

Synthesis and Immunogenicity Evaluation of Tetanus Toxoid Encapsulated Trimethyl Chitosan Nanoparticles

Majdedin Ghalavand¹,
Mojtaba Saadati²,
Jafar Salimian³,
Ebrahim Abbasi⁴,
Ali Ahmadi⁵

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).

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

مجدالدین قلاوند^۱مجتبی سعادت^۲جعفر سلیمیان^۳ابراهیم عباسی^۴علی احمدی^۵

چکیده

سابقه و هدف: نانوتکنولوژی، تأثیرات 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. تری متیل 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 $p < 0/05$ 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 الایزای نشان داد که سیستم ایمنی به صورت معنی داری در مقایسه با ترکیب پروتئین با فروند تحریک شده و میزان تیتراژ 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 بیش تری دارند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، تری متیل کایتوزان، ایمنی زایی، پروتئین کزاز

مقدمه

بیماری کزاز که توسط توکسین باکتری کلستری‌دیوم تنانی ایجاد می‌شود، یک عفونت کشنده مشترک بین انسان و بیش تر 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

مؤلف مسئول: مجتبی سعادت^۲ - تهران: دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی

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 آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴. استادیار، بخش واکسن‌های 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

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

تتانوس توکسین از دو جز تشکیل شده است که هر دوی آن ها برای سمیت زائی ضروری هستند، اما در بیماری زائی عملکردهای متفاوتی دارند (۶،۵). زمانی که توکسین وارد بدن شد و از طریق زیر واحد سنگین اتصال یافت، زیر واحد سبک که جز اصلی می باشد، از آزاد شدن نوروترانسمیترهای مهار جلودگیری می کند (۸،۷).

توکسوئید کزاز (شکل غیر فعال شده توکسین کزاز با فرمالدئید) مصونیت مناسبی در مقابل بیماری کزاز که یک مشکل در کشورهای در حال توسعه است، ایجاد می کند. امروزه این توکسوئید به همراه ادجوانت آلوم به عنوان واکسن مورد استفاده قرار می گیرد. ادجوانت های نمک آلومینیوم به عنوان یک انبار جهت رهایش آهسته آنتی ژن و هم چنین به منظور افزایش میزان ایمنی زائی واکسن ها مورد استفاده قرار می گیرند، هم چنین ادجوانت فروند فقط در کارهای تحقیقاتی و روی حیوانات انجام می شود. همان طور که مشخص است، استفاده از ادجوانت ها در واکسن با تحریک بهتر اجزای سیستم ایمنی منجر به افزایش ایمنی زائی می شود، استفاده از ادجوانت ها در انسان به دلیل عوارض جانبی دارای محدودیت فراوانی است، به عنوان مثال ادجوانت فروند که در تحقیقات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد، به دلیل ضررهای جانبی مجاز نمی باشد. 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 تری متیل 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 زیر واحدهای بتا-دی گلوکز آمین و

استیل گلوکز آمین می باشد که به وسیله ی یک پروسه داستیلایسون از کیتین ایجاد می شود (۱۰،۹). کایتوزان به دلیل خواصی هم چون زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، غیر آنتی ژنیک، سمیت پائین و خواص مخاط چسبی در تحقیقات مختلفی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱-۱۳). هم چنین کایتوزان دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ، مهار تومور، آنتی اکسیدان و رهایش تحت کنترل دارو نیز می باشد (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 برنامه های کاربردی دارویی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. ماده TMC در گروه های آمینی چهار تایی خود دارای بار مثبت ثابت می باشد و به همین دلیل در طیف گسترده ای از pH حلالیت خوبی در آب نشان می دهد (۱۸-۲۰).

هدف از این مطالعه استفاده از فناوری نانو جهت تهیه سنتر نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی توکسوئید کزاز و هم چنین ارزیابی ایمنی زائی آن در مقایسه با ادجوانت فروند در موش آزمایشگاهی می باشد.

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 تست های 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 میلی آمپر استفاده شد (۲۱).

