نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۴؛ ۱۹(۲): ۷۱-۸۴.
http://doi.org10.22034/ijvcs.2026.14960.1096

تأثیر آنتی‌ژن ویروس عامل بیماری IPN بارگذاری شده در ذرات کیتوزان و در ماتریس آلژینات بر بیان ژن‌های IL-12، IL-17 و ترکیب گلبول‌های سفید خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

بهنام بختیاری مقدم[۱]، شفیق شفیعی[۱*]، صادق شیریان[۲*]، اسماعیل میرزایی[۳]، اعظم مختاری[۲]، زهره خورشیدوند[۴]

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
۳. گروه نانوفناوری پزشکی. دانشکده پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز - ایران.
۴. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی. دانشکده پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی همدان. همدان. ایران.

دریافت: ۸ اسفندماه ۱۴۰۴ **پذیرش:** ۳ خردادماه ۱۴۰۵

چکیده

بیماری نکروز عفونی پانکراس (Infectious pancreatic necrosis) یکی از چالش‌های اصلی صنعت آبزی‌پروری، به‌ویژه در پرورش ماهی قزل‌آلا است. این مطالعه باهدف بررسی تأثیر واکسن غیرفعال خوراکی حاوی آنتی‌ژن ویروس IPN بارگذاری‌شده در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات بر بیان ژن‌های *IL-12*، *IL-17*و ترکیب گلبول‌های سفید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. تعداد ۵۴۰ قطعه ماهی با میانگین وزن ۰/۵± ۳ گرم به شش گروه شامل کنترل، کنترل مثبت (نانوذرات بدون آنتی‌ژن) و چهار گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن آزاد (۰/۰۶ یا ۰/۱۲ سی‌سی به‌ازای هر ماهی) و نانوذرات حاوی آنتی‌ژن (۰/۰۶ یا ۰/۱۲ سی‌سی) تقسیم شدند. واکسیناسیون خوراکی در روزهای صفر و ۱۵ انجام و نمونه‌برداری در روز ۳۰ صورت گرفت. نتایج نشان داد که دریافت آنتی‌ژن، به‌ویژه در دوز بالاتر و همراه با نانوذرات، باعث افزایش معنی‌دار درصد لنفوسیت‌ها و کاهش معنی‌دار درصد نوتروفیل‌ها شد ($P<0/05$). بیان ژن *IL-12* در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن، به‌خصوص در دوز ۰/۱۲ سی‌سی و گروه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن با دوز ۰/۱۲ سی‌سی، افزایش معنی‌داری یافت ($P<0/05$)؛ درحالی‌که بیان *IL-17* تغییر معنی‌داری نشان نداد. نتیجه‌گیری می‌شود که بارگذاری آنتی‌ژن IPNV در نانوذرات کیتوزان - آلژینات به‌عنوان یک سامانه رهش کنترل‌شده، می‌تواند پاسخ‌های ایمنی تطبیقی از نوع Th1 را از طریق افزایش IL-12 تقویت کرده و ترکیب گلبول‌های سفید را به سمت ایمنی اختصاصی‌تر سوق دهد. بااین‌حال، سنجش تیتر آنتی‌بادی و آزمون چالش برای نتیجه‌گیری قطعی ضروری است.

واژه‌های کلیدی :ویروس نکروز عفونی پانکراس، نانوذرات کیتوزان، آلژینات، IL-12، IL-17، قزل‌آلای رنگین‌کمان،IPN

مقدمه

ویروس نکروز عفونی پانکراس (Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) با نام علمی جدید *Aquabirnavirus salmonidae*، یکی از شایع‌ترین ویروس‌ها در ماهی قزل‌آلا، به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان است. این ویروس به دلیل توانایی بالای خود در زنده‌ماندن در محیط‌های آبی، چالش‌های مهمی را برای پیشگیری و کنترل ایجاد می‌کند (۱۷). عامل بیماری‌زا،

* پست الکترونیک نویسندگان مسئول: sshafiei@sku.ac.ir و shirian85@gmail.com

ویروس IPN، متعلق به جنس *Aquabirnavirus* است و به‌عنوان یکی از پاتوژن‌های شایع در آبزیان شناخته می‌شود که عمدتاً بر روی اکثر گونه‌های آبزی تأثیر می‌گذارد. IPNV به‌صورت افقی و عمودی منتقل می‌شود و ماهی‌های زنده معمولاً ناقلین بدون علامت هستند که می‌توانند خطراتی برای فرزندان و سایر ماهی‌های مستعد ایجاد کنند (۵۷). IPNV یک ویروس بدون پوشش با کپسیدی شش‌وجهی به قطر ۶۰ نانومتر و ژنوم RNA دو رشته‌ای (dsRNA) است. ژنوم آن شامل دو بخش A و B است که به ترتیب تقریباً ۳۱۰۰ و ۲۷۸۴ جفت باز را شامل می‌شود. بخش A دارای دو قاب خوانش باز (Open reading frame (ORF)) است که ORF بزرگ‌تر پلی پروتئینی را کد می‌کند و به پروتئین کپسید اصلی (VP۲)، یک پروتئین کپسید داخلی (VP۳) و یک پروتئین غیرساختاری (VP۵) تقسیم می‌شود. بخش B نیز حاوی یک ORF است که RNA پلیمراز وابسته به RNA (VP۱) را کد می‌کند و این پروتئین هم به‌صورت پلی‌پپتیدی آزاد و هم به‌عنوان یک پروتئین مرتبط با ژنوم وجود دارد (۵۳). IPNV از نظر شدت و شیوع بالا بوده و تاکنون درمان مؤثری برای آن ارائه نشده است (۳۳).

واکسیناسیون بهترین روش پیشگیری از بیماری‌های ویروسی شناخته شده است. واکسن‌های IPN شامل انواع DNA، زیرواحد (Subunit)، ضعیف شده (Attenuated) و واکسن‌های غیرفعال (Inactivated Vaccines) هستند. واکسن غیرفعال به دلیل هزینه کم و کارایی بالا، انتخاب اصلی جهت تولید واکسن‌های تجاری است (۱۳). بااین‌حال، این نوع واکسن‌ها معایبی مانند پاسخ ایمنی ضعیف‌تر دارند که می‌توان با افزودن ادجوانت‌ها یا نانوذرات (Nano particles (NPs)) آن را بهبود بخشید (۳۴، ۶۳). استفاده از NPs برای تحویل خوراکی واکسن‌ها در ماهی مورد بررسی قرار گرفته است (۴،۲۲،۶۱). جذب روده‌ای آنتی‌ژن می‌تواند پاسخ ایمنی مناسبی ایجاد کند. کپسوله کردن واکسن به‌عنوان یک راهبُرد مناسب برای القای ایمنی در سطح مخاطی عمل می‌کند و می‌تواند پاسخ‌های ایمنی مختلفی را فعال کند (۲).

