جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Pharmaceutical Sciences,2010, Vol. 16, No. 1, Page 57-68

علوم داروئی، 1389 دوره 16، شماره 1، 68-57

فرمولاسیون و ارزیابی برون تنی خصوصیات نیوزومهای حاوی انسولین و آپروتینین جهت تجویز خوراکی

موسی طالبی بخشایش[1]، عباس پرداختی[2*]، محمد جواد ثابت جهرمی[3]

[1] کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، کرمان ، ایران

[2] دانشیار گروه فارماسیوتیکس ، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ، کرمان ، ایران

[3] استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، کرمان ، ایران

تاریخ دریافت : 88/2/13 ، تاریخ پذیرش : 88/11/17

Formulation and in vitro characterization of niosomes containing insulin and aprotinin for oral administration

Talebi Bakhshayesh M.[1], Pardakhty A.[2] and Sabet Jahromi M.J.[3]

[1]MSc. of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Science, Kerman,Kerman, Iran.

[2]Associate Professor, Pharmaceutics Research Center, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Science, Kerman, Kerman, Iran.

[3]Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Science, Kerman , Kerman, Iran.

Received: 3 May. 2009, Accepted: 6 Feb. 2010

Objectives: The delivery of protein pharmaceuticals to the systemic circulation through oral administration is the goal of many research groups. This route of administration is hindered by numerous barriers. New drug delivery systems such as vesicles can overcome this barriers. **Methods:** Different niosomal formulations composed of sorbitan monoesters (Spans®)/ polyoxyethylen sorbitan esters (Tweens®)/cholesterol were prepared for encapsulation of insulin with or without aprotinin. In vitro characterization of vesicles were carried out including size distribution analysis, microscopic observation, insulin release measurement and SDS-gel electerophoresis.The protection of protein against three enzymes was evaluated. **Results:** Span/Tween 80 did not form niosomes, but the other surfactant combinations formed stable niosomal suspensions. Insulin was protected from proteolytic effects of enzymes efficiently ($p<0.05$). the mean volum diameter of prepared lipid vesicles was related directly to hydrophilicity of surfactants indicated by hydrophilicic-lipophilic balance (HLB) of the used amphiphiles. The maximum encapsulation of insulin 48.9±13.08, was seen in Span/Tween 60 formulations. The release profile of insulin was tow-phasic in both simulated gastric and intestinal fluids. Aprotinin had no significant effect on the protection of insulin ($p<0.05$). **Conclusion:** these results indicated that niosomes could be developed as oral dosage forms for delivery of proteins such as insulin.

Key words: *Insulin, Niosome, Aprotinin, proteolytic enzymes*

زمینه و هدف: تحویل داروهای پپتیدی و پروتئینی به گردش خون از طریق خوراکی هدف بسیاری از گروه های تحقیقاتی می باشد. این روش انتقال توسط موانعی محدود می شود. سیستم های دارورسانی جدید از قبیل وزیکول ها می توانند بر این موانع غلبه کنند.**روش ها:** فرمولاسیون های مختلف نیوزومی متشکل از استرهای سوربیتان (Spans®) / استرهای پلی اکسی اتیلن سوربیتان (Tweens®) / کلسترول برای احتباس انسولین با و بدون حضور آپروتینین تهیه شدند ارزیابی برون تنی وزیکول ها شامل بررسی توزیع اندازه ذره ای، مشاهدات میکروسکوپی، بررسی میزان آزادسازی انسولین و SDS الکتروفورز بود. همچنین حفاظت انسولین در برابر سه نوع آنزیم بررسی شد.**یافته ها:** نیوزومهای اسپان- توین 80 تشکیل نیوزوم ندادند، اما سایر ترکیبات سورفکتانتی، سوسپانسیون های نیوزومی پایداری را تشکیل دادند. انسولین در مقابل اثرات پروتئولیتیک آنزیم ها بطور مؤثری حفاظت شد ($P<0/05$). میانگین اندازه ذره ای وزیکول های لیپیدی با خاصیت آبدوستی سورفکتانت ها ی آمفی فیل رابطه مستقیم داشت. بالاترین درصد احتباس انسولین 48/9±13/08 بود که در فرمولاسیون های نیوزومی اسپان-توین 60 دیده شد. روند آزادسازی انسولین در هر دو محیط مشابه معدی (SGF) و روده ای (SIF) یک روند دو فازی بود. آپروتینین تأثیر معنی داری روی حفاظت انسولین نداشت ($P<0/05$).**نتیجه گیری:** این نتایج نشان داد که نیوزومها می توانند به عنوان اشکال دارویی خوراکی برای رساندن پروتئین هایی از قبیل انسولین بکار گرفته شوند.

واژه های کلیدی: *انسولین، نیوزوم، آپروتینین، آنزیم های پروتئولیتیک.*

*نویسنده مسئول: عباس پرداختی ،دانشیار، گروه فارماسیوتیکس ، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ، کرمان ، ایران ، تلفن: 0341-3205001، نمابر: 0341-3205003

**Corresponding Author: Associate Professor, Pharmaceutics Research Center, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Science, Kerman, Kerman, Iran.Tel:+98-o341-3205001;Fax:+341-3205003;E-mail: abpardakhty@kmu.ac.ir*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

