

# بررسی تأثیر مواد افزودنی ساکارز و کستروز بر روی دمای عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزومی در کنار استفاده از دو روش کاهش اندازه ذرات (امواج مافوق صوت/هموژناسیون تحت فشار بالا)

زهرا ملائی بلاسی<sup>۱</sup>، قاسم عموعابدینی<sup>۲\*</sup>، داود بی ری<sup>۳</sup>، فاطمه اطمیابی<sup>۴</sup>، نسیم صالحی نیک<sup>۵</sup>، بی بی فاطمه حقیرالسادات<sup>۶</sup>

## چکیده

**مقدمه:** کاربرد موفقیت آمیز نانولیپوزوم ها به عنوان سامانه های رسانش دارویی موثر به پایداری آن ها در محیط وابسته است. در این پژوهش تأثیر مواد افزودنی کستروز و ساکارز در کنار دو نوع فسفولیپید طبیعی و سنتز شده جهت تهیه فرمولاسیون پایدار نانولیپوزومی بررسی شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه، طراحی و ساخت فرمولاسیون نانولیپوزومی با استفاده از روش فیلم نازک انجام شد و به دنبال آن جهت کاهش اندازه ذرات و تولید وزیکول های تک لایه کوچک از دو روش هموژناسیون تحت فشار بالا و قرارگیری تحت امواج مافوق صوت استفاده شد. توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و دمای عبور فازی فرمولاسیون ها و همچنین آنالیزهای مربوط به ماهیت فرمولاسیون نانولیپوزومی توسط کروماتوگرافی و طیف سنجی مادون قرمز بررسی شد.

**نتایج:** نتایج اندازه گیری های دمای عبور فازی نشان دادند که الحاق فسفولیپید غیراشباع سویا با امتزاج پذیری نسبی در دولایه لیپوزومی محتوی فسفولیپید اشباع DPPG منجر به پدیده جداسازی فاز می شود. با بررسی میزان تأثیر انواع مواد افزودنی (ساکارز و کستروز) در کنار فسفولیپیدها فرمولاسیون نانولیپوزومی با ترکیب درصد مولی ( $mPEG2000-DSPE = 2$ ;  $CHOL = 15$ ;  $DPPC = 83$ ) و میزان ساکارز ۶ برابر مقدار کل لیپید به عنوان فرمولاسیون مناسب و پایدار از نظر اندازه ذرات (۱۰۴nm)، پتانسیل زتای (۸/۰۴ mv) و دمای عبور فازی در محدوده ۳۷ °C جهت بارگذاری و رهاسازی مواد فعال زیستی در دمای بدن در نظر گرفته می شود. **نتیجه گیری:** در نهایت با آماده سازی انواع فرمولاسیون های نانولیپوزومی، فرمولاسیون (DPPC:CHOL : mPEG2000-DSPE) با وزیکول های پایدار، اندازه، دمای عبور فازی و بار سطحی مناسب بدون تشکیل توده حاصل شد.

واژه های کلیدی: نانولیپوزوم، کستروز، ساکارز، دمای عبور فازی، پایداری

۱- کارشناسی ارشد، گروه نانویوتکنولوژی، مرکز پژوهشی فناوری های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران

۲- استاد، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران

۳- استاد، عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان

۴- استاد، عضو هیئت علمی گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۶- دانشجوی دکتری نانویوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۵۶۶۱۵۷۵، پست الکترونیکی: amoabediny@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۳۰

## مقدمه

در تهیه لیپوزوم اکثر پارامترهای کیفی در اکثر روش‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند اما پارامترهای کمی و عملیاتی که بیشتر برای بهینه‌سازی پایداری لیپوزوم تولیدی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند کم‌تر مورد توجه بوده‌اند. سامانه‌های رهایش دارو باید به گونه‌ای طراحی شود که نرخ تراوش دارو در حین فرایند انتقال به حداقل ممکن رسیده و در عین حال در محل هدف این رهایش به سادگی صورت پذیرد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانولیپوزوم‌ها وابسته به چندین فاکتور است که شامل pH، قدرت یونی و دما است (۱،۲).

به طور کلی کیسه‌های چربی قابلیت تراوایی پایینی را برای مواد به دام انداخته شده در درون خود نشان می‌دهند، ولی در دماهای بالاتر، آن‌ها متحمل یک عبور فازی می‌شوند، بنابراین تراوایی آن‌ها نسبت به شرایط محیطی تغییر می‌کند. نانولیپوزوم‌ها به دلیل وجود ترکیبات فسفولیپیدی، ویژگی گرمایی خاصی را نشان می‌دهند، به طور مثال یک عبور فازی در دمای ( $T_C$ ) که در دماهای پایین‌تر از دمای ذوب نهایی خود ( $T_m$ ) است را نشان می‌دهند، در دمای عبور ژل به کریستالین-مایع ( $T_C$ )، دو لایه‌های لیپیدی مقدار زیادی از پوشش منظم خود را از دست داده در نتیجه سیالیت آن‌ها افزایش می‌یابد. دمای عبور فازی وابسته به پارامترهایی از قبیل گروه‌های سری قطبی آب دوست، طول زنجیره آسیل، درجه اشباعیت زنجیره‌های هیدروکربنی، طبیعت و قدرت یونی محیط سوسپانسیون است (۳).

به طور کلی دمای عبور فازی با کاهش طول زنجیره، غیراشباع سازی زنجیره‌های آسیل و حضور زنجیره‌های شاخه‌دار و گروه‌های سری توده‌ای مانند سیکلو پروپان کاهش می‌یابد. در استخراج و بهره‌برداری لیپوزوم‌ها، درک مناسب از تبدیلات فازی و سیالیت غشاءهای فسفولیپیدی ضروری است که این امر تعیین‌کننده میزان تراوایی و به هم آمیختگی، تراکم یا توده‌سازی، قابلیت تغییر شکل‌پذیری، پیوندهای پروتئین و تمام ویژگی‌هایی که بر روی پایداری کیسه‌های لیپیدی و رفتارشان در سامانه‌های بیولوژیکی، تأثیر می‌گذارند، است.

