CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۶، خرداد۱۳۹۷، صفحه ۶۹-۶۲

تهیه و ارزیابی بارگذاری پروتئین ریواکس در نانوذرات کایتوزان

داود صادقی (PhD)[۱]، فیروز ابراهیمی (PhD)[۱*]، مهدی زین الدینی (PhD)[۲]، یوسف تاروردی زاده (MSc)[۱]، مصطفی بخشی (PhD)[۱]، محمد جواد باقری پور (PhD)[۱]، سیدمجتبی آقایی (MSc)[۱]

۱-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲-پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۱۰/۴، اصلاح: ۹۶/۱۲/۱۴، پذیرش: ۹۷/۱/۶

خلاصه

سابقه و هدف: سم ریسین یک گلیکوپروتئین هترودایمر می‌باشد که با توجه به سمیت بالا از آن بعنوان یک عامل بیوتروریسمی استفاده می‌شود. درحال حاضر مطالعات ایمنی‌زایی علیه ریسین بر روی دو کاندید واکسن زیر واحدی شامل ریواکس و RVEc متمرکز شده است. این مطالعات، ایمنی‌زایی کاندید واکسن را به صورت تنها و همراه با ادجوانت مورد بررسی قرار داده‌اند ولی تاکنون از سیستم‌های تحویل نوین مانند نانوذرات، برای بهبود ایمنی‌زایی آنها استفاده نشده است. هدف از این تحقیق،تهیه و ارزیابی بارگذاری کاندید واکسن نوترکیب ریواکس در نانوذرات کیتوزان می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از انتقال ژن ریواکس به باکتری، القاء بیان و تخلیص پروتئین ریواکس توسط ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی، پروتئین ریواکس در نانوذرات کایتوزان با روش ژلاسیون‌یونی بارگذاری شد. سپس خصوصیات نانوذرات شامل اندازه، مورفولوژی، درصد احتباس و الگوی رهایش پروتئین ریواکس از نانوذرات و پایداری این پروتئین در طی شرایط اسیدی بارگذاری در نانوذرات توسط SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین بررسی ایمنی‌زایی بر روی ۳ گروه ۴تایی موش توسط پروتئین ریواکس، نانوذرات حاوی پروتئین و بافرفسفات صورت پذیرفت.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات حاوی پروتئین دارای اندازه ۱۷۸نانومتر، پتانسیل زتای۲۷/۸+ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی برابر ۰/۱۹۳ می‌باشند. همچنین برطبق نتایج SDS-PAGE مشخص شد که پروتئین ریواکس در طی فرآیند تهیه نانوذرات کایتوزان تخریب می‌شود. بالاترین تیتر آنتی‌بادی مربوط به گروه دریافت کننده پروتئین به تنهایی بود (۰/۰۸۲ ± ۲/۶۰۶) که با گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی پروتئین (۰/۰۰۵ ± ۰/۳۶۷) و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/01$). همچنین از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و نانوذرات بارگذاری شده مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین ریواکس در شرایط اسیدی تولید نانوذرات کایتوزان، ناپایدار بوده و روش ژلاسیون‌یونی برای بارگذاری ریواکس در نانوذرات کایتوزان مناسب نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کایتوزان، نانوذرات، ریواکس، واکسن.

مقدمه

ریسین یک پروتئین سمی است که در دانه‌های گیاه کرچک موجود می‌باشد. ریسین یک گلیکوپروتئین لکتین با وزن مولکولی ۶۵kDa-۶۰ و متشکل از دو زنجیره A و B می‌باشد که توسط یک باند دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند(۲و۱). زنجیرهB ورود سم به سیتوزول را تسهیل می‌کند و زنجیرهA نیز با وزن مولکولی ۳۲kDa از طریق غیرفعال کردن برگشت ناپذیر ریبوزوم‌های یوکاریوتی، از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند که این فرآیند در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود (۴و۳). مسمومیت با ریسین می‌تواند از طریق خوراکی، استنشاقی، یا تزریقی و همچنین از مسیر چشم و پوست ایجاد شود(۱). درحال حاضر هیچ درمان خاصی برای مسمومیت با ریسین وجود ندارد و با توجه به نشانه‌های بیماری، عمدتاً درمان به صورت کمکی می‌باشد(۵). مطالعات حیوانی نشان می‌دهد از طریق ایمن‌سازی غیرفعال و یا فعال (توسط واکسن) می توان در برابر مسمومیت با ریسین محافظت ایجاد نمود(۶). Smallshaw و همکارانش با هدف تولید یک واکسن غیرسمی و بی‌خطر، زیرواحدهای زنجیرهA نوترکیب موتانت را مورد بررسی قرار داده و در نهایت یک کاندید واکسن پروتئینی نوترکیب بنام ریواکس را معرفی نمودند. این پروتئین دارای دو جهش در توالی، شامل تیروزین۸۰ به آلانین (جایگاه اعمال سمیت ریبوزومی) و والین۷۶ به متیونین (موتیف سندرم نشت عروقی) می-باشد. تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص میزان پایداری و ایمونوژنیسیتی ریواکس و روش‌های مختلف تجویز آن به بدن صورت گرفته است. همچنین آزمایش‌های ایمنی‌زایی این کاندید واکسن به صورت تنها و همراه با ادجوانت بر روی حیوانات مورد بررسی قرار گرفته است(۱۱-۷) ولی برای تجویز انسانی این واکسن، نیاز به

