

Preparation and in-vitro evaluation of sustained release glatiramer solid lipid nanoparticles

Fatemeh Ghashghaee¹, Solmaz Ghaffari^{2,3}

¹ Department of Medical Chemistry, Faculty of Chemistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Dental Material Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS), which is associated with the destruction of the myelin of the nerve cells, causes many motor-sensory problems and disrupts their quality of life. One of the remedies for this disease is glatiramer, which is injected daily as a peptide at a dose of 20 mg, tolerating of it for a long period of time is too difficult due to irritation of injection site. In this study with using nanotechnology tried to control the release rate of the drug to increase the interval of injections and consequently, patient's tolerance.

Materials and methods: Glatiramer solid lipid nanoparticles (SLNs) were prepared using cholesterol as carrier by high shear homogenization technique. The particle size and zeta potential were investigated. The particle morphology was evaluated by SEM (Scanning Electron Microscopy) and finally the drug loading efficacy and drug release pattern were studied. To enhance the stability of the prepared nanoparticles, lyophilization was carried out by mannitol as cryoprotectant agent.

Results: The results showed that particles prepared with a size less than 300 nm and PDI: Polydispersity Index of less than 0.5, drug loading rate of over 74% and release over 6 days could be a good candidate for replacement of current treatment with this drug.

Conclusion: It seems that drug delivery of glatiramer with nanotechnology could provide a new solution for the problem of controlling MS with this drug in the future with more patient compliance.

Keywords: Multiple sclerosis, Nanotechnology, Glatiramer, Sustained release, Side Effects.

Cited as: Ghashghaee F, Ghaffari S. Preparation and in-vitro evaluation of sustained release glatiramer solid lipid nanoparticles. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(3): 284-289.

Correspondence to: Solmaz Ghaffari

Tel: 98 9125272146

E-mail: soligh@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0002-5166-5112

Received: 21 Jan 2021; **Accepted:** 12 Jun 2020

تهیه و ارزیابی برون تن نانوذرات جامد لیپیدی حاوی داروی گلاتیرامر با رهایش کنترل شده

فاطمه قشقایی^۱، سولماز غفاری^{۲،۳}

^۱ گروه شیمی دارویی، دانشکده شیمی، واحد علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات مواد دندان، دانشکده دندانپزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری ام اس که با تخریب میلین سلول‌های عصبی همراه است برای مبتلایان مشکلات فراوان حسی حرکتی ایجاد می‌کند و زندگی‌شان را مختل می‌کند. یکی از داروهای درمان این بیماری گلاتیرامر می‌باشد که به عنوان یک پپتید در دوز ۲۰ میلی گرم به شکل روزانه تزریق می‌شود که تحمل تزریق هر روزه آن برای دوره طولانی طاقت فرسا است. از سویی عوارض محل تزریق نیز برای بیمار آزار رسان است. در این پروژه سعی شد با استفاده از فناوری نانو، امکان آهسته رهش نمودن دارو ایجاد شود تا علاوه بر اطمینان از کاهش تغییرات سطح خونی دارو، فاصله تزریق‌ها و به تبع آن تحمل بیمار افزایش یابد.

روش بررسی: در این پروژه نانوذرات جامد لیپیدی (SLNs: Solid Lipid Nanoparticles) از داروی گلاتیرامر بر روی حامل‌های کلسترولی با روش هموژنیزاسیون با دور بالا تهیه شد. سایز و پتانسیل زتای ذرات مورد بررسی قرار گرفت، مورفولوژی ذرات با کمک (SEM Scanning Electron Microscopy) بررسی شد و در نهایت میزان بارگیری و الگوی رهایش دارو مطالعه شد. جهت افزایش پایداری نانو ذرات تهیه شده، انجاماد سرمایی به کمک مانیتول به عنوان محافظ سرمایی یا Cryoprotectant در برنامه تحقیق قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند ذرات تهیه شده با داشتن سایز کمتر از ۳۰۰ نانومتر و شاخص پراکندگی (PDI: Polydispersity Index) کمتر از ۰/۵، میزان بارگیری دارو بیش از ۷۴٪ و رهش بیش از ۶ روزه می‌توانند کاندید مناسبی برای جایگزینی درمان فعلی با این سیستم دارورسانی باشند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد دارورسانی گلاتیرامر به کمک فناوری نانو می‌تواند راهکار جدیدی برای حل مشکلات موجود در کنترل ام اس با این دارو در آینده فراهم سازد.

