Archive of SID

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سال سی و پنجم (۱۳۸۰)، شماره ۵۲، صفحه ۶۱

تهیهٔ انسولین خوراکی

دکتر جواد فرید[۱] دکتر فیروزه نامی[۲]

خلاصه

زمینه و اهداف : دارورسانی از راه خوراکی به صورت لیپوزوم به منظور محافظت و جلوگیری آن در مقابل اثرات تخریبی آنزیمهای گوارشی است تا بتواند در برابر شیرهٔ معده مقاومت کرده و پس از رسیدن به رودهٔ باریک از طریق اپی تلیوم آن جذب خون شود. روشهای مختلفی جهت تهیه لیپوزومها متداول می باشد که اصولاً در مراکز درمانی توسط داروساز تهیه و بلافاصله توسط پزشک معالج مصرف می شود. آخرین روش که امروزه مورد توجه می باشد روش تغییر یافته مؤسسه Batelle انگلستان است.

روش بررسی: براساس روش Batelle انگلستان، لیپوزومها که حاوی انسولین بوده و جدارشان توسط ماده ای بنام Aprotinine در مقابل آنزیمها و شیره معده مقاوم شده بود تهیه گردیده و مقدار لازم از آن به خرگوشهای نر ۱ الی ۱/۵ کیلوگرمی تجویز گردید ، دو مورد خونگیری مستقیم از قلب برای اندازه گیری انسولین قبل و بعد از تجویز لیپوزوم انجام شد ، جهت اطمینان از سلامت دستگاه گوارش و سرعت عبور آن، قسمت فوقانی دستگاه گوارش با سریو گرافی بررسی شد و بالاخره نتایج به دست آمده با یک گروه شاهد که لیپوزوم دریافت نکرده بودند مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: ۱) در حیوانات سالم میزان قند خون بعد از تجویز لیپوزومهای زرده تخم مرغ با ۲۰ واحد انسولین بر هر کیلوگرم وزن بدن به صفر رسید که نشان دهنده طبیعی بودن آن بود. ۲) در بعضی از حیوانات افزایش در سطح خون دیده شد که این افزایش به علت ترشح نوروترانسیمتر اپی نفرین ، ترشح هورمون کورتیزول و ایجاد Negative Feeding می باشد. بعد از پایین آمدن مواد فوق، کاهش قند خون دیده شد و این نشان دهنده شروع جذب انسولین از اپی تلیوم روده این حیوانات است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش با یافته های دیگران تطابق کلی دارد و این امر نشانگر این است که می توان با محافظت انسولین به صورت لیپوزوم در مقابل شیره ها و آنزیمهای گوارشی از تخریب بسیار ظریف انسولین در محیط معده و روده جلوگیری نمود و نظر بر اینکه جنس جدار خارجی لیپوزومها همانند سلولهای اپی تلیال روده چربی می باشد بنابراین براساس پدیده فاگوسیتوز لیپوزومها در درون سلولهای اپی تلیوم روده وارد شده و سپس جذب می گردند. این امر سبب رتانسیون انسولین نیز می گردد و دورنمای بسیار خوبی را از معالجه بیماران دیابتیک از راه خوراکی نشان می دهد.

کلید واژه ها : لیپوزومها ، انسولین ، آنکپسولاسیون

۱- استاد داروسازی صنعتی گروه فارماسیوتیکس - دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲- استاد یار گروه رادیولوژی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز – نویسنده رابط

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

www.SID.ir

Archive of SID

سیستمهای نوین دارورسانی اشکال دارویی ویژه ای هستند که در دو دهه اخیر مطالعات گسترده ای در زمینه توسعه و تکمیل آنها به عمل آمده است (۵ – ۱) و چون این فرآورده ها از مزایای درمانی قابل توجهی برخوردار می باشند بنابراین فوق العاده مورد استقبال پزشکان قرار گرفته اند ، از جمله این نوع سیستمهای جدید می توان به قرصهای پمپ اسموتیک آهسته رهش (OROS) ، میکروسفرها ، سیستمهای دارورسانی پوستی (T.D.S)، اسپری های زیر زبانی ، قرصهای زیست چسبی گونه ای و لثه ای و مخصوصاً چشمی (Occuser) و شیافها و بالاخره به لیپوزومها اشاره نمود (۵ – ۱). این پژوهش مختص به تهیه و بررسی امکان رسانیدن انسولین به خون از راه خوراکی می باشد(۵)۰

