

فرمولاسیون، بررسی ویژگیها و مطالعات آزاد سازی میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز برای ایمن سازی از راه بینی

* دکتر محسن تفقیدی، دکتر سید ابوالقاسم سجادی طبسی، دکتر محمود رضا جعفری

* گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

آلژینات يك پليمر طبيعي سالم، غير ايمني‌زا و ارزان قيمت است که دارای خواص مخاط چسبي مناسبی می‌باشد. میکروسفرهای آلژینات می‌توانند به عنوان سیستم دارو رسانی مناسب برای تجویز آنتی ژنها در سطوح مخاطی به کار برده شود. در این مطالعه میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز با روش امولسیون سازی-ژل کردن فاز داخلی تهیه و سپس تاثیر برخی از پارامترهای فرمولاسیون بر خصوصیات میکروسفرها و نیز آزاد سازی آنتی ژن از میکروسفر مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظتهای مختلف امولسیون کننده و آلژینات، زمانهای مختلف سونیکاسیون و حجم و غلظت محلول کلرید کلسیم در اکتانول بر میانگین قطر، محدوده اندازه ذره ای، ناصافی و تخلخل سطحی، کرویت و به هم چسبیدگی میکروسفرها، با استفاده از میکروسکوپ نوری و دستگاه آنالیز کننده اندازه ذره ای بررسی شد. بهترین میکروسفرها هنگامی به دست آمدند که محلول آلژینات با غلظت ۳ w/v٪ در حضور ۲ w/v٪ سورفکتانت و با استفاده از ۹۰ ثانیه سونیکاسیون در اکتانول امولسیون شده و با افزودن به ۶۰ ml محلول ۳۳ w/v٪ از کلرید کلسیم در اکتانول شکل داده شدند. میکروسفرهای به دست آمده با شرایط بالا دارای قطر میانگین $1/34 \pm 0/3 \mu\text{m}$ (n=۳) و محدوده اندازه ذره ای $0/3-2/0 \mu\text{m}$ بدون ناصافی و تخلخل سطحی، به هم چسبیدگی کم و کرویت بالا بودند. میزان انکپسولاسیون توکسوئید کزاز (TT) حدود ۴۷/۷٪ (n=۶) بود. همه میکروسفرهای ساخته شده با شرایط مختلف، الگوی رهش نزدیک به هم و با رهش اولیه کم از خود نشان دادند. پایداری آنتی ژن مدل (توکسوئید کزاز) استخراج شده از میکروسفرها به وسیله SDS-PAGE اثبات شد و آنتی ژنیسته آن با استفاده از الایزا (ELISA) تعیین شد که برابر $5 \pm 91\%$ توکسوئید اولیه بود. با توجه به اندازه و خصوصیات شکلی میکروسفرهای تهیه شده و حفظ آنتی ژنیسته توکسوئید کزاز انکپسوله شده، این میکروسفرها می‌توانند به عنوان يك سیستم دارو رسانی در تجویز مخاطی توکسوئید کزاز به کار برده شوند.

کلمات کلیدی: آلژینات، میکروسفر، تجویز مخاطی، توکسوئید کزاز.

مقدمه

سدیم آلژینات می‌توان از کاتیونهای دو ظرفیتی (مثل کلسیم، باریم، روی) یا سه ظرفیتی (مثل آلومینیوم) استفاده کرد. بررسی‌ها نشان داده است که کمپلکس‌های به دست آمده با کاتیونهای ۲ و ۳ ظرفیتی به ترتیب دو و سه بعدی هستند (۱، ۱۰). محصول واکنش آلژینات سدیم با محلول کلسیم، ژل نامحلول آلژینات کلسیم است. واکنش با کلسیم و در پی آن ظرفیت تشکیل ژل آلژینات کلسیم، تابع مستقیمی از طول متوسط زنجیره بلوکهای گلورونیک اسید می‌باشد. به این

آلژینیک اسید، يك کوپلیمر آنبونی خطی از β -D-مانورونیک اسید (M) و α -گلوکورونیک اسید (G) است. این پلی ساکارید هیدروفیل، دارای جرم مولکولی بالا (۲۹۰-۸۰ کیلو دالتون) است و از سه گونه از جلبک قهوه‌ای (کلپ) استخراج می‌شود. نمک سدیم اسید آلژینیک (سدیم آلژینات) به آرامی در آب حل می‌شود و در میان pH ۴ تا ۱۰ پایدار است. pH محلول ۱ w/v٪ آن حدود ۷/۲ است و در pH زیر ۳، اسید آلژینیک رسوب می‌کند (۵، ۱۲، ۱۳). برای کراس لینک کردن

شوند. ذرات در محدوده ۱۰-۵ میکرون در محل تمرکز سلولهای M باقی می ماندند و بیشتر باعث تحریک ایمنی مخاطی می شوند (۲). ذرات بزرگتر از ۱۰ میکرون به هیچ وجه توسط سلولهای M برداشت نمی شود (۹). در تهیه میکروسفر آلزینات، معمولاً از سه روش عمده اسپری کردن، کوآسرواسیون (coacervation) و امولسیون کردن استفاده شده است. برای رسیدن به میکروسفرهای با قطر بسیار کم (کمتر از ۱۰ میکرون) بیش از همه از روش امولسیون کردن استفاده شده است (۶، ۱۶، ۲۰).

علیرغم استفاده وسیع از میکروسفر آلزینات، مقالات کمی در مورد اثر عوامل مختلف دخیل در فرمولاسیون بر خصوصیات میکروسفرهای نهایی منتشر شده است. Lemoine و همکارانش (۱۶) از روش امولسیون سازی (آلزینات در ایزو اکتان) برای تهیه میکروسفرهای کوچکتر از ۱۰ میکرون استفاده کردند. این محققین اثر غلظتهای مختلف محلول آلزینات، وزن مولکولی آلزینات مورد استفاده و نوع سورفکتانت را بر محدوده اندازه ذره ای و میزان به هم چسبیدگی میکروسفرها بررسی کردند.

روش استفاده از امولسیون w/o برای تهیه میکروسفرهای با قطر کم (کوچکتر از ۵ میکرون) توسط Cho و همکارانش (۶) به کار گرفته شد. این محققین اثر سرعت به هم زدن، نوع سورفکتانت، غلظت محلول آلزینات سدیم و غلظتهای مختلف از کلرید کلسیم در اکتانول را بر خصوصیات میکروسفرهای به دست آمده تنها با مقایسه عکسهای میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از میکروسفرهای مختلف با هم مقایسه کردند و هیچگونه داده کمی در این زمینه ها ارائه نکردند.

در این تحقیق میکروسفرهای آلزینات با روش امولسیون سازی و به منظور تجویز توکسوئید کزاز (به عنوان آنتی ژن مدل) از راه بینی تهیه شدند. لذا کوشش شد تا حتی الامکان میکروسفرهای کوچکتر از ۱۰ میکرون که قابل برداشت توسط سلولهای M بافتهای لنفاوی موضعی باشند، تهیه شود. همچنین اثر عوامل مختلف بر خصوصیات مربوط به

ترتیب آلزینتهایی که دارای نسبت بالاتری از گلوکونیک اسید باشند، توان بیشتری برای تشکیل ژل دارند (۱۹).

