

تهیه، تعیین مشخصات و بررسی تأثیر میکروامولسیون حاوی روغن کنجد بر میزان فاکتور هفت و فیبرینوژن در محیط حیوانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۶ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۱ آنلاین: ۱۳۹۸/۰۳/۳۱

زمینه و هدف: روغن کنجد می‌تواند در زمینه درمان بیماری‌های قلبی-عروقی مانند آترواسکلروز از طریق کاهش سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت مورد استفاده قرار گیرد. هدف از انجام مطالعه کنونی تهیه میکروامولسیون حاوی روغن کنجد به‌عنوان یک نانوحامل دارویی با قابلیت بهبود حلالیت آبی و اثر درمانی مطلوب‌تر در کاهش فاکتور هفت و فیبرینوژن در محیط حیوانی می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا دی ۱۳۹۵ در دانشکده مهندسی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تهیه انواع میکروامولسیون‌ها و نیز دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت بررسی عملکرد نمونه‌ها در محیط حیوانی انجام شده است. در راستای تهیه میکروامولسیون‌ها با روش تیتراسیون، توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ به‌عنوان زوج سورفکتانتی و نسبت‌های سورفکتانتی ۸:۱، ۹:۱ و ۱۰:۱ جهت رسم نمودارهای شبه‌سه‌فازی تعیین شد. در مرحله تست حیوانی خرگوش‌های سفید نوزلندی در سه گروه دریافت‌کننده رژیم پایه، رژیم پرکلسترول و رژیم پرکلسترول به‌همراه میکروامولسیون دسته‌بندی شدند.

یافته‌ها: میانگین اندازه ذرات نمونه‌ها در محدوده 167.6 ± 0.1 تا 211.16 ± 0.2 nm با توزیع ذرات یکنواخت، پتانسیل زتا در محدوده -10.7 تا -18.4 میلی‌ولت، شاخص شکست نور در حدود 1.39 ، ضریب هدایت الکتریکی در محدوده 311 تا 297 میکروزیمنس و pH تمامی نمونه‌ها معادل 7.42 تعیین شد. تمامی نمونه‌ها پایداری فیزیکی داشته و نمونه تهیه‌شده با نسبت سورفکتانتی ۹:۱ با توجه به درصد روغن بالاتر نسبت به سایر نمونه‌های پایدار در مدت زمان ۶ ماه، جهت انجام تست حیوانی انتخاب شد. کاهش معنادار سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت در سومین گروه خرگوش‌ها در مقایسه با دیگر گروه‌ها مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان‌دهنده عملکرد مؤثر نانوحامل‌های دارویی میکروامولسیونی در بهبود حلالیت آبی و اثرات درمانی ترکیبات آب‌گریز مانند روغن‌های گیاهی می‌باشد.

کلمات کلیدی: مدل‌های حیوانی، آترواسکلروز، بیماری‌های قلبی-عروقی، پژوهش‌های تجربی، فاکتور هفت، فیبرینوژن، روغن کنجد، ماده فعال سطحی.

محمود ابراهیمی^۱

محمد کریمی^۲

فرانک دهقانی^۳

امیر بی‌ریایی^۳

نقیسه فرهادیان^{۳*}

شیوا گل محمدزاده^۴

۱- مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۲- گروه طب اورژانس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران؛ مرکز تحقیقاتی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳- گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده مهندسی.

تلفن: ۰۵۳۸۸۰۵۱۴۰
E-mail: n.farhadian@um.ac.ir

مقدمه

بنابراین پایین آوردن فاکتورهای هموستاتیک فیبرینوژن و فاکتور هفت می‌تواند منجر به کاهش فرآیندهای التهابی و آترواسکلروز و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی شود. فاکتور هفت یک فاکتور وابسته به ویتامین K می‌باشد که توسط هپاتوسیت‌ها تولید شده و در جریان خون آزاد می‌شود. بالا بودن سطح پلاسمایی فاکتور هفت با افزایش خطر ترومبوز شریانی همراه است، به‌طوری‌که ۲۵٪ افزایش فعالیت فاکتور هفت، خطر بیماری عروق کرونر کشنده را به‌میزان ۵۵٪ بالا می‌برد.^۲ میزان فاکتور

آترواسکلروز علت اصلی بروز بیماری‌های ایسکیمی‌دهنده عروق قلب و مغز محسوب می‌شود. فیبرینوژن و فاکتور هفت به‌عنوان اجزای سیستم انعقادی به‌طور مستقیم در ارتباط با فاکتورهای فیبرینولیتیک شامل فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (Tissue plasminogen activator, TPA) مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن (PAI-1) و آترواسکلروز می‌باشند.^۱

نیز دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت بررسی اثربخشی نمونه‌ها در مدل حیوانی انجام شده است. روغن پایه، روغن کنجد تهیه‌شده توسط شرکت ثمر (Becker scored sesame oil, SAMAR Inc., Ardakan, Yazd Province, Iran) است. مهم‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده این روغن شامل اسیدهای چرب، عناصر کمیاب، ویتامین‌ها و فیبرهای غذایی می‌باشد. اسیدهای چرب موجود در این روغن شامل اسید پالمیتیک، پالمیتولیک، استئاریک، اولئیک و لینولیک بوده و از این میان اسید اولئیک و لینولیک بیشترین درصد را به خود اختصاص می‌دهند. عناصر کمیاب شامل منگنز، مس، کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر و روی می‌باشند. ویتامین‌ها شامل ویتامین B1, B2, B6 و B3 می‌باشند.

