

Evaluation of Calcipotriol Solid Lipid Nanoparticles in Male BALB/c Mice Psoriasis Model

Mahsa Narenji¹,
Bahareh Lashtoo Aghae²,
Zahra Daneshfar³,
Samaneh Farrokhfar⁴,
Reza Enayatifard⁵,
Masoumeh Bahri⁶

¹ Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

² Assistant Professor, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

³ PhD in Reproductive Health, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Pharmacy Student, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

(Received May 6, 2023 ; Accepted October 7, 2023)

Abstract

Background and purpose: Psoriasis is an autoimmune inflammatory disease with major skin involvement. Calcipotriol as a vitamin-D analogue is one of the common drugs for topical treatment of psoriasis. Local drug delivery, due to higher concentration of drug at the sites of inflammation, is more effective and causes fewer systemic side effects. Limited skin penetration and durability of common topical formulations reduce the efficacy of treatment. In this study, we aimed to investigate the effect of solid lipid nanoparticles loaded with calcipotriol on local drug delivery.

Materials and methods: In the present study, which is an interventional in vivo study, Solid Lipid Nanoparticle (SLN) was prepared by melting method and mixed with semi-solid base (cream). Then the effectiveness of the final formulation was investigated on the psoriasis model induced by imiquimod 5% in BALB/c mice. Three groups were included in this investigation: negative control (no treatment), positive control (conventional calcipotriol cream), and SLN (SLN cream with calcipotriol).

Results: The results of the present study showed that, the SLN cream significantly reduced inflammatory scores compared to the other two groups on day five ($P < 0.0001$). In addition, drug loading into SLN significantly increased the rate of healing and reduced inflammation.

Conclusion: This study showed that calcipotriol loading with SLN can improve the quality and the rate of treatment of skin lesions caused by psoriasis.

Keywords: psoriasis, solid lipid nanoparticles, skin absorption, calcipotriol, in vivo

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (226): 41-51 (Persian).

Corresponding Author: Samaneh Farrokhfar - Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran.
(E-mail: samanefarrokhfar@gmail.com)

اثر نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول در مدل القایی پسونریازیس در موش BALB/c نر

مهسا نارنجی¹
بهاره لشتوآقایی²
زهرا دانش فر³
سمانه فرخ فر⁴
رضا عنایتی فرد⁵
معصومه بحری⁶

چکیده

مقدمه: پسونریازیس یک بیماری التهابی خود ایمن با درگیری بیش تر در پوست و مفاصل است که می تواند سبب آسیب های روحی و روانی و در نتیجه کاهش کیفیت زندگی بیماران شود. این بیماری به لحاظ پاتوژنز و اپیدمیولوژی وجوه مختلفی دارد. بهبود خواص درمانی داروهای رایج این بیماری می تواند به بهبود کیفیت زندگی بیماران کمک کند. در طی سالیان اخیر نانوذرات برای بهبود دارورسانی در بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های پوستی کاربرد دارند. کلسی پوتریول به عنوان یک آنالوگ ویتامین D یکی از داروهای رایج برای درمان موضعی پسونریازیس است.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر که یک مطالعه درون تنی مداخله ای است، نانوذرات جامد لیپیدی ((Solid Lipid Nanoparticles (SLN)) این دارو با اندازه ذره ای 241 نانومتر و پتانسیل زتای 5/11- میلی ولت ساخته و به روش incorporation وارد پایه نیمه جامد شد. اثر بخشی فرمولاسیون بر مدل پسونریازیس القا شده توسط کرم ایمی کیمود 5 درصد در موش BALB/c نر، در بین گروه کنترل منفی (بدون درمان)، گروه کنترل مثبت (کلسی پوتریول) و گروه SLN (کرم SLN با کلسی پوتریول) بررسی شد.

یافته ها: نتایج روند رهایش دارو از فرمولاسیون مورد استفاده نشان دهنده تبعیت از روند هیگوشی بود و در پایان 6 ساعت، 76 درصد دارو از این نیمه جامد رها شد. نتایج تاثیر فرمولاسیون بر مدل پسونریازیس نشان داد که در روز پنجم گروه SLN در مقایسه با دو گروه دیگر کاهش امتیاز التهاب را به شکل معنی دار داشته است ($P < 0/0001$)، اگرچه این تفاوت در روز دهم معنی دار نبود. هم چنین بارگیری دارو در SLN توانست سرعت بهبود و کاهش التهاب را به شکل معنی دار افزایش دهد. **استنتاج:** نتایج این مطالعه نشان داد که الحاق کلسی پوتریول با SLN می تواند سبب بهبود کیفیت و سرعت درمان ضایعات پوستی ناشی از پسونریازیس شود.

