

دراسة العوامل المؤثرة على التمحفظ الدقيق لليورياز كبروتين نموذج بطريقة التصميم المسحي

د. لمى الهوشي*

(تاريخ الإيداع 20 / 6 / 2018. قُبِلَ للنشر في 9 / 8 / 2018)

□ ملخص □

تهدف هذه الدراسة إلى تحضير جسيمات دقيقة حاوية على بروتين نموذج (يورياز) باستخدام طريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف م¹/ز/م²، ونظراً للعوامل الكثيرة (عوامل الصياغة وعوامل التحضير) المؤثرة على خصائص الجسيمات تم استخدام طريقة التصميم المسحي Screening design لتحديد العوامل المؤثرة رياضياً. درست فعالية التمحفظ (EE) وفعالية اليورياز الحيوية (UA) كخصائص للجسيمات الدقيقة المحضرة. بين التحليل الرياضي والإحصائي أن فعالية التمحفظ تزداد بزيادة حجم المحل العضوي وزيادة سرعة التحريك خلال الاستحلاب الأولي وينقصان حجم الطور المائي البروتيني. من جهة أخرى انخفضت فعالية اليورياز الحيوية بزيادة حجم الطور المائي الداخلي البروتيني. بالنظر إلى كل العوامل المدروسة (المؤثرة أو لا) تم تحضير جسيمات دقيقة حاوية على اليورياز بفعالية تمحفظ عالية (≈82%) وفعالية حيوية لليورياز تصل إلى 55% تقريباً وهاتان القيمتان هما الأفضل من بين كل النتائج التي تم الحصول عليها. كان الموديل الرياضي ملائماً للدراسة نظراً لقيمة معامل التحديد المرتفعة: $R^2 = 0.996$ و 0.995 لفعالية التمحفظ وفعالية اليورياز الحيوية على الترتيب.

الكلمات المفتاحية: جسيمات دقيقة، تبخر المحل، يورياز، فعالية حيوية، التصميم المسحي

*أستاذ مساعد - قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

Study of factors influencing microencapsulation of urease (a model protein) by screening design

Dr. Lama AL HAUSHEY*

(Received 20 / 6 / 2018. Accepted 9 / 8 / 2018)

□ ABSTRACT □

The objective of this study was to prepare microparticles containing a model protein (urease) by double emulsion-solvent evaporation $w_1/o/w_2$. A screening design was used to evaluate the effect of the process and formulation factors on microparticles properties.

The microparticles properties considered were the encapsulation efficiency (EE) and the urease activity (UA). The mathematical and statistical analysis showed that the encapsulation efficiency increased with increasing organic phase and stirring speed during the second emulsification. It also decreased when inner aqueous phase was increased. Urease activity was decreased with an increase in the volume of the inner aqueous phase. Following the screening study and the whole results it was possible to prepare microparticles in optimal conditions with high encapsulation efficiency ($\approx 82\%$) and relatively high urease activity ($\approx 55\%$). The mathematical model was suitable for the study regarding the high value of R^2 (0.996 and 0.995) for EE and UA respectively.

Key words: microparticles, solvent evaporation, urease, bioactivity, screening design.

* Associate professor- Department Of Pharmaceutics And Pharmaceutical Technology- Faculty Of Pharmacy- Tishrine University

مقدمة

أدى التطور الهائل في التقانات الحيوية Biotechnology خلال سنوات 1980s إلى توفر البروتينات بشكل كبير وإلى زيادة استخدامها صيدلانياً (Bilati et al. 2005). فبين عامي 1980 و2001 وافقت الـ FDA على 504 دواء منها 50 دواء يعود للبروتينات (Determan et al. 2004). مازالت البروتينات العلاج الوحيد والنوعي لكثير من الأمراض وأمثلة عن هذه البروتينات نجد: الأنسولين، هرمون النمو growth hormone، والأضداد.

الجزئيات البروتينية شديدة الحساسية لتركيب الوسط الحيوي (Kyekyoon et al. 2006) مما يحصر إيتاءها حقناً وهي تتمتع أيضاً بعمر نصفي قصير مما يعني إيتاءها بشكل متكرر للوصول إلى التراكيز العلاجية. كذلك فإن الضخامة التي تتميز بها البروتينات تجعلها غير قادرة على عبور الحواجز الحيوية مما يحتم تكرار استخدامها بالطرق الحقنية للحصول على التراكيز العلاجية (Wang et al. 2013).