واژگان کلیدی: نانو فناوری، گلاتیرامر، آهسته رهش، ام اس، عوارض جانبی.

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس یا MS نوعی بیماری التهابی مزمن پیشرونده در سلول‌های سیستم عصبی مرکزی انسان است که

معمولاً در جوانان رخ می‌دهد و متوسط سن شروع آن ۳۱ سال است. در حدود ۱۵ درصد از بیماران مبتلا به MS، بیماری با یک دوره عود کننده شروع می‌شود که در نهایت ممکن است منجر به زوال تدریجی عملکرد عصبی شود. از لحاظ نوروپاتولوژی عصبی، "مولتیپل اسکلروزیس" الگوهای مختلفی را ارائه می‌دهد. در حال حاضر علت و درمان MS نامشخص باقی مانده است و در بسیاری از موارد MS به ناتوانی عصبی قابل توجهی منجر می‌شود. این بیماری عمدتاً در نژاد سفید قزاقی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات مواد دندان - دانشکده دندانپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی

دانشگاه آزاد اسلامی، سولماز غفاری (email: soligh@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0002-5166-5112

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۳/۱۲

می‌دهند و با توجه به این که پس از تزریق دچار درد، سوزش، تورم، علائم آزار دهنده ای خواهند شد، درمان با این دارو برای بیماران مشکل و ناخوشایند است.

سامانه‌های دارورسانی نوین (NDDS: Novel Drug Delivery Systems) به منظور بهبود خواص دارویی و درمانی داروهای مورد استفاده در بیماران ایجاد می‌شوند و غالباً به صورت یک مخزن، دارو را درون خود دارند. این سامانه‌ها دارو را به مقدار معین و در محل خاص آزاد می‌کنند، در نتیجه بر فارماکوکینتیک و توزیع دارو در بدن تأثیرگذار هستند. ذرات نانو به طور گسترده‌ای در دارورسانی استفاده می‌شوند. در سال‌های اخیر، توجه فراوانی به تهیه نانوذرات و نانوساختارها به عنوان حامل‌هایی برای دارورسانی شده است، چرا که این ساختارها به دلیل کنترل و آهسته نمودن رهش دارو، حفاظت از مولکول دارویی، اندازه ذره‌ای کوچک‌تر از سلول، قابلیت عبور از موانع زیستی جهت رسانش دارو به محل هدف، افزایش ماندگاری دارو در جریان خون، دارورسانی هدفمند و زیست سازگاری می‌توانند به عنوان یک سیستم دارورسانی بسیار موثر در نظر گرفته شوند، که باعث افزایش کارایی درمانی دارو می‌شود (۸). نانوذرات لیپیدی برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ به عنوان جایگزینی برای حامل‌های کلئیدی معمولی مثل امولسیون‌ها، ذرات لیپوزومی و نانو ذرات پلیمری معرفی شدند. SLN‌ها حامل‌های کلئیدی با اندازه بین ۴۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند که از لیپیدهای زیستی که در فاز آبی پراکنده شده‌اند تشکیل می‌شوند. SLN‌ها در ابتدا فقط در تهیه محصولات آرایشی به کار می‌رفتند، ولی به سرعت به عنوان حامل دارویی و یک سیستم دارورسان جایگاه خود را تثبیت کردند. مهم‌ترین علتی که باعث شد SLN در داروسازی به کار برود، هزینه مناسب و شرایط نه چندان دشوار تهیه فرمولاسیون آن بود.

