

تهیه و ارزیابی برون تن پودر استنشاقی حاوی نانوذرات فلوکونازول جهت درمان عفونت‌های قارچی ریه

سمیه تیموری^۱، حمیدرضا انصاری^۲، فاطمه شفیعی^۳، ژاله وروش‌ساز^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: افراد با نقص سیستم ایمنی بسیار مستعد عفونت‌های قارچی هستند. درمان عفونت‌های قارچی ریوی با انتقال اختصاصی دارو به ریه مطلوب است.

روش‌ها: نانوذرات ژئین حاوی فلوکونازول به روش ضد حلال تهیه شدند. خواص فیزیکی- شیمیایی آن‌ها بررسی شد. از فرمولاسیون بهینه، پودر استنشاقی با لاکتوز یا مانیتول تهیه و ویژگی‌های استنشاقی پودرهای تهیه شده با استفاده از کسکید ایمپکتور اندرسون ارزیابی شد. اثر ضدقارچی علیه کاندیدا آلبیکس بررسی و حداقل غلظت مهارى تعیین گردید. سمیت سلولی فلوکونازول آزاد، پودر استنشاقی حاوی نانوذره دارو، پودر استنشاقی حاوی نانوذره بدون دارو بر روی رده‌ی سلولی A549 به روش رنگ‌سنجی MTT، انجام شد.

یافته‌ها: اندازه‌ی نانوذرات در محدوده‌ی $1/35 \pm 88/70$ تا $5/40 \pm 226/90$ نانومتر بود و درصد کارایی بارگیری در محدوده‌ی $3/61 \pm 57/58$ تا $0/34 \pm 92/94$ قرار داشت. در نمونه‌های پودر استنشاقی تهیه شده، همه‌ی نمونه پودرها درصد دوز خروجی بالایی داشتند. تست سایتوتوکسیسیته نشان داد که به‌طور کلی هیچ کدام از گروه‌ها حتی بالاترین غلظت مورد مطالعه اثرات سایتوتوکسیک معنی‌داری نداشتند.

نتیجه‌گیری: استفاده از لاکتوز به‌جای مانیتول، ویژگی‌های آئرودینامیکی پودر استنشاقی را بهبود داد. پودر استنشاقی فلوکونازول تهیه شده، درصد کسر ذرات ریز مناسب و متوسط قطر جرمی آئرودینامیک پایینی داشت و می‌تواند به‌خوبی در ریه‌تشنین شود. علاوه بر این، پودر استنشاقی حاوی فلوکونازول ایمن است و اثر قابل مقایسه با فلوکونازول دارد.

واژگان کلیدی: فلوکونازول؛ نانوذرات؛ پودر خشک استنشاقی؛ بیماری‌های ریوی؛ قارچ

ارجاع: تیموری س، انصاری حمیدرضا، شفیعی فاطمه، وروش‌ساز ژاله. تهیه و ارزیابی برون تن پودر استنشاقی حاوی نانوذرات فلوکونازول جهت

درمان عفونت‌های قارچی ریه. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۲۸): ۶۱۴-۶۰۴

استفاده‌ی بسیار از داروهای ضدقارچ، به دلیل اثربخشی نامناسب، عوارض جانبی، تداخل دارویی و یا هزینه‌ی زیاد، محدود شده است (۳). درمان عفونت قارچی در مواردی که نواحی تحتانی ریه درگیر می‌شود، دشوار است (۴). بنابراین انتقال دارو به‌صورت اختصاصی و کنترل شده در سایت اثر مطلوب است (۵). راه استنشاقی، یک روش غیرتهاجمی در مصرف دارو می‌باشد. انتقال اختصاصی دارو از راه تنفسی در بیماری‌های ریوی، تماس سیستمیک دارو را کاهش می‌دهد. در نتیجه عوارض جانبی دارو کاهش می‌یابد (۶). مطالعات

مقدمه

عفونت‌های قارچی، معمولاً نتیجه‌ی استنشاق قارچ‌های ایجادکننده‌ی اسپور است و به‌ندرت، عفونت قارچی در جریان خون به دستگاه تنفس منتقل می‌شود (۱). در اکثر افراد، ایمنی ذاتی و اکتسابی، رشد قارچ‌ها را مهار می‌کند. اما افراد دارای نقص ایمنی، بیماران مبتلا به بدخیمی، HIV (Human immunodeficiency virus)، بیماری‌های خونی و بیماران پیوندی که نیاز به مصرف داروهای سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی دارند، بسیار مستعد عفونت قارچی هستند (۲).

- ۱- استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۲- دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۴- استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- نویسنده‌ی مسؤول: سمیه تیموری؛ استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: s_taymouri@pharm.mui.ac.ir

فلوکونازول استفاده گردید. یکی از معایب نانوذرات برای استفاده‌ی استنشاقی، قطر آئرودینامیک نامناسب آن‌ها است. اندازه‌ی مناسب ذرات برای نفوذ به نواحی عمقی ریه حدود ۱ تا ۵ میکرون می‌باشد. احتمال جای‌گذاری نانوذرات در عمق ریه به علت اندازه‌ی کوچک، کم است و امکان خروج آن‌ها با بازدم وجود دارد. یک راه‌حل برای این مشکل، قرار دادن نانوذرات در یک ماتریکس حامل با ابعاد میکرو است. ماتریکس حامل می‌تواند آمینواسید، کربوهیدرات یا فسفولیپید باشد. ذرات حامل، بعد از تماس با محیط آبی ریه حل خواهند شد و نانوذرات آزاد می‌شوند (۱۳، ۱۴).

بر اساس مطالب ذکر شده، در این مطالعه پودر استنشاقی حاوی نانوذرات فلوکونازول تهیه شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوپارتنیکل‌ها بررسی، فرمولاسیون بهینه انتخاب و سپس پودر استنشاقی حاوی نانوذرات با روش خشک کن افشانه‌ای در حضور لاکتوز یا مانیتول تهیه شد. سپس چگونگی توزیع ذرات در ریه در مطالعات برون‌تن توسط کسکید ایمپکتور اندرسون (Copley Scientific, UK) بررسی گردید.

روش‌ها

تهیه‌ی نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول: نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول به روش ضد حلال تهیه شدند (۱۵). ابتدا ۵ میلی‌لیتر محلول ۸۵ درصد حجمی یا ۶۵ درصد حجمی اتانول حاوی ۱۵۰ یا ۳۰۰ میلی‌گرم زئین و ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم فلوکونازول تهیه و سپس محلول فوق به‌صورت قطره‌قطره به ۳۰ سی‌سی فاز آب حاوی پلورونیک F68 (۰/۵-۰/۱ درصد وزنی-حجمی) با هم زدن شدید در دمای اتاق اضافه شد. سپس دیسپرسیون نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد توسط دستگاه روتاری (Heidolph-Hei-VAP, Germany) تا زمانی که حلال آلی تبخیر شده و نانوذرات تشکیل شود، به هم خورد. برای طراحی آزمایش از روش طراحی فاکتوریل کسری (Fractional factorial design) استفاده شد (جدول ۱).

غلظت اتانول (درصد)، مقدار پلیمر زئین، مقدار فلوکونازول، غلظت پلورونیک F68 به‌عنوان فاکتورهای مستقل انتخاب شدند. اندازه‌ی ذرات، درصد کارایی بارگیری (Encapsulation efficiency) EE، درصد بارگیری دارو (Drug loading) DL، شاخص پراکندگی ذرات (Polydispersity index) PDI، پتانسیل زتا و کارایی رهش در طول ۲۴ ساعت (RE24 درصد) به‌عنوان پاسخ انتخاب شدند. با توجه به داده‌های به‌دست آمده، اثرات متغیرهای مورد مطالعه و همچنین تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (نسخه‌ی ۱۱، US) انجام شد.

