

Chuẩn bị và đánh giá khả năng giải phóng hGM-CSF của hạt nano chitosan

- Đặng Tất Trường
- Nguyễn Công Thuận
- Trần Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

hGM-CSF là nhân tố kích thích tạo đại thực bào-bạch cầu hạt ở người, được tiết ra từ nhiều loại tế bào. hGM-CSF có nhiều ưu điểm phù hợp cho việc làm tá dược vaccine như có khả năng kích thích sự tồn tại, biệt hóa, tăng cường chức năng của tế bào trình diện kháng nguyên; là tác nhân hướng hóa, tập trung bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính đến vị trí xâm nhiễm; kích thích biểu hiện một số cytokine như IL-1, IL-6, TNF cần cho sự nhân dòng và biệt hóa tế bào lympho B và T. Tuy nhiên, GM-CSF có một số nhược điểm như dễ dàng bị phân hủy, gây độc ở nồng độ cao, muốn có tác dụng phải duy trì sự có mặt trong cơ thể ở nồng độ thấp. Bên cạnh đó, hệ thống dẫn truyền thuốc sử dụng hạt chitosan cho thấy có nhiều ưu điểm giúp khắc phục những nhược điểm trên của GM-CSF. Trong nghiên cứu này, hạt chitosan được tạo ra và được đánh giá khả năng hấp phụ và giải phóng protein hGM-CSF. Đầu

tiên, hoạt tính của protein hGM-CSF được đánh giá bằng thí nghiệm tăng sinh trên dòng tế bào TF-1. Tiếp theo, hạt chitosan được tổng hợp bằng phương pháp gel ion và được đánh giá độc tính. Sau khi cho hấp phụ protein lên hạt, khả năng dung ly và khả năng bảo vệ protein từ hạt chitosan trong điều kiện in vitro cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy protein hGM-CSF có hoạt tính với giá trị $ED_{50}=106$ pg/mL. Hạt chitosan tổng hợp được có dạng hình cầu với kích thước trung bình 24,5 nm và không có độc tính. Kết quả SDS-PAGE và phương pháp đo Bradford, cho thấy đã hấp phụ protein hGM-CSF lên hạt với hiệu suất trên 99 % và hạt chitosan có khả năng giải phóng và bảo vệ protein hGM-CSF khỏi sự phân hủy của trypsin. Như vậy, hạt chitosan tổng hợp được có khả năng gắn và giải phóng protein hGM-CSF có hoạt tính. Kết quả này là cơ sở để phát triển nghiên cứu tiếp theo ở điều kiện in vivo.

Từ khóa: hGM-CSF, hạt chitosan, thử nghiệm hoạt tính.

MỞ ĐẦU

Vaccine là một phương pháp hữu hiệu bảo vệ cơ thể trước các tác nhân gây bệnh. Cho đến nay đã có nhiều loại vaccine ra đời trong đó vaccine tiểu phần đang là đích nhắm tới do có độ an toàn cao cho người sử dụng so với các vaccine truyền thống như vaccine bất hoạt hay nhược độc. Tuy

niên hoạt động của vaccine tiểu phần thường kém do thành phần kháng nguyên thường được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp nên kháng nguyên tạo ra thiếu các thành phần gây đáp ứng miễn dịch bẩm sinh từ vi khuẩn và dễ dàng bị thanh thải bởi cơ thể trước khi kích

thích được đáp ứng miễn dịch; do đó, nó cần phải sử dụng chung với chất dẫn truyền và tá dược nhằm tăng hiệu quả của vaccine tiểu phần. Tá dược có vai trò quan trọng trong vaccine, nó giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch, giảm lượng kháng nguyên cần sử dụng hoặc số lần cần tiêm để tạo được sức đề kháng, giúp cải thiện hiệu quả vaccine ở trẻ sơ sinh, người cao tuổi hoặc người suy giảm miễn dịch, ngoài ra tá dược cũng có thể được sử dụng như hệ thống dẫn truyền kháng nguyên đến niêm mạc [1, 2].

