مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۹. شماره ۳. پاییز ۱۴۰۰
مقاله پژوهشی

تهیه و ارزیابی برون‌تنی فرمولاسیون ژل‌شونده برپایه پلیمرکیتوزان و حاوی مرفین به عنوان یک سامانه دارورسانی از مسیر بینی

جعفر مسافر[۱،۲*]، حسین کمالی[۳]، محسن تفقدی[۳]،مینا خواجویی[۴]
۱. مرکز تحقیقات علوم و فنون نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه، ایران
۲. گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، ایران
۳. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
۴. دانشکده داورسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: دارورسانی از مسیر بینی به روش جذب از مخاط بینی به خاطر داشتن مزایایی چون شروع اثر سریع، پرهیز از متابولیسم در کبد و دستگاه گوارش، راحتی و غیرتهاجمی و بدون درد بودن ایده جالب و مفیدی می‌باشد. این مطالعه با هدف تهیه و ارزیابی برون‌تنی فرمولاسیون ژل‌شونده بر پایه پلیمرکیتوزان و حاوی مرفین به عنوان یک سامانه دارورسانی از مسیر بینی انجام شد.

روش‌ها: ابتدا فرمولاسیون ژل‌شونده پلیمر کیتوزان که حاوی مرفین می باشد تهیه شده و در نهایت خصوصیات فیزیکوشیمیای این فرمولاسیون بصورت برون‌تنی (In vitro) مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان به دانش فنی تهیه فرمولاسیون ژل‌شونده در بینی پلیمر کیتوزان جهت دارورسانی مرفین از مسیر بینی دست یافت.

نتایج: فرمولاسیون تهیه شده نهایی، در دمای محیط بصورت سل (محلول روان) بود، درحالیکه در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و بعد از ۳۰ ثانیه بصورت ژل (ویسکوز) تغییر یافت و با کاهش دما مجددا به شکل سل تبدیل گردید. نتایج تست رهایش مرفین بیانگر رهایش مستمر مرفین از درون ماتریکس پلیمری کیتوزان بود. همچنین فرمولاسیون حاصل سمیت سلولی نشان نداد و از طریق سمپلر و بصورت اسپری قابل تجویز به بینی بود.

نتیجه‌گیری: فرمولاسیون ژل‌شونده در بینی داروی مرفین میتواند علاوه بر زیست تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار بودن در کوتاه‌ترین زمان ممکن قبل از خروج از حفره بینی در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به صورت ژل درآمده و با توجه به الگوی رهایش تدریجی مرفین، اثرات ضددردی خود را به آرامی القا نماید.

کلید واژه‌ها:
سل ژل، کیتوزان، مرفین، دارورسانی از بینی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

*آدرس نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات علوم و فنون نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه، ایران
گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه،

مقدمه

دارورسانی از مسیر بینی بخاطر وجود عروق خونی فراوان موجود در بافت اپیتلیال حفره بینی، یکی از روش‌های جدید دارورسانی در علم و صنعت داروسازی می‌باشد که انقلابی را در نحوه دارورسانی به بیمار بوجود آورده است. این روش تجویز می‌تواند به عنوان یک روش مناسب در تجویز داروهایی که عبور اول کبدی بالایی داشته یا در اثر تجویز دهانی تحت‌تاثیر آنزیم‌های دستگاه گوارش تخریب می‌شوند باشد(۱). همچنین این روش فراهمی زیستی بالا و از طرفی شروع اثر سریعی (مانند درمان درد و میگردن) دارد. از طرفی عوارض جانبی اندکی دارد و در مقایسه با سایر راه‌ها مانند خوراکی، تزریقی و رکتالی، راحت‌تر و هزینه‌های کمتر به صنعت داروسازی تحمیل می‌کند(۲).

در کنار مزایای دارورسانی از راه بینی که در بالا ذکر شد، دارورسانی از این طریق دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. بسیاری از داروها جذب کافی از این راه ندارند و یا به خاطر حلالیت کم، دوز مورد نظر در حجم قابل تجویز (۲۵-۲۰۰ میکرولیتر در هر حفره بینی) حل نمی‌شود و یا تحت واکنش‌های متابولیسمی حفره بینی قرار می‌گیرند(۳).

بنابراین پژوهشگران از راهکارهای فرمولاسیونی برای بهبود جذب این نوع داروها استفاده می‌کنند. مشتقات سلولز، نشاسته، پکتین و کیتوزان نمونه‌ای از پلیمرهای بکار رفته در فرمولاسیون داروهای تجویز شده از راه بینی می‌باشند، که از طرق افزایش زمان‌ماندگاری در بینی (خاصیت مخاط چسبی) و یا افزایش تراوایی اپیتلیوم بینی (خاصیت جذب افزایی) باعث افزایش دارورسانی می‌شود(۲). برخی دیگر از این فراورده‌ها بصورت مایع تجویز می‌شوند که به محض تجویز در حفره بینی تحت تاثیر دما یا pH حفره بینی می‌توانند به محض تماس با حفره بینی بصورت ژل درآمده و القاگر خاصیت مخاط چسبی باشند. این فراورده‌ها به شکل پودر نیز می‌توانند تجویز شده که در اثر تماس با مخاط بینی، آب را از موکوس جذب کرده و ویژگی مخاط چسبی پیدا می‌کنند. ماده Pecfent™ یک فراورده تجاری بر پایه پلیمر پکتین می‌باشد که حاوی داروی مسکن فنتانیل بوده و به شکل مایع وارد حفره بینی می‌شود، اما با برهم‌کنش با یونهای کلسیم موجود در ترشحات بینی، ژلی زیست/ مخاط چسب را ایجاد می‌کند. فنتانیل یک مولکول چربی دوست با وزن مولکولی کم است که به راحتی از اپیتلیوم بینی عبور می‌کند و تجویز آن برای درمان دردهای شدید، از راه حفره بینی نسبت به مخاط دهان (دهانی و یا زیرزبانی)، با شروع اثر سریع‌تر و فراهمی زیستی بالاتری همراه است(۲).

