

## تأثیر سونیکاسیون بر ابعاد ترانسفرزوم حاوی هورمون رشد

مریم شمشیری<sup>۱</sup>، مهوش خدابنده<sup>۲\*</sup>، فاطمه اطیابی<sup>۱</sup>، فاطمه رحیمی<sup>۲</sup> و رضا رسول زاده<sup>۱</sup><sup>۱</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات<sup>۲</sup> تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۷

## چکیده

ترانسفرزوم‌ها و وزیکولهای بسیار تغییر شکل‌پذیری هستند که به دلیل خصوصیات الاستومکانیکی فوق‌العاده خود قادرند از منافذی بسیار کوچک‌تر از اندازه خودشان عبور کرده و نقش دارورسانی به پوست را ایفاء نمایند. در این مطالعه ترانسفرزوم‌های حاوی هورمون رشد با استفاده از دو فرمول متشکل از فسفولیپید و سدیم داکسی کولات ( $f_1$ ) و سدیم لوریل سولفات ( $f_2$ ) به عنوان سورفاکتانت ساخته شدند. روشهای مختلفی برای به دست آوردن ترانسفرزوم با اندازه مشخص وجود دارد. یکی از این روشها استفاده از تکنیک سونیکاسیون برای تنظیم ابعاد آنهاست. در این تحقیق ترانسفرزوم‌های حاوی هورمون رشد مورد بررسی قرار گرفته و در راستای تغییر ابعاد، ترانسفرزوم‌ها تحت تأثیر سونیکاسیون به روش حمام و پروب قرار داده شدند. در هر دو حالت در سه دوره زمانی ابعاد ذرات، پراکنندگی ذرات، پتانسیل زتا و فعالیت زیستی هورمون رشد موجود در ترانسفرزوم‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که در کلیه زمانهای مورد بررسی فعالیت هورمون رشد در سونیکاسیون پروب در هر دو ترانسفرزوم نسبت به سونیکاسیون حمام کاهش بیشتری نشان می‌دهد لذا، اندازه وزیکولها و پتانسیل زتا در آزمایش انجام شده توسط سونیکاسیون پروب تعیین شد. میانگین سایز ذرات در وزیکولهای  $f_1$  از ۲۴۲٫۶ تا ۱۹۰٫۶ و در وزیکولهای  $f_2$  از ۱۵۹٫۶ تا ۳۷٫۸۱ است. پتانسیل زتا در ترانسفرزوم  $f_1$  منفی تر از  $f_2$  می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ترانسفرزوم، هورمون رشد، جذب پوستی، دارورسانی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۵۵، پست الکترونیکی: saba@nigeb.ac.ir

## مقدمه

مولکولهای بزرگ مانند پپتیدها و پروتئینها، معمولاً با تزریق وارد بدن می‌شوند. تلاشهای متعدد برای یافتن روشهای جدید جهت تجویز این داروها صورت گرفته است، که شامل فرمولاسیونهای حاوی پلیمرهای خوراکی (۲۸)، لیپوزوم‌ها (۱۱)، سوسپانسیون‌ها، میکروامولسیون‌ها (۹)، نوآوریهای تکنیکی مانند مخازن (۳۳) و پمپهای زیر پوستی (۳۴) و یا روشهای غیر معمول مانند رکتال، چشمی (۳)، داخل بینی (۲۴) و پوستی می‌باشد.

در سال ۱۹۹۲، سوک (cevc) و همکاران وزیکولهای لیپیدی بسیار انعطاف‌پذیر را با نام ترانسفرزوم معرفی کردند.

ترانسفرزوم‌ها وزیکولهای لیپیدی هستند و مانند لیپوزوم‌ها از یک بخش‌هایی که توسط یک یا چند دو لایه لیپیدی احاطه شده و مخلوطی از فسفولیپیدها و نرم‌کننده‌های زیست‌سازگار غشاء یا سورفاکتانت‌ها تشکیل شده‌اند (۲۶).

لیپید به عنوان عامل پایدارکننده و سورفاکتانت به عنوان عامل ناپایدارکننده عمل می‌کند، ترکیب بهینه این دو موجب انعطاف‌پذیری غشای ترانسفرزوم می‌شود (۱۵).

ویژگی مهم این حاملهای دارویی تغییر شکل‌پذیری زیاد آنهاست. آنها می‌توانند به طور موضعی و گذرا تا ۵ برابر،

در جهت حمل هورمون رشد از سیستم پوستی است. با توجه به اینکه در راستای ساخت ترانسفرزوم های حامل دارو(هورمون رشد) روشهای فیزیکی مثل سونیکاسیون جهت ریز شدن ذرات جزء مراحل اصلی کار می باشد. در این تحقیق تأثیر نوع سونیکاسیون بر ابعاد ترانسفرزوم های حامل هورمون رشد بررسی می گردد.