لیپوزوم‌ها از فسفولیپیدهای خالصی ساخته شده‌اند که در دماهای پایین‌تر از دمای عبور فازی فسفولیپید، تشکیل نخواهند شد. اضافه کردن کلسترول در برخی موارد، منجر به کاهش دمای عبور فازی می‌گردد، اما در تهیه و آماده‌سازی لیپوزوم‌ها در دماهای بالاتر از دمای عبور فازی، وزیکول‌ها تشکیل می‌شوند. به طوری که عملکرد تهیه لیپوزوم در مورد کیسه‌های محتوی دی پالمیتول فسفاتیدیل کولین (DPPC)، با دمای عبور ( $T_m=41^{\circ}\text{C}$ ) در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر یعنی  $51^{\circ}\text{C}$ ، صورت می‌گیرد، در این دما این اطمینان حاصل می‌شود که تمام فسفولیپیدها در محیط سوسپانسیون به طور هموژن حل می‌شوند و با انعطاف‌پذیری کافی و در یک ردیف قرارگرفتن آن‌ها، ساختار وزیکول‌های لیپیدی تشکیل می‌گردند. معمولاً به دنبال تهیه و آماده‌سازی نانولیپوزوم‌ها برای سخت و سفت شدن (Anneal) و تثبیت آن‌ها در مدت‌زمان معین به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای بالاتر از دمای عبور فازی قبل از ذخیره‌سازی نگاه‌داشته می‌شوند.

کلسترول برای محافظت غشا در دولایه‌های فسفولیپیدی شناخته می‌شود. با افزایش کلسترول در غشاهای فسفاتیدیل کولین (PC)، سیالیت غشا در بالاتر از دمای عبور کاهش و پایین‌تر از دمای عبور افزایش می‌یابد. همچنین الحاق و ترکیب کلسترول به غشاهای (PC)، زنجیره هیدروکربن فازی لایه به لایه را افزایش می‌دهد. مقدار کلسترول مورد نیاز در فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها، به میزان زیادی وابسته به کاربرد آن است (۴). روش این تعامل اخیراً با کیلیت کردن داخلی کلسترول بین مولکول‌های چربی، پر کردن فضای آزاد و کاهش انعطاف‌پذیری زنجیره‌های اطراف چربی بیان می‌گردد. این تعامل همچنین استحکام مکانیکی دو لایه‌های سیال را افزایش می‌دهد و ضریب نفوذ جانبی آن‌ها را کاهش می‌دهد. در مقابل اضافه کردن کلسترول به فاز دولایه ژلی، فشرده‌سازی موضعی را تخریب می‌کند. افزایش ضریب نفوذ و کاهش ضریب کشسانی را در پی خواهد داشت (۵).

ماده محافظ دمای عبور فازی را برای هیدراسیون مجدد کاهش می‌دهد، همچنین در حین انتقال فاز با گذر از دمای عبور فازی، داروی کپسوله شده به آسانی رها می‌شود، اضافه کردن ماده محافظ مانع انتقال فاز می‌شود.

دی ساکاریدها به ویژه تره‌هالوز و ساکارز مانع تنش‌های اسمزی شده و یا در حین دهیدراسیون، از ماده کپسوله شده در مدت‌زمان طولانی‌تری محافظت می‌کنند (۹). لیپوزوم‌های حساس به دما دارو را در دمای عبور اصلی فاز رها می‌کنند ولی نشت کلسئین از لیپوزوم همچنین در دمای قبل از دمای عبور هم مشاهده می‌گردد؛ بنابراین یک داروی کپسوله شده لیپوزومی از لیپوزوم‌های تشکیل شده از DPPC در دمای بدن  $37^{\circ}\text{C}$  نشت می‌کند، حتی اگر لیپوزوم‌ها برای یک دمای عبور اصلی بالاتر طراحی شوند (۱۰).

برای افزایش پایداری اکسیداتیو و قابلیت زیست دسترس‌پذیری داخل سلولی، درمان‌های لیپوزومی مؤثر نیازمند راندمان بارگذاری بالا و تراوش پایین هستند. توسعه یک سامانه رسانشی لیپوزومی مستلزم به‌کارگیری فرمولاسیون بهینه و پایدار است. بر همین اساس در این مقاله پایداری فرمولاسیون نانولیپوزومی تولیدشده از لحاظ اندازه، بار سطحی، دمای عبور فازی تحت تأثیر افزودن مقادیر مختلف فسفولیپیدها و کلسترول و ساکارز بررسی شده است.

### روش بررسی

۱-۲ مواد مورد استفاده جهت تهیه فرمولاسیون نانولیپوزومی

فسفاتیدیل کولین سویا ۷۵٪ Soybean phospholipids (with 75% phosphatidylcholine Lipoid S 80) یا به‌اختصار (SOY PC)، دی پالمیتول فسفاتیدیل کولین (Lipoid PC) یا به‌اختصار (DPPC)، دی پالمیتول فسفاتیدیل گلیسرول-نمک سدیم (- Dipalmitoyl phosphatidylcholine glycerol (1,2- Dipalmitoyl-Sn-glycerol-3- phosphor- Lipoid PG/ (rac- glycerol, sodium salt (DPPG- Na) DPPG-Na)، کلسترول سیگما (C8667) (CHOL))، دی استئاریل فسفاتیدیل اتانل آمین- پلی‌اتیلن گلایکل

ویژگی‌های دولایه لیپیدی با اضافه کردن کلسترول تا حدود  $\pm 30\%$  مولی، به شدت اصلاح می‌شود، در حالی که بیشتر از این مقدار یک اثر ناچیزی دارد. در ۳۰ درصد مولی کلسترول هر دو هم سطح مولکول و هم نظم دم لیپیدی و پارامترهای کجی و نوسانی مقادیری دارند که برای فاز ژلی عمومیت دارند (۶). شاید تغییراتی در سطح به ازای لیپید در سطح غشا نیز پیش بیاید. جهت‌گیری‌های مولکولی و شدت گرادیان فشار اسمزی باعث ترکیب و به هم آمیختگی دولایه لیپوزومی می‌شود، تحت شرایط مناسب، لیپوزوم‌ها فقط نسبت به آب قابل تراوا هستند در نتیجه چروکیدگی اسمزی برای لیپوزوم در محلول‌های هایپرتونیک و تورم در محلول‌های هیپوتونیک اتفاق می‌افتد (۷).