سنتز نانوذرات کایتوزان و تعیین میزان کارایی

پس از اطمینان از خلوص پروتئین، جهت ساخت نانوذرات از روش ژلاسیون یونی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول تری متیل کایتوزان (۱ W/V درصد) با حل کردن پودر تری متیل 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 تری متیل کایتوزان با تری پلی فسفات (TPP) (Sigma-USA) استفاده شد که در ۳ مرحله متوالی به فواصل ۱۵ دقیقه، مقدار ۶۰ ماکرولیت از محلول سدیم تری پلی فسفات (TPP) با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به 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 واکنش های بین تری متیل 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 ۱۴۰۰g 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.

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

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 می کنیم تا در نهایت مشخص شود که چند درصد از پروتئین ها وارد نانوذرات شده اند (۱۷).

میکروسکوپ الکترونی SEM

میکروسکوپ الکترونی گذاره یا روبشی (Scanning electron microscope) بر اساس برهمکنش الکترون ها با ماده مورد نظر جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوذرات و اندازه آن ها مورد استفاده قرار گرفت.

پنل تزریق به موش

سپس به منظور بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی علیه پروتئین مورد نظر، از موش های آزمایشگاهی سوری با وزن حدود ۲۰ گرم استفاده شد. گروه های آنتی ژنی 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، گروه های 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 هم چنین میزان حجم تزریق پروتئین در موش های موجود در همه گروه های آزمایش یکسان بود (توضیحات در جدول شماره ۱ و شماره ۲ ارائه شده است) (۲۲).

روش الایزا جهت بررسی تیتراژ آنتی بادی

۲۰ روز پس از آخرین تزریق، خونگیری از سینوس چشم موش ها صورت گرفت. نمونه ها به مدت یک روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شده و پس از سانتریفیوژ (دور ۵۰۰۰rpm، دمای ۴ درجه سانتی گراد و مدت ۳۰ دقیقه)، سرم آن ها جداسازی گردید. از روش الایزای غیرمستقیم برای تیتراژ کردن آنتی بادی استفاده شد. میزان آنتی ژن مورد استفاده در هر چاهک ۲ میکروگرم بود. هم چنین رقت های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم تهیه و به هر چاهک افزوده شد. کانژوگه (آنتی بادی ضد آنتی بادی موش کانژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱:۱۵۰۰۰ به همه چاهک ها اضافه شد. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، پلیت ها با طول موج ۴۹۵ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر شرکت بیوتک خوانده شدند (۲۲).

آنالیز آماری

در نهایت اطلاعات به دست آمده از تیتراژ آنتی بادی توسط نرم افزار (GraphPad InStat) و با آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One-way Anova) و آزمون

توکی بررسی گردید $p < 0.05$ به عنوان معنی دار 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	مقدار Ag / موش	گروه اول	روش تزریق
تزریق اول	۱	۲۰ μ g	ادجوانت کامل	زیر جلدی
تزریق دوم	۱۴	۲۰ μ g	ادجوانت ناقص	زیر جلدی
تزریق سوم	۳۴	۱۰ μ g	ادجوانت ناقص	زیر جلدی
تزریق چهارم	۴۸	۸ μ g	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	روش تزریق
تزریق اول	۱	۲۰ μ g	Np+TT	HEPES+Np	زیر جلدی
تزریق دوم	۲۱	۲۰ μ g	Np+TT	HEPES+Np	زیر جلدی
تزریق سوم	۳۴	۱۰ μ g	Np+TT	HEPES+Np	زیر جلدی
تزریق چهارم	۴۸	۸ μ g	Np+TT	HEPES+Np	زیر جلدی

HEPES+TT: نانوذرات حاوی آنتی ژن (توکسوئید تانی)

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

HEPES+ TT: آنتی ژن خالی (همراه بافر)

یافته ها

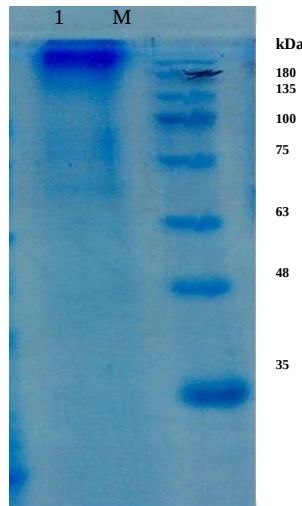
ژل الکتروفورز SDS-PAGE

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).

