نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۱): ۱۰۳-۱۱۲.

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی پیامد واکسیناسیون با نانوذره نیوکاسل بر پایه کیتوزان همراه با یاور مولکولی هموکینین-۱

احمدرضا محمدی[۱*]، عبدالکریم زمانی‌مقدم[۲]، شهلا شاهسوندی[۳]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج- ایران.

دریافت: ۳۰ شهریورماه ۹۹ **پذیرش:** ۲۴ آذرماه ۹۹

چکیده

انتشار جهانی ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) در طیور ضرورت بهبود برنامه‌های ایمن‌سازی علیه این ویروس را برجسته کرده است. در این پژوهش تجربی اثر هموکینین-۱ (HK-1) به‌عنوان یاور زیستی بر القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیه نانوذره NDV بر پایه کیتوزان ارزیابی شده است. تعداد شصت قطعه جوجه SPF به‌طور مساوی در شش گروه تقسیم شدند. گروه‌های کنترل شامل دریافت‌کننده‌ی سرم فیزیولوژی، آنتی‌ژن غیر فعال NDV، و نانوذره کیتوزان و گروه‌های تیمار شامل دریافت‌کننده‌ی آنتی‌ژن غیر فعال NDV با یاور روغنی، نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، و نانوذره NDV همراه با HK-1 بودند. بر اساس گروه‌بندی، جوجه‌ها نمونه را با قطره چشمی در یک‌روزگی دریافت کردند به‌جز گروهی که آنتی‌ژن غیر فعال دارای یاور روغنی را به‌روش زیرجلدی دریافت کرد. نمونه‌های سرم در هفته‌های۲، ۴، و ۶ پس از تزریق، جمع‌آوری شده و پاسخ ایمنی هومورال با آزمایش ممانعت از آگلوتیناسیون (HI) و تحریک پاسخ ایمنی سلولی با واکنش حساسیت بازوفیل‌های جلدی (CBH) بررسی شد. یافته‌ها بیانگر این است که تجویز همزمان HK-1 با نانوذره NDV سبب بالا رفتن میانگین عیار آنتی‌بادی HI نسبت به گروهی که نانوذره را به تنهایی دریافت کردند می‌شود. این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). داده‌های آزمایش CBH بیانگر تفاوت معنی‌دار در القای پاسخ ایمنی سلولی در گروه‌های دریافت‌کننده واکسن NDV دارای یاور روغنی، نانوذره به تنهایی و ترکیب نانوذره و HK-1 با گروه‌های کنترل بود (P<۰/۰۰۱). بر اساس داده‌ها، نانوذره کیتوزان همراه با یاور HK-1 توان القای پاسخ ایمنی هومورال و پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی نسبت به NDV را دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری نیوکاسل، نانوذره، هموکینین-۱، کیتوزان، پاسخ ایمنی.

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار مسری و کشنده‌ی پرندگان اهلی و وحشی با انتشار جهانی است و دستگاه‌های تنفسی، گوارشی، عصبی و تولید مثلی پرندگان را درگیر می‌کند. میزان مرگ و میر تا ۱۰۰ درصد در جوجه‌های واکسینه‌نشده برآورد شده است. این بیماری به‌وسیله ویروس بیماری نیوکاسل (Newcastle disease virus; NDV) ایجاد می‌شود که به خانواده پارامیکسوویریده و زیر خانواده پارامیکسوویرینه تعلق دارد و در جنس آولاویروس قرار می‌گیرد. بر اساس مطالعات پاتوژنیک OIE، جدایه‌های NDV از روی نشانه‌های بیماری در جوجه‌ها در پنج پاتوتیپ تقسیم می‌شوند (۲۰).

ویریون NDV چندشکلی، پوشش‌دار به قطر ۱۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر است و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای آن با اندازه ۱۳ تا ۱۹ کیلوباز، شش ژن شامل نوکلئوپروتئین (NP)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتینین- نورآمینیداز (HN) و RNA پلی مراز (L) را رمزدهی می‌کند. (۵و۶). NDV توسط گلیکوپروتئین‌های سطحی HN و F به سیالیک اسید سلول‌های اپی تلیوم تنفسی میزبان متصل می‌شود. شیوه آلودگی ویروس در ابتدا مستقل از pH رخ می‌دهد و در نتیجه آن پوشش ویروس با غشای سلول میزبان ادغام می‌گردد، سپس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: arm531@gmail.com

نوکلئوکپسید ویروس به‌داخل سیتوپلاسم سلول، جایی‌که RNA ویروسی رشته منفی برای تولید mRNA ساختاری با کمک RNA پلی‌مراز وابسته به RNA ویروسی، نسخه‌برداری می‌شود، وارد می‌گردد. پروتئین‌های مورد نظر ترجمه می‌شوند و به‌وسیله‌ی سامانه سلولی میزبان تا می‌خورند. هنگامی‌که سامانه به ابتدای اولین پروتئین نسخه‌برداری شده (N) می‌رسد، RNA ژنومیک (که به‌صورت رشته منفی است) برای ساختن RNA ژنومی رشته منفی جدید به الگو آنتی‌ژنومی رشته مثبت تبدیل می‌شود. این RNA ژنومی تازه تشکیل‌شده با پروتئین‌های N، P و L پوشیده شده و به شکل نوکلئوکپسید درمی‌آیند که در ادامه با پروتئین M و گلیکوپروتئین‌های سطحی سرهم‌بندی‌شده و از سلول میزبان خارج می‌شوند (۱۱).

