تهيه نيوزومهاي حاوي كلرامفنيكل سديم سوكسينات و بررسي خصوصيات فيزيكوشيميايي و ضد ميكروبي آنها

عباس پرداختي*[۱و۲]، محمد حسن مصحفي[۱و۲] و هدي متشفي[۱]

[۱]دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي كرمان، [۲] مركزتحقيقات فن آوري فارماسيوتيكس دانشگاه علوم پزشكي كرمان

تاريخ دريافت: ۸۵/۱/۱۷ ، تاريخ پذيرش: ۸۶/۲/۱۹

Preparation of niosomes containing chloramphenicol sodium succinate and evaluation of their physicochemical and antimicrobial properties

Pardakhty A. [1,2 *], Moshafi M. H. [1,2], Moteshafi H. [1]

[1]Faculty of Pharmacy, Kerman Medical University, [2]Pharmaceutical Technology Research Center, Kerman Medical University

Received: 2006/4/6, Accepted: 2007/5/9

Objectives: Various systems such as microparticulate systems are utilized for intracellular chemotherapy. One type of these systems is niosomes which are categorized as vesicular systems and essentially composed of non-ionic surfactants and cholesterol. **Methods:** In this study non-ionic surfactant vesicles (niosomes) from three polyoxyethylene alkyl ethers, i.e. $C_{16}EO_2$ (Brij 52), $C_{18}EO_2$ (Brij 72), $C_{9=9}EO_2$ (Brij 92) and cholesterol encapsulating chloramphenicol sodium succinate (CMP) were prepared by film hydration method. In vitro characterization of niosomes including microscopical observation, size distribution measurement by laser light scattering method, release of CMP in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination of free and entrapped antibiotic against E.coli were evaluated. Chloramphenicol concentration was determined by UV spectrophotometry at 276 nm. **Results:** Log-normal size distribution was observed for all prepared niosome formulations. In the presence of 40 molar percent of cholesterol the release of CMP was best fitted by Baker & Lonsdale model indicating a diffusion based release of antibiotic. In formulation containing 30 molar percent of cholesterol the erosion and dissolution based model (Hixson-Crowell) was best applicable. MIC of encapsulated CMP was less in vesicular systems in comparison with free drug. Morphological study of vesicles revealed different shape and size niosomes which were more as MLVs (Multi Lamellar Vesicles). Brij 92 containing niosomes had less stability, possibly due to liquid nature of this surfactant. **Conclusion:** Niosomes can be used for controlled release of chloramphenicol. However, although MIC of entrapped antibiotic is less than free one, more studies on in vivo and cell cultures such as mouse macrophages (J774) will be required in future studies.

Key words: *Niosomes, Polyoxyethylene alkylether, Chloramphenicol sodium succinate, E.coli.*

زمينه و هدف: براي درمان انواع عفونتهاي درون سلولي ازسامانه هاي متنوعي مثل سيستمهاي ريز ذره اي استفاده مي شود. يكي از اين سامانه ها، نيوزومها مي باشد كه از دسته سيستمهاي وزيكولي متشكل ازسورفكتانتهاي غير يوني و كلسترول تشكيل شده اند. **روش ها:** در اين مطالعه نيوزومهاي متشكل از سورفكتانتهاي غير يوني پلي اكسي اتيلن آلكيل اتري شامل بريج ۵۲ ($C_{16}EO_2$) ، بريج ۷۲ ($C_{18}EO_2$) و بريج ۹۲ ($C_{9=9}EO_2$) و كلسترول براي محبوس سازي كلرامفنيكل سديم سوكسينات به روش هيدراتاسيون لايه نازك چربي تهيه شدند. در مطالعه برون تني، خصوصيات نيوزومها شامل مشاهده ميكروسكوپي، توزيع اندازه ذره اي به روش تفرق پرتو ليزر، آزادسازي كلرامفنيكل سديم سوكسينات در بافر فسفات نمكي با pH ۷/٤ و تعيين MIC (Minimum Inhibitory Concentration) داروي آزاد و داروي محبوس در نيوزوم عليه E.coli صورت گرفت. غلظت كلرامفنيكل سديم سوكسينات به وسيله اسپكتروفتومتري UV در ۲۷۶ نانومتر تعيين شد. **يافته ها:** توزيع اندازه ذره اي لگاريتم-نرمال در تمامي فرمولاسيون ها قابل مشاهده بود. آزاد سازي دارو در حضور ۳۰ درصد مولي از كلسترول از مدل مبتني بر سايش (Hixson-Crowell) و در حضور ۴۰ درصد مولي كلسترول از مدل مبتني بر ديفوزيون دارو (Baker & Lonsdale) تبعيت مي كند. MIC كلرامفنيكل محبوس در نيوزوم كمتر از MIC داروي آزاد بود. اغلب نـيوزوم ها به شكلMLV (Multi Lamellar Vesicles) بودند. نيوزومهاي حاوي بريج ۹۲ پايداري كمي داشتند، كه شايد به دليل مايع بودن اين سورفكتانت بوده است. **نتيجه گيري:** با توجه به آزادسازي كنترل شده دارو، از نيوزومها به منظور دارورساني كلرامفنيكل مي توان استفاده نمود. با وجود اينكه آنتي بيوتيک محبوس در نيوزومها داراي MIC بيشتري در مقايسه با داروي آزاد مي باشد، مطالعات بيشتري در زمينه درون تني يا بر روي محيط كشت سلولي ماكروفاژهاي موشي (J774) در آينده مورد نياز است.

واژه هاي كليدي: *نيوزوم ها، پلي اكسي اتيلن آلكيل اتر، كلرامفنيكل سديم سوكسينات، E.coli.*

*نويسنده مسئول: دكتر عباس پرداختي، دانشيار، دانشكده داروسازي و مركـز تحقيقـات فن آوري فارماسيوتيكس دانشگاه علوم پزشكي كرمان، تلفـن: ۰۳۴۱-۳۲۲۰۰۰۱، نمـابر: ۰۳۴۱-۳۲۲۰۷۹۹

**Corresponding Author: Dr Abbas Pardakhty, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Technology Research Center, Kerman Medical University, Tel: 0341-: 3220001; Fax: 0341-3220799; E-mail: abpardakhty@kmu.ac.ir*

۱- مقدمه

برخي از عوامل بيماري‌زا، به شكل انگل اجباري يا اختياري، در درون سلول‌هاي ميزبان رشد و تكثير مي‌نمايند. از اين دسته انگل‌هاي درون سلولي، مي‌توان به عوامل باكتريايي (نظير گونه‌هاي سالمونلا و مايكوباكتريوم)، پروتوزوآيي مثل گونه‌هاي ليشمانيا (Leishmania)، قارچي (نظير گونه‌هاي كانديدا و آسپرژيلوس) و ويروسي (مثل HIV) اشاره نمود (۱). ريشه‌كني اين گونه عفونت‌ها، با استفاده از تركيبات شيميايي كه نيازمند ورود به درون سلول‌هاي بدن ميزبان مي‌باشند، تحت عنوان Intracellular chemotherapy مشهور است (۲).

اثربخشي بسياري از تركيبات شيمي درماني ضد ميكروبي به دلايلي نظيرنفوذ كم به درون سلولهاي ميزبان، تجمع محدود در بخش‌هاي Subcellular، غيرفعال شدن دارو در محيط اسيدي بخش‌هاي درون سلولي، سميت بالاي تركيب شيمي درماني براي سلول‌هاي ميزبان (۳) و محلوليت پايين تركيب شيمي درماني در محيط خارج سلولي، به نحوي كه غلظت مؤثر براي ورود به درون سلول را ايجاد نمي‌نمايد (٤)، محدود مي باشد.

