تهیه نانولیپوزوم های انسولین خوراکی با فرمولاسیونی جدید و بررسی کارایی آن در شرایط in vivo

امیر قریب[1*]، زهره فائزی زاده[2]

۱) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد، ایران

۲) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۰

چکیده

مقدمه: مصرف انسولین از طریق دهان بهترین و ساده ترین روش تجویز این هورمون بوده و خوشایند بیماران استفاده کننده از آن می باشد. در این مطالعه، ابتدا نانولیپوزوم های انسولین پوشش دار شده با ماده کیتوزان با فرمولاسیونی جدید تهیه شد، سپس کارایی آن در شرایط in vivo مورد بررسی قرار گرفت.

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

یافته های پژوهش: نتایج این تحقیق نشان داد که ضریب محصور شوندگی انسولین در نانولیپوزوم های تهیه شده با فرمولاسیون جدید به کار رفته به طور قابل توجه نسبت به سایر فرمولاسیون های دیگر بیشتر بوده و معادل ۷۹±۰/۱۶ می باشد. مطالعات **in vivo** به طور دقیق نمایانگر این بود که نانولیپوزوم های تهیه شده حاوی انسولین می تواند به شکلی مؤثر گلوکز خون را در خرگوش های دیابتی مورد آزمایش کاهش دهد.

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

واژه های کلیدی: کیتوزان، انسولین، نانولیپوزوم، ضریب محصور شوندگی

***نویسنده مسئول:** گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد، ایران

Email: amirgharib@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

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 مهم ترین 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 تجـــزیه قرار می دهند. هم چنین 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،(۲). 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 در حاملین دارویی به ویژه نانوپارتیکل ها به کار گرفته شده است،(۳). از جمله نانوپـارتیکـــل ها می توان به نانولیپوزوم ها، نانوسفرها و نانوکپسول ها اشاره نمود،(۴). نانولیپوزوم ها قادرند داروهای آب دوست نظیر پپتیدها و پروتئین ها را در خود محصور نمایند و از مهم تـــرین ویژگی آن ها این اســت که تجزیه پذیر بوده در محیط های زنده سمیت ایجـاد نمی نمایند، هم چنین نانولیپوزوم ها قادرند ترکیبات محصور در خود را از حملات آنزیمی و تشخیص توسط سیستم ایمنی در امان دارند،(۵). تحقیـــقات نشان می دهد که محصور شدن انسولین در نانولیپوزوم ها با کمتر شدن اثرات تخریبی آنزیم های گوارشی بر روی این هورمون و نیز جذب بیشتر آن در روده همراه است،(۶). امروزه در این موارد جهت تقویت و کارایی بیشتر نانولیپوزوم های حاوی انسولین علاوه بر استفاده از فرمولاسیون های جدید در تهیه، سطح آن ها را نیز با پلیمرهای مختلفی پوشش دار می نمایند،(۱۲). بهترین پلیمر شناخته شده در این مورد ماده ای به نام کیتوزان(chitosan) می باشد. این ماده غیرسمی پلیمری از قند N– استیل، بتا– D– گلوکز آمین است و از دی آسیلاسیون کیتین حاصل می گردد و به علت وجود گروه آمین این ماده در محیط اسیدی معده بسیار پایدار می باشد،(۷). بنا بر این 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 مولکول های انسولین شده و در نتیجه مولکول های انسولین از تخـــریب در امـــان می مانند،(۸). از طرف دیگر برای از بین بردن مانع دوم می توان از موادی نظیر سالیسیلات ها، کلرات سدیم و ماده بتا سیکلو دکسترین در فرمولاسیون تهیه انسولین خوراکی استفاده نمود. این مواد باعث می گردند که سیالیت لیپیدهای غشای سلول های مخاطی روده افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن ها افزایش یابد،(۹). در این کار تحقیـــقاتی با استـــفاده 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 نانولیپوزوم ها) استفاده گردید با این فرض که چون مولکول های کیتوزان بار مثبت دارند تعداد بیشتری از این مولکول ها 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 همان طور که مشخص گردیده تعداد مولکول های کیتوزان موجود در سطح خارجی نانولیپوزوم های حاوی انسولین رابطه مستقیم با مقدار جذب انسولین از طریق روده و نیز مقاومت آن در برابر هیدرولیز اسیدی و آنزیمی دارد،(۱۰). هم چنین در این فرمولاسیـــون بتاسیکلودکستـــرین با مولاریته مشخص همراه با انسولین در نانولیپوزوم ها محصور گردید و تاثیر آن در پایداری و ضریب محصور شوندگی انسولین مورد بـــــررسی قـــرار گرفت. در نهایت تاثیر انسولین خوراکی تهیه شده در کاهش گلوکز سرم خون خرگوش های مدل مبتلا شده به دیابت، تحت شرایط in vivo مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تجـــربی در آزمـــایشگاه تحقیقـــات و بیوشیـــــمی دانشکـــــده پیراپزشکی دانشگـــــاه آزاد اسلامی واحد بـــــروجرد انجـــام گرفت.

