

تطوير وتقييم جسيمات الكيتوزان النانوية المحملة بمادة الفنتونين والمصنعة بطرائق صياغة مختلفة للتطبيقات المضادة للصرع والإيصال الأنفي

د. عبد الحكيم نتوف*

د. همام كفي**

أمل يوسفان***

(تاريخ الإيداع 8 / 1 / 2021. قُبِلَ للنشر في 9 / 3 / 2021)

□ ملخص □

تم الاهتمام بالجسيمات النانوية البوليمرية في السنوات الأخيرة كأنظمة دوائية واعدة للتوصيل عبر المخاطيات الحيوية والاستهداف الدماغي متضمنة جسيمات الكيتوزان لما تتمتع به من مزايا وأهمها الخواص اللصوقة حيويًا. تركّز الهدف من الدراسة المقدمة على تحضير جسيمات الكيتوزان النانوية وتقييم خواص الجسيمات الناتجة وفقاً لكفاءة كبسلتها وأبعادها الناتجة وفق طريقة التحضير المتبعة. تم استخدام طرائق التصالب الشاردي في الأوساط المائية وطرائق الاستحلاب بنفاذ المحل وبتبخر المحل وطريقة الترسيب النانوية وقد أبدت طريقة الترسيب النانوي المعتمدة على حل الكيتوزان في الوسط المائي وحل الليسيثين والفنتونين في الوسط العضوي الفعالية الأكبر بكبسلة المادة الدوائية المدروسة إذ بلغت 67% بحجم أبعاد بلغ 311.3 نانومتر. تعد هذه النتائج أولية ولكنها واعدة لأمثلة الشروط التصنيعية للوصول لأفضل خواص فيزيوكيميائية للجسيمات المصنعة ودراسة فعاليتها في تحقيق الاستهداف الدماغي بعد تجريعها بالطريق الأنفي.

الكلمات المفتاحية: الجسيمات النانوية، الفنتونين، الكيتوزان، الليسيثين.

* قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

** هيئة الطاقة الذرية، قسم التقانة الحيوية، سورية.

*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

Development and Evaluation of Phenytoin Loaded Chitosan Nanoparticles using Different Formulation Methods for Anti-epileptic and Intranasal Delivery Applications

Dr. Abdul Hakim Natouf*
Dr. Houmam Kafa**
Amal Yousfan***

(Received 8 / 1 / 2021. Accepted 9 / 3 / 2021)

□ ABSTRACT □

In recent years, attention has been given to polymeric nanoparticles as promising drug delivery systems through the vital mucus and the development of several drug delivery systems to the brain, including chitosan nanoparticles because of their advantages, which are the bio-adhesive properties. The aim of the presented study focuses on preparing chitosan nanoparticles and evaluating the properties of the resulting particles according to the encapsulation efficiency and resulting dimensions. The methods of ionic cross linking, emulsification with solvent diffusion and evaporation, and nanoprecipitation methods were employed to produce the nanoparticles. The nanoprecipitation method based on adding organic phase contained lecithin and phenytoin to the chitosan solution in aqueous medium showed the greatest encapsulation efficiency (EE%) reaching 67% with dimensions of 311.3nm. These results are preliminary, but they are promising for determination of manufacturing conditions to reach the best physicochemical properties of the prepared particles and to study their effectiveness in brain targeting after being administrated *via* the nasal route.

Keywords: Nanoparticles, Phenytoin, Chitosan, Lecithin.

* Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

** Atomic Energy Commission, Department of Biotechnology, Syria.

*** Postgraduate Student (PhD) - Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

مقدمة:

يوصف الصرع بأنه واحدٌ من الاضطرابات العصبية الأكثر انتشاراً، والتي تؤثر على ما يقارب 1% من سكان العالم. بالنسبة لمعظم المرضى، فإن الأدوية المضادة للصرع هي الدعامه الأساسية لإدارة المرض، ولكن النافذة العلاجية الضيقة نسبياً وانخفاض انحلالية عدد من أدوية الصرع التقليدية مثل الفنتوين تؤدي إلى آثار جانبية حادة للدواء وعدم القدرة على السيطرة الكاملة على النوبات الصرعية. تحتاج المعالجة الآمنة والفعالة للصرع لنظام إيصال دوائي قادر على عبور الحاجز الدموي الدماغي يتبعه تحرر سريع ومديد للمادة الدوائية لتثبيط الاضطرابات العصبية في الوقت المناسب ولأطول فترة ممكنة. جذب الطريق المخاطي الكثير من الانتباه في السنوات الأخيرة كطريق غير باضع لإيلاء المواد الدوائية بالطرق الفموية، الأنفية، الرئوية والمهبلية. وبنفس الوقت أصبحت النظم الدوائية النانوية طرقاً سباقاً في منظومة الإيصال الدوائي مما يُمكن من ضبط تحرر المواد الدوائية وحمايتها من التدرج الأنزيمي وتوضعها الطويل الأمد على مواضع الامتصاص. تكمن أهمية الجسيمات النانوية البوليميرية الطبيعية بتدكرها حيوياً وتوفر معدات الصياغة اللازمة على نطاق واسع في المختبرات البحثية بما يتناسب مع الطبيعة الكيميائية للمادة الدوائية وطريقة الإيلاء الدوائي. تعد جسيمات الكيتوزان النانوية المعدة للتطبيق على المخاطيات الحيوية من الأنظمة المهمة لما تتمتع به من انخفاض في السمية ولصوقية حيوية وخواص فيزيائية قابلة للضبط [1].

يعد الكيتوزان من أهم مشتقات الكيتين المحضرة عبر ازالة مجموعة الاسيتات. حيث تشق من أصداف القشريات. يعرف الكيتوزان من حيث خواصه بأنه بولي سكاريد ايجابي أساسي ذو خواص لصوقية حيوياً. يعمل الكيتوزان كمعزز للنفاذية عبر فتح مناطق الاتصال المحكم في الظهارة الخلوية ويسهل العبور عبر وبين الخلايا. كما يرتبط مع الطبقة المخاطية السالبة الشحنة عبر الروابط الشاردية والهيدروجينية والارتباطات الكارهة للماء. تبلغ الـ pKa للكيتوزان 6.5 وذلك حسب درجة نزع الاستلة مما يجعله منحلأ في الأوساط المائية المحمضة وغير منحل في الأوساط المعتدلة أو القلوية. وكنتيجه لما سبق فإن عملية صياغة جسيمات الكيتوزان النانوية يجب أن تراعي خواص الكيتوزان الفيزيائية والكيميائية [2].

يعتبر الإيلاء الأنفي طريق غير باضع لإيصال المواد الدوائية للدماغ، كما يمثل الإيلاء الأنفي تحدياً حقيقياً بسبب التصفية الهدبية للمواد الدوائية. تم تجاوز التصفية الهدبية في العديد من الدراسات عبر تصميم نظام دوائي ذو خواص لصوقية حيوياً وقد لعب حجم الجسيمات دوراً هاماً بقدرة الجسيمات على النفاذية عبر المخاطية الشمية. حيث قام Liu بصياغة جسيمات الكاربوكسي ميتيل الكيتوزان الحاوية على الكاربامازين بهدف التوصيل الأنفي الدماغي وتجاوز الحاجز الدموي الدماغي. كما بين Lisbeth وزملاؤه أن التراكيز الدماغية للاسترايول كانت عالية بالنسبة للتراكيز الدموية عند اعطائه محملاً على جسيمات الكيتوزان بالطريق الأنفي مقارنة مع الإيلاء الفموي للدواء الحر. وبينت دراسة Shahnaz وزملائه على leuprolide بأن المساحة تحت المنحني بلغت من 5-2 ضعف عند توصيلها محملة على جسيمات الكيتوزان مقارنة مع محلول الدواء الحر. من جهة أخرى تتيح الخاصية للصوقية حيوياً ضبط تحرر المادة الدوائية مع الوقت مع امكانية انقاص الجرعة الدوائية وعدد مرات التجريع الدوائي [3].

يتم تحضير جسيمات الكيتوزان بعدة طرائق منها التصالب الشاردي، الاستحلاب الميكروي، الاستحلاب مع انتشار المحل، والاستحلاب مع تبخير المحل. من أهم النقاط التي يتم مراعاتها في طريقة التحضير المتبعة هي استخدام النسبة الأقل من المحلات العضوية. تعتبر طريقة الاستحلاب الشاردي من الطرائق البسيطة والتي يتم فيها حل الكيتوزان ايجابي الشحنة في وسط مائي حاوي على حمض الخل مع أو بدون استخدام عامل مثبت مثل البوليكرامير او التوين. يتم تشكل الجسيمات عبر التجاذب الكهربائي الساكن بين المجموعات الموجبة والسالبة الشحنة خلال التحريك الميكانيكي ضمن درجة حرارة الغرفة مما يؤدي لتشكيل جسيمات الكيتوزان الكروية ايجابية الشحنة السطحية وذات أبعاد تتراوح بين 900-200 نانومتر. تم سابقاً تحضير جسيمات الكيتوزان النانوية الحاوية على فيتامين سي بهذه الطريقة عبر التصالب الشاردي بين الكيتوزان والتري بولي فوسفات بالتحريك بواسطة المحرك المغناطيسي لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة. من مزايا هذه الطريقة هو سهولة توفر شروط التحضير في الأوساط

المائية وانخفاض السمية بسبب عدم استخدام المحلات العضوية ومن أهم مساوئها هو انخفاض الثباتية في الأوساط الحمضية وميلها للتكدس في الأوساط القلوية [4].

تطبق طريقة الاستحلاب ونفاذ المحل بتحضير مستحلب زيت في ماء عبر مزج المحل العضوي في محلول الكيتوزان المائي بوجود عامل مثبت وتطبيق التحريك الميكانيكي باستخدام المازج الفائق السرعة. ينتج ترسب البوليمر من اضافة كمية كبيرة من الوسط المائي للمستحلب مما يؤدي لتشكل الجسيمات النانوية. تتناسب هذه الطريقة مع كبسلة المواد الكارهة للماء وتكون كفاءة الكبسلة الناتجة عالية ضمن جسيمات تتراوح أبعادها بين 300-500 نانومتر. من أهم سلبات هذه الطريقة هو الحاجة لاستخدام مجانسات فائقة تصل سرعتها لـ 25000 دورة بالدقيقة [5].

