

تهیه و ارزیابی میزان ایمنی‌زایی نانوذرات کایتوزان حاوی تتانوتوکسین در مقایسه با ادجوانت فروند پس از تزریق زیرجلدی در مدل موشی برای بهبود واکنش کزاز

مجدالدین قلاوند^۱، مجتبی سعادت^{۲*}، جعفر سلیمیان^۳، ابراهیم عباسی^۴، یوسف تاروردی‌زاده^۵،
روح‌الله درستکار ساری^۱، مهدی فصیحی رامندی^۶، علیمحمد زند^۲

چکیده

زمینه و هدف: کزاز، یک بیماری عفونی کشنده مشترک بین انسان و بیشتر پستانداران است. واکنش کزاز نزدیک به یک قرن است که تهیه و مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف ساخت و ارزیابی میزان ایمنی‌زایی نانوذرات کایتوزان حاوی تتانوتوکسین در مقایسه با ادجوانت فروند پس از تزریق زیرجلدی در مدل موشی برای بهبود واکنش در بیماری کزاز صورت گرفت. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سنتز نانوذرات کایتوزان حاوی توکسوئید کزاز با روش ژله‌ای شدن یونی انجام شد. مورفولوژی نانوذرات با SEM و AFM مورد بررسی قرار گرفت، سپس نانوذرات به صورت زیرجلدی به موش تزریق شد و ۲ هفته بعد از اتمام تزریقات، خونگیری به عمل آمد. میزان تیتر آنتی‌بادی با روش الایزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی، در سطح $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: آنتی‌ژن با لودینگ بالا (دارای خصوصیات مورفولوژیک کروی یکنواخت و متوسط سایز برابر با ۱۴۴)، درون نانوذرات کایتوزان قرار گرفت. پس از آنالیز سرم‌ها، میزان تیتر آنتی‌بادی IgG در موش‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن به صورت نانوذرات در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری داشت، اما در گروه آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، تزریق توکسوئید کزاز با استفاده از فرآیند نانو جهت ایمنی‌زایی در مقایسه با ادجوانت فروند دارای توانایی القای پاسخ ایمنی هومورال تقریباً برابر بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن باشد.

کلید واژه‌ها: نانوذرات؛ کزاز؛ کایتوزان؛ ادجوانت فروند.

^۱مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

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

^۳مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

^۴بخش تولید واکنش‌های باکتریال، مؤسسه واکنش و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

^۵مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مجتبی سعادت، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

saadati1_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۸

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ghalavand M, Saadati M, Salimian J, Abbasi E, Tarverdzade Y, Dorostkar Sari R, et al. Preparation and evaluation of immunogenicity of chitosan nanoparticles containing tetanotoxin in comparison with freund's adjuvant in mouse model for improvement of tetanus vaccine after subcutaneous injection. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):19-28. [Full Text in Persian]

مقدمه

کزاز یک بیماری عفونی بسیار کشنده مشترک بین انسان و بیشتر پستانداران بوده که در سیستم نورولوژیک با گرفتگی‌های شدید عضلات مشخص می‌شود (۱). کلسترید یوم تاننی یکی از قوی‌ترین توکسین‌های شناسایی شده را تولید می‌کند که دوز کشنده آن تقریباً ۲/۵ نانوگرم بر کیلوگرم است؛ یعنی ۱۷۵ نانوگرم آن می‌تواند یک انسان ۷۰ کیلویی را از بین ببرد (۲-۴).

پروتئین تانوس توکسین از دو جزء تشکیل شده که هر دوی آنها برای سمیت‌زایی ضروری هستند، اما در بیماری‌زایی، عملکردهای متفاوتی دارند (۵، ۶). این توکسین به صورت یک زنجیره ۱۵۰ کیلودالتونی (~150-kDa) سنتز می‌شود، ولی در ادامه به دو قسمت تقسیم می‌شود که با یک باند دی‌سولفیدی به هم متصل هستند. زمانی که توکسین وارد بدن می‌شود از طریق زیرواحد سنگین اتصال می‌یابد، سپس زیرواحد سبک که جزء اصلی است از آزاد شدن نوروترانسمیترهای مهارتی جلوگیری می‌کند (۷، ۸). با گسترش علم نانو جهت تحقق بهتر اهداف واکسیناسیون از جمله افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکسن‌ها و داروها به وسیله آنزیم‌های هیدرولیزکننده، افزایش ثبات و بهبود اختصاصیت نسبت به هدف؛ نیاز به سیستم‌های دارورسانی نوین مرتفع گردید. در میان سیستم‌های مختلف دارورسانی، نانوذراتی که دارای خاصیت زیست تخریب‌پذیری هستند توانایی بالایی جهت انتقال عوامل درمانی از جمله انواع واکسن‌ها، داروها، ژن‌ها و پروتئین‌ها دارند (۹، ۱۰). کیتین یک پلی‌ساکارید با ساختاری فراوان در پوسته سخت پوستان است که از داستیله کردن آن یک پلی‌ساکارید کاتیونیک خطی متشکل از شبکه‌های دی‌گلوکز آمین و N-استیل گلوکز آمین به نام کایتوزان استحصال می‌شود (۱۱). کایتوزان نیز یک پلیمر پر کاربرد در علوم پزشکی و دیگر صنایع است (۱۲، ۱۳). در این تحقیق تولید نانوذرات کایتوزان، تحریک بهتر ایمنی‌زایی و افزایش پاسخ‌های سیستم ایمنی در مقایسه با ادجوانت فروند از طریق تزریق زیرجلدی، به منظور بهبود واکسن کزاز بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، پروتئین مورد نظر از مؤسسه رازی تهیه

