همچنین توزیع مجدد ذرات را در محیط آبی راحت تر می کند. البته در صورتی که PVA در سطح نانوذرات باقی بماند برداشت آن را تحت تاثیر قرار می دهد. نانوذراتی که PVA زیادی در سطح آن باقی بماند، هیدروفیل تر شده و برداشت سلولی در آنها کاهش می یابد. بنابراین ویژگیهای فیزیکی و برداشت نانوذرات را نیز می توان با تنظیم مقدار PVA باقی مانده، بهینه کرد (۲۳). از ویژگیهای دیگری که نانوذرات دارند این است که باعث تحویل اختصاصی دارو می شوند که تحویل دارو به بخش ها یا ارگانل های داخل سلولی مخصوص می تواند منجر به افزایش فراهمی زیستی ماده

برای تهیه ی نانوسپانسیون از روش MQESD استفاده شد (۱۳). مطابق این روش ابتدا آزیترومايسين و پلیمر در یک حلال مشترک که با فاز آبی اختلاط پذیر است مانند استون حل و سپس به فاز خارجی که شامل آب حاوی ۲ درصد PVA بود، قطره قطره زیر همورثنايزر با دور ۱۳۰۰۰ اضافه شد. با توجه به اینکه استون با آب اختلاط پذیر می باشد شروع به دیفوزیون به فاز آبی می کند که برای افزایش این دیفوزیون سوسپانسیون توسط مگنت به هم زده شد. با خروج استون، پلیمر که خاصیت تشکیل فیلم دارد شروع به رسوب می کند و در حین رسوب ذرات دارو را نیز در برمی گیرد و تشکیل ذره را می دهد و با توجه به اینکه دارو و پلیمر قبلاً در استون حل شده بودند و به فرم مولکولی در آمده بودند ذرات تشکیل شده در محدوده نانو قرار خواهند گرفت. در مرحله بعد حلال استون و آب توسط لیوفیلیزاسیون خارج شدند. همچنین PVA موجود در فاز آبی مانع از ادغام نانوذرات تشکیل شده در فاز آب می شود و در نتیجه نانوذرات تشکیل شده در فاز آبی پایدار خواهند بود (۱۶).

۴-۲: بررسی نحوه اثربخشی نانوذرات در مقایسه با محلول آزیترومايسين

در تهیه نانوذرات از پلیمرهای PLGA (۵۰:۵۰) و ادراژیت RS۱۰۰ استفاده شد که اندازه ذره ای نانوذرات حاوی PLGA در محدوده ی ۱۰۰-۲۳۰ نانومتر بود. در صورتی که اندازه ذره ای نانوذرات حاوی ادراژیت RS۱۰۰ به طور متوسط در محدوده ی ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بود که بنا به اندازه ذره ای مناسب نانوسپانسیون حاوی PLGA در آزمایش تعیین فعالیت ضد میکروبی از این نانوسپانسیون استفاده شد.

در آزمایش تعیین فعالیت ضد باکتریائی در روش آگار (شکل ۴) برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶ برابر افزایش اثربخشی مشاهده گردید ($p < 0.01$) که در این روش برای مقایسه اثربخشی، قطر هاله ی عدم رشد برابری از فرم نانوذره و محلول در نظر گرفته شد و سپس غلظت این قطر هاله عدم رندها با هم مقایسه گردید.

۴-۲-۱: دلایل افزایش قدرت اثربخشی نانوذرات

در مورد دلایل افزایش قدرت اثربخشی نانوذرات مکانیسم های متعددی گزارش شده است که به بعضی از این مکانیسم ها اشاره می شود. البته با توجه به اینکه فناوری نانو علمی نوپا می باشد تمامی مکانیسم های افزایش اثربخشی نانوذرات مشخص نمی باشد.

آنتی بیوتیک می گردد، زیرا نانوذرات دارو را در داخل خود محبوس کرده و مانع دگراداسیون آنتی بیوتیک توسط آنزیم های باکتریایی و عوامل محیطی و متابولیت های باکتریایی می گردد که این امر نیز باعث افزایش غلظت دارو و در نتیجه افزایش قدرت اثربخشی دارو می گردد.

