

Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant helicobacter pylori neutrophil-activating protein

Neda Soleimani¹,
Ashraf Mohabati-Mobarez²,
Fatemeh Atyabi³,
Zohair Hasan-Saraf⁴,
Mohammad-Ali Haghighi⁵

¹ PhD Student, Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Professor, Nanotechnology Research Centre, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Professor, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received July 1, 2013; Accepted March 19, 2014)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is one of the leading causes of death in women around the world with a very high degree of mortality and morbidity. Conventional treatments use cytotoxic drugs which have high levels of side effects, affecting the patient's quality of life. Therefore today's pharmacology is looking into treatments with low side effects and maximum efficiency. The helicobacter pylori neutrophil-activating protein (HP-NAP) is a virulence factor that attracts and activates neutrophils, and promotes their endothelial adhesion and the production of oxygen radicals and chemokines. HP-NAP is an immune modulator able to induce the expression of IL-12 and IL-23. Chitosan is biodegradable and biocompatible component. It is low toxicity effect, so apply in drug delivery targets. In this study, we evaluated the preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant HP-NAP helicobacter pylori.

Materials and methods: Chitosan nanoparticles were produce. The size and morphology of the nanoparticles were investigated. Recombinant HP-NAP helicobacter pylori were produce.

Results: SDS-PAGE analysis showed the expression of an approximately 20,000 Dalton protein. DLS confirm size and zeta potential of the nanoparticle.

Conclusion: The complex has the potential to shift antigen-specific T-cell responses from a predominant Th2 to a polarized Th1 cytotoxic phenotype, characterized by high levels of interferon- γ and tumor necrosis factor- α production. HP-NAP may be a new tool for future therapeutic strategies aimed in cancer immunotherapy. Nanomaterials have been used to enable drug delivery with lower toxicity to healthy cells and enhanced drug delivery to tumor cells.

Keywords: Cancer, recombinant helicobacter pylori neutrophil-activating protein (HP-NAP), chitosan

آماده‌سازی نانوذرات تری‌متیل کیتوزان حامل پروتئین فعال کننده نوتروفیلی نو ترکیب از هلیکوباکتر پیلوری

ندا سلیمانی^۱اشرف محبتی مبارز^۲فاطمه اطیابی^۳زهیر حسن صراف^۴محمدعلی حقیقی^۵

چکیده

سابقه و هدف: سرطان از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد. درمان‌های دارویی متعارف با استفاده از داروهای سیتوتوکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار است. بنابراین امروزه محققین به دنبال درمان جایگزین با اثرات جانبی کم و حداکثر بهره‌وری می‌باشند. پروتئین فعال کننده نوتروفیلی (Helicobacter pylori neutrophil activating protein یا HP-NAP) یکی از پروتئین‌های ویروالانس هلیکوباکتر پیلوری است. این پروتئین نوتروفیل‌ها را به سمت خود می‌کشاند، سبب تولید رادیکال‌های اکسیژن و سیتوکین‌ها می‌گردد، دارای خاصیت ایمونومدولاتوری می‌باشد و سبب القای بیان IL۱۲ و IL۲۳ از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های انسانی می‌شود. کیتوزان یک ترکیب زیست سازگار و زیست تخریب پذیر می‌باشد؛ بنابراین با توجه به حداقل مسمومیت سیستمیک برای تحویل پپتید یا دارو، در برنامه‌های کاربردی مطرح است. هدف از این مطالعه، ساخت و تولید نانوذرات کیتوزان حامل پروتئین نو ترکیب HP-NAP هلیکوباکتر پیلوری به عنوان داوطلب درمانی بود.

مواد و روش‌ها: نانوذرات کیتوزان سنتز شد، پروتئین HP-NAP نو ترکیب بیان و تخلیص گردید و نانوذرات کیتوزان حامل پروتئین HP-NAP نو ترکیب تهیه شد.

یافته‌ها: پروتئین تولید شده با وزن مولکولی ۲۰۰۰۰ دالتون با تکنیک SDS-page (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) تأیید شد. بار الکتریکی و اندازه نانوذرات با دستگاه DLS (Dynamic light scattering) و میکروسکوپ الکترونی تعیین و تأیید گردید.

استنتاج: پروتئین نو ترکیب HP-NAP با داشتن پتانسیل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از Th۲ به فنوتیپ Th۱ به واسطه تولید اینترفرون گاما و عامل نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود؛ بنابراین نانوذرات کیتوزان حامل پروتئین نو ترکیب HP-NAP ممکن است ابزار مناسب و مؤثری جهت درمان سرطان در آینده باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان، HP-NAP نو ترکیب، تری‌متیل کیتوزان

مقدمه

حال توسعه می‌باشد. به طور تقریبی ۷۷ درصد از تمام بیماری‌های بدخیم سینه در زنانی رخ می‌دهد که بیش از ۵۰ سال سن دارند. ۱۵ درصد از موارد در زنان با سن کمتر از ۵۰ سال و تنها

سرطان سینه شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و کشورهای در

E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: اشرف محبتی مبارز - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی.