### مواد و روشها

هورمون رشد انسانی از (Novo) ، لسیتین سویا از Avanti polar lipids (Birmingham, AI, USA)، سدیم لوریل سولفات و سدیم داکسی کولات از (Darmstad, Germany) Merck خریداری گردید.

دو فرمول ترانسفرزوم  $f_1$  و  $f_2$  به ترتیب با استفاده از لسیتین سویا و سورفاکتانت های سدیم داکسی کولات ( $f_1$ ) و سدیم لوریل سولفات ( $f_2$ ) با نسبت لیپید به سورفاکتانت ۸۶ به ۱۴ تهیه شدند. ابتدا ۸۶ میلی گرم لسیتین سویا به طور دقیق وزن شد و در ۲۰ میلی لیتر کلروفرم حل گردید. ۱۴ میلی گرم از سورفاکتانت نیز به طور دقیق وزن شد و در ۴۰ میلی لیتر اتانل ۹۶ درجه حل شد. سپس دو محلول با یکدیگر مخلوط شده و محلول همگنی به دست آمد. این محلول در دستگاه تبخیر در خلأ چرخان قرار گرفت (۳۷ درجه سانتی گراد) و در نهایت پس از تبخیر حلال یک لایه نازک از مخلوط لیپید و سورفاکتانت باقی ماند. هورمون رشد با غلظت ۱۰۰۰ ng/ml به آن اضافه شد (حلال بافر فسفات ۵۰ mM، PH ۷/۴) پس از مخلوط شدن کامل، سوسپانسیون شیری به دست آمد و به مدت ۶۰ دقیقه با ورتکس هموژنیزه شد (۳۵). جهت بررسی اثر سونیکاسیون بر روی کارایی و ابعاد ترانسفرزوم ها، نمونه ها در زمانهای ۵' و ۱۵' و ۳۰' تحت تأثیر دو نوع سونیکاسیون حمام (bath) و پروب (Branson Ultra Sonic (prob) Co., USA) قرار داده شدند.

ترانسفرزوم ها برای هم اندازه شدن و تبدیل به اندازه در

انعطاف پذیرتر از سایر اجسام هم اندازه شان باشند. این امر باعث می شود که این وزیکولها از منافذی بسیار باریک تر از قطر متوسط وزیکول رد شوند (۴، ۱۶ و ۳۰). در این تحقیق، وزیکولهای بسیار انعطاف پذیر (ترانسفرزوم) حاوی هورمون رشد ساخته شده و جهت انتقال هورمون رشد از سیستم مدل پوستی به کار رفته است.

پوست بزرگترین ارگان بدن و سد بیولوژیک و آناتومیک مهمی در برابر عبور مواد می باشد (۵ و ۷). در سیستمهای جدید دارورسانی پوست صرفاً به عنوان یک سد فیزیکی غیر فعال در نظر گرفته نشده و عملکرد آن به عنوان یک غشای نیمه تراوا نیز مورد توجه قرار می گیرد (۲ و ۱۸). پوست طبیعی نسبت به بیشتر مواد نفوذ ناپذیر است (۱۵ و ۲۷) به همین دلیل انتقال غیر تهاجمی دارو از طریق پوست فقط برای مولکولهای نسبتاً کوچک امکان پذیر است (۵). عملاً مولکولهای دارویی بزرگتر از ۷۵۰ دالتون نمی توانند از این سد عبور کنند (۱۵ و ۳۲) و این امر دارورسانی پوستی را برای مولکول دارویی بزرگ مانند پروتئینها، غیر ممکن می سازد. هورمون رشد انسانی پلی پپتیدی متشکل از یک زنجیره منفرد با ۱۹۱ اسید آمینه و وزنی معادل ۲۲ کیلو دالتون است. واجد دو پیوند دی سولفیدی بوده و پروتئین سازی را تحریک می کند (۱۹). در افرادی که توانایی ترشح هورمون رشد را از دست می دهند روند پیرشدن تسریع می گردد (۱۷). پیری به طور عمده از کاهش رسوب پروتئین در بیشتر بافتهای بدن و افزایش رسوب چربی به جای آن ناشی می شود. اثرات فیزیکی و فیزیولوژی پیری افزایش چین و چروک پوست، کاهش سرعت عمل برخی از اندامها و کاهش توده و قدرت عضلانی بوده (۱۳) بعلاوه هورمون رشد، لیپولیز را افزایش و پروتئولیز را کاهش داده و به عنوان داروی ضد چاقی به کار می رود.

