

Evaluation of the Immunogenicity Effect of Chitosan Nanoparticles Containing Botulinum Neurotoxin E binding Domain Recombinant Protein in Mice

MohamadJavad Bagheripour¹,
Firouz Ebrahimi²,
Abbas Hajizadeh³,
Shahram Nazarian²

¹ MSc in Medical Microbiology, Biological Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Biological Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

³ MSc in Cellular & Molecular Biology, Biological Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

(Received April 11, 2015 ; Accepted April 23, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Clostridium botulinum* neurotoxins are the most potent toxins that cause the life-threatening botulism syndrome in humans and animals. Researches have shown that the binding domain of the botulinum neurotoxin type E has a high immunogenicity effect that could be used as an efficient recombinant vaccine. The recombinant vaccines are not potent enough to stimulate the immune responses, therefore, the use of biocompatible and safe adjuvants is inevitable. In recent years, there have been many studies on the adjuvant effect of nanoparticles and their role as delivery vehicles of recombinant vaccines. This study investigated the vaccine delivery effect of chitosan nanoparticles for administration of a recombinant candidate vaccine against *Clostridium botulinum* type E.

Materials and methods: The expression and purification of botulinum neurotoxin type E was done in *E. coli* BL21 (DE3). Chitosan nanoparticles were synthesized by ionic gelation method. The protein containing nanoparticles were administered to mice subcutaneously. At the same time, a control group received the candidate vaccine in combination with the Freund adjuvant. Finally, the IgG titers of immunized mice were assayed by ELISA.

Results: The recombinant protein was successfully expressed and purified and was subsequently confirmed by western blot analysis. The loading capacity of the recombinant antigen into nanocapsules was calculated as 90%. ELISA results showed an increase in the IgG titer after each administration.

Conclusion: The present study shows that the chitosan nanoparticles containing a recombinant vaccine could efficiently stimulate the humoral immune responses.

Keywords: BoNT/E recombinant protein, chitosan nanoparticles, adjuvants, antibody assay

بررسی ایمنی‌زایی نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصال‌دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ E در موش

محمدجواد باقری پور^۱

فیروز ابراهیمی^۲

عباس حاجی زاده^۳

شهرام نظریان^۲

چکیده

سابقه و هدف: نورو توکسین‌های باکتری کلستری‌دیوم بوتولینوم از قوی‌ترین سموم شناخته شده می‌باشند که سبب بروز سندروم خطرناک بوتولیسم در انسان و حیوان می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که زیر واحد اتصال‌ی این سم دارای خاصیت ایمنی‌زایی بوده و میتواند در تهیه واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. از آن‌جا که واکسن‌های نوترکیب به تنهایی قادر به برانگیختن موثر پاسخ‌های ایمنی نیستند، استفاده از ادجوانت‌های زیست‌سازگار و ایمن از اهمیت زیادی برخوردار است. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی جهت استفاده از نانوذرات به عنوان ادجوانت و نیز بستری جهت رسانش واکسن صورت گرفته است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر نانوذرات کیتوسان بر روی رسانش موثر یک کاندید واکسن نوترکیب علیه نورو توکسین بوتولینوم تیپ E بود.

مواد و روش‌ها: بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب ناحیه اتصال‌ی BoNT/E در باکتری *E. coli BL21 (DE3)* صورت پذیرفت. نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین مذکور با روش ژلاسیون یونی ساخته شد و به صورت زیرجلدی به موش تزریق گردید. همزمان، آنتی‌ژن مورد نظر همراه با ادجوانت فروند نیز به گروه موشی جداگانه، تزریق شد و در نهایت میزان تیتراژ آنتی‌بادی IgG با روش الایزای غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: پروتئین نوترکیب ناحیه اتصال‌ی BoNT/E، بیان و تخلیص شد و سپس به وسیله وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات بیش از ۹۰ درصد بود. نتایج الایزا نشان داد که میزان تولید آنتی‌بادی IgG پس از هر بار تزریق افزایش یافته است.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد نانوذرات کیتوسان توانایی تحریک موثر سیستم ایمنی هومورال را دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین نوترکیب BoNT/E، نانوذرات کیتوسان، ادجوانت‌ها، سنجش آنتی‌بادی

مقدمه

عضلانی پیش رونده می‌شوند. فلج عضلانی در موارد حاد غالباً با مرگ همراه است. در میان هفت نورو توکسین بوتولینوم، انواع A، B و E عمده‌تاً برای انسان بیماری‌زا هستند. نتایج بررسی‌های همه‌گیرشناسی

نورو توکسین‌های باکتری کلستری‌دیوم بوتولینوم از طریق سطوح مخاطی نظیر روده، بافت ریه و یا محل زخم به گردش خون وارد شده و با ممانعت از آزاد شدن استیل کولین در پایانه‌های عصبی، سبب ایجاد فلج

E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir

مؤلف مسئول: فیروز ابراهیمی - تهران: دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳. کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۳

نشان می‌دهد که بیش‌ترین موارد ابتلاء به بوتولیسم در ایران مربوط به نوع E می‌باشد. در حال حاضر تنها واکسن موجود در برخی کشورهای پیشرفته، یک واکسن توکسوئیدی پنج‌گانه بر علیه تیپ‌های A تا E می‌باشد. نکته قابل‌تأمل این‌که در حال حاضر هیچ‌گونه واکسن موثری در سطح کشور در دسترس نمی‌باشد. مشکلات موجود در تهیه واکسن نظیر هزینه بالای تولید، لزوم استفاده از چندین سروتیپ مختلف، خطرات ناشی از کار با سویه‌های خطرناک فعال و در نهایت ورود پروتئین‌های ناخواسته به بدن در زمان ایمن‌سازی، موجب شده تا نسل جدید واکسن‌ها با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک مورد توجه قرار گیرد. در این روش‌ها برای تولید واکسن از نواحی خاصی از توکسین که توانایی تحریک سیستم ایمنی را داشته و فاقد اثرات سمی هستند، استفاده می‌شود (۸-۱).

