

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 Aghaie¹ , Mohammad Reza Akbari¹ , Ayoub Fazeli¹ 

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

A B S T R A C T

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

ستز نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین نوترکیب BLF1-stxB باکتری *burkholderia pseudomallei* و بررسی اینمی‌زایی آن در موش سوری

حسین هنری^{*} , سید مجتبی آقابی^۱ , محمد رضا اکبری^۱ , ایوب فاضلی^۱

^۱ مرکز زیست شناسی، دانشگاه 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، دانشگاه

علوم پایه، دانشگاه جامع امام

حسین(ع)، تهران، ایران

Email:
honari.hosein@gmail.com

مقدمه: باکتری بورخولدریا سودومائی عامل بیماری میلوئیدوزیس است. BLF1 نقش مهمی در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط بورخولدریا سودومائی دارد. STXB نقش ادجوانی و حاملی را دارد و می‌توان با ممزوج کردن آنتی-زن-های کاندیدای واکسن با این ادجوانات، به تولید واکسن مناسب پرداخت. هدف این تحقیق ساخت و ارزیابی اینمی‌زایی نانوذرة تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین BLF1-stxB به صورت تزریق زیرجلدی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بیان پروتئین نوترکیب BLF1-stxB در میزان بیانی القا و پروتئین به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص شد؛ سپس ساخت نانوذره به روش ژل‌سیون یونی صورت گرفت و اندازه و شکل ظاهری نانوذره توسط میکروسکوپ الکترونی انجام و به صورت تزریق زیرجلدی در چهار نوبت به موش تزریق گردید. ارزیابی تیراسیون آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم صورت گرفت. برای بررسی اینمی‌زایی 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 زتابی پایین تر دارند. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذره در حدود ۶۵ درصد بود. بالاترین تیتر آنتی‌بادی 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 نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که گونه نانوذرة حاوی این پروتئین نوترکیب در مقایسه با گونه بدون نانوذره، به صورت تزریقی به بروز پاسخ اینمی ضعیف‌تری منجر می‌شود. نتایج چالش نشان داد که این پروتئین کایمر نوترکیب در حالت تزریق زیرجلدی همراه ادجوانات، حفاظت مناسب تری را ایجاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین کایمر BLF1-stxB، پروتئین نوترکیب BLF1، تری متیل کایتوزان، کاندید واکسن، میلوئیدوزیس

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



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

در صنعت بیشتر از پلیمرهای زیستی مانند کایتوزان استفاده می‌شود که فراوان، ارزان و زیست‌ساز گار هستند. تری‌متیل کایتوزان یکی از مشتقات استیل زدایی شده 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 اینمی‌زایی و حفاظت آن در مقایسه با فرم بدون نانوذره *BLF1-stxB* است. با توجه به اینکه پروتئین *BLF1* توانایی توقف پروتئین‌سازی و *STxB* نقش ادجواناتی دارد و همچنین با توجه به بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده، می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن علیه بورخولدریا سودومالئی و شیگلا دیسانتری استفاده شود. البته در این مقاله، هدف بررسی اینمی‌زایی 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 *Escherichia coli* BL21 DE3 به عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن، 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 ردۀ B قرار گرفته است. باکتری بورخولدریا سودومالئی یک باسیل گرم منفی کوچک، بی‌هوای اختیاری، بدون اسپور، اکسیداز مثبت و متحرك است. این باکتری توسط ایالات متحده امریکا و پیش‌تر از آن، از سوی اتحاد جماهیر شوروی جزو سلاح‌های بیولوژیکی بالقوه ارزیابی شده است (۱). میلوئیدوزیس انسانی می‌تواند از یک آلدگی پوستی ناحیه‌ای تا یک عفونت خونی حاد یا یک ذات‌الریه متغیر باشد (۳، ۲). این ارگانیسم می‌تواند برای سال‌ها به صورت نهفته باقی بماند (۴). دو مسیر اصلی برای عفونت با باکتری بورخولدریا سودومالئی شامل استنشاق ذرات معلق آلدود یا از طریق تلقیح پوستی است (۵). بورخولدریا سودومالئی به بسیاری از آنتی‌یوتیک‌ها از جمله تعداد فراوانی از بتا لاكتاماز‌ها، آمینوگلیکوژیدها، ماکرولیدها و پلی‌میکسین‌ها مقاوم است که این امر مقابله با بیماری را دشوار می‌نماید (۳). این امر بهنوبهٔ خود موجب مهار گسترش پروتئین‌ها در سلول‌های انسان می‌شود.