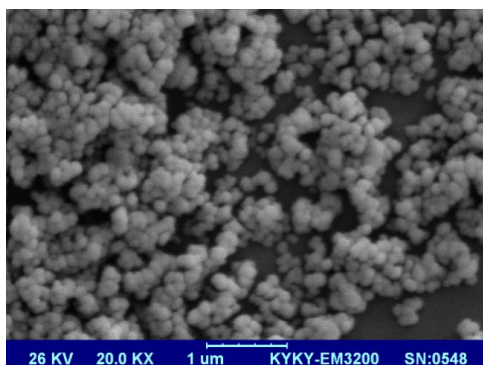
میکروسکوپ الکترونی SEM

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 آن ها 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 کراز

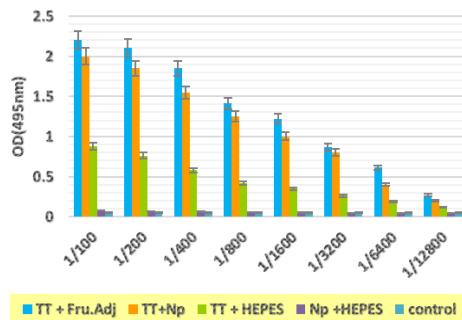


تصویر شماره ۲: نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی آنتی ژن پروتئینی؛ نانوذرات روی فویل آلومینیومی با لایه تثبیت شده و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM تصویر برداری شد

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 موش ها، میزان تحریک و فعالیت سیستم ایمنی با سنجش تیتر آنتی بادی و با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم در چند گروه آزمایش مشخص گردید

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.

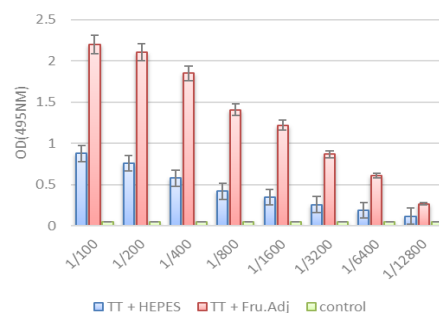


نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین تیتراسیون آنتی بادی IgG و بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی در تمامی گروه های آزمایش (جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر)؛ نمونه ها شامل آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند (آبی)، نانوذرات تری میل کایتوزان حاوی آنتی ژن (نارنجی)، آنتی ژن همراه بافر (سبز) و گروه های کنترل می باشد. نتایج آزمون آماری نشانگر این است که بین گروه آبی و نارنجی تفاوت معناداری مشاهده نگردید ($p < 0.05$)، ولی با گروه سبز رنگ تفاوت معنی دار بود.

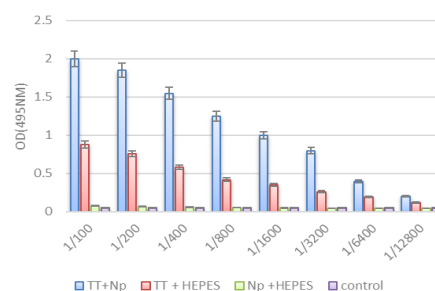
بحث

امروزه تحقیقات گسترده ای به منظور بهبود روند واکنش کزاز انجام می شود. با گسترش علم نانو جهت تحقق بهتر اهداف واکسیناسیون از جمله افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکنش ها و داروها توسط آنزیم های هیدولایز کننده، افزایش ثبات و بهبود اختصاصیت نسبت به هدف نیاز به سیستم های دارورسانی نوین مرتفع گردید (۲۳-۲۵). به منظور بررسی میزان بهبود واکنش کزاز و با توجه به تحقیقاتی که در گذشته روی دیگر آنتی ژن ها انجام شده بود، در این تحقیق نیز ساخت نانوذرات تری متیل کایتوزان برای بررسی افزایش میزان ایمنی زائی برای واکنش 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 آنتی بادی در گروه های موشی با روش تزریق زیرجلدی صورت گرفت.