میکروسفر آلزینات به عنوان یک سیستم دارو رسانی برای آنتی ژنها، دارای مزایای متعددی است که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- خاصیت مخاط چسبی آلزینات می تواند زمان تماس بین میکروسفرهای آلزینات و اپی تلیم جذب و سلولهای M بافت لنفاوی مخاطی را افزایش دهد (۱۲، ۱۶، ۲۰). ۲- آلزینات زیست تجزیه پذیر بوده و دارای سمیت، تحریک کنندگی و ایمنی زایی کم می باشد (۱۲، ۱۶). ۳- میکروسفر آلزینات نه تنها به عنوان یک سیستم دارو رسانی بلکه می تواند به عنوان یک ایمنی یار (ادجوانت) عمل کند. میکروسفر آلزینات حاوی آنتی ژن همانند ایمنی یارهای دیگر می تواند باعث ایجاد سایتوکاینها و افزایش پاسخ دهی سیستم ایمنی شود (۲۰).

به تازگی، میکروسفرهای آلزینات در مطالعات ایمین سازی متعددی چه از راه خوراکی و چه از راه بینی مورد استفاده قرار گرفته اند (۲، ۳، ۶، ۱۲، ۲۰، ۲۳، ۲۵). آلزینات به عنوان یک سیستم واکسن رسانی برای آنتی ژنهای محلول، توانسته است پاسخهای آنتی بادی بالایی ایجاد کند. تجویز داخل بینی بیدهای آلزینات حاوی اوآلبومین باعث ایجاد تیتر بالای آنتی بادهای اختصاصی علیه آنتی ژن شده است (۱۲).

در تجویز مخاطی میکروسفرهای آلزینات حاوی آنتی ژن، یک عامل بسیار مهم که باید مورد نظر قرار گیرد، اندازه ذره ای میکروسفرهاست. یکی از عوامل مهم در ایجاد پاسخ ایمنی از این راه امکان برداشت میکروسفرها توسط سلولهای M بافتهای لنفاوی موضعی است. اندازه میکروسفرها بر جذب آنها توسط سلولهای M و نوع پاسخ ایمنی تاثیر می گذارد (۱۱، ۱۸). میکروسفرهای کوچکتر از یک میکرون می توانند به راحتی از میان گلیکوکالیکس سلولهای M عبور کنند و بنابراین امکان برداشت آنها توسط سلولهای M بیشتر است (۲). ذرات کوچکتر از ۵ میکرون می توانند به مجاری لنفاوی و طحال وارد شوند و باعث تحریک ایمنی سیستمیک و مخاطی

آرام، اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه برای سخت شدن بیشتر میکروسفرها، ۲ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل به صورت قطره قطره به این مخلوط در حال چرخش اضافه شد. میکروسفرها با استفاده از فیلتراسیون غشایی ($0.45 \mu\text{m}$) جمع آوری و با ۱۵ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل شستشو داده شدند. برای خشک کردن، میکروسفرها به مدت یک شب درون دسیکاتور خلاء گذاشته شدند. ۱۱ بچ میکروسفر به ترتیب از ۱-B تا ۱۱-B با روش فوق و با تغییر در شرایط ساخت تهیه شدند که شرایط ساخت آنها در جدول ۱ ذکر شده است. برای بررسی هر یک از متغیرهای مورد مطالعه، هر بچ میکروسفر ۳ بار تهیه شد.

تعیین میزان انکپسولاسیون TT در میکروسفرهای آلژینات: برای تعیین میزان انکپسولاسیون TT در میکروسفرهای آلژینات، ۵ mg از میکروسفرهای حاوی TT به $750 \mu\text{l}$ محلول سدیم سیترات (0.1 M و $\text{pH } 7.4$) افزوده و با تکان دادن در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت، میکروسفرها حل شدند. برای تعیین غلظت TT درون محلول میکروسفر از دو روش تعیین مقدار کمی پروتئین برادفورد (Bradford) و BCA استفاده شد. به عنوان پروتئین استاندارد، از BSA استفاده شد. از آنجایی که در این روشهای تعیین مقدار پروتئین، خود محلول سدیم آلژینات نیز تداخل می کند و دارای جذب می باشد، در تمام تعیین مقادارها، جذب یک محلول میکروسفر آلژینات بدون TT با غلظت مشابه نیز خوانده می شد و جذب سدیم آلژینات از جذب محلول میکروسفرهای آلژینات حاوی TT کسر می شد. در این تعیین مقادارها، مقدار TT موجود در میکروسفرهای خشک شده و نسبت مقدار واقعی TT (w/w) موجود در میکروسفرها به مقدار اضافه شده اولیه (بازده انکپسولاسیون) تعیین شد. برای هر یک از بچهای میکروسفر، میزان انکپسولاسیون حداقل سه بار تعیین شد.

بررسی شکل و اندازه میکروسفرهای آلژینات: برای بررسی خصوصیات شکلی و همچنین توزیع ذره ای میکروسفرها از میکروسکوپ نوری (Carl Zeiss) استفاده شد. به این

اندازه، سطح و رهش آنتی ژن از میکروسفرها و تاثیر فرآیند تهیه بر پایداری و آنتی ژنیسته آنتی ژن انکپسوله (توکسوئید کزاز) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مواد: آلژینات سدیم، اسپان ۸۰ (Span 80)، بیسینکونینیک اسید (Bicinchoninic acid=BCA) و آلومین سرم گاوی (Bovine serum albumin=BSA) از فلوکا (Fluka) و کلرید کلسیم، اکتانول نرمال، ایزوپروپیل الکل و سیترات سدیم از مرک (Merck) خریداری شدند. محلول توکسوئید کزاز (2500 Lf/ml) و توکسوئید کزاز جذب شده پر آلوم (50 Lf/ml) از موسسه سرم سازی رازی-حصارک کرج دریافت شد.

ویسکوزیته محلول 2 w/v آلژینات سدیم به وسیله ویسکومتر Fungilab اندازه گیری شد و برابر 1050 سانتی پواز بود. نسبت مانورونیک اسید به گلورونیک اسید در آلژینات برابر $1/614$ بود. تمامی واکنشگرها و مواد مورد استفاده از نوع خالص و آنالیتیکال بودند.

تهیه میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز (TT): روش مورد استفاده یک روش امولسیون سازی است که با تغییراتی در روش Cho و همکارانش (۶) انجام شد و اثر عوامل متعدد کاری و فرمولاسیونی بر روی اندازه ذره ای و ویژگیهای شکلی میکروسفرها مورد بررسی قرار گرفت.

برای تهیه میکروسفرها، $1/50$ - $0/5$ میلی لیتر از محلول آبی سدیم آلژینات ($2-4 \text{ w/v}$) که دارای 5 v/v توکسوئید کزاز بود درون محلول n-اکتانول حاوی $3-1 \text{ w/v}$ سورفکتانت لپوفیل (اسپان ۸۰) پراکنده شد. برای پراکنده سازی اولیه از یک هموژنایزر مکانیکی (Ultraturrax) در 8000 دور در دقیقه استفاده شد. امولسیون نهایی با استفاده از سونیکاسیون توسط یک پروب سونیکاتور (Soniprep-150) در آمپلیتود 18 به مدت $90-30$ ثانیه تهیه شد.

