



Synthesis and Characterization of Two Sustained Release Systems of Micro- and Nano-sized Particles for Controlled Release of Atorvastatin for Bone Tissue Engineering Applications

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Nejati S.¹ BSc,
Imani R.^{*2} PhD,
Sharifi A.M.³ PhD

How to cite this article

Nejati S, Imani R, Sharifi A.M. Synthesis and Characterization of Two Sustained Release Systems of Micro- and Nano-sized Particles for Controlled Release of Atorvastatin for Bone Tissue Engineering Applications. Pathobiology Research. 2019;22(3): 113-120.

¹Biomaterial Department, Biomedical Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

²Tissue Engineering Department, Biomedical Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

³Razi Drug Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Amirkabir University of Technology, NO 350, Hafex Street, Valiasr Square, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 64545676
Fax: +98 (21) 66468186
r.imani@aut.ac.ir

Article History

Received: May 14, 2018

Accepted: March 14, 2019

ePublished: August 21, 2019

ABSTRACT

Aims Using osteoinductive agents in combination with tissue engineering scaffolds is considered as a new approach to bone repair. Recently, statins have attracted great attention among a variety of drugs used in bone repair. In order to achieve a sustained release of Atorvastatin from bone scaffolds, two systems, including nanoniosomes and gelatin microspheres, were synthesized and compared.

Materials and Methods Nanoniosomes and gelatin microspheres were prepared by thin-film hydration and single emulsion technique, respectively.

Findings The prepared systems were characterized for morphology, size, carriers' preparation efficiency, encapsulation efficiency, and drug loading. Also, release profiles of them were evaluated over a period of one week. The results indicated the formation of relatively spherical niosomes with the diameter of about 653.52nm and encapsulation efficiency of 81.34%, and formation of gelatin microspheres with the diameter of about 37.5µm and the encapsulation efficiency of 78.93%.

Conclusion The results showed that gelatin microspheres had a lower burst release than niosomes, and niosomes had more sustained release than gelatin microspheres after 24hr to 1 week. Albeit, selection of the optimal system requires cellular studies and also the selection must occur according to the severity of the damage and the rate of repair.

Keywords Atorvastatin; Drug Delivery System; Osteogenesis; Niosome; Gelatin Microsphere

CITATION LINKS

[1] Small molecules and their controlled release that induce the osteogenic/chondrogenic commitment of stem ... [2] Statins and bone ... [3] Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive ... [4] The role of statins as potential targets for bone ... [5] Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: Two sides of the same ... [6] Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial ... [7] Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem ... [8] Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat ... [9] Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin ... [10] Development of an injectable two-phase drug delivery system for sequential release of antiresorptive and osteogenic ... [11] Spectroscopic method for estimation of atorvastatin calcium in tablet dosage ... [12] Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid-effect of cross-linking on drug ... [13] Incorporation of growth factor loaded microspheres into polymeric electrospun nanofibers for tissue engineering ... [14] Biodegradable gelatin microspheres as controlled release intraarticular delivery system: The effect of formulation ... [15] The effects of polymeric nanostructure shape on drug ... [16] Fundamentals of pharmaceutical ... [17] Alkyl glucopyranoside-based niosomes containing methotrexate for pharmaceutical applications: evaluation of physico-chemical and biological ... [18] Effect of statins with α-tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp ... [19] Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium ... [20] Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy ... [21] Controlled release of simvastatin-loaded thermosensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: in vitro and in vivo ... [22] The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and ... [23] Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system

ساخت و مشخصه‌یابی دو سامانه پیوسته رهایش نانو و میکروذره‌ای به منظور رهایش کنترل شده داروی آنتورواستاتین برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

سارا نجاتی BSc

گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

رعنا ایمانی PhD*

گروه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

علی محمد شریفی PhD

مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: استفاده از داروها در القای استخوان‌زایی به همراه داربست‌های مهندسی بافت، به عنوان رویکردی نوین در ترمیم استخوان آسیب‌دیده بسیار مورد توجه است. اخیراً در میان انواع داروهای حوزه ترمیم استخوان، استاتین‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش، به منظور دستیابی به رهایش کنترل شده برای داروی آنتورواستاتین، دو سامانه پیوسته رهایش شامل نانونیوزوم‌ها و میکروکرات ژلاتین ساخته و مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها: نانونیوزوم‌ها به روش هیدراسیون فیلم نازک و میکروکرات ژلاتین با روش تشکیل امولسیون سنتز شدند.

یافته‌ها: مورفولوژی، اندازه و توزیع ابعاد، بازدهی تهیه حامل‌ها، بازده و درصد بارگذاری دارو و در نهایت پروفیل رهایش دارو از آنها در طول یک هفته ارزیابی شد. نتایج حاکی از تشکیل نیوزوم‌های نسبتاً کروی با میانگین ابعاد $603/02$ نانومتر و بازده بارگذاری $81/34\%$ و تشکیل میکروکرات ژلاتین با میانگین ابعاد $37/0$ میکرومتر و بازده بارگذاری $78/93\%$ بود.

نتیجه‌گیری: پروفیل رهایش دارو از حامل‌ها نشان داد که سامانه ژلاتینی رهایش انفجاری کمتری نسبت به نیوزوم دارد و نیوزوم‌ها از پایان روز اول رهایش آهسته‌تری نسبت به ژلاتین فراهم نموده است. اگرچه انتخاب یکی از دو سامانه به عنوان سامانه بهینه، نیازمند مطالعات سلولی روی آنها بوده و انتخاب بر مبنای پروفیل رهایش متناسب با شدت آسیب و سرعت ترمیم است.

