ORIGINAL ARTICLE

Immunogenicity of Chitosan Nanogel Containing IpaC Recombinant Protein from Shigella in Guinea Pig

Shahram Nazarian[1],
Seyed Latif Mousavi Gargari[2],
Mehdi Azimbeyk[3]

[1] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran
[3] MS , Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran

(Received Jan 25, 2016 Accepted April 10, 2017)

Abstract

Background and purpose: Shigella species cause shigellosis in humans. Considering the high frequency of illness and antibiotic resistance, development of an effective immunogen against bacteria is a major goal. Invasion Plasmid Antigen such as IpaD and IpaC are the major bacterial virulence agents of Shigella. Encapsulation of antigens in particular carriers such as chitosanic nanogels, not only protects them from degradation in environmental elements but also provides the effective concentrations of antigens in targets, hence increasing bioactivity. The aim of this study was to investigate the immunogenic properties of IpaC protein encapsulated in chitosanic nanogels.

Materials and methods: The protein was expressed in *E.coli* and purified by affinity chromatography. Chitosan nanogels were prepared by ionic gelation method using tripolyphosphate (TPP) as a crosslinking agent. The nanogels were loaded with IpaC and their structures were characterized by SEM and DLS. Encapsulated protein was introduced in guinea pigs by oral and parenteral routes. Antibody titers were determined by ELISA. Animals were challenged By Sereny test with wild-type *S. flexneri*.

Results: Expression of recombinant protein in *E.coli* led to the production of IpaC with 60 kDa molecular weight. Loading efficiency of nanogel was 98% after 48h of incubation. The average particle size was 418 nm. Immunization of mice induced serum antibody response.

Conclusion: The productivity of encapsulated protein via oral route was better than parenteral route.

Keywords: nanogel, chitosan, Shigella, IpaC, immunogen

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (149): 14-27 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۹ خرداد سال ۱۳۹۶ (۲۷-۱۴)

بررسی ایمنی زائی نانوژل کایتوسان واجد پروتئین نوترکیب IpaC از شیگلا در خوکچه هندی

شهرام نظریان[۱]
سید لطیف موسوی گرگری[۲]
مهدی عظیم بیک[۳]

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های شیگلا عامل بیماری شیگلوز در انسان می‌باشد. با توجه به فراوانی بیماری و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی، ساخت ایمونوژن موثر علیه باکتری هدف مهمی است. آنتی‌ژن‌های تهاجمی پلاسمید از جمله IpaC و IpaD از مهم‌ترین عوامل بیماری زای شیگلا هستند. بارگذاری آنتی‌ژن‌ها در حامل‌های ویژه از قبیل نانوژل‌های کیتوسانی، نه تنها آن ها را در برابر عوامل محیطی محافظت کرده بلکه غلظت‌های مناسب از آنتی‌ژن را در محیط فراهم کرده و فعالیت زیستی را افزایش می دهد. هدف از این تحقیق، بررسی ایمنی زائی پروتئین IpaC بارگذاری شده نانوژل های کیتوسان بود.

مواد و روش‌ها: پروتئین نوترکیب در *E.coli* بیان و با گرموتوگرافی میل ترکیب تخلیص شد. نانوژل های کیتوسانی به روش ژلاسیون یونی و از طریق میانکنش کیتوسان با اتصال دهنده تری پلی فسفات (TPP) تهیه شدند. نانوژل ها با IpaC بارگذاری و خصوصیات ساختاری آن ها با SEM و DLS بررسی گردید. پروتئین بارگذاری شده از مسیر خوراکی و تزریقی به خوکچه هندی انتقال یافتند. تیتر آنتی‌بادی‌ها با روش الایزا تعیین شد. حیوان ها از طریق روش سرنی و با استفاده از باکتری شیگلا فلکسنری چالش شدند.

یافته‌ها: بیان پروتئین نوترکیب *E.coli* منجر به تولید IpaC با وزن ۶۰ کیلودالتون شد. ظرفیت بارگذاری نانوژل ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۹۸ درصد بود. متوسط اندازه نانوذرات ۴۱۸ نانومتر بود. ایمن سازی موش‌ها پاسخ آنتی‌بادی سرمی را القا کرد.

استنتاج: حفاظت بخشی پروتئین بارگذاری شده از مسیر خوراکی بهتر از مسیر تزریقی بود.

واژه های کلیدی: شیگلا، ایمونوژن، IpaC، کیتوسان، نانوژل

مقدمه

بیماری اسهال یکی از علل شایع مرگ و میر در جهان است. به نظر می‌رسد شیوع این بیماری در کشورهای در حال توسعه بیش‌تر است، به طوری که مرگ و میر یک سوم از کودکان زیر پنج سال در کشورهای مذکور به بیماری اسهال نسبت داده می‌شود. گونه‌های اشریشیا کلی، سالمونلا و شیگلا از مهم‌ترین عوامل مولد اسهال در سراسر جهان می باشند(۱، ۲). بیماری ناشی از شیگلا با تهاجم باکتری به سلول‌های

مولف مسئول: سیدلطیف موسوی گرگری تهران-روبروی حرم مطهر امام خمینی،دانشگاه شاهد،کد پستی:۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱ Email:slmousavi@shahed.ac.ir
۱. استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه شاهد
۳. کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۱/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱/۲۱

مخاطی ایلئوم انتهایی و کولون آغاز شده و موجب اسهال خونی و التهاب موضعی و زخمی شدن مخاط می‌گردد. تعداد ۱۰۰ سلول باکتری شیگلا برای ایجاد بیماری شیگلوز کفایت می‌کند و از این جهت بسیار عفونی و مسری است(۳، ۴). گونه های بیماری زای شیگلا از جمله شیگلا دیسانتری و فلکسنری دارای پلاسمیدهای بزرگ بوده که دارای ژن های کد کننده لازم جهت تهاجم میکروارگانیسم به سلول‌های اپی تلیال روده بزرگ است. مطالعات نشان داده است که تعداد زیادی از ژن های درگیر در فرایند تهاجم در گونه‌های شیگلا محافظت شده اند(۴، ۵).