این هورمون به دلیل وزن مولکولی بالا برای عبور از پوست احتیاج به سیستم حامل دارد. فرضیه اصلی این تحقیق، استفاده از ترانسفرزوم ها به عنوان وزیکولهای انعطاف پذیر

ها ساخته شدند. در مراحل ساخت ترانسفرزوم، تأثیر سه زمان ۵' و ۱۵' و ۳۰' سونیکاسیون بر روی فعالیت هورمون رشد اندازه‌گیری شد. فعالیت هورمون رشد، با استفاده از کیت اندازه‌گیری شد.

با توجه به شکل ۱ و جدول ۱ سونیکاسیون پروب در هر دو ترانسفرزوم  $f_1$  و  $f_2$  نسبت به سونیکاسیون حمام تأثیر بیشتری در کاهش فعالیت هورمون رشد موجود در ترانسفرزوم‌ها نشان می‌دهد. در روش‌های معمول تهیه ترانسفرزوم‌ها یکی از مراحل اجرایی سونیکاسیون است. روش‌های استاندارد سونیکاسیون معمولاً نمی‌تواند باعث شکستن یا تجمع پروتئین‌ها شود. با این وجود چنانچه در مطالعات پروتئینی به هر دلیلی از سونیکاسیون استفاده شده باشد، مطالعه شکستن (degredation) و یا ایجاد قطعات مجتمع (aggregation) در پروتئین ضرورت می‌یابد. برای بررسی این موضوع نمونه‌های هورمون رشد ترانسفرزوم‌های  $f_1$  و  $f_2$  بر روی ژل SDS مطالعه گردید.

نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که در هر دو نوع سونیکاسیون پروب و حمام، پروتئین‌ها شکسته نشده و تشکیل قطعات مجتمع نداده‌اند، لذا کاهش کارایی هورمون به دلایل فوق‌الذکر نبوده و احتمالاً تغییراتی در ساختار آن ایجاد شده که بررسی آن به تکنیک‌های مناسب بررسی ساختار نیاز دارد. مورفولوژی ترانسفرزوم‌های حاصل قبل از عبور دهی از فیلترپلی کرینات توسط میکروسکوپ نوری و پس از عبور دادن از فیلترپلی کرینات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی گردید. که نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. به دلیل کاهش زیاد فعالیت هورمون رشد در ترانسفرزوم‌ها در اثر سونیکاسیون پروب، این نوع سونیکاسیون از آزمایشات حذف و به جهت بررسی اثر سونیکاسیون روی اندازه ذرات از سونیکاسیون حمام در سه زمان ۵' و ۱۵' و ۳۰' استفاده شد (شکل ۳).

نتایج پتانسیل زتا حاکی از آن است که این ذرات دارای بار منفی بوده و پتانسیل زتا در ترانسفرزوم  $f_1$  منفی‌تر از  $f_2$

مقیاس نانو از فیلتر پلی کرینات ۱۰۰ نانومتری و دستگاه اکسترودر (extruder) چندین بار عبور داده شده و آماده مراحل بعدی آزمایش می‌شدند.

اندازه‌گیری هورمون رشد با روش الیزا و توسط کیت اندازه‌گیری هورمون رشد (پادتن علم ایران) انجام شد. کیت الیزای هورمون رشد با حساسیت  $0.1 \text{ ng/ml}$  بر مبنای واکنش ایمنونوزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی‌بادی منوکلونال موشی که شاخص‌های آنتی ژنتیک متمایزی را بر روی مولکول هورمون رشد شناسایی می‌کند، استفاده شده است. برای تعیین غلظت هورمون رشد نمونه‌ها، ابتدا منحنی جذب نور استاندارد بر حسب غلظت‌های معلوم هورمون رشد رسم شد و سپس میزان غلظت هورمون نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین گردید (۲۲).

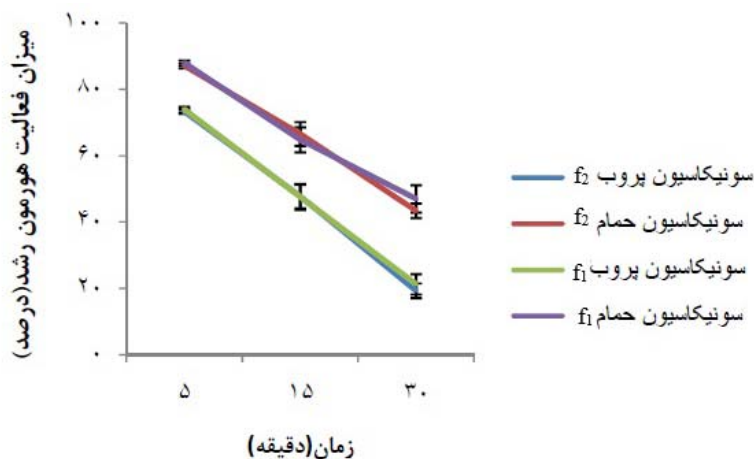
الکتروفورز نمونه‌ها بر اساس روش لاملی با غلظت ۱۲ درصد ژل انجام شد (۲۳). همچنین جهت بررسی مورفولوژی ذرات از میکروسکوپ نوری (Letiz Biomed, Germany) مجهز به دوربین عکس برداری دیجیتالی با بزرگنمایی ۴۰ و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, JEM-200 CX, yEoL, TOKYO, Japan) استفاده شد. برای انجام این کار ابتدا یک قطره از سوسپانسیون حاوی نانو ذرات بر روی یک گرید مسی قرار داده شد و در مجاورت هوا خشک گردید و به دنبال آن نمونه‌ها با رنگ آمیزی منفی، رنگ و مستقیماً به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شدند (۱۰). اندازه ذرات و پتانسیل زتا (Zeta) نانو ذرات به روش  $\text{photon correlation spectroscopy}$  با دستگاه زتا سایزر (Malvern zeta sizer مدل WorcesterShire, UK) تعیین شد (۱۰).