اجزای تشکیل دهنده فرمولاسیون SLN‌ها شامل چربی‌ها و آب و سورفکتانت(ها) است. معمول‌ترین چربی‌هایی که در تهیه نانو ذرات مورد توجه دانشمندان است، ستیل پالمیتات و استئاریک اسیدو کلسترول هستند، ولی در کل محدودیت‌های خاصی برای به کارگیری سایر لیپیدها وجود ندارد. تمام اجزای تشکیل دهنده فرمولاسیون که چرب هستند و یا در چربی حل می‌شوند، در این فاز قرار خواهند گرفت. اندازه متوسط ذرات پراکنده شده SLN با افزایش نقطه ذوب لیپید افزایش می‌یابد و این نتیجه با تئوری عمومی هموزناسیون با فشار و یسکوزیته بالای فاز پراکنده مطابقت دارد (۹) ماده اصلی تشکیل دهنده فاز آبی، آب دیونیزه است که با توجه به خصوصیات و کاربردهای هر فرمولاسیون، سایر مواد محلول در آب نیز به آن

در مدارهای شمالی کره زمین شیوع دارد. به همین علت بیشترین شیوع آن در کشورهای اروپای شمالی گزارش شده است. ام اس باعث ناتوانی جسمی- روانی و ذهنی- فکری می‌شود که این ناتوانی‌ها وابسته به سن نیستند. علاوه بر مشکلات ایجاد شده از نظر جسمی برای افراد مبتلا، هزینه‌های بالای درمان و کنترل این بیماری نیز از مشکلات اساسی برای بیمار محسوب می‌شود (۱).

برای تشخیص مقطعی، تکرار MRI در دوره زمانی و مناطق مختلف ضروری است و گاهی آنالیز مایع مغزی-نخاعی برای تشخیص باند‌ها "لیگوکلونال" و افزایش میزان "ایمونوگلوبین" که معمولاً در ام اس دیده می‌شود، لازم است (۲). پیشرفت ام اس بر اساس ناتوانی ناشی از بیماری سنجیده می‌شود (۳، ۴) و به طور کلی برای پایش روند پیشرفت بیماری، معیارهای مختلف پزشکی در نظر گرفته می‌شوند (۵). چهار نوع ام اس وجود دارد:

عودکننده- فروکش (RRMS)، پیشرفته ثانویه (SPMS)، پیشرفته اولیه (PPMS) و پیشرفته عودکننده (PRMS). هر چند داده‌ها و اطلاعات زیادی از بیماری به دست آمده است، پاتوژنز ام اس کماکان مبهم است (۶). درمان ام اس شامل درمان عودکننده‌های حاد بیماری با کورتیکواستروئیدها، کنترل علائم بیماری با داروهای مرتبط و تعدیل بیماری با داروهای تعدیل کننده بیماری (DMDs) است. به طور مثال، وقتی عود بیماری رخ می‌دهد، مثل پدید آمدن مشکلاتی نظیر از دست دادن (دید و تعادل) معمولاً برای رفع علائم از دوز بالای کورتیکو استروئیدهای خوراکی یا تزریقی استفاده می‌شود. در صورت بروز اسپاسم، از داروهای شل کننده عضلانی استفاده می‌شود. داروهای DMDs شامل گلاتیرامر، انترفرون بتا 1a عضلانی و زیرجلدی، انترفرون بتا 1b و ناتالیزوماب هستند. (۷). از بین داروها گلاتیرامر از دسته دارویی‌ها تنظیم کننده سیستم عصبی است. این داروها برای کنترل عود و پیشرفت بیماری ام اس توأم با حمله عصبی استفاده می‌شود. این داروها در ضمن می‌توانند از تولید سایتوکین‌های التهابی جلوگیری کنند (۷).

