



Evaluation of Oral and Injection Immunization with Chitosan Nanoparticles Containing HER-2 antigene

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Shafighian F.¹ MA,
Nazarian Sh.* PhD,
Amani J.² PhD,
Fahimi H.³ PhD

How to cite this article

Shafighian F, Nazarian Sh, Amani J, Fahimi H. Evaluation of Oral and Injection Immunization with Chitosan Nanoparticles Containing HER-2 antigene. Pathobiology Research. 2018;21(2):85-94.

*Biology Department, Basic Sciences Faculty, Imam Hossain University, Tehran, Iran

¹Pharmaceutical Sciences Research Center, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Applied Microbiology Research Center, System biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Molecular and Cellular Sciences Department, Advanced Sciences and Technology Faculty, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Biology Department, Basic Sciences Faculty, Imam Hossain University, Shahid Babaei Highway Tehran, Iran

Phone: +98 (21) 77104934

Fax: +98 (21) 77104934
nazarian56@gmail.com

Article History

Received: October 28, 2017

Accepted: February 12, 2018

ePublished: July 5, 2018

ABSTRACT

Aims Breast cancer is the most common cancer among women around the world and in Iran and 22% of all cancers in women is included.

About 30% of cases with breast cancers are due to the proliferation or excessive expression of HER-2 protein. Chitosan is an environmentally friendly combination, due to its minimal systemic toxicity of peptide or drug delivery, the application is considered. The aims of this study were to manufacture chitosan nanoparticle containing HER-2 recombinant protein, evaluation of the properties and effect of its oral and injection immunization on spleen lymphocytes.

Materials & Methods In this experimental study, pET-28a vector containing *HER-2* gene was evaluated using PCR by universal primers. Expression of protein in *E.coli* was induced with IPTG. The recombinant protein was purified using affinity chromatography and evaluated by Western Blotting analysis. Chitosan nanoparticles containing recombinant protein were prepared by ionic gelation method and their size were characterized by DLS. Mice were immunized with nanoparticles and antibody titers were determined by ELISA. The response of lymphocytes in exposure to nanoparticles was evaluated by MTT assay. One way ANOVA, Duncan test and SPSS 22 software were used for statistical analysis.

Findings The protein with a molecular weight of 18 kDa was confirmed. Yield of protein was 12mgL⁻¹. Encapsulation efficiency of recombinant protein in nanoparticles was 70%. The average particle size was 205.2nm. Immunization of mice induced mucosal and humoral immune response.

Conclusion Encapsulation efficiency of recombinant protein in nanoparticles is 70%. The average particle size is 205.2nm. Immunization of mice induces mucosal and humoral immune response HER-2 recombinant protein, due to the cellular and humoral immune response, is a candidate suitable for cancer diagnostic or therapeutic purposes.

Keywords Breast Neoplasms; Chitosan; HER-2- Protein; Nanoparticle

CITATION LINKS

- [1] Preparation of chitosan nanoparticles carrying ... [2] Trend analysis of breast cancer mortality ... [3] Development of a novel nanoparticle-based therapeutic ... [4] Anti-HER2 treatment and breast cancer ... [5] Update on HER-2 as a target for ... [6] Her2-positive breast cancer: Herceptin ... [7] Impact of serum Her2 levels on survival ... [8] Trastuzumab treatment in patients with advanced ... [9] Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different ... [10] The HER-2/neu Oncogene in breast ... [11] Production and characterization of Anti-Her2 ... [12] Molecular biology of cancer: Mechanisms ... [13] Nanoparticles in vaccine ... [14] Review: Doxorubicin delivery ... [15] Thiolated chitosan nanoparticles for ... [16] Oral immunization with HpaA affords ... [17] Chitosan-Pluronic nanoparticles as ... [18] NapA protects *Helicobacter pylori* from ... [19] Chitosan-based delivery systems for mucosal ... [20] Nanoparticle delivery systems ... [21] Preparation and characterization of water-soluble ... [22] Molecular cloning a laboratory ... [23] Development of monoclonal ... [24] Protein ... [25] Immunogenic properties of chimeric ... [26] Preparation and comparison ... [27] Sonochemically prepared BSA microspheres ... [28] In-vitro production of anti LPS ... [29] Progress in the development of a therapeutic ... [30] Mucins in the pathogenesis ... [31] Design and expression of recombinant ... [32] Recent advancement of gelatin nanoparticles ... [33] Nanoparticle ... [34] Chitosan: A promising safe and ... [35] Particle size and surface charge affect ... [36] The use of nanoparticles in ... [37] Efficacy and safety of trastuzumab ... [38] Use of chemotherapy plus a monoclonal ... [39] Reduced cardiotoxicity and preserved ... [40] Reduced cardiotoxicity and comparable ... [41] Poly (ethylene oxide)-modified ... [42] Reducing the risk of breast cancer ... [43] Breast cancer chemoprevention ... [44] Biological Effects of Letrozole ... [45] Making paclitaxel nanoliposomal ... [46] Application of bioinformatics ... [47] Breast cancer ... [48] Nanotechnology and ...

ارزیابی ایمنی‌زایی خوراکی و تزریقی نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی‌ژن HER-2

فاطمه شفیقیان MA

مرکز تحقیقات علوم دارویی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شهرام نظریان* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین^(ع)، تهران، ایران

جعفر امانی PhD

پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

حسین فهیمی PhD

گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سرطان سینه شایع‌ترین سرطان میان زنان در ایران و دنیا است و ۲۲٪ کل سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. حدود ۳۰٪ موارد سرطان‌های سینه به علت تکثیر یا بیان بیش از حد پروتئین HER-2 است. کیتوزان پلیمری سازگار با محیط زیست بوده که به دلیل حداقل مسمومیت سیستمیک برای تحویل پپتید یا دارو، در برنامه‌های کاربردی مطرح است. هدف مطالعه حاضر تهیه نانوذرات کیتوزان دربردارنده پروتئین نوترکیب HER-2، ارزیابی ویژگی‌ها و تاثیر ایمنی‌زایی خوراکی و تزریقی آن در لئوسیت‌های طحال بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، وکتور pET-28a حاوی ژن نوترکیب HER-2 با روش PCR و پرایمرهای عمومی تایید شد. بیان پروتئین با ایزوپروپیل تیوگالاکتوزیداز (IPTG) القا و با استفاده از ستون رزین کروماتوگرافی نیکل-نیتریلو تری‌استیک‌اسید (Ni-NTA) تخلیص و پروتئین با وسترن‌بلاتینگ تایید شد. نانوذرات کیتوزان واجد پروتئین نوترکیب به روش ژلاسیون یونی تهیه و اندازه ذرات با DLS و ایمنی‌زایی نانوذرات در موش و ارزیابی پاسخ لئوسیت‌ها با تست MTT صورت گرفت. برای تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه، آزمون دانکن و نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد.

یافته‌ها: پروتئین نوترکیب HER-2 با اندازه مولکولی ۱۸ کیلودالتون تایید شد. میزان پروتئین تخلیص شده ۱۲ میلی‌گرم در لیتر بود. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات، ۷۰٪ و متوسط اندازه نانوذرات ۲۰۵/۲ نانومتر مشاهده شد. ایمن‌سازی موش‌ها پاسخ ایمنی همورال و مخاطی را القا کرد.

نتیجه‌گیری: ظرفیت بارگذاری پروتئین HER-2 در نانوذرات کیتوزان، ۷۰٪ و متوسط اندازه نانوذرات ۲۰۵/۲ نانومتر است و ایمن‌سازی موش‌ها پاسخ ایمنی همورال و مخاطی را القا و تجویز خوراکی تزریقی بیشترین میزان پاسخ را ایجاد می‌کند.