با توجه به خاصیت ایمونوژنی زیر واحد اتصال‌دهنده توکسین، استفاده از پروتئین نوترکیب این زیر واحد به عنوان کاندید واکسن مورد توجه قرار دارد. استفاده از ادجوانت‌ها یا سیستم‌های مناسب تحویل آنتی‌ژن می‌تواند کارایی واکسن‌های زیر واحدی را بهبود بخشد. استفاده از ادجوانت‌ها در انسان به خاطر عوارض جانبی احتمالی دارای محدودیت فراوانی است. ادجوانت فروند در سیستم‌های آزمایشگاهی اثر ادجوانتی خوبی داشته ولی استفاده عمومی از آن حتی در دامپزشکی مجاز نمی‌باشد (۹-۱۱). امروزه سامانه‌های رهایش آنتی‌ژن مبتنی بر نانو و میکروذرات به عنوان ادجوانت به صورت گسترده‌ای مورد توجه و استفاده محققین قرار گرفته است. از جمله مزایای نانو و میکروذرات می‌توان به تشدید قابل توجه پاسخ ایمنی، ایجاد حالت مخزنی از آنتی‌ژن در محل تزریق و تامین تماس طولانی مدت با سیستم ایمنی و امکان تجویز موثر واکسن‌ها به بافت‌های مخاطی و محافظت آنتی‌ژن در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک هنگام تجویز مخاطی اشاره کرد (۱۲). برای این منظور می‌توان از پلیمرهای طبیعی و یا مصنوعی

زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار مختلفی استفاده نمود. انتخاب پلیمر با توجه به هدف و کاربرد نهایی، به بسیاری از عوامل از جمله اندازه نانوذرات مورد نظر، خواص ماده مورد نظر (حلالیت آبی، پایداری و غیره) جهت کپسوله‌شدن در پلیمر، ویژگی‌ها و عملکرد سطح، میزان دسترسی زیستی، سازگاری زیستی و مشخصات رهایش محصول نهایی بستگی دارد (۱۳، ۱۴). پلیمر انتخابی باید زیست‌تخریب‌پذیر، دارای سرعت تجزیه مشخص، دارای جذب مناسب، دارای رهایش قابل کنترل و مقرون به صرفه بوده و به آسانی به ماده فعال مورد نظر متصل شده و فعالیت بیولوژیک آن را از بین نبرد. در حال حاضر برای فرمولاسیون نانوذرات از پلیمرهای مصنوعی (ستتری) از جمله پلی لاکتیک اسید (PLA)، پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA)، پلی ε-کاپرولاکتون (PCL)، پلی متیل متاکریلات و پلی آلکیل سیانواکریلات و یا پلیمرهای طبیعی مانند آلبومین، ژلاتین، آلژینات، کلاژن و کیتوسان استفاده می‌شود. در بین پلیمرهای طبیعی، کیتوسان و مشتقات آن به دلیل ویژگی‌های چسبندگی به مخاط و افزایش جذب به طور گسترده‌ای برای تحویل پروتئین‌های دارویی و آنتی‌ژن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۵). نانوذرات کیتوسان متصل به پروتئین‌ها را می‌توان با روش‌های شیمیایی و فیزیکی تهیه نمود. با توجه به اثرات مخرب روش‌های شیمیایی بر پایداری پروتئین‌ها، عمدتاً از این روش در اتصال پروتئین‌ها و یا پپتیدهای دارویی استفاده نمی‌شود. یکی از روش‌های تهیه نانوذرات کیتوسان، روش ژلاسیون یونی می‌باشد. در این روش، گروه‌های آمین موجود در کیتوسان در محیط اسیدی باردار شده و به صورت پلی کاتیون درآمده و در این حالت می‌توانند به گروه‌های دارای بار منفی مانند سولفات و فسفات اتصال یافته و تولید ژل نمایند. سدیم تری پلی فسفات یکی از این مواد پلی آنیونی است که می‌تواند از طریق برقراری نیروهای الکترواستاتیکی بین گروه‌های فسفات خود و گروه‌های

آمینوی کیتوسان، به این پلیمر متصل شود (۱۶، ۱۷). در این تحقیق ابتدا فرمولاسیون نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نو ترکیب ناحیه اتصال نورو توکسین بوتولینوم تیپ E صورت گرفت و سپس با تجویز تزریقی آن به موش، میزان تیتراژ آنتی بادی حاصله با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد، وسایل و حیوان آزمایشگاهی. در این مطالعه، از باکتری *E. coli BL21-DE3* و جهت رشد آن از محیط های کشت LB مایع و آگار استفاده گردید. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. ستون افینیتی کروماتوگرافی Ni-NTA از شرکت کیاژن خریداری گردید. ادجوانت ناقص و کامل فروند از انستیتو رازی تهیه شد. آنتی بادی ثانویه (کانژوگه) متصل به HRP علیه ایمونوگلوبین G موشی و آنتی بادی موشی علیه His-tag از شرکت Abcam خریداری گردید. آنتی بادی پلی کلونال علیه توکسین بوتولینوم تیپ E از مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه شد. کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از شرکت Sigma-Aldrich، سدیم تری پلی فسفات از شرکت Scharlau و ژن صنعتی حاوی ناحیه اتصال نورو توکسین بوتولینوم تیپ E سنتز شده توسط شرکت چینی Shinegene از مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. موش های سوری ماده از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. جهت تهیه تصویر نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش و به منظور بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات از دستگاه DLS دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله استفاده شد.