آنالیز پروتئوم باکتری بورخولدریا سودومالئی و سویه 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* به عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن، موردنیاز است.

شیگلوز (عفونت حاد روده‌ای) یکی از بزرگ‌ترین

دستگاه DLS استفاده و اندازه‌گیری در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد انجام گردید.

بررسی سورفولوژی 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 پروتئین محبوس شده در نانوذرات از روش غیرمستقیم استفاده شد. با استفاده از دو رابطه ۲-۱ و ۳-۱، 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 آنتیزن از نانوذرات تری متیل کایتوزان: پس از بارگذاری ۱ میلی گرم آنتیزن در ۳ میلی لیتر محلول حاوی پلیمر تری متیل کایتوزان در بازه‌های زمانی ۰، ۱، ۰/۵، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، ترسیب ژل تری متیل کایتوزان انجام شد و محلول رویی برای پروتئین‌سنگی جمع‌آوری گردید. میزان پروتئین موجود در محلول‌های جداسده از محیط آزمایش توسط UV اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

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 میلی آمپر بررسی شد (۱۱، ۱۲).

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 واحد ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار و مس ۲۰ میلی‌مولار، نمونه‌های جمع‌آوری شده از مراحل چندگانه تخلیص پس از تیمار با سمپل بافر، با روش SDS-PAGE ارزیابی شدند (۱۳، ۱۴).

سترن 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 تری‌پلی‌فسفات تهیه گردید. محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات به صورت قطره‌قطره و طی مدت زمان ۶۰ دقیقه، به ۳ میلی لیتر 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 اندازه شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات تولیدشده، از

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 ۲-۱. فرمول محاسبه بازده احتباس

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

رابطه ۳-۱. 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 تیتر آنتی‌بادی تولید شده توسط الایزای غیرمستقیم در سرم، از آزمون‌های ANOVA و t.test استفاده شد. این آزمون برای مقایسه 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.

یافته‌ها

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 شماره ۱).

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

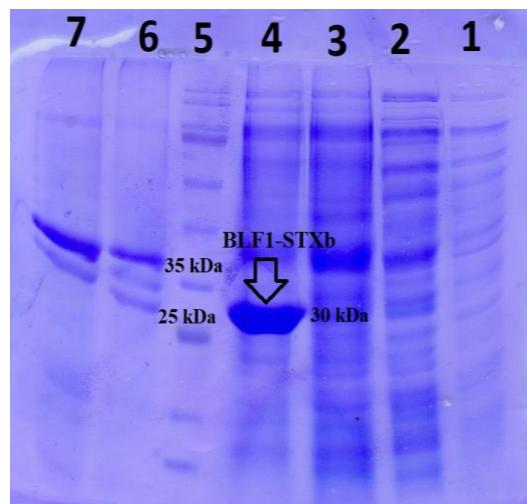


شکل شماره ۲. بررسی تخلیص پروتئین با ستون نیکل. ستون ۱. عصاره پروتئین پیش از بردن روی ستون؛ ستون ۲. نمونه جمع آوری شده پس از عصاره سلولی؛ ستون ۳. نشانگر پروتئینی؛ ستون ۴. نمونه جمع آوری شده پس از افزودن بافر C؛ ستون ۵. نمونه جمع آوری شده پس از افزودن بافر D؛ ستون ۶. نمونه جمع آوری شده پس از افزودن بافر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

ایمنی‌زایی موش: در این تحقیق، دستورالعمل‌های کمیّتی سازمانی اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها به سه گروه چهارتایی تزریق نانوذره حاوی پروتئین کایمر، PBS به عنوان شاهد و پروتئین همراه با ادجوانات تقسیم شدند. ایمونیزاسیون در ۴ مرحله به صورت تزریق زیرجلدی انجام گرفت.

در تزریق پروتئین همراه با ادجوانات، طی مرحله اول ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانات کامل فروند ترکیب شد؛ در مرحله دوم (۱۴ روز بعد) ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانات ناقص فروند ترکیب گردید؛ پس از هر خون‌گیری به منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی موجود در سرم موش‌ها، از آزمایش‌الایزای غیرمستقیم استفاده شد (۱۱، ۱۲).