کلیدواژه‌ها: بدخیمی‌های پستان، کیتوزان، پروتئین HER-2، نانوذره

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

*نویسنده مسئول: nazarian56@gmail.com

مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و کشورهای توسعه یافته است^[1]. در جامعه آمریکا، سرطان سینه ۳۰٪ تمام سرطان‌های بدخیم بوده و ۱۶٪ مرگ به علت سرطان می‌باشد، به طوری که احتمال ابتلا به سرطان سینه در طول عمر نوزادان دختر ۱۲/۵٪ است. سالیانه بیش از ۳۰ هزار نفر در ایران در اثر ابتلا به سرطان فوت می‌کنند^[2]. روش‌های مرسوم و متداول درمان، به طور اختصاصی سلول‌های توموری را هدف قرار نداده، عوارض گسترده‌ای داشته و به طور قابل توجهی کیفیت زندگی بیماران را کاهش می‌دهند. بنابراین ارایه راهکارهای درمانی جدید ضروری است^[3]. پروتئین HER-2 یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی-۲ (ERBB2) یا

(HER2/neu)، یک پروتئین غشایی ۱۸۵ کیلودالتونی و عضوی از خانواده گیرنده‌های تیروزین‌کینازی تیپ-۱ است و به طور طبیعی در مسیرهای انتقال علامت منتج به رشد و تمایز سلول دخالت دارد^[4, 5]. بیان بیش از حد این ژن با خصوصیت تهاجمی بالای سرطان سینه همراه و در سلول‌های توموری با افزایش رگ‌زایی در ارتباط است^[6, 5]. پروتئین HER-2 یک دومین سیتوپلاسمی با فعالیت تیروزین‌کینازی، یک دومین تراغشایی و یک دومین خارج سلولی دارد. دومین خارج سلولی HER-2 ممکن است توسط متالوپروتئیناز ماتریکس دو قسمت شده و از سطح سلول‌های سرطانی سینه به بیرون از سلول ریخته شود و سطوح HER-2 سرم می‌تواند توسط الیزا بدون هیچ هم‌فعالیتی با دیگر اعضای خانواده رسپتور HER-2 تشخیص داده شوند. تحقیقات زیادی غلظت افزایش‌یافته HER-2 را با عود اولیه بیماری، بقای کمتر، پاسخ کاهش‌یافته به شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی و همچنین پاسخ به ترازتوزوماب یا هرسپتین مرتبط دانسته‌اند^[7]. به دلیل خصوصیت پیش‌آگهی‌دهندگی آن و نیز قابلیت پیش‌بینی پاسخ به درمان با هرسپتین، تومورهای سینه اغلب برای تعیین افزایش بیان HER-2 کنترل می‌شوند^[8]. همچنین HER-2 با تشکیل کلاستر می‌تواند در تومورزایی نقش داشته باشد^[9, 10]. بیان زیاد ژن HER-2 در بیماران سرطان سینه با طول عمر کوتاه مشاهده شده است^[10]. مهم‌ترین مارکر سرطان سینه HER-2 است، به طوری که رایج‌ترین روش آزمایشگاهی تشخیص سرطان سینه بررسی بیان HER-2 می‌باشد^[11]. در ۲۰ تا ۳۰٪ موارد سرطان سینه متاستازی، بیان HER-2 افزایش یافته که این افزایش منجر به قطع مسیرهای انتقال پیام طبیعی، فقدان تنظیم رشد سلول و آغاز مقاومت به آپوپتوز می‌شود. افزایش بیان HER-2 در سطح سلول توموری منجر به ترانسفورماسیون بدخیم و تهاجم بالینی سرطان سینه می‌شود^[12].

به دلیل حساسیت بسیار پروتئین‌ها نسبت به پروتئازها و سایر مواد، آنها به عاملی محافظ نیاز دارند، کیتوزان به دلیل داشتن ویژگی‌های بارز، یکی از ترکیبات محافظ پروتئین به شمار می‌آید. کیتوزان پلی‌ساکاریدی است که به میزان زیاد در پوسته سخت‌پوستانی مانند خرچنگ وجود دارد. اولین بار بدمایر از کیتوزان به عنوان حامل برای انتقال یک داروی روده‌ای استفاده کرد. اطلاعات به دست آمده از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان موجب شده که این پلیمر به عنوان ماده‌ای برای رهاسازی دارو و ایمونوژن‌ها مورد توجه قرار گیرد، از دیگر ویژگی‌های کیتوزان می‌توان به خاصیت ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، فعالیت ضد توموری و ویژگی التیام زخم اشاره کرد^[13]. از نظر تکنیکی، ویژگی بار مثبت و حلالیت در آب کیتوزان بسیار مهم است^[14]، این دو ویژگی موجب می‌شوند پلیمر با سطوح باردار میکروارگانیسم‌ها و یا ماکرومولکول‌های بار منفی در محیط آبی برخورد کند، به همین دلیل از این نیروهای برخوردی برای این اهداف استفاده شده است. سوسپانسیون‌ها و ذرات کیتوزانی قابلیت تحریک سیستم ایمنی مانند کموتاکسی و فعال‌سازی سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها را دارند و نیز موجب ترشح سیتوکین‌هایی مانند اینترلوکین ۱۰ (IL10)، اینترلوکین ۲ (IL2)، اینترفرون گاما (IFN- γ) اینترلوکین ۱۲ (IL12) و فاکتور نکروزکننده توموری آلفا (TNF- α) می‌شوند. این پلیمر موجب فعال شدن سلول‌های T سیتوتوکسیک و نیز سلول‌های کشنده طبیعی شده و پاسخ آنتی‌بادی را افزایش می‌دهد. کیتوزان سمیت بسیار پایینی دارد، پلیمری سازگار با محیط زیست است و در محیط زیست تقریباً

تولید پروتئین نوترکیب HER-2: به میزان ۵۰ میکرولیتر از محیط‌کشت حاوی باکتری تراریخت شده با پلاسمید pET28a(+) در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع جدید دارای ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و تا رسیدن باکتری‌ها به مرحله رشد لگاریتمی (جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شد. به نمونه‌ها به استثنای نمونه شاهد، القاگر ایزوپروپیل تیوگالاکتوزیداز (IPTG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار در شرایط استریل اضافه و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ rpm گرماگذاری شد. پس از اتمام زمان، رسوب سلولی جمع‌آوری شده، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده حل و با سونیکاسیون با شرایط قدرت ۷۵٪ در ۴ سیکل، ۱۰ ثانیه سونیکاسیون و ۱۵ ثانیه در یخ، شکسته شدند. نمونه حاصل از سونیکاسیون سانتریفوژ و محلول رویی برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ بارگذاری شد. نشانگر پروتئین از قبل رنگ شده (SM 0673 protein ladder) به عنوان نشانگر پروتئینی استفاده شد [23, 24]. همچنین حلالیت پروتئین با استفاده از بافر نمکی فسفات (PBS) اوره ۸ مولار بررسی شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب HER-2 با روش کروماتوگرافی تمایلی: با در نظر گرفتن تشکیل اجسام انکلوژنی از روش دنا توره برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. بیان پروتئین در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع انجام و به رسوب سلولی حاصل از بیان، ۲ میلی‌لیتر بافر B واجد اوره ۸ مولار با pH برابر ۸ اضافه شد. نمونه‌ها با شرایط قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵ به تعداد ۶ مرتبه سونیکه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. پس از سانتریفوژ، محلول رویی جدا و از رزین کروماتوگرافی نیکل-نیتربیلوتری‌استیک‌اسید (Ni-NTA) عبور داده شد. در ادامه به ترتیب بافرهای شست‌وشوی C با pH برابر ۶/۳، بافرهای شست‌وشوی D با pH برابر ۵/۹ و بافر استخراج E با pH برابر ۵/۴ از ستون عبور داده شدند. برای ارزیابی تخلیص پروتئین از ژل SDS-PAGE ۱۲٪ استفاده شد. تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (سیناژن؛ ایران) به عنوان پروتئین استاندارد انجام شد [24-26].

وسترن‌بلاتینگ به منظور تایید نهایی پروتئین بیان شده: پس از حذف اوره از محلول حاصل از تخلیص کروماتوگرافی به روش دیالیز شیب اوره، پروتئین نوترکیب با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد هسیستیدین و به روش وسترن‌بلاتینگ ارزیابی شد. میزان ۲۰ میکروگرم از پروتئین در SDS-PAGE ۱۲٪ بارگذاری با استفاده از تانک وسترن‌بلاتینگ (بیورد؛ ایالات متحده) روی کاغذ پلی‌وینیلیدین دی و فلوراید منتقل شد. پوشاندن نواحی آزاد و برهنه کاغذ با استفاده از بافر بلاکینگ ۵٪ شیر خشک در PBST (بافر PBS واجد ۰/۰۵٪ توئین ۲۰) در دمای ۳۷°C به مدت ۳ ساعت انجام و شست‌وشوی کاغذ سه بار با بافر PBST تکرار شد. کاغذ با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد هسیستیدین با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. پس از شست‌وشو، برای آشکارسازی باند پروتئینی از ۱۰ میلی‌لیتر بافر حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰ میلی‌گرم دی‌آمینوبنزیلیدین و ۱۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه استفاده و نشانگر پروتئین از قبل رنگ شده SM 0673 (سیناژن؛ ایران) به عنوان نشانگر پروتئینی روی کاغذ تثبیت شد [23, 26].