براي رفع مشكلات مذكور در طي ساليان اخير از ناقل‌هاي دارويي در ابعاد Submicroscopic استفاده گسترده‌اي شده است (۲). بيشترين مطالعات انجام پذيرفته بر استفاده از ليپوزومها به عنوان ناقل متمركز بوده است؛ تجمع ليپوزومهاي داراي زنجيره پلي‌اتيلن گليكولي در بافت ريه موش‌هاي صحرايي آلوده به *Klebsiella pneumonia* (۵)، درمان عفونت داخل سلولي *Francisella tularensis* با سيپروفلوكساسين ليپوزومي (۳)، اثربخشي مناسب كلاريترومايسين ليپوزومي عليه *Mycobacterium avium complex* (MAC) در ماكروفاژهاي انساني (٤)، افزايش اثربخشي آمينوگليكوزيدهاي ليپوزومي عليه باكتري‌هاي گرم منفي و گرم مثبت (٦) و افزايش زمان استقرار پلي‌ميكسين B ليپوزومي در بافت ريه (۷) مثال‌هايي از كاربرد ليپوزومها در درمان عفونت‌هاي مختلف باكتريايي مي‌باشند. مقالات مروري ارزشمندي نيز، در مورد استفاده از ناقل‌هاي ميكروسكوپي به منظور هدف درماني آنتي‌بيوتيكي، به خصوص درmacrophage-based infections در دسترس است كه مبين اهميت موضوع و وسعت مطالعات انجام شده در اين زمينه مي‌باشد (۸،۱ و۹). از ديگر سامانه‌هاي Submicrone وزيكولي، نيوزومها (Niosomes) مي‌باشند. نيوزومها داراي سورفكتانت‌هاي غيريوني به عنوان جايگزين فسفوليپيدهاي ليپوزومي مي‌باشند.

از آنجا كه سورفكتانت‌هاي غيريوني در مقايسه با فسفوليپيدها، داراي پايداري فيزيكي و شيميايي بهتر به ويژه در برابر حرارت و اكسيداسيون بوده (۱۰ و۱۱) و همچنين داراي خلوص بالاتر و قيمت ارزانتر مي‌باشند، در طي سال هاي اخير به شدت مورد توجه محققين بوده‌اند. برخي از داروهاي ضدميكروبي نظير Enoxacin (۱۲)، ريفامپين (۱۳)، اريترومايسين (۱٤)، Zidovudin (۱۵) و سيپروفلوكساسين (۳) به منظور بهبود خواص فيزيكوشيميايي يا درماني در سامانه‌هاي نيوزومي محبوس شده‌اند. نيوزومها همچنين با محصور ساختن سديم استيبوگلوكونات (۱۸،۱۷،۱۶و۱۹)، پاروموماسين (۲۰)، Amarogentin (۲۱)، Bacopasaponin C (۲۲) و Harmine (۲۳)، باعث بهبود اثرات ضد ليشمانيوز جلدي واحشائي در نمونه‌هاي جداسازي شده و يا مدل‌هاي درون تني داروهاي مذكور شده‌اند.

Basu و Lala (۲٤) برتري نيوزوم‌ها را به عنوان سيستم‌هاي ارزان، غيرسمي، زيست تجزيه‌پذير و غير حساسيت‌زا كه به طور هدفمند داروهاي متفاوت را در درون ماكروفاژهاي آلوده به ليشمانيا آزاد مي‌نمايد، معرفي نموده‌اند.

هدف تحقيق حاضر ساخت نيوزومهاي حاوي كلرامفنيكل، از داروهاي آنتي باكتريال است كه داراي اثرات درماني از راههاي خوراكي، تزريقي و موضعي مي‌باشد. در گام اول بررسي خصوصيات فيزيكوشيميايي فرمولاسيون‌هاي تهيه شده شامل بررسي قابليت تشكيل نيوزوم، درصد محبوس‌سازي دارو، توزيع اندازه ذره‌اي وزيكولها و تعيين حداقل غلظت مهاري داروي آزاد و محبوس عليه گونه‌هاي استاندارد E.coli مطرح مي‌باشد. اين اميد وجود دارد كه در مراحل بعدي از نتايج اين تحقيق به منظور دارورساني درون سلولي در مدل‌هاي استانداردي نظير ماكروفاژهاي موش Balb/c (سلول‌هاي J774) به كمك نيوزومهاي تهيه شده استفاده شود.

۲- مواد و روشها

۲-۱: مواد

بريج ۵۲ ($C_{16}EO_2$)، بريج ۷۲ ($C_{18}EO_2$) و بريج۹۲ ($C_{9=9}EO_2$)، از دسته سورفكتانتهاي غير يوني پلي اكسي اتيلن آلكيل اتر و كلسترول از Fluka (سوييس)خريداري شدند. كلرامفنيكل سديم سوكسينات از شركت جابرابن حيان (ايران) تهيه گرديد. ساير مواد، حلالها و اجزاء سيستم بافري از Merck (آلمان) ابتياع گرديد.

۲-۲: فرمولاسيون نيوزومها

تهيه نيوزومهاي كلرامفنيكل به روش هيدراتاسيون لايه نازك چربي انجام پذيرفت. براي اين منظور، ابتدا اجزاء تشكيل دهنده نيوزوم شامل سورفكتانت غيريوني و

كلسترول در مقدار 5ml كلروفرم حل گرديد و كلرامفنيكل به دليل آبدوست بودن در بافرفسفات نمكي (pH ۷/٤) حل شد. نسبتهاي ۷۰/ ۳۰، ٦۰/ ٤۰ و ۵۰/ ۵۰ درصد مولي از سورفكتانت / كلسترول به ميزان ۲۰۰ ميكرو مول براي تهيه نيوزومها مورد استفاده قرار گرفت.

حلال آلي تحت دماي ۵۵ درجه و خلاء با استفاده از دستگاه تبخيركننده چرخان در يك بالن ته گرد ۱۰۰ml و با سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقيقه تبخير گرديد. به منظور اطمينان از تبخير باقيمانده جزئي حلال، بالن ته گرد به مدت ۲٤ ساعت در دسيكاتور نگهداري شد؛ سپس فازهاي گرم شده (۵ ميلي ليتر PBS حاوي كلرامفنيكل) در درجه حرارت بالاتر از نقطه انتقال فازي سورفكتانت‌ها (٦۰°C) به فيلم نازك اضافه شد. عمل هيدراتاسيون به مدت نيم ساعت با سرعت چرخش ۹۰ دور در دقيقه در دستگاه تبخيركننده چرخان ادامه يافت.

در خلال اين مدت نمونه مرتباً به كمك دست نيز تكان داده مي‌شد تا اينكه نهايتاً سوسپانسيون شيري رنگي حاصل شد. غلظت كلرامفنيكل به كار رفته در فرمولاسيون ۲/۵mg/ml بود.

۲-۳: بررسي مورفولوژيک نيوزومها

فرمولاسيون‌هاي نيوزومي از لحاظ شكل، تعداد نسبي نيوزومها، وجود يا عدم وجود كريستال‌هاي كلسترول يا كلرامفينكل سديم سوكسينات و وجود ذرات سورفكتانت مورد بررسي قرار گرفتند و عكس‌هاي ميكروسكوپي از نمونه‌ها با كمك دوربين ديجيتال (Sony) متصل به ميكروسكوپ تهيه گرديد. با ميكروسكوپ نوري مطالعه پديده تجمع وزيكولي (Vesicle aggregation) هم بررسي شد.