مختلف اثبات کرده‌اند که انتقال هدفمند داروهای ضدقارچ به ریه، نتایج بالینی را بهبود می‌دهد (۷).

اگر در روش استنشاقی از یک سیستم آهسته رهش استفاده شود، اثرات درمانی دارو تا چند برابر بیشتر می‌شود. رهش آهسته دارو در ریه با افزایش ماندگاری دارو در سایت اثر، اثربخشی دارو را افزایش می‌دهد و در عین حال با کاهش عوارض جانبی، پذیرش بیماران افزایش می‌یابد. تعداد زیادی از سیستم‌های دارورسانی آهسته رهش در ابعاد میکرو و نانومتر جهت انتقال دارو به‌صورت ریوی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این سیستم‌ها کلیرانس موکوسیلیاری دارو را کاهش داده، و مدت زمان توقف دارو در ریه را افزایش می‌دهد (۸).

زئین، یک پروتئین گیاهی نامحلول در آب است که حدود ۴۰ درصد کل پروتئین ذرت را تشکیل می‌دهد و از ذرت استخراج می‌شود. زئین، یک اکسپان ایمن تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده است که در فرایند روکش فیلم قرص مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است و برای تهیه‌ی نانوپارتنیکل‌ها، میکروسفیرها، فیبر و فیلم مورد استفاده قرار گرفته است. زئین، یک ترکیب آمفی‌فیلیک است که بیشتر از ۵۰ درصد آمینواسید آن از جمله لوسین، پرولین و آلانین لیپوفیل است؛ بنابراین در آب نامحلول و در اتانول با درجه الکلی بالاتر از ۷۰ درصد محلول است و برای کنترل رهش خیلی از ریز مولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۹).

در مطالعه‌ی Kamel و همکاران، نانوذرات با هسته‌ی لیپیدی و پوسته‌ی پروتئنی زئین جهت دارورسانی همزمان رتینوئیک اسید و جنستنن تهیه گردید و سپس جهت دارورسانی اختصاصی در ریه، پودر استنشاقی حاوی نانوذرات تهیه شد (۱۰).

فلوکونازول، یک داروی ضدقارچ تریازول سیتتیک است و به طور گسترده‌ای برای درمان عفونت‌های قارچی سطحی و سیستمیک استفاده می‌شود. این دارو به‌صورت خوراکی یا داخل وریدی تجویز می‌شود. دارای فعالیت مناسب علیه گونه‌های مختلف قارچ از جمله گونه‌های کاندیدا، بلاستومایکوز، هیستوپلاسما، کریپتوکوکوس و کوکسیدیوئید می‌باشد. این دارو به‌تنهایی و یا به‌صورت ترکیبی همراه با سایر داروها در درمان عفونت‌های قارچی ریه مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱). استفاده از فلوکونازول، اغلب باعث تحریک معده، سوزش سر دل، استفراغ، گهگاه همراه با زخم و کاهش در سلول‌های خونی است و معمولاً در درمان طولانی‌مدت، پذیرش بیماران کم است. جهت کاهش عوارض جانبی دارو، فرم استنشاقی دارو در درمان بیماری‌های قارچی ریه مفید است (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، از نانوذرات زئین برای دارورسانی ریوی

جدول ۱. محتوا و خواص فیزیکی فرمولاسیون‌های مختلف نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول (فرمول بهینه شده به صورت پررنگ نشان داده شده است)

فرمولاسیون	غلظت Pluronic F68% (w/v%)	مقدار فلوکونازول (mg)	مقدار پلیمر زئین (mg)	غلظت اتانول (v/v%)	سایز نمونه (نانومتر ± انحراف معیار)	پتانسیل زتا (میلی ولت ± انحراف معیار)	ایندکس شاخص پراکندگی	راندمان رهاسازی ۲۴ ساعته	درصد بارگیری دارو	درصد کارایی بارگیری
نمونه ۱	۰/۵	۵۰	۱۵۰	۶۵	۲۵/۶۱ ± ۱۹۸/۰۶	۰/۱۲ ± ۱۹/۷۷	۰/۰۵ ± ۰/۲۴	۷/۱۸ ± ۵۷/۳۶	۰/۵۱ ± ۱۹/۷۰	۲/۳۷ ± ۷۳/۵۹
نمونه ۲	۱/۰	۱۰۰	۳۰۰	۸۵	۳۶/۸۶ ± ۱۵۰/۹۳	۰/۵۶ ± ۱۶/۹۰	۰/۰۸ ± ۰/۳۶	۱۱/۱۸ ± ۸۳/۷۸	۱/۴۴ ± ۲۰/۳۱	۶/۷۵ ± ۷۶/۵۴
نمونه ۳	۱/۰	۵۰	۱۵۰	۸۵	۴۲/۱۴ ± ۱۶۸/۴۰	۱/۲۵ ± ۲۳/۲۰	۰/۰۳ ± ۰/۴۴	۱۰/۴۷ ± ۸۱/۵۴	۰/۸۳ ± ۱۹/۷۳	۳/۸۵ ± ۷۳/۷۷
نمونه ۴	۵/۰	۱۰۰	۳۰۰	۸۵	۴۲/۴۳ ± ۱۶۰/۷۰	۱/۴۰ ± ۱۹/۲۷	۰/۱۲ ± ۰/۲۶	۳/۴۳ ± ۸۵/۷۹	۲/۲۲ ± ۲۰/۵۰	۱۰/۳۷ ± ۷۷/۵۶
نمونه ۵	۱/۰	۵۰	۳۰۰	۶۵	۵۸/۵۰ ± ۱۹۰/۰۷	۰/۲۱ ± ۲۵/۹۳	۰/۰۴ ± ۰/۲۴	۶/۴۹ ± ۶۵/۹۳	۰/۲۲ ± ۱۰/۶۵	۱/۶۵ ± ۷۱/۵۴
نمونه ۶	۱/۰	۱۰۰	۱۵۰	۸۵	۴۶/۵۶ ± ۱۳۸/۴۷	۰/۹۱ ± ۱۵/۰۷	۰/۱۲ ± ۰/۳۶	۱/۹۲ ± ۷۱/۸۸	۰/۳۲ ± ۳۴/۷۲	۱/۱۲ ± ۷۹/۷۷
نمونه ۷	۵/۰	۵۰	۳۰۰	۶۵	۷/۷۵ ± ۱۳۴/۷۷	۰/۵۶ ± ۲۲/۲۰	۰/۰۳ ± ۰/۲۳	۶/۶۹ ± ۷۳/۳۸	۱/۱۷ ± ۱۰/۵۸	۸/۸۳ ± ۷۱/۰۳
نمونه ۸	۵/۰	۵۰	۳۰۰	۸۵	۱/۲۹ ± ۱۵۲/۰۳	۰/۸۵ ± ۱۸/۶۰	۰/۰۱ ± ۰/۲۷	۵/۵۱ ± ۷۹/۷۰	۱/۲۷ ± ۱۱/۱۱	۹/۵۴ ± ۷۵/۰۷
نمونه ۹	۱/۰	۵۰	۱۵۰	۶۵	۰/۸ ± ۱۲۳/۳۷	۰/۷۸ ± ۲۴/۵۰	۰/۰۲ ± ۰/۴۳	۸/۰۴ ± ۷۱/۲۸	۰/۸۵ ± ۱۶/۱۰	۳/۶۱ ± ۵۷/۵۸
نمونه ۱۰	۱/۰	۱۰۰	۳۰۰	۶۵	۱/۱۸ ± ۱۱۵/۰۰	۰/۵۷ ± ۲۳/۳۳	۰/۰۱ ± ۰/۲۵	۲/۶۵ ± ۷۷/۹۱	۰/۰۷ ± ۲۳/۶۵	۰/۳۴ ± ۹۲/۹۴
نمونه ۱۱	۵/۰	۱۰۰	۱۵۰	۸۵	۰/۸۱ ± ۱۲۳/۹۳	۰/۵۵ ± ۱۹/۸۳	۰/۰۴ ± ۰/۳۲	۱۰/۲۳ ± ۸۰/۴۰	۰/۱۹ ± ۳۰/۹۸	۰/۶۱ ± ۶۷/۳۴
نمونه ۱۲	۵/۰	۱۰۰	۳۰۰	۶۵	۱/۴۴ ± ۱۴۱/۹۷	۱/۰۵ ± ۲۶/۱۰	۰/۰۱ ± ۰/۲۶	۳/۳۱ ± ۸۰/۵۹	۰/۱۶ ± ۱۹/۷۸	۰/۷۵ ± ۷۳/۹۹
نمونه ۱۳	۵/۰	۱۰۰	۱۵۰	۶۵	۵/۳۸ ± ۹۷/۰۲	۱/۵۵ ± ۱۶/۹۷	۰/۰۸ ± ۰/۲۸	۷/۲۷ ± ۷۸/۶۴	۰/۲۷ ± ۳۲/۳۷	۰/۰۹ ± ۷۱/۷۹
نمونه ۱۴	۱/۰	۱۰۰	۱۵۰	۶۵	۱/۳۵ ± ۸۸/۷۰	۰/۶۰ ± ۱۴/۶۰	۰/۰۳ ± ۰/۳۱	۹/۰۳ ± ۸۵/۳۶	۰/۱۸ ± ۳۰/۶۹	۰/۵۶ ± ۶۶/۴۳
نمونه ۱۵	۱/۰	۵۰	۳۰۰	۸۵	۱/۸۵ ± ۱۲۰/۲۰	۱/۰۰ ± ۱۶/۸۷	۰/۰۱ ± ۰/۲۴	۴/۰۳ ± ۸۶/۵۴	۰/۳۶ ± ۱۲/۶۳	۲/۸۷ ± ۸۶/۷۱
نمونه ۱۶	۵/۰	۵۰	۱۵۰	۸۵	۵/۴۰ ± ۲۲۶/۹۰	۰/۱۷ ± ۱۵/۳۰	۰/۰۸ ± ۰/۵۰	۶/۴۳ ± ۶۳/۰۹	۰/۹۹ ± ۱۹/۹۶	۴/۶۶ ± ۷۴/۸۴

