ORIGINAL ARTICLE

Synthesis and Immunogenisity Evaluation of Tetanus Toxoid Encapsulated Trimethyl Chitosan Nanoparticles

Majdedin Ghalavand[1],
Mojtaba Saadati[2],
Jafar Salimian[3],
Ebrahim Abbasi[4],
Ali Ahmadi[5]

[1] MSc in Cell and Molecular Biology, Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Biological Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Human Bacterial Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
[5] Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 4, 2016 ; Accepted December 18, 2016)

Abstract

Background and purpose: In recent years nanotechnology has a significant impact on various fields of human life, especially in pharmaceutical and medical needs. Some biopolymers such as chitosan which is also biocompatible are low cost and abundantly found, so, their application for vaccine production is cost benefit. Trimethyl chitosan is a deacetylated derivative of chitosan that could be used to increase the induction of immune response. In this study, trimethyl chitosan nanoparticles containing tetanus protein were used to stimulate the immune system.

Materials and methods: In this experimental study, synthesis of the tetanus toxoid loaded nanoparticles was done by ion gelation method. Physical features of the nanoparticles were investigated using scanning electron microscopy (SEM). The nanoparticles were then injected subcutaneously into mice. After the sampling process, the immune system stimulation was evaluated using indirect ELISA. Data was analyzed using one-way ANOVA and significance level of $P< 0.05$.

Results: The purity of protein was confirmed by SDS-PAGE and encapsulated proteins were loaded up to 80 percent. ELISA results showed that the immune system was stimulated significantly compared with Freund adjuvant, and antibody titer increased.

Conclusion: Tetanus toxoid loaded Trimethyl chitosan nanoparticles increase the stimulation of immune system and are more effective in comparison with Freund's adjuvant.

Keywords: nanoparticles, trimethyl chitosan, immunization, tetanus protein

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 54-62 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۶۲-۵۴)

سنتز و ارزیابی ایمنی زایی نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی توکسوئید کزاز

مجدالدین قلاوند[۱]
مجتبی سعادتی[۲]
جعفر سلیمیان[۳]
ابراهیم عباسی[۴]
علی احمدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: نانوتکنولوژی، تاثیرات گسترده‌ای را در زمینه‌های مختلف زندگی بشر از جمله داروسازی و پزشکی در سال‌های اخیر گذاشته است. با توجه به فراوانی و ارزان بودن برخی از پلیمرهای زیستی از جمله کایتوزان که زیست سازگار نیز می‌باشد، استفاده از آن در صنعت ساخت واکسن مقرون به صرفه می‌باشد. تری‌متیل کایتوزان یکی از مشتقات استیل زدائی شده کایتوزان بوده که می‌توان از آن جهت افزایش القای پاسخ ایمنی استفاده نمود. در این مطالعه از نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین تتانوس جهت برانگیختن سیستم ایمنی استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ساخت نانوذرات حاوی پروتئین حاوی توکسوئید کزاز با روش ژلاسیون یونی انجام شد. ویژگی‌های ظاهری نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی و اتمی بررسی شد. سپس به صورت زیرجلدی به موش سوری تزریق شدند. پس از فرایند خونگیری، میزان تحریک سیستم ایمنی با روش الایزای غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش با آنالیز واریانس یک طرفه در سطح $p < ۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: خلوص پروتئین با SDS-PAGE مورد تایید قرار گرفت. پروتئین‌های توکسوئید کزاز با بارگذاری بالای ۸۰ درصد وارد نانوذرات شدند. نتایج الایزا نشان داد که سیستم ایمنی به صورت معنی‌داری در مقایسه با ترکیب پروتئین با فروند تحریک شده و میزان تیتر آنتی بادی افزایش یافت.

استنتاج: نانوذرات‌های تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین کزاز، میزان تحریک سیستم ایمنی را بالا برده و در مقایسه با ادجوانت فروند کارایی بیش‌تری دارند.

