فرمولاسيون ژل موضعي متوتركسات و بررسي جذب پوستي آن بصورت in vitro

يوسف جوادزاده[۱و۲ *]، محمد رضا سياهي[۱]، زهره رجبي، ايمن كيوان، اميد اثنا عشري[۳] و رضوان صفدري[۲]

[۱]دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز،[۲]مركز تحقيقات دارويي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، [۳] گروه راديوتراپي دانشگاه علوم پزشكي اصفهان

تاريخ دريافت: ۸۶/۵/۸ ، تاريخ پذيرش: ۸۶/۱۰/۱۲

Formulation of methotrexate topical formulation (gel) and evaluation of its in vitro transdermal absorption

Javadzadeh Y.[1,2*], Siahi M. R.,[1], Rajabi Z., Keivan I., Asnaashari O.[3], Safdari R.[2]

[1]School of Pharmacy, Tabriz University of Medical sciences; [2]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical sciences, Radiotherapy department, Isfahan Univrsity of Medical Sciences

Received: 2007/7/30 , Accepted: 2008/1/2

Objectives: Psoriasis is a chronic, recurrent disease that affects between 1% and 6% of the population. Methotrexate (MTX) is an effective systemic chemotherapeutic agent for the treatment of psoriasis and possibly cutaneous lymphoma (CTCL).However the risk of hepatic fibrosis and other systemic toxicity, such as bone marrow suppression, has precluded its use in all but the most severe cases of these diseases. In considering the potential severe toxicity associated with systemic administration of MTX, a topical formulation might be of greater utility for the treatment of psoriasis and other hyperproliferative skin disorders. One of the presumed reasons for the lack of clinical activity of topical methotrexate in psoriasis is insufficient percutaneous penetration necessary to inhibit epidermal DNA synthesis. The present study was undertaken to prepare a formulation to optimize penetration of MTX in vitro. **Methods:** For this mean, several gel formulations were prepared and investigated in the case of stability and physical characteristics. Among them three formulations were selected for percutaneous absorption studies using rat skin and standard Franz diffusion cells. Assay of drug was done using HPLC method. For enhancing percutaneous absorption, three penetration enhancers were added to the bases formulation with different concentrations. Among the evaluated formulations, the best one from view point of having better penetration profile was selected and the effect of various enhancers on penetration profile investigated. For this mean three surfactants (anionic, cationic and nonionic) were incorporated into formulations with different concentrations. Finally salicylic acid as a keratolytic material was added for more enhancement effect. **Results:** The results showed that SLS (sodium louryl sulphate) and alkyl benzyl dimethyl chloride had not any significant enhancement property on penetration of MTX.Lower ability of these surfactants on drug penetration through the skin probably aroused from drug enhancer complexation and formation of micells with low penetration ability containing the drug molecules. Transcutol P was able to enhance transdermal absorption of MTX and the higher enhancement ratio was obtained with 2% (w/w) concentration of transcutol P. Adding of salicylic acid increased this ratio. Better penetration profile was shown with increasing of salicylic acid concentration. **Conclusion**: prepared formulation containing transcutol p 2% (w/w) and salicylic acid 6% (w/w) had higher enhancement property and could be used clinically for local treatment of psoriasis.

Key words: *Methotrexate, Percutaneous absorption, Psoriasis, Enhancer, Formualtion.*

زمينه و هدف: پسوريازيس يك بيماري مزمن و عود شونده اي مي باشد كه در ۱ تا ۶ درصد جمعيت اتفاق مي افتد. متوتركسات (MTX) يك داروي شيمي درماني سيستميك موثر براي درمان پسوريازيس و احتمالاً جهت درمان لنفوماي جلدي مي باشد. به دليل خطر ايجاد فيبروزيس كبدي و ديگر سميتهاي سيستميك مانند سركوب مغز استخوان، به طور كلي از استفاده آن ممانعت به عمل آورده شده ولي در موارد شديد اين بيماري ها مورد استـــفاده قرار مي گيرد. با توجه به سميت شديد ايجاد شده در تجويز سيستميك متوتركسات، فرمولاسيون موضعي آن ممكن است كاربرد بيشتري براي درمان پسوريازيس و ديگر بيماريهاي پوستي كه در اثر ازدياد تكثير سلولي ايجاد مي شوند، داشته باشد. يكي از دلايل احتمالي براي فقدان فعاليت باليني متوتركسات موضعي در پسوريازيس نفوذ ناكافي پوستي اين دارو براي مهار سنتز اپيدرمال DNA مي باشد. **روش ها:** در مطالعه حاضر اقدام به تهيه فرمولاسيون مناسب براي بهينه ساختن نفوذ MTX به صورت in vitro شده است. براي اين منظور چندين فرمولاسيون ژل تهيه گرديد و خصوصيات فيزيكي و پايداري آن ها بررسي شد. از ميان آنها سه فرمولاسيون انتخاب شده و مطالعات جذب پوستي با استفاده از پوست رت و سل هاي استاندارد فرانز انجام گرديد. براي تعيين مقدار دارو استفاده از متد HPLC تعيين شد. از بين سه فرمولاسيون، تركيب برتر انتخاب شده و تاثير افزاينده هاي جذب روي آن بررسي شد. به منظور افزايش جذب پوستي از درصدهاي مختلف افزاينده هاي جذب شامل آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد، SLS، ترانسكيوتول P و اسيد ساليسيليك به عنوان ماده كراتوليتيك استفاده شده است. **يافته ها:** نتايج نشان داد كه سورفكتانتهاي آنيوني و كاتيوني اثر مفيدي در افزايش جذب نداشتند. ترانسكيوتول P با غلظت ۲ درصد بهترين جذب پوستي را دارا بود. افزودن اسيد ساليسيليك به فرمولاسيون باعث افزايش بيشتر جذب دارو گرديد. استفاده از غلظت ۶ درصد اسيد ساليسيليك بيشترين ميزان نفوذ دارو را ايجاد نمود. در نهايت غلظت ۶ درصد اسيد ساليسيليك به همراه غلظت ۲ درصد ترانسكيوتول P به عنوان فرمولاسيون برتر و نهايي انتخاب شد. **نتيجه گيري:** فرمولاسيون تهيه شده حاوي ترانسكيوتول ۲% (w/w) و اسيد ساليسيليك ۶%(w/w) داراي خاصيت افزايش دهنده جذبي بالاتري بوده و مي تواند بصورت باليني براي درمان موضعي پسوريازيس بكار گرفته شود.

واژه هاي كليدي: *متوتركسات، جذب پوستي، پسوريازيس، افزايش دهنده جذب ، فرمولاسيون.*

*نويسنده مسئول: دكتر يوسف جوادزاده، استاديار دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۶۰۶ نمابر: ۰۴۱۱-۳۳۴۴۷۹۸

**Corresponding Author: Dr Yousef Javadzadeh, Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411-3392606; Fax:0411- 3344798; E-mail: javadzadehy@yahoo.com*

