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

احمدرضا محمدی[۱،۴]*،عبدالکریم زمانی مقدم[۲]،شهلا شاهسوندی[۳]

۱.دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری های پرندگان،علوم درمانگاهی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه شهرکرد،شهرکرد-ایران.
۲.استاد، گروه علوم درمانگاهی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه شهرکرد،شهرکرد-ایران.
۳.دانشیار،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴.عضو هیئت علمی ،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

پست الکترونیک نویسنده مسؤول:arm531@gmail.com

چکیده

انتشار جهانی ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) در طیور ضرورت بهبود برنامه های ایمن سازی و پژوهش اثر هموکینین-۱ (HK-1) به عنوان یاور زیستی بر القا پاسخ های ایمنی هومورال سلولی علیه نانوذره NDV بر پایه کیتوزان را مشخص می کند.

در این مطالعه تجربی تعداد شصت جوجه SPF به طور مساوی در شش گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند. گروه های کنترل شامل دریافت کننده سرم فیزیولوژی، و آنتی ژن غیر فعال NDV، و آنتی ژن غیر فعال NDV با اجوان روغنی، و گروه های تیمار شامل دریافت کننده کیتوزان، و نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، بدون و با HK-1 بودند. جوجه ها در یک روزگی ، بجز آنتی ژن غیرفعال با اجوان روغنی که زیرجلدی تزریق شد ، به روش قطره چشمی دریافت کردند. نمونه های سرم در هفته های ۲،۴،۶ بعد از تزریق ،جمع آوری شده و پاسخ ایمنی هومورال با آزمایش ممانعت از آگلوتیناسیون (HI) و تحریک پاسخ ایمنی سلولی با واکنش حساسیت بازوفیل های جلدی (CBH) بررسی شد.

افزودن HK-1 به نانوذره NDV سبب بالا رفتن میانگین عیار آنتی بادی HI نسبت به گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) بود. داده های آزمایش CBH بیانگر تفاوت معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) در القا پاسخ ایمنی سلولی در گروهای دریافت کننده واکسن NDV دارای اجوان روغنی، نانوذره به تنهایی، و ترکیب نانوذره و HK-1 با گروه های کنترل بود.

براساس داده ها، نانوذره کیتوزان همراه با یاور HK-1 توان القا پاسخ ایمنی هومورال و پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی نسبت به NDV را دارد.

واژه های کلیدی: بیماری نیوکاسل، نانوذره، هموکینین-۱، کیتوزان، پاسخ ایمنی

Summary

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

Mohammadi,A.[1*];Zamani Moghaddam,A[2],Shahsavandi,S[3]

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

Background and Aim: The global spread of Newcastle disease virus (NDV) in poultry has highlighted the need for improved immunization programs against the disease. In this study, the effect of hemokinin-1 (HK-1) as a biological agjuvant on the induction of humoral and cellular immune responses against chitosan-based NDV nanoparticles was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, , sixty SPF chickens were equally divided into six control and treatment groups. Control groups included received physiological serum, NDV inactivated antigen, and oil-adjuvanted NDV inactivated antigen; and treatment groups received chitosan, chitosan-based NDV nanoparticles, and the nanoparticles with HK-1. Based on the groupings, the chickens received each sample via eye drop on one day of age. Serum samples were collected at defined intervals and the humoral immune response was assessed by hemaagglutination inhibition (HI) test. Stimulation of the cellular immune response in different groups was assessed using cutaneous basophil susceptibility response (CBH).

Results: Addition of HK-1 to NDV nanoparticles increased the mean HI antibody titer compared to the group receiving nanoparticles alone. The difference in immune response between these 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, nanoparticles alone, and the combination of nanoparticles and HK-1 with control groups.

Conclusion: Based on the data, chitosan based-nanoparticles with HK-1 adjuvant can induce specific humoral and cellular immune responses against NDV.

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

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

مقدمه

بیماری نیوکاسل، یکی از بیماری های ویروسی بسیارمسری و کشنده پرندگان اهلی و وحشی با انتشار جهانی است و دستگاه های تنفسی، گوارشی، عصبی، و تولید مثلی پرندگان را درگیر می کند. میزان مرگ و میر تا ۱۰۰ درصد در جوجه های واکسینه نشده برآورد شده است. این بیماری به وسیله 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 بندی می‌شوند شامل ولوژنیک ویسروتروپیک (Viscerotropic velogenic) که با علایم بیماری حاد و کشنده و ضایعات خونریزی دهنده در روده همراه است، ولوژنیک نوروتروپیک (Neurotropic velogenic) که با نشانه‌های تنفسی و عصبی و تلفات بالا در گله‌ها ظاهر

می شود، مزوژنیک (Mesogenic) که اغلب با علایم تنفسی همراه با تلفات کم می‌باشد، لنتوژنیک (Lenthogenic) فقط سبب بروز بیماری‌های تنفسی ملایم می‌شود، و بدون نشانه همراه با عفونت روده ای (Asymptomatic enteric) (۲۰).

ویریون NDV چند شکلی، پوشش دار به قطر ۱۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر است و ژنوم RNA تک رشته‌ای 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. (۵،۶). NDV توسط گلیکوپروتئین های سطحی HN و F به سیالیک اسید سلول‌های اپی تلیوم تنفسی میزبان متصل می شود. شیوه آلودگی ویروس در ابتدا مستقل از pH رخ می‌دهد و در نتیجه آن پوشش ویروس با غشا سلول میزبان ادغام می‌گردد. سپس، نوکلئوکپسید ویروس به داخل سیتوپلاسم سلول جایی که RNA ویروسی رشته منفی برای تولید mRNA ساختاری و با کمک RNA پلی مراز وابسته به RNA ویروسی نسخه برداری می-شود، وارد می‌شود. پروتئین‌های مورد نظر ترجمه شده و توسط سامانه سلولی میزبان تا می‌خورند. هنگامی که سامانه به ابتدای اولین پروتئین نسخه برداری شده (N) می‌رسد، RNA ژنومیک (که به صورت رشته منفی است) برای ساختنRNA ژنومی رشته منفی جدید به الگو آنتی ژنومی رشته مثبت تبدیل می‌شود. این RNA ژنومی تازه تشکیل شده با پروتئین‌های N، P و L پوشیده شده و به شکل نوکلئوکپسید در می‌آیند که در ادامه با پروتئین M و گلیکوپروتئین‌های سطحی سرهم بندی شده و از سلول میزبان خارج می‌شوند (۱۱).