واژه های کلیدی: پسونریازیس، نانوذرات جامد لیپیدی، جذب پوستی، کلسی پوتریول، درون تنی

مقدمه

پسونریازیس یک بیماری پوستی التهابی مزمن و خود ایمن با استعداد ژنتیکی قوی است؛ که می تواند با آرتريت

پسونریاتیک، بیماری التهابی روده، اختلالات روانی، بیماری قلبی عروقی و سندرم متابولیک نیز در بیماران همراه

E-mail: samanefarrokhhfar@gmail.com

مؤلف مسئول: سمانه فرخ فر - رامسر: پردیس خودگردان رامسر

1. استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

2. استادیار، پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

3. دکتری تخصصی بهداشت باروری، پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

4. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

5. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

6. دانشجوی دکتری حرفه ای داروسازی، پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

تاریخ دریافت: 1402/2/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/3/3 تاریخ تصویب: 1402/7/15

شود (1). اما نوع مزمن پلاکی یا پسوریازیس ولگاریس با تظاهرات بالینی کلاسیک، پلاک‌های اریتماتوز و خارش دار با فلس‌های نقره‌ای رنگ شایع‌تر است که پلاک‌ها می‌توانند با هم ترکیب و نواحی وسیعی از پوست را بپوشانند (2). در شکل پوستی این بیماری فعل و انفعالات غیر طبیعی بین سلول‌های لنفوسیت T، سلول‌های ایمنی و سیتوکین‌های التهابی باعث ضخیم شدن اپیدرم پوست می‌شود (3). درمان موضعی پسوریازیس، به دلیل افزایش جایگیری دارو در محل عارضه و کاهش آن در جریان خون سیستمیک، باعث بهبود اثربخشی، کاهش عوارض و بهبود کیفیت زندگی این بیماران می‌شود (6،7). در این میان احتمال می‌رود کمبود ویتامین D با پسوریازیس مرتبط است، زیرا وجود آن در مقدار کافی به سرکوب تولید واسطه‌های سیتوکین قوی التهاب، یعنی IL-2، IL-6، و IFN- γ کمک می‌کند (4). ویتامین D باعث تحریک سلول‌های T سرکوب‌گر، مهار سمیت سلولی و ممانعت از تکثیر سلولی در پسوریازیس می‌شود (5). کلسی‌پوتریول نوعی آنالوگ ویتامین D می‌باشد که سال‌هاست به شکل موضعی در درمان پسوریازیس استفاده می‌شود (8). هرچند محدودیت در نفوذپذیری داروها، احتباس بافتی ناکافی و ناپایداری شیمیایی و بیولوژیک دارو محدودکننده دارورسانی موضعی در بیماری‌های پوستی مانند پسوریازیس است (9-11). بنابراین برای بهبود انتقال و افزایش اثرگذاری داروها از حامل‌های دارویی استفاده می‌شود (10). متنوع بودن ترکیب حامل‌های دارویی و روش‌های مختلف تعامل آن‌ها با پوست در ماهیت ابرسازهای دارویی مانند شکل، اندازه، طراحی و نفوذ سطحی آن‌ها اثر می‌گذارد (10) و منجر به پیدایش کلاس‌های مختلف حامل‌هایی دارویی مانند لیپوزوم‌ها، ترانسفروزوم‌ها، میکروامولسیون و نانوامولسیون‌ها، نیوزوم‌ها، دندریمرها، اینوازوم‌ها، نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) و نانوحامل‌های لیپید (NLCs) می‌شود (12-17). در کنار مزایای اشاره شده حامل‌ها دارای معایبی از جمله هزینه بالای مواد جانبی، نیاز به تخصص در تولید

و ارزیابی حامل‌ها و پایداری آن‌ها می‌باشند (10). بنابراین انتخاب سیستم حامل نانوذره کارآمد و پایداری که تهیه و تولید آن آسان و ارزان قیمت باشد در انتخاب فرمولاسیون به جهت بهبود دارورسانی پوستی داروها بسیار مهم است (12،18). نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) گروهی از نانوذرات لیپیدی است که مزایای متعددی از جمله عدم ایجاد التهاب، ایجاد اثرات نرم‌کنندگی، تولید آسان و کم هزینه، پایداری حرارتی بیش‌تر، کمک به نفوذپذیری پوستی بهتر داروها، زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری در دارورسانی موضعی دارند (18،19) و در بیماری‌های مختلف موضعی پوستی مانند درمان و ترمیم زخم، عفونت‌های پوستی، پسوریازیس و مصارف آرایشی - بهداشتی مورد استفاده بوده‌اند و مطالعاتی نیز به‌عنوان حامل در دارورسانی موضعی به پسوریازیس موفق عمل نموده‌اند (20-22).

یک مطالعه درماتوکیتیک در سال 2017 بر روی ژل کاربوپول حاوی SLN نشان داد که در شرایط Ex vivo، نفوذ دارویی مناسب‌تر و عمیق‌تر ژل فرمولاسیون لیپیدی در لایه‌های اپیدرمی در مقایسه با دارو به شکل آزاد رخ می‌دهد (23). نتایج بررسی Mahajan و همکاران بر روی مدل ایجاد پسروریازیس در موش سوری و موش صحرائی نشان داد که فرمول ژل مبتنی بر SLN یک ابزار موثر و ایمن در تجویز موضعی آسیترتین بدون پتانسیل تحریک پوست و رسوب پوستی بالاتر و هم‌چنین جایگزینی برای درمان مسیر خوراکی آن است (24).

در مطالعه Rapalli و همکاران در 2021 نشان داده شد هیدروژل آپرمیلاست (API) با نانوحامل لیپید جامد موضعی (SLN) برای درمان پسوریازیس در مقایسه با آماده‌سازی معمولی، نفوذ بهتر، رسوب پوست و انتشار طولانی مدت را داشت (25). در مورد نانوفرمولاسیون کلسی پوتریول کارهای صورت گرفته بیش‌تر در همراهی با داروهای کورتیکواستروئیدی انجام شده است. در بررسی Kaur و همکاران در 2017 بر روی ژل نانوامولسیون کلویتازول پروپیونات (CP) و کلسی‌پوتریول (CT) برای

درمان موضعی پسونیازیس در موش های BALB/c پسونیاتیک ناشی از ایمنی کیمود، فعالیت ضد پسونیاتیک ژل نانوامولسیون را در مقایسه با داروهای آزاد و یا فرمول های موجود در بازار نشان دادند که نتایج حاصل نشان داد فرمول توسعه یافته با وجود افزایش نفوذ به پوست، تحریک پوستی ناچیز را نشان داد (37).

