مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۰ ، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱
صفحه: ۶۲۶-۶۱۵

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 20, No. 5, Nov-Dec 2012
Pages: 615-626

سنتز نانوپارتیکل‌های پروتئین ESAT-6 و بررسی ایمنی هومورال بعد از تجویز آن از طریق بینی

یوسف امینی[۱]، مجید تبیانیان[*۲]، نادر مصوری[۳]، مهدی فصیحی رامندی[۴]، سید محمود ابراهیمی[۵]، مهران دباغیان[۶]، حمید نجمی نژاد[۷]، سجاد یعقوبی[۸]

۸،۷،۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
۲- استادیار گروه ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، بخش تولید توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
۴- دکترای گروه زیست فنآوری پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله (عج) تهران
۵- استادیار گروه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله (عج) تهران
۶- دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۲۹

چکیده

مقدمه: کاندیداهای واکسنی مختلفی برای جایگزینی تنها واکسن موجود برعلیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (BCG) وجود دارد. در این میان پروتئین ESAT-6 نقش ویژه‌ای 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 هومورال از طریق احتباس آنتی‌ژن ESAT-6 درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان می‌باشد.

روش بررسی: سنتز نانوپارتیکل‌های کیتوزان حاوی ESAT-6 از طریق روش ژلاسیون در محیط آبی انجام شد. خصوصیات نانوپارتیکل‌ها شامل مورفولوژی، 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 کیتوزان 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 ESAT-6 با موفقیت 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 mg/ml ۱ از TMC بود، متوسط سایز نانوپارتیکل‌ها ۸/۷۱±۲۴۲/۸ نانومتر به دست آمد و میزان احتباس پروتئین ۹۵/۲۳۴٪ بود که دارای میزان رهایش ۶۷/۵٪ بعد از ۲۰۰ ساعت بودند. میزان آنتی‌بادی IgG در گروهی که نانوپارتیکل‌های کیتوزان حاوی ESAT-6 را دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد.

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

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

[*](نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۴۵۷۰۰۳۸-۲۶۱، پست الکترونیکی: mtebianian@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

مقدمه

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). واکسنی که علیه این بیماری به طور گسترده استفاده می‌شود (BCG: Bacille Calmette-Guérin) می‌باشد. یکی از معایب این واکسن عدم ایجاد ایمنی کافی علیه سل است. بررسی‌هایی که در زمینه میزان کارایی 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 ۱۴-۱۲ 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) و اثر بر روی تست پوستی توبرکولیناز از دیگر مشکلات واکسن BCG است(۴). بر همین اساس تلاش جهان در مورد جایگزینی واکسن BCG با واکسنی جدید و کارا صورت گرفته است. در میان کاندیداهای واکسنی پیشنهاد شده واکسن‌های زیر واحدی (Subunit vaccine) از مهم‌ترین واکسن‌های کاندید می‌باشند. استراتژی کلی این واکسن‌ها در ایجاد ایمنی، 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 ترانسفرازها Ag85A (Antigen 85A) و Ag85B (Antigen 85B) و Ag85C (Antigen 85C) و پروتئین ESAT-6 (6) (kDa Early Secretory Antigenic Target اشاره کرد(۶،۵).

پروتئین ESAT-6 یکی از عوامل بیماری‌زایی و کاندیدای سنتز واکسن مایکوکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. این پروتئین توسط ناحیه ژن RD1(Region of Deletion1) 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 ایمنی علیه آن در افراد واکسینه شده با BCG ایجاد نمی‌شود(۱۰-۷).

مخاط راه اصلی ورود پاتوژن‌های گوناگون به بدن میزبان است. بافت‌های لنفوئیدی ویژه‌ای در موکوس بینی و روده وجود دارد که یکی از مکان‌های اصلی آغاز پاسخ‌دهی به این پاتوژن‌ها می‌باشند(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(۱۱،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 آلژینات و (PLGA: Poly Lactic –co- Glycolic Acid) و کیتوزان جهت انتقال عوامل درمانی از جمله واکسن‌ها استفاده شده است که در این میان شاید از کیتوزان (Chitosan) به دلیل

