Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۱)، ۵۷ – ۶۵
بهار ۱۳۹۰

بررسی کارایی فیزیولوژیکی نانولیپوزوم های انسولین خوراکی تهیه شده در شرایط *in vivo*

امیر قریب[۱*]، زهره فائزی زاده[۱،۲]

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد

۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: ۲۵ خرداد ۸۹ پذیرش: ۳ آذر ۸۹

چکیده

مقدمه: مصرف انسولین از طریق دهان بهترین روش مطلوب برای تجویز انسولین می باشد. هدف از این مطالعه تهیه نانولیپوزومهای انسولین پوشش دار شده با ماده کیتوزان با فرمولاسیونی جدید بود و سپس کارایی فیزیولوژیکی انسولین محصور در نانولیپوزومها پس از تجویز خوراکی آن به خرگوشهای دیابتی شده تعیین گردید.

روش ها: محلول نانولیپوزومهای حاوی انسولین با بار سطحی منفی به روش تبخیر فاز معکوس با استفاده از موادی نظیر لسیتین، کلسترول، ستیل دی فسفات و بتا سیکلو دکسترین با فرمولاسیون های متفاوت تهیه گردید و سطح خارجی نانولیپوزومها با کیتوزان پوشش دار شد. سپس ضریب محصورکنندگی نانولیپوزوم های تهیه شده پس از تخریب غشاء نانولیپوزوم ها به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری گردید. در نهایت توانایی نانولیپوزومهای تهیه شده حاوی انسولین در کاهش گلوکز خون خرگوشهای مبتلا به دیابت بعد از تجویز خوراکی آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: تحقیقات نشان داد که ضریب محصور شوندگی انسولین در نانولیپوزوم های تهیه شده با فرمولاسیون جدید به طور قابل توجه نسبت به سایر فرمولاسیون های دیگر بیشتر بوده و معادل ۰/۱۶±۷۹ می باشد. مطالعات *in vivo* به طور دقیق نمایانگر این بود که نانولیپوزومهای تهیه شده حاوی انسولین می تواند به طور مؤثر در مدت زمان ۴ ساعت گلوکز خون را در خرگوشهای دیابتی مورد آزمایش از ۰/۷۵±۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر به ۰/۹۸± ۱۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر کاهش دهد.

نتیجه گیری: یافته های این تحقیق به صورت واضح نشان داد که به عنوان یک گزینه جدید انسولین خوراکی تهیه شده از کارایی لازم برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، انسولین، نانولیپوزوم، ضریب محصور شوندگی

مقدمه

امروزه با توجه به تمام پیشرفت هایی که در علم دارو رسانی به عمل آمده است هنوز بشر نتوانسته است در مورد سیستم انتقالی غیرتزریقی برای هورمون انسولین به یک روش قطعی و کامل دست یابد [۱]. از مهمترین مشکلاتی که بر سر راه مصرف خوراکی پپتیدها و پروتئین هایی نظیر انسولین وجود دارد وجود آنزیم های مختلف پروتئاز در دستگاه گوارش می باشد که به سرعت ترکیبات مذکور را مورد تجزیه قرار می دهند. همچنین اتصالات بین سلول های اپی تلیال مخاط روده یک سد مکانیکی را در مقابل جذب پروتئین ها ایجاد می نماید. جهت تهیه انسولین خوراکی باید دو مانع مذکور از پیش رو برداشته شوند [۱۷]. در این مورد تاکنون تحقیقات بسیار وسیعی انجام گردیده است. مثلاً برای از بین بردن مانع اول تاکنون روش های مختلفی نظیر محصور نمودن انسولین

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: amirgharib@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