سورفکتانت‌ها (مواد فعال سطحی) شامل توین ۸۰ (پلی‌سوربات ۸۰) و اسپن ۸۰ توسط شرکت نوآوران زیستی پارسه از (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) تأمین شد. جهت تهیه نمونه‌های میکروامولسیون از آب مقطر ۲ بار تقطیر بهره‌گیری شد. حیوانات آزمایشگاهی جهت بررسی کارایی درون تن نمونه‌های میکروامولسیون شامل ۳۱ سر خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن $12/9 \pm 2/10$ g بوده‌اند.

جهت تهیه میکروامولسیون خوراکی بر پایه روغن کنجد با ماهیت آب‌گریزی، سورفکتانت‌هایی با مقادیر *Hydrophile-lipophile balance* (HLB) بالاتر و ماهیت آب‌دوستی غالب مانند دسته توین‌ها مناسب می‌باشند. استفاده از توین ۸۰ در تهیه میکروامولسیون‌های خوراکی بیشتر از انواع دیگر آن صورت گرفته است. از طرفی مقدار غلظت بحرانی مایسلی شدن برای توین ۸۰ کمتر از سایر انواع توین بوده و تهیه میکروامولسیون با غلظت‌های پایین‌تری از آن امکان‌پذیر است. در نهایت توین ۸۰ به‌جهت HLB مناسب، زیست‌سازگاری بالاتر و *Critical micelle concentrations* (CMC) کمتر، به‌عنوان سورفکتانت اصلی انتخاب شد. در صورت بهره‌گیری از فاز سورفکتانتی به‌صورت مخلوط دو سورفکتانت، به‌منظور ایجاد توازن در مقدار HLB و با توجه به HLB بالای سورفکتانت توین ۸۰، سورفکتانت‌هایی با HLB پایین و در عین حال زیست‌سازگاری بالا مانند دسته اسپن‌ها به‌عنوان سورفکتانت دوم مناسب به‌نظر می‌رسند.^{۱۳،۱۴} در بین انواع اسپن، اسپن ۸۰ به‌لحاظ کاربرد گسترده‌تر در محصولات دارویی و زیست‌سازگاری بالاتر، به‌عنوان سورفکتانت دوم انتخاب شده و در کنار توین ۸۰ قرار گرفت. از دیدگاه مراجع نیز زوج سورفکتانتی توین ۸۰ و اسپن ۸۰ در کنار یکدیگر جهت تهیه میکروامولسیون‌های

هفت با میزان تری‌گلیسرید نیز متناسب می‌باشد. تغذیه با رژیم پر چربی سبب افزایش غلظت لیپوپروتئین‌ها و تری‌گلیسرید شده و لیپولیز ذره‌های بزرگ لیپوپروتئین افزایش فاکتور هفت فعال‌شده را در پی دارد.^۳ میزان فعالیت فاکتور هفت در افرادی که رژیم پرچرب دارند به‌میزان ۱۶٪ بیشتر از افرادی با رژیم کم‌چرب می‌باشد.^۴

فیبرینوژن یک پروتئین با وزن مولکولی بالاست که توسط کبد ساخته شده و میزان طبیعی آن در خون به‌طور متوسط 250 mg/dl می‌باشد. میزان فیبرینوژن پلاسما در بیماری‌های التهابی کبدی افزایش یافته و منجر به افزایش لخته می‌گردد.^{۵،۶} فیبرینوژن به‌عنوان یک عامل خطر مستقل نیز در ایجاد بیماری تصلب شرایین نقش داشته و با تاثیر بر ویسکوزیته پلاسما و افزایش تجمع پلاکت‌ها در اثر تشکیل فیبرین، زمینه ابتلا به بیماری عروق کرونر را فراهم می‌سازد.^{۷،۸}

تهیه میکروامولسیون‌های روغن در آب که به‌عنوان دسته‌ای از نانوحامل‌های دارویی با ایجاد اتصال پایدار بین ترکیبات آب‌گریز و محیط آبی موجب بهبود حلالیت آبی و افزایش جذب و اثربخشی درمانی این ترکیبات در بدن می‌گردند، با روش تیتراسیون صورت گرفته و طی آن سورفکتانت آب‌دوست در اطراف فصل مشترک روغن و آب جای می‌گیرد. به‌این ترتیب فاز روغنی با مقدار بسیار کمتر از فاز آبی، به‌عنوان فاز پراکنده‌شونده به‌صورت ذراتی با اندازه نانومتری در فاز پیوسته آبی قرار گرفته و میکروامولسیون روغن در آب را تشکیل می‌دهد.^{۱۰،۹} جهت بهبود انعطاف لایه سورفکتانت در اطراف فاز پراکنده، کاهش کشش سطحی و افزایش بیشتر پایداری در فصل مشترک روغن و آب جزء دومی تحت عنوان کوسورفکتانت در کنار سورفکتانت قرار گرفته و در برخی موارد سورفکتانت ثانویه با ماهیت آب‌دوستی متضاد در کنار سورفکتانت اول فاز سورفکتانتی را تشکیل می‌دهند.^{۱۱،۱۲}