▣ این مقاله حاصل پایان نامه داود صادقی دانشجوی رشته نانوبیوتکنولوژی دانشگاه جامع امام حسین (ع) می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر فیروز ابراهیمی
آدرس: تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی. تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴
E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir

ادجوانت‌های جایگزین و سیستم‌های تحویل نوین می‌باشد، لیکن تاکنون از سیستمهای تحویل نوین مانند نانوذرات برای بررسی بهبود خصوصیات ایمنی زایی این پروتئین استفاده نشده است. یکی از پلیمرهایی که امروزه به طور گسترده جهت تولید نانوذرات زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر مورد استفاده قرار می‌گیرد کایتوزان می‌باشد که گزینه مناسبی برای رسانش رادیوداروها، ژن‌ها، پروتئین‌ها و پپتیدها می‌باشد. امروزه نانوذرات کایتوزان از مسیرهای چشمی، تنفسی، حفره دهانی، دستگاه گوارش و واژن برای تجویز دارو و واکسن استفاده می‌شود(۱۳و۱۲). هدف از انجام این تحقیق تهیه و ارزیابی بارگذاری کاندید واکسن نوترکیب ریواکس در نانوذرات کایتوزان می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه امام حسین(ع) با کد IR.IHU.REC.۱۳۹۶.۱۸۰۵، از باکتری *E. coli* BL21-DE3 و جهت رشد آن از محیطهای کشت LB مایع و آگار استفاده گردید. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. پلیمر کایتوزان با وزن مولکولی متوسط از شرکت Sigma-Aldrich، سدیم تری‌پلی فسفات از شرکت Scharlau و ژن صناعی ریواکس که دارای دو جهش در زنجیره A ریسین بود از گروه و مرکز زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. جهت تهیه تصویر نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM ساخت شرکت KYKY و به منظور بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات از دستگاه DLS مدل Malvern ساخت کشور انگلستان استفاده شد.

تهیه پروتئین نوترکیب ریواکس: پس از تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* BL21(DE3)، ژن صناعی حاوی پروتئین ریواکس با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد ترانسفورم شد و برای القاء بیان ژن ریواکس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد از isopropyl-B-d thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت نهایی یک mM استفاده شد. همچنین پس از لیز باکتری و بررسی بیان، از ستون Ni-NTA با شیب غلظتی ایمیدازول جهت تخلیص پروتئین ریواکس استفاده شد.

تهیه نانوذرات کایتوزان حاوی پروتئین ریواکس: نانوذرات کایتوزان با روش ژلاسیون یونی تهیه شد. محلولی با غلظت ۲mg/ml از کایتوزان در اسیداستیک ۲٪ وزنی (pH= ۴/۵) و نیز محلولی با غلظت ۱ mg/ml از سدیم تری‌پلی‌فسفات تهیه گردید. ۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات به صورت قطره قطره و طی مدت زمان ۶۰ دقیقه به ۷/۵ میلی‌لیتر محلول کایتوزان حاوی ۱میلی‌گرم پروتئین نوترکیب در حالی که بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ثابت قرار گرفته بود، اضافه شد.

در نهایت محلول به مدت ۳۰دقیقه همزده شد. پس از پایان واکنش، محلول حاوی نانوذرات در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در بستر گلیسرول به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات توسط پراش نورپویا (DLS): جهت بررسی اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات تولید شده، از دستگاه DLS استفاده و اندازه گیری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد.

بررسی مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی: جهت بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد. پس از تهیه نانوذرات کایتوزان، مقداری از آن بر روی یک سطح شیشه‌ای قرار گرفت و در دمای اتاق خشک گردید. سپس نمونه بوسیله یک لایه نازک طلا پوشش داده شد. در نهایت نمونه ها توسط میکروسکوپ مورد ارزیابی قرارگرفتند.

بررسی بازده وزنی و احتباس پروتئین در نانوذرات به روش غیرمستقیم: برای این منظور پس از آنکه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن در شرایط بهینه ساخته شد، سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۳۵۰۰rpm سانتریفوژ و محلول‌رویی جمع‌آوری شد. سپس با سنجش مقدار پروتئین آزاد موجود در محلول‌رویی توسط روش برادفورد، مقدار آنتی‌ژن محبوس شده در نانوذرات بدست آمد و با قرار دادن در فرمول های مربوطه، راندمان و ظرفیت احتباس نانوذرات محاسبه شد. همچنین نانوذرات ترکیب شده نیز پس از خشک شدن در شرایط انجمادی، توزین و میزان بازده وزنی نانوذرات محاسبه شد. این کار هم برای نانوذرات حاوی BSA و هم نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب ریواکس انجام پذیرفت (۱۵و۱۴).

