Archive of SID

تهیه نانولیپوزوم‌های انسولین خوراکی با فرمولاسیونی جدید و بررسی کارایی آن در شرایط in vitro

امیر قریب
دکترای بیوشیمی بالینی، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه علوم آزمایشگاهی

زهره فائزی‌زاده
دکترای بیوشیمی بالینی، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه علوم آزمایشگاهی

نگارنده پاسخگو: دکتر امیر قریب
آدرس: بروجرد، خیابان مدرس، ساختمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی
تلفن: 2-3500201-0662داخلی 256
نمابر:0662-4453013
پست الکترونیک:
amirgharib@gmail.com

مقدمه
مصرف انسولین از طریق دهان بهترین و ساده‌ترین روش تجویز این هورمون می‌باشد. در این مطالعه ابتدا نانولیپوزوم‌های انسولین پوشش‌دار شده با ماده کیتوزان با فرمولاسیونی جدید تهیه شد و سپس کارایی آن جهت حمل و نگهداری این هورمون در شرایط in vitro مورد بررسی قرار گرفت.

هدف
هدف از این مطالعه تهیه نانولیپوزوم‌های انسولین خوراکی با فرمولاسیونی جدید و بررسی کارایی آن در شرایط in vitro بوده است.

مواد وروش‌ها
محلول نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین با بار سطحی منفی به روش تبخیر فاز معکوس با استفاده از مواد نظیر لیستین، کلسترول، ستیل دی فسفات و بتاسیکلو دکسترین با فرمولاسیون‌های متفاوت تهیه گردید و سطح خارجی نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان پوشش‌دار شد. سپس ضریب محصورکنندگی نانولیپوزوم‌های تهیه شده پس از تخریب غشاء نانولیپوزوم‌ها به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری گردید و کارایی نانولیپوزوم‌های تهیه شده در جلوگیری از هضم و تخریب انسولین توسط آنزیم‌های پپسین و تریپسین مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج
تحقیقات نشان داد که ضریب محصورشوندگی انسولین در نانولیپوزوم‌های تهیه شده با فرمولاسیون جدید به کار رفته به طور قابل توجه نسبت به سایر فرمولاسیون‌های دیگر بیشتر بوده و معادل 16/0±79 می‌باشد. در تمام شرایط مورد مطالعه بر خلاف عملکرد نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کیتوزان و نیز انسولین به فرم آزاد، نانولیپوزوم‌های پوشش‌دارشده با کیتوزان از هضم و تخریب انسولین توسط آنزیم‌های پپسین و تریپسین جلوگیری نمودند.

نتیجه‌گیری
با توجه به ضریب محصور شوندگی بالا و کارا بودن نانوکپسول‌های حاوی انسولین تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی می‌توان از این فرمولاسیون جدید جهت تهیه انسولین خوراکی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی
Chitosan, Insulin,Entrpment Efficacy, Nanoliposome

تاریخ وصول: 1389/3/23
تاریخ تایید: 1389/12/12

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه با توجه به تمام پیشرفت‌هایی که در علم داروررسانی به عمل آمده است هنوز بشر نتوانسته است در مورد سیستم انتقالی غیرتزریقی برای هورمون انسولین به یک روش قطعی و کامل دست یابد (1). بیماران مصرف کننده‌ی هورمون انسولین، نوع خوراکی آن را به سایر روش‌های تجویز این هورمون ترجیح می‌دهند، زیرا این روش بسیار راحت و بدون درد بوده و ساده‌ترین روش محسوب می‌گردد(2). از مهم‌ترین مشکلاتی که بر سر راه مصرف خوراکی پپتیدها و پروتئین‌های نظیر انسولین وجود دارد وجود آنزیم‌های مختلف پروتئاز در دستگاه گوارش می‌باشد که به سرعت ترکیبات مذکور را مورد تجزیه قرار می‌دهند. هم‌چنین اتصالات بین سلول‌های اپی‌تلیال مخاط روده یک سد مکانیکی را در مقابل جذب پروتئین‌ها ایجاد می‌نماید. جهت تهیه انسولین خوراکی باید دو مانع مذکور از پیش رو برداشته شوند(3).