به علت انتشار سریع بیماری نیوکاسل از طریق تبادلات تجاری گسترده در صنعت مرغداری، استفاده از واکسن برای پیشگیری ضروری است. اولین واکسن ها برای کنترل NDV از دهه ۱۹۴۰ شامل ویروس غیر فعال شده با فرمالین (۸) ویروس غیر فعال شده با بتا-پروپیولاکتون (۲۷)، ویروس زنده (۱۰) و ویروس تخفیف حدت یافته (۳) با هدف تولید پاسخ ایمنی قوی به آنتی ژن های تجویز که قادرند حفاظت طولانی مدت 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 با هدف کاهش تلفات و القا ایمنی مناسب در طول دوره نگه‌داری طیور، از دهه ۶۰ تا به امروز طراحی و توسعه واکسن های جدید به عنوان یک حوزه تحقیقاتی بسیار فعال ادامه یافته است. این مطالعات بر روی تولید یاور (اجوان) و واکسن‌های نانوذره متمرکز شده‌اند (۳۱). یاورها ترکیبات هتروژنی هستند که سبب افزایش ایمنی اکتسابی علیه یک آنتی‌ژن می‌شوند. پایداری ساختار اپی‌توپی، رهاسازی آهسته آنتی‌ژن، افزایش توان آنتی‌ژنی پپتیدهای ضعیف، افزایش قدرت و استمرار پاسخ ایمنی، تغییر اویدیتی و اختصاصی بودن، کاهش مقدار مصرف آنتی‌ژن، داشتن حداقل اثرات جانبی، دفع آسان از بدن، و برخورداری از قابلیت حذف زیستی مزایای یک یاور مناسب هستند (۱۳). طراحی یاور به هدف پاسخ ایمنی بستگی دارد و می‌بایست یاور را براساس شناخت آنتی‌ژن و با توجه به مسیر القای سامانه ایمنی برای پاسخ به آنتی‌ژن انتخاب کرد. سامانه ایمنی پس از تزریق دوباره واکسن حاوی یاور ممکن است علیه یاور نیز آنتی‌بادی تولید کند و در نتیجه واکسن پیش از القا فعالیت خود، از بدن حذف شده و کارآیی خود را از دست بدهد (۱۴). استفاده از یاورهای طبیعی یکی از راهکارهای حل این مشکل است. هموکینین-۱ (HK-1) آخرین پروتئین شناخته شده از خانواده تاچی‌کنین است که به‌طور غالب در بافت‌های غیر عصبی بیان شده و وظیفه عمده آن گسترش رده سلول های لنفوییدی است (۱۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که 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 ایمن بخشی واکسن است که نه فقط سبب بهبود پایداری آنتی‌ژن و ایمنوژنیسیتی آن می‌شود بلکه روند رهاسازی و تحویل آن به سلول هدف را هم تسهیل می‌کند. نانوذره هم یک سامانه تحویلی است که سبب افزایش پردازش آنتی‌ژن شده و هم به‌عنوان یاور سبب تحریک ایمنی و افزایش آن می‌شود (۱۶). اطمینان از تحویل آنتی‌ژن به بافت هدف برای تحویل واکسن از جنبه‌های مهم طراحی واکسن نانوذره است بنابراین درک درست از خواص فیزیکو شیمیایی ریزذرات و سامانه بیولوژی در طراحی واکسن ایمن موثر خواهد بود. مخاط دستگاه تنفسی راه اصلی ورود NDV به بدن میزبان است. بافت های لنفوئیدی ویژه ای در موکوس بینی وجود دارد که از مکان های اصلی آغاز پاسخ دهی به این عامل بیماری زا میباشند. به همین دلیل ، استفاده از غشای مخاطی به دلیل داشتن سطح وسیع برای رساندن واکسن و پاسخ دهی سریع بسیار با اهمیت است (۱۶).

فرمولاسیون واکسن با نانوذره برپایه افزایش توان ایمنی استوار است بدین ترتیب که آنتی‌ژن و نانوذره با هم توسط سلول ایمنی بلعیده شده و با افزایش پردازش آنتی‌ژن سبب عرضه بیش‌تر آن به سلول‌های ارایه کننده آنتی ژن (APC) شامل سلول

های دندریتیک (DC) و ماکروفاژها و القا فعالیت سامانه ایمنی می‌شود (۱۷). در این پژوهش، القا پاسخ های ایمنی هومـورال و ایمنی سلولی علیه آنتی ژن غیرفعال NDV تهیه شده بر پایه کیتوزان به عنوان کاندید واکسن همراه با یـاور مولکـولی HK-1 در جوجه های عاری از عوامل بیماری زا (SPF) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و با مشارکت دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد انجام شد.

تهیه آنتی ژن ویروس نیوکاسل

برای تهیه آنتی‌ژن، از بذر NDV سویه لاسوتا موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی استفاده شد. تکثیر ویروس در تخم مرغ جنین دار SPF طبق پروتکل استاندارد OIE انجام شد(۲۰).پس از تزریق، تخم مـرغ‌ها در دمای ۳۷ °C و رطوبت ۶۵ درصد به مدت یک هفته نگهـداری شدند. تخم مرغ‌ها روزانه بررسی شده. در پایان، تخـم مـرغ‌ها 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 جمع آوری شدند. بقایای جامد با سانتریفیوژ در۴۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه برداشته شد و آلودگی احتمالی میکروبی و قارچی آن از نظر سترونی مورد بررسی قرار گرفت.

