

مقایسه‌ی پودر استنشاقی اریترپوئیتین و فرم تزریقی آن در افزایش رتیکولوسیت‌های خون

دکتر ژاله ورشوساز^۱، دکتر محسن مینائیان^۲، مریم سامی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیوی به علت آنمی، نیاز به مصرف مکرر و طولانی مدت اریترپوئیتین وجود دارد. هدف از طرح حاضر، تهیه‌ی یک فرم قابل استنشاق از اریترپوئیتین به صورت پودر خشک و مقایسه‌ی آن با فرم تزریقی در افزایش رتیکولوسیت‌های خون بود.

روش‌ها: پودر استنشاقی توسط دستگاه اسپری درایر و مخلوط پلی متیل وینیل اتر مالئیک اسید، ۲-هیدروکسی پروپیل آلفا سیکلودکسترین و ترهالوز تهیه شد. محلول آبکی اریترپوئیتین فریزر درای شد و با پودر اسپری درای شده، با نسبت ۴ به ۱ مخلوط گردید. اندازه‌ی ذره‌ای پودر و مقدار دارو در پودر نهایی خشک شده، تعیین شد. جهت مطالعات حیوانی، از ۳ گروه عتایی رت یک گروه دریافت کننده‌ی پودر فاقد دارو، یک گروه دریافت کننده‌ی محلول معمولی تزریقی زیر جلدی و یک گروه دریافت کننده‌ی پودر استنشاقی دارو بود. ۶ روز قبل از تجویز دارو، معادل ۱ درصد وزن غذایی رت‌ها، آهن به صورت گاوآذ داده شد و ۸۴۰ واحد دارو برای هر بار تجویز در هر رت در نظر گرفته شد. در روزهای ۰، ۱، ۴ و ۷، جهت شمارش رتیکولوسیت‌ها از گوشه‌ی چشم رت‌ها خون‌گیری به عمل آمد و شمارش رتیکولوسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتر متر انجام شد.

یافته‌ها: گروه‌های شاهد منفی، اریترپوئیتین تزریقی (Eryth) و فرمولاسیون استنشاقی هیچ اختلاف معنی‌دار آماری در روزهای ۰ و ۱ مطالعه نداشتند. در روز ۴ بین هر سه گروه، اختلاف معنی‌دار وجود داشت و تعداد رتیکولوسیت‌ها در فرمولاسیون استنشاقی با $P < 0/01$ از گروه اریترپوئیتین تزریقی و با $P < 0/001$ از گروه شاهد منفی بیشتر بود. در این زمان، بین گروه اریترپوئیتین تزریقی و شاهد منفی نیز اختلاف معنی‌دار با $P < 0/01$ دیده شد. در روز ۷ نیز نتایج مشابه روز ۴ بود با این تفاوت کوچک که اختلاف فرمولاسیون استنشاقی با هر دو گروه اریترپوئیتین و شاهد منفی با $P < 0/001$ معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: پودر استنشاقی اریترپوئیتین در مقایسه با تزریق زیر جلدی به مقدار بیشتر و طولانی‌تری می‌تواند در افزایش رتیکولوسیت‌های خون مؤثر باشد و به عنوان جایگزین مناسبی برای راه تزریقی این دارو در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: اریترپوئیتین، رتیکولوسیت، دارو رسانی ریوی، نارسایی مزمن کلیوی

ارجاع: ورشوساز ژاله، مینائیان محسن، سامی مریم. مقایسه‌ی پودر استنشاقی اریترپوئیتین و فرم تزریقی آن در افزایش

رتیکولوسیت‌های خون. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۴): ۲۰۴۱-۲۰۳۱

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای داروسازی به شماره‌ی ۳۹۱۱۶۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی، و مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی داروسازی، گروه فارماسیوتکس، مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشکده‌ی داروسازی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ژاله ورشوساز

مقدمه

اریترپوئیتین یک گلیکوپروتئین اسیدی است که ژن سازنده آن ۱۹۳ اسید آمینه را کد می‌کند، اما در حین وارد شدن به جریان گردش خون، ۲۷ مورد از این اسیدهای آمینه می‌شکنند و فرمی از پروتئین که در جریان گردش خون وجود دارد، دارای ۱۶۵ اسید آمینه است. هورمون نهایی تا حد زیادی گلیکولیزه می‌شود و دارای وزن مولکولی تقریبی ۳۰۰۰۰ دالتون می‌باشد (۱).

اریترپوئیتین مهم‌ترین تنظیم‌کننده پرولیفراسیون پیش‌تازهای اریتروسیتی می‌باشد که فقدان آن سبب آنمی می‌گردد. ساخت اریتروسیت‌ها تا حد زیادی تحت کنترل سیستم فیدبکی است که در آن سنسورهای کلیوی، تغییر سطح اکسیژن رسانی را تشخیص می‌دهند و در نتیجه، ترشح اریترپوئیتین تنظیم می‌گردد (۱).

بیماری‌های منجر به نارسایی کلیه، نهمین علت مرگ و میر در آمریکا هستند؛ به طوری که آمار موجود تا سال ۲۰۰۴ نشان می‌دهد که نزدیک به ۱۹/۲ میلیون نفر در این کشور، به آن مبتلا هستند و بین سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۹ رشد ۱۰۴ درصدی نارسایی مزمن کلیوی گزارش شده است (۲). در این بیماران، مشکل آنمی بسیار جدی است و اغلب نیاز به مصرف مکرر و طولانی مدت اریترپوئیتین وجود دارد.