1- مقدمه

امروزه همچنان راه اصلی برای تجویز داروهای پروتئینی نظیر انسولین، روش های تزریق زیر جلدی یا داخل وریدی فرمولاسیون های محلول یا سوسپانسیونی این نوع ترکیبات می باشد. با ممنوع شدن فروش فرآورده های استنشاقی انسولین یعنی Exubera و Nektar در سال 2008 میلادی مجدداً راه های غیر تزریقی و غیر استنشاقی تجویز انسولین مورد توجه بسیاری از گروه های تحقیقاتی در سرتاسر دنیا قرار گرفته است (1). از جمله راه های تجویز انسولین جذب از طریق سیستم عروقی بینی می باشد که به دلیل سطح وسیع مخاطی، غشای اندوتلیال متخلخل، سیستم گردش خون وسیع و عدم متابولیسم ترکیبات جذب شده از این مسیر آن را بعنوان یکی از روش های جایگزین مطرح کرده است (2). از طرفی بدون شک آرمانی ترین راه برای تجویز داروهای پروتئینی نظیر انسولین، راه خوراکی می باشد. جهت تجویز خوراکی انسولین بایستی عبور از معده، پرهیز از تخریب آنزیمی، نفوذ در اپیتلیوم روده و گریز از مکانیسم های برون ریزی (mechanisms Efflux) دارو را مد نظر قرار داد. استفاده از افزایش دهنده های نفوذ پذیری (enhancers penetration) یکی از راه های بهبود اثر بخشی تجویز خوراکی داروهای پروتئینی می باشد (3). محبوس سازی انسولین در سامانه های ذره ای (particulated systemes) نظیر نانو امولسیون ها که دارای اندازه قطرکهای فاز داخلی در حدود 100 نانومتر می باشند، تمهیدی دیگر جهت دارورسانی خوراکی این پروتئین می باشد (4،5). نانو ذرات لیپیدی (Solid-Lipid Nanoparticles ؛SLN) نیز جهت محافظت انسولین از محیط مخرب دستگاه گوارش وهمچنین افزایش نفوذ این داروی پروتئینی مورد استفاده قرار گرفته است (4). در مطالعات قبلی ما گزارش فرمولاسیون نیوزومهای حاوی انسولین (6،7) و نیز اثر تجویز خوراکی آن ها بر کاهش سطح قند خون موش های صحرایی دیابتی شده ارایه شده است (8). با وجود تفاوت معنی دار بین کاهش سطح گلوکز خونی در گروه های دریافت کننده انسولین نیوزومی در مقایسه با گروه های کنترل، اصلاح سامانه طراحی شده به منظور بهبود عملکرد تجویز خوراکی مدنظر گروه تحقیقاتی ما بوده و در این مسیر، استفاده از سورفکتانتهای پلی اکسی اتیلنه (PEGylated) و به طور همزمان، استفاده از مهار کننده های پروتئاز نظیر Aprotinin مدنظر قرار گرفته است. وجود گروه های پلی اکسی اتیلن در سامانه های وزیکولی جهت حصول قابلیت مخاط چسبی (Mucoadhesiveness) و افزایش میزان عبور انسولین از دیواره روده در شرایط ex vivo مورد مطالعه قرار گرفته است (9). این روش جهت افزایش آبدوستی سامانه وزیکولی که به افزایش طول اثر گردش سیستمیک و پرهیز از تجمع سامانه در سیستم رتیکولواندوتلیال (Reticulo-Endothelial System ؛RES) لیپوزوم های دوکسوروبیسین (Doxil®) استفاده شده است (10،11). در مطالعه حاضر مشتقات پلی اکسی اتیلنه (PEGylated) استرهای سوربیتان (Tweens®) به صورت ترکیبی با استرهای سوربیتان (Spans®) در ساخت نیوزومهای حاوی انسولین مورد استفاده قرار گرفته است. مهار کننده های پروتئاز به منظور مهار آنزیم های مخرب داروهای پروتئینی و افزایش احتمال اثربخشی داروهایی نظیر انسولین متعاقب تجویز خوراکی، مورد استفاده بوده و گزارش های متعددی در مورد بهره گیری از این مواد وجود دارد؛ Cilek و همکارانش (2005) استفاده از آپروتینین را جهت تهیه میکروامولسیون های مبتنی بر لسیتین برای تجویز خوراکی انسولین گزارش نموده اند (12). آپروتینین با سمیت نسبتاً کم بر روی سلول های کارسینومای ریه (A549)، به طور قابل توجهی بر جذب انسولین ریوی در موش صحرایی تأثیرگذار بوده است (13). در مطالعه حاضر فرمولاسیون نیوزومهای PEGylated حاوی انسولین با یا بدون آپروتینین تهیه و خصوصیاتی نظیر درصد محبوس سازی دارو، اندازه ذره ای، پایداری سامانه وزیکولی، محافظت پروتئین در مقابل آنزیم های مخرب گوارشی و میزان آزادسازی انسولین در محیط مشابه معده (USP SIF؛ Simulated Gastric Fluid) و محیط مشابه روده (USP SIF؛ Simulated Intestinal Fluid) مطالعه شده است. همچنین با بهره گیری از روش الکتروفورز، حفظ ساختار انسولین در طول مسیر ساخت فرمولاسیونهای نیوزومی مورد مطالعه قرار گرفته است.

2- مواد و روش کار

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل پودر انسولین-روی (23IU/mg، اهدایی شرکت اکسیر)، کلسترول (Fluka، سوئیس)، ترکیب سورفکتانت های غیر یونی از خانواده استرهای سوربیتان (اسپان 20، اسپان 40، اسپان 60، اسپان 80) و مشتقات پلی اتیلن گلیکولی استرهای سوربیتان (توین 20، توین 40، توین 60، توین 80)، آپروتینین و تری فلوروواستیک اسید (TFA) (Sigma، آمریکا) و حلال ها و سایر مواد نیز از Merck (آلمان) تهیه شدند. آنزیم های مورد استفاده جهت بررسی اثر حفاظتی سامانه نیوزومی بر مولکول انسولین شامل α-کیموتریپسین (40-60U/mg)، پپسین (3200-4500U/mg) از شرکت Sigma (آمریکا)و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تریپسین (10000BAEE U/mg) از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند.

به منظور تهیه نیوزوم ها، از روش هیدراتاسیون لایه نازک چربی استفاده شد. در این روش، اجزای تشکیل دهنده نیوزوم شامل 200 میکرومول مخلوط سورفکتانت های غیر یونی و کلسترول در نسبت های متفاوت سورفکتانت (نسبت 50/50 درصد مولی دو نوع سورفکتانت) / کلسترول (50/50 و 30/70 درصد مولی) به منظور تهیه مخلوط یکنواخت (در سطح مولکولی) در 5 میلی لیتر کلروفرم حل شد. پس ازآن حلال آلی توسط دستگاه تبخیر در خلأ به صورت بخار جدا گردیده، لایه نازک چربی حاصله با افزودن 5 ml فاز مایعی که حاوی محلول انسولین (20IU/ml) و آپروتینین (500KIU/ml) در نرمال سالین بود در دمای 55 °C به مدت 30 دقیقه هیدراته شد. در مرحله بعد جهت کامل شدن هیدراتاسیون، نمونه ها به مدت 24 ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و پس از طی این مدت، به منظور بررسی های بعدی در درجه حرارت یخچال (8°C-2) نگهداری شدند. شکل ظاهری نیوزومها، احتمال جداشدن اجزای تشکیل دهنده به صورت تشکیل کریستال های کلسترولی و پدیده تجمع نیوزومی، توسط میکروسکوپ نوری (Komax, Japan) به عنوان مدل های شکل گیری و پایداری نیوزومها مطالعه و از برخی نمونه ها با دوربین دیجیتال (Sony ExwaveHAD, Japan) متصل به میکروسکوپ (Olympus BH, Japan) عکس برداری شد.

تعیین توزیع اندازه ذره ای با بهره گیری از روش پراش پرتو لیزر توسط دستگاه آنالیز اندازه ذره ای (Malvern Master sizer 2000E، انگلستان) در محدوده 100 نانومتر تا 100 میکرومتر مورد مطالعه قرار گرفت.

