

## Synthesis of Trimethyl Chitosan Nanoparticles Containing Recombinant BLF1-stxB Protein of Burkholderia Pseudomallei and Evaluation of its Immunogenicity in Mice

Hossein Honari<sup>1\*</sup> , Seyed Mojtabi Aghaie<sup>1</sup> , Mohammad Reza Akbari<sup>1</sup> , Ayoub Fazeli<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 03 November 2021

Revised: 30 April 2022

Accepted: 28 June 2022

Published Online: 21 January 2023

#### \* Correspondence to:

Hossein Honari

Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email:

honari.hossein@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** The bacterium *Burkholderia Pseudomallei* is the cause of melioidosis disease. BLF1 plays an important role in the pathogenesis and infection of *B. Pseudomallei*. STxB has an adjuvant and carrier role and can be produced by mixing vaccine-candidate antigens with this adjuvant to produce a suitable vaccine. This study aimed to construct and evaluate the immunogenicity of trimethyl chitosan nanoparticles containing BLF1-stxB protein by subcutaneous injection.

**Material & Methods:** In this study, the expression of recombinant BLF1-stxB protein was induced in the expression host, and the protein was purified by affinity chromatography. Then, nanoparticles were fabricated by ion gelation method and the size and shape of nanoparticles were assessed by electron microscopy and injected subcutaneously into mice four times. Antibody titration was evaluated by indirect ELISA. BLF1 toxin was used for immunogenicity.

(Ethic code: 6272)

**Findings:** The results of this study showed that protein-containing nanoparticles have higher size and PDI, and lower zeta potential than protein-free nanoparticles. The protein charge in nanoparticles was about 65%. The highest antibody titer belonged to the group receiving protein without nanoparticles. The results showed a 75% conservation challenge of the nanoparticle-free protein group.

**Discussion & Conclusion:** This study showed that the nanoparticle form containing this recombinant protein leads to a weaker immune response, compared to the non-nanoparticle form by injection. The results of the challenge showed that this recombinant chimeric protein provides better protection when subcutaneously injected with an adjuvant.

**Keywords:** Fire, Knowledge, Operating room staff, Performance

### ➤ How to cite this paper

Honari H, Aghaie S M, Akbari M R, Fazeli A. Synthesis of Trimethyl Chitosan Nanoparticles Containing Recombinant BLF1-stxB Protein of *Burkholderia Pseudomallei* and Evaluation of its Immunogenicity in Mice. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(6): 61-72.

# سنتز نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین نو ترکیب BLF1-stxB باکتری burkholderia pseudomallei و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری

حسین هنری<sup>۱\*</sup>، سید مجتبی آقایی<sup>۱</sup>، محمدرضا اکبری<sup>۱</sup>، ایوب فاضلی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>مرکز زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

### نویسنده مسئول:

حسین هنری

مرکز زیست شناسی، دانشکده

علوم پایه، دانشگاه جامع امام

حسین (ع)، تهران، ایران

Email:

honari.hosein@gmail.com

**مقدمه:** باکتری بورخولدریا سودومالئی عامل بیماری میلوئیدوزیس است. BLF1 نقش مهمی در بیماری زایی و ایجاد عفونت توسط بورخولدریا سودومالئی دارد. STxB نقش ادجوانتی و حاملی را داراست و می توان با ممزوج کردن آنتی ژن-های کاندیدای واکسن با این ادجوانت، به تولید واکسن مناسب پرداخت. هدف این تحقیق ساخت و ارزیابی ایمنی زایی نانوذره تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-stxB به صورت تزریق زیرجلدی است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه، بیان پروتئین نو ترکیب BLF1-stxB در میزبان بیانی القا و پروتئین به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص شد؛ سپس ساخت نانوذره به روش ژلاسیون یونی صورت گرفت و اندازه و شکل ظاهری نانوذره توسط میکروسکوپ الکترونی انجام و به صورت زیرجلدی در چهار نوبت به موش تزریق گردید. ارزیابی تیراسیون آنتی بادی به روش الایزای غیرمستقیم صورت گرفت. برای بررسی ایمنی زایی از سم BLF1 استفاده شد.

**یافته ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات حاوی پروتئین نسبت به نانوذرات بدون پروتئین، اندازه، PDI بالاتر و پتانسیل زتای پایین تر دارند. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذره در حدود ۶۵ درصد بود. بالاترین تیر آنتی بادی مربوط به گروه دریافت کننده پروتئین بدون نانوذره بود. نتایج چالش حفاظت ۷۵ درصد گروه موشی دریافت کننده پروتئین بدون نانوذره را نشان داد.

**بحث و نتیجه گیری:** این تحقیق نشان داد که گونه نانوذره حاوی این پروتئین نو ترکیب در مقایسه با گونه بدون نانوذره، به صورت تزریقی به بروز پاسخ ایمنی ضعیف تر منجر می شود. نتایج چالش نشان داد که این پروتئین کایمر نو ترکیب در حالت تزریق زیرجلدی همراه ادجوانت، حفاظت مناسب تری را ایجاد می کند.

**واژه های کلیدی:** پروتئین کایمر BLF1-stxB، پروتئین نو ترکیب BLF1، تری متیل کایتوزان، کاندید واکسن، میلوئیدوزیس

**استناد:** هنری، حسین؛ آقایی، سید مجتبی؛ اکبری، محمد رضا؛ فاضلی، ایوب. سنتز نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین نو ترکیب BLF1-stxB باکتری burkholderia pseudomallei و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۱؛ ۳۰(۶): ۷۲-۶۱.

مشکلات بهداشت جهانی است که توسط میکروب‌های جنس شیگلا در انسان اتفاق می‌افتد و گروهی از توکسین‌های دو زیرواحدی (کلاس A و B) هستند که منشأ باکتریایی یا گیاهی دارند که توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند و به‌عنوان ادجوانت‌ها و حامل‌های بالقوه پیشنهاد شده‌اند. stxB جزئی از شیگا توکسین است و نقش ادجوانتی و حاملی دارد که می‌توان با فیوژ کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با این ادجوانت به تولید واکسن مناسب پرداخت (۸).

