مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۹، شماره٤، زمستان ۱۳۸۵، ۲۳۰-۲۲۳
تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۲۵، تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۳۰

Archive of SID

بررسی پاسخهای ایمنی سیستمیک و مخاطی پس از ایمن سازی از راه بینی با لیپوزومهای حاوی توکسوئید کزاز با اندازه های مختلف

*[1]دکتر محسن تفقدی، [2]دکتر محمودرضا جعفری، [3]دکتر افشین نیکوزاده

چکیده

هدف

لیپوزومها، ادجوانتهای (adjuvants) ایمنولوژیک موثری هستند که برای تجویز آنتی ژنهای پروتئینی از راه بینی و خوراکی قابلیتهای مناسبی دارند. ویژگیهای فیزیکوشیمیایی لیپوزومها از جمله اندازه لیپوزوم می توانند روی استفاده آنها به عنوان یک سامانه دارورسانی و ادجوانت واکسن تاثیر گذار باشند.

مواد و روش کار

در این تحقیق پس از تجویز بینی لیپوزومها، اثر اندازه های مختلف لیپوزومهای حاوی توکسوئید کزاز (TT) تهیه شده به روش اکستروژن (extrusion) بر روی القا پاسخهای ایمنی سیستمیک و مخاطی بررسی شد. لیپوزومهای حاوی TT به روش دهیدراسیون- رهیدراسیون (DRV) تهیه شدند. لیپوزومهای با قطر ۱۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ nm به روش اکستروژن از لیپوزومهای DRV تهیه شدند. حیوانات سه نوبت با Lf ۴۰ لیپوزومی یا محلول ایمن سازی شدند. عیار IgG سرم و sIgA موجود در لاواژ بینی به روش الایزا (ELISA) تعیین شد.

نتایج

قطر میانگین DRVs برابر ۲/۲ µm بود. درصد محصورسازی TT در لیپوزومها بین ۷۴-۶۴/۳٪ متغیر بود. براساس مطالعات SDS-PAGE، TT محصور شده ساختمان خود را حفظ کرده بود. بالاترین عیار IgG سرمی در گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیونهای محلول مشاهده شد ($p<0/05$). اما بالاترین عیار sIgA مخاطی به وسیله لیپوزومهای با اندازه ۱۰۰ nm به دست آمد. در میان فرمولاسیونهای لیپوزومی، بالاترین عیار IgG سرمی به وسیله گروه DRV مشاهده شد ($p<0/001$). به نظر می رسد پاسخهای ایمنی مخاطی و سیستمیک به صورتی متفاوت تحت تاثیر اندازه ذره ای قرار دارند. پاسخهای ایمنی مخاطی به وسیله لیپوزومهای ۱۰۰ nm افزایش یافتند اما پاسخهای ایمنی سیستمیک کاهش یافتند.

نتیجه گیری

پس از ایمن سازی بینی با TT لیپوزومی، رابطه مستقیمی بین اندازه لیپوزوم و پاسخهای ایمنی مخاطی یا سیستمیک مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: اندازه لیپوزوم، ایمن سازی از راه بینی، توکسوئید کزاز.

۱- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
* نویسنده مسئول، تلفن: ٦٦-۸۸۲۳۲۵۵-۰۵۱۱، فاکس: ۸۸۲۳۲۵۱ -۰۵۱۱، tafaghadim@mums.ac.ir
۲- دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- داروساز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

محافظت در برابر موجودات بیماریزا، بیشتر با حضور آنتی بادیها در ترشحات موضعی مرتبط است تا با آنتی بادیهای سرمی (۱). موثرترین راه برانگیختن ایمنی مخاطی در دستگاه تنفسی فوقانی، ایمن سازی از راه بینی است (۲). ایمن سازی در سطوح مخاطی که آنتی بادی محافظ (ایمنوگلوبولین A (IgA) ترشحی) تولید می کنند، بسیار مهم است (۳، ۴).

یک مرحله مهم در ارائه آنتی ژن به سطوح مخاطی تهیه سامانه های دارورسانی موثر است (۳). در برانگیختن ایمنی سیستمیک و مخاطی، آنتی ژنهای ذره ای از آنتی ژنهای محلول موثرتر هستند، که احتمالا به خاطر اندوسیتوز بیشتر آنتی ژنهای ذره ای به وسیله سلولهای بافت لنفوئیدی متصل به مخاط (MALT) است (۲).