۱- مقدمه

پسوریازیس یکي از بیماریهاي پوستي شایعي است که در ۱ تا ۳ درصد جمعیت اتفاق مي افتد. اگرچه این بیماري تهدید کننده حیات نیست ولي مي تواند باعث مرگ و میر معني دار، محرومیت هاي اجتماعي، هزیـــنه هاي اقتصادي و شکستهایي در زندگي بیماران گردد. براي سالهاي زیادي باور بر این بود که مکانیسم بیماري در پسوریازیس هیپر پرولیفراسیون اپیـــــدرم مي باشد و بیماري بصورت پلاکهاي ضخیم و کلفت خود را نشان مي دهد. تحقیقات نشان داده که بیماران داراي پسوریازیس داراي چرخه سلولي کوتاه شده هستند. بطور نرمال کراتینوسیت ها نیازمند ۲۸ تا ٤٤ روز براي مهاجرت از سلولهاي پایه اپیدرم به طبقه شاخي پوست هستند. لیکن در بیماران پسوریازیسي این مهاجرت تنها ٤ روز طول مي کشد. پاسخ عالي بیماراني که با متوترکسات درمان شده اند (دارویي که میتوز سلولي را مهار مي کند) این فرضیه را تایید مي کند. لیکن از آنجائیکه لنفوسیت ها در اپیدرم افراد دچار پسوریازیس یافت شده و نیز بیماري مي تواند بوسیله داروهاي ساپرس کننده ایمني درمان شود پسوریازیس ممکن است یك بیماري ایمنولوژیك بوده که بطور ثانویه منجر به هیپرپرولیفراسیون اپیدرمي مي شود (۱). متوترکسات یك مهار کننده دي هیدروفولات ردوکتاز بوده که با سنتز DNA بوسیله جلوگیري از تشکیل تتراهیدروفولات تداخل مي کند. متوترکسات براي سالیان درازي در درمان بدخیمي ها استفاده شده اما این دارو در دزهاي پایین تر براي درمان پسوریازیس هم مورد استفاده قرار گرفته است. پنداشته میشود که عملکرد آن سرکوب کردن سیستم ایمني بوده و مطالعات نشان داده که این دارو سایر آنزیم ها را زیر مهار کرده باعث مي شود که آدنوزین (یك توکسین T-cell) تجمع یابد. متوترکسات براي درمان پسوریازیس شدید تنها در تعداد کمي از بیماران استفاده مي شود. این دارو در تك دز در هر هفته به میزان ۲۰-۵/ ۱۲ میلي گرم و براي از بین بردن بیماري (در عرض ۸ هفته) و نیز بعنوان دز نگهدارنده استفاده مي شود. ایـــن دارو مي تواند باعث فیبروز و سیروز کبدي و سرکوب مغز استخوان گردد (٤-۲). متاسفانه خطر فیبروزیس و سیروز کبدي، استفاده از این دارو را براي اکثریت وسیعي از بیماران داراي پسوریازیس محدود کرده است. یك روش براي جلوگیري از سمیت سیستمیك براي بافتهاي نرمال مصرف موضعي متوترکسات مي باشد. شواهد اساسي وجود دارد مبني بر اینکه فعالیت فارماکولوژیك متوترکسات در پسوریازیس از طریق مهار موضعي سنتز DNA بوده که منجر به توقف میتوز در پوست هیپرپلاستیك دچار پسوریازیس مي شود. متوترکسات زمانیکه هم بطور سیستمیك یا موضعي بصورت تزریق داخل جـــــلدي مصرف مي شود بطور انتخابي سنتز مجدد DNA را مهار کرده و میتوز را متوقف مي کند و بطور کشنده اي به سلولها در اپیدرم دچار پسوریازیس آسیب مي رساند. این به این معني است که اثرات بیولوژیك و بیوشیمیایي تولید شده بوسیله مصرف سیستمیك متوترکسات همچنین مي تواند بوسیله دوزهاي موضعي دارو نیز تولید گردد. شواهدي وجود ندارد مبني بر این که متابولیتهاي دارو مسئول اثرات فارماکولوژیك دارو در پسوریازیس بوده یا اینکه متوترکسات بوسیله عملکرد در یك فاصله مکاني به پوست در پـــــسوریازیس اثر مي کند. براي غلبه بر این مشکل سمیت سیستمیك، برخي محققان متوترکسات موضعي را براي پسوریازیس وولگاریس بکار گرفته اند و تعداد کمي از این مطالعات نتایج مناسبي گرفته اند (٦). علاوه بر آن سایر اثرات مضـر مي تواند متعاقب مصرف طولاني دارو ایجاد گردد. متوترکسات موضعي اجازه استفاده این دارو سیتوتوکسیك نسبتا قوي با حداقل خطر سمیت سیستمیك را داده و همچنین از تخریب ناشي از عبور اول کبدي یا متابولیسم در لوله گوارشي یا کبد جلوگیري میکند. علیرغم موثر بودن مصرف سیستمیك دارو در درمان پسوریازیس, نتایج بالیني با درمان موضعي نا امید کننده است (۷). مطالعات قبلي نشان داده اند که متوترکسات، یك داروي محلول در آب, به آساني در لایه شاخي نفوذ نمي یابد. فقدان تاثیر بالیني متوترکسات موضعي در درمان پسوریازیس ممکن است به فاکتور هاي سهیم در رساندن دارو به بافت هدف در غلظتهاي کافي و براي زمان کافي براي دستیابي به پـاسخ هاي بالیني مربوط باشد. در تلاش براي حل این موضوع, حاملهاي مختلفي براي افزایش نفوذ پوستي متوترکسات بکار گرفتـــه شده اند. نشان داده شده است که حاملهاي حاوي دسیل متیل سولفوکسید (C10MSO) نفوذ پوستي متوتـرکسات را افزایـــش مي دهند. لیکن آزمایشات محدود بالیني متوترکسات در دسیل متیل سولفوکسید موفقیت آمیز نبوده اند (۸). یکي از دلایل متصور براي فقدان فعالیت بالیني متوترکسات موضعي در پسوریازیس نفوذ پوستي ناکافي مورد نیاز

براي مهار سنتز DNA اپيدرمـــــال مي باشد (۹). مطالعات قبلي نشان داده اند كه MTX به آساني از لايه شاخي عبور نمي كند. براي حل اين مشكـــل جذب افزاهاي مختلفي شامل دسيل متيل سولفوكساييد، پروپيلن گليكول و ايزوپروپيل الكل يا حاملهايي نظير لوروكاپرام، كرمهاي محو شونده و ژل هيدروكسي اتيل سلولز سعي در افزايش جذب پوستي متوتركسات با درجات موفقيت متغير داشته اند. تنها يك گزارش نتايج اميد بخشي را در ۵۰ تا از ٦۰ بيمار داراي پسوريازيس كه دوبار در روز ژل هيدروفيليك بمدت ٤ هفته مصرف مي كردند نشان داده است. از تكنيك ايونتوفرزيس نيز به اين منظور استفاده شده است (۷). بنابراين با در نظر گرفتن سميت شديد مرتبط با مصرف سيستميك متوتركسات، فرمولاسيونهاي موضعي ممكن است كاربرد بزرگي در درمان پـــــسوريازيس و ساير ناراحتي هاي هيپر پروليفراتيو پوستي مانند بدخيمي ها داشته باشد. مثالهايي از بيماريهايي كه ممكن است هدف فرمولاسيون موضعي باشد شامل كارسينوماي سلولهاي بازال، برخي تومورهاي متاستاز داده به پوست، كراتوزيس مرتبط با اشعه UV و زگيل ها و پسوريازيس مي باشند. مطالعه اخير نشان داده كه فرمولاسيون موضعي متوتركسات بـــــا آزون (يك افزايش دهنده جذب پوستي) اثرات مفيدي در درمان پسوريازيس داشته است (۱۰ و ۱۱)، ليكن تلاشهاي كمي براي حداكثر كردن برداشت پوستي دارو در توسعه فرمولاسيونهاي موضعي صورت گرفته است (۱۲). تهيه فرمولاسيون ساده از متوتركسات تاثيري در درمان موضعي پسوريازيس نداشته است كه اين امر بدليل عدم نفوذ دارو از طبقه شاخي پوست بوده است (۱۳). با توجه به اينكه مطالعات بسيار كمي در مورد فرمولاسيون موضعي متوتركسات جهت درمان پسوريازيس شده و در مطالعات اندك انجام شده هم نتيجه مطلوبي از فرمولاسيون تهيه شده بدست نيامده است و در معدود مطالعاتي كه تاثيرات بالييني از فرمولاسيون موضعي مشاهده شده است فرمولاسيون بصورت پتنت بوده و اشاره اي به تركيب و اجزا نشده است و اكثرا از ماده Azon بعنوان جذب افزا استفاده شده كه ماده اي بسيار گران قيمت بوده و به آساني قابل دسترسي نمي باشد كه اين امر استفاده وسيع آن را در بيماران دچار مشكل خواهد نمود. لذا در اين مطالعه سعي خواهد شد تا فرمولاسيون جديدي از دارو با موادي كه قابل دسترسي و ارزان مي باشد تهيه كرده و بعد از ارزيابي پايداري فرآورده، ميزان جذب پوستي دارو بـصورت in vitro و با استفاده از پوست rat اندازه گيري شود. براي افزايش جذب پوستي دارو كه لازمه ايجاد اثر بالييني است سعي مي شود از انواع جذب افزاها و در غلظت هاي مختلف و نيز حامل هايي كه مي تواند در فرمولاسيون موضعي استفاده شده و نقش جذب افزاي دارند استفاده شود. مطالعات قبلي در مورد افزايش جذب پوستي داروي فيناستريد جهت درمان موضعي آلوپسي موفقيت آميز بوده (١٤) و انتـــظار مي رود كه مطالعه حاضر نيز بتواند جذب پوستي دارو را افزايش داده و اثرات بالييني از فرآورده موضعي قابل دستيابي باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱:مواد به كار رفته

- پودر متوتركسات (Fermian – Finland)
- ۱ و ۲ پروپان دي ال، ۲- پروپانول، تري اتانول آمين، متانول، سديم لوريل سولفات، آلكيل بنزيل دي متيل آمونيوم كلريد، اسيد لاكتيـــــــك، اسيد سيتريك، پتاسيم دي هيدروژن فســـــفات، سديم منو هيدروژن فسفات ، استونيتريل گريـــــد HPLC، كلروفرم (Merck – Germany)
- كارباپول ۹۳۴ ساخت (B- F Goodrich آمريكا)
- ترانسكيوتول P (Transcutol – Gattefosse – France)
- ستيل پيريدينيوم كلرايد (Sigma – USA)
- ويال ۱۰۰۰mg متوتـــركســـــــات، بدون نگهدارنده (EBEWE , pharma Ges. M.b. H Austria)
- گريز سيليكون (GREASIL 4000 limited – Eu, England)
- پودر ساليسيليك اسيد (Merck – Germany)

۲-۲: دستگاهها وابزار مورد استفاده

- دستگاه HPLC با دتكتور UV (VP – Shimadzu , Japan)
- ترازوي ديجيتالي يک كفه اي، (Germany) Sarrtorius BL – 310
- دستـگـاه بـــــه هـــــــــم زن الكتريكي شش خانـه اي (Janke & Kunkel IKA . Werk , Germany)
- دستـگاه اندازه گيري جذب پوستـي، مجـــــهز به ۶ سل شيـــشه اي فرانز و بـــــهم زن مغناطيـــسي (Erweka HDTC , VARIOMAG®, Germany)
- دستگاه اولتراسوند (Ultrasonic 35, LTARRE, Italy)

- بهم زن مغناطيسي (Velp , Italy)
- مو تراش برقي (Moser , Germany)

لوازم جراحي جهت جدا كردن پوست حيوان شامل تيغ ، قيچي و ...

