



## سنتر نانوپارتيكل‌هاى پروتئين ESAT-6 و بررسى ايمنى همورال بعد از تجويز آن از طريق بينى

يوسف امينى<sup>۱</sup>، مجيد تبيانان<sup>۲\*</sup>، نادر مصورى<sup>۳</sup>، مهدى فصيحى رامندى<sup>۴</sup>، سيد محمود ابراهيمى<sup>۵</sup>، مهران دباغيان<sup>۶</sup>، حميد نجمى نژاد<sup>۷</sup>، سجاد يعقوبى<sup>۸</sup>

۱-۸، ۷، ۱- کارشناس ارشد گروه ميكروبيولوژى، موسسه تحقيقات واكسن و سرم سازى رازى، كرج

۲- استاديار گروه ايمونولوژى، موسسه تحقيقات واكسن و سرم سازى رازى، كرج

۳- استاديار گروه ميكروبيولوژى، بخش توليد توبركولين و مالئين، موسسه تحقيقات واكسن و سرم سازى رازى، كرج

۴- دكتوراى گروه زيست فناورى پزشكى، مركز تحقيقات بيولوژى مولكولى، دانشگاه علوم پزشكى و خدمات بهداشتى درمانى بقيه الله (عج) تهران

۵- استاديار گروه ويروس شناسى، مركز تحقيقات ويروس شناسى، دانشگاه علوم پزشكى و خدمات بهداشتى درمانى بقيه الله (عج) تهران

۶- دانشجوى دكتورى ايمونولوژى، دانشگاه تهران

تاريخ پذيرش: ۱۳۹۱/۴/۲۹

تاريخ دريافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲

### چكیده

مقدمه: كانديداهای واكسنى مختلفى برای جایگزینی تنها واكسن موجود بر علیه مايكوباکتريوم توبركلوزيس (BCG) وجود دارد. در اين ميان پروتئين ESAT-6 نقش ویژه‌اى دارد. از روش‌هاى مناسب برای تجويز واكسن عليه اين باكتري مى‌توان به روش تجويز درون بينى اشاره كرد. يکى از سيستم‌هاى مناسب انتقال واكسن از طريق بينى، استفاده از نانوپارتيكل‌هاى زيست تخریب‌پذير مى‌باشد. در ميان پليمرهاى زيست تخریب‌پذير، پليمر کائيتوزان داراى قابليتى فراوان در افزايش پاسخ سيستم ايمنى است. هدف اين مطالعه افزايش پاسخ ايمنى همورال از طريق احتباس آنتى‌ژن ESAT-6 درون نانوپارتيكل‌هاى کائيتوزان مى‌باشد. روش بررسى: سنتر نانوپارتيكل‌هاى کائيتوزان حاوى ESAT-6 از طريق روش ژلاسيون در محيط آبى انجام شد. خصوصيات نانوپارتيكل‌ها شامل مورفولوژى، توزيع اندازه ذرات، پتانسيل زتا، ميزان احتباس پروتئين و ميزان آزادسازى آن در محيط آزمایشگاهى اندازه‌گيرى شد. سپس نانوپارتيكل حاوى آنتى‌ژن، آنتى‌ژن به تنهائى و کائيتوزان به تنهائى از طريق بينى به موش در روزهاى ۰ و ۱۴ و ۲۸ تجويز شد. دو هفته بعد از تجويز خونگيرى انجام شده و ميزان تيتير IgG توسط تست اليزاى غيرمستقيم اندازه‌گيرى شد. نتايج: پروتئين ESAT-6 با موفقيت درون نانوپارتيكل‌هاى کائيتوزان احتباس شد و نانوپارتيكل‌هاى سنتر شده داراى خصوصيات مناسب بودند. به طورى که هنگامى که نسبت TMC/TPP برابر با ۵/۱ در غلظت ۱ mg/ml از TMC بود، متوسط سايز نانوپارتيكل‌ها ۲۴۲/۸±۸/۷۱ نانومتر به دست آمد و ميزان احتباس پروتئين ۹۵/۲۳۴٪ بود که داراى ميزان رهايش ۶۷/۵٪ بعد از ۲۰۰ ساعت بودند. ميزان آنتى‌بادى IgG در گروهى که نانوپارتيكل‌هاى کائيتوزان حاوى ESAT-6 را دريافت کرده بودند در مقايسه با ساير گروه‌ها افزايش معنى‌دارى را نشان داد. نتيجه‌گيرى: تجويز نانوپارتيكل‌هاى حاوى آنتى‌ژن ESAT-6 و کائيتوزان از طريق بينى مى‌تواند به عنوان يک روش مناسب جهت تجويز آنتى‌ژن‌هاى ايمنى‌زاى مايكوباکتريوم توبركلوزيس برای القای پاسخ ايمنى همورال باشد.

