Original Article

Production of Antibody against CtxB Recombinant Protein based on Nanofibers and Nanocapsules

Yousef Masti[1], Mojtaba Saadati[2*], Shahram Nazarian[3], Mahdi Fasihi Ramandi[4], Morteza Asadi[1], Mohammadali Arefpoor[5]

1- M.Sc. Student, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3- Ph.D., Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
4- Ph.D. Candidate, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- M.Sc., Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Box: 19395-5739, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran*
Email: Saadati_m1@yahoo.com

Received: 09/Apr/2014, Accepted: 04/Oct/2014

Abstract

Objectives: CtxB (Cholera toxin B subunit) contributes to a vaccine's efficacy by stimulating production of the anti-CtxB antibody. Various attempts have been made to increase production of this antibody. Chitosan is a mucoadhesive polysaccharide that has tremendous potential for oral vaccine delivery in terms of its exclusive features that include biocompatibility, biodegradability, high charge density and non-toxicity. We investigated the potential for chitosan nanofibers and nanocapsules as novel carrier systems for the oral delivery of CtxB.

Methods: Antigen-containing chitosan nanofibers were prepared by electrospinning a chitosan/AcOH solution. Encapsulation of the antigen inside the chitosan nanofibers was confirmed through infrared spectroscopy analysis (FTIR). Guinea pigs were immunized with free antigen and CtxB antigen or antigen alone by direct administration of antigen-containing chitosan nanofibers into the buccal cavity. Serum immunoglobulin G (IgG) and intestinal immunoglobulin A (IgA) antibody responses were determined

Results: The results indicated that antigen in the chitosan nanofibers or nanocapsules elicited very high IgA and IgG responses. No detectable IgA and IgG responses were obtained after oral immunization with CtxB. The results of the antibody titer were analyzed using the ANOVA and LSD tests.

Conclusion: CtxB inside the nanofiber increased antibody production when administered orally. This system might be used for delivery of other antigens.

Keywords: Nanofiber, Nanocapsule, Chitosan, CtxB, Antibody Titer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 53-61

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

مقاله اصیل

تهیه آنتی‌بادی با استفاده از نانوفیبر و نانوکپسول تجویز خوراکی حاوی آنتروتوکسین وبا

یوسف مستی[1]، مجتبی سعادتی[2*]، شهرام نظریان[3]، مهدی فصیحی رامندی[4]، مرتضی اسدی[1]، محمد علی عارف پور[5]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۵۷۳۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email: Saadati_m1@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۳/۰۱/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۷/۱۲

چکیده

هدف: CtxB با تحریک تولید آنتی‌بادی علیه CtxB منجر به اثر بخشی واکسن شده است تلاش‌های مختلفی در راستای افزایش تولید این آنتی‌بادی صورت پذیرفته شده است. کایتوسان پلی‌ساکاریدی است که می‌تواند به مخاط بچسبد؛ این ماده با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، چگالی بار بالا و غیر سمی، پتانسیل بسیار زیادی برای تحویل واکسن خوراکی دارد.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه از نانوکایتوسان و نانوکپسول به‌عنوان یک سیستم حامل برای ارایه خوراکی CTXB استفاده شد. نانوکایتوسان حاوی آنتی‌ژن توسط الکترواسپینینگ محلول کایتوسان / AcOH آماده شد. آنتی‌ژن در داخل نانوالیاف کایتوسان از طریق تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز تأیید شد. خوکچه‌های هندی توسط تلقیح مستقیم نانوالیاف کایتوسان حاوی آنتی‌ژن به داخل حفره دهانی ایمن شدند. پاسخ‌های ایمونوگلوبولین سرم G (IgG) و ایمونوگلوبولین روده‌ای A (IgA) آنتی‌بادی تعیین شد.