## نتایج

ترانسفرزوم‌های  $f_1$  و  $f_2$  حاوی هورمون رشد جهت تعیین اثر سونیکاسیون روی کارایی پروتئین، و اندازه ترانسفرزوم

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد پتانسیل ذرات حاوی هورمون رشد منفی است.

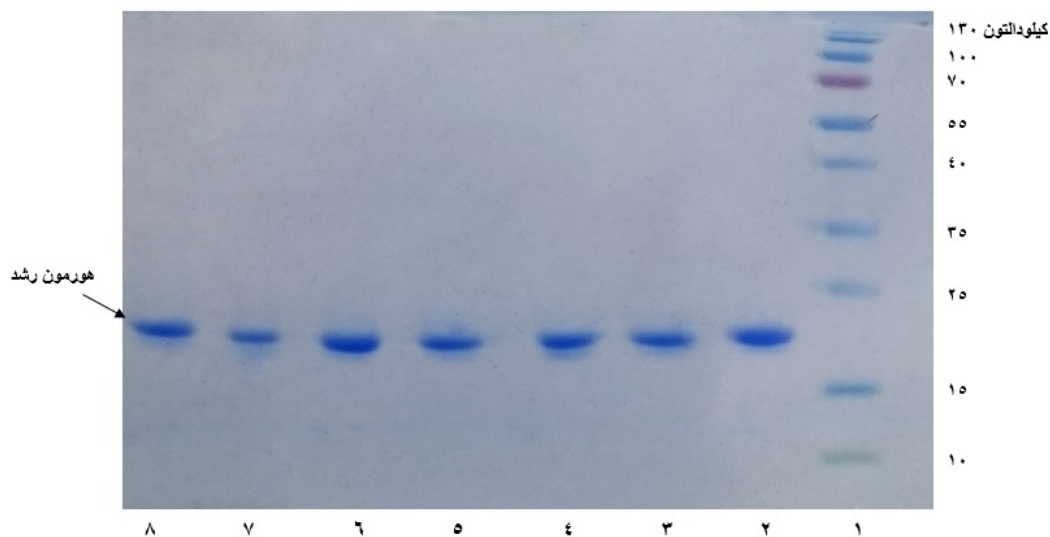
می‌باشد. ترانسفرزوم حاوی پروتئین و سایر داروها طبق گزارش‌های مقالات دیگر باید آنیونی باشند و همان‌طور که



شکل ۱- تأثیر سونیکاسیون روی کارایی هورمون رشد وزیکولهای f<sub>1</sub> و f<sub>2</sub>

جدول ۱- تأثیر سونیکاسیون حمام و پروب بر روی فعالیت هورمون رشد موجود در ترانسفرزوم f<sub>1</sub> و f<sub>2</sub>