۲-۴: آناليزتوزيع اندازه ذره اي

بدين منظور، از دستگاه مبتني بر تكنيك پراش پرتولیزر (Malvern Master-Sizer, UK) دانشكده داروسازي تهران استفاده شد. مقدار چند قطره از سوسپانسيون نيوزومي كه ايجاد انسداد نوري مناسب در مسير پرتو ليزر مي‌نمود، به سل دستگاه حاوي آب مقطر در حال چرخش توسط مگنت اضافه گرديد و شمارش ذرات تا سي ثانيه ادامه يافت. لنز مورد استفاده ۱۰۰ بود. اين لنز امكان سنجش اندازه ذره‌اي بين ۰/۱ تا ۱۸۰ ميكرومتر را فراهم مي‌سازد.

۲-۵: بررسي پايداري فيزيكي سوسپانسيون‌هاي نيوزومي

نمونه‌هاي نيوزومي در درجه حرارت اتاق (۲۵°C) نگهداري شده و در طي ٤۸ ساعت از نظر جداسازي فازها به طريق ماكروسكوپي مورد بررسي قرار گرفتند. علاوه بر اين يک ميلي ليتر از سوسپانسيون‌هاي نيوزومي از نظر تشكيل كريستال‌هاي سوزني كلرامفنيكل، تغيير رنگ، جدا شدن اجزاء و از نظر تجمع نيوزومي بلافاصله بعد از تهيه مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنين به منظور بررسي پايداري وزيكولها، برخي از نمونه ها در زمانهاي دو هفته، يك، سه و شش ماه پـــس از تهيه و نگهداري در يخچال (۴ °C) از نظر توزيع اندازه ذره اي بررسي شدند.

۲-۶: كارايي محبوس‌سازي (Encapsulation efficiency) كلرامفنيكل داخل نيوزومها

به منظور جداسازي نيوزومها از سوسپانسيون و آناليز داروي محبوس شده، 1ml از نمونه‌هاي نيوزومي در لوله‌هاي ميكروسانتريفيوژ ۱/۵ ميلي‌ليتري ريخته به مدت ۱۵ دقيقه در ۱٤۰۰۰rpm سانتريفيوژ گشت كه منجر به جدا شدن نيوزومها از سوسپانسيون شد. بـــــراي تعيين مقدار داروي محبوس شده، 1ml ايزوپروپيل الكل بـــــه پلت نيوزومي افزوده شد تا ديواره نيوزومها حل شود و سپـس با ايزوپروپيل الكل بـــــه حجم ۲۵ ml رسانده شد و به روش UV (در طول موج ۲۷۶ نانومتر) مقدار دارو تعيين گرديد. درصد انكپسولاسيون از رابطه ذيل محاسبه شد:

درصد محبـــــوس سازي= داروي مـوجود در پلت×۱۱۰۰ داروي اضافه شده اوليه

۲-۷: بررسي آزادسازي دارو

مقدار يک ميلي ليتر از سوسپانسيون نيوزومي (داراي ۳۰ يا ٤۰ درصد مولي از كلسترول) حاوي دارو يا بدون دارو (به عنوان بلانك) درون كيسه ديباليز از جنس استات سلولز (MW- Cut Off 3500 D) ريخته شد و اين مجموعه در بشر دو جداره صد ميلي ليتري حاوي فاز گيرنده (PBS) داراي گردش آب °C ۳۷ قرار داده شد. يک مگنت كوچک در حال چرخش عمل يكنواخت نمودن توزيع داروي آزاد شده در فاز گيرنده را انجام مي داد. در زمانهاي مختلف از محيـــط نـــزديك همزن ml ۱ نمونه برداشته شد و بلافاصله 1ml فاز گيرنده (PBS) جايگزين گرديد. جذب نمـــونه‌هاي جمع‌آوري شده در طول موج ۲۷٦nm فرائت و مقدار كلرامفنيكل از روي منحني استاندارد مربوطه محاسبه گرديد.

نتايج آزادسازي با مدل هاي مختلف كينتيک آزادسازي دارو منطبق گرديده و بر اساس مربع ضريب رگرسيون، مدل مناسب تعيين شد.

۲-۸: تعيين فعاليت ضد باكتريايي داروي محبوس و آزاد

جهت بررسي فعاليت ضد ميكروبي از روش تعيين حداقل غلظت بازدارنده (MIC) استفاده شد. در اين قسمت MIC نيوزومهاي حاوي كلرامفنيكل سديم سوكسينات در بـرابـــــــر باكتري E.coli (PTCC = 1330) به روش نفوذ در آگار در مقايسه با داروي آزاد تعيين شد. غلظت آنتي

بيوتيک در پليت ها به ترتيب ٦٤، ٣٢، ١٦، ٨، ٤، ٢، ١، ٠/٥، ٠/٢٥ و ٠/١٣ ميكروگرم در هر ميلي ليتر بود.
جهت تهيه پليتهاي با توزيع يكنواخت ماده ضدميكروبي، كلرامفنيكل قبل از رسيدن درجه حرارت آگار به دماي كمتر از ٤٥ درجه سانتي گراد مخلوط گرديد. در مخلوط كردن نمونه ها نيز مراقبت كافي مبذول گرديدكه در نتيجه مخلوط كردن شديد حباب تشكيل نشود، چون حبابها باعث غير يكنواخت شدن محتـــــويات سطح پليـــت مي شوند. يك محيط كشت به عنوان شاهد منفي و يك پليت هم حاوي محيط كشت و سوسپانسيون ميكروبي به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد و پس از طي يك شبانه روز در گرمخانه قرار گرفتن نتايج بررسي گرديد. حداقل غلظت آنتي بيوتيک كه مانع از رشد قابل مشاهده پس از ٢٤ ساعت نگهداري در ^{o}C ٣٧ مي شد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

٢-٩: ارزيابي آماري

در اين مطالعه از آناليز واريانس (ANOVA) يك طرفه با Post Hoc مناسب (Duncanيا Scheff) براي مقايسه نتايج و تعيين اختلاف معني‌دار استفاده شد. سطح تفاوت معني دار با $P< ٠/٠٥$ مشخص مي گرديد. در همه مواردكمي حداقل سه بار مطالعه تكرار گرديد.

٣- نتايج

٣-١: بررسي خصوصيات نيوزومها

نتايج به دست آمده از بررسي شكل و تعداد نسبي نيوزومها، وجود يا عدم وجود كريستال هاي كلسترول يا ذرات سورفكتانت و پديده تجمع وزيكولي به طور خلاصه در جدول١ و تصاوير ميكروسكوپي برخي از نمونه هاي تهيه شده در شكل ١ ارائه شده است. اغلب نيوزومهاي تهيه شده به شكل چند لايه (MLV) و مدور بودند.
قطر ميانگين حجمي (d_v) نيوزوم هاي تهيه شده و انحراف استاندارد توزيع اندازه ذره اي در جدول ٢ ارائه شده است. نمودار ٢ توزيع اندازه ذره اي فرمولاسيون نيوزومي بريج ٥٢/ كلسترول (٣٠:٧٠ درصد مولي) را به نمايش گذاشته است. در مورد فرمولاسيونهاي حاوي بريج ٥٢ و بريج ٧٢ اندازه ذره اي در محدوده مناسبي قرار داشت اما در مورد بريج ٩٢ به دليل عدم پايداري و وجود كلسترول در سيستـم، شاهد افزايش اندازه ذرات بوديم.

