● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دوازدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۲۹-۱۱۹، ۱۳۸۴

مقالهٔ پژوهشی

فرمولاسیون نیوزوم‌های حاوی انسولین و بررسی اثر تجویز خوراکی آنها بر کاهش قندخون موش‌های صحرایی دیابتی

دکتر عباس پرداختی[*۵]، دکتر ژاله ورشوساز[۲]، دکتر ولی‌الله حاج‌هاشمی[۳] و دکتر عبدالحسین روح‌الامینی نجف‌آبادی[۴]

خلاصه

وزیکول‌های چندلایه‌ای (نیوزوم) از سورفکتانت‌های پلی‌اکسی‌اتیلن آلکیل اتر (بریج ۵۲، ۷۲، ۷۶ و۹۲) به روش کلاسیک هیدراتاسیون لایه چربی تهیه و توانایی تشکیل نیوزوم در حضور و عدم حضور کلسترول ارزیابی گردید. همه سورفکتانت‌های مورد استفاده در غیاب کلسترول تشکیل نیوزوم دادند. به منظور بررسی توانایی محصورسازی و خصوصیات آزادسازی فرمولاسیون‌ها از انسولین نوترکیب انسانی به عنوان داروی پروتئینی مدل استفاده شد. میزان آزادسازی انسولین در محیط مشابه روده (SIF) و محیط مشابه معده (SGF) از نیوزوم‌های بریج ۹۲ کمتر از سایر فرمولاسیون‌ها بود. نیوزوم‌های بریج ۹۲ همچنین بیشترین درصد حفاظت انسولین در مقابل اثر پروتئولیتیک پپسین و تریپسین را به نمایش گذاردند. دیابت در موش‌های صحرایی نر (Wistar) با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۵mg/kg) القاء گردید. در حیوانات دریافت کننده انسولین (۱۰۰IU/kg) محصور در نیوزوم (بریج ۵۲ و ۹۲) گلوکز خون کاهش و سطح سرمی انسولین افزایش یافت. میزان کاهش گلوکز خون در گروه دریافت کننده نیوزوم‌های بریج ۹۲ از نظر آماری با گروه‌های کنترل تفاوت معنی‌دار داشت ($P< ۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی : انسولین، دارورسانی خوراکی، پلی‌اکسی‌اتیلن آلکیل اترها، نیوزوم.

۱- استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کرمان ۲- دانشیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اصفهان ۳- دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اصفهان۴- استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

* **نویسنده مسؤول:** کرمان، ابتدای جاده هفت باغ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی

دریافت مقاله: **۱۳۸۲/۳/۳۱** دریافت مقاله اصلاح شده: **۱۳۸۴/۳/۲۱** پذیرش مقاله: **۱۳۸۴/۴/۱**

مقدمه

تجویز غیر تزریقی داروهای پپتیدی و پروتئینی نظیر انسولین توسط محققین متعددی مورد آزمایش و بررسی قرار گرفته است. تجویز خوراکی این گونه از داروها به دلیل مقبولیت و سهولت مصرف نزد بیماران بیشتر مورد توجه بوده، لیکن ساختار شیمیایی حساس و شکل سه بعدی مولکول‌های پروتئینی و تخریب در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک، دارورسانی از این راه را با محدودیت‌های جدی روبرو ساخته است. در طی سال‌های اخیر سیستم‌های جدید ریزذره (microparticulate) برای تجویز خوراکی انسولین مورد مطالعه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به میکرواسفرها (۱،۱۸،۲۴)، میکروکپسول‌ها (۲۳،۲۵)، نانوکپسول‌ها (۶،۹،۱۲)، nanocubicles (۸) و لیپوزوم‌ها (۱۵،۱۷،۱۹،۳۱،۳۶،۳۷) اشاره نمود. در این میان لیپوزوم‌ها بیش از سایر سیستم‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما حساسیت به حرارت واکسیداسیون سریع مواد اصلی تشکیل دهنده ساختار لیپوزوم یعنی فسفولیپیدها، استفاده از ترکیبات پایدارتر و در عین حال زیست سازگار(biocompatible) را به عنوان جایگزین فسفولیپیدها مطرح ساخته است (۲۱). سورفکتانت‌های غیریونی از جمله این ترکیبات می‌باشند که در حضور کلسترول تشکیل وزیکول‌های بادیواره دو لایه (bilayer)به نام niosome می‌دهند. این نوع سیستم‌های وزیکولی به دلیل قیمت پایین، پایداری بالا، سهولت نگهداری مواد اولیه و فرمولاسیون‌های نهایی در درجه حرارت اتاق و همچنین دسترسی به تعداد زیادی از سورفکتانت‌های تشکیل دهنده ساختار دو لایه در تحقیقات پایه دارویی و در صنایع آرایشی مورد توجه زیاد واقع شده‌اند (۳۲). استفاده از نیوزوم‌ها برای دارورسانی ترکیبات پپتیدی و پروتئینی مانند آلفا اینترفرون (۲۵،۲۷)، آلبومین سرم گاوی (۵،۲۶)، آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوآنزا (۷)، ایمونوژن ضدبارداری مبتنی بر GnRH (۱۱)، انسولین (۱۶،۳۴)، سیکلوسپورین A (۲۵،۲۷)، فاکتور محرک دودمان ماکروفاژ-گرانولوسیت انسانی نوترکیب (rhGM-CSF) (۲۲)، ۹- دزگلایسین‌آمید- ۸- آرژینین وازوپرسین (DGAVP) (۳۸)، Ovalbumine (۲۸)، LHRH (۳) و vasoactive intestinal peptide (۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه استفاده از این نوع سیستم وزیکولی به اشکال گوناگونی نظیر افزایش میزان جذب دارو، بهبود اثربخشی و یا کاهش سمیت ظاهر شده است.

در تحقیق حاضر مطالعات برون‌تنی فرمولاسیون‌های برگزیده و قابلیت کاربرد نیوزوم‌ها در دارورسانی خوراکی داروی پروتئینی مدل، انسولین نوترکیب انسانی، در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسین مورد آزمایش قرار گرفته است.

