دو فصلنامه

بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی

سال دوم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

بررسی و مقایسه نانوذرات کیتوزان و کیتوزان-الژینات از لحاظ خصوصیات فیزیکی، نقل و انتقال و سمیت بعنوان وکتور انتقال ژن

ارس رفیعی[1*]، فرهاد ریاضی راد[2]، ترانه گازری[3]، محمد هوسکاری[4]

[1] استادیار دانشگاه تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[2] دکترای ایمونولوژی از دانشگاه تربیت مدرس، گروه ایمونولوژی، انیستتیو پاستور ایران، تهران، ایران

[3] دکترای تخصصی فارماسیوتیکس و دکترای عمومی داروسازی از دانشگاه تهران، مسئول فنی کمیته شرکت اکسیر نانو، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[4] کارشناسی ارشد حشره شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

استفاده از وکتورهای پلیمری، متدی ایمن و کارآمد برای انتقال ژن به سلول‌هاست. پس از ساخت نانوذرات کیتوزان و الژینات به روش پیش ژلاتینه شدن، سایز و بار زتا نانوذرات به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و دستگاه Malvern Zetasizer بدست آمد. نانوذرات کیتوزان و کیتوزان - الژینات به ترتیب اندازه‌هایی برابر با ۱۶۱٫۸ nm و nm ۲۳۵ و بار زتایی برابر با ۴۵ mV و ۱۸٫۶ mV- را داشتند.سپس ترانسفکت نانوذرات به سلول‌های یوکاریوتیک HEK 293 انجام گرفت. راندمان ۲۰٫۶٪ و ۳۰٫۸٪ به ترتیب برای نانوذرات کیتوزان و کیتوزان -الژینات در انتقال پلاسمید pEGFP_N1 به سلول‌ها به روش فلوسایتومتری بدست آمد. سنجش زیست پذیری سلول‌ها با استفاده از متدMTT assay نشان داد که این نانوذرات هیچ اثر سمی روی سلول‌های HEK 293 بعد از ۲۴ ساعت ندارند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، کیتوزان، الژینات، خصوصیات، زیست سنجی و ترانسفکت به سلول

۱- مقدمه

سیستم‌های تحویل دارو با داشتن اندازه‌ای مناسب حدود چند ده و یا چند صد نانومتر قادر به دخول به درون سلول و رساندن ژن یا دارو به سلول بوده و موردی مناسب برای درمان می‌باشند (۱). در دهه اخیر تحقیقات روی ژن تراپی به سرعت در حال گسترش است که علتش توانایی بالای درمانی آن در بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی، صدمه خوردن به ژن‌ها و یا عدم بیان آنهاست. استفاده از ژن به تنهایی به علت تجزیه سریع توسط نوکلئازها، جذب بسیار پایین توسط سلول، عدم اختصاصی بودن به سلولی خاص و قدرت ترانسفکت پایین قابل استفاده نیست بنابراین استفاده از حاملی امن و کارامد یکی از

---

[*] **مسئول مکاتبات:** aras_marine_biology@yahoo.com

نیازهای اولیه برای موفقیت در ژن درمانی است(۲). نانوذرات هیدروژل به عنوان عضوی از خانواده ذرات در حد نانو جدیدا به عنوان سیستم انتقال دارو انتخاب شده‌اند. این‌ها دارای هر دو خصوصیات نانوذرات و هیدروژل با هم هستند یعنی هم مثل هیدروژل دارای خصوصیات آب‌دوستی، انعطاف‌پذیری، تنوع و سازگاری زیستی‌اند و هم مانند نانوذرات به مدت طولانی درون جریان خون باقی مانده و قابلیت رسیدن به سلول هدف انتخابی را دارند (۳و٤).

وکتورهای غیر ویروسی (کاتیون‌های پلیمری و یا لیپیدی) به علت سنتز آسان، پایین بودن و یا عدم پاسخ ایمنی در مقابل وکتور و قابلیت استفاده برای اندازه های مختلفی از ژن، امنیت بالا تری دارند (۵).