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

مزایای فراوانی از جمله فراوان بودن و نداشتن توکسیتی، بیشترین استفاده شده است(۱۷). ساختمان این پلیمر به شکل poly [-(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) 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 آنتی‌ژن 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 ۰/۴۵ µm عبور داده شد. سپس با توجه به اینکه بر هم کنش کایتوزان با Sodium Tripolyphosphate: TPP از نظر استوکیومتری یک واکنش یک به یک می‌باشد از این رو محلول۱ mg/ml TPP ساخت شرکت سیگما آلدریچ تهیه گردید و از خلال فیلتر غشایی ۰/۴۵ µm 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 آنتی‌ژن 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 از۱۰میکرولیتر گلیسیرین ساخت شرکت سیگما آلدریچ جداسازی گردیدند و برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرارگرفتند.

جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوپارتیکل‌ها از میکروسکوپ TEM (ترانسمیژن) استفاده شد. سپس از دستگاه زتا سایزر شرکت3000 MALVEN 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 سایز 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 آلدریچ استفاده شد. با توجه به اینکه پلیمر کایتوزان در روش BCA با پروتئین دارای تداخل می‌باشد، از این رو نمی‌توان به صورت مستقیم مقدار آنتی‌ژن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها را محاسبه نمود. در این مورد مقدار آنتی‌ژن محبوس شده در نانوپارتیکل‌ها از روی مقدار کل آنتی‌ژن 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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 ºC 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 ۱۵۰۰۰g 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 آلدریچ تعیین شد.

جهت بررسی پاسخ‌های ایمنی نمونه‌های نانوپارتیکل تهیه شده با پلیمرهای کایتوزان از موش Balb/c ماده با وزن ۵±۲۵ گرم و سن ۸-۶ 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 ۲۳ºC-۲۱ 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 ۴ºC قرار داده شدند و سپس در ۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و لایه سرمی جدا گردید. نمونه سرم‌های جدا شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی در ۲۰ºC- نگهداری شدند. نتایج به دست آمده 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 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 توئین۲۰ 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 ۳۷ºC 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 ایمیونیزه اضافه شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ºC 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 آلدریچ در غلظت ۱/۸۰۰۰ و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ ºC گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۳ بار شستشو تکرار گردید. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای پراکسید (بافر TMB + H2O2) 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.

