Alexandria University
Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutics

A Study on Some Advanced Techniques Used for The Management of Some CNS Diseases

Thesis submitted to Department of Pharmaceutics
Faculty of Pharmacy - Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

in

Pharmaceutical Sciences
(Pharmaceutics)

by

Amira Sayed Mahmoud Hanafy

M.D. in Pharmaceutics
Faculty of Pharmacy
Alexandria University, 2013

2015

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 171
Classification : 615.19

مرض الألزيهايمر هو أكثر الأمراض العصبية انتشارا في هذا العصر، وينتج من تجمع لبروتينات الأميلويد داخل الخلايا العصبية وخارجها (التشابكات الليفية العصبية) مما يؤدي إلى موت الخلية العصبية، كما يُلاحظ أيضا في هذا المرض وجود التهابات عصبية ونقص في الأسيتايل كولين، ويمكن التحكم العلاجي في الألزيهايمر عن طريق التحكم في أعراض المرض أو تحوير تطوره.

تكون سياسة علاج الأعراض للتحكم في الألزيهايمر عن طريق تحسين الذاكرة والإدراك؛ إلا أن كلتا الصفتين ليستا على نفس مستوى الكفاءة المطلوب لإيقاف تطور المرض. وقد كثرت وتعددت الدراسات في الآونة الأخيرة لتطوير أنظمة انطلاق الدواء بغرض زيادة كفاءته أو لتعيين مدى أهميته في تحوير المرض أكثر من قدرته المعروفة على تحسين الأعراض الناتجة عن المرض.

وقد أُجريت عدة دراسات في محاولة لاستحداث موصلات نانونية لتوصيل الدواء إلى الجهاز العصبي المركزي، وقد لاقت الجزيئات النانونية للكيتوزان (CS-NPs) رواجا شديدا نظرا لما لها من صفات التوافق الحيوي والتحلل الحيوي، كما أن لها ثبات جيد وسمية منخفضة، بالإضافة إلى سهولة تحضيرها، وكونها منخفضة التكلفة إذا قورنت بالجزيئات النانونية لباقي البلمرات.

يعتبر تعاطي الدواء عن طريق الأنف استراتيجية ناجحة لتوصيل الأدوية مباشرة للجهاز العصبي المركزي متجاوزًا الحائل الدموي الدماغي.

لقد وقع الاختيار على دواء هيدروبروميد الجالانتامين في هذا الدراسة لكفاءته الفارماكولوجية الفريدة في التحكم في علاج مرض الألزيهايمر، وقد عُرف عن الجالانتامين أن له تأثيرات علاجية متعددة، فهو يؤدي ليس فقط إلى التحكم في المرض عن طريق التأثير المثبط لانزيم الأستيل كولين استريز، ولكن أيضا في تحوير تطور المرض، لكن تعاطي الجالانتامين عن طريق الفم يكون مصحوبا ببعض الأعراض الجانبية في القناة الهضمية مثل الغثيان، القيء، والإسهال، وقد استوجب ذلك ضرورة البحث عن طرق بديلة لتعاطي الجالانتامين.

الهدف الرئيسي لتلك الرسالة هو الاستفادة من الصفات الفلوماكولوجية الفريدة للجالانتامين في التحكم في مرض الألزيهايمر وذلك عن طريق تحضيره على هيئة جزيئات نانونية من الكيتوزان (CS-NPs) يتم إعطائها عن طريق الأنف، كما تهدف الرسالة إلى تقييم الجزيئات النانونية المحضرة معمليًا ودراسة خواصها الفارماكولوجية والسميّة.

تنقسم الرسالة إلى جزئين:

الجزء الأول بعنوان:

صياغة، وتقييم معملي، ودراسة ثبات الجزيئات النانونية لمعقد هيدروبروميد الجالانتامين مع الكيتوزان للتحكم في مرض الألزيهايمر عن طريق الأنف

يهدف هذا الجزء إلى دراسة أهمية المعقدات كوسيلة لزيادة تحميل الجالانتامين في جزيئات الكيتوزان النانونية المحضرة بطريقة التهلُّم الأيوني، وذلك لاستخدامها عن طريق الأنف للتحكم في مرض الألزيهايمر.