لیپوزومها ذرات کروی شکل و یا وزیکولهایی هستند که از یک حفره مرکزی محتوی آب یا محلول آبی دارو و یک یا چند جدار فسفولیپیدی تشکیل یافته اند. جدار لیپوزوم متشکل از دو لایه ملکول فسفولیپید است۰ بنابراین وجود طبقات هیدروفیل و لیپوفیل سبب می شوند که لیپوزومها قادر به نگهداری انواع داروهای محلول در آب و چربی باشند (٦)۰

لیپـوزومها از سال ۱۹۷۱ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته(٦) و به صورت فرآورده های بیمارستانی در درمان انواع بیماریها در دسترس پزشکان همان بیمارستان قرار می گیرند (Hospital Pharmacy)۰

لیپوزمها از نظر اندازه و نیز لایه های فسفولیپیدی به سه دسته تقسیم می شوند :

۱ – لیپوزومهای تک خانه ای یا تک بخشی (unilamellar l.): در این نوع لیپوزومها وزیکول فقط از یک جدار خارجی متشکل از دولایه ملکول فسفولیپیدی احاطه شده است که محفظه درونی محتوی آب یا حلال آبی دارو بوده و جدار خارجی آن از فسفولیپیدها می باشد که می تواند مواد محلول در چربی را در خود حل نماید۰ قطر این نوع لیپوزومها ۲۰۰ الی ۵۰۰ آنگستروم می باشد۰ در شکل ۱ طرح یک لیپوزوم تک خانه ای نمایش داده شده است (۷)۰

شکل ۱ : طرح یک لیپوزوم تک خانه ای

۲ – لیپوزومهای چند بخشی (multilamellar liposomes): این دسته از لیپوزومها از دو یا چند جدار فسفولیپیدی با جدار مرکب از دولایه ملکول فسفولیپید تشکیل یافته و در نتیجه حفره مرکزی وزیکول و نیز فاصله این جدارها محتوی آب یا حلال آبی دارو می باشد و نیز داروهای محلول در چربی نیز می توانند در جدارهای فسفولیپیدی حل گردند ، قطر این نوع از لیپوزومها در حدود ٤۰ برابر لیپوزومهای تک خانه ای می باشد (۷)۰

۳ – ماکرولیپوزومها (Macroliposomes): این دسته از لیپوزومها همانند انواع تک بخشی از یک جدار فسفولیپیدی با دولایه ملکول فسفولیپیدی ترکیب یافته ولی اندازه آنها بزرگتر از انواع تک بخشی و در حدود ۰/۱ الی ۰/۲ میکرون می باشد و در نتیجه می توانند مقادیر زیادی از مواد محلول در آب را در خود نگه دارند به طوری که توانایی Encapsulation این دسته از لیپوزومها نسبت به آب در حدود ٤۰ برابر لیپوزومهای تک بخشی می باشد۰ در هر حال لیپوزومها به هر دسته ای که متعلق باشند از جدارهای فسفولیپیدی تشکیل یافته اند۰

مواد و روش تحقیق

مواد و وسایل مورد نیاز عبارت بودند از :

زرده تخم مرغ که از این ماده به جای مجموع کلسترول و فسفولیپیدها استفاده گردید ، انسولین گاوی و انسولین انسانی (کارخانه NOVO) ، کلروفرم، استن، کلرهیدریک اسید، پارافین مایع، سیتریک اسید Aprotinine همه از مرک (ماده اخیر جهت مهار تریپسین شیره روده استفاده شده است). سلولز آستات فتالات (CAP) (Pharma - Handelsgeslschaft آلمان).

وسایل مورد استفاده غیر از خرگوشهای سالم عبارتند از: دستگاه رادیوگرافی نوع Shimadzu 1000 بهمزن مدل - 1 KN

www.SID.ir

Archive of SID

WERD، گرمخانه، صافیهای میلی پور، ترازوی حساس Sartorius، کلوریمتر نوعBauch and Loml spectric، pH متر نوع Corning 120.

روش تهیه لیپوزومها

قدیمی ترین روش تهیه لیپوزومها مربوط به سال ۱۹٦۵ توسط دانشمندی به نام Bangham می باشد (۸) که اساس آن عبارت است از انحلال فسفولیپیدها در یک حلال آلی فرار و تبخیر آن در خلاء و در نهایت تهیه امولسیون چربیهای باقیمانده در آب که نتیجه عمل، عبارت است از لیپوزومهای چند بخشی که لازم است آنها را تحت تأثیر Ultrason قرار داد تا تبدیل به لیپوزومهای تک خانه ای شود در این عملیات بازده عمل خوب نبوده است و بنابراین کنار گذاشته شد و امروزه از روش مؤسسه Batelle جهت تهیه لیپوزومهای تک بخشی استفاده می شود (۹). در این پژوهش نیز از همین روش با تغییراتی استفاده به عمل آمد. این کار مشترکی است که توسط آزمایشگاه داروسازی صنعتی دانشکده داروسازی و بخش رادیولوژی بیمارستان حضرت امام خمینی (ره) انجام یافته است.