در این مورد تاکنون تحقیقات بسیار وسیعی انجام گردیده است. مثلا برای از بین بردن مانع اول تاکنون روش‌های مختلفی نظیر محصور نمودن انسولین در حاملین دارویی به ویژه نانوپارتیکل‌ها به کار گرفته شده است. از جمله این نانوپارتیکل‌ها می‌توان به نانولیپوزوم‌ها، نانوسفرها و نانوکپسول‌ها اشاره نمود (4). نانولیپوزوم‌ها قادرند داروهای آب دوست نظیر پپتیدها و پروتئین‌ها را در خود محصور نمایند و از مهم‌ترین ویژگی آن ها این است که تجزیه پذیر بوده در محیط‌های زنده سمیت ایجاد نمی‌نمایند. هم‌چنین نانولیپوزوم‌ها قادرند ترکیبات محصور در خود را از حملات آنزیمی و تشخیص توسط سیستم ایمنی در امان دارند (5). تحقیقات نشان می‌دهد که محصورشدن انسولین در نانولیپوزوم‌ها با کمتر شدن اثرات تخریبی آنزیم‌های گوارشی بر روی این هورمون و نیز جذب بیشتر آن در روده همراه است (6). امروزه در این موارد جهت تقویت و کارایی بیشتر نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین علاوه بر استفاده از فرمولاسیون‌های جدید در تهیه، سطح آن‌ها

را نیز با پلی‌مرهای مختلفی پوشش‌دار می‌نمایند(7).

بهترین پلیمر شناخته شده در این مورد ماده‌ای به نام کیتوزان (chitosan) می‌باشد. این ماده غیرسمی پلیمری از قند N-استیل، بتا- D- گلوکز آمین است و از دی آسیلاسیون کیتین حاصل می‌گردد و به علت وجود گروه آمین این ماده در محیط اسیدی معده بسیار پایدار می‌باشد(8). بنابراین وجود پلیمری از این ماده در اطراف نانولیپوزوم‌ها حاوی انسولین مانع از دسترسی آنزیم‌های گوارشی معده و سایر قسمت‌های دستگاه گوارش به مولکول‌های انسولین شده و در نتیجه مولکول‌های انسولین از تخریب در امان می‌مانند(7). از طرف دیگر جهت از بین بردن مانع دوم می‌توان از موادی نظیر سالیسیلات‌ها، کلرات سدیم و بتا سیکلودکسترین در فرمولاسیون تهیه انسولین خوراکی استفاده نمود. این مواد باعث می‌گردند که سیالیت لیپیدهای غشاء سلول‌های مخاطی روده افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن‌ها افزایش یابد(9). در این کار تحقیقاتی با استفاده از فرمولاسیونی جدید شکل تازه‌ای از انسولین خوراکی تهیه شد. در فرمولاسیون مذکور برای اولین‌بار از ستیل دی فسفات (به عنوان ماده ایجادکننده بارسطحی منفی در نانولیپوزوم‌ها) استفاده گردید با این فرض که چون مولکول‌های کیتوزان بار مثبت دارند تعداد بیشتری از این مولکول‌ها به سطح نانولیپوزوم‌ها متصل می‌گردد

www.SID.ir

Archive of SID

و در نتیجه کارایی و عملکرد فرم جدید انسولین خوراکی تهیه شده در مقایسه با انواع قبلی بهتر خواهد بود، زیرا همان طور که مشخص گردیده تعداد مولکول‌های کیتوزان موجود در سطح خارجی نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین رابطه‌ی مستقیم با مقدار جذب انسولین از طریق روده و نیز مقاومت آن در برابر هیدرولیز اسیدی و آنزیمی دارد (10).

هم‌چنین در این فرمولاسیون بتا سیکلو دکسترین با مولاریته مشخص همراه با انسولین در نانولیپوزوم‌ها محصور گردید و تاثیر آن در پایداری و ضریب محصورشوندگی انسولین مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

مواد شیمیایی: برخی از مواد مصرفی نظیر انسولین، کلسترول، کلات سدیم، پپسین، لیستین سویا، کیتوزان (با وزن مولکولی 1000 کیلو دالتون) و ستیل دی فسفات از شرکت سیگما و تریپسین از شرکت دیفکو تهیه گردیدند.