گردید که جهت انجام تست‌های مختلف، ابتدا غلظت پروتئین با روش پروتئین‌سنجی برادفورد تعیین شد و سپس آلومین سرم گاوی (BSA) {سیناژن} به عنوان استاندارد آن در نظر گرفته شد. همچنین جهت جداسازی و تفکیک پروتئین‌ها و بررسی خلوص پروتئین، از ژل الکتروفورز (9%, 12% SDS-PAGE) با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر (در چند رقت مختلف از پروتئین) استفاده شد. در ادامه، بعد از شست‌وشو با رنگ کوماسی بلو، بررسی صورت گرفت (۱۴). در مرحله بعد جهت ساخت نانوذرات، روش ژلاسیون یونی (Ionic Gelation) به کار برده شد که ابتدا محلول کایتوزان (۱ درصد وزنی به حجمی) با حل کردن پودر کایتوزان از شرکت Sigma (با وزن مولکولی متوسط) در اسید استیک ۱٪ تهیه گردید و میزان مورد نظر از آنتی‌ژن پروتئینی به آن اضافه شد، سپس جهت ایجاد اتصالات عرضی و تشکیل نانوذرات از برهمکنش کایتوزان با (TPP (Sodium Tripolyphosphate) استفاده گردید و در ۳ مرحله متوالی به فواصل ۱۵ دقیقه، مقدار ۶۰ ماکرولیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات (TPP) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت قطره قطره اضافه شد تا اینکه حالت شفاف محلول به سمت شیری شدن تغییر پیدا کرد و کدورتی یکنواخت در محلول ایجاد شد. سپس به منظور کامل شدن واکنش‌های بین کایتوزان، TPP و آنتی‌ژن؛ اجازه داده شد تا محلول به مدت ۶۰ دقیقه در دور ۳۰۰ هم‌زده شود. در نهایت، تمام محلول وارد یک فالكون شد و عمل سانتریفوژ (در ۱۴۰۰۰ دور، به مدت ۴۰-۲۰ دقیقه) انجام گرفت، سپس نانوذرات موجود در کف، جمع‌آوری و محلول رویی دور ریخته شد. درصد انکپسولاسیون (میزان پروتئین محبوس شده در نانوذرات) از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

برای به دست آوردن نتیجه این فرمول: زمانی که سانتریفوژ به اتمام رسید، محلول رویی برداشته شد و با روش برادفورد پروتئین‌سنجی انجام گرفت و از کل پروتئین اولیه ریخته شده کم شد تا در نهایت مشخص گردید چند درصد از پروتئین‌ها وارد نانوذرات شده‌اند. جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک نانوذرات نیز از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Chine - KYKY) (SEM) و

گروه اول تزریق آنتی ژن را به همراه ادجوانت ناقص و کامل فروند دریافت کردند؛ گروه دوم تزریق آنتی ژن را به صورت نانوذرات دریافت کردند؛ گروه سوم (آنتی ژن TT به همراه بافر فسفات) و گروه چهارم (نانوذرات فاقد آنتی ژن به همراه بافر فسفات) شاهد های آزمایش بودند.

روزها و فواصل زمانی تزریق، همچنین میزان حجم تزریق پروتئین در همه گروه های آزمایش، یکسان بود (جدول شماره ۱ و ۲).

برای بررسی میزان کنتراست، زبری و صافی نمونه، اندازه نانوذرات، همچنین قابلیت مشاهده سه بُعدی نانوذرات؛ از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) {Denmark - DME} استفاده گردید.