من استراتيجيات التغلب على بعض مشاكل إيتاء البروتينات تلعب طريقة التمحفظ الدقيق (microencapsulation) دوراً هاماً في تطوير أشكال صيدلانية حاوية على بروتينات. يهدف التمحفظ الدقيق إلى حبس مادة فعالة ضمن جسيمات دقيقة كروية تتراوح أبعادها بين 1 و1000 ميكرون وتحضر هذه الجسيمات بطرائق عديدة: فيزيوكيميائية، كيميائية وميكانيكية (Puel et al. 2006). من بين الطرائق المستخدمة تحلل طريقة تبخر المحل (solvent evaporation) بواسطة الاستحلاب (ز/م أو م/ز/م) موقعاً هاماً وذلك لاستخدامها الشائع في تمحفظ البروتينات الدقيق (Al haushey et al. 2007). كما تقوم الجسيمات الدقيقة الناتجة بتعديل تحرر البروتينات وحمايتها من الظروف الخارجية (Al haushey et al. 2007, Andre Abrant et al. 2001).

وحيث أن البروتينات جزيئات حساسة للظروف الخارجية فإن لعدم ثباتية البروتين وبالتالي ضياع فعاليته تأثير سلبي فهي تؤدي إلى رבוד فعل مناعية وأحياناً سمية (van de Weert et al. 2000, Diwan et al. 2001). تتضمن طريقة تبخر المحل عدة عوامل مؤثرة على ثبات بنية البروتينات الهشة فهي تحتم التحريك وأحياناً القوي (لتصغير الأبعاد) والتماس مع المحلات العضوية والبلمرات الكارهة للماء (Meng et al. 2004, Jiang et al. 1994, Alonso et al. 1996, Chang et al. 2001). كما أن تشكيل المستحلب الأولي م/ز يخلق سطوح بينية interfaces فاصلة كبيرة (Perez et al. 2003, Tamber et al. 2005) تعرض البروتين للامتزاز عليها وبالتالي ضياع جزء من فعاليته.

يتم التحري عن ثبات البروتينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC للتحري عن الثباتية الكيميائية (Emami et al. 2009)، الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE) للتحري عن البنية الأولية للبروتينات (Determan et al. 2004)، Fluorescence spectroscopy للتحري عن البنية الثالثية للبروتينات وطرائق حيوية للتحري عن الفعالية الحيوية للبروتين (Sturesson et al. 2000, Meng et al. 2004).....

تطرفت دراسات كثيرة إلى تحديد الفعالية الحيوية للبروتينات وفي العديد منها تم التمحفظ الدقيق للأنزيمات كجزيئات بروتينية نموذج وذلك لسهولة تحديد فعاليتها ومن أمثلة هذه الأنزيمات المتحفظة: الليوزوم Lysozyme (Swed et al. 2005, Srinivasan 2003, Meng 2003, al. 2014)، غاما-الكيموتريبسين gamma-chymotrypsin (Castellanos, 2002)، البيروكسيداز (Montalvo-Ortiz et al. 2012)، اليورياز urease (Sturesson et al. 2000).....

بالنظر إلى عدد العوامل الكبير الممكن أن يؤثر على خصائص الجسيمات الدقيقة تم اختيار طريقة التصميم العاملي factorial design وبشكل محدد أكثر التصميم المسحي screening design الذي يسمح بدراسة عدد كبير من المتغيرات بأقل عدد من التجارب. تستند هذه الطريقة إلى طرائق إحصائية وأفكار رياضية بسيطة حيث يقوم التصميم العاملي على اختيار وترتيب التجارب من أجل تحديد، وأقل التكاليف، تأثيرات المتغيرات على إجابة معينة كما أنه يسمح باستنتاج موديل رياضي يمثل نظام الدراسة وبناء سلسلة من التجارب التي تسمح بحساب معاملات الموديل الرياضي (Goupy 1988, 2001, 2005). نظراً لأهمية التصميم المسحي فقد تم تطبيقه من قبل العديد من الباحثين (Dzul-Cervantes et al. 2017, Prusty et al. 2016, Narayana et al. 2014).