در صنعت بیشتر از پلیمرهای زیستی مانند کایتوزان استفاده می‌شود که فراوان، ارزان و زیست‌سازگار هستند. تری‌متیل کایتوزان یکی از مشتقات استیل‌زدایی‌شده کایتوزان است که برای بهبود خواص کایتوزان و غلبه بر موانع اصلی ماده که تنها در محیط اسیدی، محلول و فعال است، طراحی شده است (۹، ۱۰). هدف از این تحقیق استفاده از فناوری نانو برای ساخت نانوذره تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-stxB و بررسی ایمنی‌زایی و حفاظت آن در مقایسه با فرم بدون نانوذره BLF1-stxB است. با توجه به اینکه پروتئین BLF1 توانایی توقف پروتئین‌سازی و STxB نقش ادجوانتی دارد و همچنین با توجه به بررسی تیر آنتی‌بادی تولیدشده، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای واکسن علیه بورخولدریا سودومالئی و شیگلا دیسانتری استفاده شود. البته در این مقاله، هدف بررسی ایمنی‌زایی در برابر سم BLF1 است.

### مواد و روش‌ها

بررسی بیان پروتئین نوترکیب: در این مطالعه تجربی، پلاسمید نوترکیب حاوی ژن blf1-stxB از مرکز زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد (۱۱). پلاسمید نوترکیب به درون ناقل بیانی coli BL21 DE3 *E. coli* منتقل و کلونی‌های انتخابی به روش هضم آنزیمی تأیید و کشت شبانه گردیدند (۱۲). بیان پروتئین نوترکیب با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG القا شد. رسوب

باکتری بورخولدریا سودومالئی عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان است (۱). این باکتری در طبقه‌بندی عوامل بیولوژیک در سال ۲۰۰۹، جزو عوامل رده B قرار گرفته است. باکتری بورخولدریا سودومالئی یک باسیل گرم منفی کوچک، بی‌هوازی اختیاری، بدون اسپور، اکسیداز مثبت و متحرک است. این باکتری توسط ایالات متحده آمریکا و پیش‌تر از آن، از سوی اتحاد جماهیر شوروی جزو سلاح‌های بیولوژیکی بالقوه ارزیابی شده است (۱). میلوئیدوزیس انسانی می‌تواند از یک آلودگی پوستی ناحیه ای تا یک عفونت خونی حاد یا یک ذات‌الریه متغیر باشد (۲، ۳). این ارگانسم می‌تواند برای سال‌ها به‌صورت نهفته باقی بماند (۴). دو مسیر اصلی برای عفونت با باکتری بورخولدریا سودومالئی شامل استنشاق ذرات معلق آلوده یا از طریق تلقیح پوستی است (۵). بورخولدریا سودومالئی به بسیاری از آنتی‌یوتیک‌ها از جمله تعداد فراوانی از بتا لاکتامازها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و پلی‌میکسین‌ها مقاوم است که این امر مقابله با بیماری را دشوار می‌نماید (۳). این امر به‌نوبه خود موجب مهار گسترده سنتز پروتئین‌ها در سلول‌های انسان می‌شود.

آنالیز پروتئوم باکتری بورخولدریا سودومالئی و سوبه مرتبط غیر پاتوژن (*Burkholderia thailandensis*)، باعث بیان ۱۴ پروتئین نامشخص شده که عملکرد آن‌ها در باکتری پاتوژن ناشناخته است (۶). این مطالعه موجب بررسی برخی از این پروتئین‌های احتمالی با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس شد که در تحقیقات بعدی سبب تعیین ساختار پروتئین BPSL1549 گردید و این پروتئین اولین سم باکتری بورخولدریا سودومالئی است؛ در نتیجه، BPSL1549 را به BLF1 تغییر نام دادند (۷). انجام عملیات مهندسی ژنتیک روی توکسین BLF1 به‌عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن، مورد نیاز است.

شیگلوز (عفونت حاد روده‌ای) یکی از بزرگ‌ترین

باکتری‌ها تحت شرایط غیرطبیعی (دنا توره) توسط بافر لیزکننده شکسته و سونی کیت گردید. بیان پروتئین نو ترکیب روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با جریان الکتريسيته ۲۵ میلی آمپر بررسی شد (۱۱، ۱۲).  
تخليص پروتئين نوترکيب به کمک ستون کروماتوگرافي ميل ترکیبی (Ni-NTA): تخليص پروتئين با استفاده از رزين تمايلي نیکل (Ni-NTA) صورت گرفت. پس از جداسازی پروتئين نوترکيب از ستون با کمک بافرهای رهاسازی واجد ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار و مس ۲۰ میلی مولار، نمونه‌های جمع‌آوری شده از مراحل چندگانه تخليص پس از تیمار با سمپل بافر، با روش SDS-PAGE ارزیابی شدند (۱۳، ۱۴).

سنتر نانوذرات تری متیل کایتوزان و تعیین کارایی آن: نانوذرات تری متیل کایتوزان با روش ژلاسیون یونی تهیه شد. محلولی با غلظت ۲mg/ml از تری متیل کایتوزان در PBS (pH=6) و نیز محلولی با غلظت ۱mg/ml از سدیم تری پلی فسفات تهیه گردید. محلول سدیم تری پلی فسفات به صورت قطره قطره و طی مدت زمان ۶۰ دقیقه، به ۳ میلی لیتر محلول تری متیل کایتوزان حاوی ۷۰۰ میکروگرم پروتئين نو ترکیب اضافه شد، درحالی که روی همزن مغناطیسی با سرعت ثابت ۵۰۰ قرار گرفته بود.

بررسی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی نانوذرات توسط پراش نورپویا (DLS): برای بررسی اندازه شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات تولیدشده، از

دستگاه DLS استفاده و اندازه گیری در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد انجام گردید.  
بررسی مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی: برای بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد.

بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات، بازده احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات به روش غیرمستقیم: به منظور بررسی بازده وزنی، بر اساس رابطه ۱-۱ بازده وزنی نانوذرات تولیدی (PY درصد) محاسبه گردید.

همچنین در این تحقیق، برای تعیین مقدار پروتئين محبوس شده در نانوذرات از روش غیرمستقیم استفاده شد. با استفاده از دو رابطه ۱-۲ و ۱-۳، بازده احتباس (LE درصد) و ظرفیت احتباس (LC درصد) نانوذرات محاسبه گردید.

این کار هم برای نانوذرات حاوی BSA و هم نانوذرات حاوی پروتئين نو ترکیب انجام گرفت.  
بررسی برون تن رهائش آنتی ژن از نانوذرات تری متیل کایتوزان: پس از بارگذاری ۱ میلی گرم آنتی ژن در ۳ میلی لیتر محلول حاوی پلیمر تری متیل کایتوزان در بازه های زمانی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، ترسیب ژل تری متیل کایتوزان انجام شد و محلول رویی برای پروتئين سنجی جمع‌آوری گردید. میزان پروتئين موجود در محلول‌های جدا شده از محیط آزمایش توسط UV اسپکتروفتومتر بررسی شد.

