Original Article

An Investigation of Immunogenicity of Chitosan-Based Botulinum Neurotoxin E Binding Domain Recombinant Candidate Vaccine via Mucosal Route

Mohammad Javad Bagheripour[1], Firouz Ebrahimi[1], Abbas Hajizadeh[1], Shahram Nazarian[1], Jamil Zargan[1], Jamal Rashidiani[2]

[1]*Biology Research Centre, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.*

[2]*Nanobiotechnology Research Centre, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Firouz Ebrahimi,** Biology Research Centre, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email: febrhimi@ihu.ac.ir

Received: 20 Dec, 2015

Accepted: 23 Feb, 2016

Abstract

Background and Objectives: Botulism syndrome is caused by serotypes A-G of neurotoxins of *Clostridium* genus. Neurotoxin binding domain is an appropriate vaccine candidate due to its immunogenic activity. In this study, the immunogenicity of chitosan-based botulinum neurotoxin E binding domain recombinant candidate vaccine was investigated via mucosal route of administration.

Methods: In this experimental study, chitosan nanoparticles containing rBoNT/E protein were synthesized by ionic gelation method and were administered orally and intranasally to mice. After each administration, IgG antibody titer was measured by ELISA method. Finally, all groups were challenged with active botulinum neurotoxin type E. Data were analyzed using Duncan and repeated ANOVA tests. The significance level was considered as $p<0.05$.

Results: After each administration, IgG antibody titre was increased in all the test groups (except the control group). According to the results of challenge with active botulinum neurotoxin type E, the mice immunized orally and intranasally by nanoparticles containing the antigen and also the mice that only received the antigen orally, could tolerate 500 folds of LD_{50}. The group immunized intranasally with only antigen tolerated 2000 folds of LD_{50}.

Conclusion: The results of this research showed that use of chitosan nanoparticles has no significant increase in the immunogenicity of recombinant botulinum neurotoxin antigen in oral and intranasal routes ($p>0.05$), even intranasal route reduced the immunogenicity.

Keywords: Chitosan; Nanoparticles; Vaccines; Ionic gelation; Botulism.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره دهم، دی ۹۵
صفحه ۷ الی ۱۶

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی ایمنی‌زایی کاندید واکسن نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E بر پایه کیتوسان به روش مخاطی

محمدجواد باقری‌پور[۱]، فیروز ابراهیمی[۱]*، عباس حاجی‌زاده[۱]، شهرام نظریان[۱]، جمیل زرگان[۱]، جمال رشیدیانی[۲]

[۱]مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سندروم بوتولیسم توسط سروتیپ‌های A تا G نوروتوکسین باکتری‌های جنس کلستریدیوم ایجاد می‌شود. زیرواحد اتصالی نوروتوکسین به‌علت داشتن خاصیت ایمونوژنی، کاندید مناسبی جهت تهیه واکسن است. در این تحقیق ایمنی‌زایی کاندید واکسن نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E بر پایه کیتوسان به روش مخاطی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین rBoNT/E با روش ژلاسیون یونی، تهیه و به‌صورت خوراکی و داخل بینی به موش تجویز شد. پس از هر تجویز، تیتر آنتی‌بادی IgG با روش ELISA سنجش شد. در نهایت، تمام گروه‌ها با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E چالش شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن تحلیل واریانس مکرر بررسی گردید. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تیتر آنتی‌بادی IgG پس از هر بار تجویز در همه گروه‌های مورد آزمون (بجز گروه‌های کنترل) افزایش یافت. طبق نتایج چالش با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E، موش‌هایی که با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن به‌صورت خوراکی و داخل بینی ایمن شده بودند، همچنین موش‌هایی که تنها آنتی‌ژن را به‌صورت خوراکی دریافت کردند، توانستند ۵۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کنند. گروهی که به‌صورت داخل بینی با آنتی‌ژن به تنهایی ایمن شده بود نیز ۲۰۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از نانوذرات کیتوسان، افزایش معنی‌داری در میزان ایمنی‌زایی آنتی‌ژن نوترکیب نوروتوکسین بوتولینوم در روش خوراکی و داخل بینی ندارد ($p>۰/۰۵$)؛ حتی در روش داخل بینی، موجب افت ایمنی‌زایی نیز می‌شود.

کلید واژه‌ها: کیتوسان؛ واکسن‌ها؛ ژلاسیون یونی؛ بوتولیسم.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
فیروز ابراهیمی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
febrhimi@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۵

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian Sh, Zargan J, Rashidiani J :An investigation of immunogenicity of chitosan-based botulinum neurotoxin E binding domain recombinant candidate vaccine via mucosal route. Qom Univ Med Sci J 2016;10(10):7-16. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