دستگاه‌های مورد استفاده: در این تحقیق از دستگاه‌های مختلفی نظیر روتاری اواپوراتور (شرکت هایدولف، مدل-ZQF 85)، حمام اولتراسونیک (شرکت باندلین، مدل 125)، پمپ خلاء (شرکت امرسون، مدل 0205)، اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراءبنفش(شرکت شیمیدزو مدل2200)، دستگاه اولترافیلتراسیون (شرکت میلی‌پور، مدل G-200) و pH متر(شرکت تولدومتلر، مدل 320) استفاده شد.

جهت تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین از روش wu و همکارانش استفاده گردید (11)، با این تفاوت که در فرمولاسیون جدید از دو ماده ستیل دی فسفات و بتاسیکلو دکسترین نیز استفاده شد.

روش تهیه محلول نانولیپوزوم های حاوی انسولین: در این روش ابتدا لیستین سویا، کلسترول و ستیل دی فسفات به ترتیب با نسبت های مولاریته (4:1:1) شامل 0/030 گرم لیستین سویا، 0/037 گرم کلسترول و 54/7 میلی‌گرم ستیل دی فسفات در 10 میلی‌لیتر اتر حل شد و محلول مذکور به یک ظرف پلاستیکی استریل درپوش‌دار منتقل گردید. سپس در یک لوله آزمایش 50 میلی‌گرم انسولین و 1 میلی‌گرم ماده بتا سیکلو دکسترین در 3 میلی‌لیتر با فرفسفات سالین (1/5 مولار با pH معادل 7/4) حل گردید و محلول ایجاد شده نیز به ظرف بالا منتقل شد. در مرحله‌ی بعد محلول مذکور به مدت 10 دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت تاثیر امواج فرا صوت μ 6 قرار داده شد. در این حالت دو فاز مذکور کاملا مخلوط شده و یک امولسیون خاص از آن تشکیل گردید که تا مدت 30 دقیقه پایدار بود. این محلول به دستگاه روتاری اواپوراتور منتقل گردید و تحت فشار کم (ناشی از اتصال پمپ خلاء به دستگاه مذکور) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با چرخش50 دور در دقیقه تبخیر شد و به این صورت سوسپانسیون یکنواخت نانولیپوزوم‌ها در آب تشکیل گردید. در مرحله‌ی بعد جهت حذف انسولین محصور نشده و سایر ترکیبات از محلول نانولیپوزوم‌های تهیه شده، محلول مذکور به مدت30 دقیقه با سرعت 12000 دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید. در نهایت جهت یکنواخت نمودن قطر ذرات نانولیپوزوم‌ها، محلول به دست آمده از بالا با استفاده از دستگاه اولترافیلتراسیون و فیلتر پلی‌کربنات با قطر منافذ 50 نانومتر اولترافیلتره گردید. جهت بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف ستیل دی فسفات و بتا سیکلو دکسترین در ضریب محصور شوندگی انسولین و نیز پایدار کردن این هورمون در برابر هضم آنزیمی توسط پروتئازها، عمل تهیه محلول‌های نانولیپوزومی در حضور غلظت‌های مختلف ترکیبات مذکور انجام شد. به این صورت که تهیه محلول نانولیپوزومی با استفاده از ستیل دی فسفات با مولاریته‌های 0، 2 و 3 و نیز مقادیر 0، 2 و 3 میلی‌گرم بتا سیکلو دکسترین تکرار گردید.

روش پوشش‌دار کردن نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین: جهت پوشش‌دار نمودن سطح خارجی غشاء نانولیپوزوم‌های تهیه شده با ماده‌ی کیتوزان از روش Werle و همکارانش استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (12). در این بخش محلول به دست آمده از مرحله‌ی بالا در کیسه‌ی دیالیز ریخته شده و در دمای 10 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت بر روی همزن برقی در مجاورت محلول کیتوزان 0/2 درصد انکوبه گردید و به این صورت نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار حاوی انسولین تهیه شد.

