

ستنز نانوپارتیکل‌های پروتئین-6-ESAT و بررسی ایمنی همورال بعد از تجویز آن از طریق بینی

یوسف امینی^۱، مجید تبیانیان^{۲*}، نادر مصویری^۳، مهدی فصیحی رامندی^۴، سید محمود ابواهیمی^۵، مهران دباغیان^۶، حمید نجمی نژاد^۷، سجاد یعقوبی^۸

- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
- استادیار گروه ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
- استادیار گروه میکروبیولوژی، بخش تولید توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
- دکترا ای گروه زیست فناوری پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله (عج) تهران
- استادیار گروه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله (عج) تهران
- دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲

چکیده

مقدمه: کاندیداهای واکسنی مختلفی برای جایگزینی تنها واکسن موجود برعلیه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس (BCG) وجود دارد. در این میان پروتئین-6-ESAT نقش بیژنهای دارد. از روش‌های مناسب برای تجویز واکسن علیه این باکتری می‌توان به روش تجویز درون بینی اشاره کرد. یکی از سیستم‌های مناسب انتقال واکسن از طریق بینی، استفاده از نانوپارتیکل‌های زیست تخریب‌پذیر می‌باشد. در میان پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر، پلیمر کایتوزان دارای قابلیتی فراوان در افزایش پاسخ سیستم ایمنی است. هدف این مطالعه افزایش پاسخ ایمنی همورال از طریق احتباس آنتی‌ژن-6-ESAT درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان می‌باشد.

روش بررسی: سنتر نانوپارتیکل‌های کایتوزان حاوی-6 ESAT از طریق روش ژلاسیون در محیط آبی انجام شد. خصوصیات نانوپارتیکل‌ها شامل مورفوولوژی، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا، میزان احتباس پروتئین و میزان آزادسازی آن در محیط آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. سپس نانوپارتیکل حاوی آنتی‌ژن، آنتی‌ژن به تنهایی و کایتوزان به تنهایی از طریق بینی به موش در روزهای ۰ و ۱۴ و ۲۸ تجویز شد. دو هفته بعد از تجویز خونگیری انجام شده و میزان تیتر IgG توسط تست الیزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد.

نتایج: پروتئین-6-ESAT با موقوفیت درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان احتباس شد و نانوپارتیکل‌های سنتز شده دارای خصوصیات مناسب بودند. به طوری که هنگامی که نسبت TMC/TPP برابر با ۵/۱ در غلظت ۱ mg/ml از TMC بود، متوسط سایز نانوپارتیکل‌ها $242 \pm 8 \text{ نانومتر}$ به دست آمد و میزان احتباس پروتئین $95/234 \pm 67/5 \%$ بود که دارای میزان رهایش 200 ± 20 ساعت بودند. میزان آنتی‌بادی IgG در گروهی که نانوپارتیکل‌های کایتوزان حاوی-6 ESAT را دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: تجویز نانوپارتیکل‌های حاوی آنتی‌ژن-6-ESAT و کایتوزان از طریق بینی می‌تواند به عنوان یک روش مناسب جهت تجویز آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زای مایکروبکتریوم توبرکلوزیس برای القای پاسخ ایمنی همورال باشد.

واژه‌های کلیدی: مایکروبکتریوم توبرکلوزیس، 6-ESAT، آنتی‌بادی، کایتوزان

* (نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۳۸-۴۵۷۰۰-۲۶۱، پست الکترونیکی: mtebianian@yahoo.com)

مقدمه

پروتئین-6 ESAT یکی از عوامل بیماری‌زاوی و کاندیدای سنتز واکسن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. این پروتئین توسط ناحیه ژن (Region of Deletion1) RD1 کد می‌شود و در تمام مایکوباکتری‌های پاتوژن از جمله توبرکلوزیس و بوویس و آفریکانوم وجود دارد، اما به دلیل حذف ناحیه ژنی RD1 در واکسن BCG وجود ندارد. در نتیجه اینمی علیه آن در افراد واکسینه شده با BCG ایجاد نمی‌شود(۷-۱۰).

مخاط راه اصلی ورود پاتوژن‌های گوناگون به بدن میزبان است. بافت‌های لنفوئیدی ویژه‌ای در موكوس بینی و روده وجود دارد که یکی از مکان‌های اصلی آغاز پاسخ‌دهی به این پاتوژن‌ها می‌باشد(۱۱). در این میان استفاده از غشای مخاطی به دلیل داشتن سطح وسیع برای رساندن واکسن‌ها و داروها، ظهور سریع پاسخ‌دهی، امکان دسترسی به سیستم عصبی و نبود متابولیسم تأثیرگذار بر روی واکسن و داروها توسعه فراوان یافته است(۱۲). در این میان برای افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکسن‌ها و داروها توسط انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک و پروتئولیتیک و لیزوزیم، افزایش ثبات آنها، افزایش اختصاصیت به هدف و قابلیت حل شدن در محلول‌های آبی، نیاز به سیستم‌های دارورسانی نوین می‌باشد(۱۳،۱۴). بر اساس تحقیقات انجام شده، در میان سیستم‌های مختلف دارورسانی، پلیمر نانوپارتیکل‌های زیست تخریب‌پذیر (Biodegradable Nanoparticle Polymer) دارای توانایی بالایی برای انتقال عوامل درمانی از جمله انواع واکسن، دارو، ژن‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد(۱۵،۱۶). از جمله دلایل این توانایی بالا می‌توان به ویژگی نانوپارتیکل‌ها در میزان جذب بالا، انکپسوله شدن بهتر در مقایسه با سایر روش‌ها، تحت کنترل بودن آزادسازی عوامل درمانی و اثرات توکسیک کمتر، اشاره کرد(۱۶).

پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر گوناگونی از جمله آلرژینات و (PLGA: Poly Lactic -co- Glycolic Acid) و کیتوزان (Chitosan) جهت انتقال عوامل درمانی از جمله واکسن‌ها استفاده شده است که در این میان شاید از کیتوزان (Chitosan) به دلیل

توبرکلوزیس یا بیماری سل توسط باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌شود. این بیماری در گذشته یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌ها بوده است، به طوری که در طول تاریخ جان میلیاردها نفر را گرفته است(۱). علیرغم تلاش‌های فراوان در کنترل بیماری در سال‌های اخیر این بیماری همچنان به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سرتاسر جهان شناخته شده است که نتیجه آن آلوده شدن ۸۰۰۰۰۰۰ مورد جدید و مرگ ۳۰۰۰۰۰۰ نفر در هر سال می‌باشد(۲). واکسینی که علیه این بیماری به طور گسترده استفاده می‌شود (BCG: Bacille Calmette-Guérin) می‌باشد. یکی از معایب این واکسن عدم ایجاد اینمی کافی علیه سل است. بررسی‌هایی که در زمینه میزان کارآیی BCG در انسان صورت گرفته، گیج‌کننده و متضاد است. به طوری که واکسن مذکور در جلوگیری از توبرکلوزیس در کودکان، دارای کارآیی ۵۰٪ تا ۷۰٪ می‌باشد. این در حالی است که میزان کارآیی آن در بزرگسالان پیچیده و متغیر است. میزان کارآیی واکسیناسیون افراد ۱۲-۱۴ سال در انگلستان حدود ۷۵٪ بود این در حالی است که میزان کارآیی واکسن در جنوب هندوستان نزدیک به صفر بوده است(۳). ایجاد BCG منتشر در افراد مبتلا به HIV: Human immunodeficiency virus) تست پوستی توبرکولیناز از دیگر مشکلات واکسن BCG است(۴). بر همین اساس تلاش جهان در مورد جایگزینی واکسن BCG با واکسینی جدید و کارا صورت گرفته است. در میان کاندیداهای واکسینی پیشنهاد شده واکسن‌های زیر واحدی (Subunit vaccine) از مهم‌ترین واکسن‌های کاندید می‌باشدند. استراتژی کلی این واکسن‌ها در ایجاد اینمی، استفاده از آنتی‌ژن‌های غالب و اصلی در تحریک سیستم ایمنی می‌باشد(۵). از آنتی‌ژن‌های غالب و اصلی که در این واکسن‌ها استفاده می‌شود، می‌توان به دو آنتی‌ژن خانواده میکوزیل Transferrazها Ag85A (Antigen 85A) و Ag85B (Antigen 85B) و ESAT-6 (Antigen 85C) و پروتئین ۶ (Ag85B) و ۸۵C (Ag85C) اشاره کرد(۶،۷). kDa Early Secretory Antigenic Target)

آنترن ۶ ESAT به صورت قطره قطره اضافه شد تا کدورتی یکنواخت در محلول ایجاد گردد. سپس به منظور کامل شدن واکنش بین TMC و TPP و انجام واکنش بین تمام مولکول‌های TMC و TPP، اجازه داده شد تا محلول به مدت ۴۰ دقیقه در دور کم (۸۰) همزده شود. نانوپارتیکل‌های به دست آمده، توسط سانتریفوژ در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰°C بر روی بستری از ۱۰ میکرومتر گلیسیرین ساخت شرکت سیگما آلدريچ جداسازی گردیدند و برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوپارتیکل‌ها از میکروسکوپ TEM (ترانسمیشن) استفاده شد. سپس از دستگاه زتا سایزر شرکت MALVEN 3000 جهت بررسی توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای (Zeta Potential) نانوپارتیکل‌ها استفاده شد. بدین منظور حدود ۳۰ میکرومتر از نمونه نانوپارتیکلی به ۱ میلی‌لیتر از آب چند بار تقطیر شده، اضافه گردید و در محفظه دستگاه قرار داده شد و سایز ذرات اندازه‌گیری شد. برای تعیین نسبت توزیع اندازه ذرات، ۵ بار مقدار سدیم تری‌پلی‌فسفات به کایتوzan اندازه‌گیری شد و میزان توزیع اندازه ذرات به صورت میانگین گزارش شد.

سپس میزان احتباس پروتئین در درون نانوپارتیکل‌ها محاسبه شد. برای این کار از کیت اندازه‌گیری پروتئین MICRO BCA ساخت شرکت سیگما آلدريچ استفاده شد. با توجه به اینکه پلیمر کایتوzan در روش BCA با پروتئین دارای تداخل می‌باشد، از این رو نمی‌توان به صورت مستقیم مقدار آنتی‌زن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها را محاسبه نمود. در این مورد مقدار آنتی‌زن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها از روی مقدار کل آنتی‌زن اولیه اضافه شده به محیط و مقدار نهایی باقیمانده در فاز آبی (انکپسوله نشده) محاسبه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول کایتوzan mg/ml ۱ در مجاورت ۰/۲ میلی‌لیتر از TPP که در آن مقدار ۵۰ میلی‌گرم پروتئین حل شده است، در دمای اتاق بر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده شد. پس از انکوباسیون، محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و محلول رویی آن جدا شد و میزان پروتئین

مزایای فراوانی از جمله فراوان بودن و نداشتن توکسیتی، بیشترین استفاده شده است(۱۷). ساختمان این پلیمر به شکل [-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopiranose] می‌باشد(۱۸). در تحقیقات جدیدی که توسط Makhlof انجام گرفت مشاهده شد که با اضافه کردن گروه تیولی (Thioglycolic Acid-Glycol) موکوسی کایتوzan را هنگامی که از طریق بینی استفاده می‌شود، هر چه بیشتر افزایش داد(۱۹). البته کایتوzan معاوی همچون وزن مولکولی بالا و چسبندگی فراوان و در نتیجه قابلیت کم حلالیت در محلول‌های آبی فاقد اسید را هم دارد که این معاوی توسط روش‌هایی همچون هیدرولیز آنزیمی و روش‌های شیمیایی گوناگون قابل اصلاح است(۲۰). بر همین اساس در این تحقیق سعی شده است که توانایی نانوپارتیکل‌های کایتوzan در تحریک پاسخ آنتی‌بادی علیه آنتی‌زن ESAT-6 در مقایسه با آنتی‌زن ESAT به تنهایی از طریق تجویز درون بینی بررسی شود.