امولسیون w/o حاصل به سرعت به محلول ($30-90 \text{ ml}$) کلرید سدیم در اکتانول ($0/5-25/0 \text{ w/v}$) در حال چرخش

در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از بلوک کردن جایگاههای واکنش نداده با محلول ۱ w/v BSA (۳۰۰ μl/well) و شستشو با بافر PBS (۷/۴ pH) و ۰/۰۵ M (۰/۰۵ v/v) حاوی ۰/۰۵٪ از توین ۲۰ (PBS-T)، ۱۰۰ μl از رقت کار سرم هیپرایمیون موش علیه TT، به هر چاهک اضافه شد. این سرم هیپرایمیون (به عنوان منبع ایمنوگلوبولین G ضد TT (anti-TT IgG) از موشهایی به دست آمد که سه بار با تزریق زیرجلدی ۱۰ Lf واکسن Alum-TT این شده بودند. رقت مناسب کار از این سرم با استفاده از یک آزمایش الایزای مقدماتی تعیین شد.

پس از یک ساعت نگهداری پلیت در ۳۷ درجه سانتی گراد و شستشوی آن، ۱۰۰ μl از رقت کار از goat anti-mouse و IgG کنژوگه با HRP (Horseradish peroxidase) به هر چاهک اضافه و پلیت مجدداً به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس ۴ بار با PBS-T شستشو داده شد. برای ظهور رنگ از ۱۰۰ μl محلول ۰/۰۳، ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۵-تترامتیل بنزیدین (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine = TMB) استفاده شد که به نسبت مساوی با محلول پراکسیداز مخلوط شده بود، استفاده شد. پس از متوقف کردن واکنش رنگزایی با افزودن ۵۰ μl اسید فسفریک ۱M به هر چاهک، جذبها در ۴۵۰ nm اندازه گیری شد.

بررسی رهش برون تن TT از میکروسفرهای آلزینات: برای اندازه گیری سرعت و الگوی رهش TT از میکروسفرهای حاوی TT، ۳۰ mg از هر سری ساخت میکروسفر درون یک میکروتیوب ۱/۵ ml حاوی ۶۰۰ μl محیط رهش (PBS حاوی ۰/۰۱٪ سدیم آزید) اضافه شد. این لوله ها در حال همزدن مداوم در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در زمانهای مشخص، لوله ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و ۵۰۰ ml از محلول رویی برداشت می شد. مقدار TT در این محلول با استفاده از روش میکرو BCA تعیین شد.

آنالیز آماری: آنالیز آماری به وسیله unpaired t-test انجام شد.

منظور قطر ۳۰۰ میکروسفر از هر سری ساخت توسط میکروسکوپ مجهز به صفحه مدرج چشمی اندازه گیری شد. ناصافی سطح، وجود تخلخل در سطح، به هم چسبیدگی و کروییت میکروسفرها به عنوان معیارهایی برای مقایسه خصوصیات شکلی میکروسفرهای ساخته شده در شرایط مختلف در نظر گرفته شدند. سیصد میکروسفر از هر سری ساخت زیر میکروسکوپ نوری بررسی و خصوصیات ذکر شده در بالا با استفاده از یک روش عدد دهی (جدول ۲) به صورت کمی بیان شدند. قطر میانگین حجمی میکروسفرها با استفاده از دستگاه آنالیز کننده اندازه ذره ای به روش پراش اشعه ایکس (laser diffraction particle size analyzer) (Zetasizer 2000, Malvern) اندازه گیری شد.

پایداری ساختمانی و آنتی ژنیسیته TT آنکپسوله شده درون میکروسفرها

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE): دست نخورده ماندن مولکول TT آنکپسوله شده با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شد. به این منظور محلول میکروسفرهای حاوی TT در سدیم سترات، TT اولیه و یک نشانگر وزن مولکولی بر روی ژل آکریلامید ۱۰٪ افزوده شدند و با استفاده از یک سیستم الکتروفورز (پایا پژوهش) از درون ژل عبور داده شدند. نوارهای پروتئین حاصل با استفاده از رنگ آمیزی با کوماسی بلو (Commassie blue, Fluka) و نیترات نقره ظاهر شدند.

الایزا (Enzyme linked immunosorbant assay = ELISA):

میکروسفرهای آلزینات حاوی TT درون محلول ۰/۱ M سدیم سترات (pH ۷/۴) حل شدند و مقدار TT موجود در این محلول با استفاده از روش میکرو BCA اندازه گیری و آنتی ژنیسیته TT با استفاده از یک روش الایزا بررسی شد (۸). به اختصار، هر خانه یک پلیت الایزای ۹۶ خانه (Nunc-Maxisorb) با ۵۰-۱۰۰۰ ng از محلول میکروسفرهای حاوی TT و همچنین محلول TT استاندارد در بافر فسفات (pH ۷/۴ و ۰/۰۵ M) روکش داده شد، ۱۰ ml از هر غلظت در چهار ردیف اضافه شد و به مدت یک ساعت

نتایج و بحث

تهیه میکروسفرهای آلژینات و بررسی برخی از عوامل

موثر بر ویژگیهای اندازه و شکل میکروسفرها

اثر برخی از متغیرها شامل غلظت سورفکتانت، غلظت آلژینات سدیم، زمان سونیکاسیون، غلظت کلرید کلسیم و حجم محلول کلرید کلسیم (جدول ۱) بر خصوصیات اندازه و شکل میکروسفرهای تهیه شده ارزیابی شد. اثر هر متغیر بر ویژگیهای اندازه ذره‌ای (شامل میانگین قطر و محدوده اندازه ذره‌ای و درصد میکروسفرهای بزرگتر از $10 \mu\text{m}$) با استفاده از میکروسکوپ نوری و همچنین دستگاه آنالیز کننده اندازه ذره‌ای (PSA) بررسی شد.

تعدادی عکس تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی از میکروسفرهای آلژینات در شکل ۱ ارائه شده است. در این مطالعات، همه قطره‌های میانگین حجمی به دست آمده از PSA کوچکتر از قطرهای میانگین محاسبه شده توسط مشاهدات میکروسکوپی بود. در مشاهدات میکروسکوپی، کوچکترین اندازه مشخص شده بر چشمی مدرج، یک میکرون است به این خاطر میکروسفرهای کوچکتر از یک میکرون قابل اندازه‌گیری نیستند. به این دلیل در محاسبات، قطرهای زیر یک میکرون برابر یک میکرون در نظر گرفته شد. اما در PSA قطر ذرات تا $0.2 \mu\text{m}$ قابل اندازه‌گیری است و این قطرها در معدل گیری‌ها وارد می‌شود. به این دلیل میانگین قطر حجمی گزارش شده توسط PSA کوچکتر از قطر میانگین میکروسکوپی است.

اثر غلظت سورفکتانت

سوربیتان مونو اولئات (Sorbitan monooleate, Span

80) به عنوان امولسیون کننده لیپوفیل، برای امولسیون کردن محلول آلژینات سدیم در اکتانول استفاده شد. اسپان ۸۰ در غلظت‌های ۱، ۲، و 3 w/v در اکتانول حل شدند (سریهای ساخت B-۲، B-۱، و B-۳ جدول ۱). هر سری ساخت سه بار تکرار شد و تاثیر هر غلظت بر ویژگیهای میکروسفرها بررسی شد (جدول ۳). قطر میکروسفرهای تهیه شده با غلظت‌های $1-3 \text{ w/v}$ سورفکتانت مشابه بود

($P > 0.05$). درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون در سری B-۳ به صورت معنی‌داری کمتر از دو سری دیگر است ($P < 0.05$). با توجه به محدوده اندازه ذره‌ای و درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون، سری B-۳ توزیع ذره‌ای محدودتری نسبت به B-۱ و B-۲ دارد.