واژه‌هاى کلیدى: مايكوباکتريوم توبركلوزيس، ESAT-6، آنتى‌بادى، کائيتوزان

\* (نويسنده مسؤل)؛ تلفن: ۲۶۱-۴۵۷۰۰۳۸، پست الكترونيكى: mtebianian@yahoo.com

## مقدمه

توبرکلوزيس يا بيماری سل توسط باکتری مايکوباکتریوم توبرکلوزيس ايجاد می‌شود. اين بيماری در گذشته یکی از خطرناک‌ترین بيماری‌ها بوده است، به طوری که در طول تاريخ جان ميلياردها نفر را گرفته است (۱). علیرغم تلاش‌های فراوان در کنترل بيماری در سال‌های اخير اين بيماری همچنان به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و مير در سرتاسر جهان شناخته شده است که نتیجه آن آلوده شدن ۸۰۰۰۰۰۰ مورد جديد و مرگ ۳۰۰۰۰۰۰ نفر در هر سال می‌باشد (۲). واکسنی که علیه اين بيماری به طور گسترده استفاده می‌شود (BCG: Bacille Calmette-Guérin) می‌باشد. یکی از معايب اين واکسن عدم ايجاد ايمنی کافی علیه سل است. بررسی‌هایی که در زمينه میزان کارایی BCG در انسان صورت گرفته، گيج‌کننده و متضاد است. به طوری که واکسن مذکور در جلوگیری از توبرکلوزيس در کودکان، دارای کارایی ۵۰٪ تا ۷۰٪ می‌باشد. اين در حالی است که میزان کارایی آن در بزرگسالان پیچیده و متغير است. میزان کارایی واکسيناسيون افراد ۱۴-۱۲ سال در انگلستان حدود ۷۵٪ بود اين در حالی است که میزان کارایی واکسن در جنوب هندوستان نزدیک به صفر بوده است (۳). ايجاد BCG منتشر در افراد مبتلا به (HIV: Human immunodeficiency virus) و اثر بر روی تست پوستی توبرکولیناز از ديگر مشکلات واکسن BCG است (۴). بر همين اساس تلاش جهان در مورد جایگزینی واکسن BCG با واکسنی جديد و کارا صورت گرفته است. در میان کاندیداهای واکسنی پیشنهاد شده واکسن‌های زیر واحدی (Subunit vaccine) از مهم‌ترین واکسن‌های کاندید می‌باشند. استراتژی کلی اين واکسن‌ها در ايجاد ايمنی، استفاده از آنتی‌ژن‌های غالب و اصلی در تحریک سيستم ايمنی می‌باشد (۵). از آنتی‌ژن‌های غالب و اصلی که در اين واکسن‌ها استفاده می‌شود، می‌توان به دو آنتی‌ژن خانواده میکوزیل ترانسفرازا Ag85A (Antigen 85A) و Ag85B (Antigen 85B) و (85B) و Ag85C (Antigen 85C) و پروتئين ESAT-6 (6) (kDa Early Secretory Antigenic Target) اشاره کرد (۵،۶).

پروتئين ESAT-6 یکی از عوامل بيماری‌زایی و کاندیدای سنتر واکسن مايکوباکتریوم توبرکلوزيس می‌باشد. اين پروتئين توسط ناحیه ژن RD1 (Region of Deletion) کد می‌شود و در تمام مايکوباکتری‌های پاتوژن از جمله توبرکلوزيس و بویس و آفریکانوم وجود دارد، اما به دليل حذف ناحیه ژنی RD1 در واکسن BCG وجود ندارد. در نتیجه ايمنی علیه آن در افراد واکسينه شده با BCG ايجاد نمی‌شود (۷-۱۰).