برای تعیین درصد محبوس سازی انسولین در نیوزوم ها، جهت جداسازی محلول شفاف رویی (Supernatant) و پلت نیوزومی ابتدا سوسپانسیون نیوزومی مورد نظر تحت عمل سانتریفوژ (Hettic 1710، آلمان) با دور 14000 rpm به مدت 30 دقیقه در 4 °C قرار گرفته و محلول شفاف رویی از پلت نیوزومی جدا گردید. مقدار انسولین در محلول شفاف رویی و پلت نیوزومی پس از انحلال در ایزوپروپانول اندازه گیری و درصد بارگیری نیوزوم ها بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بارگیری انسولین} = \frac{\text{انسولین موجود در پلیت نیوزومی} \times 100}{\text{مقدار انسولین موجود در پلیت نیوزومی + مقدارانسولین موجود در مایع شفاف رومی}}$$

با عنایت به اینکه تجویز خوراکی انسولین، دارو را در معرض اثر آنزیم های پروتئولیتیک قرار می دهد از محلول های آنزیمی پپسین (5 U/ml، در بافر گلایسین با pH 1/2)، کیموتریپسین (4/16 U/ml، در بافر فسفات با pH 7/8) و تریپسین (704 U/ml، در بافر فسفات با pH 7/8) برای بررسی میزان حفاظت انسولین محبوس در نیوزوم در برابر این آنزیم ها استفاده شد (8-6). به این ترتیب که 0/1 میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق شده نیوزومی تحت تاثیر 0/1 میلی لیتر از محلول آنزیمی به مدت 30 دقیقه در دمای 37 °C انکوبه گردید. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون 0/1 میلی لیتر از ایزوپروپانول و غلظت 0/05٪ محلول TFA به ترتیب جهت انحلال پلت نیوزومی و غیر فعالسازی مقادیر جزئی باقیمانده از آنزیم های پروتئولیتیک در محلول به مجموعه اضافه و پس از آن مقدار انسولین باقیمانده درون نیوزوم ها اندازه گیری شد (14،8-6). شرایط مشابه برای بررسی میزان حفاظت انسولین محبوس نیوزومی در حضور آپروتینین اعمال گردید. به عنوان کنترل از محلول انسولین در بافر فسفات استفاده شد.

برای بررسی میزان آزادسازی انسولین در محیط های مشابه معدی (SGF) و روده ای (SIF)، 1 میلی لیتر از سوسپانسیون نیوزومی به مدت 30 دقیقه تحت عمل سانتریفوژ با دور 14000 rpm قرار گرفت. پس از سانتریفوژ مایع شفاف رویی (Supernatant) دور ریخته شده مقدار 1 میلی لیتر SGF و SIF به لوله های اپندورف حاوی پلت اضافه نمودیم. لوله ی اپندورف حاوی SGF را توسط همان محیط به میزان 5 برابر و لوله ی اپندورف حاوی SIF را توسط همان محیط به میزان 10 برابر رقیق کرده، به شکل نمونه های یک میلی لیتری در لوله های اپندورف جداگانه ریخته، در Shaker Incubator با درجه حرارت 37°C و دور 12 سیکل در دقیقه قرار داده شد. برای هر زمان آزاد سازی 3 لوله اپندورف در نظر گرفته شد و مدت زمان آزادسازی دارو در SGF به مدت 4 ساعت ودر SIF به مدت 24 ساعت مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از لوله های اپندورف برای نقطه زمانی خاصی کدگذاری و هر کدام ازلوله های مذکور در زمان خاص خود از انکوباتور خارج و به مدت 30 دقیقه تحت عمل سانتریفوژ با دور 14000rpm قرار گرفت. پس از سانتریفوژ مایع شفاف رویی (Supernatant) دور ریخته شده، پلت ها جهت آزادسازی انسولین باقیمانده در ایزوپروپانل حل و انسولین تعیین مقدار گردید (8-6).

برای بررسی پایداری انسولین در درجه حرارت تهیه فرمولاسیون ها و حضور ترکیبات مختلف در طی مراحل

ساخت نیوزوم از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد (15).

در مراحل مختلف این تحقیق میزان انسولین با استفاده از کیت های الایزا (Diaplus، آمریکا) تعیین مقدار شد.

در تمامی مراحل، داده های کمی پیوسته به روش ANOVA یکطرفه با post HOC مناسب (Duncan) در نرم افزار آماری spss v13/win مقایسه گردیده وسطح آماری معنی دار به صورت $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

3-نتایج

در نتایج بدست آمده بجز سورفکتانت های اسپان 80-توین 80 تمامی سورفکتانت های موجود در حضور نسبت های مختلف مولی (30 و50 درصد) کلسترول تشکیل نیوزوم های چند لایه (MLV) دادند (جدول 1).

همچنین نیوزومهای چند لایه (MLV؛ Multilamellar Vesicles) و تک لایه بزرگ (LUV؛ Large unilamellar Vesicles) در حضور مقادیر مختلف کلسترول به صورت وزیکول های کروی تشکیل شد. تصویر شماره 1 نمای میکروسکوپی برخی سوسپانسیون های نیوزومی تشکیل شده را نشان می دهد.

با توجه به اینکه در ساخت نیوزومها، از روش هیدراتاسیون لایه چربی استفاده شد، قطر نیوزومها بزرگتر از 5 میکرومتر (میکرون) شدند و نتایج حاصله در جدول 2 ارایه شده است. جهت بیان اندازه نیوزومها از میانگین قطر حجمی (Mean volume diameter؛d_v) استفاده شده است زیرا در روش پراشیدگی پرتو لیزر بر اساس حجم ذرات، میزان نور پراشیده شده ثبت و داده های حاصله مورد آنالیز قرار می گیرد.ازرسم قطر میانگین حجمی نیوزومها در مقابل درصد فراوانی در نرم افزار Mastersizer نمودارهای توزیع اندازه ذره ای که مبین توزیع Log-نرمال بود، حاصل گردید (نمودار 1).

جدول 2 نشاندهنده میانگین قطر حجمی (d_v) نیوزوم های حاوی انسولین در حضور و عدم حضور آپروتینین، نسبت های مختلف مولی کلسترول و درصد احتباس (EE%) انسولین در فرمولاسیون های تهیه شده می باشد. حداکثر درصد احتباس مربوط به نیوزومهای اسپان-توین 60 بدون آپروتینن در حضور 30 درصد مولی کلسترول برابر 48/9±13/08 و کمترین درصد احتباس مربوط به نیوزومهای اسپان-توین20 بدون آپروتینین با میزان 19/88±8/33 می باشد.