خشک‌کردن انجمادی (Lyophilization) لیپوزوم‌ها مانع هیدرولیز فسفولیپیدها و تخریب فیزیکی وزیکول‌ها در حین نگهداری می‌گردد. علاوه بر این ممکن است به تثبیت ماده‌ای که در لیپوزوم‌ها ترکیب می‌شود، کمک کند. حذف آب از لیپوزوم در حین لیوفلایز کردن یک مشکل است. خوشبختانه افزودنی‌هایی مانند دی ساکاریدها برای محافظت لیپوزوم‌ها در حین فرایندهای خشک‌کردن انجمادی استفاده می‌شوند. ماده محافظت‌کننده از سرما یک ماتریکس آمورف (غیر کریستالی) در داخل لیپوزوم‌ها و اطراف آن‌ها تشکیل می‌دهد؛ که مانع فرایندهای به هم آمیختگی و انعقاد می‌گردد و همچنین از لیپوزوم‌ها در برابر از هم گسیختگی که به دلیل رشد کریستال‌های یخ صورت می‌گیرد، محافظت می‌کند.

اضافه کردن کلسترول تا ۳۰٪ مولی از محتوای لیپیدی کل ممکن است مقاومت دولایه لیپوزومی را برای تنش‌های خشک‌کردن- انجمادی افزایش دهد (۸). اضافه کردن کلسترول به لیپوزوم‌ها نرخ تراوش را کاهش و یک ESR (Encapsulation solute retention) بالاتر بعد از خشک‌کردن انجمادی نتیجه می‌دهد، زمانی که دما به دمای عبور فسفولیپید می‌رسد دولایه نامتراکم شده و اجازه نشت ماده کپسوله شده را می‌دهد، در حین دهیدراسیون، دمای انتقال فاز فسفولیپید بدون ماده محافظت‌کننده افزایش می‌یابد.

چند لایه بزرگ (MLV) اضافه شده و سوسپانسیون لیپوزومی تشکیل می‌شود. سپس به منظور هیدراسیون فیلم نازک لیپیدی، بالن محتوی نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه تحت به هم خوردن در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  (بالتر از دمای عبور فازی فسفولیپیدها) به دستگاه تبخیرکننده دوار بدون خلأ متصل می‌گردد تا کاملاً فیلم لیپیدی درون بافر حل شود.

۲-۲-۳ کاهش اندازه و تولید نانولیپوزوم‌های تک لایه کوچک (SUV) Small lamellar vesicle (SUV) جهت کاهش اندازه و تولید نانولیپوزوم‌های (SUV)، دو روش پراکندگی لیپوزومی بر مبنای روش مکانیکی بکار گرفته می‌شود. از دستگاه میکروفلوئیدیز کردن یا همان هموژناسیون تحت فشار بالا (HPH) و سپس از دستگاه سونیکاسیون یا امواج مافوق صوت جهت کاهش اندازه رسیدن به نانولیپوزوم بهینه استفاده شد. پس از شستشوی دستگاه (HPH) با آب دیونیزه و کر دادن آن با بافر (PBS)، نمونه سوسپانسیون لیپوزومی آماده شده تحت سه گذر متوالی با فشار متوسط  $50\text{ psi}$  عبور داده می‌شود؛ و یا از روش استفاده از امواج مافوق صوت با پروتکل (زمان کل = ۱۵ دقیقه، توان = ۷۵، ۲۰ ثانیه روشن، ۲۰ ثانیه خاموش) به صورت پروب مستقیم در حمام یخ استفاده شد. برای حذف ناخالصی‌ها و رسیدن به یک سوسپانسیون نانولیپوزومی یکدست، قبل از آنالیز و ذخیره‌سازی، نمونه از فیلتر  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  میکرومتری عبور داده می‌شود.

۲-۲-۴ آنالیز فرمولاسیون نانولیپوزومی  
۲-۲-۴-۱ اندازه‌گیری توزیع اندازه و بار سطحی ذرات، دمای عبور فازی غشای نانولیپوزومی

ابتدا از سوسپانسیون نانولیپوزومی تهیه‌شده نمونه‌هایی در حدود ۲ تا ۳ میلی‌لیتری جهت آنالیز سایز و پتانسیل زتا جهت تعیین پایداری در ابتدا به صورت آنالین و بعد از دو تا سه هفته با استفاده از دستگاه زتاسایزر مالورن (Dynamic light scattering and the zeta potential by phase analysis light scattering a NanoZS (Malvern, UK)، انجام می‌شود تا توده سازی نانولیپوزوم‌ها بررسی گردد. جهت آنالیز دمای عبور فازی ابتدا نمونه‌های نانولیپوزومی به

(Lipoid PE 18:0/ 18:0 - PEG2000) یا به اختصار (mPEG2000-DSPE)، نمک فسفات (Phosphate Buffere) (Saline (PSB) (Medicago-09-2051-100)، کلروفرم-Duksan) (66-67-3)، آب دیونیزه از شرکت بحر زلال تهران، ساکارز از شرکت سیگما (S7903).

۲-۲ روش‌ها

۱-۲-۲ فرایند تهیه فیلم نازک لیپیدی

مقادیر محاسبه‌شده بر حسب گرم برای هریک از مواد در هر مرحله با ترازو توزین می‌شود. با توجه به مراجع که به ازای هر ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم لیپید، ۱ میلی‌لیتر حلال برای حل کردن ترکیب لیپیدی استفاده می‌شود، در اینجا ۱ میلی‌لیتر برای ۱۵ میلی‌گرم لیپید در نظر گرفته می‌شود. محلول لیپیدی شفاف حاصل شده در بالن ته گرد  $500\text{ }\mu\text{L}$  میلی‌لیتری ریخته می‌شود و به دستگاه تبخیر کننده دوار تحت خلا با شرایط  $150\text{ }\mu\text{m}$  دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه برای حذف حلال متصل گردید. برای اطمینان از حذف کامل حلال به مدت ۳۰ ثانیه از گاز ازت و به دنبال آن یک شبانه‌روز از دستگاه انجماد خشک استفاده می‌شود در نتیجه نمونه فیلم نازک لیپیدی کاملاً خشک برای استفاده در مراحل بعدی تولید گردید. متغیرهایی مانند خلا، سرعت چرخاندن محیط هیدراسیون و زمان هیدراسیون در تولید وزیکول‌های لیپیدی نقش دارند. سرعت گرداندن فلاسک تأثیر قابل توجهی بر روی ضخامت، یکنواختی فیلم لیپیدی می‌گذارد؛ بنابراین همان‌طور که در پژوهش‌های قبلی نشان داده شده است،  $150\text{ rpm}$  سرعت بهینه جهت به دست آوردن فیلم نازک یکنواخت و به دنبال آن جمعیت هموزنی از لیپوزوم‌ها تولید می‌کند، در نظر گرفته می‌شود (۱۱).