به منظور تولید و بررسی آنتی بادی پلی کلونال علیه پروتئین مورد نظر در حیوانات آزمایشگاهی، عوامل مورد تزریق به چهار گروه (هر گروه شامل ۵ موش سوری) به شرح زیر تقسیم شدند.

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

شماره تزریق	روز	مقدار آنتی ژن/موش	گروه اول	روش تزریق
تزریق اول	۱	۲۰ میکروگرم	ادجوانت کامل	زیرجلدی
تزریق دوم	۱۴	۲۰ میکروگرم	ادجوانت ناقص	زیرجلدی
تزریق سوم	۳۴	۱۰ میکروگرم	ادجوانت ناقص	زیرجلدی
تزریق چهارم	۴۸	۸ میکروگرم	ادجوانت ناقص	زیرجلدی

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

شماره	روز	مقدار آنتی ژن	گروه دوم	شاهد	شاهد	روش تزریق
تزریق اول	۱	۲۰ میکروگرم	TT+ نانو ذرات	PBS+ نانو ذرات	PBS+TT	زیرجلدی
تزریق دوم	۲۱	۲۰ میکروگرم	TT+ نانو ذرات	PBS+ نانو ذرات	PBS+TT	زیرجلدی
تزریق سوم	۳۴	۱۰ میکروگرم	TT+ نانو ذرات	PBS+ نانو ذرات	PBS+TT	زیرجلدی
تزریق چهارم	۴۸	۸ میکروگرم	TT+ نانو ذرات	PBS+ نانو ذرات	PBS+TT	زیرجلدی

نمونه ها به مدت یک روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری و پس از سانتریفوژ (۵۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۳۰ دقیقه) سرم آنها جداسازی شد. از روش الایزای غیرمستقیم برای تیتراژ کردن آنتی بادی استفاده گردید. میزان آنتی ژن قرار گرفته در هر چاهک، ۲ میکروگرم بود. رقت های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم، تهیه و به چاهک اضافه شدند.

کانژوگه (آنتی بادی ضد آنتی بادی موش کانژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱:۱۵۰۰۰ به همه چاهک ها اضافه گردید. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، پلیت ها با طول موج ۴۹۵ نانومتر در دستگاه ELISA rider (شرکت بیوتک) خوانده شدند (۱۵).

اطلاعات به دست آمده از تیتراژ آنتی بادی توسط نرم افزار GraphPad InStat و با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تحلیل شدند. سطح معنی داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

میزان آنتی ژن تزریق شده به تناسب وزن موش ها در تزریق اول، ۲۰ میکروگرم و در یادآورها (بوستر) به ترتیب ۲۰، ۱۰، ۸ میکروگرم از پروتئین مورد نظر بود که در ۴ نوبت تزریق گردید.

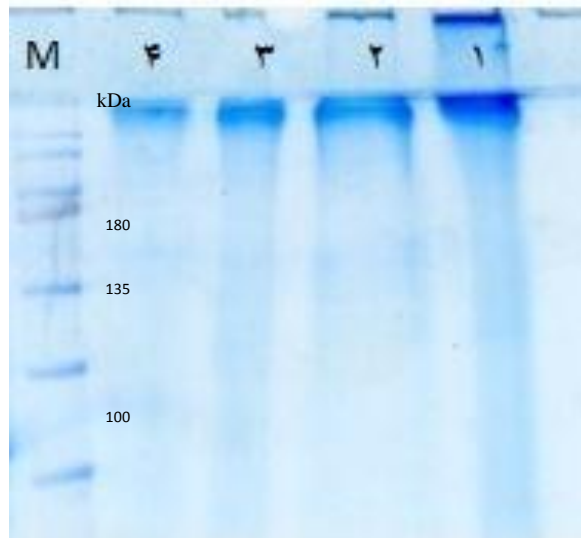
در گروه اول، هم حجم آنتی ژن، ادجوانت کامل فروند اضافه گردید و برای تزریق اول به صورت زیرجلدی استفاده شد. در سه مرحله بعد، میزان آنتی ژن تزریقی ۲۰، ۱۰ و ۸ میکروگرم به همراه ادجوانت ناقص فروند انجام گرفت. فاصله تزریق اول و دوم، ۲۰ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم نیز ۱۴ روز در نظر گرفته شد.

برای گروه دوم نیز مشابه فواصل زمانی گروه اول و هم اندازه آن نانوذرات ساخته شد و تزریق گردید. به علاوه، برای انواع حالات آزمایش؛ دو گروه شاهد یا کنترل در نظر گرفته شدند. ۲۰ روز پس از آخرین تزریق، خونگیری از سینوس چشم موش ها صورت گرفت.