تعتمد عملية التقوصر Coacervation Method على تحضير جسيمات الكيتوزان المحملة بالحمض النووي الـ DNA عبر تقوصر الكيتوزان الحاوي على مجموعات الأمونيوم الطرفية الإيجابية الشحنة مع الحمض النووي ذو مجموعات الفوسفات المشحون سلبياً [6]. تعتمد كفاءة الكبسلة وتحرر المواد الدوائية على الوزن الجزيئي لكل من البوليمرين. من مزايا الطريقة أنه يمكن تطبيقها ضمن وسط مائي ودرجة حرارة منخفضة مما يقدم فرصة أكبر للحفاظ على فعالية المادة الدوائية المكبسلة وتترافق عملية التحضير مع التشكل السريع للجسيمات المحضرة. ومن أهم سلبات هذه الطريقة هي الثباتية القليلة للجسيمات المحضرة وانخفاض كفاءة الكبسلة والحاجة لاستخدام عوامل كيميائية مصلبة سامة كالغلوتارالدهيد.

تعتمد طريقة الترسيب النانوي على اضافة الطور العضوي لمحلول الكيتوزان المائي المحضر حيث يمكن أن تنتج جسيمات كيتوزان ذات أبعاد أقل من 200 نانومتر وكفاءة كبسلة عالية مع تشتت أبعاد مرتفع مما يعد من سلبات هذه الطريقة [7]. في طريقة المستحلبات الميكروية فان المحلول الحمضي للكيتوزان مع الغلوتارالدهيد يضاف للطور العضوي كالهكسان الحاوي على العامل الفعال على السطح. يبقى المزيج تحت التحريك المستمر بدرجة حرارة الغرفة مما يسمح للجسيمات للتشكل طيلة الليل. يتم ازالة الطور العضوي عبر التبخير تحت الضغط المنخفض ويزال العامل الاستحلابي الزائد باضافة كلوريد الكالسيوم وازالته لاحقاً بالتفيل ثم فصل الجسيمات بطريقة التحال والتجفيد. تكمن ايجابيات هذه الطريقة بإمكانية الحصول على جسيمات ذات تشتت أبعاد صغير والتي يتم التحكم بها عبر تركيز الغلوتارالدهيد بالوسط بينما تكمن سلبات الطريقة بالحاجة لاستخدام محلات عضوية وطول طريقة التحضير وتعقيد طريقة الغسل.

تنتج طريقة الاستحلاب وتبخير المحل جسيمات بأبعاد 300 نانومتر عبر اضافة الطور العضوي الى الطور المائي الحاوي على الكيتوزان مع العامل الاستحلابي ثم يتم تطبيق الامواج الصوتية. يتم تحريك المستحلب الناتج حتى تمام تبخر الطور العضوي منه وتشكل الجسيمات النانوية ثم يتم تطبيق عمليات غسل متعاقبة تهدف لإزالة الكمية الزائدة من العامل الفعال على السطح وتجفيد الجسيمات الناتجة [8].

يضاف بطريقة الاستحلاب المتعكس Reverse Micellar Method العامل الفعال على السطح الى الطور العضوي متبوعاً بالكيتوزان والمادة الدوائية والمادة المصلبة تحت تطبيق التحريك المستمر طيلة الليل. يؤدي تبخير الطور العضوي الى تشكيل كتلة جافة يتم لاحقاً بعثرتها في الماء واطافة الملح المناسب لترسيب العامل الفعال على السطح. تتميز الجسيمات الناتجة بتشتت أبعاد صغيرة وقد تم وفقا تحضير جسيمات الروبينسين مع الديكستران المكبسلة ضمن جسيمات الكيتوزان النانوية [9].

يعتبر الفنتوثين حمض ضعيف ذو درجة pKa 8.3 ويستخدم كمثبط للاختلاجات الناجمة عن الصرع الكبير grand mal epileptic seizures. يبدي الفنتوثين معدلات بطيئة من الامتصاص واختلافات كبيرة في توافره الحيوي بعد الإعطاء الفموي بسبب انحلاليته البطيئة والغير مكتملة في الأوساط المائية. تمت محاولة التغلب على مشاكل انحلالية الفنتوثين عبر تصنيع الطلائع الدوائية والمعقدات بين الفنتوثين والسيكلوديسترينات. تم تحضير الاستر الفوسفاتي لـ 3 اوكسي ميتيل فنتوثين كطليعة دوائية للفنتوثين معدة للايتاء الوريدي والابتاء الفموي حيث يتم استقلالها بالكبد الى الفنتوثين. حسن استخدام الطلائع الدوائية من

التوافر الحيوي للفتوتئين بعد الإيتاء الفموي إلا أنه لم يخفف من الآثار الجانبية. تم استخدام السيكلوديسكترينات من قبل Stella و Rajewski بهدف تحسين التوافر الحيوي عبر تحسين الانحلالية ومعدل الذوبان.

تم استخدام الكيتوزان والسيكلوديسكترينات على نطاق واسع لتحضير الجسيمات النانوية في الآونة الأخيرة إذ يوفر الكيتوزان ضبطاً لتحرر المادة الدوائية المكبسلة ضمن الحامل ولكنه وبنفس الوقت يبدي كفاءة قليلة للمواد الكاره للماء عند تحميلها بشكل مباشر ضمن الجسيمات لذلك تم التصنيع بطريقة التصالب الشاردي بوجود بوليميرات مختلفة عن بنية الكيتوزان الخطية مثل هيدروكسي بروبيل بيتا سيكلو ديكسترين ذو البنية المخروطية مع بنية خارجية محبة للماء فجوة داخلية كارهة للماء حيث تحمل المواد الكارهة للماء ضمن الفجوة الكارهة للماء مما يؤدي الى تحسين كفاءة الكبسلة والانحلالية وثبات المادة الدوائية ضمن البنية النانوية.

تم في العمل المقدم دراسة خواص جسيمات الكيتوزان المحضرة والمحملة بمادة الفتوتئين وفق أربع طرائق أساسية وتقييمها من حيث كفاءة الكبسلة والأبعاد الوسطية والشكل المورفولوجي للجسيمات المحضرة.

طرائق البحث ومواده:

1. المواد:

فتوتئين الصوديوم، 5,5 دي فنيل هيدانتوين، الكيتوزان المنخفض والمتوسط الوزن الجزيئي، التري بولي فوسفات، هيدروكسي بروبيل بيتا سيكلوديكسترين، حمض الخل، الترياسيتين، البولوكزامير 188 من شركة Sigma-Aldrich Co، ألمانيا. الليسيتين المكون من الفوسفاتيديل كولين 51.9% والفوسفاتيديل ايتانول أمين 12.5% من شركة Cargill Co، ألمانيا. الأستون، الايتانول من شركة Eurolab، بريطانيا. الميثانول من شركة Merck، ألمانيا. التوين 80 والتوين 20 من شركة AppliChem، ألمانيا.

2. تحضير المعقد بين فتوتئين الصوديوم والهيدروكسي بروبيل β سيكلوديكسترين

تم تحضير المعقد بين الفتوتئين والهيدروكسي بروبيل β سيكلوديكسترين (-HP)CD β وفقاً لطريقة Savolainen في درجة حموضة 11 بنسبة 1:1مول : مول حيث أضيف 10 ملغ من فتوتئين الصوديوم إلى 0.8مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 نظامي ثم أضيف المحلول السابق إلى 3.2 مل من محلول مائي ل-CD β HP- بتركيز 25ملغ/مل يتم أخذ 200 ميكروليتر من محلول فتوتئين الصوديوم المائي النهائي واكماله الى 2مل بالماء المنزوع الشوارد. بين Savolainen أن انحلالية الفتوتئين في الوسط المائي تزداد طردياً مع زيادة نسبة (-HP)CD β في الوسط لتصبح انحلالية الفتوتئين 23.84 $\mu\text{g/ml}$ بدرجة حموضة 7.4 و 12.86 mg/ml بدرجة حموضة 11، كما تبلغ انحلالية الفتوتئين 0.820 ملغ/مل بدرجة حموضة 2.74 بوجود - β HP- CD بنسبة وزنية تبلغ عشرة أضعاف كمية فتوتئين الصوديوم المستخدم [10, 11].

3. تحضير جسيمات الكيتوزان بطريقة التصالب الشاردي مع التري بولي فوسفات

تم تحضير جسيمات الكيتوزان بطريقة التصالب الشاردي وفقاً لطريقة Bodmeier وزملائه [12] وطريقة Chen وزملائه لتصنيع جسيمات الكيتوزان المصلب شاردياً مع التري بولي فوسفات TPP والحاوية على -CD β HP- [13]. حُضِر محلول الكيتوزان المنخفض الوزن الجزيئي بتركيز 0.5, 0.8, 1, 2 ملغ/مل في وسط مائي محمض بكمض الخل بنسبة (1:1.75) وأضيف 2مل من محلول فتوتئين الصوديوم النهائي الموضح في الشكل 1 الى 1مل من TPP ذو التركيز 1.75ملغ/مل. تتم اضافة محلول التري بولي فوسفات مع فتوتئين الصوديوم الى 5مل من محلول الكيتوزان الحاوي على التوين 80، البوليكزامير 188، بولي فينيل الكحول PVA بنسبة 0.2%، البولي ايتيلين غليكول PEG 200 بتركيز 0.05، 0.1، 0.2 ملغ/مل نقطة فنقطة تحت التحريك المغناطيسي لمدة نصف ساعة. يتم تثقيف المعلق النانوي الناتج بسرعة 10000 دورة بالدقيقة ولمدة 15 دقيقة ودرجة 4°C (Eppendorf USA) وغسل الرسابة الناتجة باستخدام 1مل من الميثانول وتحليل كمية الفتوتئين في سائل الغسيل لكشف كمية المادة الدوائية المترسبة بالوسط. من جهة أخرى يتم تحليل كمية الفتوتئين في السائل الطافي لكشف كمية الفتوتئين الحر الغير

مكبسلة وتتم حساب كفاءة الكبسلة وفقاً للطريقة الغير مباشرة. تمت اعادة التجربة باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 نظامي كعامل مصلب بدلاً عن TPP وقياس كفاءة كبسلة الجسيمات الناتجة باستخدام تركيز ثابت من الكيتوزان 0.8 ملغ/مل واستخدام التوين 80 بنسبة 0.2 % كعامل مثبت. كما تم استخدام تقنية الرذ لاضافة محلول TPP مع فنتوئين الصوديوم على محاليل حاوية على تراكيز مختلفة من الكيتوزان 0.5، 1، 2 ملغ/مل.