میکروسفرهای تهیه شده با ۲٪ سورفکتانت (B-۱) بهترین ویژگیهای شکلی را نشان می‌دهند. این ویژگیها شامل عدم ناصافی سطح، عدم تخلخل سطحی، به هم چسبیدگی کم و کرویت بالا است. در میکروسفرهای تهیه شده با ۳٪ سورفکتانت، به هم چسبیدگی خیلی زیاد است. به نظر می‌رسد با افزایش غلظت سورفکتانت از ۲٪ به ۳٪، برخی میکروسفرهای خیلی کوچک به یکدیگر می‌چسبند و احتمالاً به همین دلیل نیز در سری B-۳، میکروسفرهای زیر یک میکرون به دست نیامده است (ستون محدوده ذره‌ای به دست آمده از PSA).

اثر غلظت آلژینات سدیم

در مورد غلظت مطلوب از سدیم آلژینات برای تهیه میکروسفرها با خصوصیات اندازه و شکلی مطلوب، گزارشهای متفاوتی در منابع وجود دارد. Cho و همکارانش (۶) با پیشنهاد غلظت 5 w/v ٪ به عنوان غلظت مطلوب، گزارش کرده‌اند که در غلظت‌های بالاتر تهیه میکروسفرهای کوچک و یکنواخت مشکل بوده است، حال آنکه در غلظتهای کمتر میکروسفرهای به هم چسبیده به دست می‌آمده است. در همین حال Wan و همکارانش (۲۴) بهترین میکروسفرها را با غلظت $2-3 \text{ w/v}$ ٪ از آلژینات تهیه کردند.

در این تحقیق، پس از انجام برخی آزمایشهای اولیه (نتایج ذکر نشده‌اند)، به نظر رسید که به دلیل ویسکوزیته بالای غلظتهای ۵٪ و بالاتر از محلول آلژینات، این غلظت‌ها نمی‌توانند میکروسفرهای مطلوبی ایجاد کنند. سه غلظت ۲، ۳ و 4 w/v ٪ (سریهای ساخت B-۴، B-۱، و B-۵ جدول ۱) مورد مطالعه قرار گرفت و اثر این غلظت‌ها بر ویژگیهای میکروسفرها بررسی شد (جدول ۳).

میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز

می تواند ناشی از ویسکوزیته بالاتر محلول ۴٪ آلژینات باشد. میکروسفرهای تهیه شده با این سه غلظت از سدیم آلژینات دارای به هم چسبیدگی کم یا بدون به هم چسبیدگی هستند. به نظر می رسد که به هم چسبیدگی میکروسفرها از غلظت آلژینات تاثیر نمی پذیرد.

در سری های ساخته شده با غلظتهای ۳٪ و ۴٪ آلژینات، کروییت بالا است، اما کروییت میکروسفرهای تهیه شده با محلول ۲٪ سدیم آلژینات کم است. یک فرضیه برای این مشاهده می تواند ویسکوزیته کم محلول ۲٪ از آلژینات باشد. هنگامی که آلژینات امولسیون شده در اکتانول به محلول در حال چرخش کلرید کلسیم در اکتانول اضافه می شود، به خاطر ویسکوزیته کم قطره های آلژینات، نیروی برش ناشی از چرخش محلول می تواند قبل از ژل شدن قطره ها در حضور یون کلسیم، در آنها ایجاد کشیدگی نماید.

تحقیقات قبلی نشان داده است که با افزایش غلظت و وزن مولکولی آلژینات که موجب افزایش ویسکوزیته محلولها می شود، اندازه میکروسفر نیز افزایش می یابد (۱۶، ۱۴). در تحقیق فعلی، در حالی که قطرهای میانگین به دست آمده از میکروسکوپ در توافق با گزارشهای بالاست (P < ۰/۰۵)، B-۴ > B-۱ > B-۵، قطرهای میانگین به دست آمده از PSA تفاوت معنی داری با هم ندارند (P < ۰/۰۵). غلظت آلژینات اثر واضحی روی محدوده اندازه ذره ای دارد. با افزایش غلظت از ۲٪ به ۴٪، درصد بالاتری از میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون (P < ۰/۰۵) و B-۵ > B-۱ > B-۴ و دامنه اندازه ذره ای وسیعتری (P < ۰/۰۵) B-۴ = B-۱ > B-۵ به دست آمده است. سطح سری های تهیه شده از محلول با غلظت ۲٪ و ۳٪ از آلژینات نسبتا صاف بود، اما میکروسفرهای تهیه شده با محلول ۴٪ آلژینات دارای سطوح ناصافی هستند. این ناصافی

جدول ۱: عوامل مختلف مورد تحقیق در تهیه میکروسفرهای آلژینات

سری ساخت	غلظت سورفکتانت (w/w%)	غلظت آلژینات (w/v%)	زمان سونیکاسیون (ثانیه)	غلظت کلرید کلسیم (w/v%)	حجم محلول کلرید کلسیم (ml)
B-۱	۲	۳	۳×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۲	۱	۳	۳×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۳	۳	۳	۳×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۴	۲	۲	۳×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۵	۲	۴	۳×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۶	۲	۳	۲×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۷	۲	۳	۱×۳۰	۰/۳۳	۶۰
B-۸	۲	۳	۳×۳۰	۰/۲۵	۶۰
B-۹	۲	۳	۳×۳۰	۰/۵۰	۶۰
B-۱۰	۲	۳	۳×۳۰	۰/۳۳	۳۰
B-۱۱	۲	۳	۳×۳۰	۰/۳۳	۹۰

جدول ۲: معیارهای مورد استفاده در کمی کردن متغیرهای کیفی

ویژگی کیفی	تعریف	درصد میکروسفرها	معیار کمی
ناصافی سطح میکروسفرها	وجود حفرات بسیار کوچک روی سطح میکروسفرها	۱-۲۵ ۲۵-۵۰ ۵۰-۷۵ ۷۵-۱۰۰	۱ ۲ ۳ ۴
تخلخل سطحی	وجود حفرات و تورفتگی های بزرگ بر سطح میکروسفرها	۱-۳ ۳-۵ ۵-۸ ۸-۱۰	۱ ۲ ۳ ۴
به هم چسبیدگی	وجود میکروسفرهای به هم چسبیده	۱-۱۰ ۱۰-۲۰ ۲۰-۵۰ ۵۰-۱۰۰	۱ ۲ ۳ ۴
کروییت	کره کامل بیضی کامل اعداد مابین ۱ و ۳ به صورت مقایسه ای انتخاب شدند		۴ ۱-۳