بررسی برون‌تنی رهایش آنتی‌ژن از نانوذرات کایتوزان: برای انجام مطالعات رهایش پروتئین نوترکیب از نانوذرات کایتوزان، نمونه نانوذرات در حجم ۵۰۰ میکرولیتر محلول SBF= Simulated Body Fluid درون میکروتیوب ۲میلی‌لیتری ریخته و با همزدن پراکنده شد. سپس نمونه در دمای ۳۷درجه سانتیگراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰rpm همزده شد و رهایش به مدت ۱۹۲ساعت بررسی شد. در هر بار نمونه‌برداری، نمونه‌ها به مدت ۱۰دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰rpm سانتریفوژ شده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول‌رویی برداشته و به همان میزان بافر تازه جایگزین و در شیکر انکوباتور قرار گرفت. سپس با استفاده از روش پروتئین سنجی برادفورد با سه بار تکرار، غلظت پروتئین موجود در نمونه تعیین و منحنی درصد تجمعی پروتئین رهاشده از نانوذرات در مدت زمان‌های تعیین‌شده، ترسیم شد.

بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب در طول تهیه نانوذرات کایتوزان: برای بررسی تأثیر احتمالی روش تولید نانوذره کایتوزان بر روی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب، این پروتئین در سه حالت مورد بررسی قرار گرفت. در حالت اول پروتئین نوترکیب به محلول ۲ mg/ml از کایتوزان در اسیداستیک ۲٪ وزنی (pH=۴/۵) اضافه و بدون اضافه کردن TPP (جهت جلوگیری از تولید نانوذره و عدم احتباس پروتئین)بر روی استیرر هم زده شد. در حالت دوم همان شرایط حالت اول بدون همزدن انجام پذیرفت و در حالت سوم پروتئین نوترکیب در محلول آبی بدون اسیداستیک هم زده شد. در نهایت پس از یک ساعت، محلولهای فوق در چاهک‌های ژل SDS-PAGE تزریق و با شدت جریان ۲۰میلی‌آمپر الکتروفورز گردید.

مطالعات درون تنی نانوذرات روی مدل حیوانی: به منظور تولید آنتی‌بادی و بررسی پاسخ ایمنی، موش‌های نژاد سوری از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شدند. جهت بررسی ایمنی‌زایی، از سه گروه ۴ تایی موش با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم استفاده شد. در تمامی مراحل،کارهای انجام شده بر روی حیوانات، مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود.

تجویز به صورت تزریقی طی دو نوبت به ترتیب در روزهای اول(D0) و چهاردهم (D14) صورت گرفت. به گروه اول، نانوذرات کایتوزان بارگذاری شده توسط پروتئین نوترکیب و به گروه دوم، پروتئین نوترکیب به تنهایی تجویز شد. به

گروه سوم نیز به عنوان کنترل، PBS تزریق شد. یک هفته پس از تزریق دوم (D21) خون‌گیری صورت‌گرفت و پس ازجداسازی سرم، میزان تیتر آنتی‌بادی IgG در نمونه‌ها با روش الایزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد. در نهایت آنالیز آماری نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statistica (آزمون دانکن) انجام پذیرفت و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

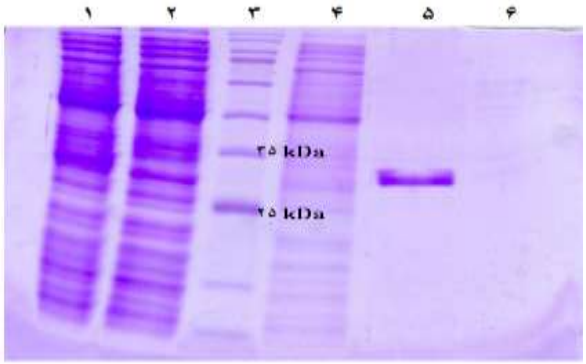
بررسی تخلیص پروتئین ریواکس: پس از عبور محلول حاصل از لیز باکتری از ستون Ni-NTA و شستشو توسط شیب غلظتی ایمیدازول، باند پروتئینی تخلیص شده در بافر شستشوی حاوی ایمیدازول ۲۵۰میلی‌مولار مشاهده شد که از خلوص مناسبی برخوردار بود (شکل۱).