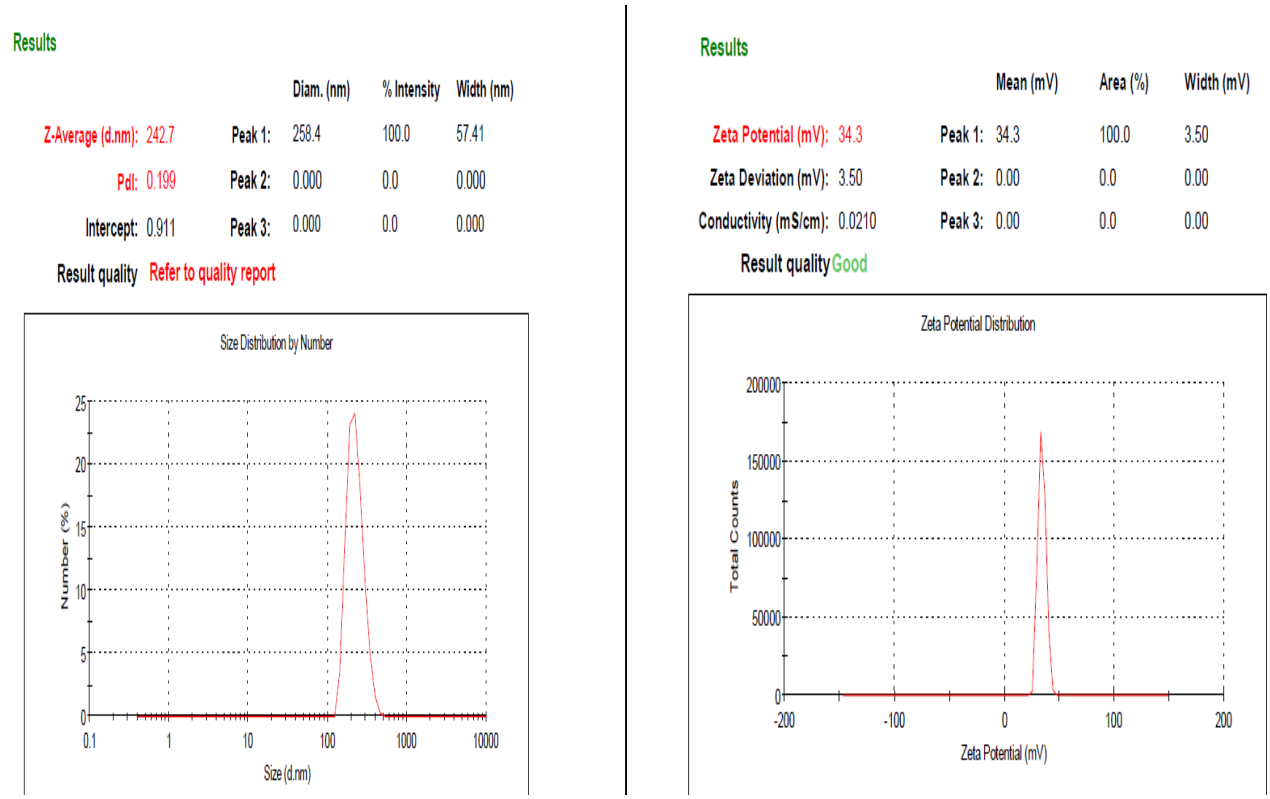
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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 mg/ml ۱ است. به طوری که در غلظت ۱mg/ml متوسط سایز نانو پارتیکل ۲۴۲/۸±۸/۷۱ نانومتر و زتا پتانسیل حاصله ۳/۵ ±۲۹/۰ 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	۲۱/ ۲۲± ۴/۰۵	۲۲۷/۱۸ ± ۷/۵۸	۰/۲۰۲± ۰/۰۵۸
۱	۲۹/۰± ۳/۵	۲۴۲/۸ ± ۸/۷۱	۰/۱۶۵ ± ۰/۰۵۳
۱/۵	۳۶/۳ ± ۴/۳۱	۲۸۲/۸۰ ± ۱۱/۵۴	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۸۱
۲	۳۸ ± ۴/۸۴	۴۸۵/۵۶ ± ۲۶/۲۲	۰/۸۴۵ ± ۰/۰۹۱



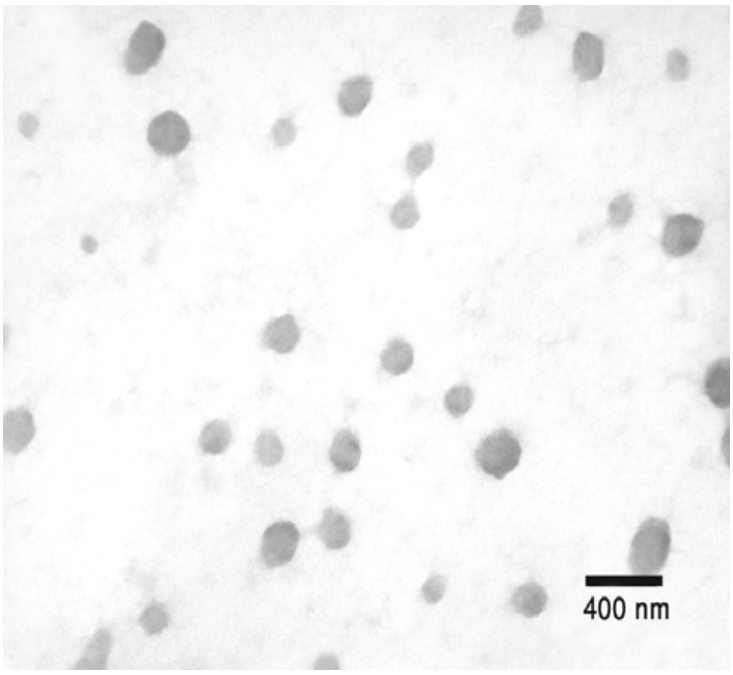
نمودار ۱: توزیع اندازه ذرات و زتا پتانسیل نانوپارتیکل های حاوی آنتی ژن ESAT-6