کلیدواژه‌ها: آنتورواستاتین، سامانه انتقال دارو، استخوان‌سازی، نیوزوم، میکروکرات ژلاتین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۳

*نویسنده مسئول: r.imani@aut.ac.ir

مقدمه

استخوان ارگانی است که نقش مهمی در عملکردهای حیاتی و فیزیولوژیکی انسان شامل حرکت، محافظت و حمایت ساختاری از ارگان‌های دیگر، تولید خون، تنظیم pH خون و مخزن سلول‌های پیش‌ساز دارد. با در نظر گرفتن این عملکردها، می‌توان به ضرورت یافتن راهی برای ترمیم یا جایگزینی این بافت پی برد. با پیشرفت علم و فناوری، روش‌های متداولی مانند پیوند آتوگرفت، آلوگرفت و زونگرفت به دلایلی از قبیل کمبود منابع استخوان، تهاجمی بودن روش برداشت از بافت میزبان، احتمال انتقال بیماری‌ها، تحریک سیستم ایمنی و امکان رد استخوان پیوندی، به چالش کشیده شده‌اند. راه حل اساسی دیگر به منظور رفع نقایص استخوانی، استفاده از مهندسی بافت استخوان است. هدف مهندسی بافت، طراحی و ساخت بافت به شیوه‌های مهندسی و ترمیم بافت است. با الهام گرفتن از مکانیزم‌های فیزیولوژیکی که در ترمیم طبیعی نقص استخوان اتفاق می‌افتد، می‌توان دریافت که ترکیب کردن زیست‌مواد و فاکتورهای القای استخوان یک استراتژی قابل قبول و بسیار قدرتمند برای بازسازی استخوان است. عوامل بازسازی

به عنوان یک نوع واسطه بیولوژیکی نقش بسیار کلیدی در این فرآیند دارند. نتایج به دست آمده از کاربرد این عوامل در کارهای تجربی و بالینی تا به امروز، بسیار امیدبخش بوده است. این عوامل برای هدف‌های گوناگونی مانند چسبندگی سلولی، تمایز استخوانی و رگ‌زایی استفاده می‌شوند، پس انتخاب آنها و ترکیب آنها با هم که استراتژی بسیار مفید و روبه‌رشدی است، به هدف نهایی ما بستگی دارد. مهم‌ترین قسمت این فرآیند دانش بازسازی طبیعی استخوان، انواع عوامل دخیل در آن و در نهایت شبیه‌سازی آن است. قدم بعدی در شبیه‌سازی درک درست از ویژگی‌های ساختاری و عملکردی فاکتورها است و این که در چه حالتی همیشه فعال خواهند بود و بیشترین تاثیر را در فرآیند می‌گذارند. پس انتخاب مناسب نوع فاکتور بازسازی و سیستم رهایش آن، ما را به مقصد نهایی یعنی ایجاد بافت استخوان نزدیک‌تر خواهد کرد. اخیراً در میان انواع ریزمولکول‌های مورد توجه در حوزه ترمیم بافت استخوان، استاتین‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند^[1]. استاتین‌ها گروهی از داروهای کاهنده کلسترول خون هستند که با مهار آنزیم کاهنده اچ‌ام‌جی‌کوآ (HMG CoA) عمل می‌کنند و معمولاً در پیشگیری از بروز بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از افزایش چربی خون استفاده می‌شوند که اخیراً این دسته دارویی در اورتوپدی مورد توجه قرار گرفته و اثرات جدید آن بر ترمیم استخوان در حال آزمون است^[2,3].

اولین بار ماندی و همکاران در یک مطالعه تجربی گزارش کردند که استاتین‌ها با افزایش BMP-2، باعث افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها شده و از این طریق حجم استخوان را افزایش می‌دهند. در این مطالعه حجم استخوان ترابکولار در نمونه‌های رت‌هایی که تخمدان آنها برداشته شده و به مدت 35 روز، روزانه سیمواستاتین با دوز 5 تا 10 میلی‌گرم دریافت کرده بودند، افزایش یافته بود^[4]. مطالعات زیادی برای اثبات تاثیر کاربرد موضعی استاتین‌ها بر تقویت استخوان در نمونه‌های حیوانی انجام شده است. در زمینه ترکیبات استاتین و متابولیزم استخوان، چند مکانیزم مورد توجه است. این ترکیبات با افزایش فعالیت استئوبلاست که توسط BMP-2 اعمال می‌شود، سبب تحریک استخوان‌سازی می‌شوند. اثر دیگر استاتین‌ها مهار آنزیم هیدروکسی‌متیل‌گلوکوتاریل کوآنزیم A- ردوکتاز و جلوگیری از سنتز مولونات است که سبب اختلال فعالیت استئوکلاست‌ها و افزایش آپوپتوز آنها می‌شود و سرانجام از افزایش بازجذب استخوانی جلوگیری می‌کند. سومین تاثیر ترکیبات استاتین اثر ضدالتهابی آنها است که در هنگام شکل‌گیری نقیصه استخوانی در استخوان درگیر و بافت‌های مجاور، التهاب شدیدی ایجاد می‌شود که این اثر استاتین‌ها نیز می‌تواند به ترمیم استخوان کمک نماید^[5]. استاتین‌ها همچنین موجب بهبود رگ‌زایی و عملکرد سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌شوند^[6].

پولیسار و همکاران در پژوهشی، سیمواستاتین را درون هیدروژلی از جنس آلزینات بارگذاری کرده و اثر آن را بر تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسانی موجود در داربست تیتانیوم اکساید پوشانده شده توسط هیدروژل آلزینات حاوی سیمواستاتین مورد بررسی قرار دادند و با کمی‌کردن بیان RNA پیام‌رسان ژن‌های مربوط به استئوبلاست، از جمله کلاژن نوع ۱، آلکالین فسفاتاز، استئوپوننتین، استئوکالکسین و فاکتور رشد اندوتلیال رگی، نشان دادند بیان این فاکتورها در سلول‌های کشت داده شده روی داربست دارای سیمواستاتین بیشتر از داربست فاقد سیمواستاتین است. به علاوه ترشح پروتئین‌هایی چون

به‌منظور بررسی مورفولوژی نیوزوم‌ها و کسب اطمینان از کروی بودن نسبی آنها، و همچنین تخمین میانگین قطر ذرات و مشاهده چگونگی توزیع اندازه ذرات، تصاویر نیوزوم‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شد. به‌منظور آماده‌سازی نمونه برای این آزمون، سوسپانسیون تهیه‌شده به‌منظور خشک‌شدن به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت. سپس به‌منظور بررسی اشکال نیوزوم‌ها، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) تحت آنالیز قرار گرفت و برای به‌دست‌آوردن اندازه نانوذرات نیوزومی و توزیع اندازه آنها از روش پراکندگی دینامیکی نور استفاده شد.