پلی ساکاریدها پلیمرهایی از مونوساکارید هستند و از لحاظ بار، پلی ساکاریدها را می‌توان به ۲ گروه پلی الکترولیت و غیرپلی الکترولیت تقسیم‌بندی کرد. پلی الکترولیت‌ها دارای بار مثبت (مثل کیتوزان) و بار منفی (مثل آلژینات، هپارین، اسید هیالورونیک و ...) هستند(٦و۷). کیتوزان به علت داشتن بار مثبت توسط برهمکنش متقابل الکترواستاتیک قادر به ایجاد کمپلکس با نوکلئوتیدهای DNA با بار منفی می‌باشد که آن را مناسب برای ژن تراپی می‌کند(۸). برای بالا بردن میزان ترانسفکت کیتوزان، وجود پلیمری آنیونی قادر به کم کردن قدرت اتصال بالای بین کیتوزان و ژن خواهد شد (۹).

کمپلکس پلی آنیونی کیتوزان/ الژینات (chi/alg) بر اثر ارتباطات انیونی بین گروه‌های کربوکسیل الژینات و گروه‌های امینی کیتوزان ایجاد می‌گردد.

در این مطالعه، و ساخت و بهینه سازی نانوذرات کیتوزان و کیتوزان- الژینات ساخته شد الژینات- کیتوزان انجام گردید. در نهایت میانگین قطر ذرات، درصد انتقال به سلول و سمیت آنها بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت نانوذرات

۲-۱-۱- ساخت استوک اصلی

برای ساخت استوک اصلی کلرید کلسیم و آلژینات، میزان mg ۲۵ از هر کدام در ml ۲۵ از آب دیونیزه حل شد. برای تهیه استوک کیتوزان، mgr ۲۵ از آن در ml ۲۵ آب دیونیزه حاوی (V/V) ٪۱ اسید استیک حل گردید. پلاسمید pEGFP در غلظت ۲۰۰ng/µl تهیه شد. تمامی این استوک ها از فیلتر µm ۰/۲۲ عبور داده شدند.

۲-۱-۲- متد ساخت نانوذرات کیتوزان- آلژینات و کیتوزان

به منظور ساخت، در نظر گرفتن مواردی همچون ۱- N/P (نسبت بار آمین مثبت کیتوزان (N) به بار فسفات منفی پلاسمید(P))، ۲- Alg/Chi (میزان آلژینات به کیتوزان) ۳- CaCl2/Alg (نسبت CaCl2 به Alg) ٤- pH محلول و بار Z (Zeta Potential) مهم بود (۱۰). در این تحقیق با به کار بردن نسبت ۵ برای N/P ، ۱ برای Alg/chi ، ۰/۲ برای CaCl2/Alg و PH ۵/۳ ساخت نانو ذرات انجام شد.

در ابتدا مقدار(µg ۱۳۰) µl ۱۳۰ از استوک سدیم آلژینات را با آب فیلتر شده به حجم 3ml رسانده و سپس µl ۲٦ کلرید کلسیم را از استوک برداشته و با آب فیلتر شده به حجم ml ۱ رسانده و کم کم به محلول آلژینات سدیم اضافه می‌کنیم. ارلن محتوی ساخت باید روی Stirer باشد و تا پایان ساخت این

مواد توسط مگنت درون ارلن با هم مخلوط شوند. سپس μl ۱۳۰ از استوک کیتوزان با ng ۱۰ از پلاسمید pEGFP ورتکس شده و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس با آب فیلتر شده آن را به حجم ml ۱ رسانده و کم کم از آن به محلول آلژینات/ کلرید کلسیم اضافه شد.