مخاط راه اصلی ورود پاتوژن‌های گوناگون به بدن ميزبان است. بافت‌های لنفوئیدی ویژه‌ای در موكوس بينی و روده وجود دارد که یکی از مکان‌های اصلی آغاز پاسخ‌دهی به اين پاتوژن‌ها می‌باشند (۱۱). در اين میان استفاده از غشای مخاطی به دليل داشتن سطح وسیع برای رساندن واکسن‌ها و داروها، ظهور سريع پاسخ‌دهی، امکان دسترسی به سيستم عصبی و نبود متابوليسم تأثیرگذار بر روی واکسن و داروها توسعه فراوان یافته است (۱۲). در اين میان برای افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکسن‌ها و داروها توسط انواع آنزیم‌های هیدروليتیک و پروتئوليتیک و ليزوزيم، افزایش ثبات آنها، افزایش اختصاصیت به هدف و قابلیت حل شدن در محلول‌های آبی، نیاز به سيستم‌های دارورسانی نوین می‌باشد (۱۱،۱۳،۱۴). بر اساس تحقیقات انجام شده، در میان سيستم‌های مختلف دارورسانی، پلیمر نانوپارتيکل‌های زیست تخریب‌پذیر (Biodegradable Nanoparticle Polymer) دارای توانایی بالایی برای انتقال عوامل درمانی از جمله انواع واکسن، دارو، ژن‌ها و پروتئين‌ها می‌باشد (۱۵،۱۶). از جمله دلایل اين توانایی بالا می‌توان به ویژگی نانوپارتيکل‌ها در میزان جذب بالا، انکسوله شدن بهتر در مقایسه با ساير روش‌ها، تحت کنترل بودن آزادسازی عوامل درمانی و اثرات توكسيك کمتر، اشاره کرد (۱۶).

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

آنتی ژن ESAT-6 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 ۱۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C بر روی بستری از ۱۰ میکرولیتر گلیسرین ساخت شرکت سیگما آلدریج جداسازی گردیدند و برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوپارتیکل‌ها از میکروسکوپ TEM (ترانسمیژن) استفاده شد. سپس از دستگاه زتا سائزر شرکت MALVEN 3000 جهت بررسی توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای (Zeta Potential) نانوپارتیکل‌ها استفاده شد. بدین منظور حدود ۳۰ میکرولیتر از نمونه نانوپارتیکلی به ۱ میلی‌لیتر از آب چند بار تقطیر شده، اضافه گردید و در محفظه دستگاه قرار داده شد و سائز ذرات اندازه‌گیری شد. برای تعیین نسبت توزیع اندازه ذرات، ۵ بار مقدار سدیم تری‌پلی‌فسفات به کایتوزان 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 آلدریج استفاده شد. با توجه به اینکه پلیمر کایتوزان در روش BCA با پروتئین دارای تداخل می‌باشد، از این روش نمی‌توان به صورت مستقیم مقدار آنتی ژن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها را محاسبه نمود. در این مورد مقدار آنتی ژن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها از روی مقدار کل آنتی ژن اولیه اضافه شده به محیط و مقدار نهایی باقیمانده در فاز آبی (انکپسوله نشده) محاسبه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول کایتوزان ۱ mg/ml 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 ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ گردید و محلول رویی آن جدا شد و میزان پروتئین

مزایای فراوانی از جمله فراوان بودن و نداشتن توکسیته، بیشترین استفاده شده است (۱۷). ساختمان این پلیمر به شکل  $\text{poly}[-(1,4)\text{-}2\text{-amino-}2\text{-deoxy-D-glucopyranose}]$  می‌باشد (۱۸). در تحقیقات جدیدی که توسط Makhlof انجام گرفت مشاهده شد که با اضافه کردن گروه تیولی (Thioglycolic Acid- Glycol) می‌توان خاصیت چسبندگی موکوسی کایتوزان را هنگامی که از طریق بینی استفاده می‌شود، هر چه بیشتر افزایش داد (۱۹). البته کایتوزان معایبی همچون وزن مولکولی بالا و چسبندگی فراوان و در نتیجه قابلیت کم حلالیت در محلول‌های آبی فاقد اسید را هم دارد که این معایب 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 کایتوزان در تحریک پاسخ آنتی‌بادی علیه آنتی ژن ESAT-6 در مقایسه با آنتی ژن ESAT-6 به تنهایی از طریق تجویز درون بینی بررسی شود.