۳-۲: روش كار

۳-۲-۱: رسم منحني كاليبراسيون متوتركسات

۶ غلظت ۱۰۰ ، ۷۵ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۱۲/۵ ، ۶/۷۵ ميكروگرم بر ميلي ليتر متوتركسات در فاز متحرک مورد استفاده در HPLC تهيه شد و پس از تزريق به دستگاه HPLC در طول موج ۳۰۲ نانومتر خوانده شد و منحني كاليبراسيون مربوطه رسم گرديد.

۳-۲-۲: تهيه ژل پايه فاقد دارو

در اين مرحله با استفاده از كارباپول ۹۴۰ به عنوان عامل ژلي كننده، ايزوپروپيل الكل و پروپيلن گليكول به عنوان كمک حلال با نسبت هاي متفاوت، در ۲۰ تركيب طراحي گرديد. براي تهيه ژل ابتدا كارباپول به ميزان نيم درصد وزني/حجمي در مقدار آب مورد نياز فرمولاسيون به مدت ۲۴ ساعت و در دماي يخچال هيدراته شد. سپس اين مخلوط به مدت ۵ دقيقه به وسيله همزن با دور ۲۷۰ به هم زده شده تا پراكندگي كاملا يكنواختي ايجاد گردد. سپس مقدارهاي مورد نظر از كمک حلال هاي مورد استفاده قطره قطره به مخلوط آب و كارباپول اضافه شد تا كاملا با هم مخلوط شوند. براي خنثي كردن مخلوط و ايجاد ژل نهايي از تري اتانولامين استفاده شد كه قطره قطره به مخلوط يكنواخت در حال به هم خوردن اضافه شد تا اين كه ژلي يكنواخت و شفاف ايجاد گردد.

۳-۲-۴:تست پايداري فيزيكي

براي بررسي پايداري فيزيكي ژل هاي تهيه شده، هر يک از ژل هاي تهيه شده به مدت ۲ هفته و به صورت چرخشي به مدت ۴۸ ساعت در دو دماي ۴ و ۴۰ درجه سانتي گراد (دماي يخچال و دماي آون) نگهداري شدند. در انتها ژل ها از لحاظ ظاهري (شفافيت، دو فازه شدن و ويسكوزيته و ...) و نيز مقدار pH مورد بررسي قرار گرفتند.

۳-۲-۵: تهيه ژل حاوي دارو و انتخاب فرمولاسيون نهايي

براي تهيه ژلهاي حاوي دارو از ويال متوتركسات (1000 mg/10ml) استفاده گرديد. بدين صورت كه از مقدار آبي كه به هر سيستم در ابتداي كار اضافه شد ۱۰ ml كسر گرديد و ديگر اجزاء با همان نسبت اضافه شدند و در انتهاي كار ۱۰ ml از ويال متوتروكسات به فرمولاسيون اضافه مي شد. به دليل حالت قليايي ويال متوتركسات، تري‌اتانول آمين نيز از فرمولاسيون حذف گرديد.

با توجه به نتايج بدست آمده و انتخاب فرمولاسيون برتر (جدول شماره ۱)، در اين مرحله غلظت هاي اوليه در انواع سورفكتانتهاي آنيوني، كاتيوني، و غير يوني به منظور بررسي افزايش جذب متوتركسات افزوده شد و هم چنين غلظتهاي مختلف از انواع سورفكتانت ها به عنوان افزايش دهنده جذب انتخاب و اسيد سالیسیلیک به عنوان ماده كراتوليتيک بر فرمولاسيون برتر افزوده شده و جذب مورد بررسي قرار گرفت. مواد كراتوليتيک به عنوان يكي از درمان هاي موضعي پسوريازيس مطرح بوده و از طرفي خاصيت افزايش دهنده جذب دارند.

۳-۲-۶: سورفكتانت غير يوني

از ترانسكيوتول P به عنوان سورفكتانت غير يوني استفاده شد. مقدار مشخصي از ترانسكيوتول P به منظور تهيه فرمولاسيونهاي ۰/۵ % ، ۱ % و ۲ % تعيين گرديد.

۳-۲-۷: سورفكتانت آنيوني

سديم لوريل سولفات (SLS) به عنوان سورفكتانت آنيوني انتخاب شد. مقدار معيني از پودر SLS همراه با ۰/۲۵ گرم كربومر در حجم مشخص آب خيسانده شد. سپس در زير به هم زن الكتريكي ساير اجزا فرمولاسيون، ايزوپروپيل الكل، پروپيلن گليكول و ويال متوتركسات افزوده شد و ژل با قوام مناسب تهيه گرديد. با اين روش غلظت هاي ۱ % و ۰/۵ % فرمولاسيون SLS را تهيه شد و به علت رسوب كربومر هنگام افزدون قطره قطره ويال متوتركسات فرمولاسيون ۲% از SLS حذف گرديد.

۳-۲-۸: سورفكتانت كاتيوني

به عنوان سورفكتانت كاتيوني از آلكيل بنزيل دي متيل آمونيوم كلريد استفاده گرديد. در مرحله آخر تهيه ژل، اين ماده بعد از افزدون ويال متوتركسات، آرام آرام اضافه كرده، با استفاده از هم زن مغناطيسي همراه با مگنت، و در حرارت مناسب به مدت ۱۵ دقيقه به هم زده شد و ژل شفافي حاصل شد. البته بعد از يک ساعت ژل رسوب داد به همين دليل فقط غلظت ۰/۵ % از اين سورفكتانت تهيه گرديد غلظت هاي ۱ و ۲ % تهيه نگرديد.

۲-۲-۹: افزودن كراتوليتيک

به عنوان مواد كراتوليتيک از اسيد سالیسیلیک (به صورت پودر) و اسيد لاكتيک (مايع) استفاده شد. به روش هاي مختلفي كه در مورد سورفكتانت ها نيز ذكر شد، اسيد لاكتيک به فرمولاسيون افزوده گرديد كه در همه موارد رسوباتي ظاهر شد و تهيه ژل ايده آل حاوي اين كراتوليتيک انجام نگرديد. در استفاده از اسيد سالیسیلیک نيز تنها با روش حل كردن پودر اسيد سالیسیلیک در پروپيلن گليكول و در حرارت همراه با به هم زن مغناطيسي (مگنت) و سپس افزودن آن به فرمولاسيون قبل از اضافه كردن ويال متوتركسات رسوبي ديده نشد و در آخر نيز به منظور تهيه فرمولاسيون حاوي ترانسكيوتول ۲ %، مقدار معيني از اين سورفكتانت به فرمولاسيون اضافه شد و ژل شفاف و با قوام مناسبي به دست آمد. كه با استفاده از روش مذكور، فرمولاسيون با غلظت هاي ۲ % ، ۶ % از اسيد سالیسیلیک وبه همراه ۲ % ترانسكيوتول تهيه شد. در تهيه فرمولاسيون هاي حاوي غلظت ۱۰ % و ۸ % اسيد سالیسیلیک به دليل پيدايش رسوبات در حين افزودن ويال متوتركسات، اين فرمولاسيون ها حذف شدند.

۲-۲-۱۰: تهيه پوست

مطالعه با استفاده از پوست كامل (Full Thickness) انجام گرفت. پوست مورد نظر از ناحيه شكمـــــي رت هاي آزمايشگاهي نر جوان با وزن متـــــوسط ۱۸۰ – ۱۴۰ گرم جدا گرديد. ابتدا حيوان با قرار گرفتن در يک محفظه سربسته حاوي كلروفرم كشته شده و بعد از ثابت كردن حيوان روي صفحات يونوليت، موهاي حيوان توسط مو تراش برقي (Moser) كاملا كوتاه شده و سپس پوست ناحيه شكمي آن توسط تيغ جراحي جدا گرديد. در هنگام جداسازي پوست، چربي هاي زير پوست حيوان به دقت توسط پنس جراحي جدا گرديد. پوست هاي جدا شده سپس به مدت ۲۴ – ۱۲ ساعت در دماي يخچال از سمت درم و اپيدرم در تماس با نرمال سالين قرار داده شدند تا علاوه بر هيدراته شدن، آنزيمها و مواد اضافي نشست كرده از پوست در حين جدا سازي كاملا شسته شده از پوست جدا شوند. اين عمل از طريق نصب كردن پوست روي سل ديفوزيون و پر كردن قسمت پاييني سل (فاز گيرنده) و روي پوست (فاز دهنده) از نرمال سالين انجام گرفت. پس از اين مدت، نرمال سالين تخليه شده و قسمت پايين سل از بافر پر شده و بقيه مراحل انجام گرفت.