أهمية البحث وأهدافه:

تكمن أهمية هذا البحث المسجل في جامعة تشرين وفق قرار مجلس الجامعة: رقم 188 تاريخ 3-10-2017 والذي تم إجراؤه في كلية الصيدلة- جامعة تشرين في صياغة أشكال صيدلانية حديثة (جسيمات دقيقة: microparticles) حاوية على بروتينات وتم اختيار أحد الأنزيمات المتوفرة مخبرياً (اليوريز) كنموذج عن هذه الجزيئات البروتينية الحساسة للشروط الخارجية لتحديد مدى تأثيرها بشروط الصياغة الصيدلانية. يهدف هذا البحث إلى تحضير جسيمات دقيقة حاوية على اليوريز باستخدام طريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف م²/ز/1. كما يهدف البحث إلى تحديد العوامل المؤثرة على فعالية التمحظ وعلى فعالية اليوريز الحيوية وذلك بواسطة طريقة الـ screening design ومن العوامل المدروسة: عوامل تتعلق بالتحضير (سرعة ومدة التحريك خلال الاستحلاب الأولي وسرعة التحريك خلال الاستحلاب الثانوي) وعوامل متعلقة بالصياغة (كمية البلمر، حجم الطور الداخلي وحجم المحل العضوي).

طرائق البحث ومواده

1- المواد

عتيدة اليوريا اللونية (Biosystem, Spain)، دي كلور ميثان (SCP, Surechem products LTD)، كحول بولي فينيلي PVA (Mw=115000, Lobachemie, India)، مواد أخرى مختلفة مثل إيدراجيت RS100.

2- الطرائق

2-1-2- تحضير الجسيمات الدقيقة

حضرت الجسيمات الدقيقة بواسطة طريقة معدلة لتبخير المحل عبر تشكيل مستحلب (Al haushey et al. 2007,) (2012). يمكن شرح طريقة التحضير كما يلي: حضر طور عضوي حاو على البوليمير (الإيدراجيت RS100 بكميتين مختلفتين: 0.4 و 0.8 غ). استحلب الطور المائي الحاوي على اليوريز (0.5 أو 1 مل) ضمن الطور العضوي تحت التحريك (Scilogex D160 homogenizer) لمديتين مختلفتين (15 أو 30 ثانية) وبسرعتين مختلفتين (15000 و 22000 rpm) للحصول على مستحلب م²/ز/1. تم استحلاب المستحلب المتشكل في كمية قليلة من الطور الخارجي المائي (0.5% PVA) بواسطة نفس المحرك لمدة 30 ثانية لتشكيل مستحلب مضاعف م²/ز/1. ثم نقل المستحلب المضاعف الناتج إلى 50 مل ماء تحت التحريك بواسطة محرك ميكانيكي (Heidolph RZR)

(2021, Germany) بسرعة (rpm 500) ليتم تصليب القطيرات وتشكيل للجسيمات الدقيقة. جمعت الجسيمات بالترشيح (Zelpa, thickness 0.33mm) ومن ثم تم تجفيفها بالهواء.

2-2-2- بناء التصميم المسحي Screening design

من التجارب المبدئية ومن الدراسات المرجعية تبين أن هناك عوامل كثيرة تؤثر على خصائص الجسيمات الدقيقة (ومنها فعالية التمحفظ وفعالية اليورياز الحيوية). بالنظر إلى العدد الكبير من العوامل المؤثرة تم اختيار طريقة التصميم المسحي screening design لدراسة تأثير عوامل الصياغة وعوامل التحضير على خصائص الجسيمات الدقيقة (فعالية التمحفظ وفعالية اليورياز الحيوية). تم اختيار ستة عوامل وتم تحديد مستويات الدراسة لكل عامل أي القيم التي يمكن أن يتغير وفقها أي عامل مدروس. يظهر الجدول رقم 1 التجارب الثمانية المجراة مع القيم المختلفة التي تأخذها العوامل المدروسة. صممت هذه التجارب الثمانية وفق مصفوفات Plackett و Burman (, 2001, 1988, Goupy 2005) والموديل الرياضي هو:

$$Y(\text{الإجابة}) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + \dots$$

حيث أن: $b_0, b_1, b_2, b_3, b_4, \dots$: معاملات الموديل الرياضي.

يمكن استخراج المعلومات التالية من التحليل الإحصائي:

- اختبار الموديل الرياضي بواسطة معامل التحديد R^2
- دلالة معاملات الموديل (وزن العامل المدروس) باستخدام اختبار Student test. في هذه الدراسة تم اختيار مستوى الدلالة عند 10%.