در مطالعه Knudsen و همکاران در 2012 اثر تثبیت لیپوزوم ها با لیوپلیمر پلی (اتیلن گلیکول) - دی استاروئیل فسفو اتانول آمین (PEG-DSPE) بر خواص فیزیکی شیمیایی لیپوزوم ها و توانایی انتقال کلسی پوتریول غشایی به پوست مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد این ترکیب باعث افزایش نفوذپذیری دارو در لایه های شاخی پوست می شود که در این میان اندازه لیپوزوم عاملی مهم در نفوذ دارو بود (26). بررسی برون تن این مطالعه در رده سلولی HaCaT نشان داد که SLN ها رشد ناگهانی کراتینوسیت ها را به تاخیر می اندازند، در حالی که مدل دم موش درون تن آن نشان داد که ژل SLNs به طور قابل توجهی ضخامت اپیدرم را کاهش می دهد و تعداد ملانوسیت ها را در مقایسه با یک پماد تجاری به نام Daiabet® افزایش می دهد (27). به نظر می رسد با توجه به اثر قطعی داروی کلسی پوتریول در درمان پسونیازیس پوستی و احتیاط در استفاده طولانی از داروهای ضد التهاب استروئیدی لزوم بهینه سازی در دارورسانی کلسی پوتریول قابل تامل می باشد که در این مطالعه به این مهم پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جهت انجام این مطالعه، پودر کلسی پوتریول (Sigma, USA)، توین 80 (Merck, USA)، لسیتین (Merck, USA)، اتانول (Merck, USA)؛ در سطح خلوص آزمایشگاهی پایه ی کلد کرم (سپیداژ، ایران)؛ در سطح خلوص دارویی و کرم ایمنی کیمود 5 درصد با نام تجاری Aldara® (Meda, Sweden) به صورت تجاری تهیه شدند.

تهیه فرمولاسیون کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی و کرم معمولی کلسی پوتریول

در این مطالعه نانوذرات جامد لیپیدی و محلول کلسی پوتریول به ترتیب برای ساخت کرم حاوی نانو ذرات جامد لیپیدی و کرم معمولی کلسی پوتریول با پایه کلد کرم (Cold Cream) با روش مخلوط سرد تهیه شدند، غلظت دارو در هر دو فرمولاسیون 0/4 درصد بوده است.

ساخت کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی و کرم معمولی حاوی کلسی پوتریول

در مطالعه حاضر که یک مطالعه درون تنی مداخله ای است، پس از اخذ کد اخلاق IR. MAZUMS. RES.1397.3177 از دانشگاه علوم پزشکی مازندران، نانوذرات جامد لیپیدی به روش ذوب لیپید تهیه شدند. بدین منظور، ابتدا فاز لیپیدی متشکل از استئاریک اسید (ماتریکس لیپیدی جامد) و (امولسیفایر داخلی) به کمک بن ماری در دمای (60 درجه سانتی گراد) ذوب شدند. سپس محلول کلسی پوتریول با غلظت 10 mg/ml در اتانول 96 درصد تهیه شد. در نهایت ماتریکس لیپیدی و یک میلی لیتر از محلول کلسی پوتریول در بن ماری با یکدیگر مخلوط شدند. جهت تشکیل SLN ها، سیستم فوق در دمای محیط به صورت قطره قطره به 25 میلی لیتر محلول آبی توین 80 (4 درصد وزنی/حجمی)، در حین هم زدن (Heidolph, Germany) با سرعت 2000 rpm اضافه شد. سپس مرحله ی جامد شدن نانوذرات با انتقال مخلوط کلوتیدی فوق به حمام یخ (0 تا 4 درجه سانتی گراد) به مدت 4 ساعت انجام شد. فرمولاسیون های نانوذرات جامد لیپیدی آزمایشی در جدول شماره 1 ذکر شده است. کاهش اندازه ذره ای نانوذرات جامد لیپیدی با روش Probe Ultrasonication (Heilscher, Germany) انجام شد. در نهایت توزیع اندازه ذره ای SLN ها با استفاده از نانوزتاسایزر (Malvern, UK) انجام شد. انتخاب فرمولاسیون منتخب بر اساس پتانسیل زتا، میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه

جدول شماره 1: ترکیب و اجزای فرمولاسیون‌های اولیه نانوذرات جامد لیپیدی

کد	وزن اجزا				حجم اجزا			
	در هر 25 ml SLN (mg)				در هر 25 ml SLN (ml)			
	کلسی پوتریول	کستورول	استارک اکاید	توین 80	لینین	اتانول	استون	آب
F1	30	-	200	0/5	10	-	5	1
F2	30	-	80	0/5	10	-	5	1
F3	30	200	-	0/5	10	5	10	1
F4	30	80	-	0/5	10	5	10	1
F5	30	80	80	0/5	10	5	10	1

بررسی اثربخشی درون تن کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی و کرم معمولی کلسی پوتریول

بررسی و مقایسه اثر درمانی فرمولاسیون‌ها، براساس روش Van der Fits همکاران در سال 2009 انجام شد (28).