۲-۲-۱۱: مطالعه جذب پوستي

بـــراي مطالعه جذب پـــوستي سيـستمي شامـل سلهاي ديفوزيون استاندارد از نوع فرانـــــز (Diffusion Cells Franz) با حجم Cm^3 ۵۲/۸۳ استفاده گرديد. براي يكسان سازي غلظت دارو در تمام نقاط فاز گيرنده، از مگنت هايي با پوشش تـــفلوني كاملا بي اثر استفاده گرديد كه با سرعت rpm ۷۰۰ در تمام مدت آزمايش مايع داخل سل ها را به هم مي زد. در فاز گيرنده ml ۵۲/۸۳ از محلول بافر فسفات (۷/۴ = pH) قرار داده و در فاز دهنده مقدار g ۱/۴ از ژل روي پوست قرار داده شد. نمونه هاي مورد نظر به حجم ۱ ميلي ليتر در زمـــان هاي تعيين شده (۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۶۰ دقيقه) از فاز گيرنده گرفته شده و بلافاصله با همين حجم از بافر فسفات تازه جايگزين گرديد. براي جلوگيري از ايجاد حباب در سطح زيرين پوست (فاز گيرنده) محلول بافر استفاده شده در فاز گيرنده قبل از انتقال به سل ها توسط دستگاه اولتراسوند گاززدايي گرديد.

۲-۲-۱۲: روش تعيين مقدار متوتركسات

تعيين مقدار متوتركسات در نمونه هاي گرفته شده از فاز گيرنده توسط HPLC انجام گرفت كه مشخصات سيستم به كار برده شده به صورت زير مي باشد:

HPLC : از نوع Shimadzu VP مجهز به دتكتور ماوراء بنفش با طول موج متغير و دو پمپ ايجاد فشار.

ستون: از نوع Shimadzu C_{18} VP – ODS به طول mm ۱۵۰ * ۴/۶ و اندازه ذرات μm ۴ ميكرومتر.

فاز متحرک: بافر فسفات (۳۷۰ ميلي متر از اسيد سيتريک ۰/۱ مولار را روي ۶۳۰ ميلي ليتر هيدروژن سديم فسفات دي بازيک ريخته و pH بافر به ۶/۰۳ رسانده شد) و استونيتريل به نسبت ۱۰ به ۹۰ حجمي - حجمي به كار برده شد.

سرعت جريان فاز متحرک : ۱/۲ ميلي ليتر در دقيقه

طول موج دتكتور : ۳۰۲ نانومتر .

براي محاسبه مقدار داروي آزاد شده به ازاي زمان، از منحني استاندارد استفاده شد و با توجه به رقيق شدن فاز گيرنده، پس از هر بار نمونه برداري غلظت واقعي نمونه ها با استفاده از معادله زير تعيين گرديد:

$$C_{tn} = C_{on} + \frac{v}{V}\sum_{n=1}^{n=1} C_{on}$$

V : حجم كل فاز گيرنده

C_{tn} : غلظت واقعي نمونه در زمان t

C_{on} : غلظت محاسبه شده با استفاده از منحني كاليبراسيون

V = حجم نمونه برداشتي

محاسبات:

قانون دوم فيک براي انتشار مقدار كل داروي وارد شده به فاز گيرنده (Q_t) در حالت تعادل به صورت زير بيان مي شود (معادله ۱):

$$\frac{Q_2}{A} = KLC_0\left[\frac{D_t}{L^2} - (\frac{1}{6})\right] \qquad (۱)$$

كه در آن A سطح كل انتشار، C_0 غلظت داروي باقي مانده در پايه ، D ضريب انتشار (diffusion coefficient)، L ضخامت غشاء و K ضريب توزيع چربي – آب (partition coefficient) غشاء و حامل مي باشد.

فلاكس (J) ميزان داروي عبور كرده از واحد سطح غشاء در واحد زمان بوده و از شيب قسمت خطي (حالت تعادل) نمودار مقدار داروي نفوذ كرده در واحد سطح در برابر زمان بـه دست مي آيد. نقطه تقاطع امتداد قسمت خطي منحني با محور طول ها اصطلاحا زمان تاخير (Lag time) ناميده مي شود كه نشان دهنده مدت زمان لازم براي اشباع پوست از دارو و رسيدن به حالت تعادل مي باشد. بر اساس(معادله ۱) فلاكس به صورت زير بيان مي شود (معادله ۲)

$$J = \frac{C_0KD}{L} = C_0Kp \qquad (۲)$$

كه در آن، Kp ضريب نفوذ پذيري پوست مي باشد. مقادير C_0 از تعيين مقدار نمونه هاي برداشتي از فاز دهنده سلول هاي ديفوزيون به دست مي آيد. براي مقايسه ميزان داروي عبور كرده از پوست در اثر غلظتهاي مختلف سورفكتانت از ضريبي به نام ضريب افزايش جذب پوستي (Enhancement Ratioes, ERs) استفاده مي شود كه طبق رابطه زير محاسبه مي شود:

ERs = (Kp with surfactant) / (Kp without surfactant)

۳- نتايج، بحث و بررسي

همانطور كه در قسمت روش كار ذكر شد از بين ۲۰ فرمولاسيون طراحي شده با بررسي خصوصيات ظاهري، شفافيت و قوام در بين ژل‌هاي حاصله، نهايتاً ۹ فرمولاسيون كه در جدول شماره ۲ آورده شده‌اند تشكيل ژل با خصوصيات مناسب دادند و انتخاب شدند. فرمولاسيون‌هاي تهيه شده همگي از نظر خصوصيات ظاهري بسيار مطلوب بودند و از نظر پايداري فيزيكي نيز مورد بررسي قرار گرفتند. تمامي ۹ فرمولاسيون در تست پايداري، پايداري فيزيكي مناسبي را نشان دادند سپس اقدام به تهيه فرمولاسيون همراه با دارو شد. از بين ۹ فرمولاسيون تنها سه فرمولاسيون F2 و F7 و F11 ژل ايده‌آل و مناسب حاوي دارو تشكيل دادند. براي افزودن ويال متوتركسات روش‌هاي مختلفي امتحان شد و تنها با افزودن قطره قطره ويال MTX در مرحله آخر، منجر به تهيه ژل گرديد. در بقيه فرمولاسيون‌ها با افزودن ويال متوتركسات ذرات كربومر احتمالاً به علت پديده salting out از حامل جدا شده و رسوب مي‌كرد. با دقت در نسبت حامل‌هاي سه فرمولاسيون F2 و F7 و F11 مي‌توان به اين نكته پي برد كه به علت بالا بودن درصد آب در بين حامل‌هاي آنها احتمالاً از پديده salting out ذرات كربومر ممانعت به عمل آمده است.

درادامه به مطالعه جذب پوستي اقدام گرديد. نمودار شماره ۱ پروفايل جذب دارو از سه فرمولاسيون F2 و F7 و F11 را نشان مي‌دهد. غلظت دارو در اين سه فرمولاسيون يكسان است و تفاوت آنها در ۳ جزء حامل شامل پروپيلن گليكول ، ايزوپروپيل الكل وآب مي‌باشد. نتايج ذكر شده نشان مي‌دهد كه تركيب اين سه حامل با نسبت‌هاي ۳۰، ۲۰ و ۵۰ به ترتيب از پروپيلين گليكول، ايزوپروپيل الكل و آب (F11) بهترين جذب پوستي را ايجاد مي‌نمايد. با توجه به اينكه هدف مطالعه افزايش نفوذ دارو از سد پوستي بوده است لذا فرمولاسيون F11 به عنوان فرمولاسيون برتر انتخاب گرديد با دقت در تركيب حامل هاي اين فرمولاسيون مشاهده مي شود كه نسبت پروپيلن گليكول در آن نسبت به دو فرمولاسيون ديگر بالا مي‌باشد. پروپيلن گليكول و ايزوپروپيل الكل از جمله افزايش دهنده‌هاي نفوذ پوستي شايعي هستند كه مي‌توانند به عنوان حامل در تهيه فرآورده‌هاي موضعي بـــــه كار گرفته شوند.

بالا بودن نفوذپذيري دارو در فرمولاسيون F11 احتمالاً به دليل خاصيت افزايش دهندگي جذب پروپيلن گليـــــكول خواهد بود.

در ادامه تاثير چند ماده افزايش دهنده جذب از قبيل انواع سورفكتانت ها (كاتيوني، آنيوني و غيريوني) شامل SLS، ترانسكيوتول، آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد و اسيد سالسيليک با غلظت هاي مختلف بر ميزان و سرعت عبور دارو از پوست مورد مطالعه قرار گرفت. موارد ذكر شده به اين دليل انتخاب شدند كه در مقالات زيادي از آن ها به عنوان افزايش دهنده جذب

پوستي دارو استفاده شده بود (۱۸-۱۶). از اين مواد SLS، آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد و ترانسكيوتول جزء سورفكتانت ها مي باشند و اسيد ساليسيليک به عنوان ماده كراتوليتيک مورد استفاده قرار گرفته است.