مخلوط حاصله ۳۰ دقیقه روی Stirer مانده تا هم بخورد. در تمام مدت آزمایش باید pH محلول را در حد ۵/۳ توسط N ۰/۱ NaOH ثابت نگه داشت. تغییر زیاد pH از این حد منجر به متراکم شدن نانوذرات‌ها و یا بزرگ شدن سایز آنها می‌گردد. در نهایت کل این محلول توسط لوله Amicon Ultra-10 در دور ٤٠٠٠r/min به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

در کنار ساخت نانوذرات کیتوزان/ آلژینات، نانوذراتی نیز فقط از جنس کیتوزان ساخته شد. به این ترتیب که ۱۳۰μl از استوک کیتوزان را با آب فیلتر شده به حجم ٤ml رسانده شد. سپس ۱۰ng از پلاسمید را به حجم ۱ml رسانده و آن را قطره قطره به به محلول کیتوزان اضافه می‌کنیم. سپس محلول حاوی ذرات در دمای ۲۰°C توسط لوله Amicon Ultra-10 در دور ٤٠٠٠r/min به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۱).

۲-۲- تعیین خصوصیات نانوذرات

برای محاسبه سایز و بار زتا (Zeta potential) مقدار ml ۲ از این نانوذرات ساخته شده به دستگاه Malvern Zetasizer ZS seris and Scattering Particle Size Analyzer (Malvern Co. UK) داده شد.

برای این منظور حدود ml ۱/۵ از نانوذرات را توسط این فیلتر Amicon Ultra-15 (Ultracel-100K Millipore Co., USA) با دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کردیم و سپس چند قطره از نانوذرات تغلیظ شده روی لام خشک شد. سپس این لام‌ها در شرایط خلاء توسط لایه‌ای از طلا روکش شده و توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنر SEM LEO1455 VP (10 kV Cambridge) در دانشکده فنی مهندسی دانشگاه تهران عکس برداری شد (۱۰).

۲-۳- کشت سلول‌ها و ترانسفکت نانوذرات به درون آنها

مقدار یک ویال از سلول‌های یوکاریوتیک HEK 293 از بخش بانک سلولی انیستیتو پاستور تهیه گردید. ابتدا در روز قبل از ترانسفکت نانوذرات به درون سلول‌های Hek293، حدود ۱۰۵×٦ تعداد سلول Hek توسط لام نئوبار شمارش شده و در پلیت ٦ خانه‌ای حاوی محیط کشت کامل RPMI ریخته شده و در انکوباتور CO2 ۵٪ با دمای 37 °C قرار داده شد. محیط کشت کامل حاوی mM L-۲gluthamine، ۱۰۰ U/ml penicillin، ۱۰۰ µg/ml streptomycin و fetal calf serum (FCS)۱۰٪ بود.

بعد از گذشت ٢٤ ساعت از کشت سلول‌ها درون انکوباتور، محیط کشت روی سلول‌های Hek را با سمپلر بیرون کشیده و سپس به آن نانوذرات تازه تهیه شده اضافه شد (۲٦µg/ µl از کیتوزان و الژینات و µg ۲ پلاسمید). پلیت را چندین بار دورانی تکان می‌دهیم تا مخلوطی یکسان ایجاد شود و در نهایت پلیت را درون انکوباتور CO2 دار در دمای ۳۷ °C به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد. در این مدت عمل

رونویسی از ژن و سپس بیان پروتئین صورت خواهد گرفت. همانطور که قبلا هم ذکر شد، به علت وجود EGFP در انتهای پروتئین، این پروتئین خاصیت فلورسانت داشته و از طریق میکروسکوپ فلورسنت و دستگاه فلوسایتومتری، قابل تشخیص است. بعد از گذشت ٤٨ ساعت از ترانسفکت کردن سلول ها به منظور انجام فلوسایتومتری، حدود ٣ ml Pbs استریل به منظور شستشو سلولها به درون پلیت‌ها ریخته شد. تمام محتوای پلیت‌ها را به درون ٣ لوله شیشه‌ای مجزا که مخصوص فلوسایتو متری است وارد گرده و در نهایت ٣ لوله را در سانتریفیوژ به مدت ٧ دقیقه و دور ١٧٠٠ قرار داده شد. سپس محیط رویی را خارج کرده و حدود ٦٠٠ CC Pbs به لوله اضافه شد. برای خواندن درصد سلول های فلورسانت توسط دستگاه فلوسایتومتری ابتدا شدت فلورسانت سلول های Hek ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی (پایه) سنجیده شده و سپس شدت فلورسانت سلول‌های ترانسفکت نشده با آن مقایسه گردید (١٢).

