

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

Yousef Masti¹, Mojtaba Saadati^{2*}, Shahram Nazarian³, Mahdi Fasihi Ramandi⁴, Morteza Asadi¹, Mohammadali Arefpoor⁵

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_ml@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

تهیه آنتی بادی با استفاده از نانوفیبر و نانوکپسول تجویز خوراکی حاوی آنروتوکسین وبا

یوسف مستی^۱، مجتبی سعادت^{۲*}، شهرام نظریان^۲، مهدی فصیحی رامندی^۳، مرتضی اسدی^۴، محمد علی عارف پور^۵

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

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۷/۱۲

دریافت مقاله: ۹۳/۰۱/۲۰

چکیده

هدف: CtxB با تحریک تولید آنتی بادی علیه CtxB منجر به اثر بخشی واکسن شده است تلاش های مختلفی در راستای افزایش تولید این آنتی بادی صورت پذیرفته شده است. کاپتوسان پلی ساکاریدی است که می تواند به مخاط بچسبند؛ این ماده با توجه به ویژگی های منحصر به فرد از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، چگالی بار بالا و غیر سمی، پتانسیل بسیار زیادی برای تحویل واکسن خوراکی دارد.

مواد و روش ها: در این مطالعه از نانوکاپتوسان و نانوکپسول به عنوان یک سیستم حامل برای ارایه خوراکی CTXB استفاده شد. نانوکاپتوسان حاوی آنتی ژن توسط الکترواسپینینگ محلول کاپتوسان / AcOH آماده شد. آنتی ژن در داخل نانوالیاف کاپتوسان از طریق تجزیه و تحلیل طیف سنجی مادون قرمز تأیید شد. خوکچه های هندی توسط تلقیح مستقیم نانوالیاف کاپتوسان حاوی آنتی ژن به داخل حفره دهانی ایمن شدند. پاسخ های ایمونوگلوبولین سرم (IgG) و ایمونوگلوبولین روده ای (IgA) آنتی بادی تعیین شد.

نتایج: خوکچه های هندی به وسیله کاپتوسان همراه با آنتی ژن یا آنتی ژن به تنهایی ایمن شدند. نتایج به دست آمده نشانگر پاسخ بسیار زیاد آنتی ژن همراه نانوفیبر و نانوکپسول بود. آنتی بادی IgA و IgG پس از تجویز خوراکی CtxB تولید نشد. نتایج آنتی بادی تولید شده با استفاده از آزمون ANOVA و LSD تجزیه و تحلیل شد. نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان دهنده آن است که در روش خوراکی می توان با نانویی کردن آنتی ژن تیتراژ آنتی بادی را بالا برد. این سیستم می تواند برای انتقال دیگر آنتی ژن ها استفاده شود.

کلیدواژگان: CtxB، نانوفیبر، نانوکپسول، تیتراژ آنتی بادی

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

مقدمه

همراه است. بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی بین سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۰ حدود نیم میلیون مورد از این بیماری گزارش شده

وبا بیماری اسهال حاد و آبکی است که عامل آن ویبرو کلرا (*Vibrio cholerae*) است و با دفع حجم بالای از آب در مدفوع

استفاده کرد زیر واحد B آنروتوکسین وبا است که در صورت تجویز خوراکی یا استنشاقی، به شدت موجب تحریک سیستم ایمنی به ویژه سیستم ایمنی مخاطی می شود [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 آنتی ژن به واسطه عملکرد آنزیم های گوارشی وجود دارد. برای رفع این چالش می توان از نانوذرات کمک گرفت. نانوذرات با ساختار ویژه خود آنتی ژن را از دسترس این آنزیم ها دور نگه داشته و همچنین در هنگام جذب با رهایش مناسب به آنتی ژن کمک می کند که بهتر در دسترس سیستم ایمنی قرار گیرد. [۱۲، ۱۳].

