



خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ایمنی‌زایی پروتئین RiVax بارگذاری شده در نانوذرات آلزینات

داود صادقی^{۱*}، فیروز ابراهیمی^۱، مهدی زین‌الدینی^۲، امیرحسین شماخی^۱، عماد کردبچه^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران.

۲- پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

چکیده: ریسین یک گلیکوپروتئین سمی است، که از دو زیر واحد (RTA) و (RTB) تشکیل شده است. دو کاندید واکسن بر اساس RTA شامل RiVax و RVEc وجود دارد. اگرچه مطالعات متفاوتی در مورد قدرت ایمن سازی RiVax، به تنهایی یا همراه با ادجوانت انجام شده است، اما سیستم تحویل جدید مانند نانوذرات برای بهبود ایمن سازی این پروتئین تا به امروز مورد استفاده قرار نگرفته است. هدف از این مطالعه، سنتز نانوذرات (NPs) آلزینات حاوی RiVax و ارزیابی پارامترهای فیزیکوشیمیایی و پتانسیل ایمن‌سازی این سیستم در مقایسه با RiVax خالص بود. در این پژوهش، پس از تخلیص RiVax، از روش ژلاسیون یونی برای تهیه نانوذرات آلزینات استفاده شد که روشی ساده و مناسب برای مواد حساس به گرما است. سپس، نانوذرات حاوی RiVax و پروتئین خالص در گروه‌های متفاوت موش تجویز شد. ۸ هفته پس از آخرین واکسیناسیون، موش‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اندازه نانوذرات تقریباً ۱۹۰ نانومتر بوده و الگوی آزاد سازی پروتئین از نانوذره آهسته است (۱۲٪ پروتئین در طول ۴۰ روز). همچنین، نتایج ایمن‌سازی نشان داد که نانوذرات حاوی RiVax در مقایسه با RiVax خالص نمی‌توانند سیستم ایمنی بدن موجود زنده را به طور محسوس تحریک کنند. نتیجه گرفته شد که نانوذرات آلزینات به دلیل آزاد شدن آهسته RiVax از آن‌ها نمی‌توانند پاسخ ایمنی قابل توجهی نسبت به پروتئین به تنهایی ایجاد کنند.

واژگان کلیدی: نانوذرات آلزینات، RiVax (NPs)، ایمنی‌سازی، ریسین

*Kpsadeghi@ihu.ac.ir

سلول‌های سالم به نسبت غیرسمی هستند، آن‌ها سنتز پروتئین را مهار می‌کنند. RIP‌های نوع دوم پروتئین‌های هتروداایمری هستند که از یک زنجیره B متصل شونده، و یک زنجیره A فعال آنزیمی (که اثرات مشابهی مانند RIP‌های نوع یک اعمال می‌کند) تشکیل شده‌اند. این پروتئین‌ها بزرگتر هستند تقریباً 65KDa، RIP‌های نوع سوم کمتر شناخته شده‌اند و بحث زیادی بر سر طبقه‌بندی دقیق این پروتئین‌ها وجود دارد [۱]. RIP‌ها را می‌توان در تعدادی از ارگانیس‌های زنده پیدا کرد، که شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان است. اغلب RIP‌ها به عنوان

۱- مقدمه

پروتئین غیرفعال کننده ریبوزوم (RIPs) پروتئین‌های فعال از نظر آنزیمی هستند که سوبستراهای سلولی را هدف قرار می‌دهند. و عملکرد اصلی آن‌ها غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها به صورت کاتالیتیک است. RIP‌ها بر اساس ساختار پروتئینی و میانکنش‌های درون مولکولی به سه کلاس تقسیم شده‌اند. RIP‌های نوع ۱ از یک زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده‌اند (تقریباً 30 KDa)، آن‌ها بیش از همه رایج هستند، و برای

از این مطالعه تهیه نانوذرات آلزینات حاوی پروتئین نوترکیب RiVax و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ایمنی آن در مقایسه با پروتئین RiVax بود.

۲- ابزار و روش‌ها

۲-۱- انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli*

فرآورده واکنش الحاق، با روش شوک حرارتی در سلول‌های صلاحیت‌دار شده *E. coli* BL21 (DE3) وارد شده و روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین (۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) گسترش داده شد [۱۲].

۲-۲- بررسی بیان پروتئین در میزبان *E. coli* توسط روش SDS-PAGE

پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG، بیان پروتئین نوترکیب صورت پذیرفته و سپس نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. باند پروتئینی موردنظر درون نمونه محلول رویی دیده می‌شود. بنابراین پروتئین به صورت محلول در سوپ رویی تولید شده و در محیط سیتوپلاسمی باکتری محلول است [۱۲].

۲-۳- نتایج حاصل از تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA

باکتری واجد پلاسمید نوترکیب در مقیاس زیاد (۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) کشت داده و سپس ژن هدف القاء شد. به دنبال جمع‌آوری سلول‌ها، ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به آن افزوده و پس از سونیکاسیون و گریزانه، محلول رویی در شرایط طبیعی برای تخلیص پروتئین نوترکیب بر ستون نیکل برده شد [۱۲].

۲-۴- تعیین غلظت پروتئین نوترکیب

از نمونه پروتئین‌های تخلیص شده با ستون Ni-NTA تعیین غلظت پروتئین نوترکیب با روش برادفورد انجام گرفت. به این صورت که پس از صفر کردن دستگاه با لوله کنترل، مقدار ۱۰ میکرولیتر از پروتئین تخلیص شده، به ۹۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد و سپس، به آن‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد افزوده شد. سپس، به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در جای

فرآورده‌های گیاهی شناخته می‌شوند، و اگرچه نقش بیولوژیکی دقیق آن‌ها در سلول‌های میزبان به خوبی شناخته شده نیست، اما آن‌ها به احتمال زیاد در دفاع گیاهی نقش دارند [۲ و ۳].