به‌علت انتشار سریع بیماری نیوکاسل از طریق تبادلات تجاری گسترده در صنعت مرغداری، استفاده از واکسن برای پیش‌گیری ضروری است. اولین واکسن‌ها برای کنترل NDV از دهه ۱۹۴۰ شامل ویروس غیر فعال شده با فرمالین (۸) ویروس غیر فعال شده با بتا-پروپیولاکتون (۲۶)، ویروس زنده (۱۰) و ویروس تخفیف حدت یافته (۳) با هدف تولید پاسخ ایمنی قوی به آنتی‌ژن‌های تجویز -که قادرند حفاظت طولانی‌مدت علیه عفونت ایجاد کنند- ابداع شدند. واکسن‌های موجود علیه NDV، شامل دو دسته غیر فعال و تخفیف حدت یافته هستند. با توجه به اهمیت واکسیناسیون در پیش‌گیری و کنترل این بیماری و نیز با هدف کاهش تلفات و القای ایمنی مناسب در طول دوره پرورش طیور، طراحی و توسعه واکسن‌های جدید به‌عنوان یک حوزه تحقیقاتی بسیار فعال از دهه ۶۰ تاکنون ادامه دارد. این پژوهش‌ها روی دو جنبه تولید تولید یاور (اجوان) بی‌ضرر و تولید واکسن‌های نانوذره متمرکز شده‌اند. یاورها ترکیبات هتروژنی هستند که سبب افزایش ایمنی اکتسابی علیه یک آنتی‌ژن می‌شوند. پایداری ساختار اپی‌توپی، رهاسازی آهسته آنتی‌ژن، افزایش توان آنتی‌ژن‌های ضعیف، افزایش قدرت و استمرار پاسخ ایمنی، کاهش مقدار مصرف آنتی‌ژن، داشتن حداقل اثرات جانبی، دفع آسان از بدن و همچنین بهره‌مندی ازقابلیت حذف زیستی، مزایای یک یاور مناسب، هستند (۱۲). هموکینین -۱ (HK-1) آخرین پروتئین شناخته‌شده از خانواده تاچی‌کنین است که به‌طور غالب در بافت‌های غیر عصبی بیان شده و وظیفه آن گسترش رده سلول‌های لنفوییدی است (۱۵). این پروتئین سلولی با فعال کردن و بلوغ سلول‌های B نقش مهمی در تحریک پاسخ ایمنی دارد (۱۵). استفاده از ریزذره رویکرد نوینی برای بهبود اثر ایمن‌بخشی واکسن است که نه فقط سبب بهبود پایداری آنتی‌ژن و توان ایمنی‌زایی آن می‌شود، بلکه روند رهاسازی و تحویل آن به سلول هدف را هم تسهیل می‌کند (۱۶).

مخاط دستگاه تنفسی راه اصلی ورود NDV به بدن میزبان است. بافت‌های لنفوئیدی ویژه‌ای در موکوس بینی وجود دارد که از مکان‌های اصلی آغاز پاسخ‌دهی به این عامل بیماری‌زا هستند، به همین دلیل استفاده از غشای مخاطی به‌دلیل داشتن سطح گسترده برای رساندن آنتی‌ژن واکسن و پاسخ‌دهی سریع بسیار با اهمیت است (۱۶). فرمولاسیون واکسن با نانوذره بر پایه افزایش توان ایمنی استوار است؛ زیرا آنتی‌ژن پوشش داده شده با نانوذره با هم توسط سلول ایمنی بلعیده می‌شوند؛ در نتیجه عرضه بیشتر آنتی‌ژن به سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن (APC) شامل سلول‌های دندریتیک (DC) و ماکروفاژها و افزایش پردازش آن در این سلول‌ها سبب فعال کردن سامانه ایمنی می‌شود (۱۷). در این پژوهش القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیه آنتی‌ژن غیر فعال NDV تهیه شده بر پایه کیتوزان به‌عنوان کاندید واکسن همراه با یاور مولکولی HK-1 در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا (SPF) ارزیابی شد.

مواد و روش کار

این مطالعه تجربی در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و با مشارکت دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد انجام گردید. برای تهیه آنتی‌ژن ویروس نیوکاسل از بذر NDV سویه لاسوتا مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده شد. تکثیر ویروس در تخم مرغ جنین‌دار SPF طبق پروتکل استاندارد OIE انجام شد (۲۰)؛ پس از تزریق، تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷ °C و رطوبت ۶۵ درصد به‌مدت یک هفته نگه‌داری شدند. تخم مرغ‌ها روزانه بررسی شده و در پایان این مدت، تخم

مرغ‌ها از انکوباتور خارج شده و مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای ۴ °C نگه‌داری شدند، سپس در زیر هود لامینار کلاس II مایع آمینوآلانتوئیک تخم مرغ‌ها برداشت شده و در ظرف استریل جمع‌آوری شدند. بقایای جامد با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه برداشته شد وآلودگی احتمالی میکروبی و قارچی آن از نظر سترونی بررسی شد.

برای تعیین عیار ویروس، مقدار ۰/۱ ml از رقت‌های سری 10^{-1} تا 10^{-9} از NDV به‌داخل حفره آلانتوئیک ۵ عدد تخم مرغ SPF جنین‌دار ۱۰روزه تلقیح شد. پس از ۷ روز نگه‌داری تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷°C، عیار ویروس با روش Spearman-Karber محاسبه شد (۲۱).

برای غیر فعال‌سازی آنتی‌ژن ویروس از محلول ۰/۱ مولار باینری اتیل انیمین (BEI) تهیه شده به غلظت ۰/۰۰۴ مولاریته در دمای ۳۰ °C و به‌مدت ۲۱ ساعت در مجاورت آنتی‌ژن ویروس قرارداده شد تا فرآیند غیر فعال شدن کامل گردد. پس از سپری شدن این مدت، باقی‌مانده BEI با افزودن تیوسولفات سدیم (Merck) هیدرولیز شد (۱). برای حصول اطمینان از غیر فعال شدن، ۰/۲ ml از آنتی‌ژن به ۵ عدد تخم مرغ جنین‌دار عاری از عوامل بیماری‌زا (SPF) ۱۰روزه تزریق گردید و تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. این آزمایش در سه مرحله (پاساژ) متوالی انجام شد و بار آخر پس از انکوباسیون به‌مدت ۵ روز، حضور یا عدم حضور ویروس با آزمایش آگلوتیناسیون بررسی شد (۲۸).

