Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Hossein Honari[1*], Seyed Mojtabi Aghaie[1], Mohammad Reza Akbari[1], Ayoub Fazeli[1]

[1] 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.hosein@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.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /بهمن ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۶، ۷۲-۶۱

سنتز نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین نوترکیب BLF1-stxB باکتری burkholderia pseudomallei و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش سوری

حسین هنری[۱*]، سید مجتبی آقایی[۱]، محمدرضا اکبری[۱]، ایوب فاضلی[۱]

[۱] مرکز زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

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

چکیده

مقدمه: باکتری بورخولدریا سودومالئی عامل بیماری ملیوئیدوزیس است. BLF1 نقش مهمی در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط بورخولدریا سودومالئی دارد. STxB نقش ادجوانتی و حاملی را داراست و می‌توان با ممزوج کردن آنتی‌ژن-های کاندیدای واکسن با این ادجوانت، به تولید واکسن مناسب پرداخت. هدف این تحقیق ساخت و ارزیابی ایمنی‌زایی نانوذرهٔ تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-stxB به‌صورت تزریق زیرجلدی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، بیان پروتئین نوترکیب 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 به‌صورت زیرجلدی در چهار نوبت به موش تزریق گردید. ارزیابی تیتراسیون آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم صورت گرفت. برای بررسی ایمنی‌زایی از سم BLF1 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات حاوی پروتئین نسبت به نانوذرات بدون پروتئین، اندازه، PDI بالاتر و پتانسیل زتای پایین‌تر دارند. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذره در حدود ۶۵ درصد بود. بالاترین تیتر آنتی‌بادی مربوط به گروه دریافت‌کنندهٔ پروتئین بدون نانوذره بود. نتایج چالش حفاظت ۷۵ درصد گروه موشی دریافت‌کنندهٔ پروتئین بدون نانوذره را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که گونهٔ نانوذرهٔ حاوی این پروتئین نوترکیب در مقایسه با گونهٔ بدون نانوذره، به‌صورت تزریقی به بروز پاسخ ایمنی ضعیف‌تری منجر می‌شود. نتایج چالش نشان داد که این پروتئین کایمر نوترکیب در حالت تزریق زیرجلدی همراه ادجوانت، حفاظت مناسب‌تری را ایجاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌کایمر BLF1-stxB، پروتئین نوترکیب BLF1، تری‌متیل کایتوزان، کاندید واکسن، ملیوئیدوزیس

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

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

حق‌مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

باکتری *بورخولدریا سودومالئی* عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان است (۱). این باکتری در طبقه‌بندی عوامل بیولوژیک در سال ۲۰۰۹، جزو عوامل ردهٔ B قرار گرفته است. باکتری *بورخولدریا سودومالئی* یک باسیل گرم منفی کوچک، بی هوازی اختیاری، بدون اسپور، اکسیداز مثبت و متحرک است. این باکتری توسط ایالات‌متحده امریکا و پیش تر از آن، از سوی اتحاد جماهیر شوروی جزو سلاح های بیولوژیکی بالقوه ارزیابی‌شده است (۱). میلوئیدوزیس انسانی می تواند از یک آلودگی پوستی ناحیه ای تا یک عفونت خونی حاد یا یک ذات الریه متغیر باشد (۳، ۲). این ارگانیسم می تواند برای سال ها 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 آنتی بیوتیک ها ازجمله تعداد فراوانی از بتا لاکتاماز ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و پلی‌میکسین ها مقاوم است که این امر مقابله با بیماری را دشوار می نماید (۳). این امر به‌نوبهٔ خود موجب مهار گستردهٔ سنتز پروتئین ها در سلول های انسان می شود.

آنالیز پروتئوم باکتری *بورخولدریا سودومالئی* و سویهٔ 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؛ درنتیجه، BPSL1549 را به BLF1 تغییر نام دادند (۷). انجام عملیات مهندسی ژنتیک روی توکسین BLF1 به‌عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن، موردنیاز است.