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات توسط DLS: نتایج حاصل از DLS نشاندهنده این بود که نانوذرات فاقد پروتئین دارای اندازه ۲۶۴نانومتر و PDI=۰/۳۱۶ (شکل۲-الف) و نانوذرات حاوی پروتئین دارای اندازه ۱۷۸نانومتر و PDI=۰/۱۹۳ (شکل۲-ب) بودند. همچنین میانگین پتانسیل زتای نانوذرات کایتوزان فاقد و حاوی پروتئین به ترتیب برابر ۲۶+ و ۲۷/۸+ میلی‌ولت(شکل۳) بود.

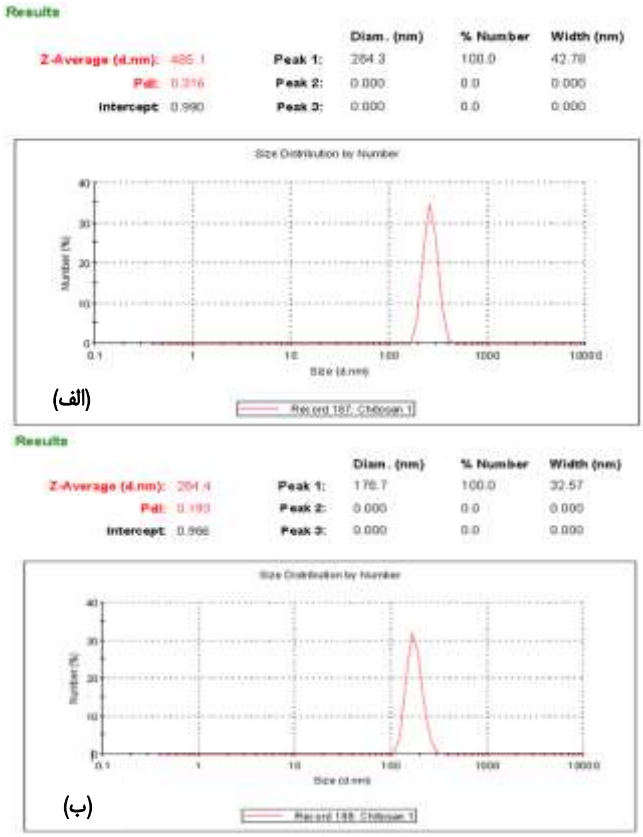
بررسی مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی: تصاویر میکروسکوپ الکترونی کروی بودن سطح نانوذرات حاصل از فرآیند تولید در شرایط بهینه را مطلوب نشان داد. همچنین این تصاویر، نتایج دستگاهDLS مربوط به توزیع اندازه نانوذرات را تائید می‌کرد(شکل۴).

بررسی بازده وزنی و احتباس پروتئین در نانوذرات به روش غیرمستقیم: مقادیر بازده وزنی، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس پروتئین ریواکس در نانوذرات کایتوزان به ترتیب برابر ۵۹/۵، ۱۰۰ و ۸ درصد و برای BSA به عنوان کنترل بترتیب برابر ۵۷/۲، ۶۳/۳ و ۵/۲ درصد بود.

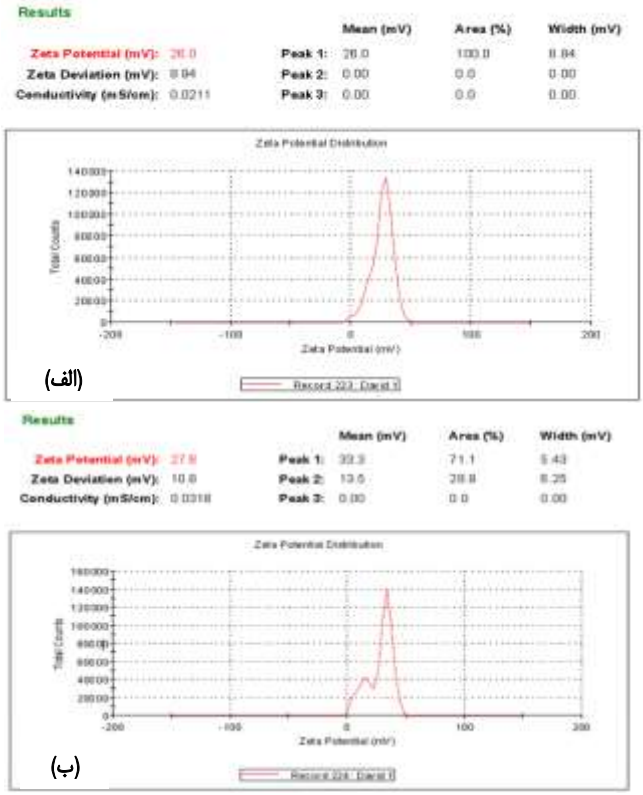
بررسی برون‌تنی رهایش پروتئین از نانوذرات کایتوزان: نتایج بررسی برون‌تنی رهایش پروتئین نوترکیب از نانوذرات کایتوزان نشان داد بعد از ۱۹۲ساعت تنها حدود ۲ درصد از پروتئین در محیط رها شده بودند که این میزان برخلاف خصوصیات رهایشی مورد انتظار از نانوذرات کایتوزان می‌باشد(شکل۵).