نتایج: خوکچه‌های هندی به‌وسیله کایتوسان همراه با آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن به تنهایی ایمن شدند. نتایج به‌دست آمده نشانگر پاسخ بسیار زیاد آنتی‌ژن همراه نانوفیبر و نانوکپسول بود. آنتی‌بادی IgA و IgG پس از تجویز خوراکی CtxB تولید نشد. نتایج آنتی‌بادی تولید شده با استفاده ازآزمون ANOVA و LSD تجزیه و تحلیل شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان دهنده آن است که در روش خوراکی می‌توان با نانویی کردن آنتی‌ژن تیتر آنتی‌بادی را بالا برد. این سیستم می‌تواند برای انتقال دیگر آنتی‌ژن‌ها استفاده شود.

کلیدواژگان: CtxB، نانوفیبر، نانوکپسول، تیتر آنتی‌بادی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۵۳-۶۱

مقدمه

وبا بیماری اسهال حاد و آبکی است که عامل آن ویبرو کلرا (*Vibrio cholerae*) است و با دفع حجم بالای از آب در مدفوع همراه است. بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۰ حدود نیم میلیون مورد از این بیماری گزارش شده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

که ۲۰۰۰۰ مورد از آن به مرگ منجر شده است [۱]. بیماری وبا در شدیدترین شکل خود موجب از دست رفتن سریع آب و الکترولیت‌ها از دستگاه گوارش شده که منجر به کاهش شدید حجم پلاسمای گردش خون و در نتیجه کلاپس (Collapse) عروق و مرگ در عرض چند ساعت می‌شود. در صورت عدم درمان، میزان مرگ و میر بیماری به حدود ٦٠ درصد می‌رسد. بیماری وبا به علت انتقال آسان، شیوع سریع به‌خصوص در مواردی از قبیل سیل، زلزله، اردوگاه‌های آوارگان و ... که سطح بهداشت پایین است، سلامت افراد را به شدت تهدید می‌کند [۲ – ٤]. باکتری ویبریو کلرا عامل بیماری وبا است که این باکتری چندین توکسین تولید می‌کند که مهم‌ترین آن‌ها اگزوتوکسین کلرا بوده و عامل اصلی بیماری وبا محسوب می‌شود. آنتروتوکسین وبا خواص آنتی‌ژنیک قابل ملاحظه‌ای از خود نشان می‌دهد به‌طوری که توجه محققین را برای استفاده از این آنتی‌ژن به‌منظور ایجاد مصونیت در مقابل این بیماری به خود معطوف داشته است [٥، ٦].

مولکول آنتروتوکسین از دو قسمت اصلی "A" (Active) به وزن مولکولی ۲۷۰۰۰ دالتون و "B" (Binding) به وزن مولکولی ۵۸۰۰۰ دالتون تشکیل شده است. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسیدآمینه‌ای است که وزن مولکولی هریک ۱۱٦۰۰ دالتون است. زیر واحد A دارای وزنی معادل ۲۷/۲ کیلودالتون بوده و دارای دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی به نام‌های A1 و A2 است. پپتید A1 دارای ۱۹۵ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۲۱/۸ کیلودالتون بوده و مسئول کلیهٔ فعل و انفعالات زیستی آنتروتوکسین ویبریو کلرا است. پپتید A2 با ٤٥ اسیدآمینه و دارای وزن مولکولی ٥/٤ کیلودالتون است [۷، ۸].

زیر واحد B خاصیت سمی نداشته و مسئول اتصال سم به گیرنده‌های موجود در غشا سیتوپلاسمی سلول میزبان است. این قسمت A1 را قادر می‌سازد که به درون سلول نفوذ کند. عملکرد زیر واحد A1 تولید مداوم آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) داخل سلولی را سبب می‌شود که در نتیجه الکترولیت‌ها و آب بیش از حد طبیعی از روده دفع خواهد شد. یکی از آنتی‌ژن‌هایی که می‌توان برای واکسن‌های نوترکیب استفاده کرد زیر واحد B آنتروتوکسین وبا است که در صورت تجویز خوراکی یا استنشاقی، به شدت موجب تحریک سیستم ایمنی به‌ویژه سیستم ایمنی مخاطی می‌شود [۹–۱۱].