تم تحضير جزيئات نانونية غُفل للكيتوزان (أي بدون دواء) باستخدام طريقة التهلُّم الأيوني عن طريق تشابك جزيئات الكيتوزان مع ثلاثي عديد الفوسفات (TPP) سالب الشحنة. تم تحضير ١٦ صياغة من CS-NPs تحتوي على نسب مختلفة من الكيتوزان وثلاثي عديد الفوسفات. وقد تم دراسة تأثير بعض عوامل التحضير على خواص الجزيئات النانونية المحضرة مثل حجم الجزيئات، ومعامل تعدد الانتشار (PDI).

بعد الفحص الشامل لنتائج دراسة تأثير عوامل التحضير على خواص الصياغات المحضرة، تم اختيار الصياغة المحسنة F4-C، حيث أن لها أصغر قطر (١٨٢±٢,٥٠٧ نانومتر)، ومعامل انتشار منخفض (٠,٢٦٤±٠,٠١٢)، وجهد زيتا مرتفع (٤٠,٤±٤,٩٢ مللي ڤولت)، ولقد تم اختيار تركيز ٠,٥٪ وزن/حجم من مادة polysorbate 80 لتمنع تجمع الجزيئات النانونية عند تخزينها لمدة ثلاثة أشهر.

تم تحضير جزيئات نانونية من الكيتوزان محملة بالجالانتامين (GH-loaded CS-NPs) بطريقتين، الطريقة (أ) والطريقة (ب). في الطريقة (أ) حُضرت خمس صياغات محملة بالدواء (GH-NP1 to GH-NP5) بنسب مختلفة من

الكيتوزان إلى الدواء، حيث تمت إذابة الجالانتامين في محلول الكيتوزان، وإضافة polysorbate 80، ثم إضافة محلول TPP. أما في الطريقة (ب)، فقد حُضرت صياغتات (CX-NP1، CX-NP2) بنسب مختلفة من الكيتوزان إلى الدواء. تمت إضافة الجالانتامين إلى محلول الكيتوزان واستمر تقليبهما معا لمدة ٢٤ ساعة في درجة حرارة الغرفة، وذلك للسماح بتكوّن معقد الدواء مع الكيتوزان، وقد أُضيف بعد ذلك polysorbate 80 وTPP واستمر تقليب المزيج. وقد تم تقييم جميع الصياغات المحضرة بتعيين حجم الجزيئات، ومعامل عديد الانتشار، وجهد الزيتا، وكفاءة تحميل الدواء في الجزيئات (EE).

دلت النتائج على أن كفاءة تحميل الدواء في الصياغات المحضرة بالطريقة (أ) منخفضة للغاية (تتراوح بين ٠,٥ إلى ٩,٣٪) بغض النظر عن نسبة الكيتوزان إلى الدواء، وقد يرجع هذا إلى التنافر بين الكيتوزان وجزيئات الدواء حيث أن كليهما يحمل شحنة موجبة عن الأس الهيدروجيني للتحضير (٤,٥)، ولم يكن هناك زيادة ملحوظة في حجم الجزيئات ومعامل عديد الانتشار في جميع الصياغات مقارنةً بالجزيئات النانونية الغُفل F4-C.

بالنسبة للطريقة (ب)، فقد حدثت زيادة ملحوظة في كفاءة تحميل الدواء في الصياغات (EE) (١٦,٩ و٢٣,٣٤٪ في CX-NP1 و CX-NP2 على الترتيب)، ويبدو أن التعقيد بين الكيتوزان والجالانتامين قد أدى إلى التغلب على قوى التنافر بينهما، مما رفع من كفاءة تحميل الدواء في الصياغات.

تم عمل دراسة مطيافية الأشعة تحت الحمراء للكشف عن التفاعل بين جزيئات الكيتوزان والدواء، وقد تميز الطيف الخاص بمعقد الكيتوزان مع الجالانتامين بنطاق عريض للغاية عند ٣٤٢٨ سم$^{-1}$ والتي تُعزى إلى الرابطة الهيدروجينية، بالإضافة إلى نطاق ذبذبة N-H عند ١٥٦٩ سم$^{-1}$، مما يرجح احتمالية وجود رابطة هيدروجينية بين مجموعة OH– في الجالانتامين، ومجموعة NH– في الكيتوزان.

تم تصوير جزيئات الكيتوزان F4-C و CX-NP2 باستخدام ميكروسكوب النفاذ الإلكتروني، وقد وُجد أن كلتا الصياغتين متجانسة الحجم ولا يوجد تجمعات للجزيئات مع بعضها البعض، وتروح حجم جزيئات الصياغة F4-C من ٣٨,٣ إلى ٥٢ نانومتر، بينما تروح حجم جزيئات الصياغة CX-NP2 بين ٤٨,٣ إلى ٦٨,٣ نانومتر.

