مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، بهمن ۱۳۹۴، ۹۳۸-۹۲۳

تهیه نانو واکسن نوترکیب نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E بر پایه کیتوسان و مقایسه ایمنی‌زایی آن به دو روش تزریقی و خوراکی در موش سوری

محمد جواد باقری‌پور[۱]، فیروز ابراهیمی[۲]، عباس حاجی‌زاده[۳]، شهرام نظریان[۲]، محمدعلی عارف‌پور[۴]

دریافت مقاله: ۹۴/۲/۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۴/۴/۱۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۶/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۸/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: بیماری بوتولیسم در اثر مسمومیت با یکی از هفت نوروتوکسین بوتولینوم ایجاد می‌شود. زیر واحد اتصالی این سموم ایمونوژن بوده و کاندید واکسن نوترکیب زیر واحدی علیه این بیماری می‌باشند. با توجه به ایمنی‌زایی پایین پروتئین نوترکیب، استفاده از حاملین مناسب جهت رسانش آنتی‌ژن به سلول‌های هدف، اجتناب‌ناپذیر است. هدف از این تحقیق، ارزیابی استفاده از نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل در تجویز خوراکی و تزریقی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی Botulinum Neurotoxin type E (BoNT/E) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E با روش ژلاسیون یونی تهیه و به صورت خوراکی و تزریقی به ۵ گروه موش سوری تجویز شدند. تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نوروتوکسین بوتولینوم با روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، تمام گروه‌ها با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E چالش شدند و داده‌های بدست آمده با آزمون t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان تولید آنتی‌بادی IgG ضد نوروتوکسین بوتولینوم پس از هر بار تزریق در همه گروه‌های مورد آزمون، افزایش یافت. استفاده از نانوذرات کیتوسان، افزایش معنی‌داری در میزان تولید آنتی‌بادی IgG ضد نوروتوکسین بوتولینوم به دنبال نداشت ($p>0.05$). با مقایسه تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نوروتوکسین بوتولینوم در موش‌های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن از طریق خوراکی و تزریقی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$). در چالش با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E، موش‌هایی که به صورت خوراکی ایمن شده بودند، ۵۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد پروتئین نوترکیب BoNT/E به تنهایی قادر است از طریق سیستم گوارش، جذب و منجر به بروز پاسخ ایمنی مؤثر شود. نتایج چالش نشان داد پاسخ ایمنی ایجاد شده در تجویز خوراکی، مؤثر و در تجویز تزریقی ناکارآمد بود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات کیتوسان، واکسن خوراکی، ژلاسیون یونی، واکسن نوترکیب، نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E

۱- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
تلفن: ۷۷۱۰۴۹۳۴-۰۲۱، دورنگار: ۷۷۱۰۴۹۳۵-۰۲۱، پست الکترونیکی: febrhimi@ihu.ac.ir
۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

مقدمه

بوتولیسم بیماری خطرناکی است که در اثر تماس با نوروتوکسین‌های بوتولینوم ایجاد می‌شود. در میان نوروتوکسین‌های بوتولینوم، عمدتاً انواع A، B و E برای انسان بیماری‌زا هستند. تاکنون تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن واکسن مناسب علیه این نوروتوکسین‌ها صورت گرفته است. در حال حاضر تنها واکسن موجود در برخی کشورهای پیشرفته، یک واکسن توکسوئیدی پنج‌گانه بر علیه تیپ‌های A تا E می‌باشد. مشکلات موجود در تهیه واکسن‌های توکسوئیدی 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 پژوهشگران تحقیق بر روی واکسن‌های نوترکیب را در اولویت اول تحقیقات خود قرار دهند. در این نوع واکسن‌ها از نواحی خاصی از توکسین که توانایی تحریک سیستم ایمنی را داشته و فاقد اثرات سمی هستند، استفاده می‌شود [۶-۱].

با توجه به خاصیت ایمونوژنی زیر واحد اتصال‌دهنده توکسین، استفاده از پروتئین نوترکیب این زیر واحد به عنوان کاندید واکسن، مورد توجه قرار دارد. به منظور بهبود کارایی واکسن‌های زیر واحدی باید از ادجوان‌ها یا سیستم‌های مناسب تحویل آنتی‌ژن استفاده نمود. برای این منظور، امروزه سامانه‌های رهایش آنتی‌ژن مبتنی بر نانو و میکروذرات به صورت گسترده‌ای مورد توجه و استفاده محققین قرار گرفته است [۹-۷].

واکسن‌ها را می‌توان به طرق مختلف از جمله تزریقی، خوراکی و استنشاقی استفاده نمود. تجویز خوراکی، به دلیل ماهیت غیرتهاجمی آن، مسیر مناسبی برای تجویز واکسن می‌باشد. از جمله ویژگی‌های این روش نسبت به روش تزریقی، عدم احساس درد و ناراحتی و نیز کاهش احتمال آلودگی است. با این حال، واکسن‌های تجویز شده، باید بتوانند در برابر شرایط اسیدی معده و محیط روده مقاومت کنند. به طور معمول، پپتیدها و پروتئین‌ها زمانی که به صورت خوراکی تجویز شوند، به دلیل نفوذ پذیری کم مخاط و عدم پایداری‌شان در محیط دستگاه گوارش و در نتیجه تخریب آنها قبل از جذب، دسترسی زیستی ضعیفی نشان می‌دهند. طیف وسیع آنزیمی و شرایط فیزیکی شیمیایی دستگاه گوارش، محیطی نامناسب را برای بسیاری از واکسن‌های خوراکی ایجاد می‌کند [۱۱-۱۰]. اگر چه در حال حاضر بیشتر واکسن‌های مؤثر و کاربردی به شکل تزریقی تهیه می‌شوند، اما مؤسسات تحقیقاتی به دنبال توسعه واکسن‌های خوراکی هستند. استفاده از واکسن‌های خوراکی دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به ایجاد تحمل خوراکی و کارا نبودن، هضم و تخریب ساختار واکسن در دستگاه گوارش و عدم ارسال صحیح و سالم آن به نواحی جذب گوارشی اشاره کرد که در نتیجه منجر به عدم تحریک سیستم ایمنی بدن می‌گردد [۱۲].