وزن ملکولی گلاتیرامر، بسته به اینکه آمینو اسیداز کدام سمت پیوند برقرار کند وزن ملکولی آن متفاوت است. گلاتیرامر داروی انتخابی ما برای درمان ام اس است. این تحقیق جهت کمک به کاهش مشکلات درمان ام اس با گلاتیرامر و افزایش ماندگاری دارو در بدن طراحی و اجرا شده است. بیماران مبتلا به ام اس هر روز و یا یک روز در میان، بسته به اینکه از دوز ۲۰ یا ۴۰ میلی گرم استفاده می‌کنند، تزریق گلاتیرامر را انجام

نتیجه اسکن دارو در طول موج ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، حداکثر جذب در طول موج ۲۳۵ نانومتر را تایید کرد. غلظت‌های مورد استفاده در رسم منحنی ۱۰-۱۰۰۰ ppm بود.

بررسی اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا

با استفاده از روش تفرق دینامیک نور (Dynamic Laser Scattering) و نیز استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا همچنین شکل ذرات تهیه شده مورد مطالعه قرار گرفت.

تعیین میزان درصد داروی انباشته شده در نانوذرات لیپیدی جامد (%LE: Loading Efficiency)

مخلوط حاوی ۲۰۰ میلی گرم دارو و مخلوطی که فاقد دارو است در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از آن محلول رویی جهت اندازه گیری میزان جذب توسط اسپکتروفوتومتر جدا شد. دستگاه UV اسپکتروفوتومتر توسط محلولی که فاقد دارو بود کالیبره و صفر شد. سپس محلول سانتریفیوژ شده حاوی دارو در دستگاه قرار گرفته و جذب آن خوانده شد. جهت محاسبه مقدار داروی بارگیری شده از روش معکوس مطابق معادله ذیل استفاده شد (۱۰):

درصد داروی بارگیری شده = مقدار دارو در محلول رویی - مقدار اولیه دارو / مقدار اولیه دارو $\times 100$

فریزدرای کردن ذرات

جهت افزایش پایداری نانوذرات تهیه شده، فریزدرای کردن آنها با افزودن w/w/۵ مانیتول به عنوان محافظ سرمایی صورت پذیرفت.

بررسی الگوی رهایش دارو

۵ میلی‌لیتر از امولسیون حاوی نانوذرات، داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات pH معادل ۷/۴ قرار داده شد و در زمان‌های تعیین شده از آن نمونه برداری صورت پذیرفت و تعیین مقدار ماده موثره انجام شد.

یافته‌ها

رسم منحنی کالیبراسیون

رسم منحنی کالیبراسیون برای آنالیز ماده موثره در طول پروژه انجام شد و رابطه خطی مناسب بین غلظت دارو و میزان جذب UV با ضریب همبستگی خطی بالا به دست آمد. R^2 برابر ۰/۹۹۸ حاصل شد که عدد بسیار مناسبی در مطالعات علوم دارویی است.

اضافه می‌شوند، از جمله این مواد می‌توان به انواع سورفکتانت-های آبی اشاره کرد.

سورفکتانت باعث پایداری نهایی SLN و قرار گیری مطلوب فاز چربی و فاز آبی کنار هم می‌شود. نوع سورفکتانت و غلظت آن اثر زیادی روی کیفیت پخش SLN دارد و همچنین روی اندازه ذرات اثرگذار هستند. غلظت زیاد امولسیفایر، کشش سطحی را کاهش می‌دهد و تفکیک ذرات در طول هموژنایزاسیون را تسهیل می‌کند (۹). در این پروژه سعی شد نانوذرات لیپیدی جامد با استفاده از کلسترول تهیه و داروی گلاتیرامر روی آن بارگیری شود.

مواد و روشها

نحوه ساخت نانوذرات حاوی دارو

مواد

پودر دارو، اهدایی شرکت تحقیقاتی-مهندسی توفیق دارو بود. غشای دیالیز، مانیتول و کلسترول، استون، اتانول، توئین ۸۰ از شرکت مرک کشور آلمان تامین شد.