در این پژوهش به جای فسفولیپیدهای مختلف از زرده تخم مرغ و از انسولین رگلار انسانی و نیز گاوی به عنوان فاز آبی استفاده گردید. لیپوزومهای به دست آمده از نظر ترمودینامیکی بسیار پایدار بوده و کارایی لازم را دارند ولی نظر بر اینکه ملکول انسولین در محیط اسیدی معده توسط شیره اسیدی تخریب می گردد و نیز تریپسین و کموتریپسین پانکراس نیز باعث پارگی زنجیرهای انسولین می شود، لذا از یک نوع مهارکننده ای به نام Aprotinine استفاده شد و تهیه لیپوزومها در سه مرحله زیر انجام پذیرفت.

مرحله اول : انسولین رگلار با اندازه های ۷/۵، ٦/۵، ٤/۵، ۳، ۲، ۱، ۰/۸، ۰/٤، ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۰۸ و ۰/۰۵ میلی لیتر به ازای یک گرم زرده تخم مرغ توزین شد و به همراه زرده تخم مرغ و آپروتی نین در یک حلال آبی که وزن مخصوص آن کمتر از آب بود به صورت امولسیون درآمد که در آن حلال آبی آلی انسولین به صورت گلبولهایی در حلال آلی پراکنده شدند.

مرحله دوم : امولسیون به دست آمده با احتیاط روی سطح یک حلال آبی سرم فیزیولوژیک بدون ماده مؤثر ولی دارای زرده تخم مرغ اضافه شد که نتیجه امر عبارت بود از دو فاز که توسط لایه فسفولیپیدی از همدیگر جدا می شدند.

مرحله سوم : مجموعه مرحله دوم با سرعت زیاد (٦۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ شد ، در این حالت گلبولهای فاز اول درون حلال آبی سرم فیزیولوژیک کشیده می شد. ضمن عبور حلال لایه فسفولیپیدی بین دو فاز، سبب تجمع فسفولیپید روی وزیکولها شده و در نتیجه لیپوزومهای یک بخشی با دو ردیف مولکول فسفولیپیدی تشکیل می شود.

مشکلاتی که در محصول تهیه شده ملاحظه گردید عبارت بودند از : چسبیدن تدریجی لیپوزومها به همدیگر، سدیمانتاسیون لیپوزومها ، فساد لیپوزومها به علت وجود مواد دیگر در زرده تخم مرغ و بالاخره مشکل تنظیم مقدار خوراک لیپوزومها هنگام تجویز بود. لذا تصمیم گرفته شد لیپوزومهای به دست آمده با استفاده از تکنیک Microencapsulation روکش داده شوند. برای نیل به این هدف از روش Coacer Vation ساده با تفکیک فازها استفاده شد (۱۲ و ۱۳) که در این عملیات از پارافین مایع به عنوان فاز نگهدارنده و از CAP (یک نوع مشتق سلولزی که در شیره اسیدی با pH 1/2 مقاومت کرده و حل نمی شود ولی در شیرهٔ قلیایی روده حل و محتویات خود را آزاد می سازد)، به جای پلیمر روکش دهنده و بالاخره از آستن به عنوان حلال پلیمر استفاده شد. به عنوان عامل Coacervant از عمل تبخیر سیستم استفاده شد، بدین ترتیب که بعد از ریختن آخرین قطره محلول پلیمر در حال بهم زدن مبادرت به تبخیر مجموعه شد و در نتیجه میکروکپسولها که همانا ذرات روکش دار لیپوزومها باشد تشکیل گردیدند ، آنگاه میکروکپسولهای جامد را چندین بار با کلروفرم شسته تا عاری از پارافین شوند وسپس مبادرت به خشکاندن آنها شد.