فرمول ۳

$$RE24\% = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100 \cdot t}} \times 100$$

مطالعه‌ی طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR): طیف FTIR پلیمر زئین، نانوذرات زئین بهینه حاوی فلوکونازول، فلوکونازول با استفاده از دستگاه FTIR (FT/IR-4X، جاسکو، ژاپن) در محدوده‌ی ۳۵۰-۴۰۰۰ cm^{-1} ثبت شد. نانوذرات زئین بهینه با سرعت ۷۸۰۰ دور/دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، نانوذرات جدا و سپس در آب پراکنده و با استفاده از دستگاه فریزدرایر خشک شدند.

تهیه‌ی پودر خشک استنشاقی نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول:

برای تهیه‌ی پودر استنشاقی نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول، مقداری از نانوذرات بهینه معادل ۱۶۰ میلی‌گرم فلوکونازول تهیه و سایر اکسیپان‌ها مطابق جدول ۲ اضافه شدند. سپس هر نمونه با استفاده از یک خشک‌کن افشانه‌ای در مقیاس آزمایشگاهی (Mini Spray Dryer B-290) در دمای ۱۰۰ درجه، سرعت اسپراتور ۱۰۰ درصد خشک شد. پودرهای حاصل در ظروف در بسته جمع‌آوری و تا استفاده‌ی بعدی در دسیکاتور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ویژگی‌های استنشاقی پودرهای تهیه شده با استفاده از کسکید ایمپکتور اندرسون، ارزیابی شد. برای این منظور، ۲۰ میلی‌گرم از هر فرمول در کپسول‌های ژلاتین سخت اندازه ۳ ریخته شد. کپسول‌ها سوراخ شده و پودر در سراسر دستگاه با سرعت جریان ۶۰ لیتر/دقیقه آئروسول شد. پس از آئروسول شدن پودرها دستگاه Cyclohaler®، آداپتور دهانی، گلوبی، فیلتر و ۷ طبقه با آب و اتانول (۲:۱) شستشو شد. در نهایت، داروی استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر UV/Visible در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید.

تعیین اندازه‌ی ذرات، PDI (Polydispersity index) و پتانسیل

زتا: میانگین اندازه‌ی ذرات، PDI و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه نانو- زتا سایزر مالورن تعیین شد.

DL% (Drug loading) و EE% (Encapsulation efficiency)

۱ میلی‌لیتر از هر نمونه در لوله‌های میکروتیوب ریخته شد. نانوذرات حاوی دارو در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با استفاده از سانتریفیوژ با شتاب ۱۳۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه جدا شدند. مقدار داروی آزاد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. EE% در نانوذرات و DL% با استفاده از فرمول ۱ و ۲ محاسبه گردید:

فرمول ۱

$$EE\% = \frac{\text{وزن داروی آزاد} - \text{وزن داروی اولیه}}{\text{وزن داروی اولیه}} \times 100$$

فرمول ۲

$$DL\% = \frac{\text{مقدار داروی به دام افتاده در نانو ذرات زئین}}{\text{مقدار کل وزن نانو ذرات زئین}} \times 100$$

مطالعه‌ی آزادسازی دارو: ۲ یا ۴ میلی‌لیتر از هر نمونه در کیسه‌ی

دیالیز ریخته و کیسه‌ی دیالیز در ۲۰ سی‌سی بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مقدار داروی آزاد شده در فواصل زمانی از پیش تعیین شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بر اساس سه بار تکرار در اندازه‌گیری ارائه شده‌اند. کارایی رهش در ۲۴ ساعت (RE24%) با کمک فرمول ۳ محاسبه گردید.