رابطه ۱-۱. فرمول محاسبه بازده وزنی نانوذرات

$$\text{Partial Yield\%} = \frac{\text{Dried nanoparticle weight}}{\text{Theoretical mass (Poymer + linker + protein)}} \times 100$$

رابطه ۱-۲. فرمول محاسبه بازده احتباس

$$\text{Loading Efficency\%} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Total amount of protein}} \times 100$$

رابطه ۱-۳. فرمول محاسبه ظرفیت احتباس

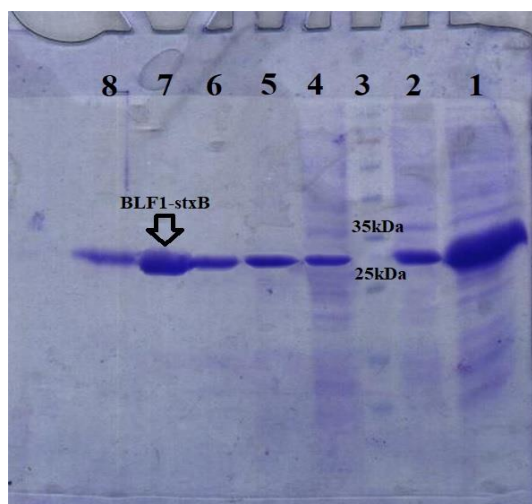
$$\text{Loading Capacity\%} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Dried nanoparticle weight}} \times 1$$

*آنالیز آماری:* برای بررسی آماری داده‌های حاصل از تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده توسط الایزای غیرمستقیم در سرم، از آزمون‌های ANOVA و t-test استفاده شد. این آزمون برای مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌بادی نمونه‌ها (آزمون دانکن برای بررسی اختلاف میان گروه‌ها) در سطح خطای ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.24 صورت گرفت.

### یافته‌ها

*الف. بررسی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب:* به دنبال القای بیان پروتئین با IPTG، لیز سلولی با استفاده از بافر دنا توره انجام شد و نتیجه روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید. وزن مولکولی پروتئین BLF1-stxB حدود ۳۰ کیلو دالتون است (شکل شماره ۱).

پس از تخلیص پروتئین با استفاده از رزین تمایلی نیکل (Ni-NTA) و شستشو توسط شیب غلظتی ایمیدازول، باند پروتئینی تخلیص شده در بافر شستشوی حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد که از خلوص مناسبی برخوردار بود (شکل شماره ۲).

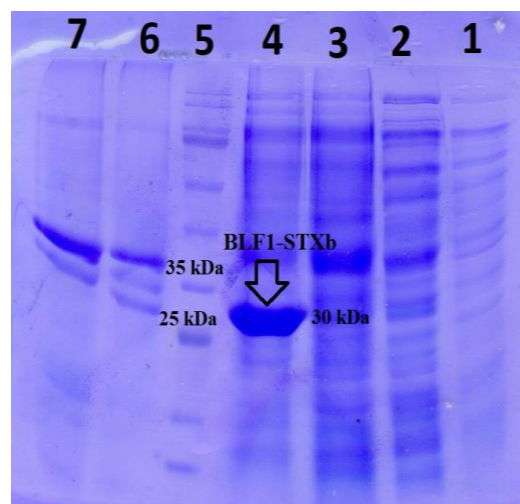


**شکل شماره ۲.** بررسی تخلیص پروتئین با ستون نیکل. ستون ۱. عصاره پروتئین پیش از بردن روی ستون؛ ستون ۲. نمونه جمع‌آوری شده پس از عصاره سلولی؛ ستون ۳. نشانگر پروتئینی؛ ستون ۴. نمونه جمع‌آوری شده پس از افزودن بافر C؛ ستون ۵. نمونه جمع‌آوری شده پس از افزودن بافر D؛ ستون ۶. نمونه جمع‌آوری شده پس از افزودن بافر E؛ ستون ۷. نمونه جمع‌آوری شده پس از افزودن بافر ایمیدازول ۲۵۰؛ ستون ۸. نمونه جمع‌آوری شده پس از افزودن بافر MES

*ایمنی‌زایی موش:* در این تحقیق، دستورالعمل‌های کمیته سازمانی اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها به سه گروه چهارتایی تزریقی نانوذره حاوی پروتئین کایمر، PBS به‌عنوان شاهد و پروتئین همراه با ادجوانت تقسیم شدند. ایمونیزاسیون در ۴ مرحله به‌صورت تزریق زیرجلدی انجام گرفت.

در تزریق پروتئین همراه با ادجوانت، طی مرحله اول ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانت کامل فروند ترکیب شد؛ در مرحله دوم (۱۴ روز بعد) ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانت ناقص فروند ترکیب گردید؛ پس از هر خون‌گیری به‌منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی موجود در سرم موش‌ها، از آزمایش الایزای غیرمستقیم استفاده شد (۱۱، ۱۲).

*بررسی ایمنی‌زایی:* در این تحقیق، از خود پروتئین BLF1 به‌عنوان سم، پس از تعیین متوسط دوز کشنده به میزان ۵۰ میکروگرم برای چالش هر موش استفاده گردید (۷). تزریق ۱۰ میکروگرم BLF1 پروتئین نوترکیب به همراه ۱۲/۵ میکروگرم ادجوانت ISCOM به داخل عضله یا به داخل صفاق موش را می‌کشد (۷، ۱۵).