با توجه به اینکه متابولیت های تولید شده توسط باکتری ها باعث اسیدی شدن محیط می شود و ماکرولیدها از جمله آزیترومايسين در محیط اسیدی تخریب می شوند (۳۰،۳۱) بنابراین نانوذرات می توانند باعث محافظت آزیترومايسين از محیط اسیدی و در نتیجه کاهش تخریب دارو و بنابراین افزایش غلظت و اثربخشی دارو گردند (۴).

از جمله مشکلات درمانی داروهای رایج می توان به نفوذپذیری کم از دیواره سلولی، دسترسی کم دارو به محل اثرش در داخل سلول، دگراداسیون دارو در بخش های مخصوصی از سلول و یا سمیت دارو اشاره کرد (۳۵-۳۲). مبارزه با عفونت های داخل سلولی شامل مشکلاتی می باشد مانند: جلوگیری از اتصال فاگولیزوزوم، مقاومت به حمله آنزیم های لیزوزومال، فرار از فاگوزوم داخل سیتوپلاسم، ترکیبات اکسیژنه و مقاومت در برابر ماکروفاژهای میزبان. بنابراین ارگانسیم های پاتوژن داخل سلولی اختیاری مانند سالمونلا، میکوباکتریوم توبرکلوزیس، بروسلا آبورتوس و پاتوژن داخل سلولی اجباری مانند لژیونلا پنوموفیلا یکی از مشکلات اساسی درمانی می باشد. اما نانوذرات با توجه به ویژگی هایی که ذکر شد بسیاری از مشکلات داروهای رایج را ندارند خصوصاً افزایش نفوذپذیری و فرار از بخش فاگولیزوزوم و یا اندولیزوزوم و همچنین تغلیظ نانوذرات در کبد و طحال در صورت استفاده ی درون تنی این حامل ها را کاندید مناسبی برای درمان عفونت های داخل سلولی که از مشکلات اساسی درمانی می باشند قرار داده است (۶،۲۰).

۵- نتیجه گیری

براساس آزمایش انجام شده مشخص شد که فرم نانوذره ی آزیترومايسين ۱۶ برابر نسبت به محلول فرم رایج دارویی آن فعالیت ضد باکتریایی بیشتری دارد ($p < 0.01$). که این افزایش فعالیت ضد باکتریایی می تواند به علت بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات، افزایش نفوذپذیری به علت ماهیت خنثی تر پلیمر نسبت به دارو که دارای بار منفی می باشد، افزایش جذب سطحی دارو و در نتیجه رهش دارو از نانوذرات که منجر به افزایش غلظت دارو در سلول می شود و کاهش تخریب دارو در فرم نانوذرات باشد.

دارویی شود که این امر منجر به کاهش عوارض جانبی داروی مورد نظر نیز می گردد. البته برای اختصاصی تر کردن تحویل دارو می توان از لیگاندهای مخصوصی استفاده کرد که باعث تمایل بیشتر نانوذره به بافت خاص شود که این مورد برای درمان بیماری های سرطانی اهمیت بیشتری دارد (۲۰).

برداشت ذرات می تواند توسط پروسه های مختلفی مانند فاگوسیتوز، پینوسیتوز و یا اندوسیتوز با واسطه ی رسپتور صورت بگیرد (۲۵،۲۴). نانو ذرات نیز بسته به خصوصیات ساختاری و سطحی که دارند توسط یکی از پروسه های زیر وارد سلول می شوند. بعد از اینکه ذرات وارد فاگوزوم یا اندوزوم شدند، بخش لیزوزومال به این بخشها چسبیده و تشکیل فاگولیزوزوم و یا اندولیزوزوم را می دهد. ارگانل لیزوزومال یکی از ارگانل های داخل سلولی است که به علت دارا بودن آنزیم های مختلف مسئول تخریب مواد وارد شده توسط فاگوزوم و اندوزوم می باشد.