جدول ۲. داده‌های رسوب پودر استنشاقی حاوی نانوذرات فلوکونازول

فرمولاسیون	نسبت فلوکونازول/حامل	لوسین (وزنی/وزنی)	درصد پمپ	سایز ذرات (میکرومتر)	بازده محصول (درصد)	دوز خروجی (درصد)	کسر ذرات ریز (درصد)	انحراف استاندارد هندسی	متوسط قطر جرمی
F1	-	۱۰	۵	۳/۸۰ \pm ۰/۲۹	۶۸/۳۷ \pm ۰/۶۶	۸۸/۹۵ \pm ۰/۶۵	۵۷/۸۷ \pm ۲/۱۰	۲/۲۱ \pm ۰/۰۱	۴/۱۱ \pm ۰/۰۳
F2	-	-	۵	۳/۸۵ \pm ۰/۳۹	۴/۵۵ \pm ۰/۴۷	۸۷/۲۲ \pm ۱/۹۳	۵۲/۶۹ \pm ۲/۸۸	۲/۲۴ \pm ۰/۰۳	۴/۰۷ \pm ۰/۳۷
F3	-	۱۰	۲	۴/۲۲ \pm ۰/۱۲	۵/۵۶ \pm ۰/۳۵	۹۵/۷۷ \pm ۰/۹۰	۵۷/۳۰ \pm ۱/۶۲	۲/۳۵ \pm ۰/۱۰	۳/۹۲ \pm ۰/۲۷
F4	-	-	۲	۴/۳۶ \pm ۰/۲۱	۵۷/۷۶ \pm ۰/۳۷	۹۴/۹۶ \pm ۲/۳۲	۵۱/۹۹ \pm ۲/۶۹	۲/۳۳ \pm ۰/۰۷	۴/۱۴ \pm ۰/۳۹
F5	۱۰:۰:۱	-	۵	۵/۱۱ \pm ۰/۱۱	۶۴/۵۶ \pm ۰/۸۳	۹۲/۲۸ \pm ۰/۳۷	۴۰/۳۱ \pm ۲/۳۲	۲/۳۱ \pm ۰/۰۳	۵/۴۱ \pm ۰/۴۵
F6	۱۰:۰:۱	-	۵	۵/۳۱ \pm ۰/۱۰	۴۰/۴۴ \pm ۰/۳۲	۸۸/۴۷ \pm ۰/۴۸	۳۲/۶۹ \pm ۱/۳۳	۲/۲۷ \pm ۰/۰۱	۵/۹۸ \pm ۰/۴۱
F7	۱۰:۰:۱	-	۲	۵/۴۹ \pm ۰/۱۷	۵۸/۱۴ \pm ۱/۳۰	۹۴/۷۷ \pm ۰/۹۰	۴۶/۴۹ \pm ۱/۷۷	۲/۴۶ \pm ۰/۱۲	۵/۱۷ \pm ۰/۵۵
F8	۱۰:۰:۱	-	۲	۵/۳۷ \pm ۰/۲۱	۵۵/۵۷ \pm ۰/۱۷	۹۱/۵۵ \pm ۱/۰۹	۳۳/۶۱ \pm ۰/۸۷	۲/۴۶ \pm ۰/۰۹	۶/۱۷ \pm ۰/۴۶

اندازه‌ی ذرات: اندازه‌ی ذرات در محدوده‌ی بین $1/35 \pm 88/70$ تا $5/40 \pm 226/90$ نانومتر متغیر بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که مقدار دارو، غلظت سورفکتانت و غلظت اتانول بر اندازه‌ی ذره‌ی نانوذرات تأثیر معنی‌داری داشت. با افزایش غلظت اتانول و درصد سورفکتانت، اندازه‌ی ذرات افزایش یافت؛ اما افزایش مقدار دارو، اندازه را کاهش داد.

ایندکس شاخص پراکندگی (PDI) (Polydispersity Index)

PDI که نمایانگر توزیع اندازه و یکنواختی سیستم است در محدوده‌ی $0/03 \pm 0/23$ تا $0/08 \pm 0/50$ متغیر بود (جدول ۱). تحلیل و داده‌های آماری نشان داد که غلظت اتانول و درصد سورفکتانت در میزان PDI به طور معنی‌داری مؤثر هستند. به‌طوری که افزایش غلظت اتانول، PDI را افزایش می‌دهد. در مقابل، افزایش مقدار پلیمر، PDI را کاهش داد.

کارایی بارگیری (EE%) (Encapsulation efficiency)

به جدول ۱، EE% در بازه‌ی $3/61 \pm 57/58$ تا $0/34 \pm 92/94$ قرار می‌گیرد. مقدار پلیمر و غلظت سورفکتانت فاکتورهای تأثیرگذار بر روی درصد EE% بودند به‌طوری که با افزایش مقدار پلیمر و غلظت سورفکتانت EE% افزایش می‌یابد.

درصد بارگیری دارو (DL) (Drug loading)

به جدول ۱ در بازه‌ی $1/17 \pm 10/58$ تا $0/32 \pm 34/72$ قرار می‌گیرد. همچنین آنالیز نتایج نشان داد که افزایش مقدار دارو، DL% را افزایش داده و افزایش مقدار پلیمر، DL% را کاهش می‌دهد.

پتانسیل زتا:

بر اساس نتایج جدول ۱، این میزان بین $0/60 \pm 14/60$ تا $1/05 \pm 26/10$ متغیر است. آنالیز آماری نتایج نشان داد که میزان غلظت اتانول، مقدار پلیمر و دارو به صورت معنی‌داری بر پتانسیل زتا اثر دارد و مقدار پتانسیل زتا با افزایش میزان اتانول و مقدار دارو کاهش و با افزایش میزان پلیمر افزایش می‌یابد.

درصد کارایی رهاسازی ۲۴ ساعته (RE₂₄) (Release efficiency over 24 h)

شکل ۱ بیانگر رفتار رهش دارو فرمولاسیون‌های مختلف در محیط بافر فسفات است. میانگین نتایج RE₂₄% فلوکونازول، بر اساس نتایج گزارش شده در جدول ۱، بین $7/18 \pm 57/36$ تا $4/03 \pm 86/54$ متغیر بود. RE₂₄% با افزایش غلظت اتانول، مقدار پلیمر و مقدار دارو افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت سورفکتانت کاهش یافت.

فرمولاسیون بهینه:

برای شناسایی بهترین فرمولاسیون از نرم‌افزار Design-Expert[®] استفاده شد. معیار انتخاب نانوذرات حاوی فلوکونازول، الف) حداقل اندازه‌ی ذرات و PDI؛ ب) ماکزیمم EE%؛ DL%؛ پتانسیل زتا و RE₂₄% بود.

آزمایش ۳ بار تکرار شد. بر اساس مقدار داروی به‌دست آمده از بخش‌های مختلف دستگاه، ویژگی‌های استنشاقی پودر مانند درصد کسر ذرات ریز (Fine particle fraction) FPF %، درصد دوز خروجی (Emitted dose) ED%، متوسط قطر جرمی آئرو‌دینامیک (Median mass aerodynamic diameter) MMAD و انحراف استاندارد هندسی (Geometric standard deviation) GSD اندازه‌گیری شد.

بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron

SEM (Microscope) مورفولوژی نانوذرات بهینه و پودر استنشاقی با استفاده از SEM ارزیابی شد.

بررسی اثر ضدقارچ:

بررسی اثر ضدقارچ با استفاده از روش رقت‌سازی سریالی و به شرح زیر انجام گرفت. برای انجام این مطالعه، نمونه‌ی تلقیحی از کاندیدا آلیکنس PTCC-5027 با غلظت 10^5 CFU/ml تهیه شد. در این آزمایش، ۵ نمونه مورد سنجش قرار گرفت که عبارت بودند از: ۱. فلوکونازول؛ ۲. نمونه‌ی نانوذرات بهینه‌ی حاوی دارو؛ ۳. نانوذرات بهینه‌ی بدون دارو؛ ۴. پودر استنشاقی بهینه‌ی حاوی نانوذرات دارو؛ ۵. پودر استنشاقی بهینه‌ی حاوی نانوذرات بدون دارو.

از هر یک از این نمونه‌ها چندین غلظت مختلف در رنج ۳۱ تا ۱۰۰۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی به لوله‌های آزمایش اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. در پایان، تعیین MIC با در نظر گرفتن حداقل غلظتی از نمونه مورد آزمایش که از رشد قارچ جلوگیری کرده تعیین گردید. محیط کشت فاقد میکروب نیز به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد.