٣-٢: پايداري فيزيكي نيوزومها

نتايج بدست آمده از بررسي پايداري فيزيكي نيوزومها بر اساس جدول ١ نشان دهنده پايداري ماكروسكوپـي فرمولاسيون هاي تهيه شده به روش هيدراتاسيون لايه نازك تا حدود سه ماه است. در مورد نيوزوم هاي بريج ٩٢ ناپـايداري بـه شكل جدا شدن كريستـــال و قطرك هاي سورفكتانت مشاهده گرديد. نتايج مربوط به ميزان احتباس كلرامفنيكل در نيوزوم ها در جدول ٢ ارائه شده است. بالاترين ميزان محبوس سازي (EE) دارو در نيوزوم هاي بريج ٧٢ / كلسترول (٦٠: ٤٠ درصد مولي) بـــه ميزان ٩/٢٤ ±٦١/٨ درصد مشاهده شد.
بر اساس اندازه گيري قطر نيوزومها متعاقب نگهداري فرمولاسيون ها در درجه حرارت يخچال اين مسئله مشخص شد كه با گذشت زمان با ذوب و ادغام نيوزومها، توزيع اندازه ذره اي به سمت دامنـــــه ذرات درشت تر انتقال مي يابد. نمودار ٣ اين موضوع را در مورد نيوزومهاي بريج ٥٢/ كلسترول (٤٠:۶٠ درصد مولي) كه به مدت شش ماه در يخچال نگهداري شده بودند را به وضوح نشان مي دهد.

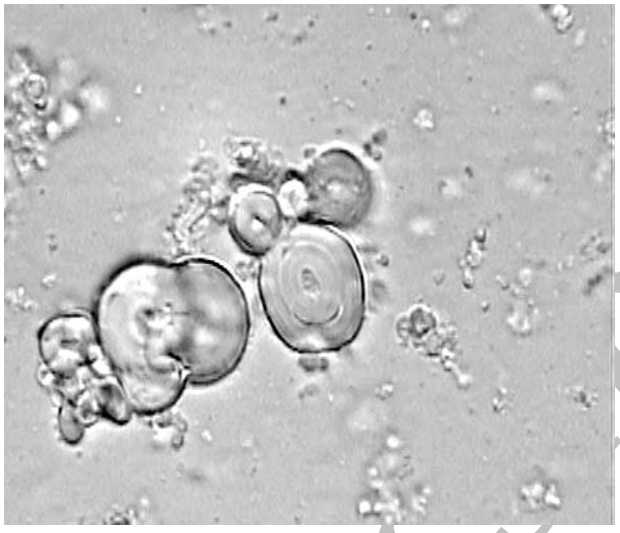
٣-٣: آزادسازي كلرامفنيكل

در همـــــه فرمولاسيـــون هاي مورد بررسي پـــروفايل آزادسازي در طي ٨ ساعت بـــررسي رهايش دارو حالت Bimodal داشت (نـــــمودار هاي ۴و۵). در طي يـــك تا ٢ ساعت ابتدايي، آزادسازي دارو داراي شيب خط بزرگتري در مقايـــــسه بـا زمان هاي بعدي بود.فاز سريعتر ابتدايي ممكن است از Desorption دارو از سطح نيوزوم ها و فـــــاز كند ثانويه احتمالاً از ديفوزيون دارو از ميان دو لايه هاي ليـــــپيدي ناشي شده باشد (٢٥).

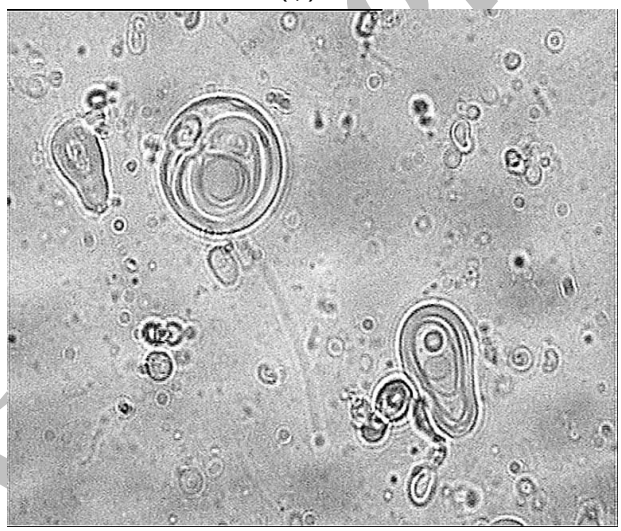
٣-۴: اثر ضد باكتريايي داروي محبوس وآزاد

در همه فرمولاسيونهاي نيوزومي بررسي شده، MIC داروي محبوس در ساختـــــارهاي نيوزومي بيشتر از داروي آزاد بود. در حالي كه براي كلرامفنيكل آزاد، MIC در مقابل E.coli برابر با ٢/٣± ٨ ميكروگرم بر مـــــيلي ليتر تعيين گرديد، در فرمولاسيونهاي نيوزومي بريج ٥٢/ كلسترول، MIC برابر با ٦/٢± ٣٢ و در فرمولاسيون هاي بريج ٧٢ / كلسترول، MIC برابر بـــا ١٨/٥± ٦٤ ميكروگرم بـــــر ميلي ليـــتر مشاهده شد (جدول٢). در فرمولاسيون هاي حاوي بريج ٩٢/ كلسترول در همه غلظت هاي مـــــورد استفاده كلرامفنيكل, رشد ميكروبي مشاهده گرديد.

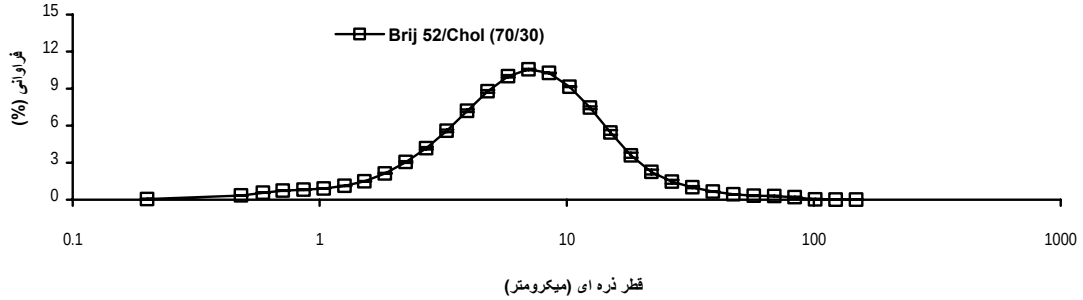
(الف)



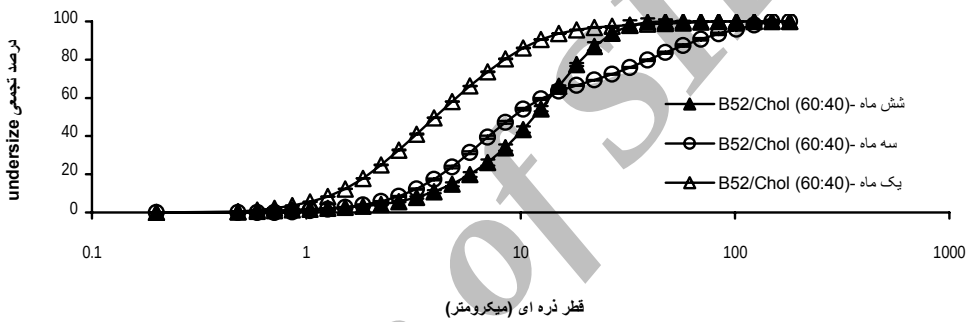
(ب)