هدف از انجام این مطالعه تهیه نمونه میکروامولسیون حاوی روغن کنجد با استفاده از زوج سورفکتانتی توین ۸۰ و اسپن ۸۰ با هدف بهبود اثر درمانی این روغن در زمینه کاهش سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت و به‌دنبال آن کاهش خطر آترواسکلروز می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا دی ۱۳۹۵ در دانشکده مهندسی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تهیه انواع میکروامولسیون‌ها و

جدول ۱: مقادیر HLB محاسبه شده برای مخلوط توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ در نسبت‌های سورفکتانتی مختلف

نسبت سورفکتانتی	۲:۱	۳:۱	۴:۱	۵:۱	۶:۱	۷:۱	۸:۱	۹:۱	۱۰:۱	۱۱:۱
مقدار HLB	۱۱/۴	۱۲/۳۲	۱۲/۸۶	۱۳/۲۱	۱۳/۴۷	۱۳/۶۶	۱۳/۸۱	۱۳/۹۵	۱۴/۰۲	۱۴/۱۱

دیونیزه در لحظه تغییر وضعیت ثبت شده و ترکیب درصد مربوط به آن لحظه تعیین گردید. به این ترتیب در طول تیتراژ نمودن نمونه‌ها، نقاط مرزی ناحیه پایدار میکرومولسیون در نمودار شبه‌سه‌فازی مشخص شده و از اتصال آن‌ها ناحیه پایدار شکل گرفت. رسم نمودارهای شبه‌سه‌فازی با داشتن نقاط روی مرز ناحیه پایدار میکرومولسیون، توسط SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) انجام شد.

تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه زتا سایزر (Nano zeta sizer, Malvern Instruments, UK) صورت گرفت. شاخص شکست نور تمامی نمونه‌ها توسط دستگاه رفراکتومتر (Abbe's refractometer (Bellingham+ Stanley limited, England) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین این شاخص، قطره میزان خطای دستگاه با اندازه‌گیری شاخص شکست نور آب مقطر و مقایسه آن با مقدار شاخص آب مقطر در دمای اتاق (۱۳۳۳۳) تعیین گردید. ضریب هدایت الکتریکی برای تمامی نمونه‌های میکرومولسیون به وسیله دستگاه هدایت‌سنج (AZ-8306 digital conductivity meter, AZ Instrument Corp., Taichung, Taiwan) اندازه‌گیری شد. مقدار pH نمونه‌های میکرومولسیون توسط دستگاه pH متر (Ciba corning diagnostics limited Sudbury, Suffolk co106xd, England) اندازه‌گیری شد.

پایداری نمونه‌های میکرومولسیون به‌طور معمول به دو صورت مورد بررسی قرار می‌گیرد. در اولین روش، نمونه‌های میکرومولسیون پس از ساخته شدن، به‌منظور بررسی پایداری فیزیکی، به مدت ۱۵ دقیقه تحت فرآیند سانتیفریوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار می‌گیرند.^{۱۷، ۱۸} هر گونه تغییر وضعیت نمونه شامل جدایش فازی، کرمی شدن، کلوخه شدن و یا ایجاد حالت ژلاتینی به معنای عدم پایداری فیزیکی مناسب به‌شمار می‌رود. در روش دوم پایداری نمونه‌های میکرومولسیون با گذشت زمان در مقابل کلوخه شدن و جدایش فازی تا مدت ۶ ماه بررسی شد. در این راستا در بازه‌های زمانی یک‌ماهه، آنالیز تعیین اندازه

حاوی روغن‌های گیاهی بسیار مناسب عمل می‌کنند.^{۱۴} انتخاب نسبت‌های سورفکتانتی با توجه به میزان HLB مخلوط سورفکتانت‌ها صورت می‌گیرد. مقدار HLB هر یک از دو سورفکتانت در معادله تعیین HLB مخلوط سورفکتانت‌ها قرار گرفته و مقدار HLB نهایی فاز سورفکتانتی محاسبه گردید.

$$HLB = [(x \times HLB_1) + ((1-x) \times HLB_2)]$$

در این رابطه x نشانگر جزء جرمی سورفکتانت اول می‌باشد. نتایج محاسبات HLB برای تمامی نسبت‌های سورفکتانتی در جدول ۱ قابل مشاهده است. بر اساس مراجع، مقدار HLB مناسب جهت تهیه میکرومولسیون‌های حاوی روغن‌های گیاهی در محدوده ۱۲-۱۵ قرار دارد.^{۱۴} بنابراین اعداد به‌دست‌آمده در تمامی نسبت‌ها به‌جز نسبت ۲:۱، در محدوده HLB مناسب برای تهیه میکرومولسیون روغن در آب قرار داشت، اما به‌دلیل دستیابی به نمونه‌هایی با پایداری بالا در طول زمان، نسبت‌های جرمی بالاتر شامل نسبت جرمی ۸:۱، ۹:۱ و ۱۰:۱ از توپین ۸۰ به اسپن ۸۰ برای فاز سورفکتانتی انتخاب شد.