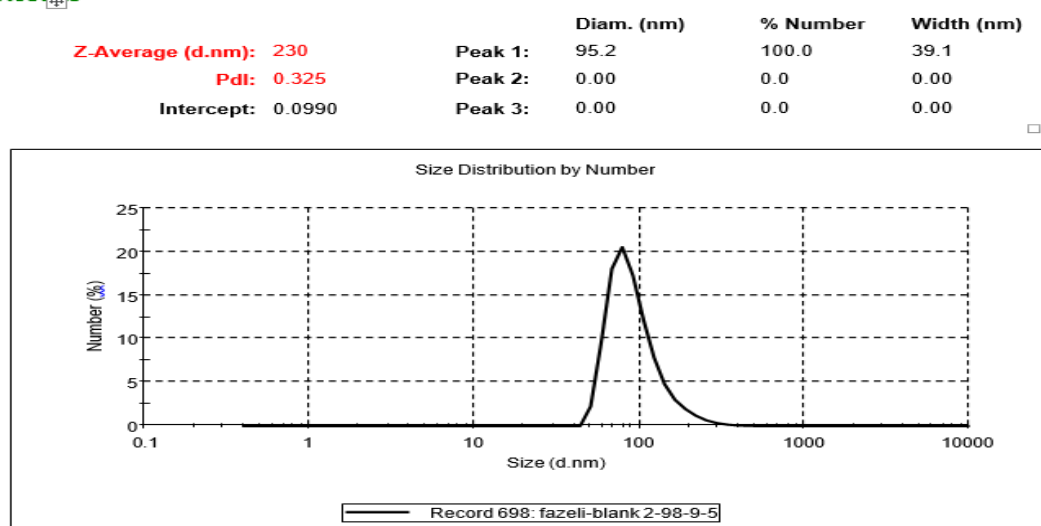


**شکل شماره ۱.** بررسی بیان پروتئین نوترکیب BLF1-stxB روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ستون ۱. نمونه PBS بدون IPTG؛ ستون ۲. نمونه PBS القاشده با IPTG؛ ستون ۳. نمونه اوره بدون IPTG؛ ستون ۴. نمونه اوره القاشده با IPTG؛ ستون ۵. نشانگر پروتئینی؛ ستون ۶. نمونه رسوب بدون IPTG؛ ستون ۷. نمونه رسوب القاشده با IPTG

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات توسط *DLS*: پس از آماده‌سازی نمونه، نانوذرات تری‌متیل کایتوزان تولیدشده در حضور پروتئین و نبود پروتئین BLF1، از نظر اندازه نانوذرات توسط دستگاه *DLS* بررسی شدند. نتایج نشان‌دهنده این بود که نانوذرات بدون پروتئین اندازه ۹۵ نانومتر و  $PDI=0.325$  (شکل شماره ۳) و نانوذراتی حاوی پروتئین اندازه ۱۶۰ نانومتر و  $PDI=0.450$  (شکل شماره ۴) داشتند که در اینجا، خصوصیات نانوذرات حاوی پروتئین در محدوده مطلوب تری از نظر اندازه و *PDI* قرار گرفته بود.

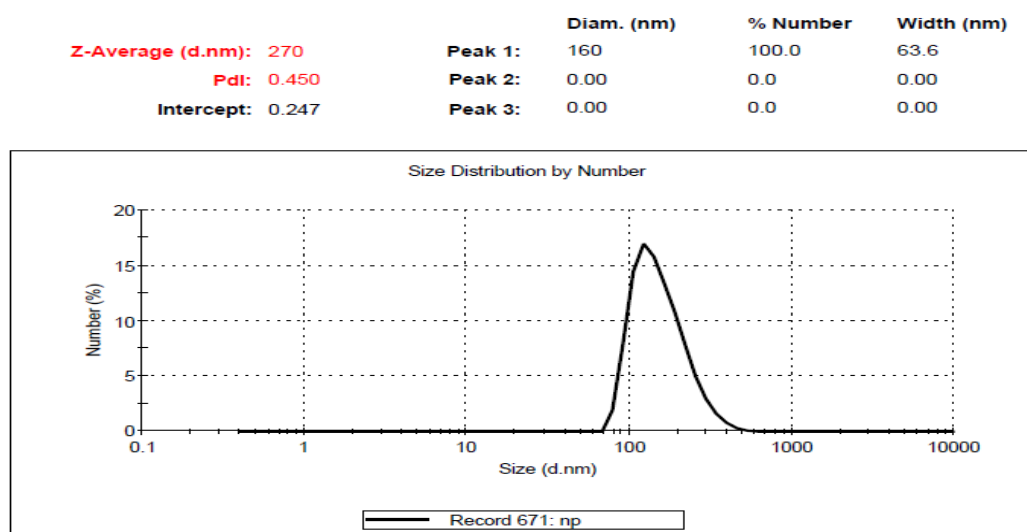
بررسی پتانسیل زتای نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین نو ترکیب *BLF1-StxB*. این آزمون نیز از نمونه‌های نانوذرات تری‌متیل کایتوزان تهیه شد که توزیع اندازه ذرات آن‌ها در مراحل پیشین بررسی شده بود. نتایج نشان داد که پتانسیل زتای نانو ذرات تری‌متیل کایتوزان بدون پروتئین یک پیک میانگین در محدوده ۲۰/۲۰ میلی‌ولت (شکل شماره ۵) داشت؛ همچنین نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین، دارای یک پیک در محدوده ۱۱/۲۳ میلی‌ولت (شکل شماره ۶) بود.

### Results



شکل شماره ۳. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات تری‌متیل کایتوزان بدون پروتئین *BLF1-StxB* در شرایط بهینه توسط دستگاه *DLS*

### Results

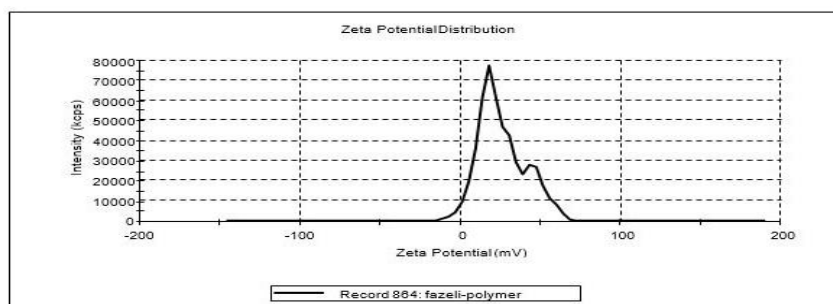


شکل شماره ۴. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین *BLF1-StxB* در شرایط بهینه توسط دستگاه *DLS*



## Results

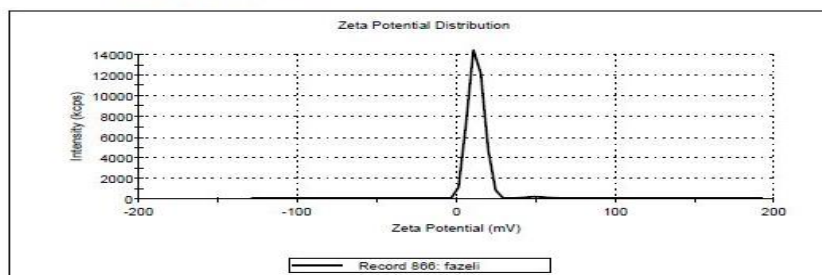
|                                     |        |           |          |            |
|-------------------------------------|--------|-----------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV):                | 20.20  | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
| Zeta SD (mV):                       | 10.01  | Peak 1:   | 18.8     | 85.9       |
| Mobility ( $\mu\text{mcm/Vs}$ ):    | 0.329  | Peak 2:   | 40.5     | 14.1       |
| Mobility SD ( $\mu\text{mcm/Vs}$ ): | 1.02   | Peak 3:   | 0.00     | 0.0        |
| Wall Zeta Potential (mV):           | 0.0245 |           |          |            |
| Conductivity (mS/cm):               | 1.78   |           |          |            |