مقدمه

بوتولیسم بیماری خطرناکی است که توسط نوروتوکسین‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* ایجاد می‌شود. نوروتوکسین از طریق بافت‌های مخاطی مانند روده، ریه و یا محل زخم به گردش خون، وارد و با ممانعت از آزادشدن استیل‌کولین در پایانه‌های عصبی باعث ایجاد فلج عضلانی پیش‌رونده شده و در موارد حاد منجر به مرگ می‌شود. در میان هفت نوع نوروتوکسین بوتولینوم، عمدتاً انواع A، B و E برای انسان بیماری‌زا بوده و در این میان، بیشترین موارد ابتلا به بوتولیسم در ایران مربوط به نوع E می‌باشد. تاکنون تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن واکسن مناسب علیه این نوروتوکسین‌ها صورت گرفته است. در حال حاضر، تنها واکسن موجود در برخی کشورهای پیشرفته، یک واکسن توکسوئیدی پنج‌گانه علیه تیپ‌های A تا E می‌باشد (۳-۱). پژوهشگران به‌دلائلی از قبیل: مشکلات مربوط به واکسن‌های توکسوئیدی مانند هزینه بالای تولید، لزوم استفاده از چندین سروتیپ مختلف، خطرات ناشی از کار با سویه‌های خطرناک و در نهایت، ورود پروتئین‌های ناخواسته به بدن در زمان ایمن‌سازی، مطالعه روی واکسن‌های نوترکیب را در اولویت تحقیقات خود قرار داده‌اند. برای تولید واکسن‌های نوترکیب، از نواحی خاصی از توکسین که توانایی تحریک مؤثر سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی محافظتی را داشته و فاقد اثرات سمی هستند نیز استفاده می‌شود. امروزه، مشخص شده است زیرواحد اتصالی نوروتوکسین به‌علت داشتن خاصیت ایمونوژنی، کاندید مناسبی جهت تهیه واکسن می‌باشد. همچنین به دلیل پایین‌بودن ایمنی‌زایی واکسن‌های نوترکیب و به‌منظور بهبود کارآیی این واکسن‌ها باید از ادجوان‌ها یا سیستم‌های مناسب تحویل آنتی‌ژن استفاده کرد (۴،۳). امروزه، سامانه‌های رهایش آنتی‌ژن مبتنی بر نانو و میکروذرات، به‌صورت گسترده‌ای مورد توجه و استفاده محققین قرار گرفته است. ازجمله مزایای نانو و میکروذرات می‌توان به تشدید قابل‌توجه پاسخ ایمنی، تأمین تماس طولانی‌مدت با سیستم ایمنی و امکان تجویز مؤثر واکسن به بافت‌های مخاطی و محافظت آنتی‌ژن در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک، هنگام تجویز مخاطی اشاره کرد (۵)، همچنین بدین منظور می‌توان از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار مانند کیتوسان استفاده کرد.

پلیمر طبیعی کیتوسان به دلیل ویژگی‌های چسبندگی به مخاط و افزایش جذب، به‌طور گسترده‌ای برای تحویل آنتی‌ژن مورد مطالعه قرار گرفته است (۷،۶). با توجه به مشکلات مربوط به واکسن‌های تزریقی، محققین درپی توسعه واکسن‌هایی هستند که بتوان آنها را از طریق روش‌های غیرتهاجمی مانند خوراکی و استنشاقی تجویز کرد. ازجمله ویژگی‌های این روش‌ها نسبت به روش تزریقی؛ عدم احساس درد و ناراحتی، همچنین کاهش احتمال آلودگی است. با این حال، واکسن‌های خوراکی باید بتوانند در برابر شرایط اسیدی معده و محیط روده مقاومت کنند. به‌طور معمول، در تجویز خوراکی به دلیل نفوذپذیری کم مخاط و عدم پایداری پروتئین‌ها در محیط دستگاه گوارش و در نتیجه تخریب آنها قبل از جذب؛ دسترسی زیستی بسیار پایین است. در واقع، وجود طیف وسیعی از آنزیم‌ها و نیز شرایط فیزیکی - شیمیایی دستگاه گوارش، محیطی نامناسب را برای بسیاری از واکسن‌های خوراکی ایجاد می‌کند (۹،۸). پایدارسازی، هدایت و افزایش جذب واکسن‌های خوراکی از طریق ایجاد تغییرات شیمیایی، مهار آنزیم‌های گوارشی، ازدیاد جذب و استفاده از سیستم‌های نانو و میکروذرات، به‌منظور انتقال و جذب موکوسی، ایده‌های مطرح در طراحی واکسن‌های خوراکی می‌باشند. استفاده از نانو و میکروذرات به‌عنوان حامل واکسن، نه تنها باعث محافظت در برابر شرایط اسیدی و پروتئازهای دستگاه گوارش خواهد شد؛ بلکه با رهایش آهسته و طولانی‌مدت آنتی‌ژن و عرضه آن به سیستم ایمنی بدن، پاسخ ایمنی مؤثر ایجاد می‌کند (۱۰). روش تجویز استنشاقی و یا داخل بینی، یکی دیگر از روش‌های تجویز واکسن است که امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. بینی به دلیل دارا بودن فعالیت‌های پروتئولیتیک پایین و دسترسی آسان، محل مناسبی برای تحویل آنتی‌ژن است. مطالعات نشان داده است واکسن‌های داخل بینی، نه‌تنها باعث مصونیت و ایجاد ایمنی موضعی بیشتر می‌شوند؛ بلکه همانند واکسن‌های تزریقی، پاسخ سیستمیک را نیز درپی خواهند داشت (۱۲،۱۱). نانوذرات به دلیل فرمولاسیون متنوع، امکان رهایش تدریجی و کنترل‌شده واکسن، اندازه کوچک، زیست‌سازگاری با سلول‌ها، بافت‌های مختلف بدن و حفاظت از واکسن در برابر شرایط نامساعد برخی از بافت‌های بدن مانند معده