بیان و تخلیص پروتئین

سویه باکتری *E. coli BL21(DE3)* به مدت ۱۵ ساعت در محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک در دمای ۳۷

درجه سانتی گراد و با هوادهی در سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت فوق به ۵۰ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه گرما گذاری شد. پس از این که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ رسید، رسوب سلولی جمع آوری و با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار، سلول های مستعد تهیه شدند. پلاسمید حاوی ژن صنعتی حاوی ناحیه اتصال *BoNT/E* با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد ترانسفورم شد. رسوب باکتری ها بر روی محیط LB آگار حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردید.

پس از تأیید ترانسفورماسیون پلاسمید نو ترکیب به سلول های *E. coli*، از کلون های رشد کرده در محیط LB براث به صورت شبانه، ۵۰ میکرو لیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB براث استریل حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۴۰ µg/ml منتقل گردید. با توجه به این که بیان پروتئین نو ترکیب در سویه *BL21(DE3)* تحت کنترل اپرون *lac* می باشد پس از این که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید برای القای بیان پروتئین از ایزوپروپیل-β-D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت ۰.۵ میلی مولار استفاده شد. پس از آن سلول ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرما گذاری شدند. نتایج بیان بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید. برای تخلیص پروتئین از ستون نیکل-نیترویلو استیک اسید استفاده شد. با توجه به این که پروتئین نو ترکیب حاصله به صورت محلول بود، پس از عبور دادن عصاره سلولی از ستون تمایلی، از بافر حاوی ایمیدازول ۴۰ میلی مولار برای شستشو و از بافر حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار به عنوان بافر خارج کننده پروتئین نو ترکیب استفاده گردید.

تأیید پروتئین نوترکیب به روش لکه گذاری وسترن

برای تایید پروتئین نوترکیب از آنتی بادی پلی کلونال علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E و از روش لکه گذاری وسترن استفاده گردید. عصاره سلولی نمونه القاء شده و القاء نشده و پروتئین BSA بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. لکه گذاری بر روی کاغذ نیتروسولوز با استفاده از سیستم BioRad و بافر مخصوص انتقال حاوی گلايسين ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۱ درصد و متانول ۲۰ درصد با pH=۸/۳ انجام شد. کاغذ نیتروسولوز به صورت شبانه در بافر PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بلاک شد. پس از فرایند شستشوی کاغذ به مدت ۱ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، کاغذ نیتروسولوز در معرض آنتی بادی پلی کلونال با رقت ۱/۵۰۰۰ قرار گرفت. در مرحله بعد شستشو تکرار شد و این بار از آنتی بادی پلی کلونال اسبی کانژوگه به آنزیم HRP در غلظت ۱/۱۰۰۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ ساعت استفاده گردید. واکنش رنگ پذیری پروتئین با افزودن دی آمینوبنزدین در بافر تریس ۵۰ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر H₂O₂ انجام شد. واکنش با افزودن آب مقطر متوقف گردید.

تهیه نانوذرات کیتوسان

نانوذرات کیتوسان با روش ژلاسیون یونی تهیه شد (۱۹-۱۷). محلولی با غلظت ۲ mg/ml از کیتوسان در اسید استیک ۲٪ وزنی و نیز محلولی با غلظت ۱ mg/ml از سدیم تری پلی فسفات تهیه گردید. ۵ میلی لیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات به صورت قطره قطره به ۷/۵ میلی لیتر محلول کیتوسان حاوی پروتئین در حالی که بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ثابت قرار گرفته بود، اضافه شد. پس از پایان واکنش، محلول کلئیدی در بستر گلیسرول به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۳۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و سپس مایع رویی برای تعیین میزان بارگذاری پروتئین جدا

گردید. رسوب حاصله که شامل نانوذرات می باشد، جهت سیر مراحل آماده سازی و تجویز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان بارگذاری پروتئین، بر اساس فرمول زیر، از اختلاف مقدار پروتئین اولیه افزوده شده به محلول کیتوسان و مقدار نهایی باقیمانده در محلول رویی به دست آمد.

$$\% LC = [(A-B)/A] \times 100$$

LC=Loading Capacity

A: مقدار پروتئین اولیه

B: مقدار پروتئین باقیمانده در مایع رویی بعد از سانتریفوژ

جهت تهیه تصویر و بررسی مورفولوژی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل LEO-1455VP استفاده گردید. اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات با استفاده از دستگاه DLS مدل Malvern اندازه گیری شد.

