مقاله پژوهشی

مجله دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، جلد سوّم، شماره (۱) بهار، تابستان ۱۳۷۲

بررسی تأثیر انسولین خوراکی بر قند خون

دکتر جواد فرید* - محمد رضا هاشمی - دکتر شریفه پاکی‌زاده تبریزی** دکتر مسعود آدرنگی و دکتر نبی‌نامور***

دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز

خلاصه

وجود پیوندهای پلی‌پپتیدی و اتصالات دی سولفیدی در ملولکولهای پروتئین از جمله انسولین مانع مهم در تجویز این قبیل ترکیبات از راه خوراکی می‌باشد زیرا شرایط مختلف از نظر pH محیط و وجود آنزیمهای پروتئولیتیک، سبب تجزیه و تخریب این قبیل ماکرومولکولها در دستگاه گوارش می‌گردند.

بمنظور محافظت انسولین از اثرات آنزیمهای گوارشی و تخریب مولکولهای آن، در این بررسی با استفاده از زرده تخم‌مرغ میکروامولسیونهای محتوی انسولین تهیه گردیده و در شرایط in vivo تأثیر این فرآورده‌ها روی میزان قندخون مورد ارزیابی قرار گرفته است.

فاز مائی میکروامولسیونها یعنی انسولین رگولار با استفاده از چربیهای موجود در زرده تخم‌مرغ یعنی کلسترول و فسفولیپیدها پوشانیده شده و محصولات تهیه شده به خرگوشهای نر با وزن ۱/۵ Kg - ۱ از راه خوراکی تجویز گردید. عمل خونگیری مستقیماً از قلب حیوان، ابتدا قبل از تجویز دارو و سپس بفواصل ۱۵ دقیقه بعمل آمده و نتایج حاکی از کاهش قندخون می‌باشد که دال بر محافظت انسولین از تأثیر آنزیمها و جذب آن از اپیتلیوم روده است. بدین ترتیب می‌توان امیدوار بود که از این فرم داروئی به‌عنوان جانشینی برای تزریقهای مکرر انسولین استفاده نمود.

مقدمه

دیابت یکی از بیماریهای شایع در جوامع بشری می‌باشد که قریب ۵۰۰۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان به آن مبتلا می‌باشند. (۱)

دیابت به دوگونه کلی وابسته به انسولین و غیر وابسته به آن تقسیم می‌گردد. در مورد نوع دوم فرد یا اصلاً به انسولین خارجی نیازی ندارد و یا میزان این نیازمندی کم می‌باشد. این نوع دیابت بیشتر در بزرگسالان شایع است و اکثراً توسط رژیمهای غذائی مناسب به همراه کاهش وزن و استفاده از داروهای خوراکی ضد دیابت درمان می‌گردد.

در دیابت نوع اول احتیاج به تجویز انسولین خارجی مشهود بوده و جلوگیری از ایجاد هیپرگلیسمی با وارد سازی انسولین به محیط داخلی بدن امکان‌پذیر است.

از جمله دلایل ایجاد این بیماری عوامل ایمیونولوژیک، چاقی ، عفونت، انتقال بیماری از طریق زنتیک و غیره می‌باشد. عامل محیطی بروز دیابت در اکثر موارد ویروسی بوده که سبب

* دانشکدهٔ پزشکی - دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز

** بخش حیوانات آزمایشگاهی - انستیتو پاستور ایران

آلودگی سلولهای بتا میگردد. (۲)

برای تشخیص دیابت معمولاً علائم تشنگی، ادرار زیاد، افزایش اشتها، کاهش وزن در عرض چند روز را ذکر کرده‌اند که‌این علائم با اندازه‌گیری میزان قند خون و وجود هیپرگلیسمی تائید می‌گردد.

راه پیشگیری از بروز کمای دیابتیک و مشکلات متابولیکی در بیماران دیابتیک بخوص نوع اول، ورود انسولین به بدن می‌باشد که متداول‌ترین روش برای نیل به این هدف تزریق مکرر انسولین است. نظر به اینکه بیماران مبتلا جهت معالجه مجبور به انجام تزریقات مکرر در طول عمر خود می‌باشند لزوم فعالیت بسیار وسیع در جهت یافتن راههای مناسبتر برای داروسانی انسولین جایز و ضروری می‌نماید.

از جمله کوششهای انجام شده در این زمینه، سیستمهای انفوزیونی با مدار باز و بسته، انسولین است.