نانوذرات کیتوزان با روش ژله شدن یونی در حضور یون‌های منفی‌تری پلی فسفات (TPP) آماده شدند (۱۴). به اختصار، کیتوزان (Sigma-Aldrich) در استیک اسید (Merck) ۱٪ حل شد و نسبت‌های حجمی متفاوت کیتوزان/TPP تهیه گردید. پس از سانتریفیوژ، بخش رویی حاوی نانوذرات کیتوزان جمع‌آوری شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات شامل اندازه، بار سطحی و شاخص پراکندگی در نسبت‌های حجمی مختلف کیتوزان/TPP با دستگاه Malvern Zetasizer Nano ZS (Worcestershire, UK) در طول موج ۶۳۳ nm تعیین شد. شدت پراکندگی در دمای ۲۵ °C و ضریب شکست ۱/۳۳۵ اندازه‌گیری شد. برای تهیه نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، مقدار ۰/۵ درصد حجمی آنتی‌ژن غیر فعال ویروس به محلول ۱ درصد حجمی کیتوزان افزوده شد. توین ۸۰ (Sigma-Aldrich) در غلظت ۰/۰۱ درصد حجمی به‌عنوان امولسیون‌کننده اضافه شد، سپس TPP به نسبت ۰/۱ درصد (W/V) به‌طور جداگانه در ۸۰ ml آب مقطر حل شد به محلول کیتوزان/ آنتی‌ژن ویروس افزوده شد. مخلوط در دمای آزمایشگاه هم زده شد تا نانوذرات تشکیل شوند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مرفولوژی نانوذره NDV بر پایه کیتوزان مانند روش ذکر شده در بالا ارزیابی گردید (۱۹).

برای تهیه پلاسمید HK-1، ریه سه جوجه SPF پس از برداشت در محلول استریل سرم فیزیولوژی (PBS) هموژن شده و RNA با کیت High Pure RNA Isolation مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Roche) استخراج شد. با نرم‌افزار Oligo پرایمرهای اختصاصی برای ژن HK-1 به طول ۲۳۱bp طراحی شد به‌گونه‌ای که دارای بخش رمز-دهنده موتیف حفظ شده Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-phe-Tyr-Gly-Leu-Met باشد. برای کلون‌سازی ژن در وکتور pcDNA3.1، جایگاه شناسایی آنزیم‌های برش‌دهنده در دو انتهای '۵ توالی پرایمرها در نظر گرفته شد. با بررسی جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودگر در توالی ژن و جایگاه‌های موجود در MCS وکتور، جایگاه برش آنزیم *Nco*I در ابتدای پرایمرهای رفت و آنزیم *Bam*HI در انتهای پرایمر برگشت قرار داده شد:

HK-1F: 5′-GGATCCCTTGCCCTGTTTCTCCTGAT-3′
HK-1R: 5′-CCATGGCTTCCCCATCAGACCGTAAT-3′

ژن HK-1 طی واکنش یک‌مرحله‌ای RT-PCR با کیت (Next generation of premix, Intron, Korea) تکثیرشده و محصول PCR با کیت PCR product extraction (GeneAll, Korean) خالص شد، سپس DNA خالص‌شده با شوک حرارتی در وکتور pcDNA3.1 (Invitrigen) کلون شد (۴ و ۴۰).

در برنامه ایمن‌سازی، تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF به‌طور تصادفی در شش گروه ۱۰ قطعه‌ای شامل گروه‌های کنترل و تیمار دسته‌بندی شدند. موارد اخلاقی نگه‌داری جوجه‌ها در دوره‌ی آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام ایمن‌سازی و

خون‌گیری به‌طور کامل رعایت شد. گروه‌های مورد آزمایش عبارت بودند از:

گروه ۱ (کنترل منفی): بدون دریافت آنتی‌ژن و یاور، دریافت یک قطره PBS در یک‌روزگی به‌روش قطره چشمی.

گروه ۲ (کنترل آنتی‌ژن غیر فعال NDV): دریافت یک قطره از آنتی‌ژن غیر فعال در یک‌روزگی به روش قطره چشمی.

گروه ۳ (کنترل نانوذره کیتوزان): دریافت یک قطره از نانوذره کیتوزان در یک‌روزگی به روش قطره چشمی.

گروه ۴ (تیمار آنتی‌ژن غیر فعال NDV با یاور روغنی): دریافت یک دوز آنتی‌ژن غیر فعال NDV و یاور روغنی ISA70 در یک‌روزگی به روش زیرجلدی.

گروه ۵ (تیمار نانوذره NDV بر پایه کیتوزان): دریافت یک قطره نانوذره NDV بر پایه کیتوزان در یک-روزگی به روش قطره چشمی.

گروه ۶ (تیمار نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1): دریافت یک قطره نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1در یک‌روزگی به روش قطره چشمی. برای این منظور، مقدار ۰/۱ درصد حجمی از HK-1 به مخلوط آنتی‌ژن غیر فعال NDV و کیتوزان افزوده شد. نانوذره NDV حاوی یاور مولکولیHK-1 به‌گونه‌ای تهیه شد که هر قطره آن معادل یک دوز واکسن و قابل تجویز به‌صورت قطره چشمی باشد.

به‌منظور ارزیابی القای پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه NDV، در هفته‌های دوم، چهارم، و ششم پس از تجویز از تمامی جوجه‌های هر گروه از ورید بال خون‌گیری انجام شد. پس از لخته شدن، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم‌های به‌دست آمده تا انجام آزمایش در دمای ۲۰- °C قرار داده شدند. میزان القای آنتی‌بادی اختصاصی علیه NDV در نمونه‌های سرمی اخذ شده از گروه‌های مختلف جوجه در زمان‌های تعیین‌شده به روش سرولوژی HI ارزیابی شد.

برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی از واکنش حساسیت بازوفیل‌های جلدی (Cutaneous basophil hypersensitivity; CBH) که برابر با شاخص پا (Foot index; FI) و یا تورم شبکه پا (Toe web swelling; TWS) در نظر گرفته می‌شود استفاده شد. برای تعیین این شاخص از هر تیمار ۵ جوجه در سن ۳۷روزگی انتخاب شد، سپس پای چپ و راست جوجه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ تمیز و ضخامت پرده پا برای هر دو پای چپ و راست بین انگشت سه و چهار با میکرومتردیجیتال ووگل (Vogel,Germany) با دقت ۰/۰۱ mm اندازه‌گیری و ثبت شد. به پای راست جوجه‌ها مقدار ۰/۱ ml از (محلول ۱۰۰µl/ml) محلول نمکی ۰/۸۵ ٪ استریل فیتوهماگلوتنین- پی (PHA-P) (Sigma-Aldrich) به-صورت داخل پوستی تزریق گردید و به همین روش به پرده بین انگشت سه و چهار پای چپ جوجه‌ها، ۰/۱ ml PBS تزریق شد. تزریق PBS به پرده پای چپ جوجه، برای تعیین میزان التهاب احتمالی ناشی از اثر تزریق است. پاسخ حساسیت بازوفیلی یا شاخص ضخامت پرده پا، با محاسبه تفاوت بین ضخامت پوست پرده پا پیش از تزریق و پس از آن (۲۴ ساعت) تعیین می‌شود. ضخامت پوست با دستگاه کولیس میکرومتر دیجیتال با دقت یک‌صدم میلی‌متر محاسبه شد. شاخص ضخامت پرده پا از فرمول زیر تعیین شد:

FI =(post-PHA - pre-PHA) - (post-PBS - pre-PBS)

این شاخص با تفاوت افزایش ضخامت پرده بین انگشت‌های سوم و چهارم پایی که به آن PHA-P تزریق شده نسبت به پیش از تزریق نسبت به پای دیگر که PBS تزریق شده است، به‌دست می‌آید (۷ و ۳۱).