جدول 1: التجارب الثمانية المصممة وفق التصميم المسحي

العامل المدروس رقم التجربة	كمية البلرم X1 (غ)	حجم DCM X2 (مل)	حجم الطور الداخلي (ط.د.) X3 (مل)	مدة تحريك 1 (مدة 1) X4 (ثا)	سرعة تحريك 1 (سرعة 1) X5 (rpm)	سرعة تحريك 2 (سرعة 2) X6 (rpm)
1	0.8	5	1	15	22000	15000
2	0.4	5	1	30	15000	22000
3	0.4	3	1	30	22000	15000
4	0.8	3	0.5	30	22000	22000
5	0.4	5	0.5	15	22000	22000
6	0.8	3	1	15	15000	22000
7	0.8	5	0.5	30	15000	15000
8	0.4	3	0.5	15	15000	15000

2-2-3- تحديد خصائص الجسيمات الدقيقة Microparticles characterization

تحديد فعالية التمحفظ EE (Encapsulation Efficiency)

تحل كمية معينة من الجسيمات الدقيقة ضمن 2مل DCM وبعد الانحلال التام، يستخلص اليورياز ضمن 4مل ماء لمدة نصف ساعة. تحدد كمية اليورياز في المحلول المائي بواسطة الـ Spectrophotometer (Model T60 U, PG Instuments Ltd, England) عند طول موجة 280 نانومتر وذلك بتطبيق المعادلة: $Y = 0.143X + 0.032$ ($R^2 = 0.997$).

تحسب فعالية التمحفظ من العلاقة التالية:

$$\text{فعالية التمحفظ} = \frac{\text{الكمية الفعلية (الحقيقية) لليورياز ضمن كمية معينة من الجسيمات الدقيقة}}{\text{الكمية النظرية ضمن نفس الوزن من الجسيمات الدقيقة}} * 100$$

تحديد الفعالية الحيوية لليورياز (Urease Activity) UA

تم تحديد الفعالية الحيوية لليورياز (في الطورين الداخلي والخارجي) بشكل معدل قليلاً عن الطريقة المستخدمة من قبل Alhakim وزملائه في دراسة منشورة عام 2012. باختصار، عند تحديد فعالية اليورياز في الطور الداخلي وتحل كمية معينة من الجسيمات الدقيقة ضمن 2مل DCM وبعد الانحلال التام، يستخلص اليورياز ضمن 4مل ماء لمدة نصف ساعة. أما بالنسبة لفعالية اليورياز في الطور الخارجي فقد تم أخذ الطور الخارجي المائي مباشرة. في كلا الحالتين: تحدد الفعالية الحيوية لليورياز في المحلول المائي بطريقة لونية باستعمال اليوريا كركيزة وقياس شوارد الأمونيوم المتحررة باستعمال هيبوكلوريت Na وساليسيلات Na مما يؤدي إلى تشكل مركب ملون (الإندوفينول) والذي تقاس امتصاصيته للأشعة الضوئية في المجال المرئي عند 600 نم بواسطة الـ Spectrophotometer (Model Y= 0.489X+0.003 (R²=0.995) وباستعمال ناصع مناسب.

النتائج والمناقشة

تم مراعاة البنية الحساسة للبروتينات أثناء تحضير الجسيمات الدقيقة فقد تم اختصار زمن الاستحلاب وزمن التماس بين البروتين والمحل العضوي. تراوح زمن الاستحلاب الأولي بين 15 و 30 ثانية وتثبيت زمن الاستحلاب الثاني عند 30 ثانية (الجدول 1).

1- تأثير العوامل المدروسة على فعالية التمحفظ (الإجابة 1)

تراوحت فعالية التمحفظ بين 8.82 و 74.18% (الجدول 2) والعوامل المؤثرة هي: حجم الطور العضوي، حجم الطور المائي الداخلي وسرعة التحريك خلال الاستحلاب الأولي (الشكل 1 والجدول 3).