4. تحضير جسيمات الكيتوزان والليسيئين بطريقة الاستحلاب ونفاذ المحل

تم تحضير جسيمات الكيتوزان النانوية وفق طريقة Sovico وزملائه [14] باستخدام الليسيئين والكيتوزان المنخفض والمتوسط الوزن الجزيئي بنسبة 20 : 1. باختصار تم حل 200 ملغ من الليسيئين مع 0.5، 1، 5، 20 ملغ من فنتوئين الصوديوم في 4 مل من الميثانول وازادتها تحت تحريك المجانس الفائق بسرعة 25000 دورة في الدقيقة أو التحريك بالمحرك المغناطيسي بسرعة 800 دورة في الدقيقة أو استخدام مسبار الأمواج فوق صوتية إلى المحلول المائي 46 مل المحضر بتمديد 0.5 من محلول الكيتوزان الحاوي على 5 ملغ من الكيتوزان مع حمض الخل بنسبة 1.75 : 1. تم فصل الجسيمات المحضرة بالثقليل بسرعة 10000 دورة بالدقيقة ولمدة 15 دقيقة ودرجة 4°C ثم غسل الرسابة الناتجة بالميثانول ومعايرة المادة الفعالة في سائل الغسيل لمقايسة المادة الدوائية المترسبة. تمت معايرة تركيز الفنتوئين في السائل الطافي وحساب كفاءة الكبسلة بالطريقة غير المباشرة كما هو موضح في الشكل. 2. تم لاحقاً تصميم هذه الطريقة باستخدام العامل F بهدف دراسة تأثير تغير ثلاث متغيرات في التجربة الواحدة وهي العامل الأول: نسبة الكيتوزان الى الليسيئين (10 : 1 أو 20 : 1) وزن/ وزن والعامل الثاني: الوزن الجزيئي للكيتوزان المستخدم منخفض أو متوسط الوزن الجزيئي والعامل الثالث: كمية مادة فنتوئين الصوديوم (1 أو 2 ملغ) كما هو موضح في الجدول. 3.

5. تحضير جسيمات الكيتوزان والليسيئين بطريقة الاستحلاب وتبخير المحل

تم تحضير الجسيمات البوليميرية الحاوية على مادة الفنتوئين وفق طريقة Fessi وزملائه [15] تم حل 200مغ من الترياسئين مع الفنتوئين 0.3، 0.6، 0.9 ملغ والليسيئين 50 ملغ في 10 مل من الاسيتون أو الميثانول. تمت اضافة الطور العضوي نقطة فنقطة الى الطور المائي الحاوي على العامل الفعال على السطح بنسبة 0.2% مع وبدون الكيتوزان المنخفض الوزن الجزيئي بنسبة 0.4 ملغ/مل وتحت تأثير المجانس عالي السرعة بسرعة 11000 دورة في الدقيقة وتم ابقاء المحلول الناتج بتأثير التحريك المغناطيسي تحت الساحة لمدة ساعة لإتاحة الوقت لتشكيل الجسيمات النانوية ونفاذ المحل. فُصلت الجسيمات النانوية من القسم المنحل الغير متصلب من البوليميرات المستخدمة باستخدام أنابيب الترشيح الفائق Viva spin, Sartorius, New York ذات الأبعاد 100 كيلو دالتون وبتفيل أنابيب الترشيح الفائق على سرعة 3214 g ولمدة 2 ساعة بدرجة حرارة 20°C وجمعت الجسيمات من الحجرة العلوية لأنابيب الترشيح. تمت اعادة التجربة المذكورة بنسب مختلفة من الاسيتون والايثانول لحل الليسيئين والفنتوئين والترياسئين حيث تم استخدام نسب (25 : 75، 40 : 60، 50 : 50) من الايثانول والاسيتون على الترتيب. تمت مقايسة كفاءة الكبسلة لكل من الصيغ المدروسة ومقارنة النتائج كما هو موضح في الشكل. 3.

6. تحضير جسيمات الكيتوزان والليسيئين بطريقة الترسيب النانوي والمحملة بمادة الفنتوئين

تم تحضير جسيمات الكيتوزان والليسيئين وفقاً للطريقة المنشورة من قبل El-Gogary وزملائه مع بعض التعديلات [16]. تم حل 5، 10، 20 ملغ من الليسيئين في 5 مل من الاسيتون والايثانول بنسبة (40%:60 حجم لحجم). تم حل 0.3، 0.6، 0.9، 1.2 ملغ من الفنتوئين في 200 مكل من الترياسئين أو تمت اضافته بشكل منفصل عن الترياسئين وازادته إلى الطور العضوي، كما تم القيام بتجربة شاهدة تضمنت اضافة الفنتوئين الى محلول الليسيئين بدون وجود الترياسئين كعامل مولد للنواة الزيتية. حُلّت كميات مختلفة من الكيتوزان مساوية لـ 0.1، 0.25، 0.5، 1.25، 5، 20 ملغ في 10 مل من الماء منزوع الشوارد والمحمض بحمض الخل بنسبة (1 : 1.75) وازادته عوامل مثبتة التوين 80، البوليكزامير 188، التوين 20 بنسبة 0.2%. أُضيف الطور العضوي إلى الطور المائي نقطة فنقطة مع التحريك بالمحرك المغناطيسي (600 دورة في الدقيقة). تم التخلص من الطور

العضوي بتبخير المعلق الناتج تحت الضغط المنخفض باستخدام المبخر الدوار (vacuum of 168 mbar, 70 C, BU^{THI}). تم تشغيل المعلق النانوي بالمتفلة المبردة بسرعة 3214g ولمدة 15 دقيقة وبدرجة 4°C بهدف فصل الجزء الغير منحل من البوليميرات الغير متفاعلة ثم أعيد حل الرسابة بـ 1مل من الميثانول وتحليلها باستخدام الفصل على الصفيحة الرقيقة عالية الأداء HP-TLC. فُصلت الجسيمات النانوية من القسم المنحل الغير متصلب من البوليميرات المستخدمة باستخدام أنابيب الترشيح الفائق Viva spin, Sartorius, New York ذات الابعاد 100 كيلو دالتون وتثقل أنابيب الترشيح الفائق على سرعة 3214 g ولمدة 2 ساعة بدرجة حرارة 20°C وجمعت الجسيمات من الحجرة العلوية لأنابيب الترشح كما هو موضح في الشكل. 4.

2. حساب كفاءة الكبسلة للفنتونين في الجسيمات النانوية المصنعة

تمت مقايسة القسم الغير مكبس من الفنتونين في العينات باستخدام الـ HP-TLC باتباع الطريقة التي أشار إليها Pippenger وزملائه مع بعض التعديلات [17]. تم تطبيق 20 مكل من العينة آلياً بشكل خطي بفاصل 1.2 سم بين كل عينتين وبعد اسم عن حافة طبقة الألمينوم المغطاة بجيل السيليكا (CAMAG automatic TLC sampler 4, Germany). تم تطوير العينات باستخدام مزيج من الكلوروفورم والأسيتون بنسبة (1:9) حجم لحجم. تمت مقايسة امتصاص العينات المطبقة للأشعة فوق البنفسجية باستخدام قارئ الصفحات (CAMAG TLC scanner 3, Germany) على طول موجة 217 نانومتر وحساب تركيز الفنتونين من معادلة السلسلة العيارية الخطية وحُسبت كفاءة الكبسلة من العلاقة التالية:

$$EE\%(w/w) = \frac{(Drug_{Total} - Drug_{filtrate})}{Drug_{Total}} \times 100$$

8. دراسة شكل الجسيمات المحضرة باستخدام المجهر الالكتروني النافذ TEM

أُستخدمت صور المجهر الالكتروني النافذ لمقايسة شكل وأبعاد الجسيمات المحضرة. باختصار تم تمديد العينة عشر مرات باستخدام الماء المنزوع الشوارد وتثبيت نقطة من المعلق المدروس على شبكات نحاسية 300 مغلقة بالكربون، تم طلي العينات باليورانيول اسيتات وغسل العينة مرتين بمحلول حاوي على نسبة 1:1 من الميثانول والماء لإزالة بقايا مادة الطلي عن الشبكة. استخدم المجهر الالكتروني النافذ ذو الخلفية المتألقة باستخدام تكبير 80 كيلو فولت وفتحة عدسة مناسبة وتصوير Philips CM12.