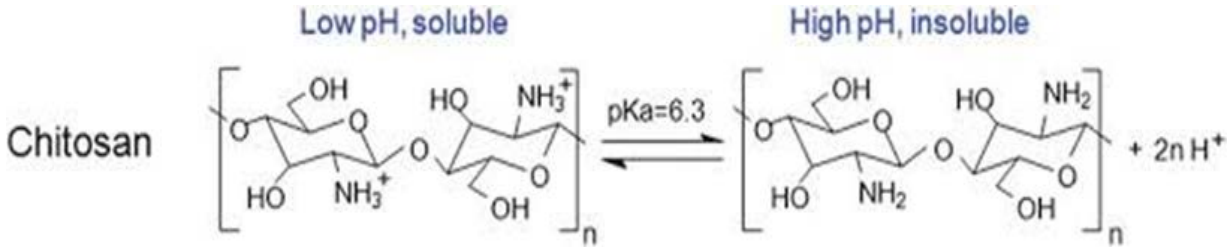
هم اکنون تجاری‌سازی تعدادی از این فراورده‌ها برای مصارف بالینی در دست انجام است که در این میان فراورده‌ای به نام Rylomine™ توسط شرکت داروسازی Javelin Pharmaceutical معرفی شده است(٤). در تهیه این محصول از تکنولوژی‌ای به نام Chisys ™ نام برده شده است. دانش فنی و اجزاء تشکیل دهنده در تولید این محصول در منابع علمی موجود نمی‌باشد و فقط اشاره شده است که در فرمولاسیون آن فرم نمکی پلیمرکیتوزان با عنوان کیتوزان-گلوتامات (Chitosan glutamate salt) به عنوان پایه اصلی فرمولاسیون جهت دارورسانی مولکول‌های کوچک آب دوست مرفین استفاده شده است که با باز کردن موقت اتصالات محکم اپیتلیوم و نیز خاصیت زیست چسبی آن باعث دارورسانی بهتر مرفین نسبت به شکل تزریق سیستمیک آن شده است.

کیتوزان یک پلی ساکارید شامل کوپلیمرهای گلوکوز آمین و N-استیل گلوکز آمین است که به تنهایی به سختی در آب حل می‌شود و لذا در بیشتر مقالات معمولاً محلول‌های اسیداستیک ۱-۳٪ جهت حل کردن کیتوزان به کار برده‌اند، اما با اسیدهای آلی و غیرآلی مانند اسیدهیدروکلریک، لاکتیک اسید، اسید استیک و اسیدگلوتامیک تشکیل نمک داده و به راحتی در آب حل می‌گردد(۵).

استفاده از اسید استیک به عنوان حلال کیتوزان به علت سمیت و بوی تند آن و عدم حذف آن نمی‌تواند گزینه مناسبی جهت تولید یک محصول تجاری جهت دارورسانی از مسیر بینی

باشد، لذا در این مطالعه سعی شد تا با الگوبرداری از تکنولوژی Chisys™ که در بالا به آن اشاره شد، از فرم نمکی کیتوزان-گلوتامات به عنوان پلیمر پایه در فرمولاسیون استفاده گردد و برای این منظور از اسیدگلوتامیک (Glutamic acid) که یکی از بیست اسیدآمینه ی اصلی یاخته‌های زنده است استفاده گردید. از طرف دیگر در بین عوامل ژل‌کننده، بیشترین مطالعات در مقالات حاضر بر روی استفاده از ماده ای به نام گلیسرول فسفات (β-Glycerol phosphate) شده است بطوریکه محلول کیتوزان- گلوتامات حاوی گلیسرول فسفات به عنوان یک سیستم هیدروژلی ژل‌شونده در محل، کاملا حساس به دما بوده که در pH=۷/٤ و دمای بالاتر از ۱۵درجه سانتی‌گراد دستخوش تغییر شکل از محلول به ژل قرار می‌گیرد. لذا با افزودن گلیسرول فسفات به محول کیتوزان-گلوتامات می‌توان از ویژگی ژل‌شونده در محل این فرمولاسیون جهت دارورسانی مرفین از مسیر بینی اقدام کرد.

مرفین یک داروی ضد درد مخدر قوی است که در دردهای شدید به عنواد ضد درد اپیوییدی در دردهایی مانند دردهای بیماران بستری، بیماران قلبی، جراحی، سرطان و سنگ کلیه کاربرد دارد (٦). مرفین (morphine) دارای اشکال دارویی تزریقی mg/ml ۱۰و mg/ml ۲۵ و mg/ml ۵۰ و شیاف mg ۱۰و قرص mg۱۵و mg۳۰و.. وکپسول mg۱۰و mg۲۰ و شربت می‌باشد. اگرچه اشکال دارویی مرفین اثر بخشی مناسبی در بهبود تظاهرات بیماری دارند، اما محدودیت‌های استفاده از این اشکال دارویی محققان را به استفاده از مسیر تجویز از راه بینی (نازال) تشویق می‌نماید. فرم قرص مرفین، در افرادیکه قادربه بلع نیستند دارای محدودیت است. فرم شیاف مرفین، با اینکه فرم بسیار خوب و کاربردی است، اما برای بسیاری از بیماران ناخوشایند می‌باشد در فرم تزریقی وریدی و عضلانی مرفین به علت تهاجمی بودن آن، بیماران زیاد تمایل به استفاده از آن را ندارند؛ لذا فرم تجویز از راه بینی مرفین علاوه بر راحتی استفاده، بخاطر وجود رگ‌های خونی فراوان در حفره بینی و نیز رهش آهسته دارو می‌تواند اثرات ضد دردی سریع‌تر و طولانی‌تری را القا نماید(۷).