شیگلوز (عفونت حاد روده‌ای) یکی از بزرگ‌ترین 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 ادجوانت ها 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 می شود که فراوان، ارزان و زیست‌سازگار هستند. تری‌متیل کایتوزان یکی از مشتقات استیل‌زدایی‌شدهٔ کایتوزان است که برای بهبود خواص کایتوزان و غلبه بر موانع اصلی ماده که تنها در محیط اسیدی، محلول و فعال است، طراحی‌شده است (۱۰، ۹). هدف از این تحقیق استفاده از فناوری نانو برای ساخت نانوذرهٔ تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-*stxB* و بررسی ایمنی‌زایی و حفاظت آن در مقایسه با فرم بدون نانوذرهٔ BLF1-*stxB* است. با توجه به اینکه پروتئین BLF1 توانایی توقف پروتئین‌سازی و STxB نقش ادجوانتی دارد و همچنین با توجه به بررسی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده، می تواند 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 روش ها

بررسی بیان پروتئین نوترکیب: در این مطالعهٔ تجربی، پلاسمید نوترکیب حاوی ژن blf1-*stxB* از مرکز زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد (۱۱). پلاسمید نوترکیب به درون ناقل بیانی *E.* coli BL21 DE3 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

باکتری‌ها تحت شرایط غیرطبیعی (دناتوره) توسط بافر لیزکننده شکسته و سونی کیت گردید. بیان پروتئین نوترکیب روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با جریان الکتریسیته ۲۵ میلی‌آمپر بررسی شد (۱۲، ۱۱).

تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Ni-NTA): تخلیص پروتئین با استفاده از رزین تمایلی نیکل (Ni-NTA) صورت گرفت. پس از جداسازی پروتئین نوترکیب از ستون با کمک بافرهای رهاسازی واجد ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار و مس ۲۰ میلی‌مولار، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مراحل چندگانهٔ تخلیص پس از تیمار با سمپل بافر، با روش SDS-PAGE ارزیابی شدند (۱۴، ۱۳).

سنتز نانوذرات تری‌متیل کایتوزان و تعیین کارایی آن: نانوذرات تری‌متیل کایتوزان با روش ژلاسیون یونی تهیه شد. محلولی با غلظت ۲mg/ml از تری‌متیل کایتوزان در PBS (pH=6) و نیز محلولی با غلظت ۱mg/ml از سدیم تری‌پلی‌فسفات تهیه گردید. محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات به‌صورت قطره‌قطره و طی مدت‌زمان ۶۰ دقیقه، به ۳ میلی‌لیتر محلول تری متیل کایتوزان حاوی ۷۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب اضافه شد، درحالی‌که روی همزن مغناطیسی با سرعت ثابت ۵۰۰ قرار گرفته بود.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات توسط پراش نورپویا (DLS): برای بررسی اندازهٔ شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات تولیدشده، از دستگاه DLS استفاده و اندازه‌گیری در دمای ۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد 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: به‌منظور بررسی بازده وزنی، بر اساس رابطهٔ ۱-۱ بازده وزنی نانوذرات تولیدی (PY درصد) محاسبه گردید.

همچنین در این تحقیق، برای تعیین مقدار پروتئین محبوس‌شده در نانوذرات از روش غیرمستقیم استفاده شد. با استفاده از دو رابطهٔ 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 پروتئین نوترکیب انجام گرفت.

بررسی برون‌تن رهایش آنتی‌ژن از نانوذرات تری‌متیل کایتوزان: پس از بارگذاری ۱ میلی گرم آنتی ژن در ۳ میلی‌لیتر محلول حاوی پلیمر تری‌متیل کایتوزان در بازه‌های زمانی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، ترسیب ژل تری‌متیل کایتوزان انجام شد و محلول رویی برای پروتئین‌سنجی جمع‌آوری گردید. میزان پروتئین موجود در محلول‌های جداشده از محیط آزمایش توسط UV اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

رابطهٔ ۱-۱. فرمول محاسبهٔ بازده وزنی نانوذرات

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

رابطهٔ ۱-۲. فرمول محاسبهٔ بازده احتباس

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

رابطهٔ ۱-۳. فرمول محاسبهٔ ظرفیت احتباس

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

ایمنی‌زایی موش: در این تحقیق، دستورالعمل‌های کمیتهٔ سازمانی اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها به سه گروه چهارتایی تزریقی نانوذرهٔ حاوی پروتئین‌کایمر، 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 مرحلهٔ اول ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانت کامل فروند ترکیب شد؛ در مرحلهٔ دوم (۱۴ روز بعد) ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانت ناقص فروند ترکیب گردید؛ پس از هر خون‌گیری به‌منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی موجود در سرم موش‌ها، از آزمایش الایزای غیرمستقیم استفاده شد (۱۲، ۱۱).