نانوذرات اندازه حدود ۱۰۰ نانومتر دارد و از آن ها در انتقال تعدادی از داروها از قبیل داروهای کوچک آب دوست، داروهای کوچک آب گریز، واکسن ها و ماکرومولکول های زیستی استفاده شده است [۱۴، ۱۵].

یکی از نانوذرات زیست تخریب پذیر کایتوسان (Chitosan) است که به دلیل ویژگی های منحصر به فرد به طور گسترده ای به عنوان یک ماده زیستی برای فرمولاسیون های دارویی و آنتی ژنی مورد توجه است [۱۶-۱۸]. برای مقابله با بیماری وبا به خصوص در موارد بحرانی و همچنین شیوع سریع و آسان این بیماری را و پیدا شدن سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و در دسترس نبودن واکسن مؤثر، نیاز به توسعه یک واکسن مناسب علیه این باکتری احساس می شود. هدف از این تحقیق بررسی و توسعه روشی برای تحویل مناسب آنتی ژن زیر واحد اتصال توکسین کلرا با نانوفیبر و نانوکپسول بود. تا در آینده به عنوان کاندید واکسن علیه بیماری وبا مطرح شود [۱۹-۲۱].

مواد و روش ها

مواد

پلیمر کایتوسان با وزن مولکولی متوسط و درجه استیلاسیون

که ۲۰۰۰۰ مورد از آن به مرگ منجر شده است [۱]. بیماری وبا در شدیدترین شکل خود موجب از دست رفتن سریع آب و الکترولیت ها از دستگاه گوارش شده که منجر به کاهش شدید حجم پلاسماي گردش خون و در نتیجه کلاپس (Collapse) عروق و مرگ در عرض چند ساعت می شود. در صورت عدم درمان، میزان مرگ و میر بیماری به حدود ۶۰ درصد می رسد. بیماری وبا به علت انتقال آسان، شیوع سریع به خصوص در مواردی از قبیل سیل، زلزله، اردوگاه های آوارگان و ... که سطح بهداشت پایین است، سلامت افراد را به شدت تهدید می کند [۲-۴]. باکتری ویبریو کلرا عامل بیماری وبا است که این باکتری چندین توکسین تولید می کند که مهم ترین آن ها اگزوتوکسین کلرا بوده و عامل اصلی بیماری وبا محسوب می شود. آنروتوکسین وبا خواص آنتی ژنیک قابل ملاحظه ای از خود نشان می دهد به طوری که توجه محققین را برای استفاده از این آنتی ژن به منظور ایجاد مصنویت در مقابل این بیماری به خود معطوف داشته است [۵، ۶]. مولکول آنروتوکسین 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 اسید آمینه ای است که وزن مولکولی هریک ۱۱۶۰۰ دالتون است. زیر واحد A دارای وزنی معادل ۲۷/۲ کیلودالتون بوده و دارای دو زنجیره پلی پپتیدی به نام های A1 و A2 است. پپتید A1 دارای ۱۹۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۲۱/۸ کیلودالتون بوده و مسئول کلیه فعل و انفعالات زیستی آنروتوکسین ویبریو کلرا است. پپتید A2 با ۴۵ اسید آمینه و دارای وزن مولکولی ۵/۴ کیلودالتون است [۷، ۸].

زیر واحد B خاصیت سمی نداشته و مسئول اتصال سم به گیرنده های موجود در غشا سیتوپلاسمی سلول میزبان است. این قسمت A1 را قادر می سازد که به درون سلول نفوذ کند. عملکرد زیر واحد A1 تولید مداوم آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) داخل سلولی را سبب می شود که در نتیجه الکترولیت ها و آب بیش از حد طبیعی از روده دفع خواهد شد. یکی از آنتی ژن هایی که می توان برای واکسن های نوترکیب