(تعداد موش ها در هر گروه برابر ۵ عدد بود)؛ در گروه اول بالاترین تیتراژ آنتی بادی (آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند) برابر ۲/۲ بود که در مقایسه با گروه آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل) تفاوت معنی دار بود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱). در گروه دوم، بالاترین تیتراژ آنتی بادی (نانوذرات حاوی آنتی ژن) برابر ۲ بود که باز هم در مقایسه با گروه آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل) تفاوت معنی دار بود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۲) و در نهایت از مقایسه تمامی گروه ها به همراه کنترل هایشان مشخص گردید که نتایج در هر دو گروه تست نسبت به گروه های کنترل، معنی دار بود؛ اما از مقایسه گروه دوم که نانوذرات را دریافت کرده بودند، در مقایسه با آن دسته از موش های گروه اول که آنتی ژن را همراه ادجوانت دریافت کرده بودند، تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($p < 0.05$)؛ (NS) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۱: میانگین تیتراسیون آنتی بادی IgG بعد از ایمنی زایی با آنتی ژن 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 به همراه ادجوانت فروند، آنتی ژن همراه بافر و گروه کنترل می باشد).



نمودار شماره ۲: میانگین تیتراسیون آنتی بادی IgG بعد از ایمنی زایی با آنتی ژن های قرار گرفته در نانوذرات تری متیل کایتوزان (تزریقات

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 و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۲۷) صورت گرفته بود، باندها در بالای ژل جداکننده قرار گرفتند که به دلیل وزن مولکولی توکسوئید حاوی فرمالدئید بوده و در این تحقیق نیز این گونه 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 ایمنی زائی زیرواحد سنگین تتانوتوکسین پرداختند که میزان ایمنی زائی تحقیق حاضر در مقایسه با ادجوانت فروند و نانوذرات یک واحد بیش تر بود (میزان تولید آنتی بادی زیرواحد سنگین = ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) (۲۹). همان طوری که در بسیاری از مقالات تحقیقی تفقدی و همکاران (۳۰)، و Garinot و همکاران (۳۱) عنوان شده، یکی از انواع روش های ساخت نانوذرات، روش ژلاسیون یونی انتخاب بوده که در این مطالعه نیز استفاده گردید؛ چون هم مقرون به صرفه بوده و هم نانوذراتی با اندازه ای کوچک تر و مناسب تر را تولید می کند. در مقاله ای که توسط باقری پور 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 آنتی بادی تولید شده با ادجوانت فروند برابر ۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۳۲). در تحقیق دیگری که توسط تفقدی و همکاران انجام شده بود (۳۰)، توکسوئید کزاز را در لیپوزوم هایی 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 می تواند جایگزین مناسبی برای فروند باشد. از بین راه های ورود آنتی ژن، تزریق زیر جلدی میزان ایمنی زائی مناسبی به دلیل تحریک بهتر سلول های سیستم ایمنی ایجاد می نماید. در تحقیقات دیگری که به صورت خوراکی و استنشاقی انجام شده بود، با توجه به این که از خرگوش استفاده شده بود و یا آنتی ژن های متفاوتی به کار رفته بود، مقایسه مناسبی صورت نگرفت.

در نهایت در این تحقیق، در گروهی که آنتی ژن ها درون نانوذرات قرار گرفته بودند، بین موش هایی که نانوذرات را دریافت کرده بودند به نسبت موش های کنترل، تفاوت میزان IgG معنی دار بود؛ ولی از مقایسه گروهی که نانوذرات را دریافت کرده بودند در مقایسه با آن دسته از موش هایی که آنتی ژن را همراه ادجوانت دریافت کرده بودند، تفاوت معناداری مشاهده نگردید ($p < 0.05$ ؛ NS). با توجه نتایج به دست آمده از این تحقیق مشخص شد که تزریق آنتی ژن به تنهایی توانایی تحریک سیستم ایمنی و القای پاسخ آنتی بادی را ندارد. این در حالیست که با تزریق پروتئین به صورت نانوذرات، میزان تحریک سیستم ایمنی به طور قابل توجهی افزایش می یابد. هم چنین زمانی که آنتی ژن همراه ادجوانت فروند تزریق شد، میزان تیترا آنتی بادی افزایش چشمگیری داشت؛ با آنالیز آماری بین گروه های آزمایش با توجه به این که اختلاف معنی داری بین ادجوانت فروند و نانوذرات مشاهده نگردید، نانوذرات تری متیل کایتوزان با توجه به خواص زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری و هم چنین ارزان بودن می توانند جایگزین مناسب تری برای ادجوانت فروند جهت تحریک سیستم ایمنی و پاسخ های ایمنولوژیک 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

- 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, Tetanus Toxin Functional Fragment Antigen and Tetanus Vaccine, The research foundation of 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. Casetari 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.

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).