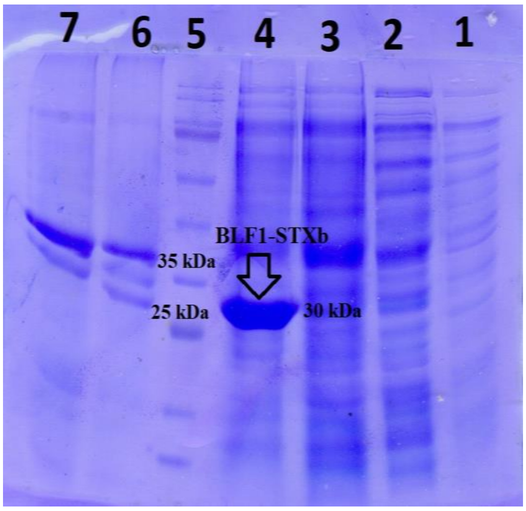
بررسی ایمنی‌زایی: در این تحقیق، از خود پروتئین BLF1 به‌عنوان سم، پس از تعیین متوسط دوز کشنده به میزان ۵۰ میکروگرم برای چالش هر موش استفاده گردید (۷). تزریق ۱۰ میکروگرم BLF1 پروتئین نوترکیب به همراه ۱۲/۵ میکروگرم ادجوانت ISCOM به داخل عضله یا به داخل صفاق موش را می کشد (۱۵، ۷).

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

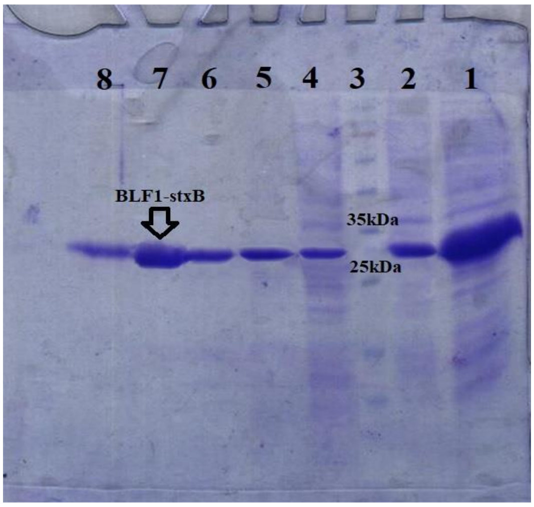
یافته ها

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

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



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



شکل شمارهٔ ۲. بررسی تخلیص پروتئین با ستون نیکل. ستون ۱. عصارهٔ پروتئین پیش از بردن روی ستون؛ ستون ۲. نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از عصارهٔ سلولی؛ ستون ۳. نشانگر پروتئینی؛ ستون ۴. نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از افزودن بافر C؛ ستون ۵. نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از افزودن بافر D؛ ستون ۶. نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از افزودن بافر E؛ ستون ۷. نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از افزودن بافر ایمیدازول ۲۵۰؛ ستون ۸ نمونهٔ جمع‌آوری‌شده پس از افزودن بافر MES

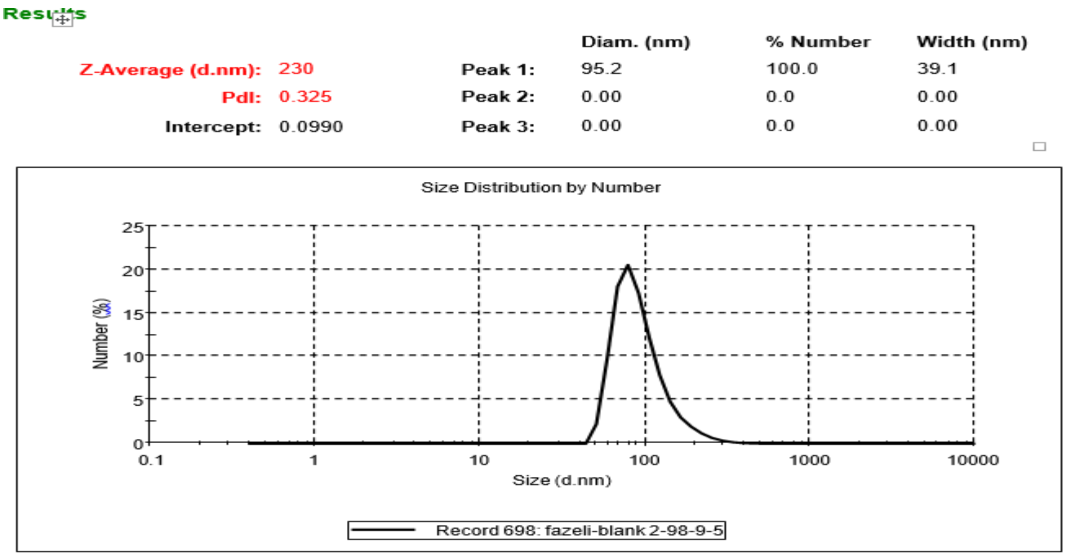
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