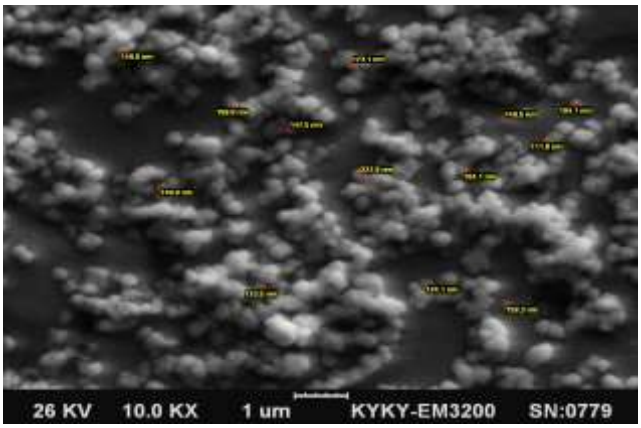
شکل ۱. نتیجه بیان و تخلیص پروتئین ریواکس بر روی ژل SDS-PAGE. ۱: نمونه القاء شده قبل از عبور از ستون Ni-NTA. ۲: نمونه القاء شده پس از عبور از ستون. ۳: نشانگر مولکولی پروتئین. ۴: بافر شستشوی اول (ایمیدازول ۴۰ mM). ۵: بافر شستشوی دوم (ایمیدازول ۲۵۰ mM). ۶: بافر MES.



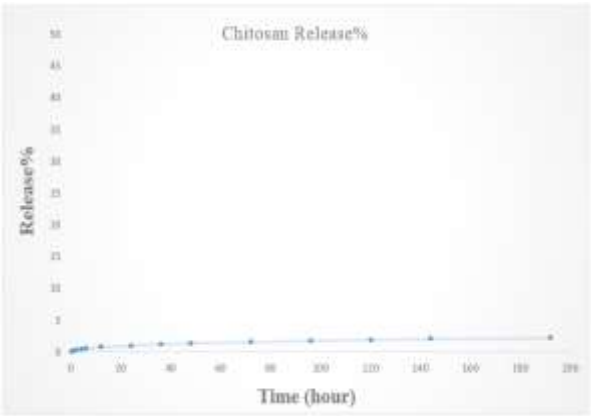
شکل۲. توزیع اندازه نانوذرات کایتوزان الف) نانوذرات فاقد پروتئین، ب) نانوذرات حاوی پروتئین در شرایط بهینه



شکل۳. پتانسیل زتای نانوذرات کایتوزان الف) نانوذرات فاقد پروتئین، ب) نانوذرات حاوی پروتئین در شرایط بهینه

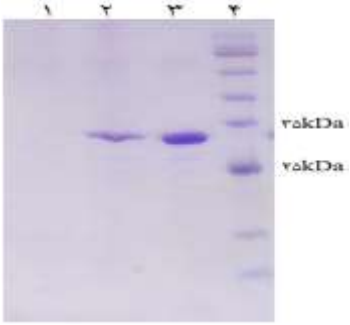


شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات کایتوزان



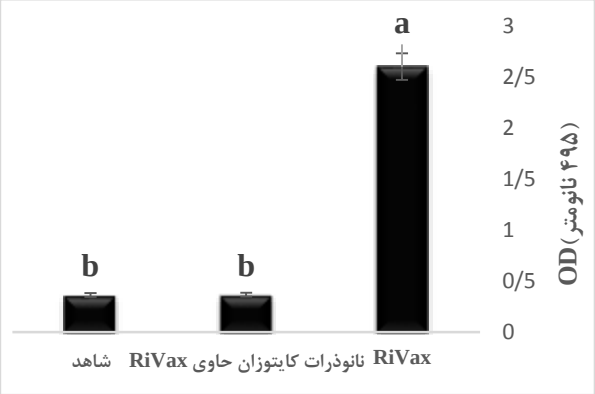
شکل۵. درصد تجمعی رهایش آنتی‌ژن از نانوذرات کایتوزان

نتایج بررسی پایداری پروتئین نوترکیب در طول تهیه نانوذرات کایتوزان: در بررسی نتایج SDS-PAGE(شکل۶) هیچگونه باندی از نمونه حالت اول که در آن پروتئین نوترکیب حل‌شده در محلول کایتوزان با pH=۴/۵ به مدت یک ساعت هم زده شده بود، مشاهده نشد ولی باند مربوط به پروتئین حل‌شده در محلول کایتوزان با pH=۴/۵ بدون هم زدن (حالت دوم) و پروتئین حل شده در آب (حالت سوم) در ژل مشاهده شد.