عیارسنجی ویروس

برای تعیین عیار ویروس، مقدار ۰/۱ ml از رقت های سری $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۹}$ از NDV به داخل حفره آلانتوئیک ۵ عدد تخم مرغ SPF جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شد. پس از ۷ روز نگهداری تخم مرغ ها در دمای ۳۷°C، عیار ویروس با روش Spearman-Karber محاسبه شد (۲۱).

غیرفعال سازی آنتی ژن ویروس

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

تهیه نانوذرات کیتوزان

نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ژله شدن یونی در حضور یون‌های منفی تری پلی فسفات (TPP) آماده شدند. به اختصار، کیتوزان (Sigma-Aldrich) در استیک اسید (Merck) ۱٪ حل شده و نسبت‌های حجمی متفاوت کیتوزان/TPP تهیه شد. پس از سانتریفیوژ، بخش رویی حاوی نانوذرات کیتوزان جمع آوری شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات شامل اندازه، بار سطحی و شاخص پراکندگی در نسبت های 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. خصوصیات مرفولوژی نانوذرات کیتوزان با استفاده از میکروسپ الکترونی گذاره و نگاره تعیین شدند.

برای تهیه نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، مقدار ۰/۵ درصد حجمی آنتی ژن غیر فعال ویروس به محلول ۱ درصد حجمی کیتوزان افزوده شد. توین ۸۰ (Sigma-Aldrich) در غلظت ۰/۰۱ درصد حجمی به عنوان امولسیون کننده اضافه شد. سپس، TPP به نسبت ۰/۱ درصد (W/V) به طور جداگانه در ۸۰ ml آب مقطر حل شده و به محلول کیتوزان/آنتی ژن 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 شد.

تهیه یاور HK-1

داده های این توالی برگرفته از نتایج پژوهش های پیشین است که در آن ها RNA بافت ریه حیوان آزمایشگاهی استخراج و قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طی واکنش RT-PCR تکثیر شد. سپس در وکتور بیانی pcDNA3.1 به روش شوک حرارتی کلون شده و پلاسمید حاصل به عنوان یاور در مطالعات ایمن سازی مورد استفاده قرار گرفت (۴،۱). به طور خلاصه، ریه سه جوجه SPF پس از برداشت در محلول استریل سرم فیزیولوژی (PBS) هموژن شده و RNA با کیت High Pure RNA Isolation (Roche) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. با استفاده از نرم افزار Oligo پرایمرهای اختصاصی برای ژن HK-1 به طول ۲۳۱bp طراحی شد به گونه ای که دارای بخش رمز دهنده موتیف حفظ شده Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-phe-Tyr-Gly-Leu-Met باشد. برای کلون سازی ژن در وکتور pcDNA3.1، جایگاه شناسایی آنزیم‌های برش دهنده 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 یک مرحله‌ای RT-PCR با استفاده از کیت (Next generation of premix, Intron, Korea) تکثیر شده و محصول PCR با استفاده از کیت PCR product extraction (GeneAll, Korean) خالص شد. سپس DNA خالص شده با شوک حرارتی در وکتور pcDNA3.1 (Invitrigen) کلون شد.

گروه بندی جوجه های مورد آزمایش و برنامه ایمن سازی

تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF در شش گروه ۱۰ قطعه ای شامل گروه های کنترل و تیمار دسته بندی شدند. موارد اخلاقی نگهداری جوجه ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام ایمن سازی و خون گیری به طور کامل رعایت شد. گروه های مورد آزمایش عبارت بودند از:

الف-گروه کنترل منفی C_1: بدون دریافت واکسن و یاور، فقط یک قطره PBS در یک روزگی به روش قطره چشمی دریافت کردند

ب-گروه کنترل C_2 به عنوان کنترل آنتی ژن غیر فعال NDV: فقط یک قطره از آنتی ژن غیرفعال در یک روزگی به روش قطره چشمی دریافت کردند

ج- گروه کنترل C_3 به عنوان کنترل آنتی ژن غیر فعال NDV با اجوان روغنی: یک دز آنتی ژن غیر فعال NDV حاوی سویه V4 و اجوان روغنی ISA70 (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی) در یک روزگی به روش زیرجلدی دریافت کردند

د- گروه تیمار A: فقط یک قطره از کیتوزان در یک روزگی به روش قطره چشمی دریافت کردند

ه-گروه تیمارB : یک قطره از نانوذره NDV بر پایه کیتوزان در یک روزگی به روش قطره چشمی دریافت کردند

و-گروه تیمار D: یک قطره از نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1 در یک روزگی به روش قطره چشمی دریافت کردند. برای این منظور، مقدار ۰/۱ درصد حجمی از HK-1 به مخلوط آنتی ژن غیرفعال NDV و کیتوزان افزوده شد. نانوذره NDV حاوی یاور مولکولی HK-1 به گونه ای تهیه شد که هر قطره آن معادل یک دز بوده و قابل تجویز به صورت قطره چشمی باشد.

ارزیابی پاسخ های ایمنی

القا پاسخ های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیهNDV در گروه های مختلف، به شرح زیر ارزیابی شد.

پاسخ ایمنی هومورال

میزان القا آنتی بادی اختصاصی علیه NDV در نمونه های سرمی اخذ شده از گروه های مختلف جوجه در زمان های تعیین شده به روش سرولوژی HI ارزیابی شد.- خونگیری در هفته های دوم و چهارم و ششم بعد از تجویز با سرنگ ۲ میلی لیتری از

ورید بال انجام شد و پس از لخته شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم به دست آمده تا انجام آزمایش در دمای °C ۲۰- قرار داده شدند.