الجدول 2 : نتائج التجارب المجرى وفق التصميم المسحي (فعالية التمحفظ + الفعالية الحيوية)

العامل المدروس رقم التجربة	فعالية التمحفظ EE % (الإجابة الأولى)	فعالية اليورياز الحيوية UA % (الإجابة الثانية)
1	50.57	13.42
2	28.53	15.43
3	35.15	13.30
4	55.7	32.04
5	74.18	40.89
6	8.82	10.87
7	48.78	48.96
8	41.51	45.03

لزيادة فعالية التمحفظ يجب زيادة حجم الطور العضوي وسرعة التحريك خلال الاستحلاب الأولي ويجب خفض حجم الطور المائي البروتيني الداخلي. بزيادة حجم الطور العضوي (DCM) تنقص سرعة تبخر المحل العضوي ويزداد احتمال إعادة حل للبلمر الموجود على السطح من قبل المحل العضوي وبالتالي نقص تشكل المسامات (Yang et al. 2000). كما أن ترسب البلمر البطيء يعطي بنية كثيفة للجسيمات (Bhalloud et al. 2012). في كلا الحالتين يتم الحد من هجرة البروتين إلى الطور الخارجي المائي وبالتالي زيادة فعالية التمحفظ.



الشكل 1: تأثير العوامل المختلفة على فعالية التمحفظ (الإجابة 1)

(يشير الخط المنقط إلى القيمة الأقصى التي يصبح العامل المدروس ذا دلالة إحصائية عند تجاوزها)

عند زيادة الطور المائي الداخلي تزداد المسامات في بنية الجسيمات مما ينتج عنه زيادة في انتقال البروتين إلى الوسط الخارجي وتتنقص بالنتيجة فعالية التمحفظ (Han et al. 2001, Al haushey et al. 2007). عند زيادة سرعة التحريك تنقص الأبعاد ويزداد السطح الكلي للجسيمات نتيجة زيادة القدرة الحركية المقدمة إلى الجملة والتي تساهم في تجزئة القطيرات (Yang et al. 2001) مما يؤدي إلى زيادة سطح التماس بين المحل العضوي والطور المائي الخارجي وبالتالي زيادة احتمال سرعة استخلاص DCM من قبل الماء مما يصلب الجسيمات بشكل أسرع ومنه زيادة فعالية التمحفظ. لم يلاحظ تأثير ذو دلالة هامة إحصائية بالنسبة إلى بقية العوامل المدروسة ضمن مجال المستويات التجريبية المختارة.

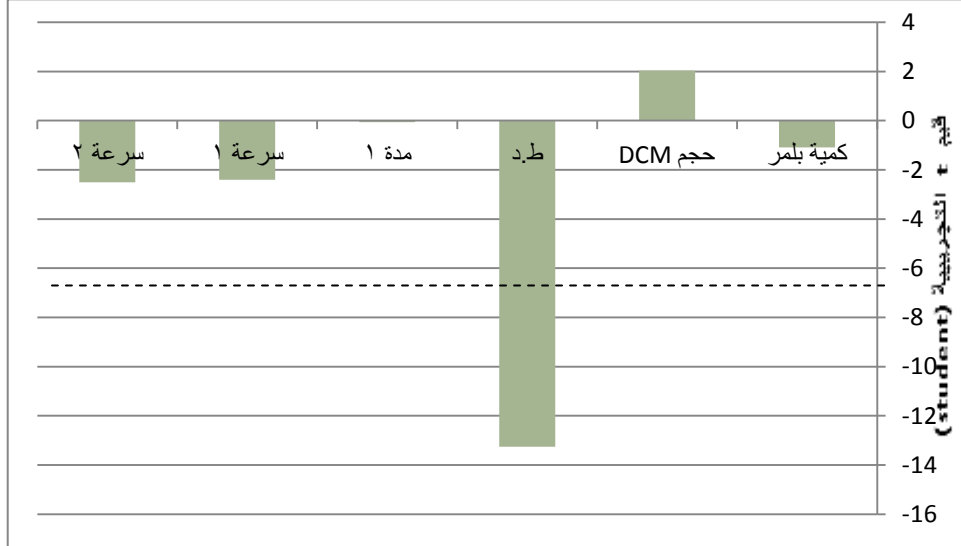
الجدول 3: التحليل الإحصائي للإجابة 1 (فعالية التمحفظ)

الدلالة الإحصائية Significativity	قيم t التجريبية (Student)	الانحراف المعياري S.D	قيمة المعامل (وزن العامل المدروس) Coefficient value	المعامل
*	36.58592	1.173	42.90608	b_0 (وسطي كل نتائج الاجابة 1)
-	-1.65231	1.173	-1.93774	b_1 (كمية بلمر)
*	6.490224	1.173	7.611401	b_2 (حجم محل)
*	-10.3499	1.173	-12.1378	b_3 (حجم الطور الداخلي)
-	-0.7372	1.173	-0.86455	b_4 (مدة التحريك 1)
*	9.375917	1.173	10.99559	b_5 (سرعة التحريك 1)
-	-0.93676	1.173	-1.09858	b_6 (سرعة التحريك 2)
FD = 1 (درجات الحرية)			R^2 (معامل التحديد) = 0.996	