به راحتی تجزیه می‌شود [15, 16] و با توجه به حداقل سمومیت سیستمیک برای تحویل پپتید یا دارو، در برنامه‌های کاربردی مطرح است. این نانوذرات قادرند ضمن افزایش میزان پاسخ سیستم ایمنی، در جهت‌دهی و هدایت این سیستم به سمت ایجاد نوع خاصی از پاسخ نیز موثر باشند. با به‌کاربردن این نانوذرات به‌عنوان حامل، مقدار استفاده از پروتئین نوترکیب مورد هدف کاهش می‌یابد و از اثرات مخرب پروتئین‌ها تا حدودی محافظت می‌شوند. این راهکار موجب ارتقای کارایی و کیفیت پروتئین مورد نظر در القای پاسخ‌های ایمنی بر ضد تومور می‌شود که در پیشبرد اهداف کاربردی از جمله پروتئین و پپتیدرسانی موثر و انتقال دارو حایز اهمیت است [17, 18]. گیلی و همکاران از سیستم‌های تحویل دارو به‌وسیله کیتوزان استفاده کردند و در این بررسی با استفاده از مشتقات کیتوزان و تغییرات نانوذرات و سطح شارژ و اکسن نشان دادند که کیتوزان به‌عنوان سیستم دارورسان با ادجوانت و بدون ادجوانت می‌تواند در مخاط به‌طور بسیار قوی اثرگذار باشد و به‌زودی وارد بازار شود [19]. در مطالعات اخیر استفاده از پلیمر کیتوزان برای انتقال داروها به محل‌های مناسب و هدفمند در سیستم‌های زیستی، توسعه فراوانی یافته است [20, 21].

مطالعه حاضر با هدف تهیه نانوذرات کیتوزان دربردارنده پروتئین نوترکیب HER-2، ارزیابی ویژگی‌ها و تاثیر ایمنی‌زایی آن در لنفوسیت‌های طحال انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر سازه ژنی به‌منظور بیان در باکتری *E. coli* در وکتور بیانی pET-28a زیرهمسازسازی شد. کاظمی و همکاران در سال ۱۳۹۴ به‌منظور طراحی یک پروتئین نوترکیب حاوی آنتی‌ژن HER-2 در میزبان پروکاریوتی *E. coli* BL21DE3 به‌عنوان ابزاری برای تشخیص سرطان پستان، توالی ایمونوژنیک HER2 را استخراج کردند. تخلیص پلاسمید pET-28a حاوی ژن HER-2 با روش لیز قلیایی انجام شد [22]. در این روش، یک کلنی از باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB) واجد آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت و به‌مدت یک شب در دمای ۳۷°C در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد. رسوب سلولی جمع‌آوری و با بافر لیزکننده واجد سدیم‌دودسیل‌سولفات و سدیم‌هیدروکسید، دیواره و غشای سلول تخریب شد و پتاسیم‌استات برای جداسازی ژنوم و پلاسمید به‌کار رفت. پروتئین‌ها با فنل/کلروفورم از فاز رویی واجد پلاسمید حذف شدند، DNA پلاسمیدی در اتانول مطلق ترسیب و سپس با اتانول ۷۰٪ شسته و در بافر تریس-EDTA (TE) حل شد.

برای تایید سازه ژنی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با پرایمرهای عمومی T7 انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲ میلی‌مول دئوکسی‌نوکلئوتید (dNTPs)، پرایمرها هر کدام ۰/۵ میکرومول و ۲ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl2)، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰/۵ میکرولیتر، راه‌اندازی شد. واکنش PCR با ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵°C و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۶۰°C و مدت زمان ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲°C و مدت زمان یک دقیقه صورت گرفت. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C اعمال شد.

سوبسترا با افزودن اسیدسولفوریک متوقف و جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر ثبت شد.

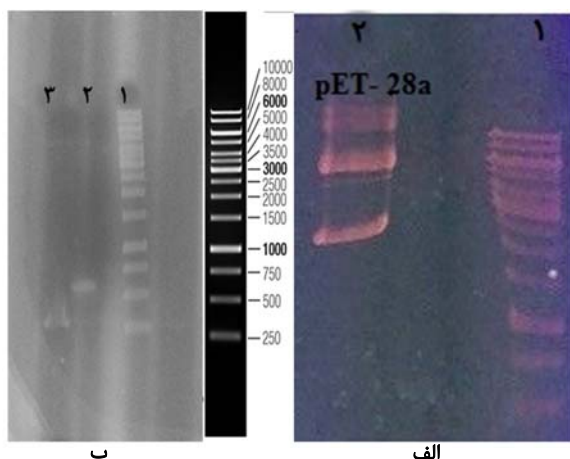
به‌منظور تعیین تیتراژ IgA سرمی اختصاصی علیه آنتی‌ژن، روش الیزای غیرمستقیم همانند روش قبل صورت گرفت با این تفاوت که در این مرحله رقت سرم ۱:۵ تا ۱:۶۴۰ در نظر گرفته شد و همچنین در مرحله افزودن کونژوگه، از آنتی‌بادی ضدایمونوگلوبولین نوع A متصل شده به آنزیم پراکسیداز تری کوهی (Anti-IgA HRP conjugate) (سیگما؛ ایالات متحده) با رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده شد.

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی به روش MTT: طحال هر موش ایمن شده پس از نخاعی کردن موش‌ها در شرایط استریل و زیر هود لامینار خارج شد. به‌منظور انجام آزمون MTT به ۳-۴، ۵دی‌متیل‌تيازول-۲-[Y1-۲]، ۵-دی‌فنیل‌تترازولیموم MTT نیاز بود تا ۱×۱۰^۴ سلول در هر گوده از میکروپلیت قرار داده شود. برای رقیق‌سازی MTT، به‌ازای هر ۱۰ میکرولیتر محلول MTT، ۹۰ میکرولیتر RPMI 1640 به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. برای توقف واکنش از الکل ایزوپروپانول اسیدی و دی‌متیل سولفواکسید (DMSO؛ مرک؛ آلمان) با الکل اتیلیک استفاده شد. بدین‌ترتیب که به تکرار دوتایی اول ایزوپروپانول و به تکرار دوتایی دوم DMSO اضافه شد و در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر مدل ۲۰۲۱ (Cecil؛ انگلستان) خوانده شد. این عمل و استفاده از دو حلال به‌منظور افزایش ضریب اطمینان صورت پذیرفت. در ضمن پس از اتمام انکوباسیون وضعیت سلول‌ها با مشاهده بلورهای سرمه‌ای‌رنگ فورمازان درون سیتوپلاسم سلول، کنترل شدند [14, 28].

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه، مقایسه میانگین در سطح تجویز با آزمون دانکن و عملیات آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 22 صورت گرفت.

یافته‌ها

محصول PCR حاصل از تکثیر با پرایمرهای عمومی روی ژل آگارز تاییدکننده وجود ژن HER-2 در وکتور بود (شکل ۱).



شکل ۱) بررسی الگوی الکتروفورز پلاسمید pET28a-HER-2 روی ژل آگارز ۱٪ (الف)
 ستون ۱) نشانگر اندازه مولکولی DNA (۱۰۰۰ جفت‌باز)
 ستون ۲) پلاسمید pET28a حاوی ژن نوترکیب HER-2
 الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای عمومی T7 روی ژل آگارز ۱٪ (ب)
 ستون ۱) نشانگر اندازه مولکولی DNA (۱۰۰۰ جفت‌باز)
 ستون ۲) محصول PCR نمونه وکتور pET28a واحد ژن نوترکیب به‌عنوان کنترل
 ستون ۳) محصول PCR نمونه وکتور pET28a به‌عنوان کنترل

تهیه نانوذرات کیتوزان حاوی پروتئین نوترکیب HER-2 و بررسی میزان بارگذاری پروتئین: نانوذرات کیتوزان با روش ژلاسیون یونی و محلول کیتوزان با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در اسیداستیک ۲٪ وزنی تهیه شد، پس از فیلترکردن محلول به دست‌آمده، ۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم‌تری‌پلی‌فسفات با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌صورت قطره‌ای به ۷/۵ میلی‌لیتر محلول کیتوزان حاوی پروتئین نوترکیب اضافه شد و روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت. پس از تشکیل نانوذرات، محلول کلونیدی در بستر گلیسرولی به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴°C و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مایع رویی برای تعیین میزان بارگذاری پروتئین جدا شد. رسوب حاصله که شامل نانوذرات بود، برای سیر مراحل آماده‌سازی و تجویز در دمای ۴°C نگهداری شد. میزان بارگذاری پروتئین، براساس اختلاف مقدار پروتئین اولیه افزوده‌شده به محلول کیتوزان و مقدار نهایی باقیمانده در محلول رویی به دست آمد. به‌منظور بررسی اندازه نانوذرات با روش DLS از دستگاه زتاسایزر مدل ZEN3600 (Malvern؛ انگلستان) استفاده شد [26, 27].

ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی: ۲۰ سر موش ماده، ۶ هفته‌ای و وزن تقریبی ۲۰ گرم انتخاب و در ۳ گروه ۵ تایی آزمون به‌منظور تجویز HER-2 به‌صورت خوراکی، تزریقی، خوراکی-تزریقی و ۵ موش دیگر نیز در یک گروه کنترل تقسیم و در شرایط دمای ۲۵°C، دسترسی کافی به مواد غذایی، رطوبت و نور مناسب در قفس‌های پلی‌پروپیلنی نگهداری شدند.

تزریقات در چهار نوبت و با فواصل ۲ هفته‌ای صورت گرفت (جدول ۱). برای تجویز خوراکی ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین بارگذاری شده و برای تزریق زیرجلدی ۱۰ میکروگرم پروتئین به‌کار برده شد. برای تزریق آنتی‌ژن آزاد از ادجوانت کامل و ناقص فروند استفاده شد. به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی، یک هفته پس از تزریقات از چشم حیوانات ایمن و غیرایمن خون‌گیری و سرم تهیه شد. به‌دلیل تجویز خوراکی نانوواکسن در موش، ایمونوگلوبولین A (IgA) ترشحی علیه آنتی‌ژن مورد نظر در مدفوع بررسی شد.

جدول ۱) زمان و نحوه مراحل ایمن‌سازی موش‌ها

دوز/روز	خوراکی	خوراکی-تزریقی	تزریقی	کنترل
اول/روز ۱	خوراکی	گاواژ	زیرجلدی	خوراکی
دوم/روز ۱۴	خوراکی	گاواژ	زیرجلدی	خوراکی
سوم/روز ۲۸	خوراکی	گاواژ	زیرجلدی	خوراکی
چهارم/روز ۳۲	خوراکی	صفاقی	صفاقی	صفاقی

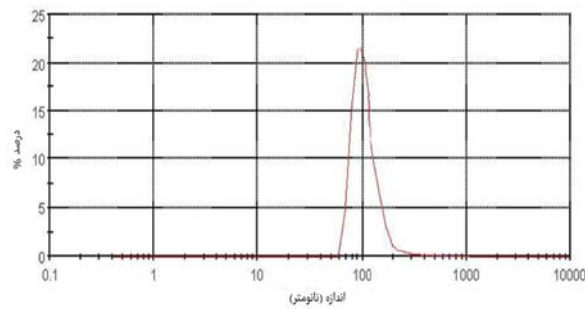
تعیین تیتراژ آنتی‌بادی IgG سرم، IgA سرم و مدفوع به روش الیزای غیرمستقیم: آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در سرم به روش الیزا ارزیابی شد. برای انجام الیزا، ۵ میکروگرم از پروتئین نوترکیب با استفاده از بافر کرینات-بی‌کرینات به داخل چاهک‌های پلیت الیزا اضافه و با گرماگذاری به‌مدت یک شب در دمای ۴°C تثبیت شد. عمل شست‌شو و خشک‌کردن با بافر PBST پس از هر یک از مراحل آزمایش الیزا انجام شد. محل‌های خالی از آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها با بافر بلاکینگ ۵٪ وزنی/حجمی در بافر PBST با اعمال دمای ۳۷°C به‌مدت ۱ ساعت، مسدود شد. سریال رقت از سرم موش ایمن و موش کنترل از رقت ۱/۵۰ تا ۱/۲۵۶۰۰ تهیه و به چاهک‌ها اضافه شد، سپس میکروپلیت به‌مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°C برای گرماگذاری قرار گرفت. از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه‌شده با HRP با رقت ۱/۲۵۰۰ استفاده شد. در مرحله آشکارسازی، به هر چاهک محلول اورتونیل دی‌آمین (OPD) اضافه شد و پلیت الیزا در تاریکی قرار گرفت. واکنش تغییر رنگ

آنتی‌بادی ضد هیسیتیدین توانست توالی آمینواسیدی هیسیتیدین که توسط وکتور به انتهای آمینی پروتئین نوترکیب اضافه شده بود را شناسایی و با آن واکنش دهد و صحت پروتئین نوترکیب بیان شده در میزان پروکاریوتی تایید شد (شکل ۴).

سیستم	مدت زمان استفاده (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)
۶۰	۲۵/۰	۲۸۴
۱/۲۵	موقعیت اندازه‌گیری (میلی‌متر)	نرخ شمارش
۵	تضعیف‌کننده	کووت اندازه‌گیری یک بار مصرف سلول

نتیجه

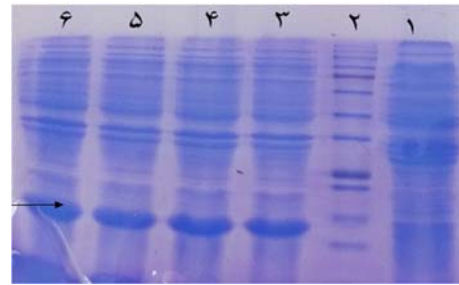
عرض (نانومتر)	درصد %	قطر (نانومتر)
۶۵/۸۵	۱۰۰/۰	۱۰۵/۹
۰/۰۰۰	۰/۰	۰/۰۰۰
۰/۰۰۰	۰/۰	۰/۰۰۰



نمودار ۱) بررسی اندازه نانوذرات کیتوزان با DLS پیک نمودار تیز، نشان‌دهنده یکنواختی نانوذرات بود. میانگین اندازه ذرات ۲۰۵/۲ نانومتر به‌دست آمد.

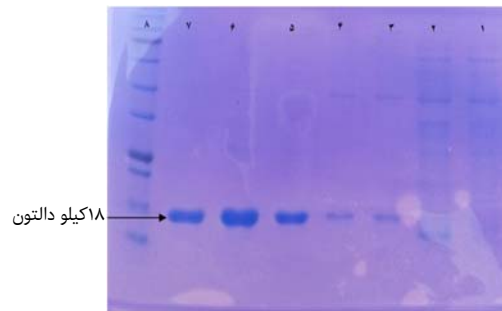
میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان ۲۰۵/۲ نانومتر مشاهده شد (نمودار ۱) و بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان واجد پروتئین نوترکیب ۹/۵ بود. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات، حدود ۷۰٪ تعیین شد. القای پاسخ سیستمیک و افزایش تیتراژ IgG سرم اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب HER2 مشاهده شد. در خون‌گیری دوم نسبت به خون‌گیری اول میزان IgG سرمی در گروه خوراکی- تزریقی افزایش یافت (نمودار ۲)، به‌نحوی که OD_{max} در خون‌گیری دوم به عدد ۲/۴ رسید، در حالی که OD_{max} در خون‌گیری اول ۰/۲ بود. میزان IgG در گروه تزریقی در رقت ۱ به ۱۰۰۰۰۰ سرم، مقدار OD_{max} خون‌گیری دوم معادل ۳/۱ به دست آمد ولی برای خون‌گیری اول OD_{max} معادل ۲/۵ بود و افزایش قابل ملاحظه آنتی‌بادی IgG در گروه تزریقی در خون‌گیری آخر مشاهده شد (نمودار ۲). نتایج مشابهی در میزان IgG گروه خوراکی دیده شد (نمودار ۲). در خون‌گیری دوم نسبت به خون‌گیری اول میزان IgG سرمی در گروه تزریقی افزایش یافت. به‌نحوی که OD_{max} خون‌گیری دوم معادل عدد ۳/۱ و خون‌گیری اول معادل ۲/۵ بود. در خصوص نقطه پایان نیز مشاهده شد در خون‌گیری دوم معادل رقت ۱ به ۱۰۰۰ و در خون‌گیری اول ۱۰۰ بود (نمودار ۲). در گروه خوراکی- تزریقی در خون‌گیری دوم یک افزایش در میزان IgA ترشحی علیه آنتی‌ژن مورد نظر و همچنین روند مشابهی در گروه خوراکی مشاهده شد، به‌نحوی که OD_{max} در خون‌گیری دوم و در خون‌گیری اول افزایش یافت (نمودار ۳).

در اثر القا، عصاره سلولی پروتئین نوترکیب HER-2 با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون در نمونه آزمون بیان شد (شکل ۲).