۱) مواد و دستگاه ها

Archive of SID

www.SID.ir

برخی از مواد مصرفی نظیر انسولین، کلسترول، کلات سدیم، لیستین سویا، کیتوزان(با وزن مولکولی ۱۰۰۰ کیلو دالتون) و ستیل دی فسفات از شرکت سیگما و کیسه دیالیز(با قطر منافذ ۲۰۰۰ کیلو دالتون) از شرکت اسپکتروم تهیه گردیدند. هم چنین 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، مدل۲۰۰-G)، دستگاه زتاسایزر(شرکت مالورن، مدل HAS ۳۰۰۰) و pH متر(شرکت تولدومتلر، مدل ۳۲۰) استفاده شد.

۲) روش تهیه نانولیپوزوم های حاوی انسولین

جهت تهیه نانولیپوزوم های حاوی انسولین از روش wu و همکارانش استفاده گردید،(۱۱). با این تفاوت که در فرمولاسیون جدید از دو ماده ستیل دی فسفات و بتا سیکلو دکسترین نیز استفاده شد. در این روش ابتدا لیستین سویا، کلسترول و ستیل دی فسفات به ترتیب با نسبت های مولاریته(۱:۱:۴) شامل ۰/۰۳۰ گرم لیستین 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 دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت تأثیر امواج فراصوت μ ۶ 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 نانولیپوزوم ها، محلول به دست آمده از بالا با استفاده از دستگاه اولترافیلتراسیون و فیلتر پلی کربنات با قطر منافذ ۵۰ نانومتر اولترافیلتره گردید. جهت بررسی تأثیر غلظت های 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، 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.

۳) روش پوشش دار کردن نانولیپوزوم های حاوی انسولین

جهت پوشش دار نمودن سطح خارجی غشای نانولیپوزوم های تهیه شده با ماده کیتوزان از روش Werle و همکارانش استفاده گردید،(۱۲). در این بخش محلول به دست آمده از مرحله بالا در کیسه دیالیز(با قطر منافذ ۲۰۰۰ کیلو دالتون) 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.

۴) روش تعیین درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم های حاوی انسولین

تعیین مقدار انسولین محصور شده در محلول نانولیپوزومی تهیه شده با استفاده از روش Jain و همکارانش انجام گردید،(۱۳). 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 بافرفسفات 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

Archive of SID

www.SID.ir

محصور در آن ها گردید. سپس با استفاده از روش لوری(معرف فولین سیوکالتو) مقدار انسولین موجود در محلول مذکور اندازه گیری شد. ذکر این نکته لازم است که روش مذکور در حد میکروگرم بر میلی لیتر به وجود پروتئین در محلول حساس می باشد،(۱۳). در نهایت با استفاده از معادله زیر درصد کارایی محصور سازی نانولیپوزوم های تهیه شده محاسبه گردید:

$$\text{درصدکارایی محصورسازی نانولیپوزومهای حاوی انسولین} = \frac{\text{مقدار انسولین محصور در یک میلی لیتر محلول حاوی نانولیپوزومها}}{\text{مقدار انسولین اولیه مصرفی جهت تهیه یک میلی لیتر محلول حاوی نانولیپوزومها}} \times ۱۰۰$$