جهت دستیابی به مقادیرمعین ومطلوب ازپارافین ، پلیمر وحلال پلیمر از سیستم دیاگرام سه تایی (Ternary Diagram) استفاده شد و پس از آزمایش مناطق ٦٦ گانه دیاگرام منطقه مناسب که در آن منطقه میکروکپسولها تشکیل می شوند مشخص شد که مختصات منطقه عبارت بودند از :

پارافین ۹۳ – ۸۵/۵ درصد، آستن ۱٤ – ٦ درصد، پلیمر ۱ – ۰/۲ درصد (۱۲).

بررسی جذب و عملکرد انسولین خوراکی:

یکی از صحیحترین راههای مطالعه جذب انسولین از راه خوراکی، بررسی نوسانهای قند خون خرگوش می باشد ، لذا جهت انجام این بررسی به عنوان حیوان آزمایشگاهی خرگوشهای نر سالم با وزن متوسط ۱ تا ۱/۵ کیلوگرم انتخاب شد، خرگوشها قبل از اینکه تحت آزمایش قرار گیرند به مدت یک هفته از نظر

www.SID.ir

Archive of SID

رژیم غذایی کاملاً تحت نظر بودند و سعی گردید هیچ گونه استرسی به حیوان وارد نشود زیرا هر گونه عوامل فیزیکی و روحی سبب تغییر ترشحات انسولین پانکراس حیوان گردیده و نتیجه آزمایش بدور از واقعیت خواهد بود (۵) و به علاوه خر گوشها بایستی دستگاه گوارشی سالم داشته باشند لذا حیوانات قبلاً توسط متخصص رادیولوژی به وسیله رادیوگرافی دستگاه گوارش بررسی شدند ، تا هیچ گونه آثاری از زخم، التهاب، اسهال و غیره در حیوان که باعث ایجاد اختلال در نتیجه آزمایشها می شود، وجود نداشته باشد (۵) و به طوری که در جریان آزمایش معلوم گردید وجود ترانزیت سریع که در کلیشه رادیوگرافی نیز واضح بود اختلالاتی در عمل جذب لیپوزومها به عمل می آورند لذا به منظور انتخاب حیوانات سالم اقدام به رادیوگرافی از قسمت فوقانی دستگاه گوارش خرگوش گردید و در این عکسبرداری نیازی به بیهوش نمودن حیوانات نبود ، برای این منظور از دستگاه گوارش خرگوشها به وسیله خوراندن سلفات باریم رادیوگرافی در دو تابش روبرو و مایل کلیشه هایی تهیه شد و در صورت نیاز عکسهای اضافی نیز تهیه گردید۰ برای ثابت نگهداشتن حیوانات از یک صفحه چوبی نازک استفاده شد که حیوانات را روی آن ثابت کرده و دستها و پاها را به وسیله باندی به سمت بالا و پایین کشانده و بی حرکت نمودیم آنگاه به وسیله دستگاه نوع Shimadzu 1000 اقدام به عکسبرداری شد (۱۳). در صورت نیاز به بررسی بیشتر از قسمت فلوروسکپی دستگاه نیز استفاده

می شد۰ کلیشه ها با شرایط رادیوگرافی40 - 50 KVP ، پنج mAS و زمان ۰/۰۲ ثانیه با فاصله ۱۰۰ سانتیمتر از بوکی و فیلمهای معمولی و با خوراندن سوسپانسیون سلفات باریم به حیوانات تهیه شدند. برای خوراندن سوسپانسیون مذکور از کاتاتر سر سوزن پروانه ای که سوزن آن برداشته شده بود استفاده شد۰ پس از رادیوگرافی تعداد ۲۰ عدد خرگوش سالم جهت خوراندن دارو انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند۰

عمل تجویز لیپوزومها توسط سرنگی که فاقد سوزن بوده و مجهز به آمبو می باشد با احتیاط کامل در حفره دهانی و نیز حلق حیوان ریخته شد و بلافاصله تا ۱۵ دقیقه ، هر ۵ دقیقه به مدت سه بار از طریق دهان و راه گوارشی حیوان رادیوگرافی به عمل آمد تا اولاً از زخم نشدن لوله گوارشی حیوان توسط سرنگ اطمینان حاصل شود و در ثانی از رسیدن لیپوزومها به محل جذب دستگاه گوارش که همانا منطقه اثنی عشر می باشد اطلاعات لازم به دست آید، زیرا بعد از تجویز انسولین از راه خوراکی چه به حیوان و چه به انسان لازم است لوله گوارشی و نیز روده ها کاملاً سالم باشد در غیر این صورت جذب ماده مؤثر مختل خواهد شد۰

با توجه به نتیجه رادیوگرافی ، خونگیری حدود ۱۵ دقیقه بعد از تجویز خوراکی از راه ورید مارژینال از قلب آغاز گردیده و قند خون با استفاده از روشهای مرسوم آزمایشگاهی با به کار گیری اسپکتروفتومتر با نور مرئی طول موج ٦۳۰ نانومتر انجام پذیرفت (١٤) در شکلهای ۲ و ۳ منحنی تغییرات نوسانهای قند خون حیوان پس ازتجویز لیپوزومهای محتوی ۲۰ واحد انسولین به هر کیلوگرم وزن حیوان نشان داده شده است.