پاسخ ایمنی سلولی

برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی از واکنش حساسیت بازوفیل های جلدی (Cutanous basophil hypersensitivity; CBH) که برابر با شاخص پا (Foot index; FI) و یا تورم شبکه پا (Toe web swelling; TWS) در نظر گرفته می شود استفاده شد(۳۳،۷). برای تعیین این پارامتر از هر تیمار ۵ جوجه در سن ۳۷ روزگی انتخاب شد. سپس پای چپ و راست جوجه ها با استفاده از اتانول ۷۰ ٪ تمیز و ضخامت پرده پا برای هر دو پای چپ و راست بین انگشت سه و چهار با استفاده از میکرومتردیجیتال ووگل(Vogel,Germany) با دقت ۰/۰۱ mm اندازه گیری و ثبت شد. به پای راست جوجه ها مقدار ml ۰/۱ 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 جوجه ها، ml ۰/۱ PBS تزریق شد. تزریق PBS به پرده پای چپ جوجه، برای تعیین میزان التهاب احتمالی ناشی از اثر سرنگ تزریق کننده می باشد. 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 می شود. صخامت پوست با دستگاه کولیس میکرومتر دیجیتال با دقت یک صدم میلی متر محاسبه شد. پای راست جوجه که تزریق سرم فیزیولوژی را داشته است به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. شاخص ضخامت پرده پا از فرمول زیر تعیین شد:

$$FI = (post\text{-}PHA - pre\text{-}PHA) - (post\text{-}PBS - pre\text{-}PBS)$$

این شاخص با تفاوت افزایش ضخامت پرده بین انگشت های 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 به دست می آید.

پردازش آماری نتایج

براساس بسته آماری SPSS statistics 22 و آزمون Oneway-Duncan داده های بدست آمده مربوط به القا پاسخ ایمنی در گروه های مختلف مورد پردازش قرار گرفت .

یافته ها

تهیه و ارزیابی آنتی ژن ویروس نیوکاسل

۴روز پس از تزریق NDV سویه لاسوتا به تخم مرغ های SPF، در زیر هود لامینار AAF برداشت شد. سترونی آنتی ژن بدست آمده با کشت در محیط های اختصاصی ارزیابی شد. در طول دوره انکوباسیون و انتهای آن، تمام کشت ها از نظر عوامل باکتریایی و قارچی منفی بودند و هیچگونه رشدی مشاهده نگردید. عیار ویروس با روش های هماگلوتیناسیون و Spearman-Karber به ترتیب برابر با HA= 10 و $EID_{50}/ml= 10^{9.67}$ محاسبه شد. سپس آنتی ژن ویروس با استفاده از BEI غیرفعال شد و حضور یا عدم حضور ویروس با آزمایش آگلوتیناسیون موردتایید قرار گرفت. NDV زنده به دلیل خاصیت هماگلوتیناسیون پروتئین HN خود، می تواندگلبول های قرمز خون را آگلوتینه نماید. در روند غیرفعال سازی آنتی ژن NDV پدیده آگلوتیناسیون مشاهده نشد. این بدان معنی است که آنتی ژن تهیه شده به خوبی غیرفعال شده است.

تهیه و ارزیابی ویروس نیوکاسل بر پایه کیتوزان

بر اساس آنالیزهای اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانوذرات، نسبت حجمی ۲:۱ کیتوزان/TPP گزینه مناسبی برای سنتز نانوذرات کیتوزان بود. داده های تصویر برداری میکروسکپی بیانگر ساختار هموژن و کروی شکل نانوذرات کیتوزان تهیه شده بود. داده های طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف سنجی FTIR تایید کننده شکل گیری نانوذرات کیتوزان و میانکنش بین گروه های فسفات TPP و گروه های آمین کیتوزان بود. پروفایل مشابه برای تهیه نانوذرات NDV بر پایه کیتوزان با استفاده از آنتی ژن ویروسی غیرفعال شده با عیار $EID_{50}/ml= 10^{9.67}$ انجام شد.

ارزیابی پاسخ های ایمنی هومورال

القا پاسخ ایمنی هومورال در گروه های مختلف با استفاده از آزمایش HI ارزیابی شد. نتایج آزمایش سرولوژی نمونه‌های سرم نشان داد میزان آنتی بادی اختصاصی علیه NDV در جوجه های تیمار شده با واکسن دارای اجوان روغنی (گروه A) نسبت به سایر گروه های تیمار افزایش بیشتری داشته و میانگین آن در پایان دوره مطالعه به ۸/۱ رسیده است (جدول ۱). این افزایش در جوجه های دریافت کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان و نانوذره به همراه یاور مولکولی HK-1 در نوبت های سه گانه پس از تجویز نیز مشاهده شد (نمودار ۱). افزودن یاور مولکولی HK-1 به نانوذره NDV سبب بالا رفتن میانگین عیار آنتی بادی در هر نوبت خونگیری و ارزیابی سرمی نسبت به گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند شد. این تفاوت در نوبت دوم خونگیری یعنی چهار هفته پس از تجویز مشهودتر بود و از ۶/۳ در گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند به ۷/۳ در گروهی که ترکیب نانوذره و یاور را دریافت کردند متفاوت بود. این میزان نشان دهنده وجود یک لگاریتم اختلاف بین این دو گروه می باشد و تفاوت معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) در پاسخ ایمنی هومورال بین گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کردند و گروهی که ترکیب نانوذره و یاور را دریافت کردند را نشان می دهد.

ارزیابی پاسخ های ایمنی سلولی

تحریک پاسخ ایمنی سلولی در گروه های مختلف با استفاده از آزمایش CBH و تزریق PHA-P ارزیابی شد. نتایج آزمایش نشان داد مقدار FI در جوجه های تیمار شده با نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1 (گروه D) نسبت به سایر گروه های تیمار افزایش بیشتری داشته و میانگین آن در پایان دوره مطالعه به ۱/۶۷ رسیده است (جدول ۲). این افزایش برمبنای مقدار FI در جوجه های دریافت کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به تنهایی و جوجه های تیمار شده با واکسن NDV دارای اجوان روغنی نیز مشاهده شد (نمودار ۲) و نشان داد تفاوت معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) در القا پاسخ ایمنی سلولی در گروهای دریافت کننده واکسن NDV دارای اجوان روغنی، نانوذره NDV به تنهایی، و ترکیب نانوذره و یاور با گروه های کنترل وجود دارد.

