جامعة دمنهور
Damanhour University

Nanomedicine-Integrated Phyto-Pharmaceuticals as Promising Approach in Treatment of Selected Skin Disorder(s)

A thesis submitted to

Faculty of Pharmacy, Damanhour University

in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master

In Pharmaceutical Science (Pharmaceutics)

By

Passant Mohamed Ali Mohamed Elhalmoushy

Bachelor of Pharmaceutical Sciences

Faculty of Pharmacy and Drug Manufacturing

Pharos University in Alexandria

(2022)

P.U.A Library
Central Medical Library (B)
Faculty of .
Serial No : 802
Classification : 615

SCOPE OF WORK

Vitiligo (leukoderma) is recognized as a common skin hypopigmentation disorder stemming from the progressive selective destruction of epidermal melanocytes operating as pigmentation cells. Vitiligo has a severe impact on a patient's quality of life and even causes suicidal attempts. Up to date, no curative therapy is available which has created a substantial demand for novel vitiligo treatments.

Berberine (BRB) is the main bioactive ingredient in medicinal plants such as Berberis, Hydrastis, and Coptis Chinensis. It is a yellowish, crystalline, quaternary isoquinoline alkaloid. Although BRB shows various promising pharmacological effects, it belongs to Biopharmaceutics Classification System class III which is characterized by high solubility, and low permeability. Therefore, BRB's poor membrane permeability obstacle limits its dermal delivery across layers of the skin and hinders its topical application.

This work for the first time endeavored for the elaboration of hyalurosomes and gel-core oleosomes as novel nanovesicular drug delivery systems followed by in-vitro and ex-vivo evaluations to assess the enhancement of berberine skin permeability compared to berberine conventional gel. Furthermore, in-vivo studies were conducted using a vitiligo-induced mouse model to evaluate the potentiality of our novel nanovesicular systems in improving berberine antioxidant and anti-inflammatory effects and hence confirm the efficacy of these formulations as a novel promising targeted topical treatment for vitiligo. Such in-vivo investigations include biochemical, gene expression, and histological, immunohistochemical, and toxicological studies to confirm the safety and efficacy of these formulations.

Thus, this work was divided into two parts:

- **Part one: Development and Evaluation of Novel Berberine loaded Nanovesicular Systems for Enhanced Topical Drug Delivery of Berberine.**

This part consisted of the following two chapters

- **Chapter I:** Novel Berberine-Loaded Hyalurosomes: Formulation, Optimization, Physicochemical and Ex-vivo appraisal.
- **Chapter II:** Development and Optimization of Novel Modified Hyalurosomes (Gel-core oleosomes): In-vitro and Ex-vivo Evaluation.

- **Part two: In vivo evaluation of the berberine-loaded hyalurosomes and berberine-loaded gel-core oleosomes formulae using biochemical, biological, and gene expression studies.**

المستخلص

يعتبر البهاق مرض جلدى يحدث بسبب وجود نقص بخلايا الميلانوسايت التى تفرز صبغة الميلانين المسئولة عن تصبغ لون الجلد. لا يتوفر علاج نهائى و جذرى لذلك المرض و لا تمتلك الخيارات العلاجية المتوفرة القدرة على منع انتشار البهاق فى اماكن جديدة فى الجسم.

يعتبر البربرين مادة عشبية طبيعية توجد في العديد من النباتات و يشيع تناوله نظرا لخصائصه العديدة و الفعالة لعلاج الكثير من الامراض لكنه يعانى من مشكلة النفاذية عن طريق الجلد .

لذلك قامت فكرة الدراسة على تحضير وتقييم حويصلات نانومترية فسفوليبديه مبتكرة (الهيالبوروزومات و الاوليوزومات) محملة بعقار البربرين لعلاج البهاق . حيث ستتمكن تلك الحويصلات المبتكرة من تحسين نفاذية عقار البربرين عبر الجلد للاستفادة من خصائصه كعامل فعال مضاد للاكسدة و مضاد للالتهابات اللذان يلعبان دورا اساسيا فى حدوث البهاق.

