

دراسة الإطلاق المتوازن والفعالية المضادة للفطريات للنستاتين المحمل على البولي (فنيل الكحول)

أيمان عبد الله جعفر التميمي
قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة البصرة

الخلاصة

تم تحضير شبيكة البولي (فنيل الكحول) الهلامية وتحميلها بالمضاد الفطري النستاتين باستخدام الكلوتيرالديهايد كعامل مشابك .
تم دراسة الإطلاق المتوازن للنستاتين المحمل مع البوليمر المحضر ومن ثم تم دراسة فعاليته تجاه الفطريات *Candida albicans* و *Cryptococcus neoformans* والفطر *Fusarium oxysporum* .
وتبين أن نسبة تحرر النستاتين المحمل (PN) من الشبيكة البوليمرية لا يعتمد نسبياً على الدالة الحامضية . وتبين من الدراسة أيضاً أن النستاتين المحمل (PN) هو أكثر فاعلية في تثبيط الفطريات المختبرة من النستاتين (N) لوحده .

Controlled Release Study and Anti – fungal activity of Delivery poly (vinyl alcohol) Nystatin

Eman A. J. Al – Timimi

Abstract:

Poly (vinyl alcohol) hydrogel was prepared and loaded with Nystatin using gluteraldehyde as crosslinking agent.

The controlled release of matrix and their anti-fungal activity against *Candida albicans* , *Cryptococcus neoformans* and *Fusarium oxysporum* have been studied . The result showed that the release of Nystatin (PN) from the polymeric matrix relativity independent on the pH value. Also Nystatin (PN) increases the antifungal activity to higher extent from Nystatin (N) alone.

المقدمة :

أُستخدمت في الآونة الأخيرة أنظمة حديثة ومفيدة في التطبيقات الطبية والصيدلانية ألا وهي أنظمة تحرير الدواء المسيطر عليه (Controlled Drug Delivery System) . والغاية هو الحصول على علاج أكثر فاعلية ، ولتقليل احتمالية كلاً من الجرعة غير المؤثرة (under dosing) والجرعة المفرطة⁽¹⁾ (over dosing) . وبهذه الطريقة يمكن تقليل عدد الجرعات الدوائية ، وتغيير الأسلوب التقليدي لتناوله. والأهم هو الإبقاء على مستويات الدواء ضمن المدى المرغوب (desired range) .

تستخدم الشبيكات البوليمرية ومنها الهلامية كهيكل بنائي لإسناد التراكيب الدوائية إذ أنها تكون محمولة على الشبيكة البوليمرية ، ويتم أنتقال المادة الفعالة إلى أنسجة الجسم بفعل توازني تحدده حاجة الجسم ، وبذلك تبقى تراكيزها ثابتة نسبياً ولفترة زمنية طويلة نسبياً⁽²⁾ .

الهلاميات (Hydrogels) هي عبارة عن بوليمرات متشابكة (crosslinked polymers) غير ذائبة في الماء ، إلا أنها بوجود الماء يحصل لها انتفاخ وينقلص حجمها بشكل كبير بعدم وجود الماء . وتحتوي على

تراكيب محبة للماء متجانسة⁽³⁾ . إن العوامل المؤثرة التي تتحكم بنسبة الإطلاق الكلية من جزيئة الهلام هي نوع التغير الحاصل في تركيب البوليمر (modification) والمادة الفعالة من خلال وجود المجاميع المحبة أو الكارهة للماء⁽⁴⁾ . بالإضافة إلى درجة الحرارة والدالة الحامضية والإشعاع الكهرومغناطيسي⁽⁵⁾ .