مواد و روش کار

پودر انسولین نوترکیب انسانی (۲۷/۵ IU/mg، Eli Lilly، فرانسه) اهدایی شرکت داروسازی اکسیر، کلسترول (Sigma ، آمریکا)وسورفکتانت‌های غیریونی ازدسته پلی‌اکسی‌اتیلن‌الکیل اترها (C_nEO_m, Brijs^{TM}) شامل بریج ۵۲ ($C_{16}EO_2$)، بریج ۷۲ ($C_{18}EO_2$)، بریج ۷۶ ($C_{18}EO_{10}$)و بریج ۹۲ ($C_{9=9}EO_2$) (Fluka ، سوئد)در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند.سایر مواد، حلال‌ها و اجزاء سیستم بافری از Merck (آلمان) تهیه شدند.

تهیه نیوزوم‌ها به روش هیدراتاسیون لایه چربی صورت پذیرفت (۴). در این روش نسبت‌های مولی مختلف سورفکتانت/کلسترول(۰/۱۰۰،۱۰/۹۰،۳۰/۷۰،۴۰/۶۰و ۵۰/۵۰ درصد مولی) دریک بالن ته گرد ۱۰۰ میلی‌لیتری توسط کلروفرم حل شده و سپس حلال آلی با دستگاه تبخیر در خلأ خارج گردید. لایه نازک چربی حاصله با افزودن ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی انسولین (۲۰IU/mL)در ۵۵^{o}C به مدت ده دقیقه هیدراته شد. نیوزوم‌های حاصله به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق و سپس برای مطالعات بعدی در یخچال نگهداری شد. تشکیل نیوزوم و شکل ظاهری آنها با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر توسط میکروسکوپ نوری (HFX-DX, Nikon, Japan) بررسی شد. توزیع اندازه ذره‌ای نیوزوم‌ها به وسیله بررسی پراشیدگی پرتو لیزر (Malvern Master Sizer، انگلستان) مورد مطالعه قرار گرفت.

در تمامی مراحل این تحقیق تعیین مقدار انسولین با استفاده ازکیت‌های radioimmunoassay، RIA (Biosource بلژیک) انجام پذیرفت.پس از مطالعات اولیه، نسبت مولار ۷۰/۳۰ از کلسترول/سورفکتانت بنوان فرمولاسیون مناسب انتخاب و بقیه مراحل تحقیق با این ترکیب ساختاری نیوزوم‌ها ادامه یافت. دلیل انتخاب این فرمولاسیون‌ها توزیع اندازه ذره‌ای مناسب، عدم تشکیل یا جداشدن بلورهای کلسترول و پایداری فیزیکی نیوزوم‌های حاصله بود. پایداری فیزیکی به صورت ماکروسکوپی و بررسی جداشدن فازها با مشاهده چشمی کنترل گردید.

برای تعیین درصد احتباس انسولین در نیوزوم‌ها، در ابتدا پلت‌نیوزومی با اولتراسانتریفوژ (۴۰۰۰۰×g) (90 XL

Ultracentrifuge, Beckman, USA) جداسازی گردیده و مقدار داروی محبوس پس از انحلال پلت در ایزوپروپیل الکل تعیین شد. مقدار انسولین در مایع شفاف فوقانی نیز اندازه‌گیری شده و سپس درصد احتباس دارو در نیوزوم‌ها از رابطه ذیل محاسبه گردید:

$$\text{درصد احتباس انسولین} = \frac{\text{انسولین موجود در پلت نیوزومی} \times ۱۰۰}{\text{مقدار انسولین درمایع شفاف فوقانی} + \text{انسولین موجود در پلت نیوزومی}}$$

برای بررسی میزان آزادسازی انسولین، در ابتدا پلت حاصل ازسانتریفوژ سوسپانسیون نیوزومی (g ×۱۳۰۰۰، ۱۰ دقیقه) دوبار شستشو داده شد و نهایتاً در PBS مجدداً به شکل سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون حاصله به میزان ۱۰ برابر در محیط مشابه معدی (USP SGF) و یا محیط مشابه روده‌ای (USP SIF) به شکل نمونه‌های یک میلی‌لیتری در لوله‌های پلی‌اتیلنی ۵ /۱ میلی‌لیتری دربدار (Eppendorf) قرار داده شد. لوله‌ها در حمام- همزن ۳۷ ^{o}C (با سرعت ۱۰ سیکل در دقیقه) قرار داده شد. هر لوله برای یک نقطه زمانی مورد استفاده قرار گرفت و برای هرزمان سه لوله Eppendorf در نظر گرفته شد. میزان آزادسازی در SGF به مدت ۴ و در SIF به مدت ۲۴ ساعت مطالعه گردید. در زمان‌های مختلف محتویات لوله سانتریفوژ و مایع فوقانی دور ریخته شد. پلت نیوزومی حاصل در یک میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل حل گردید تا انسولین باقیمانده آزاد شود و سپس داروی باقیمانده تعیین مقدار گردید.

در این مطالعه میزان حفاظت انسولین محبوس نیوزومی در حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک از محلول پپسین (۵IU/ml) در بافر گلایسین با pH برابر با ۱/۲ و محلول تریپسین (۷۰۴ IU/ml) در بافر فسفات با pH برابر با ۷/۸ استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون نیوزومی رقیق شده با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول پپسین در ۳۷ ^{o}C به مدت یک ساعت انکوبه گردید. در مورد تریپسین شرایط مشابه اعمال گردید با این تفاوت که زمان انکوباسیون ۳ ساعت بود (۲۴). علت تفاوت زمان انکوباسیون در SIF طولانی تر بودن زمان توقف مواد در روده در مقایسه با معده می‌باشد. پس از انکوباسیون ۲۰۰ میکرولیتر نمونه سوسپانسیون در g×۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از جداسازی مایع شفاف فوقانی، ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۵٪ از تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA) به منظور غیرفعال‌سازی مقادیر جزئی باقیمانده از آنزیم‌های پروتئولیتیک به پلت اضافه شد(۲۹). پس از آن نیم میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل به منظور حل کردن پلت نیوزومی اضافه و انسولین باقیمانده تعیین مقدار گردید.