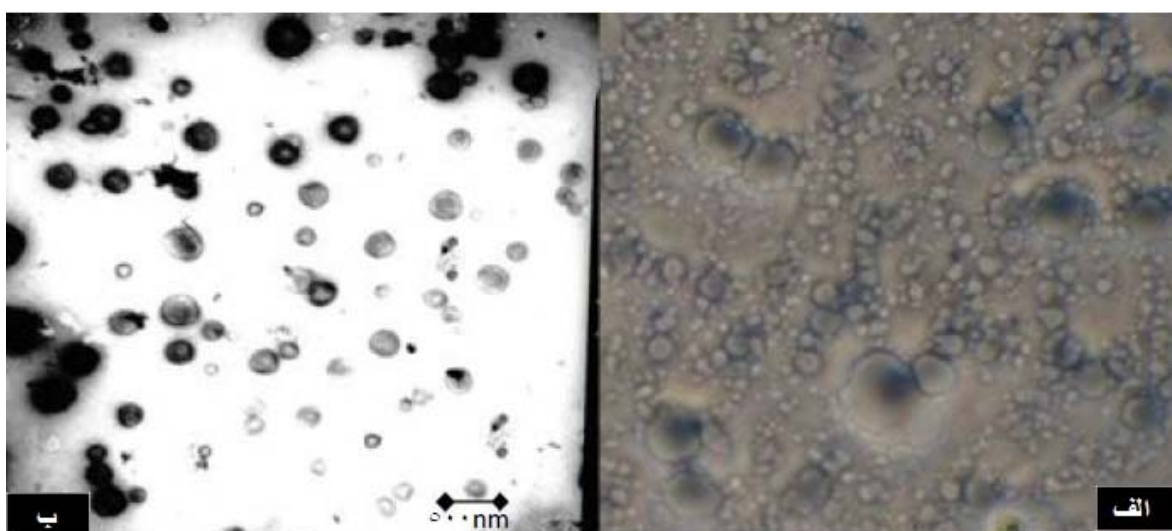
نوع سونیکاسیون	زمان		
	۳۰'	۱۵'	۵'
حمام	۴۷/۰۲±۴/۱۴۹	۶۴/۸۳±۳/۷۹۸	۸۷/۹۴±۰/۷۶۲
	۴۳/۴۳±۲/۹۶۸	۶۶/۶±۳/۳۸۲	۸۷/۰۹±۰/۸۲۴
پروب	۲۱/۳±۳/۰۶۷	۴۷/۵۷±۳/۸۸۸	۷۳/۹۵±۰/۸۲۹
	۱۹/۳۵±۲/۲۱۵	۴۷/۷۵±۳/۵۵۳	۷۳/۳۵±۰/۷۶۵
نسبت فعالیت	۲/۲۰۷	۱/۳۶۲	۱/۱۸۹
	۲/۲۴۴	۱/۳۹۴	۱/۱۸۷



شکل ۲- ژل الکتروفورز هورمون رشد: ۱- مارکر وزن مولکولی ۲- استاندارد هورمون رشد ۳- سونیکاسیون حمام ۵ دقیقه ۴- سونیکاسیون حمام ۱۵ دقیقه ۵- سونیکاسیون حمام ۳۰ دقیقه ۶- سونیکاسیون پروب ۵ دقیقه ۷- سونیکاسیون پروب ۱۵ دقیقه ۸- سونیکاسیون پروب ۳۰ دقیقه

جدول ۲- تأثیر سونیکاسیون حمام بر روی ابعاد وزیکولهای  $f_1$  و  $f_2$ 

$f_2$			$f_1$			زمان
۳۰'	۱۵'	۵'	۳۰'	۱۵'	۵'	خصوصیات ذره ای وزیکول
۸۱/۳۷±۱۳/۸۱	۱۴۰/۳±۸/۳۲۶	۱۵۹/۶±۷/۵۷۱	۱۹۰/۶±۵/۸۵۹	۲۲۳/۶±۱۶/۴۴	۲۴۲/۶±۱۶/۰۴	سایز وزیکول
-۲۱/۶±۰/۵۷۷	-۲۳/۳±۳/۰۵۵	-۲۰/۳±۲/۵۱۶	-۲۱/۳±۱/۵۲۷	-۱۹/۶±۱/۵۲۷	-۲۳/۶±۴/۷۲۵	پتانسیل زتا



شکل ۳- الف- ترانسفرزوم  $f_1$  قبل از سونیکاسیون (عکس برداری به وسیله میکروسکوپ نوری)، ب- ترانسفرزوم  $f_1$  بعد از ۵ دقیقه سونیکاسیون (عکس برداری به وسیله میکروسکوپ TEM)

### بحث و نتیجه گیری

ترانسفرزوم سیستم دارورسانی جدیدی است که با استفاده از روش طراحی منطقی غشاء ساخته شده است. این سیستم نوین دارورسانی شامل وزیکولهای لیپیدی فوق العاده تغییر شکل پذیر می باشد که برای اولین بار امکان انتقال مولکولهای دارویی بزرگ مانند پلی پپتیدها و پروتئینها را به داخل بدن و از طریق پوست به صورت غیر تهاجمی فراهم آورده است (۶). در این کار تحقیقی تأثیر عامل سونیکاسیون بر روی خصوصیات ظاهری و عملکردی ترانسفرزوم هورمون رشد بررسی گردید.