قابل ذکر است که حضور یا عدم حضور آپروتینین تأثیر معنی داری در تشکیل، میانگین قطر حجمی (d_v) و درصد احتباس (EE%) فرمولاسیون ها نداشت. در اغلب فرمولاسیون ها ثابت بودن فاکتورهای مذکور نشان دهنده پایداری فرمولاسیون های تهیه شده می باشد. همچنین مطالعه میکروسکوپی نمونه های نگهداری شده در یخچال پدیده های جدا شدن ذرات کلسترول، قطرات یا ذرات سورفکتانت و تجمع (Aggregation) وزیکول ها را که ملاک هایی از ناپایداری شیمیایی یا فیزیکی می باشند رد کرد.

نمودار 2 درصد حفاظت انسولین در حضور بعضی از آنزیم های پروتئولیتیک از جمله پپسین، تریپسین و کیموتریپسین را نشان می دهد. در تمامی فرمولاسیون های بررسی شده میزان حفاظت احتباس انسولین به میزان معنی داری بالاتر از محلول احتباس انسولین بود ($P<0/05$).

نمودارهای 3 و 4 به ترتیب بیانگر میزان آزادسازی انسولین در محیط های مشابه معدی (SGF) و روده ای (SIF) از نیوزوم های 30 درصد مولی کلسترول می باشد.

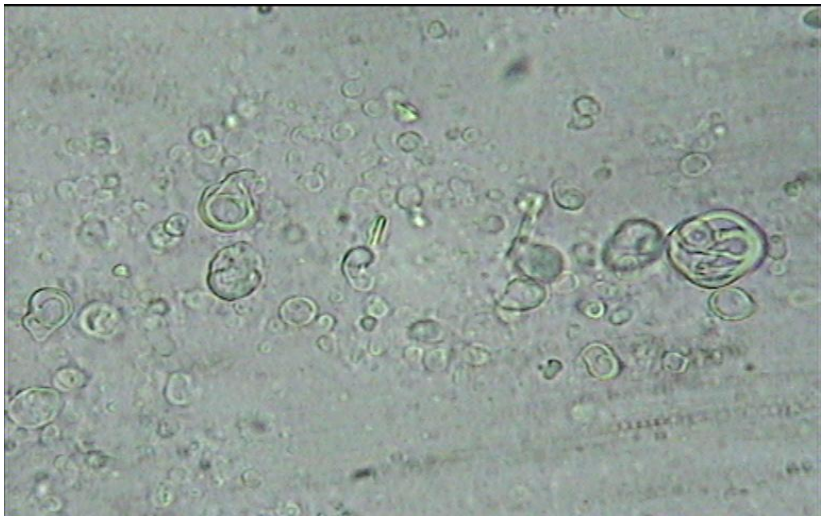
همانطور که در شکل 2 مشاهده می شود درجه حرارت لازم برای تهیه فرمولاسیون ها و حضور ترکیبات مختلف در طی مراحل ساخت نیوزوم هیچگونه تأثیری در ساختار انسولین مورد استفاده نمی گذارد.

جدول 1. توانایی تشکیل نیوزوم های قابل قبول توسط سورفکتانت های مورد استفاده در حضور نسبت های مختلف مولی کلسترول تشکیل نیوزوم های قابل قبول دادند – +عدم تشکیل نیوزوم های قابل قبول

سورفکتانت	تعداد کربن زنجیره هیدروکربنی	HLB	نسبت مولی سورفکتانت / کلسترول 30/70	نسبت مولی سورفکتانت / کلسترول 50/50
اسپان 20 – توین 20	12	12/65	+	+
اسپان 40 – توین 40	16	11/15	+	+
اسپان 60 – توین 60	18	9/8	+	+
اسپان 80 – توین 80	18	9/65	–	–

جدول 2. میانگین قطر حجمی (d_v) و درصد احتباس (EE%) انسولین در فرمولاسیون های تهیه شده (Mean ± SD, n=3)

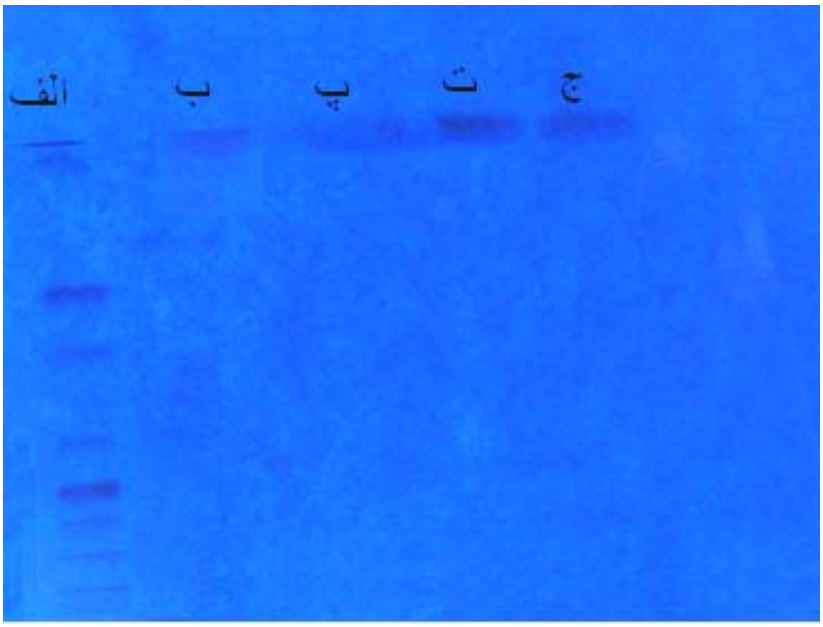
نسبت های مختلف مولی کلسترول / نوع نیوزوم	30 درصد مولی dv(µm)	30 درصد مولی EE%	50 درصد مولی dv(µm)	50 درصد مولی EE%
نیوزومهای اسپان – توین 20 حاوی آپروتینین	6/03±0/22	35/83±7/61	23/76±0/2	–
نیوزومهای اسپان – توین 20 بدون آپروتینین	7/68 ±0/3	19/88±8/33	23/61±0/05	–
نیوزومهای اسپان – توین 40 حاوی آپروتینین	5/94 ±0/3	43/38±10/18	9/4±1/2	–
نیوزومهای اسپان – توین 40 بدون آپروتینین	5/8±0/21	45/98±12/78	8/5±0/6	34/2 ± 5/32
نیوزومهای اسپان – توین 60 حاوی آپروتینین	4/6±0/04	47/42±12/32	15/78±1/8	–
نیوزومهای اسپان – توین 60 بدون آپروتینین	4/48 ±0/02	48/9±13/08	15/56±1/3	35/4 ± 6/7



(الف)

(ب)

شکل 1. تصویر میکروسکوپی بعضی از نیوزوم های حاوی انسولین. نسبت مولی 30/70 سورفکتانت / کلسترول از الف) نیوزومهای اسپان-توین 20 حاوی آپروتینین ب) نیوزومهای اسپان-توین 60 حاوی آپروتینین. درشت نمایی تصاویر 400 برابر می باشد.