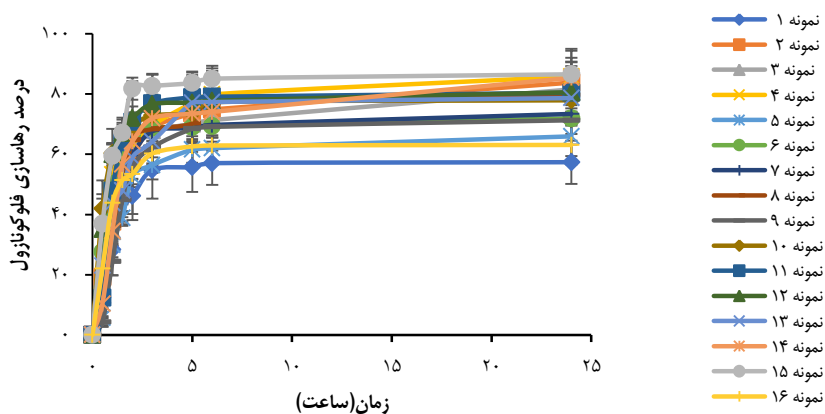
ارزیابی سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی:

سمیت سلولی داروی آزاد (فلوکونازول)، پودر استنشاقی حاوی نانوذره دارو، پودر استنشاقی حاوی نانوذره بدون دارو با استفاده از روش MTT در رده‌ی سلولی A549، در غلظت‌های مختلف ($1-0/001$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. پودر استنشاقی حاوی نانوذره بدون دارو در غلظت معادل حاوی داروی آن ارزیابی شد (۱۶).

این مطالعه با کد اخلاق در پژوهش (IR.MUI.RESEARCH.REC.1400.348) در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید.

یافته‌ها

در این مطالعه، نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول به روش ضد حلال تهیه گردید. در مجموع، ۱۶ فرمولاسیون تهیه شد که ویژگی‌های فیزی‌کوشیمیایی مربوط به هر فرمولاسیون‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱. پروفایل‌های آزادسازی فلوکونازول از فرمول‌های مختلف مورد مطالعه برای بررسی اثر مقدار پلیمر زئین، غلظت پلورونیک F68، غلظت اتانول (%) و مقدار فلوکونازول بر میزان آزادسازی نانوذرات

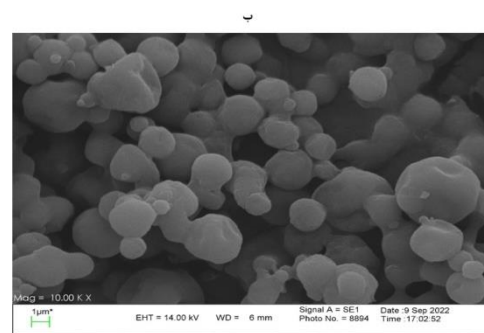
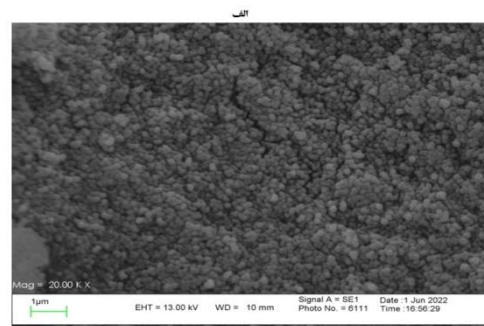
نتایج مطالعات FTIR: نمودارهای FTIR فلوکونازول، نانوذرات زئین و نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول در شکل ۳ الف نشان داده شده است.

برای فلوکونازول، پیک $1620/88 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به حلقه‌ی تری آزول است و پیک‌ها در $1272/79 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده‌ی پیوند C-F است. پیک جذبی مربوط به پیوند OH در ناحیه‌ی 3120 cm^{-1} می‌باشد. برای پلیمر زئین پیک مشخص $1520/6 \text{ cm}^{-1}$ و $1653/66 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به گروه عاملی آمید نوع ۱ و ۲ می‌باشد پیک‌های $2959/23$ و $2874/38 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-H آلیفاتیک است و پیک در ناحیه‌ی $3411/46 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به باند جذبی N-H می‌باشد. نمودار FTIR نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول، پیک دارو در ناحیه‌ی $1279/79 \text{ cm}^{-1}$ قابل مشاهده می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی بارگیری موفق دارو در نانوذرات است. علاوه بر آن، پیک $3411/46$ در پلیمر زئین به 3343 cm^{-1} در طیف نانوذرات حاوی دارو شیفت پیدا کرده است که می‌تواند به دلیل تداخلات بین مولکولی بین دارو و زنجیره‌ی پلیمری زئین باشد (۱۷، ۱۸).

مطالعات تفرق اشعه‌ی ایکس (XRD): در شکل ۳ ب، پراش پرتوی ایکس نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول، پلیمر زئین و فلوکونازول نشان‌دهنده شده است. الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به داروی فلوکونازول پیک‌های متعددی در نواحی 20° ، $25/5^\circ$ ، $16/5^\circ$ را نشان می‌دهد که به علت ساختار بلوری دارو در حالت جامد است. الگوهای پراش پرتو ایکس زئین نشان‌دهنده‌ی ماهیت آمورف این ترکیب می‌باشد. حذف پیک‌های دارو در الگوهای پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه‌های حاوی نانوذرات فلوکونازول، نشان می‌دهد که دارو در نمونه‌های نانوذرات به صورت مولکولار پراکنده شده یا به شکل آمورف موجود است.

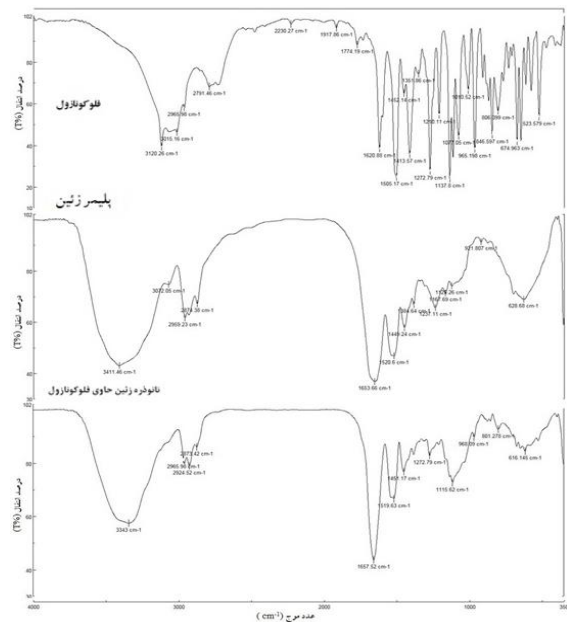
با استفاده از این معیارها، با سطح مطلوبیت ۷۹ درصد، فرمولاسیون با ۶۵ درصد حجمی اتانول، ۳۰۰ میلی‌گرم زئین، ۱۰۰ میلی‌گرم فلوکونازول و ۰/۱ درصد وزنی - حجمی پلورونیک F68 به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد.

مورفولوژی نانوذرات: تصاویر حاصل از مورفولوژی نانوذرات زئین حامل فلوکونازول در شکل ۲ الف نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نانوذرات کروی با اندازه‌ی مشابه با اندازه‌ی به دست آمده با دستگاه پارتیکل سایز آنالیزر می‌باشد.