۹۰ درصد اریترپوئیتین در سلول‌های پری توبولار کلیه‌ی یک انسان بالغ در پاسخ به کاهش سطح اکسیژن بافت‌ها ساخته می‌شود. هر چه فشار اکسیژن پلاسما کاهش پیدا کند، غلظت اریترپوئیتین خون افزایش پیدا می‌یابد. اریترپوئیتین، تکثیر و تمایز اریتروئید را با تداخل با گیرنده‌های اریترپوئیتین روی پیش‌ساز گلبول قرمز تحریک

می‌کند. گیرنده‌ی اریترپوئیتین یک عضو از خانواده‌ی بزرگ گیرنده‌های سیتوکینی است که در فسفریلاسیون پروتئینی و فعال‌سازی عامل ترجمه برای تنظیم عملکرد سلولی، استفاده می‌شود.

اریترپوئیتین باعث القای آزادسازی رتیکولوسیت‌ها از مغز استخوان نیز می‌گردد. در اصل، اریترپوئیتین درون‌زا در کلیه تولید می‌شود. در افرادی که کم‌خونی ندارند، سطح سرمی اریترپوئیتین کمتر از ۲۰ واحد بر لیتر است. چنانچه سطوح هماتوکریت و هموگلوبین پایین بیفتد و کم‌خونی شدیدتر شود، سطح اریترپوئیتین سرم به طور لگاریتمی بالا می‌رود. بیماران مبتلا به کم‌خونی‌های به نسبت شدید، به طور معمول، سطوح اریترپوئیتینی در محدوده‌ی ۵۰۰-۱۰۰ واحد بر لیتر دارند و بیماران مبتلا به کم‌خونی‌های شدید، ممکن است سطوح چند هزار واحد بر لیتر داشته باشند.

مهم‌ترین استثنا برای این رابطه‌ی معکوس، کم‌خونی ناشی از نارسایی مزمن کلیوی است. در بیماران مبتلا به بیماری کلیوی، سطوح اریترپوئیتین به طور معمول پایین است؛ چون کلیه‌ها نمی‌توانند عامل رشد را تولید کنند. این بیماران به درمان با اریترپوئیتین برون‌زا پاسخ می‌دهند. در مهم‌ترین اختلالات مغز استخوان (کم‌خونی آپلاستیک، لوکمی، اختلالات تکثیر سلول‌های مغز استخوان و عدم تکثیر سلول‌های مغز استخوان) و کم‌خونی ثانویه‌ی تغذیه‌ای، سطوح اریترپوئیتین درون‌زا بالا است و بنابراین، شباهت کمتری به پاسخ اریترپوئیتین برون‌زا وجود دارد (۳).

فرم‌های تجاری موجود از اریترپوئیتین آلفا عبارت از PROCIT، POPEN و EXPREX

Fetal pre-T cells express low-affinity)
IgG receptors for IgG یا Fc gamma R) از IgG
(Immunoglobulin G) به اریتروپوئیتین است که
حداکثر ۳۵ درصد فراهمی زیستی داشته است
(۱۱-۱۲) و پیچیدگی فرمولاسیون، مانع از کاربرد
وسیع آن شده است.

محدودیت عمده‌ی داروهای پپتیدی و پروتئینی
در تجویز خوراکی، آن است که توسط آنزیم‌های
روده‌ای آسیب می‌بینند و بر اثر هیدروفیلیسیته و
اندازه‌ی بزرگ مولکولی‌شان قابلیت نفوذ بافتی
ضعیفی دارند. به همین علت، به طور عمده از راه
تزریقی به کار می‌روند که دردناک است و باعث
ناراحتی بیمار می‌گردد.

این مولکول‌ها، کاندیداهای خوبی برای تجویز
غیر تهاجمی از راه‌های مخاطی مانند ریوی می‌باشند.
ریه‌ها با توجه به داشتن سطح جذب وسیع، عروق
خونی فراوان و سد نازک آلوئولی به عروق خونی، که
عبور داروهای ماکرو مولکولی را به جریان گردش
خون تسهیل می‌کند، موضع جذب خوبی محسوب
می‌شوند (۴). راه ریوی در مقابل راه خوراکی فاقد
اثر عبور اول کبدی و فعالیت آنزیمی گسترده می‌باشد
(۱۳). به علاوه، امکان دارو رسانی به ریه می‌تواند
دوز دارو و عوارض جانبی آن را کاهش دهد (۱۴).
پپتیدهای زیادی چون انسولین (۱۷-۱۵)، کلسی
تونین (۱۸)، هورمون رشد (۱۹) و ایتترفرون آلفا
(۲۰) تا کنون از راه ریوی به کار رفته‌اند. از بین
فرمولاسیون‌های در دسترس برای استنشاق، اغلب
پودرهای خشک در مقایسه با اشکال مایع ارجح
هستند؛ زیرا بیشترین پایداری و فراهمی زیستی را
برای ماده‌ی مؤثره ایجاد می‌کنند.

هستند که به صورت ویال‌های ۱۰۰۰۰-۲۰۰۰ واحد در
میلی‌لیتر برای مصارف تزریقی وریدی یا زیر جلدی (با
دوز حدود ۱۰۰ واحد بر کیلوگرم) موجودند.

تزریق وریدی اریتروپوئیتین آلفا دارای نیمه عمر
دفع ۴-۸ ساعت است و نیاز به تجویز ۳ بار در هفته
دارد تا اثر درمانی کافی ایجاد نماید. اندیکاسیون‌های
مصرف این دارو عبارت از کم خونی ناشی از
نارسایی مزمن کلیوی، آنمی در بیماران مبتلا به ایدز،
آنمی‌های ناشی از سرطان و جراحی‌ها هستند (۴).