یافته‌ها

مجتمع بودن تمام پروتئین به وسیله فرمالدئید، در همان بالای ژل باقی ماندند و نتیجه ژل نشان داد پروتئین خالص بوده و هیچ باند دیگری مشاهده نشد (شکل شماره ۱).

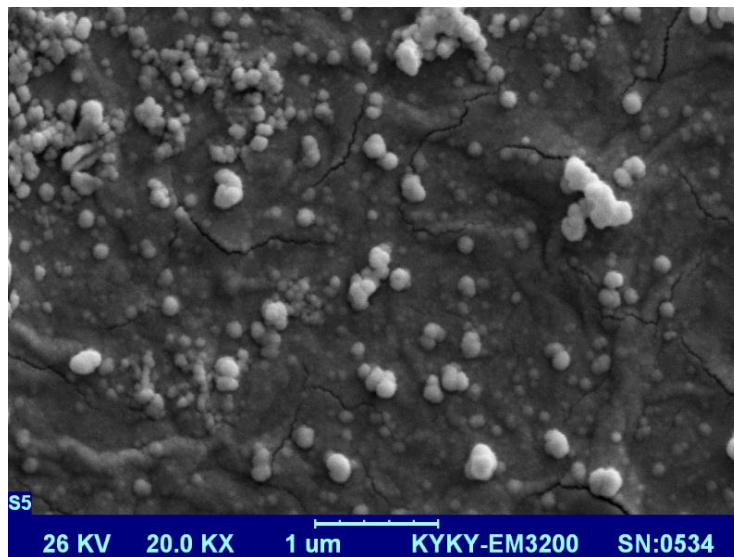
پس از انجام مراحل پروتئین سنجی به روش برادفورد، برای سنجش میزان خلوص پروتئین و اینکه پروتئین دیگری با آلودگی همراه نباشد از ژل SDS-PAGE 12% استفاده شد که به دلیل



شکل شماره ۱: الگوی الکتروفورز SDS-PAGE 12%؛ چاهک‌های M: مارکر پروتئین؛ قسمت D: چاهک ۴-۱ نمونه پروتئین؛ مابقی چاهک‌ها نمونه شاهد.

میانگین سایز نانوذرات نیز بین ۱۴۰-۱۰۰ نانومتر محاسبه گردید (شکل شماره ۲).

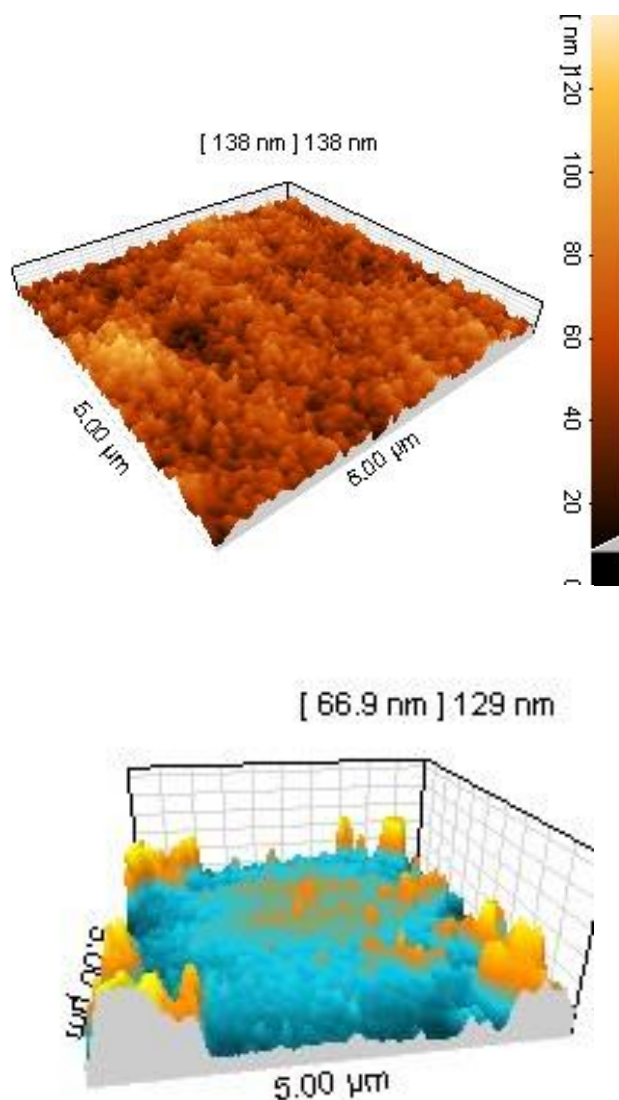
پس از ساخت نانوذرات با تصاویری که از SEM به دست آمد مشخص گردید شکل نانوذرات و توزیع آنها مناسب بوده و تجمع زیادی در آن مشاهده نشد.