کیتوزان، یک بیوپلیمر طبیعی است که از استیل‌زدایی کیتین موجود در پوسته سخت‌پوستان به دست می‌آید. این ماده به دلیل سازگاری زیستی عالی، ایمنی‌زایی کم و کاهش سمیت سلولی، توجه قابل‌ملاحظه‌ای را برای نانوکپسوله‌سازی ذرات جلب کرده است. کیتوزان به‌عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده برای دارورسانی هدفمند، تحویل پروتئین و انتقال ژن شناخته می‌شود. خواص کاتیونی و چسبندگی مخاطی منحصربه‌فرد کیتوزان امکان پیوند پایدار با مواد درمانی را فراهم می‌کند و آن را در تحقیقات دارویی ارزشمند می‌سازد. مطالعات اخیر به‌طور فزاینده‌ای بر استفاده از کیتوزان به‌عنوان حامل واکسن در ماهی تمرکز کرده‌اند که اثربخشی آن را در نانوکپسوله کردن آنتی‌ژن‌ها برای تحویل موفقیت‌آمیز مخاطی و ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی علیه پاتوژن‌ها نشان می‌دهد (۳۰، ۳۱، ۴۵، ۶۰). آلژینات، عصاره‌ای از جلبک‌های قهوه‌ای است که به‌طور طبیعی در دسترس بوده و به‌عنوان یک پلی‌ساکارید در برخی باکتری‌ها یافت می‌شود. آلژینات از واحدهای مکرر پلی‌ساکاریدهای پلی‌آنیونی بدون شاخه مانند آلفا - ال - گولورونیک اسید و بتا-دی-مانورونیک‌اسید (β-D-mannuronic acid) تشکیل شده است (۲۸). این ماده زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار، غیرسمی، مقاوم در برابر اسید و چسبنده مخاطی است و برای تحویل واکسن خوراکی مناسب است (۵۲،۶۲). آلژینات در تحویل واکسن ماهی بیشتر به‌صورت فرمولاسیون ریزذرات استفاده شده و اخیراً گزارشی وجود دارد که نانوذرات آلژینات را برای واکسن خوراکی علیه *Ichthyophthirius multifiliis* در قزل‌آلا ارزیابی کرده است (۲۴).

اینترلوکین ۱۲ (IL-۱۲) یک سیتوکین کلیدی در سیستم ایمنی است که توسط سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها و لنفوسیت‌های B تولید می‌شود. این سیتوکین نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی و تطبیقی ایفا کرده و به تحریک سلول‌های T کمک‌کننده (Th1) و تولید اینترفرون گاما (IFN-γ) کمک می‌کند. IL-۱۲ همچنین در فعال‌سازی سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer cells) و

تقویت پاسخ ایمنی ضد تومور و ضد میکروب مؤثر است (۵۸). در ماهی قزل‌آلا، IL-۱۲ نقش مهمی در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و ویروسی دارد و به فعال‌سازی ماکروفاژها و تولید اینترفرون کمک می‌کند (۱۰). پس از واکسیناسیون، بیان IL-۱۲ افزایش می‌یابد، زیرا این سیتوکین در فعال‌سازی سلول‌های T و تقویت پاسخ ایمنی نقش دارد. این افزایش به‌ویژه در واکسن‌های حاوی ادجوانت مشهود است (۶۵).

اینترلوکین ۱۷ (IL-17) به‌ویژه IL-17A ، یک سیتوکین التهابی است که توسط سلول‌های Th ۱۷تولید می‌شود. این سیتوکین در پاسخ به عفونت‌های قارچی و باکتریایی نقش دارد و همچنین در بیماری‌های خودایمنی مانند پسوریازیس و آرتریت روماتوئید دخیل است. IL-17 باعث تحریک تولید سیتوکین‌های التهابی دیگر مانند IL-6 و TNF- α می‌شود و در رگ‌زایی و التهاب بافتی نقش دارد (۳). این سیتوکین می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای ارزیابی سلامت سیستم ایمنی ماهی مورداستفاده قرار گیرد (۵۱). بیان IL-17 نیز ممکن است پس از واکسیناسیون افزایش یابد، به‌ویژه در واکسن‌هایی که پاسخ ایمنی Th ۱۷ را تحریک می‌کنند. این افزایش می‌تواند در ایجاد حافظه ایمنی و محافظت در برابر عفونت‌های مخاطی مفید باشد (۴۰). به دنبال تجویز واکسن ترکیب سلول‌های خونی ماهیان دچار تغییراتی می‌شود که به‌منظور بررسی کارایی واکسن و اثرات احتمالی بررسی تغییرات تابلوی خونی حائز اهمیت است (۵۵). باتوجه‌به اهمیت بیماری IPN این مطالعه باهدف بررسی تأثیر آنتی‌ژن ویروس عامل بیماری IPN بارگذاری شده در ذرات کیتوزان و در ماتریس آلژینات بر بیان ژن‌های IL-12، IL-17- و تابلوی گلبول‌های سفید خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت.

مواد و روش کار

۵۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سالم با میانگین وزن ۰/۵± ۳ گرم از یک مرکز تکثیر و نگهداری ماهی در استان چهارمحال‌وبختیاری (شهرکرد) تهیه شد. این ماهی‌ها در آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه شهرکرد در تانک‌های ونیرو (۲۰۰ لیتری) در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعویض آب به میزان ۳۰ درصد یک روز در میان انجام شد. ماهی‌ها به‌طور روزانه با خوراک اکسترود ۳ STF شرکت فرادانه به میزان ۲ درصد وزن بدن در ۳ وعده تغذیه شدند. سپس ماهی‌ها به‌صورت تصادفی به ۶ گروه با ۳ تکرار (هر گروه شامل ۳۰ ماهی) تقسیم شدند. قبل از واکسیناسیون، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته در آزمایشگاه سازگار شدند و تمامی دستورالعمل‌های مربوط به مراقبت و استفاده از حیوانات رعایت گردید.

یک جدایه رایج از IPNV حدت دار (شماره دسترسی بانک ژن KX665156) در سلول‌های CHSE-۲۱۴ برای انتقال آنتی‌ژن، سنجش ایمنی و چالش ماهی تکثیر شد. سلول‌ها در محیط حداقل ضروری (MEM) حاوی ۱۰٪ FBS، L-glutamine ، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین G و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. ویروس در محیط کشت تکثیر گردید و پس از چند روز، مایع رویی حاوی ویروس جمع‌آوری و سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها و بقایای سلولی جدا شوند. پس از عبور از فیلتر، تغلیظ ویروس با استفاده از اولتراسانتریفیوژ انجام شد. تیتراسیون ویروس بر اساس روش‌های معمول صورت گرفت (۵۰). ویروس با ۵۰ TCID برابر با 10^6 برای تهیه آنتی‌ژن غیرفعال استفاده شد. ویروس تغلیظ‌شده در دمای بالا (۶۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شد تا غیرفعال گردد. برای آزمایش غیرفعال‌سازی، سلول‌های CHSE تازه با مقادیر بیش از حد مایع رویی ویروس غیرفعال شده انکوبه شدند و هیچ CPE یا سمیت سلولی پس از ۷ روز مشاهده نشد (۱۵).

کیتوزان و آلژینات از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. برای نانوذرات کیتوزان از روش دپروتونه کردن محلول کیتوزان استفاده گردید. در این روش، پودر کیتوزان به همراه آنتی‌ژن (۵۰ TCID برابر با 10^6) در اسید استیک کمتر از

۱ درصد حل شده و سپس با اضافه‌کردن قلیا ذرات موردنظر تشکیل گردید. میزان افزودن آنتی‌ژن به کیتوزان به‌ازای هر قطعه ماهی ۰/۰۶ سیسی محاسبه شد. ذرات تشکیل‌شده سپس در محلول آلژینات قرار داده شده و با روش تبخیر حلال و تشکیل فیلم در بستر آلژینات قرار گرفتند (۲۳). تحلیل‌های مربوط به رهایش آنتی‌ژن، مقاومت نانوذره، توزیع آنتی‌ژن، اندازه و بار الکتریکی و اندازه نانوذرات انجام شد و پس از تأیید ویژگی‌های کمی و کیفی نانو واکسن خوراکی ساخته شده، کارآزمایی بالینی انجام گرفت. برای این منظور فیلم نهایی برای تجویز به ماهی‌ها با استفاده از آسیاب به ذرات ریز تبدیل و مورداستفاده قرارگرفت. برای تهیه واکسن خوراکی، نانوذرات آسیاب شده حاوی آنتی‌ژن ابتدا در روغن مخلوط شده و سپس به جیره غذایی ماهی‌ها اضافه شد. گروه‌بندی و تیمارهای موردمطالعه به شرح زیر بود:

* گروه کنترل: صرفاً با خوراک تجاری تغذیه شدند.
* گروه کنترل مثبت: نانوذرات کیتوزان و آلژینات به خوراک اضافه شد (به میزان مشابه گروه‌های کارآزمایی).
* گروه کارآزمایی با ویروس ۱: در این گروه آنتی‌ژن غیرفعال به میزان ۰/۰۶ سیسی به‌ازای هر ماهی به خوراک مصرفی اضافه شد.
* گروه کارآزمایی با ویروس ۲: در این گروه آنتی‌ژن غیرفعال به میزان ۰/۱۲ سیسی به‌ازای هر ماهی به خوراک مصرفی اضافه شد.
* گروه کارآزمایی با نانوذرات حاوی ویروس ۱: در این گروه نانوذره حاوی آنتی‌ژن غیرفعال به میزان ۰/۰۶ سیسی (به‌ازای هر ماهی) به خوراک مصرفی اضافه شد.
* گروه کارآزمایی با نانوذرات حاوی ویروس ۲: در این گروه نانوذره حاوی آنتی‌ژن غیرفعال (به میزان ۰/۱۲ سیسی) به‌ازای هر ماهی به خوراک مصرفی اضافه شد.

برای انجام واکسیناسیون خوراکی، ابتدا ماهی‌ها به مدت ۲۴ ساعت از غذا محروم شدند. واکسیناسیون در روزهای صفر و ۱۵ انجام گردید. در روز ۳۰ پس از واکسیناسیون اول، تعداد ۱۰ ماهی از هر گروه با استفاده از پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم پودر به‌ازای هر لیتر آب) بیهوش شده و پس از آسان کشی نمونه خون، طحال، کبد و کلیه‌ها اخذ گردید.

برای خون‌گیری از روش قطع دم استفاده شد. یک قطره خون از هر ماهی بر روی تیغه قرار داده شد و با استفاده از تیغه دیگر گسترش خونی تهیه گردید. پس از خشک‌شدن گسترش خونی در مجاورت هوا، رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ کریستال ویولت انجام شد. گسترش‌های خونی تهیه‌شده تحت میکروسکوپ نوری مشاهده و درصد گلبول‌های سفید خون برای هر گروه ثبت شد.

کبد، طحال و کلیه ماهی‌های نمونه‌گیری شده با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند. سپس فرایند استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج DNA/RNA شرکت سیناکلون و مطابق با پروتکل ارائه‌شده توسط سازنده انجام گردید. برای حذف DNAهای آلوده‌کننده، RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون، کد MO5401) تیمار گردید. RNA استخراج‌شده به‌منظور سنتز cDNA، با استفاده از پروتکل کیت سنتز cDNA (سیناکلون، ایران) به cDNA تبدیل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید .لازم به ذکر است که پرایمرهای طراحی‌شده از نوع اگزون - جانکشن (Exon-Junction) نبوده و بر اساس توالی ناحیه کدکننده (CDS) طراحی شدند؛ بنابراین، برای جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی آلوده‌کننده، پیش از مرحله سنتز cDNA، نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I تیمار شدند .برای انجام واکنش PCR، پرایمرهای مورد نیاز بر اساس داده‌های موجود در پایگاه NCBI طراحی و برای ساخت به شرکت سیناکلون ارسال شدند (جدول ۱). حجم نهایی نمونه برای واکنش PCR برابر با ۱۴ میکرولیتر بود که شامل ۷ میکرولیتر مسترمیکس حاوی سایبرگرین، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۰/۷۵ میکرولیتر cDNA و ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر موردنظر بود. پروتکل qRT-PCR در سه مرحله و بر اساس پروتکل توصیه‌شده توسط شرکت آمپلیکون اجرا شد. هر نمونه در سه تکرار مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. سطوح بیان mRNA با استفاده از qRT-PCR

و بر اساس روش لیواک و بر مبنای $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد. منحنی ذوب هر آمپلیکون نیز بررسی گردید. بیان ژن‌های هدف نسبت به بیان کنترل درون‌زا (EF-1 alpha) تصحیح شد و تغییرات نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید (۳۶).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورداستفاده برای qRT PCR

ردیف	ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	توالی معکوس
۱	IL-12 p35a1	HE798148	GGAACACCACATTCAGTGAGAGTGC	CGTCTGCAACTTGTGAGGAAGGAT
۲	IL-17A	AJ580842	CGTGTCGAAGTACCTGGTTGTGT	GGTTCTCCACTGTAGTGCTTTTCCA
۳	EF-1 alpha	AF498320	GATCCAGAAGGAGGTCACCA	TTACGTTCGACCTTCCATCC

به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن توزیع دیتاها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس با استفاده از آزمون Levene's Test مورد آزمایش قرار گرفت. سپس آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ در این تحقیق انجام شد. مقایسه‌های چندگانه توکی برای شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها مورداستفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد در همه گروه‌ها ارائه شد.

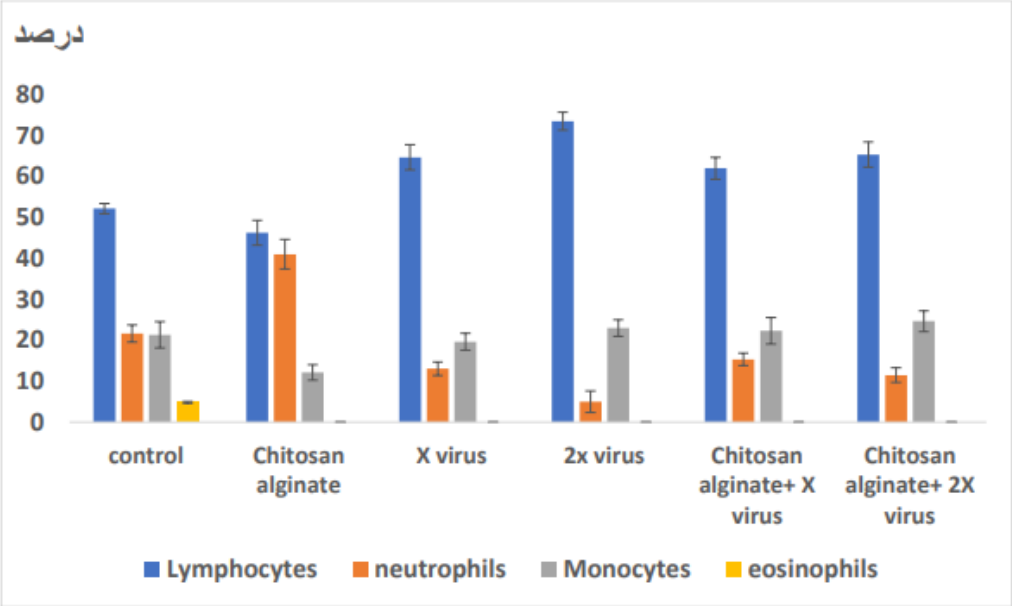
نتایج

نتایج نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن به‌طورکلی میزان لنفوسیت‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و کیتوزان آلژینات افزایش معنادار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) به دنبال افزایش دوز آنتی‌ژن ویروس میزان افزایش درصد لنفوسیت‌های خون افزایش قابل‌توجه‌تری را نشان داد و بیشترین میزان لنفوسیت خون به ترتیب در گروه‌های ویروس با دوز ۰/۱۲ و گروه کیتوزان آلژینات + ۰/۱۲ ویروس ثبت گردید (شکل شماره ۱ و شکل شماره۲). پاسخ تعدیل شده ایمنی در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن در ترکیب با کیتوزان و آلژینات نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن به‌تنهایی قابل‌استنباط بود ($P<۰/۰۵$).