تصویر شماره ۱:تغییرات ساختاری کیتوزان در pH های مختلف

روش‌ها

تهیه فرمولاسیون

ابتدا ٤۰ میلی‌گرم از پودر کیتوزان (به اختصار Ch) به همراه ۲۰ میلی‌گرم پودر گلوتامیک اسید (به اختصار Ga) در ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بشر اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی همزده شد. سپس محلول گلیسرول فسفات (به اختصار Gp) با غلظت ۱ گرم در ۰/۷۵ میلی لیتر آب مقطر، بصورت قطره قطره به محلول کیتوزان-گلوتامات (Ga-Ch) و درحالیکه در حمام آب و یخ و بر روی همزن مغناطیسی قرار داشت، اضافه گردید. فرآیند اختلاط برای ۱ دقیقه ادامه یافت. در ادامه به محلول کیتوزان-گلوتامات/ گلیسرول فسفات (Ch-Ga/Gp) حاصل، ۱۲۰ میلی‌گرم پودر سفید رنگ مرفین (به اختصار Mo) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه و بروی همزن مغناطیسی بطور کامل پراکنده گردید. فرمولاسیون نهایی حاصل یعنی کیتوزان-گلوتامات/گلیسرول فسفات/مرفین (Ch-Ga/Gp/Mo) به درون لوله شیشه ای منتقل

شده و به سرعت به مدت ۱۰ ثانیه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت تا حباب‌های هوا خارج شوند و در داخل حمام آب و یخ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری زمان ژل شدن نگهداری شد(۸).

تعیین زمان ژل‌شدن فرمولاسیون

از روش لوله آزمایش معکوس برای این تست استفاده شد. برای این منظور فرمولاسیون نهایی به لوله شیشه‌ای به قطر ۳ میلی‌متر ریخته شد و در دماهای مختلفی از ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل بن ماری نگهداری و در بازه‌های زمانی ۳۰ ثانیه از حمام خارج و با زاویه ٤٥ درجه نسبت به خط افق کج شدند. در صورتی‌که نمونه به راحتی تا انتهای لوله جریان یابد در فاز سل (محلول) است در صورتی‌که هیچ حرکتی در لوله نداشته باشد در فاز ژل (ویسکوز) قرار دارد. به این ترتیب زمان ژل شدن محلول‌های کیتوزان-گلوتامات/ گلیسرول فسفات/مرفین در دماها و شرایط محیطی متفاوت تعیین شد (آزمایش‌ها برای هر محلول ۳ بار تکرار شد)(۹).

تصویر شماره۲: ژل شدن فرمولاسیون

تست ترسیب (ته نشینی)

برای انجام تست ترسیب ابتدا فرمولاسیون نهایی داخل لوله شیشه ای به قطر ۳ میلی‌متر ریخته و در داخل بن ماری و دمای ۳٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در ادامه هر ٥ دقیقه دما را ۲ درجه افزایش داده و محلول بررسی گردید تا زمانی که فرمولاسیون در داخل لوله بصورت دو فاز تبدیل شود.

تست فریز درای (خشک کردن) فرمولاسیون

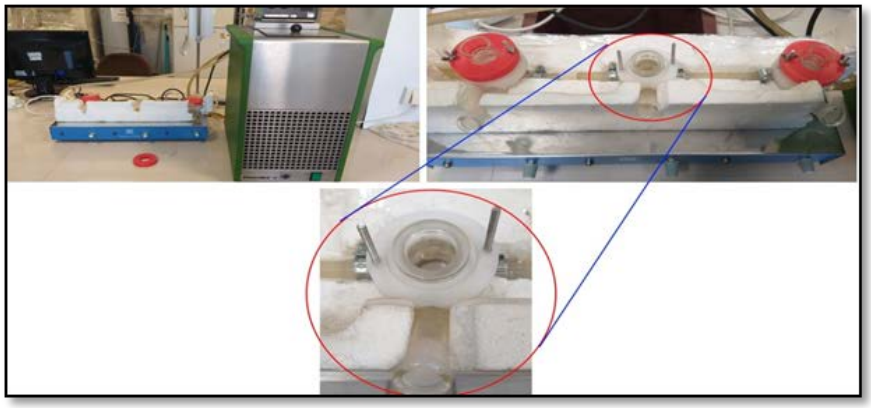
به منظور بررسی اینکه آیا محلول نهایی بعد از فریز درای کردن و پودر شدن و سپس افزودن آب مقطر می‌تواند در همان زمان و دمای بدست آمده در تست‌های قبلی ژل بشود یا نه انجام شد. فرمولاسیون نهایی به مدت ٤٨ ساعت در دمای منفی ٥٠ درجه سانتی گراد و فشار ۰/٥ اتمسفر لئوفیلیزه گردید. به پودر حاصل ۲/۲٥ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد (بعد از حل شدن کامل، حجم نهایی محلول به ۲/۸ میلی‌لیتر می‌رسد) و نتایج حاصل بیانگر ژل شدن محلول در دمای ۳٤ درجه سانتی گراد و بعد از ٦۰ ثانیه بود.

تست رهایش مرفین

ابتدا مقداری از محلول مرفین با غلظت ۹۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر را داخل سل شیشه ای ریخته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و با طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر اسکن گردید تا میزان لامبدای ماکزیمم مرفین تعیین گردد. جهت تهیه منحنی استاندارد مرفین، ۲ میلی لیتر از محلول فوق را داخل میکروتیوب ریخته و ۲ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و با همزن بطور کامل همگن گردید و به همین صورت چند غلظت متفاوت ساخته شد و جذب هرکدام توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در ادامه جهت بررسی الگوی رهایش مرفین، محلول بافر فسفات با pH ۷,٤ تهیه و از دستگاه رهایش دارو استفاده گردید که دارای سه محفظه (فرانسل) و حجم هر کدام ۳۰ میلی‌لیتر است و داخل هر فرانسل یک مگنت

قرار دارد و با بافر پر می‌شود. سپس کیسه دیالیز را روی هر محفظه گذاشته و درب آنرا می‌گذاریم و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر از فرمولاسیون نهایی را روی آن قرار داده و دستگاه برای انجام تست آماده شده و دمای دستگاه روی ۳٤ درجه تنظیم گردید.

