

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

Shahram Nazarian¹,
Seyed Latif Mousavi Gargari²,
Mehdi Azimbeyk³

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran

² Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran

³ MS, Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran

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

Abstract

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

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

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

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

Keywords: nanogel, chitosan, *Shigella*, IpaC, immunogen

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

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

پلاسمید تهاجمی باکتری دارای دو لوکوس ipa mxi-spa است که برای فنوتیپ تهاجم مهم می باشند. اپرون ipa، پروتئین های Ipa A-D را کد می کند که به عنوان افکتور برای ورود باکتری به سلول میزبان عمل می کنند. اپرون mxi-spa اجزای سیستم ترشحی تیپ III را کد می کند که برای انتقال پروتئین های Ipa از سیتوپلاسم باکتری به غشای سیتوپلاسمی و یا حتی سیتوزول سلول میزبان مهم هستند. غشای رآسی سلول های اپیتلیال کولون به وسیله گلیکولیپیدها پوشیده شده اند که تشکیل یک لایه موسینی را می دهند. مشخص شده است که پروتئین های Ipa که توسط پلاسمید تهاجمی باکتری کد می شوند، برای غلبه بر این سد لازم هستند (۵، ۶). پروتئین IpaA در داخل سیتوزول اپیتلیال سلول میزبان جایی که در آن بخش اسکلت سلولی مرتبط با پروتئین وینکولین می باشد، کمپلکس IpaA-vinculin را تشکیل داده و موجب دپلی مریزه شدن فیلامنت های اکتین می شود (۷). باکتری به وسیله IpaB خود، واکوئل های فاگوسیت را لیز کرده و از این طریق مکانیسم های کشنده ماکروفاژها را ناکارآمد می کند (۸). پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی IpaC علاوه بر این که به عنوان اولین فاکتور پروتئینی حمله کننده شیگلا به سلول های اپیتلیال مطرح است، امکان واکنش با فسفولیپیدهای غشا و تحریک تغییرات سیتواسکلتی

سلول میزبان را دارا می باشد (۴، ۹). با در نظر گرفتن این که محل اتصال، تکثیر و تهاجم باکتری شیگلا، مخاط روده می باشد، بنابراین تولید آنتی بادی های مخاطی علیه این فاکتورهای اتصالی و دخیل در تهاجم باکتری، می تواند اتصال و به تبع آن ورود باکتری به سلول ها را مختل کرده و از شدت بیماری زائی باکتری بکاهد (۱۲-۱۰). مهم ترین چالش استفاده از پروتئین هایی مانند IpaD و IpaC در طراحی واکسن مخاطی، قدرت پایین و عدم انتقال مناسب آن ها به بافت های مخاطی روده می باشد. یکی از مزیت های مهم تحریک سیستم ایمنی مخاطی، تولید آنتی بادی هایی است که می توانند در محل های ویژه از جمله روده، عملکرد میکروارگانسیم های بیماری زا را مختل سازند (۱۳). از دیگر مزایای به کارگیری واکسن ها از جمله واکسن های نو ترکیب زیر واحدی می توان به تجویز مخاطی اشاره کرد که نیاز به تزریق و پروسه استریل سازی نداشته و توسط بیمار بهتر پذیرفته می شود. اما از آن جا که ایمونوژن های زیر واحدی نو ترکیب پس از تجویز مخاطی به مقدار کافی جذب نمی شوند، استفاده از ترکیباتی از جمله ادجوانت ها و حامل ها می تواند کارائی ایمنی زائی این واکسن ها را بهبود بخشد (۱۴، ۱۵). فناوری نانو در این زمینه به کمک محققان زیست شناسی آمده است، به گونه ای که بارگذاری ایمونوژن های نو ترکیب در نانو ذرات زیست سازگار جهت افزایش ایمنی زایی، به صورت گسترده ای مورد توجه قرار گرفته است. بارگذاری پروتئین ها در نانوذرات می تواند از تخریب آن در فضای اسیدی معده جلوگیری کرده و سبب افزایش پایداری و ماندگاری آنتی ژن گردد (۱۶). از جمله فرایندهای دیگری که می توان به آن توجه نمود، استفاده از ادجوانت ها همراه با نانوذرات می باشد که می توانند ایمنی زایی را تقویت کنند (۱۷).

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

مواد و روش ها

مواد و حیوان آزمایشگاهی

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

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب IpaC

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

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

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

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

سوسپانسیون سلولی باکتری اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت القا شد. به منظور استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب بیان شده، رسوب سلولی باکتری از ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جمع آوری و با ۳ میلی لیتر بافر B متشکل از $100 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ میلی مولار، 10 Tris-HCl میلی مولار و 8 Urea میلی مولار مخلوط گردید. دیواره سلولی با استفاده از سونیکاتور پروبی و با شرایط قدرت سونیکاسیون ۵۰ درصد، پالس ۰/۵ و طی ۵ چرخه زمانی ۲۰ ثانیه ای تخریب شد. محلول حاصل از شکست باکتری با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه با سانتریفیوژ یخچال دار جمع آوری شد و جهت بررسی بیان به وسیله SDS-PAGE ۹ درصد مورد آنالیز واقع شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

تخلیص پروتئین با استفاده از رزین تمایلی نیکل انجام شد. قبل از تزریق محلول حاوی پروتئین، ستون کروماتوگرافی نیکل با بافر B (pH=۸) به تعادل رسید. بعد از خروج کامل بافر از ستون، محلول واجد پروتئین به آرامی به ستون اضافه و خروجی آن در ظرف جمع آوری شد. جهت حذف پروتئین‌هایی که به طور غیر اختصاصی به رزین متصل شده اند، ۱/۵ میلی لیتر بافر شستشوی C با pH=۶/۳ به ستون اضافه و محلول خروجی آن نیز جداگانه جمع آوری شد. پس از خروج کامل بافر شستشوی C، فرایند ذکر شده با استفاده از بافر شستشوی D با pH=۵/۹ انجام و محلول خروجی آن در میکروتیوب جمع آوری شد. جداسازی پروتئین نوترکیب از ستون با کمک بافر رهاسازی E با pH=۴/۳ انجام شد و نمونه های جمع آوری شده از مراحل چندگانه تخلیص پس از تیمار با سمپل بافر با روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور خارج کردن اوره و برگشت فولدینگ پروتئین، محصول پروتئینی به دست آمده با استفاده از کیسه دیالیز با $\text{Cut off} = 12$ و شیب غلظتی اوره از ۶ تا ۰ مولار دیالیز شد.

تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات

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

تهیه نانوزل کیتوسان (CS)-TPP

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

مقطر شستشو داده و پس از آن در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر با استفاده از سونیکاتور پروبی سونیکاسیون معلق گردید.

بررسی شکل ظاهری و تعیین اندازه نانوذرات

شکل ظاهری نانوذرات تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (KYKY مونتاز چین) بررسی شد. برای آماده سازی نمونه، رقت های مختلفی از نانوذله تهیه و بر روی فویل آلومینیومی پخش و با استفاده از دسکاتور و پمپ خلاء در مدت زمان نیم ساعت خشک گردید. نمونه ها را بر روی یک نگهدارنده قرار داده و تحت خلاء در آن خشک و با طلا پوشانده شدند تا سطح هادی الکتریکی باشد. تصویر برداری از نانوذرات با شتاب ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و با بزرگنمایی ۱۰ هزار انجام شد.

برای اندازه گیری قطر نانوذرات و پتانسیل زتای از دستگاه Zeta-potential sizer and analyzer ساخت کمپانی Malvern استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۱ میلی لیتر از نمونه نانوذله در PBS رقیق و نمونه حاصل در سونیکاتور آبی (با افزودن یخ) سونیکه شد تا نانوذرات کاملاً پراکنده شوند. نمونه آماده شده در کورت مخصوص دستگاه قرار گرفته، قطر ذرات و پراکنندگی نانوذله ها و پتانسیل زتا اندازه گیری شد.

بارگذاری نانوذرات و تعیین ظرفیت بارگذاری

۰/۵ میلی لیتر از نانوذله با غلظت کیتوسان ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر سانتریفیوژ و رسوب حاصل با ۱ میلی گرم از پروتئین نوترکیب IpaC توسط سونیکاسیون با قدرت ۴۰ مخلوط گردیدند. مخلوط حاصل یک روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در حال هم خوردن قرار گرفت تا فرایند ورد و جذب پروتئین در نانو ذرات انجام شود. محلول کلونیدی در بستر گلیسرولی و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه به سانتریفیوژ گردید و رسوب زله ای حاصل

برای ادامه تحقیق در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. مقدار پروتئین موجود در محلول روئی اندازه گیری و ظرفیت بارگذاری (LC) با فرمول زیر محاسبه گردید:

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

در ادامه یک میلی گرم از نانوذله تهیه شده در یک میلی لیتر از بافر PBS معلق گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی شیکر قرار داده شد. سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول روئی پس از تغلیظ بر روی ژل SDS PAGE لود گردید.

ایمن سازی حیوان آزمایشگاهی

در این مطالعه خو کچه هندی با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از موسسه سرم و واکسن سازی رازی تهیه و در شرایط مناسب و با دسترسی آزادانه به آب و غذا در گروه های مجزا نگهداری شدند. اصول اخلاقی در مورد کار با حیوانات رعایت گردید. ایمنی زایی نانوذرات واجد پروتئین نوترکیب از مسیر خوراکی با خوراندن ۳۰۰ میکرولیتر از نانوذرات واجد ۱۰۰ میکروگرم آنتی ژن نوترکیب به هر حیوان آزمایشگاهی انجام شد. برای ایمنی زایی از مسیر تزریقی نیز پروتئین بارگذاری شده در نانوذره و به میزان ۳۰ میکروگرم برای هر خو کچه در نظر گرفته شد. حیوانات در گروه کنترل نیز نانوذرات فاقد پروتئین نوترکیب را دریافت کردند. در هر دو گروه خوراکی و تزریقی، دوره های ایمن سازی به صورت ۴ مرحله با فواصل ۱۵ روزه بود.

بررسی تولید آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیب به روش
الایزا

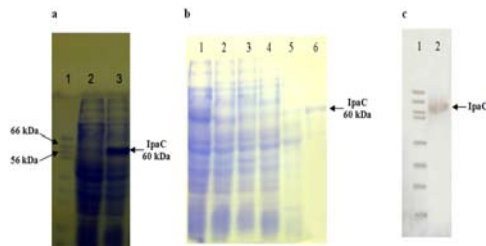
به منظور تهیه سرم، در فواصل منظم پس از تزریقات مرحله دوم به بعد از خو کچه ها خونگیری به

آورده و به چشم های خو کچه ها تلقیح شد و با دست پلک های حیوان را بسته به طوری که باکتری خارج نشود. پلک های بسته را ماساژ داده تا باکتری کاملاً در سطح چشم حیوان پخش و جذب شود. بعد از ۲۴ ساعت چشم حیوان بررسی شد. ایجاد عفونت به شکل یک لایه سفید در سطح چشم و یا عدم ایجاد عفونت ملاکی برای سنجش به شمار رفت.

یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب IpaC

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



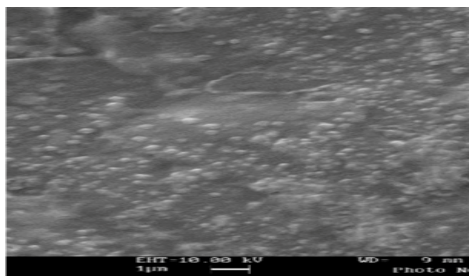
تصویر شماره ۱: بیان پروتئین نو ترکیب IpaC (a). ردیف ۱: نشانگر وزن پروتئین، ردیف ۲: کلون القا نشده، ردیف ۳: کلون القا شده با IPTG. پروتئین با وزن تقریبی ۶۰ کیلو دالتون در نمونه القا شده دیده می شود. این باند پروتئین در کلون القا نشده وجود ندارد. تخلیص پروتئین نو ترکیب (b). ردیف ۱: القای بیان پروتئین، ردیف ۲: خروجی ستون قبل از شستشو با بافر ردیف ۳ و ۴: خروجی ستون با بافر شستشوی C, D، ردیف ۵ و ۶: خروجی ستون با بافر رها سازی E و ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار. پروتئین نو ترکیب در آخرین مرحله شستشو از ستون خارج شده است. وسترن بلائینگ (c). ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲: واکنش پروتئین با آنتی بادی ضد هیستیدین. باند ظاهر شده با وزن ۶۰ کیلو دالتون تایید کننده واکنش آنتی بادی با توالی ۶ هیستیدین موجود در پروتئین می باشد.

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

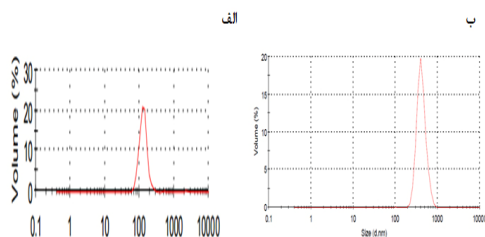
بررسی خو کچه های ایمن شده با IpaC و غیر ایمن با روش کراتوکانجوگیتو

باکتری شیگلا فلکسنری در محیط کشت LB مایع رشد داده شد و با شمارش باکتری، تعداد 2×10^8 باکتری را در سرم استریل به صورت سوسپانسیون در

سازی پروتئین نیز بر روی ژل SDS-PAGE لود گردید و وجود پروتئین ۶۰ کیلو دالتونی تأیید کننده جذب پروتئین توسط نانوذله کیتوسان بود که پس از مدت ۴۸ ساعت مقداری از آن ره سازی شده بود.



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



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

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

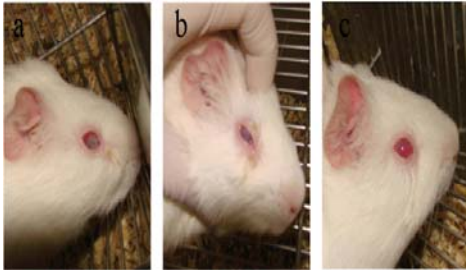
جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از روش دنا توره و بافرهای شستشو دهنده C و D و بافر ره سازی E حاوی اوره ۸ مولار و ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار استفاده شد. خروجی های حاصل از ستون جمع آوری و با SDS-PAGE بررسی شد که نتایج آن در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. همان طور که در تصویر دیده می شود پروتئین نوترکیب با خلوص بالایی در خروجی ستون حاصل از بافر اوره ۸ مولار حاوی ایمیدازول وجود دارد.

تایید پروتئین نوترکیب

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

تهیه نانوذرات کیتوسان و برآورد ظرفیت بارگذاری پروتئین

نانوذرات کیتوسان به روش ژله ای شدن یونی تهیه شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات به دست آمده در شکل ۲ آورده شده است. اندازه نانوذرات کمتر از ۴۵۰ نانومتر تعیین شد. نتایج دستگاه DLS در تصویر شماره ۳ نیز تولید نانوذرات کیتوسانی با میانگین اندازه ۴۱۸ نانومتر را نشان داد. اندازه نانوذرات قبل از مجاور سازی با پروتئین نوترکیب ۱۹۵ نانومتر بود. پتانسیل زتای نمونه پس از بارگذاری پروتئین نوترکیب به ۶/۱۰+ رسید. شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده ۰/۱۸۲ بود. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات کیتوسان پس از گذشت ۴۸ ساعت به ۹۸ درصد رسید. محلول روئی مربوط به رها



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

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

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

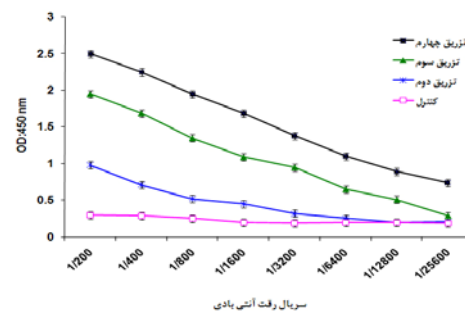
(c) ایجاد محافظت در برابر تهاج باکتری شیگلا در چشم خوکیچه ایمن شده به روش خوراکی. علائمی از بروز عفونت دیده نشد.

بررسی مقاومت خوکیچه های ایمن و غیر ایمن با تست سرنی

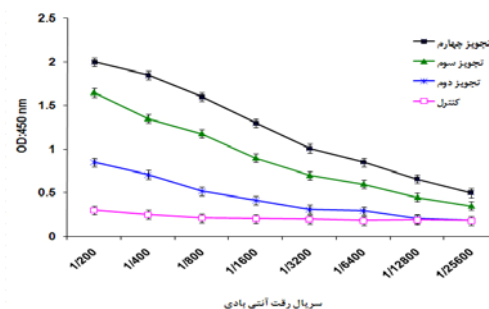
با انجام تست سرنی بررسی مقاومت حیوان نسبت به شیگلا فلکسنری ۲۴ ساعت بعد از آلودگی صورت گرفت. همان طور که در تصویر شماره ۶ آورده شده است، بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت، مشاهده شد که چشم های خوکیچه های کنترل، دچار عفونت شده که نشان از تاثیر باکتری شیگلا بر روی آن ها بوده و این عفونت به صورت یک لایه شفاف بعد از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

بحث

دست آمده از تیتراژ آنتی بادی نشان می دهد که در حیوان های ایمن شده، تیتراژ آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ($p < 0.01$) بود. در هر مرحله از تزریق، شاهد افزایش تیتراژ آنتی بادی بودیم؛ به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۲/۵ بود. تصویر شماره ۵ نیز بیانگر این است که تجویز خوراکی نانوذرات کیتوسان حاوی آنتی ژن نیز همانند گروه قلبی، منجر به افزایش تیتراژ آنتی بادی در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتراژ آنتی بادی نشان می دهد که در خوکیچه های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی ژن، تیتراژ آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ($p < 0.01$) بود.



تصویر شماره ۴: تیتراژ آنتی بادی تولید شده در خوکیچه پس از تزریق نانوذرات واجد پروتئین نو ترکیب. تیتراژ آنتی بادی در هر مرحله از تجویز نانوذرات افزایش یافته است. افزایش تیتراژ آنتی بادی در هر مرحله تفاوت معنی داری با مرحله قبل داشته است.



تصویر شماره ۵: تیتراژ آنتی بادی تولید شده در خوکیچه پس از تجویز خوراکی نانوذرات واجد پروتئین نو ترکیب. تیتراژ آنتی بادی در هر مرحله از تجویز نانوذرات افزایش یافته است. افزایش تیتراژ آنتی بادی در هر مرحله تفاوت معنی داری با مرحله قبل داشته است.

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

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

شیگلا دارای پلاسمید ۲۰۰ هزار جفت بازی است که حضور آن برای تهاجم شیگلا به سلول‌های اپیتلیال کولون ضرورت دارد. در واقع از مهم ترین عوامل ویرولانسی باکتری، آنتی‌ژن‌های تهاجم پلاسمید هستند. در مواجهه باکتری با سلول‌های اپیتلیال، پروتئین‌هایی از جمله IpaB و IpaC که در اتصال و تهاجم باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال نقش دارند، ترشح می‌شوند (۳). در سال ۲۰۰۵ Swapan نشان داد که از پروتئین‌های تخلیص شده شیگلا، تنها IpaC قابلیت تهاجم در محیط آزمایشگاهی را دارد (۲۸).

پروتئین IpaC به دلیل دارا بودن نواحی اپی توپی قوی به عنوان ایمونوژن مطرح شده است (۲۹). با توجه به مکانیزم عمل باکتری و هم چنین منشا شروع بیماری در روده، ما در این تحقیق جهت ایجاد ایمنی مخاطی بر آن شدیم که از نانوذرات به عنوان حامل برای انتقال خوراکی پروتئین نوترکیب IpaC به روده استفاده کنیم. برای تجویز و ارائه ایمونوژن‌های نوترکیب زیر واحدی، استفاده و به کارگیری ادجوانت‌های موثر و یا حامل‌ها که سبب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی بدن شود، لازم و ضروری می باشد. ر این راستا، نانو تکنولوژی و توسعه واکنش‌های مبتنی بر نانو حامل‌ها به دلیل ایجاد ایمنی موثرتر از طریق هدف گیری بهتر سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن و نیز تحریک پاسخ‌های ایمنی در سطح سلولی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به علاوه توجه محققین به راه‌های تجویز واکنش به منظور القای هر دو ایمنی سیستمیک و مخاطی علیه پاتوژن نیز متمرکز شده است. بنابراین از طریق انتخاب آگاهانه سیستم‌های مبتنی بر فناوری نانو و نوع آنتی ژن و نیز مسیر تجویز واکنش، ایمن سازی و حفاظت مطلوب و بهینه علیه بیماری می تواند القا شود (۱۹).

استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر در تهیه نانوذره می تواند انتشار آهسته آنتی ژن در جایگاه مورد نظر را در یک دوره چند روزه فراهم سازد (۱۸، ۱۹). کیتوسان با منشاء طبیعی و غیرسمی با تجزیه پذیری

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

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

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

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

نتایج به دست آمده نشان داد که ظرفیت بارگذاری با افزایش غلظت پروتئین و افزایش زمان انکوباسیون از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت افزایش می‌یابد. در تحقیقات

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

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

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

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

سپاسگزاری

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

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

References

- Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. *Jpn J Infect Dis.* 2014; 67(2): 78-85.
- Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 2014; 169(2-3): 205-212.
- Malaei F, Hesaraki M, Saadati M, Ahdi AM, Sadraeian M, Honari H, et al. Immunogenicity of a new recombinant IpaC from *Shigella dysenteriae* type I in guinea pig as a vaccine candidate. *Iran J Immunol.* 2013; 10(2): 110-117.
- Carayol N, Tran Van Nhieu G. Tips and tricks about Shigella invasion of epithelial cells. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16(1): 32-37.
- The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(4): 235-250.
- Schuch R, Maurelli AT. The mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri* requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. *Infect Immun.* 1999; 67(4): 1982-1991.
- Lee JH, Park H, Park YH. Molecular mechanisms of host cytoskeletal rearrangements by *Shigella* invasins. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(10): 18253-1866.
- Yang SC, Hung CF, Aljuffali IA, Fang JY. The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella* spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. *Microbiol Res.* 2015; 181: 43-51.
- Roehrich AD, Guilloso E, Blocker AJ, Martinez-Argudo I. *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol Microbiol.* 2013; 87(3): 690-706.
- Heine SJ, Franco-Mahecha OL, Chen X, Choudhari S, Blackwelder WC, van

- Roosmalen ML, et al. Shigella IpaB and IpaD displayed on *L. lactis* bacterium-like particles induce protective immunity in adult and infant mice. *Immunol Cell Biol.* 2015; 93(7): 641-652.
11. Pasetti MF, Jakub K. Simon, Marcelo B. Szein, Myron M Levine. Immunology of Gut Mucosal Vaccines. *Immunol Rev.* 2011; 239(1): 125-148.
 12. Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-McNair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, et al, Broadly protective Shigella vaccine based on type III secretion apparatus proteins. *Infect Immun.* 2012; 80(3): 1222-1231.
 13. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(8): 592-605.
 14. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD. Mucosal vaccine design and delivery. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:17-46.
 15. Van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliver Rev.* 2001; 52(2):139-144.
 16. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010; 31(13): 3657-3666.
 17. O Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods.* 2006;40(1):10-19.
 18. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014; 32(3): 327-337.
 19. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3:13.
 20. Badawy M, Rabea E. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int J Carbohydr Chem.* 2011;2011:1-29.
 21. Prego C, Garcia M, Torres D, Alonso M. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Release.* 2005;101(1-3):151-162.
 22. Kang ML, Cho CS, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(6):857-865.
 23. Koppolu B, Zaharoff DA. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. *Biomaterials.* 2013; 34(9):2359-2369.
 24. Koppolu BP, Smith SG, Ravindranathan S, Jayanthi S, Suresh Kumar TK, Zaharoff DA. Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery. *Biomaterials.* 2014; 35(14): 4382-4389.
 25. Mitra A, Dey B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian J Pharm Sci.* 2011 ; 73(4):355-366.
 26. Baranvand M, Honari H. Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice. *J Sabzevar Univ Med Sci.* 2016;23(4):688-697.
 27. Camacho AI, Irache JM, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Gamazo C. Nanoparticle-based vaccine for mucosal protection against Shigella flexneri in mice. *Vaccine.* 2013; 31(32): 3288-3294.
 28. Niyoyi SK. Shigellosis. *J Microbiol.* 2005; 43(2): 133-143.

29. Khaloiee F, Pourfarzam P, Rasooli I, Amani J, Nazarian S, Mousavi S. (2013). In silico analysis of chimeric recombinant immunogen against three diarrhea causing bacteria. *J Cell Mol Res.* 2013; 5(2): 65-74.
30. Taranejoo S, Janmaleki M, Rafienia M, Kamali M, Mansouri M. Chitosan microparticles loaded with exotoxin A subunit antigen for intranasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study. *Carbohydr Polym.* 2011;83(4):1854-1861.
31. Ibezim E, Andrade C, Marcia C, Barretto B, Odimegwu D, de Lima F. Ionically Cross-linked Chitosan/ Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine. *Ibnosina J Med Biomed Sci.* 2011; 3(3): 77-88.
32. Tsai M, Bai SW, Chen RH. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydr Polym.* 2008; 71(3): 448-457.
33. Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Ramandi M. Chitosan-Based Intranasal Vaccine against Escherichia coli O157: H7. *Iran biomed j.* 2016;20(2):97-108.
34. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R, Ostad SN. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1851-1863.
35. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems- A review (Part 1). *Trop J Pharm Res.* 2013; 12 (2): 255-264.
36. Atabi F, Mousavi SL, Hashemi M, Yaghmaei P. Designing and Comparison of Two Types of Chitosan Nanogels for Doxorubicine Delivery. *Pathobiol Res.* 2015;18(2):53-67.(persian).
37. Shamsavari S, Vasheghani-Farahani E, Ardjmand M, Abedin Dorkoosh F. Modeling of Drug Released from Acyclovir Nanoparticles Based on Artificial Neural Networks. *Lett Drug Des Discov.* 2014; 11(2): 174-183.