۵) روش اندازه گیری قطر ذره ای و میزان رهش انسولین از نانولیپوزوم ها

جهت اندازه گیری قطر ذرات نانولیپوزم های تهیه شده با بهترین فرمولاسیون و اثبات تشکیل ذرات نانولیپوزومی از روش Avadi استفاده گردید،(۱)، بدین صورت که ابتدا ۲۵ میکرولیتر محلول نانولیپوزومی تهیه شده در ۳ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل گردید و محلول مذکور جهت تعیین قطر ذرات نانولیپوزومی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با زاویه تفرق ۹۰ درجه با دستگاه زتاسایزر مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین جهت بررسی مقدار رهش انسولین از نانولیپوزوم های تهیه شده با بهترین فرمولاسیون از روش Graf و همکارانش استفاده شد،(۳). در این روش محلول نانولیپوزم های تهیه شده به مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در زمان های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از انکوباسیون مقدار انسولین محصور باقی مانده در نانولیپوزوم ها اندازه گیری گردید.

۶) 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،(۳). بدین صورت که ۳۰ خرگوش سفید آزمایشگاهی با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم در ۶ گروه ۵ تایی(گروه شاهد، گروه دیابتی بدون مداوا و گروه های تست تحت مداوای ۱، ۲، ۳، ۴) قرار داده شدند و پس از القاء دیابت در گروه دیابتی بدون مداوا و گروه های تست مقدار گلوکز سرم خون حیوانات مورد مطالعه در مدت زمان های معین مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت تغییرات گلوکز سرم خون در تمام گروه ها به طور کامل مقایسه شد.

۷) روش القاء دیابت شیرین

جهت القاء دیابت شیرین در خرگوش های مورد مطالعه محلول ۶۵ میلی گرم در میلی لیتر استرپتوزوتوسین(تهیه شده بافر سیترات ۵۰ میلی مولار با pH معادل ۴/۵)، با دوز ۶۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوانات مذکور، در یک دوز به صورت داخل صفاتی تزریق گردید. بعد از یک هفته دیابتی شدن حیوانات مدل با آزمایش های مختلف(مانند اندازه گیری گلوکز سرم خون ناشتا و بررسی وجود گلوکز در ادرار) در مقایسه با گروه شاهد تأیید گردید.

۸) 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 خرگوش های گروه شاهد و گروه دیابتی بدون مداوا یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل خورانده شد. سپس انسولین خوراکی با دوز ۳۰ واحد بین المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن خرگوش های گروه تست تحت مداوا یک، در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل حل گردید و به حیوانات این گروه خورانده شد. به حیوانات گروه تست تحت مداوای دو نیز انسولین به فرم آزاد(با دوز ۳۰ واحد بین المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن خرگوش ها) به صورت محلول در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین استریل خورانده شد. گروه تست تحت مداوای سه نیز به صورت خوراکی یک میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین استریل حاوی نانولیپوزوم های فاقد انسولین(با غلظت ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) دریافت نمودند و در نهایت به خرگوش های گروه تست تحت مداوای چهار نیز انسولین به فرم آزاد(با غلظت ۳۰ واحد بین المللی به

Archive of SID

www.SID.ir

ازای هر کیلوگرم وزن بدن خرگوش ها) به صورت محلول در یک میلی لیتر در بافر فسفات سالین به روش تزریق داخل صفاقی تجویز گردید.

۹) روش اندازه گیری گلوکز سرم خون

اندازه گیری گلوکز سرم خون حیوانات مورد مطالعه با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز-پراکسیداز انجام گردید،(۱۴). مقدار ۰/۵ میلی لیتر خون از سیاهرگ ناحیه گوش در حیوانات مورد مطالعه در مدت زمان های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ 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 آن ها انجام گردید.