تاکنون مطالعات زیادی به منظور یافتن راه‌کارهای مختلف برای بهینه‌سازی و افزایش تحویل خوراکی پپتیدها و پروتئین‌های درمانی صورت گرفته است. تغییر شیمیایی واکسن‌های پروتئینی، استفاده از حاملین

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

اختصاصی، بکارگیری مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی، ترکیبات افزایش و تقویت‌کننده جذب، پلیمرهای متصل شونده به مخاط گوارشی و استفاده از پاتوژن‌های گوارشی دستکاری شده برای حمل واکسن‌ها از جمله این راه‌کارها می‌باشند. یکی از روش‌های پیشنهادی برای افزایش دسترسی زیستی در تجویز خوراکی، استفاده از حامل‌های کلوئیدی از قبیل امولسیون‌ها، لیپوزوم‌ها، نانوذرات پلیمری و دندریمرها، می‌باشد. از جمله مزایای نانوذرات پلیمری نسبت به سایر حامل‌های کلوئیدی مانند لیپوزوم‌ها، می‌توان به امکان تجویز مؤثر واکسن به بافت‌های مخاطی و محافظت آنتی‌ژن در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک هنگام تجویز مخاطی اشاره کرد [۱۵-۱۳].

استفاده از پلیمرها به عنوان حامل واکسن، نه تنها باعث محافظت در برابر شرایط اسیدی و پروتئازهای دستگاه گوارش خواهد شد، بلکه با رهایش آهسته و طولانی‌مدت آنتی‌ژن و عرضه آن به سیستم ایمنی بدن، پاسخ ایمنی مؤثر ایجاد خواهد شد. برای این منظور می‌توان از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار مختلفی استفاده نمود که به صورت طبیعی و یا مصنوعی تولید می‌شوند [۱۶]. ماهیت پلیمر و خواص فیزیکوشیمیایی آن، تأثیر قابل‌توجهی بر اندازه نانوذرات و مشخصات رهایش آنها خواهد داشت. کیتوسان از جمله پلیمرهای طبیعی است که به دلیل نفوذپذیری زیاد و خصوصیات ویژه‌اش، در تحقیقات اخیر بسیار مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸-۱۷]. روش‌های مختلفی برای فرمولاسیون نانوذرات وجود دارد که در این میان، روش ژلاسیون یونی برای ساخت نانوذرات از پلیمرهای طبیعی هیدروفیل مانند ژلاتین، آلژینات و کیتوسان کاربرد فراوانی دارد [۲۰-۱۹]. از آنجا که سم کلستریدیوم بوتولینوم یکی از قوی‌ترین سموم کشنده باکتریایی برای انسان بوده و سبب بروز مسمومیت غذایی می‌گردد و از طرفی نیز واکسیناسیون تزریقی همواره مسائلی از قبیل واکنش‌های التهابی احتمالی و اثرات روانی تزریق واکسن در افراد جامعه را به دنبال دارد، دستیابی به روش ایمن‌سازی مناسبی از قبیل تجویز خوراکی برای مقابله با بیماری ناشی از توکسین کلستریدیوم ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از این تحقیق، فرمولاسیون نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E و بررسی میزان ایمنی‌زایی آن پس از تجویز تزریقی و خوراکی به موش بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از شرکت Sigma-Aldrich (ساخت کشور آلمان)، سدیم تری پلی فسفات از شرکت Scharlau (ساخت کشور اسپانیا)، مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک آلمان، سیناژن ایران، کیاژن آلمان و فرمنتاز آلمان تهیه شد. پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی نورورتوکسین بوتولینوم تیپ E از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه شد. این مطالعه در سال ۱۳۹۳ و در مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشکده و پژوهشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع)، صورت گرفت.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

روش تهیه نانوذرات کیتوسان: برای تهیه نانوذرات کیتوسان از روش ژلاسیون یونی استفاده شد [۲۲-۲۰]. در این روش، کیتوسان در محیط اسیدی به علت باردار شدن گروه‌های آمینی موجود در آن به شکل پلی کاتیونی در آمده و می‌تواند به گروه‌های دارای بار منفی مانند سولفات و فسفات متصل شود. سدیم تری پلی فسفات، پلی آنیونی است که می‌تواند از راه برقراری نیروهای الکترواستاتیکی بین گروه‌های فسفات خود و گروه‌های آمینی کیتوسان به پلیمر متصل شود.