برای بررسی رهایش در محیط برون‌تنی ابتدا سوسپانسیون حاوی نیوزوم به‌مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰rpm قرار گرفت تا نیوزوم‌ها ته‌نشین شده و داروی بارگذاری‌نشده خارج شود. سپس نیوزوم‌ها شسته و بافر نمکی فسفات به آن اضافه شد. این سوسپانسیون به درون کیسه دیالیز (MWCO ۱۲ کیلودالتون) منتقل شد، سپس کیسه دیالیز درون بشری محتوی ۹۰ میلی‌لیتر PBS قرار گرفت و بشر روی هیت-ر استیرر در دمای ۳۷°C و تحت ورتکسی آرام به‌منظور همگن‌سازی قرار گرفت. نمونه‌برداری از بافر درون بشر در ساعات ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ و ۱۶۸ انجام شد و هر بار پس از نمونه‌برداری به اندازه نمونه برداشته‌شده (۲ میلی‌لیتر)، PBS به بشر اضافه شد. برای اندازه‌گیری میزان آتورواستاتین آزادشده در ساعات مختلف، میزان جذب نمونه‌ها به کمک دستگاه طیف‌سنج مری-فرابنفش تحت طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد جذب-غلظت، غلظت دارو در بافر و مقدار داروی آزادشده تا آن زمان محاسبه شد و برای مشاهده کینتیک رهایش دارو، نمودار درصد رهایش بر حسب زمان رسم شد.

میکروکرات ژلاتین از طریق فرآیند تشکیل امولسیون تهیه شد [10]. ۱/۸ گرم ژلاتین نوع I، آرام آرام به ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر در دمای ۵۰°C روی استیرر اضافه شد تا محلول آبی ۱۵ wt% ژلاتین تهیه شود. محلول تهیه‌شده، به کمک سرنگ، قطره قطره به ۶۰ میلی‌لیتر روغن در دمای ۵۰°C اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی استیرر با دور ۴۰۰۰rpm هم‌زده شد تا میکروکرات ژلاتین تشکیل شوند. سپس با قراردادن امولسیون تهیه‌شده در حمام یخ، دمای آن به ۱۵°C کاهش یافت. به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات به امولسیون خنک‌شده اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی هم‌زده شد. به‌منظور خارج‌کردن روغن، امولسیون توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار، دو مرتبه، هر بار به‌مدت ۴ دقیقه و با دور ۳۵۰۰rpm و در دمای ۵°C سانتریفیوژ و هر بار روغن بالاآمده خارج شد. برای کراس‌لینک‌شدن، میکروکرات ژلاتین به‌مدت ۲ ساعت در محلول گلوآل‌آلدهید ۱۵ میلی‌مولار تحت همزن قرار گرفت. سپس میکروکرات کراس‌لینک‌شده دو مرتبه با استفاده از استون و دو مرتبه با استفاده از آب دوبار تقطیر، هر بار به‌مدت ۴ دقیقه، در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۴۰۰۰rpm و در دمای ۵°C سانتریفیوژ شد تا گلوآل‌آلدهید و روغن باقی‌مانده شسته شود. به‌دلیل سمیت بالای گلوآل‌آلدهید، بلاک‌کردن گروه‌های آلدهیدی واکنش‌نده و شسته‌نشده ضروری است. با قراردادن میکروکرات در محلول گلیسین ۵۰ میلی‌مولار به‌مدت ۲ ساعت، گروه‌های آلدهیدی آزاد باقی‌مانده بلاک شدند. بعد از آن، میکروکرات دو مرتبه با آب مقطر شست‌وشو داده شدند.

پس از سنتز میکروکرات ژلاتین، ۸۷/۲ میلی‌گرم از میکروکرات به‌منظور بارگذاری دارو در آنها، به‌مدت ۱۵ ساعت در ۳ میلی‌لیتر

استئوپروتگرین، فاکتور رشد اندوتلیال رگی، استئوپونتین و استئوکلسین در محیط کشت سلول‌ها در حضور سیموآستاتین بیشتر از حالت عدم حضور سیموآستاتین بود. در نتیجه داربست تیتانیم اکساید پوشیده‌شده توسط هیدروژل آلزینات حاوی داروی سیموآستاتین، موجب تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی در محیط برون‌تن شد [7].

فریبر و همکاران در مطالعه‌ای تاثیر سیموآستاتین بارگذاری‌شده در میکروکرات PLGA را روی ترمیم نقص ایجادشده در استخوان جمجمه رت ارزیابی کرده و نشان دادند سیموآستاتین موجب بهبود و تسریع روند ترمیم می‌شود. آنها نقیصه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در استخوان جمجمه رت ایجاد کرده، سپس آنها را توسط غشایی از PLGA یا غشای PLGA حاوی میکروکرات PLGA بارگذاشته‌شده توسط سیموآستاتین، پوشاندند و بعد از 60 روز، نقایص را مورد ارزیابی قرار دادند. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نقایص در حضور غشا به همراه سیموآستاتین، تقریباً به‌طور کامل التیام یافت در حالی که در گروه شامل غشای فاقد سیموآستاتین و گروه کنترل، تشکیل استخوان کمتری دیده می‌شود [8].

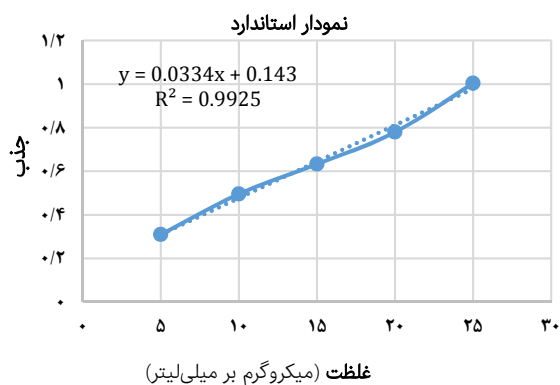
مطالعات انجام‌شده در زمینه تاثیر داروهای گروه استاتین بر روند ترمیم استخوان، نشان‌دهنده تحریک تشکیل استخوان و القای استخوان‌سازی توسط اعضای این خانواده است؛ اما در مورد داروی آتورواستاتین مطالعات بسیار کمی صورت گرفته است، ضمن این که تاثیر رهایش کنترل‌شده این دارو بر روند استخوان‌زایی مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین در این پژوهش سعی شد با گنجاندن دارو در سامانه‌های رهایش دارو، علاوه بر کنترل نرخ رهایش دارو و در دسترس قرارگیری دارو در محل ضایعه، بازدهی دارو و زیست‌دسترس‌پذیری آن را ارتقا بخشید و همچنین از اثرات جانبی مانند سمیت اجتناب نمود.