۱۰) روش تجزیه و تحلیل داده ها

در این تحقیق نتایج به دست آمده به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید. هم چنین مقدار گلوکز خون خرگوش های 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 اختلاف ها در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

۱) یافته های حاصل از اندازه گیری مقدار انسولین محصور شده در نانولیپوزوم ها

جدول شماره ۱ بیانگر مقدار انسولین محصور در تمام فرمولاسیون های تهیه شده می باشد. همان طور که مشخص است حداکثر مقدار محصور شوندگی معادل ۰/۰۸±۳۹ میلی گرم می باشد.

۲) نتایج حاصل از اندازه گیری کارایی محصورسازی نانولیپوزوم های تهیه شده

برای تمام فرمولاسیون های تهیه شده نانولیپوزوم های حاوی انسولین درصد کارایی محصورسازی محاسبه گردید(جدول شماره ۲). همان طور که مشاهده می گردد، بیشترین مقدار کارایی محصورسازی متعلق به فرمولاسیونی است که حاوی ۲ میلی گرم بتاسیکلودکسترین و محلول ستیل دی فسفات ۲ مولار است و اختلاف آن با سایر داده ها معنی دار می باشد.($p<0/05$)

۳) نتایج حاصل از اندازه گیری قطر ذره ای و میزان رهش انسولین از نانولیپوزوم ها

با توجه به روش ذکر شده میانگین قطر ذرات نانولیپوزوم های حاوی انسولین برای بهترین فرمولاسیون(حاوی ۲ میلی گرم بتا سیکلودکسترین و محلول ستیل دی فسفات ۲ مولار) معادل ۴/۱±۱۸۲ نانومتر تعیین گردید. هم چنین مقدار انسولین محصور باقی مانده در فرمولاسیون مذکور پس از ۳۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتیگراد معادل ۲/۹±۸۰ درصد بود.(نمودار شماره ۱)

۴) نتایج القاء دیابت شیرین

همان طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می گردد، در گروه شاهد میانگین مقدار گلوکز خون ناشتا ۰/۶۸±۹۱ میلی گرم بر دسی لیتر و هم چنین گلوکز موجود در ادرار منفی می باشد. در حالی که در خرگوش های دیابتی شده با استرپتوزتوسین مقدار میانگین گلوکز خون در وضعیت ناشتا ۰/۷۵±۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر بوده و هم چنین گلوکز موجود در ادرار مثبت است که خود دلیل بر القاء دیابت شیرین در این حیوانات می باشد.

۵) نتایج تجویز انسولین خوراکی، تزریقی و انسولین به فرم آزاد

در نمودار ۲ 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 نانولیپوزوم های فاقد انسولین و نیز انسولین به فرم آزاد یک ساعت بعد از دریافت اختلاف معنی داری ($p<0/05$) 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 شد، در حالی که حداکثر تأثیر انسولین خوراکی یک ساعت پس از تجویز اعمال گردید. مطالعه تغییرات گلوکز سرم خون بین زمان های ۰ تا ۴ ساعت در گروه های دریافت دارنده انسولین خوراکی و نیز انسولین به فرم تزریقی نشان داد که بعد از مدت زمان ۲/۵ ساعت پس از

Archive of SID

www.SID.ir

تجویز سطح تغییرات معنی دار($p<۰/۰۵$) شده و این اختلاف معنی دار تا ساعت ۴ ادامه یافته و افــزایش می یابد. هم چنین در تمام زمان های مورد مطالعه، تغییرات گلوکز سرم خون گروه شاهد نامحسوس است و مقادیر آن با تغییرات گلوکز سرم خون با گروه های دریافت دارنده نانولیپوزوم های فاقد انسولین و نیز انسولین به فرم آزاد اختلاف معنی داری($p<۰/۰۵$) را نشان می دهد.