۲-۲-۲ مرحله هیدراسیون فاز لیپیدی و تشکیل

لیپوزوم‌های (MLV)

$100\text{ }\mu\text{L}$  میلی‌لیتر از محلول فسفات بافر سالین (PBS) با  $\text{pH}=7/4$  که از اختلاط ده عدد قرص نمک فسفات در  $1\text{ }\mu\text{L}$  آب دیونیزه محلول بافرآبی PBS با شرایط  $\text{pH}=7/4$ ،  $0.1\text{ M}\text{NaCl}$ ،  $0.027\text{ M}\text{KCl}$ ،  $0.1\text{ M}\text{PO}_4^{3-}$  آماده شده است را به فیلم نازک لیپیدی جهت تشکیل وزیکول‌های

ساعت پایدار بوده بنابراین آن‌ها را بعد از خارج‌سازی از تانک با مداد علامت‌گذاری و جداسازی نمونه مورد نظر بررسی می‌شود. ۲-۴-۴ آماده‌سازی نمونه جهت تحلیل کروماتوگرافی

مایع با کارایی بالا (HPLC)

جهت بررسی تأثیر روش‌های مورد استفاده برای کاهش اندازه لیپوزوم‌ها که شامل الف) هموژناسیون تحت فشار بالا و ب) امواج مافوق صوت بر میزان فسفولیپید موجود در فرمولاسیون نانولیپوزومی تولیدشده، از روش کمی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography (HPLC) استفاده شد، بر این اساس نمونه‌هایی از فسفولیپید مورد استفاده (دی پالمیتویل فسفاتیدیل کولین (DPPC) با غلظت‌های (۱/۵، ۱، ۰/۷، ۰/۵) به عنوان استاندارد خارجی تهیه شد. فرمولاسیون لیپوزومی برای هر دو روش یکسان است و با میزان دو برابر مقدار فرمولاسیون نانولیپوزومی نهایی شده با درصد مولی (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ = DPPC = ۸۳:CHOL) آماده شدند، جهت کاهش اندازه لیپوزوم‌ها از امواج مافوق صوت با پروب مستقیم مطابق با پروتکل نهایی شده و همچنین سه سیکل هموژناسیون تحت فشار بالا بکار گرفته شد. بعد از اینکه هر دو نمونه با خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل شد، معادل ۱۰ mg (DPPC) از هر دو نمونه توزین شد و به بالن ژوژه ۱۰ منتقل گشت و در متانول با درجه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC grade) حل شد؛ و همه نمونه‌ها پس از فیلتر شدن به دستگاه کروماتوگرافی مایع تولیدی شرکت (KNAUER) آلمان تزریق گردید. روش مورد استفاده بر اساس (فاز متحرک: متانول ۱۰۰٪، جریان ۱/۵ mlit/min، دما ۲۵°C، آشکارساز ۲۳۸nm - UV، حجم تزریق ۲۰ میکرو لیتر، ستون Lichrospher 60-5 Si) است.

### نتایج

۱-۳ آنالیز دمای عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزومی همان‌طور که در نمودار (۱A) مشاهده می‌شود با افزودن کلسترول، شدت پیک دمای عبور فازی کاهش پیدا کرده است، با توجه به نتایج مشاهده شده برای دمای عبور فازی

روش خشک‌کردن انجمادی (۲۴ ساعت در فریزر) مرحله انجماد، ۳۰ ساعت خشک‌کردن اولیه و ۱۸ ساعت خشک‌کردن نهایی در دمای ۵۰°C- تحت خلأ (۰/۰۶ mbar) به صورت پودر در آمده که توسط دستگاه گرماسنج افتراقی جهت تحلیل دمای عبور فازی با یک نرخ اسکن ۵°C/min در محدوده دمایی ۲۰°C- تا ۱۵۰°C ارزیابی می‌شوند.

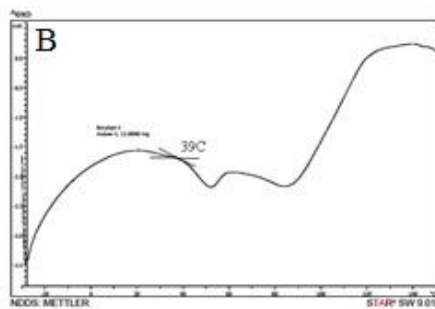
۲-۴-۲ آماده‌سازی نمونه جهت تحلیل طیف سنجی مادون قرمز (Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR))

جهت بررسی پایداری فرمولاسیون و حضور عوامل فسفولیپیدی بعد از فرایند خشک‌کردن انجمادی نانولیپوزوم‌ها، مقداری از نمونه جهت تحلیل به کمک طیف سنجی مادون قرمز FTIR کنار گذاشته می‌شود. برای شناسایی کیفی یک نمونه مجهول، نوع گروه‌های عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های آن، طیف زیر قرمز نمونه را رسم نموده و با مراجعه به جداول مربوطه که موقعیت ارتعاش پیوندهای مختلف اجسام را نشان می‌دهند، طول موج یا عدد موج گروه‌ها و پیوندها را شناسایی می‌کنند. ویژگی طیف بینی زیر قرمز تبدیل فوریه (FTIR) این است که تمام طول‌موج‌های ناحیه طیفی موردنظر در یک زمان به نمونه تابیده می‌شود.

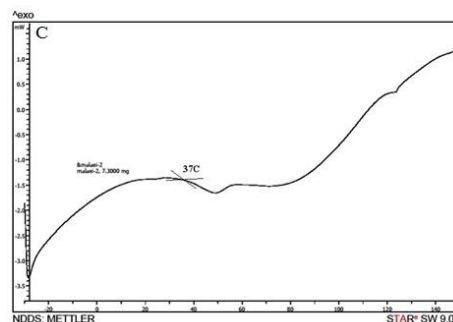
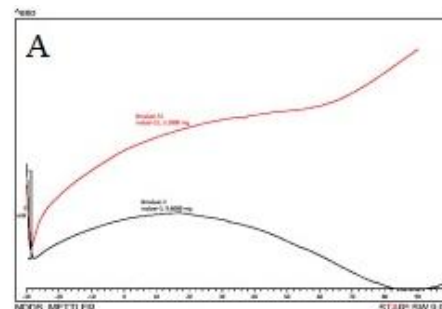
۲-۴-۳ آماده‌سازی نمونه جهت تحلیل کروماتوگرافی لایه‌نازک (Thin layer chromatography (TLC))