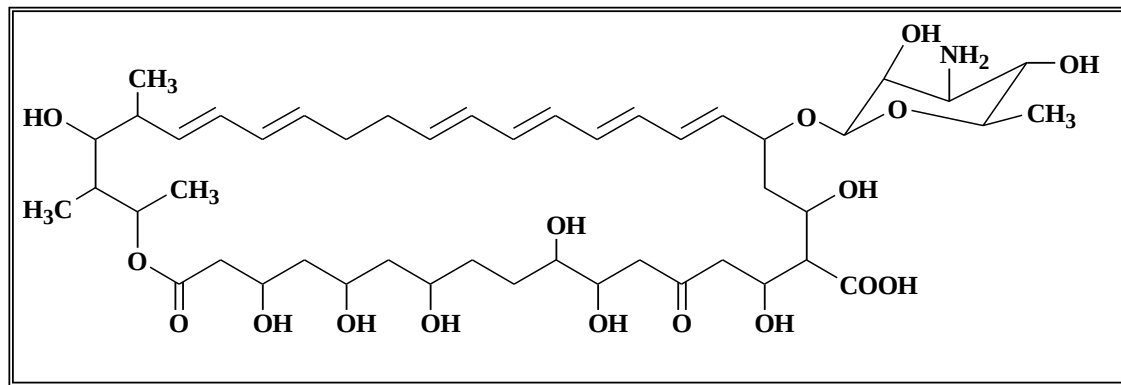
استخدمت أنظمة تحرير الدواء المسيطر عليه في الكثير من المجالات ومنها المجال الطبي. فقد درس الموالي وجماعته الإطلاق البطيء لدواء الكابتوبريل المحمل على الكايتوسان - جيلاتين إذ أوضحت الدراسة إن دواء الكابتوبريل المجهز المحمل IPN هي طريقة فعالة في تقنية الإطلاق البطيء وتتبع في ذلك طريقة ميكانيكية الانتشار⁽⁶⁾ .

درس الزبيدي وجماعته الإطلاق البطيء للميتفورمين هيدروكلوريد من شبكة البوليمر من هلاميات الجلاتين والهيدروكسي أمثل سليولوز والنترامثيلول يوريا . وأثبتت النتائج أن للدالة الحامضية تأثير كبير على معدل تحرر الميتفورمين هيدروكلوريد من شبكة الهلام⁽⁷⁾ .

درس العلي وجماعته الإطلاق المتوازن للشبكة البوليمرية المحضرة من الكيتوسان والبكتين بإضافة كلوتايرالديهيد كعامل متشابك . وحملت الشبكة المحضرة بالمضادين الحيائيتين الأموكسيلين والكلاوثيرومايسين . أظهرت النتائج فعالية حيوية على السلالات المرجعية وقدرة تثبيط عالية⁽⁸⁾ .

النستاتين Nystatin هو عبارة عن بولي إين (polyene) يستخدم كمضاد فطري لإصابات الجلد والفم والأمعاء ، يعتمد فعله البايولوجي على فسلفة الخلية الفطرية حيث يمزق غشاء الخلية الفطرية⁽⁹⁾ .

أن الخلية الفطرية محاطة بغشاء بروتوبلازمي يتحكم في عملية نفاذ المركبات الكيميائية إلى خارج الخلية وداخلها ، ويتكون هذا الغشاء أساساً من مواد دهنية ، وجد أن بزيادة طول السلسلة الكربونية تزداد قابليتها للذوبان بالدهون وبذلك يزداد نفاذها خلال الغشاء . وكذلك تزداد قابلية المركبات على النفاذ كلما قلت مجاميع الهيدروكسيل . ويعتقد الباحثون أن الشكل الجزيئي للمضاد الفطري المتكون من الجزء القطبي الذي يحدث السمية والجزء العضوي الباقي ضروري لإعطاء الشكل الجزيئي اللازم للنفاذ خلال الحاجز الدهني الموجود في الغشاء البروتوبلازمي⁽¹⁰⁾ .