۵ میلی‌لیتر محلول سدیم تری پلی فسفات با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت قطره قطره و در طول مدت زمانی یک ساعت، به ۷/۵ میلی‌لیتر محلول کیتوسان با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در اسید استیک ۲٪ حاوی پروتئین، در حالی که بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفته بود، اضافه شد. ایجاد کدورت در محلول، نشان از تشکیل ژل کیتوسانی دارد و تأییدکننده برقراری نیروهای الکترواستاتیکی بین گروه‌های فسفات سدیم تری پلی فسفات و گروه‌های آمینی کیتوسان است. پس از تشکیل نانوذرات، محلول کلوئیدی به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس رسوب حاصله که شامل نانوذرات می‌باشد، جهت سیر مراحل آماده‌سازی و تجویز، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از تهیه نانوذرات، مقداری از آن را بر روی فویل آلومینیومی قرار داده و سپس اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. از این نمونه، جهت تهیه تصویر SEM با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO-1455VP ساخت کشور انگلستان و متعلق به مؤسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش استفاده شد. همچنین جهت بررسی اندازه نانوذرات از دستگاه DLS مدل Malvern ساخت کشور انگلستان متعلق به دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله استفاده شد.

بررسی ایمنی‌زایی نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن: جهت بررسی ایمنی‌زایی، از پنج گروه موش استفاده شد. موش‌ها از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه و در تمامی مراحل،کارهای انجام شده بر روی حیوانات، مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزما-یشگاهی بود. هر گروه شامل ۱۰ سر موش سوری ماده ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم بود. تجویز به صورت تزریقی و خوراکی صورت گرفت. به گروه اول، نانوذرات کیتوسان همراه با آنتی‌ژن به صورت خوراکی تجویز شد. به عنوان کنترل، گروه دوم تنها آنتی‌ژن و گروه سوم تنها نانوذرات (بدون آنتی‌ژن) را به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم نیز نانوذرات کیتوسان همراه با آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کردند. به عنوان کنترل، به گروه پنجم نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن تزریق شد. در تجویز تزریقی، به هر موش نانوذرات کیتوسان حاوی ۱۵ میکروگرم آنتی‌ژن به صورت زیرجلدی تزریق گردید. در همه گروه‌ها، تجویز خوراکی و تزریقی در چهار نوبت و با فواصل ۱۴ روز انجام شد [۲۳].

سنجش تیتر آنتی‌بادی ضد نوروتوکسین: در فواصل ۸ روز پس از هر تجویز، از گوشه چشم حیوانات خونگیری به عمل آمد. نمونه‌های خون به داخل میکروتیوپ منتقل و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

پس از یک ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سرم جدا شده، در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. میزان آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم سرم، به روش الایزا مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت [۲۵-۲۴].

چاهک‌های پلیت الایزا با پروتئین نوترکیب به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر با استفاده از بافر کربنات/بی‌کربنات (pH=۹/۶) در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شدند. دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد، داخل یکی از چاهک‌ها آنتی‌ژن و بافر کوتینگ و در چاهک دیگر، تنها بافر کوتینگ ریخته شد. چاهک‌ها با بافر PBST (PBS -0.05% Tween 20) شستشو و به منظور جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته سرم و کانژوگه، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (Blocking Buffer) (محلول شیرخشک ۵ درصد در بافر PBST) ریخته و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

پس از شستشوی دوباره، سرم موش‌ها از رقت ۱/۱۰۰ به صورت سریال رقت دوگانه به چاهک‌ها اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو و خشک کردن، ابتدا رقت ۱/۲۰۰۰ از کانژوگه (Anti mouse IgG HRP Conjugate) در PBST تهیه و از آن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون هر چاهک ریخته شد و در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری گردید. پس از شستشو و خشک‌کردن، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا حاوی محلول OPD (O- Phenilene Diamine) به هر چاهک اضافه و میکروپلیت در محل تاریکی نگهداری شد تا واکنش انجام گیرد. پس از تغییر رنگ محلول، واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف گردید. بعد از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد. درون‌سنجی و میان‌سنجی برای بررسی وضعیت تکرارپذیری روش الایزا با استفاده از نمونه مثبت و منفی انجام گرفت.

چالش موش‌های ایمن‌شده: به منظور چالش موش‌های ایمن‌شده، ابتدا میزان LD_{50} نوروتوکسین محاسبه شد. پس از آن، نوروتوکسین غیرفعال با استفاده از آنزیم تریپسین فعال شد و سپس گروه‌های مختلف با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ برابر LD_{50} به صورت داخل صفاقی و با حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر مورد چالش قرار گرفتند [۲۷-۲۶]. شاخص LD_{50} میزان سمیت یک ماده را مشخص نموده و نمایانگر حداقل میزان سم مورد نیاز برای کشتن ۵۰٪ از جمعیت حیوان آزمایشگاهی مورد مطالعه می‌باشد.

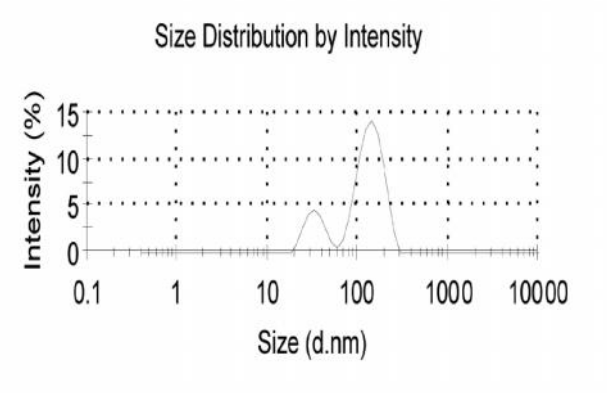
تجزیه و تحلیل آماری: بررسی تفاوت‌های معنی‌دار آماری در مورد تیتر آنتی‌بادی اختصاصی بوسیله آزمون‌های T-test و Anova (Duncan) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS, Inc. Chicago, IL) نسخه ۱۶ انجام شد.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