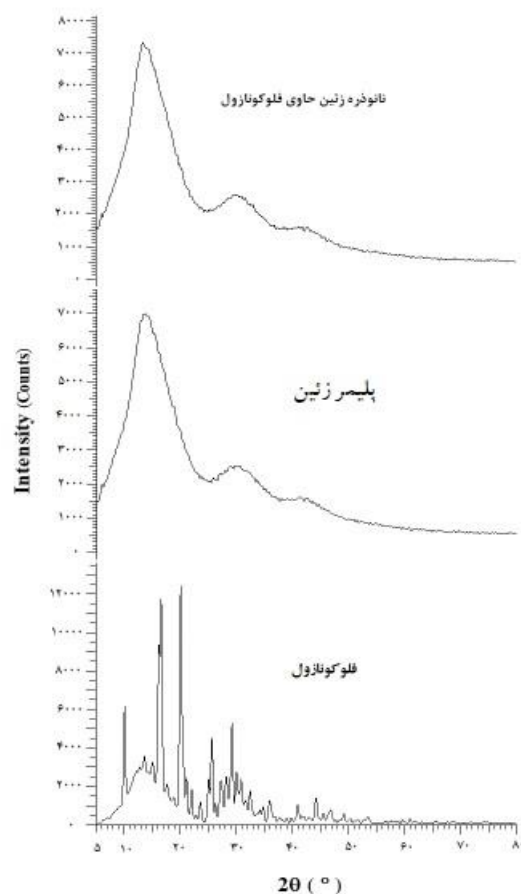


شکل ۲. تصویر SEM (الف) نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول (ب) پودر بهینه نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول

الف



ب



شکل ۳. الف) طیف سنجی مادون قرمز ب) الگوهای پراش پرتو ایکس (XRD)

بررسی چگونگی توزیع پودر در ریه در برون تن: ویژگی‌های آئرودینامیک پودر خشک حاوی نانوذرات فلوکونازول که با مانیتول یا لاکتوز تهیه شدند در جدول ۲ نشان داده شده است. بازده محصول بین ۰/۳۲ ± ۰/۷۴ تا ۰/۶۶ ± ۰/۳۷ درصد بود. همه‌ی نمونه پودرها ۱/ED بالایی دارند (بین ۱/۹۳ ± ۸۷/۲۲ تا ۰/۹۰ ± ۹۵/۷۷) و دارای حداقل اتلاف دارو در کیسول و دستگاه استنشاقی هستند. اندازه‌ی ذرات یک پارامتر کلیدی مؤثر بر محل جای‌گیری و مقدار داروی استنشاقی است که در ریه جای می‌گیرد. MMAD بین ۱ تا ۵ میکرون، پیش‌نیاز برای رسیدن پودر به نواحی تحتانی ریه است (۱۹). MMAD به دست آمده در محدوده‌ی ۰/۲۷ ± ۳/۹۲ تا ۰/۴۶ ± ۶/۱۷ میکرومتر می‌باشد. MMAD با تغییر حامل از مانیتول به لاکتوز کاهش یافت (P < ۰/۰۵). FPF، با تغییر حامل از مانیتول به لاکتوز افزایش داشت (P < ۰/۰۵). با تغییر درصد پمپ از ۵ درصد به ۲ درصد، ۱/ED، FPF% و بازده محصول به صورت وزنی-وزنی لوسین، ۱/ED، FPF% و بازده محصول به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در نهایت، فرمولاسیون F3 با ماکزیمم ۱/ED، بازده و FPF% مناسب انتخاب شد. تصاویر SEM پودر بهینه نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول در شکل ۲.ب نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ذرات اسپری تقریباً کروی با اندازه در ابعاد میکرومتر می‌باشند.

بررسی اثر ضدقارچ: در جدول ۳، حداقل غلظت مهار (MIC)، ترکیب مورد آزمایش نشان داده شده است. نتایج ارزیابی اثرات ضد میکروبی نمونه‌های مختلف بر کاندیدا آلبیکنس PTCC-5027 حاصل از سه بار تکرار نشان داد که نمونه‌های نانوذرات بهینه حاوی دارو و پودر استنشاقی بهینه حاوی دارو اثر ضدقارچی مشابهی نسبت به فلوکونازول دارند (P = ۱/۰۰۰). این مقایسه نشان می‌دهد که استفاده از نانوذرات بهینه حاوی دارو و پودر استنشاقی بهینه حاوی نانوذرات دارو می‌تواند به طور مؤثری رشد قارچ را مهار کند و به‌عنوان روشی مؤثر در کنترل عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرد. نانوذرات بهینه بدون دارو و پودر استنشاقی بهینه بدون دارو نتوانستند به تنهایی تأثیر قابل توجهی در مهار رشد قارچ داشته باشند، درحالی‌که نانوذرات بهینه حاوی دارو و پودر استنشاقی بهینه حاوی نانوذرات دارو به طور قابل توجهی رشد قارچ را مهار کردند.

ارزیابی سمیت سلولی در رده‌ی سلولی A549 بر اساس آزمایشات ارزیابی سمیت سلولی در رده‌ی سلولی A549، سه نمونه مورد بررسی شامل داروی آزاد (فلوکونازول)، پودر استنشاقی حاوی نانوذرات دارو، پودر استنشاقی حاوی نانوذرات بدون دارو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شد.

جدول ۳. حداقل غلظت مهاری فرمولاسیون‌های مختلف

حداقل غلظت مهاری MIC ($\mu\text{g/ml}$)					میکروارگانیزم
ترکیبات					کاندیدا آلبیکانس
پودر استنشاقی بیهنه حاوی نانوذرات بدون دارو	پودر استنشاقی بیهنه حاوی نانوذرات دارو	نانوذرات بیهنه بدون دارو	نانوذرات بیهنه حاوی دارو	فلوکونازول	
۱۰۰۰/۰۰ ± ۰/۰۱	۹۰/۰۰ ± ۰/۰۱	۱۰۰۰/۰۰ ± ۰/۰۱	۹۰/۰۰ ± ۰/۰۱	۹۰/۰۰ ± ۰/۰۱	

ظرفیت ذرات برای بارگیری دارو بود (۲۴).

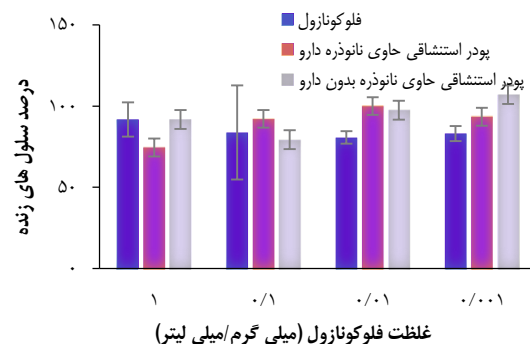
نتایج نشان داد با افزایش میزان پلیمر و اکسیپانت مطابق با فرمول ۲، DL% کاهش می‌یابد و در مقابل با افزایش میزان دارو، DL% افزایش می‌یابد (۲۵).

افزایش محتوای غلظت اتانول منجر به کاهش پتانسیل زتا شد. این یافته ممکن است با تشکیل ذرات با اندازه‌ی بزرگ‌تر، رابطه داشته باشد. ذرات درشت‌تر دارای نسبت سطح به حجم کمتری بودند که به نوبه خود، چگالی بار سطحی نانوذرات را کاهش داد (۲۶). با وجود اندازه‌ی کمتر، بار مثبت کمتر با افزایش دارو می‌تواند به علت تداخل گروه‌های فلوکونازول جذب شده در سطح ذرات با پلیمر باشد که منجر به کاهش بار مثبت ذرات شود که با مشاهدات Morteza-Semnani و همکاران مطابقت داشت (۲۷). در مقابل، افزایش پتانسیل زتا با افزایش مقدار پلیمر زئین می‌تواند به علت در معرض قرار گرفتن بخش‌های کاتیونی پلیمر زئین باشد (۲۲). نتایج یافت شده با مشاهدات de Souza Tavares و همکاران مطابقت داشت (۲۸).