9. تحليل البيانات الناتجة

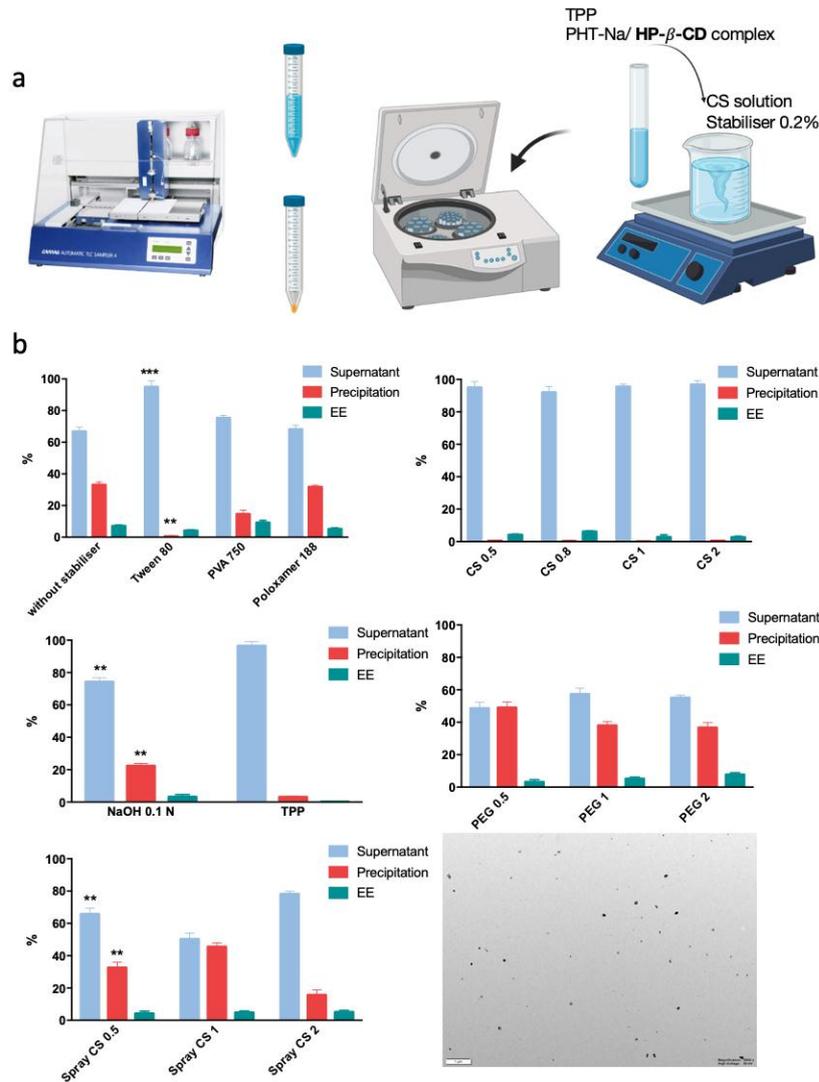
تم التعبير عن النتائج كنسبة مئوية من كمية المادة الدوائية الابتدائية وإعادة التجارب ثلاث مرات وتم التحليل الاحصائي باستخدام اختبار الاختلاف وحيد الاتجاه ANOVA one way الذي تم تطبيقه باستخدام برنامج Prism v 7.0 وفق دلالة إحصائية $p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*0.05$.

النتائج والمناقشة:

3. تحضير وقياس كفاءة كبسلة جسيمات الكيتوزان والـ CDβHP- النانوية بطريقة التصالب الشاردي

في هذه الدراسة تم اختيار الكيتوزان كبوليمير هيكل لصياغة الجسيمات النانوية الحاوية على مادة الفنتونين لما يتميز به من خواص عديدة من أهمها شحنته الايجابية واللصوقية الحيوية بالإضافة لسميته الضعيفة وتوافقه مع العضوية الحيوية. يتم التصالب الشاردي بين المجموعات الأمينية المشحونة ايجابياً في الكيتوزان مع الشحنة السالبة على TPP ولذلك فان نسبة محددة بين الكيتوزان و TPP هي المسؤولة عن تصنيع الجسيمات. عندما تكون النسبة اقل من 2 فإن الكمية الزائدة من TPP تسبب خللاً في التناظر بين جسيمات الكيتوزان والثباتية الغرويدية للمعلق النانوي كما يمكن ان تشكل جسوراً بين الجسيمات النانوية مما يؤدي الى تكديسها. تعتبر النسبة الوزنية بين الكيتوزان و TPP البالغة 5 مثالية حيث تتشكل بين جزيئة TPP خمس روابط مع المجموعات الأمينية على الكيتوزان. تم اختيار CDβHP- المعتدل الشحنة بهدف عدم التأثير في عملية التصالب الشاردي. بينت الدراسات ان وجود CDβHP- بتركيز كبيرة يقلل من حجم الجسيمات النانوية الناتجة ويؤدي لبنية أكثر كثافة بسبب تشكل

روابط هيدروجينية وروابط كارهة للماء بين $CD\beta$ HP- والكيروزان ومن جهة أخرى تبلغ نسبة تضمين $CD\beta$ HP- في جسيمات الكيتوزان 15.5% مما قد يسبب ازاحة جزء من جزيئات التري بولي فوسفات من البنية النانوية وعدم ثبات البنية الناتجة [13].



الشكل 1. تحضير الجسيمات النانوية باستخدام طريقة التصلب الشاردي. (a) تحضير جسيمات الكيتوزان الحاوية على مادة فنتونين الصوديوم باستخدام طريقة التصلب الشاردي. (b) كفاءات الكبسلة الناتجة عن تحضير الجسيمات وفق شروط مختلفة و معاينة الجسيمات

وفقاً لما سبق فإن شكل الجسيمات المحضرة يعتمد بشكل أساسي على تركيز الكيتوزان المستخدم في التحضير. تم التحضير باستخدام أربع تراكيز من الكيتوزان المنخفض الوزن الجزيئي ذو درجة الأستلة % 75. يبين الجدول 1 كفاءة الكبسلة الناتجة عن عملية التصنيع حيث لم يلاحظ لتركيز الكيتوزان المستخدم تأثير ذو دلالة احصائية على كفاءة الكبسلة. تركزت نسبة الفنتونين الأكبر في السائل الطافي بينما كانت المادة قليلة في الرسابة الناتجة وفي النسبة المكبسلة ضمن الجسيمات المصنعة. يستطيع التري بولي فوسفات تشكيل جسور داخل أو خارج جزيئية بين المجموعات الأمينية في الكيتوزان. يحتاج ثبات الجسيمات المصنعة الى مصفوفات طويلة من الترابطات الغير تشاركية وبالتالي فان الروابط الداخلة جزيئية هي التي تسهم بشكل اساسي بتشكيل الجسيمات النانوية وثباتها والتي بدورها تتطلب زيادة الوزن الجزيئي للكيتوزان المستخدم. بالمقابل فإن استخدام الكيتوزان المتوسط

الوزن الجزيئي يتطلب اضافة كمية اضافية من حمض الخل لتحريض الوسط وبرتنة المجموعات الأمينية على سلاسل الكيتوزان مما يؤدي لترسب الفنتوثين في وسط التحضير والذي لوحظ بشكل عياني واضح أثناء التجربة [7].

لمحلولي الكيتوزان والتري بولي فوسفات درجتي حموضة مختلفة وهما 3.5 و 8.9 وبناءً عليه يؤدي اضافة محلول الترّي بولي فوسفات على محلول الكيتوزان الى التعديل التدريجي لدرجة الحموضة مما يسبب نظرياً انكماش الكيتوزان ضمن أشكال كروية وتشابكها بفعل الكهرباء الساكنة مع مجموعات الفوسفات في TPP ونفذ حمض الخل الى البيئة المحيطة بتلك الجسيمات لتكون درجة حموضة المعلق النانوي الناتج 6.5 خلال 25 ل 35 دقيقة من الاضافة. تنفذ المواد المنحلة في الماء بسرعة الى الوسط المائي المحيط بالجسيمات خلال 15 دقيقة من التحضير لذلك يجب فصل الجسيمات النانوية بسرعة. وبشكل معاكس يؤدي تمديد محلول الـ TPP القلوي بالمحلول الحمضي للكيتوزان الى ترسب المادة الدوائية بوسط التحضير في حال كانت ذات خواص حمضية ضعيفة كالفنتوثين. أدى معقد الفنتوثين والـ CDβHP- لتجنب ترسب الفنتوثين ولكنه بنفس الوقت ساعد على تسرب المعقد خارج الجسيمات المتشكلة بسبب انحلاله بالوسط المائي. في حال استخدام هيدروكسيد الصوديوم في عملية التصالب فإن قلوية المحلول المصالب يقارب 11 ودرجة حموضة المعلق النهائي بلغت 8.9 مما أدى لتكدس واضح للكيتوزان وترسب الفنتوثين في الوسط بسبب فقد مجموعات الكيتوزان المبرتنة شحنتها الموجبة في الأوساط القلوية وتحولها الى عديمة الشحنة مما يضعف من التناثر الكهربائي الساكن بين جسيمات الكيتوزان المتشكلة.

الجدول 1. كفاءة كبسلة مادة الفنتوثين ضمن جسيمات الكيتوزان المحضرة بطريقة التصالب الشاردي وفق شروط مخبرية مختلفة

NP#	Chitosan (mg)	Cross linker	Stabilizer	PHT (mg)	Adding method	EE%±SD	
TPPC _i	0.5	TPP	Tween 80	0.5	Dropping	4.22±0.44	
TPPC _{ii}	0.8					6.22±0.32	
TPPC _{iii}	1					2.8±1.44	
TPPC _{iv}	2					2.7±0.67	
TPPC _{is}	0.5					4.2±1.4	
TPPC _{iiis}	1	NaOH		0.5	Spraying	4.8±1.024	
TPPC _{ivs}	2					5.1±1.04	
NaC _{ii}						3.2±1.4	
TPPC _{iiP0.5}						PEG 0.5	3.22±1.4
TPPC _{iiP1}						PEG 1	5.22±1.02
TPPC _{iiP2}	0.8	TPP	PEG 2		Dropping	7.8±1.04	
TPPC _{iiPVA}			PVA			9.22±1.44	
TPPC _{iiPolo}			Poloxamer 188			5.23±0.67	

تم اللجوء لاستخدام العوامل الفعالة على السطح بغية تأمين انحلالية عظمى للفنتوثين في وسط التحضير وتأمين ثبات الجسيمات الناتجة باعتبارها عوامل مثبتة. كان للتوين 80 كعامل فعال على السطح غير منتشر عديم الشحنة الدور الأفضل مقارنة مع البوليكزامير 188 و PVA و 200 PEG المستخدم بتركيز مختلفة كمحل مساعد للفنتوثين ومانع لتكدس الجسيمات [18]. أدى استخدام العوامل المثبتة الأخرى إلى ترسب الفنتوثين بشكل بلوري واضح الوسط وعدم وجود فارق احصائي في كمية الفنتوثين المترسبة مقارنة مع حالة عدم وجود عامل مثبت في طريقة التصنيع المتبعة كما هو موضح في الشكل 1 والجدول 1.