در ساخت نانوذرات لیپیدی جامد نیاز است که ابتدا دو فاز لیپیدی و آبی تهیه شود. برای ساخت فاز لیپیدی ۲۵۰ میلی گرم کلسترول در ۱۵ میلی‌لیتر ترکیب اتانول و استون مخلوط شد و بشر حاوی مواد روی هیتراستیرر تا انحلال کامل کلسترول و رسیدن دما به ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور ساخت فاز آبی، ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ گرم توئین ۸۰ و ۲۰۰ میلی گرم داروی گلاتیرامر به مدت چند ثانیه با استفاده از هموژنایزر با فشار بالا و دور (round per minute) ۱۰۰۰۰ به صورت یکنواخت مخلوط شدند.

فاز لیپیدی داغ به صورت آهسته به فاز آبی در حین هموژنیزاسیون اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ هموژنیزه شد. در حین سرد شدن مخلوط تا دمای اتاق، نانوذرات تشکیل شدند.

تعیین ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانو ذرات تهیه شده در شرایط برون تن

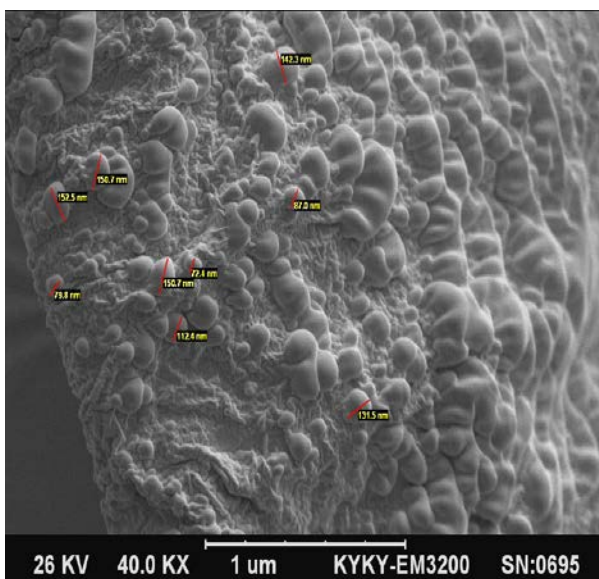
جهت تعیین مقدار داروی مورد نظر و حصول اطمینان از منطبق بودن آن با معیارهای از پیش تعیین شده نمونه استاندارد، تست‌های اعتبار سنجی تعیین مقدار دارو انجام می‌پذیرد. در این پژوهش، از روش UV اسپکتروفوتومتری استفاده شد. گلاتیرامر طبق منابع در طول موج ۲۳۵ نانومتر حداکثر میزان جذب را دارد (λ_{max}) و از این طول موج در رسم منحنی کالیبراسیون برای این دارو استفاده شد، زیرا

تعیین میزان بارگیری دارو

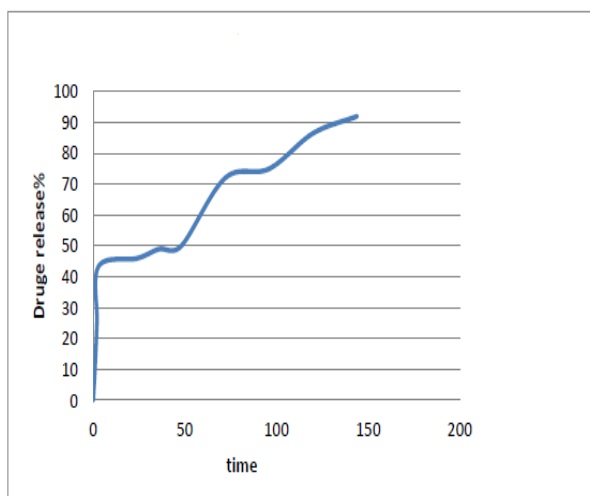
با استفاده از روش معکوس که در قسمت روش‌ها توضیح داده شد، میزان بارگیری دارو در نانوذرات تهیه شده ۷۱٪ تعیین شد.