شكل (1) : تركيب النستاتين

المواد وطرائق العمل :

(أ) تحميل النستاتين مع الشبكة البوليمرية الهلامية :

تم مزج (10%) محلول البولي (فينيل الكحول) (poly vinyl alcohol) مع (1%) من المادة الفعالة للمضاد الفطري النستاتين (والمجهزة من الشركة العراقية للأدوية في سامراء) عند درجة (60-70) مئوية مع التحريك المستمر . أضيف (2) مل من كلوتايرالديهايد (gluteraldehyde) إلى المزيج و (1) مل من حامض الكبريتيك المركز . ترك المزيج لمدة ساعة بدرجة (60-70) مئوية مع التحريك المستمر ، بعد ذلك صب في طبق وترك ليجف .

(ب) تحضير سائل المعدة الافتراضي (SGF) Simulated gastric fluid :

أذيب (2) غم من كلوريد الصوديوم في كمية قليلة من الماء المقطر . أضيف (8) مل من حامض الهيدروكلوريك المركز إلى المحلول وأكمل الحجم إلى (1) لتر⁽¹¹⁾ .

(ج) تحضير سائل الأمعاء الافتراضي (SIF) Simulated intestinal fluid :

أذيب (6.8) غم من فوسفات البوتاسيوم الأحادية (mono basic potassium phosphate) في (250) مل ماء مقطر . أضيف (190) مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) عياري و (400) مل ماء مقطر وأكمل الحجم إلى (1) لتر⁽¹¹⁾ .

(د) دراسة تحرر النستاتين من الشبكة البوليمرية الهلامية :

تم تحضير تراكيز مخففة ومختلفة من النستاتين في سائلي المعدة والأمعاء الافتراضيين . وقيست امتصاصيتهما وتم رسم منحنى المعايرة القياسي حسب قانون بير - لامبرت .

تم وزن (0.5) غم من الشبكة البوليمرية الهلامية المحملة بوزن (0.0327) غم من النستاتين ، ووضعت في (50) مل من سائلي المعدة والأمعاء الافتراضيين كلاً على حدة وبدرجة (37) مئوية مع التحريك المستمر . قيس الامتصاصية لكل محلول في أوقات زمنية مختلفة (0-5) ساعة ، باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية في كلية العلوم - جامعة البصرة ومن نوع Helios V4.60 UV.-Visible spectrophotometer ، England & بطول موجي (290) نانومتر . قورنت القراءات الناتجة مع منحنى المعايرة القياسي للنستاتين .

(هـ) الفطريات المختبرة :

أستخدم عدد من الفطريات المجهزة من مختبر أبحاث الفطريات في قسم علوم الحياة - كلية العلوم ، في دراسة فعالية المضاد الفطري النستاتين والنستاتين المحمل مع البوليمر وهي الخميرتين *Candida albicans* و *Cryptococcus neoformans* والفطر *Fusarium oxysporum* .

(و) الوسط الزراعي :

أستخدم الوسط الزراعي أكار السابرويد - كلوكوز (Sabourauds Glucose Agar (SGA) . ويتكون من (20) غم كلوكوز (Reachium) و (10) غم بيتون (Fluka) و (20) غم أكار (Fluka) و (1000) مل من الماء المقطر .

(ز) تقدير الفعالية المضادة للفطريات :

تم ذلك بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition Diameter وبطريقة باور⁽¹⁰⁾ Bauer باستخدام الخميرتين *C. albicans* و *Cr. neoformans* والفطر *F. oxysporum* حيث تم زرع تلك الأنواع من الفطريات كلاً على حدة على الوسط الزراعي أكار السابرويد كلوكوز (SGA) وحضنت بدرجة (25) مئوية ولمدة (3-5) أيام للخميرتين ، و (5-7) أيام بالنسبة إلى الفطر المدروس لغرض تنشيطها . بعد انتهاء مدة

الحضن تم تحضير المعلق الفطري حيث أخذ جزء قليل من المستعمرة الفطرية وأضيف إلى قنينة زجاجية حاوية على (5) مل ماء مقطر فضلاً عن بعض الكرات الزجاجية. تم رج المحلول للحصول على معلق فطري متجانس حسب كثافته بأستعمال جهاز عد كريات الدم البيض haemocytometer للحصول على كثافة 10^6 خلية / مل .