طبق نتایج جدول نسبت فعالیت در وزیکولهای  $f_1$  و  $f_2$  در سونیکاسیون حمام نسبت به پروب در سه زمان ۵' و ۱۵' و ۳۰' به ترتیب ۱/۱۹، ۱/۳۶، ۲/۲۱، برابر در ترانسفرزوم  $f_1$  و ۱/۱۹، ۱/۴۰، ۲/۲۵، برابر در ترانسفرزوم  $f_2$  می باشد. اگرچه در هر دو مورد فعالیت هورمون رشد درصدی از فعالیت اولیه آن بوده و این کاهش فعالیت با افزایش زمان سونیکاسیون افزایش می یابد ولی استفاده از فرایند سونیکاسیون برای یکنواخت سازی اندازه ترانسفرزوم های ایجاد شده در بسیاری از تحقیقات پیشین نیز مرسوم بوده است. گوپتا (Gupta) ترانسفرزوم حاوی تتانوس توکساید را به مدت ۳۵ دقیقه با یک وقفه ۲ دقیقه ای بعد از هر ۵

کرد که بار آن بین ۲۳- تا ۴۳- میلی ولت بود (۱۲). این در حالی است که ترانسفرزوم‌های حاوی اسیدهای نوکلئیک دارای بار مثبت هستند و اساساً لپید مورد استفاده در ساخت این ترانسفرزوم‌ها کاتیونی می‌باشد که این امر موجب واکنش مناسب بین ترانسفرزوم‌ها، DNA و RNA (که دارای بار منفی هستند) می‌شود. به طوری که گروهی به رهبری لیو (Liu) ترانسفرزوم‌های حاوی DNA را با بار سطحی ۱۱/۹ تا ۲۴ میلی ولت ساختند (۱۰). نتایج پتانسیل زتا در تحقیق حاضر، در مورد ترانسفرزوم‌های حاوی هورمون رشد بین ۲۰- تا ۲۳- میلی ولت به دست آمد. راه‌های هیدروفیل ترانس درمال در پهن‌ترین قسمت‌ها تقریباً ۱۰۰ nm و در باریک‌ترین قسمت‌ها کمتر از ۴/۰ nm می‌باشند و به طور متوسط پهنایی حدود ۱۰۰ nm برای آنها در نظر گرفته می‌شود (۳). از جمع بندی مطالب فوق چنین بر می‌آید که وزیکول‌های با اندازه کمتر از ۵۰۰ nm قابلیت عبور از پوست را دارند. (با توجه به اینکه ترانسفرزوم‌ها از منافذی تا ۵ برابر کوچکتر از اندازه خودشان عبور می‌کنند) (۳۰). در این راستا کیم (kim) و همکاران وزیکول‌هایی حاوی DNA با متوسط اندازه ۸۰ nm ساختند (۲۰). سوک (Cevc) و همکاران وزیکول‌هایی با اندازه ۹۰ تا ۱۱۰ nm حاوی انسولین ساختند (۱ و ۶). پتل (Patel) و همکاران ترانسفرزوم‌هایی حاوی کورکوماین با اندازه حدود ۳۹۹/۹ تهیه کردند (۲۶) و همچنین مونتاناری (Montanari) و همکاران وزیکول‌هایی با اندازه ۱۰۰ nm حاوی Znpc ساختند (۲۳) و متوسط اندازه ذرات ساخته شده در این تحقیق که ترانسفرزوم‌های حاوی هورمون رشد بودند از ۱۷۱ nm تا ۲۴۱/۳ nm بود که همگی این ذرات قابلیت عبور از پوست را نشان دادند.

از جمع بندی مطالب فوق چنین نتیجه‌گیری می‌شود که هر دو فرمول ترانسفرزوم  $f_1$  و  $f_2$  قادر به تشکیل ترانسفرزوم‌هایی در ابعاد استاندارد و بار مناسب برای عبور از پوست هستند.

دقیقه سونیکیت نمود (۱۴). همچنین پتل (Patel) ترانسفرزوم‌های حاوی کورکوماین را ۱۵ دقیقه shake نمود (۲۶). مونتاناری (Montanari) ترانسفرزوم‌های حاوی Znpc را پس از ۴۵ دقیقه سونیکیت، ۱۵ دقیقه اکستروند نمود و سپس نفوذ پوستی آنها را مورد بررسی قرار داد (۲۵). لیو (Liu) ترانسفرزوم‌های حاوی DNA را بدون سونیکیت کردن جهت جذب پوستی مورد استفاده قرار داد (۱۰). این در حالی است که برای ساخت ترانسفرزوم حاوی ملوکسی کام توسط دانگمیت (Duangmit) ذرات ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه توسط سونیکاسیون حمام و سپس در دو دوره ۳۰ دقیقه‌ای توسط سونیکاسیون پروب سونیکیت شدند (۱۲). با توجه به مطالب فوق می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سونیکیت کردن گرچه باعث ریز و جدا شدن ذرات از هم و تشکیل ترانسفرزوم‌های مناسب تری می‌شود ولی در مورد پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک فعالیت بیولوژیکی ماکرومولکول محصور شده در ترانسفرزوم دارای اهمیت اصلی است.