لیپوزومها ایمنی یارهای (ایمونوادجوانت) موثری به شمار می روند و قابلیت استفاده در تجویز بینی و خوراکی آنتی ژنهای پروتئینی را دارا می باشند (۵). لیپوزومها می توانند به نحوی موثر داروها و مواد زیستی گوناگون را در خود به دام اندازند و آنها را در درون بدن در دراز مدت آزاد نمایند. لیپوزومها ممکن است با کارایی مناسبی توسط سلولهای ارائه دهنده آنتی ژن، برگرفته شوند (۶، ۷). ویژگیهای فیزیکوشیمیایی لیپوزومها می تواند روی کارآیی آنها به عنوان سامانه دارورسانی و ادجوانت واکسن اثر بگذارد (۸). از این ویژگیها می توان به دمای گذر فاز مایع- بلور (T_C) لیپیدها، بار لیپیدها، اضافه نمودن کلسترول و اندازه لیپوزوم اشاره نمود (۵، ۹). روش آبگیری-آبدهی مجدد (دهیدراسیون- رهیدراسیون، DRV) یکی از پر کاربردترین روشهای مورد استفاده در محصورسازی آنتی ژنهای پپتیدی و پروتئینی می باشد. در این روش ماده محصور شده با شرایط نامساعدی همانند حلالهای آلی و سونیکاسیون مواجه نمی شود. به این خاطر این روش برای محصور سازی داروها و آنتی ژنهای پپتیدی و پروتئینی، روش انتخابی است. پس از مرحله خشک کردن انجمادی، لیپوزومها در حضور غلظت بالایی از ماده محصور شونده، دوباره شکل می گیرند و به این خاطر کفایت محصورسازی از سایر روشهای تهیه بیشتر است (۶، ۷). یکی از لازمه های مهم سامانه های ذره ای، به عنوان سامانه دارورسانی مخاطی موثر، اندازه ذره ای مناسب آنهاست. اندازه ذره ای روی برداشت آنها به وسیله سلولهای M موجود در بافت های لنفوئیدی متصل به مخاط و همچنین طبیعت پاسخ ایمنی تاثیر می گذارد (۱۰، ۱۱). مشخص شده است که در انسان ذرات با قطر بیش از ۳ میکرون هنگام استنشاق در حفره بینی باقی می مانند (۱۲). در گاو مشاهده شده است که لوزه ها می توانند ذرات رزین ۵-۱ میکرون را جذب نمایند (۱۳). مشخص شده که در لوزه های فارنژ گاو این جذب در اپیتلیوم لنفاوی و سلولهای M مربوط به آن انجام می شود (۱۴). سلولهای M که به نظر می رسد جایگاه اصلی برداشت آنتی ژنهای ذره ای هستند، در نواحی دور (دیستال) بینی، لوزه های نازوفارنژ و فکی و بافتهای لنفوئیدی متصل به برونش (BALT) در ریه یافت می شوند (۱۰).

در مطالعات ایمن سازی از راه بینی که با لیپوزومهای گوناگون حاوی توکسوئید کزاز (TT) انجام شده است، در پی دوز اولیه تنها لیپوزومهای دارای روکش کایتوزان و لیپوزومهای دارای بار منفی، عیار آنتی بادی ضد کزازی که ایجاد کردند بیش از موشهای دریافت کننده آنتی ژن آزاد بود ($p< ۰/۰۵$ ، $n = ۵$). پس از دوز یادآور، همه فرمولاسیونها عیار آنتی بادی بالاتری در مقایسه با موشهایی که آنتی ژن آزاد را به صورت محلول دریافت کرده بودند، نشان دادند ($p<۰/۰۵$ ، $n = ۵$) (۱۶).

در مطالعه دیگری پس از تجویز بینی، خوراکی و عضلانی، فرمولاسیون لیپوزومهای DSPC در حد معنی داری پاسخ ایمنی را در مقایسه با آنتی ژن آزاد افزایش داد. اما برای این که عیار IgG مشابه با تجویز عضلانی ایجاد شود، نیاز به تجویز ده برابر بیشتر از توکسوئید کزاز بود (۵). در مطالعات قبلی ما با لیپوزومهای DRV حاوی TT، فرمولاسیون لیپوزومی در مقایسه با محلول TT پاسخ ایمنی مخاطی بیشتر و سیستمیک کمتری ایجاد نمود (۱۷). همچنین نشان داده شده است که یک عامل مهم در اثر ادجوانتی ذرات، اندازه وزیکولها است که نه تنها تجویز آنتی ژن را افزایش می دهد، بلکه فراوری و ارائه آن به لنفوسیتها را نیز بهبود می بخشد (۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه، لیپوزومهای حاوی توکسوئید کزاز (TT) به روش آبگیری – آبدهی مجدد (DRV) تهیه شدند. لیپوزومهای تهیه شده از صافیهای پلی کربنات با اندازه های مورد نظر گذرانده شدند. پایداری آنتی ژن محصور شده به روش SDS-PAGE بررسی شد. کارآیی این لیپوزومها به عنوان سامانه دارورسانی از راه بینی و ادجوانت، به وسیله ایمن سازی از راه بینی در خرگوش و در پی آن تعیین پاسخهای ایمنی سیستمیک و مخاطی، ارزیابی شد.

مواد و روشها

مواد: فسفاتیدیل کولین (PC) از Fluka (سوئیس) و کلسترول (Chol) از Merck (آلمان) خریداری شد. محلول توکسوئید کزاز (۱۷۶۰ Lf/ml) از موسسه واکسن و سرم سازی رازی (حصارک، ایران) تهیه شد. آنتی بادیهای ضد IgG و IgA خرگوش به ترتیب از Sigma (آمریکا) و Bethyl (آمریکا) خریداری شدند. خرگوشهای ماده نژاد آلبینو سفید با وزن ۲-۱/۵ kg از موسسه واکسن و سرم سازی رازی (حصارک، ایران) خریداری شد.