در این روش القای پستیوریازیس با استفاده از تجویز موضعی کرم ایمی کیمود 5 درصد در سطح پوست (بدون مو) پشت و یا گوش موش BALB/c انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر تعداد 18 موش BALB/c نر با سن 8 تا 11 هفته در شرایط آرام و بدون سروصدا و دمای 23-25 درجه سانتی‌گراد جهت نگهداری به حیوان‌خانه منتقل شدند. حیوانات به میزان کافی به آب و غذا دسترسی داشتند و مراحل چرخه نوری روزانه در محیط آن‌ها رعایت شد.

برای القای پستیوریازیس از کرم موضعی ایمی کیمود 5 درصد استفاده شد. بدین منظور کرم فوق به صورت روزانه یک بار و به مدت 5 روز در سطح گوش سمت چپ موش‌ها استفاده شد. طی این 5 روز پستیوریازیس القا شد. سپس موش‌ها به صورت تصادفی به سه گروه (6 موش در هر گروه) به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه اول: کنترل منفی (بدون درمان)

گروه دوم: کنترل مثبت (کرم معمولی کلسی پوتریول)

گروه سوم: گروه SLN (موش‌های درمان شده با کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول)

مطالعه درون تن طبق رژیم درمانی مخصوص هر گروه، در مرحله‌ی درمانی به مدت 10 روز ادامه یافت. بدین صورت که گروه اول بدون هیچ مداخله‌ای باقی

ذره‌ای SLN‌ها انجام شد. پس اطمینان از وجود اندازه و بار ذره‌ای مناسب، سیستم کلوئیدی حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول جهت انجام آزمایشات بعدی با روش مخلوط سرد به پایه Cold Cream منتقل شدند. کرم کلسی پوتریول معمولی به روش مخلوط سرد انجام شد. بدین منظور، 30 میلی‌گرم کلسی پوتریول در 7 میلی‌لیتر اتانول با استفاده از ورتکس حل شد و سپس محلول فوق با پایه Cold Cream در هاون مخلوط شدند. غلظت نهایی کلسی پوتریول در هر دو فرمولاسیون کرم معمولی و کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی دارو، برابر با 0/4 درصد بوده است.

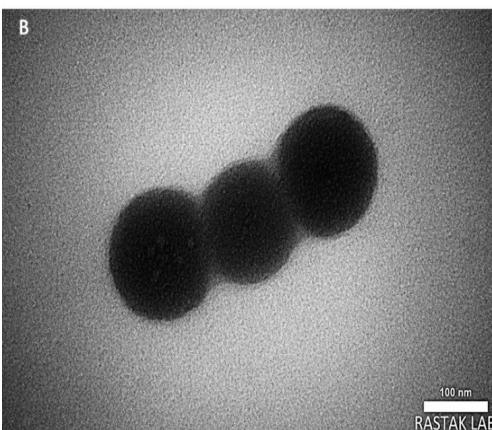
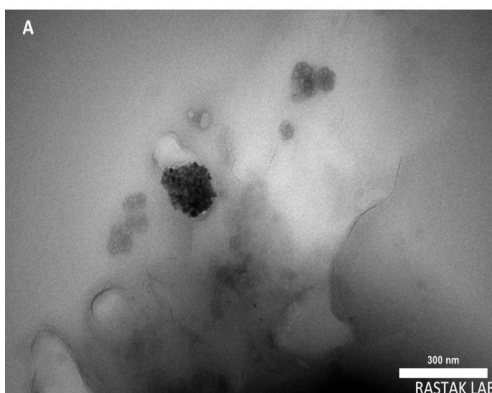
بررسی روند رهائش دارو از فرمولاسیون کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی و کرم معمولی کلسی پوتریول

ارزیابی میزان رهائش دارو از کرم‌ها با روش Paddle over disk و دستگاه انحلال در دمای 35 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. لوله‌های دستگاه به جهت شبیه‌سازی مایعات خارج سلولی با 900 میلی‌لیتر بافر فسفات سالین با pH برابر با 7 پر شدند (جدول شماره 1) پس از ایجاد دمای یکنواخت در تمامی لوله‌ها، نمونه‌های 5/20 گرم از کرم‌ها در ظروفی با سطح ثابت قرار گرفته و به لوله‌ها منتقل شدند. سپس هم زدن محیط رهائش با سرعت 20 rpm انجام شد و نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های 0/5، 1، 2، 4 و 6 ساعت بعد از شروع آزمایش صورت پذیرفت. در نهایت جذب تمام نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفتومتر (Spuv-16 BIO RAD ساخت کشور آمریکا) در طول موج 310 نانومتر اندازه‌گیری شد. برای جلوگیری از تداخل جذب ذرات و مولکول‌های دیگر محلول در محیط انحلال (اجزای تشکیل‌دهنده SLN‌ها که به صورت آزاد در محیط هستند)، آزمون رهائش برای کرم حاوی SLN بدون دارو کاملاً مطابق با نمونه‌های حاوی دارو انجام شد و از نمونه‌های زمان‌های مختلف بدون دارو به عنوان بلانک برای صفر کردن دستگاه در هنگام اندازه‌گیری جذب UV نمونه‌های حاوی داروی همان زمان استفاده شد.