در سیستم دارو رسانی مدار بسته انسولین از آنالیزور گلوکز برای سنجش میزان قند در هر لحظه استفاده می‌گردد و غلظت گلوکز خون در هر دقیقه به توسط کامپیوتر محاسبه گشته، میزان انفوزیون انسولین یا دکستروز بوسیله این کامپیوتر تعیین می‌گردد . (۳)

در سیستمهای مدار باز، انفوزیون پیوسته، داخل وریدی، بدون وجود کنترول فیزیکی انجام می‌پذیرد. در این روش از یک پمپ انفوزیونی با یک باطری کوچک استفاده می‌گردد. با وجود پیشرفتهای فراوان، مشکلات متعددی از جمله مشکلات در حمل وسائل و گران بودن تجهیزات در سر راه استفاده از این تکنیکها است. پمپهای کاشتنی انسولین، راههای مصرف رکتالی با افزودن اجوانهائی نظیر پلی‌اکسی اتیلن ۹ - لوریل اتر (۴)، ستوماکروگول (۵) و انواع دیگر سورفسکتانتهای غیر یونی، آنتونی و کاتیونی همچنین فرمهای داخل بینی با استفاده از قطره یا آئرسل (۶ و ۷) از سایر کوششهای انجام یافته است. حساسیت مخاط نسبت به سورفکتانت‌ها و آسیب‌پذیری آنها از جمله موانع در استفاده از اینگونه اشکال داروئی انسولین می‌باشد. راه خوراکی مصرف دارو شاید یکی از بهترین راههای دارو رسانی به شمار می‌رود که در مورد مولکول انسولین بواسطه ساختمان پلی‌پپتیدی آن وجود اتصالات دی سولفیدی و عدم مقاومت این پیوندها در برابر آنزیمهای پروتئولتیک دستگاه گوارش با مشکلات اساسی و فراوان روبرو می‌باشد.

این واقعیت وجود دارد که اگر روزی بشر بتواند درمان با انسولین را از راه خوراکی به انجام رساند تحول شگرفی در درمان بیماران دیابتی بوجود خواهد آمد. فعالیتهای گوناگونی برای دارو رسانی به فرم خوراکی انسولین صورت گرفته است. NISHIHOTA و همکارانش بیان داشتند که با استفاده از مهار کنندهٔ ترپسین و از طریق قوس رودهٔ جدا شده از موشهای صحرائی مقادیری از جذب را بواسطهٔ تجویز IU ۳۵ ملاحظه کردند. (۸).

لیپوزومها از دیگر روشهای دارو رسانی انسولین بصورت خوراکی هستند و در مطالعات گوناگون موثر بودن آنها در جهت محافظت انسولین در مقابل آنزیمهای مسئول تجزیه انسولین مورد بررسی قرار گرفته است. (۹)

استفاده از اجوان یا مهارکنندهٔ آنزیمی نظیر ۵ - متوکسی سالیسیلات و دترجانهای استروئیدی در فرمولاسیون انسولین دهانی (۱۰) همچنین استفاده از پلیمرهائی سیانداکریلات (۱۱) از سایر قدمهای برداشته شده در خوراکی نمودن انسولین می‌باشند.

از چندی قبل تحقیق برای دست‌یابی به فرمولاسیون مناسبی برای دارو رسانی انسولین از طریق خوراکی در آزمایشگاه داروسازی صنعتی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز با همکاری آزمایشگاه هماتولوژی دانشکده‌پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز وانستیتو پاستور ایران بانجام رسید. نتایج بدست آمده قدرت کاهش دهندگی انسولین با استفاده از فرمولاسیون مذکور را به اثبات رسانیده است.

بخش تجربی :

در میکرواسولسیونهای تهیه شده، از فسفولیپیدها، کلسترول و لستین موجود در زرده تخم‌مرغ به عنوان فازروغنی و سورفکتانت واز انسولین رکولار به عنوان فارمائی استفاده گردید. میکروامولسیونهای تهیه شده از لحاظ ترمودینامیکی بسیار پایدار بوده و کارآئی این قبیل سیستمها در صنایع داروئی، غذائی و فرآورده‌های آرایشی بهداشتی قابل ملاحظه می‌باشد.

علاوه براین توانائی لسیتین در تشکیل میکروامولسیونهای پایدار به اثبات رسیده است. (۱۲) با توجه به تخریب مولکولهای انسولین در محیط معدی، میکروامولسیونهای تهیه شده از نوع w/o می‌باشد.