در مطالعه درون‌تنی القاء دیابت توسط تجویز داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۵mg/kg) در موش‌های صحرایی نر (Wistar) با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام پذیرفت. ۱۰ روز پس از تجویز استرپتوزوتوسین، حیوانات دارای علائم دیابت (پرنوشی، پرخوری، پرادراری) جداسازی و با تعیین مقدار گلوکز خون نمونه‌گیری شده از ورید دم به روش گلوکز اکسیداز (پارس‌آزما، ایران) در صورتی که گلوکز خون بالای ۲۵۰mg/dl بود، ایجاد دیابت تأیید گردید. ۳۰ عدد موش صحرایی دیابتی شده در گروه‌های ۶ عددی و در قفس‌های جداگانه نگهداری و ۱۲ ساعت قبل از تجویز خوراکی فرمولاسیون‌ها تغذیه خوراکی قطع و آب به صورت آزاد (ad libitum) در اختیار قرار داده شد. براساس تقسیم‌بندی ذیل هر گروه از نظر تغییرات پلاسمایی گلوکز و انسولین خون مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های دریافت‌کننده شکل خوراکی از طریق لوله دهانی- معدی دوز دارو را دریافت کردند.

گروه ۱: ۱۰۰ IU/kg انسولین به شکل سوسپانسیون نیوزومی بریج ۵۲ خوراکی

گروه ۲: ۱۰۰ IU/kg انسولین به شکل سوسپانسیون نیوزومی بریج ۹۲ خوراکی

گروه ۳: ۱۰۰IU/kg محلول انسولین آزاد در PBS خوراکی

گروه ٤: (شاهد منفی)- محلول PBS بدون انسولین (یک میلی‌لیتر)

گروه ۵: (شاهد مثبت) – ۲ IU/kg محلول انسولین به روش تزریق زیرجلدی.

زمان تجویز فرمولاسیون به عنوان زمان صفر در نظر گرفته شد و در طی ۴ ساعت نمونه‌گیری خون به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از طریق retro orbital انجام پذیرفت. نمونه‌های خون در درجه حرارت اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم جداسازی و تا تعیین مقدار گلوکز و انسولین در فریزر ۲۰^{o}C- نگهداری گردید.

در تمام مراحل این تحقیق، برای مقایسه آماری از تست ANOVA یک‌طرفه با Duncan post Hoc در نرم‌افزار آماری SPSS v10/win استفاده گردید و سطح آماری معنی‌دار، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تمام سورفکتانت‌های مورد مطالعه در عدم حضور کلسترول و در حضـور نسـبت‌های مولار (۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد) کلسترول تشـکیل نـیوزوم‌هـای چندلایه (MLV) دادند (جدول ۱). در تصـویر ۱ نمای میکروسکوپی برخی از نیوزوم‌های تشکیل شده نشـان داده شـده است. در حضور ده درصد کلسترول، بریج ۷۶ تشکیل نیوزوم نداد که این مسئله می‌تواند ناشی از HLB بالای ایـن ماده، تشکیل میسل و محلول‌سازی کلسترول در این نسبت مولی باشد.

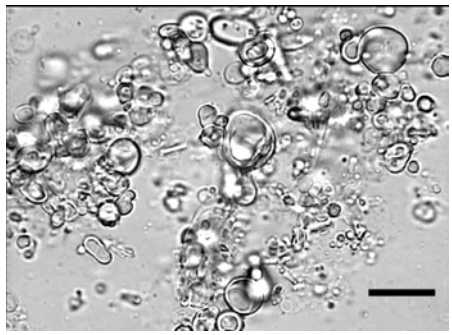
جدول ۱: *توانایی تشکیل نیوزوم توسط سورفکتانت‌های مورد بررسی در حضور مقادیر مختلف کلسترول*

سورفکتانت	نسبت مولی سورفکتانت/کلسترول				
	۰/۱۰۰	۱۰/۹۰	۳۰/۷۰	۴۰/۶۰	۵۰/۵۰
بریج ۵۲	+	+	+	+	+
بریج ۷۲	+	+	+	+	+
بریج ۷۶	+	+	+	+	+
بریج ۹۲	+	+	+	+	+

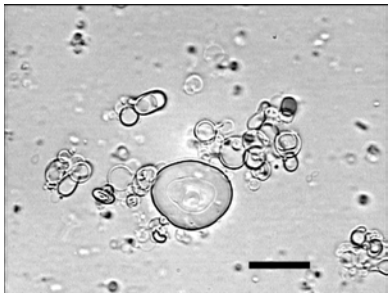
جدول ۲: *قطر میانگین حجمی* (d_v) *نیوزوم‌ها و درصد احتباس* (EE) *انسولین در فرمولاسیون‌های تهیه شده* (mean±SD)

درصد مولی کلسترول	بریج ۵۲		بریج ۷۲		بریج ۷۶		بریج ۹۲	
	d_v(μm)	EE	d_v(μm)	EE	d_v(μm)	EE	d_v(μm)	EE
۰	۲۴/۰±۰/۵	&	۴۱/۸±۰/۷	&	۱۲/۶±۰/۷	&	۵/۲۳±۰/۳	&
۱۰	۲۶/۷±۲/۱	&	۳۳/۹±۲/۶	&	×	&	۱۸/۲±۲/۹	&
۳۰	۱۳/۴±۰/۲	۴۰/۲±۴/۲	۱۲/۱±۰/۶	۴۰/۰۶±۵/۱	۴/۶±۰/۱۳	۲۷/۷±۴/۲	۶/۴±۰/۱۲	۴۱/۵±۱/۹
۴۰	۹/۳۸±۰/۲	۲۹/۸±۷/۳	۱۵/۹±۰/۳	۲۷/۹۳±۲/۱	۵/۷±۰/۴	۳۷/۵±۴/۰	۲۱/۹±۲/۵	۳۹/۴±۳/۲
۵۰	۸/۱±۰/۲	۳۵/۹±۲/۹۶	۱۵/۲±۰/۶	۳۹/۳±۲/۴	۹۴/۴±۰/۱	۳۲/۶±۲/۸	۱۱/۲±۱/۳	۳۹/۴±۲/۴

نیوزوم تشکیل نشد. & درصد احتباس انسولین به دلیل عدم تشکیل یا کم بودن تعداد نیوزوم‌ها تعیین نگردید.