تهیه لیپوزومهای DRV حاوی TT: لیپوزومها با ترکیب لیپیدی PC/Chol (۱۶/۵ µmole/ml از هر کدام) به روش آبگیری- آبدهی مجدد تهیه شدند. به اختصار، لیپیدها در مخلوط کلروفرم– متانول حل و روی دیواره ظرف خشکانیده شدند. لیپوزومها SUV با افزودن آب مقطر به لایه لیپیدی خشک شده، و ورتکس کردن و سونیکاسیون تهیه شدند. به سوسپانسیون لیپوزومی محلول TT اضافه شد و با استفاده از مخلوط یخ خشک- استون، فوری منجمد شد. پس از خشک کردن انجمادی، توده حاصل آبدهی مجدد شد و با بافر PBS رقیق شد.

تهیه لیپوزومهای ۱۰۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰ نانومتر به روش روزن رانی (*extrusion*): برای تهیه لیپوزومهای با اندازه مختلف، لیپوزومهای چند لایه (MLV) تهیه شده به روش DRV (۱۹) یازده بار از روزن ران (Avestine، کانادا) مجهز به صافی های پلی کربنات با اندازه های مناسب گذرانده شدند (۱۸).

ارزیابی شکل و اندازه لیپوزومها: میکروسکوپ نوری (Carl Zeiss، آلمان) برای مطالعه ویژگیهای شکلی لیپوزومهای بزرگتر استفاده شد. قطر میانگین حجمی لیپوزومها به وسیله دستگاه اندازه گیری کننده اندازه ذره ای به روش پراکنش لیزر (Klotz ، آلمان) تعیین شد.

تعیین کفایت محصورسازی توکسوئید کزاز (TT): کفایت محصورسازی به روش غیرمستقیم و با اندازه گیری TT محصور نشده در مایع رویی سوسپانسیون لیپوزومها به روش تعیین مقدار پروتئین برادفورد، تعیین شد (۲۰).

پایداری ساختمان TT محصور شده: پایداری مولکولی TT محصور شده به روش SDS-PAGE بررسی شد. لیپوزومها، TT اولیه و یک شاخص وزن مولکولی روی ژل آکریلامید ۱۰٪ قرار داده شدند و با استفاده از سامانه الکتروفورز (پایا پژوهش، ایران) جداسازی انجام شد. نوارهای پروتئینی با استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو یا نیترات نقره نمایان شدند.

مطالعات ایمن سازی از راه بینی: خرگوشهای آلبینو سفید با وزن ۲-۱/۵ kg (۴ خرگوش ماده در هر گروه) از راه بینی با فرمولاسیونهای زیر در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ ایمن سازی شدند:

۱- PBS

۲- ۴۰ Lf محلول TT

۳- لیپوزومهای DRV حاوی ۴۰ Lf TT

۴- لیپوزومهای ۱۰۰۰ nm حاوی ۴۰ Lf TT

۵- لیپوزومهای ۴۰۰ nm حاوی ۴۰ Lf TT

۶- لیپوزومهای ۱۰۰ nm حاوی ۴۰ Lf TT

سوسپانسیون لیپوزومی و محلولهای TT با استفاده از سمپلر تجویز شدند (۲۰۰ میکرولیتر، ۱۰۰ میکرولیتر در هر بینی). از هر حیوان در روزهای ۲۱ و ۴۲ خونگیری شد. پس از دومین خونگیری حفره بینی با ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین استریل شسته شد و لاواژهای بینی برای تعیین عیار sIgA جمع آوری شدند.

تعیین عیار IgG ضد TT در سرم و عیار IgA ضد TT در لاواژ بینی: آنتی بادیهای ضد TT در سرم و لاواژ بینی به روش الایزا تعیین مقدار شدند (۲۰). به اختصار به پلیتهای ۹۶ خانه الایزا محلول TT ۰/۰۰۱ w/v ٪ در بافر فسفات M ۰/۰۵ با pH ۷/۴ (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ °C نگهداری شدند. پس از شستشو، جایگاههای واکنش نداده چاهک ها با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول BSA ۱٪ w/v در هر چاهک، مهار شدند. پلیتها دو بار

www.SID.ir

Archive of SID

شستشو داده شدند و پس از آن نمونه های آزمایش به صورت دوتایی اضافه شدند. رقتهای متوالی از سرمها و لاواژهای بینی به صورت دوتایی اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ °C نگهداری شدند. پس از سه بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد IgG و IgA خرگوش، کنژوگه با پروکسیداز در رقتهای مناسب به پلیتهای مختلف اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در ۳۷ °C و چهار بار شستشو، ۱۰۰ µl سوبسترای TMB (تترامتیل بنزیدین) به هر چاهک اضافه شد. پس از ظهور رنگ، واکنش با افزودن ۵۰ µl اسید فسفریک ۱M به هر چاهک متوقف شد و جذبها در ۴۵۰ nm به وسیله الایزا ریدر (Statfax، آمریکا) خوانده شدند. همه شستشوها به وسیله بافر M PBS (۰/۰۵) حاوی ۰/۲٪ توین ۲۰ (PBS-T) انجام شد.