روش تعیین درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین: تعیین مقدار انسولین محصور شده در محلول نانولیپوزومی تهیه شده با استفاده از روش Jain همکارانش انجام گردید(13). به این ترتیب که به یک میلی‌لیتر از محلول مذکور 0/5 میلی‌لیتر محلول کلات سدیم (10 گرم بر لیتر)، 2/3 میلی‌لیتر بافرفسفات سالین (1/5 مولار با pH معادل 7/4) و 1 میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. محلول‌های مذکور باعث انحلال غشاء نانولیپوزوم‌ها و آزادسازی انسولین محصور در آن‌ها گردید. سپس با استفاده از روش لوری (معرف فولین سیوکالتو) مقدار انسولین موجود در محلول مذکور اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از معادله‌ی زیر درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم‌های تهیه شده محاسبه گردید:

روش تعیین اثرات پروتئازی آنزیم های پپسین و تریپسین: جهت بررسی و مقایسه اثرات پروتئولیتیک پپسین و تریپسین بر انسولین محصور در نانولیپوزوم‌ها و نیز مقایسه‌ی آن با انسولین به فرم آزاد از روش Wu و همکارانش استفاده گردید (11). در این روش ابتدا با استفاده از بافرتریس- HCl (10 میلی مولار با pH معادل 2)، محلول آنزیمی پپسین (0/05 گرم در لیتر) تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول نانولیپوزوم‌های تهیه شده به کیسه دیالیز منتقل شده و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد همراه با عمل هم‌زدن توسط همزن برقی در مجاورت محلول آنزیمی مذکور انکوبه شد. بعد کیسه دیالیز از محلول آنزیمی خارج گردید و در مجاورت 1000 حجم بافر فسفات سالین مجددا به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. در نهایت محلول مذکور از کیسه دیالیز خارج گردید و مقدار انسولین محصور باقی‌مانده در نانولیپوزوم‌ها (که از دسترس پپسین بدور مانده) اندازه‌گیری شد و سرانجام با استفاده از معادله زیر مقدار درصد انسولین باقی‌مانده در نانولیپوزوم‌ها محاسبه گردید:

جهت بررسی تاثیر پروتئولیتیک آنزیم تریپسین بر انسولین محصور در نانولیپوزوم‌ها نیز دقیقا همانند بالا عمل شده با این تفاوت که محلول آنزیمی تریپسین (3/6 گرم در لیتر) تهیه شده با بافرتریس- HCl (10 میلی مولار و pH معادل 7/4) به جای محلول آنزیمی پپسین مورد استفاده قرار گرفت. در مورد انسولین به فرم آزاد نیز مقدار 4 میلی‌گرم انسولین در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سالین حل گردید و محلول مذکور به درون کیسه دیالیز ریخته شد و دقیقا مطابق روش کار ذکر شده در بالا اثرات پروتئازی آنزیم‌های پپسین و تریپسین بر روی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق نتایج به دست آمده به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید. هم‌چنین داده‌ها با استفاده از برنامه‌ی آماری SPSS و با کمک تست آماری ANOVA تجزیه و تحلیل گردید. در این مطالعه $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

جدول 1: مقدار انسولین محصورشده در یک میلی‌لیتر محلول نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با فرمولاسیون‌های متفاوت*

www.SID.ir

Archive of SID

		مقدار بتا سیکلودکسترین (میلی‌گرم)			
		0	**1**	**2**	**3**
مقدار ستیل دی فسفات (مولاریته)	**0**	22/5 ±0/15	26 ±0/40	30/5 ±0/02	28 ±0/31
	1	25 ±0/31	29 ±0/18	33 ±0/35	30 ±0/11
	2	31/5 ±0/09	33/5 ±0/11	39 ±0/08**	35/2 ±0/61
	3	28 ±0/4	28 ±0/42	32 ±0/15	29 ±0/24

* هر آزمایش 10 بار تکرار و مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید

** مقدار ذکر شده دارای اختلاف معنی دار ($P<0/05$) با سایر داده ها می باشد.

(جدول 1) بیانگر مقدار انسولین محصور در تمام فرمولاسیون‌های تهیه شده می‌باشد. همان طور که مشخص است حداکثر مقدار محصور شوندگی معادل 0/08± 39 میلی گرم می‌باشد. برای تمام فرمولاسیون‌های تهیه شده نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین درصد کارایی محصورسازی محاسبه گردید (جدول2). انسولین محصور در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کیتوزان و نیز انسولین به فرم آزاد به شدت توسط آنزیم‌های پپسین در طی مدت زمان بسیار کوتاهی هضم گردیده است (جدول3).