براساس بسته آماری SPSS statistics 22 و آزمون Oneway-Duncan داده‌های به‌دست آمده مربوط به القا پاسخ ایمنی در گروه‌های مختلف با در نظر گرفتن سطح آماری (P<۰/۰۰۱) پردازش شد.

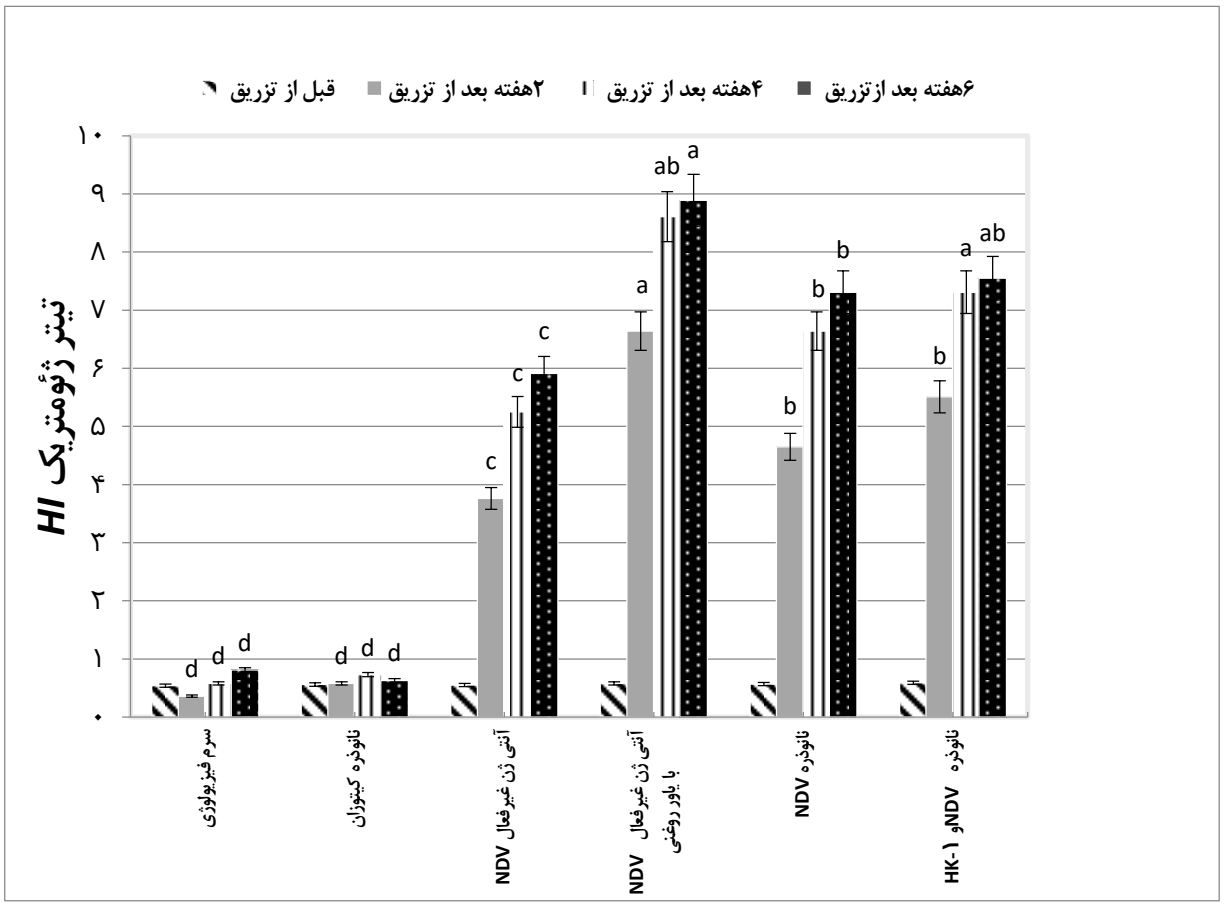
نتایج

سترونی آنتی ژن NDV با کشت آن در محیط‌های اختصاصی ارزیابی شد. در طول دوره انکوباسیون و انتهای آن، تمام کشت‌ها از نظر عوامل باکتریایی و قارچی منفی بودند و هیچ‌گونه رشدی مشاهده نگردید. عیار ویروس با روش‌های هماگلوتیناسیون و Spearman-Karber به ترتیب برابر با HA= 10 و $EID_{50}/ml= 10^{9.67}$ محاسبه شد. پس از غیر فعال‌سازی آنتی‌ژن ویروس با BEI، حضور یا عدم حضور ویروس با آزمایش آگلوتیناسیون تأیید شد.

NDV زنده به‌دلیل خاصیت هماگلوتیناسیون پروتئین HN خود، می‌تواندگلبول‌های قرمز خون را آگلوتینه کند. در روند غیر فعال‌سازی آنتی‌ژن NDV پدیده آگلوتیناسیون مشاهده نشد، این بدان‌معنی است که آنتی‌ژن تهیه‌شده به‌خوبی غیر فعال شده است.

در تهیه و ارزیابی نانوذرات NDV بر پایه کیتوزان، بر اساس آنالیزهای اندازه، ۱۹۶ نانومتر و پتانسیل زتا ۱۳/۶ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی نانوذرات ۰/۱۷۵، نسبت حجمی ۲:۱: ۰/۵ از کیتوزان/TPP و آنتی‌ژن غیر فعال NDV گزینه مناسب برای سنتز نانوذرات بود. داده‌های تصویربرداری میکروسکوپی بیانگر ساختار هموژن و کروی شکل نانوذرات تهیه شده بود. داده‌های طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف‌سنجی FTIR تأییدکننده شکل-گیری نانو ذرات و میان‌کنش بین گروه‌های فسفات TPP و گروه‌های آمین‌کیتوزان با آنتی‌ژن بود.