در حاملین دارویی بویژه نانوپارتیکلها بکار گرفته شده است [۷]. از جمله نانوپارتیکلها می توان به نانولیپوزومها، نانوسفرها و نانوکپسولها ها اشاره نمود [۶]. نانولیپوزومها قادرند داروهای آب دوست نظیر پپتیدها و پروتئینها را در خود محصور نمایند و از مهمترین ویژگی آنها این است که تجزیه پذیر بوده در محیط های زنده سمیت ایجاد نمی نمایند، همچنین نانولیپوزومها قادرند ترکیبات محصور در خود را از حملات آنزیمی و تشخیص توسط سیستم ایمنی در امان دارند [۱۴]. تحقیقات نشان می دهد که محصور شدن انسولین در نانولیپوزومها با کمتر شدن اثرات تخریبی آنزیم های گوارشی بر روی این هورمون و نیز جذب بیشتر آن در روده همراه است [۲۰]. امروزه در این موارد جهت تقویت و کارایی بیشتر نانولیپوزومهای حاوی انسولین علاوه بر استفاده از فرمولاسیون های جدید در تهیه، سطح آنها را نیز با پلی مرهای مختلفی پوشش دار می نمایند [۱۷]. بهترین پلیمر شناخته شده در این مورد ماده ای به نام کیتوزان (chitosan) می باشد. این ماده غیر سمی پلیمری از قند N– استیل، بتا– D– گلوکز آمین است و از دی آسیلاسیون کیتین حاصل می گردد و بعلت وجود گروه آمین در محیط اسیدی معده بسیار پایدار می باشد [۱۲]. بنابراین وجود پلیمری از این ماده در اطراف نانولیپوزوم ها حاوی انسولین مانع از دسترسی آنزیم های گوارشی معده و سایر قسمت های دستگاه گوارش به مولکولهای انسولین شده و در نتیجه مولکول های انسولین از تخریب در امان می مانند [۳]. از طرف دیگر جهت از بین بردن مانع دوم می توان از موادی نظیر سالیسیلاتها، کلرات سدیم و ماده بتا سیکلودکسترین در فرمولاسیون تهیه انسولین خوراکی استفاده نمود. این مواد باعث می گردند که سیالیت لیپیدهای غشاء سلولهای مخاطی روده افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آنها افزایش یابد [۱۶]. در این کار تحقیقاتی با استفاده از فرمولاسیونی جدید شکل تازه ای از انسولین خوراکی تهیه شد. در فرمولاسیون مذکور برای اولین بار از ستیل دی فسفات (به عنوان ماده ایجادکننده بار سطحی منفی در نانولیپوزومها) استفاده گردید با این فرض که چون مولکولهای کیتوزان بار مثبت دارند تعداد بیشتری از این مولکولها به سطح نانولیپوزوم ها متصل می گردد و در نتیجه کارایی و عملکرد فرم جدید انسولین خوراکی تهیه شده در مقایسه با انواع قبلی بهتر خواهد بود، زیرا همانطور که مشخص گردیده تعداد مولکول های کیتوزان موجود در سطح خارجی نانولیپوزومهای حاوی انسولین رابطه مستقیم با مقدار جذب انسولین از طریق روده و نیز مقاومت آن در برابر هیدرولیز اسیدی و آنزیمی دارد [۱۳]. همچنین در این فرمولاسیون بتا سیکلودکسترین با مولاریته مشخص همراه با انسولین در نانولیپوزوم ها محصور گردید و تاثیر آن در پایداری و ضریب محصور شوندگی انسولین مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تاثیر انسولین خوراکی تهیه شده در کاهش گلوکز سرم خون خرگوشهای مدل مبتلا شده به دیابت، تحت شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

برخی از مواد مصرفی نظیر انسولین انسانی (Art number: I0259)، کلسترول، کلات سدیم، لسیتین سویا، کیتوزان (با وزن مولکولی ۱۰۰۰ کیلو دالتون) و ستیل دی فسفات از شرکت سیگما تهیه گردیدند. در این تحقیق از دستگاه های مختلفی نظیر روتاری اواپوراتور (شرکت هایدولف، مدل-ZQF ۸۵)، حمام اولتراسونیک (شرکت باندلین، مدل ۱۲۵)، پمپ خلاء (شرکت امرسون، مدل ۰۲۰۵)، اسپکتروفتومتر مرئی– ماوراءبنفش (شرکت شیمیدزو، مدل۲۲۰۰)، دستگاه اولترافیلتراسیون (شرکت میلی پور، مدل G-۲۰۰) و pH متر (شرکت تولدومتلر، مدل ۳۲۰) استفاده شد.