أخذ (0.2) مل من المعلق الفطري ونشر بطريقة النشر spreading بأستخدام قضيب زجاجي L-shape على الوسط الزرعي لمدة عشرة دقائق لكي يمتص من الوسط الزرعي ، ثم ثقب وسط الطبق بأستخدام ثاقب الفلين cork porer قطره (9) ملم . أضيف في الثقب (0.7) غم من المضاد الفطري النستاتين و (1) غم من النستاتين المحمل مع البوليمر وحضنت الأطباق بدرجة (25) مؤوي ولمدة (10) أيام . حددت الفعالية المضادة للفطريات ابتداءً بقياس قطر منطقة التنشيط للنمو الفطري مقدرة بالسنتيمتر خلال فترات زمنية مختلفة (3-10) أيام .

تم دراسة فعالية البوليمر ضد الفطريات المختبرة لوحده كطبقة سيطرة وذلك بإضافة (0.3) غم وأتباع نفس الخطوات السابقة الذكر .

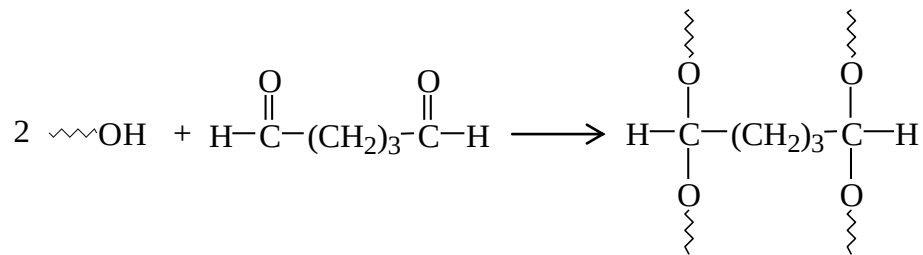
(ح) التحليل الإحصائي :

تم استخدام برامج (ANOVA test) لتحليل البيانات الإحصائية واستخدام حساب أقل فارق معنوي معدل RLSD لمعرفة الاختلافات المعنوية بين المتوسطات .

النتائج والمناقشة :

(أ) تحضير الشبكة البوليمرية الهلامية :

حضرت الشبكة البوليمرية من التفاعل المباشر بين البولي (فنييل الكحول) poly (vinyl alcohol) مع العامل المتشابك الكلوترالديهايد gluteraldehyde مكوناً ما يعرف بتراكيب البولي أسيتال . وتم ذلك من خلال تفاعل مجموعة الهيدروكسيل من البولي (فنييل الكحول) مع مجموعتي الالديهايد من الكلوترالديهايد وكما في المعادلة التالية :



(ب) تحميل النستاتين مع الشبكة البوليمرية الهلامية :

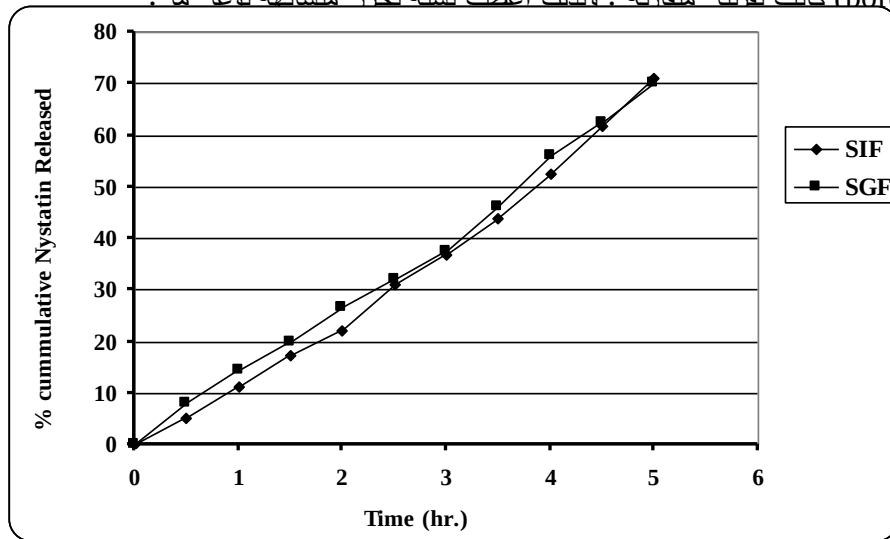
تم تحميل المضاد الفطري النستاتين مباشرة أثناء عملية التشابك . وفيها يبقى النستاتين محصوراً داخل المسافات البينية للشبكة ومرتبطة معها عن طريق تكوين الأواصر الهيدروجينية بوجود مجاميع الهيدروكسيل المتعددة والمتداخلة ومجموعة الأمين ، والذي يمثل الجزء القطبي (الذائب في الماء) ويمكن أن يتداخل عن طريق تكوين قوى فاندرفالز وتداخلات هايدروفورية hydrophobic interaction