هدف از این پژوهش ساخت و مشخصه‌یابی دو سامانه پیوسته رهش نانو و میکروذره‌ای شامل نانو نیوزوم‌ها و میکروکرات ژلاتین به‌منظور رهایش کنترل‌شده داروی آتورواستاتین، به‌عنوان یکی از اعضای خانواده استاتین‌ها، برای کاربرد در داربست استخوانی و به‌منظور القای استخوان‌زایی است که در ادامه روش ساخت این سامانه‌ها و مشخصه‌یابی‌های صورت‌گرفته شرح داده شده است.

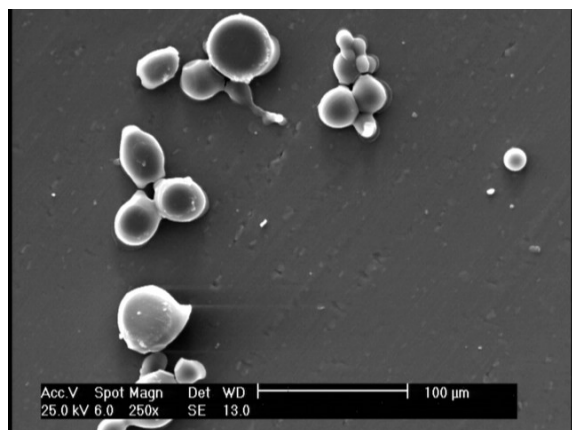
مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر داروی آتورواستاتین کلسیم (سبحان‌دارو؛ تهران؛ ایران)، سورفکتانت سوربیتان‌مونوآستارت (اسپن ۶۰)، کلسترول (سیگما؛ آلمان)، ژلاتین، متانول، اتانول، گلوآل‌آلدهید و استون (مرک؛ آلمان) تهیه شدند. بافر PBS شامل آب دی‌یونیزه و ۱۳۷ میلی‌مولار سدیم‌کلرید، ۲/۷ میلی‌مولار پتاسیم‌کلرید، ۱۰ میلی‌مولار دی‌سدیم‌فسفات و ۱/۸ میلی‌مولار مونوپتاسیم‌فسفات در آزمایشگاه سنتز شد.

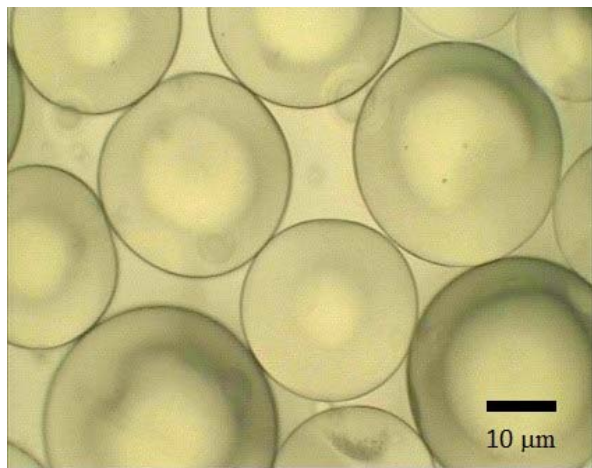
در پژوهش حاضر، روش هیدراسیون فیلم نازک به‌منظور سنتز حامل نیوزومی به کار رفت [9]. ابتدا سورفکتانت و کلسترول با نسبت ۳ به ۲ در ۱۵ میلی‌لیتر اتانول حل شدند. داروی آتورواستاتین به مقدار مساوی با سورفکتانت در یک میلی‌لیتر متانول حل و به محلول فوق اضافه شد، سپس با دستگاه روتاری اوپراتور (هیدولف؛ آلمان) در دمای ۵۰°C و دور همزن ۱۵۰rpm، حلال آلی تبخیر شد. در مرحله بعد به فیلم باقی‌مانده در کف بالن، ۳۰ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات برای هیدراسیون اضافه شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت ورتکس قرار گرفت و سپس ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور سونیکه شد.



نمودار (۱) نمودار استاندارد جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر نسبت به غلظت‌های مختلف داروی آتروواستاتین



شکل (۱) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی میکروکرات ژلاتین



شکل (۲) تصویر میکروکرات ژلاتین سنتز شده در این پژوهش، گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری

بازدهی تهیه سامانه و همچنین بازدهی بارگذاری دارو در سامانه از پارامترهای بسیار مهم در موفقیت سنتز سامانه‌های میکروذره‌ای حاوی دارو به‌منظور انتقال دارو است.

پارامترهای بازدهی تهیه میکروکرات و بازدهی و درصد بارگذاری دارو درون میکروکرات محاسبه و به‌ترتیب در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ گزارش شده است. بازده و درصد بارگذاری به‌دست‌آمده با توجه به مقادیر گزارش شده در مقالات در مورد داروی آب‌گریز، معقول است و بازده تهیه میکروکرات با توجه به شست‌وشوهای مکرر در مراحل

محلول ۴/۵ میلی‌مولار، حاوی ۷/۵ میلی‌گرم آتروواستاتین، در دمای ۴°C قرار گرفت و با دور آرام روی همزن مغناطیسی هم خورد. مقداری از میکروکرات ژلاتین روی فویل ریخته و در داخل یخچال خشک شد، سپس به‌منظور بررسی اشکال میکروکرات، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) تحت آنالیز قرار گرفت.