اظهرت نتائج التوصيف المعملى تكوين حويصلات نانومترية ذات خصائص معملية واعدة من حيث صغر الحجم الجزيئى و كفاءة تحميل عالية مع تحقق الانطلاق المتحكم بالدواء بطريقة مستديمة كما اوضحت نتائج دراسات نفاذية الجلد خارج الجسم الحى باستخدام جلد الانسان كامل السماكة كنموذج محاكاة للاستخدام الواقعى القدرة الفائقة لعقار البربرين المحضر فى تلك الحويصلات المبتكرة على النفاذ عبر طبقات الجلد مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى.

ومن ناحية اخرى تم اجراء الدراسة الحيوية عن طريق التطبيق الموضعى للهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بالبربرين على جلد الفئران كنموذج حيوانى بعد احداث البهاق لهم. هذا و قد تم ملاحظة صغر حجم البقعة البيضاء على جلد الفئران و تغير لون البقعة البيضاء الى اللون البنى مشيرا الى لون الجلد الطبيعى مما يدل على فاعلية الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المبتكرة و المحملة بعقار البيربرين فى علاج البهاق. هذا و قد تم ايضا ملاحظة اعادة ظهور الشعربلونه الاسود الطبيعى و بمعدل اسرع على الجلد فى المنطقة المصابة بمرض البهاق مقارنة بمجموعة التحكم الايجابية التى تتسم بوجود بقعة بيضاء كبيرة على الجلد وبطء نمو الشعر فى المنطقة التى تعانى من البهاق و ظهوره باللون الابيض. اثبتت نتائج اختبارات تحليل وظائف الكلى و الكبد عدم حدوث اى خلل بالوظائف الحيوية بعد التطبيق الموضعى للحويصلات المبتكرة على الفران و مقارنتهم بمجموعة التحكم .وعلاوة على ذلك، اشار الفحص النسيجي للفئران الى زيادة عدد خلايا الميلانوسيت المسئولة عن تكوين صبغة الميلانين وعدم وجود تحسس بالجلد بعد استخدام الحويصلات المحضرة و دهنها على الجلد لمدة شهر مما يأكد سلامة استخدامها و عدم حدوث اى اعراض كالالتهاب او حساسية جلدية بعد الاستخدام الموضعى . ذلك بالاضافة الى فحص الدلالات الحيوية البايوكيميائية مثل (GSH و MDA) و تحليل كفاءة انزيم التيروزينيز (Tyrosinase activity) حيث اوضحت النتائج فاعلية عالية لكل من الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بالبربرين فى الزيادة الملحوظة لكلا من مضادات الاكسدة و انزيم ال (Tyrosinase) الذى يلعب دورا اساسيا فى زيادة انتاج مادة الميلانين . هذا و قد تم دراسة الفحوصات الجينية مثل (TNF-alpha و INOs) الدالان على وجود الالتهابات بعد التطبيق الموضعى للهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بعقار البربرين و قد اثبت كل منهما تاثيرملحوظ فى انخفاض مستوى ال (INOs و TNF alpha) مشيرين لفاعليتهم كمضاد للالتهابات . و اخيرا تم عمل اختبار كيميائى مناعى للكشف عن مادة ميلان ا (Melan-A) و التى تشير الى عدد خلايا الميلانوسيت و قد اظهرت النتائج الفاعلية الملحوظة لكلا الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بعقار البربرين و قدرتهم الفائقة فى زيادة انتاج خلايا الميلانوسيت و بالتالى زيادة صبغة الميلانين فى مجموعات الفئران التى عولجت بتلك الحويصلات مقارنة بمجموعة التحكم الايجابية ومجموعة الفئران التى عولجت بعقار البربرين غير المصوغ و المحضر فى صورة جل تقليدى . و بناءا على كل تلك النتائج الواعدة تعتبر الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المبتكرة و المحملة بعقار البربرين علاج موضعى فعال، واعد و امن لاستهداف البهاق و يمهد الطريق للتجارب السريرية.