٢-٤- سنجش سمیت نانوذرات

سلول‌های Hek 293 در پلیت های ٤٨ خانه ای به تعداد ١٠٤×١ سلول و ١٨٠µl از محیط کشت کامل در هر چاهک شمارش شد. بعد از ٤٨ ساعت، هر سه چاهک از سلول‌ها با ١٠ng پلاسمید به تنهایی، ٢٦µg/ µl از نانوذرات کیتوزان و نیز کیتوزان- الژینات دردمای $^{\circ}C$ ٣٧ به مدت ٢٤ ساعت انکوباسیون گردید. سپس محلول رویی را برداشته و سلول‌ها به مدت ١٦ ساعت در محلول 3H- thymidine (Sigma, USA) کشت داده شد(١٣). سپس سلول‌ها به Glass fiber filter (Wallac, Lund, Sweden) انتقال یافت. شدت فعالیت رادیواکتیویته آن به کمک دستگاه Beta-counter (Wallac) ستجیده شد.

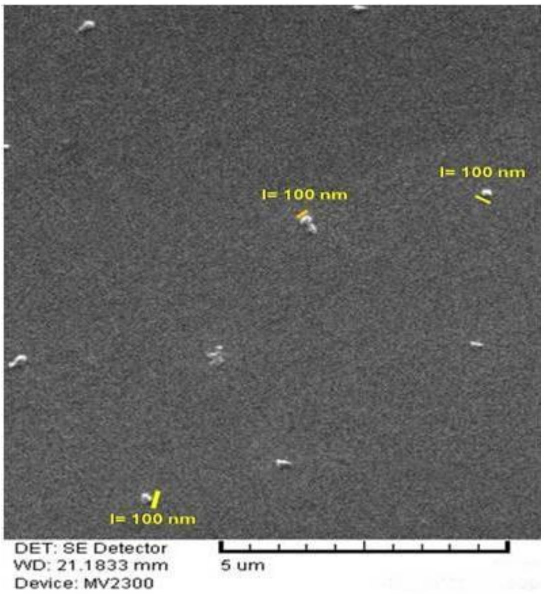
٢-٥- آنالیزهای آماری

هر کدام ار آزمایشات سه بار تکرار شدند و نتایج آماری با استفاده از t-test و P< 0.05 بدست آمد.

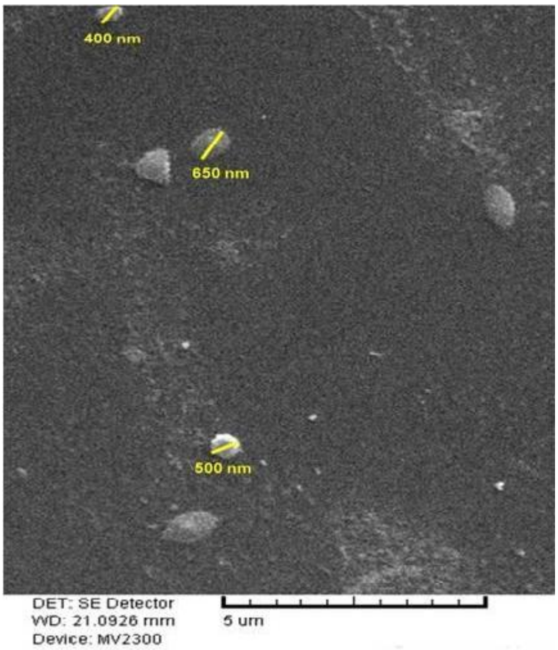
٣- نتایج

٣-١-تعیین اندازه نانوذرات کیتوزان- آلژینات و کیتوزان

پس از ساخت و تغلیظ نانوذرات توسط Amicon Altra-15 ، ارزیابی سایز ذرات، منحنی توزیع سایز و نیز سایز متوسط توسط دستگاه Mahvern zetasizer انجام شد. نانوذرات کیتوزان و کیتوزان – الژینات به ترتیب دارای اندازه هایی برابر با ١٦١،٨ nm و ٢٣٥ nm بودند (تصویر شماره ١و ٢).