دکتر محسن تفقدی

جدول ۳: خصوصیات میکروسفرهای آلزینات حاوی TT، تهیه شده با شرایط فرمولاسیونی مختلف

سری ساخت	قطر میانگین (μM) میکروسکوپ	قطر میانگین حجمی (μM) (PSA)	دامنه اندازه (μM)	درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ μM (میکروسکوپ)	بازده وزنی	ناهواری سطح*	تخلخل سطح*	هم چسبیدگی*	کرویت میکروسفرها*
B-۱	۲/۲ ± ۰/۱	۱/۳ ± ۰/۴	۰/۳-۱/۲	۱/۵ ± ۰/۷	۹۰ ± ۳۳٪	۰	۰	۱ ± ۰	۳/۵ ± ۰/۷
B-۲	۱/۹ ± ۰/۱	۱/۱ ± ۰/۵	۰/۳-۲/۱	۱/۱ ± ۰/۳	۱۱۷ ± ۱۶٪	۱/۲ ± ۰/۸	۰/۷ ± ۰/۳	۲/۳ ± ۰/۶	۳/۳ ± ۰/۶
B-۳	۱/۷ ± ۰/۳	۱/۴ ± ۰/۶	۱/۰-۱/۶	۰/۳ ± ۰/۳	۱۴۰ ± ۹٪	۱/۱ ± ۰/۵۸	۰/۷ ± ۰/۶	۴ ± ۰	۳/۳ ± ۰/۶
B-۴	۱/۴ ± ۰/۲	۱/۱ ± ۰/۴	۰/۳-۲/۰	۰	۱۵۲ ± ۱۲٪	۰/۲ ± ۰/۳	۰	۰	۲/۳ ± ۱/۵
B-۵	۳/۴ ± ۰/۶	۴/۳ ± ۲/۹	۰/۵-۷/۳	۶/۵ ± ۰/۴	۷۵ ± ۲۵٪	۱/۵ ± ۰/۷	۰	۰/۲ ± ۰/۳	۳/۵ ± ۰/۷
B-۶	۱/۹ ± ۰/۴	۲/۷ ± ۰	۱/۶-۳/۵	۱ ± ۰/۳	۱۰۴ ± ۳۳٪	۱/۳ ± ۱/۵	۰/۷ ± ۰/۶	۲ ± ۱	۳ ± ۱
B-۷	۲/۰ ± ۰/۱	۱/۶ ± ۰/۵	۰/۹-۲/۱	۰/۷ ± ۰/۵	۱۴۱ ± ۱۵٪	۱/۸ ± ۱	۱/۷ ± ۱/۶	۲ ± ۱/۷	۲/۷ ± ۱/۵
B-۸	۱/۹ ± ۰/۴	۱/۶ ± ۰/۱	۰/۸-۲/۳	۱/۸ ± ۱/۹	۹۴ ± ۲۸٪	۲ ± ۱	۰/۷ ± ۰/۶	۱/۸ ± ۱/۲	۳ ± ۰
B-۹	۲/۳ ± ۰/۵	۲/۲ ± ۰/۸	۱/۱-۳/۴	۲ ± ۰/۱	۱۴۵ ± ۵٪	۲ ± ۱/۷	۰/۷ ± ۰/۱	۳ ± ۰/۱	۳/۳ ± ۰/۶
B-۱۰	۲/۲ ± ۰/۱	۱/۹ ± ۰/۲	۱/۱-۲/۷	۱/۵ ± ۱/۰	۱۴۴ ± ۱۳٪	۲/۷ ± ۲/۳	۰	۲/۷ ± ۲/۳	۳ ± ۰
B-۱۱	۲/۳ ± ۰/۴	۲/۰ ± ۰/۵	۰/۷-۴/۴	۲/۱ ± ۱/۹	۱۰۹ ± ۳۳٪	۱/۳ ± ۱/۵	۰	۱/۳ ± ۱/۱	۳/۷ ± ۰/۶

* ۰ = ندارد، ۱ = کم، ۲ = متوسط، ۳ = زیاد، ۴ = خیلی زیاد

جدول ۴: ارتباط میان به هم چسبیدگی و بازده وزنی تهیه میکروسفر در میکروسفرهای تهیه شده با محلول آلزینات ۳ w/v

سری ساخت	B-۳	B-۹	B-۱۰	B-۲	B-۷ و B-۶**	B-۸	B-۱۱	B-۱
هم چسبیدگی*	۴	۳	۲/۷	۲/۳	۲	۱/۸	۱/۳	۱
بازده وزنی (%)	۱۴۰	۱۴۵	۱۴۴	۱۱۷	۱۲۳	۹۴	۱۰۹	۹۰

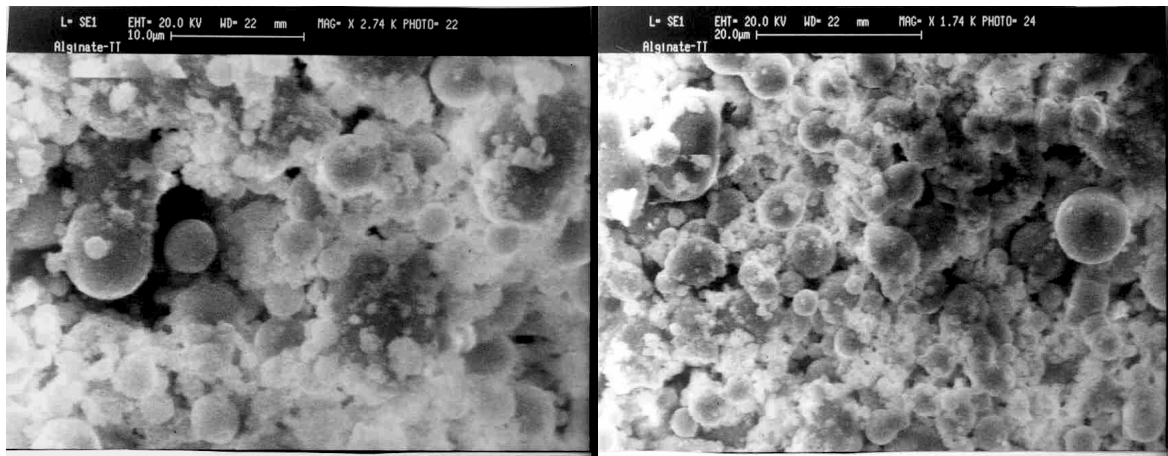
* ۰ = ندارد، ۱ = کم، ۲ = متوسط، ۳ = زیاد، ۴ = خیلی زیاد

** (B۶ + B۷) / ۲

جدول ۵: میزان انکپسولاسیون TT در میکروسفرهای مختلف و مقدار TT رهش یافته (μg) در ساعت اول و پس از یک هفته

سری ساخت	B-۱	B-۲	B-۳	B-۴	B-۵	B-۶	B-۷	B-۸	B-۹	B-۱۰	B-۱۱
درصد انکپسولاسیون	۴۷/۷	۴۱/۶	۲۹/۲	۲۶/۲	۲۵/۶	۲۶/۲	۲۸/۸	۳۴/۳	۳۴/۶	۲۹/۶	۳۲/۴
SD (n=۳)	۶/۶	۱۱/۷	۲/۷	۵/۰	۳/۷	۳/۷	۹/۲	۳/۲	۶/۸	۹/۰	۷/۰
رهش ساعت اول	-	۶/۲	۳/۴	۳/۲	۲/۶	۳	۳/۲	۳/۲	۱/۲	۰	۴/۸
رهش پس از یک هفته	-	۲۹/۸	۲۷/۱	۲۴/۴	۲۵/۲	۲۵/۶	۲۵	۳۱/۳	۲۱/۴	۱۷/۶	۲۷/۸
درصد رهش ساعت اول به یک هفته	-	۲۱	۱۲/۵	۱۳/۲	۱۰/۳	۱۱/۷	۱۲/۸	۱۰/۲	۵/۶	۰	۱۷/۳

میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز



شکل ۱. عکس‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی از میکروسفرهای آلژینات حاوی توکسوئید کزاز (سری B-۱)

نظر می‌رسد در تهیه امولسیون آلژینات با استفاده از سونیکاسیون، زمان بیشتر سونیکاسیون باعث پردازش سطح قطره‌های آلژینات در امولسیون شده و در نتیجه منجر به تشکیل میکروسفرهای صاف تر و با تخلخل کمتر و کرویتر می‌شود.