### روش بررسی

روش تهیه نانوپارتیکل‌های حاوی پروتئین ESAT-6 بر اساس انجام ژلاسیون یونی کایتوزان 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 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  $0.45 \mu\text{m}$  عبور داده شد. سپس با توجه به اینکه بر هم کنش کایتوزان با TPP: Sodium Tripolyphosphate از نظر استوکیومتری یک واکنش یک به یک می‌باشد از این روش محلول TPP ۱ mg/ml ساخت شرکت سیگما آلدریج تهیه گردید و از خلال فیلتر غشایی  $0.45 \mu\text{m}$  عبور داده شد. در مرحله بعد به ۱ میلی‌لیتر از محلول تری متیل کایتوزان با غلظت‌های مختلف (۰/۵mg/ml و ۱ 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 ۱۶-۲۴ ساعت که اتصال بین آنتی‌ژن 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 گرمخانه ۳۷°C قرار گرفت. بعد از ۱ ساعت میکروپلیت ۳ بار مورد شستشو قرار گرفت. به چاهک‌ها رقت یکسان ۱ به ۱۰۰ از سرم حیوانات ایمونیزه و به چاهک‌های کنترل منفی سرم حیوانات غیر ایمونیزه اضافه شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۱ ساعت انجام شد. در نهایت شستشو ۳ بار تکرار گردید. آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با آنزیم پراکسیداز (Peroxidas Conjugated Goat Anti-Mouse IgG) ساخت شرکت سیگما آلدریج در غلظت ۱/۸۰۰۰ و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۳ بار شستشو تکرار گردید. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای پراکسید (بافر TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ساخت شرکت مرک اضافه گردید و به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شد. محلول ۲۰٪ 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 افزوده و در دمای ۳۷°C بر روی شیکر مخلوط شدند. از نمونه‌های نانوپارتیکلی کایتوزان در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴، ۱۶۰، ۲۰۰ ساعت نمونه‌گیری انجام گردید. قبل از هر بار نمونه‌برداری، نمونه‌ها در ۱۵۰۰g به مدت 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 MICRO BCA ساخت شرکت سیگما آلدریج 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 هفته به 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 ۱۲ ساعت شب برخوردار بودند و در دمای ثابت ۲۱-۲۳°C نگهداری شدند. حیوانات قبل از هر تجویز داخل بینی توسط تزریق داخل صفاقی ۰/۰۵ml مخلوط ۱:۳ کتامین ساخت 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 کیتوزان یا ESAT-6 به تنهایی یا کیتوزان 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 ۵۰۰g به مدت 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

## نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت کایتوزان در محلول اولیه میانگین توزیع اندازه ذرات نانوپارتیکل‌های تهیه شده بزرگ و پهن‌تر می‌گردد. به طوری که بزرگترین میانگین اندازه برای نانوپارتیکل‌های تهیه شده با کایتوزان در غلظت ۲mg/ml مشاهده می‌شود. لذا به نظر می‌رسد که بهترین غلظت برای اینکه نانوپارتیکل‌های تهیه شده دارای توزیع اندازه مناسبی

باشند، غلظت ۱ mg/ml است. به طوری که در غلظت ۱mg/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 تهیه شده با غلظت‌های مختلف کایتوزان را نشان می‌دهد.