Hiện nay, ứng dụng cytokine tái tổ hợp như chất bổ trợ vaccine đang thu hút nhiều sự chú ý, chúng có tiềm năng thay thế những tá dược hiện có do cytokine là các protein tự nhiên có vai trò quan trọng trong quá trình kiểm soát hệ thống miễn dịch và được sản xuất để đáp ứng với xâm nhiễm. Chúng cung cấp tín hiệu điều khiển các phản ứng miễn dịch qua một trong hai con đường: dịch thể hoặc qua trung gian tế bào [3]. Trong đó GM-CSF là một cytokine cho thấy có nhiều tiềm năng trong ứng dụng này. GM-CSF là nhân tố kích thích tạo nhóm đại thực bào, bạch cầu hạt, được tiết ra từ nhiều loại tế bào. GM-CSF có tác dụng tăng cường kích thích sự tồn tại, biệt hóa và chức năng của các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cells – APCs). Ngoài ra, GM-CSF còn hoạt hóa và là tác nhân hướng hóa, tập trung bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính đến vị trí xâm nhiễm, gây ra đáp ứng viêm, đồng thời kích thích biểu hiện một số cytokine khác như IL-1, IL-6, TNF cần cho sự nhân đôi và biệt hóa của tế bào lympho B và T [4]. Việc sử dụng GM-CSF như một tá dược trong vaccine protein và peptide đã cho thấy khả năng tạo đáp ứng miễn dịch tương đương so với tá dược vaccine truyền thống khi thử nghiệm trên động vật [4]. Một số nghiên cứu sơ bộ khác sử

dụng GM-CSF tái tổ hợp kết hợp với vaccine viêm gan B (hepatitis B) hoặc vaccine cúm tứ giá (tetraivalent Influenza vaccines) cho thấy tiềm năng ứng dụng của GM-CSF làm tá dược cho vaccine chống virus [4]. Tuy nhiên do tính kém bền trong cơ thể, gây độc ở nồng độ cao, và dễ có tác dụng phải duy trì sự tồn tại thường xuyên trong cơ thể, nên cần thiết phải có một hệ thống chất mang nhằm giúp khắc phục những hạn chế này khi sử dụng GM-CSF làm tá dược.

Hệ thống dẫn truyền thuốc đang ngày được phát triển như một giải pháp để hạn chế sự phân hủy và hao hụt thuốc, ngăn chặn các tác dụng phụ có hại, tăng hiệu lực và tập trung thuốc tại vị trí cần thiết [5]. Trong đó, sử dụng chất mang thuốc là một trong những phương pháp tiếp cận giúp tăng hiệu quả điều trị giúp tăng độ bền, định hướng đến vị trí mục tiêu và kiểm soát sự giải phóng thuốc, bao gồm cả giải phóng liên tục và giải phóng đáp ứng [6]. Hiện nay, hệ thống dẫn truyền thuốc bằng hạt nano chitosan đã và đang thu hút được nhiều quan tâm nghiên cứu. Ngoài tính phân hủy sinh học và tương thích sinh học cao, chitosan còn là một chất bổ trợ miễn dịch, giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch và được FDA cho phép sử dụng trên người [7-9]. Thêm vào đó kích thước hạt nhỏ (từ 10 đến 100 nm) nên chúng có diện tích và điện tích bề mặt lớn, giúp thuốc dễ dàng được hấp phụ lên hạt. Kích thước nhỏ còn giúp thuốc dễ dàng đi qua các khe hở giữa tế bào giúp thâm sâu vào cơ thể [10, 11].

Mục đích của nghiên cứu này là phối trộn protein hGM-CSF với hạt chitosan để góp phần khắc phục những hạn chế của protein hGM-CSF tái tổ hợp khi sử dụng trong cơ thể người như một hướng nghiên cứu mới cho phát triển một loại tá dược vaccine mới trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất – Vật liệu

Chitosan (DD = 85 %) (Sigma), sodium tripolyphosphate (TPP) (Merck), acetic acid (Merck)

Môi trường nuôi cấy tế bào RPMI-1640 (Gibco), Fetal Bovin Serum (Sigma), Antibiotic 100X (Sigma), Cell counting kit 8 (CCK8);

Dòng tế bào TF-1 (tồn tại và tăng sinh phụ thuộc vào GM-CSF/IL-3);

Protein hGM-CSF được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Phương pháp

Đánh giá hoạt tính sinh học của protein hGM-CSF

Hoạt tính sinh học của hGM-CSF được đánh giá thông qua thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào TF-1 và được kiểm tra bằng phản ứng hiện màu với muối tetrazolium (CCK-8). Tế bào TF-1 được nuôi trong môi trường RPMI với 10 % fetal bovin serum (FBS), 2×10^3 (pg/mL) hGM-CSF và kháng sinh. Tế bào được rửa với PBS và bổ sung vào đĩa 96 giếng (2×10^4 tế bào/giếng) trong 100 uL RPMI-10 có chứa hGM-CSF ở các nồng độ khác nhau $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^0$, $2 \cdot 10^{-1}$ pg/mL, ủ ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 72 giờ. Sau đó bổ sung thuốc thử CCK8 tỉ lệ 1/10 (v/v), ủ trong 3 giờ và đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy Multiskan Ascent.