نتایج

شکل و اندازه لیپوزومها

لیپوزومهای DRV از نظر شکل، وزیکولهای چند لایه بودند. قطر میانگین حجمی لیپوزومهای DRV ۲/۲µm بود. توزیع ذره ای در شکل ۱ نشان داده شده است. در مورد لیپوزومهای روزن رانی شده، مشخص شده است که گذراندن سوسپانسیون لیپوزومی (حداقل ۱۱ بار) از یک صافی پلی کربنات با اندازه مشخص، لیپوزومهایی با قطر معادل اندازه منافذ صافی ایجاد می کند (۲۱).

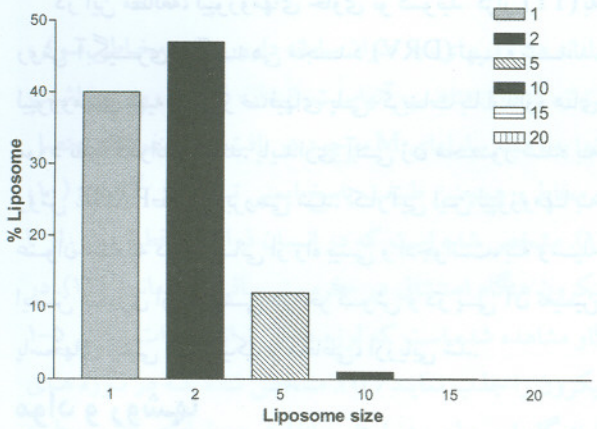
کفایت محصور شدن توکسوئید کزاز (TT) در لیپوزومها

همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، کفایت محصور سازی اندازه های مختلف لیپوزومها، با کاهش اندازه، کمتر شده است، اما تفاوتها معنی دار نیستند ($p > 0/05$)، به جز مورد لیپوزومهای DRV و ۱۰۰ nm ($p < 0/05$).

جدول ۱: کفایت محصور سازی (n =۳ ، ±SD) انواع مختلف لیپوزومها

	DRV Lip.	۱۰۰۰ nm Lip.	٤۰۰ nm Lip.	۱۰۰ nm Lip.
کفایت محصورسازی (٪)	۷٤ ± ۲/٦	۷۱ ± ۳/٥	٦۹ ± ۰/٦	٦٤/۳ ± ۳/٥

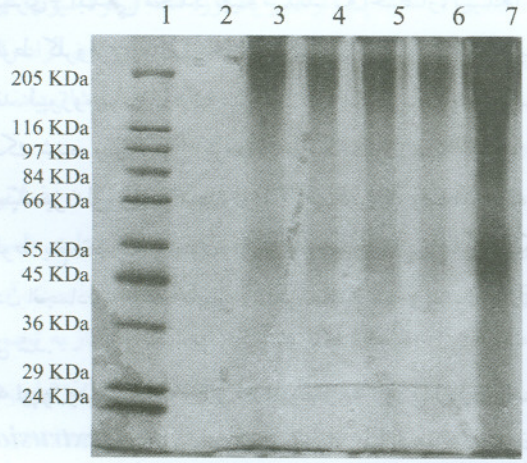
www.SID.ir



شکل ۱: توزیع اندازه ذره ای لیپوزومهای DRV، اندازه گیری شده به وسیله دستگاه آنالیز کننده اندازه ذره ای به روش پراکنش لیزر.

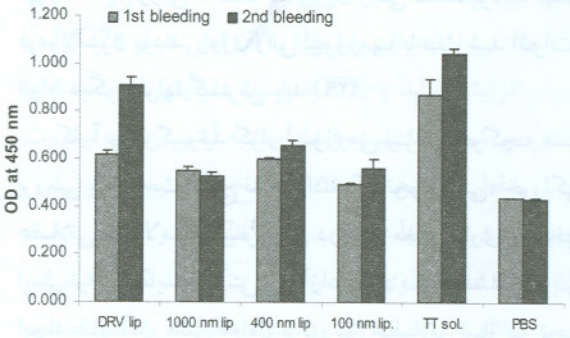
پایداری ساختمان TT محصور شده

پایداری ساختمانی اشکال لیپوزومی TT به روش SDS-PAGE ارزیابی شد. برای TT محصور شده و اولیه نوارهای مشابهی دیده شد (شکل ۲). این مساله نشان می دهد که ساختمان پروتئینی توکسوئید کزاز در مراحل تهیه و روزن رانی لیپوزومها حفظ شده است.

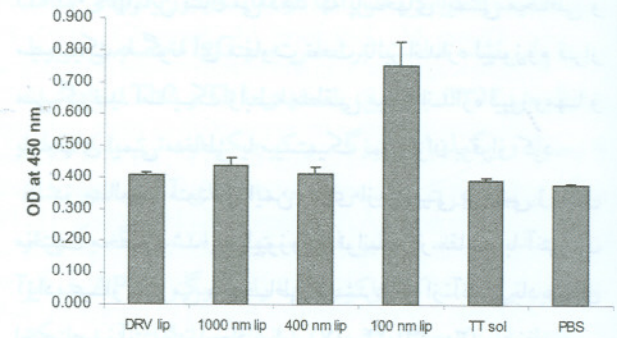


شکل ۲: ژل SDS-PAGE. نمونه ها عبارتند از: پروتئین مرجع (۱)، لیپوزومهای خالی (۲)، لیپوزومهای DRV (۳)، لیپوزومهای ۱۰۰۰ nm (٤)، لیپوزومهای ٤۰۰ nm (٥)، لیپوزومهای ۱۰۰ nm (٦) و TT اولیه (۷). نوارهای شاخص عبارتند از TT (۲۰۰-۱٥۰ KDa)، زنجیره سنگین TT (۱۰۰ KDa) و زنجیره سبک TT (٥۰ KDa).

