مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (41) العدد (1) 2019
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (41) No. (1) 2019

Evaluation of bioactivity of urease microencapsulated by double emulsion-solvent evaporation method: effect of some formulation and process parameters

Dr. Lama AL Haushey*

(Received 4 / 9 / 2018. Accepted 28 / 1 / 2019)

□ ABSTRACT □

The aim of this study was to study the effect of some factors on the bioactivity of microencapsulated urease (a model protein). The double emulsion-solvent evaporation $w_1/o/w_2$ microencapsulation method was used. In order to retain bioactivity of urease, the effect of different factors was studied. The microparticles properties considered were the particle size, the encapsulation efficiency (EE) and the urease bioactivity (UB).

An increase in particle size was shown when poly(ε-caprolactone) was used. Particle size was decreased when sucrose and ethyl acetate were used and when the volume of the outer phase was reduced. A decrease in urease concentration showed also reduction in particle diameter. The encapsulation efficiency was significantly increased when poly(ε-caprolactone) and ethyl acetate (solvent) were used and when urease concentration was reduced. The reduction of outer phase volume and the addition of PEG4000 in the preparation had positive effects on encapsulation efficiency. The ratio: UB/EE was enhanced when poly(ε-caprolactone), sucrose and PEG4000 were used. Urease bioactivity was better retained when dichloromethane was replaced by ethyl acetate (90% of encapsulated urease).

Key words: microparticles, solvent evaporation, double emulsion, urease, encapsulation efficiency, bioactivity, additives.

* **Associated professor- Department Of Pharmaceutics And Pharmaceutical Technology- Faculty Of Pharmacy- Tishrine University e.mail:** lamaalhaushey@yahoo.fr

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (41) العدد (1) 2019
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (41) No. (1) 2019

تقييم الفعالية الحيوية لليورياز المتمحفظ بطريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف : تأثير بعض عوامل التحضير والصياغة

د. لمى الهوشي *

(تاريخ الإيداع 4 / 9 / 2018. قُبِل للنشر في 28 / 1 /2019)

□ ملخّص □

تهدف هذه الدراسة إلى دراسة العديد من العوامل المؤثرة على الفعالية الحيوية لليورياز (بروتين نموذج) المتحمفظ داخل جسيمات دقيقة محضرة بطريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف م1/ز/م2. درس تأثير تغير بعض العوامل: طبيعة المحل والبلمر، حجم الطور الخارجي، تركيز اليورياز وتأثير إضافة بعض المواد في الطورين الداخلي المائي والعضوي. قيّمت أبعاد الجسيمات، فعالية التمحفظ وفعالية اليورياز الحيوية كخصائص للجسيمات الدقيقة المحضرة. زادت أبعاد الجسيمات باستخدام البولي كابرولاكتون (PCL) ونقصت الأبعاد باستعمال خلات الإيتيل، بإضافة السكاروز وبانخفاض كل من تركيز اليورياز وحجم الطور المائي الخارجي. بين التحليل الإحصائي أن فعالية التمحفظ ازدادت باستعمال الـ PCL وبإضافة بعض المواد مثل الـ PEG4000 في الطورين الداخلي المائي والعضوي وبإنقاص تركيز اليورياز في الطور المائي الداخلي. كذلك ازدادت فعالية التمحفظ عند استحلاب الطور العضوي في حجم قليل من الطور المائي الخارجي م2 وعند استخدام خلات الإيتل. عند مقارنة: نسبة الفعالية الحيوية لليورياز إلى فعالية التمحفظ، لوحظت زيادة هامة في هذه النسبة باستعمال الـ PCL وبإضافة بعض السواغات مثل السكاروز في الطور المائي الداخلي و الـ PEG4000 في الطورين الداخلي المائي والعضوي. كما زادت نسبة الفعالية الحيوية إلى فعالية التمحفظ بشكل ملحوظ باستخدام خلات الإيتيل كمحل عضوي حيث بلغت 90% وذلك عند المقارنة مع الصيغة المرجعية F1.

الكلمات المفتاحية: جسيمات دقيقة، تبخر المحل، استحلاب مضاعف، يورياز، فعالية التمحفظ، فعالية حيوية، مواد مضافة

*أستاذ مساعد في قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية- كلية الصيدلة – جامعة تشرين- اللاذقية- سورية
e.mail: lamaalhaushey@yahoo.fr

مقدمة

ازداد توفر واستخدام البروتينات علاجياً في الآونة الأخيرة نتيجة التطور السريع والكبير في التقانات الحيوية (Bilati et al. 2005)، وتأتي أهمية البروتينات من كونها العلاج الوحيد والنوعي لكثير من الأمراض مثل: الأنسولين، هرمون النمو growth hormone، الأريتروبويتين.....

تتميز البروتينات ببنية هشة وحساسة للوسط الحيوي (Kyekyoon et al. 2006) مما يعني إيتاءها حقناً وبشكل متكرر للتغلب على نصف عمرها القصير وللحصول على التراكيز العلاجية (Wang et al. 2013).

تتطلب صياغة البروتينات احتياطات خاصة من أجل الحفاظ على بنيتها الفراغية الضرورية للفعالية الحيوية (Rafi Md et al. 2010) حيث يؤدي عدم ثباتية البروتين إلى ردود فعل سيئة (Diwan et al. 2001).

تعتبر طريقة التمحفظ الدقيق (الميكروكبسلة) تقنية هامة في تطوير أشكال صيدلانية حاوية على بروتينات فهي تهدف إلى حجز مادة فعالة ضمن جسيمات بلمرية كروية صغيرة تتراوح أبعادها بين 1 و1000 ميكرون وتلعب هذه الجسيمات الدقيقة دوراً في حماية المواد المتمحفظة وتعديل تحررها وتحسين مطاوعة المرضى لقدرتها على إنقاص تكرار التجريع.

من بين طرائق التمحفظ الدقيق المستخدمة تحتل طريقة تبخر المحل (solvent evaporation) بواسطة الاستحلاب البسيط ز/م أو المضاعف م1/ز/م2 موقعاً هاماً وذلك لبساطتها وقلة تكلفتها (Katare et al. 2006, Ruan et 2002 al. ولاستخدامها الشائع في ميكروكبسلة البروتينات (N. Teekamp et al. 2015, Al haushey et al. 2007).