Tổng hợp hạt nano chitosan bằng phương pháp gel ion

Hạt chitosan được tổng hợp bằng phương pháp gel ion với tác nhân tạo nối ngang là TPP. Chitosan 0,25 % (w/v) được hoà tan trong acetic acid 1 % và điều chỉnh về pH 5 bằng dung dịch NaOH 5N. TPP 0,25 % (w/v) được nhỏ từ từ vào

dung dịch chitosan với các tỉ lệ khối lượng khác nhau 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, trong điều kiện khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ 30 phút. Quan sát sự tách lớp của hạt tạo thành trong vòng 72 giờ và đánh giá kích cỡ hạt nano chitosan thông qua chụp ảnh FE-SEM.

Đánh giá độc tính của hạt nano chitosan

Hạt nano chitosan được đánh giá độc tính thông qua thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào TF-1. Tế bào TF-1 được rửa với PBS và bổ sung vào đĩa 96 giếng (2×10^4 tế bào/giếng) trong 100 uL RPMI-10 có chứa hGM-CSF 2 ng/mL và các nồng độ chitosan khác nhau $40 \cdot 10^4$, $40 \cdot 10^3$, $40 \cdot 10^2$, $40 \cdot 10^1$, $40 \cdot 10^0$, $40 \cdot 10^{-1}$ pg/mL, ủ ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 72 giờ. Sau đó bổ sung CCK8 tỉ lệ 1/10 (v/v), ủ trong 3 giờ và đo OD bước sóng 450 nm bằng máy Multiskan Ascent.

Khảo sát khả năng hấp thụ của protein trên hạt chitosan

Dung dịch protein hGM-CSF (100 ug/mL) cho hấp phụ với dung dịch hạt nano chitosan (10 mg/mL) ở các tỉ lệ khối lượng CS:hGM-CSF khác nhau (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 20:1), ủ 10 °C trong vòng 1 giờ. Sau đó tiến hành ly tâm thu dịch nổi để xác định lượng protein hGM-CSF còn lại bằng phương pháp Bradford và phân tích SDS-PAGE. Hiệu suất hấp phụ (loading efficiency-LE) của hạt nano chitosan được tính toán theo công thức sau.

$$LE(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: Tổng lượng protein

B: Lượng protein trong dịch nổi

Đánh giá khả năng giải phóng của protein được hấp phụ trên hạt chitosan

Hạt chitosan gắn protein hGM-CSF được huyền phù trong dung dịch PBS pH 7 ủ 37 °C. Sau đó ly tâm thu dịch nổi ở các mốc thời gian 0, 2, 4,

6, 24, 48 giờ. Nồng độ protein hGM-CSF giải phóng được đánh giá bằng thí nghiệm tăng sinh trên dòng tế bào TF-1.

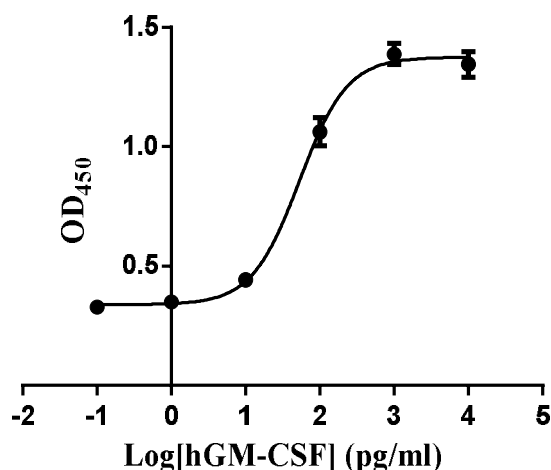
Đánh giá tính bền của protein hGM-CSF sau khi hấp phụ lên hạt chitosan

Để đánh giá tính bền và khả năng bảo vệ protein hGM-CSF sau khi hấp phụ lên hạt chitosan, chúng tôi sử dụng protease là trypsin để đánh giá khả năng bảo vệ hạt chitosan. Protein hGM-CSF, hạt chitosan hấp phụ protein hGM-CSF (CS/hGM-CSF) được trộn với trypsin theo tỉ lệ khối lượng 1:2,5 và ủ ở 37 °C. Sau mỗi 15 phút, lượng hGM-CSF chưa bị phân cắt được đánh giá bằng SDS-PAGE.

KẾT QUẢ

Đánh giá hoạt tính sinh học của protein hGM-CSF

Hoạt tính protein hGM-CSF được đánh giá thông qua sự tăng trưởng tế bào TF-1 và kiểm tra bằng phản ứng hiện màu với muối tetrazolium (CCK-8). Kết quả cho thấy có sự tương quan giữa nồng độ hGM-CSF và sự tăng sinh dòng tế bào TF-1. Khi gia tăng nồng độ hGM-CSF trong môi trường nuôi cấy thì mật độ tế bào TF-1 có sự gia tăng tương ứng, và ở nồng độ hGM-CSF bằng 2 ng/mL thì sự tăng sinh tế bào đạt mức bão hòa và giá trị ED_{50} (Effective dose 50 %) của mẫu hGM-CSF thử nghiệm là 106 pg/mL. Như vậy, hGM-CSF do phòng thí nghiệm cung cấp có hoạt tính sinh học trên dòng tế bào TF-1.