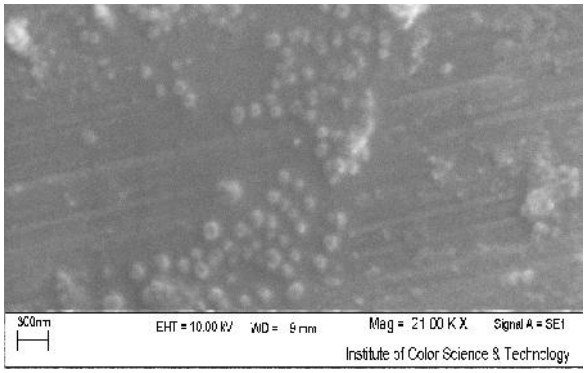
[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

نتایج

مشخصات نانوذرات کیتوسان تولیدی: نتایج دستگاه DLS بیانگر تولید نانوذرات کیتوسان با میانگین اندازه ۲۸۵ نانومتر بود (نمودار ۱). تصاویر بدست آمده نیز اندازه نانوذرات را کمتر از ۳۰۰ نانومتر نشان می‌داد (شکل ۲). بعد از بهینه‌سازی شرایط تهیه نانوذرات، میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات، حدود ۰٪۹۱ بود.

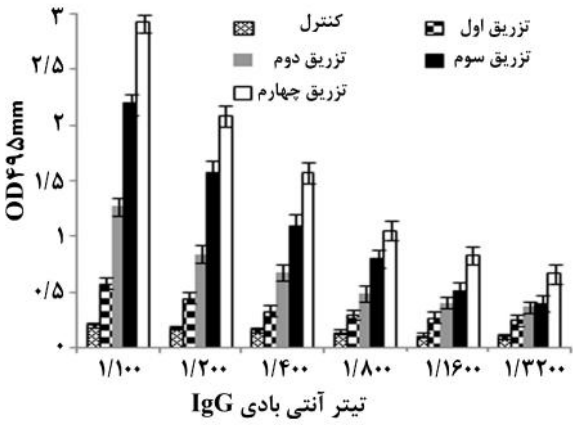


نمودار ۱- توزیع اندازه نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E



شکل ۱- نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E (نانوذرات خشک شده بر روی فویل آلومینیومی، روی گرید قرار گرفته و پس از پوشش‌دهی با لایه طلا، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO-1455VP تصویربرداری شد)

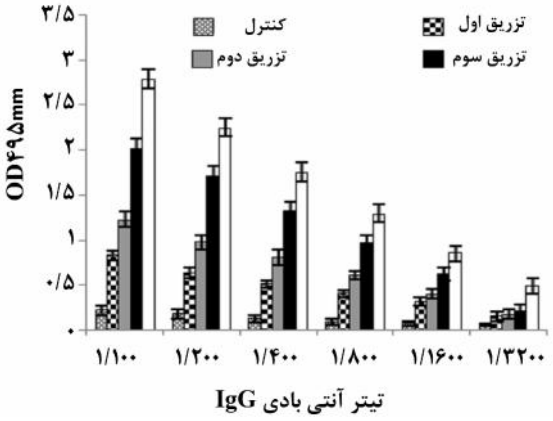
مقایسه تیتر IgG ضد نوروتوکسین بوتولینوم در گروه‌های مورد مطالعه: در آزمون الایزا میانگین و انحراف معیار جذب نوری کنترل مثبت ۱/۶۲±۰/۰۸ و کنترل منفی۰/۰۲۶± ۰/۱۲۳ تعیین شد. با استفاده از فرمول CV % =SD/X × 100 ، ضریب تغییرات برای کنترل مثبت و منفی به ترتیب ۴/۹۳ و ۲۱/۱۳ درصد بود. نتایج واکنش الایزا جهت سنجش میزان آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم نمونه‌های سرم جدا شده از مراحل مختلف خونگیری، در نمودارهای ۲ تا ۴ نشان داده شده است.



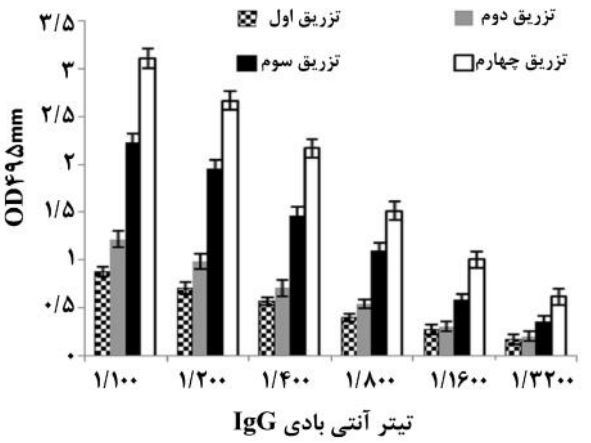
نمودار ۲- میانگین تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم پس از تجویز تزریقی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن
(نمونه‌های تست شامل نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و نمونه کنترل شامل نانوذرات فاقد آنتی‌ژن است. فواصل زمانی تزریق در هر دو گروه تست و کنترل، ۱۴ روز و زمان خونگیری، ۸ روز پس از هر تزریق بود. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تزریق اول، ۰/۵۸ و در تزریق چهارم ۲/۹ بود)