تحقیقات متفاوتی برای ساخت واکسن مناسب علیه سم ریسین انجام شده است. یکی از بهترین کاندیداهای واکسن در حال حاضر علیه این سم، پروتئین نوترکیبی به نام RiVax است. این پروتئین یک RTA دگلیکوزیله شده با دو جهش نقطه‌ای است که شامل سایت سمیت ریوزومی (Y80A) با نقش اصلی ایجاد سندرم نشت عروق (V76M) است. مطالعات متفاوت در مورد RiVax به تنهایی و همراه با ادجوانت انجام شده است، اما تا امروز از نانوذرات برای بهبود ایمن‌سازی این پروتئین استفاده نشده است [۴-۶].

یکی از سیستم‌های جدید انتقال دارو و واکسن که امروزه از کاربرد زیادی برخوردار است، سیستم تحویل مبتنی بر نانوذرات است. امروزه فناوری نانو نقش بسزایی در تولید واکسن دارد و برخی از فرصت‌ها را در طراحی نانوذرات فراهم می‌کند که از نظر ترکیب، اندازه، شکل و مشخصات سطحی متفاوت هستند. استفاده از نانوذرات نه تنها بر مقدار آزاد سازی آنتی ژن تأثیر دارد، بلکه منجر به افزایش پایداری آن در بدن می‌شود. همچنین، نانوذرات به دلیل شباهت اندازه آن‌ها با اجزای بدن، به راحتی توسط اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند [۷ و ۸]. یکی از بسپارهای پرکاربرد برای تهیه نانوذرات زیست سازگار و تجزیه پذیر، آلزینات است. این بسپار یکی از موفق‌ترین بسپارهایی است که در دارورسانی استفاده می‌شود، زیرا مونومرهای متابولیکی، اسید لاکتیک و اسید گلیکولیک با هیدرولیز این بسپار تولید می‌شوند. اسید لاکتیک یک محصول طبیعی متابولیسم در اکثر موجودات است، که این ماده پس از ورود به چرخه ۳-کربوکسیلیک اسید هضم شده و آب و دی اکسید کربن تولید می‌کند. گلیکولیک اسید یکی از اجزای پلی ساکارید در اندام‌های حیوانی است که بدون تغییر یا ورود به چرخه از کلیه آزاد، و به آب و دی اکسید کربن تبدیل می‌شود. بنابراین، با توجه به اینکه این مونومرها به راحتی در بدن متابولیزه می‌شوند، استفاده از آلزینات به منظور تهیه نانوذره برای تحویل واکسن ساختار پروتئین دارای حداقل سمیت سیستماتیک در کاربردهای پزشکی است [۹ و ۱۰]. هدف

$$\frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Dried Alginate nanoparticle weight}} \times 100$$

رابطه ۳- فرمول محاسبه درصد بازده وزنی نانوذرات

$$\frac{\text{Dried Alginate nanoparticle weight}}{\text{Theoretical mass (Alginate + CaCl}_2\text{ + protein)}} \times 100$$

۲-۷- پایداری پروتئین به دام انداخته شده

برای مشخص نمودن تأثیر احتمالی مراحل تولید نانوذره آلژینات بر روی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب، بافر مخصوص برای رهایش انفجاری پروتئین از آلژینات به نانوذرات لئوفیلیزه شده افزوده و محلول فوق به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵۰ rpm انکوبه شد. سپس نمونه گریزانه و محلول رویی جمع آوری، و در نهایت محلول جمع آوری شده از تخریب کامل نانوذرات در کنار حجم مشخص از پروتئین نوترکیب به عنوان کنترل، با روش SDS-PAGE بررسی شد. همچنین، درصد باندهای پروتئینی حاصل از نانوذرات رهایش شده با باند پروتئین نوترکیب RiVax با نرم افزار Gel Analyzer مقایسه شد [۱۵].

۲-۸- مطالعه پراکندگی نور پویا (DLS)

برای انجام این بررسی از دستگاه DLS مدل Malvern استفاده شد. برای انجام اینکار از سوسپانسیون نانوذرات تازه تهیه شده حاوی و بدون پروتئین برای تعیین میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا استفاده شد.

۲-۹- مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی ریخت‌شناسی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل EM3200 ساخت شرکت KYKY استفاده شد. برای انجام اینکار نانوذرات تازه تهیه شده بر روی یک سطح شیشه ای قرار داده شدند. پس از خشک شدن کامل، نمونه بوسیله یک لایه نازک طلا با روش P.V.D (Physical vapor deposition) پوشش داده شد. پس از لایه نشانی، نمونه نانوذرات با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-۱۰- بررسی رهایش نانوذرات آلژینات

برای بررسی پروفایل رهایش پروتئین از نانوذرات آلژینات، به رسوب نانوذرات ۱ ml بافر SBF (Simulated Body Fluid,) رسوب

تاریک قرار گرفت و از نظر مقدار پروتئین به روش برادفورد، غلظت سنجی شد. اعداد حاصل با نمودار استاندارد BSA مقایسه شد [۱۳].