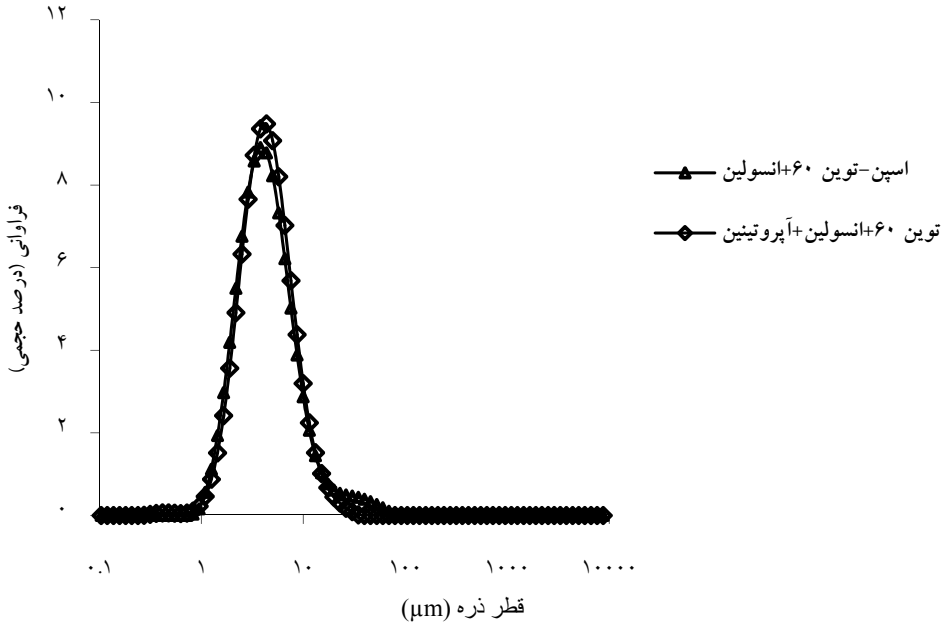
شکل **2**. الگوی الکتروفورز انسولین جهت بررسی پایداری آن.

الف: مارکرهای انسولینی با وزن های مولکولی مختلف

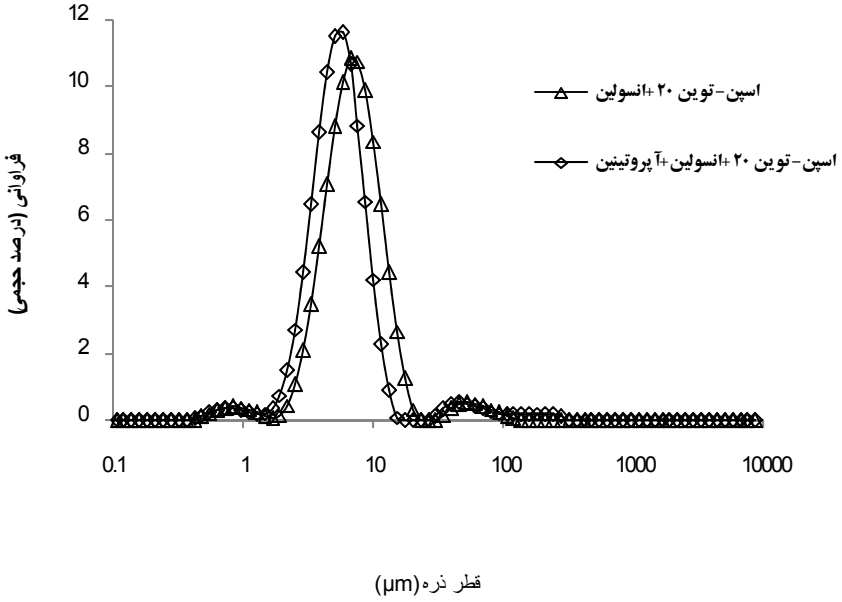
ب: نمونه خالص انسولین (20IU/ml)

پ: نمونه انسولین قرار گرفته در معرض حرارت 60ºC

ت: نمونه انسولینی که تحت تأثیر روش هیدراتاسیون لایه نازک قرار گرفته ج: نیوزوم خالی + انسولین

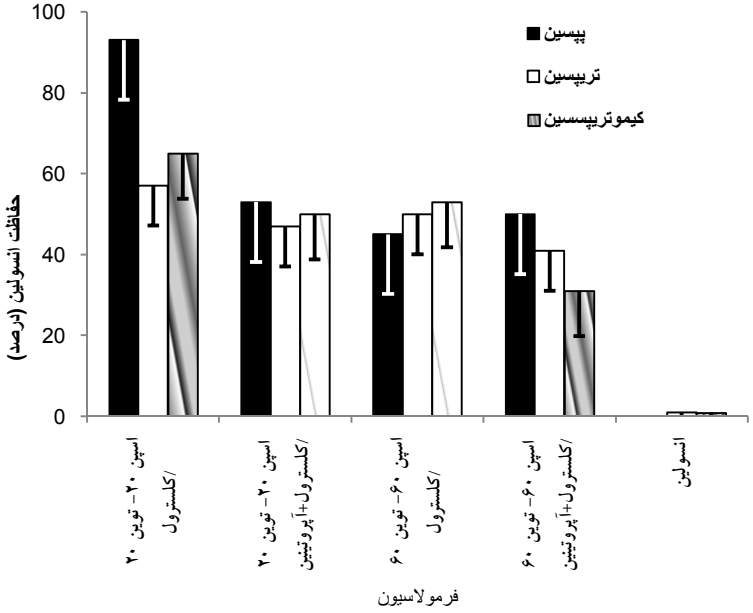


(الف)