شکل شماره ۲: نانوذرات کایتوزان به وسیله میکروسکوپ SEM.

برخوردار بوده است (شکل شماره ۳).

تصاویری که از میکروسکوپ اتمی (AFM) به دست آمد، نشان‌داد نانوذرات از پراکنش و سطح مناسبی



شکل شماره ۳: نانوذرات کایتوزان به وسیله میکروسکوپ AFM

آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل)، تفاوت معنی داری داشت ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۲). در نهایت، از مقایسه تمامی گروه‌ها به همراه کنترل‌هایشان مشخص گردید نتایج در هر دو گروه تست نسبت به گروه‌های کنترل، معنی دار بوده است، اما بین گروه دوم (دریافت کننده نانوذرات) با گروه اول که آنتی ژن را همراه ادجوانت دریافت کردند، تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۳). مقدار میانگین \pm انحراف معیار و میزان معنی داری در جدول شماره ۳ و ۴ آورده شده است.

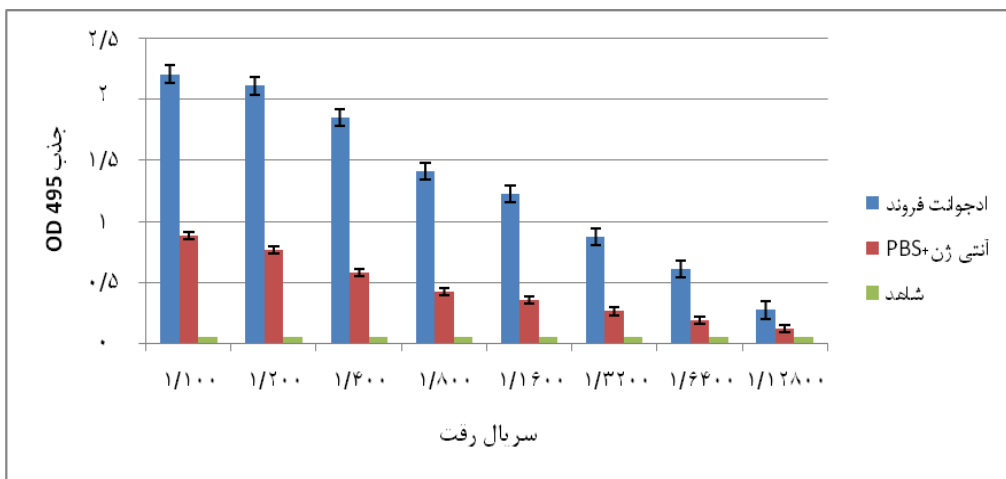
پس از ساخت نانوذرات، میزان درصد کارایی انکپسولاسیون کایتوزان برابر با ۷۶٪ به دست آمد. پس از انجام تزریقات و خونگیری از موش‌ها، میزان تیتراژ آنتی بادی پلی کلونال با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم در چند گروه آزمایش مشخص گردید (تعداد موش‌ها در هر گروه برابر ۵ عدد بود). در گروه اول بالاترین تیتراژ آنتی بادی (آنتی ژن به همراه ادجوانت فروند) برابر ۲/۲ بود که در مقایسه با گروه آنتی ژن بدون ادجوانت (کنترل)، تفاوت معنی داری داشت ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱). در گروه دوم، بالاترین تیتراژ آنتی بادی (نانوذرات حاوی آنتی ژن) برابر ۱/۸ به دست آمد که باز هم در مقایسه با گروه