۲-۵- آماده سازی ریواکس بارگذاری شده در نانوذرات آلژینات

برای تهیه نانوذرات آلژینات از روش ژلاسیون یونی استفاده شد که روشی ساده و مناسب برای مواد حساس به حرارت می‌باشد. در ابتدا پودر آلژینات (0.2% w/v) در آب مقطر دوبار تقطیر به مدت یک overnight (شبانه) بر هم‌زن مغناطیسی حل شد و به عنوان محلول استوک از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شدند. برای ساخت نانوذرات آلژینات، مقدار ۴۰۰ میکروگرم آنتی ژن نوترکیب RiVax محلول در ۰/۵ ml بافر فسفات با pH ۶ به ۲ ml فاز آبی آلژینات بصورت قطره قطره افزوده شد. سپس در حالیکه محلول بر روی هم‌زن مغناطیسی در حال هم‌وزن‌سازی بود، ۲ ml محلول CaCl₂ (0.1% w/v) به عنوان کراس لینکر بصورت قطره قطره به آن افزوده شد. سپس، اجازه داده شد تا محلول به مدت ۴۵ دقیقه شیک شود. سپس، نانوذرات حاصل به آسانی با گریزانه کردن سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm و ۴°C جدا شدند. محلول رویی نیز برای بررسی جذب پروتئین جمع آوری شد [۱۳ و ۱۴].

۲-۶- پارامترهای به دام افتادن پروتئین

برای این منظور پس از آنکه نانوذرات حاوی آنتی ژن در شرایط بهینه ساخته شد، سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm و ۴°C سانتریفیوژ و محلول رویی جمع آوری شد. سپس، مقدار آنتی ژن محبوس شده در نانوذرات از سنجش مقدار پروتئین آزاد موجود در محلول رویی توسط روش برادفورد بدست آمد و با استفاده از روابط ۱ و ۲ بترتیب، مقدار Loading efficiency% و Loading capacity% نانوذرات محاسبه شد. همچنین، نانوذرات رسوب داده شده نیز پس از فریزدرای، توسط ترازوی دیجیتال توزین و طبق رابطه شماره ۳، مقدار Particle yield% نانوذرات محاسبه شد. اینکار هم برای نانوذرات حاوی BSA و هم نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب انجام پذیرفت [۱۳].

رابطه ۱- فرمول محاسبه درصد راندمان احتباس:

$$\frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Total amount of protein}} \times 100$$

رابطه ۲- فرمول محاسبه درصد ظرفیت احتباس

اجرای آزمون دانکن ابتدا میانگین تیمارها به صورت افزایشی مرتب و خطای استاندارد هر میانگین را معین کردیم. سپس، تفاوت مشاهده شده بین میانگین‌ها را از تفاوت بین بزرگترین و کوچکترین میانگین شروع کرده که با حداقل دامنه ی معنی دار مقایسه می‌شود، سپس در آخر تفاوت بین بزرگترین و دومین میانگین کوچکتر از همه را حساب کرده و با هم مقایسه کردیم [۱۹].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- به دام افتادن RiVax در نانوذرات آلژینات سدیم

پس از ساخت نانوذرات در شرایط بهینه و انجام گریزانه، نانوذرات Freez drying شدند و سپس، % Particle yield طبق فرمول محاسبه شد که مقدار آن برای پروتئین های RiVax و BSA بترتیب برابر ۴۳/۸ و ۲۷ درصد بدست آمد. همچنین، محلول رویی جمع آوری و پروتئین سنجی شد و طبق فرمول Loading capacity% و % Loading efficiency نانوذرات با روش غیرمستقیم محاسبه شد که این مقادیر برای پروتئین BSA بترتیب برابر ۳۶/۶ و ۶۶ درصد و برای پروتئین RiVax بترتیب برابر ۱۴/۳ و ۱۰۰ درصد بود. همچنین، پس از رهایش انفجاری نانوذرات آلژینات مشخص شد که پروتئین در طول مراحل ساخت نانوذرات پایدار بوده و دنا توره نشده است (Fig. 1). از طرفی بررسی ژل SDS-PAGE با نرم افزار GelAnalyzer و مقایسه مقدار پروتئین رهایش شده با حجم مشخصی از پروتئین نو ترکیب به عنوان کنترل، نشان داد که در روش مستقیم بررسی لودینگ پروتئین RiVax، نتایج % LC و % LE برای نانوذرات آلژینات بترتیب برابر ۱۳/۹ و ۹۷/۴ درصد است (شکل A و B 1).

۳-۲- خصوصیات بارگذاری شده در نانوذرات آلژینات

پس از آماده سازی نمونه، نانوذرات آلژینات تولید شده با دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده این بود که نانوذرات فاقد و حاوی پروتئین RiVax بترتیب دارای اندازه ۱۱/۴۰nm و ۴۹/۶۵nm (شکل A و B 2) و پتانسیل زتا میانگین برابر ۲۲/۱mV و ۲۳/۲mV- (شکل A و B 3)

افزوده و نمونه درون شیکرآنکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۲۰۰ rpm قرار داده شد. در فواصل زمانی منظم (ساعات ۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۹۶) نمونه‌گیری از محلول انجام گرفت. در هر مرحله زمانی برای برداشت نمونه، محلول حاوی نانوذرات به مدت ۱۵min در ۱۰۰۰۰rpm و ۴ °C گریزانه شده و ۱ml از محلول رویی برداشته و به همان مقدار بافر تازه جایگزین می‌شد. سپس، غلظت پروتئین موجود در محلول رویی تعیین شد. در نهایت منحنی درصد تجمعی پروتئین رهاشده از نانوذرات آلژینات در مدت زمان های تعیین شده، ترسیم شد [۱۷].