الگوی رهش دارو از خلال نانوذرات

بررسی‌ها نشان داد که با بارگیری نانوذرات بر روی حامل‌های کلسرولی، رهش دارو بسیار آهسته می‌شود. البته یک آزادسازی سریع در ساعات اولیه در حدود ۴۰٪ مشاهده شد که می‌تواند به علت استرس ناشی از فرایند لیوفیلیزاسیون باشد. نمودار ۲ الگوی رهش دارو را نشان می‌دهد که مشخصاً بعد از ۱۲۰ ساعت بیش از ۸۰٪ دارو آزاد شده است.



شکل ۱. تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات حاوی گلاتیرامر.



نمودار ۲. الگوی رهش دارو از نانوذرات تهیه شده.

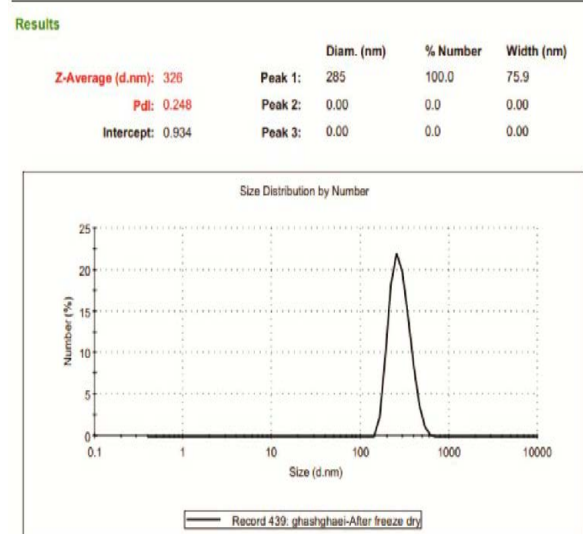
تعیین اجزا و مقادیر نهایی در فرمولاسیون ذرات

پس از اعمال تغییرات در متغیرهای مستقل و مطالعه اثر آن بر روی متغیرهای وابسته بویژه سایز ذرات، مقادیر مناسب جهت فرمولاسیون ساخت نانوذرات لیپیدی جامد گلاتیرامر در این مطالعه عبارت بودند از:

- فاز لیپیدی: کلسترول ۲۵۰ میلی گرم، اتانول و استون با نسبت ۳ به ۱ در مجموع ۱۵ میلی لیتر
- فاز آبی: گلاتیرامر ۲۰۰ میلی گرم، آب دیونیزه ۷۵ میلی لیتر، توئین ۸۰ به میزان ۰/۱٪
- مدت زمان مناسب جهت هموژنایز محلول و عدم آسیب فیزیکی: ۷ دقیقه

تعیین اندازه ذره‌ای SLNهای حاوی گلاتیرامر

ذرات در شرایط بهینه شده متوسط اندازه ذره‌ای ۲۸۵ نانومتر با شاخص پراکندگی اندازه ذره‌ای معادل ۰/۲۸۵ را نشان دادند. شاخص‌های پراکندگی اندازه ذره‌ای کمتر از ۰/۷ در داروسازی بسیار مناسب به شمار می‌روند. نمودار ۱ نمایشی از نتایج حاصل از دستگاه زتاسایزر برای ذرات تهیه شده است.



نمودار ۱. نتیجه بررسی اندازه ذره‌ای و شاخص توزیع اندازه ذره-ای SLNهای حاوی گلاتیرامر

بررسی مورفولوژی نانوذرات تهیه شده

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی موید نتایج سایز حاصل از متد DLS و وجود ذرات کروی است. شکل ۱ تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی را نمایش می‌دهد.

بحث

در مطالعات گوناگونی، به منظور کاهش عوارض دارو و افزایش سازگاری بیمار در داروهای خوراکی و تزریقی به منظور کنترل ام اس، روش‌های مختلفی مانند طراحی و ساخت میکروذرات و نانوذرات با هدف مصرف با فواصل بیشتر تجویز پیشنهاد شده‌اند (۱۱).