ارزیابی القای پاسخ ایمنی هومورال در گروه‌های مختلف در نمودار ۱ آورده شده است. نتایج آزمایش سرولوژی نمونه‌های سرم نشان داد در جوجه‌های گروه‌های کنترل دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی و دریافت‌کننده نانوذره کیتوزان، آنتی‌بادی اختصاصی علیه NDV تعیین نشده است. در گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیر فعال NDV القا آنتی‌بادی اختصاصی علیه این ویروس مشاهده شد که در مقایسه با دیگر گروه‌های کنترل، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$). افزایش چشم‌گیر عیار آنتی‌بادی در جوجه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیر فعال دارای یاور روغنی، دریافت‌کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان و دریافت‌کننده نانوذره به همراه یاور مولکولی HK-1 در نوبت‌های سه‌گانه پس از تجویز مشاهده شد.



نمودار ۱- میانگین عیار آنتی بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل در گروه‌های مورد مطالعه در نوبت های سه گانه پس از تجویز

[a,b,c,d] حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت بسیار معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).

براساس داده‌های نمودار ۱، افزودن یاور مولکولی HK-1 به نانوذره NDV نسبت به گروهی که نانوذره به تنهایی دریافت کردند، سبب بالا رفتن میانگین عیار آنتی-بادی در هر نوبت خون‌گیری شد. این تفاوت در نوبت دوم خون‌گیری؛ یعنی چهار هفته پس از تجویز مشهودتر بود و از ۶/۰ در گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند به ۷/۰ در گروهی که ترکیب نانوذره و یاور را دریافت کردند، متفاوت بود. این میزان نشان‌دهنده وجود یک لگاریتم اختلاف بین این دو گروه است و در پاسخ ایمنی هومورال بین گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند و گروهی که ترکیب نانوذره و یاور را دریافت کردند، تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) را نشان می‌دهد، اما در پایان دوره آزمایش گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیر فعال دارای یاور روغنی (گروه ۴) نسبت به سایر گروه‌های تیمار عیار آنتی-بادی بیشتری داشت و میانگین آن در پایان دوره‌ی مطالعه به ۸/۰ رسید. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$).

تحریک پاسخ ایمنی سلولی در گروه‌های مختلف با آزمایش CBH و تزریق PHA-P ارزیابی شد. نتایج آزمایش نشان داد مقدار FI در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیر فعال NDV دارای یاور روغنی، نانوذره NDV به تنهایی و ترکیب نانوذره و یاور نسبت به گروه‌های کنترل افزایش زیادی داشته است (جدول ۱). این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$). مقدار FI در جوجه‌های تیمار شده با نانوذره NDV و HK-1 نسبت به سایر گروه‌های تیمار افزایش بیشتری داشته و میانگین آن در پایان دوره مطالعه به ۱/۶۷ رسید.

جدول ۱- میزان تحریک ایمنی سلولی علیه ویروس بیماری نیوکاسل در گروه‌های مورد مطالعه بر اساس میزان تورم بازوفیلی جلدی

گروه	نمونه دریافتی	Foot index (CBH) /میلی متر
۱	سرم فیزیولوژی	۰/۱۱۶ ± ۰/۰۲۳[d]
۲	آنتی‌ژن غیر فعال NDV	۰/۱۲۴ ± ۰/۰۳۰[d]
۳	نانوذره کیتوزان	۰/۱۳۴ ± ۰/۰۳۰[d]
۴	آنتی‌ژن غیر فعال NDV با یاور روغنی	۱/۲۴۰ ± ۰/۱۳۰[c]
۵	نانوذره NDV بر پایه کیتوزان	۱/۴۸۴ ± ۰/۲۰۱[b]
۶	نانوذره NDV بر پایه کیتوزان و HK-1	۱/۶۷۰ ± ۰/۱۰۷[a]

[a,b,c,d] حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت بسیار معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$)

بحث

از دو دهه گذشته طراحی واکسن‌های غیر فعال با استفاده از حامل‌های نانوذره مورد توجه قرار گرفته است که برای بهبود جذب آنتی‌ژن فاگوسیت، سیستم‌های تحویل بر اساس پلی مرهای سنتزی یا طبیعی برای کنترل مقدار آنتی‌ژن و سرعت رهایش آن به‌کار برده می‌شوند. برخی از قابلیت‌های این واکسن‌ها عبارتند از: سهولت تجویز از راه سطوح مخاطی چشم یا بینی، خاصیت آنتی‌ژنی بالا، توانایی القا توأم ایمنی سلولی و ایمنی هومورال و افزایش دوره زمانی پاسخ‌های ایمنی (۸ و ۳۶). این واکسن‌ها با چالش رقیق شدن در ترشحات مخاطی، گرفتار شدن در سد چسبنده موکوس، تجزیه و تخریب توسط آنزیم‌های سلولی مواجه هستند؛ بنابراین برای دست‌یابی به پاسخ‌های ایمنی قوی، واکسن‌های غیر فعال که به روش مخاطی استفاده می‌شوند به فرمولاسیون مناسب شامل سیستم تحویلی و یاور نیاز دارند. این پژوهش با هدف ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی پیامد واکسیناسیون با نانوذره NDV بر پایه کیتوزان همراه با یاور مولکولی HK-1 در جوجه‌های SPF انجام شد. نتایج آزمایش سرولوژی HI نشان داد؛ اگرچه میانگین آنتی‌بادی اختصاصی علیه NDV در جوجه‌های تیمار شده با نانوذره NDV همراه با HK-1 نسبت به گروهی که آنتی‌ژن غیرفعال دارای یاور روغنی دریافت کرده بودند، کمتر بود اما نسبت به گروه‌های کنترل در

نوبت‌های سه‌گانه پس از تجویز افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) داشت و میانگین آن در پایان دوره مطالعه به ۷/۱ رسید. امکان تحریک پاسخ ایمنی سلولی با آزمایش CBH و تزریق PHA-P ارزیابی شد. نتایج این آزمایش مشابه با داده‌های ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال بود و در دو گروه دریافت‌کننده نانوذره NDV با HK-1 و دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیر فعال دارای یاور روغنی نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش چشم‌گیری داشت. این تفاوت بر اساس آزمون Oneway-Duncan معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).