شکل شماره ۵. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات تری متیل کایتوزان بدون پروتئین BLF1-StxB در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS

## Results

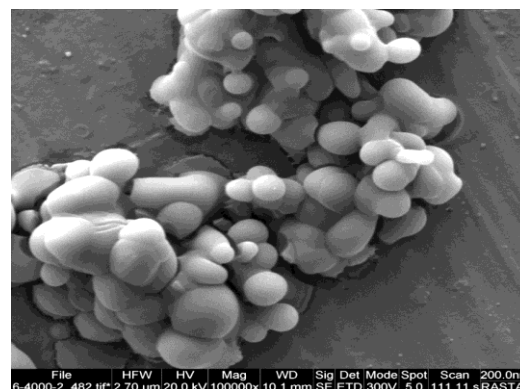
|                                     |       |           |          |            |
|-------------------------------------|-------|-----------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV):                | 11.23 | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
| Zeta SD (mV):                       | 5.20  | Peak 1:   | 11.23    | 100        |
| Mobility ( $\mu\text{mcm/Vs}$ ):    | 0.240 | Peak 2:   | 0.00     | 0.00       |
| Mobility SD ( $\mu\text{mcm/Vs}$ ): | 4.14  | Peak 3:   | 0.00     | 0.00       |
| Wall Zeta Potential (mV):           | 6.13  |           |          |            |
| Conductivity (mS/cm):               | 9.07  |           |          |            |



شکل شماره ۶. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-StxB در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS

روش غیرمستقیم: مقادیر بازده وزنی، بازده احتباس و ظرفیت احتباس پروتئین BLF1-stxB در نانوذرات تری متیل کایتوزان به ترتیب برابر ۶۹/۲۳، ۶۵ و ۵/۲ درصد است.

بررسی برون تن رهایش آنتی ژن BLF1-stxB/از نانوذرات تری متیل کایتوزان: رهایش پروتئین از نانوذرات تری متیل کایتوزان به مدت ۶ ساعت در محلول شبیه سازی شده روده (SIF) بررسی و بر اساس درصد تجمعی رهایش پروتئین در نمودار نمایش داده شد. همان طور که در شکل ۸ مشاهده می شود، پس از مدت زمان حدود ۲ ساعت، در محیط شبیه سازی شده به معده حدود ۷۰ درصد رهایش از نانوذرات تری متیل کایتوزان انجام شده است و همچنین پس از مدت زمان حدود ۴ ساعت، در محیط شبیه سازی شده به روده حدود ۲۵ درصد رهایش از



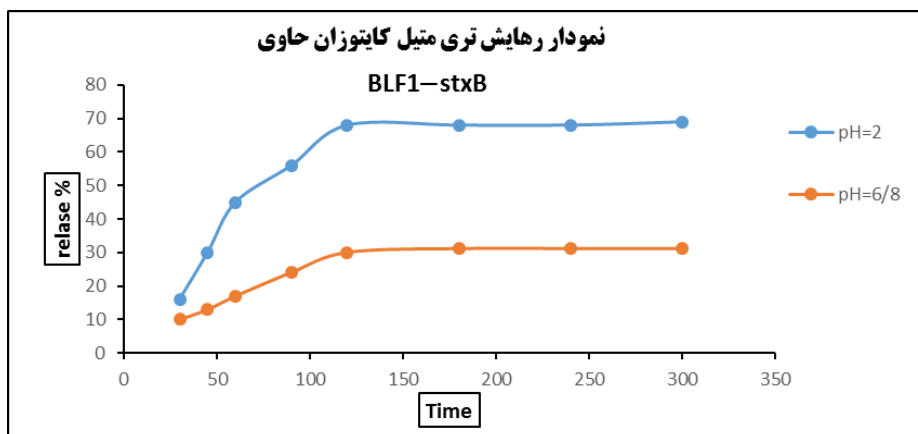
شکل شماره ۷. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM مدل FEI Quanta 200 از نانوذرات کایتوزان (نانوذرات خشک شده بر سطح شیشه ای، روی گرید قرار گرفت و پس از پوشش دهی با طلا، تصویربرداری شد).

مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی در شکل شماره ۷ نشان داده شده است.

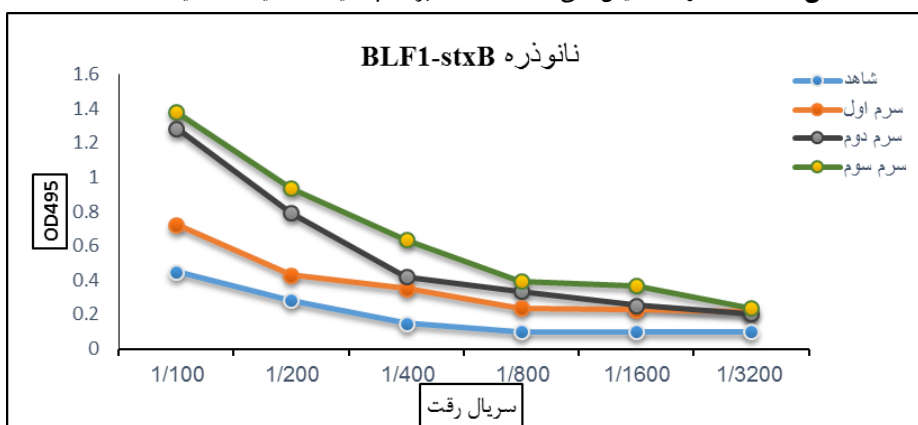
بررسی بازده وزنی و احتباس پروتئین در نانوذرات به

نانوذرات تری متیل کایتوزان صورت گرفته است. این نتایج نشان دهنده این مطلب است که نانوذره تری متیل کایتوزان در معده سریع تر هایش پیدا می کند. بررسی تیترا آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین نو ترکیب کپسوله شده با نانوذره تری متیل کایتوزان و پروتئین نو ترکیب بدون نانوذره در موش های ایمن شده الف. موش های ایمن شده به صورت زیر جلدی همراه نانوذره:

به منظور ارزیابی میزان آنتی بادی تولید شده در موش های ایمن شده همراه نانو ذره به صورت زیر جلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزای غیر مستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شماره ۹ نشان داده شده است. تیترا آنتی بادی تولید شده در موش های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیترا آنتی بادی در هر مرحله تزریق افزایش یافته است.