Archive of SID



شکل ۳: عیارهای سرمی IgG ضد TT. خرگوشها (n=٤) از راه بینی با TT ٤٠ Lf در هفته های صفر، ۲ و ٤ ایمن سازی شدند و در هفته های ۳ و٦ خونگیری انجام شد. سرمهای هر گروه روی هم ریخته شد و عیارهای IgG ضد TT به روش الایزا اندازه گیری شد. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. Error bars نشان دهنده S.E. هستند.



شکل ٤: عیارهای IgA ضد TT موجود در لاواژ بینی. خرگوشها (n=٤) از راه بینی با TT ٤٠ Lf در هفته های صفر، ۲، و ٤ ایمن شدند و لاواژ بینی در هفته ٦ جمع آوری شد. لاواژهای هر گروه روی هم ریخته شد و عیار IgA ضد TT به روش الایزا تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد. Error bars نشان دهنده S.E. هستند.

عیارهای سرمی IgG ضد TT

خرگوشها (n=۴) از راه بینی با TT ۴۰ Lf در هفته های صفر، ۲ و ۴ ایمن سازی شدند و خونگیری در هفته های ۳ و۶ انجام شد. سرمها روی هم ریخته شد و عیار IgG سرمی به روش الایزا اندازه گیری شد (شکل ۳). در میان گروههای ایمن سازی شده از راه بینی، بیشترین عیار IgG در گروه ایمن سازی شده با محلول TT مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$). محصور سازی TT در لیپوزومها، عیار IgG را کاهش داد. در میان فرمولاسیونهای لیپوزومی، بالاترین عیار IgG با لیپوزومهای MLV که به روش DRV تهیه شده بودند مشاهده شد ($p< ۰/۰۰۱$). در میان همه گروهها به جز گروه ایمن سازی شده با لیپوزومهای ۱۰۰۰ nm، عیارهای IgG سرمی در هفته ششم (پس از ۳ تجویز) در حد معنی داری از هفته سوم (پس از ۲ تجویز) بیشتر بود ($p< ۰/۰۵$).

عیارهای IgA ضد TT موجود در لاواژ بینی

پس از ایمن سازی های ذکر شده در بالا، در هفته ششم حاصلهای شستشوی بینی جمع آوری شد و پس از روی هم ریختن لاواژ حیوانات هر گروه، عیار IgA به روش الایزا تعیین شد (شکل ۴). در میان گروههای ایمن سازی شده با فرمولاسیونهای مختلف، بالاترین عیار sIgA مخاطی در حیوانات ایمن سازی شده با لیپوزومهای ۱۰۰ nm مشاهده شد ($p< ۰/۰۰۱$). انواع دیگر لیپوزومها و همچنین محلول TT نتوانستند پاسخهای sIgA مخاطی ایجاد نمایند.

بحث

بیماریهای عفونی اغلب از سطوح مخاطی شروع می شوند. بنابراین افزایش ایمنی مخاطی برای جلوگیری از اتصال و تهاجم میکروبها بسیار مهم است (۲۲). اما بر خلاف این یافته ها، بیشتر دستورالعملهای واکسیناسیون با ایمن سازی های تزریقی سروکار دارد. ایمن سازی تزریقی معمولا سامانه ایمنی را تحریک می کند و باعث ایجاد آنتی بادی IgG در سرم می شود اما در ایجاد آنتی بادی روی سطوح مخاطی ناتوان است. به عکس، تجویز مخاطی واکسنها باعث ترشح آنتی بادی IgA روی سطوح مخاطی می شود. IgG فاگوسیتوز باکتریها را تسهیل می کند و کمپلمان را فعال می نماید، حال آن که IgA اساسا مانع اتصال و ایجاد پرگنه توسط باکتریها روی سطوح مخاطی می شود (۲۳).

در این مطالعه لیپوزومهای با اندازه های مختلف به عنوان سامانه تجویز آنتی ژن و ادجوانت ذره ای، برای هدف گیری موثر آنتی ژنها به بافتهای لنفوئیدی متصل به مخاط (MALT) استفاده شدند. نتایج نشان می دهند که اندازه بهینه برای القای بالاترین پاسخ مخاطی با اندازه مناسب برای القا پاسخهای سیستمیک متفاوت می باشد.

گزارش شده که لیپوزومها هنگام تجویز از راه بینی می توانند سامانه ادجوانتی مناسبی برای تحریک پاسخهای

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی بادی به طور کلی و پاسخهای sIgA مخاطی به طور اخص باشند (۲۴). در مطالعه دیگری با لیپوزومهای خنثی، نشان دادیم که تجویز داخل بینی لیپوزومهای حاوی توکسوئید کزاز (TT) پاسخهای ایمنی سیستمیک را کاهش می دهند، حال آن که عیار sIgA مخاطی را افزایش می دهند (۱۷). به این ترتیب، فرمولاسیونهای لیپوزومی با ترکیبات و اندازه های مختلف به طور گسترده ای برای تجویز مخاطی آنتی ژنها و پپتیدها استفاده شده اند و نتایج متفاوتی به دست آمده است.