جهت رسم نمودار شبه‌سه‌فازی، پس از نام‌گذاری رئوس و اختلاط سورفکتانت‌ها با نسبت‌های سورفکتانتی معین، روغن کنجد با درصدهای ده‌گانه ۱۰:۹۰، ۲۰:۸۰، ۳۰:۷۰، ۴۰:۶۰، ۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰، ۷۰:۳۰، ۸۰:۲۰ و ۹۰:۱۰ به فاز سورفکتانتی افزوده شد. هر مخلوط دوجزی تهیه‌شده، بر روی همزن مغناطیسی اختلاط‌یافته، همزمان آب مقطر قطره‌قطره به آن افزوده شده و پیوسته تغییرات ظاهری نمونه مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب با ثابت نگه داشتن دو جزء، درصد جزء سوم از صفر تا مقادیر بالاتر تغییر یافته و نمونه‌های بی‌شماری از امولسیون ساخته شد.

نمونه‌های شفاف معرف میکرومولسیون و نمونه‌های کدر معرف ماکرومولسیون می‌باشند.^{۱۷-۱۵} جهت تسریع در تهیه نمونه‌ها و رسم نمودار شبه‌سه‌فازی، قرارگیری نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک نیز صورت گرفت. برای هر نمونه میکرومولسیون، حجم آب مقطر

جداگانه برای تهیه سرم و پلاسما ریخته شد. نمونه‌گیری از خون خرگوش‌ها براساس راهنمای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دستورکار شورای اتحادیه اروپا مورخ ۲۴ نوامبر ۱۹۸۶ (86/609/EC) و کمیته ملی حقوق حیوانات آزمایشگاهی (91-01-159-18022) جهت کاهش آسیب به حیوانات صورت گرفته است. تمام لوله‌ها با شماره و تاریخ مشخص به‌منظور تهیه سرم و پلاسما با دور ۳۵۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه تحت فرآیند سانتریفیوژ قرار گرفتند. میزان فیبرینوژن با استفاده از Coagulation tests kit, Fibrinogen (Mahsa, Yaran kit, Tehran, Iran) براساس زمان تشکیل لخته محاسبه گردید. فاکتور هفت از طریق اندازه‌گیری زمان لخته شدن و در حضور معرف نئوپلاستین، با کیت STA-deficient VII™ kit (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) و دستگاه STA-R evolution® (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) اندازه‌گیری شد. برای بررسی نتایج بیوشیمیایی و مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد و $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شد.

یافته‌ها

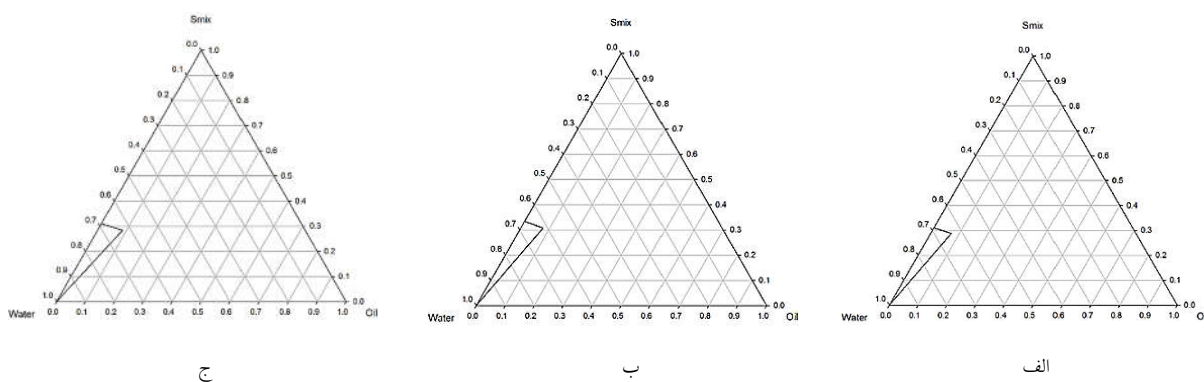
نتایج به‌دست‌آمده از تیتراسیون نمونه‌های مختلف به‌صورت نمودارهای شبه‌سه‌فازی در شکل ۱ برای سه نسبت سورفکتانتی مختلف قابل مشاهده می‌باشد.

ذرات بر روی نمونه‌های میکروامولسیون صورت گرفته و بر اساس نتایج، کدر شدن، شیری‌رنگ شدن، افزایش زیاد اندازه ذرات و غیریکنواخت شدن توزیع ذرات در آن‌ها، به‌منزله ناپایداری قلمداد شد. بررسی کارایی درون تن نمونه‌ای با درصد روغن بالاتر و پایداری بیشتر و تأثیر آن در کاهش میزان فیبرینوژن و فاکتور هفت از طریق تجویز خوراکی رژیم پایه، رژیم پرکلسترو و رژیم پرکلسترو همراه میکروامولسیون بر روی خرگوش‌های هایپرکلسترومیک صورت گرفت.