شکل شماره ۸. نمودار رهایش آنتی ژن BLF1-stxB بر حسب دقیقه در محیط های اسیدی مختلف



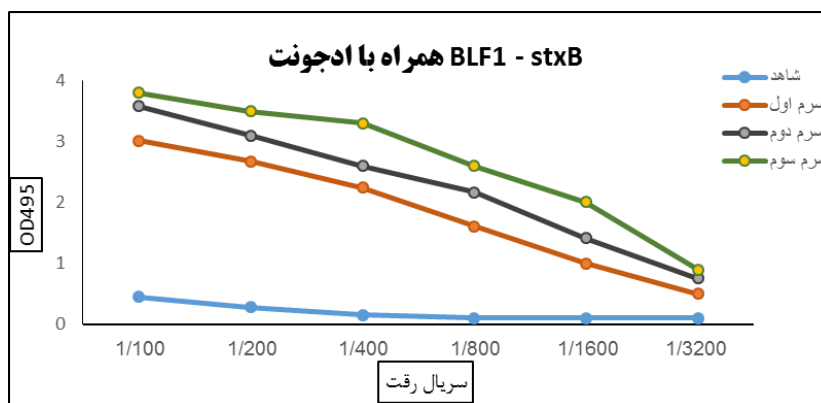
شکل شماره ۹. تیترا آنتی بادی تولید شده علیه کپسوله شده با تری متیل کایتوزان به صورت تجویز زیر جلدی در سرم موش های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می دهد.

در هر مرحله تزریق افزایش یافته است.

چالش: نتایج چالش با سم BLF1 نشان داد، موش ها ایمن شده با نانوذره حامل پروتئین حفاظت ۵۰ درصد و موش های ایمن شده با پروتئین بدون نانوذره حفاظت قابل قبول ۷۵ درصد را ایجاد می کنند، این در حالی است که گروه کنترل هیچ گونه حفاظتی را نشان ندادند (جدول شماره ۱).

ب. موش های ایمن شده با ادجوانت و پروتئین نو ترکیب به صورت تزریق زیر جلدی: به منظور ارزیابی میزان آنتی بادی تولید شده در موش های ایمن شده بدون نانوذره به صورت زیر جلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزای غیر مستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شماره ۱۰ نشان داده شده است. تیترا آنتی بادی تولید شده در موش های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیترا آنتی بادی





شکل شماره ۱۰. تیتراژ آنتی بادی تولید شده علیه BLF1-stxB بدون نانوذره به صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می دهد.

جدول شماره ۱. میزان حفاظت گروه های ایمن شده مختلف همراه با شاهد در برابر چالش

| شماره گروه | گروه های موشی                                              | تعداد | میزان سم چالشی | درصد زنده ماندن | درصد مرگ | Alphe=0.05 |
|------------|------------------------------------------------------------|-------|----------------|-----------------|----------|------------|
| ۱          | موش های ایمن شده با نانوذره تری متیل کایتوزان حامل پروتئین | ۴     | ۵۰ میکروگرم    | ۵۰ درصد         | ۵۰ درصد  | **         |
| ۲          | موش های ایمن شده بدون نانوذره تری متیل کایتوزان            | ۴     | ۵۰ میکروگرم    | ۷۵ درصد         | ۲۵ درصد  | *          |
| ۳          | شاهد                                                       | ۴     | ۱۰ میکروگرم    | ۰               | ۱۰۰ درصد |            |

## بحث و نتیجه گیری

بورخولدريا سودومالتي یکی از باکتری های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. این باکتری در سال ۲۰۰۲، جزو عوامل بیوتروریسم رده B قرار گرفته است. باکتری به آسانی حتی در هوای سرد و خارج از مناطق گرمسیری نیز رشد می کند. علاوه بر این، باکتری در آب مقطر دست کم می تواند ۱۰ سال زنده بماند (۱۶). به تازگی گزارش شده است که بورخولدريا سودومالتي قادر است گیاه گوجه فرنگی را آلوده کند که نگرانی های امنیتی برای استفاده آسان بیوتروریسم در گیاه، به عنوان میزبان جدید برای پاتوژن را بالا می برد (۳).

شناخت سازوکار مولکولی توکسین BLF1 روی سلول های انسانی راه را برای استفاده از آن در درمان سلول ها مهیا می کند و می تواند به عنوان بخشی از درمان ترکیبی با آنتی بیوتیک مفید باشد. علاوه بر این، غیرفعال کردن توکسین BLF1 نیز ممکن است به ما این اجازه را بدهد که بتوانیم برای اولین بار واکسنی برای آن تولید

کنیم (۷)؛ همچنین BLF1 می تواند کاربردهای جایگزینی را در پزشکی ارائه دهد (۱۷). BLF1 و eIF4A (مهارکننده سنتز پروتئین) ابزار جدید مولکولی نیرومندی برای شیمی درمانی در تومورها هستند. واضح است که تحویل BLF1 یا eIF4A به تومور شرط لازم برای استفاده درمانی از آن است. با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب می توان بخش هایی را که در بروز بیماری زایی به واسطه آن ها نقش اساسی دارند، کلون و بیان کرد تا به عنوان کاندید واکسن، میزان ایمن سازی آن ها علیه باکتری بررسی شود (۷).

گزارش های میلوئیدوزیس بین سال های ۱۹۲۵ و ۱۹۵۰ تا حد بسیاری به جنوب شرقی آسیا محدود می شد. در سال ۱۹۴۹، میلوئیدوزیس اولین بار در استرالیا گزارش شده است. تا سال ۱۹۷۳، بیش از ۳۰۰ نفر از سربازان آمریکایی مستقر در ویتنام دچار میلوئیدوزیس شده بودند. در اواسط دهه ۱۹۷۰، شیوع بیماری در فرانسه رخ داد. بورخولدريا سودومالتي تا سال ۱۹۹۲ به عنوان بخشی از *Pseudomonas* طبقه بندی می شد (۱۸).