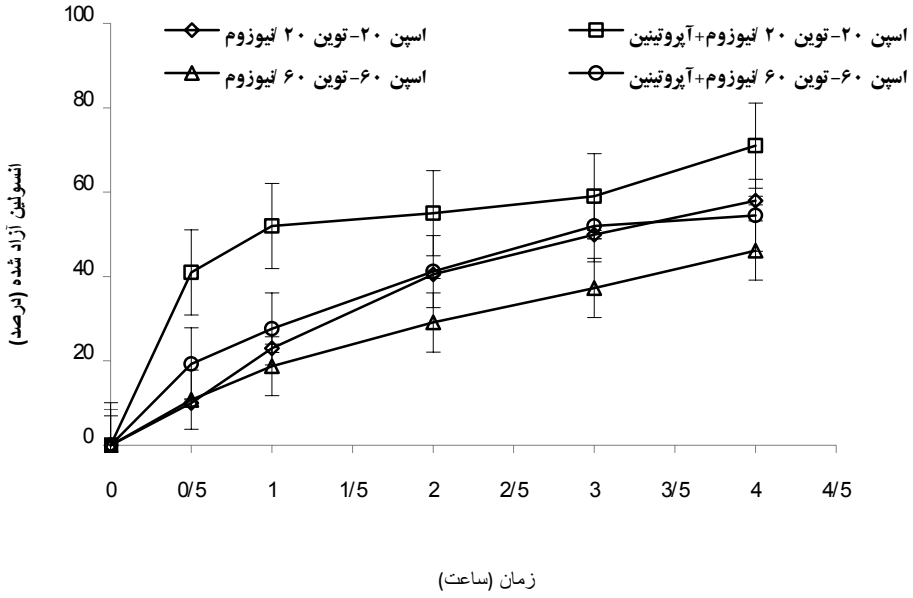


(ب)

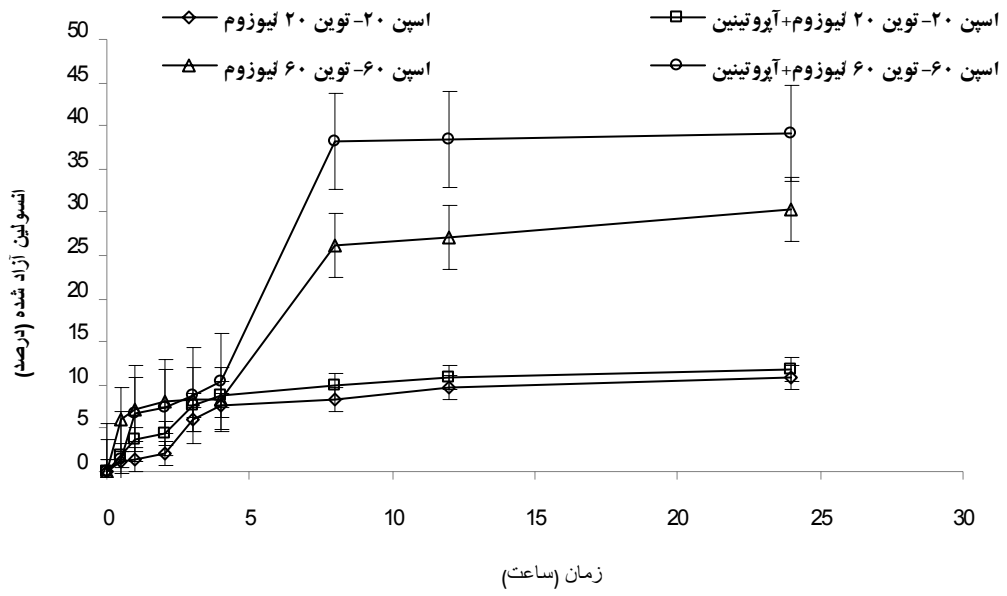
نمودار 1. توزیع اندازه ذره ای نیوزوم های متشکل از نسبت مولی 30/70 سورفکتانت / کلسترول بوسیله روش پراش پرتو لیزر. الف)نیوزومهای اسپان-توین60 ب) نیوزومهای اسپان-توین 20



نمودار 2. درصد حفاظت محلول انسولین و انسولین محبوس در نیوزوم های متشکل از نسبت 30/70 درصد مولی سورفکتانت / کلسترول در حضور آنزیم های پروتئولیتیک شامل پپسین، تریپسین و کیموتریپسین (Mean – SD, n=3).



نمودار3. آزادسازی انسولین در محیط مشابه معدی (SGF) از نیوزوم های 30 درصد مولی کلسترول (Mean±SD, n=3)



نمودار4. آزادسازی انسولین در محیط مشابه روده ای (SIF) از نیوزوم های 30 درصد مولی کلسترول (Mean ± SD, n=3).

4-بحث

استفاده از سورفکتانت های با Hydrophilic-Lipophilic HLB (Balance) متفاوت جهت تهیه نیوزوم ها به طور مکرر مورد بررسی قرار گرفته است (16). Manosroi و همکارانش (2003) محدوده HLB بین 10-3/8 را جهت تهیه نیوزومها مورد استفاده قرار دادند (17). بسیاری از محققین مخلوطی از سورفکتانت ها نظیر توین 85/ Poloxamer F108 (18) و توین-اسپان60 (19) را مورد استفاده قرار داده اند؛ در این حالت HLB مخلوط سورفکتانت، میانگین دو یا چند سورفکتانت می باشد (20). در تحقیق حاضر نیز مخلوطی از سورفکتانت ها که از نظر طول زنجیره هیدروکربنی با یکدیگر برابر بوده و به ترتیب شامل اسپان20/توین 20 (طول زنجیره 12 کربنی،C_{12})، اسپان40/توین 40 (طول زنجیره 16 کربنی،C_{16})، اسپان60/توین60 (طول زنجیره 18 کربنی،C_{18})، اسپان80/توین80 (طول زنجیره 18 کربنی،C_{18}) مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس نتایج حاصله همه مخلوط ها به جز نیوزومهای اسپان-توین80 تشکیل نیوزوم دادند. HLB و طول زنجیره سورفکتانت های مورد استفاده در جدول 1 ارایه شده است.

افزایش طول زنجیره هیدروکربنی با افزایش درجه حرارت انتقالی (temperature phase transition) سورفکتانت همراه می باشد به نحوی که اسپان 60 با طول زنجیره 18 کربنه بالاترین دمای انتقال فاز را در بر می گیرد. این مسئله می تواند به کسب حالت ژلی دو لایه های لیپیدی حاصله منتهی گردد که در این صورت احتباس داروهای محلول در آب نظیر انسولین را افزایش خواهد داد (6).

در تحقیق حاضر نیز نیوزومهای اسپان-توین60 بیشترین درصد احتباس انسولین را نشان دادند (جدول 2). پس از نیوزومهای اسپان-توین60(C_{18}) نیوزومهای اسپان-توین40 (C_{16}) و در نهایت نیوزومهای اسپان-توین 20 (C_{12}) به ترتیب با کاهش درصد محبوس سازی انسولین روبرو گردیدند(جدول 2). این نتیجه گیری با نتایج Mokhtar و همکارانش که محبوس سازی flurbiprofen در نیوزومهای حاوی استرهای سوربیتان کاملاً منطبق می باشد (21). پیش از این Hao (2002) و همکارانش در مورد محبوس سازی کلشی سین در نیوزومهای مختلف گزارش مشابهی ارایه داده اند؛ این گروه از محققین، افزایش طول زنجیره هیدروکربنی و متعاقب آن افزایش درجه حرارت انتقال فازی سورفکتانت را علت افزایش درصد محبوس سازی دارو عنوان نمودند (22). حضور آپروتینین در مورد سورفکتانت های جامد (اسپان40 و 60) با کاهش بدون تفاوت از نظر آماری محبوس سازی انسولین همراه بود (جدول 2، $P<0/05$).