این بار باعث می شود که احتمال ایجاد التهاب و حساسیت در پوست کاهش یابد. هم چنین اندازه ذره‌ای حدود 200 نانومتر باعث می شود که علاوه بر تسهیل نفوذ ذرات به اپیدرم و درم، از ورود ذرات به جریان خون جلوگیری شود (38) و به این واسطه غلظت دارو در محل ضایعات پسوریازیس مدت زمان بیش تری بالا خواهد ماند. تصویر شماره 1 نمای میکروسکوپ الکترونی را نشان می دهد.

جدول شماره 2: اطلاعات اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلسی پوتریول

شماره	کد فرمولاسیون	Zavg (nm)	pdi	پتانسیل زتا (mV)
1	F ₁	1951/0	0/189	-3/55
2	F ₂	2878/0	1/000	-2/99
3	F ₃	1813/0	1/000	-2/43
4	F ₄	5248/0	1/000	-2/29
5	F ₅	241/0	0/538	-5/11



تصویر شماره 1: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلسی پوتریول فرمولاسیون F5 با قدرت تفکیک A:300nm و B:100nm را نشان می دهد

ماند؛ در حالی که گروه‌های دوم و سوم به ترتیب با کرم معمولی و کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول به صورت روزی یک بار درمان شدند. امتیازدهی میزان التهاب براساس شاخص امتیازدهی استاندارد بالینی شدت و محیط پسوریازیس پاسی (Psoriasis Area and Severity Index (PASI)) در روزهای صفر، پنجم و دهم مرحله‌ی درمان انجام شد (29). روش پاسی به شکل تجربی و با چشم توسط فرد با دانش مبتنی بر چهار شاخص: وسعت پلاک، قرمزی (اریتم) پلاک، ضخامت پلاک و میزان پوسته‌ریزی آن انجام می گیرد. بدین منظور ابتدا معیار تصویری شدت التهاب در هر امتیاز به امتیازدهندگان نمایش داده شد. سپس امتیازدهی به التهاب گوش موش‌ها بدون اطلاع امتیازدهندگان از گروهی که موش به آن تعلق داشت و توسط 3 نفر انجام شد. میانگین امتیازات سه نفر به عنوان امتیاز التهابی حیوان در آن روز خاص ثبت شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری در نرم افزار prism8 انجام شد. برای مقایسه درون گروهی از آزمون‌های one way Anova و Tukey استفاده شد. هم چنین برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر آزمون T-test اجرا شد.

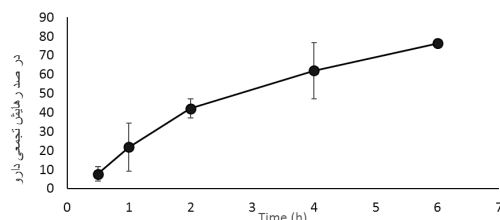
یافته‌ها

بررسی توزیع اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتای نانوذرات جامد لیپیدی
نتایج بررسی توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلسی پوتریول در جدول شماره 2 نشان داده شده است.

براساس این نتایج فرمولاسیون F5 با میانگین اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا به ترتیب 241 نانومتر و -5/11 میلی‌ولت، برای انجام مطالعات درون تن وارد پایه نیمه-جامد شد. وجود بار منفی ذرات هر چند ناچیز، به پایداری فیزیکی ذرات کمک می کند و کم بودن شدت

روند رهایش دارو از کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول

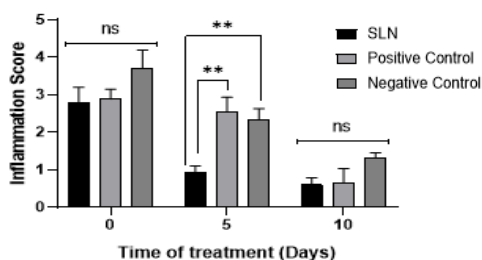
روند رهایش تجمعی دارو از کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول در نمودار شماره 1 نشان داده شده است. با توجه به این نتایج، فرمولاسیون نانوذره‌ای دارو فاقد اثر رهایش انفجاری بود و کم‌تر از 10 درصد دارو در زمان 30 دقیقه اولیه آزاد شد. بیش‌ترین میزان تجمعی داروی رهایش شده در زمان 6 ساعت در نهایت حدود 76 درصد کل داروی بارگذاری شده در کرم بوده است. هم‌چنین بررسی رابطه میزان داروی آزادشده در برابر مجذور زمان نشان داد که رهایش دارو از این فرمولاسیون از روند هیگوشی تبعیت می‌کرده است ($R^2: 0/9908$) و هم‌چنین تا زمان 6 ساعت نزدیک به 80 درصد دارو از فرمولاسیون کرم حاوی SLN‌ها آزاد شده است و بنابراین احتباس دارو در نانوذره، به لحاظ بازداری از رهایش، تاثیر منفی بر روند خروج دارو از پایه و فراهمی زیستی آن نداشته است.



نمودار شماره 1: روند رهایش تجمعی کلسی پوتریول از فرمولاسیون کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی این دارو (F_5) در بازه‌ی زمانی 6 ساعت. بیش‌ترین میزان تجمعی داروی رهایش شده در زمان 6 ساعت و حدود 76 درصد کل داروی بارگذاری شده در کرم (بدون اثر رهایش انفجاری) بوده است. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است ($n=3$).