شکل۶. الگوی الکتروفورز بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب در طول تهیه نانوذرات کایتوزان. ۱: پروتئین حل‌شده در محلول کایتوزان با pH=۴/۵ که به مدت یک ساعت هم زده شده (حالت اول). ۲: پروتئین حل‌شده در محلول کایتوزان با pH=۴/۵ بدون هم زدن (حالت دوم). ۳: پروتئین حل شده در آب که به مدت یک ساعت هم زده شده (حالت سوم). ۴: نشانگر مولکولی پروتئین.

نتایج مطالعات درون‌تنی نانوذرات روی مدل حیوانی: بالاترین تیتر آنتی‌بادی مربوط به گروه دریافت کننده پروتئین به تنهایی بود (۰/۰۸۲ ± ۲/۶۰۶) که با گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی پروتئین (۰/۰۰۵ ± ۰/۳۶۷) و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۱). همچنین از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و نانوذرات بارگذاری شده مشاهده نشد (شکل ۷).



شکل ۷. مقایسه میانگین تیتر IgG در سرم موش های ایمن شده از مسیر تزریقی (حروف غیر مشابه نشان دهنده تغییرات معنی دار می باشد).

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با وجود تولید نانوذرات ایده‌آل از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، پروتئین نوترکیب در طی مراحل تهیه نانوذرات کایتوزان کاملاً تخریب شده و بنابراین بارگذاری پروتئین نوترکیب ریواکس در نانوذرات کایتوزان با توجه به شرایط اسیدی محیط امکان پذیر نمی‌باشد. نتایج بررسی رهایش برون تنی و همچنین مطالعات دورن‌تنی نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب ریواکس نیز موید همین مطلب می‌باشد.

یکی از روش‌های رایج در ساخت نانوذرات کایتوزان، روش ژلاسیون یونی می‌باشد که در این مطالعه از آن استفاده شد. در این روش، کایتوزان در محیط اسیدی به علت باردار شدن گروه‌های آمینی موجود در آن به شکل پلی کاتیونی در آمده و می‌تواند به گروه‌های دارای بار منفی مانند سولفات و فسفات متصل شود. سدیم تری‌پلی‌فسفات، پلی آنیونی است که می‌تواند از راه برقراری نیروهای الکترواستاتیکی بین گروه‌های فسفات خود و گروه های آمینی کایتوزان به پلیمر متصل شود. در این تحقیق بهترین شرایط برای ساخت نانوذرات کایتوزان نسبت ۱ به ۳ محلول TPP به کایتوزان و pH برابر ۴/۵ برای انحلال کایتوزان درنظر گرفته شد. در مطالعه حاضر، میانگین اندازه نانوذرات کایتوزان فاقد و حاوی پروتئین بترتیب ۲۶۴ و ۱۷۸ نانومتر بود. در تحقیق انجام شده توسط Bagheripour و همکاران پس از بارگذاری پروتئین نوترکیب نوروتوکسین بوتولینیوم، نانوذرات کایتوزان حاوی پروتئین در محدوده ۲۸۵ نانومتر تولید شدند(۱۶). همچنین در تحقیق دیگری که توسط Lee و همکاران انجام شد، نانوذرات کایتوزان با اندازه ۱۵۰ تا ۲۵۰ نانومتر تولید شد(۱۷).

نتایج فوق نشان دهنده این مطلب می‌باشد که اندازه نانوذرات کایتوزان در محدوده مشابهی در مقایسه با دیگر مطالعات بوده و تفاوت‌های جزئی می‌تواند به علت تغییرات کوچکی در روش تولید و نسبت‌های مختلف مواد باشد. همچنین نتایج بررسی اندازه نانوذرات توسط SEM، تائید کننده نتایج DLS بود. در اینجا این

نکته حائز اهمیت است که اندازه نانوذره حاوی آنتی‌ژن، عاملی تعیین‌کننده در جذب و سرنوشت زیستی آن است و ذرات کوچکتر از ۲ میکرومتر این توانایی را داشته که از طریق پلاک پیر در اختیار گره‌های لنفاوی مزانتریک قرار گیرند(۱۸). در این تحقیق، پتانسیل زتای نانوذرات کایتوزان حاوی و فاقد پروتئین به ترتیب برابر ۲۷/۸+ و ۲۶+ بدست آمد و با نتایج مطالعه Amidi و همکاران که با تولید نانوذرات ۱۵۰ تا ۳۰۰ نانومتری کایتوزان به پتانسیل زتای ۱۶+ تا ۳۰+ میلی‌ولت دست یافتند(۱۹) همخوانی دارد. پتانسیل زتای ذرات، عامل مهمی برای پایداری آن‌ها در محلول بوده و ذرات کایتوزان با پتانسیل زتای مثبت و بالاتر، پایداری بیشتری در محلول خواهند داشت(۲۰). Mohammadpour و همکارانش در تحقیقات خود نشان دادند که پتانسیل زتای نانوذرات کایتوزان پس از بارگذاری با پروتئین کاهش می‌یابد(۱۴). Hosseinzadeh و همکارانش نیز نشان دادند با افزایش غلظت محلول کایتوزان، اندازه نانوذرات و پتانسیل زتای آن افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظتTPP، اندازه نانوذرات افزایش ولی پتانسیل زتای آن کاهش می‌یابد(۲۱). در مجموع، در مطالعه حاضر با مشاهده تغییرات پتانسیل زتا در نانوذرات می‌توان استنباط نمود که تغییرات قابل ملاحظه‌ای در میزان پتانسیل زتا بین نانوذرات فاقد آنتی‌ژن و نانوذرات حاوی آنتی‌ژن رخ نداده است و در هر دو حالت، نانوذرات در محدوده پایداری قرار دارند که مانع از اتصال نانوذرات به یکدیگر و تشکیل ذرات به هم چسبیده می‌شود.