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

و روده، می‌تواند گزینه مناسبی برای حمل واکسن باشد. با توجه به خصوصیات ذکرشده برای نانوذرات و با در نظر گرفتن اهمیت واکسن‌های مخاطی، استفاده از نانوذرات جهت رهایش مخاطی واکسن‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای طراحی واکسن‌های مخاطی باید فاکتورهایی از قبیل: امکان عبور از اتصالات سخت بین سلولی، پایداری در اسیدیته بالای معده، پایداری در برابر پروتئازهای دستگاه گوارش، حلالیت واکسن‌ها در pH نزدیک به خنثی، نفوذپذیری از دیواره روده و غشای پایه و ورود به جریان خون، مورد توجه قرار گیرند. کیتوسان به دلیل داشتن ویژگی چسبندگی به مخاط و نفوذپذیری بالا، به‌طور گسترده‌ای برای تحویل آنتی‌ژن‌ها، به‌خصوص از طریق روش‌های مخاطی مورد مطالعه قرار گرفته است. کیتوسان می‌تواند با مخاط و سلول‌های اپی‌تلیال، برهمکنش داده و با باز کردن اتصالات سخت بین سلولی، نفوذپذیری پاراسلولار اپی‌تلیوم را افزایش دهد، لذا پتانسیل فراوانی برای تحویل واکسن‌های داخل بینی و خوراکی دارد (۱۵-۱۳).

هدف از این تحقیق، تجویز خوراکی و داخل بینی نانوذرات کیتوسان دربرگیرنده پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E، سپس سنجش میزان آنتی‌بادی IgG و در نهایت، چالش موش‌های ایمن‌شده با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، سدیم تری‌پلی فسفات (از شرکت Scharlau)، کیتوسان با وزن مولکولی متوسط (از شرکت Sigma-Aldrich) و سایر مواد شیمیایی (از شرکت‌های مرک، کیاژن و فرمنتاز) تهیه گردید. آنتی‌بادی ثانویه (کانژوگه) متصل به HRP علیه ایمونوگلوبین G موشی و آنتی‌بادی موشی علیه His-tag از شرکت Abcam خریداری شد. پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی نورورتوکسین بوتولینوم تیپ E از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید (۱۶). موش‌های سوری ماده نیز از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند. جهت تهیه تصویر نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM (مدل LEO-1455VP، مؤسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش) و به‌منظور بررسی اندازه نانوذرات، از دستگاه DLS (مدل Malvern، ساخت کشور انگلستان) متعلق به دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله استفاده گردید. برای تهیه نانوذرات کیتوسان، روش ژلاسیون یونی به کار برده شد (۱۸،۱۷). محلول سدیم تری‌پلی فسفات به‌صورت قطره قطره و در طول مدت زمان یک‌ساعت، به محلول کیتوسان حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم پروتئین، در حال هم‌زدن اضافه شد. پس از تشکیل نانوذرات، محلول کلوئیدی به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ و سپس رسوب حاصله برای تجویز خوراکی و داخل بینی مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تهیه نانوذرات کیتوسان، مقداری از آن بر روی فویل آلومینیومی قرار گرفت و در دمای اتاق خشک گردید. از این نمونه، جهت تهیه تصویر SEM استفاده شد.

میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات، از اختلاف مقدار پروتئین اولیه افزوده‌شده به محلول کیتوسان و مقدار نهایی باقیمانده در محلول رویی به دست آمد.

شش گروه موش برای بررسی ایمنی‌زایی در نظر گرفته شدند (جدول شماره ۱). در تمامی مراحل، کارهای انجام‌شده بر روی حیوانات، مطابق با قوانین توصیه‌شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود.

هر گروه شامل ۱۰ سر موش سوری ماده ۸ هفته‌ای (با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم) بود. تجویز به‌صورت خوراکی و داخل بینی صورت گرفت. در تجویز خوراکی به هر موش، ۳۰۰ میکرولیتر محلول نانوذرات کیتوسان حاوی ۱۰۰ میکروگرم آنتی‌ژن به‌وسیله گاواژ داده شد. در تجویز داخل بینی، به هر موش ۲۰ میکرولیتر محلول نانوذرات کیتوسان تجویز گردید. هم در تجویز خوراکی و هم در تجویز داخل بینی، دو گروه کنترل انتخاب شدند. به یک گروه، فقط آنتی‌ژن و به گروه بعدی نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن تجویز شد. تمامی تجویزها در ۴ نوبت و با فواصل ۱۴ روزه انجام گرفت (۱۹). به‌منظور تعیین میزان آنتی‌بادی در هر گروه، ۸ روز پس از هر تجویز، خونگیری انجام شد و پس از جداسازی سرم، میزان آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG به روش الایزای غیرمستقیم مورد سنجش قرار گرفت. بررسی تیتر آنتی‌بادی در سه تکرار انجام شد. پس از محاسبه میزان LD_{50}، نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E با استفاده از آنزیم تریپسین، فعال و سپس موش‌های ایمن‌شده