بررسی اثربخشی کرم نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول
بعد از انجام گروه‌بندی در زمان صفر (قبل از شروع درمان با کلسی پوتریول)، مقایسه آماری امتیاز التهابی بین سه گروه نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌داری بین این سه گروه نبود ($P>0/05$) و بنابراین روند درمان برای گروه‌ها براساس تعریف هر گروه انجام شد. نتایج بررسی

اثربخشی کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول نشان دهنده‌ی روند بهبود التهاب در هر سه گروه در پایان 10 روز بوده است ($P>0/0001$) که با توجه به ایجاد مصنوعی مدل پسوریازیس قابل پیش‌بینی می‌باشد. مقایسه‌ی سرعت روند بهبود بین گروه‌های کنترل مثبت و SLN نشان‌دهنده‌ی روند سریع‌تر کاهش امتیازات التهابی در گروه SLN بوده است (نمودار شماره 2). در گروه کنترل مثبت بین روزهای 0 و 5 روز به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش امتیاز التهابی وجود نداشت ($P>0/05$). اما در گروه کرم SLN التهاب در طی 5 روز به طرز معنی‌داری روند کاهنده را نشان داده است ($P<0/001$). مقایسه امتیازات التهابی گروه‌های SLN، کنترل مثبت و کنترل منفی نشان داد در روز پنجم به ترتیب 66 درصد، 11 درصد و 37 درصد کاهش امتیازات در این گروه‌ها مشاهده شده است؛ و میانگین امتیازات التهابی سه گروه در این روز به ترتیب برابر با $2/89 \pm 0/27$ ، $2/56 \pm 0/38$ و $0/67 \pm 0/37$ بوده است. ادامه‌ی بررسی این روند در روز دهم، درصد کاهش امتیازات التهابی در این سه گروه به ترتیب 78 درصد ($3/72 \pm 0/47$)، 77 درصد ($2/34 \pm 0/30$) و 64 درصد ($1/33 \pm 0/12$) بوده است که معنی‌دار نبود (نمودار شماره 3).



نمودار شماره 2: مقایسه امتیاز التهابی براساس شاخص پاسی در مدل پسوریازیس القایی توسط کرم ایمی کیمود 5 درصد در گوش چپ موش‌های BALB/c در روزهای صفر، پنجم و دهم درمان در گروه SLN (با کرم حاوی نانوذرات جامد لیپیدی کلسی پوتریول)، کنترل مثبت (کرم معمولی کلسی پوتریول) و گروه کنترل منفی (بدون درمان) ($n=6$). درصد کاهش امتیازات التهابی در این سه گروه در روز پنجم تفاوت معنی‌دار گروه SLN با سایرین را نشان می‌داد اما در انتهای روز دهم با وجود کمتر بودن امتیازات در گروه SLN این تفاوت با سایرین معنی‌دار نبود.

بحث

پسونریازیس بیماری مزمن و چند سیستمی التهابی با دخالت عوامل ژنتیکی است که با وجود تنوع علائم بالینی با عوارض پوستی بیش تر شناخته شده است که متاسفانه درگیری پوستی بار روانی فراوان نیز برای بیماران دارد (17-13). انتخاب درمان های موضعی با حذف عوارض درمان های سیستمیک یک رویکرد درمانی موثر و مناسب محسوب می شوند که در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است (30،7). از آن جاکه عواملی مانند نوع و قدرت ماده ی موثره و نوع حامل در اثربخشی درمان موضعی پسونریازیس تعیین کننده هستند (31) و نیز نظر به این که از معایب دارورسانی موضعی محدودیت نفوذپذیری و احتباس پوستی دارو و نیز عدم ایجاد اثر آهسته رهش است (32). در مطالعه حاضر جهت بهبود روند درمان موضعی از کلسی پوتریول به عنوان آنالوگ ویتامین D (8) به همراه حامل نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد در روز پنجم بعد از شروع دوره درمانی، میانگین امتیاز التهابی موش های گروه SLN به طور معنی داری از گروه کنترل منفی و گروه کنترل مثبت کم تر بود ($P < 0/01$). در روز دهم بعد از درمان اگرچه میانگین امتیاز گروه SLN کم تر از دو گروه دیگر بود اما این تفاوت بین سه گروه معنی دار نبود ($P > 0/05$) که علت آن می تواند فاصله گرفتن از آخرین مواجهه پوستی با کرم ایمی کیمود 5 درصد (به عنوان عامل مدل ساز پسونریازیس) و در نتیجه شروع فرآیندهای خود ترمیمی بافتی و تکمیل روندهای ضد التهابی طبیعی در حیوانات مورد آزمایش باشد که در نتیجه یک بهبودی نسبی را به دنبال داشته است. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته قابل مقایسه است. در مطالعه Pradhan و همکاران در 2021 اثربخشی درون تن ژل حامل های نانوساختاری لیپیدی بارگذاری شده با کلسی پوتریول با ژل معمولی دارو، در مدل دم حیوان مقایسه شد. نتایج این مطالعه

نشان دهنده ی افزایش اثربخشی فرمولاسیون حاوی نانوذرات نسبت به فرمولاسیون معمولی، به دلیل احتباس بیش تر کلسی پوتریول بارگذاری شده در قسمت های زنده پوست در مقایسه با فرمولاسیون معمولی بود (33). در بررسی Alam و همکاران در 2023 اثربخشی درون تن ژل حاوی نانوذرات جامد لیپیدی بارگذاری شده با کلسی پوتریول در موش صحرایی نشان دهنده ی بهبود التهاب و تورم در مقایسه با پماد تجاری دارو بوده است (24).