جدول 2: درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با فرمولاسیون‌های متفاوت*

		مقدار بتا سیکلو دکسترین (میلی‌گرم)			
		0	1	2	3
مقدار ستیل دی‌فسفات (مولاریته)	0	45 ±0/30	52 ±0/11	61/5 ±0/12	56 ±0/34
	1	50 ±0/41	58 ±0/30	66 ±0/10	60 ±0/20
	2	63 ±0/18	67 ±0/32	79 ±0/16*	70 ±0/41
	3	56 ±0/42	56 ±0/18	71 ±0/14	58 ±0/76

* هر آزمایش 10 بار تکرار و مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید

** مقدار ذکر شده دارای اختلاف معنی دار ($P<0/05$) با سایر داده ها می باشد.

جدول 3: مقایسه درصد انسولین باقی مانده در نانولیپوزوم‌های حاوی و فاقد پوشش کیتوزان و هم‌چنین انسولین به فرم آزاد پس از فعالیت پروتئازی پپسین

		درصد انسولین باقی‌مانده *		
		انسولین به فرم آزاد	نانولیپوزوم فاقد پوشش	نانولیپوزوم پوشش دار **
زمان(دقیقه)	0	100	100	100
	0/5	75/6 ± 3/1	97/4 ± 2/4	98/1 ± 1/1
	1	70/5 ± 1/9	85/9 ± 3/2	95/2 ± 2/3
	5	44/9 ± 3/4	58/3 ± 3/7	75/3 ± 5/0
	15	6/9 ± 3/4	19/8 ± 2/2	61/8 ± 2/6
	30	2/9 ± 3/5	6/3 ± 5/2	47/2 ± 4/8

* هر آزمایش 3 بار تکرار گردیده و مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده است.

** فرمولاسیون مذکور این نانولیپوزوم‌ها حاوی 2 میلی گرم بتا سیکلو دکسترین و ستیل دی فسفات 2

www.SID.ir

Archive of SID

به این صورت که بعد از مدت زمان 30 دقیقه تحت اثر آنزیم پپسین مقدار درصد انسولین باقی‌مانده در محلول نانولیپوزومی فاقد پوشش کیتوزان 6/3±5/4 درصد و مقدار انسولین باقی مانده به فرم آزاد 2/9±3/5 درصد می‌باشد، در حالی که در همین مدت زمان اختلاف مقدار درصد انسولین باقی مانده برای انسولین خوراکی تهیه شده با بهترین فرمولاسیون (حاوی 2 میلی گرم بتا سیکلو دکسترین و ستیل دی فسفات 2 مولار) با موارد ذکر شده معنی دار بوده ($P<0/05$) و معادل 47/2±4/8 درصد می‌باشد. اثر پروتئازی تریپسین نیز در (جدول 4) مشاهده می‌گردد. همان طور که مشخص است مقدار درصد انسولین باقی مانده بعد از مدت زمان 5 ساعت انکوباسیون در مجاورت آنزیم تریپسین برای محلول نانولیپوزومی فاقد پوشش کیتوزان 21/4±6/1 و برای انسولین به فرم آزاد 18/6±2/3 می‌باشد. در حالی که در همین مدت زمان مقدار درصد انسولین باقی مانده برای نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با بهترین فرمولاسیون (حاوی 2 میلی گرم بتا سیکلو دکسترین و ستیل دی فسفات 2 مولار) معادل 77/4±2/7 درصد است و اختلاف آن با موارد ذکر شده در بالا معنی‌دار است ($P<0/05$).