از جمله فرم‌های غیر تزریقی اریتروپوئیتین که تا
کنون در مقالات گزارش شده‌اند، فرم لیپوزومی (۵) و
Patch‌های روده‌ای (۶) آن می‌باشد که البته بیش از
۱۲ درصد، فراهمی زیستی نداشته‌اند. نانو ذرات تهیه
شده از سیلیکون دی اکساید، نانو لوله‌های کربنی
فولرن (نانو ذرات ساخته شده از کربن که به شکل
توپ فوتبال یا بیضی شکل یا لوله‌ای هستند) نیز برای
تهیه فرم خوراکی این دارو گزارش شده است (۷).
قرص مخاط چسب این دارو با پشت‌بندی عایق
استات سلولز / یودراژیت L / یودراژیت S نیز تهیه
شده است (۸). فرم بینی آن تنها ۷-۴ درصد فراهمی
زیستی داشته است (۹).

از فرم‌های گزارش شده‌ی ریوی برای
اریتروپوئیتین نیز یک پتنت از آمریکا در دسترس
است که دارو را به شکل محلول استنشاقی تجویز
نموده است که به میزان ۹۰ درصد فرم تزریقی زیر
جلدی جذب داشته است (۱۰). این پتنت، تنها برای
نشان دادن قابلیت جذب ریوی دارو بوده است و
هیچ شکل دارویی پایدار و قابل نگهداری برای آن
پیشنهاد نشده است. گزارش دیگر در خصوص
استفاده‌ی ریوی برای این دارو، اتصال دومن FC

با وجود مزایای پیش‌گفته، مشکلات دارو رسانی به ریه، شکل هندسی خاص راه‌های هوایی و رطوبت آن‌ها، اپی تلیوم ریه و مکانیسم‌های دفاع طبیعی مانند سیستم موکوسیلیاری، ماکروفاژها و فعالیت‌های آنزیماتیک ریوی - که از موانع فیزیولوژیک محسوب می‌شوند - را می‌توان نام برد. به همین علت، استراتژی‌های زیادی در فرموله نمودن داروهای ریوی باید به کار رود که از جمله‌ی آن‌ها استفاده از مهار کننده‌های آنزیمی، سرکوب کننده‌های فعالیت ماکروفاژها، سورفکتانت‌ها، مواد مخاط چسب و پلیمرهای بهبود دهنده‌ی جذب می‌باشند (۲۳، ۲۰، ۱۸).

از جمله مهم‌ترین اشکال دارویی ریوی، می‌توان به فرآورده‌های استنشاقی تحت فشار که دوز معینی از دارو را به بیرون می‌فرستند، (Dry powder inhaler یا DPI)، اسپری‌های بینی، پودرهای خشک استنشاقی (PMDI یا Pressurized metered-dose inhalers)، محلول‌ها، سوسپانسیون‌های استنشاقی، فرآورده‌های استنشاقی مایع و نیبولایزرها اشاره کرد. برخی از این تکنیک‌ها از شرکت فایزر با نام‌های تجاری Handihaler و DirectHaler، AERx، MedTone موجود هستند. هر یک از این تکنیک‌ها برای تولید انواع داروهای استنشاق ریوی در بیماری‌های موضعی یا سیستمیک مانند حمل انسولین، سیپروفلوگراسین و داروهای ضد آسم به کار رفته‌اند، از جمله محاسن DPI نسبت به PMDI این است که می‌تواند دوزهای بیشتری را منتقل کند. استنشاق آن نیز توسط شروع تنفس صورت می‌گیرد؛ از این رو، هماهنگی بین فعال کردن دستگاه و شروع تنفس، ضروری نمی‌باشد.

با وجود مزایای پیش‌گفته، مشکلات دارو رسانی به ریه، شکل هندسی خاص راه‌های هوایی و رطوبت آن‌ها، اپی تلیوم ریه و مکانیسم‌های دفاع طبیعی مانند سیستم موکوسیلیاری، ماکروفاژها و فعالیت‌های آنزیماتیک ریوی - که از موانع فیزیولوژیک محسوب می‌شوند - را می‌توان نام برد. به همین علت، استراتژی‌های زیادی در فرموله نمودن داروهای ریوی باید به کار رود که از جمله‌ی آن‌ها استفاده از مهار کننده‌های آنزیمی، سرکوب کننده‌های فعالیت ماکروفاژها، سورفکتانت‌ها، مواد مخاط چسب و پلیمرهای بهبود دهنده‌ی جذب می‌باشند (۲۳، ۲۰، ۱۸).

از جمله مهم‌ترین اشکال دارویی ریوی، می‌توان به فرآورده‌های استنشاقی تحت فشار که دوز معینی از دارو را به بیرون می‌فرستند، (Dry powder inhaler یا DPI)، اسپری‌های بینی، پودرهای خشک استنشاقی (PMDI یا Pressurized metered-dose inhalers)، محلول‌ها، سوسپانسیون‌های استنشاقی، فرآورده‌های استنشاقی مایع و نیبولایزرها اشاره کرد. برخی از این تکنیک‌ها از شرکت فایزر با نام‌های تجاری Handihaler و DirectHaler، AERx، MedTone موجود هستند. هر یک از این تکنیک‌ها برای تولید انواع داروهای استنشاق ریوی در بیماری‌های موضعی یا سیستمیک مانند حمل انسولین، سیپروفلوگراسین و داروهای ضد آسم به کار رفته‌اند، از جمله محاسن DPI نسبت به PMDI این است که می‌تواند دوزهای بیشتری را منتقل کند. استنشاق آن نیز توسط شروع تنفس صورت می‌گیرد؛ از این رو، هماهنگی بین فعال کردن دستگاه و شروع تنفس، ضروری نمی‌باشد.