تصویر شماره ۳: دستگاه اندازه‌گیری رهایش دارو



تست سمیت

جهت بررسی سمیت هر یک از اجزاء فرمولاسیون تهیه شده باید تا سمیت هر کدام بطور جداگانه و در ترکیب با یکدیگر و داخل فرمولاسیون بررسی گردد. در این تست سه نمونه محلول آماده گردید: ۱-محلول ۲۰ میلی گرم گلوتامیک‌اسید در ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر ۲- محلول یک گرم گلیسرول‌فسفات در ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳- محلول فرمولاسیون نهایی ژل‌شونده کیتوزان-گلوتامات/گلیسرول فسفات/مرفین (Ch-Ga/Gp/Mo) با حجم ۲/۸ میلی‌لیتر.

تست سمیت سلولی با روش آلامار بلو و با استفاده از رده سلولی فیبروبلاست موشی (NIH/3T3) و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ ٪ سرم گاوی (FBS) و یک ٪ محلول آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) در داخل فلاسک‌های T25 و در انکوباتور با ٥ ٪ دی اکسیدکربن و ۹۵ ٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از محلول ۰/۲۵ ٪ تریپسین- EDTA جهت کندن سلولها استفاده گردید. جهت تعیین سمیت سلولی محلولهای فوق نیز به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر، ٥۰ میکرولیتر و ۲٥ میکرولیتر از هر محلول به عنوان سه غلظت متفاوت جهت تعیین سمیت سلولی هر محلول استفاده و در زمان های۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و در پلیتهای ۹٦ خانه تست گردید.

نتایج

تهیه فرمولاسیون ژل‌شونده کیتوزان-گلوتامات/گلیسرول فسفات/مرفین (Ch-Ga/Gp/Mo)

میزان مرفین اضافه شده به فرمولاسیون با توجه به اعدد و مقادیر ذکر شده در سایر مطالعات مربوط به تزریق صفاقی مرفین (IP) در حیوانی مانند رت یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (10 mg/kg) محاسبه شده است. لذا در یک رت با وزن ۳۰۰ گرم باید ۳ میلی‌گرم مرفین بصورت صفاقی تزریق کرد و از آنجا که حجم نهایی محلول فرمولاسیون حاصل ۲۸۰۰ مایکرولیتر می‌باشد، لذا در هر پاف حدود هر ۱۰۰ میکرولیتر از فرمول حاصل ٤,۳ میلی‌گرم مرفین وجود دارد، با توجه به محاسبات بالا و بررسی سمیت سلولی فرمولاسیون که IC_{50} حدود ۸۰ میکرولیتر بدست آمد (قسمت سمیت سلولی)، در نهایت با تزریق ۷۰ میکرولیتر از فرمولاسیون نهایی به بینی رت نه تنها به عدد ۳ میلی گرم مرفین بازای هر رت و معادل با دوز تزریق صفاقی خواهیم رسید بلکه اثرات سمی فرمولاسیون نیز از بین خواهد رفت.در جدول زیر مقادیر بهینه شده نهایی فرمولاسیون ژل‌شونده آمده است.

pH محلول	مقدار مرفین در میکرولیتر یا ۱۰۰ هرپاف معادل	مولاریته نهایی Gp	غلظت نهایی Ch	حجم محلول نهایی	مقدار (	اجزاء واکنش
۷/۴	٤/۳ میلی گرم	$\frac{1g}{2.8\ ml} \times \frac{1\ mol}{306.11\ g/mol} \times \frac{1000ml}{1L} = 1.16M$	$\frac{0.04\ g}{2.8\ ml} \times 100 = 1.43\%$		٤۰	کیتوزان (Ch)
				۲/۸	۲۰	گلوتامیک اسید(Ga)
					۱۰۰۰	گلیسرول فسفات(Gp)
					۱۲۰	مرفین (Mo)

زمان ژل‌شدن فرمولاسیون

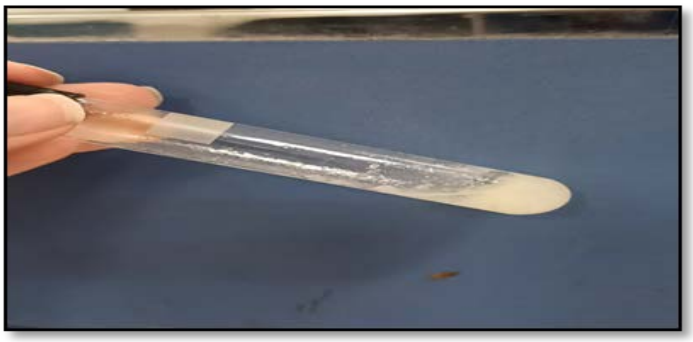
محلول نهایی بعد از ۳۰ ثانیه در دمای ۳٤ درجه سانتی‌گراد کاملا ویسکوز شد و بعد از ٦۰ ثانیه ژل کاملا سفت بدست آمد. نتایج نهایی بصورت زیر می باشد:

زمان و دمای ژل شدن(ثانیه/درجه سانتی‌گراد)	رنگ محلول بعد از ژل شدن	رنگ محلول قبل از ژل‌شدن	حجم محلول نهایی (میلی‌لیتر)
۶۰ ثانیه/ ۳۴ درجه سانتی‌گراد	سفید	کهربایی شفاف	۲/۸

ترسیب (ته نشینی)

همانطور که در جدول زیر مشاهده میشود در دمای ٤۰ درجه سانتی گراد فرمولاسیون تهیه شده به دو فاز تبدیل شد.