نقش ویژگیهای فیزیکوشیمیایی لیپوزومها روی فاگوسیت شدن آنها به وسیله ماکروفاژ بررسی شده است. عوامل متعددی شامل اندازه، بار، غلظت، ساختمان، ترکیب فسفولیپیدها و زمان انکوباسیون لیپوزومها با ماکروفاژها می توانند روی فاگوسیت شدن آنها اثر بگذارد (۲۵). لیپوزومهای حاوی انسولین با اندازه ذره ای ۱/۹۸-۰/۱ میکرون به صورت داخل تراشه ای تجویز شدند. به نظر می رسید اثر کلی کاهندگی قند خون در این محدوده در اندازه لیپوزومها تغییری نشان نمی دهد، که حاکی از این است که جذب انسولین در پی تجویز داخل تراشه ای در محدوده مورد مطالعه مستقل از اندازه ذره ای است (۲۶). Allen و همکاران ماکروفاژهای مغز استخوان موش را کشت داده (۲۷) و اثر اندازه لیپوزومها بر روی برداشت آنها توسط ماکروفاژها را ارزیابی کردند. آنها میان اندازه لیپوزومها و برداشت آنها به وسیله ماکروفاژها رابطه معکوس مشاهده نمودند.

قابلیت تحریک ایمنی لیپوزومها با ارزیابی میزان چندین سایتوکاین آزاد شده از سلولهای محیطی خون انسان مطالعه شده است. در حالی که ترکیب لیپیدی اثری روی میزان رهش سایتوکاین نداشت، لیپوزومهای بزرگتر رهش بیشتری از سایتوکاینها را باعث شدند (۲۸). اثر اندازه لیپوزومهای حاوی کلودرونات و گالیوم (عوامل سرکوب کننده ماکروفاژ) روی رسانش این ترکیبات به ماکروفاژهای RAW 264 و فیبروبلاستهای L929 با آزمایش برون تن مهار رشد، ارزیابی شده است. کاهش در اندازه لیپوزومهای تک لایه DSPG (دی استئاروئیل فسفاتیدیل گلیسرول) به وسیله روزن رانی (اکستروژن) تاثیری روی رسانش ترکیبات به ماکروفاژها نداشت اما قدرت آنها برای فیبروبلاستها را در حد زیادی افزایش داد. برای رسانش به ماکروفاژها، لیپوزومهای DSPG تهیه شده به روش REV که روزن رانی شده بودند بهترین فرمولاسیون بودند. روزن رانی لیپوزومها باعث شد اثرات به انواع دیگر سلولها گسترش یابد (۲۹).

www.SID.ir

کارآیی توکسوئید کزاز لیپوزومی نیز در خوکچه هندی بررسی شده است. نتایج نشان دادند که تجویز بینی، خوراکی و عضلانی فرمولاسیون لیپوزومی در حد معنی داری پاسخهای ایمنی را در مقایسه با آنتی ژن آزاد بهبود می بخشد. اما برای ایجاد عیار آنتی بادی معادل با تزریق عضلانی نیاز به تجویز غلظت ۱۰ برابر آنتی ژن بود (۵). در مطالعه ما، در میان حیوانات ایمن سازی شده با لیپوزوم، در حالی که بالاترین عیار sIgA مخاطی با لیپوزومهای ۱۰۰ nm ایجاد شد، بیشترین پاسخ سیستمیک در گروه DRV مشاهده شد (قطر میانگین ۲/۲ μm) ($p< ۰/۰۰۱$). این نشان می دهد که پاسخهای ایمنی مخاطی و سیستمیک به گونه ای متفاوت تحت تاثیر اندازه لیپوزوم قرار می گیرند. اما یک رابطه منطقی میان اندازه لیپوزومها و پاسخهای ایمنی مخاطی یا سیستمیک نمی توان برقرار کرد.

در مطالعات متعددی ایمن سازی از راه بینی با آنتی ژنهای مختلف محصور شده در لیپوزومها توانسته در مقایسه با آنتی ژن آزاد، عیار سرمی و مخاطی بیشتری را از آنتی بادیهای اختصاصی آنتی ژن ایجاد نماید (۱۷، ۲۴، ۳۲-۳۰). به نظر می رسد که آنتی ژنهای محلول به وسیله سلولهای accessory موجود در اپیتلیوم تنفسی مطبق کاذب برداشت می شوند. این اپیتلیوم روی سطوح حفره بینی و در ورودی و در طول مجرای نازوفارنکس وجود دارد. به این ترتیب نمی توان نتیجه گرفت که تجویز بینی محلول TT، حتی در حجمهای خیلی کم، تماس ایمونوژن با عناصری که منجر به ایجاد پاسخ ایمنی در برابر این آنتی ژن می شوند را تسهیل می کند (۱۵). در نتیجه در مورد فرمولاسیونهای واکسنی که از آنتی ژنهای محلول تهیه شده اند، می توان با چکاندن ساده آنتی ژن، انتظار پاسخهای سیستمیک داشت (۱۵). در این مطالعه، تجویز ۴۰ Lf محلول TT به صورت قطره بینی، توانست پاسخهای ایمنی سیستمیک بیشتری در مقایسه با فرمولاسیون لیپوزومی ایجاد نماید ($p< ۰/۰۵$) (شکل ۳). کاهش پاسخهای ایمنی سیستمیک در پی محصور سازی آنتی ژن در لیپوزوم، در مطالعات دیگران نیز مشاهده شده است (۱۷). مشخص شده که تجویز وزیکولهای با