Kaur و همکاران نیز در مطالعه ای فرمولاسیون ژل نانومولسیون پوستی برای دارورسانی هم زمان کلسی پوتریول و کلوتازول پروپیونات را ارزیابی کرده و نتایج بررسی احتباس پوستی نشان داد که غلظت کلسی پوتریول و کلوتازول پروپیونات در لایه شاخی و اپیدرم زنده نسبت به شکل آزاد دارو افزایش معنی داری داشته است. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که به دلیل آهسته تر بودن رهایش داروها، نفوذپذیری داروها به پوست از فرمولاسیون نانومولسیون بیش تر از نانومولسیون مخلوط شده در پایه ی ژل بوده است (37). هم چنین بررسی اثربخشی درون تن نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلسی پوتریول و متوتروکسات در مطالعه ی دیگر نشان دهنده ی بهبود نفوذپذیری دارو به پوست و بهبود اثربخشی درون تن دارو نسبت به داروی آزاد، کاهش التهاب ناشی از داروی آزاد و بهبود نفوذپذیری پوستی داروها بوده است (34).

در مطالعه ای دیگر التهاب زایی و اثر درون تن نانوذرات جامد لیپیدی حاوی بتامتازون دی پروپیونات و کلسی پوتریول بررسی شد. نتایج نشان دهنده ی عدم ایجاد التهاب پوستی، تحمل بیش تر پوستی و بهبود اثربخشی درون از فرمولاسیون نانوذرات جامد لیپیدی نسبت به پماد تجاری موجود بود (27). مجموع این مطالعات نتایج مطالعه ی حاضر را تأیید می کند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف و از آن جاکه نانوذرات جامد لیپیدی (SLN) به دلیل تنوع در مواد تشکیل دهنده، تجانس با ساختار پوست و عدم سمیت و ایجاد التهاب جزء

از ورود دارو به جریان خون سیستمیک و در نتیجه بالا بودن غلظت در دسترس دارو در پوست برای مدت طولانی تری شود. هم چنین ماهیت لیپیدی این نانوذرات مزیت عدم ایجاد التهاب و سمیت از فرمولاسیون نانوذره را دارا می باشد؛ که با وجود زیست تخریب پذیر بودن، کند بودن فرآیند تخریب نانوذره به کندتر بودن رهایش و طولانی شدن ماندگاری دارو در پوست می انجامد. هم چنین محافظت از دارو در برابر تخریب فیزیکی، شیمیایی و محافظت در برابر متابولیسم دارو در پوست از عوامل موثر دیگر برای بهبود دارورسانی پوستی داروها از جمله کلسی پوتریول هستند (29، 30).

بررسی اثربخشی فرمولاسیون کلسی پوتریول الحاقی با SLN طی 10 روز در مدل پسوریازیس موش BALB/c نر نشان داد که سرعت بهبود التهاب به شکل معنی دار افزایش یافته است اما کاهش میزان التهاب تنها در روز پنج معنی دار بود که عدم معنی داری در روز 10 می تواند مربوط به مدل ایجاد شده باشد. بنابراین می توان الحاق کلسی پوتریول با SLN را به عنوان درمانی موثرتر در ضایعات پوستی ناشی از پسوریازیس در نظر گرفت.

پرکاربردترین نانوذرات مورد استفاده جهت بهبود دارورسانی موضعی در پسوریازیس محسوب می شوند (23) و مشکلات فرمولاسیون های چرب مثل پماد از جهت احساس چربی و ایجاد لکه بر روی لباس ها که باعث کاهش تمایل و انگیزه ی بیماران در استفاده طولانی از فرمولاسیون می شوند را ندارند (21) به نظر می رسد در جهت بهینه سازی درمان موضعی این بیماری گامی موثر برداشته شده است؛ چرا که SLN ها با فرمولاسیون های ذره ای به عنوان مواد زیست سازگار و زیست تخریب پذیر وانند با تغییر خصوصیات فیزیکی شیمیایی مولکول دارو و از بین بردن محدودیت سدهای بیولوژیک، به هدایت دارو به سمت محل التهاب و بهبود خواص فارماکودینامیک دارو کمک کنند؛ و در وهله ی اول دارورسانی موضعی ایمن تر و موثرتری را به همراه افزایش پذیرش بیمار ایجاد نمایند (10). بهبود کارایی درمانی فرمولاسیون های حاوی کلسی پوتریول در دارورسانی موضعی پسوریازیس می تواند به دلایل مختلفی ایجاد شود. احتباس دارو در نانوذره علاوه بر ایجاد اثر آهسته رهش، می تواند منجر به افزایش احتباس دارو در لایه های مختلف پوست و ممانعت

References

1. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6): 1475.
2. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of Disease. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; 361(5): 496-509.
3. Mohd Nordin UU, Ahmad N, Salim N, Mohd Yusof NS. Lipid-based nanoparticles for psoriasis treatment: a review on conventional treatments, recent works, and future prospects. *RSC Adv* 2021; 11(46): 29080-29101.
4. Al-Dhubaibi MS. Association between Vitamin D deficiency and psoriasis: An exploratory study. *Int J Health Sci (Qassim)* 2018; 12(1): 33-39.
5. Filoni A, Vestita M, Congedo M, Giudice G, Tafuri S, Bonamonte D. Association between psoriasis and vitamin D: Duration of disease correlates with decreased vitamin D serum levels: An observational case-control study. *Medicine* 2018; 97(25): e11185.
6. Nițescu DA, Mușetescu A, Nițescu M, Costescu M, Coman OA. Experimental research in topical psoriasis therapy. (Review). *Exp Ther Med* 2021; 22(3): 971.
7. Laws PM, Young HS. Topical treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010; 11(12): 1999-2009.
8. Kragballe K. Calcipotriol: a new drug for topical psoriasis treatment. *Pharmacol toxicol* 1995; 77(4): 241-246.