وقد تمت دراسة تأثير معقد الكيتوزان مع الجالانتامين على الالتصاق المخاطي ومعدل انطلاق الدواء معمليا. وقد كان هناك سرعة عالية لانطلاق للدواء خلال الثلاثين دقيقة الأولى، أعقبها انطلاق ممتد للدواء وصل إلى ٥٨,٠٧٪±٦,٦٧ بعد ٧٢ ساعة. ولقد اتبع معدل انطلاق الدواء من الجزيئات نمط كورسماير-بيباس. ويُعتقد أن امتداد انطلاق الدواء سيكون مفيدًا عند استخدام حيوانات التجارب حتى يمنع الانطلاق المبكر للدواء قبل وصوله إلى المخ.

دلت دراسة الالتصاق المخاطي للجزيئات النانونية CX-NP2 على أن أكثر من ٨٠٪ من الميوسين يلتصق بسطح الجزيئات فور مزجهما سويا، كما أن الالتصاق المخاطي للصياغة F4-C لم يختلف بشكل ملحوظ عن الصياغة CX-NP2.

تم تقييم ثبات الجزيئات النانونية CX-NP2 عند تخزينها لفترة ثلاثة أشهر عن درجات حرارة ٤° و ٢٥° مئوية، ودراسة تأثير ذلك على حجم الجزيئات، ومعامل عديد الانتشار، وتسرب الدواء من الجزيئات النانونية، ولقد وُجد أن التخزين عند ٤° مئوية لثلاثة أشهر قد أدى إلى تسرب ٦,٠٩ ٪±٠,٠١٣ فقط من الدواء، ولم يؤثر تأثيرا ملحوظًا في حجم الجزيئات، أما التخزين عند ٢٥° مئوية لثلاثة أشهر فقد أثر بشكل ملحوظ ليس فقط على محتوى الدواء (١٤,٧٨٪±٠,٠٤٢ تسرب للدواء) بل أثر على حجم الجزيئات (حوالي ٦٥٪ زيادة في حجم قطر الجزيئات).

يُستنتج مما سبق أن تحضير معقد الدواء مع الكيتوزان هو خطوة ناجحة واعدة للتغلب على قوى التنافر بين الدواء والكيتوزان اللذان يحملان شحنة موجبة، فتحضير معقد الدواء مع الكيتوزان قبيل تكوين الجزيئات النانونية بطريقة التهلّم الأيوني يزيد من كفاءة تحميل الدواء في الصياغات مقارنة بطريقة التحميل المباشرة. بالإضافة إلى ذلك، فإن تحضير معقد الدواء مع الكيتوزان أدى إلى تأخر انطلاق الدواء من الجزيئات، ورفع من ثبات الصياغة عند تخزينها عند ٤° مئوية، ولم يؤثر بشكل ملحوظ على الخواص الفيزيائية-الكيميائية للصياغة المحسنة من CS-NPs.

الجزء الثاني بعنوان:

رصد، وتقييم الخواص الفارماكولوجية والسميّة للجزيئات النانونية لمعقد الجالانتامين مع الكيتوزان وتمركزها داخل الخلايا

يهدف هذا الجزء إلى دراسة إمكانية وصول الصياغة المحضرة في الجزء الأول (CX-NP2) إلى مناطق متفرقة من مخ الفئران بعد وقت قصير من إعطائها عن طريق الأنف. لبيان ذلك، تم استخدام المجهر الفلوري، وتم تحضير كيتوزان محمل بصبغة الرودامين (RBITC) ثم استُخدم في تحضير الجزيئات النانونية بتطبيق الطريقة (ب) (RBITC-labeled CX-NP2)، وأُعطيت للفئران عن طريق الأنف. ولقد تم قياس حجم الجزيئات، وجهد الزيتا، والالتصاق المخاطي، ومعدل انطلاق الدواء معلميا لها، وقورنت تلك المعايير بالمقابلة لها لصياغة CX-NP2، ووجد أن تلك المعايير لم تختلف بشكل ملحوظ بين الصياغتين، كما تم الكشف عن الجزيئات الفلورية بوضوح في مناطق متفرقة من مخ الفئران عقب إعطائها عن طريق الأنف بساعة واحدة.