تجویز دارو از طریق خوراکی نسبت به روش تزریقی دارای مزایایی از جمله عدم درد و عدم آلودگی حین تزریق است. با این حال در روش تجویز خوراکی امکان تخریب آنتی‌ژن به‌واسطه عملکرد آنزیم‌های گوارشی وجود دارد. برای رفع این چالش می‌توان از نانوذرات کمک گرفت. نانوذرات با ساختار ویژه خود آنتی‌ژن را از دسترس این آنزیم‌ها دور نگه داشته و همچنین در هنگام جذب با رهایش مناسب به آنتی‌ژن کمک می‌کند که بهتر در دسترس سیستم ایمنی قرار گیرد. [۱۲، ۱۳].

نانوذارت اندازهٔ حدود ۱۰۰ نانومتر دارد و از آن‌ها در انتقال تعدادی از داروها از قبیل داروهای کوچک آب دوست، داروهای کوچک آب گریز، واکسن‌ها و ماکرومولکول‌های زیستی استفاده شده است [۱٤، ۱٥].

یکی از نانوذرات زیست‌تخریب‌پذیر کایتوسان (Chitosan) است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک ماده زیستی برای فرمولاسیون‌های دارویی و آنتی‌ژنی مورد توجه است [۱٦–۱۸].

برای مقابله با بیماری وبا به‌خصوص در موارد بحرانی و همچنین شیوع سریع و آسان این بیماری‌زا و پیدا شدن سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و در دسترس نبودن واکسن مؤثر، نیاز به توسعه یک واکسن مناسب علیه این باکتری احساس می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی و توسعه روشی برای تحویل مناسب آنتی‌ژن زیر واحد اتصالی توکسین کلرا با نانوفیبر و نانوکپسول بود. تا در آینده به‌عنوان کاندید واکسن علیه بیماری وبا مطرح شود [۱۹–۲۱].

مواد و روش‌ها

مواد

پلیمر کایتوسان با وزن مولکولی متوسط و درجه استیلاسیون

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

۷۵ تـا ۸۰ درصـد، بـافر HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid]، PMSF (Phenyl-methanesulfonylfluoride) و OPD (Ophenylenediamine) از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد. TPP (پنتـا سـدیم تری پلی‌فسفات: PentasodiumTripolyphosphate) با وزن مولکولی ۳۶۷/۸۶ و اسید استیک گلایسـیال (Glacial Acetic Acid) از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. آنتـی‌بـادی ضـد هیستیدین از شرکت Qiagen (آمریکا) و کونژوگه (آنتی‌بادی ثانویه) از شرکت DAKO (دانمارک) تهیه شد.

تعداد ۱۵ عدد خوکچه هندی نر از مؤسسـه سـرم‌سـازی رازی تهیه شد.

آنتی‌ژن نوترکیب

ژن زیر واحد B آنتروتوکسـین ویبریـو کلـرا (CtxB) در دانشگاه جامع امام حسین قبلاً در ناقل pET 28a کلون و بیان شد و آنتی‌ژن خالص شده برای این تحقیق استفاده شد [۲۲].

الکتروریسی

برای تهیه محلول کایتوسان، ۷/۵گرم پـودر کایتوسـان در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید اسـتیک ۷۰ درصـد حـل و توسـط همـزن مغناطیسی به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه هم زده شد. در ادامه در چندین رقت پروتئین مورد نظر اضافه شد محلول پلیمری درون سرنگ ۲۰ میلی‌لیتر کشیده و سـپس در دسـتگاه پمپ قرار داده شد. فاصله نوک سوزن با صفحه جمع کننده در محدوه ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متری و ولتاژ دستگاه در محدوده ۱٦ تا ۲٤ کیلوولت تنظیم شد. نـرخ تغذیـه ۱/۵تـا ۲ میکـرولیتـر در ساعت تعیین شد. الکترود منفی به صفحه جمع کننده و الکترود مثبت به سوزن متصل شد و با روشن کردن دسـتگاه دسـته‌ای نانوالیاف روی صفحه آلومینیومی پاشیده شد. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل روند الکتروریسی با اسـتفاده از دسـتگاه میکروسکوپ الکترونی پویشی تعیین شد.