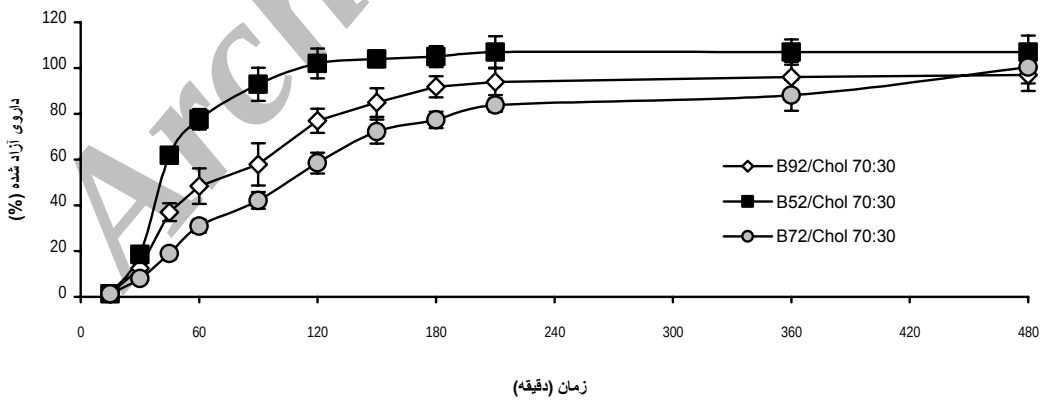
شكل ۱: تصويرهاي تهيه شده به وسيله ميكروسكوپ نوري بـــــــا درشت نمايي ٤٠٠ برابر از فرمولاسيون نيوزومي متشكل از الف) بريج ۵۲/ كلسترول با درصد مولي (۷۰: ۳۰) – ب) بريج ۵۲/ كلسترول با درصد مولي (۶۰: ۴۰).



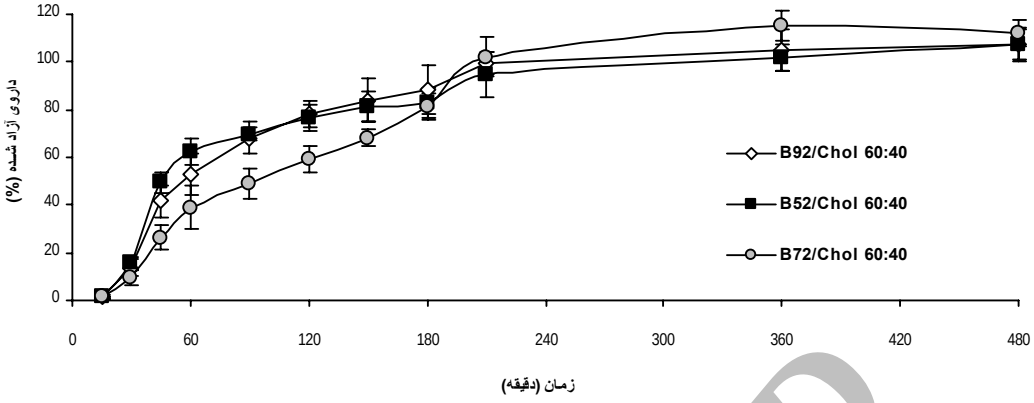
نمودار ٢: توزيع اندازه ذره اي نيوزومهاي بريج ٥٢ حاوي كلرامفنيكل در حضور ٣٠ درصد مولي كلسترول (ميانگين ± SD، n=٣)



نمودار ٣: افزايش اندازه و تغيير توزيع اندازه ذره اي نيوزومهاي بريج ٥٢ حاوي كلرامفنيكل در حضور ٤٠ درصد مولي كلسترول در طي ٦ ماه نگهداري در درجه حرارت يخچال (٤ °C). (ميانگين ± SD، n=٣)



نمودار ٤: آزادسازي كلرامفنيكل سديم سوكسينات از نيوزومها در حضور ٣٠ درصد مولي كلسترول در PBS و درجه حرارت ٣٧ °C (ميانگين ± SD، n=٣)



نمودار ۵: آزادسازي كلرامفنيكل سديم سوكسينات از نيوزومها در حضور ٤٠ درصد مولي كلسترول در PBS و درجه حرارت ۳۷oC (ميانگين ± SD، n=۳)

جدول ۱: شكل، تعداد نسبي و پايداري فيزيكي نيوزومهاي تهيه شده به روش هيدراتاسيون لايه نازك چرخي حاوي كلرامفنيكل سديم سوكسينات. نيوزومها پس از ٤٨ ساعت نگهداري در درجه حرارت اتاق در يخچال ٤ °C قرار داده شدند.

سورفكتانت	درصد مولي كلسترول	شكل ظاهري	تعداد نسبي نيوزوم	تجمع نيوزومها	وجود قطره يا ذره سورفكتانت	جدا شدن فازها	جدا شدن كريستال كلسترول		
							يک هفته	يک ماه	سه ماه
	۳۰	MLV*	زياد	+	-	+	-	-	-
بريج ۵۲	٤٠	MLV	زياد	-	-	+	-	-	-
	۵۰	MLV	زياد	+	-	-	-	+	+
	۳۰	MLV	زياد	-	-	-	-	+	+
بريج ۷۲	٤٠	MLV	زياد	-	-	+	-	+	+
	۵۰	MLV	زياد	-	-	+	-	+	+
	۳۰	MLV	كم	-	+	+	+	+	+
بريج ۹۲	٤٠	MLV	كم	-	+	+	-	+	+
	۵۰	MLV	كم	-	+	-	-	-	+

*Multilamellar vesicle

جدول ۲: درصد محبوس سازي دارو، قطر ميانگين حجمي و حداقل غلظت مهاري (MIC) كلرامفنيكل سديم سوكسينات محبوس در نيوزومهاي تهيه شده به روش هيدراتاسيون لايه نازك چرخي (SD ± ميانگين,n=3).

سورفكتانت	درصد مولي كلسترول	درصد محبوس سازي كلرامفنيكل	MIC (µg/ml)	قطر حجمي نيوزومها (µm)
	۳۰	۵۵/۲۸±٦/۲۷	۳۲ ±٦/۲	۷/۷۹±۱/٦۷
بريج ۵۲	٤٠	۲٤/٦۵±۷/۳	---	٦/۲۵±۰/۰۵
	۵۰	--------	---	۸/۳۸±۰/۰۳
	۳۰	۳٦/۹±۷/۱۰	٦٤ ±۱۸/۵	٦/۸۹±۰/۲۹
بريج ۷۲	٤٠	٦۱/۸۱±۹/۲٤	---	۱۱/۰۷±۰/۲۳
	۵۰	--------	---	۱۵/۱٤±۰/٦۳
	۳۰	٤۸/۷٦±۹/٤	>٦٤	تعيين نشد
بريج ۹۲	٤٠	۲۸/۸۲±٦/۷۲	---	تعيين نشد
	۵۰	--------	---	۸۵±۱/۷۰

جدول ۳: جدول ۳-۷- مربع ضريب رگرسيون (r2) مدلهاي بررسي آزادسازي كلرا مفنيكل از نيوزومها

مدلهاي آزادسازي دارو	نوع فرمولاسيون					
	mole% Brij 52/Chol		mole% Brij 72/Chol		mole% Brij 92/Chol	
	60:40	70:30	60:40	70:30	60:40	70:30
Baker & Lonsdale	۰/۹۳۱	۰/۹۵۷	۰/۹٤۷	۰/۸۹۹	۰/۹۳۵	۰/۹۷٦
Higuchi	۰/۵۸۷	۰/۹۵۰	۰/۹۸۵	۰/۹۲۹	۰/۹۵۰	۰/۹۷۷
Fick's first law	۰/۷٤۵	۰/۹٦۲	۰/۹۷۱	۰/۹٦۹	۰/۸۷۲	۰/۹۲٦
Zero order	۰/۷٤٦	۰/۹٦۳	۰/۹۷۰	۰/۹۷۰	۰/۸۷۳	۰/۹۲۵
Hixson-Crowell	۰/۸٤۷	۰/۹٦۲	۰/۷۸۹	۰/۹۸۷	۰/۹٤۸	۰/۹۹۰
First order	۰/۷٤٦	۰/۹۵۳	۰/۹۷۱	۰/۹٦۹	۰/ ۸۷۳	۰/۹۲٦