نتایج مشابه در پژوهش‌های دیگر نیز ارائه شده است. در پژوهش Zhao و همکاران (۳۳) نانوذرات کیتوزان حاوی ویروس زنده لاسوتا حفاظت بهتری نسبت به واکسن تخفیف حدت یافته و نیز واکسن غیر فعال NDV در جوجه‌های SPF ایجاد کرده است. نانوذرات NDV تهیه‌شده بر پایه یکی از مشتقات کیتوزان (O-2'-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride) نیز نتایج مشابهی را نشان داد (۸). نانوذرات PLGA و نیز نانوذرات بر پایه مشتق جدید کیتوزان (N-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride) حاوی DNA پلاسمیدی ژن F این ویروس نسبت به DNA واکسن به تنهایی، پاسخ‌های ایمنی سلولی، ایمنی هومورال و ایمنی مخاطی قوی‌تری ایجاد کرده و به اثر رهش پایدار رسیده‌اند (۲۷ ، ۳۲ و۳۵). در مطالعه Zhao و همکاران (۳۴) نشان داده شد در جوجه‌هایی که DNA پلاسمیدی پوشش داده شده در نانوذره کیتوزان را دریافت کرده‌اند، آنتی‌بادی IgG و sIgA علیه NDV بیشتری تولید و تحریک لنفوسیت‌ها سبب افزایش معنی‌دار IL-2، IL-4 و IFN-γ شده است. این یافته‌ها بیانگر این است که نانوذرات پلی‌ساکاریدی می‌توانند به‌عنوان یک سیستم حامل کارآمد برای ایمن‌سازی مخاطی علیه NDV استفاده شوند. این روش واکسیناسیون دارای مزیت‌هایی مانند سطح اپی تیلیوم پوششی وسیع با حضور میکروویلی متعدد و غشای اندوتلیال متخلل و مخاط پر عروق است که می‌تواند جذب آنتی‌ژن را تسهیل کند (۲۹).

در روند القا و تنظیم پاسخ ایمنی، آنتی‌ژن باید به بافت‌های لنفاوی ثانویه (معمولاً گره‌های لنفاوی) برسد. اغلب آنتی‌ژن‌ها توسط DCها به گره‌های لنفاوی حمل می‌شوند و پس از پردازش در APCها، اپی‌توپ‌ها را در مولکول‌های MHC به سلول‌های T ارائه می‌دهند. DCها، سلول‌های T نابالغ را بیشتر از سلول‌های B یا ماکروفاژها فعال کرده و بیشتر از APCهای دیگر آنتی‌ژن را گرفته و پردازش می‌کنند. بیشتر پژوهش‌ها بر نقش DCها در فعال‌سازی بین پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی و در راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی اکتسابی مناسب به‌ویژه در واکسیناسیون مخاطی تأکید دارند (۲ ، ۱۳ و ۳۷). واکسن‌های غیر فعال دارای مجوز مصرف علیه NDV در صنعت پرورش طیور، تهیه شده از کل پیکره ویروس و مخلوط شده با یاور روغنی هستند که به‌صورت زیرجلدی یا داخل عضلانی تجویز می‌شوند. از مزایای این نوع واکسن می‌توان به دست‌یابی به سطوح بالاتر پاسخ ایمنی هومورال و از معایب آن می‌توان به نیاز به تزریق عضلانی و زیرجلدی انفرادی و نیاز به استفاده از مقدار زیاد آنتی‌ژن اشاره کرد. (۱۸ ، ۲۰ و ۲۳). در این پژوهش برای بهینه‌سازی روش تجویز واکسن غیر فعال، از ناوذرات کیتوزان به‌عنوان سیستم تحویل آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی به روش مخاطی استفاده شد. مقایسه داده‌های پاسخ‌های ایمنی بین دو گروهی که آنتی‌ژن غیر فعال NDV و نانوذره آن را دریافت کرده بودند بیانگر این است که از آنتی‌ژن غیر فعال پوشش داده شده در نانوذره کیتوزان در القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیه آنتی‌ژن غیر فعال این ویروس در جوجه‌های SPF عملکرد مناسبی داشته است.

در طراحی نانوواکسن‌ها باید به افزایش جذب آنتی‌ژن، جلوگیری از تخریب آنتی‌ژن واکسن‌ها توسط انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک و پروتئولیتیک مانند لیزوزیم، افزایش ثبات آن، افزایش ویژگی و اختصاصی بودن برای سلول هدف و قابلیت حل شدن در محلول‌های آبی سیستم‌های حامل مانند کیتوزان که توانایی بالایی برای انتقال آنتی‌ژن دارند، توجه کرد (۱۷). برخی ترکیبات، آنتی‌ژن‌ها را در محل تجویز به دام انداخته و ذخیره مداومی از آنتی‌ژن برای APCها به‌صورت موضعی فراهم می‌کنند. این اثر دپو یا ذخیره آنتی‌ژن پیش از انتشار آن در بدن، ممکن است میزان حذف آنتی‌ژن توسط کبد را

کاهش دهد. امولسیون‌های روغنی مانند یاورهای فروند دپوهای کوتاه‌مدت (۱۰-۸ روز) که برای افزایش ایمنی مناسب هستند را شکل می‌دهند. نانوذرات دپوهای طولانی‌مدت (۱تا ۶ ماه) برای تحویل آنتی‌ژن به DCها را ایجاد کرده و مقدار مشخصی از آنتی‌ژن را به‌طور تدریجی رها می‌کنند (۱۶). Dehghan و همکاران نشان دادند که در مقایسه با ISA70، نانوذرات کیتوزان به‌طور معنی‌داری ایمنی‌زایی ویروس آنفلوانزا H9N2 غیر فعال شده را در طیور افزایش می‌دهند (۹)؛ اگرچه این بیوپلیمر به‌علت تحریک تولید سایتوکاین خواص بالقوه یاوری نیز از خود نشان می‌دهند و سبب افزایش سطح آنتی‌بادی‌های سرمی و مخاطی در پاسخ ایمنی به آنتی‌ژن‌های کمپلکس‌شده با کیتوزان می‌شود (۳۶)، اما برای تقویت و بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی به یاور نیاز دارند؛ زیرا این ترکیبات با متمرکز کردن آنتی‌ژن در محل تجمع لنفویست‌ها مدت زمان عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی را افزایش می‌دهند و از کاهش تجزیه آنتی‌ژن جلوگیری می‌کنند و با افزایش تحویل آنتی‌ژن به APCها سبب هدایت آن به‌سمت MHC و تولید بیشتر سایتوکاین‌ها می‌شوند. افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال اختصاصی پیامد استفاده از مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمن مانند HK-1 همراه با نانو ذره کیتوزان،علیه ویروس‌های بیماری‌زای طیور نیز گزارش شده است (۹ ، ۲۲ و ۲۴).