طی سی سال گذشته، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ به صورت پاندمیک در کشورهای آمریکای مرکزی، آسیای جنوب شرقی و مرکزی و آفریقای جنوبی گزارش شده است. حالت اندمیک آن تقریباً ۱۰ درصد در بچه‌های زیر پنج سال در کشورهای در حال توسعه است و بیش از ۷۵ درصد با مرگ همراه است. به طور کلی ۹۹ درصد مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه اتفاق می افتد. بیشتر علائم عفونی شیگلا شامل اسهال، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی، خون و موکوس یا چرک در مدفوع است. باکتری شیگلا در فهرست مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها، به عنوان یک عامل بیوتروریست با پتانسیل بالایی قرار دارد که این ناشی از مقاومت آنتی بیوتیکی، عفونی بودن و نبود یک واکسن علیه بیماری و میزان وقوع بالای بیماری است (۱۹). به صورت رایج هیچ گونه واکسنی برای شیگلا وجود ندارد. سلول های T در حفاظت علیه شیگلا نقش دارند؛ اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. شیگلا دیسانتری تیپ ۱ هنوز هم عمده ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صدسال اخیر است و نسبت مرگ و میر آن در کشورهای جهان متفاوت است (۲۰).

توکسین STx که در اصطلاح به شیگا توکسین معروف است، می تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نورو توکسیک خطرناکی را ایجاد نماید. اما در حالت طبیعی این توکسین پتانسیل لازم را برای ایجاد بیماری ندارد؛ به این سبب که این توکسین تنها توسط دو گونه از چهار گونه شیگلا به نام شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و فلکسنری و / شرشیا کلاهی O157 تولید می شود و ژن آن در گونه های دیگر وجود ندارد (۱۹).

در سال ۲۰۰۳، یک آژانس سلامت عمومی در کانادا یک واکسن پروتئوزومی با تلقیح نازال (بینی) دارای LPS شیگلا ساخت که به صورت غیر کووالان به پروتئین B نایسریا منتریتیدس متصل و در ویزیکول های مولتی لایر مشتق از نایسریا محصور شده بود. LPS شیگلا را در این ویزیکول ها قرار می دهند و به صورت نازال تلقیح می کنند

که تلقیح آن به صورت نازال بهتر از نوع خوراکی بود (۲۱). در سال ۲۰۰۵، STx1B به همراه توکسین کلرا برای ایمنی زایی به صورت اینترا نازال به موش Balb/c استفاده گردید که افزایش قوی در پاسخ ایمنی مشاهده شد (۲۲). در سال ۲۰۰۵، به منظور تقویت ایمنی زایی علیه STxB، این پروتئین را با پروتئین هموسیائین کانجوگه کردند و در بررسی ایمنی زایی پروتئین کایمیریک، پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی تری ایجاد گردید (۲۳).

در سال ۲۰۰۸، تلاش برای ساخت یک واکسن نازال (دماغی) از طریق خالص سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت. چون ایمنی زایی علیه STxB ضعیف گزارش شده بود و آنتی بادی ضد STxB هنوز نتوانسته است به تنهایی ایمنی زایی مناسبی ایجاد کند، به منظور ایجاد ایمنی مخاطی این تلاش انجام گرفت. این کار تولید آنتی بادی را به سوی آنتی بادی های مخاطی شیف داد (۲۴). در سال ۲۰۱۲، ایمن سازی توسط واکسن اینترا نازال (داخل بینی) با پروتئین Stx2B-TIR-Stx1B-Zot به کاهش خونریزی در بزغاله، پس از چالش با باکتری های / شرشیا کلی O157: H7 منجر شد (۲۵).

نتایج حاصل از بیان و تخلیص تحقیق حاضر دقیقاً با نتایج کار مسعودی و همکاران مطابقت دارد (۱۲، ۱۱). استفاده از پلیمرهایی مانند کایتوزان برای انتقال داروها به محل های مناسب در سامانه های بیولوژیک مورد توجه فراوانی است. در این تحقیق از نانوذرات تری متیل کایتوزان به عنوان حامل پروتئین استفاده گردید. تری متیله شدن کایتوزان سبب انحلال بیشتر کایتوزان می شود. از این پلیمر در تحقیقات بسیاری به عنوان حامل دارو استفاده شده و نتایج مطلوبی نیز داشته است. در این تحقیق، برای ارزیابی اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات از دستگاه DLS یا پراکندگی نور دینامیکی استفاده شد. این روش غیر مخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. اندازه گیری پتانسیل زتا برای کلئیدها و

موش (نوع موش) تجویز گردید. با ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی ژن BLF1 در سرم موش‌های ایمن‌شده به‌صورت زیرجلدی، تیتراژ مناسبی مشاهده شد، به‌نحوی که آنتی‌بادی تولیدشده علیه BLF1 موجود در سرم موش ایمن‌شده به‌صورت زیرجلدی در رقت ۱/۳۲۰۰، قادر به شناسایی توسط آنتی‌ژن BLF1 طی فرایند الایزای غیرمستقیم بودند و اختلاف مشاهده شده میان تیتراژ آنتی‌بادی‌های تولیدشده در سرم موش‌های ایمن‌شده به‌صورت تزریق زیرجلدی همراه با ادجوانت فروند و تزریق زیرجلدی همراه نانوذره دور از انتظار بود که علت این اختلاف شاید در بارگذاری اندک پروتئین در نانوذره باشد؛ همچنین نتایج چالش با سم BLF1، ۷۵ درصد حفاظت موش‌های ایمن‌شده به‌صورت تزریق زیرجلدی همراه با ادجوانت در مقابل ۵۰ درصد حفاظت موش‌های ایمن‌شده با آنتی‌ژن انکپسوله‌شده با پلیمر تری‌متیل کایتوزان را نشان داد.

### تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه جامع امام حسین (ع) انجام شده است. بدین وسیله از همه کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچگونه تعارض منافی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق: ۶۲۷۲ مورخ ۱۳۹۷/۰۴/۲۰

## References

1. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 2003;5:719-29. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x.
2. Stone R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. *Science* 2007; 317:1022-24. doi: 10.1126/science.317.5841.1022.
3. Lee YH, Chen Y, Ouyang X, Gan YH. Identification of tomato plant as a novel host model for Burkholderia pseudomallei. *BMC microbiol* 2010;10:1. doi: 10.1186/1471-2180-10-28.
4. Wuthiekanun V, Suputtamongkol Y, Simpson