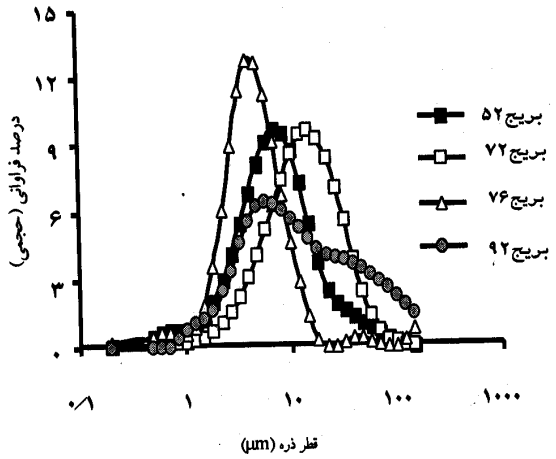
(الف)



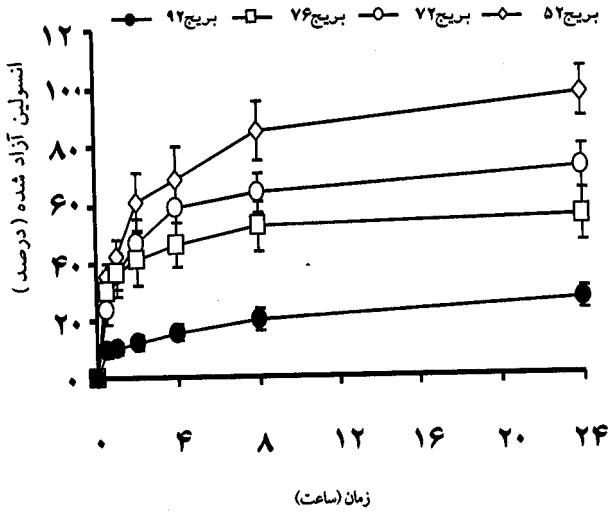
(ب)

تصویر ۱: *نیوزوم‌های حاوی انسولین تهیه شده به روش هیدراتاسیون لایه نازک چربی. نیوزوم‌ها متشکل از نسبت مولی ۳۰/۷۰ از الف) بریج ۵۲/کلسترول و ب) بریج ۹۲/کلسترول بودند. درشت‌نمایی تصاویر ۱۰۰۰ برابر و علامت پایین هر تصویر معادل ده میکرومتر می‌باشد.*

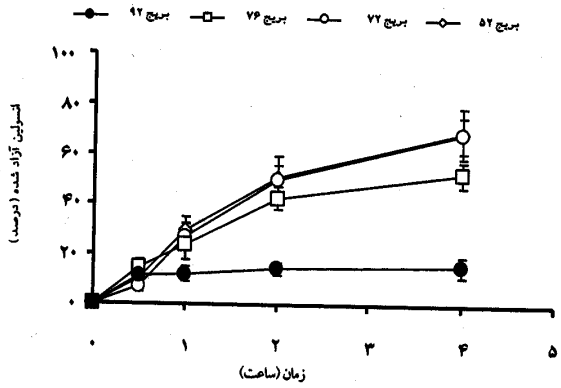
نمودارهـای توزیـع ذره‌ای نیوزوم‌های تشکیل شده مبین توزیع log – نـرمال بود (نمودار ۱). در تمام نیوزوم‌های مورد بررسی بـه غیر از بریج ۹۲، اندازه نیوزوم‌ها در غیاب کلسترول، بزرگ بـود (جدول ۲) که قابلیت انعطاف دو لایه‌های بدون کلسترول بـه خصـوص در درجـه حـرارت‌هـای بـالا بـه تشکیل چنین نـیوزوم‌هایـی منتهـی مـی‌گردد (۳۲). جدول ۲ نشان‌دهنده d_v نیوزوم‌ها در حضور نسبت‌های مختلف مولی کلسترول و درصد محـبوس‌سازی انسولین می‌باشد. حداکثر درصد احتباس انسولین در نـیوزوم‌هـای بـریج ۹۲ درحضـور نسـبت مولی ۳۰ درصد کلسـترول برابر با ۱/۸۶±۴۱/۵ درصد و حداقل درصد احتباس در نـیوزوم‌هـای بـریج ۷۶ بـه میزان ۳/۹۷±۲۸/۶۹ درصد بوده اسـت. تفـاوت معنـی‌دار آمـاری بیـن احتـباس انسـولین در فرمولاسیون‌های مختلف وجود نداشت (P>۰/۰۵).



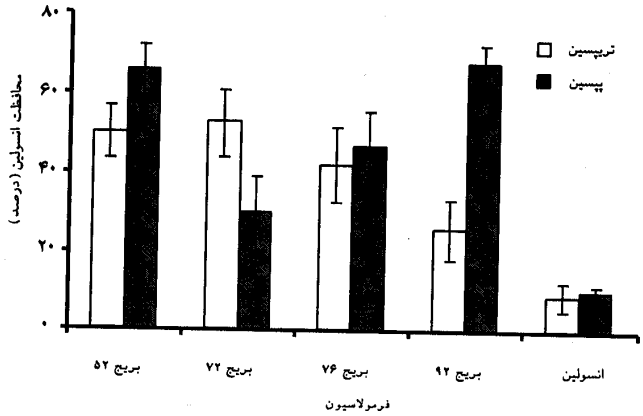
نمودار ۱: *توزیع اندازه ذره‌ای نیوزوم‌های متشکل از نسبت ۳۰/۷۰ درصد مولی از سورفکتانت/کلسترول. نیوزوم‌ها به روش کلاسیک هیدراتاسیون لایه نازک چربی تهیه شده اند.*