روش بررسی

روش تهیه نانوپارتیکل‌های حاوی پروتئین ۶ ESAT اساس انجام ژلاسیون یونی کایتوzan در محلول آبی انجام شد که توسط Remunan-Lopez و همکارانش مورد استفاده قرار گرفته بود(۲۱). این روش به دلیل ساده و ارزان بودن، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا غلظت‌های متغیری (۰/۵ mg/ml و ۱/۵ و ۱/۵ و ۲) از Trimethyl Chitosan: TMC ساخت شرکت مرک با وزن مولکولی متوسط و با درجه استیلاسیون ۸۶ درصد در آب چند بار تقطیر تهیه شده و از خلال فیلتر غشایی μm ۰/۴۵ عبور داده شد. سپس با توجه به اینکه بر هم کنش کایتوzan با TPP از نظر استوکیومتری یک واکنش یک به یک می‌باشد از این رو محلول 1 mg/ml TPP با ساخت شرکت سیگما آلدريچ تهیه گردید و از خلال فیلتر غشایی $0/45\text{ }\mu\text{m}$ عبور داده شد. در مرحله بعد به ۱ میلی‌لیتر از محلول تری‌متیل کایتوzan با غلظت‌های مختلف (۰/۵ mg/ml و ۱/۵ و ۲) در حالی که بر روی همزن مغناطیسی در حال هم خوردن بود، ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول TPP حاوی

با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه ONE – WAY ANOVA و E-TEST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای انجام تست الیزا، غلظت‌های مختلف از پروتئین ESAT-6 (۱۰، ۷، ۵، ۲ میکروگرم بر میلی لیتر) تهیه شد. سپس از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک میکرو پلیت مخصوص الیزا ریخته شد. برای هر غلظت ۳ چاهک در نظر گرفته شد. بافر کوت‌کننده، بافر بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار با pH=۹/۶ بود. سپس میکروپلیت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۲۴-۱۶ ساعت که اتصال بین آنتیزن و کف میکروپلیت انجام گرفت، میکروپلیت‌ها از یخچال خارج شده و تمامی چاهک‌ها در شرایط یکسان به وسیله بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ با pH=۷/۲) سه بار به مدت ۲ دقیقه مورد شستشو قرار گرفته شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده (Coating buffer) که PBS حاوی ۵ درصد BSA و ۰/۲ درصد توئین ۲۰ با pH=۷/۲ بوده افزوده شد و به مدت یک ساعت میکروپلیت در گرماخانه ۳۷°C قرار گرفت. بعد از ۱ ساعت میکروپلیت ۳ بار مورد شستشو قرار گرفت. به چاهک‌ها رقت یکسان ۱ به از سرم حیوانات ایمونیزه و به چاهک‌های کنترل منفی سرم حیوانات غیر ایمونیزه اضافه شد. در گرماخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۱ ساعت انجام شد. در نهایت شستشو ۳ بار تکرار گردید. آنتی‌بادی ثانویه کونزوگه با آنزیم پراکسیداز (Peroxidas Conjugated Goat Anti-Mouse IgG) ساخت شرکت سیگما آلدريچ در غلظت ۱/۸۰۰۰ و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C گرماخانه‌گذاری شد. سپس ۳ بار شستشو تکرار گردید. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبستای پراکسید (بافر TMB + H2O2) ساخت شرکت مرک اضافه گردید و به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شد. محلول ۰.۲٪ اسید سولفوریک ساخت شرکت مرک به عنوان متوقف کننده در حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. نتایج با قرار دادن میکروپلیت در دستگاه ELISA Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

موجود در آن با کسر پروتئین موجود در محلول رویی از کل پروتئین اضافه شده به نمونه و تقسیم آن بر کل پروتئین اضافه شده محاسبه گردید. به منظور آزاد سازی پروتئین از نانوپارتیکل‌های کایتوزان in-vitro ۶۰ میلی‌گرم از نمونه خشک شده در دسیکاتور، به دقت توزین و به میکروتیوب منتقل شد به هر کدام از لوله‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول بافری PBS افروده و در دمای ۳۷°C بر روی شیکر مخلوط شدند. از نمونه‌های نانوپارتیکلی کایتوزان در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۵۶، ۷۲، ۱۲۰، ۱۴۴، ۲۰۰ ساعت نمونه‌گیری انجام گردید. قبل از هر بار نمونه‌برداری، نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰g ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و تمامی محلول بالایی برداشته شد و با محلول بافری تازه جایگزین گردید و مقدار پروتئین تام آزاد شده در این زمان‌ها توسط کیت اندازه‌گیری پروتئین MICROL BCA ساخت شرکت سیگما آلدريچ تعیین شد.