یافته ها

اشکال ۲ و ۳ نوسانهای قند خون حیوان را پس از تجویز خوراکی لیپوزومهای زرده تخم مرغ انسولین به میزان ۲۰ واحد بر هر کیلوگرم وزن نشان می دهد۰ به طوری که میزان قند خون در زمان صفر مؤید وجود یک حد طبیعی می باشد که نشانگر سالم بودن حیوانات و عدم دیابت در آنها است ولی ۱۵ دقیقه بعد از تجویز فرمولاسیون در بعضی از حیوانات افزایش در سطح قند خون که بیانگر وجود شرایط مشابه دیابت است ملاحظه می گردد

بحث

افزایش میزان سطح قند در خون بعضی از حیوانات را می توان به واسطه هم زمانی سه عامل زیر دانست :

۱- ترشح نوروترانسیمتر اپی نفرین از اعصاب سمپاتیک قلب حیوان به جهت خونگیری مستقیم از قلب بعضی از خرگوشها و تأثیر انسولین تجویزی برروی این هورمون در بدن حیوان (۱۵)۰

۲- ترشح هورمون کورتیزول از غدد فوق کلیوی به علت شیوه تثبیت حیوان و نحوه خوراندن فرمولاسیون - Force) (feeding و تأثیر مستقیم انسولین خوراکی تجویزی بر روی این هورمون (١٦)۰

۳- ایجاد پدیده (Negative feedback) و بروز فرایند مشابه پدیده (Auto - regulaiton) و تأثیر مستقیم انسولین تجویزی بر انسولین درونی حیوان (۱۷)۰

بعد از اتمام پدیده های مذکور قند خون بتدریج کاهش یافته و از حد طبیعی نیز پایین می آید که در اشکال مربوط این کاهش بوضوح نشان داده شده و نمایانگر جذب انسولین از اپیتلیوم روده کوچک و آغاز فعالیت بیولوژیک در محیط داخلی بدن می باشد۰

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳ : نمودار نوسانهای قند سرم از خوراندن فرمولاسیون حاوی 201 U/Kg انسولین در خرگوش ۲

مکانیسم جذب بر اساس پدیده فاگوسیتوز می باشد که لیپوزوم و سلولهای جذب روده همانند یک آمیب در مقابل ماده غذایی انجام می گیرد بدین ترتیب که جنس لیپوزومها از مواد چرب می باشند که به محض قرار گرفتن در محیط روده بر روی سلولهای جدار اپیتلیوم روده که آنها نیز جدار چرب دارند سوار شده و طی مراحل زیرین داخل سلولهای روده و بالاخره خون می شوند.

A- جذب لیپوزوم روی جدار سلولهای روده

B- مبادله لیپید وجوش خوردن لیپوزوم با جدار سلول (Fusion)

C- آندوسیتوز یا دخول لیپوزوم داخل سلول و حمل آن به داخل خون

مراحل یاد شده در شکل (٤) نشان داده شده است (۱۸)۰

بدین ترتیب لیپوزوم وارد خون شده و بتدریج ماده مؤثر خود را در اختیار خون قرار می دهد ، بدون اینکه تحت تأثیر شیره های گوارشی از بین رفته باشد۰

شکل ٤ : مراحل مختلف ورود لیپوزم به داخل سلول (۱۸)۰

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری :

به منظور مقایسه قدرت پایین آورندگی قند خون توسط انسولین به عنوان شاهد تزریقات وریدی از طریق ورید مارژینال قلب به میزان ۲ و ۳ واحد بر هر کیلوگرم وزن حیوان انجام گرفت۰