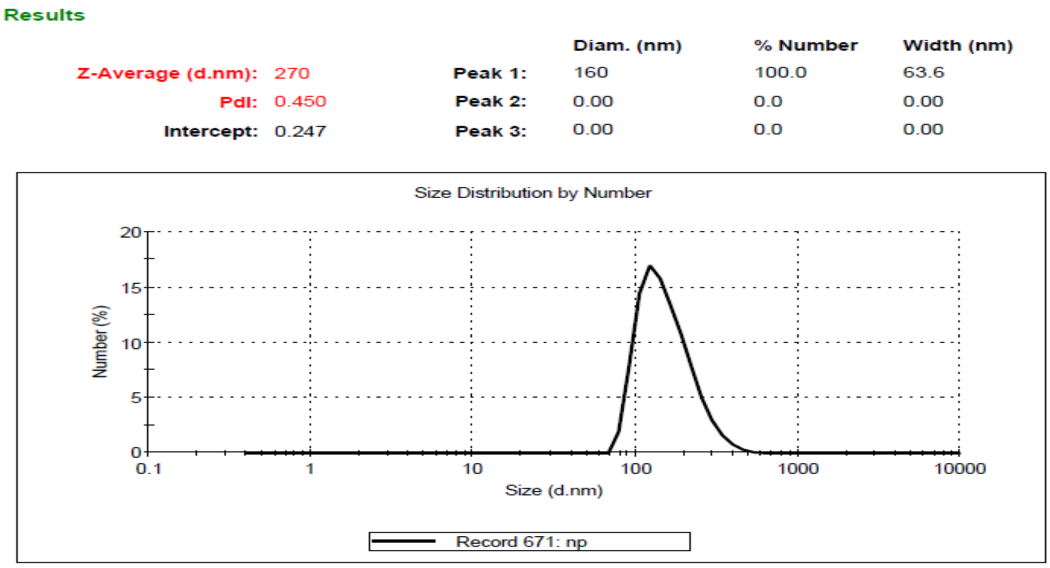
مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /بهمن ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۶، ۷۲-۶۱

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

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



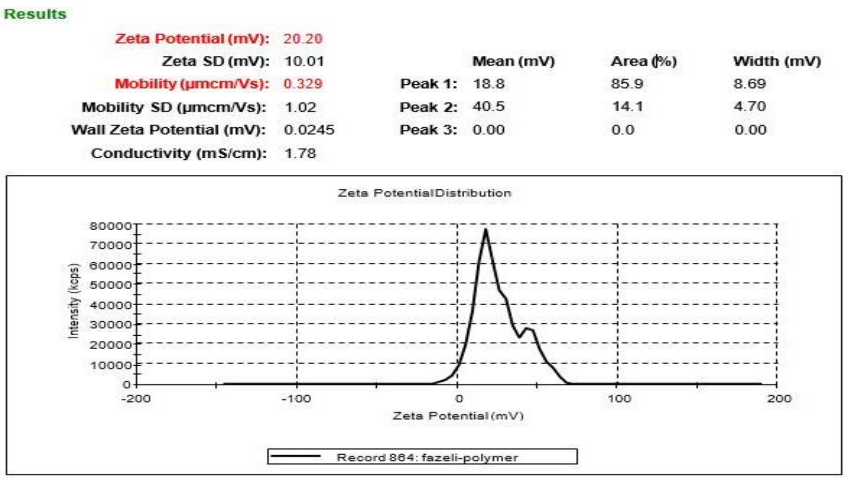
شکل شمارهٔ ۳. نمودار بررسی بازه توزیع اندازهٔ نانوذرات تری‌متیل کایتوزان بدون پروتئین BLF1-StxB در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS



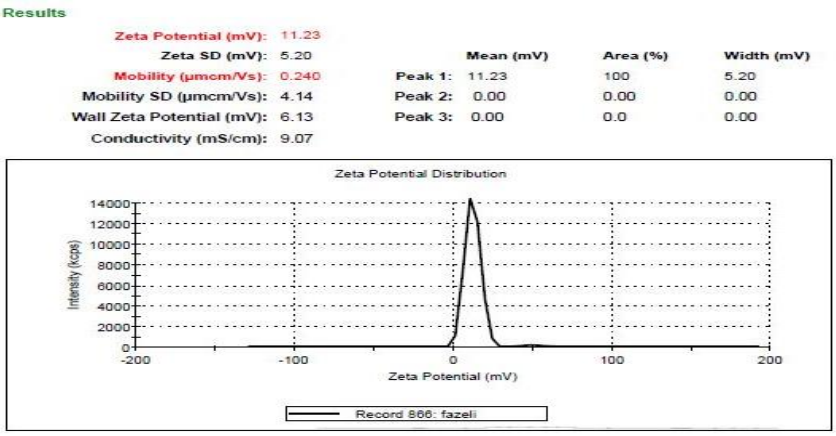
شکل شمارهٔ ٤. نمودار بررسی بازه توزیع اندازهٔ نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-StxB در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

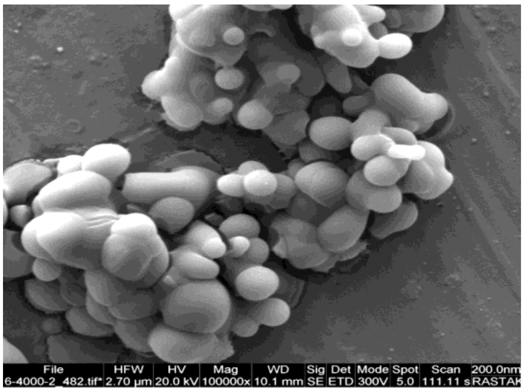
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]



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



شکل شمارهٔ ٦. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات تری‌متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-StxB در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS



شکل شمارهٔ ۷. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM مدل FEI Quanta 200 از نانوذرات کایتوزان (نانوذرات خشک‌شده بر سطح شیشه‌ای، روی گرید قرار گرفت و پس از پوشش‌دهی با طلا، تصویربرداری شد).

مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی در شکل شمارهٔ ۷ نشان داده‌شده است.

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

بررسی برون‌تن رهایش آنتی‌ژن BLF1-stxB از نانوذرات تری‌متیل کایتوزان: رهایش پروتئین از نانوذرات تری‌متیل کایتوزان به مدت ۶ ساعت در محلول شبیه‌سازی‌شدهٔ روده (SIF) بررسی و بر اساس درصد تجمعی رهایش پروتئین در نمودار نمایش داده شد. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، پس از مدت‌زمان حدود ۲ ساعت، در محیط شبیه‌سازی‌شده به معده حدود ۷۰ درصد رهایش از نانوذرات تری‌متیل کایتوزان انجام‌شده است و همچنین پس از مدت‌زمان حدود ۴ ساعت، در محیط شبیه‌سازی‌شده به روده حدود ۲۵ درصد رهایش از

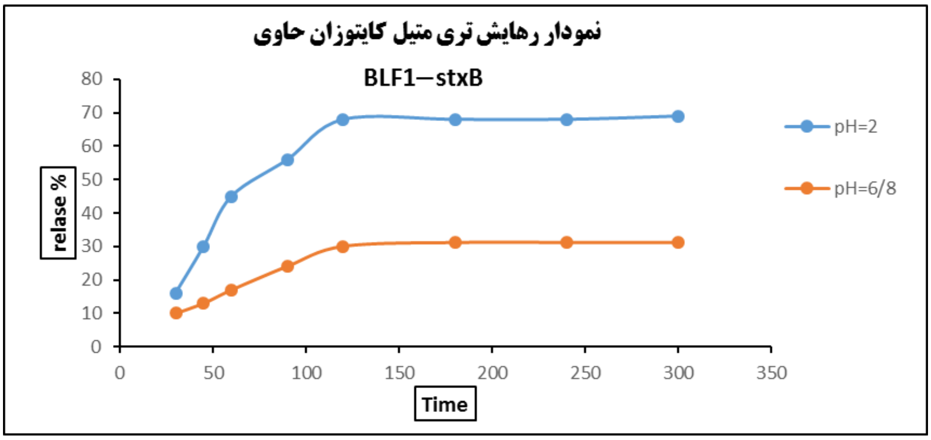
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /بهمن ۱۴۰۱، دوره ۳۰ شماره ۶ ۷۲-۶۱