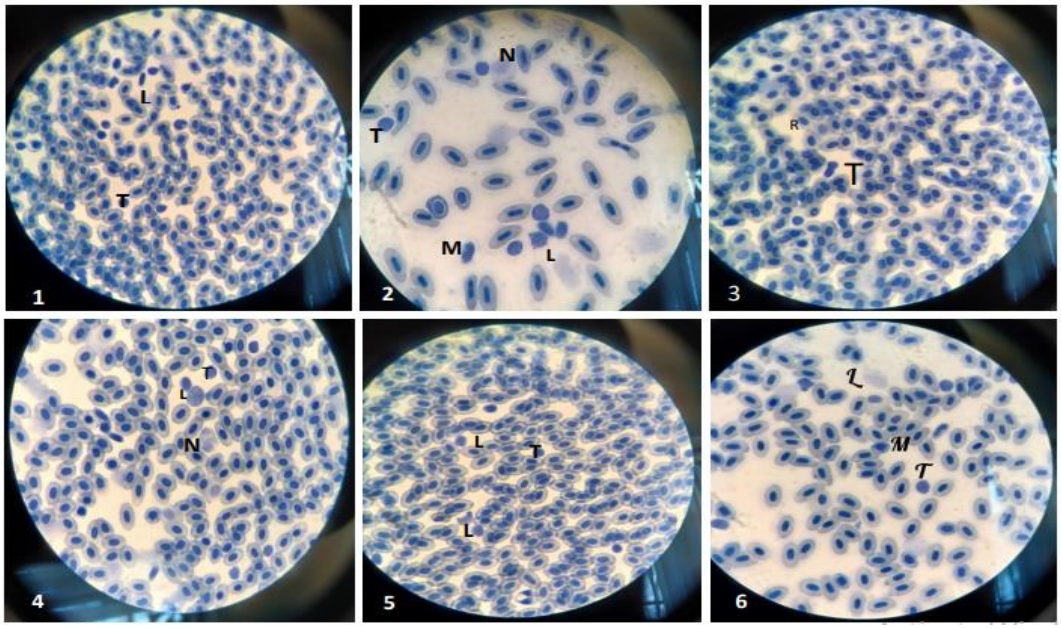
در بررسی میزان درصد نوتروفیل‌های خون بیشترین درصد نوتروفیل در گروه‌های کنترل و کیتوزان - آلژینات مشاهده و اختلاف معنادار آماری با سایر گروه‌های کارآزمایی ثبت گردید ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان درصد نوتروفیل‌های خون به‌صورت واضح در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن با اختلاف معنادار آماری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) (شکل‌های ۱ و ۲).

کمترین میزان درصد مونوسیت‌های خون با اختلاف معنادار آماری نسبت به سایر گروه‌ها در گروه کیتوزان - آلژینات مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). در میان سایر گروه‌ها اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (شکل‌های ۱ و ۲).

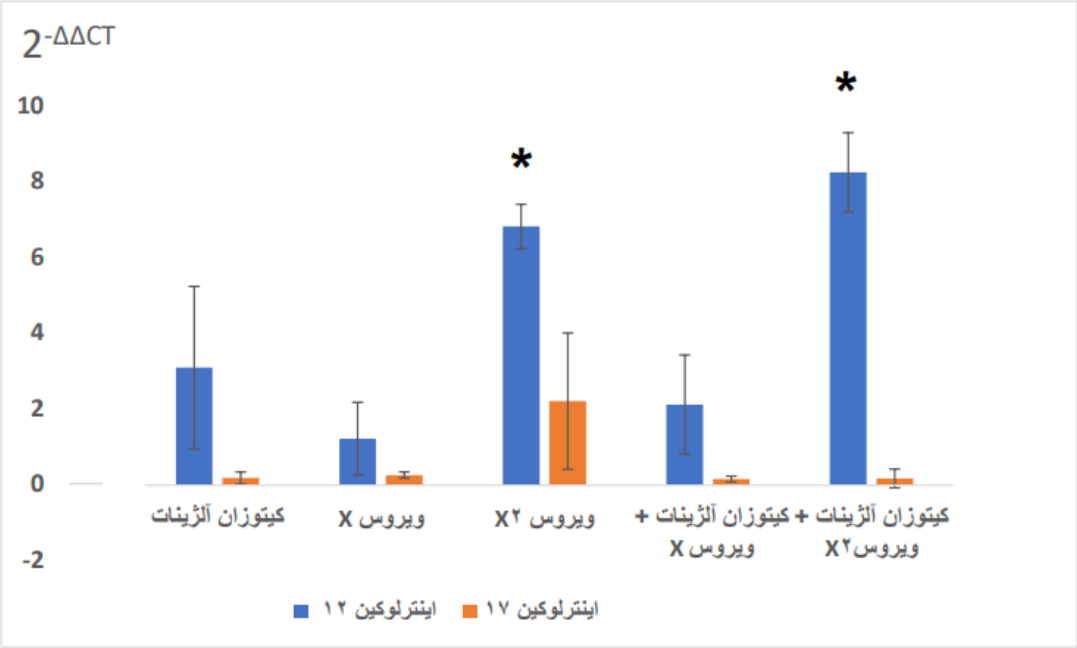
بررسی نتایج بیان ژن اینترلوکین ۱۲ در روز ۳۰ پس از تجویز خوراکی آنتی‌ژن در گروه‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن و اختلاف معنادار با سایر گروه‌ها به ترتیب در گروه کارآزمایی با آنتی‌ژن با دوز ۰/۱۲ و گروه کیتوزان آلژینات +ویروس با دوز۰/۱۲ ثبت شد ($P<۰/۰۵$). میان گروه کارآزمایی با آنتی‌ژن با دوز ۰/۱۲ و گروه کیتوزان آلژینات+ ویروس با دوز۰/۱۲ اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) .در بررسی میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۷ در میان گروه‌های مختلف اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (شکل شماره ۳).



شکل ۱- درصد گلبول‌های سفید خون در گروه‌های مختلف در روز ۳۰ پس از واکسیناسیون خوراکی



شکل ۲- شکل میکروسکوپی از گسترش خونی گروه‌های مختلف در روز ۳۰ پس از واکسیناسیون. ۱. گروه کنترل، ۲. گروه کارآزمایی با کیتوزان آلژینات ۳. گروه ویروس با غلظت۰/۰۶، ۴. گروه کارآزمایی با ویروس با غلظت ۰/۱۲، ۵. گروه کارآزمایی با کیتوزان آلژینات+ ویروس با غلظت ۰/۰۶ و ۶. گروه کارآزمایی با کیتوزان آلژینات+ویروس با غلظت۰/۱۲ . ***R*** (گلبول‌های قرمز)، ***T*** (ترومبوسیت)، ***N*** (نوتروفیل)، ***L*** (لنفوسیت)، ***M*** (مونوسیت).