به‌منظور بررسی رهایش آتروواستاتین در محیط برون‌تن، پس از خارج‌کردن سوپرناتانت حاوی داروی آزاد، میکروکرات بارگذاری شده با دارو، به همراه ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات درون کیسه دیالیز منتقل شد، سپس کیسه دیالیز درون بشر حاوی ۲۳۰ میلی‌لیتر PBS قرار گرفت، مجموعه روی هیتر- استیرر در دمای ۳۷°C و تحت ورنکسی آرام برای همگن‌سازی قرار گرفت. نمونه‌برداری از بافر درون بشر در ساعات ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ و ۱۶۸ انجام شد و هر بار به اندازه نمونه برداشته شده، PBS به بشر اضافه شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان آتروواستاتین آزاد شده در ساعات مختلف، میزان جذب نمونه‌ها به کمک دستگاه طیف‌سنج مری-فرابنفش خوانده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد جذب-غلظت، غلظت دارو در بافر محاسبه شد و با ضرب این غلظت در حجم بافر، مقدار داروی آزاد شده تا آن زمان محاسبه می‌شود. برای مشاهده کینتیک رهایش دارو، نمودار درصد رهایش برحسب زمان رسم شد. پارامترهای بازده بارگذاری و درصد بارگذاری دارو در حامل‌ها و نیز بازدهی تهیه حامل‌ها به‌ترتیب با استفاده از روابط ۱، ۲ و ۳ محاسبه شدند^[۹].

(۱)

$$EE\% = \frac{WT - WF}{WT} \times 100$$

(۲)

$$DL\% = \frac{WD}{WC} \times 100$$

(۳)

$$Recovery\% = \frac{WC}{WI} \times 100$$

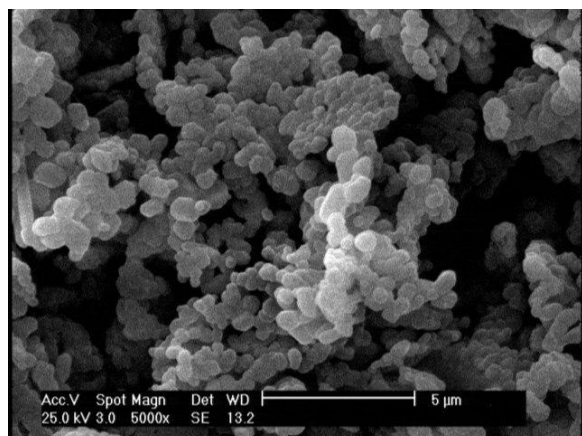
که EE= بازده بارگذاری، WT= وزن داروی استفاده شده، WF= وزن داروی آزاد، DL= درصد بارگذاری، WD= وزن داروی بارگذاری شده، WC= وزن حامل، WI= وزن مواد اولیه استفاده شده هستند.

یافته‌ها و بحث

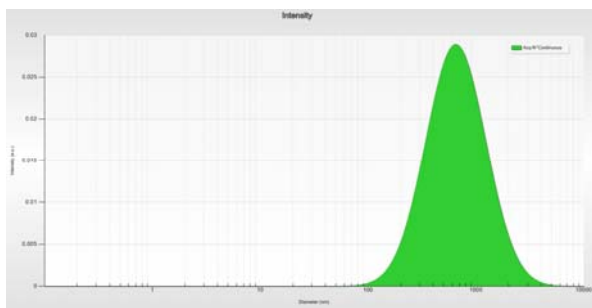
نمودار استاندارد جذب- غلظت آتروواستاتین تحت طول موج تابش ۲۴۰ نانومتر مطابق منحنی ارایه شده در نمودار ۱ و با تقریب بسیار خوبی خطی به دست آمد. معادله خطی برازش شده به این داده‌ها، برای تخمین غلظت دارو در نمونه‌های مجهول در طول موج مشابه مورد استفاده قرار گرفت^[۱۱].

تصاویر تهیه شده از حامل‌های ژلاتینی توسط میکروسکوپ الکترونی حاکی از تشکیل میکروذراتی کروی با توزیع ابعاد مناسب هستند (شکل ۱). میانگین قطر میکروکرات، به کمک نرم‌افزار آنالیز ابعادی [Image J، ۳۷/۵ میکرومتر با انحراف معیار ۵/۹ محاسبه شد که نسبت به سایر مطالعات انجام شده در حوزه ساخت میکروذرات ژلاتین به‌عنوان حامل دارو بسیار کوچک‌تر است، به‌علاوه تصاویر به‌دست‌آمده از میکروکرات ژلاتین توسط میکروسکوپ نوری، نشان‌دهنده تشکیل میکروکراتی کروی با توزیع ابعادی بسیار یکنواخت است (شکل ۲)^[۱۲].

درون نیوزوم‌ها محاسبه و به‌ترتیب در جدول‌های ۴، ۵ و ۶ گزارش شده است که نسبت به سایر مطالعات انجام‌شده در حوزه ساخت نانونیوزوم‌ها به‌عنوان حامل دارو منطقی و قابل قبول است [16-18].



شکل (۳) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیوزوم‌ها



نمودار (۳) نمودار اندازه و پراکندگی نانونیوزوم‌های حاوی آتورواستاتین

جدول (۴) بازده تهیه نیوزوم‌ها

بازده (%)	مقدار نیوزوم (میلی‌گرم)	مقدار دارو (میلی‌گرم)	مقدار کلسترول (میلی‌گرم)	مقدار اسپن ۶۰ (میلی‌گرم)
۹۲/۸۱	۱۴۸/۵	۶۰	۴۰	۶۰

جدول (۵) بازده بارگذاری آتورواستاتین در نیوزوم

بازدهی بارگذاری (%)	مقدار داروی سوسپانسیون (میلی‌گرم)	مقدار داروی بارگذاری‌نشده (میلی‌گرم)
۸۱/۳۴	۱۱/۱۹۵	۶۰

جدول (۶) درصد بارگذاری آتورواستاتین درون نیوزوم‌ها

درصد بارگذاری (%)	مقدار نیوزوم‌ها (میلی‌گرم)	مقدار داروی بارگذاری‌شده (میلی‌گرم)
۴۵/۱۸	۱۰۸	۴۸/۸

همان‌طور که در پروفیل رهایش دارو از حامل نیوزومی مشاهده می‌شود (نمودار ۴)، در یک هفته کمتر از ۳۵٪ دارو رهایش یافته است، به‌طوری‌که در ۲۴ ساعت اول، حدود ۲۵٪ دارو و از پایان روز اول تا پایان روز هفتم، کمتر از ۱۰٪ دارو آزاد شد. به بیان دیگر، در یک روز اول شاهد رهایش انفجاری دارو و بعد از آن، تا روز هفتم شاهد رهایش آهسته و پایدار دارو هستیم. لازم به ذکر است که شرایط سینک رعایت شده و آهسته‌شدن رهایش دارو پس از یک روز، به‌دلیل رسیدن غلظت دارو به حد اشباع در PBS نیست.