تصویر١- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات آلژینات/ کیتوزان، حاوی پلاسمید (با بزرگ نمایی X ١٠). این ذرات کروی و اندازه ای حدود nm ٢٠٠-١٠٠ دارند.



تصویر ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات کیتوزان حاوی پلاسمید (با بزرگ نمایی X ١٠)، این ذرات تقریبا کروی بوده و اندازه ای حدود nm ٧٠٠-٤٠٠ دارند.

۳-۲- تعیین بار Z اندازه نانوذرات کیتوزان – آلژینات و کیتوزان

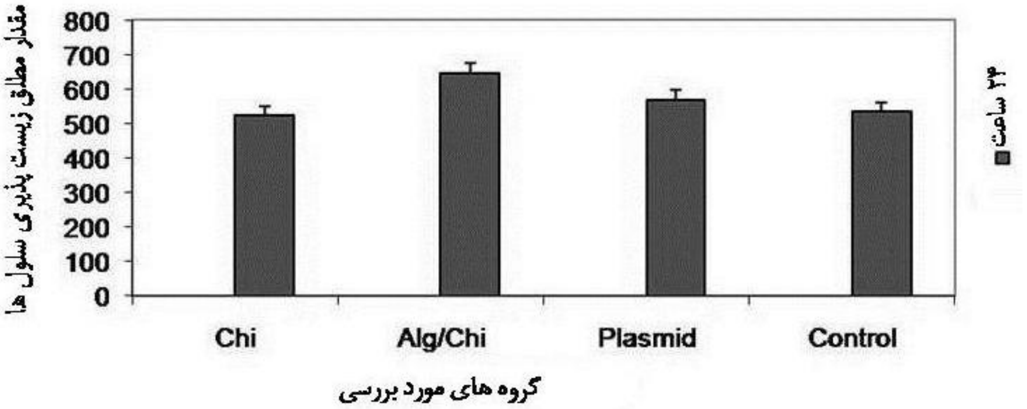
بار Z تمامی نانوذرات توسط Malver zeta sizer ZS بدست آمد. نانوذرات کیتوزان و کیتوزان – الژینات به ترتیب بار زتایی برابر با ٤٥ mV و ١٨,٦- mV داشتند.

۳-۳- فلوسایتومتری

به منظور تایید ورود نانوذرات به سلول و بیان پروتئین پلاسمید pEGFP درون سلول‌های Hek T 293، بعد از گذشت ٤٨ ساعت از ترانسفکت، آنالیزهای فلوسایتومتریک روی سلول‌ها صورت گرفت. آنالیزها راندمان ٢٠,٦٪ و ٣٠,٨٪ بیان EGFP را به ترتیب برای نانوذرات کیتوزان و کیتوزان – الژینات، توسط فلوسایتومتری بدست آوردند.

۳-٤- سنجش سمیت نانوذرات

تاثیر نانوذرات حاوی پلاسمید بر روی زنده ماندن سلول‌ها توسط آزمون سنجش سمیت، بدست آمد. همانطور که در شکل دیده می‌شود، نانوذرات کیتوزان و کیتوزان- الژینات بعد از ٢٤ ساعت، اثر سمیتی روی سلول‌های HEK293 نداشتند (تصویر شماره ۳).



تصویر ۳-آزمون سمیت بر روی سلول های HEK293 ٢٤ ساعت پس از مواجه با نانوذرات- سلول های HEK293 در پلیت های ٩٦ خانه ای کشت داده شدند و پس به مدت ٢٤ ساعت در مجاورت پلاسمید، نانوذرات کیتوزان، کیتوزان- الژینات (٢٦µg/ µl) و کنترل منفی (RPMI) قرار گرفتند. تمامی داده ها بیانگر میانگین بدست آمده از سه تکرار است.