شکل ۳- میزان بیان ژن‌های اینترلوکین ۱۲ و ۱۷ در گروه‌های مختلف در روز ۳۰ پس از تجویز خوراکی آنتی‌ژن ویروس *IPN* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنادار آماری است P<۰,۰۵)

بحث

IPNV تهدیدی جدی برای صنعت آبزی‌پروری در سراسر جهان، از جمله ایران، محسوب می‌شود و به دلیل تأثیرات اقتصادی شدید بر صنعت آبزی‌پروری، به‌ویژه در ماهی‌های قزل‌آلا از اهمیت بالایی برخوردار است. این ویروس می‌تواند باعث مرگ‌ومیر بالا در ماهی‌های جوان و در ماهی‌های بالغ نیز ممکن است باعث کاهش رشد و افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها شود (۱۲). ازآنجایی‌که این ویروس بسیار مسری است، کنترل آن در مزارع پرورش ماهی بسیار دشوار است. واکسیناسیون علیه ویروس IPNV می‌تواند به طور قابل‌توجهی از تلفات ناشی از این بیماری بکاهد و سلامت ماهیان را بهبود بخشد. واکسیناسیون نه‌تنها باعث کاهش مرگ‌ومیر می‌شود، بلکه می‌تواند از شیوع بیماری در مزارع پرورش ماهی نیز جلوگیری کند (۳۲). ما در این مطالعه از واکسن کشته شده و به روش خوراکی استفاده نمودیم. واکسیناسیون خوراکی یکی از روش‌های نوین و مؤثر در واکسیناسیون ماهیان است که دارای مزایایی از جمله سهولت در استفاده، کاهش هزینه‌ها، قابلیت استفاده در مقیاس بزرگ و قابلیت تحریک ایمنی مخاطی است (۴۹). Ph دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلا به‌شدت اسیدی بوده و ساختارهای پروتئینی نظیر آنتی‌ژن‌ها در این محیط دستخوش تغییرات می‌گردد. به‌منظور افزایش جذب آنتی‌ژن و کاهش اثرات محیطی، آنتی‌ژن تهیه شده را انکپسوله نمودیم (۶). همچنین برای تأثیرگذاری بیشتر آزادسازی آنتی‌ژن را به‌صورت آهسته رهش و در Ph قلیایی روده ماهی تنظیم نمودیم. کیتوزان استفاده شده به‌منظور انکپسوله نمودن آنتی‌ژن علاوه بر خاصیت محافظتی دارای خاصیت چسبندگی به موکوس بوده و جذب آنتی‌ژن را در سطح مخاط روده افزایش می‌دهد (۲۶، ۵۹).

واکسن‌های کشته شده قادر به ایجاد بیماری نیستند، اما می‌توانند سیستم ایمنی ماهی را تحریک کنند تا آنتی‌بادی‌های محافظتی تولید کند. این واکسن‌ها در برابر تغییرات دما و شرایط محیطی پایدارتر هستند (۴۱). در این مطالعه ما از دوز یادآوار استفاده نمودیم چرا که واکسن‌های کشته معمولاً ایمنی کوتاه‌مدت ایجاد می‌کنند و نیاز به دوزهای تقویتی دارند. این واکسن‌ها بیشتر ایمنی هومورال (تولید آنتی‌بادی) را تحریک می‌کنند و ممکن است ایمنی سلولی قوی ایجاد نکنند (۵۴). کنترل آهسته‌رهش آنتی‌ژن ویروس علاوه بر تحریک طولانی‌تر سیستم ایمنی، سبب تعدیل پاسخ ایمنی میزبان و ایجاد ایمنی پایدارتر می‌گردد (۲۱).

در این مطالعه آنتی‌ژن ویروس را در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات انکپسوله و بارگذاری نمودیم. بارگذاری آنتی‌ژن‌های ویروسی در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات موضوعی است که در سال‌های اخیر توجه زیادی را در حوزه واکسن‌ها و سیستم‌های دارورسانی هدفمند به خود جلب کرده است. این سیستم‌ها به دلیل خواص زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی در بهبود پاسخ ایمنی، به‌عنوان گزینه‌های امیدوارکننده برای تحویل آنتی‌ژن‌ها و القای ایمنی مؤثر موردمطالعه قرار گرفته‌اند (۵،۲۹). کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از دی استیلاسیون کیتین به دست می‌آید. بارگذاری آنتی‌ژن در نانوذرات کیتوزان سبب افزایش پایداری آنتی‌ژن، بهبود تحویل آنتی‌ژن و هدف‌گیری بهتر از طریق اتصال به سلول‌های هدف می‌گردد. کیتوزان به دلیل خاصیت چسبندگی به مخاط، می‌تواند جذب آنتی‌ژن‌ها را در مخاط‌های بدن (مانند مخاط بینی یا روده) افزایش دهد. این ویژگی به‌ویژه برای واکسن‌های مخاطی مفید است. نانوذرات کیتوزان می‌توانند به‌عنوان ادجوانت عمل کنند و پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی را تقویت کنند. این نانوذرات باعث فعال‌شدن ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌شوند و تولید سیتوکین‌های التهابی را افزایش می‌دهند (۱۱، ۱۸، ۶۴). از دیگر سو آلژینات یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از جلبک‌های قهوه‌ای استخراج می‌شود و به دلیل خواص زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی تشکیل هیدروژل، در سیستم‌های دارورسانی و مهندسی بافت استفاده می‌شود. ماتریس‌های آلژینات می‌توانند به‌گونه‌ای طراحی شوند که آنتی‌ژن‌ها را به‌صورت کنترل شده و پایدار رهاسازی کنند. این ویژگی برای القای پاسخ ایمنی طولانی‌مدت مفید است. آلژینات می‌تواند آنتی‌ژن‌ها را در برابر تخریب آنزیمی و شرایط اسیدی معده محافظت کند که این امر به‌ویژه برای واکسن‌های خوراکی مهم است. همچنین آلژینات به‌خوبی با مخاط بدن سازگار است و می‌تواند جذب آنتی‌ژن‌ها را در سطوح مخاطی بهبود بخشد (۱، ۱۶، ۳۸).

نتایج بررسی گسترش خون ماهی‌های قزل‌آلا در روز ۳۰ پس از اولین تجویز خوراکی واکسن، در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن ویروس افزایش قابل‌توجه تعداد لنفوسیت‌های خون و کاهش نوتروفیل‌ها را نشان داد. لنفوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های کلیدی در سیستم ایمنی تطبیقی شناخته می‌شوند و نقش اصلی را در پاسخ ایمنی به آنتی‌ژن‌های ویروسی ایفا می‌کنند. بارگذاری آنتی‌ژن ویروس IPN در نانوذرات کیتوزان و آلژینات باعث تحریک قوی‌تر سیستم ایمنی می‌شود (۲۰). این نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و خاصیت زیست‌سازگاری، به‌راحتی توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs) جذب می‌شوند. این فرایند منجر به فعال‌سازی لنفوسیت‌های T و B می‌شود که در نهایت باعث افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در خون محیطی می‌گردد (۴۷). مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات کیتوزان و آلژینات به دلیل خاصیت تقویت‌کننده ایمنی خود، باعث افزایش بیان سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین‌های ۲ و ۱۲ (IL-2 و IL-12) و اینترفرون گاما (IFN-γ) می‌شوند. این سیتوکین‌ها نقش مهمی در تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها ایفا می‌کنند و در نتیجه تعداد لنفوسیت‌ها در خون محیطی افزایش می‌یابد (۲۷، ۳۵). نوتروفیل‌ها به‌عنوان سلول‌های ایمنی ذاتی، اولین خط دفاعی در برابر عفونت‌های باکتریایی و قارچی هستند. بااین‌حال، در پاسخ به عفونت‌های ویروسی،

نقش آنها کمتر برجسته است (۳۹). بارگذاری آنتی‌ژن ویروس IPN در نانوذرات کیتوزان و آلژینات باعث کاهش تعداد نوتروفیل‌ها در خون محیطی می‌شود. این کاهش ممکن است به دلیل تغییر تمرکز سیستم ایمنی از پاسخ ذاتی به پاسخ تطبیقی باشد (۵۶). در پاسخ به واکسیناسیون، سیستم ایمنی بدن ماهی بیشتر بر فعال‌سازی لنفوسیت‌ها متمرکز می‌شود تا نوتروفیل‌ها. این تغییر ممکن است به دلیل کاهش نیاز به پاسخ التهابی شدید باشد، زیرا نانوذرات به طور مؤثر آنتی‌ژن را به سیستم ایمنی عرضه می‌کنند و نیاز به حضور گسترده نوتروفیل‌ها را کاهش می‌دهند (۷). در گروه کنترل مثبت که تنها کیتوزان و آلژینات را دریافت کردند، مشاهده شد که تعداد نوتروفیل‌ها افزایش‌یافته و تعداد لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها کاهش‌یافته است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که کیتوزان و آلژینات به‌تنهایی نیز می‌توانند تأثیرات قابل‌توجهی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلا داشته باشند. کیتوزان و آلژینات به‌تنهایی می‌توانند به‌عنوان محرک‌های التهابی عمل کنند و باعث فعال‌سازی مسیرهای ایمنی ذاتی شوند (۸). این مواد به دلیل ساختار پلی‌ساکاریدی خود، می‌توانند توسط گیرنده‌های تشخیص الگو مانند TLRs شناسایی شوند. این شناسایی منجر به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ التهابی مانند κB-NF و تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی (مانند IL-1β، α-TNF، و IL-6) می‌شود. این سیتوکین‌ها باعث افزایش جذب و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها در خون محیطی می‌شوند (۴۲،۳۷). علاوه بر این، کیتوزان به دلیل خاصیت کاتیونی خود، می‌تواند به غشای سلولی متصل شود و باعث فعال‌سازی ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها شود. این فرایند منجر به افزایش تعداد نوتروفیل‌ها در خون محیطی می‌گردد (۴۶).