من خلال السلسلة الكربونية الطويلة نوعاً ما والتي تمثل الجزء غير القطبي (الذائب في الدهون) . ويشكل النستاتين المحمل مع البوليمر (فنيل الكحول) نظاماً متجانساً يدعى (matrix system) .

(ج) دراسة الإطلاق المتوازن للنستاتين من الشبكة البوليمرية الهلامية خارج الجسم الحي :

تم تعيين تركيز النستاتين المتحرر خلال فترات زمنية مختلفة (0-5) ساعة . إن نسبة تحرر النستاتين المحمل (PN) تمت متابعته في سائلي المعدة والمعاء الافتراضيين .

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) ، أن نسبة تحرر النستاتين المحمل (PN) في سائل المعدة الافتراضي (SGF) أكبر نوعاً ما من نسبة تحرره في سائل الأمعاء الافتراضي (SIF) بمرور الزمن (0-3) ساعة . ليتساوى تقريباً عند (61.8%) في سائل المعدة الافتراضي (SGF) و (61.1%) في سائل الأمعاء الافتراضي (SIF) بعد مرور (4.5) ساعة . بينما كانت نسبة تحرره بعد مرور (5) ساعات (70.1%) في سائل المعدة الافتراضي (SGF) و (70.6%) في سائل الأمعاء الافتراضي (SIF) . من هنا نستنتج أن الدالة الحامضية ليس لها ذلك التأثير الكبير على معدل تحرر النستاتين من الشبكة البوليمرية . ولربما يرجع السبب إلى التغير الحاصل في تركيب النستاتين والبوليمر من خلال وجود مجاميع محبة للماء المتمثلة بمجاميع الهيدروكسيل المتعددة والمتبدلية كما في البولي (فنيل الكحول) والمجاميع الكارهة للماء كالسلسلة الكربونية الطويلة نوعاً ما⁽⁴⁾ . جعلت إمكانية تداخل النستاتين بسهولة لتكوين الأواصر الهيدروجينية وتداخلات هيدروفوبية مكوناً نظاماً متوازناً جديداً مع الشبكة البوليمرية ، وهذا ما قد ساعد على دخوله بصورة متساوية تقريباً باختلاف الوسط الحامضي . وبذلك تكون نسبة الانتفاخ للبوليمر متقاربة وهذا يعني أن حجم الفتحات (pore size) كانت تقريباً متقاربة . وبذلك أعطت نسبة تحرر متشابهة نوعاً ما .