بحث و نتیجه گیری

یکی از مهم ترین راه های پیشگیری از بیماری نیوکاسل در صنعت پرورش طیور واکسیناسیون با واکسن های زنده تخفیف حدت یافته لنتوژن و واکسن های غیرفعال است به گونه ای که ایمنی محافظتی با کمترین عوارض جانبی القا شود (۳). هدف از واکسیناسیون با هر فرمولی تقلید پاسخ های ذاتی و اکتسابی سیستم ایمنی بدن در برابر عفونت می باشد. رابط غالب بین این دو پاسخ، APC ها به ویژه DC است. این سلول ها، سلول های T نابالغ را بیشتر از سلول های B یا ماکروفاژها فعال نموده و بیشتر از APC های دیگر آنتی ژن را گرفته و پردازش می کنند. بیشتر تحقیقات بر نقش DC ها در فعال سازی بین پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی، و در راه اندازی پاسخ های ایمنی اکتسابی مناسب به ویژه در واکسیناسیون مخاطی تاکید دارند (۱۴). این روش دارای مزیت هایی مانند سطح اپی تیلیوم پوششی وسیع با حضور میکروویلی متعدد و غشای اندوتلیال متخلل و مخاط پر عروق است که می تواند جذب آنتی ژن را تسهیل نماید (۲۹). واکسن‌های غیرفعال دارای مجوز مصرف علیه NDV تهیه شده از کل پیکره ویروس و مخلوط شده با یاور روغنی هستند که به‌صورت زیر جلدی یا داخل عضلانی تجویز می‌شوند. از معایب این نوع واکسن می توان به محدودیت زمانی مصرف در واکسیناسیون جوجه هایی که مصرف انسانی دارند، نیاز به تزریق عضلانی و زیرجلدی انفرادی، و نیاز به استفاده از مقدار زیاد آنتی‌ژن اشاره کرد. اگرچه در واکسیناسیون با واکسن غیرفعال سطح آنتی بادی هومورال بالاتری بدست می آید اما پاسخ ایمنی سلولی قوی حاصل نشده (۲۴) و مقدار بیشتری از ویروس حاد چالش در مقایسه با پرندگانی که با واکسن زنده ND واکسینه شده اند دفع می شود (۲۰،۱۸). از دو دهه گذشته طراحی واکسن های غیرفعال با استفاده از حامل های نانوذره مورد توجه قرار گرفته است که برای بهبود جذب آنتی ژن فاگوسیت، سیستم های تحویل بر اساس پلی مرهای سنتزی یا طبیعی برای کنترل مقدار آنتی ژن و سرعت رهایش آن به کار برده می شوند. برخی از قابلیت‌های این واکسن‌ها عبارتند از سهولت تجویز از راه سطوح مخاطی چشم یا بینی، خاصیت آنتی‌ژنی بالا، توانایی القا توام ایمنی سلولی و ایمنی هومورال، و افزایش دوره زمانی پاسخ های ایمنی (۳۴،۸). این واکسن ها با چالش رقیق شدن در ترشحات مخاطی، گرفتار شدن در سد چسبنده موکوس، تجزیه و تخریب توسط آنزیم های سلولی مواجه

هستند. بنابراین برای دستیابی به پاسخ های ایمنی قوی، واکسن های غیرفعال که به روش مخاطی استفاده می شوند 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 نیوکاسل بر پایه کیتوزان همراه با یاور مولکولی HK-1 در جوجه های SPF انجام شد. در بخش اول، نانوذرات کیتوزان با روش ژلی شدن تهیه شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن ها شامل اندازه، شاخص پراکندگی، و بار سطحی در نسبت های حجمی مختلف کیتوزان/TPP اندازه گیری شد. آنالیز کمی نتایج به دست آمده در نسبت های حجمی کیتوزان/TPP نشان داد که پتانسیل زتا و میزان توزیع ذرات در نسبت ۲:۱در محدوده‌ی مطلوب قرار دارند. براساس داده های تصویر برداری، نانوذرات کیتوزان تهیه شده دارای ساختار هموژن و کروی شکل بوده و نتایج طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف FTIR تایید کننده شکل گیری آن ها بودند. در پروفایل مشابه، از آنتی ژن NDV غیرفعال شده با عیار $EID_{50}/ml= 10^{9.67}$ در نسبت های حجمی مختلف از کیتوزان/TPP برای تهیه نانوذرات NDV بر پایه کیتوزان استفاده شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن آنالیز شد و بهترین نتیجه میزان بارگذاری نانوذرات NDV بر پایه کیتوزان در نسبت حجمی ۲/۵: ۱:۵ به دست آمد. از آنجایی که هم پاسخ ایمنی هومورال و هم پاسخ ایمنی سلولی، نقش بسیار مهمی در حفاظت جوجه ها علیه عفونت NDV دارند (۱۱) در بخش دوم این پژوهش، القا این دو پاسخ ایمنی در گروه های مختلف جوجه SPF ارزیابی شد. نتایج آزمایش سرولوژی HI نمونه‌های سرم نشان داد اگرچه میانگین آنتی بادی اختصاصی علیه NDV در جوجه های تیمار شده با نانوذره NDV نسبت به گروهی که واکسن روغنی دریافت کرده بودند کمتر بوده است، اما نسبت به گروه های کنترل در نوبت های سه گانه پس از تجویز افزایش چشمگیر و معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) داشته و میانگین آن در پایان دوره مطالعه به ۷/۱ رسید. تحریک پاسخ ایمنی سلولی با استفاده از آزمایش CBH و تزریق PHA-P ارزیابی شد. نتایج آزمایش نشان داد مقدار FI در جوجه های تیمار شده با نانوذره NDV بر پایه کیتوزان نسبت به گروه های کنترل افزایش داشته و قابل مقایسه با دیگر گروه های تیمار می باشد. در جوجه های دریافت کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان این شاخص برابر با ۱/۴۸۴ و در جوجه های تیمار شده با واکسن روغنی برابر با ۱/۲۴۰ بود. این تفاوت براساس آزمون Oneway-Duncan معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$). بنابراین نتایج ما نشان می دهد نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به عنوان یک سیستم تحویل آنتی ژن، در القا پاسخ های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیه این ویروس در جوجه های SPF عملکرد مناسبی داشته است.