۱۰-۱۰۰ μl محلول کلروفومی شامل ۲۰-۲۰۰ μg از پودر فرمولاسیون نانولیپوزومی آماده شده توسط سرنگ تزریق به فواصل موازی ۱ تا ۲ سانتی‌متر، روی خط پایه کاغذ مخصوص نشانه‌گذاری می‌کنیم. وقتی که لکه خشک شد، کاغذ را در تانک کروماتوگرافی اشباع شده طوری قرار داده می‌شود که یک سر آن در حلال انتخاب شده به عنوان فاز متحرک فرو رود. زمانی که حلال به بالای صفحه رسید آن را خارج، جبهه حلال را با مداد مشخص کرده و حداکثر ۲-۵ دقیقه می‌گذاریم تا صفحه خشک شود. سپس در تانک حاوی شناساگر یداین قرار می‌دهیم. لیبیدها در عرض چند دقیقه در تانک حاوی بخارات اشباع یداین به رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شوند که تنها تا چند

القا می‌گردد، اضافه کردن حل شونده‌های کوچک مانند دی‌ساکاریدها به عنوان جایگزینی برای مولکول‌های آب می‌تواند فاصله بین غشا را به دلیل اثرات اسمزی حجمی افزایش دهد و منجر به کاهش تنش‌های داخل غشا شود. این اثرات با کاهش در دمای عبور فازی دولایه لیپیدی زمانی که دی‌ساکاریدها به فرمولاسیون اضافه می‌شود، مشاهده می‌گردد (۵،۱۱). در نمودار (۱B) مشخص می‌گردد که آنالیز نمونه با حضور قند نتیجه بهتری را حاصل کرده و منحنی ترموگرام با شدت پیک واضح‌تری را که از محدوده دمایی  $39^{\circ}\text{C}$  شروع شده است و نشان دهنده حفظ ساختار لیپوزومی است نتیجه می‌دهد.



فرمولاسیون نانولیپوزومی تولید شده با این روش باید با افزودن فسفولیپید سویا با دمای عبور فازی پایین‌تر از صفر درجه سانتی‌گراد، دمای عبور کل ترکیب کاهش پیدا کند، همچنین کاهش دمای عبور فازی همراه با گسترده شدن پیک ترموگرام با افزودن کلسترول مشاهده شود. به دلیل عدم حضور قند و دانسیته فشرده‌سازی که بعد از دو شبانه‌روز خشک کردن انجمادی نمونه پودری حاصل می‌گردد، دماهای عبور فازی گزارش شده واقعی را می‌توان این طور آنالیز کرد که حدود ده درجه سانتی‌گراد پایین‌تر باشند. افزودن ماده محافظت کننده از انجماد ساکارز و یا تراهالوز شدت تیزی پیک ترموگرام‌های DSC حاصل از لیپوزوم‌های لیوفلایز شده را کاهش می‌دهد، در غشای دهیدراته به دلیل مجاورت و نزدیکی یک تنش فشرده



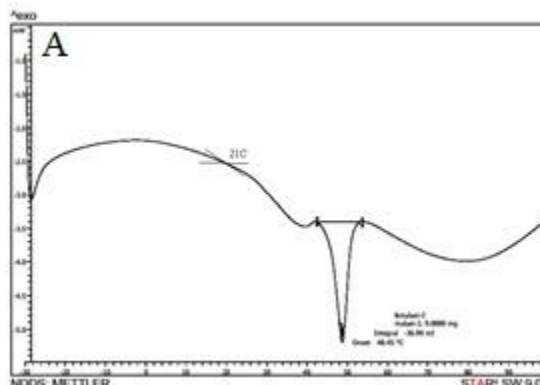
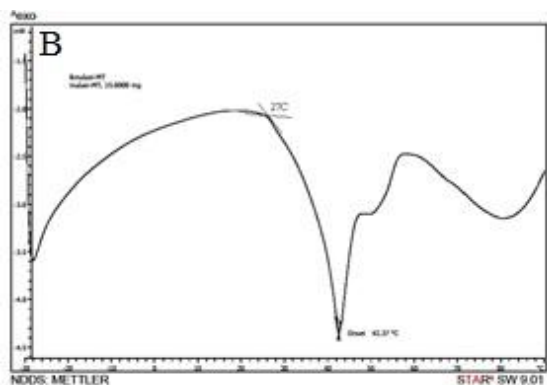
نمودار ۱: A: پیک عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزومی محتوی فسفولیپید سویا قرمز رنگ، پیک عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزومی محتوی فسفولیپید سویا و کلسترول ۱۸٪ (W/W) مشکی رنگ، نمودار B: ترموگرام عبور فازی پودر نانولیپوزومی با نسبت وزنی (SOY PC=1:Sucrose=4) ترموگرام C: دمای عبور فازی پودر خشک نانولیپوزومی محتوی فسفولیپید سویا-کلسترول-ساکارز (کلسترول ۱۸٪ وزنی، ساکارز ۴ برابر مقدار لیپیدکل)

لیپیدی می‌گردد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، شروع دمای عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزوم‌هایی که به روش امواج صوت تهیه شده‌اند در نمودار (۲A) در نقطه‌ای پایین‌تر از دمای عبور فازی نانولیپوزوم‌هایی است که به روش هموژناسیون تحت فشار

در نمودار (۱C) پیک منحنی عبور فازی با شدت بسیار کمتری نسبت به عدم حضور ساکارز نشان داده می‌شود، بنابراین حضور قند در آنالیز دمای عبور فازی پودر نانولیپوزومی، باعث کاهش شدت پیک دمای عبور فازی دو لایه

هموژناسیون تحت فشار بالا (HPH) بسیار تیزتر و شدیدتر است.

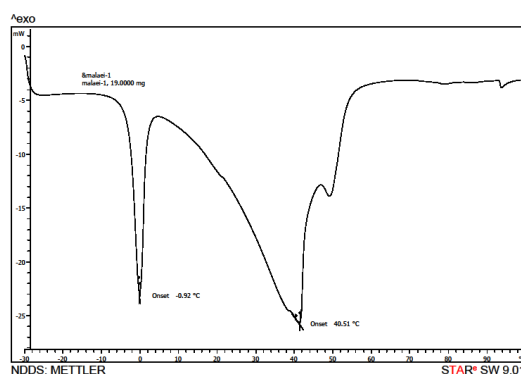
بالا HPH آماده‌سازی می‌شوند نمودار (۲B). همچنین پیک منحنی عبور فازی نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده به روش



نمودار ۲: A: ترموگرام عبور فازی نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده به روش امواج صوت غیرمستقیم، نمودار B: منحنی عبور فازی نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده به روش هموژناسیون تحت فشار بالا (HPH)

(SOY PC) با دمای عبور پایین‌تر از صفر درجه سانتی‌گراد و فسفولیپید (DPPG) با دمای عبور حدود  $41^{\circ}\text{C}$  در این فرمولاسیون باعث ایجاد دو فاز لیپیدی در ترکیب اولیه می‌شود.