جدول شماره ۳: مقایسه میزان معنی داری بین گروه های آزمایش

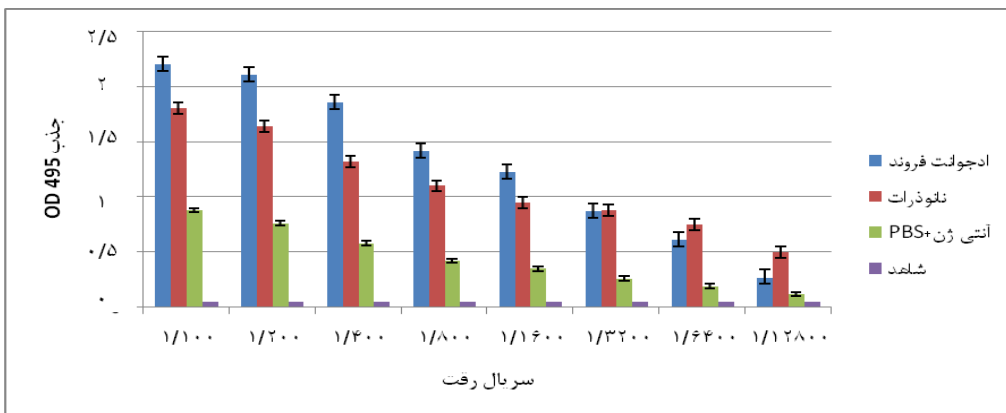
مقایسه گروه ها	خطای معیار	معنی داری
ادجوانت فروند	PBS+ژن آنتی	۰/۲۶۸۰۴۱
	نانوذرات	۰/۲۹۵۲۹۴
آنتی ژن+PBS	ادجوانت فروند	۰/۲۶۸۰۴۱
	نانوذرات	۰/۱۸۴۳۰۱
نانوذرات	ادجوانت فروند	۰/۲۹۵۲۹۴
	آنتی ژن+PBS	۰/۱۸۴۳۰۱

جدول شماره ۴: بررسی میانگین \pm انحراف معیار گروه های آزمایش

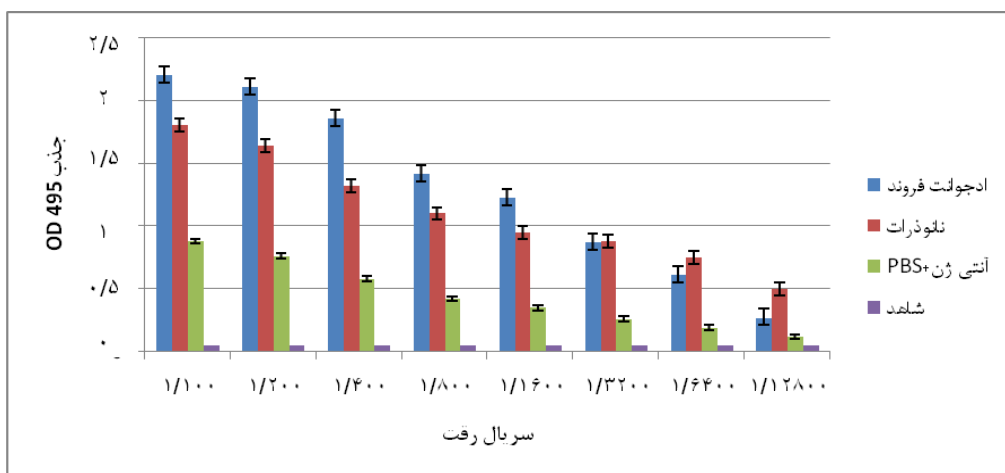
گروه ها	میانگین \pm انحراف معیار
ادجوانت فروند	۱/۳۱۷۱۳ \pm ۰/۷۰۷۳۲۷
نانوذرات	۱/۱۱۷۵ \pm ۰/۴۴۴۱۶۱
آنتی ژن+PBS	۰/۴۴۵ \pm ۰/۲۷۲۸۶۸



نمودار شماره ۱: میانگین تیتراسیون آنتی بادی IgG بعد از ایمنی زایی با آنتی ژن TT، بر پایه ادجوانت فروند.



نمودار شماره ۲: میانگین تیتراسیون آنتی بادی IgG بعد از ایمنی زایی با آنتی ژن TT، قرار گرفته در نانوذرات کایتوزان.



نمودار شماره ۳: مقایسه تیتراسیون آنتی‌بادی IgG بعد از ایمنی‌زایی در سه گروه مختلف آزمایش.

بحث

از سال ۱۹۵۰، ساخت واکسن جهت مقابله با کزاز شروع شد و هم‌اکنون سرم ضدتانوسپاسمین ساخته شده که بدن را در مقابل کزاز محافظت می‌کند (۱۷،۱۶). با گسترش علم نانو جهت تحقق بهتر اهداف واکسیناسیون از جمله افزایش نفوذ، جلوگیری از تخریب انواع واکسن‌ها و داروها به وسیله آنزیم‌های هیدرولیزکننده، افزایش ثبات و بهبود اختصاصیت نسبت به هدف؛ نیاز به سیستم‌های دارورسانی نوین مرتفع گردید (۲۰-۱۸). کایتوزان یک پلیمر نیمه کریستالی به حالت جامد است و مطالعات نشان می‌دهد از نظر بیولوژیکی قابل بازیافت بوده و خواصی همچون زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، غیرآنتی‌ژنیک، غیرسمی و دارای عملکرد زیستی می‌باشد (۲۱).