در این بررسی تجربی از ۳۱ سر خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن 201.0 ± 12.9 g استفاده شد. خرگوش‌ها از انستیتو رازی مشهد خریداری شده و در لانه حیوانات مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی مشهد به مدت ۲ هفته در دما و رطوبت مناسب، شرایط ۱۲ ساعت تاریکی-۱۲ ساعت روشنایی و رژیم پایه استاندارد نگهداری شدند. تغذیه خرگوش‌ها با استفاده از مواد غذایی دانه‌ای آماده استاندارد شامل ۱۵٪ پروتئین، ۵۰-۴۰٪ کربوهیدرات، ۲٪ چربی گیاهی و ۲۵-۱۵٪ فیبر انجام شد. حیوانات در طول دوره آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. خرگوش‌ها در ۳ گروه با رژیم‌های غذایی دریافتی متمایز در مدت زمان ۶۰ روز، دسته‌بندی شدند.

گروه اول: ۱۰ خرگوش دریافت‌کننده رژیم پایه، گروه دوم: ۱۱ خرگوش دریافت‌کننده رژیم پرکلسترو (۱٪)، گروه سوم: ۱۰ خرگوش دریافت‌کننده رژیم پرکلسترو (۱٪) به‌همراه میکروامولسیون.

پیش از شروع و پایان مطالعه، خرگوش‌ها به مدت ۱۲ ساعت در حالت ناشتا قرار گرفته و سپس نمونه خون آن‌ها از رگ میانی گوش گرفته شده و برای هر خرگوش در دو لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتری



جدول ۲: درصد جرمی اجزای تشکیل دهنده نمونه‌های میکروامولسیون حاوی بیشترین روغن کنجد

درصد آب	درصد اسپین ۸۰	درصد توین ۸۰	درصد روغن	نسبت روغن به فاز سورفکتانتی	نسبت توین ۸۰ به اسپین ۸۰	شماره نمونه
۶۴	۳/۲	۲۵/۶	۷/۲	۲۰:۸۰	۸:۱	۱
۶۱/۲۵	۳/۰۶	۲۷/۵۶	۸/۱۲	۲۱:۷۹	۹:۱	۲
۵۸/۹۶	۲/۹۵	۲۹/۴۸	۸/۶۱	۲۱:۷۹	۱۰:۱	۳

جدول ۳: تعیین مشخصات نمونه‌های میکروامولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد پس از ساخت در زمان صفر و پس از ۶ ماه

پس از ساخت در زمان صفر						
جدايش فازي در اثرسانتریفیوژ	pH	هدایت الکتریکی (میکروزیمنس)	شاخص شکست نور	شاخص توزیع اندازه ذرات	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	میانگین اندازه ذرات (nm)
مشاهده نشد	۶/۴۲	۳۱۱	۱/۳۹۱۶	۰/۳۵۶±۰/۰۱۳	-۱۲/۸	۱۶/۶۴±۰/۱
مشاهده نشد	۶/۴۲	۳۰۵	۱/۳۹۶۲	۰/۳۶۷±۰/۰۱۵	-۱۰/۷	۲۱/۱۶±۰/۲
مشاهده نشد	۶/۴۲	۲۹۷	۱/۳۹۳۲	۰/۳۸۱±۰/۰۱۷	-۱۸/۴	۱۹/۵۶±۰/۲

پس از ۶ ماه				
ناپایداری تا ۶ ماه	شاخص توزیع اندازه ذرات	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	میانگین اندازه ذرات (nm)	شماره نمونه
شیری رنگ شد	-	-	-	۱
مشاهده نشد	۰/۲۴۸±۰/۰۱۹	-۱۳/۴	۳۲/۱۰±۰/۲	۲
شیری رنگ شد	-	-	-	۳

جدول ۴: مقادیر فیبریوزن و فاکتور هفت در سه گروه خرگوش‌ها

گروه	متغیر	تعداد خرگوش‌ها	فیبریوزن (mg/dl)	فاکتور هفت (mg/dl)
اول		۱۰	۷/۲۵±۲۸۶/۲۷	۱۱/۱۴±۲۳۲/۲
دوم		۱۱	۱۰/۸۸±۳۳۷/۹۲	۴/۲۲±۲۸۱/۱۷
سوم		۱۰	۶/۰۵±۲۱۶/۸۴	۹/۸۱±۱۹۹/۲۹

۹:۱، درصد روغن ۸/۱۲ و پایداری بالاتر جهت بررسی عملکرد درون تن انتخاب شد. مقادیر فیبریوزن و فاکتور هفت در هر سه گروه دریافت‌کننده رژیم پایه، رژیم پرکلسترول و میکروامولسیون حاوی روغن کنجد در کنار رژیم پرکلسترول در جدول ۴ آورده شده است.