يهدف زيادة سطح التماس وكفاءة التصالب بين محلولي الكيتوزان والتري بولي فوسفات وتصغير أبعاد الجسيمات المحضرة تم استخدام أداة لرذ المحلول الحاوي على الفنتوثين و TPP ضمن محلول الكيتوزان ذات التراكيز المختلفة. أدت زيادة مساحة سطح التماس الى زيادة ترسب الفنتوثين في الوسط بسبب التعديل السريع لدرجة حموضة محلول الـ TPP التابع لنفاذ حمض الخل عبر محلوله المائي.

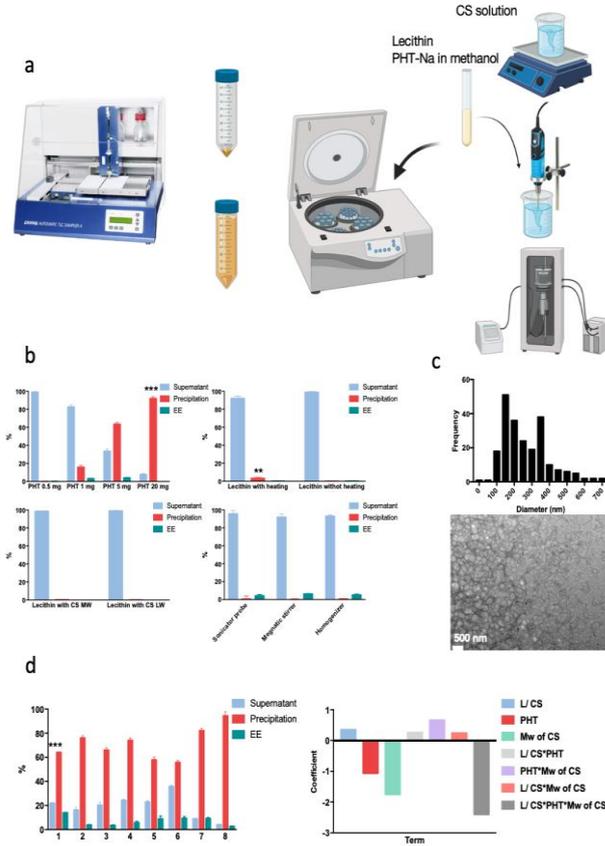
تبين الصور بعد معاينة الشكل الخارجي للجسيمات النانوية المحضرة بتركيز 0.8 ملغ/مل الكيتوزان و 1.75/مل من الترّي بولي فوسفات واستخدام التوين 80 بنسبة 0.2% كعامل مثبت باستخدام المجهر الالكتروني النافذ في الشكل 1. عدم وجود بلورات الفنتوثين وبنفس الوقت عدم تشكل الجسيمات بسبب عدم ثباتها وعودتها الى خيوطها البوليميرية. وبالنتيجة فان جسيمات الكيتوزان النانوية لم يتم تحضيرها بشكل ناجح بعملية التصالب الشاردي وان انحلالية الفنتوثين في الوسط الخارجي والمحفز بوجود -CDβHP- ينقص بشكل كبير من كفاءة كبسلة الطريقة المتبعة.

2. تحضير وقياس كفاءة كبسلة جسيمات الكيتوزان والليسيئين بطريقة الاستحلاب ونفاذية المحل

تعتبر طريقة حقن محلول كحولي للفوسفوليبيدات في الماء طريقة معتمدة في صياغة الليبوزومات [19]. في الدراسة المقدمة فإن حقن محلول كحولي حاوي على الليسيئين في المحلول المائي للكيتوزان يؤدي الى تشكيل الجسيمات النانوية بشكل أكثر احتمالاً من الليبوزومات. حيث تحضر الجسيمات النانوية وفق الدراسات السابقة بحقن المحلول الكحولي لليسيئين بتركيز 25 ملغ/مل في المحلول المائي للكيتوزان الذي يتراوح تركيزه بين 0.025 إلى 0.4 ملغ/مل. توصف الجسيمات المحضرة بحقن محلول الليسيئين الكحولي في المحلول المائي الغير حاوي على الكيتوزان بأنها صغيرة الحجم حيث تبلغ أبعادها أقل من 100 نانومتر وذات شحنة سالبة وبالمقابل فإن حقن محلول الليسيئين ضمن محلول الكيتوزان يوفر شحنة ايجابية السطح وخواص لصوقه حيويًا للجسيمات المنتجة. قام Sonvico وزملاؤه بدراسة نمط الارتباط بين الكيتوزان والليسيئين لتحضير الجسيمات النانوية وفق الطريقة المبينة حيث تمت الدراسة بمقارنة the mean square fluctuations لذرة الهيدروجين في الليسيئين بعد الوصول لدرجة التحول الزجاجي عند الدرجة 220 كلفن قبل وبعد الارتباط بالكيتوزان. بينت الدراسة انخفاض the mean square fluctuations مرتين بعد الارتباط وبالتالي كان للكيتوزان دور بتأمين سلوك ثيرموديناميكي مستقر لليسيئين مشابه للحالة قبل الوصول لدرجة التحول الزجاجي وذلك بدرجة حرارة الغرفة [20]. من ناحية أخرى فان الارتباط بين الليسيئين والكيتوزان الوثيق تم تأكيده من خلال حساب the colloidal particulate density حيث بلغت 0.873 g/cm^3 في الليسيئين منفردا بالمقارنة مع 1.175 g/cm^3 في الجسيمات. تدعم هذه النتائج نظرية أن التنظيم الذاتي للبوليميرين عند الارتباط تؤدي لبنية أكثر كثافة وأن عملية تشكيل الجسيمات بمشاركة الليسيئين والكيتوزان تتعدى كونها مجرد تغليف بسيط للجسيمات المدروسة بالكيتوزان [14].

الجدول 2. كفاءة كبسلة مادة الفنتونين ضمن جسيمات الكيتوزان المحضرة بطريقة الاستحلاب ونفاذية المحل وفق شروط مخبرية مختلفة

NP#	Chitosan (mg)	Lecithin (mg)	Mw of chitosan	PHT (mg)	Temp °C	Stirring Method	EE%±SD
LC _{0.5}	5	200	Low	0.5	25	Homogenizer	0.22±0.04
LC ₅				5			3.2±0.1
LC ₁				1			4.1±0.3
LC ₂₀				20			0
LC _{MMW}			Medium		0		
LC _H			Low	0.5	60	Magnetic stirring	0.2±0.04
LC _{ms}							25
LC _{sp}	Ultra sound probe	4.2±1.4					



الشكل 2. تحضير الجسيمات النانوية باستخدام طريقة الاستحلاب ونفاذ المحل. (a) تحضير جسيمات الكيتوزان الحاوية على مادة فنتونين الصوديوم باستخدام طريقة الاستحلاب ونفاذ المحل. (b) كفاءات الكبسلة الناتجة عن تحضير الجسيمات وفق شروط مختلفة. (c) معاينة الجسيمات النانوية الناتجة باستخدام المجهر الإلكتروني النافذ. (d) كفاءات الكبسلة الناتجة عن تحضير الجسيمات وفق متغيرات العامل F ومعاملات الارتباط الناتجة.

الجدول 3. العوامل المدروسة وقيمها وفق التجربة المصممة بناءً على العامل F

Factors	L/ CS (w/w)	PHT (mg)	Mw of CS
-1	10:1	1	Low
1	20:1	2	High

بينت الدراسة المقدمة عدم تأثير الوزن الجزيئي للكيتوزان المستخدم على كفاءة كبسلة فنتوثين الصوديوم كما هو مبين في الجدول 2 والشكل 2. قد يعود السبب إلى وجود فنتوثين الصوديوم بتركيز منحل تماماً في المحلول الكحولي لليسيثين ونفاذه إلى الطور العضوي حتى بعد مزج الطورين مما يحول دون ارتباطه ضمن خيوط البوليمر المستخدم وبناءً عليه تمت إعادة التجربة باستخدام تراكيز متزايدة من فنتوثين الصوديوم مما أدى إلى ترسب الكمية الفائضة عن الكمية القابلة للانحلال ضمن المعلق النانوي النهائي كما هو مبين في الشكل 2.a. بين Sonvico وزملائه أن كبسلة المواد المحبة للماء في جسيمات الكيتوزان والليسيثين تقريباً تعتبر مستحيلة حيث كانت كفاءة الكبسلة لهذه المواد تقارب الـ 1% وبالمقابل تعتبر الطريقة فعالة بكبسلة المواد الكارهة للماء كالبروجيسترون. أبدى الفنتوثين كدواء كاره للماء سلوكاً مشابهاً للبروجيسترون من حيث زيادة كفاءة الكبسلة مع زيادة كمية المادة المستخدمة في التصنيع ولكن لوحظ وجود تباين في النتائج بسبب الزيادة المرافقة لكمية الدواء المترسبة في الوسط [21].

بينت الدراسات عدم وجود تأثير لطريقة مزج وسرعة المزج على الخواص الفيزيوكيميائية للجسيمات المنتجة وهذا ما يتوافق مع النتائج المبينة إذ لم يكن هناك لاستخدام طرائق المزج المختلفة بالتحريك المغناطيسي أو الأمواج فوق الصوتية أو المجانس الفائق السرعة تأثير ذو دلالة احصائية على كفاءة كبسلة الجسيمات المدروسة. من جهة أخرى وبهدف تسريع التفاعل والتداخل بين الخيوط البوليميرية تم التحضير بتسخين الطور المائي لدرجة 60°C وفقاً لطريقة IIK وزملائه [22] حيث أدى التسخين لخسارة جزء من المحل العضوي الكحولي بالتبخير مما أدى لظهور رسابة الفنتوثين في المعلق النانوي الناتج كما يوضح الشكل 2.b. والجدول 2.