بررسی ایمنی‌زایی: در این تحقیق، از خود پروتئین BLF1 به عنوان 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 ادجوانات ISCOM به داخل عضله یا به داخل صفاق موش را می‌کشد (۱۵، ۷).



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.

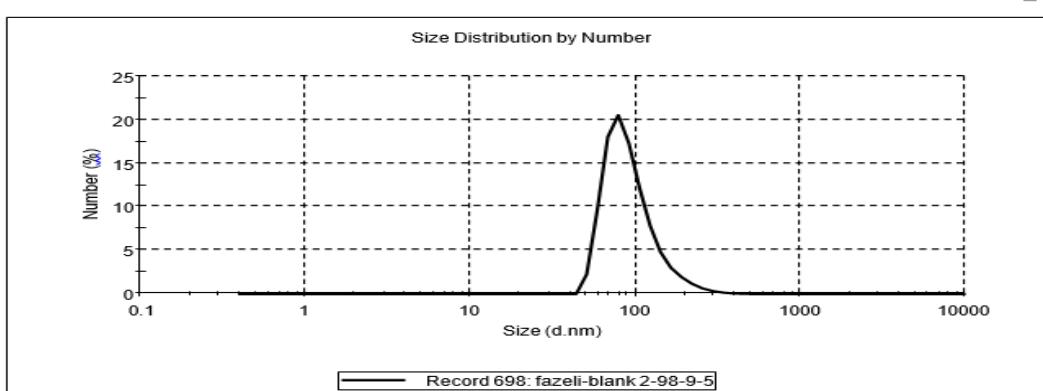
بررسی پتانسیل زتای نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین نوترکیب *BLF1-StxB* این آزمون نیز از نمونه های نانوذرات تری متیل کایتوزان تهیه شد که توزیع اندازه ذرات آن ها در مراحل پیشین بررسی شده بود. نتایج نشان داد که پتانسیل زتای نانو ذرات تری متیل کایتوزان بدون پروتئین یک پیک میانگین در محدوده $20/20$ میلی ولت (شکل شماره ۵) داشت؛ همچنین نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی پروتئین، دارای یک پیک در محدوده $11/23$ میلی ولت (شکل شماره ۶) بود.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیابی نانوذرات توسط DLS پس از آماده سازی نمونه، نانوذرات تری متیل کایتوزان تولید شده در حضور پروتئین و نبود پروتئین *DLS*، از نظر اندازه نانوذرات توسط دستگاه *BLF1* بررسی شدند. نتایج نشان دهنده این بود که نانوذرات بدون پروتئین اندازه 95 نانومتر و $PDI=0.325$ (شکل شماره ۳) و نانوذراتی حاوی پروتئین اندازه 160 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.

Results

Z-Average (d.nm): 230
Pdl: 0.325
Intercept: 0.0990

	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Peak 1:	95.2	100.0	39.1
Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Peak 3:	0.00	0.0	0.00

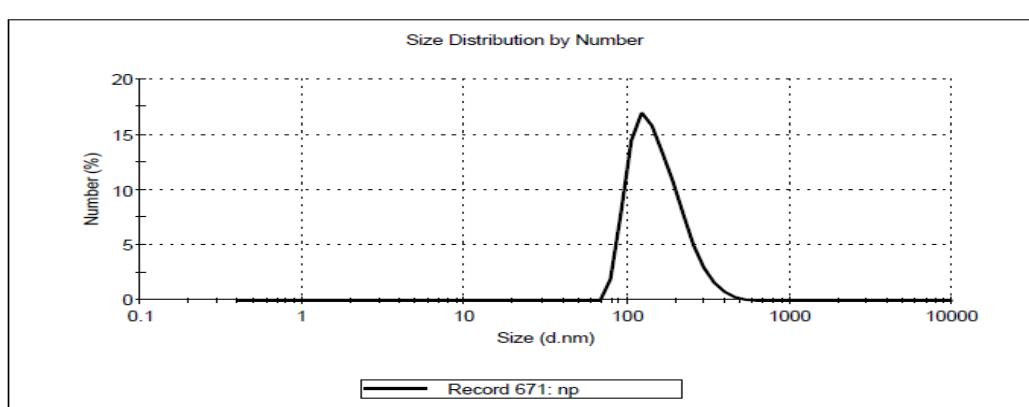


شکل شماره ۳. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات تری متیل کایتوزان بدون پروتئین *BLF1-StxB* در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS

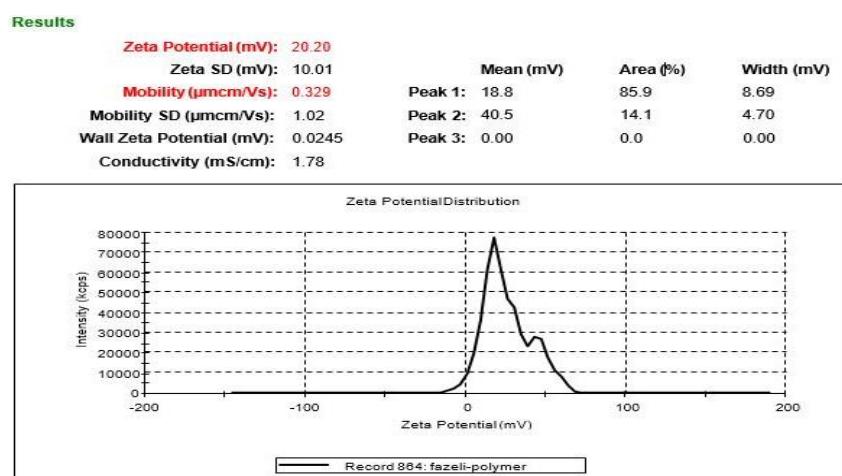
Results

Z-Average (d.nm): 270
Pdl: 0.450
Intercept: 0.247

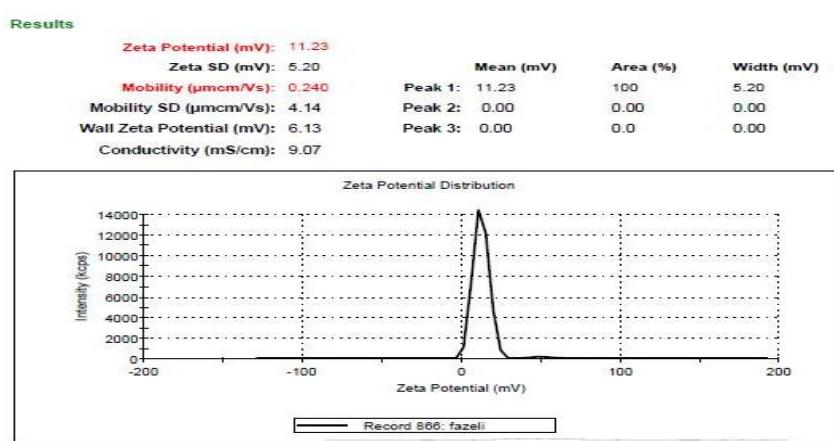
	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Peak 1:	160	100.0	63.6
Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Peak 3:	0.00	0.0	0.00



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



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



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 $69/23$ ، 65 و $5/2$ درصد است.

بررسی برون تن رهایش آنتی زن 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



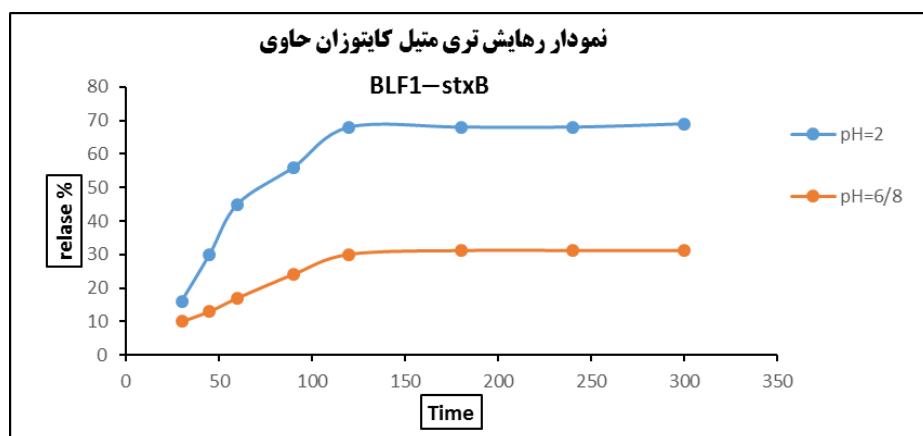
شکل شماره ۷. تصویر میکروسکوپ الکترونی FEI مدل Quanta 200 از نانوذرات کایتوزان (نانوذرات خشک شده بر سطح شیشه ای، روی گرید قرار گرفت و پس از پوشش دهی با طلا، تصویربرداری شد).

مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی در شکل شماره ۷ نشان داده شده است. بررسی بازده وزنی و احتباس پروتئین در نانوذرات به

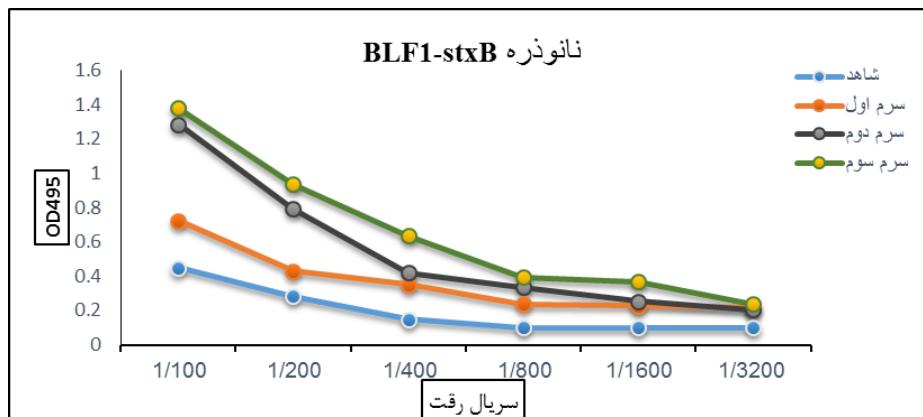
به منظور ارزیابی میزان آنتی‌بادی تولید شده در موش‌های ایمن شده همراه نانو ذره به صورت زیرجلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزا غیرمستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شماره ۹ نشان داده شده است. تیتر آنتی‌بادی تولید شده در موش‌های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله تزریق افزایش یافته است.

نانوذرات تری‌متیل کایتوزان صورت گرفته است. این نتایج نشان‌دهنده این مطلب است که نانوذرة تری‌متیل کایتوزان در معده سریع تر رهایش بیدا می‌کند.

بررسی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین نوترکیب کپسوله شده با نانوذرة تری‌متیل کایتوزان و پروتئین نوترکیب بدون نانوذرة در موش‌های ایمن شده؛ الف. موش‌های ایمن شده به صورت زیرجلدی همراه نانوذرة:



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

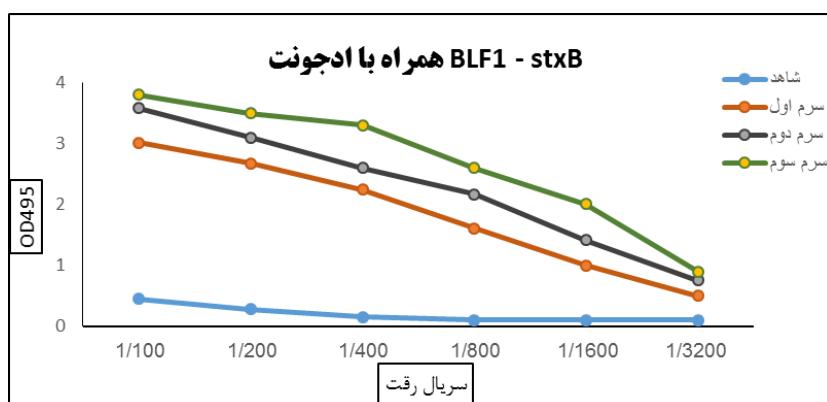


شکل شماره ۹. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده با تری‌متیل کایتوزان به صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش‌های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می‌دهد.

در هر مرحله تزریق افزایش یافته است.

چالش: نتایج چالش با سرم BLF1 نشان داد، موش‌ها ایمن شده با نانوذرة حامل پروتئین حفاظت ۵۰ درصد و موش‌های ایمن شده با پروتئین بدون نانوذرة حفاظت قابل قبول ۷۵ درصد را ایجاد می‌کنند، این در حالی است که گروه کنترل هیچ گونه حفاظتی را نشان ندادند (جدول شماره ۱).