پلاسمید تهاجمی باکتری دارای دو لوکوس ipa mxi-spa است که برای فنوتیپ تهاجم مهم می باشند. اپرون ipa، پروتئین های Ipa A-D را کد می کند که به عنوان افکتور برای ورود باکتری به سلول میزبان عمل می‌کنند. اپرون mxi-spa اجزای سیستم ترشحی تیپ III را کد می‌کند که برای انتقال پروتئین‌های Ipa از سیتوپلاسم باکتری به غشای سیتوپلاسمی و یا حتی سیتوزول سلول میزبان مهم هستند. غشای رأسی سلول‌های اپیتلیال کولون به وسیله گلیکولیپیدها پوشیده شده‌اند که تشکیل یک لایه موسینی را می دهند. مشخص شده است که پروتئین های Ipa که توسط پلاسمید تهاجمی باکتری کد می شوند، برای غلبه بر این سد لازم هستند(۵، ۶). پروتئین IpaA در داخل سیتوزول اپیتلیال سلول میزبان جایی که در آن بخش اسکلت سلولی مرتبط با پروتئین وینکولین می‌باشد، کمپلکس IpaA-vinculin را تشکیل داده و موجب دپلی مریزه شدن فیلامنت‌های اکتین می‌شود(۷). باکتری به وسیله IpaB خود، واکوئل‌های فاگوسیت را لیز کرده و از این طریق مکانیسم‌های کشنده ماکروفاژها را ناکارآمد می‌کند(۸). پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی IpaC علاوه بر این که به عنوان اولین فاکتور پروتئینی حمله کننده شیگلا به سلول‌های اپیتلیال مطرح است، امکان واکنش با فسفولیپیدهای غشا و تحریک تغییرات سیتواسکلتی سلول میزبان را دارا می‌باشد(۴، ۹). با در نظر گرفتن این که محل اتصال، تکثیر و تهاجم باکتری شیگلا، مخاط روده می‌باشد، بنابراین تولید آنتی بادی های مخاطی علیه این فاکتورهای اتصالی و دخیل در تهاجم باکتری، می‌تواند اتصال و به تبع آن ورود باکتری به سلول ها را مختل کرده و از شدت بیماری زائی باکتری بکاهد(۱۲-۱۰). مهم‌ترین چالش استفاده از پروتئین‌هایی مانند IpaD و IpaC در طراحی واکسن مخاطی، قدرت پایین و عدم انتقال مناسب آن ها به بافت های مخاطی روده می‌باشد. یکی از مزیت‌های مهم تحریک سیستم ایمنی مخاطی، تولید آنتی بادی هایی است که می توانند در محل های ویژه از جمله روده، عملکرد میکروارگانیسم های بیماری زا را مختل سازند(۱۳). از دیگر مزایای به کارگیری واکسن‌ها از جمله واکسن های نوترکیب زیر واحدی می توان به تجویز مخاطی اشاره کرد که نیاز به تزریق و پروسه استریل سازی نداشته و توسط بیمار بهتر پذیرفته می‌شود. اما از آن جا که ایمونوژن های زیر واحدی نوترکیب پس از تجویز مخاطی به مقدار کافی جذب نمی‌شوند، استفاده از ترکیباتی از جمله ادجوانت‌ها و حامل ها می‌تواند کارائی ایمنی‌زائی این واکسن‌ها را بهبود بخشد(۱۴، ۱۵). فناوری نانو در این زمینه به کمک محققان زیست شناسی آمده است، به گونه ای که بارگذاری ایمونوژن‌های نوترکیب در نانو ذرات زیست سازگار جهت افزایش ایمنی زایی، به صورت گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. بارگذاری پروتئین‌ها در نانوذرات می‌تواند از تخریب آن در فضای اسیدی معده جلوگیری کرده و سبب افزایش پایداری و ماندگاری آنتی ژن گردد(۱۶). از جمله فرایندهای دیگری که می‌توان به آن توجه نمود، استفاده از ادجوانت‌ها همراه با نانوذرات می‌باشد که می توانند ایمنی زایی را تقویت کنند(۱۷).

ترکیبات پلیمری مختلفی برای تهیه نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته اند(۱۸، ۱۹). مطالعات نشان داده که استفاده از پلیمر زیستی کیتوسان در افزایش جذب

پروتئین‌ها و ایمنوژن ها و تحریک سیستم ایمنی مخاطی عملکرد موفقیت‌آمیزی داشته است(۲۰، ۲۱). کیتوسان پلیمری کربوهیدراتی طبیعی بوده و دارای ویژگی‌هایی همانند ارزان بودن، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و قابلیت اتصال به سلول‌های لایه مخاطی می‌باشد(۲۲، ۲۳). نانوذرات کایتوسان را می‌توان با برقراری اتصالات الکتروستاتیک بین گروه های آمین پلیمر و یک ماده پلی آنیونی زیست سازگار نظیر تری پلی فسفات (TPP) تهیه کرد. به وجود آمدن چنین ساختاری و برقراری اتصال متقاطع کیتوسان با TPP علاوه بر حفظ پروتئین، موجب رهایش آهسته آن ها از نانوذرات ایجاد شده می گردد(۲۴، ۲۵).

تاکنون مطالعات زیادی در خصوص استفاده از نانوذرات کیتوسان برای بررسی ایمنی زائی علیه شیگلا گزارش نشده است. در تحقیق انجام شده توسط باران وند و همکاران، نانوذرات کیتوسانی واجد پروتئین نوترکیب IpaD و StxB تهیه گردید، اما ایمنی زائی آن علیه عملکرد پروتئین IpaD بررسی نشد(۲۶). در سال ۲۰۱۳ نیز Camacho نشان داد که استفاده از نانوذرات واجد ویزکول های غشایی باکتری شیگلا فلکسنری کارائی مناسبی علیه بیماری زائی شیگلا را سبب می‌شود(۲۷). لذا به نظر می رسد استفاده از نانوذرات مختلف به منظور ارزیابی اثرات آن ها بر ایمنی زائی علیه شیگلا می تواند مد نظر باشد.

در تحقیق حاضر به منظور ایجاد ایمنی مخاطی از مسیر خوراکی علیه تهاجم شیگلا، ابتدا پروتئین نوترکیب IpaC در *E.coli* BL21(DE3) بیان و سپس تخلیص گردید. نانوژل کیتوسان تهیه و با روش مجاور سازی با پروتئین نوترکیب تخلیص شده بارگذاری شد. نانوژل های بار گذاری شده با پروتئین نوترکیب به خوکچه های هندی آزمایشگاهی خورانده شدند. به گروه دیگری از حیوانات آزمایشگاهی، پروتئین IpaC خالص به روش زیر جلدی تزریق شد و در نهایت تولید آنتی بادی و ایمنی زائی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد و حیوان آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه شاهد انجام شده است، ژن بهینه سازی شده کدونی IpaC که از کاست طراحی شده سه گانه تکثیر و در وکتور بیانی pET-32a زیر همسانه سازی شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان پروتئین نوترکیب در میزبان *E.coli* BL21-DE3 استفاده شد. از محیط‌های کشت LB مایع و آگار برای رشد باکتری *E.coli* BL21-DE3 و شیگلا استفاده گردید. مواد شیمیایی از جمله ترکیبات لازم برای ساخت بافر ها، آنتی بیوتیک از شرکت مرک تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب، رزین تمایلی نیکل-نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) از شرکت کیاژن خریداری شد. ادجوانت ناقص و کامل فروند از انستیتو رازی تهیه شد. آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP علیه ایمنوگلوبین G خوکچه هندی، آنتی‌بادی موشی علیه نشان هیستیدین از کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از شرکت سیگما و سدیم تری پلی فسفات از شرکت شارلو تهیه شد. خوکچه‌های هندی از انستیتو رازی تهیه شدند و روش نگهداری آن‌ها مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب IpaC