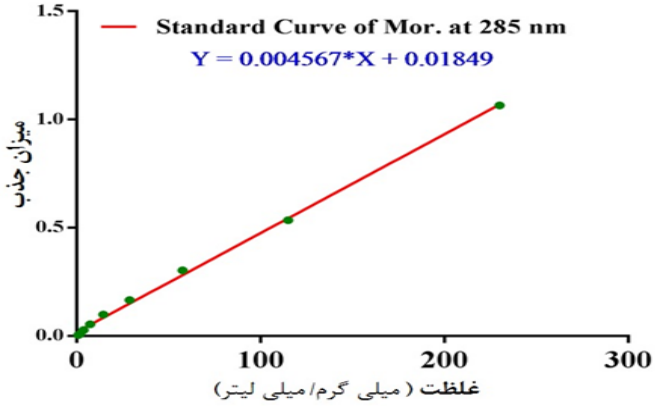
تغییرات	**دما** (درجه سانتی گراد)
در ۳۰ ثانیه اول حالت ژل شد و پس از یک دقیقه ژل سفت شد	۳۴
کمی شل شد ولی تکه‌های ژل در آن بود	۳۶
تکه‌های ژل کمتر و مایه اطراف بیشتر شد	۳۸
به دو فاز تبدیل شد	۴۰



تصویر شماره ۴: تست ترسیب

منحنی استاندارد مرفین

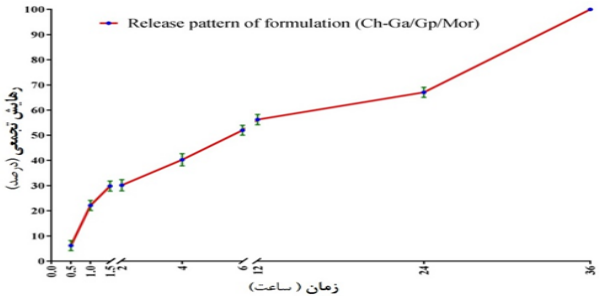
بعد از اینکه طول موج ماکزیمم مرفین ۵ اندازه‌گیری و عدد ۲۸۵/ بدست آمد، در ادامه جهت تعیین الگوی رهایش دارو، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت های متفاوت مرفین تهیه گردید که در زیر مشاهده می‌شود.



تصویر شماره۵: منحنی کالیبراسیون مرفین

الگوی رهایش مرفین

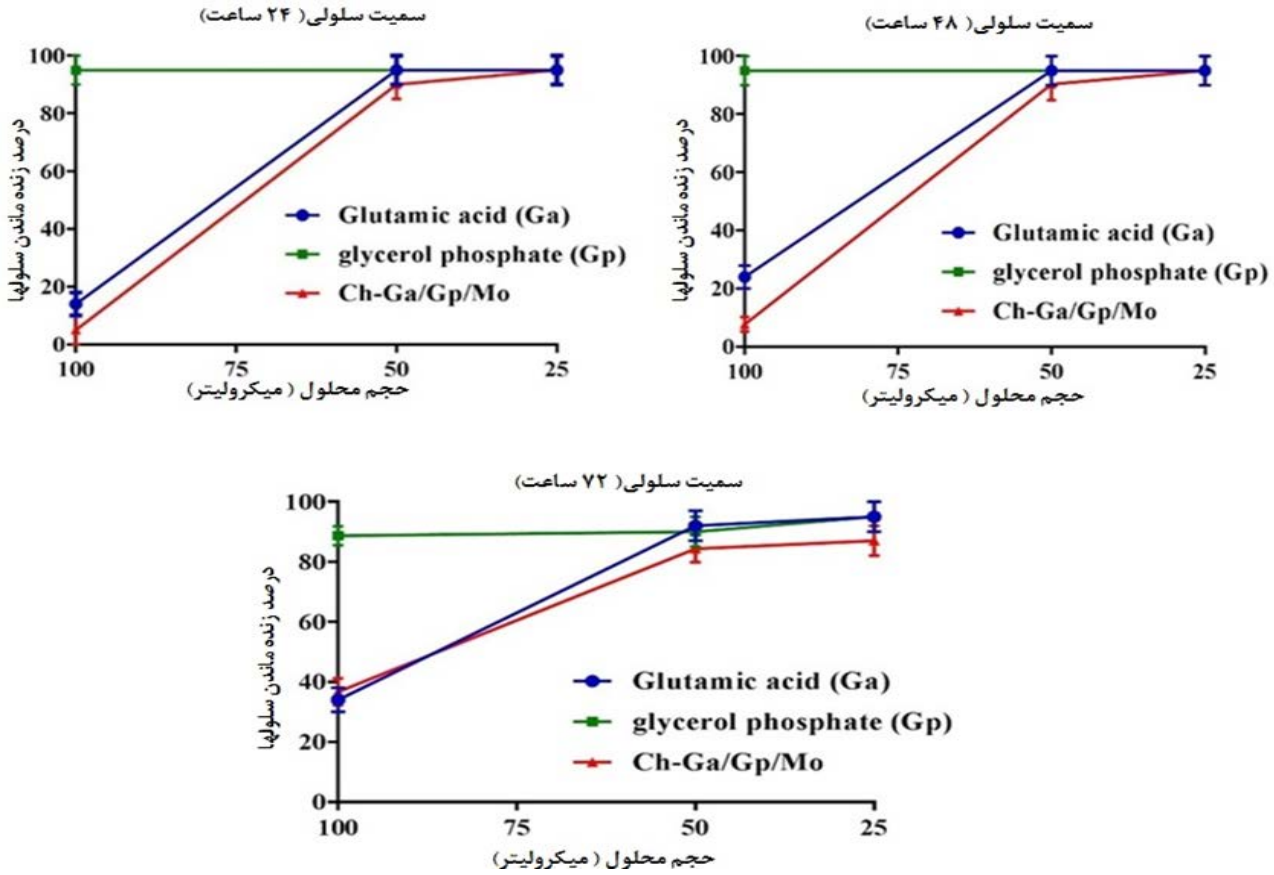
مطابق شکل، از روز ابتدای آزمایش تا دو ساعت بعد از آن حدودا ۳۰ ٪ از مرفین با یک شیب تندی از داخل ساختار ماتریکس فرمولاسیون خارج شده که ناشی از تاخیر در تشکیل ماتریکس یا ژل دارویی است که ٦ ساعت پس از آن و با شیب ملایم‌تری حدود ۵۲ ٪ از مرفین با مکانیسم نفوذ یا هیگوشی از سامانه آزادسازی شده است. در نهایت از ساعت ٦ تا انتهای آزمایش یعنی ۳٦ ساعت پس از شروع تست، سامانه وارد فاز تخلیه دارو ناشی از تخریب ماتریکس پلیمری می‌گردد که تقریبا ۱۰۰ ٪ ار مرفین و با یک شیب یکنواختی رهایش یافته است.