تزریق به موش

تعداد ۴۰ سر موش سوری ماده با سن ۷ تا ۸ هفته ای انتخاب شدند. سپس ۳۰ سر از موش ها در ۳ گروه ۱۰ تایی تست و ۱۰ سر موش دیگر نیز در ۲ گروه کنترل تقسیم شدند. تزریقات مطابق با جدول ۱ در چهار نوبت و با فواصل ۲ هفته ای صورت گرفت. روش تزریق به صورت زیر جلدی و با حجم نهایی ۲۰۰ میکرو لیتر بود.

جدول شماره ۱: مقادیر و فواصل زمانی تزریق به گروه های موشی در مراحل ایمنی زایی

روزهای تزریق	غلظت آنتی ژن بر حسب میکرو گرم				گروه های موشی
	۰	۱۴	۲۸	۴۲	
۱	۲۰	۱۵	۱۵	۱۵	Np+Ag
۲	۲۰ (ادجانت کامل)	۱۵ (ادجانت ناقص)	۱۵ (ادجانت ناقص)	۱۵ (ادجانت ناقص)	Ag+Adj
۳	۲۰ (ادجانت کامل)	۲۰ (ادجانت ناقص)	۲۰ (ادجانت ناقص)	۲۰ (ادجانت ناقص)	Np+Ag+Adj
۴	۲۰	۱۵	۱۵	۱۵	Control (Ag)
۵	۰	۰	۰	۰	Control (Np)

Ag+Np: نانوذرات حاوی آنتی ژن؛

Ag+Adj: آنتی ژن همراه با ادجانت فروند؛

Ag+Adj+Np: نانوذرات حاوی آنتی ژن همراه با ادجانت فروند؛

(Ag) Control: آنتی ژن بدون ادجانت؛

(Np) Control: نانوذرات بدون آنتی ژن؛

تعیین تیتراژ آنتی بادی با روش الایزای غیرمستقیم

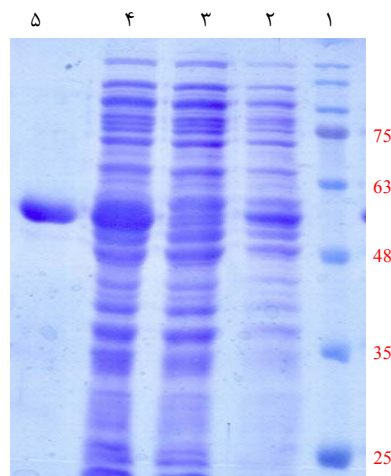
در فواصل ۸ تا ۱۰ روز پس از هر تزریق، خون گیری صورت گرفت و پس از جداسازی سرم، در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان تیتراژ آنتی بادی IgG در نمونه های سرم با روش الایزای غیرمستقیم اندازه گیری شد.

یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین

ابتدا انتقال سازه pET28a/BoNT/E binding domain

در سلول های مستعد اشریشیا کلی سویه BL21(DE3) انجام گرفت. پس از القاء ژن مورد نظر و جمع آوری سلول های بیانی و شکستن سلول ها، کل محتوای پروتئینی روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه های القاء شده، پروتئینی با بیان بالا مشاهده گردید. چنین پروتئینی در نمونه های القاء نشده وجود نداشت. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل - نیترویلو استیک اسید بیانگر وجود پروتئین نوترکیب با وزن ۵۲ کیلو دالتون در خروجی شستشوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار با درجه خلوص بالا بود (تصویر شماره ۱).

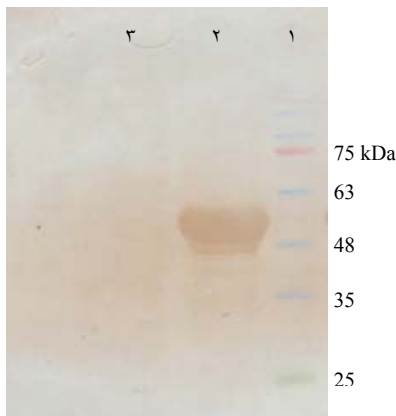


تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورز پروتئین بیان شده روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد

۱. نشانگر مولکولی پروتئین؛ ۲. خروجی شستشوی ستون با ایمیدازول ۴۰ میلی مولار؛ ۳. عصاره باکتری القاء نشده به عنوان کنترل منفی؛ ۴. عصاره باکتری القاء شده با IPTG؛ ۵. خروجی شستشوی ستون با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار

تأیید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات

با توجه به این که پروتئین نوترکیب اتصالاتی بخشی از توکسین ۱۵۰ کیلو دالتونی کلستریدیوم بوتولینوم می باشد، لذا جهت تأیید پروتئین نوترکیب تکنیک وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد توکسین تیپ E انجام شد. نتیجه وسترن بلات نشان داد که این آنتی بادی توانسته است پروتئین نوترکیب حاصل را به خوبی شناسایی نماید (تصویر شماره ۲).