الجدول 4. قيمة معامل الارتباط لكل من العوامل المدروسة وفق العامل F

Term	Coefficient
L/ CS	0.352
PHT	-1.063
Mw of CS	-1.749
L/ CS*PHT	0.259
PHT*Mw of CS	0.662
L/ CS*Mw of CS	0.242
L/ CS*PHT*Mw of CS	-2.4

بينت الصور المجهرية المأخوذة بالمجهر الإلكتروني النافذ تشكل الجسيمات الكروية بشكل واضح الحدود كما أوضحت مخططات توزيع الأبعاد أن متوسط الأبعاد الناتجة بلغ 171.8 نانومتر بانحراف بلغ 45.4 كما يوضح الشكل 2.c.

تم تصميم تجربة مبنية على العامل F وذلك بغية دراسة تأثير تغير عدد من المتغيرات بأقل عدد تجارب ممكنة حيث تم تغيير نسبة الليسيتين الى الكيتوزان وكمية فنتونين الصوديوم المستخدمة في عملية التصنيع والوزن الجزيئي للكيتوزان وفق الجدول. 3.

الجدول 5. كفاءة كبسلة مادة الفنتونين ضمن جسيمات الكيتوزان تبعاً للعامل F

Run	A	B	C	EE%±SD
1	-1	-1	-1	13.94±0.04
2	-1	-1	1	3.821±0.1
3	-1	1	-1	3.55±0.3
4	-1	1	1	5.703±1.2
5	1	-1	-1	8.83±2.4
6	1	-1	1	9.3±1.5
7	1	1	-1	9.1±0.9
8	1	1	1	2.6±0.3

بينت النتائج الموضحة في الجدول. 4 والجدول. 5 والشكل 2b أن لنسبة الليسيتين الى الكيتوزان التأثير الأكبر على كفاءة كبسلة الجسيمات المحضرة بينما كان لكمية الفنتونين وزيادة الوزن الجزيئي للكيتوزان كعاملين منفصلين دوراً سلبياً على كفاءة الكبسلة قد يعود ذلك لكون زيادة العاملين سببت وبشكل معتد به احصائياً زيادة كمية الفنتونين المترسبة بوسط التحضير. من جهة أخرى فإن زيادة كمية الفنتونين المقترنة مع زيادة الوزن الجزيئي للكيتوزان كان له دوراً بزيادة كفاءة الكبسلة ضمن الجسيمات المدروسة والذي قد يعود لزيادة الروابط بين الجزئية المتاحة مما ينتج عنه بنية قادرة على كبسلة الكميات المتزايدة من الفنتونين. كان لزيادة العوامل المدروسة مجتمعة تأثير سلبي على كبسلة الفنتونين مما يدل إلى أن عملية التشكل والكبسلة تتم وفق نسب محددة من المواد المتفاعلة ينبغي العمل على أمثلتها بشكل دقيق للحصول على الجسيمات المطلوبة القادرة على كبسلة المادة الدوائية بكفاءة عالية. تم تمثيل تأثير العوامل المدروسة على كفاءة الكبسلة الناتجة وامكانية التنبؤ بها بالعلاقة:

$$Response\ of\ EE\% = 7.105 + (0.352 * L / CS) + (-1.063 * PHT) + (-1.749 * Mw\ of\ CS) + (0.259 * L / CS * PHT) + (0.662 * PHT * Mw\ of\ CS) + (0.242 * L / CS * Mw\ of\ CS) * (-2.4 * L / CS * PHT * Mw\ of\ CS)$$

3. تحضير وقياس كفاءة كبسلة جسيمات الكيتوزان والليسيين بطريقة الاستحلاب وتبخير المحل

حيث تعتمد الطريقة على حل الليسيين في الاسيتون الحاوي على الفنتونين المنحل في وسط زيتي وهو الترياسيتين. يتم إضافة الطور العضوي إلى الماء الحاوي على عامل فعال على السطح فيحدث التشكل التلقائي للجسيمات النانوية المؤلفة جدرانها من الليسيين الحاوية على النواة الزيتية المكونة من الترياسيتين كنواة حاملة للفنتونين. يتم التخلص من الاسيتون بالتبخير تحت تيار من الآزوت وفصل الجسيمات الناتجة بالترشيح الفائق. يلعب كلاً من الليسيين والعامل الفعال على السطح دوراً مهماً في الطريقة من حيث تشكيل الغلاف الليبيدي والحفاظ على ثبات البنية النانوية المتشكلة. يتميز الاسيتون ببنفاذية سريعة ضمن الطور المائي بالمقارنة مع الميثانول ولكنه غير قادر على تأمين الانحلالية المثلى لليسيين مما يؤدي لخلل بتشكيل بنية الجسيمات والترسب اللاحق للمادة الدوائية المكبسلة. بناءً على ماسبق تمت المحاولة مع عدة مزائج بين الايتانول والاسيتون بهدف تحقيق كلٍ من الانحلالية الكاملة لليسيين في الوسط الكحولي وانتشار الاسيتون السريع ضمن الوسط المائي. بينت التجربة أن الوسط العضوي المكون من الايتانول والاسيتون بنسبة 40:60 كان له التأثير الأفضل من حيث تشكل الجسيمات النانوية وكفاءة كبسلة الفنتونين

النتيجة كما يوضح الجدول 6. لم يؤثر وجود الكيتوزان بشكل احصائي على كفاءة الكبسلة مما يدل على أن كبسلة الفنتونين تتم بشكل اساسي عبر وجود الليسيثين في الوسط الذي يلعب دورا كعامل بنائي وان دور الكيتوزان يكمن باعتباره بوليمر تغلفي ذو شحنة موجبة.

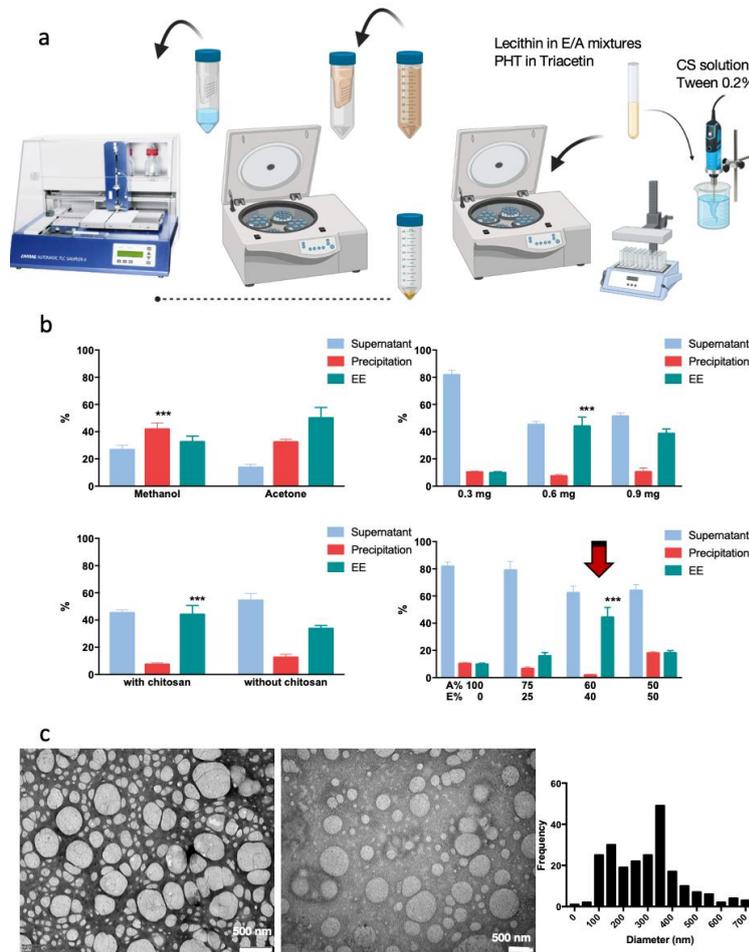
الجدول 6. كفاءة كبسلة مادة الفنتونين ضمن جسيمات الكيتوزان المحضرة بطريقة الاستحلاب ونفاذية المحل وفق شروط مخبرية مختلفة

NP#	Chitosan (mg)	Lecithin (mg)	PHT (mg)	Lecithin solvents	EE%±SD
LC _M	5	200	1.2	Methanol	32.5±4.3
LC _A			1.2	Acetone	50±7.8
LC _{AE 75}			1.2	Acetone 75 + Ethanol 25	15.9±2.56
LC _{AE60}			1.2	Acetone 60 + Ethanol 40	44.405±7.18
LC _{AE50}			1.2	Acetone 50 + Ethanol 50	18.1±1.78
LC _{AEp0.3}			0.3	Acetone 60 + Ethanol 40	9.8±0.8
LC _{AEp0.6}			0.6	Acetone 60 + Ethanol 40	44±6.7
LC _{AEp0.9}			0.9	Acetone 60 + Ethanol 40	38.6±3.45
L _{AE}	0		1.2	Acetone 60 + Ethanol 40	33.67±2.3

تمت زيادة كمية الفنتونين الداخلة بعملية الصياغة من 0.3 حتى 1.2 ملغ ودراسة تأثير الزيادة على كفاءة الكبسلة ولم يتم دراسة كميات فنتونين أكبر من 1.2 ملغ بسبب حدود انحلالية الفنتونين في الترياسيتين والتي تقدر بـ 6 ملغ/مل. ترافقت زيادة كميات الفنتونين المستخدمة مع زيادة كفاءة الكبسلة بعكس الطرق السابقة مما يدل على نجاح عملية الكبسلة ضمن الجسيمات النانوية المصغرة كما يبين الشكل 3. a. توافقت هذه النتائج مع دراسات سابقة أثبتت فعالية طريقة التحضير المتبعة بكبسلة العديد من المواد الدوائية الغير منحلة بالماء باستخدام بوليمرات تغليف عديدة منها polyvinylacetate, polyvinylchloride, poly cabro-caprolactone, ethylcellulose.