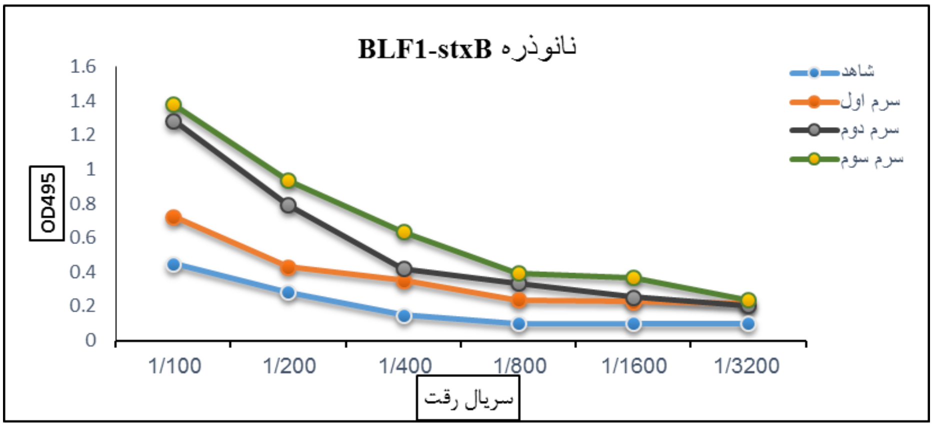
نانوذرات تری‌متیل کایتوزان صورت گرفته است. این نتایج نشان‌دهندهٔ این مطلب است که نانوذرهٔ تری‌متیل کایتوزان در معده سریع تر رهایش پیدا می کند.

بررسی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین نوترکیب کپسوله‌شده با نانوذرهٔ تری‌متیل کایتوزان و پروتئین نوترکیب بدون نانوذره در موش‌های ایمن‌شده؛ الف. موش های ایمن شده به‌صورت زیرجلدی همراه نانوذره:

به‌منظور ارزیابی میزان آنتی‌بادی تولید شده در موش های ایمن شده همراه نانو ذره به‌صورت زیرجلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شمارهٔ ۹ نشان داده‌شده است. تیتر آنتی‌بادی تولید شده در موش‌های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیتر آنتی‌بادی در هر مرحلهٔ تزریق افزایش‌یافته است.



شکل شمارهٔ ۸. نمودار رهایش آنتی‌ژن BLF1-stxB برحسب دقیقه در محیط‌های اسیدی مختلف

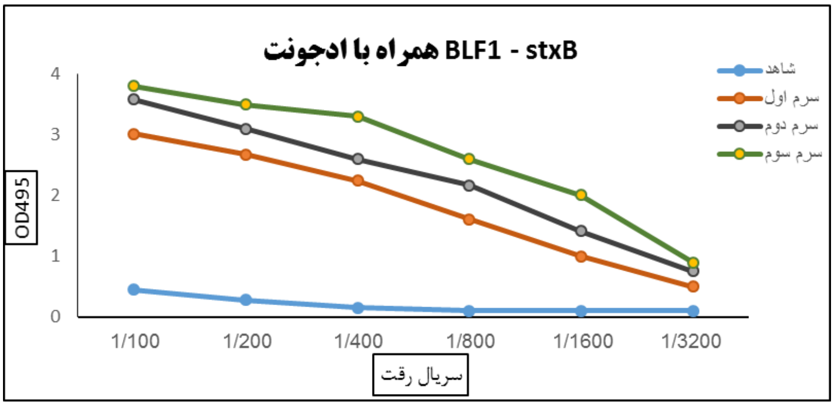


شکل شمارهٔ ۹. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه BLF1-stxB کپسوله‌شده با تری‌متیل کایتوزان به‌صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش های ایمن و مقایسهٔ آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول‌موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می‌دهد.

ب. موش‌های ایمن‌شده با ادجوانت و پروتئین نوترکیب به‌صورت تزریق زیرجلدی: به‌منظور ارزیابی میزان آنتی‌بادی تولیدشده در موش‌های ایمن‌شده بدون نانوذره به‌صورت زیرجلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شمارهٔ ۱۰ نشان داده‌شده است. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در موش‌های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیتر آنتی‌بادی در هر مرحلهٔ تزریق افزایش‌یافته است.