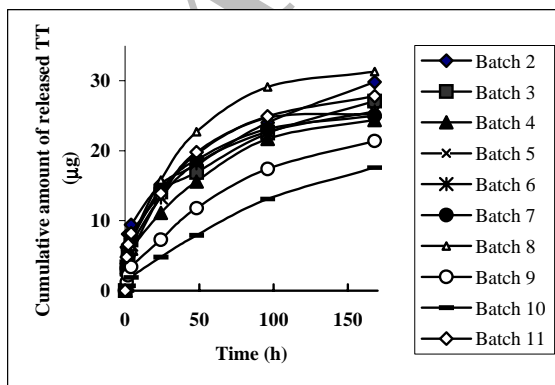
اثر غلظت کلرید کلسیم

زمان افزودن آلژینات سدیم امولسیون شده به محلول کلرید کلسیم در اکتانول، گروه‌های کربوکسیلات از مونومرهای گلورونات آلژینات با کلسیم کمپلکس می‌دهند. این تشکیل شبکه باعث جمع شدن میکروسفر و کاهش حجم اشغال شده توسط قطره‌های آلژینات می‌شود. این مساله باعث کاهش حجم و قطر میکروسفرها می‌شود (۷). در تحقیق حاضر، اثر سه غلظت (۲۵٪، ۳۳٪، و ۵ w/v٪) از کلرید کلسیم در اکتانول (سریهای ساخت B-۸، B-۱، و B-۹ جدول ۱) بر اندازه

اثر زمان سونیکاسیون

از آنجایی که قطره‌های امولسیون شده آلژینات تبدیل به میکروسفر می‌شوند، فرایند امولسیون کردن و امولسیون به دست آمده اثرات مهمی بر ویژگیهای میکروسفرهای نهایی دارند. Cho و همکارانش (۶) گزارش کرده‌اند که سرعت چرخش هموژنایزر، نقش مهمی در تشکیل قطره‌های امولسیون با قطر مطلوب دارد. این محققین نشان داده‌اند که در یک زمان ثابت، در سرعت‌های کمتر از ۵۰۰۰ دور در دقیقه، میکروسفرهای هتروژن با قطر بیش از ۱۰ میکرون به دست می‌آید، حال آنکه در سرعت‌های بیش از ۸۰۰۰ rpm، میکروسفرهای به هم چسبیده و با بازده کم به دست می‌آید. این گروه در نهایت سرعت rpm ۸۰۰۰ هموژنایزر به مدت یک ساعت را وضعیت مطلوب پیشنهاد کردند.

در تحقیق فعلی، برای تهیه امولسیون، به جای هموژنایزر از پروب سونیکاتور استفاده شد و اثر زمانهای مختلف سونیکاسیون (سریهای ساخت B-۷، B-۱، و B-۶ جدول ۱) بر میکروسفرهای تهیه شده ارزیابی گردید (جدول ۳). به نظر می‌رسد در محدوده زمانی کار شده، زمان سونیکاسیون اثر معنی‌داری روی قطر میانگین (میکروسکوپ)، درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون، بازده وزنی میکروسفر ($P > 0.05$) و محدوده اندازه ذره‌ای ندارد، اما زمان سونیکاسیون روی خصوصیات شکلی میکروسفر موثر بود. به



شکل ۲. مقدار تجمعی رهش یافته (µg) از توکسوئید کزاز از سریهای مختلف میکروسفر آلژینات در عرض یک هفته

آلژینات می‌شود. این برخورد بیشتر می‌تواند دلیل ناصافی و به هم چسبیدگی بیشتر میکروسفرها و کرویت کمتر آنها باشد. عامل دیگری که می‌تواند با افزایش برخورد میکروسفرها بر روی آنها اثر بگذارد، سرعت چرخش محلول کلرید کلسیم در اکتانول است. در آزمایشهای مقدماتی (نتایج ذکر نشده است) این نتیجه حاصل شد که سرعت چرخش این محلول نقش مهمی در ویژگیهای ظاهری و به خصوص به هم چسبیدگی میکروسفرها دارد. با افزایش سرعت چرخش، برخورد بیشتری بین قطره‌های امولسیون شده آلژینات و میکروسفرهای شکل گرفته اتفاق می‌افتد و به هم چسبیدگی بیشتری را باعث می‌شود.

بهترین شرایط برای کسب میکروسفرهای جدا از هم و با سطح صاف، فقط سرعت به هم زدن محلول در حداقل سرعت مورد نیاز برای چرخش ملایم محلول است. این مساله توسط محققین دیگر نیز توصیه شده است (۶).

بازده وزنی میکروسفرهای تهیه شده

نسبت وزن میکروسفرهای آلژینات خشک شده در دسیکاتور به وزن پودر خشک سدیم آلژینات مورد استفاده در تهیه میکروسفر به عنوان بازده وزنی تعریف می‌شود. با مرور بازده وزنی سری‌های ساخت مختلف (جدول ۷-۳)، دو پرسش مطرح می‌شود:

اول اینکه دلیل بازده وزنی کم سری B-۵ چیست؟

در امولسیون کردن محلول آلژینات ۴٪ (سری B-۵) مشاهده شد که احتمالاً "به خاطر ویسکوزیته بالای محلول آلژینات، مقادیری از آلژینات به صورت امولسیون نشده باقی می‌ماند. این مورد در غلظتهای بالاتر محلولهای آلژینات در آزمایشهای مقدماتی نیز مشاهده شد (نتایج ذکر نشده است). در سری‌های تهیه شده با محلول ۵٪ آلژینات، بازده وزنی میکروسفر ۳۰٪ بود و مقدار زیادی از محلول آلژینات به صورت امولسیون نشده در ته و دیواره‌های ظرف باقی ماند.

پرسش دوم این است که دلیل بازده وزنی بیش از ۱۰۰٪ چیست؟

میکروسفر و ویژگیهای ظاهری آنها بررسی گردید (جدول ۳). در این غلظتهای کلرید کلسیم، قطر میانگین (میکروسکوپ و PSA)، درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون (۰/۰۵) ($P >$) و محدوده اندازه ذره‌ای سری‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. اما از نظر ویژگیهای ظاهری، بهترین غلظت کلسیم، ۳۳ w/v / ۰٪ بود. میکروسفرهای تهیه شده با این غلظت از کلرید کلسیم در اکتانول صاف و بدون تخلخل، دارای به هم چسبیدگی کم و کرویت بالا بودند. یک نکته قابل توجه به هم چسبیدگی بالای میکروسفرهای تهیه شده با ۰/۵٪ کلرید کلسیم بود. در آزمایشهای مقدماتی (نتایج ذکر نشده است)، غلظتهای بالاتر کلرید کلسیم (تا ۳ w/v / ۰٪) نیز بررسی شد، اما در تمامی میکروسفرهای ساخته شده با این غلظتهای بالا از کلرید کلسیم به هم چسبیدگی زیادی مشاهده می‌شد. به نظر می‌رسد در غلظتهای بالای کلسیم، لایه ژلی خارجی بر سطح میکروسفر به سرعت تشکیل شده در نتیجه موجب به هم چسبیدگی بیشتر میکروسفرها می‌شود.