نمودار ۲: *آزادسازی انسولین در محیط مشابه روده (SIF) از نیوزوم‌های حاوی ۳۰درصد مولی کلسترول (n=۳)*

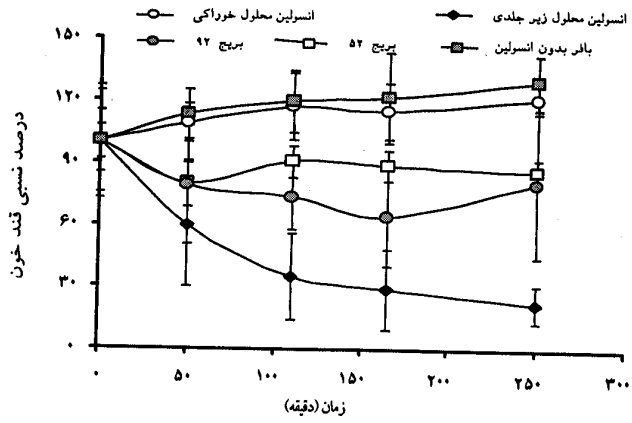


نمودار ۳: *آزادسازی انسولین در محیط مشابه معده (SGF) از نیوزوم‌های حاوی ۳۰ درصد مولی کلسترول (n=۳)*

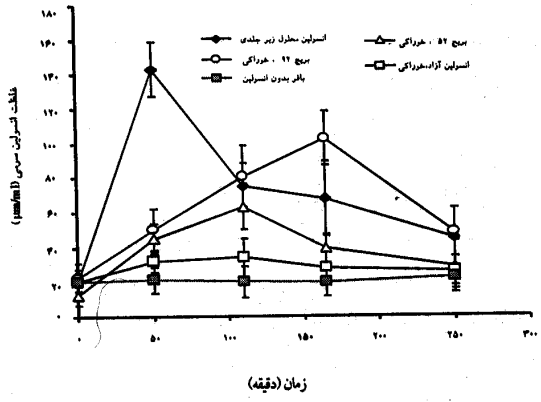


نمودار ٤: *میزان محافظت انسولین محبوس در نیوزوم‌های متشکل از نسبت ۳۰/۷۰ درصد مولی سورفکتانت/ کلسترول*

در مقابل اثر پروتئولیتیک پپسین و تریپسین (n=۳)



نمودار ۵: *تغییر سطح سرمی گلوکز متعاقب تجویز خوراکی IU/kg ۱۰۰ انسولین محبوس نیوزومی و IU/kg ۲ انسولین زیر جلدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (n=۶)*



نمودار ٦: *تغییر سطح سرمی انسولین متعاقب تجویز خوراکی IU/kg ۱۰۰ انسولین محبوس نیوزومی و IU/kg ۲ انسولین زیر جلدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (n=۶)*

نمودارهـای ۲ و ۳ بـه ترتیب میزان آزادسازی انسولین در SIF و SGF در ۳۷°C را به نمایش می‌گذارند. کمترین مقدار رهـایش دارو در SGF و SIF مربوط به بریج ۹۲ و به ترتیب برابـر بـا ۱۵/۳۲±۴/۱۲ و ۲۶/۳۱±۳/۹۸ درصـد بود. این مقدار آزادسـازی در مقایسـه بـا سـایر نـیوزوم‌ها به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). این مسئله ممکن است به دنبال تشکیل کمپلکس بین دارو و اجزاء فرمولاسیون ایجاد شده باشد (۱۴).

درصـد محافظـت انسولین در حضور پپسین و تریپسین در نمـودار ۴ آورده شـده اسـت. احتباس انسولین در نیوزوم‌ها در مقایسه با انسولین آزاد حفاظت مؤثر و بالایی را نشان داد (۰۵/ P<۰).

تغیـیر سـطح گلوکـز و انسولین در سرم حیوانات دیابتی مورد مطالعـه در نمودارهـای ۵ و ۶ ارائه گردیده است. در دو گروه دریافـت‌کـنـنده انسـولین خوراکی محبوس در نیوزوم، گلوکز خـون در مقایسـه با گروه‌های کنترل (PBS و محلول انسولین آزاد) افت نمود که درمورد بریج ۹۲ این کاهش معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵).سـطح بالای منحنی کاهش گلوکز خون ($AAC_{0-250\ min}$) در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده بریج ۵۲ و ۹۲ به ترتیب برابر با ۱۳/۸۷×۱۰^۳±۸/۵۱×۱۰^۳ و ۲۵/۱۰×۱۰^۳±۱۰/۸۹×۱۰^۳ $mg.dL^{-1}.min$ بود.

به طور هم‌زمان سطح انسولین خون در گروه‌های دریافت کننده فرمولاسـیون نیوزومی خوراکی افزایش یافت. سطح زیر منحنی افزایش انسولین خون ($AUC_{0-250\ min}$) در موش‌های صحرایی دریافـت کـنـنده فرمولاسـیون‌هـای خوراکی بریج ۵۲ و ۹۲ به ترتیـب برابر با ۱۳/۹۸×۱۰^۳±۴/۴۶×۱۰^۳ و ۲۳/۴۶×۱۰^۳±۵/۲۸×۱۰^۳ $\mu U.ml^{-1}.min$ بـود. بدیـن ترتیـب مشخص گردید که تجویز خوراکـی انسـولین نیوزومـی بـا جـذب سیستمیک هورمون و کاهش گلوکز خون همراه می‌باشد.

بحث

سـورفکتانت‌های غیر یونی از دسته پلی‌اکسی‌آلکیل‌اتر در حضـور کلسترول به خوبی تشکیل نیوزوم داده و برای محـبوس‌سـازی دیـترانول، لیدوکائیـن، اسـترهای PABA، استرادیول و تریامسینولون استوناید (۳۳) مورد استفاده قرار گرفـته‌اند. در مجموعه سورفکتانت‌های مورد استفاده، بریج ۷۲ بـا HLB(hydrophilic-lipophilic balance) برابـر بـا ۴/۹ دارای حداقـل وبـریج ۷۶ بـا HLB برابـر بـا ۱۲/۴ دارای حداکـثر قطبیت در ساختار مولکولی خود بودند. این دامنه وسـیع HLB در مـورد سـورفکتانت‌های غیریونی از دسته اسـترهای سـوربیتان و مشـتقات پلـی‌اکسی‌اتیلن استرهای سوربیتان نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۳۹).