درصد اجزای تشکیل دهنده نمونه‌های میکروامولسیون حاوی بیشترین روغن در هر یک از سه نسبت سورفکتانتی بررسی شده در جدول ۲ و نتایج مربوط به آنالیزهای صورت گرفته بر روی آن‌ها در جدول ۳ بیان شده است. نمونه میکروامولسیون حاوی روغن کنجد با نسبت سورفکتانتی

بحث

تشخیص فاز پیوسته میکرومولسیون نیز عامل مهمی به‌شمار می‌رود. به‌نحوی که شاخص شکست نور هر نمونه میکرومولسیون به شاخص فاز پیوسته خود نزدیک‌تر می‌باشد.^{۱۵} مقدار شاخص شکست نور در تمامی نمونه‌ها به عدد ۱/۳۵۸۳، به‌عنوان عدد شاخص شکست نور آب مقطر در دمای اتاق (با احتساب خطای دستگاه)، نزدیک بوده است. بر این اساس تمامی نمونه‌ها از شفافیت بالایی برخوردار بودند. افزون‌براین نزدیک بودن مقدار شاخص شکست نور نمونه‌ها به شاخص آب، می‌تواند بیانگر شکل‌گیری میکرومولسیون روغن در آب و وجود فاز پیوسته آبی در آن‌ها باشد.

میزان هدایت الکتریکی میکرومولسیون‌ها به‌میزان رسانش فاز پیوسته آن‌ها نزدیک‌تر است. به‌طورکلی امولسیون‌های روغن در آب رسانش الکتریکی چشمگیری داشته و امولسیون‌های آب در روغن فاقد هدایت الکتریکی بالا می‌باشند.^{۱۸} بنابراین ضریب هدایت الکتریکی در تشخیص فاز پیوسته میکرومولسیون بسیار اهمیت دارد.^{۱۹،۲۰} براساس نتایج، محدوده ضریب هدایت الکتریکی نمونه‌های میکرومولسیون نزدیک به ضریب هدایت الکتریکی آب مقطر می‌باشد. بنابراین میکرومولسیون‌های تشکیل‌شده دارای فاز پیوسته آبی و از نوع روغن در آب می‌باشند.

pH تمامی نمونه‌های میکرومولسیون معادل ۶/۴۲ تعیین شد. این عدد با مقدار pH تعیین شده برای میکرومولسیون‌های حاوی روغن کنگد در مراجع نیز همخوانی دارد.^{۲۱،۲۲}

براساس نتایج جدول ۴، سطح فاکتور هفت و مقدار فیبرینوژن در گروه سوم با دریافت نمونه میکرومولسیون حاوی روغن کنگد به‌همراه رژیم پرکلسترول به‌شکل چشمگیری کمتر از دو گروه دریافت‌کننده رژیم پایه و رژیم پرکلسترول می‌باشد و تفاوت بین تمام گروه‌ها معنادار بود ($P < 0.001$). سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت در رژیم دوم با کلسترول بالا بیشتر از گروه دریافت‌کننده رژیم پایه و گروه سوم با دریافت میکرومولسیون به‌همراه رژیم پرکلسترول می‌باشد. تفاوت مشاهده شده در غلظت فیبرینوژن و فاکتور هفت در گروه دوم و سوم نشانگر کاهش چشمگیر سطح این ترکیبات در صورت استفاده از میکرومولسیون حاوی روغن کنگد در کنار رژیم پرکلسترول می‌باشد. از آنجاکه سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت در صورت استفاده از میکرومولسیون حاوی روغن کنگد حتی در کنار رژیم پرکلسترول پایین‌تر از سطح این ترکیبات در گروه اول با دریافت رژیم پایه

بررسی پایداری فیزیکی نمونه‌ها نشان داد که هیچ‌گونه جدایش فازی، کرمی شدن یا ژل شدن پس از انجام سانتریفیوژ در آن‌ها رخ نداده و تمامی نمونه‌ها از پایداری فیزیکی بسیار بالایی برخوردار بودند. مقدار شاخص توزیع اندازه ذرات برای تمامی نمونه‌ها کمتر از ۰/۵ بوده است. این نتیجه نشانگر توزیع اندازه ذرات به‌نسبت یکنواخت می‌باشد. اندازه ذرات در نمونه‌های تهیه‌شده با سه نسبت سورفکتانتی متمایز، پس از ساخت در یک محدوده قرار داشت. براساس جدول ۶، نمونه ۹:۱ با وجود افزایش اندک اندازه ذرات، با کاهش شاخص توزیع اندازه ذرات و یکنواختی بیشتر مواجه شد، به‌نحوی که پس از گذشت ۶ ماه، ۹۸/۶٪ از ذرات آن هم‌اندازه بوده و نمودار اندازه آن تا مرز تک‌پیک شدن پیش رفت (شکل ۳)، درحالی که نمونه‌های تهیه‌شده با نسبت‌های سورفکتانتی ۸:۱ و ۱۰:۱ به‌طور کامل شیری‌رنگ شده و در مدت ۶ ماه پایداری خود را از دست دادند. بنابراین نمونه تهیه‌شده با نسبت سورفکتانتی ۹:۱ و درصد روغن ۸/۱۲ پایداری مطلوب‌تری را در طول مدت ۶ ماه نشان داده است.