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]



نمودار ۳- میانگین تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم پس از تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن
(نمونه‌های تست شامل نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و نمونه کنترل شامل نانوذرات فاقد آنتی‌ژن است. تجویز در هر دو گروه به صورت خوراکی و در فواصل زمانی ۱۴ روز انجام شد. خونگیری، ۸ روز پس از هر تجویز صورت گرفت. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تجویز اول، ۰/۸۳ و در تجویز چهارم ۲/۸ بود)



نمودار ۴- میانگین تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم پس از تجویز خوراکی آنتی‌ژن
(نمونه شامل آنتی‌ژن به تنهایی است. تجویز به صورت خوراکی و در فواصل زمانی ۱۴ روز انجام شد. خونگیری ۸ روز پس از هر تزریق صورت گرفت. میزان OD رقت ۱/۱۰۰ در تجویز اول، ۰/۸۸ و در تجویز چهارم ۳/۱ بود)

افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند در نمودار ۲ دیده می شود. نمودار ۳ بیانگر این است که تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن نیز همانند گروهی که به صورت تزریقی، تجویز شده بودند، منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم در هر مرحله شده است. بر طبق آنچه که در نمودار ۴ آورده شده است در گروهی که آنتی‌ژن به تنهایی و به صورت خوراکی تجویز شده بود، نیز در هر مرحله شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۱۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳/۱ بود.

نتایج بدست آمده از تیتر آنتی‌بادی نشان داد در موش‌های ایمن شده خوراکی با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن، تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم به صورت بارزی بالاتر از گروه کنترل دریافت کننده نانوذره کیتوسان ($p<۰/۰۱$) بود (جدول ۱).

گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی آنتی‌ژن به صورت تزریقی نیز به صورت معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده نانوذره کیتوسان تزریقی ($p<۰/۰۵$) تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم بالاتری را نشان داد. تفاوت معنی‌داری بین تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و آنتی‌ژن به تنهایی خوراکی دیده نشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج تیتر آنتی‌بادی نشان داد در موش‌های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن از طریق خوراکی افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم نسبت به موش‌های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن از طریق تزریقی تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

جدول ۱- آنالیز آماری پاسخ های هومورال (IgG تام ضد نورتوکسین بوتولینوم) در موش‌های ایمن شده با فرمولاسیون‌های مختلف

آزمون		گروه‌های مورد آزمون		میانگین تیتر آنتی‌بادی	میانگین خطای انحراف معیار	انحراف معیار	F	معنی‌داری آزمون
T-test	۱	خوراکی	نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۷۱۰	۰/۲۴۱۰۲	۰/۵۹۰۳۷	۰/۱۲	۰/۷۳۷
			آنتی‌ژن به تنهایی	۱/۰۷۲۵	۰/۲۱۹۶۹	۰/۵۳۸۱۲		
	۲	خوراکی	نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۷۱۰	۰/۲۴۱۰۲	۰/۵۹۰۳۷	۱۲/۴۰۴	۰/۰۰۶
			نانوذره به تنهایی	۰/۱۲۵۷	۰/۰۲۵۲۷	۰/۰۶۱۸۹		
	۳	خوراکی	آنتی‌ژن به تنهایی	۱/۰۷۲۵	۰/۲۱۹۶۹	۰/۵۳۸۱۲	۱۵/۷۳	۰/۰۰۳
			نانوذره به تنهایی	۰/۱۲۵۷	۰/۰۲۵۲۷	۰/۰۶۱۸۹		
	۴	تزریقی	نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۱۷۸	۰/۲۰۴۱۶	۰/۵۰۰۰۸	۱۰/۰۳	۰/۰۱۰
			نانوذره به تنهایی	۰/۱۵۸۷	۰/۰۱۵۹۸	۰/۰۳۹۱۳		
	۵	خوراکی تزریقی	نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۷۱۰	۰/۲۴۱۰۲	۰/۵۹۰۳۷	۰/۴۰۱	۰/۵۴۱
			نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۱۷۸	۰/۲۰۴۱۶	۰/۵۰۰۰۸		
Anova (Duncan)	۶	خوراکی تزریقی	نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۷۱۰	----	----	۰/۱۲۵	۰/۸۳۳
			آنتی‌ژن به تنهایی	۱/۰۷۲۵	----	----		
			نانوذرات حاوی آنتی‌ژن	۰/۹۱۷۸	----	----		

مقایسه چالش موش‌های مورد مطالعه با نوروتوکسین بوتولینوم: پس از اندازه‌گیری و بررسی میزان آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم در گروه‌های مختلف، موش‌های ایمن شده با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E چالش شدند. نتایج چالش نشان داد گروهی که نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن و همچنین گروهی که آنتی‌ژن به تنهایی را به صورت خوراکی دریافت کرده بودند، توانستند ۵۰۰ برابر دوز کشنده توکسین را تحمل کنند اما گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند، علی‌رغم تولید آنتی‌بادی، نتوانستند حتی ۵۰ برابر دوز کشنده را تحمل نمایند.

بحث

نوروتوکسین‌های 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 عضلانی پیش‌رونده می‌شوند که در موارد حاد، غالباً با مرگ همراه است [۵-۴]. نتایج بررسی‌های همه‌گیرشناسی نشان می‌دهد که بیشترین موارد ابتلاء به بوتولیسم در ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

مربوط به نوع E می‌باشد [۲۸]. 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 [۵].