۱. دانشجوی دکتری، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، گروه فارماکوسیتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه میکروپزشناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۲/۲۸

۶/۵ درصد از تمام موارد در زنان کمتر از ۴۰ سال دیده می شود (۱). در ایران بر اساس آمارهای موجود در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران (انستیتو کانسر)، پیش بینی می شود که ۲۰-۱۰ درصد از کل جمعیت ایران سرطان را در طول زندگی خود تجربه کنند. شایع ترین سرطان در میان زنان ایرانی، سرطان سینه است که ۲۲ درصد از کل سرطان های زنان را شامل می شود. با وجود روش های درمانی مختلف، هنوز هم جراحی به عنوان اولین روش درمانی برای سرطان سینه محسوب می شود (۸-۲). درمان های رایج سرطان ممکن است اندازه تومور را کاهش دهد، اما گذرا است و بر بقای بیمار اثر مثبتی ندارد و احتمال عود بیماری هم وجود دارد (۹).

با توجه به ماهیت تهاجمی سرطان و همین طور مکانیسم های پیچیده دخیل در پیشرفت آن، درمان های سنتی مانند جراحی، شیمی درمانی و رادیو درمانی در بسیاری از موارد ناکارآمد می باشد. عوارض جانبی بالا، اختصاصیت پایین و احتمال بروز مجدد بیماری از محدودیت های روش های فوق هستند؛ بنابراین نیاز به جایگزینی درمان های مؤثرتر، اختصاصی تر و دارای عوارض جانبی کمتر بسیار احساس می شود. از این رو استفاده از محصولات باکتریایی شامل پروتئین ها و توکسین های باکتریایی به عنوان ایمونومدولاتور و ایمونوتوکسین در درمان سرطان ها مورد توجه واقع شده است. پروتئین فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP یا *Helicobacter pylori neutrophil activating protein*) یکی از پروتئین های مهم هلیکوباکتر پیلوری است. حین رشد باکتری، مولکول های HP-NAP از باکتری رها می شوند و مقداری از آن در سطح غشای خارجی به شکل متصل باقی می ماند. HP-NAP متصل به سلول می تواند واسطه اتصال باکتری به کربوهیدرات های سطح سلول میزبان باشد (۱۱، ۱۰). این پروتئین به عنوان یک ایمونومدولاتور مطرح می باشد. پروتئین ها نسبت به پروتئازها و سایر مواد بسیار حساس هستند؛ بنابراین نیازمند حفاظت می باشند. از بین ترکیبات محافظ با توجه به ویژگی های آن، کیتوزان مطرح می باشد.

کیتوزان پلی ساکرایدی است که به مقدار زیاد در پوسته

سخت پوستان وجود دارد. اطلاعات به دست آمده از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان باعث شده است که این پلیمر به عنوان ماده ای برای رهاسازی دارو و به ویژه برای رهاسازی ماکرومولکول ها پیشنهاد شود. از نظر تکنیکی، خصوصیت حل شدن در آب و بار مثبت کیتوزان بسیار مهم است (۱۲). این خصوصیات باعث می شود که این پلیمر با ماکرومولکول های بار منفی در محیط آبی و یا با سطوح باردار میکروارگانیسم ها برخورد کند؛ بنابراین از این نیروهای برخوردی در این اهداف سود برده شده است. سوسپانسیون ها و ذرات کیتوزانی قابلیت تحریک سیستم ایمنی مانند کموتاکسی و فعال سازی ماکروفاژها را دارند و نیز باعث ترشح سیโตکین هایی مانند IL_2 ، IL_{10} ، $TNF-\alpha$ ، IL_{12} و $IFN-\gamma$ می شوند. این پلیمر پاسخ آنتی بادی را افزایش می دهد و سلول های T سیتوتوکسیک و نیز سلول های کشنده طبیعی را فعال می کند. کیتوزان سمیت بسیار پایینی دارد (۱۱). این پلیمر یک ترکیب زیست سازگار و زیست تخریب پذیر می باشد (۱۳). با توجه به حداقل مسمومیت سیستمیک برای تحویل پپتید یا دارو، در برنامه های کاربردی مطرح می باشد. این نانوذرات قادر هستند ضمن افزایش میزان پاسخ سیستم ایمنی، در جهت دهی و هدایت این سیستم به سمت ایجاد نوع خاصی از پاسخ نیز مؤثر باشند. با به کار بردن این نانوذرات به عنوان حامل، مقدار استفاده از پروتئین نو ترکیب مورد هدف کاهش می یابد و از اثرات مخرب پروتئازها بر آن نیز کاسته می شود. این استراتژی باعث ارتقای کارایی پروتئین مورد نظر در القای پاسخ های ایمنی بر ضد تومور می گردد که در پیشبرد اهداف کاربردی از جمله پروتئین و پپتیدرسانی مؤثر، حایز اهمیت می باشد (۱۵، ۱۴). بنابراین هدف از این مطالعه، ساخت و تولید نانوذرات تری متیل کیتوزان حامل پروتئین نو ترکیب HP-NAP هلیکوباکتر پیلوری و ارزیابی ویژگی های آن بود.