همچنین در مطالعه حاضر برای بررسی راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات از روش غیرمستقیم و با بررسی غلظت پروتئین در محلول‌رویی حاصل از ترسیب نانوذرات استفاده شد که نتایج نشان دهنده جذب ۱۰۰درصدی پروتئین در نانوذرات کایتوزان بود ولی در بررسی رهایش پروتئین از نانوذرات، الگوی بدست آمده، نشانگر رهایش بسیار کم پروتئین در طول مدت زمان مورد نظر بود، در حالی که براساس مطالعات مشابه، در طول ۷ روز، بیشتر پروتئین از نانوذرات کایتوزان آزاد می‌شود(۲۲). با توجه به این نتایج، احتمال دناتوره شدن پروتئین در شرایط تولید نانوذرات کایتوزان مطرح بود که با طراحی یک آزمایش و بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین ریواکس در شرایط مختلف اسیدی و آبی، مشخص شد که پروتئین ریواکس به شرایط اسیدی به شدت حساس بوده و بنابراین در طی تولید نانوذرات کایتوزان، پروتئین تخریب می‌شود. بنابراین برخلاف نتایج میزان احتباس، هیچ‌گونه پروتئینی جذب نانوذرات نشده بود که نتایج رهایش نانوذرات کایتوزان نیز تائید کننده این امر بود. همچنین در مرحله نهایی، گروه‌های موشی توسط پروتئین به تنهایی و نانوذرات حاوی پروتئین ایمن شدند و نتایج تیتر آنتی‌بادی در این موش‌ها نیز تائید کننده تخریب پروتئین نوترکیب ریواکس در طول مراحل بارگذاری در نانوذرات بود. در همین ارتباط مطالعات مشخص کرده است که پروتئین ریواکس پروتئین حساس و دارای پایداری کمی بوده و بنابراین در محلول‌هایی که سازگاری با آن نداشته باشد تخریب می‌شود(۲۳).

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، پروتئین ریواکس دارای پایداری کمی در شرایط اسیدی تولید نانوذرات کایتوزان می‌باشد و باید از روش‌های دیگری برای بارگذاری این پروتئین در نانوذرات استفاده کرد. به طور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که بررسی راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات به روش غیرمستقیم تائید کننده قطعی بارگذاری پروتئین در نانوذرات نبوده و نیاز به یک روش مکمل جهت تائید ماندگاری و پایداری پروتئین‌ها در طول بارگذاری در نانوذرات می‌باشد که در این تحقیق یک روش ساده جهت تائید ماندگاری و پایداری پروتئین‌ها در طول بارگذاری در نانوذرات کایتوزان ارائه شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران و پژوهشگران دانشگاه جامع امام حسین (ع) و دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) که ما را در به ثمر رسیدن این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

Preparation and Evaluation of Rivax Protein Loading in Chitosan Nanoparticles

D. Sadeghi (PhD) [1], F. Ebrahimi (PhD) [*1], M. Zeinoddini (PhD)[2], Y. Tarverdizadeh (MSc)[1], M. Bakhshi (PhD)[1], M.J. Bageripor (PhD)[1], S.M. Agaii (MSc)[1]

1.Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, I.R.Iran
2.Institute of Biotechnology and Science, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(6); June 2018; PP: 62-9
Received: Dec 25th 2017, Revised: Mar 5th 2018, Accepted: Mar 26th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Ricin toxin is a heterodimer glycoprotein which, due to its high toxicity, is used as a bioterrorism agent. Immunogenicity studies against ricin are now focused on two subunit vaccine candidates, including RiVax and RVEc. These studies have examined the vaccine candidate immunization as an alone and in combination with adjuvant, however, there is not a published study on the immunogenicity evaluation of the candidate vaccine through the delivery by nanoparticles. The aim of this study was preparation and evaluation of RiVax recombinant vaccine-loading in chitosan nanoparticles.

METHODS: In this experimental study, After transferring the RiVax gene to the bacterium, inducing the expression and purification of the RiVax protein by affinity chromatography column, the RiVax protein was loaded with Ionic Gelation method in chitosan nanoparticles. Then, the properties of nanoparticles including size, morphology, loading percentage and release pattern of RiVax protein from nanoparticles and stability of this protein during acidic loading conditions in nanoparticles by SDS-PAGE were evaluated. Also, Immunization study were performed on 3 mouse groups (n=4/group) by RiVax protein, Nanoparticles containing protein and phosphate buffer.