به طور كلي سورفكتانت ها مي توانند به طرق مختلفي عمل كنند: اولا، سورفكتانت ها ممكن است داخل مناطق بين سلولي لايه شاخي نفوذ كرده، سياليت را افزايش داده و نهايتا باعث انحلال و استخراج تركيبات ليپيدي شوند. ثانيا، نفوذ سورفكتانت به ماتريكس داخل سلولي و به دنبال آن واكنش و اتصال بـه فيلامنت هاي كراتين ممكن است سبب اغتشاش بين كورنئوسايت ها شود. مكانيسم احتمالي ديگر در ارتباط با مطالعات شامل مناطق پروتئيني (كورنئوسايتها) مي شود. در اين مورد اهداف افزايش دهنده جذب ها فيبريل هاي كراتيني و مولكول هاي آب تجمع يافته در آنها مي باشد. اغتشاش ايجاد شده توسط افزايش دهنده جذبها سبب آبكشي شدن بيشتر آن ناحيه مي شود. حجم بالاي افزايش در قابليت محلول سازي لايه آبكي مي تواند سبب تغييرات عمده عملكردي ضريب توزيع (PC) در اين ناحيه از پوست شود و اين مسئله سبب افزايش انتقال دارو در كورنئوسايت ها مي شود (۱۹).

طي مطالعات اخير نشان داده شده است كه تغييرات در پروفايل حرارتي مشاهده شده در نمونه حاوي سورفكتانت گنجانده شده داخل لايه شاخي منجر به كاهش نظم در چربي ها مي شود. همچنين نشان داده شده است كه افزايش دهنده جذب هاي مختلف، اثرات روان كنندگي مختلفي روي چربي هاي لايه شاخي، اپي درم، درم و چربي هاي زير جلدي دارند. پس از افزودن سورفكتانت هاي غير يوني در پوست نشان داده شده كه لايه شاخي به صورت شل، لايه لايه شده و منافذ داخل سلولي بسيار گسترده شده اند.

هم چنين در مطالعات انجام شده گزارش شده است كه سورفكتانت هاي آنيوني نظير SLS با توجه به تغييرات عمده در اجزاء پوست مي توانند روي نفوذپذيري پوست تاثير عمده اي داشته باشند (۲۱و۲۰). مخصوصا SLS قادر به ايجاد تغييراتي در ساختمان چربـــي ها مي باشد، هنگامي كه بالاتر از غلظت بحراني تشكيل ميسل استفاده مي شود (۲۲). اگر افزايش دهنده جذب، لايـــه هاي چربي را تخريب كند، ثابت نفوذ بـهبود مي يابد و باعث افزايش جريان خواهد شد. مكانيسم ديگر براي افزايش نفوذپذيري توسط SLS مي تواند واكنش هيدروفوبيک زنجيره آلكيل SLS با ساختار پوست باشد كه گروه سولفات آخر سورفكتانت باقي گذاشته مي شود كه باعث ايجاد مناطق اضافي در پوســت مي شود كه افزايش هيدراسيون در پوست را به دنبال خواهد داشت (۲۴و۲۳).

نمودار شماره ۲ ميزان جذب پوستي دارو از فرمولاسيونهاي حاوي غلظتهاي مختلف ترانسكيوتول و فرمولاسيون كنترل در زمان هاي مختلف را نـــشان مي دهد. همـــــان طور كه ملاحظه مي شود ابتدا مقداري دارو از پوست عبور كرده و وارد فاز گيرنده مي شود. سپس غلظت دارو كاهش يافته پس از مدت زماني مجددا روند افزايش خود را از سر مي گيرد. همان طور كه قبلا نيز اشاره شد اين افت غلظت در نمونه هاي حاوي افزايش دهنده جذب، بيشتر و قـــوي تر مي باشد. اين امر مي تواند ناشي از عبور دادن سريع دارو از پوست توسط افزايش دهنده در زمانهاي اوليه باشد (۲۶و۲۵). سپس داروي عبور كرده در بخش پشتي پوست حل شده و غلظت دارو كاهش مي يابد. افزايش مجدد غلظت پس از اشباع پوست از دارو اتفاق مي افتد. شرايط in vitro مي تواند كاملا متفاوت بـــــا شـرايط in vivo باشد. در شرايـــــط in vivo دارو پس از جذب مي تواند سريعا جذب ارگان هاي هدف با جريان خون سيستميک شده و اثرات درماني خود را ايجاد نمايد. در اين صورت در همان زمان هاي اوليه اثرات دارويي ايجاد شده و هدف درماني مورد نظر تامين مي گردد.

ميانگين مقدار داروي عبور كرده از پوست به ازاي واحد سطح در ۱۵ دقيقه اول براي فرمولاسيون هاي حاوي۰/۲۵، ۱ و ۲ % ترانسكيوتول و فرمولاسيون كنترل به ترتيب برابر با ۰/۳µ g/cm^2، µg/cm^2 ۰/۳۴، µg/cm^2 ۱/۸ و۰/۲۹۸ µg/cm^2 مي باشد كه تفاوت قابل ملاحظه اي در ميزان داروي عبور يافته در غلظت هاي ۰/۵ و ۱ % نسبت به فرمولاسيون پايه در اين مدت ديده نمي شود. بهترين فرمولاسيون در دقيقه پانزدهم فرمولاسيون پايه حاوي ۲ % ترانسكيوتول است كه µg/cm^2 ۱/۸ دارو آزاد مي كند كه ۶/۰۴ برابر كنتـرل مي باشد. همان طور كه در جدول شماره ۳ نيز مشاهده مي شود فلاكس ترانسكيوتول ۲ % نسبت به بقيه غلظتهاي اين افزايش دهنده جذب بيـــــشتر بوده و ER (Enhancement ratio) بالاتري نيز نسبت به بقيه درصدها ايجاد كرده است.

نمودار شماره ۳ پروفايل نفوذ دارو در حضور غـــلظت هاي مختلف از SLS در زمان هاي مختلف را نـــشان مي دهد. با وجود گزارشات قبلي مبني بر اثرات افزايش دهندگي جذب پوستي داروها توسط اين ماده (۱۷) نتايج مطالعه نشان داد كه SLS تنها در دقايق ابتدايي ۱۵ دقيقه با غلظت هاي ۰/۵ و ۱ % و تا ۴۵ دقيقه با غلظت ۱ % اثرات افزايش دهندگي بر جذب پوستي را اعمال كرده است. حتي غلظت ۱ % SLS تا حد زيادي از جذب پوستي دارو ممانعت به عمل آورده است. در مقايسه با كنترل كاهش قابل توجهي در ادامه روند جذب پوستي مشاهده مي شود. اين امر ظاهرا" از تمايل شديد متوتركسات به ميسل هاي تشكيل شده توسط SLS يا تمايل زياد به تشكيل كمپلكس با اين سورفكتانت مربوط مي شود. تشكيل ميسل از يک طرف سبب به دام افتادن مولكول هاي دارو و كاهش غلظت داروي آزاد شده و از طرف ديگر سبب فاصله گرفتن غلظت دارو در فاز گيرنده از غلظت اشباع اوليه (در محلول آب - پروپيلن گليكول و ۲ - پروپانول) و كاهش فعاليت ترموديناميكي دارو در محلول و متعاقب آن كاهش تمايل دارو به نفوذ در پوست (driving force) مي گردد كه هر دو اين اثرات سبب كاهش ميزان داروي عبور كرده در غلظتهاي بالاتر مي گردد.

همان طور كه در جدول شماره ۳ نيز آمده است. فلاكس در فرمولاسيون حاوي SLS ۰/۵ % از فرمولاسيون حاوي SLS ۱ % بيشتر بوده و اين افزايش در ER فرمولاسيون حاوي SLS ۱ % نيـــز مشاهده مي شود.

نمودار شماره ۴ پروفايل جذب دارو از فرمولاسيون حاوي ۰/۵ % آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد در مقايسه با فرمولاسيون كنترل را نشان مي دهد. همان طور كه در اين نمودار مشاهده مي شود، اضافه شدن آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد به فرمولاسيون در كل سبب كاهش غلظت داروي عبور كرده از پوست مي شود. تنها در زمان هاي اوليه (۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۱۲۰) ميزان جذب بالاتري نسبت به فرمولاسيون پايه F_{11} نشان داده شده است. با توجه به جدول شماره ۳ نيز با مشاهده فلاكس فرمولاسيونهاي حاوي اين افزايش دهنده جذب و ER آن مي توان به كاهش جذب دارو توسط آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد پي برد. كاهش ميزان جذب دارو در نتيجه افزودن اين سورفكتانت كاتيوني را بدين ترتيب مي توان توجيه نمود كه آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد در زمان هاي اول سبب به هم خوردن موقتي ساختمان چربي هاي پوست شده و جذب دارو را بالا مي برد ولي با گذشت زمان اندازه ميسل ها و تعداد آن افزايش مي يابد. اين ميسل ها مي توانند مولكول هاي دارو را در ميان خود به دام انداخته و از تماس اين مولكول ها با پوست و متعاقبا جذب پوستي آن ممانعت به عمل آورند. خود ميـــسل ها نيز به دليل درشتي قابليت عبور مناسب از پوست را نخواهند داشت. اين ماده هم چنين مي تواند تمايل دارو به محيط انحلال را افزايش داده و از آزاد شدن دارو و جذب در پوست ممانعت به عمل بياورد. در اغلب اين پروفايل ها مانند آن چه در مورد نمودارهاي قبلي ذكر شد يک افت غلظت پس از زمان اوليه ايجاد شده است كه احتمالا به دليل انحلال دارو در بـــــخش سروزي پوست مي باشد. در صورت اشباع پوست از دارو غلظت در فاز گيرنده مجددا افزايش مي يابد. از ساير دلايل احتمالي براي كاهش جذب پوستي دارو توسط آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد مي تواند كمپلكس شدن دارو با اين سورفكتانت باشد. كمپلكس هاي ايجاد شده به دليل درشتي قابليت جذب كمتري دارند. هم چنين كمپلكس شدن دارو با سورفكتانت ميتواند روي خصوصيات فيزيكوشيميايي دارو تاثير گذاشته و جذب آن را كاهش دهد.