تم تقييم الكفاءة الفارماكولوجية للصياغة CX-NP2 عن طريق تعيين تأثيرها على مستوى البروتين ونشاط إنزيم أستيل كولين استريز في مخ الفئران، وقد اتضح أن تعاطي تلك الجزيئات عن طريق الأنف قد أدى إلى انخفاض ملحوظ في مستوى ونشاط إنزيم أستيل كولين استريز في مخ الفئران مقارنة بمحلول الجالانتامين المأخوذ عن طريق الفم أو الأنف عند تعاطي نفس الجرعة من الجالانتامين يوميًا (٣ مجم/كجم/يوم). ويُستنتج من ذلك أن التعقد بين الجالانتامين والكيتوزان لم يؤثر بشكل سلبي على الكفاءة الفارماكولوجية للجالانتامين.

ولقد تم في هذا الجزء أيضا دراسة الأمان والسميّة للجزيئات النانونية CX-NP2 بعد إعطائها عن طريق الأنف للفئران، بالإضافة إلى دراسة إن كان التعقد بين الجالانتامين والكيتوزان قد غير من أمان الجالانتامين وتجانسه الحيوي. ولقد تم من خلال هذه الدراسة مراقبة بعض العوامل الاكلينيكية مثل وزن الجسم، استهلاك الطعام، الصحة الاكلينيكية العامة، وبعض المؤشرات الحيوية للمصل لحيوانات التجارب، كما تم فحص أنسجة من أجزاء متفرقة من مخ الفئران في نهاية الدراسة بحثًا عن مظاهر سميّة. ولقد نتج عن تعاطي محلول الجالانتامين بالفم نقصًا في وزن الفئران، وعلامات اكلينيكية أخرى كالإسهال، لكن لم يظهر أي نقص في وزن الفئران التي تعاطت الصياغة CX-NP2 عن طريق الأنف، وذلك مقارنةً بالمجموعة الضابطة من حيوانات التجارب.

ولقد ظهر كذلك أن تعاطي محلول الجالانتامين عن طريق الفم يؤثر بشكل واضح على الكبد والكُلى، واتضح ذلك من خلال ارتفاع اليوريا، والكرياتينين، وإنزيمات الكبد (AST, ALT) في المصل. لكن في المقابل لم يتسبب تعاطي صياغة CX-NP2 عن طريق الأنف في تغيرات ملحوظة في المؤشرات الحيوية السابقة مقارنةً بالمجموعة الضابطة.

الاستخدام المتكرر للصياغة CX-NP2 عن طريق الأنف لم يسبب تغيرًا في عدد كرات الدم البيضاء، مما يدل على عدم وجود استجابات مناعية لتعاطي تلك الصياغة، مما يؤكد كونها متجانسة حيويًا. كما أن فحص الأنسجة المأخوذة من مناطق المخ (البصلة الشميّة، والحصين، والقشرتين الأمامية والجدارية) باستخدام المجهر الضوئي لم يكشف عن وقوع أضرار في تلك الأنسجة.

عند فحص مقاطع من القشرة الأمامية لمخ الفئران بعد انقضاء فترة تعاطي جزيئات CX-NP2 عن طريق الأنف، وذلك باستخدام ميكروسكوب النفاذ الإلكتروني، شوهدت تلك الجزيئات كأشكال حويصلية مستديرة بقطر يتراوح من ٤٣,٩ إلى ٨٢,٤ نانومتر، وقد وُجدت تلك الجزيئات إما بداخل حويصلات داخل الخلايا العصبية أو حرة في العصارة الخلوية، مما يرجح كونها تعمل كمخزن داخل الخلايا لخروج الدواء.

يُستنتج من هذه الدراسة أن الجزيئات النانونية المحضرة في هذا الرسالة (CX-NP2) لها أهمية علاجية للتحكم في مرض الألزيهايمر عند تعاطيها عن طريق الأنف. لم تظهر أية أعراض إكلينيكية ضارة من الصياغة المحضرة، كما ثبت أنها آمنة بعد دراسة أجريت على أنسجة مخ الفئران. بساطة الطريقة المستخدمة في تحضير الصياغة، وانخفاض تكلفة بلمر الكيتوزان مقارنة ببقية البلمرات المتجانسة حيويًا يجعلان هذه الصياغة ناجحة وواعدة كطريقة لتوصيل الدواء مباشرة للمخ، وتستحق إدراجها في دراسات اكلينيكية في الأبحاث المستقبلية.