کپسوله کردن

TPP (پنتـا سـدیم تـری پلـی‌فسـفات) بـا غلظـت ۱۸۰ میلی‌مولار تهیه شد، ۱ میلی‌لیتر از تری‌متیـل کایتوسـان بـه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول HEPES ۵ میلی‌مولار (pH= ۷/٤) اضافه و سپس ۱ میلی‌گرم از آنتی‌ژن CtxB به آن افزوده شد. در حـین هم زدن مداوم هر ۵ دقیقـه ۷۵ میکـرولیتـر از TPP در چهـار مرحله به محلول اضافه شد. نمونه به‌دست آمده ۲٤ ساعت در این محلول قرار داده شد و در مرحله بعد نانوذرات تهیه شده با سانتریفوژ دور ۱٤۰۰۰ و به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و سپس شستشو شد. محلول رویـی حاصـل از سـانتریفوژ نیـز بـرای محاسبه کارآیی روش کپسوله کردن استفاده شد. مقدار پروتئین کپسول شده با روش برادفورد (Bradford) سنجیده شـد کـه نشان داد میـزان ٦۰ درصـد از پـروتئین کپسـوله شـده اسـت. نمونه‌های نانوذرات حاصل روی صفحه نازک آلومینیومی در گرمخانـه خـلأ خشـک و پـس از لایـه گـذاری بـا روش عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی پویشی مطالعه شد.

تجویز آنتی‌ژن

برای ایمن‌سازی، حیوان‌ها به‌صورت انفرادی در قفس مجزا قرار داده و به‌مدت یک شب گرسنگی داده شدند. برای خوراندن نمونه‌های آماده شده از سمپلر (Sampler) و فیـدینگ تیـوب (Feeding Tube) دهـانی اسـتفاده شـد.در ایـن روش ۱۵۰ میکروگرم از CtxB کـه بـا کایتوسـان الکتروریسـی و بـا تری‌متیل‌کایتوسـان (Trimethyl Chitosan: TMC) کپسـوله شده به هر کدام از گروه‌ها از طریق خوراکی تجویز شد. به گروه کنترل نیز کایتوسان الکتروریسی شده و نیز کایتوسان کپسوله فاقد آنتی‌ژن خورانده شد. هر کدام از گروه‌ها شامل ۵ خوکچه هندی نر با وزن حدود ٤۰۰ تا ۵۰۰ گرم در نظر گرفته شد.

بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن تزریق شده

خون‌گیری از گوشه چشم خوکچه در ٤ مرحلـه (روز ۰،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