FINDING: The results of this study showed that the nanoparticles containing protein had a size of 178 nm and a Zeta potential of +27.8 MV and a polydispersity index of 0.193. Also, according to SDS-PAGE results, it was found that the RiVax recombinant protein was denatured during the process of preparing the chitosan nanoparticles.

CONCLUSION: The results of this study showed that the RiVax protein has been unstable in acidic conditions for the production of chitosan nanoparticles and Ionic Gelation method is not suitable for loading this protein in chitosan nanoparticles.

KEY WORDS: *Chitosan, Nanoparticles, RiVax, Vaccine*.

Please cite this article as follows:

Sadeghi D, Ebrahimi F, Zeinoddini M, Tarverdizadeh Y, Bakhshi M, Bageripor MJ, Agaii SM. Preparation and Evaluation of Rivax Protein Loading in Chitosan Nanoparticles. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(6):62-9.

[*]**Corresponding Author: F. Ebrahimi (PhD)**
Address: Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 77104934
E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir

References

1.Sadeghi D, Ebrahimi F, Zeinoddini M, Hosseini SA, Hedayat Manesh Z. Ricin Toxin; Mechanisms of Toxicity, Diagnosis Methods, Treatment and Immunization Against it. Jundishapur Sci Med J. 2017;16(1):103-24 [In Persian].

2.O'Hara JM, Brey III RN, Mantis NJ. Comparative Efficacy of Two Leading Candidate Ricin Toxin A Subunit Vaccines in Mice. Clin Vaccine Immunol. 2013;20(6):789-94.

3.Roy CJ, Song K, Sivasubramani SK, Gardner DJ, Pincus SH. Animal models of ricin toxicosis. Curr Top Microbiol Immunol. 2012;357:243-57.

4.Bhaskaran M, Didier PJ, Sivasubramani SK, Doyle LA, Holley J, Roy CJ. Pathology of lethal and sublethal doses of aerosolized ricin in rhesus macaques. Toxicol Pathol. 2014;42(3):573-81.

5.Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. Toxicon. 2004;44:361-70.

6.Bramwell VW, Eyles JE, Alpar HO. Particulate delivery systems for biodefense subunit vaccines. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:1247-65.

7.Brey RN, Mantis NJ, Pincus SH, Vitetta ES, Smith LA, Roy CJ. Recent advances in the development of vaccines against ricin. Hum Vac Immunother. 2016;12:1196-201.

8.Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, Schindler J, Vitetta ES. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. Vaccine. 2005;23(39):4775-84.

9.Smallshaw JE, Richardson JA, Vitetta ES. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. Vaccine. 2007;25:7459-69.

10.Marconescu PS, Smallshaw JE, Pop LM, Ruback SL, Vitetta ES. Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. Vaccine. 2010;28:5315-22.

11.Roy CJ, Brey RN, Mantis NJ, Mapes K, Pop IV, Pop LM, et al. Thermostable ricin vaccine protects rhesus macaques against aerosolized ricin: Epitope-specific neutralizing antibodies correlate with protection. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(12):3782-7.

12.Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014;32(3):327-37.

13.Wang JJ, Zhao ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carrier. Int J Nanomedicine. 2011;6:765-74.

14.Mohammadpour Dounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Mir Mohammad Sadeghi A, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2012;18(1):44-52.

15.Adlin Jino Nesalin J, Gowthamarajan K, Somashekhara C.N. Formulation and evaluation of nanoparticles containing flutamide. Int.J. ChemTech Res.2009,1(4): 1331-4.

16.Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian Sh, Arefpour MA, Rashidiani J. Preparation of chitosan based botulinum neurotoxin e recombinant nanovaccine and evaluation of its immunogenicity as oral & intradermal route in mice. J RafsanjanUniv Med Sci. 2016;14(11):923-38. [In Persian].

17.Lee E, Park SJ, Lee JH, Kim MS, Kim CH. Preparation of chitosan–TPP nanoparticles and their physical and biological properties. AJPS. 2016;166-7.

18.Yeh P. Ellens H. Smith PL. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. Adv Drug Deliv Rev. 1998;34(2-3):123-33.

19.Amidi M, Romeijn SG, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jiskoot W. Amidi Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. J Control Release, 2006; 111:107-116.

20.Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2013; 3:1-13.

21.Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R, Ostad SN. Chitosan-pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study. Int J Nanomedicine 2012;7:1851-63.

22.Jarudilokkul S, Tongthammachat A, Boonamnuayvittaya V. Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. Korean J. Chem. Eng. 2011;28(5):1247-51.

23.Smallshaw JE, Vitetta ES. A lyophilized formulation of RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, retains immunogenicity. Vaccine. 2010; 28(12): 2428-35.