على الرغم من البساطة الظاهرية لطريقة التحضير المتبعة إلا انها تتضمن العديد من الظواهر الهيدروديناميكية على سطح النواة الزيتية، إذ أن اضافة طور زيتي اسيتوني الى الطور المائي يؤدي لحدوث استحلاب تلقائي للمحلول الزيتي بشكل قطرات نانوية كنتيجة للزيادة الكبيرة المفاجئة للتوتر السطحي التابع للنفاذ السريع للاسيتون ضمن الوسط المائي والاضطراب البيئي في السطح الفاصل بين سائلين غير متوازنين وفق ما يطلق عليه بقوانين Marangoni المتضمنة هجرة المادة المنحلة بين سائلين ذوي لزوجة مختلفة وقدرة نفاذية مختلفة [23]. وفقاً لذلك يهاجر كل من الكيتوزان الغير منحل في الطور العضوي والمنحل في الطور المائي ذو اللزوجة الأعلى والليسيثين الغير منحل في الطور المائي والمنحل في الطور العضوي ذو النفاذية الأعلى الى سطح التماس بين الطورين ينتج عن النفاذية السريعة للطور العضوي ضمن المائي وبوجود مدروج حاد بتركيز البوليميرين تشكيل بنى كروية ذات أبعاد صغيرة جداً بغية تخفيض التوتر السطحي العالي الناتج بين الطورين بعد الإضافة. يجعل وجود عامل فعال على السطح هذه العملية أكثر تعقيداً بسبب تثبيطه للتدفق البيئي وخفضه التوتر السطحي الحاد بين الطورين الضروري لتشكيل الجسيمات إلا أن وجود عامل فعال على السطح ذو انحلالية عالية في الطور المائي يعتبر اساسياً للحفاظ على الثبات الفيزيائي للجسيمات المصنعة وعدم ترسب المادة الدوائية في وسط التحضير كما تم توضيحه في عمليات التصنيع السابقة. أدت خطة التصنيع الموضحة في الشكل 3. a. إلى تصنيع بنى نانوية ثابتة ذات تحميل دوائي عالي وصل حتى 50% مع امكانية الحصول

عليها بشكل تلقائي ذو تكرارية حيث كانت الجسيمات الناتجة ذات ابعاد 244.35 نانومتر وانحراف معياري 127.8. توافقت النتائج المبينة مع العمل المقدم من قبل Fessi وزملائه حيث تمت كبسلة الاندوميثاسين الغير منحل في الماء والمحمل على نواة زيتية من بنزوات البنزيل ضمن جسيمات اللسيثين بوجود البوليكزامير 188 كعامل فعال على السطح فتم التشكل التلقائي للجسيمات النانوية [15].



الشكل 3. تحضير الجسيمات النانوية باستخدام طريقة الاستحلاب وتبخير المحل. (a) تحضير جسيمات الكيتوزان الحاوية على مادة الفنتونين باستخدام طريقة الاستحلاب وتبخير المحل. (b) كفاءات الكبسلة الناتجة عن تحضير الجسيمات وفق شروط مختلفة. (c) معاينة الجسيمات النانوية الناتجة باستخدام المجهر الالكتروني النافذ.

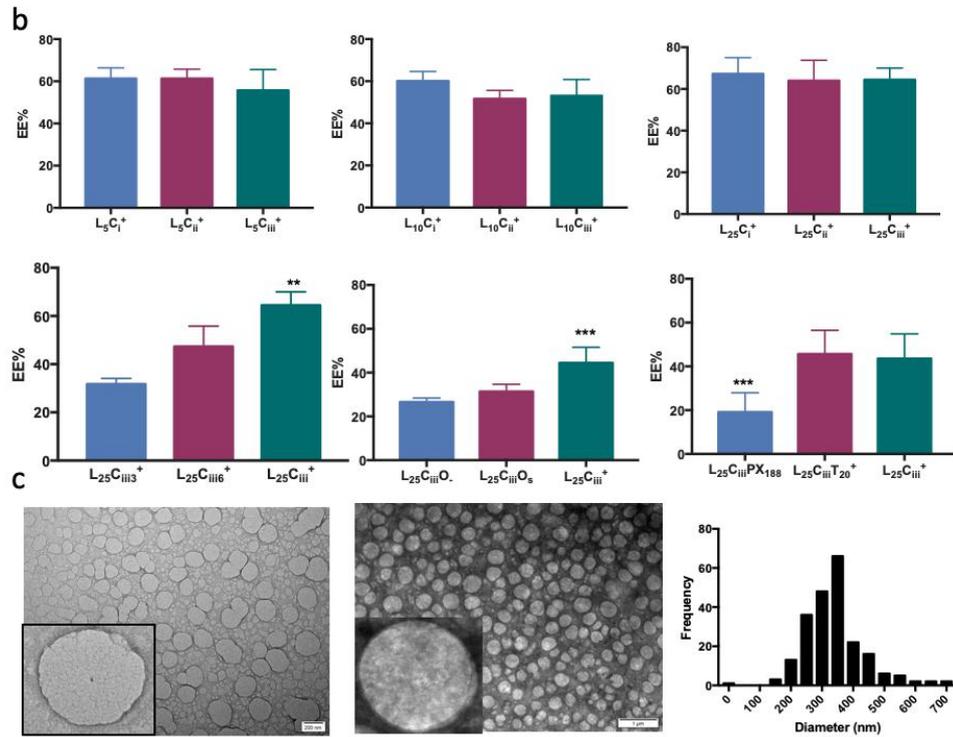
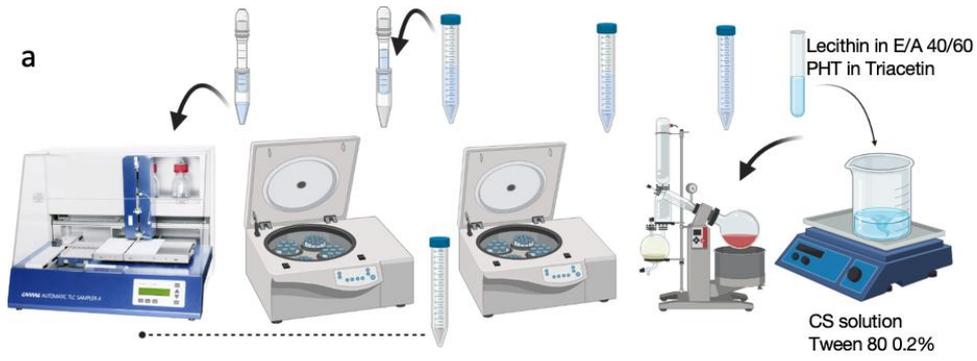
4. تحضير جسيمات الكيتوزان والليسيثين بطريقة الترسيب النانوي والمحملة بمادة الفنتونين

تبقى مشكلة قلة انحلالية الفنتونين في الأوساط المائية من أهم التحديات لاستخدام الفنتونين في المعالجة السريرية وفي عمليات الصياغة. تم في الطريقة التالية استغلال النواة الزيتية من الترياسين كحامل للفنتونين لمنع من البلورة وجعله متاحاً للمعالجة والارتباط بمواقع التأثير استناداً على تطبيق الطريقة الموضحة في 3.3 مع بعض التعديلات من حيث حجوم المحاليل المستخدمة وتركيز المواد والاعتماد على مبدأ الترسيب النانوي للبوليمرات المستخدمة. تم تحضير الجسيمات بحل الكيتوزان في الوسط المائي الحمضي وحل الليسيثين في الوسط العضوي المكون من الايتانول والاسيتون بنسبة 40:60% حيث شرح Gerelli وزملاؤه التداخل بين الكيتوزان والليسيثين لتشكيل الجسيمات النانوية باستخدام مجهر cryo-TEM والذي بين وجود بنية متعددة الطبقات

من الغلاف الليبيدي المحاطة بجزيئات الكيتوزان المشحونة ايجابياً. تم استخدام الكيتوزان المنخفض الوزن الجزيئي والذي يوصف بانحلالية أفضل في الماء مقارنة مع الأوزان الجزيئية الأعلى وسلاسل بوليميرية أقصر والتي تقوم بتشكيل جسيمات نانوية ذات أبعاد أصغر. أدت عملية التحضير إلى الحصول على معلق نانوي ذو درجة حموضة 4.5-5 بما يتوافق مع درجة الحموضة الطبيعية للمخاطية الأنفية [24].

تمت دراسة تأثير العوامل المختلفة على كفاءة كبسلة الجسيمات المحضرة حيث تراوحت كفاءة الكبسلة بين 51-67% لجميع الجسيمات المحضرة باستخدام كميات مختلفة من الكيتوزان تراوحت بين 1.25 و 20 ملغ. لم يكن لزيادة تراكيز الكيتوزان تأثير ذو دلالة احصائية على كفاءة الكبسلة والذي توافق مع ما تم نشره سابقاً مما يؤكد وجود الكيتوزان على سطح الجسيمات. تمت معاينة التبعر المائي للجسيمات المحضرة بطريقة الترسيب النانوي عيانياً ومجهرياً ولم يلاحظ أي تكدسات للجسيمات المصنعة أو ترسب للفنتونين. كما بينت النتائج أن كمية الليستين المستخدمة لم تؤثر على كفاءة الكبسلة عندما لم تتجاوز كمية الليستين المستخدم 20 ملغ، وبالمقابل فإن استخدام تراكيز عالية من الليستين تؤدي لزيادة في كفاءة الكبسلة متناسبة مع زيادة المادة الليبيدية المستخدمة مما يتوافق مع ما بينه Chevalier وزملاؤه بأن زيادة تراكيز الليستين في الصيغة أدت الى تشكل طبقة متينة وسميكة تحيط بسطح النواة الزيتية مما زاد من كفاءة كبسلة الجسيمات المصنعة للمادة الدوائية المدروسة [25].