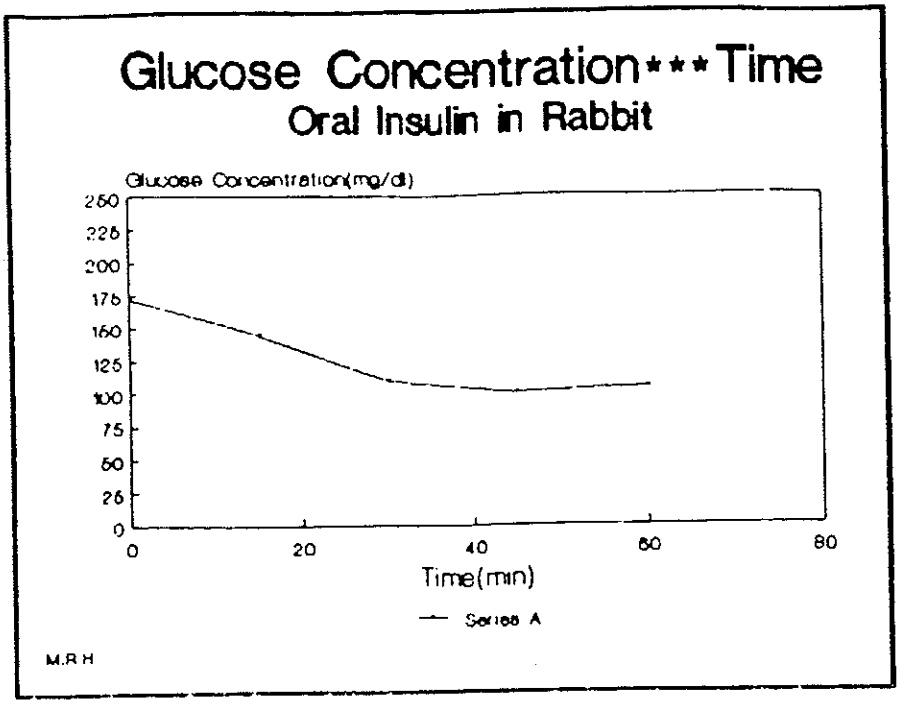
به‌منظور مهار پپسین معده و کموترپسین پانکراس از یک مهار کنندهٔ آنزیمی یعنی آپروتینین استفاده شده است. سیستم‌های پراکنده مورد نظر بوسیلهٔ ۷/۵ ، ۶/۵، ۴،۵، ۲،۳، ۰/۸،۱ ، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌لیتر از انسولین رگولار (۱۰۰ U/ml) به ازای ۱ گرم از زرده تخم‌مرغ بوده است. مخلوط تهیه شده برای مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm بهم زده شد. نوع میکروامولسیونهای تولیدی از طریق رنگ‌سنجی و هوایت‌سنجی مورد بررسی قرار گرفت. پایداری نمونه‌ها در ۴^{oc}، ۴۰^{oc} و دمای آزمایشگاه مورد مطالعه واقع شد.

در میکروامولسیونهای حاوی ۴^{cc} - ۷/۵ از انسولین رگولار پس از قطع عمل بهم زدن تولید رسوب گردید. میکروامولسیونهای تولید شده با $۰/۲^{cc}$ - ۴ فاز آبکی از نوع o/w بودند در حالیکه نمونه‌های حاوی $۰/۲^{cc}$ و کمتراز انسولین رگولار دارای ماهیت w/o بوده از نظر شرایط ترمودینامیکی بسیار پایدار بودند. از آنجائیکه مجاورت انسولین و آپروتینین در کنار یکدیگر سبب ایجاد رسوب و کدر شدن محلول می‌گردید، میکروامولسیونهای حاوی هر یک بطور جداگانه تهیه شده، در هنگام انجام آزمایش تواما به حیوانات تجویز گردید.

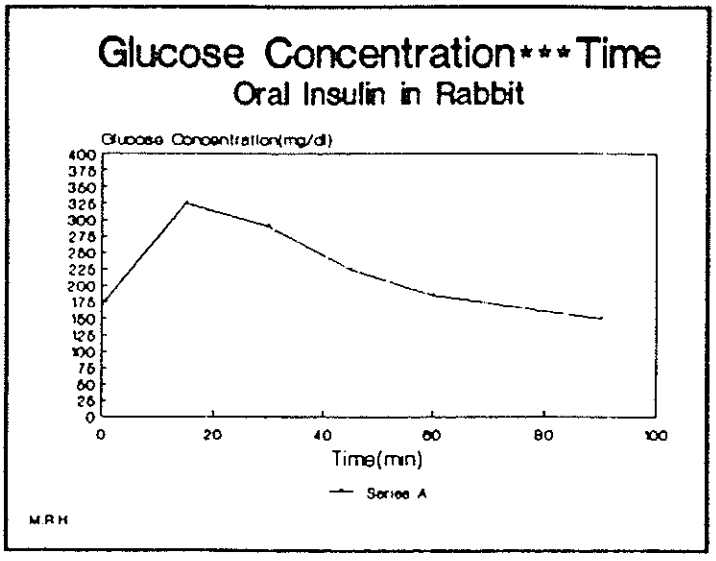
کلیه حیوانات مورد آزمایش از طریق رژیم غذائی طبیعی برای انجام آزمایشات آماده شدند . علت عدم استفاده از گلوکز بصورت مستقیم از طریق خوراکی، امکان تداخل در جذب از طریق رقابت با ماده موثره بوده است (۱۱).

فرمولاسیونهای تهیه شده بوسیله یک سرنگ بدون سوزن در حفرهٔ دهانی خرگوشهائی به وزن ۱/۵ Kg - ۱ قرار داده شد. خونگیری از طریق ورید مارژینال گوش بدلیل نیاز به خونگیری لحظه‌ای و سنجش مقطعی قند خون و همچنین تعداد خونگیریها امکان‌پذیر نبوده و روی این اصل عمل خونگیری مستقیماً از قلب حیوان انجام گرفت. خونگیری اولیه قبل از تجویز میکروامولسیونها صورت گرفته و سپس بفواصل زمانی ۱۵ دقیقه تکرار گردید. بمنظور اندازه‌گیری قندخون، بطور همزمان از روشهای موسوم شیمیائی واسپکتروفوتومتری با نور مرئی، طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده گردیده است.

تصاویر ۱و۲ نوسانات قند خون را پس‌از تجویز خوراکی میکروامولسیونها به‌میزان ۲۰ واحد برهرکیلوگرم وزن حیوان نشان می‌دهد.



تصویر ۱ : نمودار نوسانات قند سرم بعداز خوراندن فرمولاسیون حاوی 20IU/kg انسولین در خرگوش ۱ .