Nishimura و همکاران (سال ۱۹۸۵)، فعالیت ادجوانتی کیتین و مشتقات این پلیمر از جمله کایتوزان را در القای آنتی‌بادی‌ها با ماندگاری طولانی و تحریک ایمنی سلولی علیه آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی و عفونت ناشی از *شرشیاکلی* همراه با القای سایتوکاین‌ها، به وسیله تزریق درون صفاقی موش و خوکچه هندی مورد بررسی قرار دادند. Burbouze و همکاران (سال ۱۹۹۱) نیز طی مطالعه روی کایتوزان با درجه داستیلاسیون ۷۰٪ نشان دادند کایتوزان می‌تواند باعث القای سایتوکاین‌ها، اینترلوکین - ۱، فاکتور محرک کلونی (CSF) و ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی شود (۲۲). پس از آن Zaharoff و همکاران نشان دادند کایتوزان به صورت قابل توجهی، میزان آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن، همچنین تکثیر CD4+ اختصاصی آنتی‌ژن را پس از

تزریق زیرپوستی همراه با محلول آبی β -گالاکتوزیداز به عنوان یک مدل کایتوزان - آنتی‌ژن افزایش می‌دهد (۲۳). با توجه به انجام مطالعات پیشین بر روی آنتی‌ژن‌های مختلف؛ در این تحقیق نیز ساخت نانوذرات کایتوزان (با توجه به خواص ویژه کایتوزان از جمله: زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری و قابلیت شکستن موقت پل‌های بین‌سلولی) جهت بررسی افزایش میزان ایمنی‌زایی در واکسن کزاز مدنظر قرار گرفت. همچنین با توجه به خاصیت بسیار قوی ادجوانت‌های فروند در تحریک ایمنی‌زایی، از آن به عنوان گروهی برای مقایسه ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی در گروه‌های موشی (با روش تزریق جلدی) استفاده گردید (۲۴،۲۵). از انواع روش‌های مختلف ساخت نانوذرات؛ روش ژلاسیون یونی انتخاب شد چون هم مقرون به صرفه بوده و هم نانوذراتی با اندازه‌های کوچکتر و مناسب‌تر تولید می‌کند (۲۶،۲۷). در مطالعه حاضر پس از ساخت نانوذرات و تقسیم‌بندی گروه‌ها، ابتدا در گروهی که آنتی‌ژن به همراه ادجوانت کامل و ناقص فروند تزریق شد تحریک ایمنی‌زایی بالا و افزایش میزان IgG مشاهده گردید که در کنار آن گروه شاهد فاقد ادجوانت، تفاوت معنی‌داری با گروه ادجوانت داشت ($p < 0.05$). همچنین در گروهی که آنتی‌ژن‌ها درون نانوذرات قرار گرفته بودند (به همراه چند گروه شاهد)، بین موش‌های دریافت‌کننده نانوذرات نسبت به سایر موش‌ها، تفاوت میزان IgG معنی‌دار بود، ولی از مقایسه گروهی که نانوذرات را دریافت کرده بودند در مقایسه با آندسته از موش‌هایی که آنتی‌ژن را همراه ادجوانت دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری

زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری به‌عنوان جایگزین مناسب‌تری برای ادجوانت فروند استفاده کرد.

نتایج این تحقیق نشان داد تزریق آنتی‌ژن به تنهایی، توانایی القای پاسخ آنتی‌بادی را ندارد. این در حالی است که با تزریق پروتئین به‌صورت نانوذرات، میزان ایمنی هومورال و پاسخ آنتی‌بادی به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. همچنین زمانی که آنتی‌ژن همراه ادجوانت فروند تزریق شود میزان تیتراژ آنتی‌بادی افزایش چشمگیری دارد. با توجه به اینکه در آنالیز آماری بین گروه‌های آزمایش، اختلاف معنی‌داری بین ادجوانت فروند و نانوذرات مشاهده نشد، لذا می‌توان از نانوذرات کایتوزان با توجه به خواص

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی اساتید، دوستان و همکاران دانشگاه‌های بقیه‌الله (عج)، جامع امام حسین (ع) و معاونت پژوهشی بیمارستان بقیه‌الله (عج) که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، سپاسگزاریم.