۲-۱۱- مطالعه *in vivo*

برای مطالعات درون حیوان، ۳ گروه موش ماده ۶ هفته ای (۱۲ موش در هر گروه) به طور تصادفی تقسیم شدند و به مدت ۱۴ روز سازگار شدند. موش‌ها برای هر گروه واکسن RiVax برهنه و Alg NPs حاوی RiVax با همان دوز RiVax (۱۰ میکروگرم) و کنترل بافر، به زیر جلدی- داخل صفاقی در ۴ بازه (روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۴۲) انجام شد. از آغاز آزمون تیتراسیون IgA و IgG در نمونه های سرمی (روز ۴۹) آنتی ژن انجام شد نمونه ها با ۶۰۰۰ دور در دقیقه در طی ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند و مواد مایع رویی جمع آوری و ۱۰ میکرولیتر PMSF (۱۰۰ میلی مولار) به ۱ میلی لیتر مواد افزوده شده و در نهایت با ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد گریزانه و در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای تعیین آنتی بادی ضد RiVax تولید شده از الیزا غیرمستقیم با موش های IgG و IgA متصل به HRP (1/1000) در PBST استفاده شد. در نهایت پس از تایید توزیع نرمال داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS v24 v اختلاف بین گروه‌های تزریقی بوسیله آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن بررسی شد [۱۸].

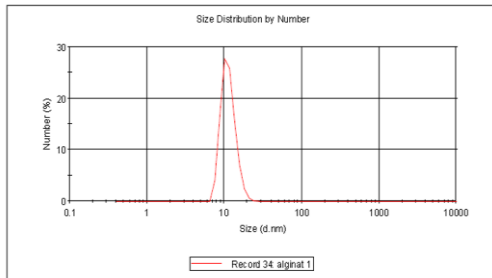
۲-۱۲- روش کار آماری

پس از تایید توزیع نرمال داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS v24 اختلاف بین گروه‌های تزریقی بوسیله آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن بررسی شد. از «آنالیز واریانس یک طرفه» به این دلیل استفاده کردیم که مشخص کنیم از نظر آماری تفاوت معنی داری بین میانگین دو یا چند گروه «مستقل» وجود دارد. و برای

B. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE از RiVax رهایش شده از نانوذرات آلژینات. ستون اول: RiVax رهایش شده از نانوذرات آلژینات. ستون دوم: RiVax قبل از به دام افتادن به عنوان کنترل. ستون سوم: استانداردهای جرم مولکولی.

Results

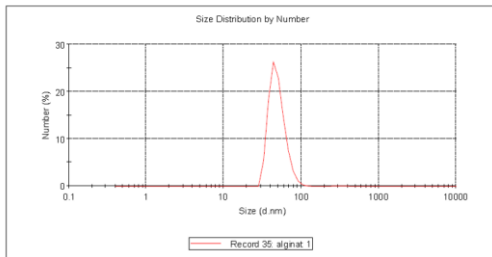
	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 646.9	Peak 1: 11.40	100.0	2.482
Pdi: 0.629	Peak 2: 59.50	0.0	14.17
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000



(A)

Results

	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 300.7	Peak 1: 49.65	99.9	12.14
Pdi: 0.598	Peak 2: 322.4	0.1	76.12
Intercept: 0.939	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

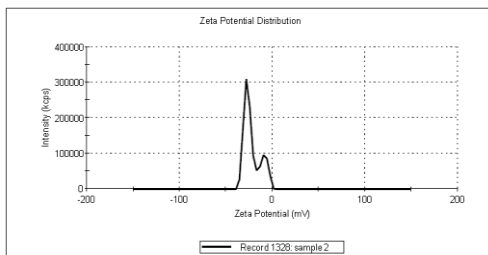


(B)

شکل ۲. داده‌های DLS برای اندازه‌های نانوذرات آلژینات در وضعیت معلق در پراکندگی (آب). A: بدون RiVax و B: نانوذرات با RiVax بارگذاری شده.

Results

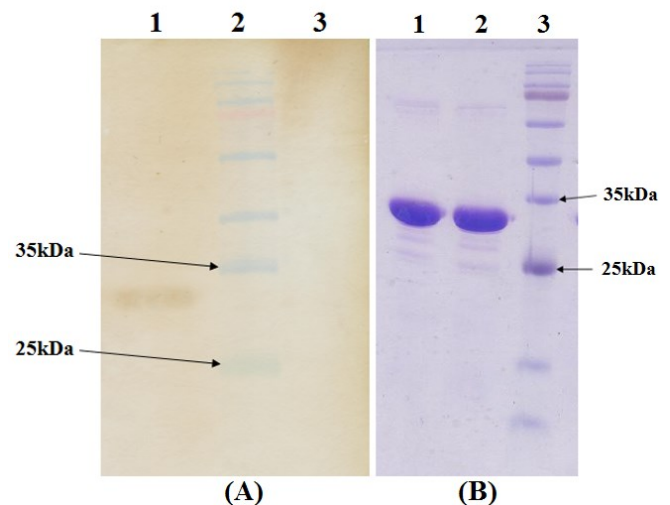
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -22.1	Peak 1: -26.5	80.0	4.34
Zeta Deviation (mV): 8.89	Peak 2: -6.77	20.0	2.76
Conductivity (mS/cm): 0.132	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



(A)