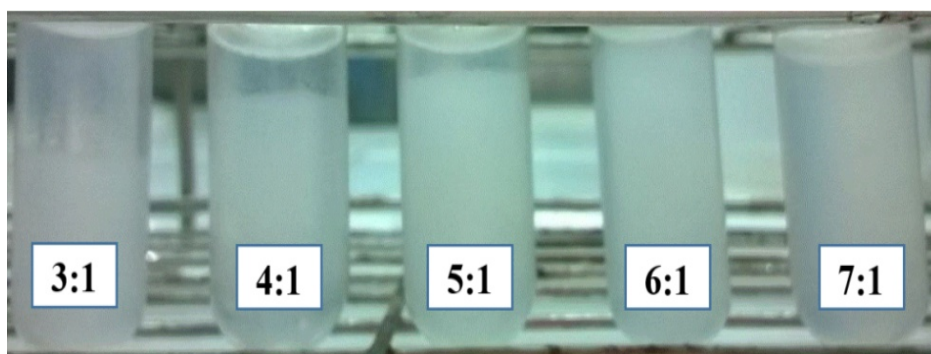


Hình 1. Hoạt tính hGM-CSF

Tổng hợp hạt nano chitosan bằng phương pháp gel ion

Hạt chitosan được tổng hợp bằng phương pháp gel ion sử dụng tác nhân tạo nối ngang TPP. Trong phương pháp này, kích thước hạt chitosan

bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong đó tỉ lệ chitosan:TPP (CS:TPP) và pH lúc tạo nối ngang là hai yếu tố quan trọng có ảnh hưởng nhiều đến kích thước hạt.



Hình 2. Hạt chitosan điều chế từ các tỷ lệ CS:TPP 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1.

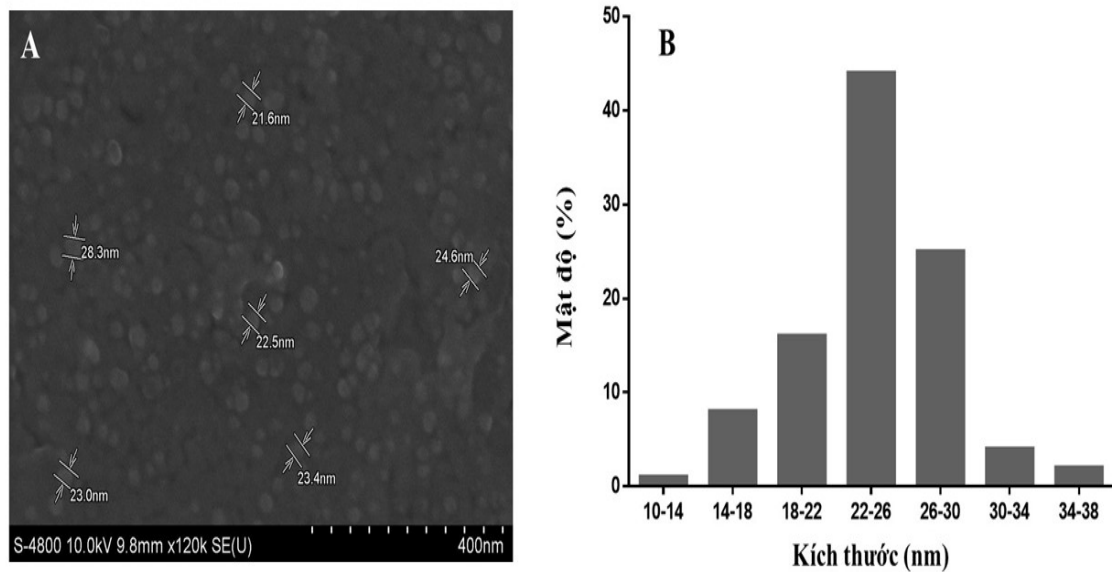
Chitosan bị kết tủa trong dung dịch có pH >6,5. Theo nghiên cứu của Fan năm 2012, giá trị pH từ 4,5-5,2 cho hạt nano chitosan phân tán đơn, ở pH >5,2 sẽ hình thành các hạt có kích thước lớn. Kết quả tương tự ở nghiên cứu của Quan Gan năm 2005, ở giá trị pH từ 4 đến 5 kích thước hạt không thay đổi nhiều, hạt có kích thước tăng cao khi ở pH 6. Từ đó, chúng tôi chọn pH 5 để thực hiện phản ứng tạo nối ngang giữa chitosan và TPP với tỉ lệ CS:TPP tăng dần từ 3:1 đến 7:1. Kết quả từ Hình 2. cho thấy ở các tỉ lệ CS:TPP từ 3:1 đến 6:1 xuất hiện sự tách lớp và khi giảm dần lượng TPP phản ứng (tỉ lệ CS:TPP tăng) thì sự tách lớp cũng giảm dần. Ở tỉ lệ CS:TPP 7:1 không xuất hiện sự tách lớp, dịch có màu trắng đục đồng nhất. Điều này có thể giải thích do khi tỷ lệ CS:TPP tăng (nghĩa là hàm lượng TPP giảm), TPP chỉ được sử dụng cho quá trình tạo nối ngang nội phân tử và liên phân tử với CS tạo thành những hạt chitosan đơn. Nhưng khi tỷ lệ CS:TPP giảm (nghĩa là lượng TPP tăng), sau khi thực hiện quá trình tạo nối ngang nội phân tử và liên phân tử với CS tạo thành