نمونه‌های حاوی هر دو نوع فسفولیپید در بحث دمای عبور فازی قبل از کاهش اندازه در اندازه میکرو دو پیک را نشان می‌دهند، نمودار (۳) که می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد اختلاف دمای عبور اجزای فاز چربی، فسفولیپید سویا



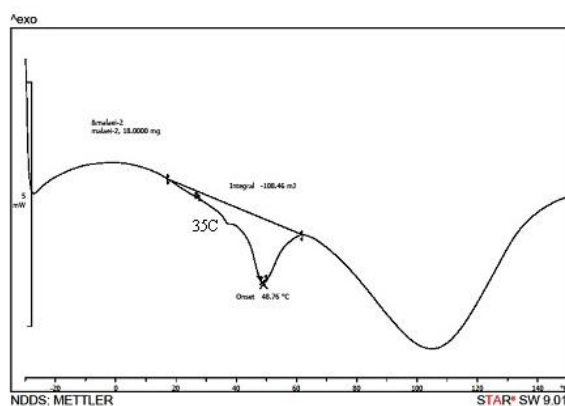
نمودار ۳: منحنی عبور فازی فرمولاسیون لیپوزوم‌های (MLV) (SOY PC:DPPG:CHOL:mPEG2000-DSPE)

نسبت به نشت محتویات خود در محدوده دمایی وسیع نشان می‌دهد. انتخاب لیپید مناسب جهت ممانعت از بزرگ شدن دو لایه‌های لیپوزومی در حین ذخیره‌سازی است. در غیاب آب، فاصله بین سرگروه‌های قطبی فسفولیپیدی کاهش می‌یابد، بدین‌وسیله تعاملات واندروالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی افزایش یافته و  $T_m$  بالاتر می‌رود. با افزودن کلسترول پیک عبور مشاهده شده به شدت کاهش پیدا می‌کند (۱۳). در این

بعد از رسیدن به نتیجه جداسازی فاز برای فرمولاسیون ترکیب لیپوزومی تصمیم گرفته شد که نوع فسفولیپید اصلی از نوع فسفاتیدیل کولین طبیعی با دمای عبور فازی پایین‌تر از صفر درجه به فسفولیپید سنتز شده با دمای عبور حدود  $40^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد (DPPC) جایگزین شود. لیپوزوم‌های به دست آمده از DPPC به دلیل دمای عبور  $41^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نسبت به فرم SOY PC پایین‌تر از صفر درجه سانتی‌گراد، پایداری بیشتری

راستا آزمایشی بر مبنای یک فرمولاسیون نانولیپوزومی جدید (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ = DPPC : ۸۳ = CHOL) با (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ = DPPC : ۸۳ = CHOL) تغییر نکرده است و نشان دهنده غلظت ساکارز مختلف به ترتیب برای نمونه ۱ حدود ۳ برابر مقدار لیپید کل (۱۴/۴۶ mg/ml) و نمونه ۲ حدود ۶ برابر مقدار لیپید کل (۲۸/۹۲ mg/ml)، صورت گرفت. در تکرار تحلیل منحنی عبور فازی توسط دستگاه گرماسنج افتراقی (DSC) بعد از یک هفته نیز مشاهده شد پیک ترموگرام این فرمولاسیون نانولیپوزومی (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ =

مقدار لیپید کل (۲۸/۹۲ mg/ml) و نمونه ۲ حدود ۶ برابر مقدار لیپید کل (۱۴/۴۶ mg/ml) و نمونه ۱ حدود ۳ برابر مقدار لیپید کل (۲۸/۹۲ mg/ml)، صورت گرفت. در تکرار تحلیل منحنی عبور فازی توسط دستگاه گرماسنج افتراقی (DSC) بعد از یک هفته نیز مشاهده شد پیک ترموگرام این فرمولاسیون نانولیپوزومی (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ =

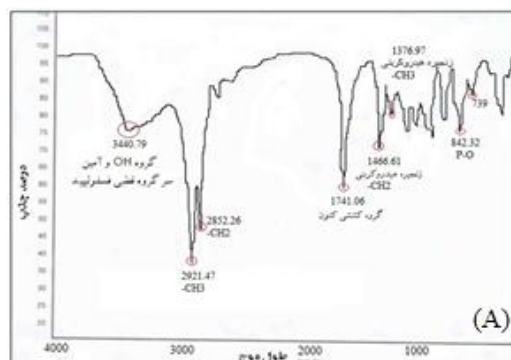


نمودار ۴: منحنی عبور فازی فرمولاسیون نانولیپوزومی حاوی میزان ساکارز ۶ برابر مقدار کل لیپید (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ = DPPC : ۸۳ = CHOL) به روش امواج مافوق صوت

ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن  $\text{CH}_2$ - و  $\text{CH}_3$  است. ظهور پیک‌های  $1466 \text{ cm}^{-1}$  و  $1376 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب ارتعاشات خمشی زنجیرهای هیدروکربنی  $\text{CH}_2$ - و  $\text{CH}_3$ - است. پیک  $1741 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به فرکانس کششی کتون و پیک ناحیه‌ی  $1102/52 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به فرکانس کششی اتر در گروه استری است. همان‌طور که در شکل سمت چپ (۵B) نیز مشاهده می‌شود فسفولیپیدهای بکار رفته در فرمولاسیون (SOYPC:DPPG:CHOL:mPEG2000-DSPE) به روش TLC شناسایی شدند. این نتایج حاکی از حضور هر دو نوع فسفولیپید سویا و فسفولیپید DPPG و اطمینان از حفظ ساختار لیپیدی است.