يشير رمز * في عمود الدلالة الإحصائية على أهمية العامل الموافق

2- تأثير العوامل المدروسة على فعالية اليوريز الحيوية (الإجابة 2)

تراوح مجموع فعالية اليوريز الحيوية في الطورين الداخلي والخارجي بين 10.87 و 48.96% بالنسبة إلى كمية اليوريز البدئية الداخلة في التحضير. من بين العوامل المدروسة لعب حجم الطور الداخلي البروتيني الدور الأهم في خفض فعالية اليوريز (الشكل 2 والجدول 4).



الشكل 2: تأثير العوامل المختلفة على فعالية اليوريز الحيوية (الإجابة 2)

(يشير الخط المنقط إلى القيمة الأقصى التي يصبح العامل المدروس ذا دلالة إحصائية عند تجاوزها)

يرجح دور زيادة حجم الطور الداخلي في خفض فعالية اليوريز الحيوية إلى زيادة احتمال تشكل المسامات في بنية الجسيمات وعلى سطحها (Han et al. 2001, Al haushey et al. 2007) مما يقود إلى زيادة تعرض اليوريز إلى الوسط المائي وبالتالي زيادة تعرضه للتخرب ونقص في فعاليته. كما أن زيادة الطور المائي الداخلي تؤدي إلى نقص في فعالية التمحفظ (الشكل 1) أي أن قسماً كبيراً من اليوريز قد أصبح في الطور الخارجي وبالتالي زيادة تخربه. لم يلاحظ للعوامل الأخرى أي تأثير هام إحصائياً ضمن مجال مستويات الدراسة.

الجدول 4: التحليل الإحصائي للإجابة 2 (فعالية اليوريز الحيوية)

الدالة الإحصائية Significativity	قيم t التجريبية (Student)	الانحراف المعياري S.D	قيمة المعامل (وزن العامل المدروس) Coefficient value	المعامل
*	25.61593	1.073	27.49203	b_0 (وسطي كل نتائج الاجابة 2)
-	-1.08993	1.073	-1.16975	b_1 (كمية بلمر)
-	2.032242	1.073	2.181083	b_2 (حجم محل)
*	-13.2644	1.073	-14.2359	b_3 (حجم الطور الداخلي)
-	-0.05438	1.073	-0.05836	b_4 (مدة التحريك 1)
-	-2.4027	1.073	-2.57867	b_5 (سرعة التحريك 1)
-	-2.50081	1.073	-2.68397	b_6 (سرعة التحريك 2)
FD = 1 (درجات الحرية)			R^2 (معامل التحديد) = 0.995	

يشير رمز * في عمود الدلالة الإحصائية على أهمية العامل الموافق

عند محاولة ربط نتائج تأثير العوامل على فعالية التمحفظ مع نتائج العوامل المؤثرة على الفعالية الحيوية فقد وجد ترابط فيما يخص حجم الطور المائي الداخلي أي أن زيادة حجم الطور الداخلي يؤدي إلى نقص فعالية التمحفظ وخفض فعالية البروتين. أما زيادة حجم الطور العضوي فقد أدت إلى زيادة فعالية التمحفظ ولم يكن لها تأثير ذو دلالة إحصائية على الفعالية الحيوية ويمكن تفسير ذلك بالتأثير المخرب للمحل العضوي نتيجة تماسه مع البروتين (Swed et al. 2004, Meng et al. 2014) ولكن في هذه الدراسة لم تتخفف الفعالية الحيوية بدرجة كبيرة هامة إحصائياً لتطغى على الزيادة الحاصلة في فعالية التمحفظ أي بقيت الفعالية الحيوية مرتفعة قليلاً ولكن بدون دلالة إحصائية (الشكل 2). كذلك الأمر بالنسبة إلى زيادة سرعة التحريك حيث نقصت الفعالية الحيوية ولكن بدون أهمية إحصائية (الشكل 2). من أجل تحضير جسيمات تتمتع بفعالية حيوية كبيرة لليورياز يجب البدء بزيادة فعالية التمحفظ ومن أجل هذا الهدف تم تحضير جسيمات دقيقة مع مراعاة العوامل التي بإمكانها زيادة فعالية التمحفظ (زيادة حجم المحل العضوي وسرعة التحريك خلال الاستحلاب الأولي ونقص حجم الطور المائي الداخلي) مع بقاء العوامل الأخرى عند المستوى 1- طالما لم يكشف لها دور هام إحصائياً في هذه الدراسة (الجدول 5).