جهت بررسی پاسخ‌های ایمنی نمونه‌های نانوپارتیکل تهیه شده با پلیمرهای کایتوزان از موش Balb/c ماده با وزن ۲۵±۵ گرم و سن ۶-۸ هفت‌به عنوان مدل حیوانی مناسب استفاده گردید. موش‌ها از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. موش‌ها در تمام مدت آزمایش از شرایط ۱۲ ساعت روز و ۲۱-۲۳°C ساعت شب برخوردار بودند و در دمای ثابت ۱:۳ مخلوط ۰/۰۵ml تزریق داخل صفاقی ۱۲ ساعت روز و نگهداری شدند. حیوانات قبل از هر تجویز داخل بینی توسط شرکت دارو پخش و زایلزین ساخت شرکت مرک نیمه بیهوش گردیدند. موش‌ها به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم و هر گروه در روزهای ۰ و ۱۴ و ۲۸ با ۳۰ میکروگرم ESAT-6 انکپسوله شده در کایتوزان یا ESAT-6 به تنها‌یابی یا کایتوزان یا شاهد که PBS دریافت می‌کرد، ایمن سازی شدند. عمل خون‌گیری از سینوس چشمی حیوان دو هفته پس از آخرین تجویز انجام گرفت. نمونه‌های خونی به مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شدند و سپس در ۵۰۰۰g ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و لایه سرمی جدا گردید. نمونه سرم‌های جدا شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی در ۲۰°C- نگهداری شدند. نتایج به دست آمده

باشند، غلظت 1 mg/ml است. به طوری که در غلظت 1 mg/ml متوسط سایز نانو پارتیکل $242/8 \pm 8/71$ نانومتر و زتا پتانسیل حاصله $3/5 \pm 29/0$ می‌باشد. در نمودار ۱ می‌توان چگونگی توزیع ذرات و زتا پتانسیل حاصله را مشاهده نمود. جدول ۱ نتایج مربوط به نانوپارتیکل‌های تهیی شده با غلظت‌های مختلف کایتوزان را نشان می‌دهد.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت کایتوزان در محلول اولیه میانگین توزیع اندازه ذرات نانوپارتیکل‌های تهیی شده بزرگ و پهن‌تر می‌گردد. به طوری که بزرگترین میانگین اندازه برای نانوپارتیکل‌های تهیی شده با کایتوزان در غلظت 2 mg/ml مشاهده می‌شود. لذا به نظر می‌رسد که بهترین غلظت برای اینکه نانوپارتیکل‌های تهیی شده دارای توزیع اندازه مناسبی

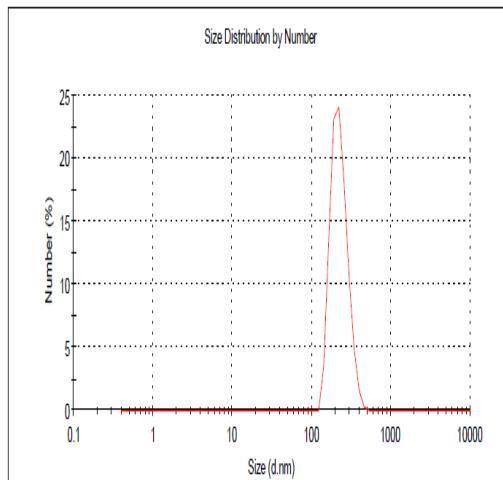
جدول ۱: خصوصیات نانوپارتیکل‌های ایجاد شده از غلظت‌های مختلف TMC در مجاورت سدیم تری پلیفسفات

اختلاف پراکندگی (PDI)	میانگین اندازه ذرات ایجاد شده (nm)	پتانسیل زتا (mV)	غلظت محلول تری متیل کایتوزان (mg/ml)
$0/20 \pm 0/058$	$227/18 \pm 7/58$	$21/22 \pm 4/05$	$0/5$
$0/165 \pm 0/053$	$242/8 \pm 8/21$	$29/0 \pm 3/5$	1
$0/222 \pm 0/081$	$282/80 \pm 11/54$	$36/3 \pm 4/31$	$1/5$
$0/845 \pm 0/091$	$485/56 \pm 26/22$	$38 \pm 4/84$	2

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 242.7	Peak 1: 258.4	100.0	57.41
Pdi: 0.199	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.911	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

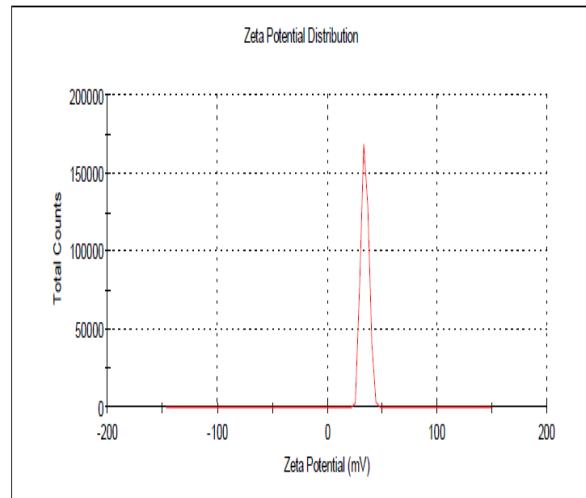
Result quality Refer to quality report



Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 34.3	Peak 1: 34.3	100.0	3.50
Zeta Deviation (mV): 3.50	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0210	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality Good