کشت شبانه سلول های BL21-DE3 حاوی پلاسمید نوترکیب pET32a-*ipaC* آماده شد. از کشت شبانه ۵۰ میکرولیتر برداشته و به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در حالت به هم زنی گرمخانه گذاری گردید. پس از آن که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید، بیان پروتئین نوترکیب با افزودن IPTG (ایزوپروپیل β-D-۱ تیوگالاکتوپیرانوزید) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به

سوسپانسیون سلولی باکتری اضافه شده و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت القا شد. به منظور استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب بیان شده، رسوب سلولی باکتری از ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جمع‌آوری و با ۳ میلی لیتر بافر B متشکل از NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی‌مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار و Urea ۸ مولار مخلوط گردید. دیواره سلولی با استفاده از سونیکاتور پروبی و با شرایط قدرت سونیکاسیون ۵۰ درصد، پالس ۰/۵ و طی ۵ چرخه زمانی ۲۰ ثانیه ای تخریب شد. محلول حاصل از شکست باکتری با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه با سانتریفوژ یخچال دار جمع آوری شد و جهت بررسی بیان به وسیله SDS-PAGE ۹ درصد مورد آنالیر واقع شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

تخلیص پروتئین با استفاده از رزین تمایلی نیکل انجام شد. قبل از تزریق محلول حاوی پروتئین، ستون کروماتوگرافی نیکل با بافر B(pH=۸) به تعادل رسید. بعد از خروج کامل بافر از ستون، محلول واجد پروتئین به آرامی به ستون اضافه و خروجی آن در ظرف جمع آوری شد. جهت حذف پروتئین‌هایی که به طور غیر اختصاصی به رزین متصل شده اند، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر شستشوی C با pH= ۶/۳ به ستون اضافه و محلول خروجی آن نیز جداگانه جمع آوری شد. پس از خروج کامل بافر شستشوی C، فرایند ذکر شده با استفاده از بافر شستشوی D با pH=۵/۹ انجام و محلول خروجی آن در میکروتیوب جمع آوری شد. جداسازی پروتئین نوترکیب از ستون با کمک بافر رهاسازی E با pH=۴/۳ انجام شد و نمونه های جمع آوری شده از مراحل چندگانه تخلیص پس از تیمار با سمپل بافر با روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور خارج کردن اوره و برگشت فولدینگ پروتئین، محصول پروتئینی به دست آمده با استفاده از کیسه دیالیز با Cut off =۱۲ و شیب غلظتی اوره از ۶ تا ۰ مولار دیالیز شد.

تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات

پس از بارگذاری پروتئین در SDS-PAGE، انتقال بر روی کاغذ نیتروسلولز با استفاده از تانک وسترن بلاتینگ (Biorad, USA) و بافر انتقال واجد گلایسین ۱۵۰ میلی مولار، تریس ۲۰ میلی مولار و متانول ۲۰ درصد انجام گردید. به منظور پوشاندن نواحی آزاد و فاقد پروتئین، کاغذ نیتروسلولز با بافر حاوی ۵ درصد شیر خشک تهیه شده در PBST (بافر PBS واجد ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ شب مجاور شد. جهت شستشو و حذف ترکیبات اضافی سه بار با بافر PBST شستشو داده شد.آنتی بادی ضد هیستیدین کانژوگه شده با آنزیم HRP، با رقت ۱:۱۰۰۰۰ بر روی کاغذ نیتروسلولز اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. پس از شستشو، بافر ظهور متشکل از تریس ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی گرم دی آمینوبنزیدین و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه روی کاغذ نیتروسلولز ریخته و پس از مشاهده باند های پروتئینی، واکنش با آب مقطر متوقف شد.

تهیه نانوژل کیتوسان (CS)-TPP

تهیه نانوذرات کیتوسانی به روش ژلاسیون یونی انجام شد. بدین منظور محلول یکنواخت و همگنی از کیتوسان با غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر با هم زدن ۰/۰۵ گرم از کیتوسان در ۲۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد در دمای اتاق به دست آمد. محلول TPP در آب مقطر نیز تهیه شد و pH آن با اسید کلریدریک ۴ نرمال روی ۴ تنظیم گردید. محلول TPP با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر و pH=۴، قطره قطره به محلول کیتوسان اضافه و به طور همزمان، سونیکاسیون مداوم با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز هم زدن اعمال گردید. نانوذره کیتوسان با نسبت ۴:۱ از CS: TPP در مدت ۶۰ دقیقه به دست آمد و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. نانوژل تهیه شده با آب

مقطـر شستـشو داده و پـس از آن در ۱۰ میلـی‌لیتـر آب مقطر با استفاده از سونیکاتور پروبـی سونیکاسـیون معلـق گردید.

بررسی شکل ظاهری و تعیین اندازه نانوذرات

شکل ظاهری نانوذرات تهیه شده بـا میکروسـکوپ الکترونی روبشی(SEM) (KYKY مونتاژ چین) بررسـی شـد. بـرای آمـاده سـازی نمونـه، رقـت‌هـای مختلفـی از نـانوژل تهیـه و بـر روی فویـل آلومینیـومی پخـش و بـا استفاده از دسیکاتور و پمـپ خـلاء در مـدت زمـان نـیم سـاعت خـشک گردیـد. نمونـه هـا را بـر روی یـک نگهدارنده قرار داده و تحت خلاء در آون خـشک و بـا طـلا پوشـانده شـدند تـا سـطح هـادی الکتریکـی باشـد. تصویر برداری از نانوذرات با شتاب ولتاژ ۱۰ کیلو ولـت و با بزرگنمایی ۱۰ هزار انجام شد.