۴- بحث

در تحقيق حاضر آزادسازي كامل كلرامفنيكل سديم سوكسينات، داروي محلول در آب با وزن مولكولي پايين، مشاهده گرديد (نمودارهاي ۴و۵). آزادسازي كامل كربوكسي فلوئورسئين از نيوزومهاي متشكل از بريج / كلسترول نيز قبلاً گزارش شده است (۲۶). بر خلاف نتيجه گيري بدست آمده در اين تحقيق، Ruckmani و همكارانش آزادسازي كند سيتارابين هيدروكلرايد از نيوزومهاي متشكل از استرهاي سوربيتان / كلسترول و استرهاي پلي اكسي اتيلنه سوربيتان / كلسترول را گزارش نموده اند (۲۷). با دقت در مقدار كلسترول مورد استفاده در تحقيق مذكور، مشخص مي گردد كه درصد مولي بالاي كلسترول مورد استفاده باعث كند شدن آزادسازي داروي محلول در آب سيتارابين هيدروكلرايد شده است. در فرمولاسيون نيوزومي بريج ۵۲ / كلسترول (۷۰ : ۳۰ درصد مولي) درصد داروي آزادشده پس از ۱۲۰ دقيقه كامل گرديده و برابر با ۱۰۰ درصد مي شود، در حالي كه در فرمولاسيون بريج ۵۲ / كلسترول (٦۰: ٤۰ درصد مولي) اين ميزان آزادسازي پس از ۳٦۰ دقيقه مشاهده مي شود (نمودار۵). براساس اين يافته بين زمان كامل شدن آزادسازي دارو در حضور دو مقدار متفاوت كلسترول اختلاف معني دار آماري وجود دارد ($P< ۰/۰۵$). اين نتيجه گيري با يافته هاي Yoshioka و همكارانش (۲۸) در مورد آزادسازي كربوكسي فلوئورسئين از نيوزومهاي حاوي استرهاي سوربيتان / كلسترول مطابقت دارد. Bisby و همكارانش (۲۹) نيز ملاحظه كردند كه تغيير درصد كلسترول بر رهايش Calcein از ليپوزومهاي داراي فسفوليپيدهاي مختلف تاثيرگذار بوده و با افزايش كلسترول به بيش از ۵ درصد مولي، سرعت رهايش دارو به ميزان قابل توجهي كاهش مي يابد. افزايش درصد كلسترول در دو نوع نيوزوم بريج ۵۲ و بريج ۷۲ اثر متفاوتي را نشان داد به نحوي كه در فرمولاسيونهاي بريج ۵۲ با كاهش و در وزيكولهاي بريج ۷۲ با افزايش سرعت و ميزان آزادسازي دارو همراه بود (نمودارهاي ۴و۵). تفاوت درجه حرارت انتقال فاز ژلي به مايع بريج ۵۲ و بريج ۷۲ مي تواند اثر متفاوت كلسترول را در دو نوع نيوزوم توجيه نمايد. افزايش درصد كلسترول در زير درجه حرارت انتقال فازي (در مورد بريج ۷۲) منجر به نامنظم شدن نظم غشاء گرديده و نشت بيشتر دارو مشاهده مي شود (۲۹). در حالي كه در بالاي درجه حرارت انتقال فاز (در مورد بريج ۵۲) با افزايش درصد كلسترول نظم غشاء افزايش يافته و آزادسازي دارو كاهش خواهد يافت (۲۶).

در حضور مقادير مساوي از كلسترول، سرعت آزاد سازي كلرامفنيكل در فرمولاسيونهاي بريج ۷۲ در مقايسه با نيوزومهاي بريج ۵۲ و بريج ۹۲ كمتر بود (نمودارهاي ۴و۵). با توجه به اينكه زنجيره هيدروكربني بريج ۷۲ داراي ۱۸ كربن ($C_{18}EO_2$) و زنجيره آلكيل بريج ۵۲ داراي ١٦ كربن ($C_{16}EO_2$) بوده و متعاقباً مولكولهاي بريج ۷۲ در ساختار نيوزومي داراي نظم بيشتري مي باشند، سرعت آزادسازي كمتر كلرامفنيكل مشاهده مي شود. آزادسازي كندتر انسولين از نيوزومهاي اسپن ٦۰ (C_{18}) در مقايسه با اسپن ٤۰ (C_{16}) نيز قبلاً گزارش شده است (۳۰). همچنين Chattaraj و Das (۳۱) رهايش كندتر هماگلوتينين ويروس آنفلوانزا را در نيوزومهاي اسپن ٦۰ (C_{18}) در مقايسه با اسپن ٤۰ (C_{16}) گزارش نمودند. از آنجا كه زنجيره هيدروكربني C_{18} بريج ۹۲ داراي پيوند غيراشباع بوده و رهايش داروها از دولايه هاي حاوي زنجيره غير اشباع بالاتر است، سرعت بالاتر آزادسازي دارو از نيوزوم هاي بريج ۹۲ در مقايسه با بريج ۷۲ قابل توجيه است.

براساس يافته هاي مذكور به طور كلي نتيجه گيري شد كه در حضور ۳۰ درصد مولي كلسترول در هر ۳ نوع سورفكتانت مورد بررسي، مدل Hixson-Crowell يافته هاي رهايش را بهتر بيان مي نمايد (جدول ۳). اين مدل براي بيان رهايش داروها از ماتريكسهاي كروي كه بيشتر تابع انحلال لايه هاي سطحي و يا سايش آنها بوده مورد استفاده قرار گرفته و كمتر به ديفوزيون دارو از خلال ماتريكس مورد نظر اشاره دارد (۳۲). از سوي ديگر در هر ۳ نوع سورفكتانت پلي اكسي اتيلن آلكيل اتري بررسي شده، رهايش مبتني بر ديفوزيون در حضور ٤۰ درصد مولي از

كلسترول توجيه گر آزادسازي كلرامفنيكل سديم سوكسينات مي باشد. در نيوزومهاي بريج ۵۲ اين مدل Baker & Lonsdale بود. اين مدل آزادسازي براي فرمولاسيونهاي كروي كه رهايش دارو به شكل ديفوزيون از خلال ماتريكس صورت پذيرفته، مورد استفاده قرار گرفته و از مدل هيگوچي مشتق شده است (۳۲). در مورد دو سورفكتانت ديگر داده هاي حاصل از آزادسازي دارو براي فرمولاسيونهاي حاوي ۴۰ درصد كلسترول با مدل هيگوچي بهتر منطبق مي گرديد (جدول۳).

با توجه به اينكه كلسترول در ساختارهاي دو لايه نيوزومي با تغيير سياليت زنجيره هاي هيدروكربني، اندوترم انتقال ژل به مايع را حذف مي نمايد، ديواره نيوزومي استحكام بيشتري پيدا مي كند (۳۳). كلسترول اثر متراكم كننده اي روي دولايه هاي چربي داشته و نشت پذيري غشاهاي حاوي كلسترول كاهش مي يابد (۳۴). نتيجه اين وضعيت، مقاومت بيشتر غشاهاي دو لايه نيوزومي را در برابر انحلال و سايش به دنبال خواهد داشت.