مختلف، منطقی و قابل قبول است [13, 14].

همان‌طور که در پروفیل رهایش دارو از میکروکرات ژلاتین مشاهده می‌شود (نمودار ۲)، در پایان یک هفته، حدوداً ۵۲٪ کل داروی بارگذاری‌شده در میکروکرات، از آنها رهایش یافت. به‌گونه‌ای که در یک روز اول شاهد رهایش نسبتاً انفجاری حدود ۱/۰۶۵ میلی‌گرم و به عبارت بهتر ۱۸٪ دارو هستیم و از روز اول تا پایان روز هفتم، شاهد رهایش پایدار حدود ۳۵-۳۰٪ دارو با نرخ ملایم‌تر ۰/۲۹۶ میلی‌گرم بر روز هستیم.

جدول (۱) بازده تهیه میکروکرات ژلاتین

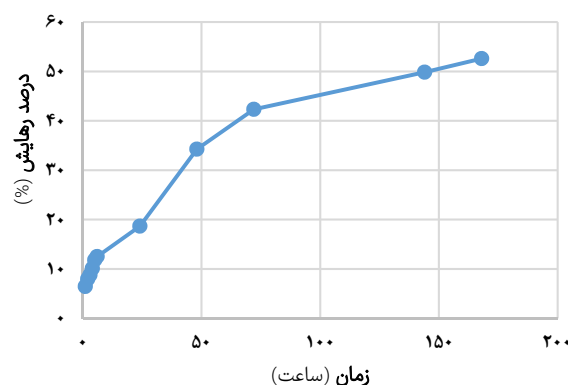
مقدار ژلاتین اولیه (گرم)	مقدار میکروکرات حاصله (گرم)	بازده (%)
۱/۸	۱/۲۳	۶۸/۳۳

جدول (۲) بازدهی بارگذاری آتورواستاتین در میکروکرات ژلاتین

مقدار کل داروی موجود در سوسپانسیون (میلی‌گرم)	مقدار داروی بارگذاری‌نشده (میلی‌گرم)	بازدهی بارگذاری (%)
۷/۵	۱/۵۸	۷۸/۹۳

جدول (۳) درصد بارگذاری آتورواستاتین درون میکروکرات ژلاتین

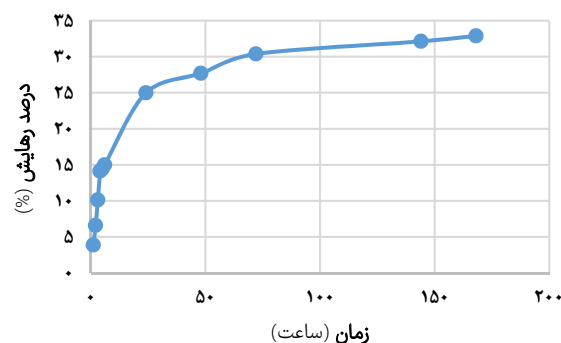
مقدار میکروکرات ژلاتین (میلی‌گرم)	مقدار داروی بارگذاری‌شده (میلی‌گرم)	درصد بارگذاری (%)
۸۷/۲	۵/۹۱۹	۶/۷۹



نمودار (۲) نمودار درصد رهایش تجمعی داروی آتورواستاتین از میکروکرات ژلاتین در محیط بافر فسفات

در مورد حامل نیوزومی، پس از خشک‌کردن نمونه سنتز شده توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی، شکل، اندازه تقریبی و مورفولوژی سطح نیوزوم‌ها با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، نیوزوم‌ها تشکیل شده و شکل آنها تقریباً کروی بوده، به‌علاوه، علت به هم فشرده‌بودن نیوزوم‌ها، روش خشک‌کردن آنها است [15].

اندازه نانونیوزوم‌ها با آنالیز پراکندگی دینامیکی نور نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، نمودار تنها یک پیک تیز دارد، بنابراین اندازه نانوذر از گستردگی کمی برخوردار است. میانگین اندازه ذرات (Z)، ۵۲/۵۳ نانومتر و شاخص پراکندگی (PDI)، ۰/۵۰۹، اندازه‌گیری شد. پارامترهای بازدهی تهیه نیوزوم‌ها و بازدهی و درصد بارگذاری دارو



نمودار ۴) نمودار درصد رهايش تجمعی داروی آتورواستاتین از نانوحامل نیوزومی در محیط بافر فسفات