روش تهیه محلول نانولیپوزوم های حاوی انسولین: جهت تهیه نانولیپوزوم های حاوی انسولین از روش Wu و همکارانش استفاده گردید [۲۱]، با این تفاوت که در فرمولاسیون جدید از دو ماده ستیل دی فسفات و بتا سیکلودکسترین نیز استفاده شد. در این روش ابتدا لسیتین سویا، کلسترول و ستیل دی فسفات به ترتیب با نسبت های مولاریته (۴:۱:۱) شامل ۰/۰۳۰ گرم لسیتین سویا، ۰/۰۳۷ گرم کلسترول و ۵۴/۷ میلی گرم ستیل دی فسفات در ۱۰ میلی لیتر اتر حل شد و محلول مذکور به یک ظرف پلاستیکی استریل درپوش دار منتقل گردید. سپس در یک لوله آزمایش ۵۰ میلی گرم انسولین و ۱ میلی گرم ماده بتا سیکلو دکسترین در ۳ میلی لیتر بافر فسفات سالین (۱/۵ مولار با pH معادل ۷/۴) حل گردید و محلول ایجاد شده نیز به ظرف بالا منتقل شد. در مرحله بعد محلول مذکور به مدت ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت تأثیر امواج فراصوت ۶ μ قرار داده شد. در این حالت دو فاز مذکور کاملاً مخلوط شده و یک امولسیون خاص از آن تشکیل گردید که تا مدت ۳۰ 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 ۲۵ درجه سانتیگراد با چرخش ۵۰ دور در دقیقه تبخیر شد و بدین صورت سوسپانسیون یکنواخت نانولیپوزوم ها در آب تشکیل گردید. در مرحله بعد جهت حذف انسولین محصور نشده و سایر ترکیبات از محلول نانولیپوزوم های تهیه شده، محلول مذکور به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید. در نهایت جهت یکنواخت نمودن قطر ذرات نانولیپوزومها، محلول بدست آمده از بالا با استفاده از دستگاه اولترافیلتراسیون و فیلتر پلی کربنات با قطر منافذ ۱۵۰ نانومتر اولترافیلتره گردید. جهت بررسی تأثیر غلظت های مختلف ستیل دی فسفات و بتا سیکلودکسترین در ضریب محصور شوندگی انسولین و نیز پایدار کردن این هورمون در برابر هضم آنزیمی توسط پروتئازها، تهیه محلول های نانولیپوزومی در حضور غلظت های مختلف ترکیبات مذکور انجام شد. بدین صورت که تهیه محلول نانولیپوزومی با استفاده از ستیل دی فسفات با مولاریته های ۰ ، ۲ و ۳ و نیز مقادیر ۰ ، ۲ و ۳ میلی گرم بتا سیکلو دکسترین تکرار گردید.

روش پوشش دار کردن نانولیپوزومهای حاوی انسولین: جهت پوشش دار نمودن سطح خارجی غشاء نانولیپوزوم های تهیه شده با ماده کیتوزان از روش Werle و همکارانش استفاده گردید [۱۹]. در این بخش محلول بدست آمده از مرحله بالا در کیسه دیالیز ریخته شده و در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت بر روی همزن برقی در مجاورت محلول کیتوزان ۰/۲ درصد انکوبه گردید و بدین صورت نانولیپوزوم های پوشش دار شده با کیتوزان حاوی انسولین تهیه شد.

روش تعیین درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم های حاوی انسولین: تعیین مقدار انسولین محصور شده در محلول نانولیپوزومی تهیه شده با استفاده از روش Jain همکارانش انجام گردید [۸]. به این ترتیب که به یک میلی لیتر از محلول مذکور ۰/۵ میلی لیتر محلول کلات سدیم (۱۰ گرم بر لیتر)، ۲/۳ میلی لیتر بافر فسفات سالین (۱/۵ مولار با pH معادل ۷/۴) و ۱ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد. محلول های مذکور باعث انحلال غشاء نانولیپوزوم ها و آزاد سازی انسولین محصور در آنها گردید. سپس با استفاده از روش لوری (معرف فولین سیوکالتو) مقدار انسولین موجود در محلول مذکور اندازه گیری شد. در نهایت با استفاده از معادله زیر درصد کارایی محصور سازی نانولیپوزوم های تهیه شده محاسبه گردید:

$$\text{درصد کارایی محصورسازی نانو لیپوزومهای حاوی انسولین} = \frac{\text{مقدار انسولین محصور در یک میلی لیتر محلول حاوی نانو لیپوزومها}}{\text{مقدار انسولین اولیه مصرفی جهت تهیه یک میلی لیتر محلول حاوی نانو}} \times ۱۰۰$$

روش مطالعات *in vivo* : جهت بررسی کارایی انسولین خوراکی تهیه شده در مقایسه با فرم آزاد آن (به دو حالت خوراکی و تزریقی) تحت شرایط *in vivo* از روش Graf و همکارانش استفاده شد [۷]. بدین صورت که ۳۰ خرگوش سفید آزمایشگاهی با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم در ۶ گروه ۵ تایی قرار داده شدند. این گروهها عبارت بودند از: الف- گروه شاهد، ب- گروه دیابتی بدون مداوا، ج- گروه دیابتی تحت مداوای یک که در آزمایش انسولین محصور در نانولیپوزومها (انسولین خوراکی) را از طریق دهان دریافت نمودند، د- گروه دیابتی تحت مداوای دو که در آزمایش انسولین را به فرم آزاد بصورت خوراکی دریافت کردند، هـ- گروه دیابتی تحت مداوای سه که در این تحقیق از طریق دهان نانولیپوزومهای فاقد انسولین دریافت نمودند، و- گروه دیابتی تحت مداوای چهار که از طریق تزریق داخل صفاقی انسولین به فرم آزاد دریافت داشتند. پس از القاء دیابت در گروههای دیابتی و اعمال درمان در گروههای مذکور مقدار گلوکز سرم خون حیوانات مورد مطالعه در مدت زمانهای معین مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت تغییرات گلوکز سرم خون در تمام گروهها به طور کامل مقایسه شد.