۲-۳ نتیجه آنالیز مربوط به تست FTIR و TLC جهت تشخیص ماهیت فرمولاسیون نانولیپوزومی نمودار سمت راست (۵A) طیف حاصل از آنالیز FTIR پودر نانولیپوزومی را پس از خشک شدن که توجیهی از حضور فسفولیپیدها را نشان می‌دهد. پیک مشاهده شده در ناحیه طیفی  $3440 \text{ cm}^{-1}$  به هم‌پوشانی ارتعاشات کششی گروه  $\text{OH}$ - و گروه‌های آمینی موجود در سر قطبی فسفولیپیدها نسبت داده می‌شود حضور هر دو این گروه‌های عاملی منجر به پهن‌شدگی پیک شده است. از سوی دیگر پیک قوی  $1243$  -  $1170 \text{ cm}^{-1}$  حاکی از  $\text{P=O}$  و پیک متوسط در ناحیه فرکانسی  $845$  -  $725 \text{ cm}^{-1}$  پیوند ساده  $\text{P-O}$  را نشان می‌دهد. پیک‌های  $2852 \text{ cm}^{-1}$  و  $2921 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به





نمودار ۵: سمت راست (A) آنالیز FTIR نمونه نانولیپوزومی خشک شده با فرمولاسیون (SOY PC:DPPG:CHOL:mPEG2000-DSPE). شکل سمت چپ (B) نمایی از پیشرفت حلال بر روی کاغذ TLC توسط واکنش گریداین بعد از انحلال فسفولیپیدهای موجود در نمونه

در استفاده از روش امواج مافوق صوت را نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل کاویتاسیون حاصل از امواج مافوق صوت در اثر تماس مستقیم پروب با نمونه باشد. این میزان کاهش، بسیار کم و در انتخاب اولویت استفاده از امواج مافوق صوت نسبت به هموژنیزاسیون در فشار بالا تأثیری ندارد.

۳-۴ آنالیز اندازه و پتانسیل زتا فرمولاسیون نانولیپوزومی

با مقایسه نمودار توزیع اندازه ذرات نانولیپوزومی HPH شده و سونیکیت شده مشاهده شد که توزیع اندازه ذرات به دست آمده برای فرمولاسیون نانولیپوزوم‌های تولید شده نهایی به روش هموژنیزاسیون تحت فشار بالا، دارای دو پیک بوده (پیک (۱): شدت پراکنش = ۸۳/۱٪، پهنای پیک = ۵۱/۳nm، قطر ذرات = ۱۸۴nm)، (پیک (۲): شدت پراکنش = ۱۶/۹٪، پهنای پیک = ۸/۵۵nm، قطر ذرات = ۵۵/۲۸nm) که قطر متوسط برابر ۱۳۰nm و  $PdI=0/221$  حاصل شد، در مورد فرمولاسیون نانولیپوزوم‌های تولید شده نهایی به روش سونیکاسیون پیک منودیسپرس (یک دست) و اندازه مطلوب‌تری نتیجه داده است. در واقع توزیع اندازه ذرات نانولیپوزومی به صورت ۱۰۰٪ تک پیک بوده و با اندازه قطر متوسط ۱۰۴nm،  $PdI=0/139$  کوچک‌تر از ۰/۲ مناسب است. همچنین برای بارگذاری داروی حساس و میزان کم نسبت به روش HPH برتری دارد. همچنین از نتایج آنالیز بار سطحی ذرات مشاهده گردید، به دلیل اثرات پوششی mPEG2000-DSPE بر روی لیپوزوم‌ها، میزان پتانسیل زتا بسیار کاهش می‌یابد و در حدود ۸/۰۴mV مشاهده

با توجه به نتایج مربوط به تست FTIR و آنالیز TLC مشخص شد که پودر نانولیپوزومی تولید شده ماهیت خودش را از نظر وزیکول‌های دو لایه‌ای لیپیدی شامل هر دو نوع فسفولیپید حفظ کرده است.

۳-۳ تحلیل فرمولاسیون نانولیپوزومی بر اساس روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

جهت بررسی تأثیر روش‌های مورد استفاده برای کاهش اندازه لیپوزوم‌ها در این پژوهش که شامل الف) هموژنیزاسیون تحت فشار بالا و ب) امواج مافوق صوت بر میزان فسفولیپید موجود در فرمولاسیون‌ها و همچنین تحلیل مقایسه کمی فرمولاسیون نانولیپوزومی (۲) = mPEG2000-DSPE: DPPC = ۱۵:۸۳ و نمونه استاندارد از DPPC پس از فیلتر شدن با حجم تزریق ۲۰ میکرو لیتر و فاز متحرک (متانول ۱۰۰٪) با جریان ۱/۵ml/min در طول موج ۲۳۸nm از روش کمی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با ستون C18, Lichrospher 60-5 Si تولیدی شرکت (KNAUER) آلمان استفاده شد. میزان فسفولیپید DPPC موجود در فرمولاسیون نانولیپوزومی حاصل از روش هموژنیزاسیون تحت فشار بالا برابر با ۰/۶۰۸mg/ml با زمان ماند (Retention time) (RT) ۵/۲۵۰ دقیقه و برای فرمولاسیون نانولیپوزومی حاصل از روش امواج مافوق صوت کمتر و برابر با ۰/۵۷۲ با زمان ماند ۵/۲۳۳ از تحلیل کروماتوگرافی به دست آمده است. نتایج کاهش حدود ۶٪ از میزان فسفولیپید DPPC،

دهیدراته می‌شوند، دانسیته فشرده‌سازی از سرگروه‌ها افزایش می‌یابد، بدین‌وسیله تعاملات واندروالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی بیشتر می‌شود، در نتیجه لیپوزوم‌های خشک شده یک دمای عبور بالاتر و تغییرات انتالپی بزرگ‌تری نسبت به لیپوزوم‌های هیدراته شده نشان می‌دهند. یک دمای عبور فازی بالا نیز نشان دهنده حضور مطلوب نسبی و تعاملات تثبیت کننده بین استرول‌ها و فسفولیپیدها است؛ بنابراین در نهایت با بررسی میزان تأثیر انواع مواد افزودنی (ساکارز و کلسترول) در کنار فسفولیپیدها فرمولاسیون نانولیپوزومی با ترکیب درصد مولی (۲ = mPEG2000-DSPE : ۱۵ = DPPC : CHOL = ۸۳) و میزان ساکارز ۶ برابر مقدار کل لیپید به عنوان فرمولاسیون مناسب و پایدار از نظر اندازه ذرات (۱۰۴nm)، پتانسیل زتای (۸/۰۴ mv) و دمای عبور فازی در محدوده ۳۷ °C جهت بارگذاری و رهاسازی مواد فعال زیستی در دمای بدن در نظر گرفته می‌شود.