تصویر ۲ : نمودار نوسانات قند سرم بعداز خوراندن فرمولاسیون حاوی IU/Kg ۲۰ انسولین در خرگوش ۲ .

نتایج بدست آمده :

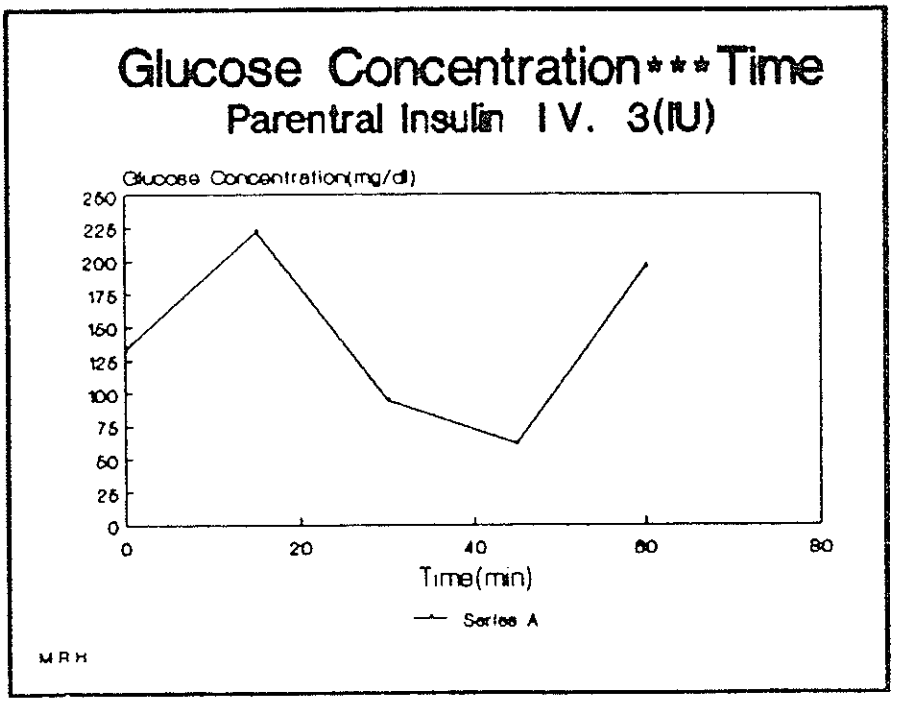
کاهش مشهود قند سرم نمایانگر جذب انسولین از اپیتلیوم روده کوچك و آغاز فعالیت بیولوژیک در محیط داخلی بدن می‌باشد. انسولین رگولار در هنگام تزریق وریدی در مواقع اورژانس بروز کتواسیدوز، و اصولاً محیطهای بیولوژیک مختلف، دارای شروع اثر، دوام و زمان حداکثر پیک متفاوت می‌باشد که ناشی از تفاوتهای بیولوژیک نسبت به واکنش انسولین است (۱۳). از طرف دیگر همانگونه که مشاهده میزان اندازه‌گیری شده قند خون حیوانات در زمان صفر مؤید وجود یک حد طبیعی می‌باشد که نشانگر عدم وجود دیابت در این حیوانات است. ولی ۱۵ دقیه پس از تجویز فرمولاسیون، افزایشی در سطح قندخون مشاهده می‌گردد که بیانگر وجود شرایطی مشابه دیابت مصنوعی است. این افزایش قند را می‌توان به واسطه هم زمانی ۳ فاکتور دانست :

الف - ترشح نوروترانسیمتراپی نفرین از اعصاب سمپاتیک قلب حیوان به جهت خونگیری مستقیم از قلب و تاثیر انسولین تجویزی برروی ترشح این هورمون در بدن حیوان (۱۴).

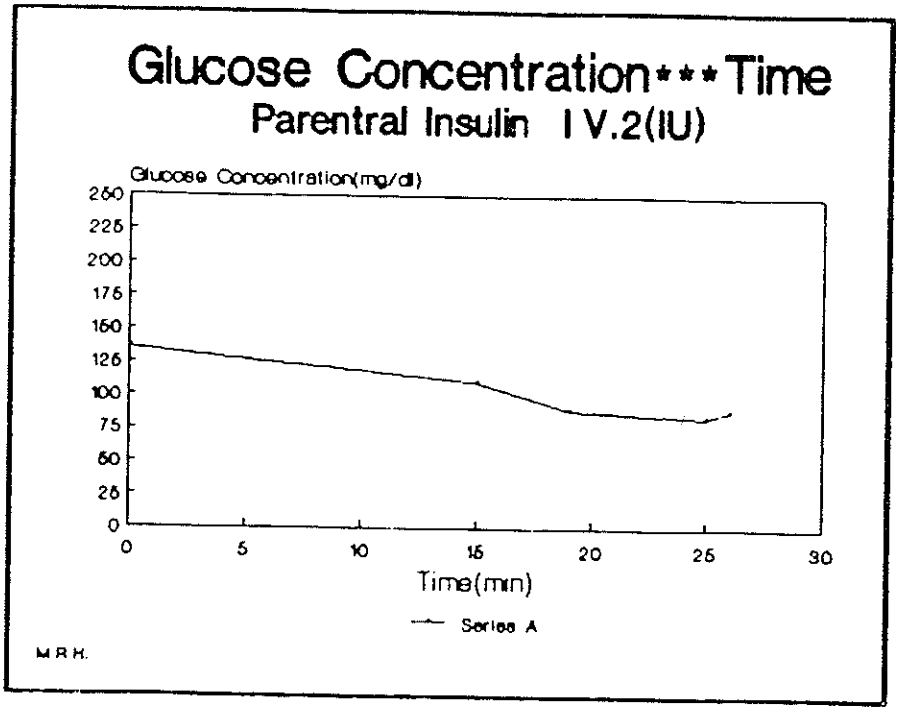
ب - ترشح هورمون کورتیزول از غدد فوق کلیوی بواسطه شیوه تثبیت جانور و نحوهٔ خوراندن فرمولاسیون (force-feeding) و تاثیر مستقیم انسولین تجویزی برروی این هورمون (۱۵).