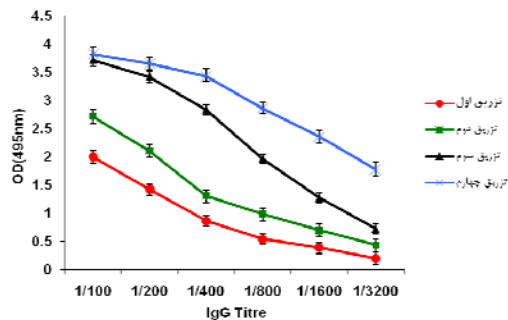


تصویر شماره ۲: تأیید پروتئین نوترکیب BoNT/E با روش وسترن بلات
۱. نشانگر مولکولی پروتئین. (Prestained Protein Ladder, (10-250KDa)
۲. پروتئین نوترکیب BoNT/E؛ ۳. پروتئین BSA (کنترل منفی)

تهیه نانوذرات کیتوسان و بررسی میزان بارگذاری پروتئین تصاویر به دست آمده اندازه نانوذرات را کمتر از ۳۰۰ نانومتر نشان می داد (تصویر شماره ۳). نتایج دستگاه DLS نیز بیانگر تولید نانوذرات کیتوسان با میانگین اندازه ۲۸۵ نانومتر بود. پتانسیل زتای نانوذرات کیتوسان فاقد آنتی ژن ۲۲/۹ + میلی ولت و نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی ژن نوترکیب ۹/۴۳ + میلی ولت بود (نمودار شماره ۱ و ۲). پس از بهینه سازی شرایط تهیه نانوذرات میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات حدود ۹۱ درصد بود.

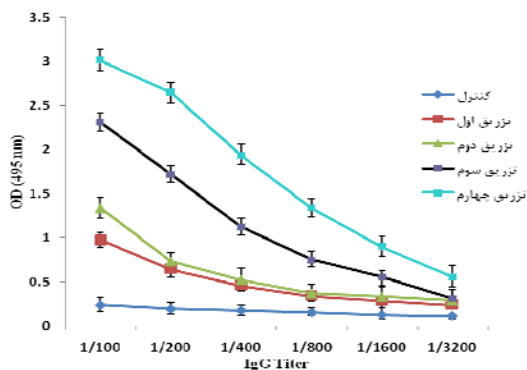
سنجش میانگین تیتراژ آنتی بادی IgG

میزان تیتراژ آنتی بادی IgG نمونه های سرم جدا شده از مراحل مختلف خونگیری در تمام گروه ها با روش الایزای غیرمستقیم اندازه گیری شد. نتایج در نمودارهای ۳ تا ۶ نشان داده شده است.



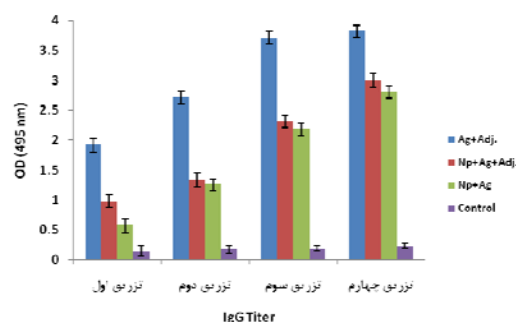
نمودار شماره ۴: میانگین تیتراژ آنتی‌بادی IgG پس از تزریق آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند

(نمونه‌ها شامل آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند است. تزریق به صورت زیرجلدی و در فواصل زمانی ۱۴ روز انجام شد. خون‌گیری ۸ روز پس از هر تزریق صورت گرفت. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تزریق اول ۱/۹ و در تزریق چهارم ۳/۸ بود).



نمودار شماره ۵: میانگین تیتراژ آنتی‌بادی IgG پس از تزریق نانوذرات حاوی آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند

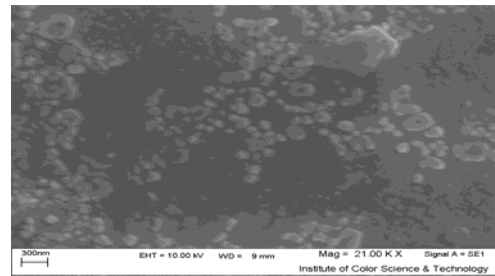
(نمونه‌ها شامل نانوذرات حاوی آنتی‌ژن می‌باشند که همراه با ادجوانت فروند به صورت زیرجلدی و در فواصل زمانی ۱۴ روز تزریق شده است. خون‌گیری ۸ روز پس از هر تزریق صورت گرفت. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تزریق اول ۰/۹۷ و در تزریق چهارم ۳/۰ بود).



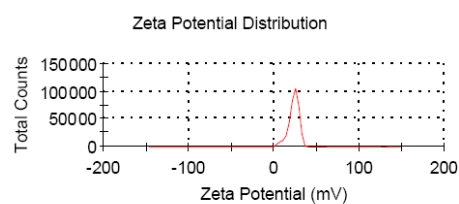
نمودار شماره ۶: مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌بادی IgG (رقت ۱/۱۰۰)

در گروه‌های مختلف

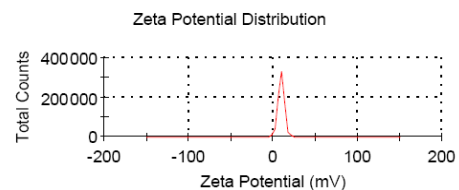
نمونه‌ها شامل آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند (آبی)، نانوذرات حاوی آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند (قرمز)، نانوذرات حاوی آنتی‌ژن (سبز) و نانوذرات بدون آنتی‌ژن (بنفش) می‌باشند. نتایج آزمون آماری t-test نشان داد که تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌هایی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن با/بدون ادجوانت فروند تزریق شده است، تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P < 0.05$).