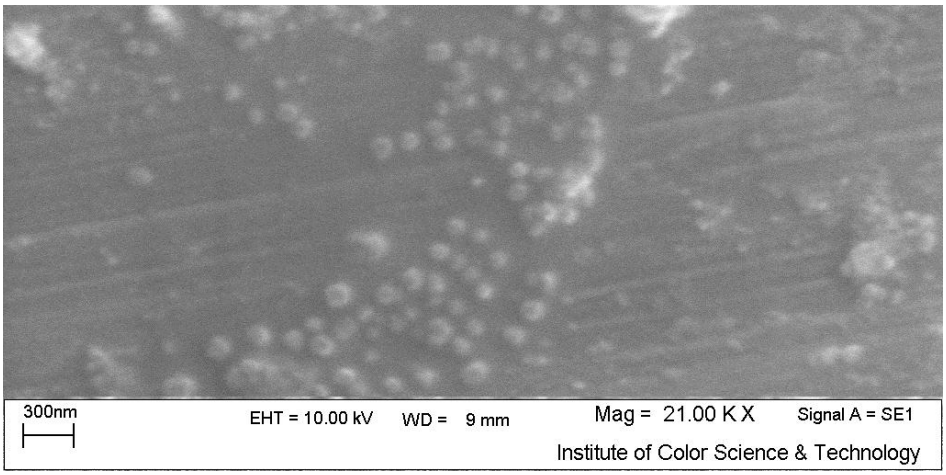
به‌صورت داخل صفاقی با دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ برابر LD_{50} چالش شدند. از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف (برای تعیین نرمال بودن داده‌ها)، از تحلیل واریانس مکرر (برای مقایسه تعداد دفعات تجویز فرمولاسیون در مراحل مختلف اندازه‌گیری) و درصورت مشاهده تفاوت معنی‌دار از آزمون تی زوجی وابسته (برای تعیین منشأ تفاوت) و از آزمون دانکن (جهت مقایسات بین گروه‌های شش‌گانه تجویز) استفاده گردید. سطح معنی‌داری برای تمامی محاسبات، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند.

جدول شماره ۱: نحوه تجویز نانوذرات کیتوسان و آنتی‌ژن به گروه‌های موشی

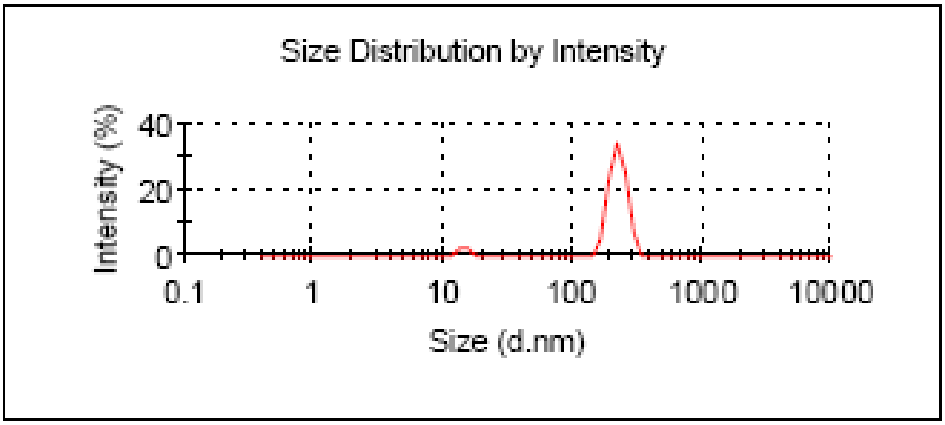
ردیف	گروه	نوع تجویز
۱	آنتی‌ژن (به تنهایی)	خوراکی
۲	نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن	خوراکی
۳	نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن	خوراکی
٤	آنتی‌ژن (به تنهایی)	داخل بینی
٥	نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن	داخل بینی
٦	نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن	داخل بینی

یافته‌ها

نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین، با روش ژلاسیون یونی تهیه گردید. نتایج تصویربرداری به‌وسیله میکروسکوب روبشی، بیانگر تولید نانوذرات با اندازه کمتر از ۳۰۰ نانومتر بود (شکل). نتایج دستگاه DLS نیز تولید نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن با میانگین اندازه ۲۸۵ نانومتر را نشان داد (نمودار شماره ۱).