پتانسیل زتا به‌عنوان معیاری از بار سطحی ذرات شناخته‌شده و در میکرومولسیون‌ها بیشتر به طبیعت شیمیایی و گروه‌های عاملی اجزای سازنده بستگی دارد. پتانسیل زتا در تعیین برهمکنش‌های میان اجزای میکرومولسیون حایز اهمیت است. حضور سورفکتانت‌های غیر یونی و آنیونی بار سطح ذرات را در نمونه منفی و وجود سورفکتانت‌های کاتیونی آن را مثبت می‌نماید. حضور گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربوکسیل در ساختار اجزای سازنده نیز موجب ایجاد بار منفی در سطح ذرات می‌شود. بنابراین حضور سورفکتانت‌های غیر یونی توین ۸۰ و اسپن ۸۰ با گروه‌های عاملی هیدروکسیل و الکترون‌گاتیویته بالای اتم اکسیژن در ساختار این گروه‌های عاملی در ایجاد بار منفی سطح ذرات میکرومولسیون‌های تأثیرگذار بوده است. مقادیر بالای پتانسیل زتا نشانگر شکل‌گیری میکرومولسیون در ساختار مایسل مستقیم (روغن در آب) و مقادیر پایین آن حاکی از شکل‌گیری میکرومولسیون در ساختار مایسل معکوس (آب در روغن) می‌باشد.^{۱۵} بر اساس نتایج مقادیر به‌نسبت بالای پتانسیل زتا حاکی از شکل‌گیری میکرومولسیون روغن در آب می‌باشد.

شاخص شکست نور مبین میزان شفافیت نمونه‌ها بوده و در

اندازه نانومتری با توزیع یکنواخت و در واقع شرایط مناسب برای جذب و اثربخشی درمانی مطلوب را نشان داد. بررسی کارایی درون تن نمونه میکروامولسیون با بیشینه‌ی درصد روغن و پایداری بیشتر نشانگر کاهش سطح فیبرینوژن و فاکتور هفت در خرگوش‌های دریافت‌کننده رژیم پرکلسترویل به همراه میکروامولسیون حاوی روغن کنجد در مقایسه با دو گروه دریافت‌کننده رژیم پایه و رژیم پرکلسترویل بود.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تهیه و تعیین خصوصیات میکروامولسیون حاوی عصاره گیاهی روغن کنجد و عسل" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ و کد ۳۳۰۳۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی مشهد اجرا شده است.

می‌باشد، تأثیر درمانی این نانودارو در کاهش سطح این ترکیبات و کاهش خطر آترواسکلروز بسیار چشمگیر می‌باشد. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده با پژوهش‌های پیشین حاکی از آن است که اثر درمانی میکروامولسیون حاوی روغن کنجد در کاهش سطح فیبرینوژن در پژوهش کنونی بیشتر از مطالعات مربوط به کرفس کوهی و حتی آسپرین بوده است. قرارگیری روغن کنجد در ساختار میکروامولسیون به جهت بهبود حلالیت آن، میانگین اندازه ذرات نانومتری و توانایی اثربخشی بهتر می‌تواند حتی در کنار رژیم پرکلسترویل موجب کاهش میزان فیبرینوژن و فاکتور هفت در مقایسه با گروه اول و دوم شده و در کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی مؤثر باشد. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه حاکی از شکل‌گیری موفق میکروامولسیون روغن در آب بوده و نتایج اندازه ذرات، میانگین