درمورد سورفکتانت مایع اسپان 20 وضعیت معکوس یعنی افزایش قابل توجه محبوس سازی دارو متعاقب حضور آپروتینین مشاهده شد(جدول2) که تفاوت ماهیت دو لایه های لیپیدی سورفکتانت های مورد بررسی می تواند مبین وجود این اختلاف رفتار باشد. به دلیل جدا شدن کریستال های کلسترول با افزایش مقدار این ماده از 30 به 50 درصد مولی، درصد محبوس سازی انسولین تنها در فرمولاسیون های اسپان-توین40 و 60 حاوی 50 درصد مولی کلسترول و بدون حضور آپروتینین بررسی شد. در هر دو مورد فوق الذکر کاهش محبوس سازی انسولین مشاهده شد (جدول 2، $P<0/05$). افزایش مقدار کلسترول اثری مشابه در محبوس سازی flurbiprofen در نیوزومهای متشکل از اسپان-توین40 و 60 داشته است (21). گزارش Mohammed و همکارانش (2004) مبنی بر کاهش محبوس سازی ایبوپروفن در لیپوزوم ها و با حضور غلظت های بالای کلسترول نیز مؤید مشاهدات مذکور می باشد (23). کلسترول با تثبیت دو لایه های لیپیدی در غلظت های کم منجر به کاهش نشت پذیری دو لایه های لیپیدی و احیاناً افزایش احتباس داروهای مختلف می گردد ولی با افزایش غلظت کلسترول فضای حضور داروهای کم محلول نظیر ایبوپروفن و flurbiprofen و داروهای دوگانه دوست نظیر انسولین کاهش می یابد (21). محبوس سازی انسولین در نیوزومهای اسپان-کلسترول با کاهش و یا عدم تغییر محبوس سازی انسولین به دنبال افزایش کلسترول از 30 به 50 درصد مولی روبرو بوده است (6).

در مطالعه حاضر توزیع Log-نرمال نیوزومهای تهیه شده در همه فرمولاسیون ها مشاهد گردید (نمودار1). با افزایش طول زنجیره هیدروکربنی سورفکتانت های مورد استفاده از C_{12} (اسپان-توین20) به C_{18} (اسپان-توین 60) قطر میانگین حجمی نیوزومها در حضور 30 درصد مولی کلسترول کاهش نشان داد (جدول 2، $P<0/05$). در مقایسه HLB میانگین سورفکتانت های مورد استفاده مشخص می شود که این کاهش قطر نیوزومی با کاهش HLB همراه بوده است؛ Ruckmani و همکاران (2000) و همچنین Yoshioka و همکاران (1994) نتایج مشابهی را در مورد نیوزومهای متشکل از استرهای سوربیتان گزارش نموده اند (24،25). به دلیل ثابت بودن سر قطبی استرهای سوربیتان، افزایش بنابراین با عنایت به اینکه در درجه حرارت بررسی آزادسازی و یا تأثیرگذاری آنزیم های پروتئولیتیک (37°C) نحوه شکل گیری مولکول های سورفکتانت و کلسترول به نحوی است که اجازه خروج انسولین را فراهم می سازد، درصد محافظت کمتر انسولین دور از انتظار نخواهد بود. طول زنجیره هیدروکربنی به کاهش آبدوستی سورفکتانت و در نتیجه کاهش تمایل بر هم کنش سورفکتانت و بافر پیرامون آن منتهی می گردد که این مسئله با کوچک شدن نیوزومها و شکل گیری سریعتر آن ها همراه می باشد. از سوی دیگر افزایش درصد کلسترول که با افزایش تعداد دو لایه های لیپیدی همراه می باشد (7،8) در همه فرمولاسیون های تهیه شده به افزایش قطر حجمی نیوزومها منجر گردید (جدول 2، $P<0/05$). درمورد نیوزومهای اسپان-توین20 و اسپان-توین 60 در حضور 50 درصد مولی کلسترول نتایج مشابه کاهش اندازه نیوزومها ملاحظه گردید ولی کوچک بودن قابل توجه نیوزومهای اسپان-توین 40 در مقایسه با اسپان-توین 60 در این مورد احتمالاً به رفتار متفاوت استرهای سوربیتان در حضور مشتقات پلی اتیلنه آن ها مرتبط می باشد. حضور آپروتینین در اغلب فرمولاسیون ها تغییر معنی داری را در اندازه نیوزومها ایجاد نکرد (جدول 2، $P<0/05$). در تحقیق حاضر دو نوع فرمولاسیون اسپان-توین 20 و اسپان-توین 60 جهت بررسی آزادسازی و درصد محافظت در برابر آنزیم های پروتئولیتیک انتخاب شدند تا تأثیر تفاوت درجه حرارت انتقال فازی، طول زنجیره هیدروکربنی و HLB سورفکتانت ها مورد بررسی قرار گیرد. دراین مطالعه با عنایت به اینکه فرمولاسیون های نیوزومی جهت تجویز خوراکی طراحی شده بودند، درصد محافظت انسولین محبوس شده در برابر اثر آنزیم های پروتئولیتیک مورد بررسی قرار گرفت. با وجود پیش بینی های به عمل آمده نیوزومهای اسپان-توین 20 که دارای دو لایه لیپیدی با حالت فیزیکی مایع می باشند، بیشترین درصد محافظت داروی محبوس را به نمایش گذاردند به نحوی که بیش از 90 درصد پروتئین احتباس یافته در مقابل پپسین محافظت گردید. در سایر موارد (تریپسین و کیموتریپسین) نیز درصد محافظت انسولین بیشتر از فرمولاسیون های اسپان-توین 60 بود (نمودار2، $P<0/05$). حضور توین 60 در فرمولاسیون های نیوزومی مورد بررسی احتمالاً بر توانایی نگهداری انسولین در نیوزومها تأثیر معکوس گذاشته، به نحوی که در بررسی آزادسازی دارو نیز بیشترین آزادسازی دارو در SIF مربوط به فرمولاسیون های حاوی اسپان-توین 60 می باشد. (نمودار4).