بودند. از مقایسه نتایج این مطالعه و سایر موارد، ما اطمینان حاصل کردیم که اندازه ذرات آماده شده خوب است. همچنین پتانسیل زتا منفی بدست آمد که برای نانوذرات حاوی RiVax و نانوذرات آزاد به ترتیب $-22/1\text{mV}$ و $-23/2\text{mV}$ بود، که می‌توان توان استنباط کرد، تغییرات قابل توجهی در مقدار پتانسیل Zeta بین نانوذرات آزاد و نانوذرات حاوی RiVax رخ نداده است و در هر دو حالت، نانوذرات پایدار هستند که از تجمع آنها جلوگیری می‌کند. چون پتانسیل Zeta نانوذرات حاوی RiVax منفی بود نتیجه گرفتیم که در مقایسه با ذرات با بار مثبت برای جذب در روده مناسب‌تر است. در سایر مطالعات نیز این پارامتر در گستره منفی قرار داشت. شاخص PDI عددی است که از دو پارامتر متناسب با داده‌های همبستگی (تجزیه و بررسی تجمعات) محاسبه می‌شود که این شاخص بدون بعد (dimensionless) و مقیاس‌پذیر است که برای RiVax بدون نانوذره 0.629 و برای RiVax با نانوذره 0.598 به دست آمد. با توجه به مقالات گذشته، شاخص PDI کمتر از 0.7 نشان دهنده توزیع ذره ای یکنواخت نانوذرات است [۲۱].

تصویر میکروسکوپ الکترونی نیز کروی و صاف بودن سطح ذرات حاصل از فرایند تولید نانوذرات در شرایط بهینه را مطلوب نشان داد. همچنین، با آنالیز تصویر بالا با نرم افزار Image J مشخص شد که میانگین اندازه نانوذرات برابر $47/26\text{nm}$ است (شکل 4 A و 4 B).

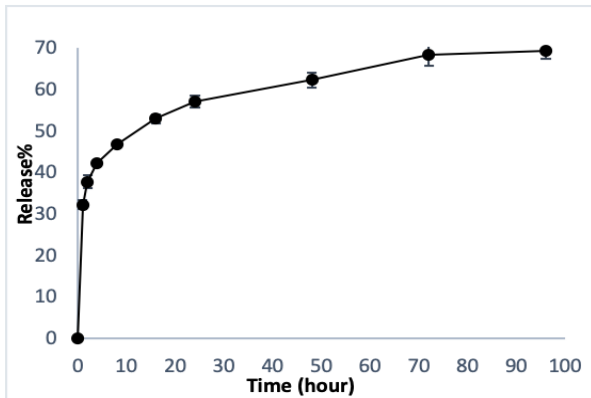


(A)

(B)

شکل ۱: A. تجزیه و تحلیل ایمونوبلاتینگ RiVax رها شده از نانوذرات. ستون اول: RiVax رهایش شده از نانوذرات. ستون دوم: استانداردهای جرم مولکولی، ستون سوم: نمونه کنترل (BSA)

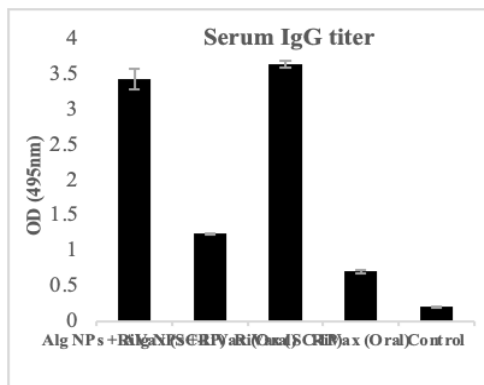
رهایش انجام شده است و پس از گذشت ۹۶ ساعت از بررسی بیش از ۶۰ درصد از پروتئین از نانوذرات رهایش شده است.



شکل ۵. مشخصات رهایش RiVax از نانوذرات آلژینات در بافر SBF.

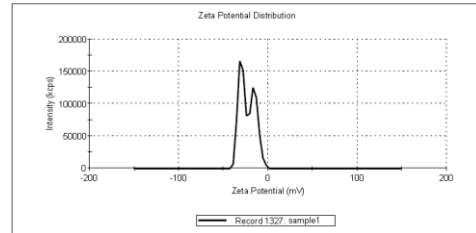
۳-۴ نتایج تیتر آنتی بادی IgA و IgG در نمونه‌های سرمی
با توجه به نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل آماری در ارتباط با تیتر آنتی بادی برای پروتئین تنها و پروتئین بارگذاری شده در نانوذره، بالاترین تیتر آنتی بادی IgG مربوط به تجویز RiVax و پس از آن مربوط به نانوذره آلژینات تزریقی است. با این حال از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند ($p > 0.01$).

با توجه به نتایج بدست آمده از تجزیه و بررسی آماری در ارتباط با تیتر آنتی بادی IgA سرمی برای پروتئین تنها و پروتئین بارگذاری شده در نانوذره، بالاترین تیتر آنتی بادی IgA مربوط به تجویز تزریقی RiVax و نانوذره آلژینات است که تفاوت معنی داری با سایر تجویزات دارد ($p < 0.01$) هر چند تفاوت معنی داری بین تیتر هر دو نوع تجویز مشاهده نمی‌شود.