واژه های کلیدی: نانوذرات، تری متیل کایتوزان، ایمنی زائی، پروتئین کزاز

مقدمه

بیماری کزاز که توسط توکسین باکتری کلستریدیوم تتانی ایجاد می‌شود، یک عفونت کشنده مشترک بین انسان و بیش‌تر پستانداران بوده و با گرفتگی‌های شدید عضلات ناشی از سیستم نورولوژیک مشخص می‌شود(۱). با توجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، کزاز عامل ایجاد ۲،۱۳،۰۰۰ مرگ و میر در سال ۲۰۰۲ بود که تقریباً ۸۵ درصد مبتلایان، نوزادان بودند(۲). این توکسین به صورت یک زنجیره ۱۵۰ کیلودالتونی بوده

مولف مسئول: مجتبی سعادتی- تهران: دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی E-mail saadati1_m@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران
۲. استاد، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
۴. استادیار، بخش واکسن های باکتریال انسانی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۴/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۴/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۹/۲۸

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

که از دو زیرواحد زنجیره سبک (~50-kDa) و زنجیره سنگین (~100-kDa) ساخته شده و با یک باند دی سولفیدی به هم متصل هستند. زیرواحد سبک، قسمت فعال توکسین است، اما وظیفه زیرواحد سنگین جهت وارد شدن به سلول می‌باشد(۴،۳).

تتانوس توکسین از دو جزتشکیل شده است که هر دوی آن‌ها برای سمیت‌زائی ضروری هستند، اما در بیماری‌زائی عملکردهای متفاوتی دارند(۶،۵). زمانی که توکسین وارد بدن شد و از طریق زیرواحد سنگین اتصال یافت، زیرواحد سبک که جز اصلی می‌باشد، از آزاد شدن نوروترانسمیترهای مهاری جلوگیری می‌کند(۸،۷).

توکسوئید کزاز (شکل غیر فعال شده توکسین کزاز با فرمالدئید) مصونیت مناسبی در مقابل بیماری کزاز که یک مشکل در کشورهای درحال توسعه است، ایجاد می‌کند. امروزه این توکسوئید به همراه ادجوانت آلوم به‌عنوان واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. ادجوانت‌های نمک آلومینیوم به عنوان یک انبار جهت رهایش آهسته آنتی ژن و هم‌چنین به منظور افزایش میزان ایمنی‌زائی واکسن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، هم‌چنین ادجوانت فروند فقط در کارهای تحقیقاتی و روی حیوانات انجام می‌شود. همان طور که مشخص است، استفاده از ادجوانت‌ها در واکسن با تحریک بهتر اجزای سیستم ایمنی منجر به افزایش ایمنی‌زائی می‌شود، استفاده از ادجوانت‌ها در انسان به دلیل عوارض جانبی دارای محدودیت فراوانی است، به عنوان مثال ادجوانت فروند که در تحقیقات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به دلیل ضررهای جانبی مجاز نمی‌باشد. از آن‌جایی که امروزه از نانوذرات برای استفاده در واکسن کاربرد دارد و با توجه به پاسخ ایمنی مناسب، ایجاد حالت مخزنی و رهایش آهسته آن، از نانوذرات تری‌متیل کایتوزان که زیست سازگار بوده و برای سلول سمیت ندارد، به عنوان جایگزینی برای ادجوانت فروند استفاده گردید. کایتوزان یک پلی ساکارید کاتیونیک خطی متشکل از زیرواحدهای بتا-دی گلوکز آمین و استیل گلوکز آمین می‌باشد که به وسیله‌ی یک پروسه داستیلاسیون از کیتین ایجاد می‌شود(۱۰،۹). کایتوزان به دلیل خواصی هم‌چون زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، غیر آنتی‌ژنیک، سمیت پائین و خواص مخاط چسبی در تحقیقات مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۳-۱۱). هم‌چنین کایتوزان دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ، مهار تومور، آنتی اکسیدان و رهایش تحت کنترل دارو نیز می‌باشد(۱۵،۱۴). اما یک نقطه ضعف عمده کایتوزان، حلالیت ضعیف آن در pH فیزیولوژیک است، در حالی که تنها در محیط اسیدی در فرم پروتونه آن محلول و فعال است(۱۷،۱۶). در مقابل N- تری متیل کایتوزان (TMC) یکی از مشتقات کایتوزان بوده که جهت بهبود خواص کایتوزان و برای غلبه بر موانع اصلی در استفاده از کایتوزان در برنامه‌های کاربردی دارویی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. ماده TMC در گروه‌های آمینی چهارتایی خود دارای بار مثبت ثابت می‌باشد و به همین دلیل در طیف گسترده‌ای از pH حلالیت خوبی در آب نشان می‌دهد(۲۰-۱۸).