در این پژوهش، برای ارزیابی فعالیت یاوری پروتئین تنظیم‌کننده HK-1 بر پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی القاشده توسط نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، گروه تیمار دریافت‌کننده نانوذره به همراه این یاور نیز در نظر گرفته شد. افزایش میانگین عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه NDV در جوجه‌های دریافت‌کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1 در نوبت‌های سه‌گانه پس از تجویز مشاهده شد. میزان افزایش بین این گروه و گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کرده بودند معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) و برابر با یک لگاریتم اختلاف بود. در آزمایش CBH نیز میزان FI در جوجه‌های دریافت‌کننده یاور مولکولی HK-1 نسبت به گروه‌های تیمار افزایش داشت. نتایج این بررسی بیانگر این است که HK-1 سبب افزایش سطح ایمنی هومورال و ایمنی سلولی شده و میزان IgG تولید شده علیه آنتی‌ژن NDV بیشتر از واکسیناسیون با نانوذره NDV بدون یاور است. بر این اساس، HK-1 اثر فزاینده‌ای روی پاسخ ایمنی سلولی پس از تجویز نانوذره NDV دارد. این امر می‌تواند به‌دلیل مسیرهای انتقال پیام داخلی این سایتوکاین با فعال شدن آبشار انتقال پیام MAPK و فاکتور رونویسی NF-κB باشد که سبب تکثیر و تمایز سلول‌های B و افزایش فعال‌سازی سلول‌های T می‌شوند و ایمنی را از هر دوی مسیرهای Th1 و Th2 پیش می‌برند (۶ ، ۱۲ و ۳۰). به‌طور کلی، نانوذرات آنتی‌ژن را به مسیرهایی تحویل می‌دهند که به هدایت آن‌ها به سمت مولکول‌های MHC I و تولید پاسخ لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک منجر شود و یاورهای مولکولی با افزایش برخی سایتوکاین‌ها و کاهش غلظت انواع دیگر، بر نوع پاسخ ایمنی تأثیر می‌گذارند؛ بنابراین به نظر می‌رسد ترکیبی از یک سیستم تحویلی مناسب و یک یاور مولکولی می‌تواند در فرآیند پیچیده ایمن‌سازی مؤثر بوده و علاوه بر بهبود کیفیت واکسن سبب افزایش عمر مفید آن گردد.

منابع

1- Bahnemann, H.G; Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary thylenimine. Vaccine; 1990; 8(4):299–303.

2- Banchereau ,J; Briere, F; Caux, C; Davoust, J; Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K; Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol ; 2000; 18(1):767-811.

3- Bankowaski, R; A modified live Newcastle disease virus vaccine. Exp. Biol. Med.; 1957; 96:114-118.

4- Béatris, M; Sohail, A; Mode of action of adjuvants: Implications for vaccine safety and design. Biologicals ; 2010; 38(5):594-601.

5- Chimeno, Z.S; Go´mez ,E; Carrillo, E; Berinstein, A; Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for

Newcastle disease virus. Braz J Med and Biol Res; 2008; 41:318–323.

6- Colonna, M; TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. Eur J Immounol; 2007; 37(2):306-309.

7- Corrier, D.E. and DeLoach, J.R; Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. Poultry Sci; 1990; 69:403-408.

8- Dai, C; Kang, H; Yang, W; Sun, J; Liu, C; Cheng, G; Rong, G; Wang, X; Wang, X; Jin, Z; Zhao, K; O-2'-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan nanoparticles for the delivery of live Newcastle disease vaccine. Carbohyd. Polym; 2015; 130:280-289.

9- Dehghan, A; Shahsavandi, S; Jabalameli, L; Improvement Efficacy of Influenza Nanovaccine in Combination with Hemokinin-1 Molecular Adjuvant. Avicenna J Med Biotechnol; 2018; 10(4):208-213.

10- Doll, E; Mccollum, W. & Wallace, M.E; Susceptibility to Newcastle disease infection of chickens from hens immunized with live virus vaccines. Am. J. Vet. Res; 1951; 12:232-239.

11- Ganar, K; Das, M; Sinha, S. & Kumar, S; Newcastle disease virus: current status and our understanding. Virus Res; 2014; 184:71-81.

12- Honda, K; Yanai, H; Negishi, H; Asagiri, M; Sato, M; Mizutani, T; Shimada, N; Ohba, Y; Takaoka, A; Yoshida, N; Taniguchi, T; IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature; 2005; 434(7034):772-777.

13- Koyasu, S; Ohteki, T; Role of antigen-presenting cells in innate immune system. Arch. Immunol. Ther. Exp; 2001; 49(1):47-52.

14- Kumar, V; Dandapat, S; Kumar, A; Kumar, N; Preparation and characterization of chitosan nanoparticles “alternatively, carrying potential’’ for cellular and humoral immune responses. Adv. Anim. Vet. Sci; 2014; 2 (7):414-417.

15- Liang, z; Arjun Seth; Nanoparticle Vaccines.Vaccine ; 2014; 32:327-337

16- Lima, K.M; dos Santos, S.A; Rodrigues Jr JM, Silva CL; Vaccine adjuvant: it makes the difference. Vaccine; 2004; 22(19):2374-2379.

17- Liu, C; Tan, Y; Liu, C. et al; Preparations, characterizations and applications of chitosan-based nanoparticles. J Ocean Univ. China; 2007; 6:237–243.

18- Miller, P.J; Afonso, C.L; ElAttrache, J; Dorsey, K.M; Courtney, S.C; Guo, Z; Kapczynski, D.R; Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. Dev. Comp. Immunol; 2013; 41:505-513.