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

		مقدار بتا سیکلو دکسترین (میلی گرم)			
		۰	۱	۲	۳
مقدار ستیل دی فسفات (مولاریته)	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.

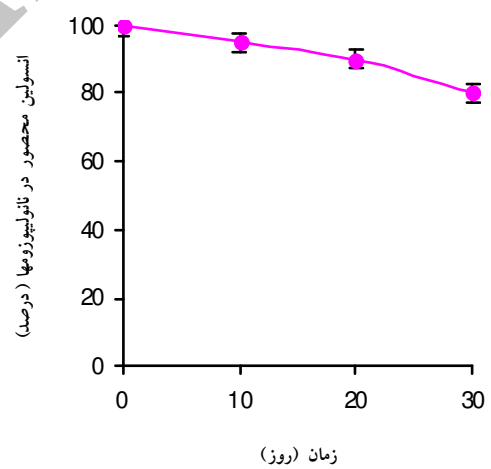
** مقدار ذکر شده دارای اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) با سایر داده ها می باشد.

جدول شماره ۲ . درصد کارایی محصور سازی نانولیپوزوم های پوشش دار شده با کیتوزان حاوی انسولین با فرمولاسیون های متفاوت*

		مقدار بتا سیکلو دکسترین (میلی گرم)			
		۰	۱	۲	۳
مقدار ستیل دی فسفات (مولاریته)	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

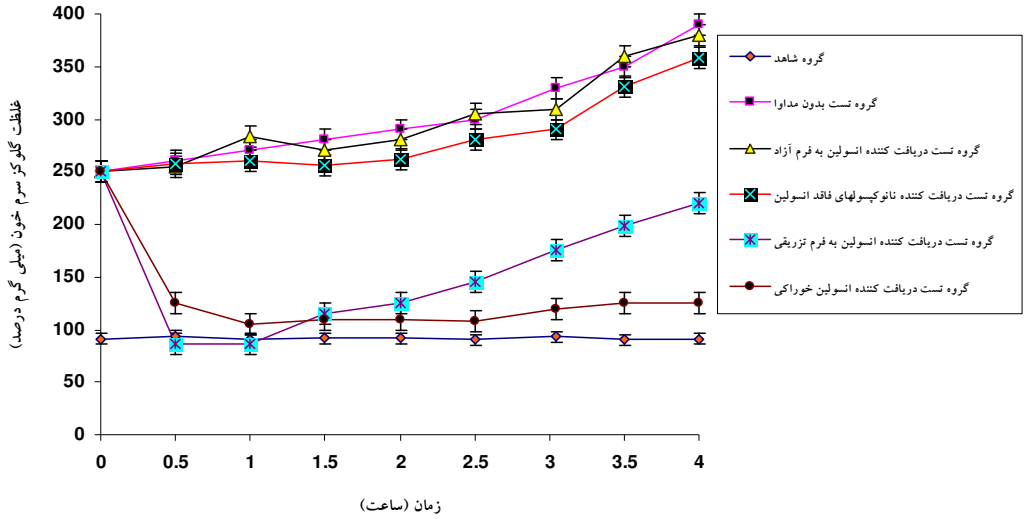
** مقدار ذکر شده دارای اختلاف معنی دار($p<۰/۰۵$) با سایر داده ها می باشد.



نمودار شماره ۱ . تغییرات درصد انسولین محصور باقی مانده در نانولیپوزوم ها در واحد زمان

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۲ . تغییرات گلوکز سرم خون خرگوش های مورد مطالعه در واحد زمان