شكل (2) : تأثير الدالة الحامضية على نسبة الدواء المتحرر النستاتين عند (37) منوي

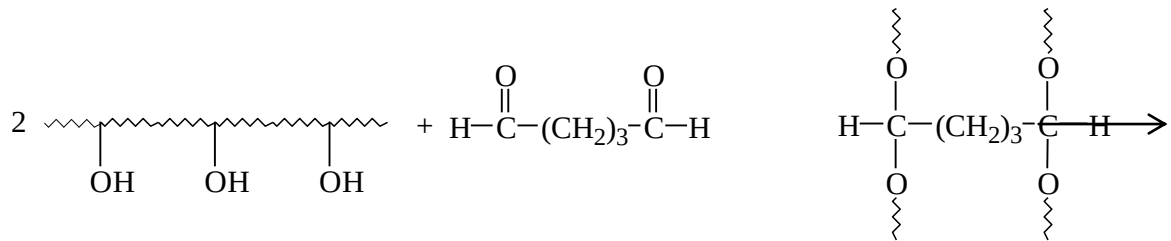
(د) فعالية النستاتين (N) و النستاتين المحمل (PN) المضادة للفطريات Anti-Fungal Activity :

سجلت دراسة الفعالية المضادة للفطريات للنستاتين (N) ومقارنتها مع النستاتين المحمل (PN) من خلال قياس قطر منطقة التثبيط . حيث أظهرت فاعلية معنوية ($P < 0.01$) ضد جميع الفطريات المختبرة ، كما موضح في الجدول (1) .

أن المضاد الفطري النستاتين المحمل (PN) له القدرة على تثبيط نمو الفطريات المدروسة وأنعدام نمو بعضها تماماً . كما أظهرت الدراسة أن النستاتين المحمل على البوليمر (PN) له تأثير متباين حسب الفطريات المختبرة كلاً حسب ضراوتها إذ كان التأثير الأكبر ($P<0.01$) على الفطر *F. oxysporum* مقارنة بتأثيره على الخميرتين *C. albicans* و *Cr. neoformans* بالرغم من ضراوة الفطر المذكور . أما بالنسبة للنستاتين (N) فكان أقل فاعلية معنوية ($P<0.01$) باختلاف الفطريات المختبرة ، وكان التأثير واضح على الخميرة *Cr. neoformans*.

نستنتج من ذلك أن تحميل النستاتين على البوليمر أدى إلى زيادة فاعليته وبشكل معنوي ($P<0.01$) مقارنة مع النستاتين لوحده ، وهذا جاء مطابقاً لكثير من الدراسات السابقة التي أثبتت أن المواد الفعالة المحملة على البوليمرات كانت لها فاعلية أعظم من المواد الفعالة القياسية⁽¹²⁾ .

إن ما تبقى من النستاتين المحمل وهو ما يقارب (29%) لربما قد تشابك من خلال مجاميع الهيدروكسيل مع العامل المتشابك كلوتايرالديهيد بدلاً من البولي (فنيال الكحول) لتكوين آصرة أسياتل وبذلك قلت مجاميع الهيدروكسيل وزادت السلسلة الكربونية لتزيد قابلية المضاد الفطري على النفاذ إلى جدار الخلية الفطرية عن طريق زيادة الذائبية بالدهون وبهذا يستطيع النستاتين المحمل (PN) من الوصول إلى الموقع الفعال في الخلية الفطرية والذي أدى إلى تثبيط نموها مقارنة مع النستاتين لوحده⁽¹⁰⁾ . التفاعل المتوقع يمثل بالمعادلة التالية :



جدول (1) : قطر منطقة التثبيط مقدره (cm) للمضاد الفطري النستاتين (N) و النستاتين المحمل (PN) باختلاف الفطريات المختبره