در روند القا پاسخ ایمنی، تنظیم ایمنی القا شده توسط واکسن به یک پاسخ مناسب برای مقابله با عامل بیماری زا اهمیت دارد و برای این منظور آنتی ژن باید به بافت های لنفاوی ثانویه (معمولا گره های لنفاوی) برسد. اغلب آنتی ژن ها توسط DC ها به گره های لنفاوی حمل شده و پس از پردازش در APC ها، اپی توپ ها را در مولکول های MHC به سلول های T ارایه می دهند. ماکروفاژها، DC ها، و سلول های B سایر پیام های مورد نیاز برای آغاز پاسخ ایمنی را فراهم می کنند. برخی از ترکیبات، آنتی ژن ها را در محل تجویز به دام انداخته و ذخیره مداومی از آنتی ژن برای APC ها به صورت موضعی فراهم می کنند. این اثر دپو یا ذخیره آنتی ژن پیش از انتشار آن در بدن، ممکن است میزان حذف آنتی ژن توسط کبد را کاهش دهد. امولسیون های روغنی مانند یاورهای فروند دپوهای کوتاه مدت (۱۰-۸ روز) که برای افزایش ایمنی مناسب هستند را شکل می دهند. نانوذرات دپوهای طولانی مدت (۱تا ۶ ماه) برای تحویل آنتی ژن به DC ها را ایجاد کرده و مقدار مشخصی از آنتی ژن را به طور تدریجی رها می کنند (۱۶). برای افزایش جذب، جلوگیری از تخریب آنتی ژن واکسن‌ها توسط انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک وپروتئولیتیک ولیزوزیم، افزایش ثبات آن افزایش ویژگی و اختصاصی بودن به هدف، و قابلیت حل شدن در محلول‌های آبی سیستم های حامل مانند کیتوزان که دارای توانایی بالایی برای انتقال آنتی ژن می باشد در طراحی نانو واکسن‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱۷). خلیلی و همکاران نشان دادند که در مقایسه با ISA70، نانوذرات کیتوزان بطور معنی داری ایمنی زایی ویروس آنفلوانزا H9N2 غیرفعال شده را در طیور افزایش می دهند (۹). اگرچه این بیوپلیمر به علت تحریک تولید سایتوکاین خواص بالقوه یاوری نیز از خود نشان داده و سبب افزایش سطح آنتی بادی های سرمی و مخاطی در پاسخ ایمنی به آنتی ژن های کمپلکس شده با کیتوزان می شود (۳۴) اما برای تقویت و بهینه سازی پاسخ های 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 داده و از کاهش تجزیه آنتی‌ژن جلوگیری می‌کنند، و با افزایش تحویل آنتی‌ژن به APC ها سبب

هدایت آن به سمت MHC و تولید بیش‌تر سایتوکاین‌ها می‌شوند. افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال اختصاصی پیامد استفاده از مولکول های تنظیم کننده ایمنی مانند HK-1 همراه با نانوذره کیتوزان علیه ویروس های بیماری زای طیور نیز گزارش شده است (۲۶،۲۳،۹).

در این پژوهش، برای ارزیابی فعالیت یاوری پروتئین تنظیم کننده HK-1 بر پاسخ های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی القا شده توسط نانوذره NDV بر پایه کیتوزان، گروه تیمار دریافت کننده نانوذره به همراه این یاور نیز در نظر گرفته شد. افزایش میانگین عیار آنتی بادی اختصاصی علیه NDV در جوجه های دریافت کننده نانوذره NDV بر پایه کیتوزان به همراه یاور مولکولی HK-1 در نوبت های سه گانه پس از تجویز مشاهده شد. میزان افزایش بین این گروه و گروهی که نانوذره به تنهایی را دریافت کرده بودند معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) و برابر با یک لگاریتم اختلاف بود. در آزمایش CBH نیز میزان FI در جوجه های دریافت کننده یاور مولکولی HK-1 نسبت به گروه های 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 آنتی ژن NDV بیش تر از واکسیناسیون با نانوذره NDV بدون یاور می باشد. بر این اساس، HK-1 اثر فزاینده ای بر روی پاسخ ایمنی سلولی پس از تجویز نانوذره NDV دارد. این امر می تواند به دلیل 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 فعال سازی سلول های T می‌شوند و ایمنی را از هر دوی مسیرهای Th1 و Th2 پیش می برند (۱۳،۶). به طور کلی، نانوذرات آنتی ژن را به مسیرهایی تحویل می دهند که به هدایت آن ها به سمت مولکول های MHC I و تولید پاسخ لنفوسیت های T سیتوتوکسیک منجر شود و یاورهای مولکولی با افزایش برخی سایتوکاین ها و کاهش غلظت انواع دیگر، بر نوع پاسخ ایمنی تاثیر می گذارند. بنابراین به نظر می رسد ترکیبی از یک سیستم تحویلی مناسب و یک یاور مولکولی می تواند در فرآیند پیچیده ایمن سازی موثر بوده و علاوه بر بهبود کیفیت واکسن سبب افزایش عمر مفید آن گردد.

منابع:

1-Akhilesh Kumar Shakya, Kutty Selva Nandakumar; Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases.(2012) J R Soc Interface 10: 20120536.

