مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۴/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۸

# مقایسه‌ی پودر استنشاقی اریتروپوئیتین 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 اریتروپوئیتین وجود دارد. هدف از طرح حاضر، تهیه‌ی یک فرم قابل استنشاق از اریتروپوئیتین 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 وترهالوز تهیه شد. محلول آبکی اریتروپوئیتین 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 ۶تایی رت یک گروه دریافت کننده‌ی پودر فاقد دارو، یک گروه دریافت کننده‌ی محلول معمولی تزریق 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 گاواژ 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 هموسیتومتر انجام شد.

**یافته‌ها:** گروه‌های شاهد منفی، اریتروپوئیتین 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 $P < ۰/۰۱$ از گروه اریتروپوئیتین تزریقی و با $P < ۰/۰۰۱$ از گروه شاهد منفی بیشتر بود. در این زمان، بین گروه اریتروپوئیتین تزریقی و شاهد منفی نیز اختلاف معنی‌دار با $P < ۰/۰۱$ دیده شد. 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 $P < ۰/۰۰۱$ معنی‌دار بود.

**نتیجه‌گیری:** پودر استنشاقی اریتروپوئیتین 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:** اریتروپوئیتین، رتیکولوسیت، دارو رسانی ریوی، نارسایی مزمن کلیوی

**ارجاع:** ورشوساز ژاله، مینائیان محسن، سامی مریم. **مقایسه‌ی پودر استنشاقی اریتروپوئیتین 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 دارو رسانی، دانشکده‌ی داروسازی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر ژاله ورشوساز

Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir

## مقدمه

اریتروپوئیتین یک گلیکوپروتئین اسیدی است که ژن سازنده‌ی 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).

اریتروپوئیتین مهم‌ترین تنظیم کننده‌ی 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 اریتروپوئیتین 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 اریتروپوئیتین وجود دارد.

۹۰ درصد اریتروپوئیتین 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 اریتروپوئیتین خون افزایش پیدا می‌یابد. اریتروپوئیتین، تکثیر و تمایز اریتروئید را با تداخل با گیرنده‌های اریتروپوئیتین روی پیش‌ساز گلبول قرمزتحریک می‌کند. گیرنده‌ی اریتروپوئیتین یک عضو از خانواده‌ی بزرگ گیرنده‌های سیتوکینی است که در فسفریلاسیون پروتئینی و فعال‌سازی عامل ترجمه برای تنظیم عملکرد سلولی، استفاده می‌شود.

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

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

فرم‌های تجاری موجود از اریتروپوئیتین آلفا عبارت از EXPREX و PROCRIT ،POGEN

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

تزریق وریدی ارپتروپوئیتین آلفا دارای نیمه عمر دفع ۸-۴ 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 تهیه‌ی 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 تزریق 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 (Fetal pre-T cells express low-affinity receptors for IgG یا Fc gamma R) از IgG (Immunoglobulin G) به اریتروپوئیتین است که حداکثر ۳۵ درصد فراهمی زیستی داشته است (۱۲-۱۱) 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 هیدروفیلیسیتی 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 اینترفرون 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.

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 فراورده‌های استنشاقی تحت فشار که دوز معینی از دارو را به بیرون می‌فرستند، (Dry powder inhaler یا DPI)، اسپری‌های بینی، پودرهای خشک استنشاقی (Pressurized metered- dose inhalers یا PMDI)، محلول‌ها، سوسپانسیون‌های استنشاقی، فراورده‌های استنشاقی مایع و نبیولایزرها اشاره کرد. برخی از این تکنیک‌ها از شرکت فایزر با نام‌های تجاری MedTone، AERx، DirectHaler و Handihaler موجود هستند. هر یک از این تکنیک‌ها برای تولید انواع داروهای استنشاق ریوی در بیماری‌های موضعی یا سیستمیک مانند حمل انسولین، سیپروفلوگزاسین 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 اریتروپوئیتین از راه ریوی و عدم وجود یک شکل دارویی خشک و پایدار از آن (که می‌تواند قابلیت تولید صنعتی در مقیاس بالا را دارا باشد)، به نظر می‌رسد اشکال دارویی ریوی این دارو با قابلیت تولید به شکل خشک و پایدار ضروری باشد.

از جمله موادی که در دارو رسانی ریوی می‌توانند با ایجاد تماس نزدیک بین ذرات و مخاط ریه، میزان جذب دارو را افزایش دهند، می‌توان به مواد زیست چسبی چون کیتوزان، آگار، کندروئیتین سولفات و کوپلیمر پلی (متیل وینیل اتر– مالئیک اسید) (Poly methyl vinyl ether-alt-maleic acid یا PMVEMA) اشاره نمود (۲۴).