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، به منظور رهايش پيوسته داروی آتورواستاتین و همچنين کنترل نرخ رهايش، به عنوان یک مولکول پیام‌رسان با قابلیت القای استخوان‌زایی به هنگام ترميم نقایص استخوانی، دو مدل سامانه از انواع نانونیوزومی و میکروکرات ژلاتین، طراحی و سنتز شد و مورفولوژی، اندازه و توزیع اندازه ذرات، بازدهی تهیه حامل‌ها، درصد و بازدهی بارگذاری و پروفیل رهايش دارو از آنها مورد ارزیابی واقع شد. هر دو سامانه به صورت ذره‌ای ساخته شدند، اگرچه به منظور کنترل رهايش، یک سامانه در ابعاد نانومتری و به صورت نانوکپسول لیپیدی و سامانه دیگر در ابعاد میکرومتری و به صورت میکروکپسول پلیمری تهیه شد. نیوزوم‌های تهیه شده دارای اشکالی تقریباً کروی با میانگین ابعادی در حدود $653/52$ نانومتر بودند، همچنین میکروکرات ژلاتینی دارای اشکالی کاملاً کروی با میانگین ابعادی $37/5$ میکرومتر و با توزیع ابعادی بسیار مناسبی بودند. بازده تهیه میکروکرات ژلاتین ($68/33\%$) در مقایسه با نیوزوم‌ها ($92/81\%$)، کمتر است که این اتفاق با توجه به شست‌وشوهای مکرر میکروکرات ژلاتین (چندین بار قبل از کراس‌لینک شدن برای خارج کردن روغن و چندین بار بعد از کراس‌لینک شدن برای خارج کردن گلوکارآلدهید) و با توجه به این که هیچ شست‌وشویی در مورد نیوزوم‌ها صورت نگرفته است، منطقی به نظر می‌رسد. بازدهی بارگذاری آتورواستاتین در دو سامانه نیوزوم ($81/34\%$) و میکروکرات ژلاتین ($78/93\%$)، مشابه و قابل قبول است اما کینتیک رهايش دارو از آنها متفاوت است؛ به این صورت که در پروفیل رهايش دارو از نیوزوم، شاهد رهايش سریع و کوتاه ابتدایی بیشتری (25% در 24 ساعت نخست) نسبت به میکروکرات ژلاتین (18% در 24 ساعت نخست) هستیم، اما از پایان روز اول در حامل نیوزومی شاهد رهايش آهسته‌تر و پایدارتری (کمتر از 10% در 6 روز) در مقایسه با میکروکرات ژلاتین (حدود $35-30\%$ در 6 روز) هستیم. و در نهایت درصد بارگذاری دارو درون میکروکرات ژلاتین ($6/79\%$) در مقایسه با نیوزوم‌ها ($45/18\%$) خیلی کمتر است، به این معنی که برای آزاد شدن مقدار مشخصی دارو، مستلزم استفاده از مقدار بسیار بیشتری میکروکرات ژلاتین حاوی دارو در مقایسه با نیوزوم حاوی دارو خواهد بود. با توجه به مطالعات مشابه گزارش شده در این حوزه، می‌توان ارزیابی کرد که استفاده از کدام سامانه در چه مقادیری درون داربست‌های مهندسی بافت استخوان وابسته به محل و شدت آسیب مناسب خواهد بود. اگرچه بسیاری از این مطالعه استفاده از داروهای خانواده استاتین‌ها را به صورت موضعی یا تزریق درون‌وریدی مطالعه نموده‌اند. برای نمونه، ماندی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که حجم

استخوان ترابکولار رت در نمونه‌هایی که به مدت 35 روز، روزانه داروی سیمواستاتین با دوز 5 تا 10 میلی‌گرم دریافت کرده بودند، افزایش یافته بود. ماندی و همکاران این افزایش حجم را به دلیل افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها به دنبال افزایش BMP-2 دانسته‌اند^[4]. اراسورمان و همکاران اثر سیمواستاتین و آتورواستاتین را بر تکثیر، تمایز و معدنی‌شدن سلول‌های پالپ دندان مطالعه کردند و نشان دادند ترکیب $0/5$ میلی‌گرم سیمواستاتین یا آتورواستاتین با تری‌کلسیم‌فسفات، رشد و تکثیر سلول‌ها، فعالیت آلکالین فسفاتاز و تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت ادونتوبلاست را بهبود می‌بخشد^[18]. نیان و همکاران نیز پیشنهاد کردند که ترکیب $0/1$ میلی‌گرم سیمواستاتین با 14 میلی‌گرم تری‌کلسیم‌فسفات برای رهايش سیمواستاتین بسیار موثر است. آنها گزارش کردند که این ترکیب رهايش انفجاری اولیه ظرف 24 ساعت و به دنبال آن رهايش آهسته و بادوام سیمواستاتین به مدت 14 روز را به همراه خواهد داشت. این پروفیل رهايش نتایج مطلوبی را در ترميم استخوان جمجمه رت به همراه داشت^[19].

در مطالعه‌ای اثر رهايش موضعی سیمواستاتین از کلسیم‌سولفات در ترکیب با یک صفحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر التیام شکستگی استخوان تییبی رت ارزیابی شد. پروفایل رهايش سیمواستاتین از کلسیم‌سولفات در برون‌تن به این صورت بود که نزدیک به 10% دارو در روز اول آزاد شد و پس از آن رهايش همچنان به صورت پایدار ادامه یافت تا در روز 21 نزدیک به 95% سیمواستاتین رهايش یافت. در این مطالعه گزارش شد که رهايش سیمواستاتین موجب افزایش چشمگیر بیان BMP-2، آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین، استئوپرونگرین و VEGF می‌شود، به علاوه این که تشکیل کالوس در اطراف محل شکستگی را نیز افزایش داده و از این طریق به التیام شکستگی کمک شایانی می‌کند^[20].

یان و همکاران در مطالعه‌ای اثر رهايش کنترل‌شده داروی سیمواستاتین از یک هیدروژل تزریق‌پذیر و حساس به دما را بر بازسازی استخوان بررسی کردند. رهايش سیمواستاتین در محیط برون‌تن در دو روز اول به صورت انفجاری و پس از آن آهسته بود و 80% داروی بارگذاری‌شده تا روز چهاردهم آزاد شد. آزمون‌های برون‌تنی و درون‌تنی انجام شده در این مطالعه حاکی از اثربخشی این دارو در تشکیل استخوان و بازسازی نواقص استخوانی بود^[21]. در مطالعه‌ای دو فرمولاسیون از ذرات بر پایه پلی لاکتیک-گلايکولیک‌اسید شامل میکروکرات و نانوکرات حاوی داروی سیمواستاتین تهیه شدند و اثر داروی رهايش‌یافته از آنها بر تشکیل استخوان بررسی شد. ارزیابی رهايش برون‌تنی از این ذرات نشان داد که رهايش دارو از نانوکرات در 24 ساعت اول انفجاری بوده، به گونه‌ای که حدود 78% دارو در روز اول آزاد شده و رهايش دارو تا 5 روز ادامه یافته است. این در حالی است که رهايش دارو از میکروکرات روند بسیار آهسته‌تری داشته، به این صورت که حدود 7% دارو در 24 ساعت اول آزاد و پس از آن رهايش پایدار و آهسته دارو تا 4 هفته مشاهده شد. هر دو فرمولاسیون اثر مثبتی بر تشکیل استخوان در نقص استخوان جمجمه رت داشتند اما میکروکرات PLGA به دلیل رهايش پایدارتر بر نانوکرات ارجحیت داشتند^[22].