الملخص العربى

المقدمة

يعتبر البهاق مرض جلدى مزمن يحدث بسبب نقص او موت خلايا الصبغة (الميلانوسيت) التى تفرز صبغة الميلانين المسؤولة عن تصبغ لون الجلد و البشرة . يظهر البهاق على شكل بقع بيضاء فى مختلف انحاء الجسم، اكثرها شيوعا فى اليدين و الوجه و يمكن ان ينتشر ايضا على الشعر و داخل الفم و فى اجزاء عديدة من الجسم .يعتبر البهاق مرض غير معدى و لا ينتقل بالتلامس بين الاشخاص . قد يصاب الانسان فى اى عمر بذلك المرض و لكنه فى العادة يظهر قبل سن الثلاثين .
و هناك اسباب عديدة قد تؤدى لحدوث البهاق وهى :اضطراب بالجهاز المناعى ، وجود تاريخ وراثى بالعائلة، حروق الشمس الحادة ، او تعرض الجلد لمادة كيميائية كمادة الهايدروكينون او الاصابة بسرطان الجلد الذى يتسبب فى حدوث خلل فى الخلايا الصبغية او موتها. يصيب البهاق الأشخاص بمختلف أنواع بشراتهم، ولكنه قد يكون أكثر وضوحًا في الأشخاص ذوي البشرة الداكنة. لا تهدد هذه الحالة المرضية الحياة ولا تنتشر بالعدوى و لكنها قد تسبب التوتر و الحرج للشخص المصاب و من الممكن حدوث اكتئاب و محاولات للانتحار . يهدف علاج البهاق الى استعادة لون الجلد الطبيعى فى المناطق المصابة، و لكن فى الحقيقة لم يتوصل العلماء حتى وقتنا الحالى الى عقار طبى يستطيع ايقاف تلف خلايا الميلانوسيت المنتجة لصبغة الميلانين بالجلد. ومن ناحية اخرى هناك بعض الادوية التى قد تستخدم وحدها او الى جانب العلاج الضوئى او الجراحة بهدف الاستعادة الجزئية للون البشرة . بالنسبة للعلاج بالضوء، تستخدم الأشعة فوق البنفسجية ضيقة النطاق لوقف أو ابطاء تطور البهاق النشط الذى قد يكون أكثر فعالية عند استخدامه مع الكورتيكوستيرويدات أو مثبطات الكالسينيورين. ولكن قد تستغرق هذه العلاجات عدة اشهر للحكم على فاعليتها، و بالرغم من ذلك، الا ان تاثير هذه العلاجات غيردائم و الجدير بالذكر انه لا يتوفر علاج نهائى و جذرى لذلك المرض، و لا تمتلك الخيارات العلاجية المتوفرة القدرة على منع انتشار البهاق فى اماكن جديدة فى الجسم . فنتيجة الى ذلك اظهرت الدراسات الحديثة الرغبة فى ابتكار دواء امن و فعال للتخلص من ذلك المرض و استعداد مرضى البهاق للمشاركة فى التجارب السريرية للادوية التى سوف يتم ابتكارها.
هناك اتجاه عالمى مؤخرا نحو العودة الى الطبيعة و الاعتماد على العقاقير العشبية للعلاج بدلا من استخدام المواد الكيميائية و ذلك نظرا للاعراض الجانبية التى تسببها المواد الكيميائية فان لم تحدث سريعا فعلى الامد البعيد و مع تكرار استخدام ستحدث.
هذا و يعتبر البربرين عقار عشبى طبيعى يوجد فى العديد من النباتات العشبية حيث يشيع تناوله نظرا لخصائصه العديدة و الفعالة لعلاج الكثير من الامراض و منها مرض السكري، ارتفاع مستويات الكوليسترول أو الدهون في الدم
وارتفاع ضغط الدم. هذا و يتم تطبيقه أيضًا فى العلاجات الجلدية للحروق وآفة القروح. و على الرغم من تلك المزايا العديدة التى يتمتع بها عقار البربرين الا و انه يعانى من مشكلة النفاذية عن طريق الجلد مما يعيق استخدامه و التطبيق الاكلنيكى له.
قد شاع الضا استخدام المكونات الطبيعية الموجودة فى جسم الانسان مثل هياليورينات الصوديوم و اوليات الصوديوم فى الكثير من التركيبات الدوائية و مستحضرات التجميل و ذلك نتيجة لخصائصهم المميزة فى زيادة لزوجة التركيبة بالاضافة الى القدرة العالية للنفاذ عبر الجلد.
لذلك و لاول مرة قامت فكرة الدراسة الحالية على تحضير وتقييم حويصلات نانومترية فسفوليبديه مبتكرة معتمدة فى التحضير على هياليورينات الصوديوم (الهياليوروزومات و الاوليوزومات) و محملين بعقار البربرين المستخلص من عشب طبيعى كعلاج امن و فعال للبهاق . حيث ستتمكن تلك الحويصلات المبتكرة و المحملة بالبربرين من تحسين نفاذية البربرين عبر الجلد للاستفادة من خصائصه كعامل فعال مضاد للاكسدة و مضاد للالتهابات و اللذان يلعبان دورا محوريا و اساسيا فى حدوث البهاق .
تم تقسيم العمل الى جزئين وحيث يتكون الجزء الاول من فصلين .