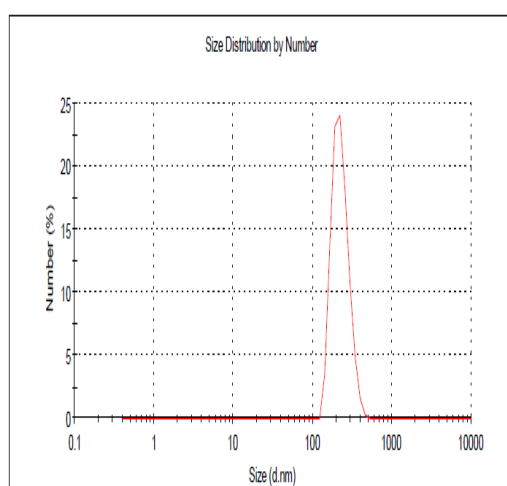
جدول ۱: خصوصیات نانوپارتیکل‌های ایجاد شده از غلظت‌های مختلف TMC در مجاورت سدیم تری پلی‌فسفات

غلظت محلول تری متیل کایتوزان (mg/ml)	پتانسیل زتا (mV)	میانگین اندازه ذرات ایجاد شده (nm)	اختلاف پراکندگی (PDI)
۰/۵	$4/05 \pm 21/22$	$227/18 \pm 7/58$	$0/202 \pm 0/058$
۱	$3/5 \pm 29/0$	$242/8 \pm 8/71$	$0/165 \pm 0/053$
۱/۵	$4/31 \pm 36/3$	$282/80 \pm 11/54$	$0/222 \pm 0/081$
۲	$4/84 \pm 38$	$485/56 \pm 26/22$	$0/845 \pm 0/091$

## 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

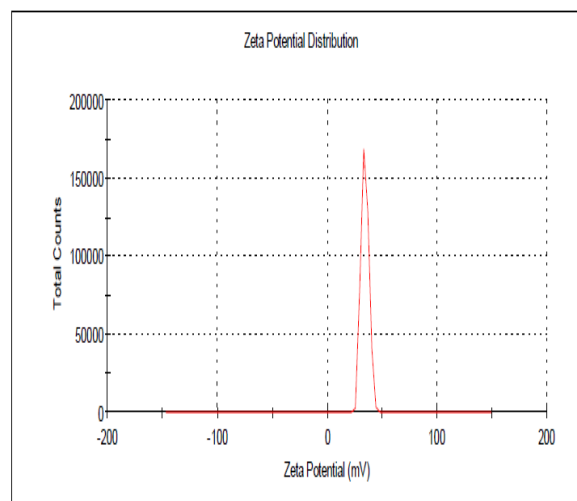
Result quality Refer to quality report



## 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

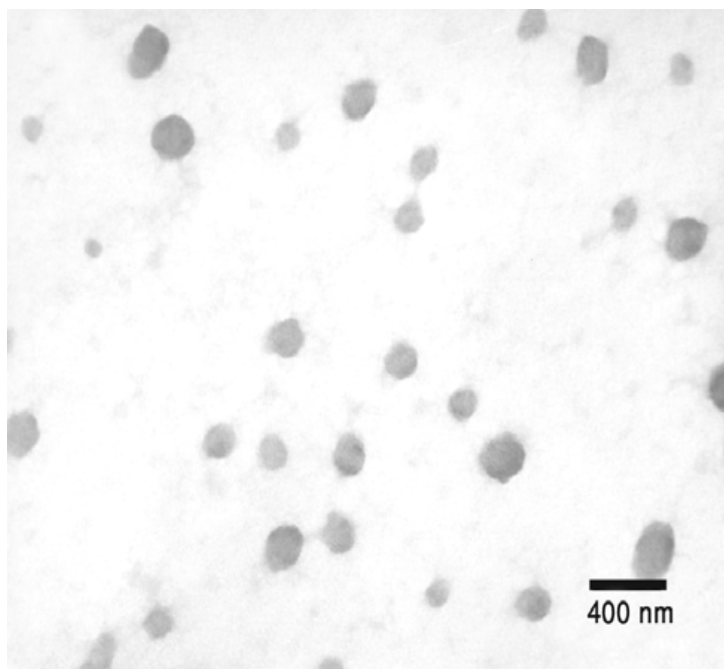
Result quality Good



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

منتهی می‌گردد، به طوری که درصد کارایی احتباس با افزایش مقدار ESAT-6 در این نانوپارتیکل‌ها کاهش می‌یابد. در ادامه مطالعه با افزودن پروتئین ESAT-6 (در غلظت ۳۰ μg/ml) به محلول کایتوزان ۱ mg/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 ۹۵/۲۳۴٪ 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 فاقد بهم چسبندگی و تجمع بودند (شکل ۱). مقایسه نتایج حاصله از افزودن مقادیر افزایش یابنده 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 کارایی احتباس در نانوپارتیکل‌ها نشان می‌دهد که درصد کارایی 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