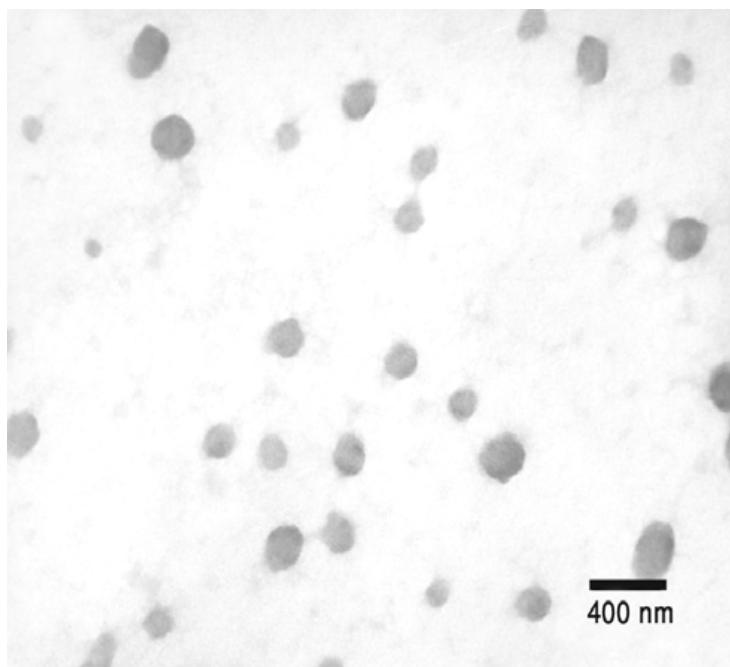


نمودار ۱: توزیع اندازه ذرات و زتا پتانسیل نانوپارتیکل‌های حاوی آنتی ژن ESAT-6

منتھی می‌گردد، به طوری که درصد کارآیی احتباس با افزایش مقدار ESAT-6 در این نانوپارتیکل‌ها کاهش می‌یابد. در ادامه مطالعه با افزودن پروتئین ESAT-6 (در غلظت $30 \mu\text{g}/\text{ml}$) به محلول کایتوزان $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ، میزان پروتئین موجود در مایع رویی محاسبه گردید. در نتیجه محاسبات انجام شده میزان بارگیری پروتئین موجود در درون ذرات نانوپارتیکل ایجاد شده تقریباً $95/234\%$ از مقدار اولیه بوده است. جدول ۲ نتایج مربوط به احتباس مقادیر مختلف پروتئین ESAT-6 را در نانوپارتیکل‌های کایتوزان نشان می‌دهد.

شکل نانوپارتیکل‌ها و توزیع آنها مناسب بود و قادر بهم چسبندگی و تجمع بودند (شکل ۱).

مقایسه نتایج حاصله از افزودن مقادیر افزایش یافته از پروتئین ESAT-6 به محلول TPP اولیه بر مقدار پروتئین محبوس شده در نانوپارتیکل‌های کایتوزان نشان می‌دهد که با افزایش میزان پروتئین، بدون در نظر گرفتن غلظت کایتوزان، مقدار پروتئین محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها به تدریج افزایش می‌یابد. اما محاسبه درصد کارآیی احتباس در نانوپارتیکل‌ها نشان می‌دهد که درصد کارآیی احتباس با افزایش مقدار ESAT-6 به تدریج افزایش می‌یابد و سپس به یک کفه ثابت



شکل ۱: بررسی مورفولوژی نانو پارتیکل‌های کایتوزان توسط میکروسکوپ TEM

جدول ۲: بررسی میزان احتباس مقادیر مختلف پروتئین BSA در نانوپارتیکل‌های کایتوزان

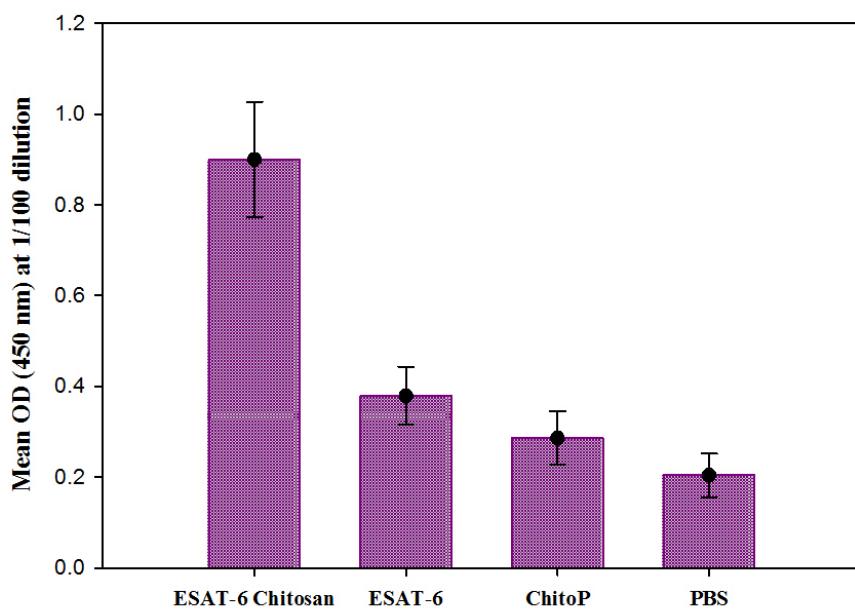
مقدار آنتی زن موجود در نانوپارتیکل	زتا پتانسیل (mv)	اندازه میانگین ذرات (nm)	اختلاف پراکندگی (PDI)	درصد کارآیی احتباس
۱۰	$33/2 \pm 3/4$	$238/7 \pm 12/12$	$0/178 \pm 0/061$	۸۸/۵۲۴
۳۰	$28/2 \pm 4/3$	$248/\pm 14/5$	$0/100 \pm 0/028$	۹۵/۲۳۴
۶۰	$24/2 \pm 3/6$	$305/8 \pm 9/8$	$0/281 \pm 0/092$	۸۳/۲۵۳

نانوپارتیکل‌های ESAT-6 (ESAT6ChitoP) و ESAT-6 را به صورت تجویز داخل بینی دریافت کرده بودند از سایر گروه‌ها بیشتر می‌باشد و اختلاف بین این گروه با سایر گروه‌ها معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). اما در این میان مقدار OD به دست آمده از گروهی که ESAT-6 را به شکل نانوپارتیکل دریافت کرده بودند بیش از دو برابر گروهی بود که ESAT-6 را به طور مستقیم دریافت کرده بودند. نمودار ۲ میانگین حاصله از اندازه‌گیری مقدار IgG در طول موج ۴۵۰ nm را نشان می‌دهد. گروهی که آنتیژن-6 ESAT-6 را در همراهی با کایتوzan به صورت نانوپارتیکل دریافت کرده بودند نسبت به سایر گروه‌ها میزان بالاتری از آنتی بادی اختصاصی را تولید کرده‌اند ($p < 0.05$)

به منظور بررسی روند رهایش پروتئین‌های محبوس شده در درون نانوپارتیکل‌های کایتوzan، نانوپارتیکل‌های فوق به مدت ۲۰۰ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند.