٤- بحث

استفاده از پلیمرهای کیتوزان و الژینات با توجه به نداشتن سیتوتاکسیسیتی و دارا بودن زیست تخریب پذیری مناسب بوده و قابلیت انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل سلول های انتروسیت را دارا می‌باشند (١٤، ١٥ و ١٦).

لذا پلیمرهای کیتوزان و الژینات با این هدف انتخاب شد و ساخت و بهینه سازی دو نوع نانوذرات کیتوزان و الژینات- کیتوزان انجام گردید(۱۷و ۱۸و ۱۹). فرمول بهینه با کوچکترین سایز عبارت بود از نسبت الژینات به کیتوزان ۱، نسبت الزینات به کلسیم کلراید ۰/۲ و نسبت پلاسمید به کیتوزان ۵ (نسبت مولی گروه آمین کیتوزان به گروه فسفات پلاسمید) و PH برابر با ۵. میانگین قطر ذرات حاصل نانوذرات کیتوزان و کیتوزان – الژینات به ترتیب برابر با nm ۱۶۱٫۸ و nm ۲۳۵ بودند که نشان می‌دهد وجود الژینات در کنار کیتوزان منجر به کوچک‌تر شدن اندازه نانو ذرات می‌گردد. این امر زمانی که از این ذرات برای ژن‌تراپی استفاده گردند و سلول‌های روده هدف اصلی نانوذرات باشند، مزیت بسیار بالایی دارد. چون ذرات کوچکتر به عنوان مثال جذب بالاتری را توسط سلول‌های روده خواهند داشت(۲۰).

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشانگر بالاتر بودن قدرت ترانسفکت نانوذرات کیتوزان-الژینات نسبت به کیتوزان به تنهایی می باشد. علت این امر، ناتوانایی کیتوزان در آزادسازی پلاسمید بخاطر طبیعت هیدروفیلیک بالای آن است (۲۱). کیتوزان بار مثبت و پلاسمید بار منفی دارد. درنتیجه این دو با جاذبه بالایی در کنار هم قرار می گیرند بطوریکه آزادسازی پلاسمید را از درون هیدروژل، سخت می سازد.

همچنین نتایج نشان دادند که کلاً هر دو نوع نانوذرات ساخته شده اثر سمیتی بر سلول‌های HEK ندارند. حتی مقایسه نتایج بدست آمده با سلولهای درون محیط‌کشت کنترل منفی (RPMI) نشان می‌دهد که وجود کیتوزان و الژینات منجر به بالا بردن سرعت تکثیر سلول ها می شود که دلیل آن اثر این مواد بر فعالیت میتوکندری درون سلول‌هاست.

۵- نتیجه‌گیری

در پایان ما تابت کردیم که ترکیبی از سایز، بار ذرات و هیدروفیل بودن روی قدرت ترانسفکت نانوذرات به درون سلول تاثیرگذار خواهد بود بطوریکه نانوذرات کیتوزان-الژینات با اندازه‌ای کوچکتر، بار زتای کمتر و هیدروفیل بودن کمتر نسبت به نانوذات کیتوزان، ترانسفکت بالاتری داشتند. همچنین الژینات به‌علت کاستن از نیروی الکترواستاتیک بین کیتوزان و پلاسمید بر آزاد شدن پلاسمید تاثیرگذار خواهد بود. همچنین وجود الژینات در کنار پلاسمید منجر به کوچکتر شدن اندازه نانوذرات و فرم بهتر آن خواهد شد. بنابراین ما پیشنهاد می کنیم که برای ساخت نانوذرات هیدروژل از کیتوزان و الژینات باهم استفاده گردد.

٦- تشکر و قدردانی

انجام این پروژه تحقیقاتی با حمایت همه جانبهٔ دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران مرکزی در طرح با نام "مقایسه نانوذرات کایتوزان، کایتوزان- الژینات و الژینات به منظور ژن درمانی و یا حامل های واکسن DNA" صورت گرفته است.