با توجه به مزایای ذکر شده برای تجویز ریوی داروها نسبت به روش تزریقی و قابلیت جذب

از جمله مهم‌ترین اشکال دارویی ریوی، می‌توان به فرآورده‌های استنشاقی تحت فشار که دوز معینی از دارو را به بیرون می‌فرستند، (Dry powder inhaler یا DPI)، اسپری‌های بینی، پودرهای خشک استنشاقی (PMDI یا Pressurized metered-dose inhalers)، محلول‌ها، سوسپانسیون‌های استنشاقی، فرآورده‌های استنشاقی مایع و نیبولایزرها اشاره کرد. برخی از این تکنیک‌ها از شرکت فایزر با نام‌های تجاری Handihaler و DirectHaler، AERx، MedTone موجود هستند. هر یک از این تکنیک‌ها برای تولید انواع داروهای استنشاق ریوی در بیماری‌های موضعی یا سیستمیک مانند حمل انسولین، سیپروفلوگراسین و داروهای ضد آسم به کار رفته‌اند، از جمله محاسن DPI نسبت به PMDI این است که می‌تواند دوزهای بیشتری را منتقل کند. استنشاق آن نیز توسط شروع تنفس صورت می‌گیرد؛ از این رو، هماهنگی بین فعال کردن دستگاه و شروع تنفس، ضروری نمی‌باشد.

روش‌ها

مواد

اریترپوئیتین (انستیتو پاستور)، پلی متیل وینیل اتر مالئیک اسید، ترهالوز، موسین، هیدروکسی پروپیل آلفا سیکلودکسترین از Sigma Aldrich- USA، پلی اتیلن گلایکول ۴۰۰۰ و دی اتیل اتر از Merck Schuchardt - Germany و فرس سولفات از روزدارو - ایران خریداری گردیدند.

روش تهیهی پودر خشک اریترپوپوئیتین استنشاقی

پودر استنشاقی با استفاده از دستگاه اسپری درایر (BUCHI Mini Spray Dryer B-۲۹۰ - Swiss) تهیه شد. شرایط دستگاه اسپری درایر به صورت زیر تنظیم شد: اسپراتور ۸۰ درصد، پمپ ۵ درصد، دمای ورودی ۵۴ درجهی سانتی گراد، دمای خروجی ۳۴ درجهی سانتی گراد، سرعت اسپری شدن محلول ۲ ml/min و سرعت اسپراتور ۳۲/۵ m^۳/hr بود. بر اساس فرمولاسیون طراحی شده، ۳۰ میلی گرم پلیمر زیست چسب (پلی متیل وینیل اتر مالئیک اسید) و ۵۳/۳ میلی گرم افزایندهی جذب (۲-هیدروکسی پروپیل آلفا سیکلودکسترین) هر کدام جداگانه در ۱۰۰ سی سی آب حل شدند. ۱۸۳۳/۴ میلی گرم ترهالوز (به عنوان حامل فرمولاسیون) نیز در ۱۰۰ سی سی آب حل شد. محلولهای فوق به هم اضافه شدند و محلول نهایی در دستگاه اسپری درایر اسپری شد. پودر جمع آوری شده از الک با مش شمارهی ۴۰ عبور داده شد و داخل دسیکاتور نگهداری گردید.

سپس ۵۰ میلی گرم از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ (به عنوان کرایوپرکتیو) در یک بالون ریخته و ۵ سی سی از محلول آبکی اریترپوپوئیتین به آن اضافه شد تا حل شود. محلول فوق داخل فریزر با دمای ۸۰- درجهی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد تا منجمد شود. سپس به دستگاه فریز درایر (CHRIST Alpha ۲-۴ LD Plus - Germany) وصل شد تا پودر خشک به دست آید. پودر به دست آمده از الک با مش مشخص شمارهی ۴۰ عبور داده شد و داخل دسیکاتور در یخچال نگهداری گردید. لازم به ذکر است که علت فریز درایر کردن اریترپوپوئیتین این

بود که به دلیل گران قیمت بودن و در اختیار داشتن مقدار کم دارو، نمی شد آن را در دستگاه اسپری درایر خشک نمود. بنابراین ابتدا در فریز درای خشک شد و سپس با پودر اسپری شده مخلوط گردید.

جهت مخلوط کردن، پودر اسپری درای شده و فریز درای شده به نسبت ۴ به ۱ داخل یک ویال شیشه ای ریخته شد و با غلتاندن شیشه روی سطح افقی، پودرها با هم مخلوط شدند. برای اطمینان از یکنواختی اختلاط در یکی از پودرها (پودر فریز درای شده) مقدار کمی رنگ خوراکی استفاده شد.

تعیین اندازهی ذره ای پودر اسپری درای شده

اندازهی ذره ای پودر پس از پراکنده کردن در اتیل استات، توسط دستگاه نانو- زتاسایزر مالورن (UK - Malvern Instrumental -ZEN ۳۶۰۰ - Zetasizer) اندازه گیری شد.

تعیین مقدار دارو در پودر نهایی خشک شده

جهت اطمینان از یکنواختی دارو در پودر تهیه شده، سه نمونه ی ۱۰ میلی گرم پودر که مخلوطی از ۲ میلی گرم پودر فریز درای شده و ۸ میلی گرم پودر اسپری درای شده بود و انتظار می رفت که حاوی ۸۴۰ واحد دارو باشد، به روش استفاده از کیت الایزای اریترپوپوئیتین (Erythropoietin ELISA-IBL - INTERNATIONAL-Germany) تعیین مقدار شد.

مطالعات حیوانی

۳ گروه ۶ تایی رت با وزنهای تقریبی ۲۵۰ گرم برای این مطالعه در نظر گرفته شد. یک گروه شاهد منفی (گروه دریافت کنندهی پودر فاقد دارو)، یک گروه شاهد مثبت (دریافت کنندهی فرم تزریق زیر جلدی محلول معمولی دارو) و یک گروه دریافت کنندهی استنشاقی داروی پودری تهیه شده بودند.