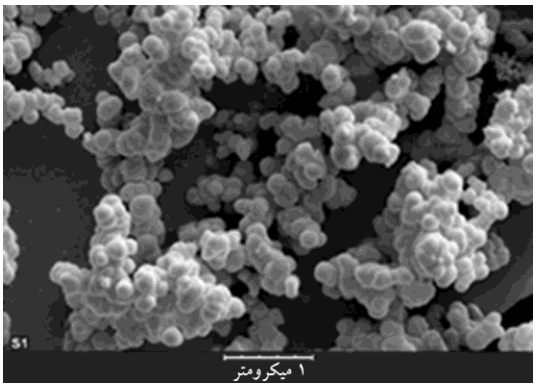
۱۴، ۲۸، ۴۲) انجام شد. بعد از خون‌گیری، نمونه‌ها به‌مدت ۱ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سانتریفوژ نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه انجام و سرم‌ها جدا و در دمای منهای۲۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. برای انجام روش الایزا، ۳ میکروگرم آنتی‌ژن CtxB که در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات- بیکربنات (pH= ٦/٩) رقیق شده بود و به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشوی چاهک‌ها با PBS-T (حاوی Tween ۲۰)، از محلول مسدود کننده (۳ درصد سرم آلبومین گاوی در بافرPBST) برای پوشاندن نواحی در دسترس استفاده شد. به این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از بافر مسدود کننده به هر چاهک اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سرم حیوان ایمن شده و شاهد در چاهک‌های مورد نظر از بالا به پایین و از رقت ۱/۲۰۰ در PBST رقیق شد وسپس پلیت الایزا به‌مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو و اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه به نسبت ۱ به ۲۰۰۰ به تمام چاهک‌ها، پلیت الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای واکنش ELISA (حاوی بافرسیترات فسفات، H_2O_2 و OPD) به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریک منتقل شد. پس از تغییر رنگ محلول به زرد، واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و جذب در ٤۹۲ نانومتر خوانده شد.

سنجش میزان IgA در مدفوع

پس از جمع‌آوری مدفوع از حیوان، به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم، ۳۰۰ میکرولیتر PBS به آن اضافه و خوب مخلوط شد. نمونه‌ها در دمای ٤ درجه به‌مدت ۵ دقیقه و در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به ازای هر سی‌سی از محلول رویی ۱۰ میکرولیتر از PMSF ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه و سپس در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی حاوی آنتی‌بادی جمع‌آوری و به میکروتیوب سترون منتقل و تا زمان استفاده در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از ELISA برای هر دو آنتی‌بادی IgG و IgA با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Varience: ANOVA) و همچنین LSD (حداقل تفاوت معنی‌دار) و مقدار معنی‌داری تجزیه و تحلیل شد.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوکپسول کایتوسان حاوی CtxBکه تشکیل نانوکپسول‌های کروی به وضوح مشاهده می‌شود.