موش‌های ایمن شده با ادجوانت و پروتئین نوترکیب به صورت تزریق زیرجلدی؛ به منظور ارزیابی میزان آنتی‌بادی تولیدشده در موش‌های ایمن شده بدون نانوذرة به صورت زیرجلدی و نیز گروه شاهد، از روش الایزا غیرمستقیم استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا در شکل شماره ۱۰ نشان داده شده است. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در موش‌های ایمن معادل ۱ به ۳۲۰۰۰ بود. تیتر آنتی‌بادی



شکل شماره ۱۰. تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه BLF1-stxB بدون نانوذاره به صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش‌های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رفت را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱. میزان حفاظت گروه‌های ایمن شده مختلف همراه با ادجوفت را برابر چالش

شماره گروه	گروه‌های موشی	تعداد	میزان سهم چالشی	درصد زنده ماندن	درصد مرگ	Alphe=0.05
۱	موش‌های ایمن شده با نانوذاره تری‌متیل کاپیتوزان حامل پروتئین	۴	۵۰ میکروگرم	۵۰ درصد	۵۰ درصد	**
۲	موش‌های ایمن شده بدون نانوذاره تری‌متیل کاپیتوزان	۴	۵۰ میکروگرم	۷۵ درصد	۲۵ درصد	*
۳	شاهد	۴	۱۰ میکروگرم	۰	۱۰۰ درصد	

کنیم (۷)؛ همچنین BLF1 می‌تواند کاربردهای جایگزینی را در پزشکی ارائه دهد (۱۷). eIF4A و BLF1 (مهارکننده سنتر پروتئین) ابزار جدید مولکولی نیرومندی برای شیمی درمانی در تومورها هستند. واضح است که تحويل BLF1 یا eIF4A به تومور شرط لازم برای استفاده درمانی از آن است. با استفاده از فناوری DNA نوترکیب می‌توان بخش‌هایی را که در بروز بیماری زایی به‌واسطه آن‌ها نقش اساسی دارند، کلون و بیان کرد تا به عنوان کاندید واکسن، میزان ایمن‌سازی آن‌ها علیه باکتری بررسی شود (۷).

گزارش‌های میلوئیدوزیس بین سال‌های ۱۹۲۵ و ۱۹۵۰ تا حد سیاری به جنوب شرقی آسیا محدود می‌شد. 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. بورخولدریا سودومالئی تا سال ۱۹۹۲ به عنوان بخشی از *Pseudomonas* طبقه‌بندی می‌شد (۱۸).

بحث و نتیجه‌گیری
بورخولدریا سودومالئی یکی از باکتری‌های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. این باکتری در سال ۲۰۰۲، جزو عوامل بیوتوریسم ردۀ B قرار گرفته است. باکتری به‌آسانی حتی در هوای سرد و خارج از مناطق گرمسیری نیز رشد می‌کند. علاوه بر این، باکتری در آب مقطر دست کم می‌تواند ۱۰ سال زنده بماند (۱۶). به تازگی گزارش شده است که بورخولدریا سودومالئی قادر است گیاه گوجه‌فرنگی را آلدود کند که نگرانی‌های امنیتی برای استفاده آسان بیوتوریسم در گیاه، به عنوان میزبان جدید برای پاتوژن را بالا می‌برد (۳).

شناخت سازوکار مولکولی توکسین BLF1 روی سلول‌های انسانی راه را برای استفاده از آن در درمان سلول‌ها مهیا می‌کند و می‌تواند 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

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 بچه های زیر پنج سال در کشورهای در حال توسعه است و ۹۹ بیش از ۷۵ درصد با مرگ همراه است. به طور کلی 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 کترول و پیشگیری از بیماری ها، به عنوان یک عامل بیوتروپریست 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 عمدترين علت اصلی ایدمی اسهال، در صد سال 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 سیتو توکسیک 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 اشرشیا کلای 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 پروتئزومی با تلقیح نازال (بینی) دارای LPS شیگلا ساخت که به صورت غیر کووالان به پروتئین B نایسیریا منثربیس متعلق و در ویزیوکول های مولتی لایر مشتق از نایسیریا محصور شده بود. LPS شیگلا را در این وزیکول ها قرار می دهنده و به صورت نازال تلقیح می کنند

که تلقیح آن به صورت نازال بهتر از نوع خوارکی بود (۲۱). در سال ۲۰۰۵، STx1B به همراه توکسین کلرا برای ایمنی زایی به صورت اینترا نازال به موش c/ Balb 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 هموسیانین کانجو گه کردن و در بررسی ایمنی زایی پروتئین کایمیریک، پاسخ ایمنی به طور ناجیزی 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 شیفت 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 اشرشیا کلی H7: O157: H7 منجر شد (۲۵).