hạt chitosan đơn thì lượng TPP còn dư sẽ liên kết với những hạt nano chitosan đơn tạo thành những hạt có kích thước lớn hơn do đó tạo thành một hệ phân tán keo không bền và bị tách lớp.

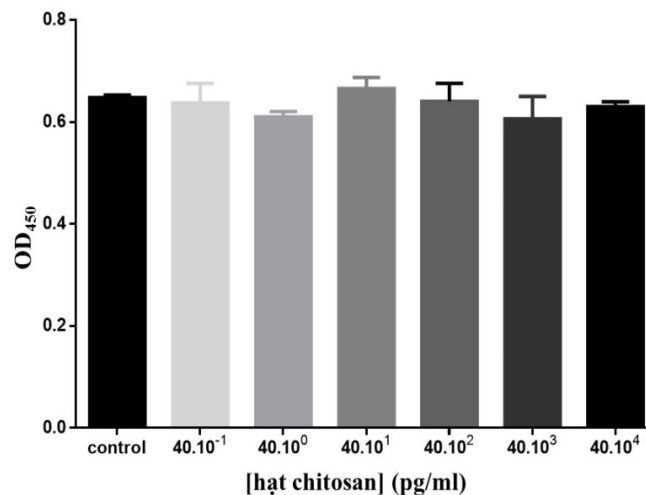
Kết quả hình chụp FE-SEM và đánh giá sự phân bố kích thước cho thấy hạt chitosan được tổng hợp ở tỉ lệ CS:TPP=7:1 có dạng hình cầu, không bị dính cụm, hơn 80 % số hạt chitosan tạo thành có kích thước trong khoảng từ 18 đến 30 nm, tập trung nhiều nhất ở 22-26 nm, kích thước hạt trung bình là 24,5 nm (Hình 3).

Đánh giá độc tính của hạt nano chitosan

Chitosan là một tác nhân tương hợp sinh học tốt với nhiều công bố đã chứng minh không gây độc trên tế bào. Trong thí nghiệm này một lần nữa chúng tôi tiến hành xác định độc tính hạt chitosan lên sự tăng trưởng tế bào TF-1. Tế bào TF-1 được nuôi trên môi trường RPMI bổ sung FBS 10 % có sự hiện diện của hGM-CSF (2 ng/ml) và các nồng độ hạt chitosan khác nhau.



Hình 3. Kích thước và sự phân bố kích thước hạt chitosan. Ảnh FE-SEM hạt chitosan (A) sự phân bố kích thước hạt chitosan ở tỷ lệ CS:TPP là 7:1 (B)



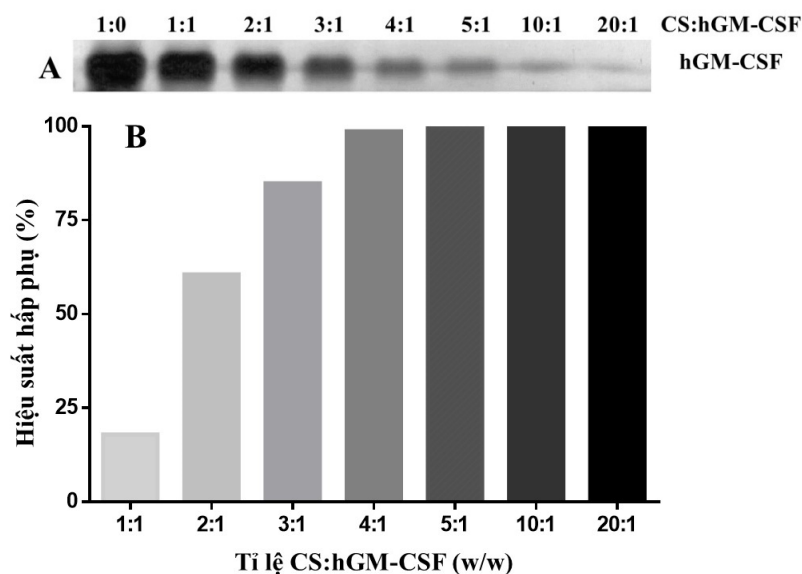
Hình 4. Độ tính *in vitro* của hạt chitosan trên dòng tế bào TF-1.