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

3-Bankowaski , R. 1957. A modified live Newcastle disease virus vaccine. Experimental Biology and Medicine, 96, 114-118.

4- Béatris Mastelic , Sohail Ahmed and et al. Mode of action of adjuvants: Implications for vaccine safety and design. Biologicals 38 (2010) 594e601.

5-Chimeno Zoth S, Go´mez E, Carrillo E, Berinstein A .2008. Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. Braz J Med and Biol Res 41: 318–323.

6- Colonna M. 2007.TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. Eur J Immounol.; 37(2): 306-9.

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

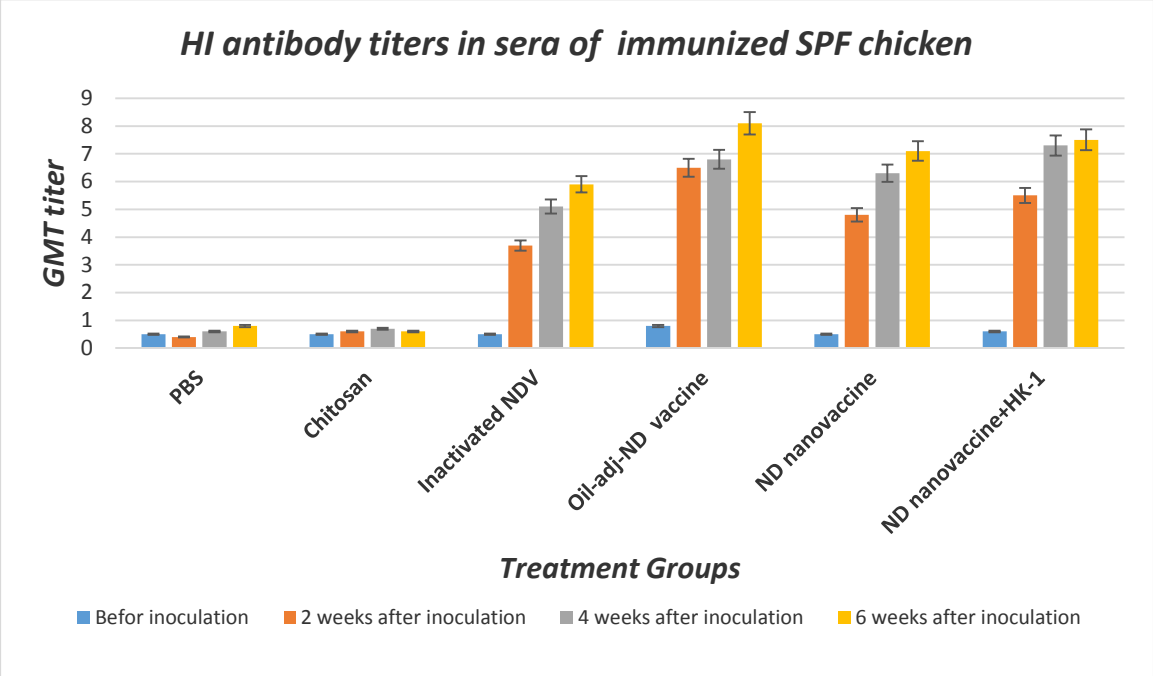
8- Dai, C., Kang, H., Yang, W., Sun, J., Liu, C., Cheng, G., Rong, G., Wang, X., Wang, X., Jin, Z.,Zhao, K., 2015. O-2'-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan nanoparticles for the delivery of live Newcastle disease vaccine. Carbohyd. Polym. 130, 280-289.

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

10-Doll, E., Mccollum, W. & Wallace, M. E. 1951. Susceptibility to Newcastle disease infection of chickens from hens immunized with live virus vaccines. *American journal of veterinary research*, 12, 232-239.

11-Ganar, K., Das, M., Sinha, S. & Kumar, S. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus research*, 2014.184, 71-81.
12- Heegaard et al., Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology. Arch Virol. 2011 Feb;156(2):183-202.
13- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri, M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. 2005.IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature.; 434(7034): 772-7.
14- Koyasu S, Ohteki T.2001. Role of antigen-presenting cells in innate immune system. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.; 49(1): 47-52.
15- Liang zhao, Arjun Seth; Nanoparticle Vaccines.Vaccine 32(2014)327-337.
16- Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues Jr JM, Silva CL.2004.Vaccine adjuvant: it makes the difference. Vaccine.; 22(19):2374-9.
17- Liu, C., Tan, Y., Liu, C. et al.2007. Preparations, characterizations and applications of chitosan-based nanoparticles. J Ocean Univ. China 6, 237–243.
18-Miller, P.J., Afonso, C.L., El Attrache, J., Dorsey, K.M., Courtney, S.C., Guo, Z., Kapczynski,D.R., 2013. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. Dev. Comp. Immunol. 41, 505-513.
19-Miller, P.J., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D.L., King, D.J., 2009. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. Avian Dis. 53, 39-49.
20-OIE. 2012. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees. Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health Paris, France.
21- Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J Virol 2016; 5(2): 85-86
22- Robert L. Coffman,Alan Sher, Robert A. Seder; Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. Immunity 33,
23- Sadeghi K, Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mahravani H, Fazel H.2014.Hemokinin-1 molecular adjuvant: an approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. Arak Med Univ J.; 17(11): 62-9.
24-Schijns, V.E.J.C., van de Zande, S., Lupiani, B., Reddy, S.M. 2013. Practical Aspects of Poultry Vaccination, In: Schat, K.A., Kaspers, B., Kaiser, P. (Eds.) Avian Immunology. Elsevier Science, 345 - 362.
25-Schoening, H. & Osteen, O. Vaccination against Newcastle disease with formalin-inactivated, commercially produced vaccines. *American journal of veterinary research*, 1949;10, 176-182.
26-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
27-Sullivan, J., Gill, E. & Somer, A. Immune response of chickens to Betapropiolactone-killed Newcastle disease vaccines. *American journal of veterinary research*, 1958;19, 483.
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 .2004. Nasal route and drug delivery systems. Pharm World Sci 26(3): 137–142.
30- Vimal Kumar, Satyabrata Dandapat; Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles "Alternatively, Carrying Potential'' for Cellular and Humoral Immune Responses. Advances in Animal and Veterinary Sciences 2 (7): 414 – 417.
31- Volker Gerdts,George Mutwiri; Carrier molecules for use in veterinary vaccines. Vaccine 31 (2013) 596– 602.
32- Wang W, Li Q, Zhang J. Hemokinin-1 activates the MAPK pathway and enhances B cell proliferation and antibody production. J Immunol. 2010 Apr 1;184(7):3590-7.