در مقابل در درجه حرارت محبوس سازی انسولین (55°C) تحت تأثیر درجه حرارات بالا مولکول های اسپان-توین 60 دارای حالت مایع هستند سیالیت بیشتری پیدا کرده، ورود انسولین به درون نیوزوم امکان پذیر می شود و با سرد شدن تدریجی تبدیل به حالت ژلی در درجه حرارت اتاق

(25°C)، امکان خروج انسولین را کمتر می کند و این مسئله به بالا بودن درصد محبوس سازی دارو منجر می شود (16). بنابراین رفتار متفاوت نیوزومهای اسپان-توین 60 در محبوس سازی، محافظت و آزادسازی انسولین را می توان به تأثیر درجه حرارت مورد استفاده مرتبط دانست. آپروتینین آنزیم جدا شده از ریه گوساله می باشد که آنزیم های کلاس سرین پروتئازی را مهار می نماید. آپروتینین به عنوان یک مهارکننده پروتئازی در فرمولاسیون های خوراکی (11) و انسولین استنشاقی (12) انسولین منجر به افزایش اثر بخشی انسولین شد، اما در مطالعه حاضر در حضور آپروتینین درصد محافظت انسولین در اغلب فرمولاسیون ها بدون تفاوت معنی دار آماری کاهش یافت (نمودار 2) و این کاهش درصد محافظت انسولین در شرایط برون تنی را می توان به رقابت و بار مخالف دو ترکیب پروتئینی مورد استفاده یعنی انسولین و آپروتینین در جای گیری درون نیوزوم مرتبط دانست (26). اینکه در فرمولاسیون های مورد برسی اثر مهاری این ترکیب کمتر از حد انتظار بوده است، به طور احتمالی به عدم تأمین غلظت کافی آن جهت جهت مهار آنزیم متعاقب محبوس سازی در نیوزومها مرتبط می باشد. به هر حال در تمام فرمولاسیون های مورد بررسی احتباس انسولین منجر به حفاظت پروتئین در مقایسه با انسولین آزاد شده است (نمودارهای 2 و 3 و 4، $P<0/05$) و این یافته ها با گزارش های قبلی حفاظت انسولین نیوزومی (6،7) کاملاً منطبق می باشد

.

5- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده و خصوصیتهای منحصر به فرد نیوزومها می توان آنها را به عنوان اشکال دارویی خوراکی برای رساندن عوامل دارویی و انواع پرتیین ها از جمله انسولین بکار گرفت.

.

6- سپاسگزاری

با سپاس از درگاه ایزد منّان در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که بودجه این طرح پژوهشی (طرح شماره 86/105) را تأمین کردند تقدیر و تشکر به عمل می آید

References:

1. Moeller E.H., Jorgensen L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals, Drug Discovery Today Technologies, 2008, 5: e89-e94.
2. Khafagy E., Morishita M., Isowa K., Imai J., Takayama K. Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin, Journal of Controlled Release, 2009, 133: 103–108
3. Singh R., Singh S., Lillard J.W. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97: 2497–2523
4. Rao S.V., Agarwal P., Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs II. In vitro transport study, International Journal of Pharmaceutics, 2008, 362: 10-15
5. Rao S.V., Agarwal P., Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs I. Formulation development, International Journal of Pharmaceutics, 2008, 362: 2–9
6. Varshosaz J., Pardakhty A., Hajhashemi V.I., Najafabadi A.R. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery, Drug Delivery, 2003¸ 10(4): 251-62
7. Pardakhty A., Varshosaz J., et al. In vitro study of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin, International Journal of Pharmaceutics ,2007, 328: 130–141.
8. Pardakhty A., Varshosaz J., Hajhashemi V., and Rouhlamini A. Formulation of Insulin Containing Niosomes and the Effect of Their Oral Administration on Blood Glucose in Streptozotocin-induced Diabetic rats. Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2005; 12(2): 119-129
9. Iwanaga K., Ono S., Narioka K., Kakemi M., Morimoto K., Yamashita S., et al. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, 88(2): 248-252.

10. Gabizon A., Goren D., Cohen R., Barenholz Y. Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical Applications, Journal of Controlled Release, 1998, 53: 275–279

11. Gabizon A. Stealth Liposomes and Tumor Targeting: One Step Further in the Quest for the Magic Bullet, Clinical Cancer Research, 2001, 7: 223–225.

12. Ilek A.C., Elebi N.C, Tırnaksız F., Tay A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats, Internationa Journal of Pharmaceutics, 2005, 298: 176–185

13. Park S.H., Jai-Hyun Kwon, Se-Hwan Lim, Hye Won Park, Chan-Wha Kim. Characterization of human insulin microcrystals and their absorption enhancement by protease inhibitors in rat lungs, International Journal of Pharmaceutics, 2007, 339: 205–212

14. Chalasani K.B., Russell-Jones G.J., Yandrapu S.K., Diwan P.V., Jain S.K. A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin, J Control Release, 2007, 117(3): 421-9.

15. Naha P.C., Kanchan V., Manna P.K., Panda A.K. Improved bioavailability of orally delivered insulin using Eudragit-L30D coated PLGA microparticles, Journal of Microencapsulation, 2008, 25(4): 248-256

16. Uchegbu I.F., Vyas S.P. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, International Journal of Pharmaceutics, 1998, 172: 33-70.

17. Manosroi A., Wongtrakul P., Manosroi J., Sakai H., Sugawara F., Yuasa M., Abe M. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 30: 129-138.

18. Naresh R.A.R., Pillai G.K., Udupa N. Chandrashekar G. Anti-inflammatory activity of niosome encapsulated diclofenac sodium in arthritic rats. Indian Journal of Pharmacology, 1994, 26: 46 – 48.

19. Manosroi A., Jantrawut P., Manosroi J. Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium, International Journal of Pharmaceutics, 2008, 360: 156–163.

20. Sinko P.J. Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5the Ed., Lea & Febiger, USA , 2006.

21. Mokhtara M., Sammour O.A., Hammada M.A., Megraba N.A. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes, International Journal of Pharmaceutics, 2008, 361: 104–111.

22. Hao Y., Zhao F., Li N., Yang Y., Li K. Studies on a high encapsulation of colchicine by niosome system, International Journal of Pharmaceutics, 2002,244: 73–80.

23. Mohammed A.R., Weston N., Coombes A.G.A., Fitzgerald M., Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimization of drug loading and ESEM analysis of stability, International Journal of Pharmaceutics, 2004, 285: 23–34.

24. Ruckmani K., Jayakar B., Ghosal S.K. Non-ionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabin hydrochloride for effective treatment of Leukemias: ecapsulation, storage, and in vitro release, Drug Development and Industerial Pharmacy, 2000, 26: 217–222.

25. 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.

26. Bernkop-Schn¨urch A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins, Journal of Cntrolled Release, 1998, 52: 1-1.