نتایج حاصل از بیان و تخلیص تحقیق حاضر دقیقاً با نتایج کار مسعودی و همکاران مطابقت دارد (۱۱، ۱۲). استفاده از پلیمرهایی مانند کایتوzan برای انتقال داروها به محل های مناسب در سامانه های بیولوژیک مورد توجه فراوانی است. در این تحقیق از نانوذرات تری متیل کایتوzan به عنوان حامل پروتئین استفاده گردید. تری متیل شدن کایتوzan سبب انحلال بیشتر کایتوzan 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 پراکنده گی 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 کلوئیدها و

موش (نوع موش) تجویز گردید. با ارزیابی تیتر آنتی بادی تولید شده علیه آنتی ژن BLF1 در سرم موش های ایمن شده به صورت زیر جلدی، تیتر مناسبی مشاهده شد، به نحوی که آنتی بادی تولید شده علیه BLF1 موجود در سرم موش ایمن شده به صورت زیر جلدی در رقت ۱/۳۲۰۰، قادر به شناسایی توسط آنتی ژن BLF1 طی فرایند الایزای غیر مستقیم بودند و اختلاف مشاهده شده میان تیتر این آنتی بادی های تولید شده در سرم موش های ایمن شده به صورت تزریق زیر جلدی همراه با ادجوانات فروند و تزریق زیر جلدی 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 موش های ایمن شده به صورت تزریق زیر جلدی همراه با ادجوانات در مقابل ۵۰ درصد حفاظت موش های ایمن شده با آنتی ژن انکپسوله شده با پلیمر تری متیل 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 کردن تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندهای کان مقاله هیچگونه تعارض منافعی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق: ۶۲۷۲ ۱۳۹۷/۰۴/۲۰ مورخ

References

- 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.
- Stone R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. Science 2007; 317:1022-24. doi: 10.1126/science.317.5841.1022.
- 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.
- Wuthiekanun V, Suputtamongkol Y, Simpson

نانوذرات در سوپرانسیون برای پیش‌بینی قدرت ثبات و پایداری نانوذرات در فاز مایع است (۲۶). در این تحقیق، مبانگین اندازه نانوذرات تری متیل کایتوزان بدون و حاوی BLF1 پروتئین به ترتیب ۹۵/۲ و ۱۱۶ نانومتر برای پروتئین BLF1-stxB بود. در تحقیق ۱۶۰ نانومتر برای پروتئین قلاوند و همکاران پس از بارگذاری پروتئین توکسوئید کراز در نانوذرات تری متیل کایتوزان، در محدوده ۱۲۰-۹۰ نانومتر تولید شدند (۲۷)؛ همچنین در تحقیق دیگری که آنشوا مالیک و همکاران انجام دادند، اندازه نانوذرات آبکار و همکاران نیز اندازه نانوذرات تری متیل کایتوزان حاوی Omp31 حدوداً بین ۲۰۰-۳۰۰ اندازه گیری شد (۲۸). در تحقیق دیگری، سلیمانی و همکاران به بررسی ساخت و تولید نانوذرات تری متیل کایتوزان حامل پروتئین نوترکیب HP-NAP هیلوکوباکترپلوری پرداختند که سایز ۹۵ درصد ذرات بین ۱۵۰-۲۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید (۲۹)؛ همچنین در مطالعه اکبری و همکاران که پروتئین IpaD را در تری متیل کایتوزان بارگذاری کردند، اندازه بیشتر نانوذرات بین ۱۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر به دست آمد (۹). نتایج بالا نشان می دهد که اندازه نانوذرات کایتوزان در محدوده مشابهی در مقایسه با دیگر مطالعات قرار دارد و این تفاوت های جزئی می تواند به علت تغییرات اندکی در روش تولید از جمله استفاده از حللهای مختلف و نسبت های مختلف مواد اتفاق افتاده باشد.

در این مطالعه، آنتی ژن نوترکیب BLF1، پس از بیان توسط نانوذره تری متیل کایتوزان، انکپسوله شد؛ سپس به صورت تزریق زیر جلدی 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.
- 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.
- Wongtrakoongate 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 Titors 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.0000000000000000
 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, Haghghi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2014; 23:134-44.