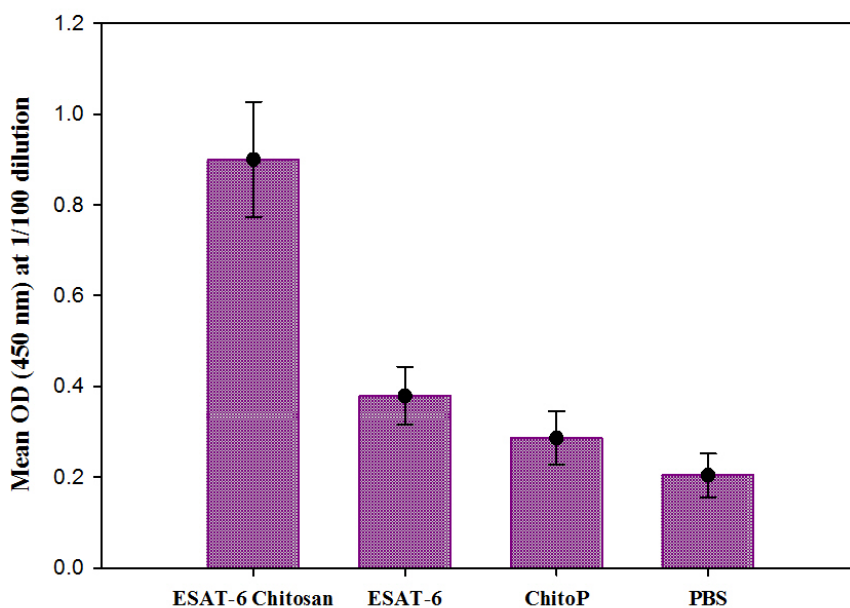
مقدار آنتی ژن موجود در نانوپارتیکل (μg)	زتا پتانسیل (mv)	اندازه میانگین ذرات (nm)	اختلاف پراکندگی (PDI)	درصد کارایی احتباس
۱۰	۳۳/۲±۳/۴	۲۳۸/۷±۱۲/۱۲	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۶۱	۸۸/۵۲۴
۳۰	۲۸/۲±۴/۳	۲۴۸/۱±۱۴/۵	۰/۱۰۰ ± ۰/۰۲۸	۹۵/۲۳۴
۶۰	۲۴/۲±۳/۶	۳۰۵/۸±۹/۸	۰/۲۸۱ ± ۰/۰۹۲	۸۳/۲۵۳

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 ESAT-6 را در همراهی با کاپتوزان 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 کاپتوزان، نانوپارتیکل‌های فوق به مدت ۲۰۰ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  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 ۲۸/۵٪ از پروتئین موجود در نانوپارتیکل‌ها آزاد می‌شود. در ساعت ۴۸ این عدد به ۵۲/۳٪ 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 ۶۷/۵٪ 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 کاپتوزان در ایجاد محافظت همچون مکانی ذخیره‌ای برای آنتی‌ژن و آزادسازی تدریجی آنتی‌ژن دانست (۲۳). به طوری که کاپتوزان باعث محافظت آنتی‌ژن 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 تنهایی 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 کاپتوزان در افزایش ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌ها

است که پروتئین ESAT-6 بدون استفاده از نانوپارتیکل‌های کایتوزان به عمل این آنزیم‌ها حساس بوده و به سرعت دناتوره می‌شود. علاوه بر این کایتوزان دارای اثرات ضد میکروبی و ضد اکسیدانسی نیز می‌باشد (۲۷-۲۵). مکانیسم دیگر اثر کایتوزان در افزایش ایمنی‌زایی از طریق بینی را می‌توان، شکسته شدن موقت پل‌های بین سلولی توسط کایتوزان 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 روشی 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 نانوپارتیکل‌ها می‌باشد (۱۶، ۱۵). مطالعات قبلی نشان دادند که کایتوزان می‌تواند به عنوان ترکیب مناسبی برای انتقال آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کار رود (۳۱).