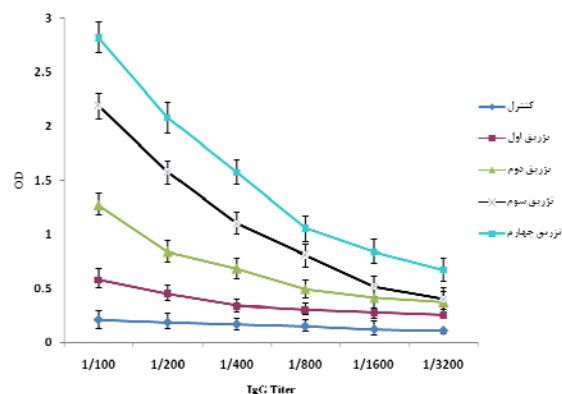
تصویر شماره ۳: نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین ناحیه اتصال BoNT/E (نانوذرات بر روی فویل آلومینیومی قرار گرفته و پس از خشک شدن و پوشش با لایه طلا، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO-1455VP تصویربرداری شد)



نمودار شماره ۱: توزیع پتانسیل زتای نانوذرات فاقد آنتی‌ژن (مقدار پتانسیل زتا ۲۲/۹+ میلی‌ولت می‌باشد)



نمودار شماره ۲: توزیع پتانسیل زتای نانوذرات حاوی آنتی‌ژن (مقدار پتانسیل زتا ۹/۴۳+ میلی‌ولت می‌باشد)



نمودار شماره ۳: میانگین تیتراژ آنتی‌بادی IgG پس از تزریق نانوذرات حاوی آنتی‌ژن

(نمونه‌های تست شامل نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و نمونه کنترل شامل نانوذرات فاقد آنتی‌ژن است. فواصل زمانی تزریق در هر دو گروه تست و کنترل، ۱۴ روز و زمان خون‌گیری، ۸ روز پس از هر تزریق بود. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تزریق اول ۰/۵۸ و در تزریق چهارم ۲/۹ بود).

بوتولیسم بیماری خطرناکی است که در نتیجه تماس با نوروتوکسین‌های بوتولینوم ایجاد می‌شود. امروزه تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن واکسن مناسب علیه این نوروتوکسین‌ها صورت می‌گیرد. پژوهشگران تحقیق بر روی واکسن‌های نو ترکیب را به دلیل مشکلات مربوط به واکسن‌های توکسوئیدی در اولویت اول تحقیقات خود قرار داده‌اند (۲۰۸، ۵، ۴). برای تجویز واکسن‌ها باید ادجوانت‌های قوی و بی‌خطر و یا سیستم‌های تحویل مناسبی یافت که دارای قدرت تحریک‌کنندگی بالایی سیستم ایمنی بوده و شرایطی مانند زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، عدم ایجاد سمیت سلولی، امکان رهایش آهسته و پیوسته واکسن را نیز داشته باشند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی استفاده از نانوذرات به عنوان حاملین واکسن و دارو صورت گرفته است. در واقع رهایش مناسب آنتی‌ژن از نانوذرات به سیستم ایمنی اجازه پردازش بیشتر و بهتر جهت بروز پاسخ مناسب را می‌دهد. در این میان، کیتوسان به عنوان یک پلیمر طبیعی بیش از سایرین توجه محققین را به خود جلب کرده است. تهیه نانوذرات کیتوسان با روش‌های مختلف امکان‌پذیر است ولی یکی از بهترین و ساده‌ترین آنها روش ژلاسیون یونی می‌باشد که بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش با تغییر پارامترهای دخیل در فرآیند ژلاسیون می‌توان بهترین شرایط برای ساخت نانوذرات با اندازه مناسب و حداکثر میزان بارگذاری پروتئین را به دست آورد (۲۱).

تاکنون مطالعات زیادی در خصوص استفاده از کیتوسان به عنوان حامل دارو یا واکسن‌های مختلف علیه بیماری‌های گوناگون به صورت تزریقی، خوراکی و داخل بینی صورت گرفته است (۲۷-۲۲). به عنوان مثال، استوان و همکاران (۲۰۰۶) عصاره سالمونلا انتریکا سرو واریته Abortusovis را در نانوذرات پلیمری کپسوله نمودند و پس از تزریق زیر جلدی در موش‌های Balb/c، مشاهده کردند که میزان ایمنی و تیتراژ آنتی‌بادی ایجاد

شده توسط نانوذرات مشابه با واکسن ضعیف‌شده تجاری Rv6 بود. در مطالعه دیگری، اوالبومین با نانوذرات کیتوسان پوشیده شده با آلژینات، کپسوله شده و از مسیر دهانی به پلاک‌های پیر تحویل شده است. جین و همکاران (۲۰۰۶) با با فرمولاسیون وزیکولی نانوذرات و تجویز خوراکی آن‌ها، غلظت بالای sIgA و پاسخ ایمنی بهتری را مشاهده کردند. همچنین در مطالعه انجام شده با استفاده از میکرو و نانو ذرات کپسوله شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی، افزایش قابل توجهی در ایمنی سیستمیک و مخاطی مشاهده شد (۲۸). علی‌رغم مطالعات گسترده، تاکنون در خصوص استفاده از کیتوسان به عنوان ادجوانت برای پروتئین نو ترکیب ناحیه اتصال BoNT/E مطالعه‌ای صورت نگرفته است. تنها در یک مطالعه، ربیعی رودسری و همکاران (۲۰۱۳) در خصوص اثر ادجوانتی نانوذرات طلا بر ایمنی‌زایی BoNT/E نشان دادند که این نانوذرات می‌توانند همانند ادجوانت فروند باعث تحریک سیستم ایمنی و در نتیجه بروز پاسخ شوند (۲۹). در سایر مطالعاتی که بر روی پروتئین نو ترکیب ناحیه اتصال BoNT/E صورت گرفته است، صرفاً از ادجوانت فروند استفاده شده است (۸، ۴، ۳).