ج - ایجاد پدیدهٔ (negative feedback) و بروز فرایند مشابه پدیدهٔ (auto - regulation) نحاصل از تاثیر انسولین تجویزی برانسولین درونی حیوان (۱۶).

ایجاد هیپوگلیسمی و شروع اثر عملکرد انسولین در زمانهای مختلف نشان داده شده در تصاویر ۲ و ۳ ناشی از این مسئله بوده است. برای این منظور و به عنوان شاهد تزریقات وریدی از طریق ورید مارژینال انجام گرفت. میزان این تزریقات IU/Kg ۲ و ۳ بوده است. (شکل‌های ۳ و ۴)

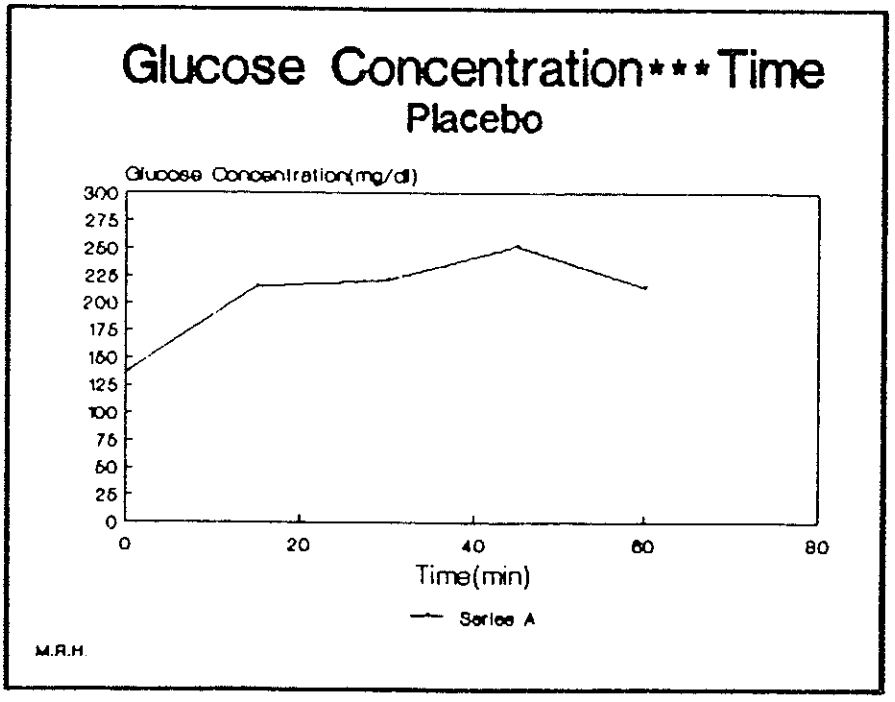


تصویر ۳ - نوسانات گلوکز خون بعداز تزریق ۳ واحد انسولین رکولار بر هر کیلوگرم وزن حیوان از طریق ورید مارژینال