مواد و روش ها

۱- القا و بیان پروتئین نو ترکیب NAP-A

توالی ژن NAP-A توسط شرکت GenScript آمریکا

شستشوی ستون با بافر B تا زمانی که جذب نوری ۲۸۰ نانومتری خروجی ستون به صفر برسد، ادامه یافت. سپس بافر شستشوی دوم به ستون اضافه شد و تمام خروجی در یک ظرف مجزا نگهداری شد. در نهایت بافر شستشوی سوم اضافه شد و خروجی ستون نیز به طور جداگانه جمع آوری گردید. پس از جمع آوری جزء پروتئینی، تحلیل الکتروفورز SDS-page به منظور بررسی خلوص آن‌ها انجام شد. به منظور حذف ایمیدازول از محلول پروتئینی از روش دیالیز تعویض بافر در حضور بافر PBS (Phosphate buffered saline) استفاده شد (۱۷، ۱۸).

۴- Western blot

پروتئین نوترکیب از ژل SDS-page به کاغذ پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (Polyvinylidene fluoride) یا PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط مرطوب منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین، از مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده استفاده گردید (Pre-stain ladder SM۰۶۰۷). مسدودسازی (Blocking) غشای PVDF با محلول TBS (Tris buffered saline) (۵۰ میلی‌مولار Tris و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) حاوی ۵ درصد شیر خشک (Fat free milk) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد غشا با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی بر علیه His-tag ۶ (Roche) در بافر TBS-T با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. شستشو با بافر TBS-T (TBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) انجام شد. پس از شستشوی نهایی، غشا با محلول ۰/۰۶ درصد DAB (Diaminobenzidine) (۵۰ میلی‌مولار Tris به همراه یک دهم درصد آب اکسیژنه) قرار گرفت و پس از ظهور باند واکنش با آب مقطر متوقف شد و از آن عکس تهیه گردید (۱۶-۱۸).

۵- تهیه تری‌متیل کیتوزان

کیتوزان از شرکت سیگما با وزن مولکولی پایین ۲۰۰-۱۰۰ کیلوالتون (Low molecular weight) تهیه شد. کیتوزان با وزن مولکولی پایین در محیط پایه متیل پیرولیدون

ساخته شد. ژن کلون شده در وکتور pet۲۸a انتقال داده شد. به منظور بیان پروتئین نوترکیب NAP-A، از میزبان بیانی E.coli BL۲۱ استفاده شد. جهت انجام القا از کشت شبانه باکتری در حضور ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین استفاده شد. القا در حجم بالا و پس از رسیدن جذب نوری محیط به حدود ۰/۸-۱ (در طول موج ۵۵۰ نانومتر) انجام شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از محلول IPTG یا Isopropyl-Beta-Thio Galactopyranoside با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۱۶).

۲- ارزیابی پروتئین نوترکیب به روش SDS-page (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

به منظور بررسی بیان پلاسמיד نوترکیب از روش الکتروفورز SDS-page با غلظت ۱۲/۵ درصد ژل پلی‌اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور مارکر پروتئین Pre-stain ladder SM۰۶۰۷ (شرکت فرمتاز و لدر ۲۰۰ کیلو دالتون) استفاده شد. در نهایت ژل پلی‌اکریل آمید با رنگ کوماسی G-۲۵۰ رنگ آمیزی شده و باند موردنظر بررسی شد (۱۶).

۳- تخلیص و بیان پروتئین نوترکیب NAP-A

از آنجایی که در وکتور مورد استفاده His-tag تعبیه شده بود و با توجه به پرایمر طراحی شده، می‌توان از رزین نیکل و کروماتوگرافی تمایلی جهت خالص سازی پروتئین استفاده کرد. به منظور تهیه لیز سلولی، رسوب E.coli کشت داده شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر IB washing buffer سوسپانسیون شد و توسط سونیکاتور در ۱۰ سیکل ۴۰ ثانیه‌ای با سرعت ۹۰ درصد تحت شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد شکسته شد. سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) و سوپرناتانت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. پس از عبور سوپرناتانت پروتئینی،

حل شد. سپس هیدروکسید سدیم، متیل یدید و سدیم یدید در دمای ۶۰ درجه سلسیوس اضافه و برای ۶ ساعت در این شرایط نگهداری شد. پلیمر با استون رسوب داده شد و با سانتریفیوژ نمودن آن رسوب جداسازی شد. برای انجام فرایند جابه جایی یونی I به Cl⁻، پلیمر در محلول نمکی کلرید سدیم ۰/۵ درصد وزنی - وزنی قرار گرفت. پس از آن، با استون رسوب داده شد و یک پودر سفید رنگ محلول در آب به دست آمد و در نهایت خشک گردید (۱۹).

۶- تهیه نانوذرات تری متیل کیتوزان

برای تولید و آماده سازی نانوذرات، ابتدا ۱ میلی گرم در میلی لیتر از تری متیل کیتوزان در محلول ۱ درصد اسید استیک حل شد. پس از تهیه پروتئین HP-NAP نوترکیب هلیکوباکتر پیلوری و تعیین غلظت و بار الکتریکی آن، میزان ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آن به بشر منتقل گردید و بر روی استیر با دور ۳۰۰ در دمای اتاق قرار گرفت. سپس تری پلی فسفات (Tripolyphosphate یا TPP) ۰/۱ درصد در آب مقطر حل شد و به محلول پروتئین به حجم ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اضافه گردید و بر روی استیر با دور ۳۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول کیتوزان به شکل قطره قطره به پروتئین حاوی تری پلی فسفات اضافه شد. واکنش به مدت ۱ ساعت در این شرایط ادامه یافت. جهت بررسی خصوصیات ذرات اتصال یافته مانند شکل، اندازه، پراکندگی و یکنواختی از میکروسکوپ الکترونی و دستگاه Zetasizer مجدد استفاده شد. برای خالص سازی ابتدا از کیسه دیالیز با کاتاف ۲۰ کیلودالتون استفاده شد. نانو کمپلکس از فاز آبی که حاوی پروتئین آزاد می باشد با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتی گراد جدا شد (۲۰، ۱۸).