دهان وارد ابتدای نای حیوان شد. پیستون سرنگ با یک حرکت به پایین فشار داده شد تا محتوای فیدینگ تیوب وارد نای حیوان شود. جهت اطمینان از تخلیه‌ی کامل پودر به نای حیوان، سرنگ تعویض شده و بار دیگر هوا با فشار به نای حیوان وارد شد. در روزهای ۰، ۱، ۴ و ۷ جهت شمارش رتیکولوسیت‌ها از گوشه‌ی چشم رت‌ها خون‌گیری به عمل آمد. حدود ۱ سی‌سی از خون رت جمع‌آوری شد و جهت شمارش رتیکولوسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتر به آزمایشگاه منتقل گردید.

یافته‌ها

نتایج تعیین اندازه‌ی ذره‌ای و مقدار داروی بار شده در ۱۰ میلی‌گرم از پودر تهیه شده نشان داد که درصد کارایی بارگیری دارو \pm انحراف معیار (درصد) $13/50 \pm 62/02$ و در متوسط اندازه‌ی ذره‌ای 50 درصد \pm انحراف معیار $2/20 \pm 8/30$ میکرومتر بود. در شکل ۱ درصد افزایش رتیکولوسیت‌ها پس از تجویز استنشاقی ۸۴۰ واحد اریترپوپوئیتین به فرم پودر استنشاقی اسپری درای شده با محلول تزریقی معمولی آن مقایسه شده است. بین گروه‌های شاهد منفی، اریترپوپوئیتین تزریقی (Eryth) و فرمولاسیون استنشاقی، هیچ اختلاف معنی‌دار آماری در روزهای ۰ و ۱ بعد از تجویز مشاهده نشد.

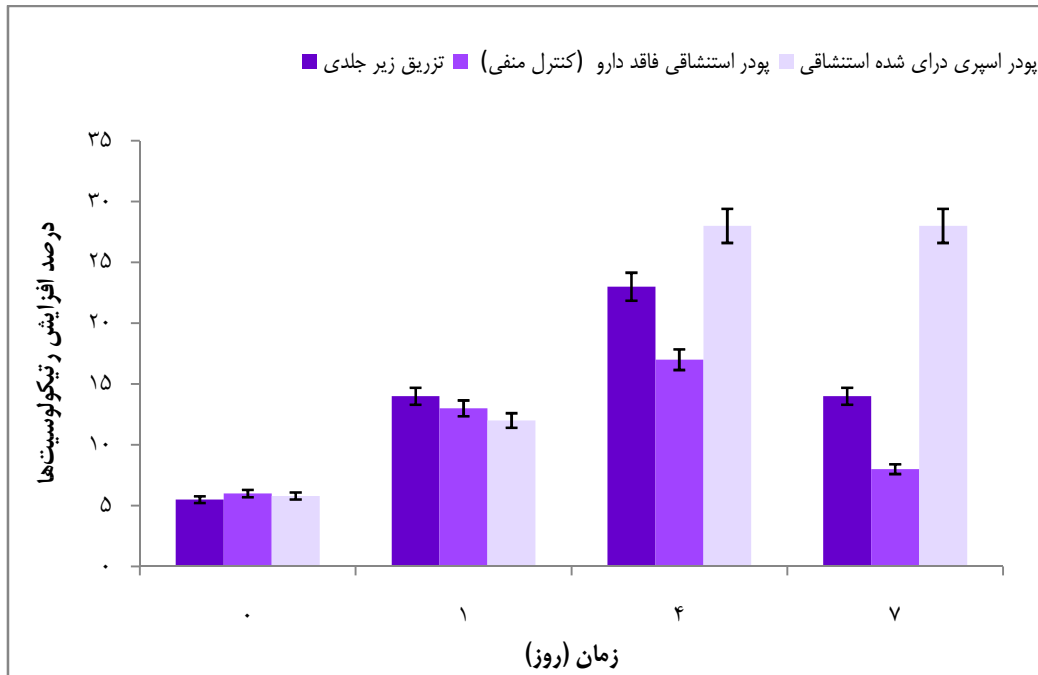
در روز ۴ بین هر سه گروه اختلاف معنی‌دار وجود داشت؛ به نحوی که تعداد رتیکولوسیت‌ها در فرمولاسیون استنشاقی با $P < 0/01$ از اریترپوپوئیتین تزریقی و با $P < 0/001$ از شاهد منفی بیشتر بود. در این روز، همچنین بین گروه اریترپوپوئیتین و شاهد منفی نیز اختلاف معنی‌دار با $P < 0/01$ مشاهده گردید.

جهت پر شدن ذخایر آهن بدن رت‌ها، ۶ روز قبل از تجویز دارو به حیوانات به میزان ۱ درصد وزن غذایی که می‌خورند، آهن به صورت گاوژ داده شد (۲۵). با توجه به این که هر رت روزانه حدود ۲۵ گرم غذا مصرف می‌کرد، پس باید ۲۵۰ میلی‌گرم فرس سولفات به رژیم غذایی آن‌ها اضافه می‌شد. هر قرص فرس سولفات که در این آزمایش استفاده شد، حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم فرس سولفات بود و وزن هر قرص، معادل ۲۲۰ میلی‌گرم بود. پس باید ۳۷۵ میلی‌گرم از قرص‌ها توزین می‌شد تا حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم فرس سولفات باشد. ۳۷۵ میلی‌گرم از پودر قرص فرس سولفات، توزین و در ۳ سی‌سی آب پراکنده شد و توسط یک سرنگ و فیدینگ تیوب به صورت گاوژ به مدت ۶ روز به حیوان داده شد. ۶ روز بعد از تجویز آهن، هر کدام از رت‌ها، دارو دریافت کردند.

دوزی از دارو که برای هر بار استعمال در هر رت در نظر گرفته شده بود، ۸۴۰ واحد بود. گروه شاهد مثبت ۲۰۰ میکرولیتر محلول دارو (معادل ۸۴۰ واحد دارو) را به صورت تزریق زیر جلدی محلول معمولی دارو دریافت کردند. گروه شاهد منفی که ۵ میلی‌گرم پودر استنشاقی فاقد دارو دریافت کردند و گروه دیگر نیز ۵ میلی‌گرم پودر استنشاقی حاوی دارو را دریافت کردند.