هدف از این مطالعه استفاده از فناوری نانو جهت تهیه سنتز نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی توکسوئید کزاز و هم چنین ارزیابی ایمنی‌زائی آن در مقایسه با ادجوانت فروند در موش آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش ها

غلظت سنجی با روش برادفورد

آنتی ژن مورد استفاده در این تحقیق، پروتئین توکسوئید کزاز بود که از موسسه رازی تهیه گردیده و جهت انجام تست‌های مختلف ابتدا با روش پروتئین سنجی برادفورد، تعیین غلظت گردید.

الکتروفورز SDS-PAGE

در ادامه جهت بررسی خلوص پروتئین از الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر استفاده شد(۲۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

سنتز نانوذرات کایتوزان و تعیین میزان کارائی

پس از اطمینان از خلوص پروتئین، جهت ساخت نانوذرات از روش ژلاسیون یونی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول تری‌متیل کایتوزان (W/V ۱ درصد) با حل کردن پودر تری‌متیل کایتوزان (Sigma-USA) در بافر HEPES تهیه شده و میزان مورد نظر از آنتی ژن پروتئینی به آن اضافه گردید. سپس جهت ایجاد اتصالات عرضی و تشکیل نانوذرات از برهمکنش تری‌متیل کایتوزان با تری پلی فسفات (TPP) (Sigma-USA) استفاده شد که در ۳ مرحله متوالی به فواصل ۱۵ دقیقه، مقدار ۶۰ ماکرولیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات (TPP) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتربه صورت قطره قطره اضافه شد تا این که حالت شفاف محلول به سمت شیری شدن تغییر پیدا کرد و کدورتی یکنواخت در محلول ایجاد گردید. سپس به منظور کامل شدن واکنش‌های بین تری‌متیل کایتوزان، TPP و آنتی ژن اجازه داده شد تا محلول به مدت ۶۰ دقیقه در دور ۳۰۰ هم زده شود. در نهایت تمام محلول توسط سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰g دور به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه جداسازی شد و نانوذرات در کف جمع شده و محلول روئی دور ریخته شده و تعیین درصد انکپسولاسیون با فرمول زیر محاسبه شد.

$$EE\% = \frac{Total\ protein - Free\ protein}{Total\ protein} \times 100$$

برای به دست آوردن نتیجه این فرمول: زمانی که سانتریفیوژ به اتمام رسید، محلول روئی را برداشته و با روش برادفورد، پروتئین سنجی کرده و از کل پروتئین اولیه ریخته شده، کم می‌کنیم تا در نهایت مشخص شود که چند درصد از پروتئین‌ها وارد نانوذرات شده‌اند(۱۷).

میکروسکوپ الکترونی SEM

میکروسکوپ الکترونی گذاره یا روبشی (Scanning elecron microscope) بر اساس برهمکنش الکترون‌ها با ماده مورد نظر جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوذرات و اندازه آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

پنل تزریق به موش

سپس به منظور بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی علیه پروتئین مورد نظر، از موش‌های آزمایشگاهی سوری با وزن حدود ۲۰ گرم استفاده شد. گروه‌های آنتی‌ژنی مورد استفاده شامل ۴ گروه به صورت زیر بود: گروه اول آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند، گروه دوم نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی آنتی ژن، گروه‌های سوم و چهارم که شاهد بودند، در هر گروه تعداد ۵ موش سوری و به صورت تزریق زیر جلدی استفاده شد. روزها و فواصل زمانی تزریق و هم‌چنین میزان حجم تزریق پروتئین در موش‌های موجود در همه گروه‌های آزمایش یکسان بود (توضیحات در جدول شماره ۱ و شماره ۲ ارائه شده است)(۲۲).