الجزء الاول:

تطوير وتقييم أنظمة حويصلات نانومترية جديدة محملة بعقار البربرين لتحسين نفاذية البربرين عبر الجلد .

يتضمن ذلك الجزء تحضير حويصلات فسفوليبدية نانومترية مبتكرة لتحسين نفاذية عقار البربرين عبر طبقات الجلد باستخدام تقنية الحقن الايثانولى المعدل وهي طريقة سهلة و سريعة في التصنيع و غير مكلفه وذلك لتقليل تكلفة المنتج بالاضافة الى سهولة تحضير التركيبات على نطاق كبير و مضاعفة الكميات .
تم الاعتماد فى تحضير الحويصلات المبتكرة على مادة هياليورينات الصوديوم وهوملح الصوديوم المعد من حمض الهياليورونيك. تم اختيار هياليورينات الصوديوم لتوافر العديد من المزايا لديه حيث انه يتوفر بشكل طبيعى فى جسم الانسان و يتواجد فى اغلب الاعضاء و الانسجة و الغضاريف. وعلاوة على ذلك فمن الخصائص الهامة و المميزة لمادة هياليورينات الصوديوم هى قدرته على النفاذ عبر طبقات الجلد و لذلك يشيع استخدامه فى منتجات العناية بالبشرة و مستحضرات التجميل و التركيبات الجلدية و ذلك لفاعليته فى زيادة لزوجة التركيبات و تحويل القوام من الصورة السائلة الى جل مما يساعد على الثبات الفزيائى وبالاضافة الى البقاء لفترة اطول على المنطقة الموضوع عليها مما يقلل عدد مرات الاستخدام و زيادة التزام المريض بالدواء.

الفصل الاول:

الهياليوروزومات كنواقل نانومترية جديدة محملة بالبربرين: التحضير التجويد، التوصيف المعملى و تقييم النافذية عبر الجلد خارج الجسم الحى