جدول 4: مقایسه درصد انسولین باقی مانده در نانولیپوزوم های حاوی و فاقد پوشش کیتوزان و هم‌چنین انسولین به فرم آزاد پس از فعالیت پروتئازی تریپسین

		درصد انسولین باقی‌مانده *		
		انسولین به فرم آزاد	نانولیپوزوم فاقد پوشش	نانولیپوزوم پوشش دار**
زمان (ساعت)	0	100	100	100
	0/25	96/5 ±2/8	97/3 ±1/9	98/4 ±1/2
	0/5	86/7 ±5/0	93/8 ±53/9	96/3 ±3/7
	2	64/5 ±1/6	85/2 ±3/1	93/5 ±1/8
	4	29/6±5/2	40/2±1/9	84/5±5/1
	5	18/6±3/2	21/4±6/1	77/4±2/7

* هر آزمایش 3 بار تکرار گردیده و مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده است.

** فرمولاسیون این نانولیپوزوم‌ها حاوی 2 میلی گرم بتا سیکلو دکسترین و ستیل دی فسفات 2 مولار می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از جنبه‌های تحقیقی مورد اهمیت در دنیای امروز ایجاد حامل‌های مناسب و کارآ برای تجویز خوراکی پپتیدها و پروتئین‌ها می‌باشد (1،3). بیشترین تحقیقات در این زمینه بر روی حاملین خوراکی انسولین صورت گرفته است. زیرا این روش تجویز انسولین از لحاظ فیزیولوژیک سازگارتر محسوب شده و انسولین به طور مستقیم از طریق روده به کبد منتقل می‌گردد و هم‌چنین اثرات افزایش انسولین محیطی را هم ندارد(14).

عدم کارایی مناسب نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به عنوان حاملین خوراکی انسولین کاملا مشخص و اثبات شده می‌باشد (15)، زیرا طی تحقیقات انجام شده لیپوزوم‌های فاقد پوشش

www.SID.ir

Archive of SID

نمی‌توانند با دو مانع ذکر شده (آنزیم‌های پروتئاز و اتصالات محکم بین آنتروسیت‌ها) به طور کامل مقابله نمایند. این مورد در یافته‌های Kisel و همکارانش منعکس گردیده است (16).

نتایج تحقیقات آن ها نشان داد که نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش تهیه شده با فسفاتیدیل اینوزیتول در برابر اثر پروتئازی آنزیم پپسین به شدت حساس بوده و انسولین محصور شده در آن از بین می‌رود که علت این امر را اتصال الکترواستاتیک قوی بین نانولیپوزوم‌های ذکر شده با آنزیم پپسین در pH معادل 2 ذکر نموده‌اند. در تحقیقات دیگر نیز مشخص شده که حتی در بهترین فرمولاسیون حداکثر جذب روده‌ای انسولین محصور شده در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کمتر از 5 درصد می‌باشد (17). تاکنون در مورد مکانیسم‌های جذب نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین در روده به سه مورد اشاره گردیده که شامل جذب از طریق بین سلولی، جذب از طریق آندوسیتوز و جذب از طریق لنف به ویژه درناحیه ایلیوم روده کوچک می‌باشند (18).