یکی از راه‌های ایمنی‌زایی در بدن، مصرف واکسن‌های خوراکی است که امروزه مطالعات زیادی در این خصوص در جهان صورت گرفته است. برای طراحی واکسن‌های خوراکی باید فاکتورهایی مانند پایداری در اسیدیته بالای معده، پایداری و مقابله با پروتئازهای دستگاه گوارش، حلالیت واکسن‌ها در pH نزدیک به خنثی، نفوذپذیری از دیواره روده و غشاء پایه و ورود به جریان خون را در نظر داشت. پایدارسازی، هدایت و افزایش جذب واکسن‌های خوراکی به صورت تغییرات شیمیایی، مهار آنزیم‌های گوارشی و ازدیاد جذب گوارشی و استفاده از سیستم‌های انتقال و جذب موکوسی، ایده‌های مطرح در طراحی واکسن‌های خوراکی می‌باشند [۲۹].

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی استفاده از نانوذرات به عنوان حاملین واکسن صورت گرفته است [۳۰-۳۴]. نانوذرات زیست تخریب‌پذیر به دلیل فرمولاسیون متنوع، خواص رهایش حفظ‌شده، اندازه کوچک (کمتر از اندازه سلولی) و زیست‌سازگاری با سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن، گزینه مناسبی برای حمل واکسن می‌باشند. مزیت استفاده از نانوذرات پلیمری مانند کیتوسان این است که با کپسوله‌نمودن مولکول‌های فعال زیستی باعث حفاظت آنها در برابر تخریب هیدرولیتیک و آنزیمی می‌شوند [۳۵].

تاکنون مقالات متعددی در مورد سیستم‌های تحویل خوراکی نانوذرات منتشر شده است که نتایج دلگرم‌کننده‌ای نیز به همراه داشته است، اما این مشاهدات بر اساس اطلاعات بدست آمده در شرایط آزمایشی مختلف (مدل‌های درون‌تنی و برون‌تنی مختلف، پروتئین‌های مختلف، غلظت‌های متفاوت، پلیمرهای مختلف و ...) بوده است، که در نتیجه سؤالاتی را به دنبال خواهد داشت. به عبارت دیگر، نمی‌توان نتایج مختلف را با هم مقایسه کرده و از بین آنها بهترین نانوذرات مناسب را بدست آورد و چون مطالعات بالینی کمی در مورد انسان صورت گرفته است، لذا نمی‌توان نتایج حاصل را به انسان تعمیم داد. با این حال، برخی از نتایج بدست‌آمده (مانند عوامل مؤثر بر جذب نانوذرات توسط سلول‌های روده) را می‌توان با یکدیگر مقایسه کرد و مورد بررسی قرار داد. اندازه نانوذرات و خواص سطح نانوذرات جزء معیارهای مهم و درجه اول هستند. تقریباً تمام محققین در مورد اندازه مطلوب (۵۰۰ - ۱۰۰ نانومتر) به یک اتفاق نظر واحد رسیده‌اند ولی در مورد خواص سطح مطلوب که متأثر از ماهیت پلیمر می‌باشد، اتفاق نظر وجود ندارد. بنابراین برای تحویل خوراکی پپتید و پروتئین‌های درمانی، انتخاب ماتریس پلیمری و بهینه‌نمودن انواع جدید آن (با توجه به نیازهای سلول)، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۳۶-۳۹].

با وجود مطالعات گسترده‌ای که در خصوص استفاده از کیتوسان به عنوان حامل دارو یا واکسن‌های مختلف علیه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

بیماری‌های گوناگون به صورت تزریقی و خوراکی صورت گرفته است [۴۳-۴۰]، تاکنون در خصوص استفاده از آن به صورت تزریقی و خوراکی برای پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E مطالعه‌ای انجام نشده است. در یک مطالعه، Ravichandran و همکاران نشان دادند که استفاده از کیتوسان در تجویز مخاطی (داخل بینی) واکسن سه‌گانه علیه سروتیپ‌های A، B و E باعث افزایش میزان تولید آنتی‌بادی می‌شود [۴۴]. Jain و همکاران نیز با فرمولاسیون وزیکولی نانوذرات و تجویز خوراکی آنها، غلظت بالای sIgA و پاسخ ایمنی بهتری را مشاهده کردند [۴۵]. Rabiee Rudsari و همکاران نیز با بررسی 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 [۴۶].

در پژوهش حاضر، نتایج الایزا نشان داد در هر سه گروه مورد آزمون، میزان تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم در هر مرحله افزایش یافته است. افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند، نشان داد نانوذرات توانسته‌اند به عنوان ادجوان عمل کرده و با تحریک مؤثر سیستم ایمنی، منجر به تولید IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم شوند به طوری که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۱۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۲/۹ بود (نمودار ۲).

تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن نیز همانند گروهی که به صورت تزریقی، تجویز شده بودند، منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم در هر مرحله شد. در این گروه بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۱۰۰ در تجویز چهارم و به میزان ۲/۸ بود که تفاوت معنی‌داری با گروهی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند، نداشت (نمودار ۳).