روش هیدراتاسـیون لایـه نـازک چربـی در سـاخت لیـپوزوم‌هـای حاوی انسولین نیز مورد استفاده قرار گرفته ونتایج حاصله مؤید پایداری مناسب انسولین در طی فرایند سـاخت وزیکـول‌هـا بـوده‌است (۳۰). این روش در تهیه

نـیوزوم‌هـای حاوی LHRH نیز استفاده شده‌است (۳). توزیع انـدازه ذره‌ای زنگوـله‌ای شـکل(bell-shape) و انحـراف اسـتاندارد پایین در مورد قطر حجمی اندازه‌گیری شده به روش پراش پرتولیزر مشخص کننده روش مناسب ساخت می‌باشد. در نیوزوم‌های بریج ۵۲ افزایش درصد مولی کلسترول از ۱۰ به ۵۰ درصد مولی منجر به کاهش معنی‌دار اندازه وزیکول‌ها گردید (P<۰/۰۵). همچنیـن در نـیوزوم‌های بریج ۷۲ به دنبال افزایش درصـد مولی کلسترول از ۰ به ۳۰ درصد با کاهش قطر حجمی نـیوزوم‌هـا همراه بود (جدول ۲). از آنجا که کلسترول افزایش دهنده نظم ساختار دو لایه‌ای وزیکول‌ها می‌باشد، افزایش درصد مولـی کلسـترول در برخی از نیوزوم‌های پلی‌اکسی‌اتیلن آلکیل اتـر به کاهش اندازه ذره ای منتهی می‌شود(۳۳). در نیوزوم‌های بریج ۹۲، افزایش درصد کلسترول از ۳۰ به ۴۰ درصد به افزایش میانگیـن قطـر حجمی (d_v) نیوزوم‌ها منجر گردید (P<۰/۰۵). افـزایش تعـداد دو لایه‌ها در اثر حضور مقادیر بالای کلسترول می‌تواند توجیه کننده این افزایش اندازه باشد(۱۴).

درصد محبوس‌سازی (EE) انسولین در این تحقیق (جدول ۲) مشابه نتایج EE این هورمون در لیپوزوم‌های روکش داده شده با مشتقات مختلف گلیکوزیدی بوده است (۳۰). با توجه به اینکه نقطه ایزوالکتریک انسولین در حدود ۵/۵ می‌باشد، در pH های بالاتر از این عدد، مولکول انسولین دارای بار منفی خواهد بود و در این شرایط وارد کردن مواد دارای بار مثبت، نظیر استئاریل‌آمین، در ساختار لیپوزوم منجر به افزایش درصد احتباس دارو می‌گردد (۱۳).

محل استقرار مولکول‌های انسولین در ساختارهای وزیکولار بـا توجـه بـه ماهیت آمفی‌فیل این پروتئین، در سطح و بینابین لایـه‌هـای دوگانـه مـی‌باشد (۱۵). همین امر منجر به پروفایل آزادسازی متشکل از فاز سریع اولیه، جداشدن از سطح نیوزوم، و فـاز کـند ثانویـه، عـبور انسـولین از لایـه‌هـای متعدد دوگانه نیوزومـی، مـی‌گـردد (نمودارهای ۲ و ۳). آزادسازی مبتنی بر دیفوزیـون مولکـول‌هـای کوچـک آبدوسـت مـثل -(6)-5 carboxyfluoroscein(CF) از سـاختارهای چـندلایه لیپوزومی یا نیوزومی سریع‌تر از آزادسازی ماکرو مولکول‌هایی نظـیر انسولین می‌باشد (۲۰). در تحقیق حاضر کندترین سرعت آزادسـازی در دو محیط مختلف مربوط به نیوزوم‌های بریج ۹۲ بـود (P< ۰/۰۵). بـا توجـه به مایع بودن بریج ۹۲ و در نتیجه سـیال بـودن لایـه‌هـای دوگانه حاصله، این آزادسازی کند را مـی‌تـوان بـه تشکیل کمپلکس بین مولکول‌های سورفکتانت و پروتئیـن، مشـابه کمـپلکس بیـن CF و مولکول‌های بریج ۹۷ مربوط دانست (۱۴).

احتـباس انسولین در ساختارهای چندلایه لیپوزومی منجر به حفاظـت پروتئین در مقابل آنزیم‌های مخرب گردیده است که ایـن امـر مـی‌تواند ناشی از عدم دسترسی آنزیم به مولکول‌های محصور انسولین و یا بی‌اثر شدن آنزیم متعاقب جذب سطحی در سطح لایه های دوگانه لیپوزومی‌باشد (۳۷). در تحقیق حاضر نیز حفاظت انسولین به دنبال محصورشدن در نیوزوم‌های متشکل از پلـی‌اکسـی‌اتیلن آلکیل اتر و کلسترول به اثبات رسید. با اینکه بین فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی تفاوت بارز آماری از نظر درصـد محافظـت انسولین وجود نداشت، لیکن بیشترین درصد محافظـت انسولین در مقابل تریپسین مربوط به بریج ۹۲ بود که ایـن مسـئله احتمالا ناشی از آزادسازی کند پروتئین ازاین نوع فرمولاسـیون مـی‌باشد. همچنین مجموع درصد حفاظت انسولین محـبوس در نـیوزوم‌هـای بریج ۵۲ در مقابل پپسین و تریپسین بـیش از سـایر فرمولاسـیون‌هـا بود وبه دلیل مذکور از این دو فرمولاسـیون (بـریج ۵۲ و ۹۲ بـا ۳۰ درصـد کلسترول) برای مطالعه درون‌تنی استفاده شد.