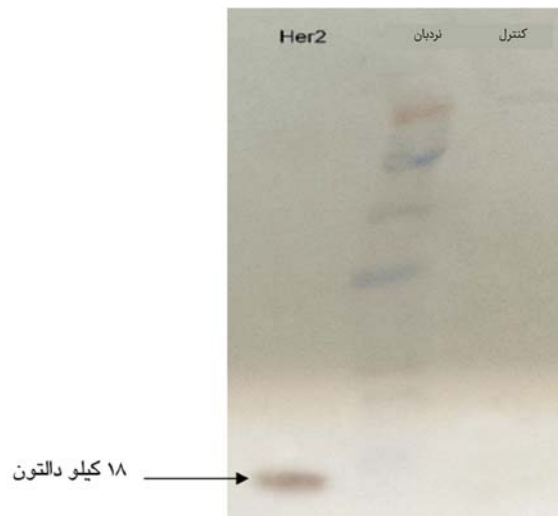


شکل ۲) ارزیابی بیان پروتئین HER-2 القا شده با غلظت یک میلی‌مولار IPTG روی ژل SDS-PAGE ستون ۱) عصاره سلولی باکتری واجد ژن نوترکیب القا شده با IPTG ستون ۲) نشانگر پروتئین از قبل رنگ شده SM 0673 ستون‌های ۳ تا ۶) عصاره سلولی باکتری واجد ژن نوترکیب القا شده با IPTG

پروتئین نوترکیب با خلوص بسیار بالایی در خروجی ستون حاصل از بافر رهاسازی E و بافر ام‌ای اس (MES) وجود داشت (شکل ۳). غلظت پروتئین تخلیص شده ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

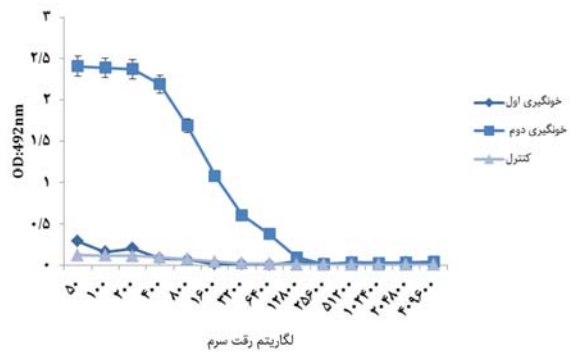
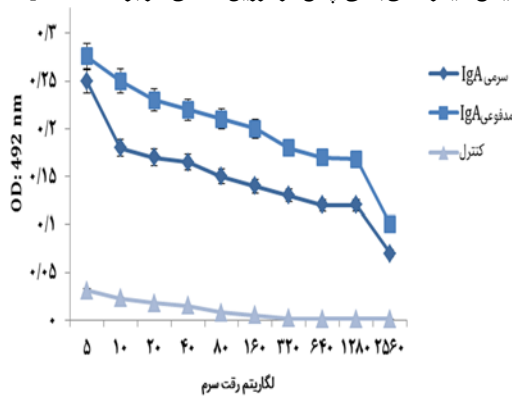


شکل ۳) تخلیص پروتئین نوترکیب HER-2 با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA ستون ۱) عصاره سلولی حل شده اوره ۸ مولار پس از عبور از ستون نشانگر مولکولی پروتئین ستون ۲) نمونه مربوط به شست‌وشوی ستون با بافر C ستون ۳ و ۴) نمونه مربوط به شست‌وشوی ستون با بافر D ستون ۵ و ۶) نمونه مربوط به شست‌وشوی ستون با بافر E ستون ۷) نمونه مربوط به شست‌وشوی ستون با بافر MES ستون ۸) نشانگر پروتئین از قبل رنگ شده SM 0673

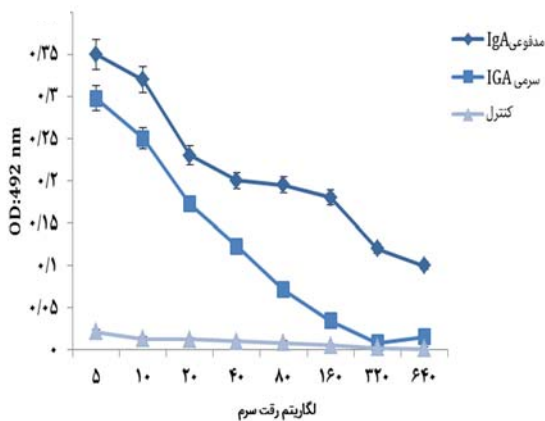


شکل ۴) وسترن بلات پروتئین HER-2 با آنتی‌بادی ضد هیسیتیدین با توجه به نشانگر پروتئینی و نمونه کنترل، لکه قهوه‌ای رنگ تاییدکننده نهایی پروتئین HER-2 در ناحیه ۱۸ کیلودالتونی بود. نشانگر پروتئین از قبل رنگ شده SM 0673 استفاده شد.

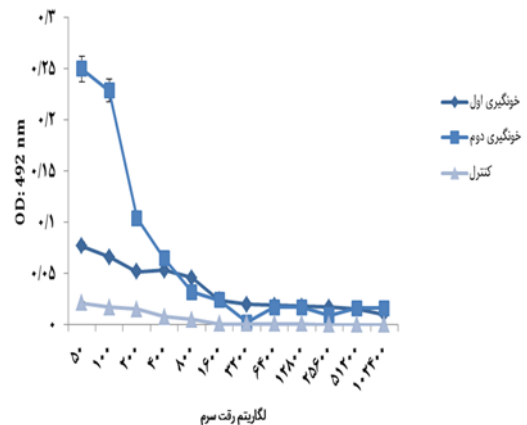
تولید آنتی‌بادی پس از تزریق در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن افزایش یافت که این افزایش در گروه کنترل دیده نشد (نمودار ۲ و ۳) افزایش تیترا آنتی‌بادی پس از تزریق معنی‌دار بود ($p < 0.05$).



الف



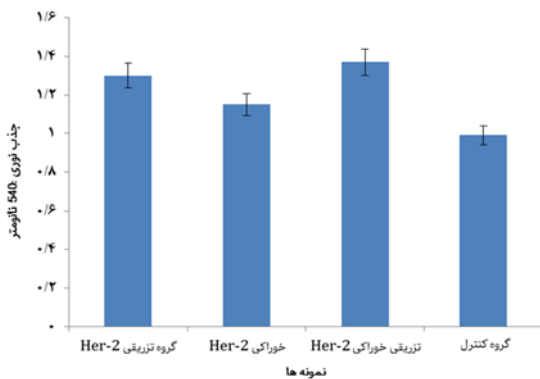
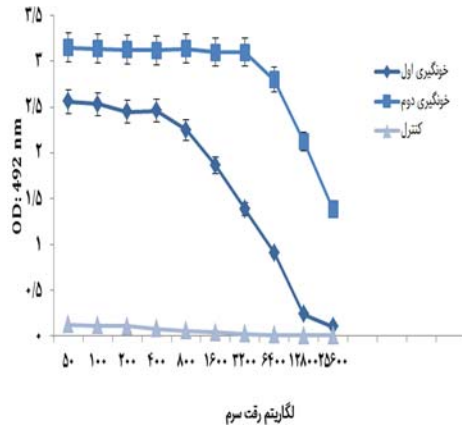
الف



نمودار ۳ میزان تیتراسیون IgA در دو نمودار، بالاترین میزان تیتر آذ مربوط به نمونه مدفوع گروه خوراکی و پس از آن بالاترین تیتر آنتی‌بادی مربوط به نمونه سرمی گروه تجویز خوراکی نانوذره بود.

ب

در مواجهه با نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب HER2 گروه موش‌های خوراکی- تزریقی بیشترین تیتر لنفوسیت‌های طحال را نسبت به گروه کنترل داشت (نمودار ۴)، پس از آن گروه تزریقی و سپس گروه خوراکی قرار داشتند. با توجه به نمودار حاصل از میزان اندیکس تحریکی، بیشترین پاسخ سلولی در گروه خوراکی- تزریقی مشاهده شد. با این حال این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).



ج

نمودار ۲ نتایج تیتراسیون IgG در خونگیری اول و دوم در گروه‌های موشی با تجویز خوراکی-تزریقی (الف)، خوراکی (ب) و تزریقی (ج) مورد آزمایش مشاهده شد میزان تیتراسیون IgG در گروه موش با تجویز تزریقی نانوذره بیشتر از گروه‌های موشی با تجویز خوراکی-تزریقی و تزریقی بود (۳/۱). در حالی که مقدار تیتراسیون IgG در گروه خوراکی ۰/۲۵ و در گروه خوراکی-تزریقی ۲/۴ بود.

نمودار ۴ مقایسه میزان رشد لنفوسیت‌ها در مواجهه با نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب HER2 بین گروه‌های تزریقی، خوراکی و خوراکی- تزریقی میزان رشد لنفوسیت‌ها در گروه خوراکی- تزریقی بیشتر از گروه‌های خوراکی و تزریقی مشاهده شد، با این حال این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

اثرات فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن و تعداد دفعات تجویز برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این مطالعه، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$; $F = 16/085$).