نيوزومهاي بريج ۷۲ در حضور ۴۰ درصد مولي كلسترول بيشترين درصد احتباس دارو را به نمايش گذاردند (جدول ۲). با توجه به اينكه زنجيره آلكيل بريج ۷۲ داراي ۱۸ كربن بوده و درجه حرارت انتقالي فاز آن برابر با ۴۰ °C (۱۱) مي باشد، يكپارچگي غشاء ليپيدي دو لايه افزايش يافته و نشت پذيري آن كاهش مي يابد (۲۷). نتيجه اين امر افزايش درصد EE داروهاي محلول در آب در ساختار وزيكولي خواهد بود (۲۹). بالاترين درصد محبوس سازي انسولين در سري نيوزوم هاي تهيه شده از استرهاي سوربيتان/ كلسترول (۷۰ : ۳۰ درصد مولي) نيز در مورد اسپن ۶۰ (C_{18} ، نقطه ذوب برابر با ۵۱/۵ °C) گزارش شده است (۳۰). با كاهش درصد كلسترول در فرمولاسيون هاي بريج ۷۲ / كلسترول (۷۰: ۳۰ درصد مولي) درصد محبوس سازي دارو هم به ميزان قابل توجهي كاهش يافته ($P< ۰/۰۵$) و به ۷/۱ ± ۳۶/۹ رسيده است. تأثير متضاد كلسترول بر آزادسازي و محبوس سازي دارو به دليل تفاوت در درجه حرارتي (۳۷°C در مرحله بررسي آزاد سازي و ۶۰°C در زمان شكل گيري و محبوس سازي كلرامفنيكل) است كه كلسترول اثر خود را اعمال مي نمايد.

از سوي ديگر در دو فرمولاسيون بريج ۵۲ و بريج ۹۲ افزايش مقدار كلسترول به كاهش درصد محبوس سازي دارو منتهي شده است (جدول۲). در بررسي محبوس سازي Calcein در نيوزومهاي متشكل از اسپن ۶۰ / كلسترول نيز چنين حالتي مشاهده شده است به طوري كه با افزايش درصد مولي كلسترول از ۳۰ به ۴۰ درصد، محبوس سازي اين ماده فلوئورسان كاهش يافته است (۱۱). اين تصور وجود دارد كه كلسترول در ساختارهاي دو لايه ژل مانند (نظير بريج ۷۲) به دليل بر هم زدن نظم ساختاري و امكان ورود داروي هيدروفيل باعث افزايش درصد محبوس سازي دارو مي گردد (۳۵). برعكس درمورد ساختارهاي دو لايه با ماهيت مايع (نظير بريج ۵۲ و بريج ۹۲), كلسترول با افزايش نظم ساختاري از ورود داروهاي هيدروفيل ممانعت نموده و درصد محبوس سازي دارو را كاهش مي دهد (۲۶).

اندازه وزيكول هاي ليپيدي تحت تاثير حجم زنجيره هيدروكربني، طول زنجيره آلكيل و مساحت سطحي مولكولي در بين فاز آب، هيدروكربن قرار مي گيرد. در مورد نيوزوم هاي بريج ۵۲ (C_{16})/كلسترول با افزايش درصد مولي كلسترول از ۳۰ به ۴۰ قطر متوسط حجم (d_v) از ۱/۶۷±۷/۷۹ ميكرومتر به ۰/۰۵ ± ۶/۲۵ ميكرومتر تقليل يافته است (جدول۲). اثر مشابهي در مورد كاهش اندازه نيوزومهاي متشكل از $C_{12}EO_3$، $C_{18}EO_3$، $C_{9=9}EO_{10}$ (۲۶) و $C_{12}EO_7$ ، $C_{16}EO_5$ و $C_{18}EO_7$ گزارش شده است (۳۶). در مورد نيوزوم هاي متشكل از بريج ۵۲ يا بريج ۷۲ / كلسترول حاوي انسولين نيز اثري مشابه ملاحظه شده است (۳۰). اندازه بسيار بزرگ نيوزومهاي بريج ۹۲ / كلسترول (۵۰:۵۰ درصد مولي) كه بر خلاف انتظار مي باشد، مبين ناپايداري زياد فرمولاسيونهاي حاوي اين سورفكتانت در حضور كلرامفنيكل سديم سوكسينات است. در مورد تمام فرمولاسيون هاي حاوي بريج ۹۲ پس از مدت كوتاهي (حدوداً يك ماه پس از تهيه)، جدا شدن قطرهاي سورفكتانت و كريستالهاي كلسترول مشاهده گرديد (جدول۱). اين مسئله مي تواند ناشي از سياليت بالاي غشاهاي نيوزومي حاوي اين سورفكتانت داراي پيوند غير اشباع دوگانه در زنجيره آلكيل خود باشد. اين وضعيت در مورد نيوزومهاي اسپن ۸۰ حاوي انسولين (۳۰) يا ترتينوئين (۳۷) نيز، گزارش گرديده است. افزايش اندازه نيوزوم هاي بريج ۵۲ و بريج ۷۲ متعاقب افزايش درصد كلسترول از ۳۰ به ۴۰ درصد مولي (جدول ۲) مي تواند ناشي از افزايش دو لايه هاي ليپيدي باشد (۳۰).

محبوس سازي آنتي بيوتيك ها در سيستم هاي وزيكولي غالباً به كاهش اثر بخشي آنتي بيوتيك در محيط كشت منجر مي گردد (۳۸)؛ در اين بررسي كاهش قابل توجه اثربخشي كلرامفنيكل و استرپتومايسين محبوس در ليپوزومها، عليه E.coli گزارش شده است.در تحقيق حاضر نيز چنين نتيجه اي حاصل شد (جدول۲). در فرمولاسيونهاي حاوي بريج ۹۲/كلسترول در همه غلظت هاي مورد استفاده كلرامفنيكل, رشد ميكروبي مشاهده شد.

اين امر مي تواند ناشي از تشكيل كمپلكس بين آنتي بيوتيك و بريج ۹۲ ($C_{9=9}EO_2$) باشد، زيرا آزادسازي محدود كربوكسي فلوئورسئين از نيوزوم هاي بريج ۹۷ ($C_{9=9}EO_{10}$) / كلسترول (۲۶) نيز به تشكيل كمپلكس بين سورفكتانت با زنجيره هيدروكربني غير اشباع و داروي محلول در آب ارتباط داده شده است.

بـــــه هر حال كاهش اثر بخشي در محيط كشت داروهاي مذكور در محيط هاي درون تني و يا كشت سلولي, وضعيت معكوس را در پيش مي گيـرند. در حالي كه Stevenson و همكارانش (۳۸) كاهش ضد ميكروبي استرپتومايسين و كلرامفنيكل محبوس ليپوزومي بر عليه استافيلوكوك طلايي و E.coli را در شرايط برون تني گزارش نموده اند، افزايش ده تا صد برابر غلظت و اثر بخشي داروهاي محبوس ليپوزومي مذكور را در محيـــــط كشت سلول هاي ماكروفاژ موش (J774) مشاهده نمودند.

استفاده از روش نفوذ آنتي بيوتيک در آگار براي تعيين MIC داروهاي محلول در آب نظير آمينوگليكوزيدها (۶) و پلي ميكسين B (۳۹) گزارش شده و در تحقيق حاضر نيز بدين منظور مورد استفاده واقع گرديد.

۵- نتيجه گيري

بر اساس نتايج تحقيق حاضر مي توان استنتاج نمود كه با تغيير نوع سورفكتانت و درصد كلسترول مي توان آزادسازي كنترل شده كلرامفنيكل سديم سوكسينات را به دست آورد، اما اين پديده با كاهش اثر بخشي برون تني آنتي بيوتيك مذكور همراه است. به هر حال علي رغم كاهش اثرضد ميكروبي آنتي بيوتيكهاي محصور در سيستم هاي وزيكولي نظير ليپوزومها و نيوزومها، اين انتظار وجود دارد كه در بررسي درون تني، اين گونه سيستم ها به عنوان افزايش دهنده هاي نفوذ، عمل نموده و كارآيي داروهاي مذكور را افزايش دهند. اين نظريه با بررسي اثر بخشي درون سلولي (سلول هاي J774 آلوده به E.coli) نيوزومهاي حاوي كلرامفنيكل سديم سوكسينات تاييد يا رد خواهد شد و انشاا... در مرحله بـــعدي تحقيق حاضر اين مسئله بررسي مي گردد.