کپسوله کردن

TPP (پتسا سدیم تری پلی فسفات) با غلظت ۱۸۰ میلی مولار تهیه شد، ۱ میلی لیتر از تری متیل کایتوسان به ۱۰ میلی لیتر از محلول HEPES ۵ میلی مولار (pH= ۷/۴) اضافه و سپس ۱ میلی گرم از آنتی ژن CtxB به آن افزوده شد. در حین هم زدن مداوم هر ۵ دقیقه ۷۵ میکرولیتر از TPP در چهار مرحله به محلول اضافه شد. نمونه به دست آمده ۲۴ ساعت در این محلول قرار داده شد و در مرحله بعد نانوذرات تهیه شده با سانتریفوژ دور ۱۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و سپس شستشو شد. محلول رویی حاصل از سانتریفوژ نیز برای محاسبه کارایی روش کپسوله کردن استفاده شد. مقدار پروتئین کپسول شده با روش برادفورد (Bradford) سنجیده شد که نشان داد میزان ۶۰ درصد از پروتئین کپسوله شده است. نمونه های نانوذرات حاصل روی صفحه نازک آلومینیومی در گرمخانه خالص خشک و پس از لایه گذاری با روش عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی پویشی مطالعه شد.

تجویز آنتی ژن

برای ایمن سازی، حیوانها به صورت انفرادی در قفس مجزا قرار داده و به مدت یک شب گرسنگی داده شدند. برای خوراندن نمونه های آماده شده از سمپلر (Sampler) و فیدینگ تیوب (Feeding Tube) دهانی استفاده شد. در این روش ۱۵۰ میکروگرم از CtxB که با کایتوسان الکترورسی و با تری متیل کایتوسان (Trimethyl Chitosan: TMC) کپسوله شده به هر کدام از گروه ها از طریق خوراکی تجویز شد. به گروه کنترل نیز کایتوسان الکترورسی شده و نیز کایتوسان کپسوله فاقد آنتی ژن خوراندند. هر کدام از گروه ها شامل ۵ خوکچه هندی نر با وزن حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ گرم در نظر گرفته شد.

بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه آنتی ژن تزریق شده

خون گیری از گوشه چشم خوکچه در ۴ مرحله (روز ۰،

۷۵ تا ۸۰ درصد، بافر HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)-1-] Phenyl-) PMSF, [Piperazineethanesulfonic Acid (Ophenylenediamine) OPD و (methanesulfonyl fluoride) از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد. TPP (پتسا سدیم تری پلی فسفات: Pentasodium Tripolyphosphate) با وزن مولکولی ۳۶۷/۸۶ و اسید استیک گلاسیال (Glacial Acetic Acid) از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. آنتی بادی ضد هیستیدین از شرکت Qiagen (آمریکا) و کونزوگه (آنتی بادی ثانویه) از شرکت DAKO (دانمارک) تهیه شد. تعداد ۱۵ عدد خوکچه هندی نر از مؤسسه سرم سازی رازی تهیه شد.

آنتی ژن نوترکیب

ژن زیر واحد B آنتروتوکسین و بیرو کلرا (CtxB) در دانشگاه جامع امام حسین قبلاً در ناقل pET 28a کلون و بیان شد و آنتی ژن خالص شده برای این تحقیق استفاده شد [۲۲].

الکترورسی

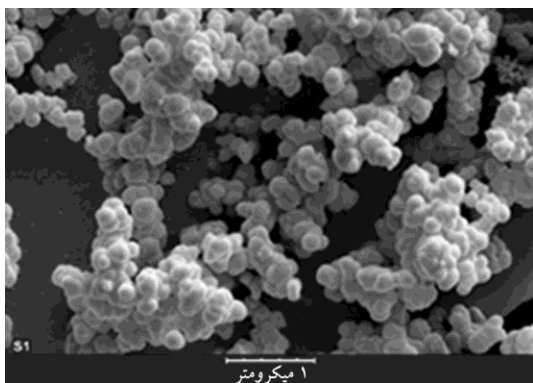
برای تهیه محلول کایتوسان، ۷/۵ گرم پودر کایتوسان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۷۰ درصد حل و توسط همزن مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه هم زده شد. در ادامه در چندین رقت پروتئین مورد نظر اضافه شد محلول پلیمری درون سرنگ ۲۰ میلی لیتر کشیده و سپس در دستگاه پمپ قرار داده شد. فاصله نوک سوزن با صفحه جمع کننده در محدوده ۱۵ تا ۲۰ سانتی متری و ولتاژ دستگاه در محدوده ۱۶ تا ۲۴ کیلوولت تنظیم شد. نرخ تغذیه ۱/۵ تا ۲ میکرولیتر در ساعت تعیین شد. الکتروود منفی به صفحه جمع کننده و الکتروود مثبت به سوزن متصل شد و با روشن کردن دستگاه دسته های نانوالیاف روی صفحه آلومینیومی پاشیده شد. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل روند الکترورسی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی پویشی تعیین شد.