روش استعمال پودر استنشاقی در رت

۵ میلی‌گرم از پودر مورد نظر داخل محفظه‌ی ابتدایی یک فیدینگ تیوب ریخته شد. سپس فیدینگ تیوب به یک سرنگ که پیستون آن تا جای مشخصی بالا کشیده شده بود، متصل شد. حیوان توسط اتر داخل دسیکاتور بی‌هوش گردید و فیدینگ تیوب از طریق



شکل ۱. مقایسه‌ی درصد افزایش رتیکولوسیت‌ها پس از تجویز استنشاقی ۸۴۰ واحد اریتروپوئیتین به فرم پودر استنشاقی اسپری درای شده یا محلول تزریقی معمولی آن

میکرونی گردید.

جهت افزایش جریان پذیری داروی استنشاقی و نیز جهت افزایش رهش دارو از اینهالر و قرارگیری دارو در قسمت‌های عمیق ریه، استفاده از یک پودر حامل ضروری می‌باشد. به علاوه، افزودن حامل باعث افزایش حجم پودر استنشاقی و سهولت استفاده نیز می‌شود. لاکتوز تنها اکسپانانی است که توسط FDA (Food and drug administration) برای استنشاق تأیید شده است، چون یک اکسپان بی‌خطر، در دسترس و پایدار از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و سازگار با تعداد زیادی از داروهای با وزن مولکولی پایین است (۲۶).

با این وجود، تعداد زیادی از اکسپان‌های دارویی هستند که برای تهیه‌ی پودرهای خشک استنشاقی مناسب به نظر می‌رسند. ترهالوز یک حامل پر مصرف در صنعت داروسازی می‌باشد. در مقایسه با لاکتوز،

در روز ۷ نیز نتایج مشابه روز ۴ بود؛ با این تفاوت کوچک که اختلاف فرمولاسیون استنشاقی با هر دو گروه اریتروپوئیتین و شاهد منفی با $P < 0/001$ معنی‌دار بود.

بحث

ریه دارای مکانیسم‌های دفاعی مختلفی مثل فاگوسیتوز یا کلیرانس موکوسیلیاری است که از طریق آن ذرات وارد شده را به بیرون از خود می‌راند. بنابراین، وقتی که داروهای پپتیدی یا پروتئینی با استفاده از میکرو ذرات به عنوان حامل فرموله شوند، اثر این مکانیسم‌های کلیرانسی ضعیف‌تر می‌شود و جذب کارآمدتر و اثر درمانی آهسته‌تری حاصل می‌شود. به همین علت، در مطالعه‌ی حاضر به روش اسپری درآیینگ و با استفاده از پودر حامل، اقدام به تهیه‌ی پودر استنشاقی اریتروپوئیتین با اندازه‌ی ذره‌ای

ترهالوز باعث کاهش بیشتر هیگروسکوپیسیتی می‌شود (۲۶). در این مطالعه، از حامل ترهالوز استفاده شده است و اثر آن بر روی خصوصیات پودر، مورد بررسی قرار گرفته است.

استفاده از افزایشنده‌های جذب جهت بهبود ویژگی‌های جذب پیتیدها و پروتئین‌های پلار توصیه شده است. در گذشته، شماری از افزایشنده‌های جذب از قبیل Saturated polyglycolized glyceride, Hyaluronic acid, Trihydroxy bile salt, Cyclodextrin, Fatty acid, Taurocholate, Surfactant و Glycyrrhizic acid برای افزایش زیست دستیابی و پاسخ فارماکودینامیک این قبیل پیتیدها یا پروتئین‌های درمانی از قبیل انسولین و کلسی تونین استفاده شده است (۲۷). در این مطالعه از سیکلودکستین برای افزایش جذب ریوی اریتروپوئیتین از پودر خشک استنشاقی استفاده شده است.

Shao و همکاران (۲۸) تأثیر مثبت سیکلودکستین‌ها را به عنوان افزایشنده‌های جذب ریوی انسولین به ترتیب زیر گزارش کردند: دی متیل بتا سیکلودکستین < آلفا سیکلودکستین < بتاسیکلودکستین < گاما سیکلودکستین < هیدروکسی پروپیل بتا سیکلودکستین.

در مطالعه‌ی حاضر، رساندن دارو به ریه‌ی حیوانات از طریق اسپری کردن دارو توسط یک فیدینگ تیوب انجام شد. در حالی که روش داخل تراشه‌ای هم برای این کار گزارش شده است (۲۹). در مطالعه‌ی انجام شده توسط Garcia-Contreras و همکاران (۲۹) جهت دارو رسانی انسولین از راه ریوی، هر دو روش فوق یعنی داخل تراشه‌ای و اسپری کردن به کار گرفته شده است.

ذرات کلسیم فسفات و پلی اتیلن گلیکول جهت افزایش جذب به کار رفته است که باعث اثر مثبت در قرارگیری انسولین در ریه‌های رت می‌شد و همچنین روش اسپری نسبت به روش داخل تراشه‌ای برای رساندن انسولین به ریه‌های رت کارآمدتر بود. در مطالعه‌ی Garcia-Contreras و همکاران (۲۹) زیست دستیابی دارو و طول اثر آن از راه ریوی نسبت به روش زیر جلدی افزایش یافت. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، در مطالعه‌ی حاضر نیز تعداد رتیکولوسیت‌ها پس از تجویز خوراکی تا روز ۷ که مطالعه در آن قطع شد، ادامه یافت و نه تنها اثر فارماکودینامیک دارو در مقایسه با فرم داخل زیر جلدی افزایش یافت؛ بلکه طولانی‌تر نیز شد.