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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 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 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 ۱: بررسی مورفولوژی نانو پارتیکل‌های کایتوزان توسط میکروسکوپ TEM

جدول۲: 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/±۱۴/۵	۰/۱۰۰ ± ۰/۰۲۸	۹۵/۲۳۴
۶۰	۲۴/۲±۳/۶	۳۰۵/۸±۹/۸	/۲۸۱± ۰/۰۹۲	۸۳/۲۵۳

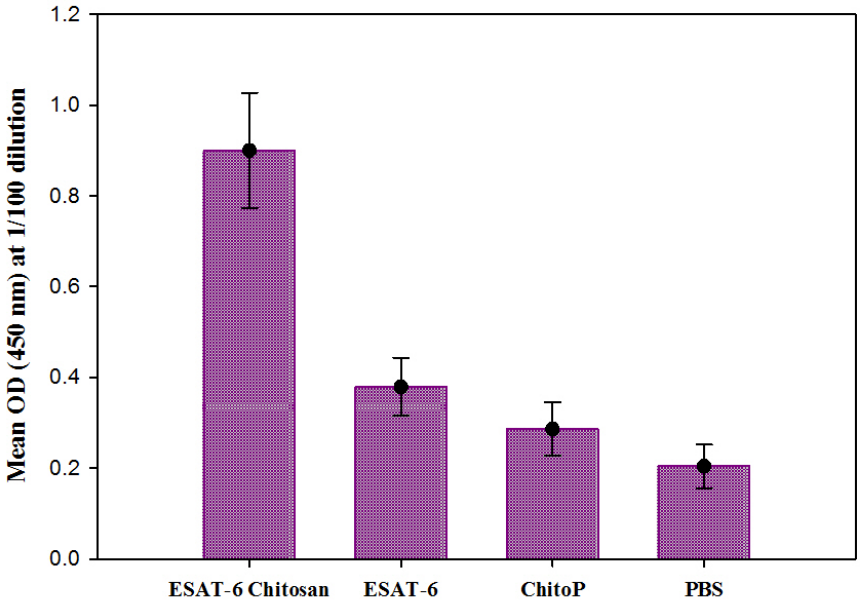
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

به منظور بررسی روند رهایش پروتئین‌های محبوس شده در درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان، نانوپارتیکل‌های فوق به مدت ۲۰۰ ساعت در دمای C ۳۷° انکوبه گردیدند.

روند رهایش پروتئین از نانوپارتیکل‌های بارگیری شده با پروتئین، کُند 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 هومورال بیانگر آن است که میزان تولید IgG در آن دسته از حیوانات تحت آزمایش که 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<۰/۰۵). 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 ۴۵۰nm را نشان می‌دهد.

گروهی که آنتی‌ژن ESAT-6 را در همراهی با کایتوزان به صورت نانوپارتیکل دریافت کرده بودند نسبت به سایر گروه‌ها میزان بالاتری از آنتی بادی اختصاصی را تولید کرده‌اند (p <۰/۰۵)



نمودار ۲: میانگین حاصله از اندازه‌گیری مقدار IgG اختصاصی در طول موج۴۵۰ nm

بحث

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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 ضدمیکروبی و ضداکسیدانتی 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 می شود 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(۱۵،۱۶). 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(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 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 پلاسما سیتوئیدی آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند که با شناسایی آنتی‌ژن، IFN- α تولید می‌کند. IFN- α همراه با لیگاند CD40 دارای توانایی فعال کردن سلول‌های B و تبدیل آنها به پلاسما سل‌ها هستند(۳۶). این سلول‌ها علاوه بر IFN- α به طور مستقیم IL-6 تولید می‌کنند که باعث تکثیر سلول‌های B و تبدیل آنها به پلاسما 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 هومورال و پاسخ آنتی‌بادی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

این مطالعه بر توانایی نانوپارتیکل‌های کایتوزان در افزایش پاسخ ایمنی هومورال 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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 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, 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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, 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, 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]

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
[2]Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran
[3]Department of Tuberculin Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran
[4]Medical Biotechnologist, Molecular Biology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences
[5]Assistant Professor, Virology of Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences
[6]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 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-25]