روش الایزا جهت بررسی تیتر آنتی بادی

۲۰ روز پس از آخرین تزریق، خونگیری از سینوس چشم موش‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها به مدت یک روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده و پس از سانتریفیوژ (دور ۵۰۰۰rpm، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و مدت ۳۰ دقیقه)، سرم آن‌ها جداسازی گردید. از روش الایزای غیرمستقیم برای تیتر کردن آنتی‌بادی استفاده شد. میزان آنتی‌ژن مورد استفاده در هر چاهک ۲ میکروگرم بود. هم‌چنین رقت‌های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم تهیه و به هر چاهک افزوده شد. کانژوگه (آنتی‌بادی ضد آنتی‌بادی موش کانژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱:۱۵۰۰۰ به همه چاهک‌ها اضافه شد. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، پلیت‌ها با طول موج ۴۹۵ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر شرکت بیوتک خوانده شدند(۲۲).

آنالیز آماری

در نهایت اطلاعات به دست آمده از تیتر آنتی‌بادی توسط نرم‌افزار (GraphPad InStat) و با آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One-way Anova) و آزمون

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

توکی بررسی گردید $p < ۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: میزان تزریق آنتی ژن، بازه زمانی تزریق و روش تزریق در گروه اول

شماره تزریق	روز	مقدارAg / موش	گروه اول	روش تزریق
تزریق اول	۱	µg۲۰	ادجوانت کامل	زیر جلدی
تزریق دوم	۱۴	µg۲۰	ادجوانت ناقص	زیر جلدی
تزریق سوم	۳۴	µg۱۰	ادجوانت ناقص	زیر جلدی
تزریق چهارم	۴۸	µg۸	ادجوانت ناقص	زیر جلدی

جدول شماره ۲: میزان تزریق آنتی ژن، بازه زمانی تزریق و روش تزریق در گروه دوم + گروه های کنترل

شماره	روز	مقدار Ag	گروه دوم	شاهد	شاهد	روش تزریق
تزریق اول	۱	۲۰ µg	Np+TT	HEPES+Np	HEPES+TT	زیر جلدی
تزریق دوم	۲۱	۲۰ µg	Np+TT	HEPES+ Np	HEPES+ TT	زیر جلدی
تزریق سوم	۳۴	۱۰ µg	Np+TT	HEPES+ Np	HEPES+ TT	زیر جلدی
تزریق چهارم	۴۸	۸ µg	Np+TT	HEPES+ Np	HEPES+ TT	زیر جلدی

Np+TT: نانوذرات حاوی آنتی ژن (توکسوئید تتانی)

HEPES+ Np: نانوذرات بدون آنتی ژن (همراه بافر)

HEPES+ TT: آنتی ژن خالی (همراه بافر)

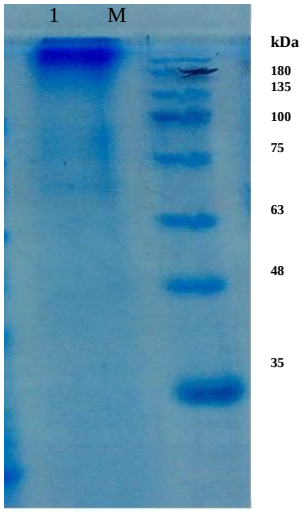
یافته ها

ژل الکتروفورز SDS-PAGE

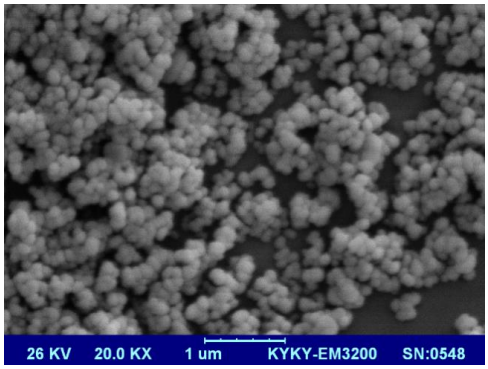
برای سنجش میزان خلوص پروتئین، پس از این که پروتئین سنجی با روش برادفورد کامل شد و غلظت نهائی پروتئین مشخص گردید، ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد انجام شد که به دلیل مجتمع بودن تمام پروتئین به وسیله فرمالدهید، در همان بالای ژل باقی ماندند و نتیجه ژل نشان داد که پروتئین خالص بوده و هیچ باند دیگری مشاهده نگردید (تصویر شماره ۱).