Arrieta-Molero و همکـاران (۲) گزارش داده‌اند که بهترین فرمولاسیون لیپوزومی با دوز IU/kg ۵ منجر به کاهش گلوکـز خـون به میزان ۵۸ درصد مقدار پایه گردیده است. در مـوش‌هـای صـحرایی دریافت کننده دوز زیر جلدی انسولین، سـطح گلوکـز خون به سرعت کاهش یافته و در آخرین زمان نمونه‌برداری(۲۵۰ دقیقه) به حداقل میزان تنزل یافت (نمودار ۵). در مقایسـه بـا گـروه‌هـای کنـترل، در گروهـی نـیز کـه نیوزوم‌های بریج ۹۲ تجویز خوراکی شده بود سطح گلوکز خون بـه طور معنی‌داری(۶۴ درصد مقدار اولیه) کاهش یافت (۰/۰۵ >P). نـتایج این تحقیق مشابه کاهش گلوکز خون به میزان ۶۷ درصـد، پس از تجویز خوراکیIU/kg ۷۰ انسولین محصور در لیـپوزوم‌های با بار منفی روکش داده شده با مشتق کلسترول - مانـــان (cholesteroldrivatized mannan) مـی‌باشـد (۳۰). در گـروه نیوزوم خوراکی بریج ۹۲، حداقل سطح گلوکز در زمان ۱۶۵ دقیقه پس از تجویز خوراکی فرمولاسیون نیوزومی مشاهده شـد کـه بـا زمـان دسترسـی به بالاترین غلظت خونی انسولین (نمـودار ۶) منطبق بود. این مشاهده مبین آن است که انسولین انسانی جذب شده از این فرمولاسیون به گیرنده‌های خود متصل و تسـهیل ورود گلوکـز را بـه بافـت‌هـای مختلف امکان‌پذیر

مـی‌سـازد (۱۹). حصـول حداکثرافـت گلوکز خون در گروه نـیوزوم بـریج ۵۲ خوراکـی برابـر با ۵۰ دقیقه بود که تفاوت معنـی‌داری بین این گروه و گروه شاهد ملاحظه نگردید (۰/۰۵ >P). بـا توجـه بـه ایـن کـه در گروه مذکور حداکثرغلظت پلاسمایی انسولین در زمان۱۱۰ دقیقه ملاحظه گردید (نمودار ۶)، تعیین مقدار کسری از انسولین غیرفعال یا اجزای آن به روش رادیوایمیونواسـی را مـی‌تـوان بـه عـنوان دلـیل عـدم انطباق فارماکوکینتـیک (افـزایش انسـولین پلاسـمایی) و فارماکودینامـیک (کـاهش گلوکز خون) انسولین دراین گروه مطرح نمود. نتیجه مشابهی به دنبال تجویز خوراکی لیپوزوم‌های فسـفاتیدیل اتانول حاوی انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی گزارش شده است (۱۹).

علـی‌رغـم افت قابل توجه گلوکز خون در گروه‌های مورد مطالعـه، بـه دلـیل فراهمی زیستی (bioavailability) پایین انسـولین متعاقب تجویز فرم نیوزوم خوراکی، آزمایشات بیشتر نظـیر روکـش‌دادن نـیوزوم‌هـا با مشتقات کیتوزان، استفاده از ترکیـبات جـذب افزا و مهارکننده‌های آنزیم‌های پروتئولیتیک برای بهبود فرمولاسیون خوراکی این هورمون را طلب می‌نماید.

سپاسگزاری

مؤلفین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل تأمین بودجه طرح پژوهشی (طرح شماره ۷۹۲۲۳) و جناب آقای دکتر فرزندی (شرکت داروسازی اکسیر) به دلیل در اختیار قرار دادن پودر انسولین نوترکیب انسانی تقدیر و تشکر می‌نمایند.

Summary

Formulation of Insulin Containing Niosomes and the Effect of Their Oral Administration on Blood Glucose in Streptozotocin-induced Diabetic rats

Pardakhty A., PhD.,[1] Varshosaz J., PhD.,[2] Haghashemi V., PhD.[3] and Rouhlamini A., PhD.[4]

1. Assistant Professor, Pharmaceutics Department, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Science, Kerman, Iran, 2. Associate Professor, Pharmaceutics Department, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran, 3. Associate Professor, Pharmacology Department, School of Pharmacy, Isfahan University of medical Science, Isfahan, Iran, 4. Assistant Professor, Pharmaceutics Department, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Multilamellar vesicles (noisome) of polyoxyethylene alkyl ether surfactants (Brij 52, 72, 76 and 92) were prepared using classic film hydration method. Vesicle formation ability of the surfactants was assessed in presence or absence of cholesterol. All used surfactants formed vesicles in the absence of cholesterol. Recombinant human insulin was used as a model protein drug to investigate encapsulation efficiency and release characteristics of the vesicles. The amount of insulin released in simulated intestinal fluid (SIF) and simulated gastric fluid (SGF) from Brij 92 vesicles was lower than the other ones. This vesicles also showed the highest protection of insulin against proteolytic enzymes, pepsin and trypsin. Diabetes was induced by IP injection of streptozotocin (65 mg/kg) in male wistar rats. Animals treated with oral niosome (Brij 52 and 92)-encapsulated insulin (100 IU/kg) showed decreased levels of blood glucose and elevation of serum insulin, which in the case of Brij 92 niosomes the hypoglycemic effect was significant (P< 0. 05).

Key words: *Insulin, Oral drug delivery, Polyoxyethylene alkyl ethers, Niosome*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2005; 12(2): 119-129

References

1) Agarwal V, Reddy IK and Khan MA. Polymethyacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: preparation and *in vitro* dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. *Int J Pharm* 2001; 225(1-2): 31-90.

2) Arrieta-Molero JF, Aleck K, Sinha MK, Brownscheidle CM, Shapiro LJ and Sperling A. Orally administered liposome-entrapped insulin in diabetic animals. *Horm Res* 1982; 16(4): 249-256.