همانطوری که قبلاً در شکلهای مربوط نتیجه تجویز خوراکی انسولین بود نشان داده شد ، در این مرحله نیز ابتدا مقدار قند خون بالا رفت و سپس به شدت پایین آمد به طوری که در عرض ٤٠ دقیقه به حد هیپوگلیسمی نیز رسید ، از طرف دیگر به منظور نمایاندن تأثیر و جذب واقعی انسولین از راه اپیتلیوم روده خرگوش ، لیپوزومهای بدون انسولین (پلاسبو) دقیقاً با همان شرایط قبلی به حیوان خورانیده شد و ملاحظه گردید که تفاوت معنی داری در روند منحنی نوسانهای قند خون حیوانات وجود دارد ($P < ۰/۰۵$) به طوری که قند خون خرگوشها همواره بالا بود۰ در این پژوهش علاوه بر اینکه قدرت جذب و پایین آورندگی قندخون توسط لیپوزومهای انسولین ثابت شد ، مسلم گردید که دلیل عدم جذب تنها بواسطه نرسیدن شکل غیرفعال دارو به محل جذب آن یعنی اپیتلیوم روده باریک می باشد۰ بنابراین به نظر می رسد که لیپوزوم انسولین در محل جذب مطلقاً باز نشده بلکه در اکثر عمل فاگوسیتوز سلولهای جذب و همجنس روده جذب و وارد خون می گردد و سپس درون خون بتدریج انسولین آزاد می شود ؛ روی این اصل می توان به یک نکته مهم دیگری نیز اشاره نمود که با این وسیله می توان تأثیر درمانی انسولین را در بدن طولانی ساخت. لذا با توجه به توانایی بالای تولید لیپوزومها به وسیله زرده تخم مرغ و با توجه به ارزش غذایی این ماده استفاده از این فرمولاسیون در انسان جهت معالجه دیابت می تواند آغاز پرپیچ و خمی باشد که در سر راه تجویز خوراکی انسولین قرار گرفته است.

References :

1. Bangham AD. Liposomes. In: Liposomes, edited by Marc J. Oston. Marcal Dedder, 1983; p : 1 – 20.
2. Buri P, Puisieux F, Doelker E, and Benoit JP. Les Liposomes. In: Formes Pharmaceutiques Nouvelles Lavoisier Edition and Documeutation, Paris 1985; P: 467 – 497.
3. Puisieux F, Delater J. Interaction des liposomes avec les cellules In: Liposomes. Lavoisier edition & Documeutation , Paris 1985; P: 147 – 163.
4. Machy P and Leserman L. Liposomes In: Les Liposomes en Biologie et Phamracolgie, Edition, Paris 1987; P: 40 – 58
5. Hsony EA, Relative hypoglycemia suppositories containing deoxychole acid, sodium taurochalate, phlycarliophil, and theirs combination in diabetic rabbits. Drug Devel and Indus Pharm 1999 ; 25(6) : 745 - 752.
6. Dange C, Michel C, Abrahamian M, and Couvreur P**.** Diabet J 1990 ; 13: 233 –239.
7. Veingarten E, Moufti A, Delatre J, Puiseiux F and Couvreur P**.** In. J. Pharm 1985; 26: 251-257.
8. Adrangui M, Physiologie de la peau et prepartion topiques. Adineh Ketab . Tehran 1369 (1990); P: 970 – 971.
9. Bamgham AD, Hill MW, and Meller NGM**.** Method Membrane Biol (Korn E.D edition) 1974 ; P: 11 – 68.
10. Schneider M. Progres recents dans la preparation de liposomes. Labo. Pharm. Probleme et Techniques 1978 ; 28: 905 – 907.
11. Farid DJs, Hashemi MR, Tabrizi. SH and Adrangui M. The effect of oral in blood glucose concentration J. Sch. of Pharm. Tehran University Spring & Summer 1372; 3(1): 11–15.
12. Farid DJ, and Nokhodchi A, The Third International Seminar on Hygoene & Cosmetics Industeries 1376; 3: 23 – 28
13. Nokhodchi A**.** Microencapsulation of A.S.A, Pharm Thesis , 1376 , 1368.
14. Lee R **.** Manual of Radiography and Radiology in Small Animal Practice, 1990; P: 101 – 105.
15. Clarke S. Isolation and Identification of Drug, 2 nd ed, Part 2, Jackson et al Ed, 1986; P: 684.
16. Donovan C.M. Diabets, 1991, 40: 155 - 158
17. Landgrof R, Nusser J, and Land W**.** Diabetology, 1991; 34: 561 - 567 .
18. Hartter E, Sovoloda T, and Prayer K. Diabetology 1991; 34: 52 – 54.
19. Himany L**.** Liposomes cell international edited by M.J. Ostro, Marsel DEKKEN, 1983; P: 87 – 125.

www.SID.ir