منابع

1- Yang, S.J., Chang, S.M., Tsai, KC., Chen, WS., Lin, FH., Shieh, MJ. (2010). Effect of chitosan-alginate nanoparticles and ultrasound on the efficiency of gene transfection of human cancer cells. J Gene Med, 12(2), 168-179.

2- Suk, J.S., Kim, AJ., Trehan, K., Schneider, C.S., Cebotaru, L., Woodward,

3- O.M. (2014). Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. J Control Release, 178, 8-17.

4- Jeong, J., Kim, S., Park, T. (2007). Molecular design of functional polymers for gene therapy, Prog. Polym. Sci. 32 (11), 1239–1274.

5- Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticle in drug delivery. Advanced drug delivery reviews. 60 (15), 1638-1649.

6- Ishida, T., Harada, M., Wang, X.Y., Ichihara, M., Irimura, K., Kiwada, H. (2005). Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface density and chain length of the first-dose liposomes, J. Control. Release. 105 (3), 305–317.

7- Sinha, V.R., Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. Int. J. Pharm. 224 (1-2), 19–38.

8- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., inchcliffe, M., Rolland, A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, J. Control. Release 56 (1-3), 259–272.

9- Fang, N., Chan, V., Mao, H.Q., Leong, K.W. (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. Biomacromolecules. 2 (4),1161–1168.

10- Ciofani, G.RV., Menciassi, A. (2008). Alginate and chitosan particles as drug delivery system for cell therapy. Biomedical Microdevices. 10 (2),131-140.

11- Gazori, T., Khoshayand, M., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani,A., Haririan, I. 2009. Evaluationof alginate/chitosan nanoparticle delivery vector: Formulation, optimization and invitro characterization. Carbohydrate Polymers. 77 (3),599-606.

12- Douglas K. L, TabrizianM. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan based nanaoparticles. J ControlRelease;115(3),354–61.

13- Sanna V, Roggio AM, Siliani S, Piccinini M, Marceddu S, Mariania, et al. (2012). Development of novel cationic chitosan- and anionic alginate-coated poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. Int J Nanomedicine; 7(1), 5501-5516.

14- Sun Y, Zhang S, Peng X, Gong Z, Li X, Yuan Z, Li Y, Zhang D, Peng Y.(2012). Preparation, characterization and transfection efficacy of chitosan nanoparticles containing the intestinal trefoil factor gene. Mol Biol Rep. 39(2), 945-52.

15- Jeong, J., Kim, S., Park, T. (2007). Molecular design of functional polymers for gene therapy, Prog. Polym. Sci. 32 (11), 1239–1274.

16- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K.M., Artursson, P. (2001).Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo, Gene Ther. 8 (14), 1108–1121.

17- Hallaj-Nezhadia S, Valizadeha H, Dastmalchia S, Baradaranc B, Barzegar Jalalia M, Dobakhtid F, Lotfipoure F. (2011). Preparation of Chitosan-Plasmid DNA Nanoparticles Encoding interleukin-12 and their Expression in CT-26 Colon Carcinoma Cells. J Pharm Pharmaceut Sci. 14(2),181-195.

18- Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. (2001). Biochim Biophys Acta, 1514(1),51-64.

19- George M, Abraham TE. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal

20- delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. J Control Release, 114(1),1-14.

21- Liu Z, Lv D, Liu S, Gong J, Wang D, Xiong M, et al. (2013) Alginic acidcoated chitosan nanoparticles loaded with legumain DNA vaccine: effect against breast cancer in mice. PLoS One 8 (4). doi:10.1371/journal.pone.0060190.

22- Rieux, A. D., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Preat, V. (2006). Nano particle as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. J Control Release. 116(1), 1-27.

23- Dupuy, B., Arien, A., Minnot, A. (1994). FT-IR of membranes made with alginate/polylysine complexes—variations with the mannuronic or guluronic content of the polysaccharides. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol; 22(1), 71-82.