نمودار شماره ۵ نشان دهنده پروفايل هاي جذب پوستي دارو از فرمولاسيون هاي حاوي ۵ % از ترانسكيوتول، SLS و آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد به علاوه فرمولاسيون پايه مي باشد. همان طور كه مشاهده مي شود فرمولاسيون حاوي SLS با غلظت ۰/۵ % جذب پوستي بالايي در زمان ۱۵ دقيقه دارد. اين پيک خاصيت مفيد براي اين فرآورده محســوب مي شود كه مي تواند مقدار قابل توجهي از داروي موجود در خود را در زمان بسيار كوتاه از پوست عبور دهد ولي در ادامه روند جذب پوستي دارو در اين فرمولاسيون به دلايل مذكور كاهش چشمگيري حتي نسبت به فرمولاسيون پايه مشاهده مي شود اما در مورد فرمولاسيون حاوي ۰/۵ % ترانسكيوتول با گذشت زمان افزايش قابل قبولي در ميزان جذب پوستي دارو ديده مي شود. نـــــمودار شماره ۶ پروفايل هاي جذب پوستي دارو از فرمولاسيون پايه و فرمولاسيون هاي حاوي غلظت هاي ۱ % SLS و ترانسكيوتول را نشان مي دهد. همان طور كه ملاحظه مي شود در حالت كلي افزايش قابل ملاحظه اي در

هيچ كدام از فرمولاسيون هاي مذكور مشاهـــــده نمي شود، اما در زمان هاي اوليه خصوصا دقيقه ۱۵ افزايش مختصري نسبت به فرمولاسيون پايه، در فرمولاسيونهاي حاوي ۱ % SLS ديده مي شود كه اين ميزان افزايش معني دار نمي باشد. هم چنين در دقيقه ۱۲۰ افزايش در جذب پوستي در فرمولاسيون ۱ % SLS ايجاد شـــــده كه باز هــم قابل صرفه نظر كردن است.

مقايسه نمودارهاي مختلف مربوط به جذب پوستي دارو از فرمولاسيون هاي حاوي درصدهاي مختلف افزايش دهنده جذب نشان مي دهد كه علاوه بر تركيب حلال به كار رفته درصد افزايش دهنده جذب نيز تاثير مهمي بر كارايي فرمولاسيون در جذب پوستي متوتركسات دارد. ارتباط درصد افزايش دهنده با ميزان جذب دارو يک ارتباط خطي نيست به عبارت ديگر با افزايش درصد افزايش دهنده جذب، ميزان جذب دارو ابتدا افزايش يافته و سپس به حد ماكزيمم خود رسيده و مجدداً كاهش مي يابد. كاهش جذب پوستي متوتركسات از فرمولاسيون هاي حاوي درصد هاي بالاي افزايش دهنده جذب مي تواند به دلايل مختلفي ايجاد شود كه برخي از اين دلايل در قسمت هاي قبلي آورده شده است. در مورد فرمولاسيون متوتركسات از اين مواد افــزايش دهنده جذب، ترانسكيوتول ۲ % به عنوان بهترين افزايش دهنده جذب پوستي تعيين گرديد. دلايل احتمالي بيشتر بودن جذب در مورد ترانسكيوتول شايد اين باشد كه يكي از مكانيسم هاي اصلي افزايش جذب توسط سورفكتانتها، اين است كه اين تركيبات باعث مي شوند كه سد لايه شاخي مختل شود و براي اين كه سورفكتانت بتواند اين عمل را انجام دهد بايستي ابتدا خود بتواند از اين سد نفوذ كند. با توجه به اين كه اين سد خاصيت ليپوفيل دارد بنابراين سورفكتانت هاي غير يـــــــونی راحت تر مي توانند در اين سد نفوذ كرده و عملكرد خود را انجام دهند بنابراين بهتر مي توانند ساختار استراتوم كورنئوم را به هم ريخته و باعث جذب و عبور بيشتر دارو گردند.

به منظور افزايش جذب پوستي متوتركسات از ژل حاوي ۲ % ترانسكيوتول، از درصدهاي مختلف اسيد سالیسیلیک به عنوان ماده كراتوليتيک استفاده شد. اسيد سالیسیلیک ماده كراتوليتيكي است كه به عنوان يكي از درمان هاي موضعي پسوريازيس به ويژه در نوع خفيف آن به كار مي رود. از طرفي اين ماده به علت داشتن خاصيت كراتوليتيک و لايه برداري مي تواند باعث نازک شدن استراتئوم كورنئوم شده و با به هم زدن ساختار نرمال آن باعث افزايش جذب داروها شود. بنابراين هم به خاطر خاصيت درماني و هم خاصيت افزايش دهنده جذبي اين ماده سعي شد فرمولاسيون هاي حاوي اين ماده نيز طراحي و مورد بررسي قرار گيرد. بنابراين فرمولاسيون حاوي ۲ و ۶ % اسيد سالیسیلیک در فرمول F_{11} حاوي ۲ % ترانسكيوتول تهيه و جذب پوستي آن ها مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به ذكر است كه تهيه غلظت هاي بالاتر از اين ماده در پايه انتخاب شده به دليل به هم زدن ساختار ژل و تشكيـل رسوب امكان پذير نگرديد. نمودار شماره ۷ پروفايل نفوذ متوتركسات در حضور غلظت ۲ % ترانسكيوتول و غلظت هاي ۲ و ۶ % اسيد سالیسیلیک را نشان مي دهد. همان طور كه مشاهده مي شود افزودن ماده كراتوليتيک با غلظت ۶ % باعث افزايش چشمگيري در جذب پوستي دارو شده است. البته اين افزايش جذب در حضور غلظت ۲ % اسيد سالیسیلیک هم مشاهده مي شود ولي با توجه به جدول شماره ER در غلظت ۶ % خيــلي بالاتر مي باشد (ER = ۷/۸۷). دلايل افزايش جذب بيشتر توسط اسيد سالیسیلیک احتمالا به خاطر خاصيت كراتوليتيک اين ماده است كه باعث نازک شدن لايه هاي استراتئوم كورنئوم شده و از طرفي عبور سورفكتانت غيريوني را از اين لايه نازک شده تسهيل مي نمايد ودر نهايت باعث مي شود كه اولا نفوذپذيري اين لايه نازک شده نسبت به دارو زياد شده ثانيا به خاطر نفوذپذيري زياد سورفكتانت تغيير ساختار زيادي در لايه هاي پوستي ايجاد كرده و باعث عبور مقدار زيادي از متوتركسات از اين ساختار به هم ريخته پوستي مي گردد.

جدول١: اجزاء مختلف در فرمولاسيون هاي اوليه

نام فرمولاسيون	کربومر ٩۴٠ (گرم)	PG (ml)	ايزوپروپيل الکل (ml)	آب (ml)
F_1	٠/۵	١٠	١٠	٨٠
F_2	٠/۵	١٠	٢٠	٧٠
F_3	٠/۵	١٠	۴٠	۵٠
F_4	٠/۵	١٠	۶٠	٣٠
F_5	٠/۵	١٠	٨٠	١٠
F_6	٠/۵	١٠	٩٠	-
F_7	٠/۵	٢٠	٢٠	۶٠
F_8	٠/۵	٢٠	۴٠	۴٠
F_9	٠/۵	۶٠	۶٠	٢٠
F_{10}	٠/۵	٨٠	٨٠	-
F_{11}	٠/۵	٣٠	٢٠	۵٠
F_{12}	٠/۵	٣٠	۴٠	٣٠
F_{13}	٠/۵	٣٠	۶٠	١٠
F_{14}	٠/۵	٣٠	٧٠	-
F_{15}	٠/۵	۴٠	٢٠	۴٠
F_{16}	٠/۵	۴٠	۴٠	٢٠
F_{17}	٠/۵	۴٠	۶٠	-
F_{18}	٠/۵	۵٠	٢٠	٣٠
F_{19}	٠/۵	۵٠	۴٠	١٠
F_{20}	٠/۵	۵٠	۵٠	-