فى هذا الفصل تم بنجاح تحضير الهياليوروزومات المبتكرة كحويصلات فسفوليبدية نانومترية و محملة بالبربرين. هذا و قد تم استخدام طريقتين للتحضير فى التجارب الاولية و هما 1) طريقة ترطيب الغشاء الرقيق 2) طريقة الحقن الايثانولى المعدل. و من ضمن تلك الطرق نجحت طريقة الحقن الايثانولى المعدل فى انتاج الهياليوروزومات ذات حجم جزيئى صغير و أتاق تم اعتماد هذه الطريقة لانتاج الهياليوروزومات و من ثم تحميلها بعقار البربرين. بعد التحضير تم الاستعانة بتقنيتين لتصغير الحجم الجزيئى و تحسين معامل الانتشار و هما 1) تقنية المزج عالى السرعة الذى ساهم فى التجانس و تقليل الحجم عند استخدام سرعة 10 الاف لفة بالدقيقة لمدة عشرة دقائق و يليه 2) الاستعانة بمجسا يصدر موجات فوق صوتية لمدة عشرة دقائق و بالتالى تم الحصول على الحجم الجزيئى النانومترى الامثل. هذا و قد تم التقيم المعملى للهياليوروزومات المحضرة غير المحملة بالبربرين مقارنة بالمحملة بالبربرين (0.25%) من حيث الحجم الجزيئى و معامل الانتشار و الشحنة الجسيمة. اظهرت الهياليوروزومات غير المحملة حجم جزيئى (1.05 ± 118.6 نانوميتر) و معامل انتشار (0.01± 0.26) و شحنة جسيمة (0.16±19.2- ملل فولت). بينما اثبتت النتائج زيادة حجم حويصلات الهياليوروزومات المحمله بعقار البربرين (4.58±148.07 نانوميتر) و معامل انتشار (0.02± 0.25) ، و كما ان لهم شحنه سالبه (0.432±13.01- ملل فولت) ذلك بالاضافة الى كفاءة تحميل عالية و هى (1.56%±86.03). ترجع قدرة التحميل الدوائية العالية للهياليوروزومات نتيجة لاستخدام الفوسفوليبد الذى ثبت فى الطبقات الخارجية للهياليوزومات مما ازاد من الكفاءة التحميلية و تقليل تسريب الدواء هذا و بالاضافة الى الى زيادة لزوجة التركيبة المحضرة بسبب استخدام هياليورينات الصوديوم مما ادى الى المساهمة في الحفاظ علي الثبات الفيزيائي الجيد للحويصلات لمده 6 شهور وايضا بقائها في نفس نطاق الحجم الجزيئى الذي تم قياسه بعد التحضير مباشرة. اوضحت نتائج المجهر الالكتروني الناقذ عن وجود حويصلات كروية ذات لب و طبقة غلاف ثنائية من الفوسفوليبد. هذا و قد اظهرت نتائج اختبار تقيم معدل انطلاق الدواء تحقق الانطلاق المتحكم للدواء بصورة مستديمة خلال 24 ساعة من الهياليوروزومات مما يتيح استخدام المستحضر عدد مرات اقل مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحمل فى الجل المحضر تقليديا الذى انطلق كاملا خلال 3 ساعات. واخيرا تم اختبار نفاذية الهياليوروزومات خلال جلد الانسان كامل السماكة خارج الجسم الحى و ذلك لمحاكاة الاستخدام و التطبيق الحقيقي للدواء. وجدير بالذكر ان هذه التجربة تعد الاولى من نوعها لاستخدام جلد الانسان كامل السماكة لاختبار نافذية الهياليوروزومات المبتكرة لعلاج البهاق. و اشارت النتائج الى القدرة العالية للهياليوروزومات المحملة بالبرين على النفاذ الفائق فى طبقات الجلد بفارق 5.6 ضعف مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحضر بشكل جل تقليدى مما يمثل مستودع لانطلاق الدواء فى طبقات الجلد و تركيزه بهم و علاوة على ذلك تقليل كمية الدواء التى تصل الى الدم مما يقلل فرص حدوث اى اثار جانبية و الحصول على علاج موضعى مستهدف طبقات الجلد. يرجع ذلك التحسن الملحوظ فى نفاذية الهياليوروزومات المحملة بالبربرين مقارنة بالبربرين غير المصوغ والمحضر فى شكل جل تقليدى الى استخدام مادة هياليورينيت الصوديوم بالاضافة الى مادة Tween 80 التى تعمل كمساعد فعال لتحسين النفاذية عبر طبقات الجلد .

الفصل الثانى:

تطوير و تجويد هياليوروزومات جديدة معدلة (الاوليوزومات) : التوصيف المعملى و تقييم النافذية عبر الجلد خارج الجسم الحى

فى هذا الفصل تم تحضير هياليوروزومات معدلة بهدف استبدال مادة ال Tween 80 المتعارف عنها بتسبب بعض اعراض التحسس الجلدى بمحسن اخر طبيعى للنفاذية و لذلك قمنا باستخدام مادة اوليات الصوديوم لما عرف عنها و انها ملح الاوليك الاسيد الذى يوجد طبيعيا بجسم الانسان والذى ذكر فى العديد من الابحاث السابقة انه يستخدم فى تحسين النفاذية عبر الجلد. و بذلك تم تحضير الاوليوزومات المبتكرة ذات اللب فى صورة جل و هى عبارة عن دمج بين مادة الفوسفوليبيد و هياليورونيت الصوديوم بالاضافة الى اوليات الصوديوم.