وزیکول‌های  $f_1$  و  $f_2$  آنیونی بوده و دارای بار منفی می‌باشند. بار منفی این وزیکول‌ها نفوذ پوستی داروها را به شدت فراهم می‌کند (۳۳). توجیه احتمالی این بار منفی را می‌توان بدین ترتیب عنوان کرد که ترکیب فسفا تیدیل کولین به کار رفته در ساخت ترانسفرزوم‌ها از نظر بار خنثی و نقطه ایزوالکتریک آن بین ۶ و ۷ است (۸). تحت شرایط آزمایشگاهی که  $pH=7/4$  و بالاتر از نقطه ایزوالکتریک است، فسفاتیدیل کولین دارای بار منفی می‌شود. از طرفی سورفاکتانت‌های استفاده شده هم آنیونی هستند بنابراین در  $pH=7/4$  اکثر ترانسفرزوم‌های  $f_1$  و  $f_2$  باید دارای بار منفی باشند (۲۱). در این راستا پتل (patel) به همراه همکاران توانست ترانسفرزوم‌های حاوی کورکوماین را با بار منفی حدود ۲۰- تا ۲۵- میلی ولت تهیه کند (۲۶). همچنین دانگمیت (Duangmit) ترانسفرزوم حاوی ملوکسی کام دارای بار منفی را جهت استفاده نفوذ پوستی داروها تهیه

## منابع

1. Aungst B.J., Rogers N.J., Shefter E., 1988, Comparison of nasal, rectal, buccal, sublingual and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter, *J pharmacol EXP Ther*, 244(1) 23–27.3
2. Barratt M.D., 1995, Quantitative structure – activity relationships for skin permeability, *Toxicol. Vitro* 9, 27–37.7
3. Cevc G., 2004, Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *J Drug Delivery*, 56:675-711.15
4. Cevc G., 1994, Material transport across permeability carriers by means of lipid vesicles. In: Lipwork R, editors, *Handbook of physics of biological systems*, Amstrdam: Elsevier, 1:441-487. 18
5. Cevc G., 2002, Self regulating smart carriers for non-invasive and targeted drug delivery, *Cell. Mol. Bioi. Lett*, 7:224-225. 19
6. Cevc G., Gebauer D., Stieber J., Schatzlein A., Blume G., 1998, Ultraflexible vesicles Transfersomes have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1368:201-215. 25
7. Cevc G., Vierl U., 2010, Nanotechnology and the trans dermal route a state of the art review and critical appraisal, *Journal of controlled release*, 141:277-299. 27
8. Chain E., Kemp I., 1994, The isoelectric points of lecithin and sphingomyelin, *Biochemical Journal*, 28:2052–2055.28
9. Cho Y.W., Flynn M., 1989, Oral delivery of insulin wletterx *Lancet*, *Asian Journal of pharmaceutical sciences and clinical research*, 23-30, 1518–1519.29
10. Chunxi Liu., Zhijin Chen., 2011, Novel cationic 6-lauroxyhexyl lysinate modified poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles enhance gene transfection, *Journal of colloid and interface science*, 528-535.30
11. Das N., Basu M.K., Das M.K., 1988, Oral application of insulin encapsulated liposomes, *Biochem. Int.* 16, 983–989.32
12. Duangmit S., opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhirunpat T., 2011, characterization and in vitro skin permeation of meloxicam–Loaded liposomes versus transfersomes, *Journal of Drug delivery*, Article ID 418316, 9 Pages.35
13. Goodman H.M., 2003, Current status and future prospects of transdermal drug delivery, *Basic Medical Endocrinology*; San Diego, Academic; Guy; R;H, 13:1765-1769.51
14. Gupta N.P., Mishra V., Rawat A., Dubey P., Mahor S., Jain S., Chatterji D.P., Vyas S.P., 2005, Non-invasive vaccine delivery in transferosomes; niosomes and Liposomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 293:73- 82. 53
15. Hofer Ch, Hartung R, Gobel R, Deering P, Leluner A, Breul J., 2000, New ultradeformable drug carriers for potential transdermal application of Interleukin-2 and Interferon c: theoretic and practical aspects, *World J. Surgery*, 24:1187-1189. 57
16. Jain S, Jain P, Umamaheshwari RB, Jain NK., 2003, Transfersome: A novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery; Development, characterization and performance evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29:1013-1026. 60
17. Jamieson J., Dormam L.E., et al., 1997, Growth Hormone: Reversing Human Aging Naturally; The Methuselah Factor. East Canaan. Safe Goods, Longevity News Network.61
18. Kennish L., Reidberg R., 2005, A review of the effect of occlusive dressing on lamellar bodies in the stratum corneum and relevance to transdermal absorption, *J. Dermatol*, 11:7-10. 63
19. Kililian B., Suarez V., Liria C.W., Gombert A.K., 2000, Process strategies to improve heterologous protein production in Escherchia coil under lactose or IPTG induction, *J.Process Biochem*, 35:1019-1025.64
20. Kim A., Lee E.H., Choi S.H., Kim C.K., 2004, In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultra formable cationic liposome, *J.Biomaterials*, 25:305-313.65
21. Luger P., Daneck K., Engel W., Trummlitz G., Wagner K., 1996, Structure and physicochemical properties of meloxicam a new NSAID, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4:175–187.67
22. Langkamp M., Weber k., Ranke M.B.(2008) Human growth hormone measurement by means of a sensitive ELISA of whole blood spots on filter paper. *Growth Hormone & IGF Research* 18, 528-532.