میکروسکوپ الکترونی SEM

پس از انجام محاسبات عددی و فرمولاسیون ساخت نانوذرات، در مرحله بعد و قبل از تزریق به حیوانات، خصوصیات ساختاری آن بررسی شد. با تصاویری که از SEM به دست آمد، مشخص شد که شکل نانوذرات و توزیع آن‌ها مناسب بوده و تجمع زیادی در آن مشاهده نگردید و میانگین سایز نانوذرات بین ۹۰ تا ۱۲۰ نانومتر محاسبه گردید (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: تصویر الگوی الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد آنتی ژن پروتئینی مورد آزمایش؛ چاهک های M: نشانگر مولکولی پروتئین؛ چاهک ۱ نمونه پروتئین توکسوئید کزاز



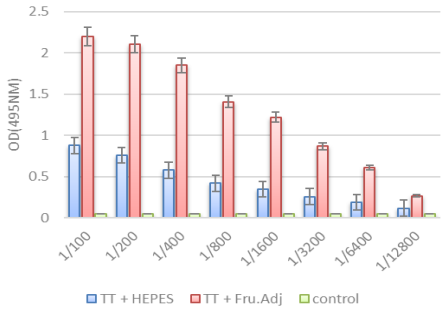
تصویر شماره ۲: نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی آنتی ژن پروتئینی؛ نانوذرات روی فویل آلومینیومی با لایه تثبیت شده و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM تصویر برداری شد

تزریقات، بررسی ایمنی زائی و تحلیل آماری

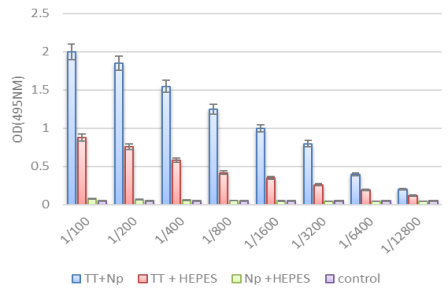
پس از ساخت نانوذرات، میزان درصد کارائی نانوذرات تری متیل کایتوزان برای احتباس پروتئین تقریباً ۸۰ درصد بود. پس از انجام تزریقات و خونگیری از موش‌ها، میزان تحریک و فعالیت سیستم ایمنی با سنجش تیتر آنتی‌بادی و با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم در چند گروه آزمایش مشخص گردید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

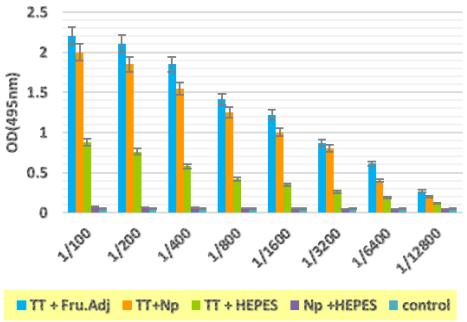
(تعداد موش‌ها در هر گروه برابر ۵ عدد بود)؛ در گروه اول بالاترین تیتر آنتی بادی (آنتی‌ژن به همراه ادجوانت فروند) برابر ۲/۲ بود که در مقایسه با گروه آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل) تفاوت معنی‌دار بود (p <۰/۰۵) (نمودار شماره ۱). در گروه دوم، بالاترین تیتر آنتی‌بادی (نانوذرات حاوی آنتی ژن) برابر ۲ بود که باز هم در مقایسه با گروه آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل) تفاوت معنی‌دار بود (p <۰/۰۵) (نمودار شماره ۲) و درنهایت از مقایسه تمامی گروه ها به همراه کنترل‌هایشان مشخص گردید که نتایج در هر دو گروه تست نسبت به گروه‌های کنترل، معنی‌دار بود؛ اما از مقایسه گروه دوم که نانوذرات را دریافت کرده بودند، در مقایسه با آن دسته از موش‌های گروه اول که آنتی‌ژن را همراه ادجوانت دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (p <۰/۰۵ ؛ NS) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۱: میانگین تیتراسیون آنتی‌بادی IgG بعد از ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن بر پایه ادجوانت فروند (تزریقات با فواصل زمانی ۱۴ روز انجام شد و دو هفته بعد از بوستر سوم، میزان OD در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش گردید؛ نمونه ها شامل آنتی ژن همراه بافر و گروه کنترل می باشد).