تتضمن طريقة تبخر المحل عدة عوامل مؤثرة على ثبات الجزيئات البروتينية الهشة فالتحريك (أحياناً القوي) والتماس مع المحلات العضوية (F.T. Meng et al. 2004, W.S. Jiang et al. 2001, Chang et al. 1996, Alonso et al. 1994) يعرضان البروتينات إلى ضياع في الفعالية الحيوية. كما أن السطوح البينية الفاصلة الكبيرة المتشكلة بين طوري المستحلب زيت/ ماء (Perez et al. 2003, Tamber et al. 2005) تعرض البروتين للامتزاز عليها وبالتالي ضياع جزء من فعاليته.

بما أن صياغة شكل صيدلاني حاو على بروتينات تتطلب مراعاة بنيتها الحساسة فمن الممكن إضافة بعض المواد لزيادة ثباتها. في الأدبيات تطرقت دراسات كثيرة إلى زيادة ثبات البروتينات بإضافة مواد معينة مثل zinc acetate حيث تؤدي هذه الإضافة إلى زيادة ثباتية الانسولين بالحفاظ على بنيته الفراغية مما يمنع تجمعه وتراكمه على السطح الفاصل: زيت/ماء (Manoharan and Singh, 2015). كما أن لنقص لزوجة الطور العضوي دور في ثبات البروتين بتقليل تعرض البروتين إلى السطح الفاصل ماء/محل عضوي (Hnaien et al. 2011). من بين العوامل الأخرى المحسنة لثبات البروتينات: تخفيض فترة التماس بين البروتين والمحل العضوي عبر استبدال خلات الإيتل بديكلورروميتان (F.T. Meng et al. 2004) وإضافة المالتوز والبولي إيتيلين غليكول PEG 5000 في الطور الداخلي (Pérez-Rodriguez C et al. 2003). كما أن زيادة تركيز البروتين المتمحفظ تقود إلى حمايته من إحداث تجمعات في السطوح الفاصلة (Tamber H et al. 2005 –Perez C et al 2002).

من وسائل التحري عن الحفاظ على فعالية البروتينات، استخدام الأنزيمات كجزيئات بروتينية نموذج (موديل) وذلك لسهولة تحديد فعاليتها. توجد دراسات عديدة تدرس تأثير عملية التمحفظ الدقيق على انزيمات (نموذج) ومنها: الليزوزوم Lysozyme (Swed et al. 2014, Meng 2003, Srinivasan 2005)، غاما –الكيموتريبسين

gamma-chymotrypsin (Castellanos, 2002)، البيروكسيداز (Montalvo-Ortiz et al. 2012)، اليورياز urease (Sturesson et al. 2000)،....

أهمية البحث وأهدافه:

تكمن أهمية هذا البحث المسجل والمجرى في كلية الصيدلة- جامعة تشرين خلال عام 2018 في تحسين ثبات البروتينات ذات البنية الحساسة خلال عملية الصياغة الصيدلانية. كما تأتي أهمية هذا البحث من خلال إمكانية تطوير طريقة لتحضير أشكال صيدلانية حديثة (جسيمات دقيقة) حاوية على بروتينات وبالتالي الاستمرار في تعريف السوق المحلية بهذه الأشكال الحديثة.

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير بعض عوامل الصياغة والتحضير على الفعالية الحيوية لليورياز (بروتين نموذج متوفر مخبرياً) المتمحفظ باستخدام طريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف م$_1$/ز/م$_2$. من العوامل المدروسة: طبيعة البلمر (Eudragit RS100 أو poly(ε-caprolactone))، طبيعة المحل العضوي (ديكلوروميتان وخلات الإيتيل)، إضافة بعض المواد مثل السكاروز وPEG4000، حجم الطور الخارجي وتركيز اليورياز (تمديد بالوقاء الفوسفاتي أو بمحلول PVA 0.5%).

طرائق البحث ومواده:

1- المواد

عتيدة اليوريا اللونية (Biosystem, Spain)، ديكلوروميتان DCM (SURECHEM)، خلات الإيتيل AE (AVONCHEM)، كحول بولي فينيلي PVA (TitanBiotech, India)، بولي كابرولاكتون PCL 45000 (Sigma- Aldrich)، بولي ايتيلين غليكول 4000 (SRL, India)، فوسفات أحادية الصوديوم (LOBAchemie, India) وفوسفات ثنائية الصوديوم (Qualikems, India) مواد أخرى مختلفة مثل إيدراجيت RS100، سكاروز.

2- الطرائق

2-1- تحضير الجسيمات الدقيقة

حضرت الجسيمات الدقيقة بواسطة طريقة تبخر المحل عبر تشكيل مستحلب (Al haushey et al. 2018). حضر طور عضوي حاو على البلمر (PCL أو الإيدراجيت RS100) ثم استحلب الطور المائي الحاوي على اليورياز (بتركيزين مختلفين 100 أو 50 وحدة/0.2مل) ضمن الطور العضوي الحاوي على DCM أو AE تحت التحريك (Scilogex D160 homogenizer) لمدة 30 ثانية وبسرعة 15000 rpm للحصول على مستحلب م$_1$/ز. استحلب المستحلب المتشكل في كمية قليلة (5 أو 10مل) من الطور الخارجي المائي (PVA 0.5%) بواسطة نفس المحرك لمدة 30 ثانية ليتشكل مستحلب مضاعف بدئي م$_1$/ز/م$_2$ حاو على قطيرات زيتية غير متصلبة بعد. نقل المستحلب المضاعف الناتج إلى 40 أو 45 مل PVA (0.25%) تحت التحريك بواسطة محرك ميكانيكي (Heidolph RZR 2021, Germany) لمدة ساعة وبسرعة (500 rpm) ليتم تصليب القطيرات وتشكيل للجسيمات الدقيقة. جمعت الجسيمات بالترشيح (Zelpa, thickness 0.33mm) ومن ثم جففت بالهواء. تمت إضافة بعض المواد مثل السكاروز أو PVA في الطور المائي الداخلي أوالـ PEG4000 في الطور الداخلي المائي والطور العضوي. يبين الجدول (1) مكونات الصيغ المختلفة المحضرة.