۶-۱ بار الکتریکی و اندازه نانوذرات: DLS (Dynamic light scattering) یا Zetasizer دستگاهی است که با استفاده از تابش نور مرئی با طول موج ۶۳۳ نانومتر به نمونه سوسپانسیون می تواند برخی از خواص آن را از قبیل پتانسیل زتا و وزن مولکولی و همچنین توزیع اندازه ذرات را در ابعاد نانو اندازه گیری کند. به منظور تعیین بار الکتریکی،

پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان از دستگاه Zetasizer (Malvern) استفاده شد و این پارامترها در نانوذراتی با pH = ۶ تعیین شد (۲۰).

۶-۲ میکروسکوپ الکترونی TEM (Transmission electron microscope): میکروسکوپ انتقال الکترونی که به اختصار به آن TEM می گویند مشابه میکروسکوپ های نوری است؛ با این تفاوت که به جای پرتوی نور در آن از پرتوی الکترون استفاده می شود. آنچه که می توان با کمک میکروسکوپ نوری مشاهده کرد، بسیار محدود است؛ در حالی که با استفاده از الکترون ها به جای نور، این محدودیت از بین می رود. به منظور تعیین شکل، اندازه، پراکندگی و تأیید اندازه توسط دستگاه DLS از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد و این پارامترها در نانوذراتی با pH = ۴ تعیین گردید (۲۱).

۶-۳ میکروسکوپ الکترونی SEM (Scanning electron microscope): میکروسکوپ الکترونی روبشی که به آن SEM می گویند. مبنای عملکرد این میکروسکوپ، برهم کنش پرتوی الکترونی با ماده است. پرتوهای ساطع شده از این برهم کنش می توانند جهت بررسی ها مورد استفاده قرار گیرند. به منظور تعیین شکل و اندازه از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد و این پارامترها در نانوذراتی با pH = ۴ تعیین گردید (۲۱).

۶-۴ طیف سنجی (Fourier transform infrared spectroscopy یا FTIR): دستگاه FTIR روشی برای شناسایی ترکیبات آلی و گروه های عاملی آنها می باشد که می توان پیوندهای کووالانسی لیگاندهای مختلف را شناسایی کرد. طیف FTIR در حالت عبور با استفاده از دستگاه FTIR اسپکتروفتومتر (ساخت انگلستان Bruker) در گستره $4000-400\text{ cm}^{-1}$ و در تفکیک پذیری ۴ سانتی متری تعیین گردید (۲۰).

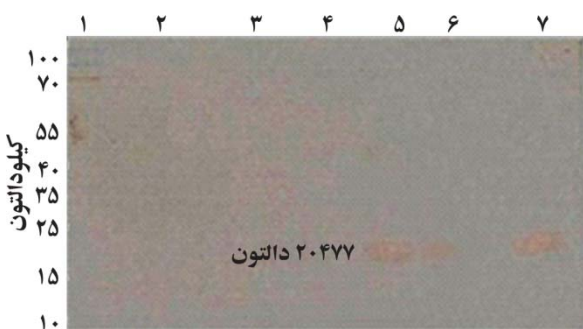
یافته ها

الف و بیان پروتئین NAP-A در *E. coli* BL ۲۱

جهت ارزیابی پروتئین ساخته شده پس از القاء، ابتدا

گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتئین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفوریتیک نتایج تخلیص پروتئین نو ترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این پروتئین بود (تصویر شماره ۱). نتایج حاصل از Western blot بیان این پروتئین را به طور اختصاصی تأیید کرد و نشان داد از درجه خلوص بالایی برخوردار است (تصویر شماره ۲).

بر اساس اندازه گیری با روش Bradford [به همراه استاندارد BSA (Bovine serum albumin)] و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیتر کشت باکتری در حدود ۴۰۰ میلی گرم تعیین شد.



تصویر شماره ۲: وسترن بلات با آنتی بادی ضد ساختار پلی هیستیدین متصل شده به پروتئین نو ترکیب HP-NAP (*Helicobacter pylori* neutrophil activating protein)