لوحظ زيادة ذات دلالة احصائية بكفاءة كبسلة الفنتونين من 31-64% ترافقت مع زيادة كمية الفنتونين المستخدمة في التحضير من 1.2 و 3 ملغ كما هو موضح بالشكل 4. والجدول 7. تعتمد كفاءة كبسلة الجسيمات المصنعة بشكل عام على طبيعة المادة الدوائية المكبسلة من حيث كميتها وشحنتها، بين Barbieri وزملاؤه بأن الأدوية المشحونة ايجابياً مثل التاموكسيفين تتنافس مع الكيتوزان على مواقع الارتباط مع الفوسفوليبيدات السالبة الشحنة، وبناءً عليه تتأثر كفاءة الكبسلة مع كمية المادة الدوائية المستخدمة، اما في حال استخدام المواد العديمة الشحنة كالبروجيسترون فلم يكن لكمية المادة الدوائية تأثير احصائي على كفاءة الكبسلة [21]. في دراستنا تبين تأثير زيادة كمية الفنتونين المستخدمة على زيادة كفاءة الكبسلة بغض النظر عن الشحنة المعتدلة للفنتونين. انخفضت كفاءة الكبسلة بشكل احصائي عندما تم حل الفنتونين في الطور العضوي بشكل منفصل عن الترياسيتين وكذلك في الصيغ الغير حاوية على الترياسيتين قد تعود النتيجة الى أن انحلالية الفنتونين في الترياسيتين تفوق 200 مرة انحلاليته في الماء لذلك أبدى الترياسيتين فعالية كبيرة في نقل الفنتونين ضمن النواة الزيتية في الجسيمات المصنعة وتقليل المادة المترسبة في وسط التحضير [26]. توافقت النتائج مع ما وجده Clementino وزملاؤه والذي قام بتحميل الستاتينات على مكون زيتي وهو plus Labrafac™ @Maisine داخل الجسيمات المحضرة مما أدى لزيادة فعالية كبسلة السيمفاساتين بشكل احصائي [27].



الشكل. 4. تحضير الجسيمات النانوية باستخدام طريقة الترسيب النانوي. (a) تحضير جسيمات الكيتوزان الحاوية على مادة الفنتونين باستخدام طريقة الترسيب النانوي. (b) كفاءات الكبسلة الناتجة عن تحضير الجسيمات وفق شروط مختلفة. (c) معاينة الجسيمات النانوية الناتجة باستخدام المجهر الالكتروني النافذ.

الجدول 7، كفاءة كبسلة مادة الفنتونين ضمن جسيمات الكيتوزان المحضرة بطريقة التصالب الشاردي وفق شروط مخبرية مختلفة

NP#	Chitosan (mg)	Lecithin (mg)	Phenytoin (mg)	Surfactant	PHT & triacetine	EE%±SD		
L ₅ C _i ⁺	0.1	5	1.2	Tween 80	Phenytoin was added as a solute in triacetine	61.21± 5.12		
L ₅ C _{ii} ⁺	0.25					61.23 ± 4.44		
L ₅ C _{iii} ⁺	20					55.72 ± 9.8		
L ₁₀ C _i ⁺	1.25	10				Tween 20	Phenytoin and triacetine were added separately	60.12 ± 4.4
L ₁₀ C _{ii} ⁺	5							51.61± 4.1
L ₁₀ C _{iii} ⁺	20							53.26 ± 7.5
L ₂₅ C _i ⁺	0.5	25				Poloxamer 188	Triacetine was not added	67.23 ± 7.8
L ₂₅ C _{ii} ⁺	1.25							63.98 ± 9.5
L ₂₅ C _{iii} ⁺	20							64.46 ± 5.6
L ₃₅ C _{iii} ⁺		35				62.93 ± 2.6		
L ₅₀ C _{iii} ⁺		50	73.95 ± 3.91					
L ₂₅ C _{iii} T ₂₀ ⁺				Tween 20		45.62 ± 10.88		
L ₂₅ C _{iii} PX ₁₈₈				Poloxamer 188		19.08 ± 8.87		
L ₂₅ C _{iii} P ₃ ⁺	20	25	0.3	Tween 80	Triacetine was not added	31.71 ± 2.36		
L ₂₅ C _{iii} P ₆ ⁺			0.6			47.28 ± 8.55		
L ₂₅ C _{iii} O.						1.2	26.59 ± 1.82	
L ₂₅ C _{iii} O _s					Phenytoin and triacetine were added separately	31.39±3.34		

أما بالنسبة لدراسة شكل الجسيمات المحضرة بالمجهر الإلكتروني النافذ فقد أبدت منحنيات تشتت أبعاد الجسيمات المحضرة تجانساً في أبعاد الجسيمات البالغة 311.3 نانومتر بانحراف معياري 67.14. كما أبدت الصور المجهرية زيادة في وضوح وتفاصيل الجسيمات المحضرة مع زيادة كميات الليسيثين والكيتوزان المستخدمة في التحضير وأكدت إمكانية تشكل الجسيمات المدروسة بدون استخدام النواة الزيتية أو الترياسيتين. قدمت الصور المأخوذة من المجهر الإلكتروني النافذ دليلاً متيناً على شكل ومورفولوجيا الجسيمات المصنعة والوصول لصياغة جسيمات كروية مفصولة عن بعضها وخالية من أي تكس.

الاستنتاجات والتوصيات:

تستوجب المعالجة الإسعافية للنوبات الصرعية والاختلاجات المترافقة معها توصيلاً سريعاً للمادة الدوائية المضادة للصرع الى الدماغ بجرعات عالية إذ يتم عادة تجرع جرعات عالية عبر الاعطاء الوريدي مما يسبب آثاراً جانبية حادة. يمكن استخدام

الطريق الأنفي كطريق واعد لإيصال المواد الدوائية الى الدماغ بطرق ايتاء غير باضعة عبر طريق أنفي دماغي مباشر وتجنب المرور الكبدي الأول، ومن جهة أخرى فإن نقص السوائل المتاحة في المخاطية الشمية وضعف انحلالية أغلب المواد الدوائية المضادة للصرع تؤدي الى تباين في امتصاص هذه المواد ويحول دون التوصيل الناجع الى الدماغ. تم تحضير جسيمات الكيتوزان المحملة دوائيا بعدة طرائق وتم الاستعانة بالبروتوكولات المنشورة لتحضير جسيمات الفنتوتئين بغاية تحقيق أعلى كفاءة كبسلة ممكنة وأقل ترسب للمادة الدوائية في وسط التحضير لتجنب التشويش بقياس النتائج الفيزيوكيميائية والسريية وهدر المادة الدوائية المستخدمة في التصنيع.

References:

1. Rampino, A., et al., Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. 455(1-2): p. 219-228.
2. Nagpal, K., S.K. Singh, and D.N. Mishra, Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 2010. 58(11): p. 1423-1430.
3. Shahnaz, G., et al., Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: Bioavailability and pharmacokinetic characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. 428(1-2): p. 164-170.
4. Alishahi, A., et al., Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrate Polymers*, 2011. 86(1): p. 142-146.
5. Sheikholeslami, Z.S., et al., Exploring the effect of formulation parameters on the particle size of carboxymethyl chitosan nanoparticles prepared via reverse micellar crosslinking. *Journal of Microencapsulation*, 2017. 34(3): p. 270-279.
6. Zhao, K., et al., Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*, 2011. 29(47): p. 8549-8556.
7. Bhattarai, N., et al., Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2006. 1(2): p. 181-187.
8. Wei, X.-H., et al., Preparation and in vitro and in vivo characterization of cyclosporin A-loaded, PEGylated chitosan-modified, lipid-based nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2013: p. 601.
9. Mitra, S., et al., Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*, 2001. 74(1-3): p. 317-323.
10. Savolainen, J., et al., Improved dissolution and bioavailability of phenytoin by sulfobutylether- β -cyclodextrin ((SBE)7m- β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) complexation. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. 165(1): p. 69-78.
11. Loftsson, T. and M.E. Brewster, Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. 101(9): p. 3019-3032.
12. Bodmeier, R., K.-H. Oh, and Y. Pramhar, Preparation and Evaluation Of Drug-Containing Chitosan Beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1989. 15(9): p. 1475-1494.

13. Chen, Y.-Z., et al., Novel nanoparticles composed of chitosan and β -cyclodextrin derivatives as potential insoluble drug carrier. *Chinese Chemical Letters*, 2015. 26(7): p. 909-913.
14. Sonvico, F., et al., Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. 324(1): p. 67-73.
15. Fessi, H., et al., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989. 55(1): p. R1-R4.
16. El-Gogary, R.I., et al., Polyethylene Glycol Conjugated Polymeric Nanocapsules for Targeted Delivery of Quercetin to Folate-Expressing Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *ACS Nano*, 2014. 8(2): p. 1384-1401.
17. Pippenger, C.E., J.E. Scott, and H.W. Gillen, *Thin-Layer Chromatography of Anticonvulsant Drugs*. *Clinical Chemistry*, 1969. 15(3): p. 255-260.
18. Kadajji, V.G. and G.V. Betageri, Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers*, 2011. 3(4): p. 1972-2009.
19. Batzri, S. and E.D. Korn, *Single bilayer liposomes prepared without sonication*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1973. 298(4): p. 1015-1019.
20. Sonvico, F., et al., Mean square hydrogen fluctuations in chitosan/lecithin nanoparticles from elastic neutron scattering experiments. *Physica B: Condensed Matter*, 2006. 385-386: p. 725-727.
21. Barbieri, S., et al., Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. 491(1-2): p. 99-104.
22. Ilk, S., N. Saglam, and M. Özgen, Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017. 45(5): p. 907-916.
23. Sternling, C.V. and L.E. Scriven, Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the marangoni effect. *AIChE Journal*, 1959. 5(4): p. 514-523.
24. Gerelli, Y., et al., Structure of Self-Organized Multilayer Nanoparticles for Drug Delivery. *Langmuir*, 2008. 24(20): p. 11378-11384.
25. Chevalier, Y. and M.-A. Bolzinger, *Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013. 439: p. 23-34.
26. Riley, C.M., The effect of triacetin on solubility of diazepam and phenytoin. The University of Arizona, 1990: p. 72.
27. Clementino, A., et al., The nasal delivery of nanoencapsulated statins – an approach for brain delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2016. Volume 11: p. 6575-6590.