نانوپارتیکل‌های کایتوزان که در این تحقیق به دست آمد در غلظت ۱ mg/ml کایتوزان، خصوصیات ظاهری و اندازه مناسب دارند. اندازه نانوپارتیکل‌های به دست آمده در نتیجه بارگیری پروتئین در درون کایتوزان، 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 (۳۲، ۲۴). 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 ۲۰۰ ساعتی که میزان رهایش آنتی‌ژن از درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان محاسبه گردید، نشان داد که روند رهایش آنتی‌ژن از درون نانوپارتیکل‌ها کند و دو مرحله‌ای می‌باشد. در مرحله اول رهایش مقداری از آنتی‌ژن که

در سطح نانوپارتیکل‌ها قرار دارند، با سرعت بیشتری رها می‌شوند و در مرحله دوم باقیمانده آنتی‌ژن که در درون نانوپارتیکل‌ها حضور دارند، به آرامی رها می‌شوند. آنتی‌ژن‌های فوق به طور خود به خودی از درون نانوپارتیکل‌های 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 دندریتیکی که در اپی‌تلیوم بینی وجود دارند از نوع میلوئیدی و پلاسماسیتوئیدی می‌باشند (۳۴). هنگامی که آنتی‌ژن ارائه شده در مخاط بینی توسط سلول‌های دندریتیکی 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 دندریتیکی از نوع پلازما سیتوئیدی آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند که با شناسایی آنتی‌ژن، IFN- $\alpha$  تولید می‌کند. IFN- $\alpha$  همراه با لیگاند CD40 دارای توانایی فعال کردن سلول‌های B و تبدیل آنها به پلازما سل‌ها هستند (۳۶). این سلول‌ها علاوه بر IFN- $\alpha$  به طور مستقیم IL-6 تولید می‌کنند که باعث تکثیر سلول‌های B و تبدیل آنها به پلازما سل‌ها می‌شوند (۳۵).

### نتیجه‌گیری

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

این مطالعه بر توانایی نانوپارتیکل‌های کایتوزان در افزایش پاسخ ایمنی هم‌مورال مانند مطالعات گذشته همچون افزایش پاسخ آنتی‌بادی علیه دیفتری (۳۷) پنوموکوک (۳۸) تأکید دارد. علاوه بر این نتایج به دست آمده در این تحقیق با گزارش‌های قبلی که از حاملین نانو و میکرو پارتیکل 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



میکروپارتیکل با پلیمرهای PLA توانسته بود باعث القای تولید IFN- $\gamma$  و IL-4 گردد (۳۹). طبق نتایج به دست آمده می‌توان نانوپارتیکل‌های کایتوزانی ESAT-6 را به عنوان سیستم انتقالی مناسب جهت افزایش 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.

### 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, Sasseti CM, Sherman DR, et al. *Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence*. Proc Natl 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, Pr at 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- Damg  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, Schlom 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, Smaghe 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, Gi o MS, Ramos  S, 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, Sarmiento 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)<sup>1</sup>, Tebianian M(PhD)<sup>2</sup>, Mosavari N(PhD)<sup>3</sup>, Fasihi Ramandi M(PhD)<sup>4</sup>, Ebrahimi SM(PhD)<sup>5</sup>, Dabaghian M(student PhD)<sup>6</sup>, Najminezhad H(MSc)<sup>7</sup>, Yahghubi S(MSc)<sup>8</sup>*

<sup>1,7,8</sup>Microbiologist, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

<sup>3</sup>Department of Tuberculin Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran

<sup>4</sup>Medical Biotechnologist, Molecular Biology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

<sup>5</sup>Assistant Professor, Virology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

<sup>6</sup>Department 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 route 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 in 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 route.

**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**