برای اندازه گیری قطر نانوذرات و پتانسیل زتـای از دسـتگاه Zeta-potential sizer and analyzer سـاخت کمپانی Malvern استفاده شد. بدین منظور ابتـدا ۱ میلـی لیتر از نمونـه نـانوژل در PBS رقیـق و نمونـه حاصـل در سونیکیتور آبی (با افزودن یخ) سونیکه شد تـا نـانوذرات کـاملاً پراکنـده شـوند. نمونـه آمـاده شـده در کـوت مخصوص دستگاه قرار گرفته، قطـر ذرات و پراکنـدگی نانوژل‌ها و پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد.

بارگذاری نانوذرات و تعیین ظرفیت بارگذاری

۰/۵ میلـی لیتـر از نـانوژل بـا غلظـت کیتوسـان ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر سانتریفیوژ و رسوب حاصـل بـا ۱ میلـــی گـــرم از پـــروتئین نوترکیـــب IpaC توســـط سونیکاسیون بـا قـدرت ۴۰ مخلـوط گردیدنـد. مخلـوط حاصل یـک روز در دمـای ۲۵ درجـه سـانتی‌گـراد و در حال هـم خـوردن قـرار گرفـت تـا فراینـد ورد و جـذب پروتئین در نانو ذرات انجام شـود. محلـول کلوئیـدی در بستر گلیسرولی و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰دور در دقیقه به سانتریفیوژ گردید و رسـوب ژلـه ای حاصـل بـرای ادامـه تحقیـق در دمـای ۴ درجـه سـانتی گـراد نگهداری شد. مقدار پروتئین موجـود در محلـول روئـی اندازه‌گیری و ظرفیـت بارگـذاری (LC) بـا فرمـول زیـر محاسبه گردید:

مقدار کیتوسان فسفریله/(پروتئین آزاد- مقـدار پـروتئین کل) = LC

در ادامه یک میلی‌گرم از نانوژل تهیه شده در یـک میلی‌لیتر از بافر PBS معلق گردید و به مـدت ۴۸ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بـر روی شـیکر قـرار داده شد. سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول روئی پس از تغلیظ بر روی ژل SDS PAGE لود گردید.

ایمن سازی حیوان آزمایشگاهی

در این مطالعه خوکچه هندی با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از موسسه سرم و واکسن سازی رازی تهیه و در شرایط مناسب و با دسترسی آزادانه به آب و غـذا در گروه هـای مجـزا نگهـداری شـدند. اصـول اخلاقـی در مـورد کـار بـا حیوانـات رعایـت گردیـد. ایمنـی زایـی نانوذرات واجد پروتئین نوترکیـب از مـسیر خـوراکی بـا خورانـــدن ۳۰۰ میکرولیتـــر از نـــانوذرات واجـــد ۱۰۰ میکروگرم آنتی ژن نوترکیب به هر حیوان آزمایشگاهی انجام شد. برای ایمنی زایی از مسیر تزریقی نیـز پـروتئین بارگـذاری شـده در نـانوذره و بـه میـزان ۳۰ میکروگـرم برای هر خوکچه در نظر گرفته شـد. حیوانـات در گـروه کنترل نیز نانوذرات فاقـد پـروتئین نوترکیـب را دریافـت کردند. در هر دو گروه خوراکی و تزریقـی، دوره هـای ایمن سازی به صورت ۴ مرحله با فواصل ۱۵ روزه بود.

بررسی تولید آنتی بادی علیه پروتوین نوترکیب به روش الا یزا

بـه منظـور تهیـه سـرم، در فواصـل مـنظم پـس از تزریقات مرحله دوم به بعد از خوکچه هـا خـونگیری بـه

عمل آمد. نمونه‌های خون تهیه شده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شده و پس از آن یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با اعمال سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه، سرم جداسازی و تا زمان استفاده جهت بررسی آنتی‌بادی در دمای ۲۰- نگهداری شد. برای انجام الیزا، ۵ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده همراه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات-بی کربنات در داخل چاهک‌های پلیت الایزا به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد تثبیت شد. شستشوی چاهک‌ها ،۶ مرتبه با بافر PBST انجام شد. پس از خشک کردن چاهک‌ها، جهت جلوگیری از واکنش‌های نا خواسته سرم با کف میکروپلیت، بافر پوشانده PBST دارای ۵ درصد پودر شیر خشک پس چرب شده به مدت ۱ ساعت و اعمال دمای ۳۷ درجه سانتی گراد. استفاده گردید. پس از شستشوی چاهک ها، رقت های ۱/۲۰۰ تا ۱/۲۵۶۰۰ از نمونه سرم تهیه و به چاهک‌های مورد نظر اضافه شد. پلیت های الیزا به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کانژوگه خوکچه هندی با رقت ۱/۲۰۰۰ اضافه و سپس پلیت الیزا در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در مرحله اشکارسازی ، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر تترا متیل بنزیدین اضافه و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. واکنش تغییر رنگ سوبسترا با افزودن اسید سولفوریک ۳ مولار متوقف و جذب نوری نمونه ها توسط دستگاه خواننده الایزا (TECAN) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

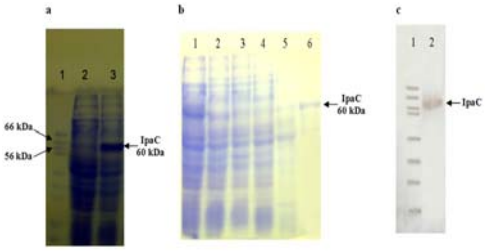
بررسی خوکچه های ایمن شده با IpaC و غیر ایمن با روش کراتوکانجوگیتیو

باکتری شیگلا فلکسنری در محیط کشت LB مایع رشد داده شد و با شمارش باکتری ، تعداد 2×10^{8} باکتری را در سرم استریل به صورت سوسپانسیون در آورده و به چشم های خوکچه‌ها تلقیح شد و با دست پلک های حیوان را بسته به طوری که باکتری خارج نشود. پلک‌های بسته را ماساژ داده تا باکتری کاملا در سطح چشم حیوان پخش و جذب شود . بعد از ۲۴ ساعت چشم حیوان بررسی شد. ایجاد عفونت به شکل یک لایه سفید در سطح چشم و یا عدم ایجاد عفونت ملاکی برای سنجش به شمار رفت.

یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب IpaC

به دنبال القای بیان پروتئین با IPTG، جداسازی پروتئین به روش دناتوره انجام و نتیجه بر روی SDS-PAGE ۹ درصد بررسی شد. وزن مولکولی پروتئین IpaC با اضافه شدن فیوژن تیرودوکسین وکتور pET32a به ۶۰ کیلو دالتون می رسد که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در ستون مربوط به نمونه فاقد IPTG چنین باند پروتئینی مشاهده نمی شود.