قطر میانگین ۲۲۵ nm > به موش BALB/c، بیشتر پاسخهای Th1 ایجاد می نماید. این پاسخها با افزایش عیار IgG2a در پلاسما و افزایش تولید IFN-γ به وسیله سلولهای غدد لنفاوی مشخص می شود. اما تهیه مقدار مشابه آنتی ژن به صورت وزیکول با قطر میانگین ۱۵۵ nm> پاسخ Th2 ایجاد نمود. این پاسخ با افزایش IgG1 در غیاب تولید IgG2a و افزایش تولید IL-5 توسط غدد لنفاوی خود را نشان می دهد (۳۳). بنابراین در این مطالعه ناتوانی لیپوزومها در ایجاد پاسخ ایمنی سیستمیک بیشتر از محلول TT را می توان به دو عامل برهم کنش ناموثر لیپوزومها با NALT یا القا پاسخهای Th1 (IgG2a) نسبت داد که عیار IgG2a اندازه گیری نشده است.

در مطالعه دیگری، کاهش اندازه وزیکولها اثر معنی داری روی فعالیت ادجوانتی کلی آنها در مقایسه با وزیکولهای شاهد روزن رانی نشده نداشت (بر اساس عیار IgG اختصاصی مربوط به اوالبومین) (۳۳). بنابراین، پاسخهای Th1 و Th2 ایجاد شده به وسیله وزیکولهای بزرگ و کوچک (به ترتیب)، دارای سوگیری بیشتری در مقایسه با آنچه داده های آنتی بادی نشان می دهد، هستند. توانایی فاگوسیتوز ذرات بزرگ یکی از خصوصیاتی است که ماکروفاژها را از دیگر APCs متمایز می کند، با این وجود برای پیش سازهای سلولهای دندریتیک در برون تن، تا حدی قابلیت بلعیدن آنتی ژنهای ذره ای دیده شده است. به عکس APCs دیگر مانند لنفوسیتهای B، نمی توانند فاگوسیتوز کنند و احتمالا باید آنتی ژن را به وسیله پینوسیتوز بردارند. این حالت بدین معناست که نمی توانند ذراتی را که تقریبا بزرگتر از ۱۵۰ nm هستند وارد خود نمایند (۳۳). بنابراین ایجاد بیشترین پاسخ sIgA به وسیله لیپوزومهای ۱۰۰ nm را می توان به پینوسیتوز شدن بهتر آنها به وسیله سلولهای B نسبت داد. در مجموع این نتایج نشان می دهند که تجویز داخل بینی محلول TT می تواند پاسخهای ایمنی سیستمیک ایجاد نماید اما در افزایش عیار sIgA مخاطی ناتوان می باشد. محصورسازی TT در لیپوزومهای ۱۰۰ nm می تواند روی ایجاد پاسخهای ایمنی مخاطی اثر مثبتی بگذارد، اما پاسخهای ایمنی سیستمیک تضعیف شده اند. در میان فرمولاسیونهای لیپوزومی بالاترین پاسخهای سیستمیک با بزرگترین لیپوزومها دیده شد ($p<0/001$)، حال آن که بیشترین پاسخهای مخاطی به وسیله کوچکترین لیپوزومها به دست آمد. این نشان می دهد که پاسخهای ایمنی مخاطی و سیستمیک به صورتی متفاوت تحت تاثیر اندازه لیپوزوم قرار می گیرند. اما پس از ایمن سازی از راه بینی با TT لیپوزومی، نمی توان میان اندازه لیپوزوم و پاسخهای ایمنی مخاطی با سیستمیک ارتباط منطقی برقرار نمود.

تشکر و قدردانی

حمایت مالی این پروژه توسط اعتباری از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (MUMS) تامین شده است.

References

1. Husband A. J., 1993, Novel vaccination strategies for the control of mucosal infection, Vaccine, 11: 107-112.
2. Rebelatto M. C., Guimond P., Bowersock T. L., HogenEsch H., 2001, Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles, Vet. Immunol. Immunopathol., 83: 93-105.
3. Gombotz W. R., Wee S., 1998, Protein release from alginate matrices, Adv. Drug Deliv. Rev., 31: 267-285.
4. McGhee J. R., Mestecky J., Dertzbaugh M. T., Eldridge J. H., Hirasawa M., Kiyono H., 1992, The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development, Vaccine, 10: 75-88.
5. Alpar H. O., Bowen J. C., Brown M. R. W., 1992, Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid, Int. J. Pharm., 88: 335-344.
6. Barenholz Y., Crommelin D., Liposomes as pharmaceutical dosage forms, in: Swarbrick J., Boylan E. (eds.), Encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker, New York, 1994, 1-39.
7. Gregoriadis G., Gursel I., Gursel M., McCormack B., 1996, Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers, J. Control. Rel., 41: 49-56.
8. Joseph A., Louria-Hayon I., Plis-Finarov A., Zeira E., Zakay-Rones Z., Raz E., Hayashi T., Takabayashi K., Barenholz Y., Kedar et a., 2002, Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines, Vaccine, 20: 3342-3354.
9. Kim C. K., Jeong E. J., 1995, Development of dried liposome as effective immuno-adjuvant for hepatitis b surface antigen, Int. J. Pharm., 115: 193-199.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