اثبتت القياسات ان حجم حويصلات الاوليوزومات غير المحملة لديهم حجم جزيئى (4.86 ± 190.2 نانوميتر) و شحنة جسيمة (1.18 ± 77.9- ملل فولت). بينما اظهرت الاوليوزومات المحملة بعقار البيربرين (0.25%) حجم جزيئى (4.25±186.7 نانوميتر) و كما ان لهم شحنة سالبة (1.13±36.0- ملل فولت) والتي ساهمت في الحفاظ علي الثبات الفيزيائي الجيد للحويصلات لمدة 6 شهور وايضا اثبتت بقائها في نفس نطاق الحجم الذي تم قياسه بعد التحضير مباشرة. تم التقاط صور للتحضيرات باستخدام المجهر الالكتروني الناقذ موضحة شكل كروي للاوليوزومات كما تبين تكون الطبقة الثنائية من الفسفوليبدات. وقد بينت الاوليوزومات المحملة بعقار البيربرين كفاءة فائقة في حمل الدواء (0.67%±92.3). و قد تم اختبار نفاذية الاوليوزومات المحملة بالبربرين خلال جلد الانسان كامل السماكة و اظهرت النتائج قدرتهم العالية على النفاذ فى طبقات الجلد بفارق 4 اضعاف مقارنة بالبربرين غير المصوغ والمحضر فى شكل جل تقليدى.

الجزء الثانى

تقييم الهيالبوروزومات المحملة بالبربرين والأوليوزومات المحملين بالبربرين فى النموذج الحيوانى باستخدام الدراسات البيولوجية و الدلالات البيوكيميائية و الدراسات الجينية.

اجريت الدراسه الحيوية فى النموذج الحيوانى لكل من الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بالبربرين عن طريق استخدام فئران تجارب و اصابتهم بمرض البهاق عن طريق التطبيق الموضعى ل 2.5% من مادة الهيدروكينون على جلد الفئران لمدة 8 اسابيع متتالية . بعد الاصابة بالبهاق بنجاح و ظهور البقعة البيضاء على جلد الفئران تم تقسيم الفئران الى 8 مجموعات وتم التطبيق الموضعى لعدة تحضيرات و منهم الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بالبربرين و البربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى لاختبار كفاءة و فاعلية التركيبات السابق ذكرها فى معالجة البهاق. و قد استمرت فترة العلاج لمدة اربعة اسابيع متتالية. تم ملاحظة صغر حجم البقعة البيضاء على جلد الفئران التى تشير لمرض البهاق و تغير لون البقعة البيضاء الى اللون البنى مشيرا الى لون الجلد الطبيعى مما يدل على فاعلية كلا الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المبتكرة والمحملة بعقار البيربرين فى علاج البهاق. ويرجع ذلك الى تحفيز و تنشيط صبغة الميلانين بالخلايا الصبغية فى الجلد و هى المسئولة لاعطاء الجلد لونه الطبيعى. هذا و قد تم ايضا ملاحظة اعادة ظهور الشعربلونه الاسود الطبيعى و بمعدل اسرع على الجلد فى المنطقة المصابة بمرض البهاق مقارنة بمجموعة التحكم الايجابية التى تتسم بوجود بقعة بيضاء كبيرة على الجلد ويتسم نمو الشعر ببطء فى المنطقة التى تعانى من البهاق و ظهوره باللون الابيض . هذا و قد لوحظ ايضا عدم كفاءة البربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى فى علاج البهاق و عدم حدوث فارق ملحوظ فى نتائج تلك المجموعة عند مقارنتها بمجموعة التحكم الايجابية. تم اجراء اختبارات لتحليل وظائف الكبد و الكلى لاختبار السمية و التاكد من الاستخدام الامن لكلا الحويصلات المبتكرة و اثبتت النتائج عدم حدوث اى خلل بوظائف الكلي (Urea and Creatinine) او الكبد (ALT and AST) بعد تطبيق الحويصلات النانومترية المبتكرة على الفران و مقارنتهم بمجموعة التحكم .وعلاوة على ذلك، اوضح الفحص النسيجي للفئران زيادة فى عدد خلايا (الميلانوسيت) المسئولة عن تكوين صبغة الميلانين التى تعطى الجلد لونه البنى و ذلك عند التطبيق الموضعي لتركيبات الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بعقار البيربرين مقارنة بالفئران التى تعانى من البهاق و ايضا عدم وجود تحسس بالجلد بعد استخدام كلا الحويصلات المبتكرة و دهنها على الجلد لمدة شهر مما ياكد سلامة استخدامهم وبالاضافة الى عدم حدوث اى اعراض كالالتهاب او التحسس الجلدى بعد الاستخدام الموضعى. هذا و قد تم فحص الدلالات البايوكيميائية مثل (MDA & GSH) و تحليل انزيم التيروزينيز (Tyrosinase activity) حيث اظهرت النتائج فاعلية عالية لكل من للهيالبوروزومات و