مقدار دارو و بارگیری دارو بر RE24% تأثیر بسزایی دارد؛ افزایش مقدار دارو در فرمولاسیون‌ها باعث افزایش RE24% می‌شود که می‌تواند به علت کاهش نسبت پلیمر/دارو باشد (۲۹). با افزایش سورفکتانت پلورونیک F68، مقادیر RE24% کاهش می‌یابد که می‌تواند به دلیل ایجاد یک شبکه‌ی محکم به وسیله‌ی سورفکتانت پلورونیک F68 روی سطح نانوذرات باشد که بعد از حذف حلال آلی در ساخت نانوذره اتفاق می‌افتد (۳۰). افزایش RE24% با افزایش میزان اتانول ممکن است به علت تفاوت در خصوصیات سطحی ذرات با مقادیر مختلف اتانول باشد. با افزایش اتانول و کاهش سرعت رسوب ذرات، منافذ سطح ذرات افزایش یافته و سرعت رهش افزایش می‌یابد (۱۶). با افزایش مقدار پلیمر، RE24% افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل افزایش EE% دارو باشد (۳۱). با افزایش مقدار پلیمر زئین، ظرفیت موجود برای جذب و نگهداری دارو افزایش می‌یابد. این امر منجر به بهبود EE% می‌شود.

پایین‌تر بودن FPF% و بالاتر بودن MMAD پودرهای حاوی مانیتول نسبت به پودرهای حاوی لاکتوز می‌تواند به علت چسبندگی بالای مانیتول باشد که باعث افزایش اندازه‌ی ذرات خارج شده از

نتایج نشان داد که درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر ۳ نمونه‌ی مورد مطالعه و در غلظت‌های مختلف بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون بیش از ۷۴ درصد بود. این نتایج نشان می‌دهد که تمامی فرمولاسیون‌های تهیه شده دارای خواص زیست‌سازگاری هستند.



شکل ۴. ارزیابی سمیت سلولی فلوکونازول، پودر استنشاقی حاوی نانوذرات دارو، پودر استنشاقی حاوی نانوذرات بدون دارو روی سلول‌های A549 بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده، اندازه‌ی ذرات با افزایش غلظت اتانول افزایش می‌یابد که می‌تواند به علت کاهش سرعت رسوب نانوذرات به دلیل افزایش غلظت اتانول باشد (۲۰). با افزایش غلظت سورفکتانت پلورونیک F68، احتمال متراکم شدن سورفکتانت در سطح ذرات با ایجاد لوپ توسط بخش هیدروفوب و دم توسط بخش هیدروفیل افزایش می‌یابد، احتمال ایجاد پل بین ذرات اولیه و تشکیل ذرات بزرگ‌تر بیشتر می‌شود (۲۱). با افزایش مقدار فلوکونازول، اندازه‌ی ذرات کاهش یافت که این کاهش اندازه ممکن است به علت تداخلات الکتروستاتیک بین زئین و دارو و متراکم شدن ساختمان نانوذرات باشد (۲۲).

میزان پلیمر بیشترین تأثیر را در EE% داشت که با افزایش پلیمر درصد EE% افزایش یافت و در مطالعات مشابه نیز این مورد اتفاق افتاد (۲۳) که می‌تواند به علت افزایش ویسکوزیته فاز هیدرو الکلی و کاهش انتشار دارو به فاز آبی باشد. با افزایش غلظت سورفکتانت، EE% افزایش یافت که احتمالاً به دلیل افزایش اندازه و افزایش

بودند. پس از تهیه پودر استنشاقی، مشاهده شد که استفاده از حامل لاکتوز به جای مانیتول اثرات قابل توجهی بر بازده و ویژگی‌های آئروپنایمیکی پودر داشته است. از بین فرمولاسیون‌های پودر استنشاقی، فرمولاسیون F3 با حامل لاکتوز و درصد پمپ ۲ درصد، مناسب‌ترین حامل استنشاقی انتخاب گردید. با توجه به داده‌های بررسی اثر ضدقارچی، نانوذرات بهینه حاوی دارو و پودر استنشاقی بهینه حاوی نانوذرات دارو و فلوکونازول، دارای اثر ضدقارچی قابل‌قبولی بر روی کاندیدا آلیکنس هستند. نتایج ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که به‌طور کلی هیچ کدام از گروه‌ها حتی در بالاترین غلظت مورد مطالعه اثرات سایتوتوکسیک معنی‌داری نداشتند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای حرفه‌ای رشته‌ی داروسازی به شماره‌ی ۳۴۰۰۶۵۰ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید. بدین‌وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تقدیر و تشکر می‌شود.

دستگاه اینهالر می‌شود (۳۲). با توجه به نتایج آماری به‌دست آمده از جدول ۲، با تغییر حامل از مانیتول به لاکتوز، ED٪ تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت. افزایش ED٪ با کاهش درصد پمپ از ۵ درصد به ۲ درصد را می‌توان به علت فرصت بیشتر برای خشک شدن با کاهش درصد پمپ و محتوای آب کمتر ذرات دانست (۳۳). افزایش ED٪/FPF و بازده محصول با افزودن لوسین می‌تواند به علت اصلاح سطح ذرات توسط لوسین باشد که منجر به کاهش تداخلات بین ذرات و تولید یک پودر استنشاقی با چسبندگی کمتر می‌شود (۳۴، ۳۵).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، پودر استنشاقی نانوذرات زئین حاوی فلوکونازول با موفقیت تهیه شد. در این مطالعه فرمولاسیون با ۶۵ درصد حجمی اتانول، ۳۰۰ میلی‌گرم زئین، ۱۰۰ میلی‌گرم فلوکونازول و ۰/۱ درصد وزنی - حجمی پلورونیک F68 به‌عنوان فرمولاسیون بهینه نانوذرات حاوی فلوکونازول توسط نرم‌افزار Design-Expert® انتخاب شد. این نانوذرات با میانگین اندازه‌ی ذره‌ای $115 \pm 1/18$ و $PDI 0/25 \pm 0/01$

References

- Koltsida G, Zaoutis T. Fungal lung disease. *Paediatr Respir Rev* 2021; 37: 99-104.
- Li S, Yang X, Moog C, Wu H, Su B, Zhang T. Neglected mycobiome in HIV infection: Alterations, common fungal diseases and antifungal immunity. *Front Immunol* 2022; 13: 1015775.
- Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(8): 805-17.
- Mathew BP, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem* 2009; 4(3): 310-23.
- Le J, Schiller DS. Aerosolized delivery of antifungal agents. *Curr Fungal Infect Rep* 2010; 4(2): 96-102.
- Patil JS, Sarasija S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India* 2012; 29(1): 44-9.
- Brunet K, Martellosio JP, Tewes F, Marchand S, Rammaert B. Inhaled antifungal agents for treatment and prophylaxis of bronchopulmonary invasive mold infections. *Pharmaceutics* 2022; 14(3): 641.
- Guo Y, Bera H, Shi C, Zhang L, Cun D, Yang M. Pharmaceutical strategies to extend pulmonary exposure of inhaled medicines. *Acta Pharm Sin B* 2021; 11(8): 2565-84.
- Thapa RK, Nguyen HT, Jeong JH, Shin BS, Ku SK, Choi HG, et al. Synergistic anticancer activity of combined histone deacetylase and proteasomal inhibitor-loaded zein nanoparticles in metastatic prostate cancers. *Nanomedicine* 2017; 13(3): 885-96.
- Kamel NM, Helmy MW, Abdelfattah EZ, Khatatb SN, Ragab D, Samaha MW, et al. Inhalable dual-targeted hybrid lipid nanocore-protein shell composites for combined delivery of genistein and all-trans retinoic acid to lung cancer cells. *ACS Biomater Sci Eng* 2020; 6(1): 71-87.
- Teixeira MM, Carvalho DT, Sousa E, Pinto E. New antifungal agents with azole moieties. *Pharmaceuticals (Basel)* 2022; 15(11): 1427.
- Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(1): 96-128.
- Grenha A, Seijo B, Serra C, Remuñan-López C. Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: structure and surface characterization. *Biomacromolecules* 2007; 8(7): 2072-9.
- Azarmi S, Tao X, Chen H, Wang Z, Finlay WH, Löbenberg R, et al. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles. *Int J Pharm* 2006; 319(1-2): 155-61.
- Franco P, Reverchon E, De Marco I. Production of zein/antibiotic microparticles by supercritical antisolvent coprecipitation. *J Supercrit Fluids* 2019; 145: 31-8.
- Otroj M, Taymouri S, Varshosaz J, Mirian M. Preparation and characterization of dry powder containing sunitinib loaded PHBV nanoparticles for enhanced pulmonary delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020; 56: 101570.
- Park CE, Park DJ, Kim BK. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. *Food Sci Biotechnol* 2015; 24: 1725-33.