در مطالعه حاضر، نتایج تأثیر واکسیناسیون خوراکی با استفاده از آنتی‌ژن ویروس IPNبارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات بر بیان ژن‌های اینترلوکین۱۲ و اینترلوکین۱۷ در بافت‌های کبد، طحال و کلیه ماهی قزل‌آلا نشان داد که در روز ۳۰ پس از واکسیناسیون، بیان ژن اینترلوکین ۱۲ افزایش یافت، درحالی‌که بیان ژن اینترلوکین ۱۷ تغییر معناداری نداشت. این الگوی بیان ژن در هر دو گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات و گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن بدون این حامل‌ها مشاهده شد. اینترلوکین۱۲ یک سایتوکاین کلیدی در پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی است که توسط سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها تولید می‌شود (۲۵). لینترلوکین ۱۲ نقش مهمی در القای پاسخ ایمنی سلولی از طریق تحریک تمایز سلول‌های T کمک‌کننده (Th۱) و تولید اینترفرون - گاما دارد. افزایش بیان IL-12 در بافت‌های کبد، طحال و کلیه ماهی قزل‌آلا نشان می‌دهد که آنتی‌ژن ویروس IPN، چه به‌تنهایی و چه در ترکیب با نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات، توانسته است پاسخ ایمنی ذاتی را فعال کند. این فعال‌سازی ممکن است ناشی از تحریک گیرنده‌های تشخیص الگو مانند TLR ها باشد که توسط آنتی‌ژن‌های ویروسی یا نانوذرات کیتوزان فعال می‌شوند (۱۹،۱۴). از دیگر سو کیتوزان به دلیل خواص ادجوانتی و توانایی در فعال‌سازی ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک، می‌تواند تولید IL-12 را افزایش دهد. بااین‌حال، در این مطالعه، افزایش IL-12 در گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن بدون کیتوزان و آلژینات نیز مشاهده‌شده که نشان می‌دهد خود آنتی‌ژن ویروسی نیز به‌تنهایی قادر به تحریک این پاسخ بوده است. در واقع انکپسوله نمودن آنتی‌ژن سبب آزادسازی کنترل شده و تعدیل پاسخ ایمنی در ماهی شده است (۴۸).

از دیگر سو اینترلوکین ۱۷ یک سیتوکین التهابی است که توسط سلول‌های Th۱۷ تولید می‌شود و نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی ضدباکتریایی و التهابی دارد (۴۰). بااین‌حال، در این مطالعه، بیان IL-17 در هیچ یک از گروه‌ها تغییر معناداری نداشت. آنتی‌ژن‌های ویروسی مانند IPN ممکن است بیشتر پاسخ‌های Th ۱ را تحریک کنند تا پاسخ‌های Th۱۷. اگرچه ویروس‌های زنده مسیر سلولی (MHC-I) و Th1 را تحریک می‌کنند، اما واکسن کشته شده مورداستفاده در این مطالعه، عمدتاً انتظار می‌رود که پاسخ هومورال را تحریک کند این موضوع با یافته‌های سایر مطالعات مطابقت

دارد که نشان می‌دهند عفونت‌های ویروسی تمایل به القای پاسخ‌های Th ۱ دارند. اگرچه کیتوزان و آلژینات می‌توانند پاسخ‌های ایمنی را تقویت کنند، اما ممکن است تأثیر خاصی بر مسیر Th۱۷ نداشته باشند (۹، ۴۳، ۴۴). این موضوع نیاز به بررسی بیشتر دارد. همچنین ممکن است تغییرات در بیان IL-17 در زمان‌های دیگر (زودتر یا دیرتر از روز ۳۰) رخ‌داده باشد.

به‌طورکلی، بارگذاری آنتی‌ژن‌های ویروسی در نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات یک راهبُرد امیدوارکننده برای بهبود اثربخشی واکسن‌ها و سیستم‌های دارورسانی است. این سیستم‌ها می‌توانند پایداری آنتی‌ژن را افزایش دهند، پاسخ ایمنی را تقویت کنند و رهایش کنترل شده آنتی‌ژن را ممکن سازند. این روش نه‌تنها باعث افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در خون محیطی می‌شود، بلکه با کاهش تعداد نوتروفیل‌ها، نشان‌دهنده تغییر تمرکز سیستم ایمنی از پاسخ ذاتی به پاسخ تطبیقی است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که نانوذرات کیتوزان و آلژینات می‌توانند به‌عنوان یک سیستم تحویل آنتی‌ژن مؤثر در واکسیناسیون آبزیان مورداستفاده قرار گیرند. این مطالعه نشان داد که واکسیناسیون خوراکی با آنتی‌ژن ویروس IPN، در ترکیب با نانوذرات کیتوزان و ماتریس آلژینات، منجر به افزایش بیان ژن IL-12 در بافت‌های کبد، طحال و کلیه ماهی قزل‌آلا می‌شود. شواهد موجود برای نتیجه‌گیری قطعی در مورد تحریک مسیر Th1 کافی نیست و افزایش مشاهده‌شده IL-12 می‌تواند به فعال‌سازی ایمنی ذاتی نسبت داده شود. برای بهینه‌سازی این سیستم واکسیناسیون، مطالعات بیشتری در مورد دوز، فرمولاسیون و دینامیک پاسخ ایمنی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Abourehab MA, Rajendran RR, Singh A, Pramanik S, Shrivastav P, Ansari MJ, Manne R, Amaral LS, Deepak A. Alginate as a promising biopolymer in drug delivery and wound healing: A review of the state-of-the-art. International Journal of Molecular Sciences. 2022 Aug 12;23(16):9035.
2. Ahmadivand S, Soltani M, Behdani M, Evensen Ø, Alirahimi E, Hassanzadeh R, Soltani E. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. Developmental & Comparative Immunology. 2017 Sep 1;74:178-189.
3. Akhter S, Tasnin FM, Islam MN, Rauf A, Mitra S, Emran TB, Alhumaydhi FA, Ahmed Khalil A, Aljohani AS, Al Abdulmonem W, Thiruvengadam M. Role of Th17 and IL-17 Cytokines on Inflammatory and Auto-immune Diseases. Current Pharmaceutical Design. 2023 Jul 1;29(26):2078-2090.
4. Ballesteros NA, Alonso M, Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI. An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss). Fish & shellfish immunology. 2015 Aug 1;45(2):877-888.
5. Boroumand H, Badie F, Mazaheri S, Seyedi ZS, Nahand JS, Nejati M, Baghi HB, AbbasiKolli M, Badehnoosh B, Ghandali M, Hamblin MR. Chitosan-based nanoparticles against viral infections. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021 Mar 17;11:643953.
6. Cabillon NA, Lazado CC. Mucosal barrier functions of fish under changing environmental conditions. Fishes. 2019 Jan 10;4(1):2.
7. Campbell JH, Dixon B, Whitehouse LM. The intersection of stress, sex and immunity in fishes. Immunogenetics. 2021 Feb;73(1):111-129.
8. Chang J, Zhu W, Huo X, Qiao M, Yang C, Zhang Y, Su J. Oral Lactobacillus casei