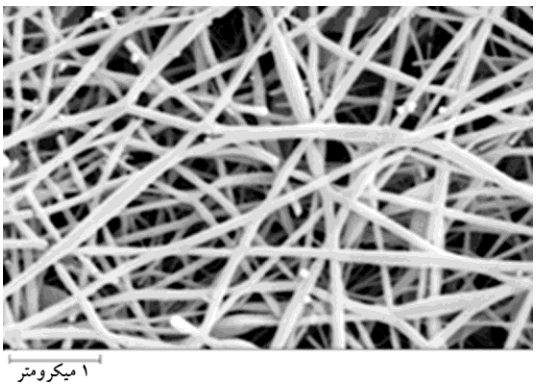
نتایج

بررسی نانو کپسول و نانوفیبر

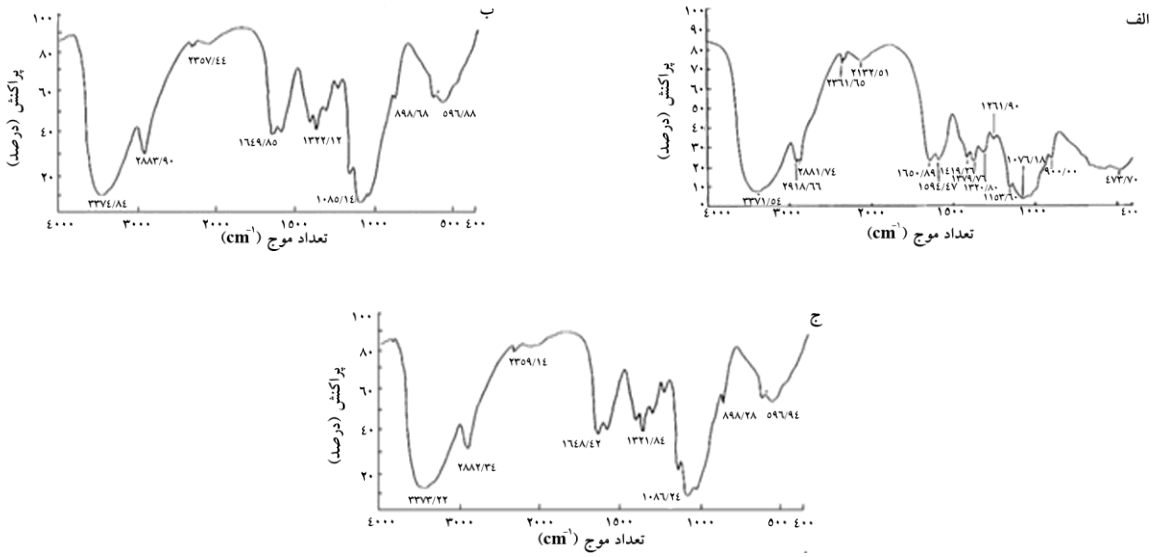
نمونه‌های کپسول شده با برادفورد تعیین غلظت شد که نشان داد که حدود ٦۰ درصد از آنتی‌ژن CtxB درون کپسول قرار گرفته شد نمونه کپسول شده با میکروسکوپ الکترونی SEM (Scanning Electron Microscope) تأیید شد (شکل ۱). همچنین CtxB که با روش الکتروریسی به شکل نانوفیبر درآمده است با SEM تأیید شد (شکل ۲). شناسایی نانوالیاف تهیه شده با استفاده از روش طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه (Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR) انجام شد نوارهای جذبی گروه‌های عاملی کربوکسیل، آمین و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

هیدروکسیل در طیف ظاهر شد. نقطه اوج (Peak) FTIR در طیف حدود ۱۰۰۰ تا ۱۷۰۰ نشان داد که گروه آمینی کایتوسان با گروه کربوکسیل پروتئین میان‌کنش مناسبی ایجاد کرده‌است (شکل ۳).



شکل۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوفیبر کایتوسان حاوی CtxB: تصویر نشان می‌دهد که نانوفیبر به‌خوبی شکل گرفته و گره‌های بسیار کمی در آن دیده می‌شود.

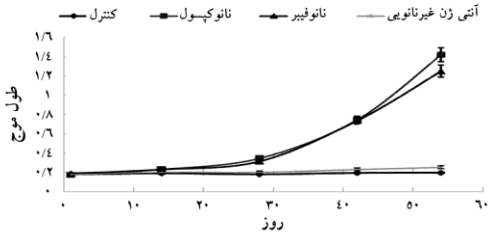


شکل ۳ FTIR: الف) کایتوسان ب) کایتوسان و CtxB، ج) CtxB؛ شکل الف FTIR فیبر کایتوسان بعد از الکتروریسی را نشان می‌دهد. شکل ب FTIR نانوفیبر کایتوسان حاوی آنتی‌ژن CtxB است. تغییرات اندک در طیفی جذبی بین ۱۰۰۰ تا ۱۷۰۰ که نشان دهنده میان‌کنش مناسب بین گروه آمینی کایتوسان و گروه هیدروکیسل پروتئین است. شکل ج FTIR آنتی‌ژن CtxB قبل از الکتروریسی است.

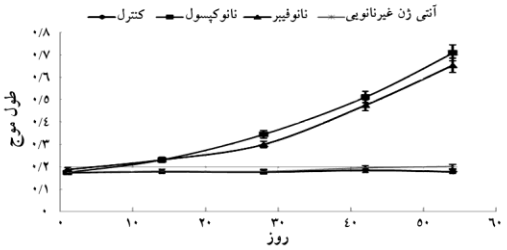
بررسی تیتر آنتی‌بادی

ارزیابی تولید IgG به روش ELISA انجام شد که نتایج آن در شکل ٤ آمده است. همان‌طور که شکل ٤ نشان می‌دهد تولید آنتی‌بادی IgG در گروه نانوکپسول و نانوفیبر نسبت به گروه غیر نانویی افزایش چشم‌گیری دارد (شکل ٤). سنجش تیتر تولید IgA بر علیه CtxB برای هر چهار گروه نانوفیبر، نانوکپسول، کنترل و غیر نانویی انجام گرفت که در نمونه‌های نانویی نسبت به گروه غیر نانویی تیتر بسیار بالاتری مشاهده شد (شکل ۵).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]