مخاط (موکو ادهسینی) برای داروهای استنشاقی و انتقال واکسن کاربرد دارد.^[34]

میانکشی آنتی‌ژن و نانوذره یا به‌عنوان سیستم انتقال عمل می‌کند یا ایمنی‌زایی را تقویت می‌کند. در عملکرد نانوذرات به‌عنوان ارتقادهنده پاسخ‌های ایمنی، نانوذره روش‌های معینی را فعال می‌کند که احتمالاً بعد از آن پردازش آنتی‌ژن و بهبود ایمنوژن‌یابی را افزایش دهد. میانکشی بین نانوذره و آنتی‌ژن به‌طور نسبی ضعیف است، که ممکن است به جدایش سریع آنتی‌ژن و نانوذره در شرایط درون سلول زنده منجر شود. آنکپسولاسیون و کانجوگاسیون شیمیایی میانکشی قوی‌تری را بین نانوذره و آنتی‌ژن فراهم می‌کند. در آنکپسولاسیون، آنتی‌ژن‌ها با مواد سازنده نانوذره در طی سنتز مخلوط می‌شوند، در نتیجه آنتی‌ژن تنها موقع تجزیه‌شدن نانوذره داخل سلول، آزاد می‌شود.^[33] در این تحقیق نیز میانکشی نانوذره و آنتی‌ژن به‌وسیله آنکپسولاسیون تقویت شد.

مطالعات نشان داده است که اندازه، بار و شکل نانوذرات نقش مهمی در جذب آنتی‌ژن دارد. به‌طور کلی نانوذرات سایز قابل مقایسه‌ای با پاتوژن‌ها دارند که می‌تواند به‌آسانی تشخیص داده شده و در نتیجه جذب کارآمدی توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن برای القای پاسخ‌های ایمنی انجام شود. سلول‌های دندریتیک اغلب ذرات با اندازه مشابه ویروس را جذب می‌کنند (۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر)، در حالی که ماکروفاژها اغلب ذرات بزرگتر را جذب می‌کنند (۵ تا ۵ میکرومتر). علاوه بر اندازه ذره، بار سطحی نیز نقش مهمی را در فعال‌سازی پاسخ ایمنی بازی می‌کند. نانوذرات کاتیونی به‌علت میانکشی‌های الکترواستاتیکی با غشاهای سلولی آنیونی القای بیشتر جذب سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن را نشان می‌دهند.^[35]

در مطالعه حاضر نیز متوسط اندازه نانوذرات واجد آنتی‌ژن در حدود ۲۰۰ نانومتر بود که امکان ارایه آنتی‌ژن به سلول‌های سیستم ایمنی را فراهم می‌سازد.

تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از نانوذرات با قابلیت اینکه بتواند بافت‌های سالم را محافظت نموده و اثرات کشنده روی سلول‌های سرطانی داشته باشد انجام شده است. به‌طور مثال از آنتراسیکلین لیپوزومی در درمان تمام درجه‌های سرطان سینه استفاده می‌شود.^[36, 37] ولی کاربرد آن به‌دلیل اثرات سمی روی قلب محدود است. این ترکیب همراه با ترازتوزوماب، یک آنتی‌بادی مونوکلونال علیه ERBB2، تاثیر بهتری خواهد داشت.^[36, 38]

گزارش شده است که پی‌گلیتیدیل‌لیپوزوم و لیپوزوم حاوی دوکسوروبیسین در درمان سرطان سینه در مرحله متاستازی کاربرد دارند.^[39, 40] استفاده از نانوذرات همراه با داروها نفوذپذیری آنها را به بافت‌های توموری افزایش می‌دهد. با خصوصیت حفاظت‌کنندگی نانوذره اثرات سمی دارو بر سلول‌های سالم بافت غیرتوموری نیز کمتر است.^[41]

برای مدت طولانی تاموکسیفن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده استروژن برای درمان سرطان سینه استفاده می‌شد، اما مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که موارد زیادی از مقاومت به تاموکسیفن در بافت سرطانی ایجاد شده است، از طرفی استفاده از این دارو خطر ابتلا به آندومتریوز را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.^[42, 43] امروزه مهارکننده‌های آروماتاز، دسته جدید دارویی موثرتر از تاموکسیفن را برای درمان سرطان سینه معرفی می‌کند. لتروزول، یک مهارکننده غیراسترویدی آروماتاز است که توسط سازمان غذا و

مطالعه حاضر با هدف تهیه نانوذرات کیتوزان دربردارنده پروتئین نوترکیب HER-2، ارزیابی ویژگی‌ها و تاثیر ایمنی‌زایی آن در لنفوسیت‌های طحال انجام شد.

سرطان سینه ایمنوژنیک است و چندین آنتی‌ژن مرتبط با تومور وجود دارد که از آنها برای ساخت واکسن برای سرطان سینه استفاده شده است. واکسن‌های سرطان سینه طراحی شدند تا پاسخ ایمنی در گام‌های مختلف مسیر پردازش آنتی‌ژن طبیعی برای مراقبت ایمنی را تحریک کنند. آنتی‌ژن‌های HER-2/neu، Mucin-1 و hTERT آنتی‌ژن‌هایی هستند که به‌طور کارآمدی در واکسن‌های بیماران مبتلا به سرطان سینه مطالعه شده‌اند. طراحی این واکسن‌ها به این منظور بود که سلول‌های T کمکی و کشنده را اصطلاحاً بیرون بکشد. در طول سال‌های اخیر آزمایش‌های بالینی انسانی برای این آنتی‌ژن‌ها گزارش شده است. آنتی‌ژن HER-2/neu هدفی بسیار مناسب برای ایمنوتراپی است.^[29]

اتوانت‌بادی‌های مرکب و آزاد علیه HER2 می‌تواند هم در بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم و هم در افراد سالم کشف شود. مطالعات ثابت کرده است که جریان آنتی‌بادی‌های anti-HER2 ممکن است به‌عنوان یک عامل تشخیصی مطلوب برای بیماران مبتلا به سرطان سینه در مراحل اولیه قبل از درمان مورد استفاده قرار گیرند.^[4, 30]

در تحقیق پیشین که ارایه یک کاندید واکسن مناسب ضدسرطان سینه پپتید نوترکیب HER2 در *E. coli* بیان شد و ایمنوژنیسیته و کارکرد ضدسرطان آن مورد تایید قرار گرفت.^[31] با توجه به یافته‌های پیشین، تولید نانوذره کیتوزان حاوی این پروتئین نوترکیب و ایمنی‌زایی آن در مدل موش BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت.

به‌طور کلی نانوتکنولوژی در علم واکسن انتقال دارو، انتقال کنترل‌شده ژن، تشخیص پاتوژن، شناسایی و استخراج DNA، مهندسی بافت و تصویربرداری زیستی و مولکولی کاربرد دارد. به‌عبارتی نانو ساختارها در فرمولاسیون واکسن وسیله‌ای برای انتقال هستند و همچنین به‌دلیل خاصیت ادجوانتی ذاتی پاسخ‌های ایمنی را بهبود می‌بخشند. ویژگی‌های نانوذرات از قبیل کیتوزان اثرات مهمی در کیفیت واکسن مانند اندازه، خاصیت آب‌گریزی، بار، شکل سطحی، اضافه‌شدن لیگاند خواهند داشت.^[31]

نانوذرات در مقایسه با سایر سیستم‌های حامل به‌ویژه در اندام‌های غنی از ماکروفاژ مثل ریه‌ها، کبد و طحال تجمع بهتری دارند، زیرا نانوذرات بیشتر در این اندام‌ها فاگوسیت می‌شوند.^[32] همچنین به‌دلیل اینکه اندازه‌ای مشابه اجزای سلولی دارند می‌توانند با استفاده از مکانیزم اندوسیتوز سلولی به‌ویژه پینوسیتوز وارد سلول‌های زنده شوند.^[33]

وزن مولکولی، درجه داستیل‌اسیون (چگالی بار) و توزیع گروه‌های استیل به‌شدت روی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی و زیستی کیتوزان اثرگذار است و به‌طور مستقیم روی کاربرد آن نقش دارد. نمک‌های کیتوزان طبیعی عمدتاً در pH برابر ۶ حل‌نشده هستند. حلالیت آبی افزایش‌یافته کیتوزان با تغییرات مولکولی گروه‌های آمین اولیه و گروه‌های هیدروکسیل به دست می‌آید که در محلول گروه‌های آمینوی کیتوزان پروتونه می‌شوند و پلی‌ساکارید محلول حاصل به‌طور مثبت باردار می‌شود که کیتوزان با ویژگی‌های چسبندگی به

محلول بوده و ذرات کیتوزان با پتانسیل زتای مثبت، و بالاتر پایداری بیشتر در محلول خواهند داشت، همچنین اگر پتانسیل زتای ذرات کیتوزان ومشتقات آن مثبت تر باشد، چسبندگی این پلیمرها به پروتئین ها و نیز سطوح مخاطی بیشتر خواهد بود و قابلیت بهتری برای تحویل پروتئین و آنتی ژن در واکسیناسیون مخاطی خواهد داشت.