در خصوص استفاده از رژیم آهن که قبل از تجویز اریتروپوئیتین در حیوانات تحت مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تزریق آهن در حین درمان با اریتروپوئیتین به طور معنی‌دار پاسخ خون‌سازی به اریتروپوئیتین را در نمونه‌های طبیعی تقویت می‌کند (۲۵). در یک مطالعه، به ۷ داوطلب بزرگسال سالم علاوه بر اریتروپوئیتین نوترکیب انسانی، ۲۰۰ میلی‌گرم آهن هم تزریق شد و به ۷ داوطلب بزرگسال دیگر تنها اریتروپوئیتین تزریق شد و پاسخ‌های خون‌سازی آن‌ها با هم مقایسه شد. نتایج نشان داد که استفاده از آهن تزریقی از کاهش سطح فریتین سرم که هنگام استعمال اریتروپوئیتین مشاهده می‌شود، جلوگیری می‌کند. در این مطالعه اگر چه سطح کلی رتیکولوسیت‌ها تحت تأثیر استعمال آهن تزریقی قرار نگرفت، اما محتوای هموگلوبین رتیکولوسیت‌ها نسبت به گروهی که فقط اریتروپوئیتین دریافت کرده بودند، افزایش یافت (۲۵).

اسپری درایینگ در مدل آزمایشگاهی رت که یک هفته قبل از شروع درمان با آهن خوراکی درمان شده‌اند، در مقایسه با فرم تزریق داخل زیر جلدی علاوه بر فراهمی زیستی بهتر، دوام اثر بیشتری را نیز ایجاد نماید و به مدت طولانی‌تری در افزایش رتیکولوسیت‌های خون مؤثر باشد. این شکل دارویی می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای راه تزریقی این دارو که در زمان اجرای پژوهش، تنها فرم در دسترس برای آن است، در نظر گرفته شود.

در هر حال، مطالعات انسانی بیشتری برای تأیید این موضوع به منظور استفاده در کلینیک نیاز است. ارزیابی مشخصات فرمولاسیون فوق از دیدگاه فارماسیوتیکال و ارزیابی‌های توکسیکولوژیک بر روی فرم پودری ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

یک نگرانی عمده در مورد استعمال پیتیدها و پروتئین‌های ریوی، احتمال ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیکی از طریق ریه است. چون ممکن است بدن این مولکول‌ها را به عنوان آنتی ژن شناسایی کند. اما Wolff (۳۰) در یک مطالعه نشان داد که دارو رسانی ریوی بیشتر پیتیدها و پروتئین‌های درمانی حداقل برای استفاده‌ی کوتاه مدت بی‌خطر است. در مورد بیماران دیابتی نوع ۱ و ۲، Cefalu و همکاران (۳۱) نشان دادند که استعمال ریوی انسولین برای مدت بیشتر از ۲ سال ایمن می‌باشد.

اگر چه اندازه‌ی ذره‌ای به دست آمده برای پودرها ۸/۳ میکرون بود و حد مطلوب برای ته‌نشینی ذرات در عمق ریه ۵-۱ میکرون می‌باشد (۳۲)، اما اسپری سالبوتامول و ایپراتروپیوم بروماید نیز با دو اندازه‌ی ذره‌ای ۳/۳ میکرون و ۷/۷ میکرون از نظر پاسخ درمانی تفاوتی نشان نداده است (۳۳). به هر حال، نتایج مناسب فارماکولوژیک به دست آمده حاکی از مؤثر بودن فرمولاسیون می‌باشد.

نتیجه‌گیری

پودر استنشاقی اریتروپوئیتین تهیه شده به روش

References

1. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502: 365-76.
2. United States Renal Data System. 2009 Annual Report United States Renal Data System [Online]. [cited 2011 Oct 8]; Available from: URL: <http://www.usrds.org>
3. Katzung B, Masters S, Trevor A. Basic and clinical pharmacology 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2011. p. 591-2.
4. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics 12th ed. New York, NY: McGraw Hill; 2010. p. 1068-73.
5. Maitani Y, Moriya H, Shimoda N, Takayama K, Nagai T. Distribution characteristics of entrapped recombinant human erythropoietin in liposomes and its intestinal absorption in rats. *Int J Pharm* 1999; 185(1): 13-22.
6. Venkatesan N, Uchino K, Amagase K, Ito Y, Shibata N, Takada K. Gastro-intestinal patch system for the delivery of erythropoietin. *J Control Release* 2006; 111(1-2): 19-26.
7. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, Shibata N, Takada K. Liquid filled nanoparticles as a drug

- delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* 2005; 26(34): 7154-63.
8. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ohashi Y, Ito Y, Sugioka N, Shibata N, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies following oral administration of erythropoietin mucoadhesive tablets to beagle dogs. *Int J Pharm* 2006; 310(1-2): 46-52.
 9. Shimoda N, Maitani Y, Machida Y, Nagai T. Effects of dose, pH and osmolarity on intranasal absorption of recombinant human erythropoietin in rats. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(5): 734-9.
 10. Pitt CG, Platz RM. Pulmonary administration of erythropoietin [US Patent No. 5354934]. 1994.
 11. Bitonti AJ, Dumont JA, Low SC, Peters RT, Kropp KE, Palombella VJ, et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(26): 9763-8.
 12. Bitonti AJ, Dumont JA. Pulmonary administration of therapeutic proteins using an immunoglobulin transport pathway. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(9-10): 1106-18.
 13. Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lung *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996; 19(1): 3-36.
 14. Azarmi S, Roa WH, Lobenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(8): 863-75.
 15. Brain JD. Inhalation, deposition, and fate of insulin and other therapeutic proteins. *Diabetes Technol Ther* 2007; 9(Suppl 1): S4-S15.
 16. Bi R, Shao W, Wang Q, Zhang N. Solid lipid nanoparticles as insulin inhalation carriers for enhanced pulmonary delivery. *J Biomed Nanotechnol* 2009; 5(1): 84-92.
 17. Grainger CI, Alcock R, Gard TG, Quirk AV, van AG, de Swart RL, et al. Administration of an insulin powder to the lungs of cynomolgus monkeys using a Penn Century insufflator. *Int J Pharm* 2004; 269(2): 523-7.
 18. Kobayashi S, Kondo S, Juni K. Pulmonary delivery of salmon calcitonin dry powders containing absorption enhancers in rats. *Pharm Res* 1996; 13(1): 80-3.
 19. Jalalipour M, Najafabadi AR, Gilani K, Esmaily H, Tajerzadeh H. Effect of dimethyl-beta-cyclodextrin concentrations on the pulmonary delivery of recombinant human growth hormone dry powder in rats. *J Pharm Sci* 2008; 97(12): 5176-85.
 20. Giosue S, Casarini M, Ameglio F, Zangrilli P, Palla M, Altieri AM, et al. Aerosolized interferon-alpha treatment in patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(1): 99-104.
 21. Geller D, Thippawong J, Otulana B, Caplan D, Ericson D, Milgram L, et al. Bolus inhalation of rhDNase with the AERx system in subjects with cystic fibrosis. *J Aerosol Med* 2003; 16(2): 175-82.
 22. Rooijen N, Sanders A. The macrophage as target or obstacle in liposome-based targeting strategies. *Int J Pharm* 1998; 162(1-2): 45-50.
 23. Hussain A, Arnold JJ, Khan MA, Ahsan F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J Control Release* 2004; 94(1): 15-24.
 24. Yoncheva K, Lizarraga E, Irache JM. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *Eur J Pharm Sci* 2005; 24(5): 411-9.
 25. Major A, Mathez-Loic F, Rohling R, Gautschi K, Brugnara C. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 1997; 98(2): 292-4.
 26. Zhang Y, Wang X, Lin X, Liu X, Tian B, Tang X. High azithromycin loading powders for inhalation and their in vivo evaluation in rats. *Int J Pharm* 2010; 395(1-2): 205-14.
 27. Onoue S, Yamamoto K, Kawabata Y, Hirose M, Mizumoto T, Yamada S. Novel dry powder inhaler formulation of glucagon with addition of citric acid for enhanced pulmonary delivery. *Int J Pharm* 2009; 382(1-2): 144-50.
 28. Shao Z, Li Y, Mitra AK. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin III: pulmonary route of delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1994; 40: 283-8.
 29. Garcia-Contreras L, Morcol T, Bell SJ, Hickey AJ. Evaluation of novel particles as pulmonary delivery systems for insulin in rats. *AAPS PharmSci* 2003; 5(2): E9.
 30. Wolff RK. Safety of inhaled proteins for therapeutic use. *J Aerosol Med* 1998; 11(4): 197-219.
 31. Cefalu WT, Balagtas CC, Landschultz WH, Gelfand RA. Sustained efficacy and pulmonary safety of inhaled insulin during 2 years of outpatient therapy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2000; 50(Suppl 1): 73.
 32. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(6): 588-99.
 33. Johnson MA, Newman SP, Bloom R, Talaei N, Clarke SW. Delivery of albuterol and ipratropium bromide from two nebulizer systems in chronic stable asthma. Efficacy and pulmonary deposition. *Chest* 1989; 96(1): 6-10.

Comparing the Inhalable and Parenteral Forms of Erythropoietin in Enhancement of Reticulocytes Count

Jaleh Varshosaz PhD¹, Mohsen Minaiyan PhD², Maryam Sami³

Original Article

Abstract

Background: In patients with renal failure, frequent use of erythropoietin is necessary for long times due to serious anemia. The aim of the present study was production of an inhalable dry powder of erythropoietin and comparison it with its parenteral form in erythrocytes count enhancement.

Methods: The inhalable powder was prepared using spray-drying of the mixture of poly (methyl-vinyl ether-maleic anhydride), 2-hydroxy propyl-alpha-cyclodextrin and terhalose. The freeze-dried aqueous solution of erythropoietin was mixed with the spray-dried powder in 1:4 ratio. The particle size and drug content uniformity were determined in the final dried powder. There were 3 groups of rats each containing 6 animals. One group received 840 IU as subcutaneous (sc) injection of regular solution of the drug. The other was treated with blank pulmonary powder and the last group with 840 IU of the spray dried pulmonary powder. Six days before starting the treatment, all animals were fed with 1 % (w/w) ferrous sulfate as gavage. Blood sampling was carried out from eye retro-orbital vein at 0, 1, 4 and 7 days after treatment and the reticulocytes were counted by hemocytometer.

Findings: There was not any significant difference between control, inhalable and parenteral groups at days of 0 and 1 after administration. At the day 4, there was significant difference between all three groups and reticulocytes count was higher in the inhalable group than the parenteral ($P < 0.001$) and the control groups ($P < 0.010$). At the 7th day, the results were similar to the 4th day but the reticulocytes count of inhalable group was significantly higher than the control and parenteral groups ($P < 0.001$ for both).

Conclusion: The spray-dried inhalable powder of erythropoietin was more effective than subcutaneous injection form in enhancing the reticulocytes count for a longer time and may be a good replacement for the parenteral form of this drug.

Keywords: Erythropoietin, Reticulocyte, Pulmonary drug delivery, Chronic renal failure

Citation: Varshosaz J, Minaiyan M, Sami M. Comparing the inhalable and parenteral forms of erythropoietin in enhancement of reticulocytes count. J Isfahan Med Sch 2014; 31(264): 2031-41

* This paper is derived from a PharmD thesis No. 391163 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Student of Pharmacy, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Jaleh Varshosaz PhD, Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir