

Research Paper

Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice

Mahdi Baranvand¹, *Hosein Honari²

1. MSc., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Citation: Baranvand M, Honari H. [Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice (Persian)]. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016; 23(4):688-697.



Received: 8 Mar. 2016

Accepted: 19 Jun. 2016

ABSTRACT

Backgrounds The intestinal infection caused by Shigella and Escherichia coli is known as a bioterrorist agent. IpaD and STx proteins play an important role in the invasion and angiogenesis by Shigella. Therefore, IpaD with STxB can be appropriate candidates for a safety vaccine. In this study the immunogenicity of STxB and combined STxB-IpaD nanocapsule recombinant proteins has been examined in the form of oral and injection in mice.

Methods & Materials In this experimental study, pET28a(+) vectors containing stxB and stxB-ipaD genes were transformed into E. coli BL21 DE3 bacteria. These bacteria were grown on antibiotic medium and were confirmed by direct PCR, and protein expression and SDS-PAGE gel. Recombinant proteins purified by nickel column and SDS-PAGE gel and were confirmed by immunoblotting. STxB and STxB-IpaD recombinant proteins become nanoparticles by inotropic gelation method with chitosan polymer and its picture was taken by Scanning Electronic Microscope (SEM). STxB and STxB-IpaD nanocapsule antigens prescript in the form of oral and injection four time to mice and their antibodies titer and immunogenicity were monitored.

Results By performing ELISA test, IgG antibody titer was detected by injection method but not in oral method, maybe due to loss of nanoparticle structure and antigens in acidic environment and trypsin enzyme of stomach. Immunized mice's with STxB and STxB-IpaD recombinant proteins with inotropic gel method were able to tolerance order up to 7 and 10 times the E. coli O157: H7 Shiga toxin LD50.

Conclusion STxB and STxB-IpaD protein nanoparticles can be used as safety injection adjuvant for immunogenesis against the E. coli O157: H7 Shiga toxin.

Keywords:

Shigella dysenteriae I,
STxB, STxB-IpaD, Chi-
tosan nanoparticles

* Corresponding Author:

Hosein honari, PhD

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 3848187

E-mail: honari.hosein@gmail.com

بررسی ایمنی‌زایی نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD شیگلادیسانتتری تیپ یک در موش سوری

مهدي باران‌وند^۱، حسين هنري^۲

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۸ اسفند ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۳۰ خرداد ۱۳۹۵

اهداف: عفونت حاد روده‌ای که توسط باکترهای شیگلا و اشرشیاکلی ایجاد می‌شود به عنوان عامل بیوتروریستی شناخته شده است. پروتئین IpaD و STxB نقش مهمی در تهاجم و بیماری‌زایی شیگلاها دارد. با ممزوج کردن IpaD با STxB می‌توان کاندیدای واکسن مناسب تهیه کرد. در این مطالعه ایمنی‌زایی پروتئین‌های نوترکیب نانوذره‌ای STxB-IpaD ممزوجی و STxB به صورت خوراکی و تزریقی در موش بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، از وکتورهای pET28a(+) دارای ژن‌های stxB و stxB-IpaD استفاده شد که به درون باکتری E.coli BL21 DE3 ترانسفورم شدند. این باکتری روی محیط آنتی‌بیوتیک رشد داده شد و با روش PCR مستقیم و بیان پروتئین و ژل SDS-PAGE تأیید شد. پروتئین‌های نوترکیب توسط ستون نیکل تخلیص و توسط ژل SDS-PAGE و ایمنوبلاتینگ تأیید شدند. پروتئین‌های نوترکیب STxB و STxB-IpaD با روش ژله‌ای شدن یونی با پلیمر کیتوسان نانویی شدند و تصویربرداری آن با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) انجام گرفت. تجویز خوراکی و تزریقی آنتی‌ژن‌های نانوذره‌ای STxB-IpaD و STxB در چهار نوبت متوالی به موش‌های سوری انجام و تیتراژ آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی آن‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: با انجام آزمایش الیزا تیتراژ آنتی‌بادی IgG در حالت تزریقی مشاهده شد، ولی در حالت خوراکی مشاهده نشد. ممکن است به علت ازبین‌رفتن ساختار نانوذره و آنتی‌ژن توسط محیط اسیدی معده و آنزیم تریپسین باشد. موش‌های ایمن شده با پروتئین‌های نوترکیب STxB و STxB-IpaD با روش ژله‌ای شدن یونی نانویی توانستند به ترتیب تا هفت و ده برابر LD شیگلا توکسین E.coli O157:H7 را تحمل کنند.

نتیجه‌گیری: می‌توان از نانوذره پروتئینی STxB-IpaD و STxB به عنوان اجزای تزریقی برای ایمنی‌زایی در برابر شیگلا توکسین E.coli O157:H7 استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها:

شیگلادیسانتتری تیپ یک، STxB-IpaD، STxB، نانوذرات

مقدمه

شیگلایکسوسنی^۱، شیگلایکسوسنی^۲ نام‌گذاری شده‌اند.

اسهال خونی با عامل شیگلا در صورت عدم درمان به مرگ می‌انجامد [۱، ۲]. شیگلاتوکسین یا STxB به‌عنوان یکی از عوامل ویرولانسی شیگلادیسانتتری تیپ یک در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری مطرح است. شیگلاتوکسین STxB، انتروتوکسین شیگلادیسانتتری، یک پروتئین هموپنتامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون است که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیرواحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری است [۳، ۴].

شیگلادیسانتتری و E.coli O157:H7 از خانواده انتروتوباکتریاسه‌ها به شمار می‌آید. شیگلاتوکسین یا STxB عامل اسهال خونی شیگلاست. STxB از سم‌های دو قسمتی A و B است که قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری است. همچنین پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا هستند. پروتئین IpaD در گونه‌های شیگلا شباهت زیادی با هم دارند. مهم‌ترین شیگلاها از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها چهار سروتیپ هستند که بر اساس پلی‌ساکارید اختصاصی O شان (osp) در LPS طبقه‌بندی می‌شوند و به نام شیگلادیسانتتری^۱، شیگلایکسوسنی^۲،

3. S. sonnei

4. S. boydii

1. S. dysentery

2. S. flexneri

* نویسنده مسئول:

دکتر حسین هنری

نشانی: تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۲۸۴۸۱۸۷ (۹۱۲) ۹۸+

پست الکترونیکی: honari.hosein@gmail.com

غیرسمی بوده و از مضراتی چون لخته کردن خون، التهاب‌زایی عاری هستند. این ذرات زیستی تخریب‌پذیر هستند و برای حمل مولکول‌های دارویی، پروتئینی، پپتیدی یا نوکلئیک اسیدی مناسب هستند. پروتئین یا داروی مدنظر می‌تواند در سطح یا درون نانوکپسول یا نانوکره قرار گیرد [۱۶، ۱۷].

ژله‌ای شدن یون تروپیک بر اساس برهم‌کنش الکترواستاتیک بین گروه‌های آمینی کیتوزان و گروه‌های با بار منفی پلی‌آنیونی نظیر تری‌پلی‌فسفات (TPP) است. در این روش کیتوزان در اسیداستیک در حضور یا غیاب عامل تثبیت‌کننده، حل و پلی‌آنیون اضافه می‌شود و نانوذرات به تدریج با همزن مکانیکی تشکیل می‌گردند [۱۳]. هدف از انجام این تحقیق بررسی بیان، تجویز خوراکی و تزریقی آنتی‌ژن‌های نانوکپسولی STxB و STxB-IpaD به موش و بررسی تیتراژ آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی علیه *E. coli* O157:H7 است.

مواد و روش‌ها

کاست‌های ژنی *stxB-IpaD* و *stxB* در وکتور pET28a(+) تهیه شد [۹، ۱۷، ۱۸]. وکتورهای بیانی pET28a(+) با ژن‌های *stxB* و *stxB-IpaD* در سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21 (stratagen) (DE3) ترانسفورم شد. کلون‌های انتخابی به کمک PCR تأیید شدند.

به منظور بیان ژن‌های *stxB*، *IpaD* و *stxB-IpaD* از کشت شبانه کلون‌های جداسازی‌شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح شد و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به‌دست‌آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمناز با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. الکتروفورز SDS-PAGE نمونه‌ها قبل و بعد از القای همراه با مارکر پروتئینی (SM۰۶۷۱) تحت شرایط دناتور، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود.

برای تأیید پروتئین‌های نو ترکیب بیان‌شده از تکنیک ای‌مونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلاسیفین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر PBST (۳۷ NaCl میلی‌مولار، ۲/۷ KCl میلی‌مولار، ۲/۴ Na_۲HPO_۴·۷H_۲O میلی‌مولار، ۵ درصد شیر خشک میلی‌مولار، تویین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک شد.

نمونه پس از سه بار شست‌وشو با بافر PBST به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی ضد His-tag (Ebcam) کانزوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار

هر نمونر STxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده است و وزن مولکولی حدود ۷/۷ kDa دارد [۴، ۳]. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb_۳ متصل می‌شود که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود [۵]. مطالعات نشان داده است بیان Gb_۳ در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. Gb_۳ بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کولون دارد. همچنین این فراوانی در سطح سلول‌های دندریت (DC) انسان و موش نیز دیده می‌شود [۶].

با تزریق زیرپوستی یا تجویز نازالی آنتی‌ژن STxB آنتی‌بادی علیه STxB تولید می‌شود و با خنثی‌سازی آن می‌توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری کرد. همچنین یکی دیگر از عواملی که در بیماری‌زایی شیگلا نقش دارد پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H هستند که محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا هستند. کمپلکس ایجاد شده از سه پروتئین IpaB/C/D نقش بسیار مهمی در اتصال به سلول‌های اپیتلیالی روده (M-cell) و فرار از فاگوزوم ماکروفاژها بازی می‌کند [۷، ۸].

توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای IpaD بین گونه‌های شیگلا شباهت زیادی نسبت به هم دارند. به این صورت که توالی IpaD در شیگلادیسانتی‌سروتیپ A با شیگلایبوتیدی ۹۸ درصد و شیگلایسونتی ۹۵ درصد و شیگلایفلکسنری ۹۴ درصد کاملاً همولوژی دارد [۹]. با تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG علیه IpaD می‌توان از بیماری‌زایی شیگلا جلوگیری کرد. با تولید آنتی‌ژن‌های STxB، STxB-IpaD در باکتری *E. coli* BL21 و بررسی بیان و ایمنی‌زایی آن در موش و خوکچه هندی به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیز مطرح است [۱۰، ۱۱، ۱۲].

کیتوزان یک آمینو پلی‌ساکارید خطی ترکیبی از رابطه‌ای به‌طور تصادفی پراکنده شده که واحدهای بتا (۴→۱)-D-گلوکز آمین و N-استیل D-گلوکز آمین است. کیتوزان از داستیل‌سیون کیتین (پلی‌ساکارید طبیعی و فراوان موجود در اسکلت خارجی سخت‌پوستانی همچون خرچنگ و میگو) تهیه می‌شود. این پلی‌ساکارید کاتیونی به دلیل دسترسی فراوان، چسبندگی بی‌نظیر به موکوس، خواص دارویی مناسب و زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، سمی نبودن و تحریک کم سیستم ایمنی، در زمینه‌های بیوپزشکی و دارویی به صورت تزریقی، نازالی، خوراکی، وریدی و غیره استفاده می‌شود [۱۳].

کپسوله کردن پروتئین‌های درمانی در نانوذرات، گزینه امیدبخشی برای غلبه بر مشکلاتی است که با تزریق دهانی پروتئین‌ها ایجاد می‌شود. متصل کردن پروتئین‌ها به ماتریکس پلیمری سدی در مقابل تخریب آنزیمی و هیدرولیتیکی در محیط بدن است [۱۴، ۱۵]. نانوذرات کایتوزانی ویژگی رهاسازی کنترل‌شده، ممتد و زیست‌سازگاری دارند. علاوه بر این در خون

عکس گرفته شد [۱۴، ۱۵، ۲۰].

برای پروتئین‌سنجی بعد از تشکیل نانوذرات دارای نمونه پروتئینی و بدون پروتئین (نمونه کنترل) و سانتریفیوژ، محلول رویی جدا شد و با روش برادفورد با طول موج ۵۹۵ nm، عددی را که دستگاه اسپکتروفوتومتر برای کنترل نشان می‌دهد از عددی که دستگاه از محلول رویی نمونه پروتئینی خوانده است کم کرده و با توجه به نمودار استاندارد برادفورد مقدار پروتئینی را که نانویی نشده و در محلول رویی است محاسبه کرده و با کم کردن این مقدار پروتئین از کل پروتئین استفاده‌شده، تقسیم بر کل پروتئین، ضرب در ۱۰۰، مقدار درصد افیشنسی یا نانویی شدن پروتئین به دست آمد (فرمول زیر).

$$\% \text{افیشنسی} = \frac{\text{کل پروتئین - پروتئین قابل حل}}{\text{کل پروتئین}} \times 100$$

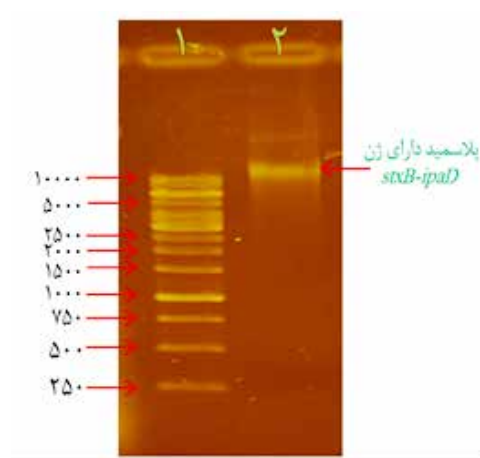
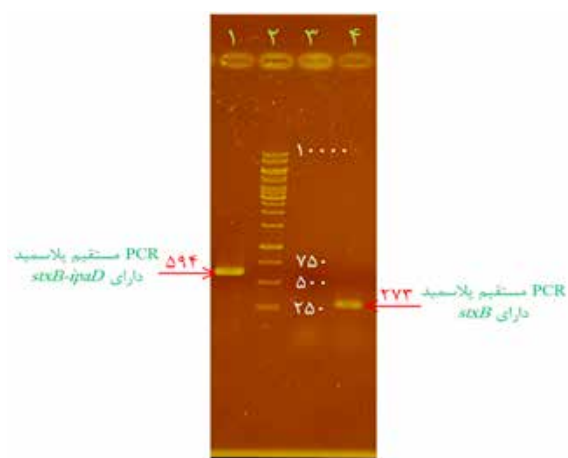
به منظور تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های STxB و STxB-IpaD به میزان ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ میکروگرم از پروتئین‌های نانوذره STxB و STxB-IpaD در چهار نوبت به صورت خوراکی و تزریقی به موش‌ها تجویز و در نهایت از موش‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الیزا تیترا آنتی‌بادی آن اندازه‌گیری شد [۱۷، ۱۸، ۲۰].

به منظور چالش حیوانات ایمن‌شده با عصاره سلولی E.coli سویه O157:H7 بعد از ایمن‌سازی حیوانات به اندازه ۳۰۰ میکروگرم از عصاره سلولی E.coli سویه O157:H7 به موش‌های شاهد تزریق شد که همه مردند و تا هفت و ده برابر LD₅₀ از این عصاره سلولی به موش‌های ایمن‌شده تزریق و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن بررسی شد و حیوانات تا ۱۰ روز تحت نظر قرار گرفتند.

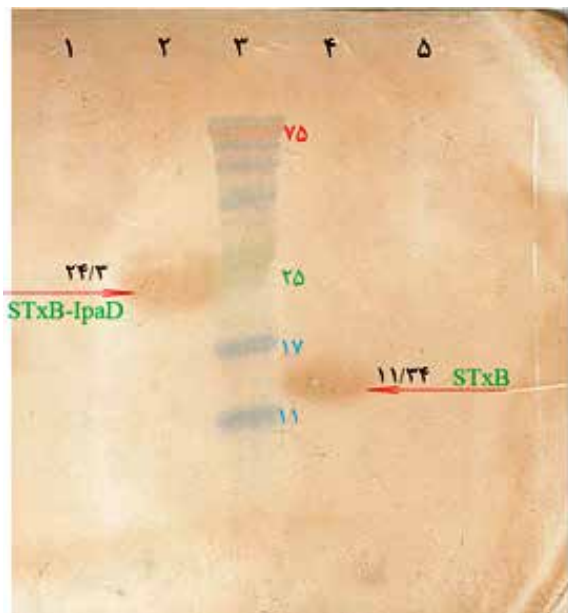
شست‌وشو با بافر PBST برای آشکارسازی از سوپسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی ۶ mg DAB، ۱۰ μl H₂O₂) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوپسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسولولزی، واکنش با استفاده از H₂O₂ متوقف شد [۱۰].

پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه‌های حاصل روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA سیناژن) به عنوان استاندارد انجام گرفت [۱۰]. به منظور تهیه نانوذره با روش ژله‌ای شدن یونی ابتدا پلیمر کایتوسان با غلظت نهایی ۰/۱ درصد (۱۰ mg) به محلول استیک اسید ۱ درصد (۱۰ ml) اضافه شد و محلول با یک مگنت مغناطیس و همزن برقی کاملاً هموژنیزه و همگن شد.

در مرحله بعد PH محلول کایتوزان بسته به PI پروتئین تنظیم شد. (پروتئین STxB PI= ۵/۷ دارد. پس محلول در PH= ۶/۷ تنظیم شد) سپس به مقدار مورد نیاز (۱۵۰ μg) از آنتی‌ژن پروتئینی مدنظر به محلول اضافه شد. در مرحله بعد نمک STPP با غلظت نهایی ۰/۵ درصد (۵۰۰ μl) به محلول اضافه شد (هر ۵ دقیقه ۵۰ میکرولیتر) تا به رنگ شیری درآمد. حین اضافه کردن نمک باید سونیکاسیون (۵ مرتبه و هر مرتبه ۲۰ ثانیه) انجام می‌شد. در این مرحله نانوذرات در حال شکل‌گیری است. بعد از یک ساعت محلول در تیوب یا فالتکون ریخته و در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰ و در زمان ۴۵ دقیقه و در دمای ۱۰ درجه قرار داده شد. نانوذرات به ته تیوب می‌چسبید و محلول بالایی برای پروتئین‌سنجی با روش برادفورد جدا شد. تیوب حاوی نانوذرات STxB کاملاً خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از نانوذرات به دست آمده با میکروسکوپ اسکن الکترونی (SEM)،



تصویر ۱: تصویر از ژل آگاروز ۱ درصد. تصویر سمت راست: ستون ۱: نشانگر مولکولی pb ۱۰۰۰۰ ستون ۲: استخراج پلاسمید دارای ژن stxB-ipaD تصویر سمت چپ: ستون ۱: باند حاصل از RCP مستقیم ژن سنتتیک stxB-ipaD و مشاهده قطعه ۴۹۵ جفت بازی ستون ۲: نشانگر مولکولی pb ۱۰۰۰۰ ستون ۴: باند حاصل از RCP مستقیم ژن stxB و مشاهده قطعه ۳۷۲ جفت بازی.

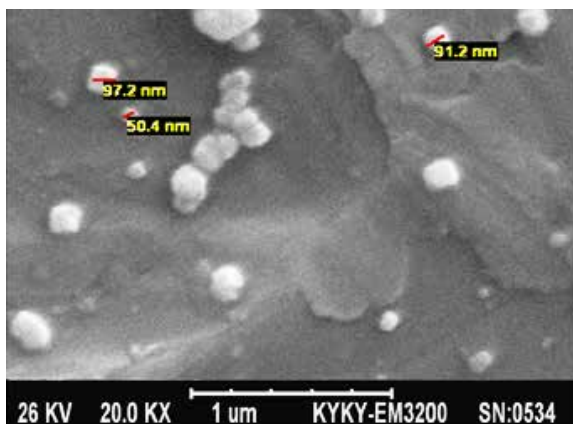


مجله علمی پژوهشی
دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

تصویر ۳. تصویر تکنیک وسترن بلات بر روی کاغذ نیتروسولوز. ستون ۱: نمونه کنترل منفی بیان نشده STxB-IpaD ستون ۲: نمونه تست بیان شده از پروتئین STxB-IpaD توسط IPTG ستون ۳: نشانگر پروتئینی ستون ۴: نمونه تست بیان شده از پروتئین STxB ستون ۵: نمونه کنترل منفی بیان نشده STxB

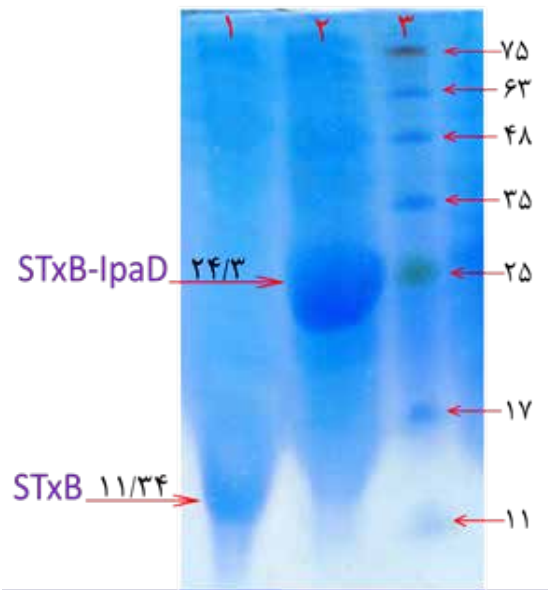
آن روی ژل SDS-PAGE برده شد. باند پروتئینی STxB- و STxB-IpaD به ترتیب در جایگاه صحیح ۱۱/۳۴ kDa و ۲۴/۳ قرار گرفت، در حالی که در کنترل‌ها هیچ بانندی دیده نشد (تصویر شماره ۲). پروتئین‌های نوترکیب به کمک ستون نیکل خاص سازی و غلظت پروتئین‌های تولید شده به روش برادفورد اندازه گیری شد.

آنالیز وسترن بلا تینگ با آنتی بادی ضد His-tag انجام شد. بیان پروتئین‌های STxB-IpaD و STxB به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلات و به کارگیری آنتی بادی علیه His-tag تأیید شد. باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرار گرفت، اما در ستون کنترل هیچ بانندی دیده نشد (تصویر شماره ۳).



مجله علمی پژوهشی
دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

تصویر ۵. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانوکپسول STxB-IpaP



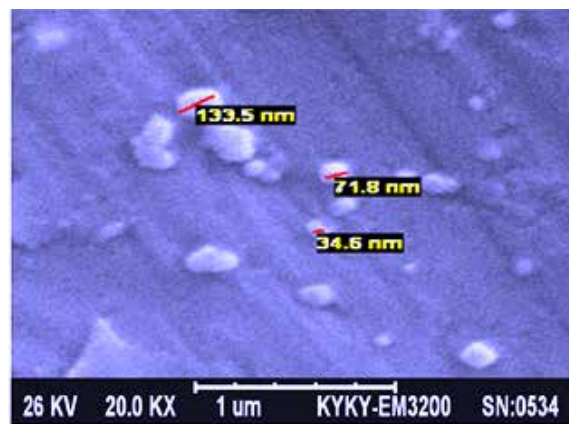
مجله علمی پژوهشی
دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

تصویر ۲. بیان پروتئین های نو ترکیب بر روی ژل SDS-PAGE. ستون ۱: بیان پروتئین STxB که دارای وزن مولکولی ۱۱/۳ KDa است. ستون ۲: بیان پروتئین STxB-IpaD که دارای وزن مولکولی ۲۴/۳ kDa است. ستون ۳: نشانگر پروتئینی.

یافته‌ها

تأیید حضور ژن با PCR مستقیم انجام گرفت. پلاسمیدهای نو ترکیب تهیه شده به باکتری E.coli BL۲۱DE۳ ترانسفورم شد. به منظور تأیید حضور قطعه مورد نظر در وکتور بیانی (+) pET۲۸a از واکنش PCR استفاده شد (تصویر شماره ۱).

برای بیان پروتئین STxB-IpaD و STxB تخلیص آن، کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG یک میلی مولار القا گردید و برای بررسی بیان و کیفیت



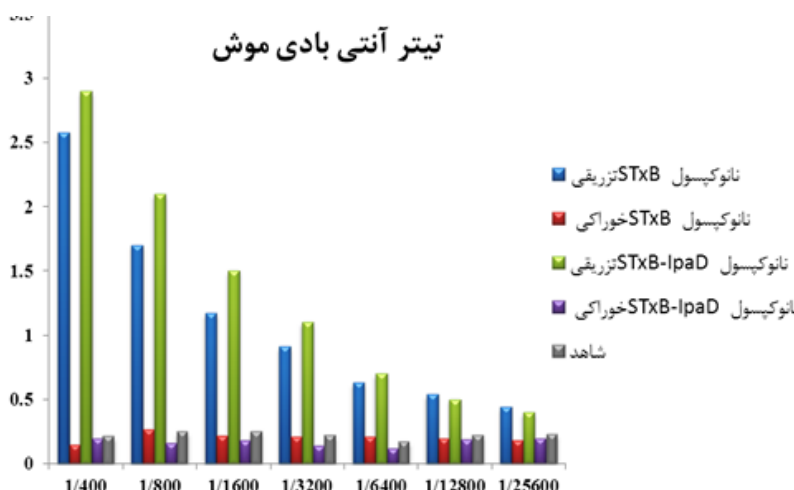
مجله علمی پژوهشی
دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

تصویر ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانوکپسول STxB

جدول ۱. تجویز خوراکی یا تزریق زیرجلدی آنتی ژن به موش.

شماره تزریق	روز تجویز	آنتی‌ژن STxB و روش تجویز		آنتی ژن STxB-IpaD و روش تجویز	
		زیر جلدی	خوراکی	زیر جلدی	خوراکی
۱	۱	۲۰ μg	۴۰ μg	۲۰ μg	۴۰ μg
۲	۱۴	۱۵ μg	۳۰ μg	۱۵ μg	۳۰ μg
۳	۲۸	۱۰ μg	۲۰ μg	۱۰ μg	۲۰ μg
۴	۴۲	۱۰ μg	۲۰ μg	۱۰ μg	۲۰ μg

مهر و آبان ۱۳۹۵، دوره ۲۳، شماره ۴



مهر و آبان ۱۳۹۵، دوره ۲۳، شماره ۴

تصویر ۶. تیتراسیون سرم موش.

تصویر برداری SEM

آمد (جدول شماره ۱). بعد از جداسازی سرم آن‌ها آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در هر مرحله در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است.

به منظور انجام چالش به موش‌های ایمن‌شده تا هفت و ده برابر LD_{۵۰} عصاره شیگاتوکسین با غلظت‌های ذکر شده در جدول شماره ۲ تزریق شد و به مدت ۵۰ روز تحت نظر قرار گرفتند. همان‌طور که نتایج آماری نشان می‌دهد گروه‌های

از نانوکپسول‌های کیتوسان دربرگیرنده آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عکس‌برداری شد (تصویر شماره ۴ و ۵). به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تجویز از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. دو هفته بعد از تزریق سوم و چهارم به صورت تصادفی از موش‌های تست و شاهد خون‌گیری به‌عمل

جدول ۲. نتایج چالش گروه‌های موشی با عصاره سلولی باکتری *E. coli* O157:H7

ردیف	گروه موشی	میزان عصاره سلولی تزریق شده	میزان تحمل	مقایسه گروه‌ها	مقایسه آماری
۱	PBS+کیتوسان تزریقی	۳۰۰ μg	مرد		
۲	نانوکپسولی STxB تزریقی	۲۱۰۰ μg	زنده	۳ یا ۱	P<۰/۰۰۱
۳	نانوکپسولی STxB خوراکی	۳۰۰ μg	مرد	۲ یا ۳	ns
۴	نانوکپسولی STxB-IpaD تزریقی	۳۰۰۰ μg	زنده	۵ یا ۴	P<۰/۰۰۱
۵	نانوکپسولی STxB-IpaD خوراکی	۳۰۰ μg	مرد	۳ یا ۵	ns

مهر و آبان ۱۳۹۵، دوره ۲۳، شماره ۴

شیگاتوکسین تولید و به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله می‌کند و سبب آماس و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌شود که نتیجه آن اسهال خونی است.

باکتری شیگلا با به‌کارگیری سیستم ترشحی نوع سه عوامل بیماری‌زای خود را به سلول میزبان انتقال می‌دهد. پروتئین IpaD عاملی است که در رأس این سیستم برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چندکاره است که ترشح و عرضه پروتئین‌های IpaA و IpaB را در حد فاصل سلول میزبان و باکتری و همچنین نفوذ صحیح ناقل‌های پروتئینی به داخل سلول میزبان کنترل می‌کند. پروتئین IpaD یک پروتئین ۳۷ kDa است و بین سایر پروتئین‌های اپرون Ipa تنها پروتئین IpaD آب‌دوست است.

ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز در تمامی مطالعات یک ناحیه عملکردی و بسیار مهم در IpaD تلقی می‌شود. در مطالعاتی که به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های IpaD انجام شد غالب اپی‌توپ‌های در دسترس IpaD در این ناحیه قرار داشتند. همچنین عملکرد IpaD به عملکرد این ناحیه بستگی دارد، به‌طوری‌که اگر فعالیت آن سرکوب شود به‌طور کلی قابلیت تهاجم شیگلا سرکوب می‌شود [۲۴، ۲۳].

مطالعات نشان دادند آنتی‌بادی‌هایی که ناحیه N-ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند برهم‌کنش این پروتئین با نمک‌های صفرای به‌ویژه دی‌اکسی‌کوات را سرکوب می‌کنند. در این حالت باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به‌کارگیری IpaB نخواهد بود. در نتیجه توان شیگلا برای ایجاد منفذ در سلول یوکاریوتی از بین می‌رود و فرایند ورود باکتری به درون سلول میزبان سرکوب می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد پروتئین IpaD و به‌ویژه ناحیه N-ترمینال این پروتئین عامل لازم برای ورود باکتری شیگلا به سلول‌های میزبان است و این پروتئین به عنوان آنتی‌ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است [۲۳].

آنتی‌بادی علیه IpaD می‌تواند توانایی باکتری را برای تهاجم از بین ببرد. آزمایش‌ها در محیط *in vivo* نیز با استفاده از روده خرگوش انجام شد. بدین ترتیب که پس از تهیه آنتی‌بادی Anti-IpaD با روش ایمونیزه کردن خرگوش‌ها آنتی‌بادی‌ها را در رقت‌های مختلف با باکتری شیگلا مخلوط کرده و از آن در آزمایش Rabbit Intestinal iliac loops استفاده شد. نتایج نشان داد در غلظت‌های اولیه آنتی‌بادی هیچ ضایعه‌ای در روده ایجاد نشد. در صورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی‌بادی درون روده خرگوش قرار گرفت سرتاسر روده دچار ضایعه شد [۲۳].

تحقیقات مشخص کردند مقدار آنتی‌ژنی که در حالت فیوژن‌شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است کمتر از مقداری است که به صورت تجویز هم‌زمان برای ایمونیزاسیون

تزریقی نانوکپسولی STxB-IpaD و STxB-IpaD با گروه‌های خوراکی نانوکپسولی STxB و STxB-IpaD اختلاف معناداری با همدیگر دارند (جدول شماره ۲).

بحث

بیماری شیگلوزیز به عنوان اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توأم با علائم بالینی چون تب، کرامپ‌های شکمی مشخص می‌شود که ممکن است به همراه سندروم اورمیک همولیتیک باشد. از طرفی شیگاتوکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروٹوکسیک ایجاد کند. امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده است. تا امروز سازمان جهانی سلامت WHO و FDA هیچ کدام از این کاندیداها را به دلایل مختلف تأیید نکرده‌اند، اما تلاش‌ها برای ساخت واکسن علیه شیگلوز به‌طور جدی ادامه دارد.

نتایج پژوهش‌های منتشرشده در خصوص شیوع شیگلا در ایران نشان می‌دهد تا چند سال پیش شیگلافلکسزنی بیشترین شیوع را در ایران داشته است. در رتبه‌های بعدی به ترتیب شیگلایسونئی و شیگلادیسانتری قرار دارند و مقدار کمی شیگلایبوتیدی مشاهده شده است. مطالعات جدید نشان می‌دهد شیگلایسونئی از شیگلافلکسزنی شایع‌تر است. تقریباً همین ترتیب شیوع شیگلا در کشورهای همسایه ایران (عربستان و پاکستان) نیز گزارش شده است [۲۲، ۱۸، ۱۰، ۹].

با توجه به گزارش محققان ایرانی مبنی بر فراوانی وقوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی شیگلا، این باکتری می‌تواند به عنوان یک عامل ناتوان‌کننده مورد توجه قرار گیرد. بنابراین لازم است سوش‌های بومی ایران به منظور تهیه واکسن مطالعه شوند [۲۲]. هیچ واکسنی برای شیگلا به صورت رایج در دسترس نیست. هر چند سلول‌های T در حفاظت علیه شیگلا نقش دارند، اما برای ایمن‌شدن ضروری نیستند. داده‌های حاصل از چندین مطالعه نشان داد پاسخ ایمنی همورال نقش مهم‌تری در ایمنی علیه شیگلا با هر دو پاسخ سیستمیک و مخاطی علیه LPS و تعدادی از پروتئین‌های کدشده توسط پلاسمید بیماری‌زاه، از جمله پروتئین‌های Ipa دارد. هنوز شیگلادیسانتری تیپ یک عمده‌ترین علت اپیدمی اسهال در صد سال اخیر است و نسبت مرگ‌ومیر آن در کشورهای جهان متفاوت است [۱].

مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است. مرحله اول شامل اتصال و به‌دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول‌های اپی‌تلیال روده کوچک با فاکتورهای کلونیزاسیون که باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی و تجمع پلی‌نوکلئورها و بالاخره نکروز و خونریزی می‌شود و به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می‌شود. در مرحله دوم باکتری

خوراکی آنتی‌ژن نانوذره‌ای در ابتدا باید به موش‌ها هیدروکسید آلومینیوم خورانده شود تا pH اسیدی معده خنثی و ساختار کپسول‌های کیتوسانی حفظ شود و آنتی‌ژن از pH اسیدی معده و آنزیم تریپسین در امان باشد و در نهایت با سلول‌های اپیتلیالی روده جذب شود. با توجه به بالا بودن تیتراژ آنتی‌بادی تزریقی نانوذره‌ای تحمل موش‌های ایمن شده در برابر عصاره حاوی شیگاتوکسین بالا بوده است و همچنین از نظر اقتصادی و زمان تهیه مقرون به صرفه است و به عنوان یک کاندیدای واکسن مناسب است.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای مهدی باران‌وند در گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) گرفته شده است. از تمامی اساتید و پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در به‌نتیجه‌رسیدن این تحقیق تلاش کردند تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

استفاده می‌شود. این نشان‌دهنده مزیت متصل کردن آنتی‌ژن‌ها با ادجوانت‌های مختلف است. امروزه توجه خاصی به واکسن‌هایی شده است که این مزیت را دارند [۲۵]. به منظور تقویت اثر واکسن و رفع محدودیت عمده آن یعنی میزان ایمنی‌زایی پایین آنتی‌ژن‌های محلول، باید ناحیه N ترمینال IpaD به عنوان آنتی‌ژن کاندیدای واکسن شیگلوز با یک ایمونوآدجوانت مناسب همراه شود که برای این منظور در این مطالعه STxB انتخاب شد. ژن STxB در باکتری E.coli کلون و بیان آن بررسی شد و ایمنی‌زایی آن به اثبات رسید [۱۲، ۲۶].

مطالعات نشان می‌دهد به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می‌شود. امروزه دانشمندان زیادی برای انتقال داروهای ضدسرطان به سلول‌های STxB و کاهش اثرات سوء شیمی‌درمانی به STxB، به خاطر اتصال اختصاصی با گیرنده ۳Gb روی اکثر سلول‌های سرطانی، توجه می‌کنند [۲۴، ۲۷]. به منظور افزایش ایمنی‌زایی مخاطی علیه STxB طی آزمایشی پروتئین تخلیص شده STxB به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح شد که نتیجه آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان داد. با ممزوج کردن STxB-IpaD میزان ایمنی‌زایی آن با استفاده از سم فعال E.coli O1۵۷:H۷ در خوکچه هندی تا ۲۸ برابر افزایش یافت [۲۵، ۲۸].

نتایج الایزای این آزمایش نشان داد تیتراژ آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD در موش اندکی متفاوت بود و با ممزوج شدن IpaD به STxB میزان تیتراژ آنتی‌بادی افزایش یافت. موش‌های ایمن شده با STxB توانستند تا ۷ برابر LD_{۵۰} موش‌های ایمن شده با STxB-IpaD تا ۱۰ برابر LD_{۵۰} شیگاتوکسین E.coli O1۵۷:H۷ را تحمل کنند. برای تحویل آنتی‌ژن از طریق دهان از نانوذرات چسبنده به موکوس که با سلول‌های اپیتلیال برهم‌کنش داشته و امکان افزایش جذب آنتی‌ژن را فراهم می‌سازند استفاده شد [۲۹، ۳۰].

به منظور بررسی پاسخ سیستم ایمنی همورال پروتئین نوترکیب STxB و STxB-IpaD این پروتئین به موش سوری به روش خوراکی و تزریقی به همراه PBS به شکل نانوکپسول تجویز شد و بعد از خون‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی (IgG) سرمی بررسی شد. برای به‌چالش کشیدن و بررسی قدرت حفاظت‌کنندگی آنتی‌بادی تولیدشده، ایمنی‌زایی روی موش صورت پذیرفت. با توجه به گزارش‌های شیوع شیگلا در ایران، با در نظر گرفتن همولوژی بالا در گونه‌های STxB و نیز مطالعات مشابه انجام شده در این مرکز به جای استفاده از شیگاتوکسین از سم E.coli O1۵۷:H۷ استفاده شد.

با توجه به تصاویر تیتراژ آنتی‌بادی و نتایج چالش موش‌ها نتیجه می‌گیریم روش ژله‌ای شدن یونی و نانوکپسول را می‌توان برای ساخت واکسن با آنتی‌ژن STxB و STxB-IpaD به کار برد که از نظر اقتصادی و زمانی نیز مقرون به صرفه است. در روش تجویز

References

- [1] Key B, Clemens J, and Kotloff. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhea and dysenteric mortal. Geneva: World Health Organization.
- [2] Swapan KN. Shigellosis. *The Journal of Microbiology*: 2005. 133-43.
- [3] Oludare O, Dequina N, Hiroshi Y, William L. AB Toxins: A paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins*. 2010; 2(7):1612-45. doi: 10.3390/toxins2071612
- [4] Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: Thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. *Toxicon*. 2005; 45(4):389-93. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.12.014
- [5] Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. *Biology of the Cell*. 2008; 100(12):717-25. doi: 10.1042/bc20080009
- [6] Janssen KP, Vignjevic, Boisgard R, Falguie T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Research*. 2006; 66(14):7230-36. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-0631
- [7] Sani M, Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ, Allaoui A. IpaD is localized at the tip of the shigella flexneri type iii secretion apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1770(2):307-311. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.10.007
- [8] Man A, Prieto G and Nicoletti C. Improving M-Cell-mediated transport across mucosal barriers. *Immunology*. 2004; 113(1):15-22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01964.x
- [9] Saadati M, Heiat M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. Cloning and expression of N-terminal region of IpaD from Shigella Dysenteriae in E. coli. *Journal of Paramedical Sciences*. 2010; 1(4):12-17.
- [10] Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. [Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein (Persian)]. *Arak Medical University Journal*. 2013; 16(73):83-93.
- [11] Honari H, Amlashi I, Minaei M. [Expression of Recombinant Proteins IpaD-STxB and Immunogenicity STxB in the Mice (Persian)]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014; 23(109):196-206
- [12] Honari H, Baranvand M, Minaei ME. [Immunogenicity Investigation of recombinant proteins (StxB) of Shigella dysenteriae type 1 in mice (Persian)]. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015; 21(6):1103-1112.
- [13] Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62(1):28-41. doi: 10.1016/j.addr.2009.10.003
- [14] Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 42(5):445-51. doi: 10.1016/j.ejps.2010.12.007
- [15] Amini Y, Tebianian M, Mosavari N, Fasihi Ramandi M, Ebrahimi SM, Dabaghian M, et al. Preparation of ESAT-6 nanoparticles and evaluation of humoral immunity after intranasal administration. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2012; 20(5):605-14.
- [16] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012; 161(2):505-22. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- [17] Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*. 2009; 87(3):133-70. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.009
- [18] Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R. Serogroup Distribution of Shigella in Tehran. *Iranian Journal of Public Health*. 2004; 33(3):32-35.
- [19] Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteriae type I in E. coli Rosseta DE3. *Genetics in the 3rd Millennium*; 2012; 1:2641-2647.
- [20] Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012; 81(3):463-9. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.04.007
- [21] Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 77(3):656-61. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008
- [22] Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, and Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iranian Journal of Public Health*. 2009; 38(2):134-138.
- [23] Chia M-Y, Hsiao S-H, Chan H-T, Do Y-Y, Huang P-L, Chang HW, et al. The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2010; 146(3-4):189-99. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.007
- [24] Hromockyj AE, Maurelli AT. Identification of an Escherichia coli gene homologous to virR, a regulator of Shigella virulence. *Journal of Bacteriology*. 1989; 171(5):2879-81. doi: 10.1128/jb.171.5.2879-2881.1989
- [25] Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006; 58(1):52-67. doi: 10.1016/j.addr.2006.01.002
- [26] Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007; 15(2):359-66. doi: 10.1128/cvi.00399-07
- [27] Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. *Vaccine*. 2011; 29(45):8094-100. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.040
- [28] Esmaili A, Honari H, Hamedian M, Safaei S, Ghofrani M. Targeted cloning of GFP as a tracker and its fusion mediated by PRARR flexible linkers to CTB-STB chimerical vaccine genes. *Genetics in the 3rd Millennium*. 2012; 10(1):2657-2665.
- [29] Soane R, Frier M, Perkins A, Jones N, Davis S, Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999; 178(1):55-65. doi: 10.1016/s0378-5173(98)00367-6
- [30] Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Illum L, et al. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection & Immunity* 2000; 68(10):5764-70. doi: 10.1128/iai.68.10.5764-5770.2000