روش القاء دیابت شیرین: جهت القاء دیابت شیرین در خرگوشهای مورد مطالعه از روش Kedar و همکارانش استفاده گردید [۹]. در این روش محلول ۶۵ میلی گرم در میلی لیتر استرپتوزوتوسین (تهیه شده با بافر سیترات ۵۰ میلی مولار با pH معادل ۴/۵)، با دوز ۶۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن حیوانات مذکور، در یک دوز به صورت داخل وریدی تزریق گردید. بعد از یک هفته دیابتی شدن حیوانات مدل با آزمایشهای مختلف (مانند اندازه گیری گلوکز سرم خون ناشتا،

www.SID.ir

Archive of SID

انسولین و C-Peptid و بررسی وجود گلوکز در ادرار به صورت کیفی) در مقایسه با گروه شاهد تأیید گردید.

روش تجویز انسولین خوراکی، تزریقی و انسولین به فرم آزاد: در این بخش ۶ گروه حیوانات مورد مطالعه به مدت ۱۲ ساعت به طور ناشتا نگهداری شدند و به ترتیب زیر عمل گردید:

به خرگوشهای گروه شاهد و گروه دیابتی بدون مداوا یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل خورانده شد. سپس انسولین محصور در نانولیپوزوم ها (انسولین خوراکی) با دوز۳۰ واحد بین المللی به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن خرگوشهای گروه دیابتی تحت مداوای یک، در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل حل گردید و به حیوانات این گروه خورانده شد. به حیوانات گروه دیابتی تحت مداوای دو نیز انسولین به فرم آزاد (با دوز۳۰ واحد بین المللی به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن خرگوشها) به صورت محلول در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل خورانده شد. گروه دیابتی تحت مداوای سه نیز به صورت خوراکی یک میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین استریل حاوی ۳۰ میلی گرم نانولیپوزومهای فاقد انسولین لیوفیلیزه دریافت نمودند و در نهایت به خرگوشهای گروه دیابتی تحت مداوای چهار نیز انسولین به فرم آزاد (با غلظت۳۰ واحد بین المللی به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن خرگوشها) به صورت محلول در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین به روش تزریق داخل صفاقی تجویز گردید.

روش اندازه گیری گلوکز سرم خون: اندازه گیری گلوکز سرم خون حیوانات مورد مطالعه با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز- پراکسیداز انجام گردید [۲]. جهت خونگیری از خرگوشهای مورد مطالعه از روش Mir و همکارانش استفاده گردید [۱۴]. از مزایای این روش می توان به استحصال آسان نمونه و عدم نیاز به بیهوشی و آرامش حیوانات مورد مطالعه در طول آزمایش اشاره نمود. در این روش مقدار ۰/۵ میلی لیتر خون از سیاهرگ حاشیه ای ناحیه گوش (Marginal ear vein) در حیوانات مورد مطالعه در مدت زمانهای ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ ساعت پس از تجویز موارد ذکر شده در بالا جمع آوری شد و پس از جداسازی سرم این نمونه ها اندازه گیری گلوکز در آنها انجام گردید.

روش تجزیه و تحلیل داده ها: در این تحقیق نتایج به دست آمده به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید. همچنین مقدار گلوکز خون خرگوشهای مورد مطالعه با استفاده از برنامه آماری SPSS و با کمک تست آماری ANOVA یک طرفه با پس آزمون Tukey post hoc تجزیه و تحلیل گردید. در این مطالعه $p<0/05$ به عنوان سطح معنی دار اختلافها در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار انسولین محصورشده در نانولیپوزومهای تهیه شده: جدول ۱ بیانگر مقدار انسولین محصور در تمام فرمولاسیونهای تهیه شده می باشد. همانطور که مشخص است حداکثر مقدار محصور شوندگی معادل ۰/۰۸ ± ۳۹ میلی گرم می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری کارایی محصورسازی نانولیپوزومهای تهیه شده: برای تمام فرمولاسیونهای تهیه شده نانولیپوزوم های حاوی انسولین درصد کارایی محصورسازی محاسبه گردید (جدول ۲). همانطور که مشاهده می گردد،

جدول ۱- مقدار انسولین محصور شده در یک میلی لیتر محلول نانولیپوزوم های پوشش دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با فرمولاسیون های متفاوت*