چالش: نتایج چالش با سم BLF1 نشان داد، موش‌ها ایمن‌شده با نانوذرهٔ حامل پروتئین حفاظت ۵۰ درصد و موش‌های ایمن‌شده با پروتئین بدون نانوذره حفاظت قابل‌قبول ۷۵ درصد را ایجاد می‌کنند، این در حالی است که گروه کنترل هیچ‌گونه حفاظتی را نشان ندادند (جدول شمارهٔ ۱).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]



شکل شمارۀ ۱۰. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه BLF1-stxB بدون نانوذره به‌صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش های ایمن و مقایسۀ آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول‌موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می‌دهد.

جدول شمارۀ ۱. میزان حفاظت گروه‌های ایمن‌شدۀ مختلف همراه با شاهد در برابر چالش

شماره گروه	گروه‌های موشی	تعداد	میزان سم چالشی	درصد زنده ماندن	درصد مرگ	*Alphe=0.05*
۱	موش‌های ایمن‌شده با نانوذرۀ تری‌متیل کایتوزان حامل پروتئین	۴	۵۰ میکروگرم	۵۰ درصد	۵۰ درصد	**
۲	موش‌های ایمن‌شده بدون نانوذرۀ تری‌متیل کایتوزان	۴	۵۰ میکروگرم	۷۵ درصد	۲۵ درصد	*
۳	شاهد	۴	۱۰ میکروگرم	۰	۱۰۰ درصد	

بحث و نتیجه‌گیری

بورخولدریا سودومالئی یکی از باکتری های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. این باکتری در سال ۲۰۰۲، جزو عوامل بیوتروریسم ردۀ B قرار گرفته است. باکتری به‌آسانی حتی در هوای سرد و خارج از مناطق گرمسیری نیز رشد می کند. علاوه بر این، باکتری در آب مقطر دست‌کم می تواند ۱۰ سال زنده بماند (۱۶). به‌تازگی گزارش‌شده است که *بورخولدریا سودومالئی* قادر است گیاه گوجه‌فرنگی را آلوده کند که نگرانی های امنیتی برای استفادۀ آسان بیوتروریسم در گیاه، به‌عنوان میزبان جدید برای پاتوژن را بالا می برد(۳).

شناخت سازوکار مولکولی توکسین BLF1 روی سلول‌های انسانی راه را برای استفاده از آن در درمان سلول ها مهیا می کند و می‌تواند به‌عنوان 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 (مهارکنندۀ سنتز پروتئین) ابزار جدید مولکولی نیرومندی برای شیمی‌درمانی در تومورها هستند. واضح است که تحویل BLF1 یا eIF4A به تومور شرط لازم برای استفادۀ درمانی از آن است. با استفاده از فناوری DNA نوترکیب می‌توان بخش‌هایی را که در بروز بیماری زایی به‌واسطۀ آن ها نقش اساسی دارند، کلون و بیان کرد تا به‌عنوان کاندید واکسن، میزان ایمن‌سازی آن ها علیه باکتری بررسی شود (۷).

گزارش‌های میلوئیدوزیس بین سال های ۱۹۲۵ و ۱۹۵۰ تا حد بسیاری به جنوب‌شرقی آسیا محدود می شد. در سال ۱۹۴۹، میلوئیدوزیس اولین بار در استرالیا گزارش‌شده است. تا سال ۱۹۷۳، بیش از ۳۰۰ نفر از سربازان آمریکایی مستقر در ویتنام دچار میلوئیدوزیس شده بودند. در اواسط دهۀ ۱۹۷۰، شیوع بیماری در فرانسه رخ داد. *بورخولدریا سودومالئی* تا سال ۱۹۹۲ به‌عنوان بخشی از *Pseudomonas* طبقه‌بندی می شد (۱۸).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /بهمن ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۶، ۷۲-۶۱

طی سی سال گذشته، *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ به‌صورت پاندمیک در کشورهای آمریکای مرکزی، آسیای جنوب‌شرقی و مرکزی و آفریقای جنوبی گزارش‌شده است. حالت اندمیک آن تقریباً ۱۰ درصد در بچه‌های زیر پنج سال در کشورهای درحال‌توسعه است و بیش از ۷۵ درصد با مرگ همراه است. به‌طورکلی ۹۹ درصد مرگ‌ومیر در کشورهای درحال‌توسعه 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، به‌عنوان یک عامل بیوتروریست با پتانسیل بالایی قرار دارد که این ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونی بودن و نبود یک واکسن علیه بیماری و میزان وقوع بالای بیماری است (۱۹). به‌صورت رایج هیچ‌گونه واکسنی برای *شیگلا* وجود ندارد. سلول‌های T در حفاظت علیه *شیگلا* نقش دارند؛ اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. *شیگلا دیسانتری تیپ ۱* هنوز هم عمده‌ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صدسال اخیر است و نسبت مرگ‌ومیر آن در کشورهای جهان متفاوت است (۲۰).