شکل ٤ تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه CtxB (سرم با رقت ۱/۲۰۰): نتایج نشان دهنده افزایش قابل توجه تیتر آنتی‌بادی بعد از تجویز سوم است.



شکل ٥ تیتر آنتی‌بادی IgA تولید شده علیه CtxB تیتر آنتی‌بادی بعد از تجویز سوم افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از ELISA برای هر دو آنتی‌بادی IgG و IgA با آزمون ANOVA و همچنین LSD و مقدار p تجزیه و تحلیل شد که نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد که گروه‌های نانویی با گروه کنترل با ضریب اطمینان بیش از ۹۰ درصد برای هر دو آنتی‌بادی متفاوت است. اما گروه غیر نانو تفاوتی را با گروه کنترل نشان نداد. همچنین مقایسه داده‌ها با ضریب اطمینان بیشتر از ۹۰ درصد نشان داد که گروه نانوکپسول با گروه نانوفیبر تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

بحث

روش‌های متعددی برای محافظت انسان در برابر آنتی‌ژن CtxB پیشنهاد شده است که هر کدام دارای مزایا و معایبی است و در روش خوراکی به تنهایی این آنتی‌ژن توانایی ایجاد پاسخ ایمنی قوی ندارد و برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب به یک عامل برای تحویل و محافظت نیاز است.

آنتی‌بادی IgA یکی از مهم‌ترین عامل محافظتی و اولین خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا در سطوح موکوسی است، برای ایجاد ایمنی لازم است آنتی‌ژن CtxB در معرض سیستم ایمنی قرار گیرد ولی این آنتی‌ژن در عبور از معده تجزیه شده و قادر به ایجاد ایمنی نیست. هر چند بعضی از مواد از جمله کایتوسان می‌توانند نقش محافظتی برای این آنتی‌ژن در عبور از دستگاه گوارش و نیز آزادسازی تدریجی آن بازی نمایند [۲۳] به‌طوری که کایتوسان باعث محافظت آنتی‌ژن در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتک و لیزوزیم موکوس می‌شود [۲٤].

نتایج سنجش تیتر آنتی‌بادی نشان داد که نانویی کردن آنتی‌ژن CtxB در روش خوراکی بسیار مناسب بوده است و می‌تواند برای تحویل این آنتی‌ژن به روش خوراکی مفید باشد و ایمنی‌زایی مناسبی را ایجاد نماید. نانوذرات با توجه به رهایش مناسب برای تحریک سیستم ایمنی و همچنین جلوگیری از اثر آنزیم‌های گوراشی روی آنتی‌ژن مورد نظر، تحویل خوراکی آنتی‌ژن را بسیار تسهیل می‌کند. سلول‌های M در اپتیلیال روده نانوذرات را گرفته و به پلاک‌های پیر (Peyer's Patches) می‌رساند که پردازش شوند [۲۵-۲۷].

نانوذارت از چهار طریق می‌تواند از اپتلیال روده عبور کند؛ البته اکثر نانوذرات فقط از دو یا سه مسیر از این چهار مسیر می‌توانند عبور کنند اما کایتوسان با توجه به اندازه و ساختار آن از همهٔ مسیرها توانایی عبور دارد که این یک مزیت برای این پلیمر محسوب می‌شود، مهم‌ترین انتقال برای تحریک سیستم ایمنی، انتقال از طریق سلول‌های M است [۲۱].