شکل: نانوذرات کیتوسان حاوی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی BoNT/E



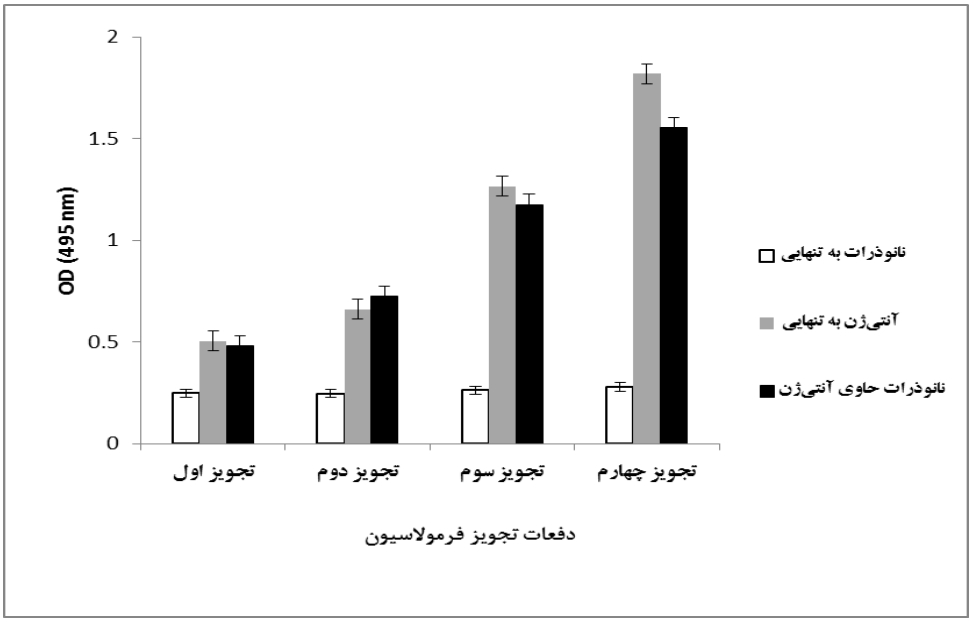
نمودار شماره ۱: توزیع اندازه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن (میانگین اندازه نانوذرات ۲۸۵ نانومتر می‌باشد.)

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

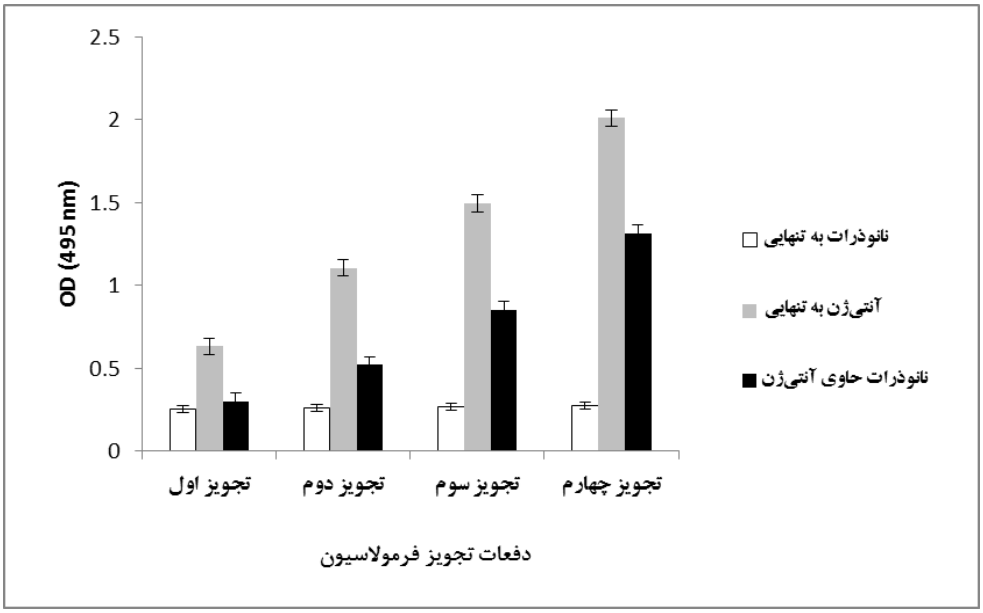
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

تولید آنتی‌بادی IgG پس از هر بار تجویز در همه گروه‌های مورد آزمون افزایش یافت که این افزایش در گروه‌های کنترل مشاهده نشد.

با توجه به آنالیزهای آماری مشخص گردید افزایش تیتر آنتی‌بادی پس از هر بار تجویز، معنی‌دار بوده است (نمودارهای شماره ۲ و ۳).



نمودار شماره ۲: میانگین تیتر آنتی‌بادی IgG، براساس میزان OD پس از تجویز خوراکی.



نمودار شماره ۳: میانگین تیتر آنتی‌بادی IgG، براساس میزان OD پس از تجویز داخل بینی.

در این تحقیق، طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی، از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (جدول شماره ۲ و ۳).