33-Yousefi A, Khajali F, Hassanpour H, *et al*. Dietary L-carnitine Improves Pulmonary Hypertensive Response in Broiler Chickens Subjected to Hypobaric Hypoxia. *Journal of Poultry Science*, 2013; 50:143-149.
34- Zhao, K., Sun, Y., Chen, G., Rong, G., Kang, H., Jin, Z., Wang, X., 2016. Biological evaluation of N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan as a carrier for the delivery of live Newcastle disease vaccine. Carbohyd. Polym. 149, 28-39.
35-Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014;32(3):327-337.



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

جدول ۱: میانگین عیار آنتی بادی (Log_2) علیه ویروس بیماری نیوکاسل در نمونه های سرم جوجه های تیمار شده به روش HI در نوبت های سه گانه پس از تجویز

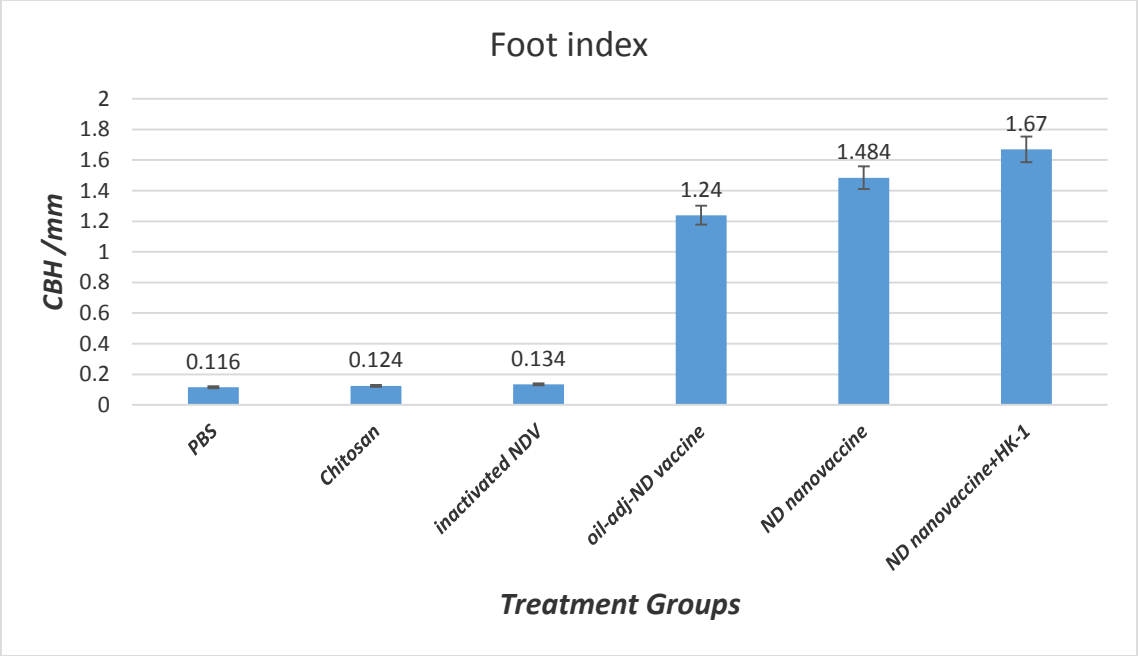
Group	Discription	ND specific antibody titer	Befor inoculation	Weeks after inoculation		
				2	4	6
C1	PBS (Neg.C)		0.50±0.52	$0.40±0.51^{d}$	$0.60±0.51^{d}$	$0.80±0.42^{d}$
C2	chitosan		0.50±0.52	$0.60±0.51^{d}$	$0.70±0.48^{d}$	$0.60±0.51^{d}$
C3	inactivated NDV		0.50±0.70	$3.70±1.15^{c}$	$5.10±0.87^{c}$	$5.90±1.10^{c}$
A	oil-adj-ND vaccine		0.80±0.63	$6.50±1.08^{a}$	$6.80±1.03^{ab}$	$8.10±0.73^{a}$
B	ND nanovaccine		0.50±0.52	$4.80±1.03^{b}$	$6.30±0.94^{b}$	$7.10±0.87^{b}$
D	ND nanovaccine+HK-1		0.60±0.51	$5.50±0.97^{b}$	$7.30±1.05^{a}$	$7.50±0.84^{ab}$

حروف لاتین $^{(a,b,c,d)}$ غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده تفاوت بسیار معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱)

جدول ۲: میزان تحریک ایمنی سلولی علیه ویروس بیماری نیوکاسل در گروه های مورد مطالعه بر اساس میزان تورم بازوفیلی جلدی

Group	Discription	Foot index (CBH)/mm
C1	**PBS**	0.116±0.023 [d]
C2	**Chitosan**	0.124±0.030 [d]
C3	**inactivated NDV**	0.134±0.030 [d]
A	**oil-adj-ND vaccine**	1.240±0.130 [c]
B	**ND nanovaccine**	1.484±0.201 [b]
D	**ND nanovaccine+HK-1**	1.670±0.107 [a]

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



نمودار ۲: مقایسه مقدار FI در گروه های مختلف تیمار