6- References:

1. Bakker-Woudenberg A.J.M. Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages, Advanced Drug Delivery Reviews, 1995, 7: 5-20.
2. Touitou E., Junginger H.E., Weiner N.D., Nagai T., Mezei M. Liposomes as carries for topical and transdermal delivery, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994, 83: 1189-1203.
3. Wong J., Yang-Huiming L. Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular francisella tularensis infection, Journal of Controlled Release, 2003, 92: 265-273.
4. Salem I.I., Duzgunes N. Efficacies of Cyclodextrin-complexed and liposome- encapsulated clarithromycin against Mycobactrerium avium complex infection in human macrophages, International Journal of Pharmaceutics, 2003, 250: 403-414.
5. Schiffelers R.M., Bakker-Woudenberg A.J.M., Snijders S.V., Strom G. Localization of sterically stabilized liposomes in klebsiella pneumoniae-infected rat lung tissue: influence of liposome characteristics, Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1421: 329-339.
6. Omri A., Ravaoarinoro M. Preparation, properties and the effect of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulations on Gram-negative and Gram-positive bacteria, International Journal of Antimicrobial Agents, 1996, 7: 9-14.
7. McAllister S.M., Alpar H.O., Brown M.R.W. Antimicrobial properties of liposomal polymixin B, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1993, 43: 203-210.
8. Pinto-Alphandary H., Andremont A., Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications, International Journal of Antimicrobial Agents, 2000, 13: 155-158.
9. Agrawal A.K., Gupta C.M. Tuftsin–bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 41: 135-146.
10. Tao L. Skin Delivery from Lipid Vesicles, Cosmetic & Toiletry, 2000, 115: 43-49.
11. Manosroi A., Wongtrakul P., Manosroi J., Saki H., Sugawara F., Yuasa M., Abe M. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol, Colloid. Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 30, 129-138
12. Fang J.Y., Hong C.T., Chiu W.T., Wang Y.Y. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin, International Journal of Pharmaceutics, 2001, 219: 61-72.
13. Jain C.P., Vyas S.P. preparation and characterization of niosomes containing rifampicin for lung targeting, Journal of Microencapsulation, 1995, 12:401-407.
14. Jayaraman S.C., Ramachandran C., Weiners N. Topical delivery of erythromycin from formulations: preparation and in vivo hairless mouse study, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996, 85: 1082-1084.
15. Gopinath D., Ravi D., Karwa R., Rambhau D. Pharmacokinetics of zidovudine following intravenous bolus administration of a novel niosome preparation devoid of cholesterol. Arzneim. –Forsch./Drug Research, 2001, 51: 924-930.
16. Carter K.C., Mullen A.B., Sundar S., Kenney R.T. Efficacies of vesicular and free Sodium stibogluconate formulations against clinical isolate of Leishmania donovani, Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2001, 45: 3555-3559.
17. Carrter K.C., Baillie A.J., Alexander J., Dolan T.F. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BABL/c mice infected with Leishamania donovani is organ-dependent, Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1998, 40: 32.
18. Williams D.M., Carter K.C. Baillie A.J. Visceral Leishmaniasis in the BALB/C mouse: a comparison of the in vivo activity of five non-ionic surfactant vesicle preparations of sodium stibogluconate, Journal of Drug Targeting, 1995, 3: 1-7.

19. Baillie A.J., Dolan T.F., Alexander J., Carter K.C. Visceral Leishmaniasis in the BALB/C mouse: sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stable of infection, International Journal of Pharmaceutics, 1989, 57: 23-28.
20. Williams D., Mullen A.B., Baillie A.J., Carter K.C. Comparison of the efficacy of free and non-ionic-surfactant vesicular formulations of paromomycin in a murine model of visceral Leishmaniasis, Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1998, 50: 135-135.
21. Medda S, Mukhopadhyay S., Basu M.K. Evaluation of the in vivo activity and toxicity of amarogentin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 44: 791-794.
22. Sinha J , Raay B., Das N., Medda S., Mahato S.B., Basu M.K. Bacopasaponin C: critical evaluation of anti-leishmanial properties in various delivery Modes, Drug Delivery, 2002,9:55-62.
23. Giorgio C.D., Delmas F., Oliver E., Elias R., Balansard G., Timon-David P. In vitro activity of the β-carbolin alkaloid harmane, harmine and harmalin toward parasites of the species Leishmania infantom, Journal of Experimental parasitology, 2004, 106:67-74.
24. Basu M.K., Lala S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis, Current in Molecular Medicine, 2004;4:681-689.
25. Manosori A., Bauer K.H. The entrapment of human insulin-DEAE dextran complex in different compound liposomes. Drug Development & Industrial Pharmacy, 1989, 15: 2531-2546.
26. Hofland H.E.J. Vesicles as transdermal delivery system, PhD Thesis, University of Leiden, The Netherlands, 1992.
27. Ruchmani K., Jayakar B., Ghosal S.K. Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemias: encapsulation, storage, and in vitro Release, Drug Development & Industrial Pharmacy, 2000, 26: 217-222.
28. Yoshioka T., Strenberg B., Florence A.T. Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60 and 80) and a sorbitan triester (Span 85), International Journal of Pharmaceutics, 1994, 105: 1-6.
29-Bisby R.H., Mead C., Morgan C.H. Photosensitive liposomes as "cages" for laser-triggered solute delivery: the effect of bilayer cholesterol on Kinetics of solute release. FEBS Letter, 1999, 463: 165-168.
30. Varshosaz J., Pardakhty A., Hajhashemi V., Najafabadi A.R. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery, Drug Delivery, 2003, 10: 251-262.
31. Chattaraj S.C., Das S.K. Physicochemical characterization of influenza viral loaded surfactant vesicles, Drug Delivery, 2003, 10: 73-77.
32. Lu D.R, Abu-Izzak and Mao F. Nonlinear data fitting for controlled release devices: an integrated computer Program, International Journal of Pharmaceutics, 1996, 129: 243-251.
33. Uchegbu I.F., Vyas S.P. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, International Journal of Pharmaceutics, 1998, 172: 33-70.
34. Seras-Cansel D., Ollivion M., Lesieur S. Generation of non-ionic monoalkyl amphiphile-cholesterol vesicles: evidence of membrane impermeability to octyl glycoside. S.T.P. Pharma Sciences, 1996, 6: 12-20.
35. Schiffelers R., storm G., Bakker-woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies, Journal of Antimicrobial chemotherapy, 2001, 48. 333-344.
36. Vanhal D. Non-ionic surfactant vesicles for dermal and transdermal drug delivery, PhD Thesis, University of Leiden, The Netherlands, 1994.
37. Manconi M., Sinico C., Valenti D., Loy G., Fadda A.M. Niosomes as carriers of tretinoin. I. Preparation and propterties, International Journal of Pharmaceutics, 2002, 234: 237-248.
38. Stevenson M., Baillie A., Richards R.M.E. Enhanced activity of streptomycin and choloramphenicol against intra cellular Escherichia coli in the J774 macrophage cell line mediated by liposome delivery, Journal of Antimicrobial Agents & chemotherapy, 1983, 24: 742-749.
39. Omri A., Suntres Z.E., Shek P.N. Enhanced activity of liposomal polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa in a rat model of lung infection, Biochemical Pharmacology, 2002, 64: 1407-1413.