کیتوزان در طول زمان در سیستم های بیولوژیک تخریب می شود و میزان تخریب پذیری کیتوزان با کنترل مقدار استیل زدایی آن قابل کنترل است. این ویژگی موجب می شود داروها به طور کنترل شده در بدن آزاد شوند و بنابراین اثرگذاری آن را افزایش می دهد. گروه های آزاد آمین که به کیتوزان بار مثبت می دهند، برای انتقال دارو ضروری هستند. این بارهای مثبت موجب برهمکنش با بارهای منفی داروها، پلیمرها و مولکول های زیستی فعال می شوند. نانوذرات کیتوزان به دلیل ویژگی های منحصر به فرد آن برای انتقال انواع مختلفی از داروها مانند داروهای ضدهورمونی، انسولین، داروهای ضدسرطان و واکنس مطرح هستند. حسین زاده و همکاران از این نانوذرات به عنوان یک سیستم دارورسانی برای درمان سرطان استفاده کردند [1, 17].

آغاز بروز واکنش ایمنی علیه سرطان به طور غالب توسط سلول های دندریتیک MHC-I صورت می گیرد. این سلول ها، مولکول های MHC-II و مولکول های کمک محرک را به میزان زیادی بیان می کنند. در حقیقت به عنوان ابزار جدیدی برای جهت دادن سیستم ایمنی ویژه شناخته شده اند و سلول های دندریتیک به سمت پاسخ سلول های مذکور را به خوبی تحریک می کنند. با توجه به خواص موجود، این کمپلکس می تواند ابزار مناسب و موثری برای کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان سرطان در آینده باشد [1].

در مطالعه حاضر ایمونوگلوبولین در گروه های خوراکی و خوراکی-تزریقی بررسی و تجویز خوراکی این نانوذره برای تحریک سیستم ایمنی، با به کارگیری یک دوز تقویتی تزریقی موجب افزایش پاسخ ایمنی شد.

مقایسه میزان IgG گروه تزریقی و گروه های خوراکی و خوراکی-تزریقی نشان داد که در گروه تزریقی میزان IgG بیشتری نسبت به دو گروه دیگر تولید شده است. این یافته ها با سایر گزارش های موجود در این خصوص مطابقت دارد.

مقایسه میزان IgG و IgA گروه خوراکی و خوراکی-تزریقی نشان داد که میزان تحریک سیستم ایمنی همورال و مخاطی در هر دو مورد، در گروه تزریقی بیشتر بود. در این خصوص نتایج با یافته های پیشین در یک راستا است [47]. به نظر می رسد یک برنامه ایمنی زایی ترکیبی می تواند پاسخ های بهتری را به دنبال داشته باشد.

در مطالعه حاضر در بررسی سلول های طحال موش های ایمن شده و تحریک تکثیر سلول های ایمن در این سلول ها در مواجهه با پروتئین نوترکیب مشخص شد که گروه خوراکی-تزریقی بیشترین میزان پاسخ را ایجاد کرد. این یافته با بررسی های صورت گرفته روی میزان IgG و IgA در یک راستا است و نشان می دهد که در گروه خوراکی تزریقی ایمنی سلولی هم راستا با ایمنی مخاطی و همورال ایجاد می شود. در جمع بندی این نتایج به نظر می رسد که تحریک سیستم ایمنی با روش خوراکی تزریقی به خوبی سیستم ایمنی را تحریک کرده و علاوه بر تولید IgG و IgA سیستم ایمنی سلولی نیز تحریک شده و می تواند پاسخ مناسبی در صورت بروز بیماری ایجاد شود. براساس این یافته ها می توان این پروتئین کایمر و استفاده از نانوذرات کیتوزان را به عنوان یک کاندید واکنس علیه بیماری سرطان سینه پیشنهاد داد.

داروی ایالات متحده برای درمان سرطان پستان وابسته به استروژن، تایید شده است [44].

نانوذرات پلیمری مثل کیتوزان ویژگی هایی مانند پایداری بالا در طول دستگاه گوارش، حلالیت در آب، امکان تغییر سطح، ساخت راحت، قابلیت زیست سازگاری، قابلیت هضم زیستی، فقدان ایمونوژنیسیته و سمیت دارند که کاربرد آنها برای اهداف تشخیصی و دارویی هر روزه افزایش می یابد [13].

در حفره بینی pH موضعی (۵/۵ تا ۶/۵) با درجه داستیل ساییون کیتوزان ترکیب می شود و می تواند راه انتقال برای واکنس باشد. تاکنون هیچ یافته ای کاربرد کیتوزان در واکنس استنشاقی را منع نکرده است. واکنس های بر پایه کیتوزان اصطلاحاً توانایی بیرون کشیدن پاسخ های ایمنی را دارند. مکانیزم فعالیت کیتوزان به عنوان یک ادجوانت برای آنتی ژن های واکنس های استنشاقی به طور کامل شناخته نشده است. کیتوزان ویژگی های ایمنومدولاتوری از قبیل تحریک افزایش سلول های کشنده طبیعی و ماکروفاژها را در معرض نمایش قرار می دهد [34].

مهم ترین هدف در شیمی درمانی برای سرطان، کاهش تماس دارو با بافت سالم و به دنبال آن کاهش عوارض جانبی و همچنین فراهم آوردن غلظت درمانی مناسب از دارو در بافت سرطانی است. اگر دارورسانی به این شکل هدفمند باشد امکان درمان اختصاصی و رساندن دارو به بافت هدف فراهم می شود، بدیهی است که در این صورت عوارض جانبی هم کاهش می یابد. چندین روش برای هدفمند کردن دارورسانی وجود دارد که تهیه نانوکپسول های لیپیدی یکی از این روش ها است [44].

نانوکپسول های لیپیدی اندازه ای بین ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر دارند و با عنوان ساختاری هیبریدی بین نانوکپسول های پلیمری و لیپوزوم ها شناخته می شوند [45].

کیتوزان به دلیل ویژگی های فیزیکی شیمیایی و بیولوژیکی بی نظیر، انگیزه های بسیاری را برای توسعه سالم و موثر سیستم دارورسانی و نیز انتقال واکنس برانگیخته است. حقیقی و همکاران از روش بیوانفورماتیک برای بهینه سازی کلون ژن مورد نظر در *شریشیا کالی* استفاده کردند، نتایج آنها نشان داد که ژن کلون شده با پرایمرهای مهندسی و در نهایت پروتئین تولید شده حدود ۲۰ کیلودالتون بود [46].

در مطالعه حاضر پروتئین نوترکیب HER-2، آنتی ژن شایع در سرطان سینه بیان شد. نتایج تکنیک SDS-PAGE بیان این پروتئین را تایید کرد. نتایج وسترن بلات هم حضور پروتئین نوترکیب را از نظر واکنش با آنتی بادی اختصاصی ضد هیستیدین اثبات کرد. این نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب به درستی تولید شد و اندازه آن به همراه فیوژن وکتور pET28a حدود ۱۸ کیلودالتون بود. ویلا و همکاران از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل پروتئین برای واکنس کزاز استفاده کردند [1]. استفاده از پلیمرهایی مانند کیتوزان برای انتقال داروها به محل های مناسب در سیستم های بیولوژیک مورد توجه زیادی قرار گرفته است. بار مثبت مولکول های کیتوزان قادر است با بار منفی موجود در پروتئین نوترکیب متصل شود که این قسمت با مولکول کیتوزان مزدوج شده و ترکیب دوگانه ایجاد شده ممکن است به تشکیل نانوذرات منجر شود و قادر به کپسوله کردن دارو و تحویل آن به ناحیه هدف باشد. اندازه نانوذرات با دستگاه زتاسایزر بررسی و تایید شد. طبق نتایج قطر ذرات ۲۰۵ نانومتر بود.

پتانسیل زتای نانوذرات تهیه شده در مطالعه حاضر ۹/۵ مثبت تعیین شد. پتانسیل زتای ذرات عامل مهمی برای پایداری ذرات در

strategies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2009;4(1):9-18.

5- Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3(6):385-9.

6- Dean-Colomb W, Esteva FJ. Her2-positive breast cancer: Herceptin and beyond. *Eur J Cancer.* 2008;44(18):2806-12.