تصویر شماره ۱: بیان پروتئین نوترکیب IpaC(a). ردیف ۱: نشانگر وزن پروتئین، ردیف ۲: کلون القا نشده، ردیف ۳: کلون القا شده با IPTG. پروتئین با وزن تقریبی ۶۰ کیلو دالتون در نمونه القا شده دیده می شود. این باند پروتئین در کلون القا نشده وجود ندارد.

تخلیص پروتئین نوترکیب (b). ردیف ۱: القا بیان پروتئین، ردیف ۲: خروجی ستون قبل از شستشو با بافر ردیف ۳ و ۴: خروجی ستون با بافر شستشوی C,D، ردیف ۵ و ۶: خروجی ستون با بافر رها سازی E و ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار. پروتئین نوترکیب در آخرین مرحله شستشو از ستون خارج شده است.

وسترن بلاتینگ (c). ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲: واکنش پروتئین با آنتی بادی ضد هیستیدین. باند ظاهر شده با وزن ۶۰ کیلو دالتون تایئد کننده واکنش آنتی بادی با توالی ۶ هیستیدن موجود در پروتئین می باشد.

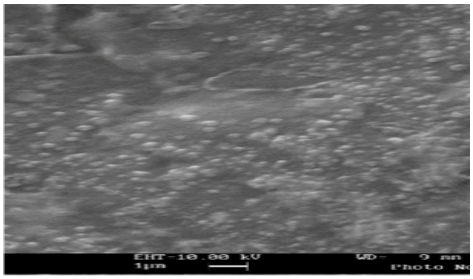
جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از روش دناتوره و بافرهای شستشو دهنده C و D و بافر رهاسازی E حاوی اوره ۸ مولار و ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. خروجی‌های حاصل از ستون جمع‌آوری و با SDS-PAGE بررسی شد که نتایج آن در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود پروتئین نوترکیب با خلوص بالایی در خروجی ستون حاصل از بافر اوره ۸ مولار حاوی ایمیدازول وجود دارد.

تایید پروتئین نوترکیب

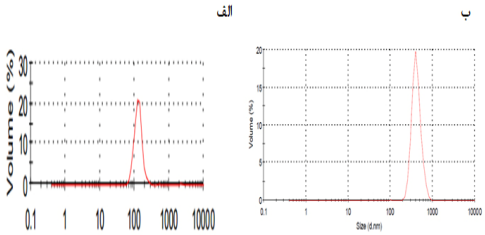
برای اطمینان از صحت پروتئین نوترکیب تولید شده، از روش وسترن بلات با آنتی بادی ضد نشان هیستیدین استفاده شد. پروتئین خالص شده، الکتروفورز و بر روی کاغذ نیتروسلولز تثبیت شد. تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد که آنتی بادی ضد هیستیدین توانسته توالی ۶ تکرار هیستیدین که به انتهای امینی پروتئین نوترکیب جوش خورده را شناسایی کرده و با آن واکنش دهد و از این طریق حضور پروتئین تائید شد.

تهیه نانوذرات کیتوسان و برآورد ظرفیت بارگذاری پروتئین

نانوذرات کیتوسان به روش ژله ای شدن یونی تهیه شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات به دست آمده در شکل ۲ آورده شده است. اندازه نانوذرات کمتر از ۴۵۰ نانومتر تعیین شد. نتایج دستگاه DLS در تصویر شماره ۳ نیز تولید نانوذرات کیتوسانی با میانگین اندازه ۴۱۸ نانومتر را نشان داد. اندازه نانوذرات قبل از مجاور سازی با پروتئین نوترکیب ۱۹۵ نانو متر بود. پتانسیل زتای نمونه پس از بارگذاری پروتئین نوترکیب به ۶/۱۰+ رسید. شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده ۰/۱۸۲ بود. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات کیتوسان پس از گذشت ۴۸ ساعت به ۹۸ درصد رسید. محلول روئی مربوط به رها سازی پروتئین نیز بر روی ژل SDS-PAGE لود گردید و وجود پروتئین ۶۰ کیلو دالتونی تائید کننده جذب پروتئین توسط نانوژل کیتوسان بود که پس از مدت ۴۸ ساعت مقداری از آن ره سازی شده بود.



تصویر شماره ۲:تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات کیتوسان واجد پروتئین نوترکیب (نانوذرات خشک شده بر روی فویل آلومینیومی، روی گرید قرار داده شده و پس از پوشش دهی با طلا، با استفاده از میکروسکوپ SEM تصویربرداری شد)

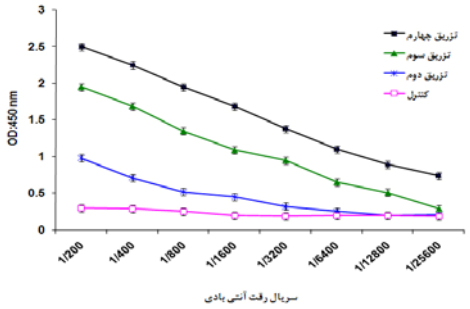


تصویر شماره ۳: توزیع اندازه نانوذرات کیتوسان قبل (الف) و بعد از مجاور سازی با پروتئین نوترکیب (ب). افزایش اندازه پس از مجاور سازی پروتئین با نانوذرات مشهود می باشد

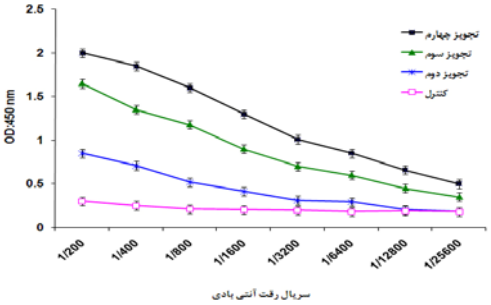
سنجش میانگین تیتر آنتی بادی با روش ELISA

بررسی میانگین تیتر آنتی بادی نمونه های سرم جدا شده از حیوانات ایمن با استفاده از نانوذره تزریقی و خوراکی و حیوانات شاهد با روش الیزای غیر مستقیم انجام شد. نتایج به دست آمده در نمودارهای مربوط به تصاویر شماره ۴ و ۵ نمایش داده شده است. در تصویر شماره ۴، افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروه تست که آنتی‌ژن بارگذاری شده در نانوذرات را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند، دیده می شود. نتایج به

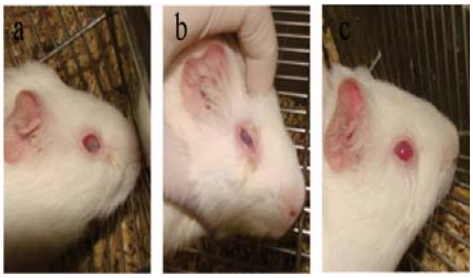
دست آمده از تیتر آنتی بادی نشان می‌دهد که در حیوان‌های ایمن شده، تیتر آنتی بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل (p <۰/۰۱) بود. در هر مرحله از تزریق، شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی بودیم؛ به نحوی که بیش‌ترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۲/۵ بود. تصویر شماره ۵ نیز بیانگر این است که تجویز خوراکی نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن نیز همانند گروه قبلی، منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتر آنتی بادی نشان می دهد که در خوکچه های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن، تیتر آنتی بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل (p <۰/۰۱) بود.