هدف از انجام این طرح، تهیه‌ی یک فرم قابل استنشاق از اریتروپوئیتین به صورت پودر خشک به طریق اسپری دراینگ و فریز دراینگ از اریتروپوئیتین می‌باشد که بتواند جایگزین فرم تزریقی شود. برای این منظور، ابتدا میکرو ذرات حاوی اریتروپوئیتین که دارای قابلیت زیست چسبی هستند، تهیه و سپس با استفاده از مواد مرسوم برای تولید DPI به پودر خشک قابل استنشاق (با محدوده‌ی اندازه‌ی ذره‌ای ۵–۱ میکرون جهت ته‌نشینی در عمق ریه) تبدیل می‌شوند.

## روش‌ها

### مواد

اریتروپوئیتین (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 فروس سولفات از روزدارو– ایران خریداری گردیدند.

## روش تهیه‌ی پودر خشک اریتروپوئیتین 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: اسپیراتور ۸۰ درصد، پمپ ۵ درصد، دمای ورودی ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، دمای خروجی ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سرعت اسپری شدن محلول ml/min ۲ و سرعت اسپیراتور ۳۲/۵ $m^3/hr$ بود.

بر اساس فرمولاسیون طراحی شده، ۳۰ میلی‌گرم پلیمر زیست چسب (پلی متیل وینیل اتر مالئیک اسید) و ۵۳/۳ میلی‌گرم افزاینده‌ی جذب (۲-هیدروکسی پروپیل آلفا سیکلودکسترین) هر کدام جداگانه در ۱۰۰ سی‌سی آب حل شدند. ۱۸۳۳/۴ میلی‌گرم ترهالوز (به عنوان حامل فرمولاسیون) نیز در ۱۰۰ سی‌سی آب حل شد. محلول‌های فوق به هم اضافه شدند و محلول نهایی در دستگاه اسپری درایر اسپری شد. پودر جمع‌آوری شده از الک با مش شماره‌ی ۴۰ عبور داده شد و داخل دسیکاتور نگهداری گردید.

سپس ۵۰ میلی‌گرم از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ (به عنوان کرایوپرتکتیو) در یک بالون ریخته و ۵ سی‌سی از محلول آبکی اریتروپوئیتین به آن اضافه شد تا حل شود. محلول فوق داخل فریزر با دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد تا منجمد شود. سپس به دستگاه فریز درایر (CHRIST Alpha۲-۴ 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 درای کردن اریتروپوئیتین این بود که به دلیل گران قیمت بودن و در اختیار داشتن مقدار کم دارو، نمی‌شد 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 شیشه‌ای 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 ذره‌ای پودر اسپری درای شده

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

## تعیین مقدار دارو در پودر نهایی خشک شده

جهت اطمینان از یکنواختی دارو در پودر تهیه شده، سه نمونه‌ی ۱۰ میلی‌گرم پودر که مخلوطی از ۲ میلی‌گرم پودر فریز درای شده و ۸ میلی‌گرم پودر اسپری درای شده بود و انتظار می‌رفت که حاوی ۸۴۰ واحد دارو باشد، به روش استفاده از کیت الایزای اریتروپوئیتین ( Erythropoietin ELISA-IBL INTERNATIONAL-Germany) تعیین مقدار شد.

## مطالعات حیوانی

۳ گروه ۶تایی 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.

جهت پر شدن ذخایر آهن بدن رت‌ها، ۶ روز قبل از تجویز دارو به حیوانات به میزان ۱ درصد وزن غذایی که می‌خوردند، آهن به صورت گاواژ داده شد (۲۵). با توجه به این که هر رت روزانه حدود ۲۵ گرم غذا مصرف می‌کرد، پس باید ۲۵۰ میلی‌گرم فروس سولفات به رژیم غذایی آن‌ها اضافه می‌شد.

هر قرص فروس سولفاتی که در این آزمایش استفاده شد، حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم فروس سولفات بود و وزن هر قرص، معادل ۲۲۰ میلی‌گرم بود. پس باید ۳۷۵ میلی‌گرم از قرص‌ها توزین می‌شد تا حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم فروس سولفات باشد. ۳۷۵ میلی‌گرم از پودر قرص فروس سولفات، توزین و در ۳ سی‌سی آب پراکنده شد و توسط یک سرنگ و فیدینگ تیوب به صورت گاواژ 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 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.