در این پژوهش جهت طراحی سامانه دارورسانی برای درمان بیماری ام اس از داروی گلاتیرامبارگیری شده در SLN استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که شانس ماندگاری دارو در بدن در این حالت در مقایسه با داروهای ضد ام اس دیگر به میزان چشمگیری می‌تواند افزایش داشته باشد که متعاقب این تاثیر دوز مصرفی قابل کاهش و فواصل مصرف دارو قابل افزایش خواهد بود.

سیستم‌های ذره‌ای با پایه لیپیدی برای درمان ام اس کمتر بررسی شده‌اند، اگر چه آنها ایمن شناخته شده‌اند. در میان سیستم‌های لیپیدی بیشتر مطالعات بر روی لیپوزوم‌ها انجام شده‌اند، در حالی که توجه کمتری بر ذرات لیپیدی جامد شده است. ذرات لیپیدی جامد ویژگی‌های سودمند فراوانی، از قبیل تولید بدون استفاده از حلال‌های آلی، افزایش محتوای دارویی و

افزایش پایداری فرمولاسیون‌های دارویی دارند (۱۲، ۱۳). لذا در این مطالعه به ساخت نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) حاوی داروی ضد ام اس گلاتیرامر پرداخته شد و فاکتورهای گوناگونی از قبیل اندازه و پتانسیل زتا و مورفولوژی نانوذرات، سرعت آزادسازی دارو، میزان درصد انباشتگی دارو درون SLN و تاثیر فریزدرایینگ بر نانوذرات در محیط برون تن مورد بررسی قرار گرفت. درمان‌های جاری بیماری ام اس با استفاده از مسیرهای معمول، مانند خوراکی و یا تزریق درون ماهیچه-ای است که برپایه دوز بالا و تجویزهای مکرر جهت حفظ غلظت درمانی دارو در سایت مورد نظر به دلیل نفوذ ضعیف دارو و فراهمی زیستی پایین دارو طراحی شده‌اند. در این پروژه سعی شد به برخی مشکلات موجود در درمان با گلاتیرامر غلبه شود. نتایج این مطالعه نشان داد سامانه طراحی شده از نظر سائز و شکل و میزان بارگیری دارو و الگوی رهایش شرایط مناسبی دارد و به نظر می‌رسد که در آینده با تکمیل مطالعات از جمله بررسی پایداری و مطالعات حیوانی بتوان به این سامانه دارورسانی به عنوان یک سیستم امیدوارکننده نگاه کرد.

REFERENCES

1. Kobelt G, Berg J, Atherly D, Hadjimichal O. Costs and Quality of Life in Multiple Sclerosis: A Cross Sectional Study in the United States. *Neurology* 2006;66:1696-1712.
2. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840-6.
3. Kurtzke J. Rating Neurological Impairment in Multiple Sclerosis: An Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-1452.
4. Wubgerchuck D, Noseworthy J, Weinshenkar B. Clinical Outcome Measures and Rating Scales in Multiple Sclerosis Trials. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 1171-1179.
5. Gray O, Butzkueven H. Measurement of disability in multiple sclerosis. *Neurol Asia* 2001;13:153-156.
6. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 2002;53:215-312.
7. Smith B, Carson S, Fu R, McDonagh M, Dana T, Chan BKS, et al. Drug Class Review: Disease-modifying Drugs for Multiple Sclerosis: Final Update 1 Report [Internet]. Portland (OR): Oregon Health & Science University; 2010.
8. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:161-77.
9. Pardeike J, Hommoss A, Muller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2007: 114-117.
10. Alihoseyni F, Ghaffari S, Dabirsiaghi AR, Haghighat S. Preparation and evaluation of ampicillin solid lipid nanoparticles. *World J Pharm Sci* 2014;2:914-20.
11. Rao SM, Leo GJ, Ellington L, Nauertz T, Berbardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology* 1991;41: 692-696.
12. El-Harati AA, Charcosset C, Fessi H. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contactor. *Pharm Dev Technol* 2006;11:153-7.
13. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, Mc Clements DJ, Weiss J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Colloid Interface Sci* 2009; 334:75-81.