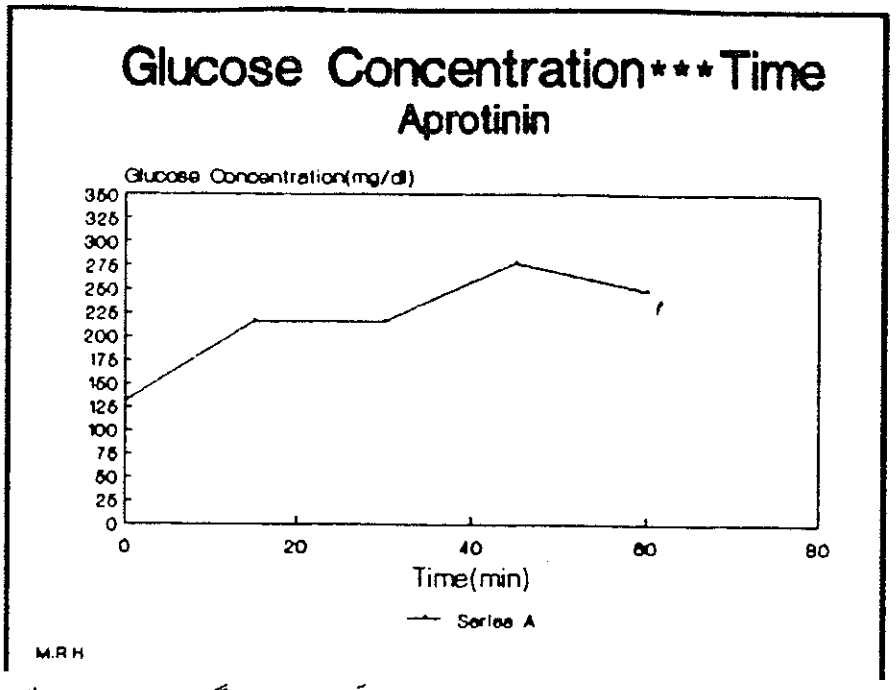


تصویر ۴ - تزریق IU/Kg ۲ به خرگوش از طریق ورید مارژینال

تفاوت در زمان شروع اثر، دوام و زمان بروز پیک در مصرف وریدی انسولین کاملاً مشهود می‌باشد. برای برطرف نمودن وجود و تاثیر انسولین متوشحه از پانکراس، پایه بدون انسولین به‌حیوان تجویز گردید. نتایج حاصل در اشکال ۵ و ۶ نمایش داده شده است. به منظور رعایت و یسکوزیته، فاز مطلوب بوسیلهٔ آب مقطر ایجاد شد. روش خوراندن و نحوه انجام خونگیری و شرایط ایجاد شده در هر ۲ مرحله یکسان انتخاب شده‌اند.

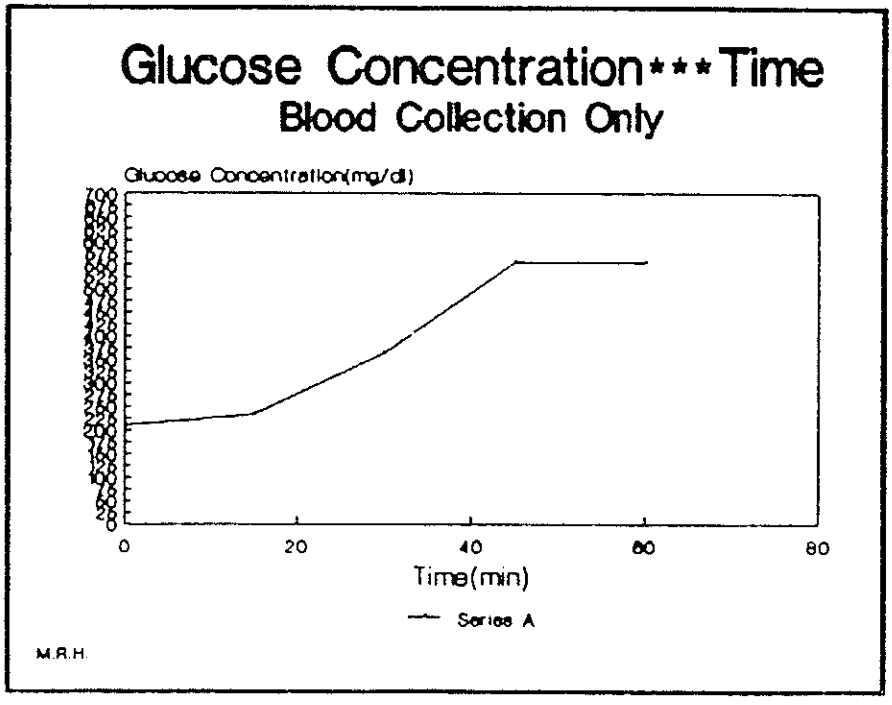


تصویر ۵ - نوسانات قندخون بعداز تجویز خوراکی پلاسبو



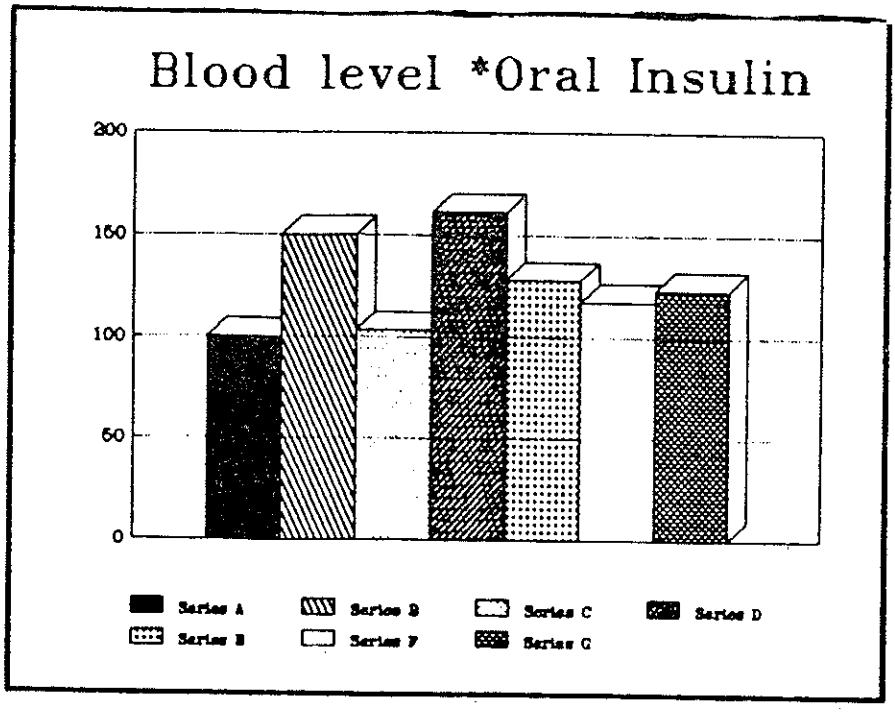
تصویر ۶ - نوسانات قندخون بعداز تجویز خوراکی فرمولاسیون محتوی آپروتینین خونگیری بدون تجویز انسولین نیز انجام گرفت.