engineering and regenerative medicine. Marine Drugs. 2023 Mar 18;21(3):189.
17. Fayaz I, Bhat RA, Tandel RS, Dash P, Chandra S, Dubey MK, Ganie PA. Comprehensive review on infectious pancreatic necrosis virus. Aquaculture. 2023 Sep 15;574:739737.
18. Gaglio SC, Perduca M, Zipeto D, Bardi G. Efficiency of chitosan nanocarriers in vaccinology for mucosal immunization. Vaccines. 2023 Aug 6;11(8):1333.
19. Gao H, Li K, Ai K, Geng M, Cao Y, Wang D, Yang J, Wei X. Interleukin-12 induces IFN-γ secretion and STAT signaling implying its potential regulation of Th1 cell response in Nile tilapia. Fish & Shellfish Immunology. 2023 Sep 1;140:108974.
20. Giri SS, Kim SG, Kang JW, Kim SW, Kwon J, Lee SB, Jung WJ, Park SC. Applications of carbon nanotubes and polymeric micro-/nanoparticles in fish vaccine delivery: progress and future perspectives. Reviews in Aquaculture. 2021 Sep;13(4):1844-1863.
21. Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, Khan W. A comprehensive review of mRNA vaccines. International journal of molecular sciences. 2023 Jan 31;24(3):2700.
22. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2013 Mar 25;3:13.
23. Halimi M, Alishahi M, Abbaspour MR, Ghorbanpoor M, Tabandeh MR. Valuable method for production of oral vaccine by using alginate and chitosan against Lactococcus garvieae/Streptococcus iniae in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish & shellfish immunology. 2019 Jul 1;90:431-9.
24. Heidarieh M, Moodi S, Katuli KK, Unger H. Biochemical effects of encapsulated radiovaccine via alginate nanoparticles as expressing VP56310–500 and adjuvant flagellin C delivered by alginate-chitosan microcapsules remarkably enhances the immune protection against GCRV infection in grass carp. Aquaculture. 2023 Mar 30;567:739301.
9. Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Fuentes-Pananá EM. Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. Journal of oncology. 2013;2013(1):835956.
10. Collet B. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. Developmental & Comparative Immunology. 2014 Apr 1;43(2):160-173.
11. Dmour I, Islam N. Recent advances on chitosan as an adjuvant for vaccine delivery. International Journal of Biological Macromolecules. 2022 Mar 1;200:498-519.
12. Dopazo CP. The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known. Pathogens. 2020 Feb 4;9(2):94.
13. Duan K, Tang X, Zhao J, Ren G, Shao Y, Lu T, He B, Xu L. An inactivated vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish & Shellfish Immunology. 2022 Aug 1;127:48-55.
14. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. Frontiers in immunology. 2022 Mar 3;13:812774.
15. Elveborg S, Monteil VM, Mirazimi A. Methods of inactivation of highly pathogenic viruses for molecular, serology or vaccine development purposes. Pathogens. 2022 Feb 19;11(2):271.
16. Farshidfar N, Iravani S, Varma RS. Alginate-based biomaterials in tissue

31. Kole S, Kumari R, Anand D, Kumar S, Sharma R, Tripathi G, Makesh M, Rajendran KV, Bedekar MK. Nanoconjugation of bicistronic DNA vaccine against Edwardsiella tarda using chitosan nanoparticles: Evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in Labeo rohita vaccinated by different delivery routes. Vaccine. 2018 Apr 12;36(16):2155- 165.
32. Kumar A, Middha SK, Menon SV, Paital B, Gokarn S, Nelli M, Rajanikanth RB, Chandra HM, Mugunthan SP, Kantwa SM, Usha T. Current challenges of vaccination in fish health management. Animals. 2024 Sep 16;14(18):2692.
33. Lakshmi B, Syed S, Buddolla V. Current advances in the protection of viral diseases in aquaculture with special reference to vaccination. Recent developments in applied microbiology and biochemistry. 2019 Jan 1:127-146.
34. Li L, Liu W, Zhang Z, Zhao J, Lu T, Shao Y, Xu L. IPNV Inactive Vaccine Supplemented with GEL 02 PR Adjuvant: Protective Efficacy, Cross-protection, and Stability. Fish & Shellfish Immunology. 2025 Jan 30:110167.
35. Lima BV, Oliveira MJ, Barbosa MA, Goncalves RM, Castro F. Immunomodulatory potential of chitosan-based materials for cancer therapy: a systematic review of in vitro, in vivo and clinical studies. Biomaterials Science. 2021;9(9):3209-3227.
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001 Dec 1;25(4):402-428.
37. Lv B, Shen N, Cheng Z, Chen Y, Ding H, Yuan J, Zhao K, Zhang Y. Strategies for biomaterial-based spinal cord injury repair via the TLR4-NF-κB signaling pathway. useful strategy for booster in immunized rainbow trout against Ichthyophytirius multifiliis. (2015): 1330.
25. Hildenbrand K, Aschenbrenner I, Franke FC, Devergne O, Feige MJ. Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines. Trends in Biochemical Sciences. 2022 Nov 1;47(11):936-49.
26. Huo X, Zhang Q, Chang J, Yang G, He S, Yang C, Liang X, Zhang Y, Su J. Nanopeptide C-I20 as a novel feed additive effectively alleviates detrimental impacts of soybean meal on mandarin fish by improving the intestinal mucosal barrier. Frontiers in Immunology. 2023 Jun 26;14:1197767.
27. Hwang J, Yadav D, Lee PC, Jin JO. Immunomodulatory effects of polysaccharides from marine algae for treating cancer, infectious disease, and inflammation. Phytotherapy Research. 2022 Feb;36(2):761-777.
28. Ji J, Torrealba D, Ruyra À, Roher N. Nanodelivery systems as new tools for immunostimulant or vaccine administration: targeting the fish immune system. Biology. 2015 Oct 19;4(4):664-696.
29. Kang HJ, Li J, Razzak MA, Eom GD, Yoon KW, Mao J, Chu KB, Jin H, Choi SS, Quan FS. Chitosan-alginate polymeric nanocomposites as a potential oral vaccine carrier against influenza virus infection. ACS applied materials & interfaces. 2023 Oct 30;15(44):50889- 50897.
30. Kole S, Qadiri SS, Shin SM, Kim WS, Lee J, Jung SJ. Nanoencapsulation of inactivatedviral vaccine using chitosan nanoparticles: evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in olive flounder (Paralichthys olivaceus) against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection. Fish & Shellfish Immunology. 2019 Aug 1;91:136-147.