در تحقیق حاضر از روش ژلاسیون یونی برای تهیه نانوذرات استفاده شد. با تغییر پارامترهای دخیل در ساخت نانوذرات از جمله غلظت محلول کیتوسان، غلظت محلول TPP، pH محلول کیتوسان، نسبت کیتوسان به TPP، میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات بهینه گردید به طوری که در نهایت میزان بارگذاری به حدود ۹۱ درصد رسید. ضمن آن که برخی از پارامترهای فوق بر روی اندازه نانوذرات و میزان پتانسیل زتا نیز تاثیر به سزایی دارند. پتانسیل زتای ذرات عامل مهمی برای پایداری آن‌ها در محلول بوده و ذرات کیتوسان با پتانسیل زتای مثبت و بالاتر پایداری بیش‌تر در محلول خواهند داشت. همچنین چنانچه پتانسیل زتای ذرات کیتوسان و مشتقاتش مثبت‌تر باشد، چسبندگی این

پلیمرها به پروتئین‌ها و نیز سطوح مخاطی بیشتر خواهد بود و قابلیت بهتری برای تحویل پروتئین و آنتی‌ژن در واکسیناسیون مخاطی خواهند داشت. به عنوان مثال، لی و همکارانش (۲۰۰۸) نشان دادند که با افزایش اندازه نانوذرات به علت افزایش غلظت پروتئین مقدار پتانسیل زتا کاهش می‌یابد (۳۰). هم‌چنین محمدپور و همکارانش (۲۰۱۲) در مطالعه خود نشان دادند که پتانسیل زتای نانوذرات کیتوسان پس از بارگذاری با پروتئین کاهش می‌یابد (۲۲). حسین‌زاده و همکارانش (۲۰۱۲) نشان دادند با افزایش غلظت محلول کیتوسان، اندازه نانوذرات و پتانسیل زتای آن افزایش می‌یابد. هم‌چنین با افزایش غلظت TPP، اندازه نانوذرات افزایش ولی پتانسیل زتای آن کاهش می‌یابد (۳۱). گان و همکارانش (۲۰۰۷) نیز نشان دادند با کاهش غلظت کیتوسان، اندازه نانوذرات نیز کاهش می‌یابد. هم‌چنین اندازه نانوذرات کیتوسان هنگامی که با پروتئین BSA بارگذاری می‌شود، به مقدار قابل ملاحظه‌ای (نسبت به زمانی که بدون پروتئین ساخته می‌شود)، افزایش و پتانسیل زتا به میزان ناچیزی کاهش می‌یابد (۳۲). در تحقیق حاضر با تغییر در پارامترهای فوق نهایتاً نانوذرات کیتوسان با میانگین اندازه ۱۴۰ نانومتر و پتانسیل زتای $22/9 +$ میلی‌ولت تهیه شد که پس از بارگذاری با پروتئین نوترکیب BoNT/E، میانگین اندازه نانوذرات به ۲۸۵ نانومتر و پتانسیل زتای آن‌ها به $43/9 +$ میلی‌ولت رسید.

در پژوهش حاضر، نتایج الایزا (نمودارهای ۳ تا ۵) نشان داد که در هر سه گروه مورد آزمون میزان تیتراژ آنتی‌بادی IgG در هر مرحله افزایش یافت. افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را دریافت کرده بودند حاکی از آن بود که نانوذرات توانسته‌اند به عنوان ادجوانت عمل کرده و با رهایش مناسب و طولانی مدت آنتی‌ژن و قرار دادن آن در معرض سیستم ایمنی منجر به تولید IgG شوند به طوری

که بیشترین میزان OD مربوط به رقت $1/100$ در تزریق چهارم و به میزان $2/9$ بود. البته افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در این گروه به اندازه گروهی که آنتی‌ژن همراه با ادجوانت را دریافت کرده بودند، نبود. در این گروه، میزان OD رقت $1/100$ در تزریق چهارم عدد $3/8$ را نشان می‌داد. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی تیتراژ آنتی‌بادی گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند را دریافت کرده بودند نشان از افزایش میزان تولید آنتی‌بادی در هر مرحله بود به طوری که بیشترین میزان OD در رقت $1/100$ در تزریق چهارم و به میزان $3/0$ بود.