تصویر ۷ بالا رفتن قند در حین خونگیری را نشان می‌دهد.

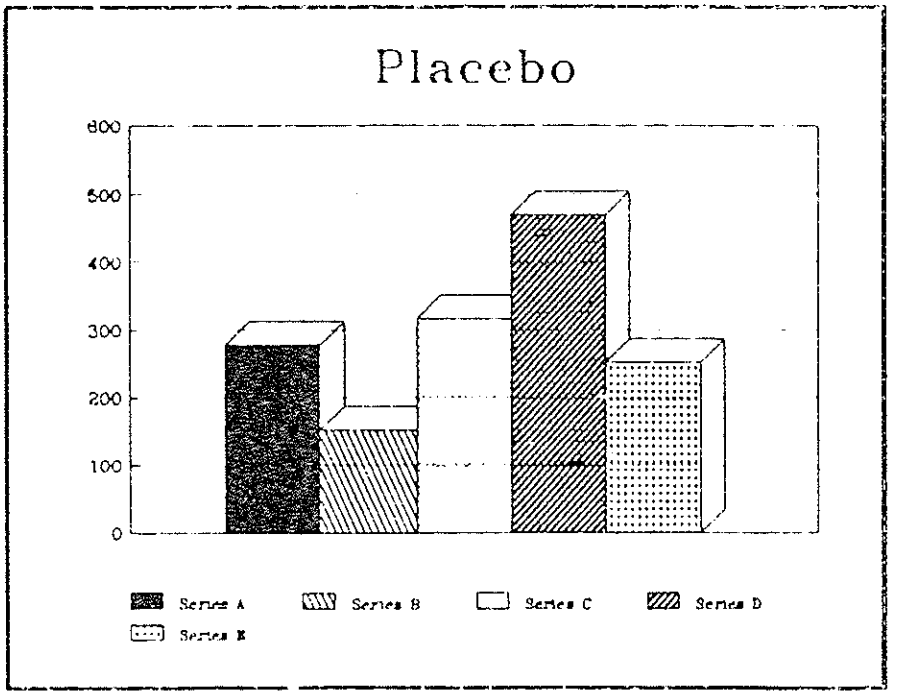


تصویر ۷ - نوسانات قندخون در حین عمل خونگیری

نتایج بدست آمده بعداز تجویز میکروامولسیون‌ها در هفت حیوان در شکل ۸ و بعداز تجویز پلاسیبو در شکل ۹ نشان داده شده‌اند.



تصویر ۸ - هیستوگرام وضعیت قندخون در ۷ نمونه (خوراندن فرمولاسیون)



تصویر ۹ - هیستوگرام وضعیت قندخون در ۵ نمونه (خوراندن پلاسبو) تست آماری بکار رفته، آنالیز و اریانس یک طرفی می‌باشد. (۱۷)

بحث :

تفاوت مشهود در میزان قندخون بدست آمده در حیوانات با مصرف خوراکی انسولین و مصرف پایه بدون انسولین، نشان می‌دهد که میکروامولسیونهای تهیه شده بوسیلهٔ زرده تخم‌مرغ توانائی محافظت و تولید پوشش برروی مولکولهای انسولین را دارا می‌باشند. بالاماندن قندخون در خرگوشها با مصرف پایه بدون انسولین احتمال فعالیت انسولین مترشحه از پانکراس حیوان را مردود می‌سازد زیرا کلیه شرایط اعمال شده در هر دو مورد یکسان بوده و تنها تفاوت در حضور یا عدم وجود انسولین در فرمولاسیون بوده است.

میانگین حاصل از ۵ مورد آزمایش خوراندن پلاسبو و ۷ مورد فرمولاسیون حاوی انسولین رگولار به ترتیب ۴۹+۳۱۱/۴ و ۱۱+ ۱۳۳/۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تعیین گردید.

علت عدم جذب انسولین و عدم بروز کاهش در قند سرم در استفاده از انسولین بدون پوشش از راه خوراکی را نمی‌توان به جهت درشتی مولکول دانست بلکه این عدم جذب تنها بواسطهٔ نرسیدن فرم فعال دارو به محل جذب آن یعنی اپیتلیوم رودهٔ کوچک می‌باشد. انسولین می‌تواند بعداز باز شدن پوشش موجود در اطراف آن به‌صورت داروی آزاد از طریق دستگاه عمومی گردش خون جذب گردد. یکی دیگر از احتمالات برای جذب انسولین جذب بصورت میکروامولسیون می‌باشد. تسهیل در این نوع جذب بواسطهٔ شباهت بسیار فراوان فسفولیپیدهای بکار رفته در زرده با فسفولیپیدهای موجود در غشای سلولی است.