الجدول 5: الشروط المثلى لتحضير جسيمات ذات فعالية تمحفظ عالية

كمية البلمر	حجم DCM	حجم ط.د.	مدة تحريك 1	سرعة تحريك 1	سرعة تحريك 2
0.4 g	5 ml	0.4 ml	15 sec.	22000rpm	15000rpm
مستويات التجربة					

إن تحضير جسيمات دقيقة ضمن الشروط المثلى المبينة في الجدول 5 أدت إلى فعالية التمحفظ عالية (≈82%) وإلى فعالية حيوية عالية لليورياز (≈55%) وهما أعلى قيمتين تم الحصول عليهما من بين كل التجارب المنجزة. بـدراسة خصائص الجسيمات الدقيقة المحضرة وفق هذه التحضير المثلى تبين أن هناك ثلاثة عوامل مؤثرة على فعالية التمحفظ وعلى فعالية اليورياز الحيوية وهي: حجم الطور العضوي وحجم الطور المائي الداخلي وسرعة التحريك أثناء الاستحلاب الأولي.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

في هذه الدراسة تم تحضير جسيمات دقيقة حاوية على بروتين نموذج (يورياز) باستخدام طريقة تبخر المحل عبر الاستحلاب المضاعف م/ز/م² وفق تجارب مصممة بواسطة التصميم المسحي (Screening design) وذلك من أجل تحديد العوامل المؤثرة إحصائياً.

تبين في هذه الدراسة أن زيادة حجم المحل العضوي وزيادة سرعة التحريك خلال الاستحلاب الأولي ونقصان حجم الطور المائي البروتيني تؤدي إلى زيادة فعالية التمحفظ. من جهة أخرى انخفضت فعالية اليورياز الحيوية بزيادة حجم الطور المائي الداخلي البروتيني. بأخذ كل العوامل المدروسة بعين الاعتبار، تم تحضير جسيمات دقيقة حاوية على اليورياز ضمن شروط مثلى وذلك بفعالية تمحفظ عالية (82%) وبفعالية حيوية لليورياز تصل إلى 55% وهاتان القيمتان هما الأعلى من بين كل النتائج التي تم الحصول عليها وفق تجارب التصميم العملي المسحي مما يثبت أن

الموديل الرياضي كان مناسباً للدراسة بالأخذ بعين الاعتبار قيمة معامل التحديد الكبيرة ($R^2 = 0.996$ و 0.995 من أجل فعالية التمحفظ وفعالية اليورياز الحيوية على الترتيب).