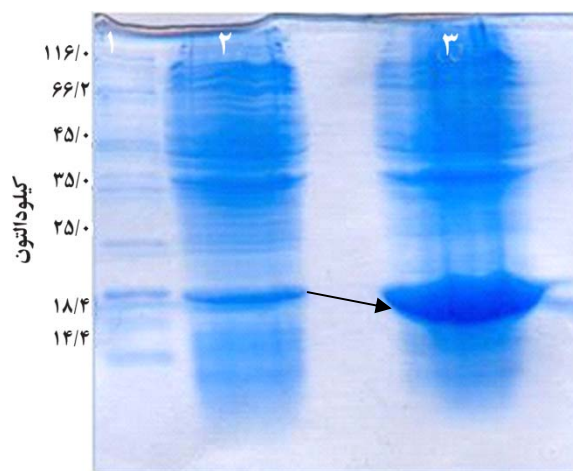
اندازه نانوذرات

اندازه، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان توسط دستگاه DLS (Malvern) تعیین شد. تصویر شماره ۳ اندازه نانوذرات کیتوزان در pH = ۶ را نشان می دهد که اندازه نانوذرات کیتوزان به طور میانگین با سه تکرار ۲۱۰ نانومتری تعیین شد. داده های دستگاه DLS در مورد این نمونه نشان داد که بیش از ۹۵ درصد نمونه های مورد آزمایش در محدوده ۲۱۰ نانومتر و پیک بزرگ تر قرار دارند و حدود ۵ درصد در محدوده ۷۰-۲۰ نانومتر و به طور میانگین ۴۵ نانومتر بودند.

بار الکتریکی

بار الکتریکی، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان توسط دستگاه Zetasizer (Malvern) تعیین شد. تصویر

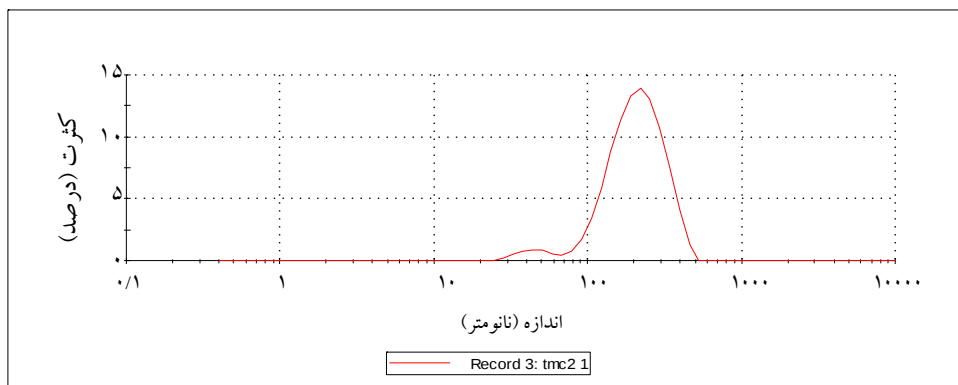
سلول های *E. coli* لیز شد و سپس پروتئین محلول آن ها بررسی گردید. پروتئین محلول سلول بر روی ژل پلی اکریل آمید و در حضور دترژنت SDS از یکدیگر تفکیک شد و پس از رنگ آمیزی با کوماسی G-۲۵۰ کلونیدی، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که بخشی از پروتئین NAP-A تولید شده بود، پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون به دست آمد (تصویر شماره ۱).



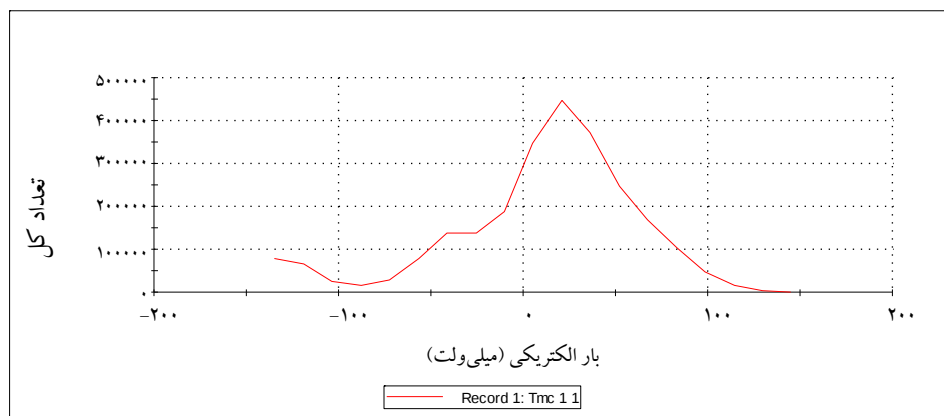
تصویر شماره ۱: ارزیابی بیان پروتئین NAP-A (Neutrophil activating protein) در ژل SDS-page (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) چاهک ۱: مارکر با وزن پایین، چاهک ۲: NAP-A القا نشده، چاهک ۳: NAP-A القا شده با IPTG (Isopropyl-Beta-Thio Galactopyranoside) ۰/۱ میلی مولار

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب HP-NAP

نتایج SDS-page، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۲۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان داد که با وزن مولکولی حدود ۲۰۴۷۷ دالتون پیش بینی شده همخوانی دارد (تصویر شماره ۱). بیان این پروتئین از ساعت سوم آغاز شد و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود رسید. بین ساعت پنجم، هفتم و القای شبانه تفاوت قابل ملاحظه ای وجود نداشت. با بررسی های انجام شده مشخص گردید که بیشترین مقدار پروتئین نو ترکیب به صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوژن) در فاز رسوبی قرار دارد. رسوبی بودن این پروتئین با نتایج به دست آمده از تخلیص فاز مایع حاصل از لیزات سلول با روش Native و استفاده از بافرهای فاقد اوره نیز تأیید



تصویر شماره ۳: اندازه نانوذرات کیتوزان با دستگاه DLS (Dynamic light scattering) بر اساس نانومتر



تصویر شماره ۴: بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان با دستگاه Zetasizer بر اساس میلی‌ولت

شکل ظاهری نانوذرات شد. پرتوهای ساطع شده از این بر هم کنش جهت بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تصویر شماره ۶ تصویر نانوذرات تری‌متیل کیتوزان حامل پروتئین با میکروسکوپ SEM را نشان می‌دهد.