تحقیقات مختلف نشان داده که کیتوزان و مشتقات آن می‌توانند جذب نانولیپوزوم‌ها را در روده به سه طریق فوق به شدت افزایش دهند (19). به طور مثال نانولیپوزوم‌های پوشش دار شده با کیتوزان قادرند به مخاط روده متصل گردند که خود باعث افزایش مدت زمان ماندگاری نانولیپوزوم‌ها درون روده شده و در نتیجه نفوذپذیری این حاملین به داخل لایه مخاطی روده افزایش می‌یابد (7). هم‌چنین کیتوزان سطحی می‌تواند اتصالات محکم بین سلول‌های جاذب روده را به طور لحظه‌ای و برگشت ناپذیر به نانولیپوزوم‌ها نفوذپذیر نماید(8). انسولین محصور شده در نانولیپوزوم‌ها پوشش‌دار با کیتوزان در مقایسه با انسولین به فرم آزاد و نیز انسولین محصور شده در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به طور موثری در برابر اثر آنزیم‌های پپسین و تریپسین محافظت گردید. طبق تحقیقات انجام شده در pH معادل 2 پپسین بار الکتریکی مثبت و لیستین سطح نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش بار الکتریکی منفی دارد. در نتیجه افزایش هم بر کنش بین آنزیم و نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش اثر پروتئازی پپسین را بر روی انسولین محصور در این نوع نانولیپوزوم‌ها را به شدت افزایش می‌دهد، ولی در نانولیپوزوم‌های حاوی انسولین پوشش‌دار شده به دلیل این که در pH معادل 2 کیتوزان بار مثبت دارد آنزیم پپسین را به شدت دفع نموده و سطح تماس انسولین محصور در این نوع نانولیپوزوم‌ها با آنزیم مذکور حداقل می‌گردد. این مورد در تحقیقات مشابه انجام شده اثبات گردیده است (13-11).

علت پایداری انسولین محصور در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده با کیتوزان در برابر آنزیم تریپسین با شرایط ذکر شده در مورد پپسین متفاوت می‌باشد. تحقیقات نشان داده که در pH معادل 7/4 (که pH ایزوالکتریک تریپسین است) مولکول‌های کیتوزان شکل فضایی مارپیچ مانند می‌یابند که سبب ایجاد یک سطح پوششی محافظ بر روی نانولیپوزوم‌ها می‌گردند و بنابراین دسترسی آنزیم تریپسین (که بار الکتریکی مثبت نیز دارد) به انسولین محصور در نانولیپوزوم‌ها حداقل می‌گردد (3). بتا سیکلودکسترین جزء ترکیبات سیکلودکسترینی است و باعث افزایش حلالیت، نفوذپذیری و نیز مهار فعالیت پروتئازهای خاص بر روی داروهای پپتیدی و پروتئینی می‌گردد (9). تحقیقات Krauland و همکارانش نشان داد که به کارگیری بتا سیکلودکسترین در تهیه نانوپارتیکل‌های حاوی انسولین از چند طریق سبب افزایش ضریب محصورسازی و پایداری نانو پارتیکل‌های مذکور شده و کارایی آن را در آزمایش‌های in vitro افزایش می‌دهد (20). استفاده از این ترکیب در فرمولاسیون جدید به کار گرفته شده در این تحقیق موارد ذکر شده را اثبات نمود. ترکیب لیپیدی لیپوزوم‌ها در ضریب محصورسازی آن ها موثر است(4). استفاده از ستیل دی‌فسفات دارای بار منفی در فرمولاسیون به کار گرفته شده باعث افزایش ضریب محصورسازی نانولیپوزوم‌ها گردیده است که طبق تحقیقات

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شده می‌تواند ناشی از هم بر کنش قوی بین گروه‌های آمین موجود در انسولین با ستیل دی فسفات باشد (16)، به همین دلیل وجود این ماده در فرمولاسیون سبب افزایش کارایی محصورسازی نسبت به یافته‌های مشابه گردیده است. البته افزایش غلظت ستیل دی فسفات (3 مولار) و مقدار بتا سیکلودکسترین (3 میلی‌گرم) در فرمولاسیون سبب کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) مقدار کارایی گردیده است که می‌تواند ناشی از اثر دفع الکترواستاتیکی ستیل دی فسفات و بتا سیکلودکسترین در غلظت‌های بالا باشد (20).

هم‌چنین وجود ستیل دی فسفات موجود در غشاء نانولیپوزوم‌ها با پیوند یونی به کیتوزان متصل شده و باعث افزایش مقدار کیتوزان سطحی گردیده است که خود می‌تواند توجیهی برای موثر بودن فرمولاسیون به کار گرفته شده در مقایسه با موارد گزارش شده باشد(16،12،1).