مقدار ستیل دی فسفات (مولار نسبت)	مقدار بتا سیکلو دکسترین (میلی گرم) ۰	۱	۲	۳
۰	۲۲/۵ ±۰/۱۵ میلی گرم	۲۶ ±۰/۴۰ میلی گرم	۳۰/۵ ±۰/۰۲ میلی گرم	۲۸ ±۰/۳۱ میلی گرم
۱	۲۵ ±۰/۳۱ میلی گرم	۲۹ ±۰/۱۸ میلی گرم	۳۳ ±۰/۳۵ میلی گرم	۳۰ ±۰/۱۱ میلی گرم
۲	۳۱/۵ ±۰/۰۹ میلی گرم	۳۳/۵ ±۰/۱۱ میلی گرم	۳۹ ±۰/۰۸** میلی گرم	۳۵/۲ ±۰/۶۱ میلی گرم
۳	۲۸ ±۰/۴ میلی گرم	۲۸ ±۰/۴۲ میلی گرم	۳۲ ±۰/۱۵ میلی گرم	۲۹ ±۰/۲۴ میلی گرم

* هر آزمایش ۱۰ 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.

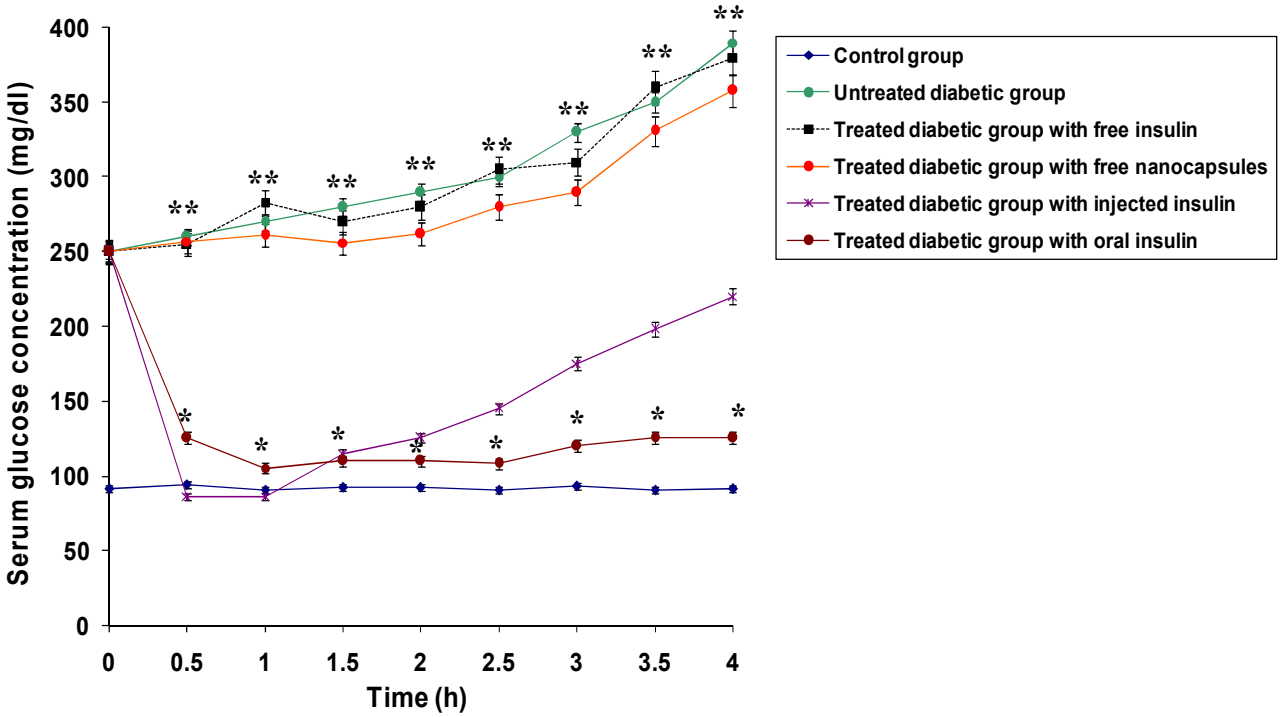
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- درصد کارایی محصور سازی نانولیپوزوم های پوشش دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با فرمولاسیونهای متفاوت*

مقدار ستیل دی فسفات	مقدار بتا سیکلو دکسترین [میلی گرم] ۰	۱	۲	۳
۰	۴۵ ±۰/۳۰	۵۲ ±۰/۱۱	۶۱/۵ ±۰/۱۲	۵۶ ±۰/۳۴
۱	۵۰ ±۰/۴۱	۵۸ ±۰/۳۰	۶۶ ±۰/۱۰	۶۰ ±۰/۲۰
۲	۶۳ ±۰/۱۸	۶۷ ±۰/۳۲	۷۹ ±۰/۱۶**	۷۰ ±۰/۴۱
۳	۵۶ ±۰/۴۲	۵۶ ±۰/۱۸	۷۱ ±۰/۱۴	۵۸ ±۰/۷۶

* هر آزمایش ۱۰ بار تکرار و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید، ** مقدار ذکر شده دارای اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) با سایر داده ها می باشد.