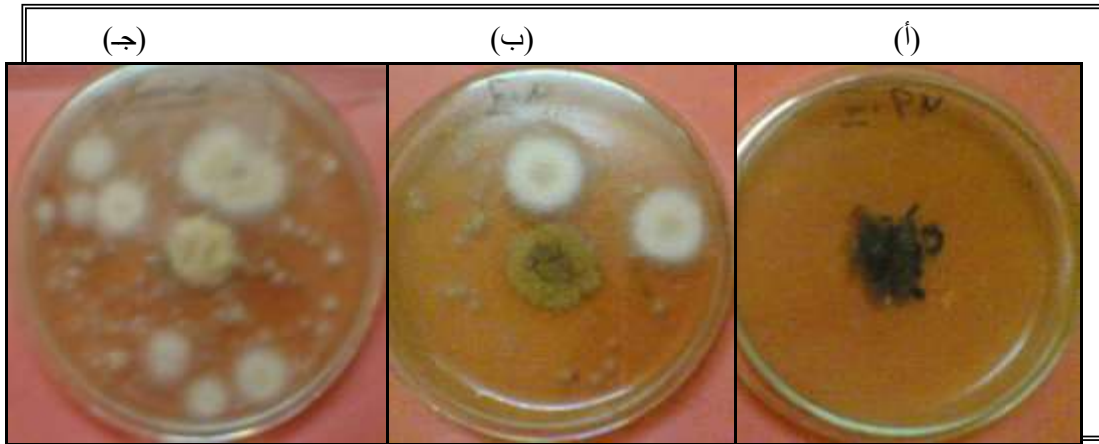
	<i>c. albicans</i>						<i>cr. neoformans</i>						<i>f. oxysporum</i>					
عدد الأيام	3	4	5	6	7	10	3	4	5	6	7	10	3	4	5	6	7	10
المركب N*	4.0	3.9	3.6	3.4	3.3	3.0	4.6	4.6	4.4	4.2	4.2	4.2	2.5	2.4	2.3	2.3	2.3	2.3
PN**	7.0	6.8	6.6	6.5	6.5	6.5	5.2	5.2	5.1	5.0	5.0	5.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0

* ، ** تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P < 0.01$) بين المركبين .

C: candida , Cr: cryptococcus , F: fusarium

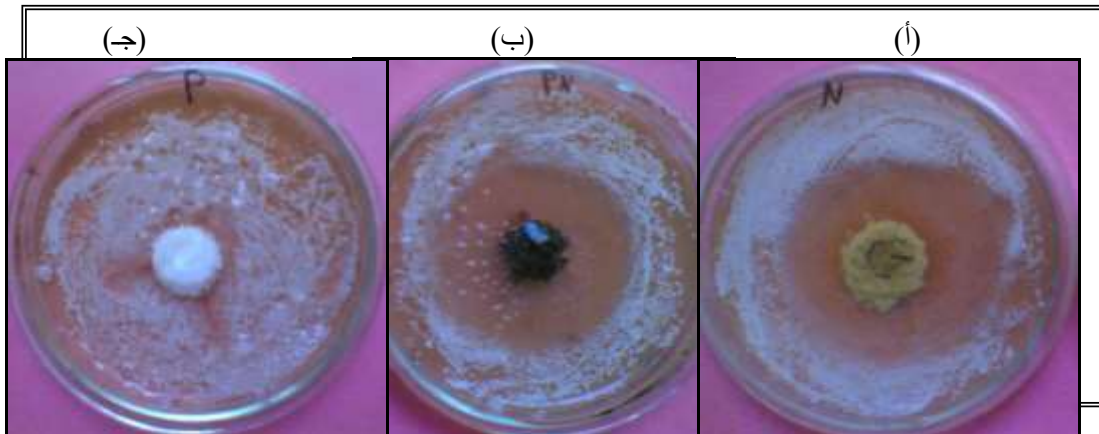
في ما يخص البولي (فنيل الكحول) فلم يظهر أي فاعلية تجاه الفطريات المختبرة . وقد يعزى ذلك إلى أن البوليمر المدروس يتصف بعدم وجود الجزء العضوي المناسب لإختراق جدار الخلية الفطرية المتمثل بطول السلسلة الكاربونية لذا نرى أن البوليمر فاعليته معدومة .

توضح الأشكال (3،4،5) قطر منطقة التنشيط للنستاتين (N) والنستاتين المحمل (PN) والبوليمر (P) ضد الفطريات المختبرة .