نانو فیبر و نانو کپسول CtxB

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 Variance: ANOVA) و همچنین LSD (حداقل تفاوت معنی‌دار) و مقدار معنی‌داری تجزیه و تحلیل شد.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو کپسول کایتوسان حاوی CtxB که تشکیل نانو کپسول‌های کروی به وضوح مشاهده می‌شود.

نتایج

بررسی نانو کپسول و نانوفیبر

نمونه‌های کپسول شده با برادفورد تعیین غلظت شد که نشان داد که حدود ۶۰ 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 الکترورسی 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

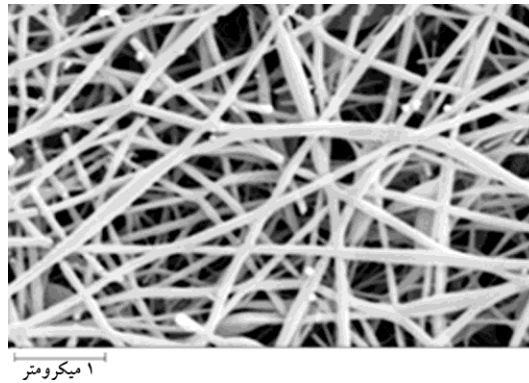
۱۴، ۲۸، ۴۲) انجام شد. بعد از خون‌گیری، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سانتریفوژ نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام و سرم‌ها جدا و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای انجام روش الایزا، ۳ میکروگرم آنتی‌ژن CtxB که در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات-بیکربنات (pH= ۶.۹) رقیق شده بود و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشوی چاهک‌ها با PBS-T (حاوی Tween ۲۰)، از محلول مسدود کننده (۳ درصد سرم آلبومین گاوی در بافر PBST) 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 و سپس پلیت الایزا به مدت 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 بافر سیترات 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 ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

سنجش میزان IgA در مدفوع

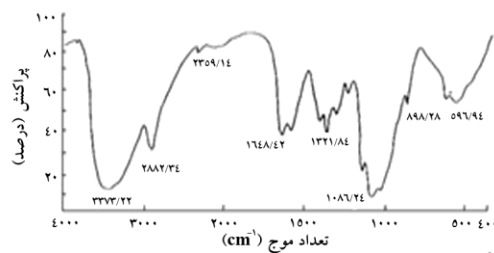
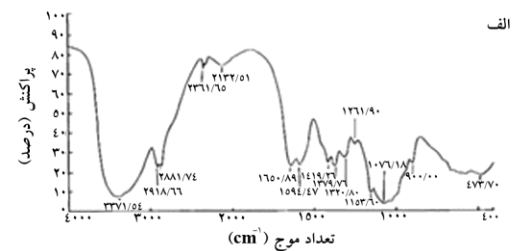
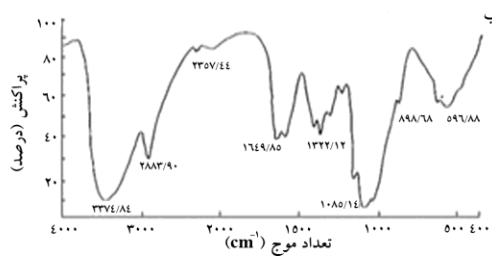
پس از جمع‌آوری مدفوع از حیوان، به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم، ۳۰۰ میکرولیتر PBS به آن اضافه و خوب مخلوط شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به ازای هر سی‌سی از محلول رویی ۱۰ میکرولیتر از PMSF ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دور

با گروه کربوکسیل پروتئین میان کنش مناسبی ایجاد کرده است (شکل ۳).