نمودار شماره ۲:میانگین تیتراسیون آنتی‌بادی IgG بعد از ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن های قرارگرفته در نانوذرات تری متیل کایتوزان (تزریقات با فواصل زمانی ۱۴ روز انجام شد و دو هفته بعد از بوستر سوم، میزان OD در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش گردید؛ نمونه ها شامل نانوذرات تری میل کایتوزان حاوی آنتی ژن، آنتی ژن همراه بافر، نانوذرات عاری از آنتی ژن و گروه کنترل می باشد).



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین تیتراسیون آنتی‌بادی IgG و بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی در تمامی گروه‌های آزمایش (جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر)؛ نمونه‌ها شامل آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند (آبی)، نانوذرات تری میل کایتوزان حاوی آنتی‌ژن (نارنجی)، آنتی ژن همراه بافر (سبز) و گروه‌های کنترل می‌باشد. نتایج آزمون آماری نشانگر این است که بین گروه آبی و نارنجی تفاوت معناداری مشاهده نگردید (p <۰/۰۵ ؛ NS)، ولی با گروه سبز رنگ تفاوت معنی‌دار بود.

بحث

امروزه تحقیقات گسترده‌ای به منظور بهبود روند واکسن کزاز انجام می‌شود. با گسترش علم نانو جهت تحقق بهتر اهداف واکسیناسیون از جمله افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکسن‌ها و داروها توسط آنزیم‌های هیدولایز کننده، افزایش ثبات و بهبود اختصاصیت نسبت به هدف نیاز به سیستم‌های دارورسانی نوین مرتفع گردید(۲۵-۲۳). به منظور بررسی میزان بهبود واکسن کزاز و با توجه به تحقیقاتی که درگذشته روی دیگر آنتی ژن‌ها انجام شده بود، در این تحقیق نیز ساخت نانوذرات تری متیل کایتوزان برای بررسی افزایش میزان ایمنی‌زائی برای واکسن کزاز مد نظر بود که با توجه به خاصیت قوی ادجوانت فروند در تحریک ایمنی زائی از آن به عنوان گروهی برای مقایسه میزان تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی در گروه‌های موشی با روش تزریق زیرجلدی صورت گرفت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