اثر حجم محلول کلرید کلسیم در اکتانول

سه حجم متفاوت از محلول ۳۳ w/v / ۰٪ کلرید کلسیم در اکتانول (سریهای ساخت B-۱۰، B-۱، B-۱۱ و B-۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. این متغیر اثر معنی‌داری روی قطر میانگین (میکروسکوپ و PSA)، درصد میکروسفرهای بزرگتر از ۱۰ میکرون، بازده وزن میکروسفر ($P >$ ۰/۰۵) و محدوده اندازه ذره‌ای میکروسفرها ندارد، اما بر خصوصیات ظاهری میکروسفرها تاثیر می‌گذارد (جدول ۳). با در نظر گرفتن همه متغیرهای مورد بررسی، سری ساخت B-۱ به عنوان بهترین سری ارزیابی شد. میکروسفرهای تهیه شده با ۳۰ میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم در اکتانول بیشترین ناصافی و به هم چسبیدگی و کمترین کرویت را نشان دادند. به نظر می‌رسد هنگامی که حجم ثابتی از امولسیون آلژینات در اکتانول به محیط ژل شدن (کلرید کلسیم در اکتانول) اضافه می‌شود، کاهش حجم محیط ژل شدن باعث برخورد بیشتر بین قطره‌های امولسیون شده و میکروسفرهای شکل گرفته

داده‌اند که رهش دکستران از آلزینات يك فرایند وابسته به وزن مولکولی است. رهش برای دکستران با وزن مولکولی کم تحت کنترل پدیده انتشار است و برای دکستران با وزن مولکولی بالاتر، رهش تحت کنترل متلاشی شدن ژل آلزینات می‌باشد. رهش دکستران تحت تاثیر تبادل یونهای سدیم موجود در PBS و یونهای کلسیم متصل به گروههای کربوکسیلات در مولکول آلزینات نیز قرار می‌گیرد. این تبادل بر روی اغلال ژل آلزینات و به این ترتیب رهش دکستران با وزن مولکولی بالا اثر می‌گذارد (۱۵).

عامل دیگر موثر بر رهش مواد از ژلهای آلزینات، ظرفیت و شعاع کاتیون مورد استفاده است. Al-musa و همکارانش (۱) نشان داده‌اند که در کراس لینک کردن بیدهای آلزینات سدیم، کاتیونهای سه ظرفیتی مثل Al^{3+} در هنگام اتصال به آلزینات يك شبکه سه بعدی تشکیل می‌دهد. در چنین ساختمانی تمامی یونهای آلومینیوم، قبل از کراس لینک شدن کامل سطح بید، قادر به انتشار به درون لایه ژل سطحی هستند. در حالی که در مورد کاتیونهای دو ظرفیتی مثل Ca^{2+} ، اتصال دو بعدی و يك سطحی آنها به آلزینات می‌تواند نفوذ کاتیونهای کلسیم را کاهش دهد و منجر به کراس لینک شدن کمتر ژل شود. تحقیقات نشان داده است که رهش از ژل آلزینات آلومینیوم کمتر از آلزینات کلسیم است (۱).

همانگونه که در شکل ۲ مشخص شده است همه سری‌های ساخت میکروسفرها (B۱۱-B۲) که در شرایط مختلف تهیه شده‌اند (جدول ۱)، الگوی رهش کمابیش مشابهی را نشان می‌دهند. به عنوان معیاری برای بیان رهش اولیه TT از میکروسفرهای آلزینات، نسبت TT رهش یافته در ساعت اول به کل رهش در يك هفته مقایسه شده است (جدول ۵). با توجه به تداخل داخلی بالای میکروسفرها و بیدهای آلزینات، رهش اولیه در کارهای محققین دیگر معمولاً "بسیار بالاست، به گونه‌ای که در برخی از آزمایشها ۹۰٪ ماده انکپسوله شده در عرض ۱۵ دقیقه رهش یافته است (۴). در این تحقیق مقدار TT

با در نظر گرفتن میکروسفرهای مختلف تهیه شده در شرایط متفاوت (جدول ۳)، به نظر می‌رسد که بازده وزنی بالای ۱۰۰٪ بیشتر در سری‌هایی دیده می‌شود که میزان به هم چسبیدگی بالایی را نشان می‌دهند (جدول ۴). این مشاهده را می‌توان به صورت زیر توضیح داد: در پدیده سینرزیس (Syneresis) که در هنگام کراس لینک شدن آلزینات با یون کلسیم اتفاق می‌افتد، آب از میکروسفر به بیرون تراوش می‌کند و وزن و حجم میکروسفر کاهش می‌یابد (۷).

در میکروسفرهای به هم چسبیده خروج آب از میکروسفرهای داخلی کاهش می‌یابد و در مقایسه با میکروسفرهای جدا از هم آب بیشتری درون توده به هم چسبیده میکروسفرها حتی پس از خشک کردن در دسیکاتور باقی می‌ماند. آب باقی مانده می‌تواند دلیل بازده وزنی بیش از ۱۰۰٪ باشد. در جدول ۸ نشان داده شده است که با افزایش به هم چسبیدگی از متوسط به زیاد، بازده وزنی از حدود ۱۰۰٪ به ۱۴۰٪ افزایش یافته است.

میزان انکپسولاسیون توکسوئید کزاز (TT) در میکروسفرهای آلزینات

میزان انکپسولاسیون TT در سریهای مختلف میکروسفرها تعیین شد (جدول ۵). برای مقایسه میزان انکپسولاسیون در میان سری‌های مختلف ساخت، از تست ANOVA يك طرفه استفاده شد. در حالی که میزان انکپسولاسیون در سریهای B-۲ تا B-۱۱ تفاوت معنی‌داری ندارند ($P > 0/05$)، میزان انکپسولاسیون سری B-۱ به صورت معنی‌داری بیشتر از سری‌های B-۳ تا B-۷ و سری B-۱۰ می‌باشد ($P > 0/05$).
اثر متغیرهای دخیل در تهیه میکروسفر بر رهش برون تن آنتی ژن از میکروسفرها

رهش برون تن مواد انکپسوله شده در میکروسفر آلزینات می‌تواند تحت تاثیر عوامل متعددی قرار گیرد. محققین نشان داده‌اند که سرعت رهش داروهای با وزن مولکولی کم با افزایش نسبت اسید مانورونیک به اسید گلورونیک افزایش می‌یابد (۱۷، ۲۱، ۲۲). Kikuchi و همکارانش نیز نشان

استفاده از روش تعیین مقدار پروتئین میکرو BCA اندازه‌گیری شد. آنتی ژنیسیته TT انکپسوله با افزودن مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم از TT انکپسوله شده (هر غلظت در سه ردیف اضافه شد) در حضور مقادیر مشابه از TT اولیه (هر غلظت در چهار ردیف) تعیین شد. در این آزمایش، میزان آنتی ژنیسیته TT انکپسوله شده برابر $91 \pm 5\%$ بود. بنابراین در روش تهیه مورد استفاده در این تحقیق، شرایط نامساعد می‌توانند بر آنتی ژن اثر بگذارند و آنتی ژنیسیته آن را تا حدود ۹٪ کاهش دهند هر چند این شرایط اثری بر ساختمان توکسوئید کزاز نداشتند.

نتیجه‌گیری

میکروسفرهای تهیه شده با ۲ w/v٪ سورفکتانت (اسپان ۸۰)، ۳ w/v٪ سدیم آلژینات، ۹۰ ثانیه سونیکاسیون و ژل شده در ۶۰ ml محلول کلرید کلسیم در اکتانول (۳۳ w/v٪) (سری ساخت B-۱، جدول ۱)، بهترین خصوصیات و بالاترین میزان انکپسولاسیون را در میان سریهای مختلف (۴۷/۷٪) از خود نشان دادند. این میکروسفرها دارای قطر میانگین حجمی $1/34 \mu\text{m}$ ، بدون ناصافی یا تخلخل سطحی، با به هم چسبیدگی کم و کرویت بالا بودند. نحوه رهش توکسوئید کزاز به عنوان یک آنتی ژن مدل، از سریهای ساخت مختلف بررسی شد. ۲۱-۵٪ کل TT رهش یافته در عرض یک هفته، در ساعت اول آزاد شد. فرایند ساخت اثری بر ساختمان TT نداشت اما آنتی ژنیسیته آن را در مقایسه با TT اولیه تا حدود ۹٪ کاهش داد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با استفاده از بودجه اختصاص یافته توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد.