شکل ۱- تغییرات گلوکز سرم خون خرگوشهای مورد مطالعه در واحد زمان (گروه دیابتی تحت مداوای ۱ در آزمایش انسولین محصور در نانولیپوزومها (انسولین خوراکی) را از طریق دهان دریافت نمودند، گروه دیابتی تحت مداوای ۲ در آزمایش انسولین را به فرم آزاد بصورت خوراکی دریافت کردند، گروه دیابتی تحت مداوای ۳ از طریق دهان نانولیپوزومهای فاقد انسولین دریافت نمودند و در نهایت گروه دیابتی تحت مداوای ۴ از طریق تزریق داخل صفاقی انسولین به فرم آزاد دریافت داشتند)، * : اختلاف معنی دار بین گروه دیابتی تحت مداوای ۱ با گروه شاهد و گروههای دیابتی تحت مداوای ۲ و ۳ ($p<۰/۰۵$)، ** : اختلاف معنی دار بین گروههای دیابتی بدون مداوا و تحت مداوای ۲و۳ با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

بیشترین مقدار کارایی محصورسازی متعلق به فرمولاسیونی است که حاوی ۲ میلی گرم بتا سیکلودکسترین و محلول ستیل دی فسفات ۲ مولار است و اختلاف آن با سایر داده ها معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج القاء دیابت شیرین: همان طور که در شکل ۱ مشاهده می گردد، در گروه شاهد میانگین مقدار گلوکز خون ناشتا ۹۱±۰/۶۸ میلی گرم بر دسی لیتر بوده، در حالیکه در خرگوشهای دیابتی شده با استرپتوزتوسین مقدار میانگین گلوکز خون در وضعیت ناشتا ۲۵۰±۰/۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر می باشد. نتایج بدست آمده در مورد تغییرات انسولین خون خرگوشهای سالم و دیابتی نشان داد که القاء دیابت سبب تغییر مقدار انسولین سرم خون از ۳/۳ ±۶/۲۰ واحد بین المللی بر لیتر (گروه شاهد) به ۱/۲ ± ۲/۵۰ واحد بین المللی بر لیتر (گروههای دیابتی شده) می گردد. همچنین در این وضعیت مقدار C-Peptid در سرم خون خرگوشهای سالم معادل ۴/۲۲ ± ۱۳/۴۵ میلی گرم بر لیتر بود که این مقدار در خرگوشهای

www.SID.ir

Archive of SID

دیابتی به صفر تنزل یافت. در مورد جستجوی کیفی گلوکز در ادرار توسط نوار ادراری، در خرگوشهای دیابتی شده گلوکز ادرار مثبت بود در حالیکه در گروه شاهد گلوکزی در ادرار مشاهده نگردید و با توجه به این نتایج القاء دیابت در گروههای دیابتی شده محرز گردید.

نتایج تجویز انسولین خوراکی، تزریقی و انسولین به فرم آزاد: در شکل ۱ تغییرات گلوکز سرم خون حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه بعد از تجویز انسولین خوراکی، تزریقی و فرم آزاد انسولین مشخص گردیده است. همان طور که مشاهده می شود تغییرات گلوکز سرم خون گروه دریافت دارنده انسولین خوراکی در مقایسه با گروه های تست بدون مداوا و دریافت دارنده نانولیپوزومهای فاقد انسولین و نیز انسولین به فرم آزاد یک ساعت بعد از دریافت اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۵$) را نشان می دهد و این اختلاف تا ۴ ساعت پس از تجویز نیز ادامه می یابد. بیشترین تأثیر انسولین تزریقی ۰/۵ ساعت بعد از تزریق مشاهده گردید، در حالیکه حداکثر تأثیر انسولین خوراکی یک ساعت پس از تجویز اعمال گردید. همانطور که در شکل ۱ مشخص است بعد از ۲/۵ ساعت انسولین خوراکی تهیه شده نسبت به نوع تزریقی کارایی بیشتری داشته و گلوکز خون خرگوشهای گروه مصرف کننده آنرا به ۰/۶۸ ± ۱۰۸ میلی گرم بر دسی لیتر می رساند، در حالیکه گلوکز خون خرگوشهای دریافت کننده انسولین تزریقی در همین زمان۰/۳۳ ± ۱۴۵ میلی گرم بر دسی لیتر است. همچنین در زمان های ۳، ۳/۵ و ۴ ساعت این اختلاف محسوس تر می گردد. در تمام زمانهای مورد مطالعه، تغییرات گلوکز سرم خون گروه شاهد نامحسوس است و مقادیر آن با تغییرات گلوکز سرم خون با گروههای دریافت دارنده نانولیپوزومهای فاقد انسولین و نیز انسولین به فرم آزاد اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۱$) را نشان می دهد.