شد که در واقع اثرات جانبی نامطلوبی در خواندن میزان پتانسیل واقعی ایجاد می‌کند (۱۴)؛ بنابراین بار سطحی فرمولاسیون به دست آمده بسیار بیشتر از این مقدار است و ذرات پایدار می‌باشند.

#### بحث

روش HPH باعث تشدید ناسازگاری فازی شده و با این فرمولاسیون توصیه نمی‌شود، در مقابل روش امواج مافوق صوت مشکلات به مراتب کمتری دارد، به این معنا که خود روش امواج مافوق صوت باعث تغییرات فازی نشده است. روش امواج مافوق صوت ویژگی‌های اجزای تشکیل دهنده نانولیپوزومی را بعد از کاهش اندازه بسیار بهتر در فرم ساختار دو لایه‌ای حفظ می‌کند و از آسیب و تنش منجر شده برای جدایش فازی که ممکن است به دلیل روش مورد استفاده مانند HPH باشد جلوگیری می‌کند. میزان تغییرات دمایی حدود ۱۰°C به دلیل فشرده شدن دو لایه بعد از خشک کردن انجمادی سوسپانسیون لیپوزومی ایجاد می‌شود. به دلیل اینکه زمانی که لیپوزوم‌ها

#### References:

- 1-Anisi F. *Study of the production of liposomes and nanoliposomes as drug carriers for the purposeful administration of drugs*. Faculty of Chemical Engineering, College of Engineering, Tehran University. 2009.
- 2-Rahimi M. *Investigating the engineering parameters for the production of controlled nanoliposomes*. Faculty of Chemical Engineering, College of Engineering, Tehran University. 2011.
- 3-Förster GF, Faber F, Weber T, Blume A. *Influence of Poly-L-lysine on the Structure of Dipalmitoylglycerophosphoglycerol (DPPG)/Water Dispersions*. 2005.
- 4-Weissig V. *Liposomes Methods and Protocols*. Springer protocols. Vol 1. 2010.
- 5-Yokota D, Moraes M, Pinho SC. *Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: A case study of casein hydrolysate microencapsulation*. Braz. J. Chem. Eng 2012; 29: 325-35.
- 6-Epand RM, Bach D, Epand RF, Borochoy N, Wachtel E. *A New High-Temperature Transition of Crystalline Cholesterol in Mixtures with Phosphatidylserine*. Biophys J 2001; 81(3): 1511-20.
- 7-Liu AL. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Department of Physiology Michigan State University East Lansing, Michigan USA. Vol 4. 2006.
- 8-Van Winden EC. *Freeze-Drying of liposomes: Theory & Practice*. Methods Enzymol 2003; 367: 99-110.

- 9- Chen C, Han D, Cai C, Tang X. *An overview of liposome lyophilization and its future potential*. J Control Release 2010; 142(3): 299-311.
- 10- Ono A, Takeuchi K, Sukenari A, Suzuki T, Adachi I, Ueno M. *Reconsideration of Drug Release from Temperature-Sensitive Liposomes*. Biol Pharm Bull 2002; 25(1): 97-101.
- 11- Patel SS, Patel MS, Salampure S, Vishwanath B, Patel NM. *Development and Evaluation of Liposomes for Topical Delivery of Tacrolimus (Fk-506)*. J scientific Research 2010; 2(3): 585-96.
- 12- Cabral ECM, Zollner RL, Santana MHA. *Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins*. Braz. J. Chem 2004. 21(2): 137-146.
- 13- Ohtake S, Schebor C, Palecek, SP, de Pablo JJ. *Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose*. Biochimica et Biophysica Acta 2005; 1713(1): 57-64.
- 14- Carvalheiro MC. *Liposomes as Nanosystems for the Transport and Delivery of Bioactive Agents*. Repositório da Universidade de Lisboa, 2010.

## Investigation of the Influence of Sucrose and Cholesterol on the Phase Transition Temperature of nanoliposomal formulation besides using particle size Reduction Techniques (Ultrasonication/High Pressure Homogenization)

Zahra Malaei-Balasi<sup>1</sup>, Ghassem Amoabediny<sup>\*2</sup>, Davoud Biria<sup>3</sup>,  
Fatemeh Atyabi<sup>4</sup>, Nasim Salehi-Nik<sup>5</sup>, Bibi Fatemeh Haghirosadat<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Department of Nanobio Engineering, Research Center for New Technologies in Life Science Engineering, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>4</sup> Department of Nanotechnology, Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>6</sup> Department of life Science Engineering, Faculty of New sciences & technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 19 Feb 2016

Accepted: 19 Jan 2017

### Abstract

**Introduction:** The successful application of nanoliposomes as an effective drug delivery system depends on their stability in the medium. In this article, influence of additive materials such as cholesterol and sucrose besides two natural and synthesized phospholipids have been investigated.

**Methods:** In the present study, designing and synthesis of nanoliposomal formulations were prepared using thin film method. This liposomal suspension was downsized by two methods, the high-pressure homogenizer and ultrasound to form small unilamellar vesicles. The size distributions, zeta potentials and phase transition temperature of formulations were all determined by a zetasizer and differential scanning calorimetry(DSC). In addition, the contribution of nanoliposomal formulation has been investigated by HPLC and FTIR methods.

**Results:** Results of the DSC measurements indicated that incorporation of unsaturated phospholipid (SOY PC) may cause phase separation with partial miscibility in the liposome bilayer containing of DPPG. The optimal nanoliposomal formulation was composed of (DPPC: CHOL: mPEG2000-DSPE) with the mole percents equal to (83:15:2), respectively. In addition, sucrose has been used in the formulation with a total amounts six times greater than that of the lipids. The properties of optimized nanoliposome have been shown as the size average 104nm, zeta potential 8.04mv and phase transition temperature of lipid less than 37°C which were stable enough to be utilized for loading and releasing bioactives in body temperature.

**Conclusion:** Finally the produced nanoliposomes were stable vesicles in the proper size, phase transition temperature and surface charge without any aggregation and fusion.

**Keywords:** Nanoliposome; Sucrose; Cholesterol; Phase Transition Temperature; Stability

### This paper should be cited as:

Malaei-Balasi Z, Amoabediny GH, Biria D, Atyabi F, Salehi-Nik N, Haghirosadat BF. **Investigation of the Influence of Sucrose and Cholesterol on the Phase Transition Temperature of nanoliposomal formulation besides using particle size Reduction Techniques (Ultrasonication/High Pressure Homogenization).** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(2): 144-55.

\*Corresponding author: Tel: 09125661575, email: amoabediny@ut.ac.ir