Kết quả từ Hình 4 cho thấy sự tăng sinh tế bào không có sự khác biệt đáng kể ở các nồng độ hạt chitosan khác nhau so với giếng không bổ sung. Như vậy, nồng độ hạt chitosan trong khoảng thử nghiệm này vẫn chưa gây độc tế bào.

Khảo sát khả năng hấp thụ của protein trên hạt chitosan

Protein hGM-CSF được hấp phụ lên hạt chitosan thông qua tương tác tĩnh điện. Quá trình

hấp phụ được thực hiện ở pH 6. Giá trị này cao hơn giá trị điểm đẳng điện của hGM-CSF ($pI = 4,95$), làm cho protein này tích điện âm, còn hạt chitosan mang tích điện dương nên protein hGM-CSF sẽ dễ dàng gắn lên hạt chitosan. Thí nghiệm được thực hiện ở các tỉ lệ khối lượng CS và hGM-CSF khác nhau. Lượng protein hGM-CSF dư sau quá trình hấp phụ được đánh giá bằng phương pháp Bradford.



Hình 5. Khả năng hấp phụ hGM-CSF của hạt nanochitosan. Kết quả SDS-PAGE hGM-CSF trong dịch nổi sau khi loại bỏ hạt (A) và hiệu suất hấp phụ hGM-CSF lên hạt chitosan xác định bằng phương pháp Bradford (B).

Trong quá trình hấp phụ, khi tăng lượng chitosan thì lượng protein thừa sẽ giảm do được hấp phụ hoàn toàn lên hạt. Ở các tỉ lệ hạt chitosan:protein 20:1, 10:1, lượng hạt chitosan nhiều cùng với độ nhớt của dung dịch tạo thành không đáng kể nên protein dễ dàng hấp phụ lên bề mặt hạt. Điều này giải thích tại sao kết quả phân tích trên gel SDS-PAGE Hình 5.A protein còn lại ở các tỉ lệ này rất ít và bằng phương pháp đo Bradford cho thấy hiệu suất hấp phụ ở các tỉ lệ này cao trên 99 % theo Hình 5.B. Trong khi đó, ở các tỉ lệ thấp hơn như 1:1, 2:1, 3:1, lượng hạt chitosan ít nên vẫn còn một lượng lớn protein chưa được hấp phụ lên hạt, do đó kết quả phân tích trên gel cho thấy protein còn lại nhiều và hiệu suất hấp phụ ở các tỉ lệ này không cao. Từ kết quả thí nghiệm này chúng tôi quyết định chọn tỉ lệ khối lượng giữa hạt chitosan với protein hGM-CSF là 20:1 để thực hiện các thí nghiệm về sau.

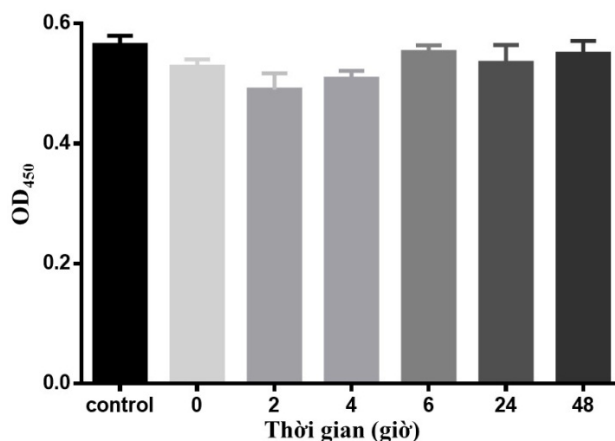
Đánh giá khả năng giải phóng của protein được hấp phụ trên hạt chitosan

Lượng protein giải phóng ra từ hạt chitosan hấp phụ hGM-CSF (CS/hGM-CSF) được đánh giá thông qua sự tăng sinh tế bào TF-1. Tế bào TF-1 được nuôi trên môi trường RPMI có FBS 10 % và bổ sung dịch nổi (pha loãng 20,000 lần) được thu sau quá trình giải phóng ở các mốc thời gian khảo sát.