در گروهی که آنتی‌ژن به تنهایی و به صورت خوراکی تجویز شده بود، نیز در هر مرحله شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۱۰۰ در تجویز چهارم و به میزان ۳/۱ بود (نمودار ۴). با توجه به این که در این گروه، تجویز خوراکی آنتی‌ژن به تنهایی منجر به تولید آنتی‌بادی به میزان قابل قبولی شده بود، انتظار می‌رفت استفاده از نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و تجویز خوراکی آن، این اثر را تقویت نموده و در نتیجه با افزایش بسیار زیاد آنتی‌بادی مواجه باشیم. اما بر خلاف تصور، این میزان با کمی کاهش همراه بود که البته از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن نتایج چالش می‌توان نتیجه گرفت، پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم E در صورت تجویز خوراکی، قادر است سیستم ایمنی را به طور مؤثر تحریک نموده و پاسخ ایمنی مناسب ایجاد نماید و استفاده از نانوذرات همراه با این آنتی‌ژن، تأثیری در افزایش تولید آنتی‌بادی و در نتیجه ایمنی نخواهد داشت. در مقابل، تجویز تزریقی نانوذرات حاوی این آنتی‌ژن، علی‌رغم تولید آنتی‌بادی IgG ضد نورتوکسین بوتولینوم، توانایی حفاظت در برابر توکسین را نداشته و لذا روش مناسبی جهت تجویز نمی‌باشد. پیشنهاد می‌شود تأثیر

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

نانوذرات پلیمری دیگری از جمله پلیمرهای سنتزی مثل PLGA در میزان ایمنی‌زایی این پروتئین نوترکیب و نیز زیر واحدهای اتصالی سروتایپ‌های دیگر از جمله A و B نیز بررسی شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی به واسطه فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] 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):1861-7.

[2] Gargari SLM, Rasooli I, Valipour E, Basiri M, Nazarian S, Amani J, et al. 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):181-7.

[3] Smith LA, Byrne MP, Middlebrook JL, Lapenotiere H, Clayton MA, Brown DR. Recombinant vaccine against botulinum neurotoxin. United States Patent 7214787, 2007.

[4] 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):260-4.

[5] Smith LA. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine* 2009; 27: D33-D39.

[6] Przedpelski A, Tepp WH, Kroken AR, Fu Z, Kim JP, Johnson EA, et al. Enhancing the Protective Immune Response against Botulism. *Infection and Immunity* 2013; 81(7): 2638-44.

[7] Kim MG, Park JY, Shon Y, Kim YB, Oh YK. Nanodelivery systems for mucosal vaccines. *Recent Patents on Nanomedicine* 2013; 3(2): 119-27.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

[8] 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.

[9] Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery* 2012; 9 (4): 367-94.

[10] Simerska P, Moyle PM, Olive C, Toth I. Oral vaccine delivery-new strategies and technologies. *Curr Drug Deliv* 2009; 6(4): 347-58.

[11] Steffansen B, Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, Frokjaer S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies forimproving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* 2004; 2: 3-16.

[12] Sinha V, Singh A, Kumar RV, Singh S, Kumria R, Bhinge J. Oral colon-specific drug delivery of protein and peptide drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007; 24(1): 63-92.

[13] Mestecky J, Moldoveanu Z, Michalek SM, Morrow CD, Compans RW, Schafer DP, et al. Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *J Con Rel* 1997; 48: 243-57.

[14] Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst* 2005; 22: 419-64.

[15] Nandedkar TD. Nanovaccines: recent developments in vaccination. *J Biosci* 2009; 34(6): 1-9.

[16] Rieux AD, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Control Release* 2006; 116(1): 1-27.

[17] Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011; 3: 1377-97.

[18] Balthasar S, Michaelis K, Dinauer N, von BH, Kreuter J, Langer K. Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 2005; 26: 2723-32.

[19] Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, et al. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2011; 28(3): 353-62.

[20] Vaezifar S, RazaviSh, Golozar MA, Karbasi S, Morshed M, Kamali M. Effects of Some Parameters on Particle Size Distribution of Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionic

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

Gelation Method. *J Clust Sci* 2013; 24(2): 891-903.

[21] Nesalin AJ, Smith AA. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing zidovudine. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 7(1): 80-4.

[22] Dustgani A, Vasheghani Farahani E, Imani M. Determination of the Optimum Conditions for Production of Chitosan Nanoparticles. *Iranian Journal of Polymer science and thecnology* 2007; 20(5): 457-67. [In Persian]

[23] Hedrich H. The laboratory Mouse. 1st edition, Italy, Elsevier academic press, 2004; pp. 526-141.

[24] Crowther JR. The ELISA guidebook. Methods in molecular biology, Humana Press, New Jersey, 2001; pp. 115-301.

[25] Schunk MK, Macallum GE. Applications and optimization of immunization procedures. *Institute of Laboratory Animal Resources* 2005; 241e57.

[26] Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, Middlebrook JL. Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. *Infect Immun* 1995; 63(7): 2738-42.

[27] Yu YZ, Li N, Wang RL, Zhu HQ, Wang S, Yu WY, et al. Evaluation of a recombinant Hc of Clostridium botulinum neurotoxin serotype F as an effective subunit vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(12) :1819-23.

[28] Shahcheraghi F, Nobari S, Masoumi Asl H, Aslani MM. Identification of botulinum toxin type in clinical samples and foods in Iran. *Arch Iran Med* 2013; 16(11): 642-6.

[29] Honari H. Special Adjuvant for the Oral Vaccines and the Role of that in Passive Defense.

Passive Defense Quarterly 2011;(2):11-9. [Farsi]

[30] Fujita Y, Taguchi H. Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles. *Fujita and Taguchi Chemistry Central Journal* 2011; 5:48.