تصویر شماره ٤: تیتر آنتی بادی تولید شده در خوکچه پس از تزریق نانوذرات واجد پروتئین نوترکیب. تیتر آنتی بادی در هر مرحله از تجویز نانوذرات افزایش یافته است. افزایش تیتر آنتی بادی در هر مرحله تفاوت معنی داری با مرحله قبل داشته است.



تصویر شماره ٥: تیتر آنتی بادی تولید شده در خوکچه پس از تجویز خوراکی نانوذرات واجد پروتئین نوترکیب. تیتر آنتی بادی در هر مرحله از تجویز نانوذرات افزایش یافته است. افزایش تیتر آنتی بادی در هر مرحله تفاوت معنی داری با مرحله قبل داشته است.



تصویر شماره ۶: بررسی مقاومت خوکچه های ایمن و غیر ایمن به روش سرنی

a) آلوده شدن چشم خوکچه غیر ایمن در اثر تلقیح باکتری شیگلا. چشم خوکچه بعد از چالش با باکتری دچار عفونت همراه با چرک شد.

b) آلوده شدن خفیف تر چشم خوکچه ایمن شده به روش تزریقی در اثر تلقیح باکتری شیگلا. چشم خوکچه بعد از چالش با باکتری دچار عفونت خفیف تری شد.

c) ایجاد محافظت در برابر تهاج باکتری شیگلا در چشم خوکچه ایمن شده به روش خوراکی. علائمی از بروز عفونت دیده نشد.

بررسی مقاومت خوکچه های ایمن و غیر ایمن با تست سرنی

با انجام تست سرنی بررسی مقاومت حیوان نسبت به شیگلا فلکسنری ۲۴ ساعت بعد از آلودگی صورت گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره ۶ آورده شده است، بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت، مشاهده شد که چشم‌های خوکچه های کنترل، دچار عفونت شده که نشان از تاثیر باکتری شیگلا بر روی آن ها بوده و این عفونت به صورت یک لایه شفاف بعد از ۴۸ ساعت بر روی چشم ها مشهود بود. این در حالی است که در چشم‌های خوکچه های متعلق به گروه تست ایمن شده از طریق تجویز تزریقی نانوذرات با گذشت ۹۶ ساعت، عفونت در چشم‌ها مشاهده شد. در صورتی که چشم خوکچه‌های ایمن شده با روش خوراکی پس از گذشت مدت زمان مذکور هنوز هم سالم بوده و نشان دهنده مقاومت خوب آن ها نسبت به باکتری می‌باشد.

بحث

شیگلا دارای پلاسمید ۲۰۰ هزار جفت بازی است که حضور آن برای تهاجم شیگلا به سلول های اپیتلیال کولون ضرورت دارد. در واقع از مهم ترین عوامل ویرولانس باکتری، آنتی‌ژن‌های تهاجم پلاسمید هستند. در مواجهه باکتری با سلول های اپیتلیال، پروتئین ها ئی از جمله IpaC و IpaB که در اتصال و تهاجم باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال نقش دارند، ترشح می‌شوند(۳، ۴). در سال Swapan۲۰۰۵ نشان داد که از پروتئین های تخلیص شده شیگلا، تنها IpaC قابلیت تهاجم در محیط آزمایشگاهی را دارد(۲۸).

پروتئین IpaC به دلیل دارا بودن نواحی اپی توپی قوی به عنوان ایمونوژن مطرح شده است(۲۹). با توجه به مکانیزم عمل باکتری و هم چنین منشا شروع بیماری در روده، ما در این تحقیق جهت ایجاد ایمنی مخاطی بر آن شدیم که از نانوذرات به عنوان حامل برای انتقال خوراکی پروتئین نوترکیب IpaC به روده استفاده کنیم.

برای تجویز و ارائه ایمونوژن های نوترکیب زیر واحدی، استفاده و به کارگیری ادجوانت های موثر و یا حامل‌ها که سبب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی بدن شود، لازم و ضروری می باشد ر این راستا، نانوتکنولوژی و توسعه واکسن‌های مبتنی بر نانو حامل ها به دلیل ایجاد ایمنی موثرتر از طریق هدف گیری بهتر سلول های عرضه کننده آنتی ژن و نیز تحریک پاسخ های ایمنی در سطح سلولی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به علاوه توجه محققین به راه های تجویز واکسن به منظور القای هر دو ایمنی سیستمیک و مخاطی علیه پاتوژن نیز متمرکز شده است. بنابراین از طریق انتخاب آگاهانه سیستم های مبتنی بر فناوری نانو و نوع آنتی ژن و نیز مسیر تجویز واکسن، ایمن سازی و حفاظت مطلوب و بهینه علیه بیماری می‌تواند القا شود(۱۹).

استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر در تهیه نانوذره می تواند انتشار آهسته آنتی ژن در جایگاه مورد نظر را در یک دوره چند روزه فراهم سازد(۱۸، ۱۹). کیتوسان با منشاء طبیعی و غیرسمی با تجزیه پذیری زیستی، سازگاری زیستی، به عنوان پلیمری مناسب برای تهیه نانوذره برای مصارف دارو رسانی و رسانش ایمونوژن‌ها مد نظر است. کیتوسان با اتصال دهنده متقاطع تری پلی فسفات (TPP) تهیه شد. یکی از روش‌های مناسب و مؤثر برای اصلاح خواص هیدروژل کیتوسان، ایجاد و چگونگی ایجاد اتصالات عرضی درآن است. یکی از ساده ترین روش های تهیه نانوذرات کایتوسان، روش ژله ای شدن یونی است. در این تحقیق برای تهیه نانوذرات بر پایه کیتوسان، روش یک مرحله ای تهیه نانوژل با نسبت ۱ : ۴ برای کیتوسان: TPP مد نظر قرار گرفت. با تغییر نسبت مولی کیتوسان: TPP امکان عملکرد نانوذرات حاصل در pH فیزیولوژیک مهیا گردید. یکی از مزایای به کار گیری این روش، بارگذاری مطلوب و آسان نانوژل حاصل با پروتئین نوترکیب از طریق انکوباسیون می باشد. در تحقیق های جداگانه ترانه جو و Ibezim گزارش کرده اند که غلظت TPP مورد استفاده در تهیه نانوذره می تواند در تجمع و اتصال نانوذرات سنتز شده به هم موثر بوده و این عامل می تواند در تغییر اندازه ذرات نقش مهمی داشته باشد(۳۰، ۳۱). در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین، متعاقب اثر TPP بر کیتوسان، بارهای مثبت موجود در کیتوسان به بار منفی تغییر یافته و در نتیجه در ترکیب حاصل میل ایجاد اتصال الکترواستاتیک با سطح موکوس بالاتر رفته و بدین ترتیب یک نانوژل مناسب برای دارورسانی هدفمند خصوصاً به روش غیرفعال ایجاد گردید. در حالی که در تهیه نانوژل های دیگری مانند PLGA، تهیه نانوژل و بارگذاری آن طی مراحل متعدد و در حین تهیه نانوژل صورت می گیرد(۲).

در تحقیق حاضر، غلظت‌های متفاوتی از TPP به عنوان رابط پلیمری مورد استفاده قرار گرفت که در نتیجه آن، استفاده از غلظت‌های بیش‌تر TPP باعث پل زدن TPP بین ذرات کیتوسان و در نتیجه بزرگ شدن ذرات، تجمع و رسوب آن‌ها شد. تحقیقات انجام شده

توسط Tsai و همکارانش، اثر افزایش غلظت کیتوسان بر قطر نانوذرات تولیدی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که افزایش غلظت پلیمر می‌تواند باعث افزایش متوسط قطر نانوذرات شود(۳۲). بر این اساس در این تحقیق نیز حداکثر غلظت کیتوسان مورد استفاده ۱/۵ میلی گرم در نظر گرفته شد.

میانگین اندازه ذرات برای نانوژل واجد پروتئین IpaC حدود ۴۱۸ نانومتر با PdI حدود ۰/۱۸۲ و پتانسیل زتای ۶/۱۰+ میلی ولت می باشد. در تحقیق دعاوی و همکاران، سایز نانوذرات کایتوسانی تهیه شده بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بوده که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر، کوچک تر می باشند(۳۳). یکی از علل بالاتر بودن اندازه نانوذرات این تحقیق می تواند به تعداد دفعات سونیکاسیون و غلظت پلیمر کایتوسان مورد استفاده مرتبط باشد، هر چند که غلظت کیتوسان مورد استفاده، ۱/۵ میلی گرم در نظر گرفته شد. هم چنین استفاده از روش مجاور سازی آنتی ژن با نانوذرات از قبل تهیه شده نیز عاملی است که می تواند بر اندازه نانوذرات تاثیر داشته باشد.

حسین‌زاده و همکارانش نشان دادند با به کار بردن غلظت بالای پلیمر کیتوسان، اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده نیز افزایش می‌یابد. هم چنین با افزایش غلظت TPP، اندازه نانوذرات افزایش ولی پتانسیل زتای آن کاهش می‌یابد(۳۴).

پتانسیل زتای نانوذرات تاثیر زیادی بر پایداری آن‌ها در محلول دارد؛ به گونه ای که ذرات کیتوسان با ویژگی پتانسیل زتای مثبت و بالاتر پایداری بیش‌تری در نمونه از خود نشان می دهند. یکی از نکات مهم در بحث نانوذرات کایتوسان این است که چنانچه پتانسیل زتای ذرات مثبت‌تر باشد، چسبندگی آن ها به پروتئین‌ها و سلول‌های مخاطی بیش‌تر خواهد بود(۳۵).

نتایج به دست آمده نشان داد که ظرفیت بارگذاری با افزایش غلظت پروتئین و افزایش زمان انکوباسیون از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت افزایش می یابد. در تحقیقات انجام گرفته توسط عتابی و همکاران، با ۲۴ ساعت انکوباسیون نانوژل با داروی دکسوروبیسین، مقدار بارگذاری مؤثر (LC) ۹۷ درصد به دست آمد(۳۴). بر طبق گزارشات ترانه جو و همکاران، غلظت کیتوسان و مقدار TPP، نسبت پروتئین به پلیمر و سرعت بهم زدن، ممکن است بارگذاری مؤثر (LE) دارو یا عوامل بیولوژیکی دیگر را تحت تأثیر قرار دهد(۳۰). شهسواری و همکاران نیز گزارش نمودند که کاهش غلظت در نسبت کیتوسان به TPP می تواند بر روی LE اثر داشته باشد(۳۷). ظرفیت بالای بارگذاری (LC) نانوژل های کیتوسان با پروتئین در خارج از بدن و در آزمایشگاه، می تواند آن ها را به عنوان کاندید مناسبی برای انتقال پروتئین و واکسن رسانی مطرح نماید. در این تحقیق ظرفیت بارگذاری نانوژل کیتوسان پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با پروتئین حدود ۵۲ درصد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به ۹۸ درصد رسید که در مقایسه با پژوهش مشابه بیش‌تر می‌باشد(۳۰، ۳۷).

نتایج الایزای ارائه شده نشان می داد که در هر دو گروه مورد بررسی، میزان تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله افزایش یافته است. افزایش تیتر آنتی‌بادی حاکی از آن است که نانوذرات پلیمری کیتوسان توانسته‌اند به عنوان ادجوانت عمل کرده و با رهایش آهسته و مناسب آنتی‌ژن و عرضه آن به سیستم ایمنی، منجر به تولید آنتی‌بادی شود.

جهت چالش موش های ایمن شده با آنتی ژن IpaCاز باکتری شیگلا فلکسنری استفاده شد. در تحقیق انجام شده توسط ملائی و همکاران، ایمنی زائی با استفاده از ادجوانت فروند انجام و نتایج آن ها نشان داد که آنتی بادی تولید شده علیه IpaC سبب ایجاد تحمل در تست سرنی با تجویز 10^8 باکتری گردیده است(۳). نتایج تحقیق حاضر نیز با تحقیق ملائی و همکاران همخوانی دارد. اما آنچه که باید مد نظر باشد این است که در مطالعه حاضر از ادجوانت فروند که سبب بروز التهاب می شود استفاده نگردید.