بحث

یکی از جنبه های تحقیقی مورد اهمیت در دنیای امروز ایجاد حاملهای مناسب و کارآ برای تجویز خوراکی پپتیدها و پروتئینها می باشد [۱و۷]. 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 می گردد و همچنین اثرات افزایش انسولین محیطی را هم ندارد [۳]. عدم کارایی مناسب نانولیپوزومهای فاقد پوشش به عنوان حاملین خوراکی انسولین کاملاً مشخص و اثبات شده می باشد [۴]، زیرا طی تحقیقات انجام شده لیپوزومهای فاقد پوشش نمی توانند با دو مانع ذکر شده (آنزیمهای پروتئاز و اتصالات محکم بین آنتروسیتها) به طور کامل مقابله نمایند. این مورد در یافته های Kisel و همکارانش منعکس گردیده است [۱۰]. تاکنون در مورد مکانیسمهای جذب نانولیپوزومهای حاوی انسولین به مواردی نظیر جذب از طریق مویرگهای خونی و جذب از طریق لنف به ویژه درناحیه ایلیوم روده کوچک اشاره گردیده است [۵، ۲۲]. تحقیقات مختلف نشان داده که کیتوزان و مشتقات آن می توانند جذب نانولیپوزومها را در روده به روشهای فوق به شدت افزایش دهند [۱۸]. بطور 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 می یابد [۱۲]. همچنین کیتوزان سطحی می تواند اتصالات محکم بین سلولهای جاذب روده را به طور لحظه ای و برگشت ناپذیر به نانولیپوزومها نفوذپذیر نماید [۳]. بتا سیکلودکسترین جزء ترکیبات سیکلودکسترینی است و باعث افزایش حلالیت، نفوذپذیری و نیز مهار فعالیت پروتئازهای خاص بر روی داروهای پپتیدی و پروتئینی می گردد [۱۶]. 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 نانوپارتیکلهای مذکور شده و کارایی آن را در آزمایشهای *in vivo* افزایش می دهد [۱۱]. 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 آنها مؤثر است [۶]. استفاده از ستیل دی فسفات دارای بار منفی در فرمولاسیون به کار گرفته شده باعث افزایش ضریب محصورسازی نانولیپوزومها گردیده است که طبق تحقیقات انجام شده می تواند ناشی از هم بر کنش قوی بین گروههای آمین موجود در انسولین با ستیل دی فسفات باشد

www.SID.ir

Archive of SID

[۹]. همچنین ستیل دی فسفات موجود در غشاء نانولیپوزومها با پیوند یونی به کیتوزان متصل شده و باعث افزایش مقدار کیتوزان سطحی گردیده است که خود می تواند توجیهی برای موثر بودن فرمولاسیون بکار گرفته شده در مقایسه با موارد گزارش شده باشد [۱، ۱۰و ۱۹]. مصرف انسولین خوراکی تهیه شده باعث کاهش گلوکز سرم خون ناشتا در خرگوشهای مورد مطالعه به مقدار ۴۲ درصد در طی ۱ ساعت گردیده است و این اختلاف معنی دار تا ۴ ساعت ادامه می یابد ($p<۰/۰۵$). در طول مطالعه انجام شده گلوکز سرم خون ناشتا گروه تحت درمان با انسولین خوراکی به سطح تولید اولیه خود بعد از ۴ ساعت بر نمی گردد. این مسئله در دیگر یافته ها نیز اثبات شده و علت آن تأثیر همزمان ناشتا بودن و عوامل دخیل در هیپوگلیسمی ذکر گردیده است [۴، ۱۹]. بررسی تغییرات غلظت گلوکز سرم خون در حیوانات دریافت کننده انسولین خوراکی نشان دهنده این است که جذب انسولین در شرایط *in vivo* با تأخیر همراه است به طوریکه بعد از مدت زمان یک ساعت پس از تجویز حداکثر تأثیر خود را در کاهش قند خون نشان می دهد. این موضوع ناشی از جذب با تأخیر انسولین محصور در نانولیپوزومها در روده است [۲]. با اینکه در انسولین تزریقی این نقیصه وجود ندارد ولی مشکلاتی نظیر ایجاد هیپوگلیسمی ناشی از تزریق و افزایش انسولین محیطی را ایجاد می کند [۱۲]، که ایجاد وضعیت اول در شکل ۱ محسوس است. بنابراین برتری انسولین خوراکی تهیه شده نسبت به فرم تزریقی از این جهت اثبات می گردد. اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) غلظت گلوکز سرم خون بین گروه تحت مداوا با انسولین خوراکی و نیز گروه تحت مداوا با انسولین تزریقی بعد از ۴ ساعت می تواند بیانگر این باشد که رها شدن انسولین از نانولیپوزومهای حاوی آن به تدریج و مداوم صورت می گردد و اثر آن پایدارتر است، در حالیکه در شکل تزریقی، به دلیل افزایش یکباره مولکولهای انسولین و برخورد مستقیم آنها با آنزیمهای پروتئاز، این مولکولها به سرعت تخریب شده و از بین می روند [۷،۳]. در نهایت یافته های این تحقیق به طور واضح نشان داد که انسولین خوراکی تهیه شده کارایی لازم را در شرایط *in vivo* برای معرفی شدن به عنوان یک گزینه جدید به عنوان حامل انسولین دارد. به هر حال مطالعات بیشتر بر روی این فرمولاسیون جدید می تواند نوید بخش روشی نوین در تجویز انسولین برای بیماران مبتلا دیابت باشد و این بیماران را از رنج تحمل تزریق مکرر انسولین و نیز هزینه های گزاف آن رهایی بخشد.