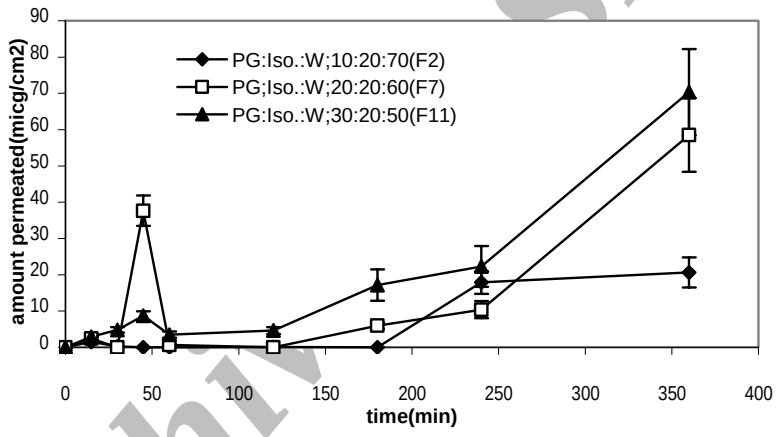
جدول ٢: نسبت اجزاي مختلف در فرمولاسيون هاي انتخاب شده*

نام فرمولاسيون	P.G (ml)	ايزوپروپيـل الکل (ml)	آب (ml)
F1	١٠	١٠	٧٠
F2	١٠	٢٠	۶٠
F3	١٠	۴٠	۴٠
F4	٢٠	٢٠	۵٠
F8	٢٠	۴٠	٣٠
F11	٣٠	٢٠	۴٠
F12	٣٠	۴٠	٢٠
F15	۴٠	٢٠	٣٠
F18	۵٠	٢٠	٢٠

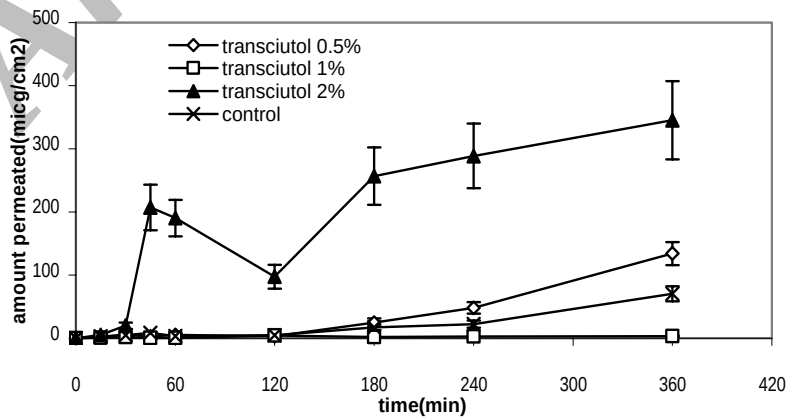
*ميزان کربومر ٩۴٠ و محلول متوترکسات در تمامي فرمولاسيونها به ترتيب ٠/۵، گرم و ١٠ ميلي ليتر بود.

جدول شماره ٣: مقايسه پارامترهاي حاصل از سورفكتانت هاي مختلف

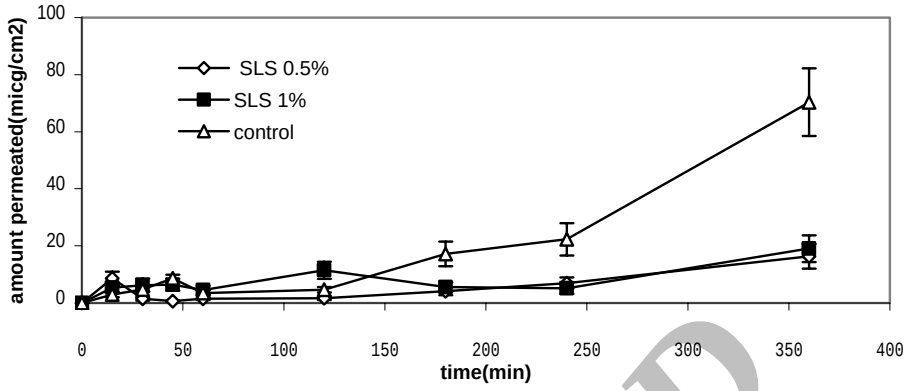
غلظت سورفكتانت (% w/w)	Steady-state flux (µgcm-2min-1)	Kp(x10-3,cm min-1)	Lag time (min)	ER
كنترل	٠/٢٧٢٢	٢/٧٢٢	١٥	١
ترانسكيوتول ٠/٥	٠/٥٤٤٢	٥/٤٤٢	١٥	١/٩٩٩
١	٠/٠٠٢٧	٠/٠٢٧	٣٠	٠/٠٠٩
٢	٠/٩٢٥٥	٩/٢٥٥	٣٠	٣/٤
٠/٥ SLS	٠/٠٦١٨	٠/٦١٨	١٥	٠/٢٢٧
١	٠/٠٣٧٩	٠/٣٧٩	١٥	٠/١٣٩
آلكيل بنزيل دي متيل كلرايد ٠/٥	٠/٠٠٤٩	٠/٠٤٩	١٥	٠/٠١٨
اسيد ساليسيليك ٢	١/٢٦٩٦	١٢/٦٩٦	١٥	٤/٦٦٤
٦	٢/١٤٣	٢١/٤٣	١٥	٧/٨٧٢



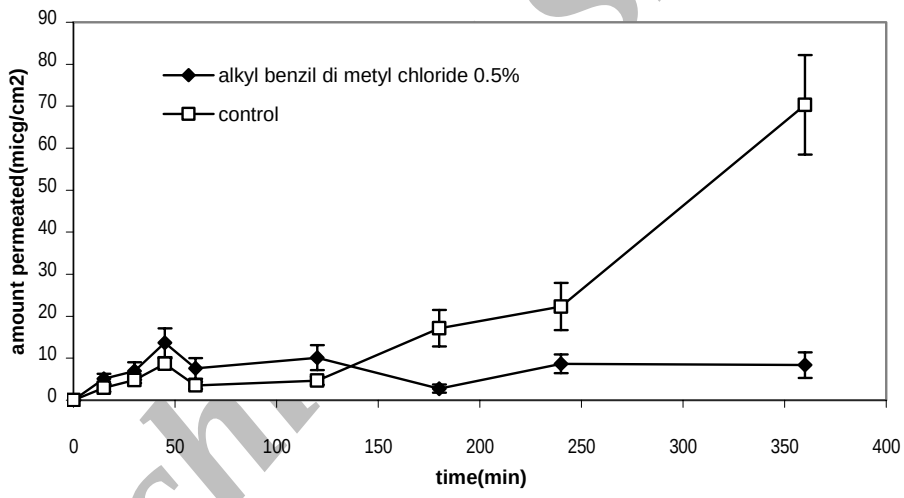
نمودار شماره١: پروفايل نفوذ متوتركسات ازپوست رت از فرمولاسيون هاي پايه(PG: پروپيلن گليكول، Iso. : ايزوپروپيل الكل و W: آب)



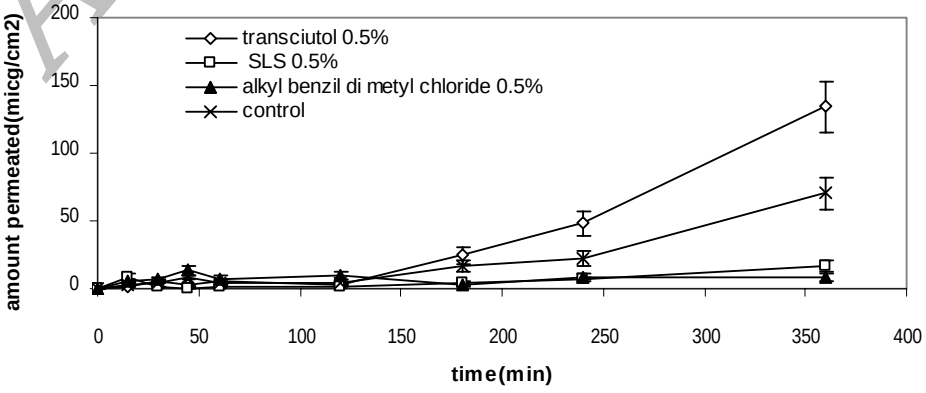
نمودار شماره ٢: پروفايل نفوذ متوتركسات ازپوست رت در حضور غلظت هاي مختلف ترانسكيوتول



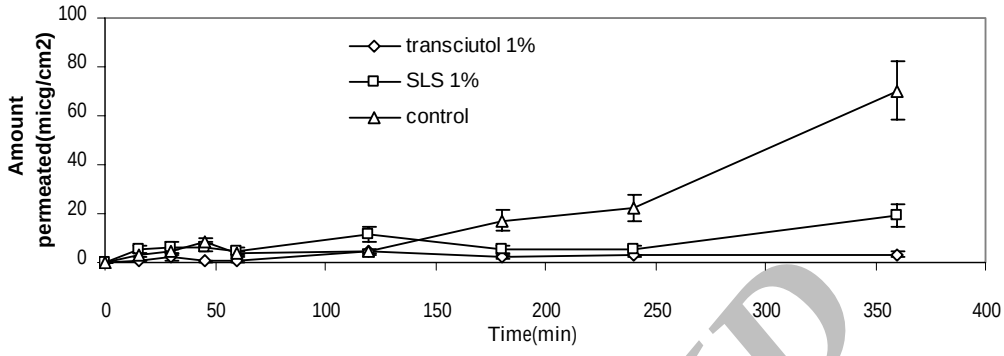
نمودار شماره ۳: پروفايل نفوذ متوترکسات ازپوست رت در حضور غلظت هاي مختلف SLS