نانوذرات در سوسپانسیون برای پیش‌بینی قدرت ثبات و پایداری نانوذرات در فاز مایع است (۲۶). در این تحقیق، میانگین اندازه نانوذرات تری‌متیل کایتوزان بدون و حاوی پروتئین به‌ترتیب ۹۵/۲ و ۱۱۶ نانومتر برای پروتئین BLF1 و ۱۶۰ نانومتر برای پروتئین BLF1-stxB بود. در تحقیق قلاوند و همکاران پس از بارگذاری پروتئین توکسوئید کزاز در نانوذرات تری‌متیل کایتوزان، در محدوده ۱۲۰-۹۰ نانومتر تولید شدند (۲۷)؛ همچنین در تحقیق دیگری که آنشوا مالیک و همکاران انجام دادند، اندازه نانوذرات بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ نانومتر تولید گردید (۲۸). در تحقیقات آبکار و همکاران نیز اندازه نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی Omp31 حدوداً بین ۲۰۰-۳۰۰ اندازه‌گیری شد (۱۰). در تحقیق دیگری، سلیمانی و همکاران به بررسی ساخت و تولید نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حامل پروتئین نو ترکیب HP-NAP هیلوکوباکتریلوری پرداختند که سایز ۹۵ درصد ذرات بین ۲۰۰-۱۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۹)؛ همچنین در مطالعه اکبری و همکاران که پروتئین IpaD را در تری‌متیل کایتوزان بارگذاری کردند، اندازه بیشتر نانوذرات بین ۱۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد (۹). نتایج بالا نشان می‌دهد که اندازه نانوذرات کایتوزان در محدوده مشابهی در مقایسه با دیگر مطالعات قرار دارد و این تفاوت‌های جزئی می‌تواند به علت تغییرات اندکی در روش تولید از جمله استفاده از حلال‌های مختلف و نسبت‌های مختلف مواد اتفاق افتاده باشد.

در این مطالعه، آنتی‌ژن نو ترکیب BLF1، پس از بیان توسط نانوذره تری‌متیل کایتوزان، انکپسوله شد؛ سپس به‌صورت تزریق زیرجلدی و خوراکی به مدل حیوانی

- AJH, Kanaphun P, White NJ. Value of throat swab in diagnosis of melioidosis. *J clin microbiol* 2001; 39: 3801-2. doi.org/10.1128/JCM.39.10.3801-3802.2001.
5. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin microbiol rev* 2005;18: 383-416. doi.org/10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
6. Wongtrakongate P, Mongkoldhumrongkul N, Chaijan S, Kamchonwongpaisan S, Tungpradabkul S. Comparative proteomic profiles and the potential markers between Burkholderia

- pseudomallei and Burkholderia thailandensis. Mol cell probe 2007;21: 81-91. doi.org/10.1016/j.mcp.2006.08.006.
7. Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuk PJ, Baker PJ, Bokori-Brown M, Chang C-T, et al. A Burkholderia pseudomallei toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. Science 2011; 334: 821-4. doi: 10.1126/science.1211915.
  8. Medina-Bolivar F, Wright R, Funk V, Sentz D, Barroso L, Wilkins TD, et al. A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. Vaccine 2003;21:997-1005. doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00551-0
  9. Akbari M, Saadati M, Honari H, Mohammad Ghorbani H. IpaD-loaded N-trimethyl Chitosan Nanoparticles Can Efficiently Protect Guinea Pigs against Shigella Flexneri. Iran J Immunol 2019; 16: 212-24. doi.org/10.22034/iji.2019.80272.
  10. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Sahebghadam LA. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against Brucella melitensis infection. Int J Nanomedicine 2017;12: 8769-78. doi: 10.2147/IJN.S149774.
  11. Masoudi M, Honari H, Abdollah M. Expression of Blf1-Stx B Gene Cassette in E. coli and Investigation Antibody Titer in Mice. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2017;24: 876-86.
  12. Masoudi M, Honari H, Etemadaubi M, Abdollah M. Comparison of the Titers of Produced Antibodies against BLF1 and BLF1-STxB Recombinant Proteins in Laboratory Rats. J Ilam Uni Med Sci 2019;26: 111-21. doi: 10.29252/sjimu.26.6.111.
  13. Bollag D.M, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein methods. Wiley-liss NY. 1996.
  14. Daniel MB, Rozycki MD, Edelstein S. J. Affinity chromatography. Protein methods. New York: Wiley-Liss, 1996.
  15. Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. Virulence 2013; 4: 774-84. doi.org/10.4161/viru.26399.
  16. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg Infect Dis 2002; 8: 225-30. doi: 10.3201/eid0802.010164.
  17. Malina A, Cencic R, Pelletier J. Targeting translation dependence in cancer. Oncotarget. 2011; 2:76-88. doi: 10.18632/oncotarget.218.
  18. Currie BJ. Melioidosis and Burkholderia pseudomallei: progress in epidemiology, diagnosis, treatment and vaccination. Curr Opin Infect Dis 2022;35:517-23. doi: 10.1097/QCO.0000000000000869.
  19. German RR. Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems. MMWR Recomm Rep 2001. 50:1-35.
  20. Clemens J, Kotloff K, Kay BA. Generic protocol to estimate the burden of Shigella diarrhoea and dysenteric mortality. CiteSeer, 1999.
  21. Dutta Sh, Dutta D, Dutta P, Matsushita Sh, Kumar Bhattacharya S, Yoshida SH. Shigella dysenteriae serotype 1, Kolkata, India. Emerg Infect Dis 2003; 9:1471-74. doi: 10.3201/eid0911.020652.
  22. Imai Y, Ishikawa T, Tanikawa T, Nakagami H, Maekawa T, Kurohane K. Production of IgA monoclonal antibody against Shiga toxin binding subunits employing nasal-associated lymphoid tissue. J Immunol Methods 2005; 302:125-35. doi.org/10.1016/j.jim.2005.05.007.
  23. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. Infect Immun 2005;73: 6523-29. doi.org/10.1128/IAI.73.10.6523-6529.2005.
  24. Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S. et al. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. Vaccine 2008;26:2092-9. doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.034.
  25. Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, et al. Protection by a recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing Escherichia coli in mice. Clin Vaccine Immunol 2012;19:1932-7. doi.org/10.1128/CI.00473-12.
  26. Xu R. Particle characterization: light scattering methods. Vol. 13. Springer Science & Business Media. 2001.
  27. Ghalavand M, Saadati M, Salimian J, Abbasi E, Ahmadi A. Synthesis and Immunogenicity Evaluation of Tetanus Toxoid Encapsulated Trimethyl Chitosan Nanoparticles. J Mazandaran Uni Med Sci 2017;26:54-62.
  28. Malik A, Gupta M, Mani R, Gogoi H, Bhatnagar R. Trimethyl chitosan nanoparticles encapsulated protective antigen protects the mice against anthrax. Front Immunol 2018; 20: 562. doi.org/10.3389/fimmu.2018.00562
  29. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghighi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. J Mazandaran Uni Med Sci 2014; 23:134-44.