سپاسگزاری

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 می آید.

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*** 6 (2010) 58–63.

[2] 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 Pha***rm 356 (2008) 259- 266.

[3] Cui F, Qian F, Zhao Z, Yin L, Tang C, Yin C, Preparation, characterization, and oral delivery of insulin loaded carboxylated chitosan grafted poly (methylmethacrylate)nanoparticles. ***Biomacromolecules*** 10 (2009) 1253–1258.

[4] 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*** 114 (2006) 242-250.

[5] Damge C, Maincent P, Ubrich N, Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats***. J Controlled Release*** 117 (2007) 163-170.

[6] Gaffari MA, Dabbagh MA, Gharib A, Human erythrocyte superoxide dismutase encapsulated in positively charged liposomes. ***Iran J Pharm Sci*** 1 (2005) 153-160.

www.SID.ir

[7] Graf A, Rades T, Hook SM, Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and in vivo evaluation; ***Euro J Pharm*** Sci 37 (2009) 53-61.

[8] Jain D, Panda AK, Majumdar DK, Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. ***AAPS Pharm Sci Tech*** 3 (2005) 123-128.

[9] Kedar P, chakrabarti CH, Effects of Jambolan seed treatment on blood sugar, lipids and urea in streptozotocin induced diabetes in rabbits. ***Indian J Pharmacol*** 27 (1983) 135-40.

[10] 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*** 216 (2001) 105-114.

[11] Krauland AH, Alonso MJ, Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. ***Int J Pharm*** 340 (2007) 134-142.

[12] Krishnankutty RK, Mathew A, Saikiran K, Shrikumar S, Carani S, Aalternative routes on insulin delivery. ***J Cent South Univ*** 44 (2009) 21-29.

[13] 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*** 8 (2007) 146-152.

[14] Mir SH, Baqui A, Bhagat RC, Darzi MM, Shah AW, Biochemical and histomorphological study of streptozotocin-Induced diabetes mellitus in rabbits. ***Pakistan J Nutrition*** 7 (2008) 359-364.

[15] Mirzaee M, Owlia P, Mehrabi M, Gharib A, In vitro bactericidal activity of encapsulated amikacin in liposome. ***Iranian J Path*** 4 (2009) 151-156

[16] Sajeesh S, Sharma CP, Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. ***Int J Pharm*** 325 (2006) 147-154.

[17] Shelma R, Paul W, Sharma CP, Development and characterization of self-aggregated nanoparticles from anacardoylated chitosan as a carrier for insulin. ***Carbohydrate Polymers*** 80 (2010) 285-290.

[18] Singh B, Chauhan N, Modification of psyllium polysaccharides for use in oral insulin delivery. ***Food Hydroclloids*** 23 (2009) 928-935.

[19] Werle M, Takeuchi H, Chitosan–aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. ***Int J Pharm*** 370 (2009) 26-32.

[20] 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*** 5 (2009) 2475-2484.

[21] Wu Z, Ping Q, Wei Y, La J, Hypoglycemic efficacy of chitosan–coated insulin liposomes after oral adminstration in mice. ***Acta Pharmacol Sin*** 25 (2004) 966–972.

[22] 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*** 135 (2009) 25-34.

www.SID.ir