با توجه به این که نانوذرات به تنهایی توانسته بودند با رهایش تدریجی نانوذرات و عرضه آن به سیستم ایمنی نقش ادجوانتی ایفا نموده و منجر به تولید آنتی‌بادی به میزان قابل قبولی شوند، انتظار می‌رفت استفاده همزمان از نانوذرات و ادجوانت فروند این اثر را تقویت نموده و در نتیجه با افزایش بسیار زیاد آنتی‌بادی مواجه باشیم. اما بر خلاف تصور، همان‌گونه که در نمودار شماره ۶ مشاهده می‌شود، در گروهی که آنتی‌ژن به صورت کپسوله در نانوذرات کیتوسان و همراه با ادجوانت فروند دریافت کرده بودند، تیتراژ آنتی‌بادی نسبت به گروهی که آنتی‌ژن همراه با ادجوانت تجویز شده بود، نه تنها افزایش نیافته بلکه به میزان زیادی با کاهش همراه بوده است که علت آن ممکن است مربوط به اثرات ممانعتی احتمالی نانوذرات بر روی ادجوانت و یا بالعکس باشد. البته میزان آنتی‌بادی در این گروه نسبت به گروهی که آنتی‌ژن را به صورت نانو کپسوله دریافت کرده بودند، به میزان ناچیزی افزایش نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات کیتوسان توانایی رسانش آنتی‌ژن و تحریک سیستم ایمنی را داشته و برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب علیه آنتی‌ژن ناحیه اتصال BoNT/E می‌توان از نانوذرات کیتوسان حاوی این آنتی‌ژن استفاده نمود

References

1. Przedpelski A, Tepp WH, Kroken AR, Fu Z, Kim JJ, Johnson EA, et al. Enhancing the protective immune response against botulism. *Infect Immun*. 2013; 81(7): 2638-2644.
2. Smith LA. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine*. 2009; 27: D33-339.
3. Karalewitz APA, Barbieri JT. Vaccines against botulism. *Current Opinion in Microbiology* 2012; 15: 317-324.
4. Valipour E, Moosavi ML, Amani J, Nazarian S. High level expression, purification and immunogenicity analysis of a protective recombinant protein against botulinum neurotoxin type E. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30(6): 1861-1867.
5. Mansour AA, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal heavy chain of C. botulinum neurotoxin type E. *Biologicals* 2010; 38(2): 260-264.
6. Baldwin MR, Tepp WH, Przedpelski A, Pier C, Bradshaw M, Johnson E, Barbieri J. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. *Infect Immun* 2008; 76(3): 1314-1318.
7. Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Valipour E, Basiri M, Nazarian S, Amani J, Farhadi, N. Immunogenic and protective potentials of recombinant receptor binding domain and a C-terminal fragment of Clostridium botulinum neurotoxin type E. *Iranian Journal of Biotechnology* 2011; 9(3): 181-187.
8. Baldwin MR, Tepp WH, Pier CL, Bradshaw M, Ho M, Wilson BA, et al. Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. *Infect Immun* 2005; 73(10): 6998-7005.
9. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(3): 411-416.
10. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33(4): 492-503.
11. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(3): 310-315.
12. Mi-Gyeong Kim MG, Joo Yeon Park JY, Yuna Shon Y, Young Bong Kim YB, Yu-Kyoung Oh YK. Nanodelivery Systems for Mucosal Vaccines. *Nanodelivery Systems for Mucosal Vaccines. Recent Patents on Nanomedicine* 2013; 3(2): 119-127.
13. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv Polym Sci* 2012; 247: 31-64.
14. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery* 2012; 9 (4): 367-394.
15. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010; 58(11): 1423-1430.
16. Li-Ming Zhao, Lu-E Shi, Zhi-Liang Zhang, Jian-Min Chen, Dong-Dong Shi, Jie Yang, et al. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2011; 28(3): 353-362.
17. Vaezifar S, Razavi Sh, Golozar M A, Karbasi S, Morshed M, Kamali M. Effects of Some Parameters on Particle Size Distribution of

- Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionic Gelation Method. *J Clust Sci* 2013; 24(3): 891-903.
18. Nesalin JAJ, Smith AA. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing zidovudine. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 7(1): 80-84.
19. Dustgani A, Vasheghani Farahani E, Imani M. Determination of the Optimum Conditions for Production of Chitosan Nanoparticles. *Iranian Journal of Polymer Science and Thecnology* 2008; 20(5): 457-464 (Persian).
20. Janice M, Rusnak A, Smith L. Botulinum Neurotoxin Vaccines Past History and Recent Developments. *Vaccines* 2009; 5(12): 794-805.
21. Hasanzadeh Kafshgari M, Khorram M, Khodadoost M, Khavari S. Reinforcement of Chitosan Nanoparticles Obtained by an Ionic Cross-linking Process. *Iranian Polymer Journal* 2011; 20(5): 445-456.
22. Mohammadpour Dounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Mir Mohammad Sadeghi A, et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2012; 18(1): 44-52.
23. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(1): 59-82.
24. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 765-774.
25. Bowman K, Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(2): 117-128.
26. Rajan M, Raj V. Potential Drug Delivery Applications of Chitosan Based Nanomaterials. *International Review of Chemical Engineering* 2013; 5(2): 145-155.
27. Chen F, Zhang ZR, Huang Y. Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. *Int J Pharm* 2007; 336(1): 166-173.
28. Shahiwala A, Vyas TK, Amiji MM. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2007; 1(1): 1-9.
29. Rabiee Rudsari A, Ebrahimi F, Arefpour Torabi M A. Study of Adjuvant Capability of the Gold Nanoparticles on the Immunity of Botulinum Neurotoxin Serotype E in Mouse. *The Scientific Journal of Advanced Defence Science & Technology* 2013; 4(2): 87-92 (Persian).
30. Li X, Kong X, Shi S, Zheng X, Guo G, Wei Y, et al. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnol* 2008; 8: 89.
31. 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: 1851-1863.
32. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007; 59(1): 24-34.