شماره ۴ بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان در $\text{pH} = 6$ را نشان می‌دهد که بار الکتریکی نانوذرات کیتوزان به طور میانگین با سه تکرار $+11$ میلی‌ولت تعیین شد. داده‌های دستگاه DLS نشان داد که نمودار تک پیک می‌باشد و همسانی وجود دارد.



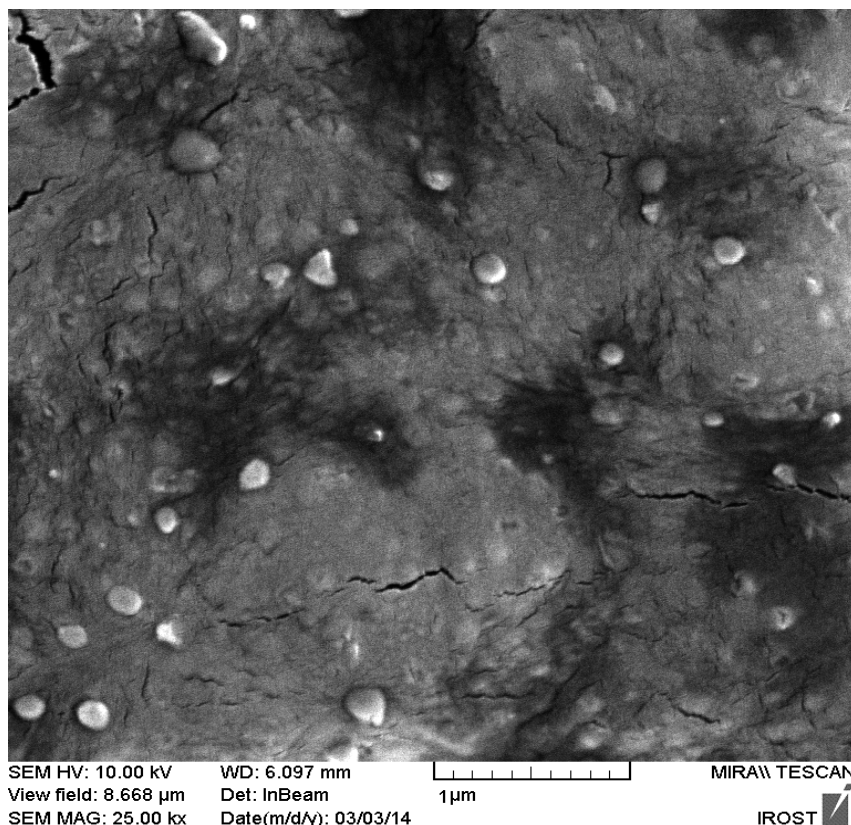
تصویر شماره ۵: نانوذرات کیتوزان با میکروسکوپ (Transmission electron microscope) TEM

میکروسکوپ الکترونی TEM

شکل، اندازه، پراکندگی و یکنواختی نانوذرات کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی و دستگاه Zetasizer تعیین شد. تصویر شماره ۵ تصویر TEM مربوط به این نانوذرات در $\text{pH} = 4$ را نشان می‌دهد. اندازه بیشتر ذرات در محدوده $150-200$ نانومتر به دست آمد. نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی TEM نتایج حاصل از دستگاه DLS را تأیید می‌کند.

میکروسکوپ الکترونی SEM

بر هم کنش پرتوی الکترونی با ماده سبب نمایان شدن



تصویر شماره ۶: نانوذرات تری‌متیل کیتوزان حامل پروتئین با میکروسکوپ SEM (Scanning electron microscope)

طیف‌سنجی (FTIR)

از دستگاه FTIR جهت شناسایی گروه‌های عاملی اتصال یافته پروتئین نو ترکیب به کیتوزان استفاده شد که این اتصال شناسایی گردید. منحنی طیف FTIR در تصویر شماره ۷ نمایش داده شده است.