9. Xie J, Huang S, Huang H, Deng X, Yue P, Lin J, et al. Advances in the application of natural products and the novel drug delivery systems for psoriasis. *Front Pharmacol* 2021; 12: 644952.
10. Katare OP, Raza K, Singh B, Dogra S. Novel drug delivery systems in topical treatment of psoriasis: rigors and vigors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010; 76(6): 612-621.
11. Fouéré S, Adjadj L, Pawin H. How patients experience psoriasis: results from a European survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(Sup3): 2-6.
12. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366(1-2): 170-184.
13. Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Temoporfin-loaded invasomes: development, characterization and in vitro skin penetration studies. *J Control Release* 2008; 127(1): 59-69.
14. Singh B, Kapil R, Bandyopadhyay SH, Prakash OM. Dendrimers as nanobiopolymers: Drug delivery applications. *Pharma Buzz* 2009; 4(9): 34-43.
15. Azmin MN, Florence AT, Handjani-Vila RM, Stuart JF, Vanlerberghe G, et al. The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37(4): 237-242.
16. Bali V, Bhavna, Ali M, Baboota S, Ali J. Potential of microemulsions in drug delivery and therapeutics: a patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008; 2(2): 136-144.
17. de Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann HA. Liposomes in dermatology today. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(5): 505-516.
18. Souto EB, Müller RH. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). *Int J Cosmet Sci* 2008; 30(3): 157-165.
19. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50(1): 161-177.
20. Arora R, Katiyar SS, Kushwah V, Jain S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carrier-based nanotherapeutics for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Deliv* 2021; 18(12): 1857-1872.
21. Mohapatra SH, Ranjan SH, Dasgupta N, Mishra RK. *Nanocarriers for Drug Delivery*. Amsterdam: Elsevier; 2019.
22. García-Pinel B, Porras-Alcalá C, Ortega-Rodríguez A, Sarabia F, Prados J, Melguizo C, et al. Lipid-based nanoparticles: application and recent advances in cancer treatment. *Nanomaterials*, 2019; 9(4): 638.
23. Arora R, Katiyar SS, Kushwah V, Jain S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carrier-based nanotherapeutics in treatment of psoriasis: a comparative study. *Expert Opin Drug Deliv* 2017; 14(2): 165-177.
24. Mahajan M, Kaur M, Thakur S. Solid Lipid Nanoparticles as Carrier to Increase Local Bioavailability of Acitretin After Topical Administration in Psoriasis Treatment. *J Pharm Innov* 2022; 18: 220-237.
25. Rapalli VK, Sharma S, Roy A, Alexander A, Singhvi G. Solid lipid nanocarriers embedded hydrogel for topical delivery of apremilast: In-vitro, ex-vivo, dermatopharmacokinetic and anti-psoriatic evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021; 63: 102442.
26. Knudsen NØ, Rønholt S, Salte RD, Jorgensen L, Thormann T, Basse LH, et al. Calcipotriol delivery into the skin with

- PEGylated liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 81(3): 532-539.
27. Sonawane R, Harde H, Katariya M, Agrawal S, Jain S. Solid lipid nanoparticles-loaded topical gel containing combination drugs: an approach to offset psoriasis. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11(12): 1833-1847.
 28. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009; 182(9):5836-5845.
 29. Naldi L. Scoring and monitoring the severity of psoriasis. What is the preferred method? What is the ideal method? Is PASI passé? facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; 28(1): 67-72.
 30. Feldman SR, Horn EJ, Balkrishnan R, Basra MK, Finlay AY, McCoy D, et al. Psoriasis: Improving adherence to topical therapy. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(6): 1009-1016.
 31. Armstrong AW, Read C. Read, Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review. *JAMA* 2020; 323(19): 1945-1960.
 32. Gowda BHJ, Ahmed MG, Hani U, Kesharwani P, Wahab S, Paul K. Microneedles as a momentous platform for psoriasis therapy and diagnosis: A state-of-the-art review. *Int J Pharm* 2023; 632: 122591.
 33. Pradhan M Alexander A, Singh M, Singh D. Statistically optimized calcipotriol fused nanostructured lipid carriers for effectual topical treatment of psoriasis. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021; 61: 102168.
 34. Lin YK, Huang ZR, Zhuo RZ, Fang JY. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 117-128.
 35. Garcês A, Amaral MH, Sousa Lobo JM, Silva AC. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *Eur J Pharm Sci* 2018; 112: 159-167.
 36. Sala M, Elaissari A, Fessi H. Elaissari, and H. Fessi, Advances in psoriasis physiopathology and treatments: Up to date of mechanistic insights and perspectives of novel therapies based on innovative skin drug delivery systems (ISDDS). *J Control Release* 2016; 239: 182-202.
 37. Özcan A, Sahin D, Impellizzieri D, Nguyen TT, Hafner J, Yawalkar N, et al. Nanoparticle-coupled topical methotrexate can normalize immune responses and induce tissue remodeling in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2020;140(5): 1003-1014. e8.
 38. Aghajani A, Kazemi T, Enayatifard R, Amiri FT, Narenji M. Investigating the skin penetration and wound healing properties of niosomal pentoxifylline cream. *Eur J Pharm Sci* 2020; 151: 105434.