23. Laemmli UK., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277:680-685.
24. Mishima M., Okada S., Wakita Y., Nakano M., 1989, Promotion of nasal absorption of insulin by glycyrrhetic acid derivatives, *I. J. Pharmacobio.-Dynam.* 12:31-36.70
25. Montanari J., Perez A.P., Salvo F., Diz V., Barnadas R., Dicelio L., Doctorovich F., Morilla M.J., Romero E.L., 2007, Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization, *International Journal of Pharmaceutics*, 330:183-194.71
26. Patel R., Singh S.K., Singh S., Sheth N.R., Gendle R., 2009, Development and characterization of curcumin loaded transfersome for transdermal delivery, *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 4:71-80.74
27. Potts R.O., Guy R.H., 1992, Predicting skin permeability, *Pharm. Res.* 9:663-669.76
28. Saffran M., Sudesh G.K., Savariar C., Burnham J.C., Williams F., Neckers D.C., 1986, *Science* 233, 1081-1084.81
29. Schaefer P., Bewick-Sonntag C., Capri M.G., Berardesca E., 2002, Physiological changes in skin barrier function, *Skin Pharmacol, Appl. Skin Physiol.* 15:7-19.82
30. Schatzlein A., Cevc G., 1995, Biological properties and new applications of phospholipids, *AUOC Publications*, 191-209. 83
31. Sinico C., Manconi M., Peppi M., Lai F., Valenti D., Fadda A.M., 2005, Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicleskin interaction, *Journal of Controlled Release*, 103:123-136.85
32. Sweetman S C., editor., 2005, Martindale: The complete drug reference. 33th ed, London: Pharmaceutical press;768-770, 1281-1283,84-85, 1076, 1480, 1574, 1415, 1660. 88
33. Walter H, Gunther A., Kronski D., Flaschentrager I., Mehnert H., 1989, Implantation of programmable infusion pumps for insulin delivery in type I diabetic patients; *Klin, Wochen-schr.* 67:583-587.95
34. Wang P.Y., 1989, Implantable reservoir for supplemental insulin delivery on demand by external compression, *J.Biomaterials*, 10:197-201.97
35. Yang T., Cui F., Choi M., Cho J., Cheng S., Shim C., Kim D., 2007, Enhanced solubility and stability of PEG ylated liposomal paclitaxel: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* 338:317-326.100



## Effect of sonication on the size of growth hormone transfersome

Shamshiri M.<sup>1</sup>, Khodabandeh M.<sup>2</sup>, Atyabi F.<sup>1</sup>, Rahimi F.<sup>2</sup> and Rasoolzadeh R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

The transfersomes are ultraflexible vesicles, which due to their elastomechanic properties are able to penetrate into pores smaller than their own size, and thereby have the potential to deliver drugs to the skin. In this study growth hormone transfersomes were constructed from two formula made of phospholipids, sodium deoxycholate (f1) and sodium lauryl sulphate (f2) as surfactants. There are different ways of obtaining transfersomes with a specified size range. One of the methods is the use of sonication to regulate their size and dimensions. Accordingly, in order to study transfersomes carrying the growth hormone, the vesicles were sonicated using both the probe and bath methods. In each case, dimensions, dispersity, the zeta potential of transfersomes and biological activity of the growth hormone were measured during three different time cycles of sonication. The results showed that during investigation of all the different time periods, growth hormone activity was found to decrease further following probe sonication when compared to that of bath sonication. Therefore, vesicle size and zeta potential were measured in the probe sonication tests. The mean size was found to vary between 242.6 to 190.6 and 81.37 to 159.6, for the f1 and f2 vesicles, respectively. The zeta potential of the f1 transfersomes was more negative than that of f2.

**Key words:** Transfersome, growth hormone, skin adsorption, drug delivery.