وانگ و همکاران اثر رهايش سیمواستاتین بارگذاری‌شده در نانوذرات PLGA بر بهبود پوکی استخوان را ارزیابی کردند. به دلیل ابعاد نانو این ذرات پلیمری، رهايش دارو از آنها نسبتاً سریع بود

- Izumi Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *J Dent Res*. 2006;85(6):520-3.
- 7- Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, Brinchmann JE, Østrup E. Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447(1):139-44.
- 8- Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl*. 2015;29(7):965-76.
- 9- Balakrishnan P, Shanmugam S, Lee WS, Lee WM, Kim JO, Oh DH, et al. Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *Int J Pharm*. 2009;377(1-2):1-8.
- 10- Zou Y, Brooks JL, Talwalkar V, Milbrandt TA, Puleo DA. Development of an injectable two-phase drug delivery system for sequential release of antiresorptive and osteogenic drugs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(1):155-62.
- 11- Prajapati KP, Bhandari A. Spectroscopic method for estimation of atorvastatin calcium in tablet dosage form. *Indo Glob J Pharm Sci*. 2011;1(4):294-9.
- 12- Dinarvand R, Mahmoodi S, Farboud E, Salehi M, Atyabi F. Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid-effect of cross-linking on drug release. *Acta Pharm*. 2005;55(1):57-67.
- 13- Selcan Gungor-Ozkerim P, Balkan T, Kose GT, Sezai Sarac A, Kok FN. Incorporation of growth factor loaded microspheres into polymeric electrospun nanofibers for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(6):1897-908.
- 14- Farhangi M, Dadashzadeh S, Bolourchian N. Biodegradable gelatin microspheres as controlled release intraarticular delivery system: The effect of formulation variables. *Indian J Pharm Sci*. 2017;79(1):105-12.
- 15- Venkataraman Sh, Hedrick JL, Ong ZY, Yang C, Rachel Ee PL, Hammond PT, et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(14-15):1228-46.
- 16- Uchegbu IF, Schätzlein AG, Cheng WP. Fundamentals of pharmaceutical nanoscience. Springer-Verlag: New York;2013.
- 17- Muzzalupo R, Tavano L, La Mesa C. Alkyl glucopyranoside-based niosomes containing methotrexate for pharmaceutical applications: evaluation of physico-chemical and biological properties. *Int J Pharm*. 2013;458(1):224-9.
- 18- Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. 2013;39(6):806-12.
- 19- Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;93(1):65-73.
- 20- Qi Y, Zhao T, Yan W, Xu K, Shi Z, Wang J. Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytherapy*. 2013;15(1):44-56.
- 21- Yan Q, Xiao LQ, Tan L, Sun W, Wu T, Chen LW, et al. Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue

به‌گونه‌ای که ۸۰٪ دارو در ۷۲ ساعت اول آزاد شد. آزمون‌های انجام‌شده نشان داد که رهایش این دارو موجب القای تمایز استخوانی و به‌دنبال آن بهبود پوکی استخوان می‌شود [23].
با توجه به شباهت روند رهایش آتورواستاتین به‌دست‌آمده از سامانه‌های بر پایه نانونیوزوم‌ها و همچنین میکروکرات ژلاتین که در این پژوهش تهیه شدند، با روند رهایش دیگر داروهای خانواده استاتین در کاربردهای استخوانی و اثبات اثربخشی آنها بر ترمیم و بازسازی استخوان، می‌توان نتیجه گرفت که رهایش آتورواستاتین از این دو سامانه در تلفیق با داربست‌های مهندسی بافت قادر به القای استخوان‌زایی است. به‌علاوه، مقدار داروی رهایش‌یافته نیز از طریق تغییر میزان سامانه‌های دارویی آمیخته‌شده با داربست قابل تنظیم است.

لازم به ذکر است که با توجه به این که داروی مطالعه‌شده در این پژوهش و نوع سامانه متفاوت از سایر مطالعات است، انتخاب دقیق یکی از دو سامانه به‌عنوان سامانه بهینه، نیازمند مطالعات سلولی روی آنها بوده و لازم است سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف دارو قرار گرفته و حداقل غلظت موثر، حداقل غلظت سمیت و به‌دنبال آن، پنجره درمانی دارو تعیین شود. همچنین تاثیر رهایش انفجاری اولیه بر رفتار سلول‌های بالغ و بنیادی بررسی شود، سپس متناسب با شدت آسیب و سرعت ترمیم و با توجه به این که پروفیل رهایش کدام حامل به‌مدت طولانی‌تری در پنجره درمانی قرار می‌گیرد و سلول در چه شرایطی رفتار مناسب‌تری از خود نشان می‌دهد، که این مطالعات در دست انجام است، می‌توان حامل و پروفیل رهایش بهینه را انتخاب نمود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از مسئولین آزمایشگاه مهندسی بافت دانشگاه صنعتی امیرکبیر و همچنین همکاران آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، به‌خاطر همکاری‌شان در تامین تجهیزات و مواد مورد نیاز این پژوهش تشکر می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی در این پژوهش وجود ندارد.

سهام نویسندگان: سارا نجاتی (نویسنده اول)، نگارنده اصلی (۴۰٪)؛ رعنا ایمانی (نویسنده دوم)، تحلیل‌گر داده‌ها (۳۰٪)؛ محمدعلی شریفی (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۳۰٪)

منابع مالی: این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

منابع

- 1- Wang Y, Zhu G, Li N, Song J, Wang L, Shi X. Small molecules and their controlled release that induce the osteogenic/chondrogenic commitment of stem cells. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1626-40.
- 2- Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Des*. 2001;7(8):715-36.
- 3- Balmayor ER. Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;94:13-27.
- 4- Ross Garrett I, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res*. 2002;4(4):237-40.
- 5- Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: Two sides of the same coin. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(11):995-8.
- 6- Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao JK, Node K,

simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;33:136-42.

23- Wang H, Liu J, Tao S, Chai G, Wang J, Hu FQ, et al. Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:5671-85.

regeneration: in vitro and in vivo characteristics. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(11):3580-9.

22- Terukina T, Naito Y, Tagami T, Morikawa Y, Henmi Y, Prananingrum W, et al. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of