نتیجه چالش خوکچه‌های ایمن شده با نانوذرات از روش تزریقی و خوراکی نشان داد که در روش ایمن سازی تزریقی اگر چه تیتر آنتی بادی به دست آمده در مقایسه با ایمنی زائی خوراکی با استفاده از نانوذرات کیتوسان بالاتر بود، اما میزان حفاظت بخشی کم‌تری حاصل شد. به نحوی که میزان تهاجم باکتری به چشم خوکچه ایمن شده به روش تزریقی بیش‌تر از حیوان ایمن شده به روش خوراکی بود. این نتیجه موید آن است که روش ایمنی سازی حیوان باید متناسب با مکانیسم ایجاد بیماری و موضع شروع عفونت در بدن باشد.

حفاظت بخشی حیوان ایمن شده با نانوذرات حاوی IpaC از مسیر خوراکی بهتر از مسیر تزریقی بود. امکان جایگزین کردن کیتوسان به عنوان حامل و تحریک کننده سیستم ایمنی با ادجوانت وجود دارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد جهت فراهم آوردن امکانات لازم جهت اجرای این تحقیق تشکر می‌گردد.

References

1. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. Jpn *J Infect Dis*. 2014; 67(2): 78-85.
2. 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): 205-212.
3. Malaei F, Hesaraki M, Saadati M, Ahdi AM, Sadraeian M, Honari H, et al. Immunogenicity of a new recombinant IpaC from *Shigella dysenteriae* type I in guinea pig as a vaccine candidate. Iran J Immunol. 2013; 10(2): 110-117.
4. Carayol N, Tran Van Nhieu G.Tips and tricks about Shigella invasion of epithelial cells. Curr Opin Microbiol. 2013;16(1):32-37.
5. The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. Nat Rev Microbiol. 2016; 14(4): 235-250.
6. Schuch R, Maurelli AT. The mxi-Spa type III secretory pathway of Shigella flexneri requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. Infect Immun. 1999; 67(4):1982-1991.
7. Lee JH, Park H, Park YH. Molecular mechanisms of host cytoskeletal rearrangements by Shigella invasins.Int J Mol Sci. 2014; 15(10):18253-1866.
8. Yang SC, Hung CF, Aljuffali IA, Fang JY. The roles of the virulence factor IpaB in Shigella spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. Microbiol Res. 2015;181:43-51.
9. Roehrich AD, Guillossou E, Blocker AJ, Martinez- Argudo I. *Shigella* IpaD has a dual role :signal transduction from the type III secretion system needletip and intracellular secretion regulation. Mol Microbiol. 2013; 87(3):690-706.
10. Heine SJ , Franco-Mahecha OL , Chen X, Choudhari S, Blackwelder WC, van

Roosmalen ML, et al. Shigella IpaB and IpaD displayed on L. lactis bacterium-like particles induce protective immunity in adult and infant mice. Immunol Cell Biol. 2015; 93(7): 641-652.

11. Pasetti MF, Jakub K. Simon, Marcelo B. Sztein, Myron M Levine. Immunology of Gut Mucosal Vaccines.Immunol Rev. 2011; 239(1): 125–148.

12. Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-McNair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, et all, Broadly protective Shigella vaccine based on type III secretion apparatus proteins. Infect Immun. 2012; 80(3): 1222-1231.

13. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. Nat Rev Immunol. 2012; 12(8): 592-605.

14. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD. Mucosal vaccine design and delivery. Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:17-46.

15. Van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination *Adv Drug Deliver Rev*. 2001; 52(2):139-144.

16. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. Biomaterials. 2010; 31(13): 3657-3666.

17. O Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. Microparticle-based technologies for vaccines. Methods. 2006;40(1):10-19.

18. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014; 32(3): 327-337.

19. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles.Front Cell Infect Microbiol. 2013; 3:13.

20. Badawy M, Rabea E. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. Int J Carbohydr Chem. 2011;2011:1-29.

21. Prego C, Garcia M, Torres D, Alonso M. Transmucosal macromolecular drug delivery. J Control Release. 2005;101(1-3):151-162.

22. Kang ML, Cho CS, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(6):857-865.

23. Koppolu B, Zaharoff DA. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. *Biomaterials*. 2013; 34(9):2359-2369.

24. Koppolu BP, Smith SG, Ravindranathan S, Jayanthi S, Suresh Kumar TK, Zaharoff DA. Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery.Biomaterials. 2014; 35(14): 4382-4389.

25. Mitra A, Dey B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian J Pharm Sci.* 2011 ; 73(4):355-366.

26. Baranvand M, Honari H. Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice. J Sabzevar Univ Med Sci. 2016;23(4):688-697.

27. Camacho AI, Irache JM, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Gamazo C. Nanoparticle-based vaccine for mucosal protection against Shigella flexneri in mice. Vaccine. 2013; 31(32): 3288-3294.

28. Niyoqi SK. Shigellosis. J Microbiol. 2005; 43(2): 133-143.

29. Khaloiee F, Pourfarzam P, Rasooli I, Amani J, Nazarian S, Mousavi S. (2013). In silico analysis of chimeric recombinant immunogen against three diarrhea causing bacteria. J Cell Mol Res. 2013; 5(2): 65-74.

30. Taranejoo S, Janmaleki M, Rafienia M, Kamali M, Mansouri M. Chitosan microparticles loaded with exotoxin A subunit antigen for intranasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study. *Carbohydr Polym*. 2011;83(4):1854-1861.

31. Ibezim E, Andrade C, Marcia C, Barretto B, Odimegwu D, de Lima F. Ionically Cross-linked Chitosan/ Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine. *Ibnosina J Med Biomed Sci*. 2011; 3(3): 77-88.

32. Tsai M, Bai SW, Chen RH. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohyd Polym*. 2008; 71(3): 448-457.

33. Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Ramandi M. Chitosan-Based Intranasal Vaccine against Escherichia coli O157: H7. *Iran biomed j*. 2016;20(2):97-108.

34. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R,Ostad SN. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine:preparation and in vitro study. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 1851-1863.

35. Honary S , Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems- A review (Part 1).*Trop J Pharm Res*. 2013; 12 (2): 255-264.

36. Atabi F, Mousavi SL, Hashemi M, Yaghmaei P. Designing and Comparison of Two Types of Chitosan Nanogels for Doxorubicine Delivery. *Pathobiol Res*.2015;18(2):53-67.(persian).

37. Shahsavari S, Vasheghani-Farahani E, Ardjmand M, Abedin Dorkoosh F. Modeling of Drug Released from Acyclovir Nanoparticles Based on Artificial Neural Networks. *Lett Drug Des Discov*. 2014; 11(2): 174-183.