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از جنبه های تحقیقی مورد اهمیت در دنیای امروز ایجاد حامل های مناسب و کارآ برای تجویز خوراکی پپتیدها و پروتئین ها می باشد،(۱،۳). 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 هم چنین اثرات افزایش انسولین محیطی را هم ندارد،(۸). عدم کارایی مناسب نانولیپوزوم های فاقد پوشش به عنوان حاملین خوراکی انسولین کاملاً مشخص و اثبات شده می باشد(۱۵)، زیرا طی تحقیقات انجام شده لیپوزوم های فاقد پوشش نمی توانند با دو مانع ذکر شده(آنزیم های پروتئاز و اتصالات محکم بین آنتروسیت ها) به طور کامل مقابله نمایند. این مورد در یافته های Kisel و همکارانش منعکس گردیده است،(۱۶). در حالی که در این تحقیق مشخص گردید که پوشش دار نمودن نانولیپوزوم ها در کارایی انسولین خوراکی تهیه شده نقش بسزایی داشته و این موضوع در شرایط in vivo اثبات گردید. تاکنون در مورد مکانیسم های جذب نانولیپوزوم های 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 می باشند،(۱۷،۱۸). تحقیقات مختلف نشان داده که کیتوزان و مشتقات آن می توانند جذب نانولیپوزوم ها را در روده به سه طریق فوق به شدت افزایش دهند،(۱۹). به طور مثال نانولیپوزوم های پوشش دار شده با کیتوزان قادرند به مخاط روده متصل گردند که خود باعث افزایش مدت زمان ماندگاری نانولیپوزوم ها درون روده شده و در نتیجه نفوذپذیری این حاملین به داخل لایه مخاطی روده افزایش می یابد،(۷). هم چنین کیتوزان سطحی می تواند اتصالات محکم بین سلول های جاذب روده را به طور لحظه ای و برگشت ناپذیر به نانولیپوزوم ها نفوذپذیر نماید،(۸). بتاسیکلودکسترین جزء ترکیبات سیکلودکسترینی است و باعث افزایش حلالیت، نفوذپذیری و نیز مهار فعالیت پروتئازهای خاص بر روی داروهای پپتیدی و پروتئینی می گردد،(۹). تحقیقات Krauland و همکارانش نشان داد که به کارگیری بتا سیکلودکسترین در تهیه نانوپارتیکل های حاوی انسولین از چند طریق سبب افزایش ضریب محصورسازی و پایداری نانو پارتیکل های مذکور شده و کارایی آن را در آزمایش های in vivo افزایش می دهد،(۲۰). استفاده از این ترکیب در فرمولاسیون جدید به کار گرفته شده

Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق موارد ذکر شده را اثبات نمود. هم چنین در این پروژه اثبات گردید که بهترین مقدار این ماده جهت حداکثر نمودن ضـــــریب محصور سازی ۲ میلی گرم می باشد(جدول شماره ۲)، و این امـــــر می تواند توجیه کننده کارایی بهتر انسولین خوراکی تولید شده در مقایسه با نانوپارتیکل های حاوی انسولین توسط Krauland و همکارانش باشد که ۱ میلی گرم از ترکیب مذکور را در فرمولاسیون تهیه شده استفاده نموده اند. ترکیب لیپیدی لیپوزوم ها در ضریب محصورسازی آن ها مؤثر است،(۴). استفـــــاده از ستیل دی فسفات دارای بار منفی در فرمولاسیون به کار گرفته شده باعث افزایش ضریب محصورسازی نانولیپوزوم ها گردیده است که طبق تحقیقات انجام شده مـــــی تواند ناشی از هم بر کنش قوی بین گروه های آمین موجود در انسولین با ستیل دی فسفات باشد،(۱۶). هم چنین ستیل دی فسفات موجود در غشای نانولیپوزوم ها با پیوند یونی به کیتوزان متصل شده و باعث افزایش مقدار کیتوزان سطحی گردیده است که خود می تواند توجیهی برای موثر بودن فرمولاسیون به کار گرفته شده در مقایسه با موارد گزارش شده توسط Avadi، Werle و Kisel و همکارانشان باشد،(۱،۱۲،۱۶). مصرف انسولین خوراکی تهیه شده باعث کاهش گلوکز سرم خون ناشتا در خرگوش های 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 یافته های Werle و Cui نیز اثبات شده و علت آن تأثیر همزمان ناشتا بودن و عوامل دخیل در هیپوگلیسمی ذکر گردیده است،(۱۲،۱۵). 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 طوری که بعد از مدت زمان یک ساعت پس از تجویز حداکثر تأثیر خود را در کاهش قندخـــون نشان می دهد. این موضوع ناشی از جذب با تأخیر انسولین محصور در نانولیپوزوم ها در روده است. البته این تاخیر در تحقیقات Wu و همکارانش بیشتر از یک ساعت می باشد که می تواند ناشی از عدم استفاده از ستیل دی فسفات و کم بودن تراکم مقدار کیتوزان در سطح نانولیپوزوم های تهیه شده باشد،(۱۴). با این که در انسولین تزریقی این نقیصه وجود ندارد ولی مشکلاتی نظیر ایجاد هیپوگلیسمی ناشی از تزریق و افزایش انسولین محیطی را ایجاد می کند،(۷)، که ایجاد وضعیت اول در نمودار ۲ محسوس است. بنا بر این برتری انسولین خوراکی تهیه شده نسبت به فرم تزریقی از این جهت اثبـــات می گـــردد. اختـــــلاف 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 نانولیپوزوم های حاوی آن به تدریج و مداوم صورت می گردد و اثر آن پایدارتر است، در حالی که در شکل تزریقی، به دلیل افزایش یکباره مولکول های انسولین و برخورد مستقیم آن ها با آنزیم های پروتئاز، این مولکول ها به سرعت تخریب شده و از بین می روند.(۳،۸)