روند رهایش پروتئین از نانوپارتیکل‌های بارگیری شده با پروتئین، کند و دو مرحله‌ای می‌باشد و مقدار رهایش اولیه نیز در آنها بسیار کم است. به طوری که در ۱۲ ساعت اول $48/5\%$ از پروتئین موجود در نانوپارتیکل‌ها آزاد می‌شود. در ساعت ۲۸/۵ این عدد به $52/3\%$ می‌رسد و سپس به یک حد تعادل می‌رسد که با رهایش بسیار ناچیز پروتئین همراه است، به گونه‌ای که این میزان در ساعت ۲۰۰ به $67/5\%$ می‌رسد.

نتایج حاصل از ارزیابی ایمنی همورال بیانگر آن است که میزان تولید IgG در آن دسته از حیوانات تحت آزمایش که



نمودار ۲: میانگین حاصله از اندازه‌گیری مقدار IgG اختصاصی در طول موج ۴۵۰ nm

بحث

قابل تصور است. از جمله آنها می‌توان در توانایی کایتوzan در ایجاد محافظت همچون مکانی ذخیره‌ای برای آنتیژن و آزادسازی تدریجی آنتیژن دانست(۲۳). به طوری که کایتوzan باعث محافظت آنتی زن ESAT-6 در مقابل عمل آنزیمهای پروتئولیتیک و لیزوزیم موکوس می‌شود(۲۴). این در حالی

آنتیژن ESAT-6 علیرغم توانایی در ایجاد پاسخ ایمنی به تنها یک فاقد توانایی ذاتی در ایجاد پاسخ ایمنی قوی می‌باشد و برای ایجاد پاسخ ایمنی قوی و ویژه احتیاج به ادجوانت دارد(۲۲).

چندین دلیل برای نقش کایتوzan در افزایش ایمنی‌زایی آنتیژن‌ها

در سطح نانوپارتيکل‌ها قرار دارند، با سرعت بیشتری رها می‌شوند و در مرحله دوم باقیمانده آنتیژن که در درون نانوپارتيکل‌ها حضور دارند، به آرامی رها می‌شوند. آنتیژن‌های فوق به طور خود به خودی از درون نانوپارتيکل‌های فوق رها نمی‌شود و تنها در نتیجه تخریب بیولوژیکی ذرات فوق، به درون محیط اطراف آزاد می‌شود. این تخریب بیولوژیکی می‌تواند به واسطه لیزوزیم موجود در مخاط صورت گیرد(۳۳).

سلول‌های دندربیتیکی که در اپیتلیوم بینی وجود دارند از نوع میلوئیدی و پلاسماسیتوبؤیدی می‌باشند(۳۴). هنگامی که آنتیژن ارائه شده در مخاط بینی توسط سلول‌های دندربیتیکی از نوع میلوئیدی شناسایی می‌شوند این سلول‌ها باعث تنظیم آغاز فعال شدن سلول‌های B از طریق سایتوکاین‌های IL-6 و IL-12 و Blys/Baff می‌شود(۳۵). علاوه بر این، سلول‌های دندربیتیکی از نوع پلاسما سیتوبؤیدی آنتیژن را شناسایی می‌کنند که با شناسایی آنتیژن، α -IFN تولید می‌کند. همراه با لیگاند CD40 دارای توانایی فعال کردن سلول‌های B و تبدیل آنها به پلاسما سل‌ها هستند(۳۶). این سلول‌ها علاوه بر تبدیل آنها به پلاسما سل‌ها همچنند(۳۷). این سلول‌ها علاوه بر α -IFN به طور مستقیم IL-6 تولید می‌کنند که باعث تکثیر سلول‌های B و تبدیل آنها به پلاسما سل‌ها می‌شوند(۳۸).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که تجویز پروتئین-ESAT-6 به تنها ای از طریق بینی نمی‌تواند به عنوان روش مناسبی برای القای پاسخ آنتی‌بادی باشد. این در حالی است که با تجویز این پروتئین به صورت نانوپارتيکل میزان ایمنی هومورال و پاسخ آنتی‌بادی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

این مطالعه بر توانایی نانوپارتيکل‌های کایتوzan در افزایش پاسخ ایمنی هومورال مانند مطالعات گذشته همچون افزایش پاسخ آنتی‌بادی علیه دیفتیزی(۳۷) پنوموکوک(۳۸) تأکید دارد. علاوه بر این نتایج به دست آمده در این تحقیق با گزارش‌های قبلی که از حاملین نانو و میکرو پارتيکل برای انتقال آنتیژن‌های توبرکلوزیس استفاده شده بود، همخوانی دارد. در این زمینه می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Carpenter اشاره کرد که در آن تجویز آنتیژن ESAT-6 به صورت

است که پروتئین ESAT-6 بدون استفاده از نانوپارتيکل‌های کایتوzan به عمل این آنزیمهای حساس بوده و به سرعت دناتوره می‌شود. علاوه بر این کایتوzan دارای اثرات ضدمیکروبی و ضدآکسیدانتی نیز می‌باشد(۲۵-۲۷). مکانیسم دیگر اثر کایتوzan در افزایش ایمنی‌زایی از طریق بینی را می‌توان، شکسته شدن موقت پل‌های بین سلولی توسط کایتوzan دانست. به طوری که از این طریق باعث افزایش جذب عوامل درمانی مختلف از جمله واکسن‌ها می‌شود(۲۸).