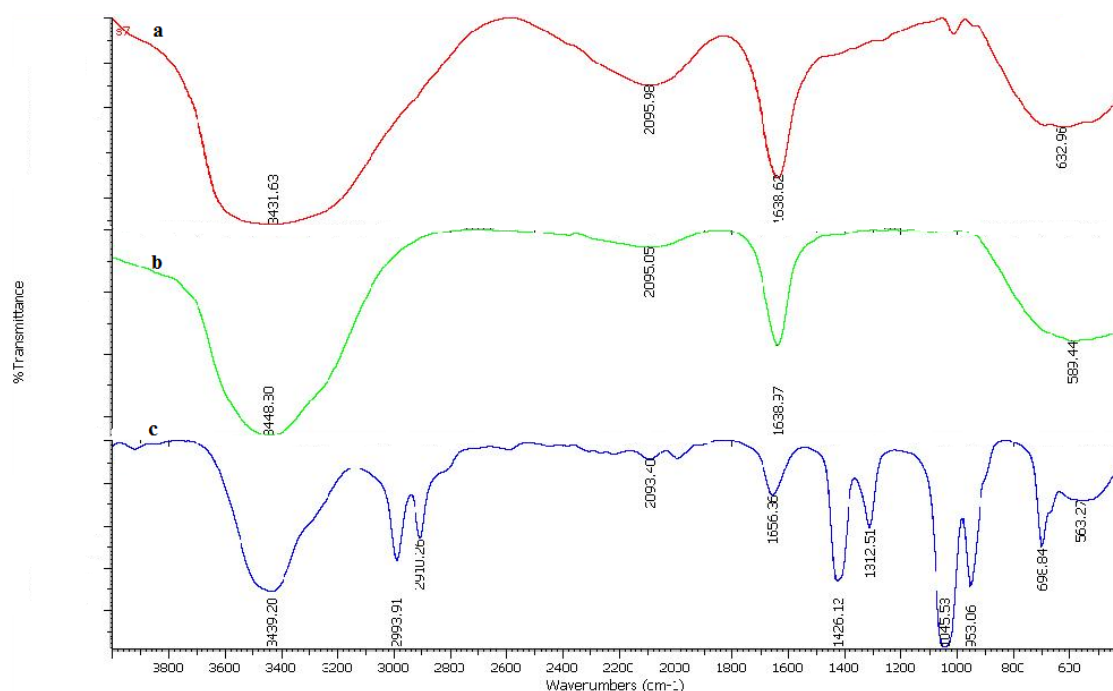
طیف FTIR در حالت عبور با استفاده از دستگاه FTIR اسپکتروفتومتر (ساخت انگلستان Bruker) در گستره $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و در تفکیک پذیری ۴ سانتی‌متری تعیین گردید. نتایج طیف‌سنجی نشان داد که طیف اتصالی پروتئین نو ترکیب به تنهایی و کیتوزان به تنهایی نسبت به زمانی که پروتئین نو ترکیب به کیتوزان اتصال می‌یابد، متفاوت است.

طیف FTIR منحنی c مربوط به کیتوزان را نشان می‌دهد که باند پهن در محدوده تفکیک‌پذیری ۳۴۳۹ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی از گروه‌های NH و OH ظاهر می‌شود. در محدوده تفکیک‌پذیری ۲۹۹۳ بر سانتی‌متر ارتعاشات کشش گروه‌های CH می‌باشد. محدوده

تفکیک‌پذیری ۱۶۵۶ بر سانتی‌متر به کشش گروه‌های NH اختصاص داده می‌شود و محدوده تفکیک‌پذیری ۱۴۲۴ بر سانتی‌متر به CO کشش اولیه گروه الکلی در کیتوزان تعلق دارد. طیف FTIR منحنی b مربوط به پروتئین را نشان می‌دهد. طیف FTIR منحنی a مربوط به کیتوزان حامل پروتئین را نشان می‌دهد که باند پهن در محدوده تفکیک‌پذیری ۳۴۳۱ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی از گروه‌های NH و OH ظاهر می‌شود. در محدوده تفکیک‌پذیری ۱۶۳۸ بر سانتی‌متر به کشش گروه‌های NH اختصاص داده می‌شود.

بحث

کیتوزان به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی بی‌نظیرش، انگیزه‌های بسیاری را برای توسعه سالم و مؤثر سیستم دارورسانی برانگیخته است. حقیقی و همکاران از روش بیوانفورماتیک برای بهینه‌سازی کلون ژن موردنظر در اشریشیاکلی استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن کلون



تصویر شماره ۷: منحنی طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy)

بار مثبت مولکول‌های تری‌متیل کیتوزان قادر به اتصال با بار منفی موجود در پروتئین‌ها می‌باشد که این قسمت با مولکول کیتوزان مزدوج می‌شود و ترکیب دو گانه دوست ایجاد شده ممکن است منجر به تشکیل نانوذرات شود و قادر به کپسوله کردن دارو و تحویل آن به ناحیه هدف باشد.

اتصال شیمیایی پروتئین‌های نوترکیب به کیتوزان از طریق گروه‌های عاملی می‌تواند کمپلکس سودمندی تولید کند. نتایج حاصل از دستگاه FTIR تأیید کننده اتصال ذرات کیتوزان با پروتئین به واسطه گروه‌های عاملی آمینی و هیدروکسیلی آن می‌باشد. اندازه نانوذرات با دو دستگاه DLS و میکروسکوپ الکترونی بررسی و تأیید شد و نتایج مؤید آن بود که قطر ذرات در محدوده نانومتری می‌باشد و حدود 10 ± 200 نانومتر بود.