بنابراین بدیهی است که هر چه ذره ای زودتر از اندولیزوزوم و یا فاگولیزوزوم فرار کند، میزان تخریب آن کمتر خواهد بود خصوصاً در مورد داروهایی که در محیط اسیدی ناپایدار می باشند (۲۸-۲۶).

تحقیقات انجام شده بیانگر آن است که نانوذرات می توانند راحت تر از این بخشها فرار کنند (۲۹، ۲۰). فرار نانوذرات از این بخشها و ورود به سیتوپلاسم، باعث کاهش میزان تخریب نانوذره و افزایش غلظت دارو در بخش سیتوپلاسمی خواهد شد (۲۸). همچنین نانوذره ای که وارد بخش سیتوپلاسمی می شود می تواند به عنوان منبع داخل سلولی برای آزاد سازی پیوسته ی دارو باشد. البته توانایی نانوذرات برای فرار از بخش اندولیزوزومال بستگی به بار سطحی نانوذرات و ویژگیهای سطحی آنها دارد (۲۸). به طوری که نانوذراتی که بار سطحی منفی در pH برابر ۷/۵ دارند و در pH برابر ۵-۴ در محیط اسیدی اندوزوم بار سطحی کاتیونی پیدا می کنند نسبت به نانوذراتی که در pH برابر ۵-۴ در محیط اسیدی اندوزومال بار سطحی منفی خود را حفظ می کنند، بیشتر تمایل به فرار از بخش اندوزومال را دارند. بنابراین می توان با تنظیم بار سطحی نانوذره کاری کرد که نانوذره به لیزوزوم یا سیتوپلاسم تمایل داشته باشد. در مورد مکانیسمی که نانوذراتی از این بخشها فرار می کنند، تصور بر این است که نانوذرات با دیواره ی وزیکولی سلول واکنش داده (شاید به علت کاتیونیزه شدن در داخل وزیکول) و این امر منجر به ناپایداری دیواره شده و نانوذره به داخل بخش سیتوپلاسمی فرار می کند (۲۰). همچنین بکارگیری نانوذرات، باعث افزایش پایداری

References:

- Fattal E., Youssef M., Couvreur P., Andreumont A. Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanosuspensions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, 33: 1540-3.
- Jaeghere F.D., Doelker E., Gurny R. In: *Encyclopedia of controlled drug delivery*, E.Mathiowitz Ed. John Wiley & Sons, New York, 1999, 641.
- O'Hara P., Hickey A.J. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization, *Pharm. Res.*, 2000, 17: 955-961.
- Turos E., Reddy S., Greenhalgh K., Ramaraju P., Sampath C., Jang A., Dickey S., Lim D. Penicillin-bound polyacrylate nanosuspensions: Restoring the activity of β -lactam antibiotics against MRS, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17: 3468-3472.
- Ramteke S., Maheshwari R.B., Jain N.K. Clarithromycin based oral sustained release nanoparticulate drug delivery system, *Ind. J. Pharm. Sci.*, 2006, 68: 479-484.
- Pinto-Alphandary H., Andreumont A., Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanosuspensions: research and applications, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 13: 155-168.
- Samuel U., Guggenbichler J.P. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 23: 75-78.
- Tiyaboonchai W., Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanosuspensions, *Int. J. Pharm.*, 2008, 329: 142-149.
- Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58: 1532-1555.
- Fawaz F., Bonini F., Maugein J., Laguëny A.M. Ciprofloxacin loaded polyisobutylcyanoacrylate nanosuspensions: pharmacokinetics and in vitro antimicrobial activity, *Int. J. Pharm.*, 1998, 168: 255-259.
- Youssef M., Fattal E., Alonso M.J., Roblot-Treupel L., Sauzie' res J., Tancre'de C., et al. Effectiveness of nanosuspension-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice, *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 32: 1204-1207.
- Stephan C., Larry H., Rodvold K. Clarithromycin and azithromycin: new macrolides antibiotics, *Clinical Pharmacy*, 1992, 11: 137-152.
- Pignatello R., Bucolo C., Ferrara P., Maltese A., Puleo A., Puglisi G. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen, *Eur. J. Pharm. Sciences*, 2002, 16: 53-61.
- Physician's Desk reference. Volume 1, 61st ed. Thompson PDR, Mont Vale NJ, 2007, 2583-2586
- The United State Pharmacopeia. Volume 2, 31st ed. Rockville, United State Pharmacopeia Convention Inc, 2008, 1476-1478.
- Mohammadi G., Valizadeh H., Barzegar-Jalali M., Lotfipour F., Adibkia K., Milani M., Azhdarzadeh M., Kiafar F., Nokhodchi A. Development of azithromycin-PLGA nanosuspensions: physicochemical characterization and antibacterial effect against *Salmonella typhi*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 80: 34-39.
- Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Redwood, 2006, 533-585.
- Dillen K., Bridts C., van d., Cos P., Vandervoort J., Augustyns K., Stevens W., Ludwig A. Adhesion of PLGA or Eudragit ((R))/PLGA nanosuspensions to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*, *Int. J.Pharm.*, 2008, 349: 234-240.
- Xu P., Gullotti E., Tong L., Highley C.H.B., Errabelli D.R., Hasan T., et al. Intracellular Drug Delivery by Poly (lactic-co-glycolic Acid) Nanosuspensions, Revisited, *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 6: 190-201.
- Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanosuspensions for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 55: 329-347.
- Anderson J.M., Shive M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Deliv. Re.*, 1997, 28: 5-24.
- Lin S.Y., Chen K.S., Teng H.H., Li M.J. (2000). In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters, *J. Microencapsul.*, 2000, 17: 577-586.
- Sahoo S.K., Panyam J., Prabha S., Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (DL - lactide-co-glycolide) nanosuspensions affects their physical properties and cellular uptake, *J. Control. Release*, 2002, 82: 105-114.
- Foster K.A., Yazdani M., Audus K.L. Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001, 53: 57-66.
- Suh H., Jeong B., Rathi R., Kim S.W. Regulation of smooth muscle cell proliferation using paclitaxel-loaded poly (ethylene oxide)-poly (lactide/glycolide) nanospheres, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 42: 331-338.
- Wagner E., Plank C., Zatloukal K., Cotten M., Birnstiel M.L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 7934-7938.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C., Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 12918-12924.
- Panyam J., Zhou W.Z., Prabha S., Sahoo S.K., Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly (dl-lactide-co-glycolide) nanosuspensions: implications for drug and gene delivery, *FASEB J.*, 2002, 16: 1217-1226.
- Chellat F., Merhi Y., Moreau A., Yahia L'H. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting, *Biomaterials*, 2005, 26: 7260-7275.
- Zuckerman J.M. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, *Infectious Disease Clinics of North America*, 2004, 18: 621-649.
- Erah P.O., Goddard A.F., Barrett D.A., Shaw P.N., Spiller R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the

treatment of *Helicobacter pylori* infection, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997, 39: 5-12.

32. Tachibana R., Harashima H., Shono M., Azumano M., Niwa M., Futaki S., Kiwada H. Intracellular regulation of macromolecules using pH-sensitive liposomes and nuclear localization signal: Qualitative and quantitative evaluation of intracellular trafficking, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1998, 251: 538-544.

33. Wattiaux R., Laurent N., Conninck S.W., Jadot M. Endosomes, lysosomes: their implications in gene transfer, Adv. Drug Del. Rev., 2000, 41: 201-208.

34. Sibley L.D., Andrews N.W. Cell invasion by unpalatable parasites, Traffic, 2000, 1: 100-106.

35. Lappalainen K., Jaaskelainen I., Syrjanen K., Urtti A., Syrjanen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes, Pharm. Res., 1994, 11: 27-113.