جدول شماره ۲: تجزیه واریانس اثرات فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن و تعداد دفعات تجویز بر میزان تیتر آنتی‌بادی با اندازه‌گیری مکرر

متغیرهای آزمون	درجه آزادی	F
فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن	۵	۱۰۰/۱**
تعداد دفعات تجویز	۳	۲۷۱/۱۵**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

جدول شماره ۳: مقایسه‌های جفتی دفعات تجویز با تصحیح بونفرونی

مرتبه تجویز مبنا	مرتبه تجویز مورد مقایسه	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
۱	۲	-۰/۱۸۱	۰/۰۱۷	۰/۰۰۰
	۳	-۰/۴۸۳	۰/۰۳۴	۰/۰۰۰
	۴	-۰/۸۰۴	۰/۰۴۶	۰/۰۰۰
۲	۱	-۰/۱۸۱	۰/۰۱۷	۰/۰۰۰
	۳	-۰/۳۰۱	۰/۰۲۲	۰/۰۰۰
	۴	-۰/۶۲۲	۰/۰۳۴	۰/۰۰۰
۳	۱	-۰/۴۸۳	۰/۰۳۴	۰/۰۰۰
	۲	-۰/۳۰۱	۰/۰۲۲	۰/۰۰۰
	۴	-۰/۳۲۳	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰
٤	۱	-۰/۸۰۴	۰/۰۴۶	۰/۰۰۰
	۲	-۰/۶۲۲	۰/۰۳۴	۰/۰۰۰
	۳	-۰/۳۲۱	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰

میانگین تیتر آنتی‌بادی ناشی از تجویز داخل بینی آنتی‌ژن و آنتی‌ژن خوراکی، به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر فرمولاسیون‌ها بود و پس از آن، فرمولاسیون تجویز خوراکی نانوذره حاوی آنتی‌ژن و تجویز داخل بینی نانوذره حاوی آنتی‌ژن قرار داشت. هرچند میانگین تیتر آنتی‌بادی ناشی از تجویز داخل بینی آنتی‌ژن و آنتی‌ژن خوراکی، به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر فرمولاسیون‌ها بود، ولی تیتر آنتی‌بادی مربوط به تجویز داخل بینی آنتی‌ژن نسبت به تیتر آنتی‌بادی آنتی‌ژن خوراکی بالاتر بود که این میزان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. بر این اساس در بین فرمولاسیون‌های واجد آنتی‌ژن، بهترین نتایج مربوط به تجویز داخل بینی آنتی‌ژن و ضعیف‌ترین نتایج مربوط به تجویز داخل بینی نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن گزارش شد (جدول شماره ۴). همان‌طورکه انتظار می‌رفت تیتر آنتی‌بادی مربوط به تجویز نانوذرات کیتوسان در تجویز خوراکی و داخل بینی بسیار پایین بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ٤: اثرات فرمولاسیون تجویزشده بر روی تیتر آنتی‌بادی با آزمون دانکن

فرمولاسیون تجویز	میانگین تیتر آنتی‌بادی
نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن (خوراکی)	۰/۹۹$_{bc}$
آنتی‌ژن (خوراکی)	۱/۱$_{ab}$
نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن (خوراکی)	۰/۲۵$_{d}$
نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن (داخل بینی)	۰/۷۵$_{c}$
آنتی‌ژن (داخل بینی)	۱/۳۱$_{a}$
نانوذرات کیتوسان بدون آنتی‌ژن (داخل بینی)	۰/۲۶$_{d}$

***حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).**

به‌منظور بررسی قدرت حفاظت‌کنندگی آنتی‌بادی تولیدشده، چالش موش‌های ایمن‌شده با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E انجام گرفت. نتایج چالش نشان داد بیشترین میزان تحمل مربوط به گروهی است که به‌صورت داخل بینی و با آنتی‌ژن، به تنهایی ایمن شده‌اند. در سایر گروه‌ها، نتایج چالش یکسان بود (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵: نتایج چالش موش‌های ایمن‌شده با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E

ردیف	گروه	نوع تجویز	میزان تحمل
۱	آنتی‌ژن به تنهایی	خوراکی	۵×۱۰^{۲} **LD_{50}**
۲	نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن	خوراکی	۵×۱۰^{۲} **LD_{50}**
۳	آنتی‌ژن به تنهایی	داخل بینی	۲×۱۰^{۳} **LD_{50}**
٤	نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن	داخل بینی	۵×۱۰^{۲} **LD_{50}**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