توکسین STx که در اصطلاح به شیگا توکسین معروف است، می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک 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 گونهٔ *شیگلا* به نام *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ و *فلکسنری* و *اشرشیاکلای* O157 تولید می‌شود و ژن آن در گونه‌های 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 به‌صورت غیر کووالان به پروتئین B *نایسریا مننژیتیدس* متصل و در ویزیوکول‌های مولتی‌لایر مشتق از نایسریا محصور شده بود. LPS شیگلا را در این وزیکول‌ها قرار می‌دهند و به‌صورت نازال تلقیح می کنند که تلقیح آن به‌صورت نازال بهتر از نوع خوراکی بود (۲۱). در سال ۲۰۰۵، STx1B به همراه توکسین کلرا برای ایمنی‌زایی به‌صورت اینترا نازال به موش Balb/c استفاده گردید که افزایش قوی در پاسخ ایمنی مشاهده شد (۲۲). در سال ۲۰۰۵، به‌منظور تقویت ایمنی‌زایی علیه STxB، این پروتئین را با پروتئین هموسیانین کانجوگه کردند و در بررسی ایمنی‌زایی پروتئین کایمریک، پاسخ ایمنی به‌طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی‌تری ایجاد گردید (۲۳).

در سال ۲۰۰۸، تلاش برای ساخت یک واکسن نازال (دماغی) از طریق خالص‌سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت. چون ایمنی‌زایی علیه STxB ضعیف گزارش‌شده بود و آنتی‌بادی ضد STxB هنوز نتوانسته است به‌تنهایی ایمنی‌زایی مناسبی ایجاد کند، به‌منظور ایجاد ایمنی مخاطی این تلاش انجام گرفت. این کار تولید آنتی‌بادی را به‌سوی آنتی‌بادی‌های مخاطی شیفت داد (۲۴). در سال ۲۰۱۲، ایمن‌سازی توسط واکسن اینترا نازال (داخل بینی) با پروتئین Stx2B-TIR-Stx1B-Zot به کاهش خونریزی در بزغاله، پس از چالش با باکتری‌های *اشرشیا 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 محل‌های مناسب در سامانه‌های بیولوژیک مورد توجه فراوانی است. در این تحقیق از نانوذرات تری متیل کایتوزان به‌عنوان حامل پروتئین استفاده گردید. تری‌متیله شدن کایتوزان سبب انحلال بیشتر کایتوزان می‌شود. از این پلیمر در تحقیقات بسیاری به‌عنوان حامل دارو استفاده‌شده 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 غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازهٔ ذرات در محدودهٔ چند نانومتر تا میکرون به‌کار می‌رود. اندازه‌گیری پتانسیل زتا برای کلوئیدها و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

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

در این مطالعه، آنتی‌ژن نوترکیب BLF1، پس از بیان توسط نانوذرهٔ تری‌متیل کایتوزان، انکپسوله شد؛ سپس به‌صورت تزریق زیرجلدی و خوراکی به مدل حیوانی موش (نوع موش) تجویز گردید. با ارزیابی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی ژن BLF1 در سرم موش‌های ایمن‌شده به‌صورت زیرجلدی، تیتر مناسبی مشاهده شد، به‌نحوی‌که 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 مشاهده‌شده میان تیتر این 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 می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچگونه تعارض منافعی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق: ٦٢٧٢ مورخ ۱۳۹۷/۰٤/۲۰

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 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. Wongtrakoongate P, Mongkoldhumrongkul N, Chaijan S, Kamchonwongpaisan S, Tungpradabkul S. Comparative proteomic profiles and the potential markers between Burkholderia

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]

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. Wileyliss 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/CVI.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.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /بهمن ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۶، ۷۲-۶۱

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-12]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.6.61]