References

- Gensini GF, Comeglio M, Colcila A. Hemostatic factors, atherogenesis and atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* 1996;50(8):395-405.
- Bialecka M. The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits. *Ann Acad Med Stetin* 1997;43:41-56.
- Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S. Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytother Res* 2001;15(7):608-12.
- Utermann G. The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 1989;246(4932):904-10.
- Podolsky DK, Isselbacher KJ. Derangements of hepatic metabolism. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdor RG, Martin JB, et al, editors. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 14th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1998. P. 1667-72.
- Miche E, Baller D, Gleichmann U, Mannebach H, Schmidt H, Prohaska W. Fibrinogen and leukocyte number in coronary heart disease. Correlation with angiography and clinical degree. *Z Kardiol* 1995;84(2):92-7.
- Ernst E. Plasma fibrinogen: an independent cardiovascular risk factor. *J Intern Med* 1990;227(6):365-72.
- Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118(12):956-63.
- McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012;8(6):1719-29.
- Golmohammadzadeh S, Farhadian N, Biriace A, Dehghani F, Khameneh B. Preparation, characterization and in vitro evaluation of microemulsion of raloxifene hydrochloride. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(10):1619-1625.
- Dehghani F, Farhadian N, Golmohammadzadeh S, Biriace A, Ebrahimi M, Karimi M. Preparation, characterization and in-vivo evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. *Eur J Pharm Sci* 2017;96:479-89.
- Narang AS, Delmarre D, Gao D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm* 2007;345(1-2):9-25.
- Syed HK, Peh KK. Identification of phases of various oil, surfactant/co-surfactants and water system by ternary phase diagram. *Acta Pol Pharm* 2014;71(2):301-9.
- The HLB System: A Time-Saving Guide to Emulsion Selection. 2nd ed.: Wilmington, NC: ICI Americas, Inc.; 1984.
- Ebrahimi M, Dehghani F, Farhadian N, Karimi M, Golmohammadzadeh S. Investigating the anti-apoptotic effect of sesame oil and honey in a novel nanostructure form for treatment of heart failure. *Nanomed J* 2017;4(4): 245-53.
- Okonogi S, Saeio K, Chaiyana W, Yotwimonwat S, Niwatananan W. Encapsulation of sesame oil by microemulsion technique: Study of phase diagram. XVII International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands, 2009.
- Waman N, Ajage R, Kendre P, Kasture S, Kasture V. Improve release oral drug delivery of metaxalone. *Int J Pharm* 2014;4(1):417-24.
- Gibaud S, Attivi D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. *Expert Opin Drug Deliv* 2012;9(8):937-51.
- Atashafrooz Z, Maleki Dizaj S, Salehi Sadaghiani A. Cucurbita pepo oil as a drug microemulsion formulation: study of phase diagram. *Nanomed J* 2014; 1(5):298-301.
- Dizaj SM. Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. *J Nanostructure Chem* 2013;3(1):1-6, 2013.
- Silva KG, Santiago RR, Barratt G, Egito S. Phase behavior and physicochemical aspects of sesame oil containing microemulsion systems. *Eur Cells Mater* 2010;20(3):241.
- Trivedi HJ, Thakur RS, Ray S, Patel KR. Design and evaluation of piroxicam microemulsion. *Int J Pharm Res Sch* 2012;1(2):166-77.

Preparation, characterization and evaluation the effects of microemulsion containing sesame oil on fibrinogen and factor VII level in animal model

Mahmoud Ebrahimi M.D.¹
Mohammad Karimi M.D.²
Faranak Dehghani Ph.D.
Student³
Amir Biriaei M.Sc.³
Nafiseh Farhadian Ph.D.^{3*}
Shiva Golmohammadzadeh
M.D.⁴

1- Cardiovascular Research Center,
Faculty of Medicine, Mashhad
University of Medical Sciences,
Mashhad, Iran.

2- Department of Emergency
Medicine, Faculty of Medicine,
Ahvaz Jundishapur University of
Medical Sciences, Ahvaz, Iran;
Cardiovascular Research Center,
Mashhad University of Medical
Sciences, Mashhad, Iran.

3- Department of Chemical
Engineering, Faculty of
Engineering, Ferdowsi University
of Mashhad, Mashhad, Iran.

4- Faculty of Pharmacy, Mashhad
University of Medical Sciences,
Mashhad, Iran.

* Corresponding author: Faculty of
Engineering, Ferdowsi University of
Mashhad, Azadi Sq., Mashhad, Iran.
Tel: +98 5138805140
E-mail: n.farhadian@um.ac.ir

Abstract

Received: 07 Dec. 2018 Revised: 14 Dec. 2018 Accepted: 11 Jun. 2019 Available online: 21 Jun. 2019

Background: Sesame oil can be used to treat cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, by reducing the levels of fibrinogen and factor VII. The aim of this study is to prepare a microemulsion containing sesame oil as a drug nanocarrier for improving the aqueous solubility and therapeutic effects of this vegetable oil on the reduction of the fibrinogen and factor VII levels in animal model.

Methods: This experimental study was performed for microemulsion preparation and animal test at Ferdowsi University of Mashhad and Cardiovascular Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, respectively, from April 2015 to January 2017. To prepare the microemulsion samples, Tween 80 and span 80 were selected as surfactant couple and surfactant ratios of 8:1, 9:1 and 10:1 were determined for construction of pseudo-ternary phase diagrams. The Zealand white rabbits were categorized in three groups: receiver of base diet group, high cholesterol diet and high cholesterol diet plus microemulsion.

Results: The average particle size of the samples was in the range of 16.64 ± 0.1 to 21.16 ± 0.2 nm with a uniform particle size distribution. Zeta potential was in the range of -10.7 to 18.4 mV, refraction index was approximately 1.39. Electrical conductivity coefficient was in the range of 297 to 311 μS and pH of all the samples were approximately 6.42 for all samples. All of the microemulsion samples were physically stable and the prepared sample with 9:1 surfactant ratio was selected to investigate the animal test due to the higher oil percentage in comparison with the other samples that be stable over 6 months. Significant decrease in the levels of fibrinogen and factor VII in the third group of rabbits was observed compared to the other groups.

Conclusion: The results of this study showed the effective performance of nanostructured drug delivery systems in the form of microemulsion to improve the aqueous solubility and therapeutic effects of hydrophobic compounds such as vegetable oils.

Keywords: animal models, atherosclerosis, cardiovascular diseases, experimental studies, factor VII, fibrinogen, sesame oil, surface-active agents.