المراجع

1. Alhakim H.K., Al-Shams J.K., Abdul Kadhem M. Immobilization of urease enzyme on ion-exchange resin. *J Babylon univ/Pure and applied sciences*, 2012; 20(4), 1231-1235.
2. Al haushey, L.; Bolzinger, M.A.; Bordes, C.; Gauvrit, J.Y.; Briancon, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *Int J Pharm.* 2007; 344: 16-25.
3. Al haushey, L., Madani F. A study of factors influencing the release of caffeine from new pharmaceutical dosage forms (microparticles). *Tishreen University Journal For Research And Scientific Studies- Health Sciences Series*, 2012; 34 (3):137-148.
4. Alonso M.J., R.K. Gupta, C. Min, G.R. Siber, and R. Langer. Biodegradable microspheres as controlled release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, 1994; 12(4):299–306.
5. Andre Abrant A., Taverdet J-L, Jay J. microencapsulation par evaporation de solvent. *Eur. Pol. J.*, 2001; 37: 955-963.
6. Bhalloud Y. Shah D. influence of addititfs on fabrication and release from protein loaded PLGA microparticles. *J, Chem. Pharm. Res.* 2012;4(3): 1708-1715.
7. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59: 375-88.
8. Castellanos I.J., Cruz G., Crespo R., Griebenow K., Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of gamma-chymotrypsin and their prevention, *J. Control. Release.* 2002; 81 (3): 307–319.
9. Chang A. and R.K. Gupta. Stabilization of tetanus toxoid in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J. Pharm. Sci.*, 1996; 85:129–132.
10. Determan Amy S., Trewyn Brian G., Lin Victor S.-Y. et al. Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres. *J. Control. Rel.*, 2004; 100: 97–109.
11. Diwan M and Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release* 2001; 73: 233-44.
12. Dzul-Cervantes M., Herrera-Franco P. J., Tábi T., et Valadez-Gonzalezl A. Using Factorial Design Methodology to Assess PLA-g-Ma and Henequen Microfibrillated Cellulose Content on the Mechanical Properties of Poly(lactic acid) Composites. *International Journal of Polymer Science.* 2017: 1-14
13. Emami J., Hamishehkar H., Najafabadi AR., et al. A novel approach to prepare insulin-loaded poly(lacti-co-glycolic acid_ microcapsules and the protein stability study. *J Pharm* 2009; 98: 1712-31.
14. Goupy J. La méthode des plans d'expériences. Optimization du choix des essais et de l'interprétation des résultats. 2nd ed. Paris: Dunot, 1988:303p.
15. Goupy J. Introduction aux plans d'expériences. 2nd ed. Paris: Dunot, 2001:293p.
16. Goupy J. Pratiquer les plans d'expériences. 2nd ed. Paris: Dunot, 2005:552p.
17. Han K., Lee K.D., Gao Z.S., Park J.S. Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *J Control Release* 2001; 75: 259-269.
18. Jiang W.S. and P. Steven. Stabilization of a model formalinized protein antigen encapsulated in poly(lactideco-glycolide)-based microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 2001; 90(10):1558–1569.

19. Kyekyoon K. K. and Pack D. W. Microspheres for drug delivery BioMEMS and Biomedical nanotechnology. Volume 1: Biological and Biomedical Nanotechnology, 2006.
20. Meng F.T., G.H. Ma, Y.D. Liu, W. Qiu, Z.G. Su. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004; 33: 177–183.
21. Meng F.T., G.H. Ma, W. Qiu, Z.G. Su. W /O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. J Controlled Release, 2003; 91:407–416.
22. Montalvo-Ortiz B.L., Sosa B, Griebenow K. Improved enzyme activity and stability in polymer microspheres by encapsulation of protein nanospheres. AAPS PharmSciTech., 2012; 13(2): 632-636.
23. Narayana K., Subrahmanyam V.M., Venkata Rao J. A faractional factorial design to study the effect of process variables on the preparation of hyaluronidase loaded PLGA nanoparticles. Enzyme Research, 2014, 1-10.
24. Perez C. and K. Griebenow. Effect of salts on lysozyme stability at the water-oil interface and upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. Biotechnol. Bioeng., 2003; 82(7):825–832.
25. Prusty A. , Mishra A. K. , Bijon K. G. The Plackett-Burman model-An Improved Alternative to Identify the Significant Factors Implied in the Preparation of Tramadol Hydrochloride Microsphere. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2016; 50: 295-300.
26. Puel, F.; Briançon, S. Fessi, H. Industrial Technologies and Scale-Up. In: Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, 2nd ed., Taylor and Francis, New York-London, 2006, 149.
27. Srinivasan C., Katare Y.K., Muthukumaran T., Panda A.K. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles, J. Microencapsul. 2005; 22 (2): 127–138.
28. Stureson C., J. Carlfors. Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity. Journal of controlled release, 2000; 67: 171-178.
29. Swed A., Cordonnier T., Fleury F., Boury F. Protein encapsulation into PLGA nanoparticles by separation method using non toxic solvents. J. Nanomedicine and Nanotechnology, 2014; 5(6): 1-8.
30. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, et al. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. Adv Drug Delivery Rev 2005; 57: 357-76.
31. van de Weert M, Hennink WE, and Jiskoot W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. Pharm Res 2000; 17: 1159-67.
32. Wang L , Liu Y, Weifeng Zhang W, et al. Microspheres and Microcapsules for Protein Delivery: Strategies of Drug Activity Retention. Current Pharmaceutical Design, 2013; 19: 6340-6352.
33. Yang Y.Y., Chung T,S., Bai X.L., Chan W.K. effect of preparation condition on morphology and release profile of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. Chem. Eng. Sci. 2000; 55: 2223-2236.
34. Yang Y.Y., Chung T,S., Ng N.P. Morphology ,drug distribution and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials, 2001; 22: 231-241.