بحث

در سالهای اخیر مطالعات زیادی بر روی استفاده از نانوذرات به‌عنوان حامل واکسن صورت گرفته است (۲۴-۲۰). اگرچه از طیف وسیعی از نانوذرات تحت عنوان حامل واکسن استفاده می‌شود، ولی نانوذرات پلیمری کیتوسان به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، امکان رهایش هدفمند، همچنین محافظت از واکسن در بدن، بسیار مورد توجه بوده و مطالعات گسترده‌ای، درخصوص استفاده از آن به‌عنوان حامل واکسن‌های داخل بینی و خوراکی مختلف علیه بیماری‌های گوناگون انجام شده است (۳۲-۲۵). Ravichandran و همکاران (سال ۲۰۰۷) نشان دادند استفاده از کیتوسان در تجویز داخل بینی واکسن سه‌گانه علیه سروتیپ‌های A، B و E باعث افزایش میزان تولید آنتی‌بادی می‌شود (۳۳). Jain و همکاران (سال ۲۰۰۶) نیز با فرمولاسیون وزیکولی نانوذرات و تجویز خوراکی آنها، غلظت بالای sIgA و پاسخ ایمنی بهتری را مشاهده کردند (۳۴). Bagheripour و همکاران (سال ۲۰۱۵)، درخصوص اثر ادجوانتی نانوذرات کیتوسان بر ایمنی‌زایی BoNT/E نشان دادند نانوذرات کیتوسان می‌تواند همانند ادجوانت فروند باعث تحریک سیستم ایمنی و در نتیجه بروز پاسخ شود (۱۶). در مطالعه حاضر از نانوذرات کیتوسان به‌عنوان حامل کاندید واکسن نوترکیب علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E برای تجویز خوراکی و داخل بینی استفاده شد. این اولین بار است که نانوذرات کیتوسان جهت رهایش مخاطی این کاندید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین در پژوهش حاضر، نتایج ELISA نشان داد در تمام گروه‌های مورد آزمون، میزان تیتر آنتی‌بادی IgG در هر مرحله افزایش می‌یابد، درحالی‌که این افزایش در گروه‌های کنترل مشاهده نشد. تجویز خوراکی آنتی‌ژن به گروه اول، تیتر آنتی‌بادی IgG در هر مرحله را افزایش داد؛ به‌نحوی‌که میزان OD در تجویز چهارم، ۰/۹۹ بود (جدول شماره ۴). در گروه دوم نیز که نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن به‌صورت خوراکی تجویز شده بود، در هر مرحله افزایش تیتر آنتی‌بادی مشاهده گردید، به‌طوری‌که میانگین میزان OD در تجویز چهارم، ۱/۱ برآورد شد. با توجه به اینکه در گروه اول، تجویز خوراکی آنتی‌ژن به تنهایی منجر به تولید آنتی‌بادی به میزان قابل‌قبولی شده بود، انتظار می‌رفت استفاده از نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن و تجویز خوراکی آن، این اثر را تقویت کرده و در نتیجه با افزایش بسیار زیاد آنتی‌بادی همراه باشد. اما برخلاف تصور، این میزان، کمی کاهش درپی داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در تجویز داخل بینی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن نیز افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG در هر مرحله مشاهده گردید، به‌طوری‌که میانگین میزان OD در تجویز چهارم، ۰/۷۵ بود (جدول شماره ۴). همچنین گروهی‌که آنتی‌ژن را به تنهایی از طریق داخل بینی دریافت کرده بودند، افزایش تیتر آنتی‌بادی قابل‌توجهی را نشان دادند. در این گروه، میزان OD در تجویز چهارم، ۱/۳ بود. در مقایسه این دو گروه برخلاف انتظار، میانگین تیتر آنتی‌بادی در گروهی‌که آنتی‌ژن به تنهایی تجویز شده بود، بالاتر از گروهی بود که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن را دریافت کرده بودند که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

نتایج چالش با نوروتوکسین فعال بوتولینوم تیپ E در گروه‌هایی که به‌صورت خوراکی ایمن‌شده بودند نیز نشان داد هر دو گروه مورد آزمون توانسته‌اند ۵۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کنند. همچنین نتایج چالش گروه‌هایی که به‌صورت داخل بینی ایمن شده بودند نشان داد گروهی‌که نانوذرات دربرگیرنده آنتی‌ژن را دریافت کرده‌اند، توانسته‌اند ۵۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کنند، اما موش‌هایی که آنتی‌ژن را به تنهایی به‌صورت داخل بینی دریافت کرده بودند، توانستند ۲۰۰۰ برابر LD_{50} را تحمل کنند که با توجه به میانگین تیتر آنتی‌بادی حاصله، این نتیجه قابل‌قبول بود (جدول شماره ۵).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از چالش نشان داد تجویز خوراکی و داخل بینی پروتئین نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E، به تنهایی قادر است سیستم ایمنی را به‌طور مؤثر، تحریک و پاسخ ایمنی مناسب ایجاد کند و استفاده از نانوذرات دربرگیرنده این آنتی‌ژن نیز تأثیری در افزایش تولید آنتی‌بادی و در نتیجه ایمنی بیشتر نخواهد داشت. همچنین بهترین راه برای ایجاد ایمنی مؤثر در برابر نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در موش، تجویز داخل بینی آنتی‌ژن می‌باشد که در مطالعه حاضر در این حالت، بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی و تحمل در برابر توکسین،

مشاهده گردید و در سایر روش‌های تجویز، گرچه تفاوت‌هایی در میزان تولید آنتی‌بادی IgG مشاهده شد، ولی نتایج چالش یکسان بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، به‌واسطه فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق، همچنین از مساعدت و همکاری پژوهشگران آزمایشگاه بیوشیمی مرکز، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

References:

1. Mansour AA, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal heavy chain of C. botulinum neurotoxin type E. Biologicals 2010;38(2):260-4.

2. Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Valipour E, Basiri M, Nazarian Sh, Amani J, et al. Immunogenic and protective potentials of recombinant receptor binding domain and a C-terminal fragment of Clostridium botulinum neurotoxin type E. Iranian J Biotechnol 2011;9(3):181-7.

3. Valipour E, Moosavi ML, Amani J, Nazarian S. High level expression, purification and immunogenicity analysis of a protective recombinant protein against botulinum neurotoxin type E. World J Microbiol Biotechnol 2014;30(6):1861-7.

4. Przedpelski A, Tepp WH, Kroken AR, Fu Z, Kim JP, Johnson EA, et al. Enhancing the protective immune response against botulism. Infect Immun 2013;81(7):2638–44.

5. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. Curr Opin Immunol 2010;22(3):411-6.

6. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv Drug Deliv Rev 2010;62(1):59-82.

7. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. Int J Nanomedicine 2011;6:765-74.

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

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

10. Honari H. Special adjuvant for the oral vaccines and the role of that in passive defense. Passive Defense Q 2011;(2):11-9. [Full Text in Persian]

11. Rahisunddin, Sharma PK, Garg G, Salim M. Review on nasal drug delivery system with recent advancement. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3(2):1-5.

12. Alagusundaram M, Chengaiah B, Gnanaprakash K, Ramkanth S, Chetty CM, Dhachinamoorthi D. Nasal drug delivery system - an overview. Int J Res Pharm Sci 2010;1(4):454-65.

13. Raut S, Sutar M, Singh S. Nasal vaccine: A novel approach in nasal drug delivery system. World J Pharm Pharma Sci 2015;4(4):1520-36.

14. Rahisuddin, Sharma PK, Garg G, Salim M. Review no nasal drug delivery system with recent advancement. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3(2):6-11.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 3:50 IRST on Saturday February 24th 2018

15. Slütter B, Bal SM, Que I, Kaijzel E, Löwik C, Bouwstra J, et al. Antigen–adjuvant nanoconjugates for nasal vaccination: An improvement over the use of nanoparticles? Mol Pharm 2010;7(6):2207-15.

16. Bagheripour MJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Nazarian Sh. Immunogenicity effect of chitosan nanoparticles containing botulinum neurotoxin e binding domain recombinant protein in mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2015;25(124):37-47.

17. Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, et al. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. Brazilian J Chem Eng 2011;28(3):353-62.

18. Vaezifar S, Razavi Sh, Golozar MA, Karbasi S, Morshed M, Kamali M. Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. J Clust Sci 2013;24(2):891-903.

19. Hedrich HJ. The laboratory Mouse. Italy: Elsevier Academic Press; 2004. p. 526-41.

20. Fujita Y, Taguchi H. Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles. Chem Cent J 2011;5(1):48.

21. Nnamani PO, Scoles G, Kröl S. Preliminary characterization of N-trimethylchitosan as a nanocarrier for malaria vaccine. J Vector Borne Dis 2011;48(4):224-30.

22. Bret D, Ulery BD, Kumar D, Ramer-Tait AE, Metzger DW, Wannemuehler MJ, et al. Design of a protective single-dose intranasal nanoparticle-based vaccine platform for respiratory infectious diseases. PLoS ONE 2011;6(3):e17642.

23. 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.

24. 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 Deliv Sci Technol 2014;24(1), 33-9.

25. Rezaei Mokarram A, Alonso MJ. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing diptheria toxoid as new carrier for nasal vaccine delivery in mice. Arch Razi Institute 2006;61(1):13-25.

26. Bento D, Staats HF, Gonçalves T, Borges O. Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. Eur J Pharm Biopharm 2015;93:143-64.

27. Islam MA, Firdous J, Choi YJ, Yun CH, Cho CS. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. Int J Nanomedicine 2012;7:6077-93.

28. Shahnaz G, Vetter A, Barthelmes J, Rahmat D, Laffleur F, Iqbal J, et al. Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: Bioavailability and pharmacokinetic characterization. Int J Pharm 2012;428(1–2):164-70.

29. Xu JH, Dai WJ, Chen B, Fan XY. Mucosal immunization with PsaA protein, using chitosan as a delivery system, increases protection against acute otitis media and invasive infection by Streptococcus pneumoniae. Scand J Immunol 2015;81(3):177-85.

30. Biswas S, Chattopadhyay M, Sen KK, Saha MK. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. Carbohydr Polym 2015;121:403-10.

31. Millotti G, Perera G, Vigl C, Pickl K, Sinner FM, Bernkop-Schnurch A. The use of chitosan-6-mercaptonicotinic acid nanoparticles for oral peptide drug delivery. Drug Deliv 2011;18(3):190-7.

32. Patil S, Babbar A, Mathur R, Mishra A, Sawant K. Mucoadhesive chitosan microspheres of carvedilol for nasal administration. J Drug Target 2010;18(4):321–31.

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

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