Hoạt tính của hGM-CSF giải phóng trên tế bào TF-1 ở các thời điểm từ 0 giờ đến 48 giờ không có sự khác biệt đáng kể cho thấy hGM-CSF vẫn giữ được hoạt tính sinh học sau khi hấp phụ và giải phóng, tuy nhiên lượng hGM-CSF đã giải phóng gần như hoàn toàn ở thời điểm 0 giờ. Điều này có thể được giải thích do protein hGM-CSF khi hấp phụ lên hạt chitosan chỉ liên kết với bề mặt hạt mà không được đóng gói vào bên trong hạt chitosan, nên sự khuếch tán cùng với pH cao và môi trường có nhiều ion cũng làm cho cấu trúc hạt chitosan không ổn định gây ra sự giải phóng hoàn toàn. Các nghiên cứu trước đó cũng cho thấy thuốc hay protein khi liên kết trên bề mặt hạt cũng gây

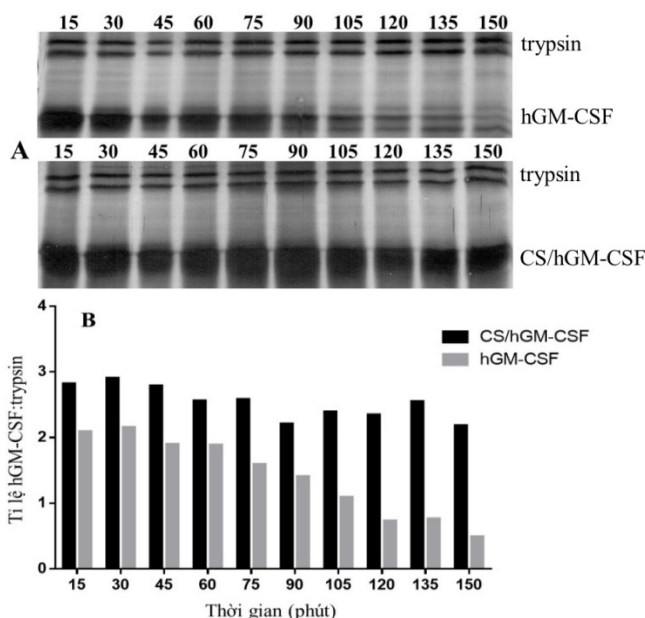
ra sự giải phóng nhanh chóng [9]. Nghiên cứu của Ping He năm 1999 thực hiện hấp phụ cimetidine lên bề mặt hạt chitosan đã cho thấy thuốc nhanh

chóng được giải phóng hoàn toàn chỉ trong vòng vài phút đầu của giai đoạn hòa tan [12].



Hình 6. Hoạt tính tăng sinh protein hGM-CSF giải phóng ra từ hạt CS/hGM-CSF

Đánh giá tính bền của protein sau khi hấp phụ lên hạt chitosan



Hình 7. Khả năng bảo vệ hGM-CSF trước tác động của trypsin của hạt chitosan. Kết quả SDS-PAGE hGM-CSF và CS/hGM-CSF sau phản ứng với trypsin ở các mốc thời gian (A) và lượng CS/hGM-CSF:hGM-CSF còn lại sau phản ứng trypsin (B).

Để đánh giá tính bền và khả năng bảo vệ protein hGM-CSF sau khi hấp phụ lên hạt chitosan, chúng tôi tiến hành thí nghiệm khảo sát sự tác động của enzyme phân hủy trypsin lên protein hGM-CSF ở các thời gian phản ứng khác nhau.

Kết quả từ Hình 7.A cho thấy protein hGM-CSF không hấp phụ lên hạt bị phân cắt bởi trypsin, lượng protein hGM-CSF giảm rõ rệt sau 90 phút ủ với trypsin và gần như bị phân cắt hoàn toàn sau 150 phút.

Ở Hình 7.B, tỉ lệ lượng hGM-CSF:trypsin của protein không hấp phụ lên hạt có sự giảm dần theo thời gian và thấp nhất ở 150 phút. Trong khi đó protein hGM-CSF hấp phụ lên hạt chitosan thì lượng protein sau khi ủ với trypsin không có sự thay đổi đáng kể (Hình 7.A). Tỉ lệ lượng hGM-CSF:trypsin ở trường hợp protein hấp phụ lên hạt thì tỉ lệ này giảm nhẹ theo thời gian (Hình 7.B). Kết quả so sánh lượng protein không được bảo vệ và được bảo vệ cho thấy được sự khác biệt đáng kể từ phút 90. Khả năng bảo vệ hGM-CSF của hạt chitosan được giải thích là do trypsin là protein có $pI = 10,5$ nên trong điều kiện pH 7,4 trypsin mang điện tích dương, do đó sự tương tác giữa trypsin và hạt CS/hGM-CSF (cũng mang điện tích dương) bị hạn chế do tương tác tĩnh điện.