استفاده از روش واکسن‌رسانی از طریق مخاط بینی علیه بیماری سل روشن است که در مطالعات قبلی مورد استفاده فراوان قرار گرفته و نتایج قابل قبولی را ارائه نموده است(۱۱). مطالعات بیانگر آن است که استفاده از این روش باعث تحریک سیستم ایمنی به خصوص در شکل موضعی می‌شود و حتی گاهی نسبت به سایر روش‌های تجویز، ایمنی بهتری می‌دهد(۲۹،۳۰). روش‌های مختلفی در تجویز واکسن از طریق مخاط بینی وجود دارد که یکی از مؤثرترین آنها استفاده از نانوپارتيکل‌ها می‌باشد(۱۵،۱۶). مطالعات قبلی نشان دادند که کایتوzan می‌تواند به عنوان ترکیب مناسبی برای انتقال آنتیژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کار رود(۳۱).

نانوپارتيکل‌های کایتوzan که در این تحقیق به دست آمد در غلظت ۱ mg/ml کایتوzan، خصوصیات ظاهری و اندازه مناسب دارند. اندازه نانوپارتيکل‌های به دست آمده در نتیجه بارگیری پروتئین در درون کایتوzan، در حدود ۲۴۲/۸ نانومتر بود که برای انتقال از طریق بینی ایده‌آل می‌باشد. مطالعات گذشته ثابت کرده‌اند که ذرات کوچکتر از ۱ میکرون به راحتی توسط سلول‌های فاگوسیت بلعیده می‌شوند(۲۴،۳۲). لذا ذرات ایجاد شده برای بلعیده شدن توسط این سلول‌ها ایده‌آل خواهند بود. علاوه بر این، پتانسیل زتا و شارژ الکتریکی مثبت ایجاد شده نیز می‌تواند در اتصال مؤثر ذرات فوق به مخاط بینی مؤثر باشد.

نتایج به دست آمده در دوره ۲۰ ساعتی که میزان رهایش آنتیژن از درون نانوپارتيکل‌های کایتوzan محاسبه گردید، نشان داد که روند رهایش آنتیژن از درون نانوپارتيکل‌ها کند و دو مرحله‌ای می‌باشد. در مرحله اول رهایش مقداری از آنتیژن که

ایمنی علیه سل دانست. در ضمن نتایج به دست آمده نشان دهنده توانایی بالای روش تجویز به شکل درون بینی در ایجاد ایمنی علیه آنتیژن ESAT-6 می‌باشد.

میکروپارتیکل با پلیمرهای PLA توانسته بود باعث القای تولید IFN- γ و IL-4 گردد (۳۹).

طبق نتایج به دست آمده می‌توان نانوپارتیکل‌های کایتوزانی ESAT-6 را به عنوان سیستم انتقالی مناسب جهت افزایش

References:

- 1- Martin C. *Tuberculosis vaccines: past, present and future*. Curr Opin Pulm Med 2006; 12(3): 186-91.
- 2- Wang Q, Sun SH, Hu ZL, Yin M, Xiao CJ, Zhang JC. *Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting*. Vaccine 2004; 22(27-28): 3622-7.
- 3- Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. *Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis*. Int J Epidemiol 1993; 22(6): 1154-8.
- 4- Hoft DF ,Brown RM, Belshe RB. *Mucosal Bacille Calmette-Guerin vaccination of humans inhibits delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative but induces mycobacteria-specific interferon- gamma responses*. Clin Infect Dis 2000; 30(Suppl 3): S217-22.
- 5- Andersen P. *TB vaccines: progress and problems*. Trends Immunol 2001; 22(3): 160-8.
- 6- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. *Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis*. Science 1997; 276(5317): 1420-2.
- 7- Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. *Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guerin attenuation*. J Infect Dis 2003; 187(1): 117-23.
- 8- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. *Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis*. J Bacteriol 1996; 178(5): 1274-82.
- 9- Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, Sherman DR, et al *Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence*. Proc Nati Acad Sci USA 2005; 102(30): 10676-81.
- 10- Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, et al. *Individual RD1 region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 2004; 51(2): 359-70.
- 11- Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. *Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with Mycobacterium tuberculosis and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity*. J Immunol 2006; 177(9): 6353-60.
- 12- Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. *Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects*. Int J Pharm 2007; 337(1-2): 1-24.

- 13-** Chaudhury A, Das S. *Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents.* AAPS Pharm SciTech 2011; 12(1): 10-20.
- 14-** Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. *Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers.* Int J Nanomedicine 2011; 6: 765-74.
- 15-** Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Préat V. *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach.* J Control Release 2006; 116(1): 1-27.
- 16-** Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010; 75(1): 1-18.
- 17-** Damgé C, Reis CP, Maincent P. *Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin.* Expert Opin Drug Deiv 2008; 5(1): 45-68.
- 18-** Kalyan S, Sharma PK, Garg VK, Kumar N, Varshney J. *Recent advancement in Chitosan based formulations and its pharmaceutical application.* Der Pharmacia Sinica 2010; 1 (3): 195-210.
- 19-** Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. *Nanoparticles of glycol chitosan and its thiolated derivative significantly improved the pulmonary delivery of calcitonin.* Int J Pharm 2010; 397(1-2): 92-5.
- 20-** Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Gu W, et al. *Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical Applications.* Marine Drugs 2010; 8(7): 1962-87.
- 21-** Remunan-Lopez C, Portero A, Vila-Jato JL, Alonso MJ. *Design and evaluation of chitosan /ethyl cellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery.* J Control Rel ease 1998; 55(2-3): 143-52.
- 22-** Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. *ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis.* Infecti Immunity 2000; 68(2): 791-5.
- 23-** Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schлом J, Greiner JW. *Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination.* Vaccine 2007; 25(11): 2085-94.
- 24-** Aiba S. *Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans.* Int J Biol Macromol 1992; 14(4): 225-8.
- 25-** Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action.* Biomacromolecules 2003; 4(6): 1457-65.
- 26-** Xie W, Xu P, Liu Q. *Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives.* Bioorg Med Chem Lett 2001; 11(13): 1699-701.
- 27-** Fernandes JC, Eaton P, Nascimento H, Gião MS, Ramos ÓS, Belo L, et al. *Antioxidant activity of chitooligosaccharides upon two biological systems: erythrocytes and bacteriophages.* Carbohydrate Polymers 2010; 79(4): 1101-6.