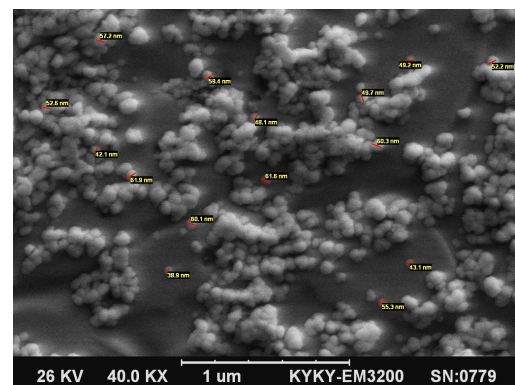
(A)

Results			
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV):	-23.2	60.9	3.67
Zeta Deviation (mV):	8.44	39.1	3.58
Conductivity (mS/cm):	0.133	0.0	0.00
	Peak 1: -29.9		
	Peak 2: -13.4		
	Peak 3: 0.00		

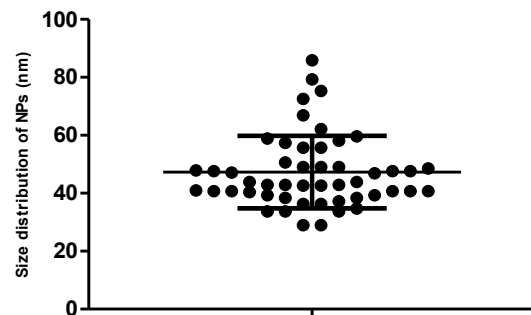


(B)

شکل ۳. پتانسیل Zeta برای نانوذرات آلژینات بدون RiVax (A) و با RiVax بارگذاری شده (B).



(A)



(B)

شکل ۴. تصویر SEM از نانوذرات آلژینات، A: تصویر SEM از RiVax بارگذاری شده در نانوذرات آلژینات، B: اندازه متوسط نانوذرات با نرم افزار Image J تحلیل شده است.

۳-۳ مشخصات آزادسازی آزمایشگاهی RiVax از نانوذرات آلژینات:

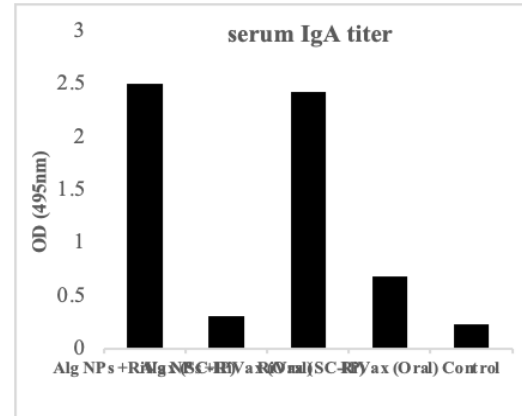
رهایش پروتئین از نانوذرات آلژینات در بافر SBF به مدت ۹۶ ساعت بررسی و براساس درصد تجمعی رهایش پروتئین در نمودار نمایش داده شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، فرایند رهایش پروتئین در ساعات نخست با سرعت بسیار بالایی انجام شده است اما از این زمان به بعد با یک سرعت تقریباً ثابت

منجر به برانگیختن ایمنی حفاظتی در برابر قرار گرفتن در معرض ریسین از طریق استنشاق، گاوژ و یا تزریق می‌شود [۱۱ و ۱۲]. در حال حاضر مطالعات پژوهشگران، بر یک ادجوانت مناسب و ایمن برای افزایش ایمنی زایی RiVax متمرکز شده است. در این تحقیق سعی شد از نانوذرات به عنوان سیستم‌های تحویلی نوین برای افزایش ماندگاری و ایمنی زایی پروتئین RiVax استفاده شود [۱۳ و ۱۴].

در مطالعه‌ای توسط نظریان و همکارانش، یک پروتئین نوترکیبی کایمیریک با استفاده از روش واکنش ژلی در نانوذرات آلزینات بارگذاری شد که اندازه ذرات آماده شده حدود ۲۵۲/۷ نانومتر بود [۱۳]. از مقایسه نتایج این مطالعه و سایر موارد، ما پیشنهاد کردیم که اندازه ذرات آماده شده خوب است. همچنین پتانسیل زتا منفی بوده که برای نانوذرات حاوی آلزینات حاوی RiVax و نانوذرات آزاد به ترتیب ۲۱/۶- و ۱۴/۷- بود. در سایر مطالعات هم این پارامتر در گستره منفی قرار داشت. به عنوان مثال، در پژوهش تامیلسلوان و همکارانش، نانوذرات آلزینات سنتز شده حاوی داروهای آب دوست بود که پتانسیل Zeta برای این نانوذرات ۱۳- میلی ولت بود [۱۹]. می‌توان استنباط کرد که تغییرات قابل توجهی در مقدار پتانسیل Zeta بین نانوذرات خالی و NPهای حاوی RiVax رخ نداده است و در هر دو حالت، نانوذرات پایدار هستند، و اینکه پتانسیل Zeta منفی است که این مقدار در مقایسه با ذرات با بار مثبت برای جذب روده مناسب‌تر خواهد بود. همچنین، مطالعات نشان داد که بار سطحی نانوذرات در پاکسازی خون موثر است و نانوذرات دارای بار مثبت در مقایسه با موارد با بار منفی راحت‌تر از بدن خارج می‌شوند. بنابراین نانوذرات آماده شده در این پژوهش، زمان بیشتری را در بدن می‌مانند که این مسئله می‌تواند در تقویت و دوره ایمن سازی پروتئین RiVax موثر باشد [۲۰].

Halayqa و همکارانش، نشان دادند که میانگین اندازه نانوذرات آلزینات به روش ژلاسیون یونی به ترتیب ۱۱/۳۰nm و ۴۹/۳۵nm نانومتر بود. [۲۲].

اندازه ذرات مشخصه اصلی همه سیستم‌های نانوذره است و بر آزاد سازی دارو، پایداری و خصوصیات جذب سلولی تأثیر می‌گذارد به طور کلی، نانوذرات از ریز ذرات کارایی بیشتری دارند و به دلیل اندازه کوچک، جذب داخل سلولی بیشتری دارند [۲۶].



(B)

شکل ۵: بررسی میانگین تیتراژ آنتی بادی های IgA و IgG در نمونه های سرم: موش های ایمن شده از مسیر تزریقی به روش الایزا.