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 بیشتـــــر بر روی این فرمولاسیون جـــدید می تواند نوید بخش روشی نوین در تجویز انسولین برای بیمـــــاران مبتلا دیابت باشد و این بیمـــــاران را از رنج تحمـــــل تزریق مکرر انسولین و نیز هزینـــــه های گزاف آن رهایی بخـــــشد.

سپاس گزاری

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشـــــی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گردیده است. لذا از زحمات ایشان تشکر و قدردانی به عمل می آید.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Polymer 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. Eur J Pharm Sci 2009;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 Pathol 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. Biomacromolecules 2009;10:1253-8.

9-Sajeesh S, Sharma CP. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. Int J Pharm 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 S. 100 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.

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.

Archive of SID

www.SID.ir

New Formulated Insulin-Loaded Nanoliposomes for Oral Delivery: Preparation And in vivo Efficacy

Gharib A[1], Faezizadeh Z[2]*

(Received: 11 Jul. 2010 Accepted: 10 Jan. 2011)

Abstract

Introduction: The oral insulin delivery is the most familiar, easy and patient friendly of all the routes of insulin applications. The aim of this study was to generate a new chitosan coated insulin nanoliposomes and evaluate their potential for the delivery of insulin.

Materials & Methods: Nanoliposomes encapsulated insulin with negative surface charge was prepared by reverse phase evaporation method. For such a preparation, nanoliposomes lecithin, cholesterol, cetyl-diphosphate and β-cyclodexterin were used. Then, nanoliposomes were coated by means of incubation with the chitosan solution. The encapsulation efficiency of the prepared nanoliposomes was measured by spectrophotometry technique after dissolution of the nanoparticles. The hypoglycemic efficacies of chitosan-coated insulin nanoliposomes were investigated by monitoring the blood glucose level after oral administration to diabetic rabbits.

Findings: Insulin entrapment efficacy for the prepared nanoliposomes by application of the new formulation was significantly ($p<0.05$) higher(79 ± 0.16) than those of other formulations, respectively. The in vivo result clearly indicated that the insulin-loaded nanoliposomes could effectively reduce the blood glucose level in diabetic rabbits.

Discussion & Conclusion: The results clearly suggested that the prepared nanoliposomes could be considered a good candidate for oral insulin delivery.

Keywords: chitosan, insulin, nanoliposome, entrapment efficacy

1. Dept of Laboratory Sciences, Islamic Azad University, Brojerd Branch, Brojerd, Iran(corresponding author)
2. Dept of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran

Archive of SID

www.SID.ir