[31] Nnamani PO, Scoles G, Krol S. Preliminary characterization of N-trimethylchitosan as a nanocarrier for malaria vaccine. *J Vector Borne Dis* 2011; 48: 224–30.

[32] Bret D, Ulery BD, Kumar D, Ramer-Tait AE, Metzger DW, Wannemuehler MJ, et al. Design of a Protective Single-Dose Intranasal Nanoparticle-Based Vaccine Platform for

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

Respiratory Infectious Diseases. *PLoS ONE* 2011; 6(3): e17642.

[33] Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. *Microbiol Res* 2014; 169(2-3): 205-12.

[34] Jahantigh D, Saadati M, FasihiRamandi M, Mousavi M, Zand AM. Novel Intranasal Vaccine Delivery System by Chitosan Nanofibrous Membrane Containing N-Terminal Region of Ipad Antigen as a Nasal Shigellosis Vaccine, Studies in Guinea Pigs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2014; 24(1): 33-9.

[35] Wang JJ, Zhao ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carrier. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 765–74.

[36] Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Préat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* 2006; 116: 1–27.

[37] Bakhru SH, Furtado S, Morello AP, Mathiowitz E. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(6): 811-21.

[38] Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv R*ev 2013; 65(6): 822-32.

[39] Herrera Estradaa LP, Champion J A. Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery. *Biomater Sci* 2015; 3: 787-99.

[40] MohammadpourDounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Mir Mohammad Sadeghi A, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthuseupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2012; 18(1): 44-52.

[41] Bowman K, Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2006; 1(2): 117-28.

[42] Rajan M, Raj V. Potential Drug Delivery Applications of Chitosan Based Nanomaterials. *International Review of Chemical Engineering* 2013; 5(2): 145-55.

[43] Chen F, Zhang ZR, Huang Y. Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

nanoparticles as protein carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 336: 166-73.

[44] Ravichandran E, Al-Saleem FH, Ancharski DM, Elias MD, Singh AK, Shamim M, et al. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. *Infection and Immunity* 2007; 75(6): 3043-54.

[45] Jain S, Sharma RK, Vyas SP. Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, in-vitro and in-vivo characterization. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58(3): 303-10.

[46] Rabiee Rudsari A, Ebrahimi F, ArefpourTorabi MA. Study of Adjuvant Capability of the Gold Nanoparticles on the Immunity of Botulinum Neurotoxin Serotype E in Mouse. *Journal of Advanced Defence Science and Technology* 2013; 4(2): 87-92. [Farsi]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]

Preparation of Chitosan Based Botulinum Neurotoxin E Recombinant Nanovaccine and Evaluation of its Immunogenicity as Oral & Intradermal Route in Mice

M.J. Bagheripour[1], F. Ebrahimi[2], A. Hajizadeh[3], Sh. Nazarian[2], M.A. Arefpour[4]

Received: 22/04/2015 Sent for Revision: 01/07/2015 Received Revised Manuscript: 08/09/2015 Accepted: 10/11/2015

Background and Objectives: Botulism syndrome is caused by one of the seven botulinum neurotoxins. The toxins binding domain have immunogenicity effect and can be used as a recombinant vaccine candidate against botulism disease. Due to the low immunogenicity of recombinant protein , the use of an appropriate vehicle for antigen delivery to target cells is inevitable. The purpose of this study was to evaluate the use of chitosan nanoparticles as carriers for oral and injection administration of Botulinum Neurotoxin Type E (BoNT/E) binding domain recombinant protein.

Materials and Methods: In this experimental study Chitosan nanoparticles containing BoNT/E binding domain recombinant protein were prepared by ionic gelation method and were administered orally and subcutaneously into 5 groups of mice. IgG anti-BoNT/E binding domain titers were assayed by ELISA. Finally all groups were challenged with active botulinum neurotoxin type E and data were analyzed by t-test.

Results: In all groups after each administration, the amount of IgG anti-BoNT/E increased. Chitosan nanoparticles did not show a significant increase in the production of IgG anti-BoNT/E binding domain ($p>0.05$). There was not a significant difference in IgG anti-BoNT/E titre of the mice immunized with nanoparticles containing antigens in the oral and intradermal route ($p>0.05$). The challenge with active neurotoxin botulinum type E showed that the mice immunized orally, can tolerate 500 folds LD_{50}.

Conclusion: The results of this study showed that the recombinant protein of BoNT/E is able to be absorbed through the digestive system and induce an effective immune response. The challenge of immunized mice with active botulinum neurotoxin type E created immune response in oral administration was effective but it was ineffective in injection administration.

Key words*:* Chitosan nanoparticles, Oral vaccine, Ionic gelation, Recombinant vaccine, BoNT/E

Funding: This research was funded by Imam Hosein University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Imam Hosein University approved the study.

How to cite this article: Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian Sh, Arefpour MA, Rashidiani J. Preparation of Chitosan Based Botulinum Neurotoxin E Recombinant Nanovaccine and Evaluation of its Immunogenicity as Oral & Intradermal Route in Mice. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2016; 14(11): 923-38. [Farsi]

1- PhD Student in Nanobiotechnology, Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran
(Corresponding Author) Tel: (021) 77104934, Fax: (021) 77104935 E-Mail: febrhimi@ihu.ac.ir
3- PhD Student in Medical Biotechnology, Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran.
4- MSc. Cell and Molecular Biology, Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-13]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.11.4.2]