جدول 1: الصياغات المختلفة التي تم وفقها تحضير الجسيمات الدقيقة

العامل المدروس / رقم الصيغة	كمية إيدراجيت RS100 (غ)	كمية PCL (غ)	تركيز اليوبياز (وحدة/0.2مل)	كمية السكاروز (غ)	كمية PEG في الطور الداخلي (غ)	كمية PEG في الطور العضوي (غ)	PVA في الطور الداخلي	حجم DCM (مل)	حجم AE (مل)	حجم م2 (مل) في مرحلة قبل التصلب
F1	0.5	–	100	–	–	–	–	3	–	10
F2	–	0.5	100	–	–	–	–	3	–	10
F3	0.5	–	100	–	0.05	–	–	3	–	10
F4	0.5	–	100	–	0.05	–	–	3	–	10
F5	0.5	–	100	0.05	–	–	–	3	–	10
F6	0.5	–	100	–	–	–	–	–	3	10
F7	0.5	–	100	–	–	–	–	3	–	5
F8	0.5	–	*50	–	–	–	–	3	–	10
F9	0.5	–	*50	–	–	–	نعم	3	–	10

* تم الحصول على تركيز يورياز: 50 وحدة/0.2مل بواسطة التمديد بوقاء فوسفاتي: pH=7 (F8) أو بمحلول PVA 0.5% (F9)

2-2- تحديد خصائص الجسيمات الدقيقة Microparticles characterization

تحديد الأبعاد

تم تحديد الأبعاد بواسطة المجهر الضوئي (Wet zlar BX 300) عن طريق عد 200 جسيمة ضمن الساحة المجهرية. قسّم مجال الأبعاد الكلي الذي تنتمي إليه الجسيمات الدقيقة إلى تحت مجالات ذوات متوسطات أبعاد محددة. أحصي عدد الجسيمات التابعة لكل مجال أبعاد ثم تم تحديد متوسط البعد للجسيمات الدقيقة (لكل تحضيرة) بتطبيق العلاقة التالية (Allen et al. 2005, Parrott, 1970):

$$\text{متوسط البعد} = \frac{\text{مجموع (عدد الجسيمات الدقيقة * متوسط البعد الموافق لكل مجموعة)}}{\text{عدد الجسيمات الكلية المعدودة}}$$

تحديد فعالية التمحفظ

تحل كمية معينة من الجسيمات الدقيقة ضمن 1مل DCM وبعد الانحلال التام، يستخلص اليورياز ضمن 4مل ماء مقطر لمدة نصف ساعة. تحدد كمية اليورياز في المحلول المائي الراشح (عبر مرشحة مثبتة على محقنة: Isolab. 0.45µ) بواسطة الـ Spectrophotometer (Model T60 U, PG Instuments Ltd, England) عند طول موجة 280 نانومتر.

يتم حساب فعالية التمحفظ من العلاقة التالية:

$$\text{فعالية التمحفظ} = \frac{\text{الكمية الفعلية (الحقيقية) لليوبياز ضمن كمية معينة من الجسيمات الدقيقة}}{\text{الكمية النظرية ضمن نفس الوزن من الجسيمات الدقيقة}} * 100$$

تحديد الفعالية الحيوية لليورياز

تم تحديد الفعالية الحيوية لليورياز (في الطور الداخلي بالنسبة إلى الكمية الكلية البدئية) بشكل معدل قليلاً عن الطريقة المستخدمة من قبل Alhakim وزملائه في دراسة منشورة عام 2012. باختصار، تحل كمية معينة من الجسيمات الدقيقة ضمن 1مل DCM ومن ثم يستخلص اليورياز ضمن 4مل وقاء فوسفاتي (pH: 7) لمدة نصف ساعة. تم

تحديد الفعالية الحيوية لليورياز في المحلول المائي بطريقة لونية باستعمال اليوريا كركيزة وقياس شوارد الأمونيوم المتحررة باستعمال هيبوكلوريت Na وساليسيلات Na مما يؤدي إلى تشكل مركب ملون (الإندوفينول) والذي تقاس امتصاصيته للأشعة الضوئية في المجال المرئي عند 600 نم بواسطة الـ Spectrophotometer (Model T60 U, PG Instuments Ltd, England).

2-2-1- التحليل الإحصائي

حللت جميع النتائج إحصائياً باستخدام اختبار t-Student وقد اعتبرت الفروق ذات أهمية عندما كانت *p* أصغر أو تساوي 0.05.

النتائج والمناقشة:

تم مراعاة البنية الحساسة للبروتينات أثناء عملية التحضير فقد اختصر زمن مرحلتي الاستحلاب إلى 30 ثانية، كما أن تشكل الاستحلاب المضاعف في كمية قليلة من الطور الخارجي المائي تمنع الانتشار السريع للمحل إلى الطور الخارجي المائي (خاصة في حال استخدام خلات الإيتيل كمحل) وتفيد بالنتيجة في تشكل جسيمات كروية غير مشوهة. تم إضافة بعض المواد بهدف تحسين فعالية اليورياز الحيوية ومنعه من التخرب كما تم تعديل بعض شروط الصياغة من أجل نفس الهدف.

1- ***تأثير العوامل المدروسة على الأبعاد***

تراوحت أبعاد الجسيمات الدقيقة المحضرة وفق الصيغ التسع بين 54 و209ميكرون (الجدول 2).

الجدول 2: متوسط أبعاد الجسيمات المحضرة وفق الصيغ المختلفة

الخاصة المدروسة / رقم الصياغة	متوسط الأبعاد S.D±M (ميكرون)
F1	196± 2.5
F2	209± 2.5
F3	193± 3
F4	194± 4.5
F5	106± 3.5
F6	54± 3
F7	99± 6.5
F8	63± 1.5
F9	101± 5.5

أدى استخدام الـ PCL إلى زيادة في الأبعاد والذي يمكن تفسيره باختلاف طبيعته عن الإيدراجيت RS100 وزيادة لزوجة محلوله المحتملة مما يجعل من الصعب تجزئة قطيرات الطور العضوي إلى قطيرات أصغر.