۴- نتیجه گیری

آلزینات یک بسپار طبیعی است که از جلبک دریایی استخراج می‌شود و در صورت حل شدن در آب و قرار گرفتن در معرض نمک‌های خاص، قادر به تشکیل ژل است. واکنش ژلی را می‌توان برای ایجاد دانه های کروی مرطوب یا خشک برای کپسول سازی مواد دیگر یا تجمع پودرها، دستکاری کرد. آلزینات در دمای بالا پایدار و زیست تخریب پذیر و زیست سازگار است [۴].

آلزینات‌ها افزون بر داشتن گروه‌های هیدروکسیلی متعدد در سطح زنجیرهای بسپاری، گروه‌های عاملی دیگری نظیر کربوکسیلات دارند. ترکیبات مزبور به واسطه این گروه‌های عاملی، ویژگی منحصر به فردی نشان می‌دهند. یکی از این ویژگی، قابلیت آلزینات‌ها در نگهداری و انتقال انواع داروها و مولکول‌های زیستی به عنوان بستر و محملی مناسب است که کاربرد آن‌ها را به عنوان بسپار زیستی- پزشکی به شدت رونق بخشیده است. در این کاربردها، اندازه ذرات بسیار مهم است. بنابراین، روش‌های متعددی برای تهیه ذرات با اندازه‌های متفاوت گزارش شده است. ذرات آلزینات با ابعاد متفاوت میکرو و نانوکاربردهای متفاوتی دارند.

هدف از این مطالعه این بود که نانوذرات آلزینات حاوی RiVax می‌توانند از موش‌ها در برابر تزریق با ریسین محافظت کنند. این کار بسیار اهمیت داشت. زیرا سیستم‌های تحویل جدید مانند نانوذرات برای بهبود ایمن سازی این پروتئین تا به امروز استفاده نشده است. واکسن RiVax در موش بسیار ایمنونژنیک بوده و

آلژینات در پژوهش دارویی و زیست پزشکی آینده امیدوار کننده‌ای دارد. مهمترین ویژگی آلژینات شامل ایمنی، سازگاری زیستی و روشهای ساده آماده‌سازی است. به دلیل سازگاری زیستی، تجزیه زیستی و غیرسمی بودن آن، در فناوری‌های متفاوت انتقال دارو اعمال می‌شود. بنابراین، پژوهشگران باید پیشرفت‌های موجود در سیستم های دارویی مبتنی بر آلژینات را به روز کنند و این بررسی منبع هدایت پژوهش آینده است. [۲۶].

مراجع

- [1]. S. Olsnes, The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*. 44, 361-370, 2004.
- [2]. J. Audi, M. Belson, M. Patel, J. Schier, J. Osterloh, Ricin poisoning: A comprehensive review. *J. Am. Med. Assoc.* 294, 2342-2351, 2005.
- [3]. L.J. Schep, W.A. Temple, G.A. Butt, M.D. Beasley. Ricin as a weapon of mass terror-separating fact from fiction. *Environ. Int.* 35 1267-1271, 2009.
- [4]. A.M. Bramwell, J.E. Eyles, H.O. Alpar, Particulate delivery systems for biodefense subunit vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 57, 1247-1265, 2005.
- [5]. J.E. Small, J.A. Richardson, S. Pincus, J. Schindler, E.S. Vitetta. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine*. 23, 4775-4784, 2005.
- [6]. J.E. Smallshaw, J.A. Richardson, E.S. Vitetta, RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine*. 25, 7459-7469, 2007
- [7]. P.S. Marconescu, J.E. Smallshaw, L.M. Pop, S.L. Ruback, E.S. Vitetta. Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. *Vaccine*. 28 5315-5322, 2010.
- [8]. P.M. Legler, R.N. Brey, J.E. Smallshaw, E.S. Vitetta, C.B. Millard, Structure of RiVax: a recombinant ricin vaccine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67 826-30, 2011.
- [9]. L. Zhao, A. Seth, N. Wibowo, C.X. Zhao, N. Mitter, C. Yu, Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 32 327-337, 2014.
- [10]. F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical

بار سطحی ذرات بر اتصال نانوذرات به غشای سلول تأثیر دارد به طوریکه پتانسیل zeta پوست انسان ۲۳ میلی ولت است. پس، بار مخالف می تواند باعث افزایش زمان تماس بین دارو و پوست شود. [23].

نانوذرات دارای اندازه ۳۰۰ نانومتر می توانند از طریق نفوذ لایه شاخی به داخل پوست نفوذ کنند. بنابراین، آلژینات را میتوان یکی از بهترین حامل های دارویی دانست. [۲۳].

در تحقیقات دیگر در حوزه حامل های دارویی میانگین پتانسیل زتا $4/30 \pm 72/57$ است، که بعد از کپسوله کردن با ترکیب $glucosamine sulfate$ $7/78 \pm 47/1$ میشود مقدار منفی پتانسیل زتا ممکن است به دلیل وجود گروه های کربوکسیل یونیزه در سطح $glucosamine sulfate$ آلژینات نسبت داده شود. [۲۴].

ذرات با پتانسیل های zeta مثبت تر از $+30$ میلی ولت یا منفی- تر از -30 میلی ولت به طور معمول پایدار هستند، زیرا بار سطحی مانع تجمع ذرات می شود [۲۵].