3) Arunothayanun P, Turton JA, Uchegbu IF and Florence AT. Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-loaded polyhedral and spherical/tubular niosomes. *J Pharm Sci* 1999; 88(1): 34-38.

4) Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT and Rogerson A. The preparation and properties of niosomes, non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37(12): 863-868.

5) Brewer JM and Alexander J. The adjuvant activity of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) on the BALB/c humoral response to bovine serum albumin. *Immunology* 1992; 75(4): 570-575.
6) Carino GP, Jacob JS and Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery. *J Control Release* 2000; 65(1-2): 261-269.
7) Chattaraj SC and Das SK. Physicochemical characterization of influenza viral loaded surfactant vesicles. *Drug Deliv* 2003; 10(2): 73-77.
8) Chung H, Kim J, Um J.Y, Kwon IC and Jeong SY. Self-assembled nanocubicle as a carrier for peroral insulin delivery. *Diabetologia* 2002; 45: 448-451.
9) Damge C, Vranckx H, Balschmidt P and Couvreur P. Poly (alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86(12): 1403-1409.
10) Dufes C, Gaillard F, Uchegbu IF, Schatzlein G, Olivier JC and Muller JM. Glucose-targeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int J Pharm* 2004; 285(1-2): 77-85.
11) Ferro VA, Costar R, Carter KC, *et al.* Immune responses to a GnRH-based antifertility immunogen, induced by different adjuvants and subsequent effect on vaccine efficacy. *Vaccine* 2004; 22(8): 1024-1031.
12) Foss AC, Goto T, Morishita M and Peppas NA. Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57(2): 163-169.
13) Hashimoto A and kawada J. Effects of oral administration of positively charged insulin liposomes on alloxan diabetic rats: preliminary study. *Endocrinol J* 1979; 26(3): 337-344.
14) Hofland HEJ. Vesicles as transdermal drug delivery systems, Ph.D. thesis. University of Leiden, Leiden, The Netherlands, 1992.
15) Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Kakemi M, Morimoto K, Yamashita S, Namba Y and Oku N. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 1999; 88(2): 248-252.
16) Khaksa G, D'Souza R, Lewis S and Udupa N. Pharmacokinetic study of noisome encapsulated insulin. *Indian J Exp Biol* 2000; 38(9): 901-905.
17) Kim A, Yun MO, Oh YK, Ahn WS and Kim CK. Pharmacodynamics of insulin in polyethylene glycol-coated liposomes. *Int J Pharm* 1999; 180(1): 75-81.
18) Kimura T, Sato K, Sugimoto K, *et al.* Oral administration of insulin as poly (vinyl alcohol)-gel spheres in diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(6): 897-900.
19) Kisel MA, Kulik LN, Tsybovsky IS, *et al.* Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int J Pharm* 2001; 216(1-2): 105-114.
20) Lehr C-M. Bioadhesive drug delivery systems for oral application. Ph.D. thesis, University of Leiden, Leiden, The Netherlands, 1991.
21) Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, *et al.* Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces* 2003; 30: 129-138.
22) Memisoglu E, Oner F, Ayhan A, Basaran I and Hincal AA. *In vivo* evaluation of rhGM-CSF wound-healing efficacy in topical vehicles. *Pharm Dev Technol* 1997; 2(2): 171-180.
23) Morcol T, Nagappan P, Nerenbaum L, Mitchell A and Bell SJ. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. *Int J Pharm* 2004; 277(1-2): 91-97.
24) Morishita M, Morishita I, Takayama K, Machida Y and Nagai T. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int J Pharm* 1992; 78: 1-7.
25) Morishita M, Goto T, Peppas NA, *et al.* Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. *J Control Release* 2004; 97(1): 115-124.
26) Murdan S, Gregoriadis G and Florence AT. Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigens. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8(3): 177-186.
27) Niemiec SM, Ramachandran C and Weiner N. Influence of non-ionic liposomal composition on topical delivery of peptide drugs into pilosebaceous units: an *in vivo* study using the hamster ear model. *Pharm Res* 1995; 12(8):1184-1188.

28) Rentel CO, Bouwstra JA, Naisbett B and Junginger HE. Niosomes as a novel peroral vaccine delivery system. *Int J Pharm* 1999; 186(2): 161-167.
29) Shao Z Li Y, Krishnamoorthy R, Chermak T and Mitra AK. Differential effects of anionic, cationic, nonionic and physiologic surfactants on the dissociation, α-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin hexamers. *Pharm Res* 1993; 10(2): 243-251.
30) Tabbakhian M. Oral delivery of insulin by polymer-coated liposomes. Ph. D. thesis. University of Alberta, Edmonton, Canada, 1998.
31) Takeuchi H, Yamamoto H, Niwa T, Hino T and Kawashima Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res* 1996; 13(6): 896-901.
32) Uchegbu IF and Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int J Pharm* 1998; 172: 33-70.
33) Van Hal, D. A. Non-ionic surfactant vesicles for dermal and transdermal drug delivery. Ph.D. thesis. University of Leide, Leiden, The Netherlands, 1994.
34) Varshosaz J, Pardakhty A, Hajhashemi V and Najafabadi AR. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. *Drug Del* 2003; 10: 251-262.
35) Waranuch N, Ramachandran C and Weiner ND. Controlled topical delivery of cyclosporin-A from non-ionic liposomal formulation: mechanistic aspects. *J Liposome Res* 1998; 8(2): 225-238.
36) Weingarten C, Moufti A, Delattre J, Puisieux F and Couvreur P. protection of insulin from enzymatic degradation by its association to liposomes. *Int J Pharm* 1985; 26: 251-257.
37) Wu ZH, Ping QN, Wei Y and Lai JM. Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(7): 966-972.
38) Yoshida H, Lehr CM, Kok W, Juninger HE, Verhoef JC and Bouwstra JA. Niosomes for oral delivery of peptide drugs. *J Control Rel* 1992; 21: 145-154.
39) Yoshioka T, Strenberg B and Florence AT. Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60 and 80) and a sorbitan triester (Span 85). *Int J Pharm* 1994; 105: 1-6.