7- Ryu DW, Lee CH. impact of serum Her2 levels on survival and its correlation with clinicopathological parameters in women with breast cancer. *J Breast Cancer.* 2012;15(1):71-8.

8- Santin AD, Bellone S, Roman JJ, McKenney JK, Pecorelli S. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008;102(2):128-13.

9- Kaufmann R, Muller P, Hildenbrand G, Hausmann M, Cremer C. Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *J Microsc.* 2011;242(1):46-54.

10- Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells.* 1998;16(6):413-28.

11- Tabatabaei-Panah AS, Zarnani AH, Montaser-Kouhsari Sh, Chamankhah M, Ghods R, Bayat AA, et al. Production and characterization of Anti-Her2 monoclonal antibodies. *Cell J (Yakhteh).* 2008;10(2):109-120.

12- Pecorino L. *Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics.* Oxford: OUP Oxford; 2012.

13- Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian AH, Arpanaei A, Amani J. Nanoparticles in vaccine development. *J Appl Biotechnol Rep.* 2014;1(4):125-34.

14- Tan ML, Choong PF, Dass CR. Review: Doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(2):131-42.

15- Saremi S, Atyabi F, Akhlaghi SP, Ostad SN, Dinarvand R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:119-28.

16- Nystrom J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine.* 2007;25(14):2591-8.

17- 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.

18- Cooksley C, Jenks PJ, Green A, Cockayne A, Logan RP, Hardie KR. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 6):461-9.

19- Jabbal-Gill I, Watts P, Smith A. Chitosan-based delivery systems for mucosal vaccines. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012;9(9):1051-67.

20- Krishnamachari Y, Geary SM, Lemke CD, Salem AK. Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharm Res.* 2011;28(2):215-36.

21- Zhang HL, Wu SH, Tao Y, Zang LQ, Su ZhQ. Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. *J Nanomater.* 2010;2010:898910.

22- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning a laboratory manual.* 1st Volume. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

در حال حاضر کاربردهای نانوتکنولوژی برای انتقال واکسن بر مبنای نانوحامل در مراحل تحقیق اولیه است و فقط تعداد کمی از محصولات در آزمایش‌های بالینی، آزمایش شده‌اند. همچنین این سیستم‌های انتقال می‌تواند برای پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی مورد توجه قرار گیرند^[48]. مطالعه حاضر گشایشی برای ایده مذکور به منظور بررسی بهبود سرطان با استفاده از خاصیت ایمنومودولاتوری است. پروتئین HER-2 به دلیل ایجاد پاسخ ایمنی سلولی و همورال کاندیدی مناسب برای اهداف تشخیصی و یا درمانی سرطان است. نانوذرات کیتوزان هم به علت خاصیت ادجوانتی ذاتی و بهبود پاسخ‌های ایمنی می‌تواند به عنوان حامل برای انتقال واکسن به کار روند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم در اختیار داشتن آنتی‌بادی اختصاصی ضد HER-2 اشاره کرد و پیشنهاد می‌شود عملکرد نانوذره حاوی پروتئین HER-2 علیه سرطان سینه در مدل حیوان ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

ظرفیت بارگذاری پروتئین HER-2 در نانوذرات کیتوزان ۷۰٪ و متوسط اندازه نانوذرات ۲۰۵/۲ نانومتر است. ایمن‌سازی موش‌ها پاسخ ایمنی همورال و مخاطی را القا و تجویز خوراکی- تزریقی بیشترین میزان پاسخ را ایجاد می‌کند.

تشکر و قدردانی: از همکاری آقایان دکتر جواد معتمدی و دکتر مهدی فصیحی و سرکار خانم زهرا سادات حسینی کمال تشکر را داریم.

تأییدیه اخلاقی: در این پژوهش اصول اخلاقی در مورد نحوه نگهداری موش‌های آزمایشگاهی، تهیه غذا و همچنین شرایط تزریق و گاوآژ آنها و سایر موارد رعایت شد.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه شفیقیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰٪)؛ شهرام نظریان (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ جعفر امانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ حسین فهیمی (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۱۰٪).

منابع مالی: مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته سلولی و مولکولی مصوب دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی است.

منابع

1- Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghghi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant *helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2014;23(2):134-44. [Persian]

2- Fazeli Z, Fazeli Bavandpour F, Abdi A, pour hosaingholi M, Akbari A, Salimian J. Trend analysis of breast cancer mortality in Iranian women. *J Ilam Univ Med Sci.* 2013;20(4):246-251. [Persian]

3- Zupančič E, Silva JM, Videira MA, Moreira JN, Florindo HF. Development of a novel nanoparticle-based therapeutic vaccine for breast cancer immunotherapy. *Proced Vaccinol.* 2014;8:62-7.

4- Daniele L, Sapino A. Anti-HER2 treatment and breast cancer: State of the art, recent patents, and new

- 37- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):719-26.
- 38- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.
- 39- Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, et al. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(5):1444-54.
- 40- O'Brien MER, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCL (Caelyx/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):440-9.
- 41- Shenoy DB, Amiji MM. Poly (ethylene oxide)-modified poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm.* 2005;293(1-2):261-70.
- 42- Vogel VG. Reducing the risk of breast cancer with tamoxifen in women at increased risk. *J Clin Oncol.* 2001;19(18 Suppl):87S-92.
- 43- Brown K. Breast cancer chemoprevention: Risk benefit effects of the antiestrogen tamoxifen. *Expert Opin Drug Saf.* 2002;1(3):253-67.
- 44- Sadeghi Aliabadi H, Karimimanesh A, Varshosaz J. Biological Effects of Letrozole-Loaded Lipid Nanocapsules on MCF-7 Cell Line. *J Isfahan Med Sci.* 2013;30(217):2169-77. [Persian]
- 45- Koohi Moftakhari Esfahani M, Alavi SE, Heidarinasab A, Chiani M, Akbarzadeh A. Making paclitaxel nanoliposomal and evaluating its effect on the MCF-7. *New Cell Mol Biotechnol J.* 2013;3(10):67-71. [Persian]
- 46- Haghighi MA, Mohabati Mobarez A, Salmanian AH, Zali MR, Moazzeni SM, Karkhane AA. Application of bioinformatics and genetic engineering for designing optimized cloning and overexpression of Neutrophil activating protein of Helicobacter pylori in Escherichia Coli. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2013;21(85):40-54. [Persian]
- 47- Zhou J, Zhong Y. Breast cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(4):247-55.
- 48- Kim MG, Park JY, Shon Y, Kim G, Shim G, Oh YK. Nanotechnology and vaccine development. *Asian J pharm Sci.* 2014;9(5):227-35.
- 23- Iankov ID, Penheiter AR, Carlson SK, Galanis E. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *J Immunol Methods.* 2012;384(1-2):1-9.
- 24- Bollag DM, Rozcki MD, Edelman SJ. *Protein methods.* 2nd Edition. New York: Wiley-Liss; 1991.
- 25- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157:H7. *Vaccine.* 2010;28(42):6923-9.
- 26- Yousefpour P, Atyabi F, Dinarvand R, Vasheghani-Farahani E. Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation. *Daru.* 2011;19(5):367-75.
- 27- Grinberg O, Gedanken A, Patra CR, Patra S, Mukherjee P, Mukhopadhyay D. Sonochemically prepared BSA microspheres containing Gemcitabine, and their potential application in renal cancer therapeutics. *Acta Biomater.* 2009;5(8):3031-7.
- 28- Yardel V, Seyed N, Mosaffa N. In-vitro production of anti LPS antibody by peritoneal and spleen B-Lymphocyte of Balb/c mice. *Res Med.* 2010;33(3):148-55. [Persian]
- 29- Coveler AL, Bates NE, Disis ML. Progress in the development of a therapeutic vaccine for breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2010;2:25-36.
- 30- Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Jain M, Batra SK. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1815(2):224-40.
- 31- Kazemi M, Amani J, Salmanian AH, Forghanifard MM, Aghamollaei H. Design and expression of recombinant HER-2 antigen as a marker for detection of breast cancer. *Modares J Med Sci.* 2015;17(4):88-99. [Persian]
- 32- Sahoo N, Sahoo RK, Biswas N, Guha A, Kuotsu K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:317-31.
- 33- Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014;32(3):327-37.
- 34- Smith A, Perelman M, Hinchcliffe M. Chitosan: A promising safe and immune-enhancing adjuvant for intranasal vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(3):797-807.
- 35- Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm.* 2005;298(2):315-22.
- 36- Salehzadeh M, Norouzi P, Abbasali-Pourkabir R. The use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer: A review. *Pajouhan Sci J.* 2015;13(2):1-12.