در صورت تصور جذب انسولین همراه با پوشش، می‌توان ورود آن را به لنف و سیستم لنفاوی محتمل دانست مسئله قابل ذکر دیگر در این زمینه، تفاوت در مدت اثر و طولانی شدن زمان اثر انسولین در حالت خوراکی نسبت به روش تزریق وریدی است. آزمایشات انجام شده روی خرگوشهای سالم موید کارائی فرمولاسیون ارائه شده می‌باشد. میکروامولسیونهای تهیه شده توسط زرده می‌توانند به‌عنوان طریقه مناسب و جدید در راه دراورسانی انسولین، هورمونهای پلی‌پپتیدی و سایر داروهای حساس نسبت به آنزیمهای دستگاه گوارش کارائی داشته باشند. با توجه به توانائی بالای تولید میکروامولسیونها بوسیله زردهٔ تخم‌مرغ و با توجه ه ارزش غذائی این ماده، استفاده از این فرمولاسیون در انسان می‌تواند آغاز گرمسیر پرپیچ و خمی باشد که در سرراه تجویز خوراکی انسولین قرار گرفته است.

منابع و ماخذ

1 - Hoet J. J. , WHO, 4 May - June 1991

2 - Foster D. W, in Harrison' s Principles of Intemal Medicine, 12th 1991 12, P.P, 1739 - 1765

3 - Raskin ph. , Open and closed insulin infusion systems, in : Newer Methods of insulin delivery, 1983, Chapter 47, 941-959.

4 - Shichivi M., Y., Kawamori R., Kihuchi M., Hahli N.; J. Pharm. Pharmacol., 1978, 30, 808.

5 - Touitou E., onbrow M., Azaz E.; J.pharm. Pharmacol. 1978, 30, 662-663.

6 - Deruloo M. J., Hermens A. T. T , Romeyn S. G, Verhocf J. C, and Uer Kus W. H. H; Pharm. Res., 1989, 10, 853-856.

7 - Sazman R. and Melby J.C ; New England J. Med., 1985, 25, 1078-1084.

8 - Nishihota T., Rytting J. H., Kamada A. and Higuchi T. ; Diabetes, 1981, 30, 1065 - 1067.

9 - Veingarten C., Moufti A., Delatte J., Puisieux F. and Couvreur P., Int . J. Pharm., 1985, 26, 251-257.

10 - Aungst B.T. and Rojers N.J., Int . J. Pharm, 1989, 53, 227-235.

11 - Damge C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P . and Devissaguet J. P., J. Cont. Rel., 1990, 13, 233-239

12 - Venturella V.S., in : Remingtons' Pharmaceutical Sciences, Pensylvania, 1990, Chapter 23 PP, 380 - 410.

13 - Generic Drugs of IRAN, Daroo Pakhsh, 1990.

14 - Donovan C. M. , Diabetes. 1991, 40, 155 - 58

15 - Landgraf R., Nusser J., Riepl R. L., Fiedler F., I llner W. D., Abendroth D.and land W., Diabetology, 1991, 34. S61-S67.

16 - Hartter E., Sovaboda T., Ludvik B., Schuller U.,lell B., Keunburg E., Brunnbauer M., Woloszuk W. and Prayer R., Diabetologia, 1991, 34. 52-54

17 - Bolton S., Pharmaceutical Statistics, New York, 1984, Volume I; pp 152-161.

Title : EFFECT OF ORAL INSULIN IN BLOOP GIUCOSE CONCENTRATION

Authors : DJ. FARID, [*] , M. R. HASHEMI, SH. P. TABRIZI[**] , M. ADRANGUI[*], N.Namvar.[***]

Address; Tabriz medical Science Suniversity, Industrial phanmacy Laboratory. Hematology Laboratory.[**]
Institut Pasteur - Theran[***]

ABSTRACT

Gastrointestinal tract can not be used as a route for oral administration of polypeptid hormones because of their enzymatic degradation.

Degradation of these macromolecules in acidic and alkaline conditions determines the need for using protective delivery systems.

In this research microemulsions were used for protection of insulin against proteolytic enzymesof gastrointestinal tract. Cholestrol and phospholipids of egg yolk have been used as lipid phase as lipid phase and Lecithin as surfactant.

Insulin Regular was used as aqueous phase, being entrapped with lipidic phase in W/O manner. Male rabbits with body weight of about 1-1.5 KG were accomplished and oral insulin was force fed to them. Blood collection has been carried out from heart every 15 minutes after oral administration.

Reduction in blood glucose level indicates the well being protection of insulin and absorbtion of it through epithelium of small intestine. Increasing of glucose level in placebo demonstrates that endogenous insulin has not been responsible for serum glucose reduction.

This experiment suggests that microemulsions formed with egg Yolk compounds have the ability to be an alternate for parenteral administration of insulin and other chemicals sensitive to enzymatic degradation, in human.