delivery in Macrobrachium rosenbergii (DE MAN 1879). Journal of Cell and Tissue Research. 2013 Aug 1;13(2):3619.
46. Oroojalian F, Beygi M, Baradaran B, Mokhtarzadeh A, Shahbazi MA. Immune cell membrane-coated biomimetic nanoparticles for targeted cancer therapy. Small. 2021 Mar;17(12):2006484.
47. Patra P, Upadhyay TK, Alshammari N, Saeed M, Kesari KK. Alginate-Chitosan biodegradable and biocompatible based hydrogel for breast cancer immunotherapy and diagnosis: a comprehensive review. ACS Applied Bio Materials. 2024 May 24;7(6):3515- 3534.
48. Rane BR, Patil VL, Mhatre NR, Padave AP, Mane NP, Gavit MR, Mutkule DS, Gawade SS, Udmale AV, Chaure PP, Jain AS. Polymer-Based Vaccines. Polymers in Modern Medicine-Part 2. 2024 Dec 13:135.
49. Radhakrishnan A, Vaseeharan B, Ramasamy P, Jeyachandran S. Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture—an encapsulation approach. Aquaculture International. 2023 Apr;31(2):867-891.
50. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. 1938: 493- 497.
51. Reyes-Cerpa S, Maisey K, Reyes-López F, Toro-Ascuy D, Sandino AM, Imarai M. Fish cytokines and immune response. New advances and contributions to fish biology. 2012 Nov 21;1.
52. Rivas-Aravena A, Sandino AM, Spencer E. Nanoparticles and microparticles of polymers and polysaccharides to administer fish vaccines. Biological research. 2013;46(4):407-419.
53. Robledo D, Taggart JB, Ireland JH, McAndrew BJ, Starkey WG, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Mota-Velasco JC, Gheyas AA, Tinch AE. Gene expression comparison of resistant and susceptible Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022 Apr 29;9:813169.
38. Malek-Khatabi A, Tabandeh Z, Nouri A, Mozayan E, Sartorius R, Rahimi S, Jamaledin R. Long-term vaccine delivery and immunological responses using biodegradable polymerbased carriers. ACS Applied Bio Materials. 2022 Oct 10;5(11):5015-5040.
39. Ma Y, Zhang Y, Zhu L. Role of neutrophils in acute viral infection. Immunity, inflammation and disease. 2021 Dec;9(4):1186-1196.
40. Mills KH. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. Nature Reviews Immunology. 2023 Jan;23(1):38-54.
41. Mondal H, Thomas J. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. Aquaculture international. 2022 Aug;30(4):1971- 2000.
42. Mu R, Dong L, Wang C. Carbohydrates as putative pattern recognition receptor agonists in vaccine development. Trends in immunology. 2023 Oct 1;44(10):845-57.
43. Najafi A, Ghazvini K, Sankian M, Gholami L, Amini Y, Zare S, Khademi F, Tafaghodi M. T helper type 1 biased immune responses by PPE17 loaded core-shell alginate-chitosan nanoparticles after subcutaneous and intranasal administration. Life Sciences. 2021 Oct 1;282:119806.
44. Najafi A, Ghazvini K, Sankian M, Gholami L, Zare S, Arvand AY, Tafaghodi M. Mucosal and systemic immunization against tuberculosis by ISCOMATRIX nano adjuvant coadministered with alginate coated chitosan nanoparticles. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2023;26(10):1162.
45. Nandanpawar P, Badhe M, Rather MA, Sharma R. Chitosan nanoparticles for gene

calcarifer (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. Aquaculture. 2014 Jan 15;420:240-246.
61. Vimal S, Taju G, Nambi KN, Majeed SA, Babu VS, Ravi M, Hameed AS. Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. Aquaculture. 2012 Aug 15;358:14-22.
62. Vinay TN, Bhat S, Gon Choudhury T, Paria A, Jung MH, Shivani Kallappa G, Jung SJ. Recent advances in application of nanoparticles in fish vaccine delivery. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 2018 Jan 2;26(1):29-41.
63. Zhang Z, Guan C, Zhao J, Lin J, Shao Y, Li L, Lu T, Chen P, Zhang YA, Xu L. Production and evaluation of a bivalent adjuvant inactivated vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. Aquaculture. 2025 Feb 15;597:741914.
64. Zhao Z, Peng Y, Shi X, Zhao K. Chitosan derivative composite nanoparticles as adjuvants enhance the cellular immune response via activation of the cGAS-STING pathway. International Journal of Pharmaceutics. 2023 Apr 5;636:122847.
65. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, Tian X. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. Signal transduction and targeted therapy. 2023 Jul 19;8(1):283.

Atlantic salmon fry challenged with Infectious Pancreatic Necrosis virus reveals a marked contrast in immune response. BMC genomics. 2016 Dec;17:1-16.
54. Sell S. How vaccines work: immune effector mechanisms and designer vaccines. Expert review of vaccines. 2019 Oct 3;18(10):993-1015.
55. Silva BC, Martins ML, Jatobá A, Buglione Neto CC, Vieira FN, Pereira GV, Jerônimo GT, Seiffert WQ, Mouriño JL. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009 Nov;29(11):874-80.
56. Su L, Feng Y, Wei K, Xu X, Liu R, Chen G. Carbohydrate-based macromolecular biomaterials. Chemical reviews. 2021 Aug 2;121(18):10950-1029.
57. Tapia D, Eissler Y, Reyes-Lopez FE, Kuznar J, Yáñez JM. Infectious pancreatic necrosis virus in salmonids: Molecular epidemiology and host response to infection. Reviews in Aquaculture. 2022 Mar;14(2):751-769.
58. Ullrich KA, Schulze LL, Paap EM, Müller TM, Neurath MF, Zundler S. Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. EXCLI journal. 2020 Dec 11;19:1563.
59. Vasquez-Martínez N, Guillen D, Moreno-Mendieta SA, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R. The role of mucoadhesion and mucopenetration in the immune response induced by polymer-based mucosal adjuvants. Polymers. 2023 Mar 24;15(7):1615.
60. Vimal S, Majeed SA, Nambi KS, Madan N, Farook MA, Venkatesan C, Taju G, Venu S, Subburaj R, Thirunavukkarasu AR, Hameed AS. Delivery of DNA vaccine using chitosan– tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, Lates

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2025; 19(2): 71-84.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2026.14960.1096

Effect of IPN virus antigen loaded in chitosan particles and in alginate matrix on IL-12, IL-17 gene expression and white blood cell composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Behnam Bakhtiari Moghadam[1], Shafigh Shafiei[1*], Sadegh Shirian[2*], Esmaeil Mirzaei[3], Azam Mokhtari[2], Zohreh Khorshidvand[4]

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Pathobiology. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Medical Nanotechnology. Faculty of Medicine. Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz- Iran.
4. Department of Parasitology and Mycology. Faculty of Medicine. Hamadan University of Medical Sciences. Hamadan- Iran.

Received: 27 February 2026 ***Accepted***: 24 May 2026

Summary

Infectious pancreatic necrosis (IPN) is one of the major challenges in the aquaculture industry, particularly in in rainbow trout farming. This study aimed to evaluate the effect of an inactivated oral vaccine containing IPNV antigen loaded into chitosan nanoparticles and alginate matrix on the gene expression of *IL-12*, *IL-17*, and white blood cell composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A total of 540 fish with an average weight of 3 ± 0.5 g were divided into six groups: control, positive control (nanoparticles without antigen), and four groups receiving free antigen (0.06 or 0.12 cc per fish) or antigen-loaded nanoparticles (0.06 or 0.12 cc per fish). Oral vaccination was performed on days 0 and 15, and sampling was conducted on day 30. The results showed that antigen administration, particularly at the higher dose and when associated with nanoparticles, significantly increased the percentage of lymphocytes and significantly decreased the percentage of neutrophils ($P<0.05$). The expression of IL-12 significantly increased in antigen-receiving groups, especially at the dose of 0.12 cc and in the group receiving antigen-loaded nanoparticles at 0.12 cc ($P<0.05$), whereas IL-17 expression showed no significant change. It is concluded that encapsulation of IPNV antigen in chitosan-alginate nanoparticles, as a controlled-release system, can enhance Th1-type adaptive immune responses through upregulation of IL-12 and shift white blood cell composition toward more specific immunity. However, antibody titer measurement and challenge tests are necessary for definitive conclusions.

***Keywords*:** Infectious Pancreatic Necrosis virus, Chitosan nanoparticles, Alginate, IL-12, IL-17, Rainbow trout, IPN.

* Corresponding Authors: sshafiei@sku.ac.ir ; shirian85@gmail.com