به منظور بررسی میزان خلوص پروتئین و عدم آلودگی در آن از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد، در تحقیقاتی که توسط تفقدی و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲۶) و همچنین Harde وهمکاران درسال ۲۰۱۵ (۲۷) صورت گرفته بود، باندها در بالای ژل جداکننده قرار گرفتندکه به‌دلیل وزن مولکولی توکسوئید حاوی فرمالدئید بوده و در این تحقیق نیز این‌گونه بود. عارف پور و همکاران، پروتئین نوترکیب زنجیره سنگین تتانوتوکسین را بیان و تخلیص نمودند(۲۸) و در ادامه این کار، نظریان و همکاران (سال ۱۳۹۳) به بررسی ایمنی‌زائی زیرواحد سنگین تتانوتوکسین پرداختند که میزان ایمنی زائی تحقیق حاضر در مقایسه با ادجوانت فروند و نانوذرات یک واحد بیش‌تر بود (میزان تولید آنتی‌بادی زیرواحد سنگین=۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)(۲۹). همان‌طوری که در بسیاری از مقالات تحقیقی تفقدی و همکاران(۳۰)، و Garinot و همکاران(۳۱) عنوان شده، یکی از انواع روش‌های ساخت نانوذرات، روش ژلاسیون یونی انتخاب بوده که در این مطالعه نیز استفاده گردید؛ چون هم مقرون به صرفه بوده و هم نانوذراتی با اندازه‌ای کوچک‌تر و مناسب‌تر را تولید می‌کند. در مقاله‌ای که توسط باقری‌پور و همکاران (سال ۹۴) انجام شد، زیر واحد نوترکیب توکسین بوتولینوم را در نانوذرات کایتوزان به صورت نانوذره سنتز کردند که اندازه نانوذرات که توسط این روش تهیه شده بودند، برابر ۳۰۰ نانومتر بوده و میزان آنتی‌بادی تولید شده با ادجوانت فروند برابر ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(۳۲). در تحقیق دیگری که توسط تفقدی و همکاران انجام شده بود(۳۰)، توکسوئید کزاز را در لیپوزوم‌هایی انکپسوله نموده بودند که سایز این ذرات در حدود ۱۰۰ نانومتر بود؛ در تحقیقی که ما انجام دادیم، اندازه نانوذرات حدوداً ۱۰۰ نانومتر بود که در مقایسه با تحقیقات موجود و به نسبت گروه ادجوانت فروند ایمنی زائی مطلوبی داشت که می‌تواند جایگزین مناسبی برای فروند باشد. از بین راه‌های ورود آنتی ژن، تزریق زیر جلدی میزان ایمنی‌زائی مناسبی به دلیل تحریک بهتر سلول‌های سیستم ایمنی ایجاد می‌نماید. در تحقیقات دیگری که به صورت خوراکی و استنشاقی انجام شده بود، با توجه به این که از خرگوش استفاده شده بود و یا آنتی‌ژن‌های متفاوتی به کار رفته بود، مقایسه مناسبی صورت نگرفت.

در نهایت در این تحقیق، در گروهی که آنتی‌ژن‌ها درون نانوذرات قرار گرفته بودند، بین موش‌هایی که نانوذرات را دریافت کرده بودند به نسبت موش‌های کنترل، تفاوت میزان IgG معنی‌دار بود؛ ولی از مقایسه گروهی که نانوذرات را دریافت کرده بودند در مقایسه با آن دسته از موش‌هایی که آنتی ژن را همراه ادجوانت دریافت کرده بودند، تفاوت معناداری مشاهده نگردید ($p < ۰/۰۵$ ؛ NS). با توجه نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشخص شد که تزریق آنتی‌ژن به تنهایی توانایی تحریک سیستم ایمنی و القای پاسخ آنتی‌بادی را ندارد. این در حالیست که با تزریق پروتئین به صورت نانوذرات، میزان تحریک سیستم ایمنی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. هم‌چنین زمانی که آنتی‌ژن همراه ادجوانت فروند تزریق شد، میزان تیتر آنتی‌بادی افزایش چشمگیری داشت؛ با آنالیز آماری بین گروه‌های آزمایش با توجه به این که اختلاف معنی‌داری بین ادجوانت فروند و نانوذرات مشاهده نگردید، نانوذرات تری متیل کایتوزان با توجه به خواص زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری و هم‌چنین ارزان بودن می‌توانند جایگزین مناسب‌تری برای ادجوانت فروند جهت تحریک سیستم ایمنی و پاسخ‌های ایمونولوژیک باشند.

References

1. Steven GF. Wassilak, Kretsinger K. Tetanus, in Bacterial Infections of Humans. Springer; 2009. p. 813-832.
2. WHO Bull. Weekly Epidemiological Record (WER). 2006; 81: 453-464.
3. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

P, Aguilera J, Osta R . Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci 2012; 13(6): 6883-6901.