هیدروکسیل در طیف ظاهر شد. نقطه اوج (Peak) FTIR در طیف حدود ۱۰۰۰ تا ۱۷۰۰ نشان داد که گروه آمینی کایتوسان



شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوفیبر کایتوسان حاوی CtxB: تصویر نشان می‌دهد که نانوفیبر به خوبی 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 الکترورسی را نشان می‌دهد. شکل ب FTIR نانوفیبر کایتوسان حاوی آنتی ژن CtxB است. تغییرات اندک در طیفی جذبی بین ۱۰۰۰ تا ۱۷۰۰ که نشان دهنده میان کنش مناسب بین گروه آمینی کایتوسان و گروه هیدروکسیل پروتئین است. شکل ج FTIR آنتی ژن CtxB قبل از الکترورسی است.

نانویی افزایش چشم گیری دارد (شکل ۴). سنجش تیتراژ 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 تیتراژ بسیار بالاتری مشاهده شد (شکل ۵).

بررسی تیتراژ آنتی بادی

ارزیابی تولید IgG به روش ELISA انجام شد که نتایج آن در شکل ۴ آمده است. همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد تولید آنتی بادی IgG در گروه نانوکپسول و نانوفیبر نسبت به گروه غیر

نانو فیبر و نانو کپسول CtxB

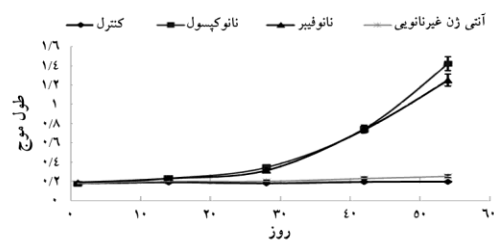
یک عامل برای تحویل و محافظت نیاز است.

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] به طوری که کایتوسان باعث محافظت آنتی‌ژن در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیزوزیم موکوس می‌شود [۲۴].

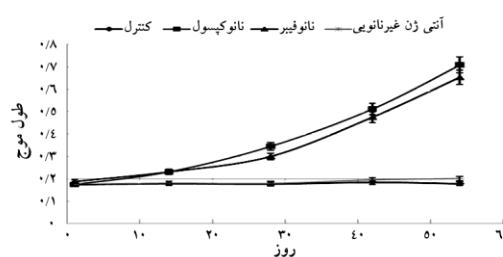
نتایج سنجش تیتراژ آنتی‌بادی نشان داد که نانویی کردن آنتی‌ژن CtxB در روش خوراکی بسیار مناسب بوده است و می‌تواند برای تحویل این آنتی‌ژن به روش خوراکی مفید باشد و ایمنی‌زایی مناسبی را ایجاد نماید. نانوذرات با توجه به رهائش مناسب برای تحریک سیستم ایمنی و همچنین جلوگیری از اثر آنزیم‌های گوارشی روی آنتی‌ژن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

نانوذرات از چهار طریق می‌تواند از اپتیلیال 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 همه 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، به خوبی نشان دهنده کارایی این روش در تحریک سیستم ایمنی است که موجب افزایش تیتراژ آنتی‌بادی می‌شود [۲۶].



شکل ۴ تیتراژ آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه CtxB (سرم با رقت ۱/۲۰۰): نتایج نشان دهنده افزایش قابل توجه تیتراژ آنتی‌بادی بعد از تجویز سوم است.



شکل ۵ تیتراژ آنتی‌بادی IgA تولید شده علیه CtxB تیتراژ 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

تشکر و قدردانی

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

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.

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, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a

- 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 Spring 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, Pr at 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.