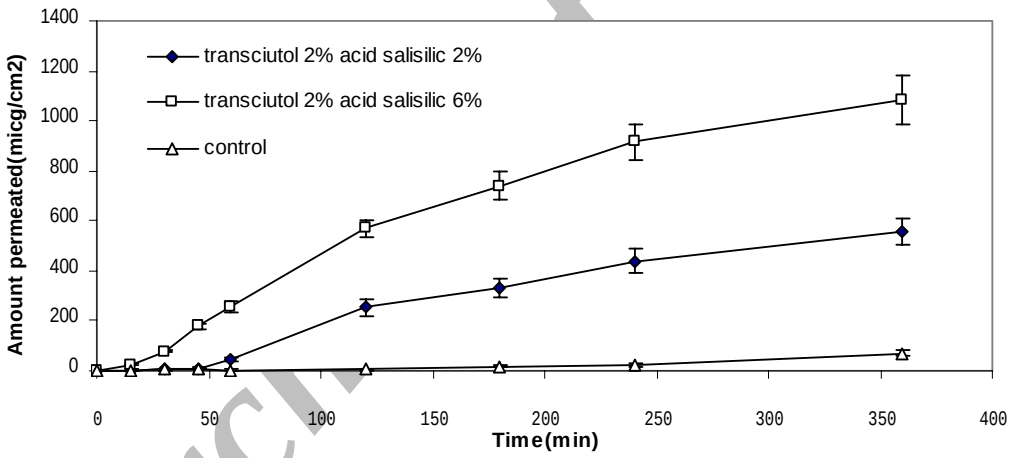
نمودار شماره ۴: پروفايل نفوذ متوترکسات ازپوست رت در حضور آلکيل بنزيل دي متيل کلراید



نمودار شماره ۵: مقايسه ميزان نفوذ متوترکسات از پوست رت در حضور غلظت ۰/۵% انواع سورفکتا نت ها



نمودار شماره ٦: مقايسه ميزان نفوذ متوترکسات از پوست رت در حضور غلظت ١% انواع سورفکتا نت ها



نمودار شماره ٧: پروفايل نفوذ متوترکسات ازپوست رت در حضور غلظت ٢% ترانسکيوتول و غلظت هاي مختلف اسيد سالیسيليك

۴- نتيجه گيري

بـــــا توجه در نتـايج بدست آمده مي تـــوان چنين نتـــــيجه گيري کـــرد که در بين سورفکتانـــــت هاي مورد بررسي، ترانسکيوتول داراي کارآيي بهتري در افزايش نفوذ پذيري متوترکسات بوده که اين امر در حضور اسيد سالیسيليك بعنوان يك ماده کراتوليتيك تـــــقويت مي گردد.

فرمولاسيـــــــون نـــــهايي با داشتن ترانـسکيوتول و اسيد سالیسيليك داراي بيشترين توانايي در عبور دادن دارو از ســـــد پوستي بوده و بـــا کارآيي بالايي مي تواند در درمان موضعي پسوريازيس بکار گرفته شـــــود.

مي توان اميدوار بود که در آينده بتوان از درمانهاي موضعي متوترکسات در موارد شديد بيماري پسوريازيس با حداقل عوارض جانبي سود جست.

۵- تشكر و قدرداني

از زحمات آقايان دكتر هادي وليزاده، دكتر قباد محمدي و دكتر مهران مسگري بخاطر همكاري صميمانه در اين مطالعه و نيز از مركز تحقيقات كاربردي دارويي دانشگاه علوم پزشكي تبريز بخاطر حمايت مالي پروژه تقدير و تشكر مي شود.

6- References:

1- Federman D. G., Froelich C. W., Kirsner R. S., Topical psoriasis therapy, American Family Physician, 1999, 59 (4), 1-10.
2- Clark Ch., Management of severe psoriasis, The pharmaceutical journal, 2005, 274, 689-698.
3- Malatjalian D. A., Ross J. B., Williams C. N., Colwell S. J., Eastwood B. J., Methotrexate hapatotoxicity in psoriatics: report of 104 patients from Nova Scotia, with analysis of risks from obesity, diabetes and alcohol consumption during long term follw-up, Can J Gastroenterol., 1996, 10(6), 369-75.
4- Naldi L., Griffiths C. E. M., Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis, Br. J. Dermatol., 2005, 152(4), 597-615.
5- Wikipedia, the free cncyclopedia, Methotrexate, http://en.wikipedia.org /wiki/Amethopterin.
6- Kumar R. B. C., Inderjeet K., Bhushan K., Topical methotrexate therapy in palmoplantar psoriasis, Indian J. of Dermatology,
7- Venereology and Leprology, 1999, 65(6), 270-272.
8- Wong T.W., Zhao Y.L., Sen A., Hui S.W., Pilot study of topical delivery of methotrexate by electroporation, Bri. J. Dermatol., 2005, 152, 524-530.
9- Weinstein G. D., McCullough J. L., Olsen E., Topical methotrexate therapy for psoriasis, Arch Dermatol., 1989, 125, 227-230.
10- Ball M., McCullough J. L., Weinstein G. D., Percutaneous absorption of methotrexate: effect on epidermal DNA synthesis in hairless mice, J Invest Dermatol., 1982, 79(1), 7-10.
11- Brain K.R., Hadgraft J., Lewis D., Allan G., The influence od azon on the percutaneous absorption of methotrexate, International journal of pharmaceutics, 1991, 71(3), R9-R11.
12- Sutton L., Swinehart J.M., Cato A., Kaplan A.S., A clinical study to determine the efficacy and safety of 1% methotrexate/azon gel applied topically once daily in patients with psoriasis vulgaris, International journal of dermatology, 2001, 40, 464-467.
13- Hwang G.C., Lin A.Y., Chen W., Sharpe R.J., Development and optimization of a methotrexate topical formulation, Drug Development and Industrial Pharmacy, 1995, 21(17), 1941-1952.
14- Radan M. R., Faghihi G., Efficacy and side effect of topical methotrexate in psoriasis, 12th international congress of immunology and 4th annual conference of FOCIS, 2004, July 18-23, Montral-Canada.
۱۵- شكري جواد، نخودچي علي، جوادزاده يوسف، آيت اللهي منصوره، اثناعشري سولماز، متين اميرعباس، فرمولاسيون فيناستريد موضعي و بررسي جذب پوستي آن، مجله علوم دارويي، شماره ۱، بهار و تابستان، ۱۰۶-۰۹۷ ۱۳۸۳.
16- LO K.K., HO L.Y., Psoriasis in: Handbook of dermatology & Venereology, 2004, 2nd Edition, Chapter 4.
16- Lauglin RG, Relative hydrophilicities amoung surfactants hydrophilic groups. In: Brown G.H., Advances in liquid crystals, 1978, Academic Press, New York.
17- Gibson K.T., Teall M.R., Intractions of C12 surfactants with the skin : Changes in enzymes and visible and histological features of rat skin treated with sodium lauryl sulphate, Food Chem Toxical., 1983, 21 , 587 -94.
18- Park E., Chang S.Y., Hahn M., Chi S., Enhancing effect of poly oxy ethylen alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen , Int. J. Pharm., 2000, 209 , 109-19.
19- Shin S.C., Cho C.W., Oh L.J., Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. Int. J. Pharm., 2001, 222, 199-203.
20- Walters K.A., Surfactants and percutaneous absorption. In: Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J. (Eds.), Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurements, Modelling, 1989, Ibc Technical services, London,148-162.
21- Cheon Koo L., Takahiro U., Kazahosa K., Akira Y., NakSeo K., Shigeru G.J., Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. J. Pharm. Sci. 1994, 8, 562-565.
22- Ribaud C.H., Garson J.C., Doucet J., Leveque J.L., Organisation of stratum corneum lipids in relation to permeability: influence of sodium lauryl sulphate and preheating. Pharm. Res., 1994, 11, 1414-1418.
23- Rhein L.D., Robbins C.R., Fernee K., Cantore R., Surfactanta structure effects on swelling of isolated human stratum corneum. J. Soc. Cosmet. Chem., 1986, 37, 199-210.
24 - Goodman M., Barry B., Action of penetration enhancers on human stratum corneum as assessed by differential scanning calorimetry. Transdermal Drug Deliv., 1989, 35, 574-93.

25-Nokhodchi A., Shokri J., Dashbolaghi A. , Hassan-zadeh D. Ghafourian T., Barzegar-Jalali M., The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin , Int. J. Pharm., 2003, 250: 359-69.

26- Nokhodchi A., Shokri J., Dashbolaghi A., Hassan-zadeh D., Ghafourian T., Barzegar-Jalali M., The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam , Int. J. Pharm., 2001, 228 : 99-107.