4. Binz T, Rummel A. Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. J Neurochem 2009; 109(6): 1584-1595.
5. Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, et al. Tetanus. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69(3): 292-301.
6. Morihiro Matsuda, Tetanius Toxin Functional Fragment Antigen and Tatanus Vaccine, The research foundation if microbial disease of Osaka University. Osaka (JP), Patent No: US6372225 B1, Apr. 16, 2002.
7. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci 2012; 13(6): 6883-6901.
8. Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. Nat Rev Microbiol 2010; 8(9): 645-655.
9. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. J Control Release 2004; 100(1): 5-28.
10. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem Rev 2004; 104(12): 6017-6084.
11. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(4-5): 207-233.
12. Tafaghodi M, Kersten G, Jiskoot W. Nano-adjuvanted polio vaccine: Preparation and characterization of chitosan and trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with inactivated polio virus and coated with sodium alginate. Nanomed J 2014; 1(4): 220-228.
13. van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Vaccine 2003; 21(13-14): 1400-1408.
14. Casettari L, Vllasaliu D, Lam JK, Soliman M, Illum L. Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: A review. Biomaterials 2012; 33(30): 7565-7583.
15. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? J Control Release 2012; 161(2): 496-504.
16. Podrepšek GH, Knez Ž, Leitgeb M. Different preparation methods and characterization of magnetic maghemite coated with chitosan. Journal of Nanoparticle Research 2013; 15(6): 1-12.
17. Tafaghodi M, Saluja V, Kersten GF, Kraan H, Slütter B, Amorij JP, et al. Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan: Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics. Vaccine 2012; 30(36): 5341-5348.
18. Moghassemi S, Parnian E, Hakamivala A, Darzianiazizi M, Vardanjani MM, Kashanian S, et al. Uptake and transport of insulin across intestinal membrane model using trimethyl chitosan coated insulin niosomes. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015; 46(1): 333-340.
19. Atyabi F, Majzoob S, Iman M, Salehi M, Dorkoosh F. In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon. Carbohydrate Polymers 2005; 61(1): 39-51.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

20. Hamman J, Stander M, Kotze AF. Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. Int J Pharm 2002; 232(1-2): 235-242.
21. Edelstein S, Bollag MD. Protein methods. NewYork: Wiley-Liss; 1991.
22. Little SF, Webster WM, Norris SL, Andrews GP. Evaluation of an anti-rPA IgG ELISA for measuring the antibody response in mice. Biologicals 2004; 32(2): 62-69.
23. 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.
24. Jia F, Liu X, Li L, Mallapragada S, Narasimhan B, Wang Q. Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents. J Control Release 2013; 172(3): 1020-1034.
25. Chaudhury A, Das S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. AAPS Pharm Sci Tech 2011; 12(1): 10-20.
26. Harde H, Agrawal AK, Jain S. Tetanus toxoids loaded glucomannosylated chitosan based nanohoming vaccine adjuvant with improved oral stability and immunostimulatory response. Pharm Res 2015; 32(1): 122-134.
27. Aref pour MA, Nazarian SH, Olad GR, Rezaie E, Salimian J. Expression and purification of recombinant heavy chain (Hc) of Tetanus toxin in prokaryotic expression system. J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16(1): 106-113.
28. Nazarian SH, Olad GH, Arefpour MA, Salimian J, Bagheripour MJ, Minaie ME, et al. Polyclonal antibody production and purification against tet-anospasmin. Journal of Police Medicine. Summer 2014; 3(2): 101-106 (Persian).
29. Tafaghodi M, Sajadi Tabassi SA, Jaafari MR. Induction of systemic and mucosal immune responses by intranasal administration of alginate microspheres encapsulated with tetanus toxoid and CpG-ODN. Int J Pharm 2006; 319(1-2): 37-43.
30. Tafaghodi M, Jaafari MR, Tabassi SA. Nasal immunization studies by cationic, fusogenic and cationic-fusogenic liposomes encapsulated with tetanus toxoid. Curr Drug Deliv 2008; 5(2): 108-113.
31. Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. J Control Release 2007; 120(3): 195-204.
32. Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian S. Immunogenicity Effect of Chitosan Nanoparticles Containing Botulinum Neurotoxin E binding Domain Recombinant Protein in Mice. Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(124): 37-47 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]