References:

1. Roper MH, Vandelaer JH, Gasse FL. Maternal and neonatal tetanus. *Lancet* 2007;370(9603):1947-59.
2. Slonczewski JL, Foster JW. *Microbiology: An evolving science*. 3rd ed. New York: W. W. Norton & Company; 2013.
3. Atkinson WS, Hamborsky J. *Centers for disease control and prevention epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. Pink Book. Washington, DC: Public Health Foundation; 2016.
4. Wassilak SG, Kretsinger K. *Tetanus in bacterial infections of humans*. USA: Springer; 2009. p. 813-32.
5. Farrar JJ, Yen L, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, et al. Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2000;69(3):292-301.
6. Matsuda M, 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 P, Osta R, Fragment C of tetanus toxin: New insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci* 2012;13(6): 6883-901.
8. Salinas S, Schiavo G, Kremer J. A hitchhiker's guide to the nervous system: The complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(9):645-55.
9. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Control Release* 2006;116(1):1-27.
10. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;75(1):1-18.
11. Chaturvedi M, Kumar M, Pathak K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *J Adv Pharm Technol Res* 2011;2(4):215-22.
12. Casettari L, Vllasaliu D, Lam KW, Soliman M, Illum L. Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: A review. *Biomaterials* 2012;33(30):7565-83.
13. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J Control Release* 2012;161(2):496-504.
14. Edelstein S, Bollag MD. Concentrating protein solutions. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 74.

15. Little SF, Webster WM, Norris SLW, Andrews GP. Evaluation of an anti-rPA IgG ELISA for measuring the antibody response in mice. *Biologicals* 2004;32(2):62-9.
16. Danilova E, Shirayayev A, Kristoffersen EK, Sjursen H. Attenuated immune response to tetanus toxoid in young healthy men protected against tetanus. *Vaccine* 2005;23(42):4980-3.
17. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe E. *Epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases*. 10th ed. US: Centre for Disease Control and Prevention, Public Health Foundation; 2007.
18. 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;6:765-74.
19. 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):1020-34.
20. Chaudhury A, Das S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. *AAPS Pharm SciTech* 2011;12(1):10-20.
21. 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):207-33.
22. Chakraborty S, Liao IC, Adler A, Leong KW. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009 Oct 5;61(12):1043-54.
23. Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 2007;25(11):2085-94.
24. Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, Das Neves J, Sosnik A, Sarmiento B. Review article Chitosan-grafted copolymers and chitosan-ligand conjugates as matrices for pulmonary drug delivery. *Int J Carbohydrate Chem* 2011;1-14.
25. van der Merwe SM, Verhoef JC, Kotze AF, Junginger HE. N-trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitablet and granule formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57(1):85-91.
26. Tafaghodi M, Sajadi Tabassi SA, Jaafari MR. Induction of systemic and mucosal immune responses by intranasal administration of alginate microspheres encapsulated with tetanus oxoid and CpG-ODN. *Int J Pharm* 2006;319(1-2):37-43.
27. 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):108-13.

Preparation and Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing Tetanotoxin in Comparison with Freund's Adjuvant in Mouse Model for Improvement of Tetanus Vaccine after Subcutaneous Injection

Majdedin Ghalavand¹, Mojtaba Saadati^{2*}, Jafar Salimian³, Ebrahim Abbasi⁴, Yosuf Tarverdizade², Rouhollah Dorostkar Sari¹, Mahdi Fasihi Ramandi⁵, Ali Mohammad Zand²

¹Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Biology Research Center, Faculty & Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

³Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Department of Human Bacterial Production of Vaccine, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran.

⁵Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Mojtaba Saadati, Biology Research Center, Faculty & Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email:
saadati1_m@yahoo.com

Received: 18 Feb, 2016

Accepted: 7 May, 2016

Abstract

Background and Objectives: Tetanus is a deadly zoonotic infectious disease. For nearly a century, tetanus vaccine has been produced and used. This study was carried out with the aim of preparation and evaluation of immunogenicity of chitosan nanoparticles containing tetanotoxin in comparison with Freund's adjuvant in mouse model for improvement of tetanus vaccine after subcutaneous injection.

Methods: In this experimental study, chitosan nanoparticles synthesis containing tetanus toxoid was performed using ionic gelation method. The morphology of nanoparticles was investigated using SEM and AFM, then, the nanoparticles were subcutaneously injected into mice and two weeks after the end of injection, blood was taken. Antibody titer was measured by indirect ELISA. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test at significance level of $p < 0.05$.

Results: High-load antigen (uniform spherical morphology and the mean size of 144), were encapsulated in chitosan nanoparticles. After serum analysis, IgG antibody titer was significantly different between the mice that received antigen as nanoparticle and the control group, but no significant difference was observed in the antigen with Freund's adjuvant group.

Conclusion: Based on the results of this study, tetanus toxoid injection using nanoprocess is able to induce humoral immune response almost equal to Freund's adjuvant and can be an appropriate alternative.

Keywords: Nanoparticles; Tetanus; Chitosan; Freund's adjuvant.