جستجو در رابطه با تحویل آنتی‌ژن CtxB با این روش نتیجه‌ای در بر نداشت. اما در بررسی مشابه‌ای برای آنتی‌ژن IpaD شیگلا فلکسنری (Shigella flexneri) که به روش استنشاقی با استفاده از نانوفیبر کایتوسان برای تحویل واکسن استفاده شده بود، به‌خوبی نشان دهندهٔ کارآیی این روش در تحریک سیستم ایمنی است که موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی می‌شود [۲٦].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب علیه آنتی‌ژن CtxB، می‌توان از روش تحویل خوراکی نانوفیبر و نانوکپسول استفاده کرد. این روش برای ایجاد نانو واکسن علیه ویبریو کلرا پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) به جهت فراهم آوردن امکانات مورد نیاز تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pac J Trop Med 2011; 4(7): 573-80.

[2] Medinskiĭ GM, Zaĭdenov AM, Saiamov RM, Galtseva GV, Somova AG. [Clinical cases of food poisoning caused by NAG-vibrios]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1976; (7): 131-4.

[3] Corner BM, Cawley PF. Vibrio parahaemolyticus-food poisoning: case report. N Z Med J 1976; 83(559): 155-6.

[4] Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. FEMS Microbiol Lett 2007; 266(2): 129-37.

[5] Todar K. Vibrio cholerae and Asiatic Cholera. Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2002; Available at: http://textbookofbacteriology.net/cholera.html

[6] Safa A, Nair GB, Kong RY. Evolution of new variants of Vibrio cholerae O1. Trends Microbiol 2010; 18(1): 46-54.

[7] Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin - a foe & a friend. Indian J Med Res 2011; 133: 153-63.

[8] Nair GB, Qadri F, Holmgren J, Svennerholm AM, Safa A, Bhuiyan NA, Ahmad QS, Faruque SM, Faruque AS, Takeda Y, Sack DA. Cholera due to altered El Tor strains of Vibrio cholerae O1 in Bangladesh. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4211-3.

[9] Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against Vibrio cholerae O1 challenge. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56(2): 179-84.

[10] Harakuni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T. Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. Infect Immun 2005; 73(9): 5654-65.

[11] Lycke N. Targeted vaccine adjuvants based on modified cholera toxin. Curr Mol Med 2005; 5(6): 591-7.

[12] 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.

[13] des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Préat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

mechanistic approach. J Control Release 2006; 116(1): 1-27.

[14] Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Curr Opin Sci 2002; 6(4): 319-27.

[15] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cell Mol Life Sci 2009; 66(17): 2873-96.

[16] Smith JM, Dornish M, Wood EJ. Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption. Biomaterials 2005; 26(16): 3269-76.

[17] Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nat Med 1999; 5(4): 387-91.

[18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. Second edition. New York: Cold Sprin Harbor Laboratory Press 1999; Chapter: 7, p: 267-96.

[19] Hamman JH, Enslin GM, Kotzé AF. Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. BioDrugs 2005; 19(3): 165-77.

[20] 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 Carrier Syst 2005; 22(5): 419-64.

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

[22] Nazarian S, Arefpour MA, Bagheripour MJ, Olad G. Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate. J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 378-87.

[23] Johansson EL, Bergquist C, Edebo A, Johansson C, Svennerholm AM. Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. Vaccine 2004; 22(8): 984-90.

[24] Lisby G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. Mol Biotechnol 1999; 12(1): 75-99.

[25] Marchlewicz BA, Finkelstein RA. Immunological differences among the cholera/coli family of enterotoxins. Diagn Microbiol Infect Dis 1983; 1(2): 129-38.

[26] Jahantigh D, Saadati M, Fasihi Ramandi 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. J Drug Del Sci Tech 2014; 24(1): 33-9.

[27] Van Der Lubben IM, Konings FA, Borchard G, Verhoef JC. In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. J Drug Target 2001; 9(1): 39-4.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]