- 28- Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, Das Neves J, Sosnik A, Sarmento B. *Chitosan- grafted copolymers and chitosan-ligand conjugates as matrices for pulmonary drug delivery.* Int J Carbohydrate Chem; 2011. doi:10.1155/2011/865704.
- 29- Tchilian EZ, Ronan EO, de Lara C, Lee LN, Franken KLMC, Vordermeier MH, et al. *Simultaneous immunization against tuberculosis.* PloS one 2011; 6(11): e27477.
- 30- Sable SB, Cheruvu M, Nandakumar S, Sharma S, Bandyopadhyay K, Kellar KL, et al. *Cellular immune responses to nine mycobacterium tuberculosis vaccine candidates following intranasal vaccination.* PloS one 2011; 6(7): e22718.
- 31- Tian X, Cai H, Zhu YX. *Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64.* Acta Biochim Biophys Sin 2004; 36(4): 269-76.
- 32- O'Hagan DT. *Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines.* Adv Drug Deliv Rev 1998; 34(2-3): 305-20.
- 33- van der Lubben IM, Verhoef J, Borchard G, Junginger HE. *Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery.* Eur J Pharm Sci 2001; 14(3): 201-7.
- 34- Eijgenraam JW, Reinartz SM, Kamerling SWA, Van Ham VJ, Zuidwijk K, Van Drunen CM, et al. *Immuno-histological analysis of dendritic cells in nasal biopsies of IgA nephropathy patients.* Nephrol Dial Transplantat 2008; 23(2): 612-20.
- 35- Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. *Dendritic cells control B cell growth and differentiation.* Curr Dir Autoimmun 2005; 8: 124-39.
- 36- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. *Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity.* J Virol 2005; 79(1): 17-27.
- 37- Rezaei Mokarram A, Alonso M. *Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing Diphtheria toxoid as new carriers for nasal vaccine delivery in mice.* Arch Razi Institute 2007; 61(1): 13-25.
- 38- Xu J, Dai W, Wang Z, Chen B, Li Z, Fan X. *Intranasal vaccination with chitosan-dna nanoparticles expressing pneumococcal surface antigen a protects mice against nasopharyngeal colonization by streptococcus pneumoniae.* Clin Vaccine Immunol 2011; 18(1): 75-81.
- 39- Carpenter ZK, Williamson ED, Eyles JE. *Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu.* J Control Release 2005; 104(1): 67-77.

Preparation of ESAT-6 Nanoparticles and Evaluation of Humoral Immunity after Intranasal Administration

Amini Y(MSc)¹, Tebianian M(PhD)², Mosavari N(PhD)³, Fasihi Ramandi M(PhD)⁴, Ebrahimi SM(PhD)⁵, Dabaghian M(student PhD)⁶, Najminezhad H(MSc)⁷, Yahghubi S(MSc)⁸

^{1,7,8}Microbiologist, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

²Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

³Department of Tuberculin Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

⁴Medical Biotechnologist, Molecular Biology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

⁵Assistant Professor, Virology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

⁶Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 21 Feb 2012

Accepted: 19 Jul 2012

Abstract

Introduction: Among several tuberculosis vaccine candidates for replacement of BCG, ESAT-6 protein has a special role. Since mycobacterium tuberculosis infection most often attacks the lungs, intranasal rout can be regarded as appropriate methods for tuberculosis vaccines and drug delivery. One of the appropriate systems for intranasal vaccine delivery is using biodegradable nanoparticles. Among biodegradable polymers, chitosan polymer has great features to increase the response of immunity system. This study aimed to investigate the specific humoral immune response of mice model after encapsulation of recombinant ESAT-6 antigen in chitosan nanoparticles.

Methods: The chitosan nanoparticles containing ESAT-6 antigen were synthesized by ionic gelation. Nanoparticle properties including morphology, particle size, zeta potential, encapsulation rates, and protein release were measured in vitro. The immunization was performed through the nose for 3 times on days 0 and 14 and 28. 2 weeks after last administration, blood samples were collected and specific IgG titers were measured by indirect ELISA.

Results: The nanoparticles synthesized had appropriate properties. The mean size of resulting nanoparticles was 242.8 nm by excellent antigen loading capacity (95.23 %). The vitro release of antigen from nanoparticles after 200 hours was detected as 67.5%. The Level of IgG antibody showed significant increase in the group that had received chitosan nanoparticles containing ESAT-6 compared with other groups.

Conclusion: ESAT-6 protein was encapsulated in chitosan nanoparticles successfully. Administration of chitosan nanoparticles can be a suitable method for administration of humoral immunity antigens of Mycobacterium tuberculosis through intranasal rout.

Keywords: Chitosan; ESAT-6; Humoral immune responses; Mycobacterium tuberculosis

This paper should be cited as:

Amini Y, Tebianian M, Mosavari N, Fasihi Ramandi M, Ebrahimi SM, Dabaghian M, Najminezhad H, Yahghubi S. ***Preparation of ESAT-6 nanoparticles and evaluation of humoral immunity after intranasal administration.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2012; 20(5): 605-14.

*Corresponding author: Tel: +98 2614570038, Email: mtebianian@yahoo.com