KẾT LUẬN

Đã chứng minh được hoạt tính *in vitro* của hGM-CSF do phòng thí nghiệm cung cấp. Tổng

hợp thành công hạt chitosan bằng phương pháp gel ion sử dụng tác nhân tạo nối ngang TPP. Với nồng độ chitosan 0,25 % (w/v) pha loãng trong acetic acid 1 % (v/v), nồng độ TPP (0,25 %), tỷ lệ CS:TPP là 7:1, pH 5, dưới điều kiện khuấy 1 giờ 30 phút. Đã chứng minh được hạt chitosan không có độc tính trên tế bào TF-1. Nghiên cứu hấp phụ thành công protein hGM-CSF lên hạt chitosan với hiệu suất hấp phụ >99 % ở tỉ lệ khối lượng CS:hGM-CSF là 20:1. Đã chứng minh được hạt chitosan có khả năng giải phóng protein hGM-CSF sau khi hấp phụ và việc hấp phụ không làm cho protein mất hoạt tính. Đã chứng minh được hạt chitosan có khả năng bảo vệ protein sau khi được hấp phụ lên hạt khỏi sự tác động của enzyme phân hủy.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến GS. Toshio Kitamura, Viện Y khoa, Đại học Tokyo đã cung cấp dòng tế bào TF-1.

Preparation and characterization of nano chitosan for hGM-CSF release

- Dang Tat Truong
- Nguyen Cong Thuan
- Tran Hieu Van

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

hGM-CSF (human granulocyte-macrophage colony stimulating factor) is a cytokine secreted by many cell types. Its characters are suitable for vaccine adjuvant such as ability to stimulate survival, differentiation and enhancement the functions of antigen-presenting cells. This cytokine is also a chemoattractant for monocytes and neutrophils to the infected sites, stimulates the expression of several cytokines like IL-1, IL-6, TNF, which are

essential for B and T lymphocyte differentiation. However, hGM-CSF has some drawbacks for being an adjuvant candidate due to its easy degradation, toxicity at high concentration and low-dose requirement for therapeutic effect. Drugs delivery system using chitosan can overcome these disadvantages of hGM-CSF. In this present study, chitosan particles were prepared and evaluated the absorption and release of human hGM-CSF. Firstly, the activity of hGM-

CSF was evaluated by proliferation bioassay using TF-1 cell line. Afterward, chitosan particles were prepared by ionic gelation method and were examined for its toxicity on TF-1 cell line. After protein absorbance onto chitosan particles, the release capacity and in vitro protection of chitosan for hGM-CSF were assessed. The result showed that hGM-CSF had an ED_{50} value of 106 pg/mL. The synthesized chitosan particles had an average diameter of 24.5 nm and were

nontoxic. Based on the results of SDS-PAGE and Bradford, the adsorption efficiency of hGM-CSF onto chitosan particles reached 99 % and chitosan has the ability to release hGM-CSF and protects it from hydrolysis of trypsin. In conclusion, the synthesized chitosan beads absorbed and released hGM-CSF with its activity remained. This result provides the evidence for further in vivo researches.

Key words: hGM-CSF, chitosan nanoparticles, biological activity

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N. Petrovsky, J. C. Aguilar, Vaccine adjuvants: current state and future trends, *Immunology and Cell Biology*, 82, 5, 488-496 (2004).
- [2]. T. Jones, A. Stern, R. Lin, Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 2, S47-S53 (1994).
- [3]. M. Asif, K.A. Jenkins, L. S. Hilton, W.G. Kimpton, A.G. Bean, J.W. Lowenthal, Cytokines as adjuvants for avian vaccines, *Immunology and Cell Biology*, 82, 6, 638-643 (2004).
- [4]. J.A. Hamilton, Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity, *Nature Reviews Immunology*, 8, 7, 533-544 (2008).
- [5]. A. Kagalkar, S. Nitave, Review: Approach on novel drug delivery system, *World J Pharm. Pharm. Sci*, 2, 5, 3449-61 (2013).
- [6]. A.K. Sailaja, P. Amareshwar, P. Chakravarty, Chitosan nanoparticles as a drug delivery system, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 1, 3, 474-484 (2010).
- [7]. L. Ruo, Chitosan particles for the controlled release of proteins, Politecnico di Torino, (2012).
- [8]. M.N. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1, 1-27 (2000).
- [9]. S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 1, 5-28 (2004).
- [10]. M.O. Emeje, I.C. Obidike, E.I. Akpabio, S.I. Ofoefule, Nanotechnology in drug delivery, (2012).
- [11]. D.S. Kohane, Microparticles and nanoparticles for drug delivery, *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 2, 203-209 (2007).
- [12]. P. He, S.S. Davis, L. Illum, Chitosan microspheres prepared by spray drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 1, 53-65 (1999).