الاوليوزومات المحملين بالبربرين فى الزيادة الملحوظة لمستوى ال (Tyrosinase) الذى يلعب دورا اساسيا فى انتاج صبغة الميلانين حيث ساهمت الحويصلات المبتكرة فى زيادة ال (Tyrosinase) بفارق (1.4) ضعف للهيالبوروزومات المحملة بالبربرين و (1.27) ضعف للاوليوزومات المحملة بالبربرين مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى. و قد اظهرت نتائج الدراسات الجينية (INOs, TNF-alpha) التاثيرالملحوظ فى انخفاض مستوياتهم مشيرين لفاعلية الهيالبوروزومات المحملة بالبربرين بفارق (2.25) ، (2.21) ضعف فى مستوى (TNF-alpha) و(INOs) على التوالى مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى بينما اوضحت الاوليوزومات المحملة بالبربرين انخفاض فى مستوى ال (TNF-alpha) و (INOs) بفارق (1.85)، (1.71) ضعف على التوالى فى مقارنة بالبربرين غير المصوغ و المحضر فى شكل جل تقليدى. و جدير بالذكر ان النتائج قد اوضحت فاعلية الهيالبوروزومات و الاوليوزومات غير المحملة بالبربرين فى علاج البهاق و ذلك بسبب وجود هياليورينيات الصوديوم لما تمتلكه من خصائص مضادة للاكسدة و مضادة للالتهابات و التى ساهمت فى العلاج .و قد اظهرت نتائج الاختبار الكيميائى المناعى الدقيق و المخصص للكشف عن مادة ميلان ا (Melan-A) الفاعلية الملحوظة لكلا الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المحملين بعقار البربرين وقدرتهم الفائقة فى زيادة انتاج خلايا الميلانوسيت و بالتالى زيادة صبغة الميلانين فى مجموعات الفئران التى عولجت بتلك الحويصلات مقارنة بمجموعة التحكم الايجابية ومجموعة الفئران التى عولجت بعقار البربرين الغير مصوغ و المحضر فى صورة جل تقليدى . و اخيرا تم انشاء علاقة ممتازة بين نتائج دراسات النفاذية عبر الجلد خارج الجسم الحى و الدلالات البايوكيميائية ممثلة فى انزيم التيروزينيز (Tyrosinase) و بناء على النتائج السابقة فانه يمكن استخدام دراسات النفاذية عبر جلد الانسان كامل السماكة خارج الجسم الحى كطريقة مجدية للتنبؤ بسلوك الهيالبوروزومات و الاوليوزومات بعد التطبيق الموضعى على جسم الانسان و التقليل من استخدام حيوانات التجارب. وفى النهاية بناءا على كل تلك النتائج الواعدة تعتبر الهيالبوروزومات و الاوليوزومات المبتكرة و المحملة بعقار البربرين علاج موضعى فعال و امن مستهدف لعلاج البهاق و بالتالى تمهد الطريق لاستخدامهم فى التجارب السريرية .