کیتوزان در طول زمان در سیستم‌های بیولوژیک تخریب می‌شود. میزان تخریب‌پذیری کیتوزان با کنترل مقدار استیل‌زدایی آن قابل کنترل است. این ویژگی باعث می‌شود داروها به طور کنترل شده در بدن آزاد شوند و بنابراین اثرگذاری آن را افزایش می‌دهد. گروه‌های آزاد آمین که به کیتوزان بار مثبت می‌دهد برای انتقال دارو ضروری است. این بارهای مثبت باعث برهم کنش با بارهای منفی داروها، پلیمرها و

با پرایمرهای مهندسی شده و در نهایت پروتئین تولید شده حدود ۲۰ کیلو دالتون بود (۲۲). در این تحقیق پروتئین فعال کننده نوتروفیلی نوترکیب از هلیکوباکتر پیلوری ساخته شد. نتایج SDS-page آن بیان این پروتئین را تأیید کرد. نتایج Western blot حضور پروتئین نوترکیب را به لحاظ واکنش با آنتی‌بادی اختصاصی اثبات کرد. این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین نوترکیب باکتریایی به درستی تولید شده است و اندازه آن حدود ۲۰۴۷۷ دالتون می‌باشد. Vila و همکاران از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل پروتئین برای واکنش کزاز استفاده نمودند (۲۳).

استفاده از پلیمرهایی مانند کیتوزان برای انتقال داروها به محل‌های مناسب در سیستم‌های بیولوژیک مورد توجه زیادی است. با توجه به کاربردهای کیتوزان، Zhang و همکاران از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل دارو استفاده کردند (۲۴). در این تحقیق از نانوذرات تری‌متیل کیتوزان به عنوان حامل پروتئین استفاده گردید. تری‌متیله شدن کیتوزان سبب انحلال بیشتر کیتوزان می‌شود. نانوذرات کیتوزان به لحاظ داشتن گروه‌های هیدروکسیل و آمین نوع اول واقع شده بر بدنه، اجازه اصلاح شیمیایی برای کنترل خواص فیزیکی را می‌دهد.

صورث می‌گیرد. این سلول‌ها، مولکول‌های MHC-I و MHC-II (Major histocompatibility complex)، مولکول‌های کمک محرک را به میزان زیادی بیان می‌کنند و مسیر پاسخ ایمنی به سمت Th1 به وسیله سیتوکین‌های تولید شده توسط آن‌ها تعیین می‌گردد. در حقیقت HP-NAP به عنوان ابزار جدیدی برای جهت دادن سیستم ایمنی به خصوص سلول‌های دندریتیک به سمت پاسخ Th1 شناخته شده است و سلول‌های مذکور را به خوبی تحریک می‌کند. با توجه به خواص موجود، این کمپلکس می‌تواند ابزار مناسب و مؤثری جهت کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان سرطان در آینده باشد (۲۶، ۲۷). مطالعه حاضر گشایشی برای ایده مذکور جهت درمان سرطان با استفاده از خاصیت ایمنومودولاتوری می‌باشد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از رساله دکتری رشته باکتری‌شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

References

1. Hashemzadeh S, Aligholipour Maleki R, Golzari S. The incidence of breast cancer in Northwest Iran (2003 -2008). J Cardiovasc Thorac Res 2012; 4(1): 5-9.
2. Duffy MJ. CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. Ann Clin Biochem 1999; 36(Pt 5): 579-86.
3. Man YG, Stojadinovic A, Mason J, Avital I, Bilchik A, Bruecher B, et al. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. J Cancer 2013; 4(1): 84-95.
4. Kahlenborn C, Modugno F, Potter DM, Severs WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. Mayo Clin Proc 2006; 81(10): 1290-302.
5. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 2012; 156(9): 635-48.
6. Russo J, Rivera R, Russo IH. Influence of age and parity on the development of the human breast. Breast Cancer Res Treat 1992; 23(3): 211-8.
7. Townsend CM. Treatment of breast cancer. Clin Symp 1997; 49(1): 1-32.
8. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. Lancet Oncol 2010; 11(2): 136-46.
9. Stockler M, Wilcken NR, Gherzi D, Simes RJ. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev 2000; 26(3): 151-68.
10. Carlsohn E, Nyström J, Svennerholm A, Bölin I. HpaA Is Essential for Helicobacter pylori Colonization in Mice. Infect Immun 2006; 74(2): 920-6.
11. 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.
12. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. J Pharm Pharmacol 2009; 61(2): 131-42.
13. Saremi S, Atyabi F, Akhlaghi SP, Ostad SN, Hashemzadeh S, Aligholipour Maleki R, Golzari S. The incidence of breast cancer in Northwest Iran (2003 -2008). J Cardiovasc Thorac Res 2012; 4(1): 5-9.

- 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.
14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Sieval AB, Thanou M, Kotze AF, Verhoef JC, Brussee J, Junginger HE. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers* 1998; 36(2-3): 157-65.
 20. 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.
 21. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47(1): 39-54.
 22. 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).
 23. Vila A, Sanchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Vila Jato JL, et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57(1): 123-31.
 24. Zhang H, Wu S, Tao Y, Zang L, Su Z. Preparation and Characterization of Water-Soluble Chitosan Nanoparticles as Protein Delivery System. *Journal of Nanomaterials* 2009; 2010(1): 5.
 25. Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Del GG, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2003; 33(4): 840-9.
 26. Satin B, Del GG, Della B, V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000; 191(9): 1467-76.
 27. Wang G, Hong Y, Olczak A, Maier SE, Maier RJ. Dual Roles of *Helicobacter pylori* NapA in inducing and combating oxidative stress. *Infect Immun* 2006; 74(12): 6839-46.