19-Mohammadi, AR; Zamani Moghaddam, AK; Shahsavandi, S; Encapsulation of inactivated Newcastle disease virus onto the chitosan nanoparticles for use in mucosal immunity. Iran J Virol. (In Press).

20- OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees. Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health Paris, France.; Seventh Edition; 2012; 555-567.

21- Ramakrishnan, M.A; Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J Virol; 2016; 5(2):85-86.

22- Sadeghi, K; Shahsavandi, S; Ebrahimi, M.M; Mahravani, H; Fazel, H; Hemokinin-1 molecular adjuvant: an

approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. Arak Med Univ J; 2014; 17(11):62-69.

23- Schijns, V.E.J.C.; van de Zande, S; Lupiani, B; Reddy, S.M; Practical Aspects of Poultry Vaccination, In: Schat, K.A; Kaspers, B; Kaiser, P; (Eds.) Avian Immunology. Elsevier Science; 2013; 345-362.

24- Shahsavandi, S; Ebrahimi, M M; Samiee, M R; Promotion the Immunogenicity of Chitosan Nanoparticle-Based Influenza Vaccine Using Hemokinin-1. J Arak Uni Med Sci; 2018; 21(3):65-74.

25- Shakya, A. K.& Nandakumar, K.S; Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. J. R. Soc. Interface.; 2013;10(79):1-16.

26- Sullivan, J; Gill, E. & Somer, A; Immune response of chickens to Betapropiolactone-killed Newcastle disease vaccines. Am. J. Vet. Res; 1958; 19:483-488.

27- Sun,Y; Zhang, Y; Shi, C; Li, W; Chen, G; Wang, X; Zhao, K; Newcastle disease virus vaccine encapsulated in biodegradable nanoparticles for mucosal delivery of a human vaccine. Hum. Vaccines Immunother; 2014;10(8):2503-2506.

28- Thayer, S.G; Beard, C.W; Serologic procedure, A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th edition, American Association pathologist; 1998; 255-266.

29- Tu¨rker, S; Onur, E; Ozer, Y; Nasal route and drug delivery systems. Pharm World Sci; 2004; 26(3):137-142.

30- Wang, W; Li, Q; Zhang, J; Hemokinin-1 activates the MAPK pathway and enhances B cell proliferation and antibody production. J Immunol; 2010;184(7):3590-3597.

31- Yousefi, A; Khajali, F; Hassanpour, H.et al; Dietary L-carnitine Improves Pulmonary Hypertensive Response in Broiler Chickens Subjected to Hypobaric Hypoxia. J. Poult. Sci; 2013; 50:143-149.

32- Zhang, W; Yin Z; Liu, N; Yang, T; Wang, J; Bu, Z; Wu, D; DNA–chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. J. Microencapsul; 2010; 27(8):693-702.

33- Zhao, K; Chen, G; Shi, X-m; Gao, T-t; Li, W. et al; Preparation and Efficacy of a Live Newcastle Disease Virus Vaccine Encapsulated in ChitosanNanoparticles. PLoS ONE; 2012; 7(12):1-11.

34- Zhao, K; Han, J; Zhang, Y; Wei, L; Yu, S; Wang, X; Jin, Z; Wang, Y; Enhancing mucosal immune response of newcastle disease virus DNA vaccine using N-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride chitosan and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as delivery carrier. Mol. Pharm; 2018; 15(1):226-37.

35- Zhao, K; Li, W; Huang, T; Luo, X; Chen, G; Zhang, Y; Guo, C; Dai, C; Jin, Z; Zhao, Y; Cui, H; Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in PLGA nanoparticles. PLoS One; 2013; 8(12):1-8.

36- Zhao, K; Sun, Y; Chen, G; Rong, G; Kang, H; Jin, Z; Wang, X; Biological evaluation of N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan as a carrier for the delivery of live Newcastle disease vaccine. Carbohyd. Polym; 2016; 149:28-39.

37- Zmrhal, V; Slama, P; Current knowledge about interactions between avian dendritic cells and poultry pathogens. Dev Comp Immunol; 2020; 104:103565.

Vol.15/No.2
Spring-Summer 2021

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2021; 15(1): 103-112.

Evaluation of humoral and cellular immune responses of chitosan-based Newcastle nanoparticles vaccination with homokinin-1 molecular adjuvant

Ahmadreza Mohammadi[1*]; Abdolkarim Zamani Moghaddam[2]; Shahla Shahsavandi[3]

1. Resident of Poultry Health and Diseases, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2.Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj- Iran.

Received: 21 September 2020 ***Accepted:*** 15 December 2020

Summary

The worldwide spread of Newcastle disease virus (NDV) in poultry has highlighted the need for improved immunization programs against the disease. In this experimental study, the effect of hemokinin-1 (HK-1) as a biological adjuvant on the induction of humoral and cellular immune responses against chitosan-based NDV nanoparticles was investigated. Sixty SPF chickens were divided equally into six groups. Control groups included received physiological serum, NDV inactivated antigen, and chitosan nanoparticles; and treatment groups received oil-adjuvanted NDV inactivated antigen, chitosan-based NDV nanoparticles, and the nanoparticles with HK-1. Based on the groupings, the chicks received the sample with eye drops in one day, except for the group that received the inactive antigen with the oil-adjuvanted NDV inactivated antigen subcutaneously. Serum samples were collected at 2, 4, and 6 weeks after administration, and the humoral immune response was assessed by hemagglutination inhibition (HI) test and cellular immune response stimulation by cutaneous basophil susceptibility (CBH) response. The results indicate that co-administration of HK-1 with NDV nanoparticles increased the mean HI antibody titer compared to the group receiving nanoparticles alone. The difference in immune response between the two groups was significant ($P<0.001$). CBH test data showed a significant difference ($P<0.001$) in inducing cellular immune response in the groups receiving oil-adjuvanted NDV inactivated vaccine, NDV nanoparticles alone, and the combination of nanoparticles and HK-1 with control groups. Based on the data, NDV nanoparticles with HK-1 adjuvant can induce specific humoral and cellular immune responses against the virus.

***Keywords*:** Newcastle disease, nanoparticle, hemokinin-1, chitosan, immune response**.**

*Corresponding Author E-mail: arm531@gmail.com