تصویر شماره ۷: نمودار رهایش مرفین

سمیت سلولی فرمولاسیون

با توجه به نتایج حاصل از تست سمیت سلولی، محلول گلیسرول فسفات به تنهایی سمیتی را نشان نداد، ولی محلول گلوتامیک اسید به نظر می‌رسد که ۱۰۰ میکرولیتر از آنها سمیت سلولی ایجاد می‌کند. درحالی‌که ۵۰ میکرولیتر از این محلول‌ها تقریبا سمیتی را ایجاد نمی‌کند. با توجه به محاسبات تامین دوز مورد نیاز مرفین و البته بررسی سمیت سلولی فرمولاسیون که IC_{50} حدود ۸۰ میکرولیتر را نشان می‌دهد، در نهایت با تزریق حدود ۷۰ میکرولیتر از فرمولاسیون نهایی به بینی حیوانی مانند رت نه تنها به عدد ۳ میلی‌گرم مرفین بازای هر رت و معادل با دوز تزریق صفاقی خواهیم رسید بلکه اثرات سمی فرمولاسیون نیز از بین خواهد رفت.



تصویر شماره۸: سمیت سلولی در زمان‌های ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت. نمودارها بصورت میانگین ± انحراف معیار رسم شده‌اند (تعداد ۳ تکرار)

بحث

هیدروژل‌های حساس به دما در سال‌های اخیر به عنوان سامانه‌های آهسته رهش مطرح شده‌اند و مزایای زیادی در مقایسه با سیستم‌های دیگر دارند. کیتوزان به تنهایی در آب قابل حل نمی‌شود، ولی با افزودن گلوتامیک اسید به آن به فرم کیتوزان گلوتامات درآمده که براحتی در آب حل می‌گردد(۱۰). دیده شده با افزودن گلیسرول فسفات به محلول کیتوزان-گلوتامات، میتوان یک سامانه ژل‌شونده حساس به دما در محل ایجاد کرد که در دمای محیط به حالت روان و سل می‌باشد، ولی در دمای بدن به ژل تبدیل می‌شود. مکانیسم ژل‌شدن محلول کیتوزان گلیسرول فسفات در اثر افزایش دما بدین صورت است که چون گلیسرول فسفات یک باز می‌باشد و بازها تمایل به کاهش غلظت H^+ از محیط را دارند، لذا پیوندهای

هیدروژن (H-band: Hydrogen bonding) بین اتم های H^+ زنجیره های کیتوزان و گلوتامیک اسید را شکسته و در نتیجه حلالیت کیتوزان در محلول کاهش یافته و واکنش‌های هیدروفوبیک (Hydrophobic interaction) افزایش یافته و لذا کیتوزان شروع به ژل‌شدن می کند(۱۱).در تهیه فرمولاسیون نهایی پس از انجام آزمایشات بسیار به نتایج عالی برای ژل شدن در کمترین زمان ممکن (۳۰ثانیه) رسیدیم که نسبت به نتایج مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، از نتیجه خوبی برخوردار می‌باشد. درمطالعه‌ی دیگری که توسط Shublna و همکاران صورت گرفت، محلولی از کیتوزان، دوستاکسول، هیالورونیک اسید و پولاکسامر برای افزایش اثر درمانی و کاهش سمیت تهیه شد. این آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ژل شدن در حالت برون‌تنی ۳ دقیقه بود، که قابلیت بهتری در مقایسه با فرمولاسیون تزریقی معمولی با انتشار فوری کمتر از دو ساعت داشت(۱۲).