18. Fatima I, Rasul A, Shah S, Saadullah M, Islam N, Khames A, et al. Novasomes as nano-vesicular carriers to enhance topical delivery of fluconazole: A new approach to treat fungal infections. *Molecules* 2022; 27(9): 2936.
19. Fröhlich E. Biological obstacles for identifying In vitro-in vivo correlations of orally inhaled formulations. *Pharmaceutics* 2019; 11(7): 316.
20. Cui B, Li J, Lai Z, Gao F, Zeng Z, Zhao X, et al. Emamectin benzoate-loaded zein nanoparticles produced by antisolvent precipitation method. *Polymer Testing* 2021; 94: 107020.
21. Taymouri S, Minaiyan M, Ebrahimi F, Tavakoli N. In-vitro and in-vivo evaluation of chitosan-based thermosensitive gel containing lorazepam NLCs for the treatment of status epilepticus. *IET Nanobiotechnol* 2020; 14(2): 148-54.
22. Liang J, Yan H, Wang X, Zhou Y, Gao X, Puligundla P, et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. *Food Chem* 2017; 231: 19-24.
23. Rodsuwan U, Pithanthanakul U, Thisayakorn K, Uttapap D, Boonpisuttinart K, Vatanyoopaisarn S, et al. Preparation and characterization of gamma oryzanol loaded zein nanoparticles and its improved stability. *Food Sci Nutr* 2021; 9(2): 616-24.
24. Taymouri S, Hajhashemi V, Tabbakhian M, Torkashvand M. Preparation and evaluation of imatinib loaded transfersomal gel for the treatment of rheumatoid arthritis. *Iran J Pharm Res* 2021; 20(4): 33-46.
25. Amanat S, Taymouri S, Varshosaz J, Minaiyan M, Talebi A. Carboxymethyl cellulose-based wafer enriched with resveratrol-loaded nanoparticles for enhanced wound healing. *Drug Deliv Transl Res* 2020; 10(5): 1241-54.
26. Shahriyar S, Taymouri S, Saberi S, Asadi P, Tabbakhian M. Preparation and characterization of itraconazole loaded nanomicelles based on dextran-benelic acid for cutaneous leishmaniasis treatment. *Drug Dev Ind Pharm* 2021; 47(3): 416-28.
27. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbari J, Moazeni M, Seraj H, Daftarifard E, et al. Fluconazole nanosuspension enhances in vitro antifungal activity against resistant strains of candida albicans. *Pharm Sci* 2022; 28(1): 112-29.
28. De Souza Tavares W, Pena GR, Martin-Pastor M, De Sousa FFO. Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities. *J Mol Liq* 2021; 341: 116915.
29. Su Z, Sun F, Shi Y, Jiang C, Meng Q, Teng L, et al. Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of risperidone poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2009; 57(11): 1251-6.
30. Mei L, Zhang Y, Zheng Y, Tian G, Song C, Yang D, et al. A novel docetaxel-loaded poly (ϵ -Caprolactone)/pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4(12): 1530-9.
31. Shariff SHA, Daik R, Haris MS, Ismail MW. Hydrophobic drug carrier from polycaprolactone-b-poly(Ethylene Glycol) star-shaped polymers hydrogel blend as potential for wound healing application. *Polymers (Basel)* 2023; 15(9): 2072.
32. Bosquillon C, Rouxhet PG, Ahimou F, Simon D, Culot C, Pr at V, et al. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. *J Control Release* 2004; 99(3): 357-67.
33. Lechanteur A, Evrard B. Influence of composition and spray-drying process parameters on carrier-free DPI properties and behaviors in the lung: A review. *Pharmaceutics* 2020; 12(1): 55.
34. Chew NYK, Shekunov BY, Tong HHY, Chow AH, Savage C, Wu J, et al. Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders. *J Pharm Sci* 2005; 94(10): 2289-300.
35. Yang XF, Xu Y, Qu DS, Li HY. The influence of amino acids on aztreonam spray-dried powders for inhalation. *Asian J Pharm Sci* 2015; 10(6): 541-8.

Preparation and in Vitro Evaluation of Inhalation Powder Containing Fluconazole Nanoparticles for the Treatment of Fungal Lung Infections

Somayeh Taymouri¹, Hamidreza Ansari², Fatemeh Shafiee³, Jaleh Varshosaz⁴

Original Article

Abstract

Background: Immunocompromised persons are very susceptible to fungal infections. It is desirable to treat pulmonary fungal infections with specific delivery of drugs to the lungs.

Methods: Zein nanoparticles containing fluconazole were prepared by the anti-solvent method. Their physico-chemical properties were investigated. From the optimal formulation, the inhalation powder was prepared with lactose or mannitol using spray drying, and aerosolization characteristics of the dry powders were evaluated using Anderson's cascade impactor. Antifungal effect was investigated against candida albicans and minimum inhibitory concentration was determined. Cytotoxicity of free fluconazole, a dry powder inhaler containing drug loaded nanoparticles, and dry powder inhaler containing nanoparticles without a drug was also evaluated against the A549 cell line by the MTT method.

Findings: The size of nanoparticles was in the range of 88.70 ± 1.35 to 226.90 ± 5.40 nm, and the percentage of loading efficiency was in the range of 57.58 ± 3.61 to 92.94 ± 0.34 . In the prepared dry powder samples, all the powder samples had a high emitted dose percentage. Cytotoxicity test showed that in general none of the groups had significant cytotoxic effects even at the highest studied concentration.

Conclusion: Using lactose as the carrier, can improve the aerodynamic properties of dry powder inhaler compared with mannitol. The prepared inhaled fluconazole powder has a suitable fine particle fraction % and a low median mass aerodynamic diameter and can be well deposited in the lung. In addition, powder containing fluconazole was safe and its effect was comparable with fluconazole.

Keywords: Fluconazole; Nanoparticles; Dry powder inhaler; Lung diseases; Fungi

Citation: Taymouri S, Ansari H, Shafiee F, Varshosaz J. **Preparation and in Vitro Evaluation of Inhalation Powder Containing Fluconazole Nanoparticles for the Treatment of Fungal Lung Infections.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(728): 604-14.

1- Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Novel Drug Delivery Systems Research Centre, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Pharmacy Student, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Novel Drug Delivery Systems Research Centre, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Novel Drug Delivery Systems Research Centre, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Somayeh Taymouri, Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Novel Drug Delivery Systems Research Centre, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: s_taymouri@pharm.mui.ac.ir