10. O'Hagan D. T., 1996, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery, J. Anat., 189: 477-482.
11. Florence A. T., 1997, The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual, Pharm. Res., 14: 259-266.
12. Stuart B. O., 1984, Deposition and clearance of inhaled particles, Environ. Health Perspect., 55: 369-390.
13. Payne J. M., Sansom B. F., Garner R. J., Thomson A. R., Miles B. J., 1960, Uptake of small resin particles (1-5 micron diameter) by the alimetary canal of the calf, Nature, 188: 586-587.
14. Chen K. S., Quinnan G. V., Jr., 1989, Secretory immunoglobulin A antibody response is conserved in aged mice following oral immunization with influenza virus vaccine, J. Gen. Virol., 70 (Pt 12): 3291-3296.
15. Eyles J. E., Williamson E. D., Alpar H. O., 1999, Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume, Int. J. Pharm., 189: 75-79.
16. Alpar H. O., Somavarapu S., Atuah K. N., Bramwell V. W., 2005, Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 57: 411-430.
17. Tafaghodi M., Jaafari M. R., Sajadi Tabasi S. A., 2006, Nasal immunization studies by liposomes encapsulated with tetanus toxoid and CpG-ODN, Eur. J. Pharm. Biopharm., 64: 138-145.
18. Brewer J. M., Pollock K. G. J., Tetley L., Russell D. G., 2004, Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles, J. Immunol., 173: 6143-6150.
19. Gregoriadis G., da Silva H., Florence A. T., 1990, A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs), Int. J. Pharm., 65: 235-242.
20. Diwan M., Tafaghodi M., Samuel J., 2002, Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres, J. Control. Rel., 85: 247-262.
21. MacDonald R. C., MacDonald R. I., Menco B. P., Takeshita K., Subbarao N. K., Hu L. R., 1991, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, Biochim. Biophys. Act., 1061: 297-303.
22. Bowersock T. L., Hogenesch H., Suckow M., Guimond P., Martin S., Borie D., Torregrosa S., Park H., Park K., 1999, Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres, Vaccine, 17: 1804-1811.
23. Suckow M. A., Jarvinen L. Z., HogenEsch H., Park K., Bowersock T. L., 2002, Immunization of rabbits against a bacterial pathogen with an alginate microparticle vaccine, J. Control. Rel., 85: 227-235.
24. de Haan A., Geerligs H. J., Huchshorn J. P., van Scharrenburg G. J. M., Palache A. M., Wilschut J., 1995, Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes, Vaccine, 13: 155-162.
25. Ahsan F., Rivas I. P., Khan M. A., Torres Suarez A. I., 2002, Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages, J. Control. Rel., 79: 29-40.
26. Li Y., Mitra A. K., 1996, Effects of phospholipid chain length, concentration, charge, and vesicle size on pulmonary insulin absorption, Pharm. Res., 13: 76-79.
27. Allen T. M., Austin G. A., Chonn A., Lin L., KC L., 1991, Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size., Biochim. Biophy. Act., 1061, 56-64.
28. Yamamoto S., Ishida T., Inoue A., Mikami J., Muraguchi M., Ohmoto Y., Kiwada H., 2002, HEPC-based liposomes trigger cytokine release from peripheral blood cells: effects of liposomal size, dose and lipid composition, Int. J. Pharm., 236: 125-133.
29. Monkkonen J., Valjakka R., Hakasalo M., Urtti A., 1994, The effects of liposome surface charge and size on the intracellular delivery of clodronate and gallium in vitro, Int. J. Pharm., 107: 189-197.
30. Sakaue G., Hiroi T., Nakagawa Y., Someya K., Iwatani K., Sawa Y., Takahashi H., Honda M., Kunisawa J., Kiyono H., 2003, HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses, J. Immunol., 170: 495-502.
31. de Haan A., Tomee J. F., Huchshorn J. P., Wilschut J., 1995, Liposomes as an immunoadjuvant system for stimulation of mucosal and systemic antibody responses against inactivated measles virus administered intranasally to mice, Vaccine, 13: 1320-1324.
32. de Haan A., Tomee J. F. C., Huchshorn J. P., Wilschut J., 1995, Liposomes as an immunoadjuvant system for stimulation of mucosal and systemic antibody responses against inactivated measles virus administered intranasally to mice, Vaccine, 13: 1320-1324.
33. Brewer J. M., Tetley L., Richmond J., Liew F. Y., Alexander J., 1998, Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen, J. Immunol., 161: 4000-4007.

www.SID.ir