در مطالعه‌ای که توسط گنجی و همکاران روی زمان ژل‌شدن محلول شامل کیتوزان، گلیسرول‌فسفات، اسیداستیک و سدیم‌فسفات که برای تزریق آماده شده بود، انجام گرفت در این آزمایش لوله‌های آزمایش مختلفی آماده شد، در لوله آزمایش شماره ۱ محلول حاوی کیتوزان ۲ ٪ وزنی/ حجمی همراه ۰/۵٦میلی گرم از گلیسرول فسفات آماده شد، که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از ٤ دقیقه به حالت ژل درآمد و وقتی افزایش دما را به ٦۰ درجه سانتی‌گراد رساندند زمان ژل شدن به کمتر از ۲۱ ثانیه رسید. در لوله آزمایش دیگری همین مقدار درصد کیتوزان را با ۰/٤٦میلی‌گرم گلیسرول فسفات آماده و زمان ژل شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۹ دقیقه و در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به ۱ دقیقه رسید. گنجی لوله آزمایش دیگری شامل محلول حاوی کیتوزان ۱ ٪ وزنی/حجمی را آماده همراه ۰/۵٦میلی‌گرم گلیسرول فسفات در دمای ۳۷ درجه پس از ٦ دقیقه ژل وبا افزایش دما به ٦۰ درجه پس از یک دقیقه ژل شد و در لوله آزمایش دیگری با همین درصد کیتوزان و مقدار ۰/٤٦ میلی‌گرم گلیسرول فسفات زمان ژل شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۱۱ دقیقه و در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه بود. پس افزایش مقدار کیتوزان، گلیسرول فسفات و افزایش دما در کاهش زمان ژل‌شدن موثر می‌باشد(۱۳).طبق آزمایشاتی که توسط صدوق و همکاران روی محلولی از کیتوزان و ونکومایسین همراه عوامل ژل‌شونده PEG (پلی اتیلن گلیکول) وHPMC (هیدروکسی پروپیل متیل سلولز) صورت گرفته بود، زمان ژل‌شدن را با ثابت نگه داشتن کیتوزان و گلیسرول فسفات و اضافه کردن عوامل ژل‌شونده به نتایجی مبنی بر افزایش زمان ژل‌شدن رسیدند، بجز زمانی که افزایش HPMC به میزان یک درصد باعث بالا رفتن قدرت آماس و تخلخل بیشتر و سبب رهش بیشتر دارو نسبت به دیگر هیدروژل های فاقد HPMC می شود. در این مطالعه بررسی شد افزایش HPMC بیش از ۵ ٪ سبب رهش کمتر دارو نسبت به سامانه کیتوزان گلیسرول فسفات بدون HPMC می شود که علت آن افزایش ویسکوزیته اعلام شد(١٤).

سرعت رهایش مرفین از فرمولاسیون نهایی از دو جهت حایز اهمیت است. اول اینکه به محض تجویز فرمولاسیون در بینی چه مقدار مرفین و در طی چه زمانی می تواند رهش پیدا کند تا بتواند در حداقل زمان ممکن و با حداکثر توان بی دردی را ایجاد کند و دوم اینکه فرمولاسیون تجویز شده تا چند روز بعد از تجویز می‌تواند مرفین را همچنان آزاد کند بطوریکه بتواند بی دردی طولانی‌تری را در مقایسه با فرم مرفین خالی که تجویز می‌شود ایجاد کند. طبق نتایج حاصل از بررسی رهایش مرفین ، آزادسازی آهسته مرفین طی تقریبا ۳٦ ساعت (۱/۵روز) صورت گرفت که باعث می‌شود تعداد دفعات مصرف مرفین کاهش و رضایت بیمار افزایش پیدا کند. در مطالعه Ilium و همکاران که روی آزادسازی مرفین در ترکیب با کیتوزان و نمک گلوتامات به صورت تجویز از راه بینی صورت گرفت، افزایش چسبندگی و تعامل قوی با مخاط بینی مشاهده گردید.

این ترکیب باعث افزایش ۵ تا ٦ برابری فراهمی زیستی نسبت به محلول‌های ساده مرفین و جذب بسیار بالایی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که آزادسازی دارو به صورت سریع رهش

است. چون طی ۲ ساعت اول تقریبا حداکثر میزان دارو آزاد شد (۱۵).

باتوجه به اینکه فرمولاسیون تهیه شده در این مطالعه سمیتی را نشان نداد یک فرمولاسیون ایده‌آل میباشد و قابلیت استفاده در مطالعات حیوانی را دارد. طبق مطالعات انجام شده، کیتوزان عموما توسط فرآیندهای شیمیایی تجزیه و تحلیل آنزیم تخریب می‌شود و بدون سمیت است. مطالعاتی که توسط Samuels درباره سمیت حاد و مزمن گلوتامیک اسید انجام شد نتایجی درباره سمیت این ماده در غلظت‌های بالا نشان داد(۱٦). در مطالعه‌ی جالبی که توسط Jun lee و همکارانش انجام شد ذرات پاکلی‌تاکسول و کیتوزان سمیت بالایی نسبت به پاکلی‌تاکسول به تنهایی و جذب سلولی بیشتری داشت چون بار منفی سطح سلول را خنثی میکند و این باعث افزایش جذب میشود(۱۷)، ولی در مطالعه‌ی دیگری که توسط Triklar روی پاکلی‌تاکسول انجام شد اضافه کردن گلیسرول‌مونولئات(GMO) همراه کیتوزان باعث شد نانو ذرات با هسته آب گریز و پوسته آب دوست ایجاد شده و جذب سلولی ٤ برابر افزایش و دوز کشنده میانی آن کاهش یابد. پس اضافه کردن نانو ذرات مثل گلیسرول‌فسفات باعث افزایش فراهمی زیستی فرمولاسیون شده است(۱۸).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مرفین در سامانه کیتوزان-گلوتامات/ گلیسرول فسفات بارگیری شد و در نهایت فرمولاسیونی تهیه گردید که می‌تواند به دلیل عدم وجود سمیت سلولی و نیز خاصیت ژل شوندگی در دمای ۳٤ درجه سانتی گراد و حداقل زمان ممکن یعنی ۳۰ ثانیه ژل شده و در بینی تجویز شده و از حفره بینی خارج نگردد. با توجه به الگوی رهایش دارو نیز، مرفین میتواند به آرامی آزاد شده و از طریق مویرگهای فراوان حفره بینی جذب شده و اثر سریع و نیز طولانی تری را القا نماید. نتایج حاصل از فرمولاسیون تهیه شده در این مطالعه بیانگر قابلیت استفاده از آن به عنوان یک سامانه ژل شونده در محل که قابلیت دارورسانی طیف وسیعی از داروها از مسیر بینی را دارد به اثبات می‌رساند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کلیه افرادی که در مراحل نگارش این مقاله همکاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها : جعفر مسافر، حسین کمالی، محسن تفقدی،مینا خواجویی

(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: جعفر مسافر، حسین کمالی، محسن تفقدی،مینا خواجویی

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله:

جعفر مسافر، حسین کمالی، محسن تفقدی،مینا خواجویی

References

1. Van Woensel M, Wauthoz N, Rosière R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F, Van Gool SW, De Vleeschouwer S. Formulations for intranasal delivery of pharmacological agents to combat brain disease: a new opportunity to tackle GBM?. Cancers. 2013 Sep;5(3):1020-48.

2. Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. Drug discovery today. 2016 Jan 1;21(1):157-66.

3. Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. Journal of Controlled Release. 2014;190:189-200.

4. Christensen KS, Cohen AE, Mermelstein FH, Hamilton DA, McNicol E, Babul N, Carr DB. The analgesic efficacy and safety of a novel intranasal morphine formulation (morphine plus chitosan), immediate release oral morphine, intravenous morphine, and placebo in a postsurgical dental pain model. Anesthesia & Analgesia. 2008 Dec 1;107(6):2018-24.

5. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. Marine drugs. 2016;14(5):99.

6. Jonsson T, Christensen CB, Jordening H, Frølund C. The bioavailability of rectally administered morphine. Pharmacol Toxicol. 1988;62(4):203-5.

7. Hoekman JD, Ho RJ. Enhanced analgesic responses after preferential delivery of morphine and fentanyl to the olfactory epithelium in rats. Anesthesia and analgesia. 2011 Sep;113(3):641.

8. Kim S, Nishimoto SK, Bumgardner JD, Haggard WO, Gaber MW, Yang Y. A hitosan/β-glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer. Biomaterials. 2010 May 1;31(14):4157-66.

9. Naik A, Nair H. Formulation and evaluation of thermosensitive biogels for nose to brain delivery of doxepin. BioMed research international. 2014 Jan 1;2014.

10. Abrami M, Siviello C, Grassi G, Larobina D, Grassi M. Investigation on the thermal gelation of chitosan/β-glycerophosphate solutions. Carbohydrate polymers. 2019 Jun 15;214:110-6.

11. Cheng Y-H, Yang S-H, Su W-Y, Chen Y-C, Yang K-C, Cheng WT-K, et al. Thermosensitive chitosan–gelatin–glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study. Tissue Engineering Part A. 2010;16(2):695-703.

12. Singh A, Thakur S, Singh N, Kaur S, Jain SK. Novel Gellan Gum-Based In Situ Nanovesicle Formulation of Docetaxel for Its Localized Delivery Using Depot Formation. AAPS PharmSciTech. 2021;22(5):1-17.

13. Ganji F, Abdekhodaie M, SA AR. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel. Journal of sol-gel science and technology. 2007;42(1):47-53.

14. Sadogh M. Investigation of different additives on characteristic and vancomaycin release through chitosan glycerolphosphate temperature sensitive systems. School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. A desertation. 2010.

15. Illum L, Watts P, Fisher A, Hinchcliffe M, Norbury H, Jabbal-Gill I, et al. Intranasal delivery of morphine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2002;301(1):391-400.

16. Samuels A. Dose dependent toxicity of glutamic acid: a review. International Journal of Food Properties. 2020;23(1):412-9.

17. Li F, Li J, Wen X, Zhou S, Tong X, Su P, et al. Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An in vitro study. Materials Science and Engineering: C. 2009;29(8):2392-7.

18. Trickler W, Nagvekar A, Dash A. A novel nanoparticle formulation for sustained paclitaxel delivery. Aaps Pharmscitech. 2008;9(2):486-93.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2021, Volume 9, No. 3: 1-12.

Original article

Preparation and in-vitro evaluation of an in-situ gel forming of chitosan-based morphine formulation as an intranasal administration

Running title: An intranasal in-situ gel forming of morphine

Jafar Mosafer[1,2*], Hossein Kamali[3], Mohsen Tafaghodi[3], Mina Khajooee[4]

1. Department of Nanomedicine, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

2. Research Center of Advanced Technologies in Medicine, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

3. Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4. School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding author: Department of Nanomedicine, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

Email: Mosaferj901@gmail.com (J. Mosafer)

Keywords:

Sol-gel, Chitosan, Morphine, Nasal drag delivery

Abstract

Background & Aim: Intranasal delivery through the epithelium of nose is an interesting and useful idea because it has a fast onset of effect with any metabolism in liver and digestive system, also it is user-friendly, noninvasive and without pain. In this study, we aimed to prepare and evaluate an in-situ gel forming of chitosan-based morphine formulation as an intranasal administration in vitro.

***Methods*:** In this project, the in-situ gel forming of morphine-loaded chitosan formulation was firstly prepared and finally its physicochemical properties was determined in order to achieve the technology of a gel-forming formulation for morphine nasal delivery.

***Results*:** The final prepared formulation was in the form of sol in room temperature; while, it was transmitted to the gel form at 37 °C and subsequently returned to the sol form after decreasing temperature. The obtained results of burst release test showed a sustained release of morphine from the polymeric matrix of chitosan. Additionally, the formulation showed that it could be sprayed in nostril with no toxicity.

***Conclusion*:** The biodegradable and biocompatible intranasal form of morphine could be gelled in the shortest possible time before leaving the nose at a temperature of 34 °C. Also, based on the release pattern of morphine, morphine could slowly induce its analgesic effects.

How to Cite this Article: Mosafer J, Kamali H, Tafaghodi M, Khajooee M. Preparation and in-vitro evaluation of an in-situ gel forming of chitosan-based morphine formulation as an intranasal administration**.** Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2021;9(3):1-12.

*آدرس نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات علوم و فنون نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربتحیدریه، ایران
آدرس پست الکترونیک: **Mosaferj901@gmail.com (J. Mosafer).**