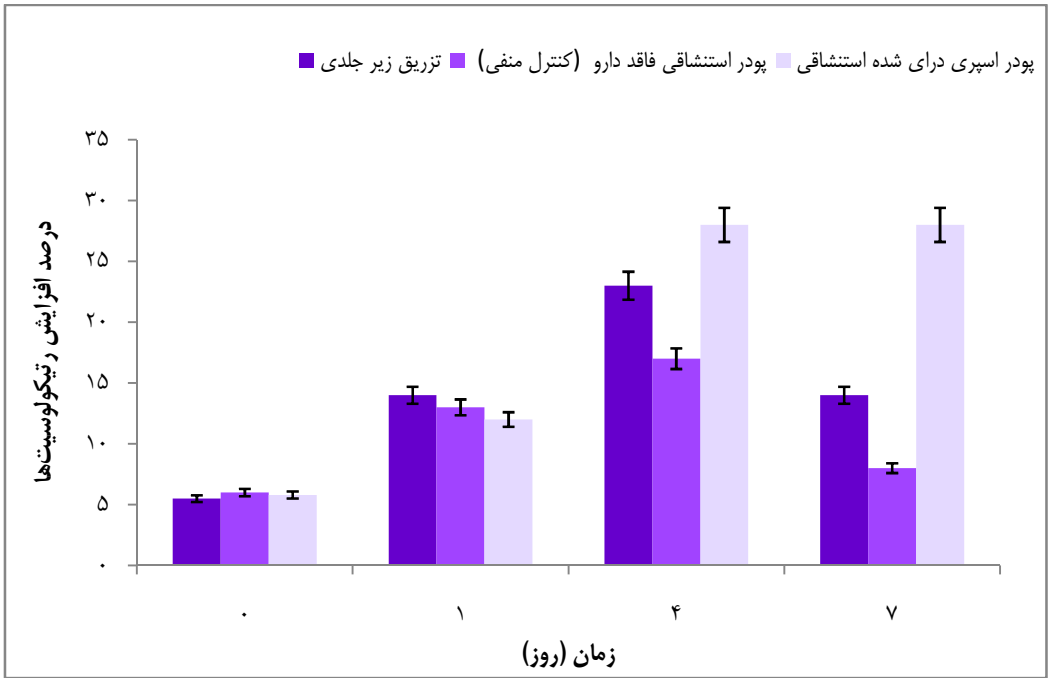
در روزهای ۰، ۱، ۴ و ۷ جهت شمارش رتیکولوسیت‌ها از گوشه‌ی چشم رت‌ها خون‌گیری به عمل آمد. حدود ۱ سی‌سی از خون رت جمع‌آوری شد و جهت شمارش رتیکولوسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر به آزمایشگاه منتقل گردید.

## یافته‌ها

نتایج تعیین اندازه‌ی ذره‌ای و مقدار داروی بار شده در ۱۰ میلی‌گرم از پودر تهیه شده نشان داد که درصد کارایی بارگیری دارو ± انحراف معیار (درصد) ۱۳/۵۰ ± ۶۲/۰۲ و در متوسط اندازه‌ی ذره‌ای ۵۰ درصد ± انحراف معیار ۲/۲۰ ± ۸/۳۰ میکرومتر بود.

**در شکل ۱** درصد افزایش رتیکولوسیت‌ها پس از تجویز استنشاقی ۸۴۰ واحد اریتروپوئیتین به فرم پودر استنشاقی اسپری درای شده با محلول تزریقی معمولی آن مقایسه شده است. بین گروه‌های شاهد منفی، اریتروپوئیتین 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 $P < ۰/۰۱$ از اریتروپوئیتین تزریقی و با $P < ۰/۰۰۱$ از شاهد منفی بیشتر بود. در این روز، همچنین بین گروه اریتروپوئیتین و شاهد منفی نیز اختلاف معنی‌دار با $P < ۰/۰۱$ مشاهده گردید.




**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**

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 $P < ۰/۰۰۱$ 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 درایینگ و با استفاده از پودر حامل، اقدام به تهیه‌ی پودر استنشاقی اریتروپوئیتین با اندازه‌ی ذره‌ای میکرونی گردید.

جهت افزایش جریان پذیری داروی استنشافی 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 اکسیپیانی است که توسط FDA (Food and drug administration) برای استنشاق تأیید شده است، چون یک اکسیپیان 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 اکسیپیان‌های 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،

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

Shao و همکاران (۲۸) تأثیر مثبت سیکلودکسترین‌ها را به عنوان افزاینده‌های جذب ریوی انسولین به ترتیب زیر گزارش کردند: دی متیل بتا سیکلودکسترین > آلفا سیکلودکسترین > بتاسیکلودکسترین > گاما سیکلودکسترین > هیدروکسی پروپیل بتا سیکلودکسترین.

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 اریتروپوئیتن 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).

یک نگرانی عمده در مورد استعمال پپتیدها و پروتئین‌های ریوی، احتمال ایجاد واکنش‌های ایمونولوژیکی 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 پپتیدها 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 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.

## 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, Thipphawong 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 Biopharm1994; 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, Talaee 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.

**Journal of Isfahan Medical School** Received: 20.10.2013

**Vol. 31, No. 264, 2nd Week, February 2014** Accepted: 29.12.2013

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

Jaleh Varshosaz PhD[1], Mohsen Minaiyan PhD[2], Maryam Sami[3]

**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 ininhalable 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