References

1. Al-Musa S., Abu Fara D., Badwan A. A., 1999, Evaluation of parameters involves in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate, J. Con. Rel., 57, 223-232.
2. Bowersock T. L., HogenEsch H., Suckow M., Porter R. E., Jackson R., Park H., Park K., 1996, Oral vaccination with alginate microsphere systems, J. Control. Rel., 39, 209-220.

رهش یافته در ساعت اول بین ۲۱-۵٪ کل رهش در یک هفته است. این مورد را می‌توان به عنوان دلیلی برای تخلخل کمتر میکروسفرهای تهیه شده با این روش در نظر گرفت.

با مقایسه دو سری B-۲ و B-۳ که با درصدهای مختلفی از سورفکتانت تهیه شده‌اند (جدول ۲)، سری B-۳ رهش اولیه کمتری نسبت به B-۲ نشان می‌دهد. با رجوع به جدول ۲ مشخص می‌شود که تفاوت اصلی میان این دو سری ساخت درجه بالاتر به هم چسبیدگی در میکروسفرهای B-۳ است. به نظر می‌رسد که به هم چسبیدگی بیشتر، سطح موثر تماس میکروسفرها با محیط رهش را کاهش می‌دهد و باعث رهش اولیه کمتر می‌شود. چنین توجیهی را می‌توان در مقایسه سری‌های B-۴ و B-۵، B-۸ و B-۹، B-۱۰ و B-۱۱ نیز مطرح کرد. مقدار کل TT رهش یافته از میکروسفرها در یک هفته، بین ۱۰-۳۰ μg بود.

دست نخورده ماندن ساختمان و میزان آنتی ژنیسیته توکسوئید کزاز پس از فرایند انکپسولاسیون

یک پیش نیاز مهم برای یک سیستم دارورسانی مورد استفاده برای آنتی ژنها، حفظ ساختمان و به ویژه آنتی ژنیسیته آنتی ژن است. در فرایند انکپسولاسیون TT در میکروسفر آلژینات، آنتی ژن در معرض شرایط نامساعد متعددی از جمله تماس با حلالهای آلی، سورفکتانتها و سونیکاسیون قرار می‌گیرد. چنین شرایطی دارای این پتانسیل هستند که بر ساختمان یا آنتی ژنیسیته آنتی ژنها اثر بگذارند. به این دلیل پایداری توکسوئید کزاز انکپسوله در میکروسفرهای سری B-۱ با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. در ژلهای SDS-PAGE، TT اولیه و TT انکپسوله شده در میکروسفرها نوارهای پروتئینی یکسانی ایجاد کردند که نشان دهنده حفظ ساختمان TT در فرایند ساخت میکروسفر بود. برای تعیین آنتی ژنیسیته TT انکپسوله شده در میکروسفرهای آلژینات، از یک روش الیزا استفاده شد. پس از انحلال میکروسفرهای حاوی TT (سری B-۱) در محلول ۰/۱ M سدیم سیترات (۷/۴ pH)، مقدار TT موجود در محلول با

- dextran with different molecular weights, *J. Con. Rel.*, 58, 21-28.
16. Lemoine D., Wauters F., Bouchend'homme S., Preat V., 1998, Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen, *Int. J. Pharm.*, 176, 9-19.
 17. Murata Y., Nakada K., Miyamoto E., Kawashima S., Seo S., 1993, Influence of erosion of calcium-induced alginate gel matrix on the release of brilliant blue, *J. Con. Rel.*, 21-26.
 18. O'Hagan D. T., 1996, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery, *J. Anat.*, 189, 477-482.
 19. Pillay V., Fassihi R., 1999, In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets, *J. Control. Rel.*, 59, 243-256.
 20. Rebelatto M. C., Guidmond P., Bowersock T. L., HogenEsh H., 2001, Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles, *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 83; 93-105.
 21. Sugawara S., Imai T., Otagiri M., 1993, The controlled release prednisolone using alginate gel, *Pharm. Res.*, 11(2), 272-277.
 22. Tateshita K., Sugawara S., Imai T., Otagiri M., 1993, Preparation and evaluation of a controlled release formulation of nifedipine using alginate gel beads, *Biol. Pharm. Bull.*, 16(4), 420-424.
 23. Vandenberg G. W., Drolet C., Scott S. L., de la Noue, J., 2001, Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation, *J. Con. Rel.*, 77, 297-307.
 24. Wan L. S. C., Heng P. W. S., Chan L. W., 1990, Development of alginate microcapsules by emulsification, *Proceedings of the NUS-JSPS. Seminar on Recent Developments in Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Japan: Chiba. University)*, PP. 243-255.
 25. Wee S. F., Gombotz W. R., Fanslow W., 1995, Evaluation of alginate microbeads for intranasal delivery of ovalbumin, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, 22, 566-567.
 3. Bowersock T. L., HogenEsh H., Torregrosa S., Boric D. L., Park H., Park K., 1998, Induction of pulmonary immunity in cattle by the oral administration of antigen encapsulated in alginate microspheres, *Thematic issue on mucosal immunity, S.T.P. Pharma Sci.*, 8(1), 53-57.
 4. Chan L. W., 1997, Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification, *J. microencap.*, 14(5); 545-555.
 5. Chan L. W., Heng P. W. S., 2002, Effects of aldehydes and methods of cross-linking on properties of calcium alginate microspheres prepared by emulsification, *Biomaterials*, 23, 1319-1326.
 6. Cho N. H., Seong S. Y., Chun K. H., Kim Y. H., Kwon I. C., Ahn B. Y., Jeong S. Y., 1998, Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres, *J. Control. Rel.*, 53, 215-224.
 7. Dashevsky A., 1998, Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads, *Int. J. Pharm.*, 161, 1-5.
 8. Diwan M., Khar R. K., Talwar G. P., 2001, Tetanus toxoid loaded 'preformed microspheres' of cross-linked dextran, *Vaccine*, 19, 3853-3859.
 9. Eldridge H. H., Staas J. K., Meulbroek J. A., McGee J. R., Trice T. R., Gilley R. M., 1991, Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system, *Mol. Immunol.*, 28(3), 287-294.
 10. Esquisabel A., Hernandez R. M., Igartua M., Gascon A. R., Calvo B., Pedraz J. L., 1997, Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation, *J. Microencap.*, 14, 627-638.
 11. Florence A. T., 1997, The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual, *Pharm. Res.*, 14(3), 259-266.
 12. Gombotz W. R., Wee S. F., 1998, Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 31, 267-285.
 13. Gürsoy A., Karakus D., Okar I., 1999, Polymers for sustained release formulations of dipyridamole-alginate microspheres and tableted microspheres, *J. Microencap.*, 16, 439-452.
 14. Jeffery H., Davis S. S., O'Hagan D. T., 1991, The preparation and characterisation of poly (lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.*, 77, 169-175.
 15. Kikuchi A., Kawabuchi M., Watanabe A., Sugihara M., Sakurai Y., Okano T., 1999, Effect of Ca²⁺-alginate gel dissolution on release of

Archive of SID