نانوذرات آلژینات حاوی RiVax با محلول آزادسازی کامل آمیخته شده و مقدار جذب نانوذرات مستقیم اندازه گیری و تشخیص داده شد که مقدار پروتئین محبوس شده ۶۴ درصد پروتئین کل است. نتایج نشان داد که پروتئین در تمام مراحل به دام انداختن پایدار است و از طرف دیگر، این روش پیشنهاد شده است که ما نمی توانیم مقدار واقعی پروتئین محبوس شده را اندازه گیری کنیم و برای این منظور باید یک روش مناسب ارائه دهیم.

در حال حاضر مطالعات پژوهشگران بر یک ادجوانت مناسب و ایمن برای افزایش ایمنی زایی RiVax متمرکز شده است. در این پژوهش، سعی شد از نانوذرات به عنوان سیستم های تحویلی نوین برای افزایش ماندگاری و ایمنی زایی پروتئین RiVax استفاده شود [۱۳ و ۱۴]

مطالعات متفاوتی برای تولید یک واکسن مناسب برای جلوگیری از سمیت ریسین انجام پذیرفته است و طبق مطالعات حیوانی، ایمن سازی فعال بررسی شده و نشان داده است که سطوح مناسبی از آنتی بادی های خنثی کننده ریسین تولید و حفظ خواهند شد [۱۵].

آلژینات به عنوان یک حامل بالقوه برای تحویل انواع داروهای کم و زیاد با وزن مولکولی بررسی شده است. کاربردهای بسیار

- [21]. L. Hu, H. Zhong, Zh. He. Alleviating the toxicity of quantum dots to *Phanerochaete chrysosporium* by sodium hydrosulfide and cysteine. *Environmental Science and Pollution Research* 27 (10), 11116-11126, 2020.
- [22]. M. Halayqa, U. Domańska, PLGA Biodegradable Nanoparticles Containing Perphenazine or Chlorpromazine Hydrochloride: Effect of Formulation and Release. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 23909-23923, 2014.
- [23]. S. Prabha, W.Z. Zhou, J. Panyam, V. Labhasetwar, Size dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* 244, 105–15, 2004.
- [24]. S.G Yang, J.E. Chang, Shin B, Park S, Na K, Shim CK. 99mTc-ematoporphyrin linked albumin nanoparticles for lung cancer targeted photodynamic therapy and imaging. *J Mater Chem* 2010;20:9042–6.
- [25]. Zeta Potential: An Introduction in 30 Minutes. https://caliscc.org/images/presentations/Morante_Zeta_Potential.pdf. Accessed on March 31, 2014
- [26]. H. Thai, C. Thuy Nguyen, L. Thi Thach et al., “Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo,” *Scientific Reports*, vol. 10, 12-25, 2020.
- applications. *J Control Release.* 161, 505–522, 2012.
- [11]. H.K. Makadia, J. Steven, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 3, 1377–1397, 2011.
- [12]. Kordbacheh E, Nazarian Sh, Sadeghi D, Hajizadeh A. An LTB-entrapped protein in PLGA nanoparticles preserves against enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran J Basic Med Sci.* 21, 1-8, 2018.
- [13]. E. Kordbacheh, S. Nazarian, A. Hajizadeh, D. Sadeghi, Entrapment of LTB protein in alginate nanoparticles protects against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *APMIS.* 12, 320-328, 2018.
- [14]. T.E. Rajapaksa, M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H.A. Eckelhoefer, D.D. Lo. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *J Control Release.* 142, 196–205, 2010.
- [15]. M.L. Houchin, E.M. Topp, Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms, *J. Pharm. Sci.* 97, 2395–2404, 2008.
- [16]. D. Cun, D.K. Jensen, M.J. Maltesen, M. Bunker, High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 26–35, 2010.
- [17]. S. Freitas, H.P. Merkle, B. Gander Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J. Control. Release.* 102, 313–332, 2005.
- [18]. J.U. Menon, S.Kona A.S. Wadajkar, F. Desai, A. Vadla, K.T. Nguyen. Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 100, 1998-2005, 2012.
- [19]. N. Tamilselvan, C.V. Raghavan, K. Balakumar, S. Karthik. Preparation of PLGA nanoparticles for encapsulating hydrophilic drug: modifications of standard methods and its in vitro biological evaluation. *AJRBPS.* 2, 121-132, 2014.
- [20]. F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 5 505-15, 2008.

RiVax Loaded ALG Nanoparticles: Physicochemical and Immunological Characterization

Davoud Sadeghi^{1*}, Firouz Ebrahimi¹, Mehdi Zeinoddini², Amirhossain Shamakhi¹, Emad Kordbacheh¹

¹ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

² Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

Abstract: Ricin is a toxic glycoprotein, it consists of two subunits (RTA&RTB). There are two vaccine candidates based on RTA included RiVax and RVEc. Although different studies about immunized potency of RiVax, alone and with adjuvant, have been performed, but novel delivery system like nanoparticles to improve immunization of this protein has not been used until today. The purpose of this study was the synthesis of alginate nanoparticles (NPs) containing RiVax and evaluation of physicochemical parameters and immunization potential of this system as compared to naked RiVax. In this research, after purification of RiVax, Ionic gelation method was used to prepare alginate nanoparticles, which is a simple and suitable method for heat sensitive materials. Then, NPs containing RiVax and naked protein was administrated into different groups of mice. 8 weeks after last immunization, the mice were analyzed. Results showed that the size of NPs was 190nm and the release pattern of protein from nanoparticle is slow (12% of protein during 40 days). Also, immunization results showed that NPs containing RiVax compared to naked RiVax could not stimulate the immune system interestingly. We concluded that the alginate NPs could not be able to make a remarkable immune response compared to protein alone due to the slow release of RiVax from them.

Keywords: alginate nanoparticles (NPs); RiVax; Ricin; immunization.