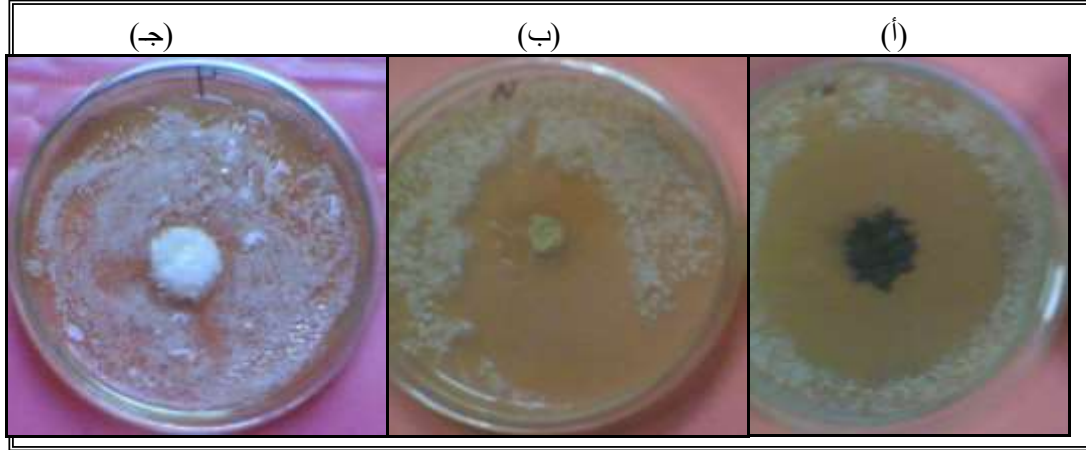
شكل (3) : قطر منطقة التنشيط لـ (أ) النستاتين المحمل ، (ب) النستاتين ، (ج) البوليمر

Fusarium Oxysporum ضد الفطر



شكل (4) : قطر منطقة التثبيط لـ (أ) النستاتين ، (ب) النستاتين المحمل ، (ج) البوليمر

ضد الفطر *cryptococcs neoformans*



شكل (5) : قطر منطقة التثبيط لـ (أ) النستاتين المحمل ، (ب) النستاتين ، (ج) البوليمر

ضد الفطر *candida albicans*

المصادر :

- 1- Y. Lu. And S. C. Chem. , Adv. Drug Deliv ; Rev. 56 , Issue 11 , 1621 – 1633 (2004) .
- 2- آدم ، كوركيس عبد آل آدم – الراتنجات البوليمرية في الأنظمة الدوائية الجديدة – مجلة الدواء العربي 1999 – مجلد 8 – العدد 95 – 107.
- 3- A. M. , Lowman and N. A. Peppas , “Hydrogels” Encyclopedia of controlled Drug Delivery , E. mathiowitz , ed , wiley , New York , 397 – 418 (1999) .
- 4- N. Imberg , Ph. D. Thesis , University of Uppsala , Sweden (2003) .
- 5- A. M. Haddad , A. A. Juma and G. A. Adam , Iraqi J. of Polymers , Vol. 6 , No. 2 , 75 – 82 (2002) .
- 6- A. H. Al-Mowali , A.A. Al-Mowali and R.K. Zedan , Basrah J. Science , 20 , 23 – 30 (2002) .
- 7- A. M. Al-Zubaidi , A. M. Haddad and D. S. Ali , Basrah J. Science , C , Vol. 23 , No. 1 , 116 – 127 (2005) .
- 8- M. A. Al-Ali , MSc. Thesis , University of Basrah (2002) .

-
- 9- D.R. Laurence , P. N. Bennette and M. J. Brown , “Clinical Pharmacology” , New York , 8th , P235 (1997) .
- 10- A. H. Al-Mowali , E.A.Al-Timimi and I. Al-Rubayea , Iraqi J. og Biology 2(1) 209 – 214 (2002) .
- 11- European pharmacopoeia – 3rd edition – council of Europe – Strasbourg – 1999.
- 12- Murat Sen and Arzuyakar , Luternational J. of Pharmaceuties 228 , 33 – 41 (2001) .