ترافقت إضافة السكاروز في الصيغة F5 مع تصغير أبعاد الجسيمات الدقيقة الموافقة وربما يعود ذلك إلى قدرة السكاروز على تعديل الفرق بالضغط الحلولي بين الطورين المائيين: الداخلي والخارجي وبالتالي لا يدخل الماء من الطور الخارجي إلى الطور الداخلي ولا يلاحظ بالنتيجة انتفاخ في الجسيمات أو كبر في الأبعاد.

عند استخدام خلات الإيتيل كمحل مكان ديكلوروميتان لوحظ انخفاض في الأبعاد وذلك نتيجة الانتشار السريع لخلات الإيتيل من القطيرات الزيتية باتجاه الطور المائي الخارجي أي لا يترك أي وقت لتعود القطيرات تندمج وتزداد أبعادها.

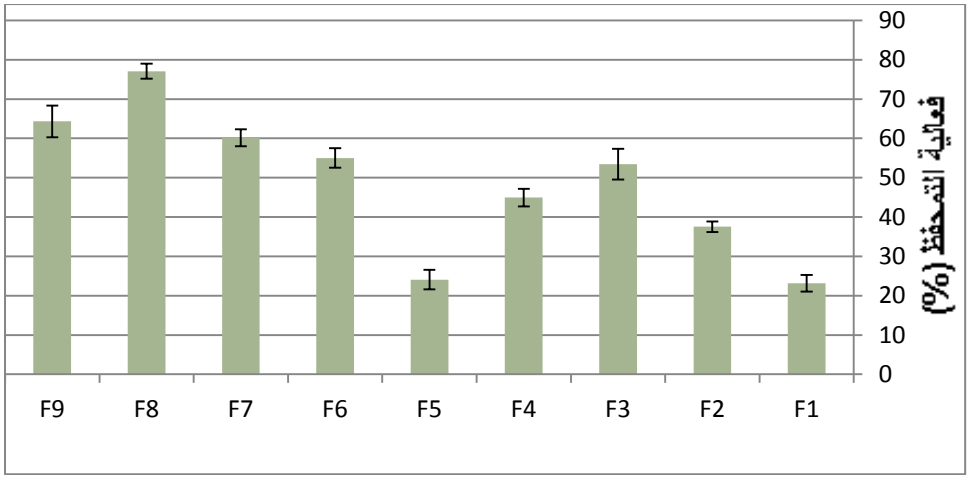
يلاحظ انخفاض في الأبعاد كذلك عند استحلاب المستحلب الاولي م1/ز في كمية قليلة من الطور المائي الخارجي (الصيغة F7) وذلك عائد إلى فعالية التحريك أكثر في تقسيم القطيرات عندما يكون حجم الجملة قليلاً (Al haushey et al. 2007, Benoit et al. 1999).

بالنسبة إلى الانخفاض في الأبعاد المترافق مع انخفاض تركيز اليورياز في الطور المائي الداخلي فيمكن تفسيره بتعادل الضغط الحلولي بين الطورين المائيين: الداخلي والخارجي (عند المقارنة مع F1) وبالتالي التقليل من انتشار الماء الخارجي إلى الطور الداخلي والحد من انتفاخ القطيرات وقد لوحظ هذا التغير في الأبعاد عند عدم تعادل الضغط الحلولي بين الطورين المائيين الداخلي و الخارجي في دراسات مختلفة (Al haushey et al. 2007, Han et al. 2001)

بالنسبة إلى بقية العوامل المدروسة فلم تكن هناك فروق هامة في الأبعاد مقارنة مع الصيغة المرجعية.

2- تأثير العوامل المدروسة على فعالية التمحفظ

تراوحت فعالية تمحفظ اليورياز داخل الجسيمات الدقيقة بين 23 و 77% (الشكل 1) وكانت عوامل الصياغة المؤثرة في زيادة فعالية التمحفظ هي: استخدام PCL كبلمر وإضافة بعض المواد مثل الـ PEG4000 في الطورين الداخلي المائي والعضوي وإنقاص حجم الطور الخارجي المائي م2 خلال مرحلة ما قبل التصلب. ازدادت فعالية التمحفظ كذلك عند استخدام خلات الإيتل كمحل عضوي بدلاً من ديكلوروميتان وعند إنقاص تركيز اليورياز في الطور الداخلي (سواء بالتمديد بالوقاء أو بمحلول PVA 0.5%).



الشكل 1: فعالية تمحفظ اليورياز ضمن الجسيمات الدقيقة المحضرة وفق الصيغ المختلفة

أدى استخدام الـ PCL كبلمر إلى زيادة فعالية التمحفظ ($P<0.05$) عند المقارنة مع الإيدراجيت RS100 (الصيغتان 1 و2 من الجدول 2) ويفسر ذلك بطبيعة الـ PCL الكارهة للماء والتي تشكل حاجزاً أمام زيادة انتشار اليورياز (أو محلوله) إلى الطور الخارجي بالمقارنة مع جزيئة الإيدراجيت RS100 الحاوية على بعض المناطق المحبة للماء العائدة لمجموعات الأمونيوم الرباعية (Handbook of pharmaceutical excipients).

بإضافة الـ PEG4000 سواء في الطور العضوي أو المائي لوحظت زيادة في فعالية التمحفظ ($P<0.05$) ويرجح السبب إلى زيادة اللزوجة الميكروية الحاصلة نتيجة هذه الإضافة وبالتالي الحد من هجرة اليورياز إلى الطور الخارجي. لاتتوافق هذه النتيجة مع النتائج التي توصل إليها الباحث Bhatt وزميله عام 2012 حيث لاحظ نقصاً في فعالية التمحفظ بسبب البنية المسامية التي تخلفها هجرة الـ PEG1450 من الطور العضوي الموضوع فيه إلى الطور الخارجي. إلا أن الباحث Bhatt وزميله قد استخدما الـ PEG1450 ذي الوزن الجزيئي الأخفض والانحلالية الأكبر

في الماء مقارنة مع الـ PEG4000 المستخدم في دراستنا (Handbook of pharmaceutical excipients) مما يعني هجرة أقل لـ PEG4000 المستخدم في دراستنا إلى الطور الخارجي.

لم يظهر أي تأثير لإضافة السكاروز في الطور الداخلي المائي على فعالية المتمحفظ ($P>0.05$) ضمن الجسيمات. لم تتوافق نتائج دراستنا مع نتائج الدراسة التي أجراها Srinivasan وزملاؤه عام 2005 حيث أن إضافة السكاروز في الطور الداخلي أدت إلى نقص في فعالية تمحفظ الليزوزوم. كذلك لم تتوافق نتائج دراستنا مع الدراسة التي قامت بها الباحثة Sturesson وزميلها عام 2000 حيث أدت إضافة السكاروز إلى زيادة هامة في فعالية التمحفظ حيث فسرا النتائج بكون اليورياز يرتبط مع السكاروز أكثر من ارتباطه مع المحل العضوي مما يمنع انتشار البروتين من الطور المائي الداخلي. ربما يعود هذا الاختلاف بين نتائج الدراستين إلى اختلاف تراكيز السكاروز المستخدمة.

لكن عند ربط نتائج فعالية التمحفظ مع الأبعاد يتبين أن جسيمات الصيغة الحاوية على سكاروز كانت أصغر من ابعاد جسيمات الصيغة المرجعية مما يعني أنه ربما ترافق وجود السكاروز مع زيادة في فعالية التمحفظ ولكن الابعاد الصغيرة الموافقة لـ F5 جعلت فعالية التمحفظ تنقص لتصبح قريبة من القيمة المسجلة لـ F1، أي أنه لم يلحظ أي تأثير إيجابي لإضافة السكاروز على فعالية التمحفظ وقد شوهد هذا الترافق بين تصغير الأبعاد ونقص فعالية التمحفظ في دراسات اخرى (Al haushey et al. 2012, Maiti et al. 2009, Alex et al. 1990).

عند استبدال خلات الإيتيل كمحل عضوي بدي كلوروميتان لوحظت زيادة في فعالية التمحفظ مقارنة مع الصيغة الأساسية F1 ($P<0.05$) ويمكن تفسير ذلك بالتصلب السريع للجسيمات الدقيقة نتيجة انتشار خلات الإيتيل الكبير باتجاه الطور المائي الخارجي (F.T. Meng et al. 2003) مقارنة مع الديكلوروميتان.

أدى استحلاب الطور العضوي ضمن كمية صغيرة من الطور المائي الخارجي إلى زيادة هامة في فعالية التمحفظ ($P<0.05$) ويفسر ذلك بزيادة اللزوجة الموضعية الحاصلة في الجملة نتيجة زيادة نسبة الطور المبعثر الداخلي في حجم قليل من الطور الخارجي والتي كانت كافية للحد من انتشار وهجرة اليورياز إلى الطور الخارجي وبالتالي زيادة فعالية التمحفظ. كما أن زيادة اللزوجة الحاصلة تؤدي إلى نقص سرعة تبخر المحل العضوي بالتالي احتمال إعادة حل للبلمر الموجود على السطح من قبل المحل العضوي وبالتالي تشكل بنية أقل مسامية تزيد من فعالية التمحفظ (Yang et al. 2000).

أما في الصيغتين F8 وF9 اللتين تحويان تركيز يورياز أقل في الطور الداخلي فإن زيادة فعالية التمحفظ الملاحظة ($P<0.05$) يمكن أن تفسر بنقص مدروج التركيز بين الطورين الداخلي والخارجي وبالتالي بقاء نسبة يورياز أكبر في الطور الداخلي أي زيادة فعالية التمحفظ. سجّل هذا التأثير أيضاً في دراسة أجراها .Lamprecht A وزملاؤه عام 2000 وكذلك في دراسة قام بها Haggag وزملاؤه عام 2017 على الأنسولين وقد تم تفسير هذه الظاهرة بأنه عند زيادة مدروج التركيز بين الطورين المائيين: الداخلي والخارجي فإن البروتين يندفع باتجاه الطور الخارجي المائي. كما يمكن أن ترجح الزيادة الحاصلة في فعالية التمحفظ إلى معادلة الفرق في الضغط الحلولي بين الطورين المائيين: الداخلي والخارجي نتيجة إضافة الوقاء أو PVA، ومن المعروف أن ضبط الضغط الحلولي يؤدي إلى زيادة فعالية التمحفظ (Al haushey et al. 2007, Srinivasan et al. 2005).

بيّن التحليل الإحصائي لنتائج فعالية التمحفظ للصيغتين F8 وF9 أن التمديد بالوقاء الفوسفاتي قادر على زيادة فعالية التمحفظ أكثر من التمديد بمحلول PVA (0.5 %) ويمكن تفسير ذلك بقدرة الوقاء الفوسفاتي على تعديل الفرق الحاصل في الضغط الحلولي بين الطورين المائيين وبالتالي الحد من انتشار اليورياز إلى الطور الخارجي أي زيادة في

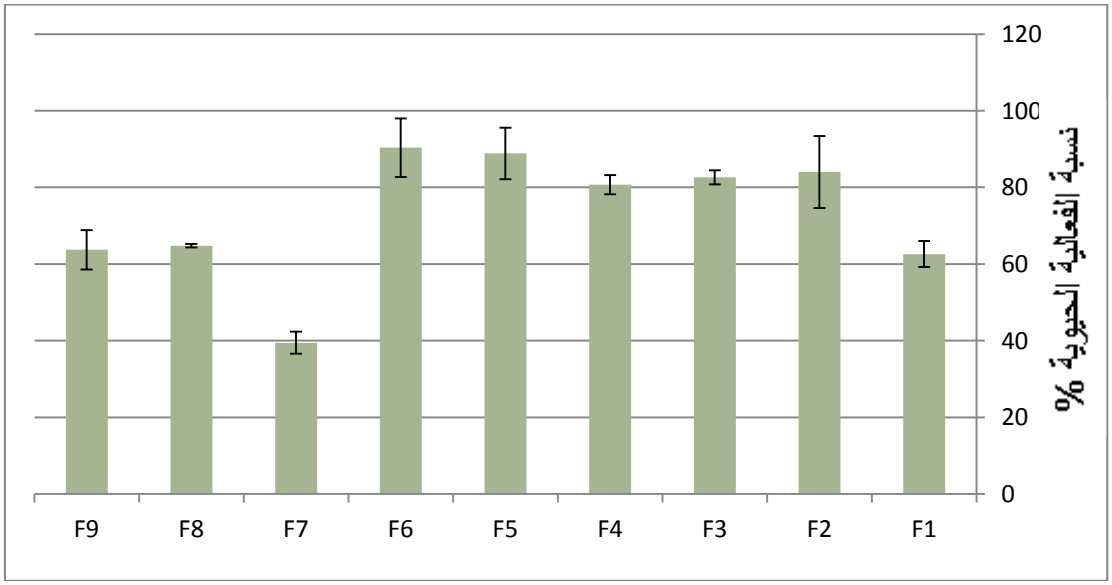
فعالية التمحفظ. بينما في الصيغة F9 ربما يتولد فرق قليل في الضغط الحلولي بين الطورين المائيين وتتبعه هجرة لليورياز إلى الطور الخارجي لتنخفض معها فعالية التمحفظ مقارنة مع الصيغة F8. ربما تكون الزيادة الحاصلة في أبعاد جسيمات الصيغة F9 مقارنة مع جسيمات الصيغة F8 عائدة إلى انتفاخ القطيرات نتيجة ظاهرة الضغط الحلولي هذه.

3- تأثير العوامل المدروسة على فعالية اليورياز الحيوية

يتم التعبير عن الفعالية الحيوية لليورياز في هذه الفقرة بالنسبة بين الفعالية الحيوية في الطور الداخلي وفعالية التمحفظ وسيتم استخدام تعبير "نسبة الفعالية الحيوية" للتعبير عن هذه النسبة. تراوحت نسبة الفعالية الحيوية بعد عملية التمحفظ الدقيق بين ≈ 40 و 90% (الشكل 2). من العوامل التي تزيد من هذه النسبة ($p<0.05$): إضافة السكاروز والـ PEG4000 في الطورين المائي الداخلي والعضوي. كما احتفظ اليورياز بفعالية حيوية كبيرة عند استخدام الـ PCL وخلات الإيتيل كمحل عضوي بدلاً من ديكلوروميتان.

من المعروف أن استخدام البلمرات الكارهة للماء في التمحفظ يؤدي إلى ضياع في الفعالية الحيوية للبروتينات (Lopac SK et al. 2009) إلا أنه في هذه الدراسة كان لتقليل وجود البيئة المحبة للماء في الصيغة F2 الحاوية على PCL التأثير الأكبر في حماية اليورياز من التخرب وذلك بالمقارنة مع الصيغة F1 الحاوية على الإيدراجيت RS100 ($P<0.05$).

في دراسة أجراها Jiang وزميله عام 2001 تبين أن التأثير الحامي لـ PEG يتوقف على نسبته إلى البلمر فقد بينت الدراسة أن نسبة لـ PEG أقل من 20% فإنه لايلاحظ تأثير حام للبروتين. أما في دراستنا فقد لوحظ احتفاظ كبير لليورياز بفعاليته الحيوية (83 و81%) عند استخدام الـ PEG4000 بتركيز أقل من 20% وربما يعود عدم التوافق بين هذه الدراسة والمرجعية ودراستنا إلى اختلاف طبيعة الأنزيم المتمحفظ وطبيعة البلمر المستخدم. تتوافق نتيجة دراستنا مع الدراسة التي قام بها الباحث Pérez-Rodriguez وزملاؤه عام 2003 والتي قاموا فيها بإضافة PEG5000 إلى الطور المائي الداخلي أو الطور العضوي ولاحظوا عدم ضياع هام في فعالية alpha-Chymotrypsin.



الشكل 2: نسبة الفعالية الحيوية % (الفعالية الحيوية لليورياز /فعالية التمحفظ) في الصيغ المختلفة

تلعب السكاكر ومن بينها السكاروز دوراً يحمي البروتينات ويزيد من ثباتها (Wang et al. 2013, Srinivasan et al. 2005) وذلك عبر تشكيل روابط هيدروجينية وتآثرات قطبية على سطح البروتين مما يزيد من طاقة التخرب (Gekko et al. 1981). عند مقارنة نسبة اليورياز الفعال حيوياً مع فعالية التمحفظ يظهر أن السكاروز يستطيع حماية تقريباً 89% من الكمية المتمحفظة من التخرب مقابل 63% في حال عدم إضافته (في الصيغة F1).

أدى استخدام خلات الإيتيل كمحل عضوي إلى تحسين الفعالية الحيوية وتتفق هذه النتيجة مع نتائج الدراسة التي أجراها Meng وزملاؤه عام 2004 وتم تفسير هذا الاحتفاظ بالفعالية بانخفاض فترة التماس بين البروتين والمحل العضوي نتيجة التصلب السريع للقطيرات المتشكلة على اعتبار أن خلات الإيتيل يملك قدرة انتشار أعلى باتجاه ماء الطور الخارجي لأن انحلاليته في الماء أكبر مقارنة مع انحلالية الديكلوروميتان: 8.7% مقابل 2%.

إن استحلاب الطور العضوي في حجم قليل من الطور المائي الخارجي (5مل) قد يترافق مع زيادة في لزوجة الجملة وبالتالي نقص في انتشار المحل العضوي (الديكلوروميتان) إلى الطور الخارجي وهناك دراسات تربط بين زيادة اللزوجة ونقص سرعة تبخر المحل (Hnaien et al. 2011) ونتيجة لزيادة فترة التماس بين المحل العضوي غير المتبخر واليورياز فإنه يلاحظ نقص في فعالية اليورياز الحيوية.

لم تستطع عملية التمحفظ الدقيق حفظ نسبة فعالية حيوية إلا بمقدار 64% و65% تقريباً عند استعمال تركيز منخفض لليورياز في الطور المائي الداخلي وبذلك لايوجد فرق إحصائي هام عند المقارنة مع F1.

الاستنتاجات والتوصيات:

في هذه الدراسة تم تحضير جسيمات دقيقة حاوية على أنزيم اليورياز كبروتين نموذج وذلك بهدف إمكانية التحري عن فعاليته الحيوية بسهولة. أظهرت النتائج أن أبعاد الجسيمات تزداد باستعمال الـ PCL وتنخفض هذه الأبعاد باستعمال خلات الإيتيل وبإضافة السكاروز وبإنقاص كل من تركيز اليورياز وحجم الطور المائي الخارجي. أما بالنسبة إلى فعالية التمحفظ فقد ازدادت باستعمال الـ PCL وخلات الإيتل وبإضافة بعض المواد مثل الـ PEG4000 وبإنقاص تركيز اليورياز وحجم الطور المائي الخارجي. من بين كل العوامل المدروسة تتبيّن أهمية الـ PCL وخلات الايتيل وبعض السواغات (السكاروز والـ PEG4000) في حماية البروتينات من شروط عملية التمحفظ الدقيق بواسطة تبخر المحل وبالتالي تظهر أهمية الصياغة الصيدلانية في تحسين الفعالية الحيوية للبروتينات.

من خلال تجميع كل نتائج هذه الدراسة يمكن **التحكم بخصائص الجسيمات الدقيقة:** فإذا كان المطلوب تصغير أبعاد الجسيمات مع الاحتفاظ بفعالية تمحفظ ونسبة فعالية حيوية عاليتين فإن الاختيار سيقع على استعمال خلات الإيتيل. أما كان تصغير الأبعاد ليس مطلباً فإن استعمال الـ PCL أو PEG4000 سيكونان خياران جيدان حيث أنهما يسمحان بزيادة كل من فعالية التمحفظ ونسبة الفعالية الحيوية.

المراجع

1. Alhakim H.K., Al-Shams J.K., Abdul Kadhem M. Immobilization of urease enzyme on ion-exchange resin. J Babylon univ/Pure and applied sciences, 2012; 20(4), 1231-1235.

2. Al haushey, L.; Bolzinger, M.A.; Bordes, C.; Gauvrit, J.Y.; Briancon, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. Int J Pharm. 2007; 344: 16-25.

3. Al haushey, L., Madani F. A study of factors influencing the release of caffeine from new pharmaceutical dosage forms (microparticles). Tishreen University Journal For Research And Scientific Studies- Health Sciences Series, 2012; 34 (3):137-148.

4. Al haushey, L. Study of factors influencing microencapsulation of urease (a model protein) by screening design. Tishreen University Journal For Research And Scientific Studies- Health Sciences Series, 2018 (under publication).

5. Alex R, Bodmeier R. Encapsulation of water soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. J Microencapsul. 1990; 3: 347–55.

6. Allen L.V, Popovich N.G., Ansel Howard C. Powders and Granules *in* Ansel`s Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 8th ed. 2005; 186-203.

7. Alonso M.J., R.K. Gupta, C. Min, G.R. Siber, and R. Langer. Biodegradable microspheres as controlled release tetanus toxoid delivery systems. Vaccine, 1994; 12(4):299–306.

8. Benoit M.A., Baras B., Gillard J. preparation and characterization of protein-loaded poly(ε-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. Int J Pharm., 1999; 184: 73-84.

9. Bhatt Y., Shah D. influence of addititfs on fabrication and release from protein loaded PLGA microparticles. J, Chem. Pharm. Res. 2012;4(3): 1708-1715.

10. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. Eur J Pharm Biopharm 2005; 59: 375-88.

11. Castellanos I.J., Cruz G., Crespo R., Griebenow K., Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of gamma-chymotrypsin and their prevention, J. Control. Release. 2002; 81 (3): 307–319.

12. Chang A. and R.K. Gupta. Stabilization of tetanus toxoid in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. J. Pharm. Sci., 1996; 85:129–132.

13. Diwan M and Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. J Control Release 2001; 73: 233-44.

14. Gekko K and Timasheff SN. Thermodynamic and Kinetic Examination of Protein Stabilization by Glycerol. Biochemistry. 1981; 20: 4677-86.

15. Haggag Y. A., Faheem A. M., Tambuwala M., Osman M. A., A. El-Gizawy S., O'Hagan B., Irwin N. and McCarron P. A. Effect of poly(ethylene glycol) content and formulation parameters on particulate properties and intraperitoneal delivery of insulin from PLGA nanoparticles prepared using the double-emulsion evaporation procedure. Pharmaceutical Development and Technology · 2017

16. Han K., Lee K.D., Gao Z.G et al. Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. J. Control. Release. 2001; 75: 259-269.

17. Handbook of pharmaceutical excipients, 5th ed.

18. Hnaien M, Ruffin E, Bordes C, Marcillat O, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Briançon S. Integrity characterization of myoglobin released from poly(ε-caprolactone) microspheres using two analytical methods: UV/Vis spectrometry and conductometric bi-enzymatic biosensor. Eur J Pharma Biopharm. 2011; 78 (2): 298-305

19. Jiang W.S. and P. Steven. Stabilization of a model formalinized protein antigen encapsulated in poly(lactideco-glycolide)-based microspheres. J. Pharm. Sci., 2001; 90(10):1558–1569.

20. Jiang, W. and Schwendeman, S.P. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. Pharm Res, 2001; 18(6): 878-85.

21. Katare Y.K., Panda A.K. Influences of excipients on in vitro release and in vivo performance of tetanus toxoid loaded polymer particles, Eur. J. Pharm. Sci. 2006; 28 (3): 179–188.

22. Kyekyoon K. K. and Pack D. W. Microspheres for drug delivery BioMEMS and Biomedical nanotechnology. Volume 1: Biological and Biomedical Nanotechnology, 2006.

23. Lamprecht A, Ubrich N, Hombreiro Perez M, Lehr C, Hoffman M, Maincent P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. Int J Pharm 2000; 196:177-82.

24. Lopac SK, Torres MP, Wilson-Welder JH, *et al*. Effect of polymer chemistry and fabrication method on protein release and stability from polyanhydride microspheres. J Biomed Mater Res Part B, 2009; 91B: 938-47.

25. Maiti S., Dey P., Kaity S., Ray S., Maji S., and Sa B.. Investigation on Processing Variables for the Preparation of Fluconazole-Loaded Ethyl Cellulose Microspheres by Modified Multiple Emulsion Technique. AAPS PharmSciTech, 2009; 10(3):703-715.
26. Manoharan Ch., J. Singh. Addition of Zinc Improves the Physical Stability of Insulin in the Primary Emulsification Step of the Poly(lactide-*co*-glycolide) Microsphere Preparation Process. Polymers, 2015, *7*, 836-850.

27. Meng F.T., G.H. Ma, Y.D. Liu, W. Qiu, Z.G. Su. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004; 33: 177–183.

28. Meng F.T., G.H. Ma, W. Qiu, Z.G. Su. W /O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. J Controlled Release, 2003; 91:407–416.

29. Montalvo-Ortiz B.L., Sosa B, Griebenow K. Improved enzyme activity and stability in polymer microspheres by encapsulation of protein nanospheres. AAPS PharmSciTech., 2012; 13(2): 632-636.

30. Parrott E.L., Characteristics of particles and powders *in* Pharmaceutical technology, Fundamental Pharmaceutics.1970: 1-36.

31. Perez C, Castellanos IJ, Costantino HR, et al. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. J Pharm Pharmacol 2002; 54: 301-13.

32. Perez C.and K. Griebenow. Effect of salts on lysozyme stability at the water-oil interface and upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. Biotechnol. Bioeng., 2003; 82(7):825–832.

33. Pérez-Rodriguez C , Montano N, Gonzalez K, Griebenow K. Stabilization of alpha-chymotrypsin at the CH_2Cl_2/water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. J Control Release. 2003 Apr 14;89(1):71-85.

34. Rafi Md., Surinder M. Singh, Vibhu Kanchan, C. K. Anish and Amulya K. Panda. Controlled release of bioactive recombinant human growth hormone from PLGA microparticles. Journal of Microencapsulation, 2010; 27(6): 552–560.

35. G. Ruan, S.S. Feng, Q.T. Li, Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process, J. Control. Release. 2002; 84 (3):151–160.

36. Srinivasan C., Katare Y.K., Muthukumaran T., Panda A.K. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles, J. Microencapsul. 2005; 22 (2): 127–138.

37. Sturesson C., Carlfors J.. Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity. Journal of controlled release, 2000; 67: 171-178.

38. Swed A., Cordonnier T., Fleury F., Boury F. Protein encapsulation into PLGA nanoparticles by separation method using non toxic solvents. J. Nanomedicine and Nanotechnology, 2014; 5(6): 1-8.

39. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, et al. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. Adv Drug Delivery Rev., 2005; 57: 357-76.

40. Teekamp N., F Duque L., W Frijlink H., LJ Hinrichs W.and Olinga P.. Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. Expert Opin. Drug Deliv., 2015; 12(8): 1-21.

41. Wang L , Liu Y, Weifeng Zhang W, et al. Microspheres and Microcapsules for Protein Delivery: Strategies of Drug Activity Retention. Current Pharmaceutical Design, 2013; 19: 6340-6352.

42. Yang Y.Y., Chung T,S., Bai X.L., Chan W.K. effect of preparation condition on morphology and release profile of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. Chem. Eng. Sci. 2000; 55: 2223-2236.

43. Andre Abrant A., Taverdet J-L, Jay J. microencapsulation par evaporation de solvent. Eur. Pol. J., 2001; 37: 955-963.

44. Coccoli V., Luciani A. , Orsi S., Guarino V., Causa F., P. Antonio Netti. ngineering of poly(ε-caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, April 2008, Volume 19, Issue 4, pp 1703–1711.

45. Determan Amy S., Trewyn Brian G., Lin Victor S.-Y. et al. Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres. J. Control. Rel., 2004; 100: 97–109.

46. Dzul-Cervantes M., Herrera-Franco P. J., Tábi T., et Valadez-Gonzalez1 A. Using Factorial Design Methodology to Assess PLA-g-Ma and Henequen Microfibrillated Cellulose Content on the Mechanical Properties of Poly(lactic acid) Composites. International Journal of Polymer Science. 2017: 1-14

47. Emami J., Hamishehkar H., Najafabadi AR., et al. A novel approach to prepare insulin-loaded poly(lacti-co-glycolic acid_ microcapsules and the protein stability study. J Pharm 2009; 98: 1712-31.

48. Han K., Lee K.D., Gao Z.S., Park J.S. Preparation and evaluation of poly9L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. J Control Release 2001; 75: 259-269.

49. Narayana K., Subrahmanyam V.M., Venkata Rao J. A faractional factorial design to study the effect of process variablesbon the preparation of hyaluronidase loaded PLGA nanoparticles. Enzyme Research, 2014, 1-10.

50. Prusty A. , Mishra A. K. , Bijon K. G. The Plackett-Burman model-An Improved Alternative to Identify the Significant Factors Implied in the Preparation of Tramadol Hydrochloride Microsphere. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2016; 50: 295-300.

51. Puel, F.; Briançon, S. Fessi, H. Industrial Technologies and Scale-Up. In: Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, 2nd ed., Taylor and Francis, New York- London, 2006, 149.

52. van de Weert M, Hennink WE, and Jiskoot W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. Pharm Res 2000; 17: 1159-67.

53. Yang Y.Y., Chung T,S., Ng N.P. Morphology ,drug distribution and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials, 2001; 22: 231-241.

Celand JL and Jones AJS. s tale formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradables microspheres. Pharm Res 1996, 13:1464-75.

He JT et al. stabilization and encapsulation of a staphlokinase variant (K35R) into poly(lactic-c0-glycolic acid) Microspheres. Int J Pharm 2006, 309: 101-8.

Ruan G., J.-K. Ng and S.-S. Feng. Effects of polymer, organic solvent and mixing strength on integrity of proteins and liposomes encapsulated in polymeric microspheres fabricated by the double emulsion process. Journal of microencapsulation, 21 (4), 399-412.

Sah H. Protein behavior at the water/methylene chloride interface. J Pharm Sci 1999; 88: 1320-5.

Castellanos I.J.C. and Kai. Ruben; Griebenow. Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres. J. Control. Rel., 2003; 88(1):135–145.

Coccoli V., Luciani A. , Orsi S., Guarino V., Causa F., P. Antonio Netti. ngineering of poly(ε-caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, April 2008, Volume 19, Issue 4, pp 1703–1711.

Jiang W.and S.P. Schwendeman. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. Pharm. Res., 2001a, 18(6) :878–885.