با توجه به کارایی محصورسازی بالا و جلوگیری از اثرات پروتئازی پپسین و تریپسین بر روی انسولین محصور شده در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که فرمولاسیون جدید به کار گرفته شده کارایی لازم را برای معرفی شدن به عنوان یک گزینه جهت حمل انسولین به شکل خوراکی را دارد. به هر حال مطالعات بیشتر بر روی این فرمولاسیون جدید می‌تواند نوید بخش روشی نوین در تجویز انسولین برای بیماران مبتلا دیابت باشد و این بیماران را از رنج تحمل تزریق مکرر انسولین و نیز هزینه‌های گزاف آن رهایی بخشد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گردیده است. بدین وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

یافته‌ی نوین	کاربرد بالینی
اثرات ضد قارچی نانوکپسول‌های تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی بر روی سوش‌های استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکنس نشان از کارایی بالای آن در مقایسه با فرم ازاد دارو دارد.	با توجه به ضریب محصور شوندگی بالا و کارا بودن نانوکپسول‌های حاوی انسولین تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی می‌توان از این فرمولاسیون جدید جهت تهیه انسولین خوراکی استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Avadi MR, Sadeghi AM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. Nanomedicine. 2010; 6: 58–63.
2. Shelma R, Paul W, Sharma CP. Development and characterization of self-aggregated nanoparticles from anacardoylated chitosan as a carrier for insulin. Carbohydrate Polymers. 2010; 80: 285-90.
3. Graf A, Rades T, Hook SM. Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and in vivo evaluation. 2009; Euro. J. Pharma. Sci. 37: 53-61.
4. Gaffari MA, Dabbagh MA, Gharib A. Human erythrocyte superoxide dismutase encapsulated in positively charged liposomes. Iran. J. Pharm. Sci. 2005; 1: 153-60.
5. Mirzaee M, Owlia P, Mehrabi M, Gharib A. In Vitro Bactericidal Activity of Encapsulated Amikacin in Liposome. Iranian j. Path. 2009; 4: 151-6.
6. Woitiski CB, NeuFeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Colloidal carrier integrating biomaterials for oral insulin delivery: Influence of component formulation on physicochemical and biological parameters. Acta Biomaterialia. 2009; 5: 2475-84.
7. Krishnankutty RK, Mathew A, Saikiran K, Shrikumar S, Carani S. Aalternative routes on insulin delivery. J. Cent. South Univ. 2009; 44: 21-9.
8. Cui F, Qian F, Zhao Z, Yin L, Tang C, Yin C. Preparation, Characterization, and Oral Delivery of Insulin Loaded Carboxylated Chitosan Grafted Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles. 2009; 10: 1253–8.
9. Sajeesh S, Sharma CP. Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. 2006; 325: 147-54.
10. Lin YH, MI FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF, et al. Preparation and Characterization of Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Insulin Delivery. Biomacromolecules. 2007; 8: 146-52.
11. Wu Z, Ping Q, Wei Y, La J. Hypoglycemic efficacy of chitosan – coated insulin liposomes after oral adminstration in mice. Acta. Pharmacol. Sin. 2004; 25: 966–72.
12. Werle M, Takeuchi H. Chitosan–aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. Int. J. Pharm. 2009; 370: 26-32.
13. jain D, panda AK, majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2005; 3: 123-8.
14. Bayat A, Dorkoosh FA, Dehpour AR, Moezi L, Larijani B, junginger HE, et al. Nanoparticles of quaternized chitosan derivatives as a carrier for colon delivery of insulin: Ex vivo and in vivo studies. Int. J. Pharm. 2008; 356: 259- 66.
15. Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. J. Controlled Release. 2006; 242-50.
16. Kisel MA, Kulik LN, Tsybovsky IS, Vlasov AP, Vorob'yov MS, Kholodova EA, *et al.* Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. Int. J. Pharm. 2001; 216: 105-14.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Damge C, Maincent P, Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. J. Controlled Release. 2007; 163-70.
18. Ungaro F, Bianca R, Giovino C, Miro A, Sorrentino R, quaglia F, et al. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs. J. Controlled Release. 2009; 135: 25-34.
19. Singh B, Chauhan N. Modification of psyllium polysaccharides for use in oral insulin delivery. Food hydroclloids. 2009; 23: 928-35.
20. Krauland AH, Alonso MJ. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. Int. J. Pharm. 2007; 340: 134-42.

www.SID.ir