نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۴۳- ۱۵۲

ارزیابی ایمنی‌زایی نانوواکسن مبتنی بر PLGA توکسین بتای کلستریدیوم پرفرنژنس در مدل موشی

ابراهیم عباسی[۱]، تقی زهرایی صالحی[*۲]، مجید تبیانیان[۳]، رضا پیله چیان لنگرودی[۴]، رامک یحیی رعیت[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- دانشیار، بخش ایمنی‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۴-استادیار، بخش تولید واکسن‌های بی‌هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی راز، ،سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۵- استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۰۱ شهریور ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۳ شهریور ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۳ شهریور ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.473829.1253

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات به‌عنوان یک استراتژی جدید در تقویت پاسخ ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. از توکسین‌های پروتئینی غیر دناتوره می‌توان برای ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی استفاده کرد. هنگامی که این توکسین‌ها با نانوذرات واکنش می‌دهند، خاصیت سمی خود را از دست می‌دهند، زیرا نمی‌توانند به لیگاندهای خود در سطح سلول متصل شوند. مطالعات نشان می‌دهد که کمپلکس‌های تشکیل شده از نانوذرات و توکسین‌ها می‌توانند فرآیند رهاسازی داخلی توکسین را تسهیل کنند. یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که توسط این توکسین‌ها ایجاد می‌شود، اسهال خونی در بره‌های نوزاد است. نانوذره استفاده شده در این تحقیق پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) می‌باشد که یکی از توسعه‌یافته‌ترین پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر است. هدف از این تحقیق جداسازی و تخلیص توکسین بتاکلستریدیوم پرفرنژنس و ایجاد کمپلکس آن با نانوذره PLGA و تولید یک ساختار غیر توکسیک است. پاسخ ایمنی پس از تزریق این نانوتوکسوئید در حیوان هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. سنجش توکسین به‌طور درون‌تن (LD50) و برون‌تن توسط تکنیک سدیم دودسیل سولفات (SDS psge) در هر مرحله انجام شد. در این بررسی آنتی‌ژن توکسین بتا مبنای تهیه کاندید نانوتوکسوئید با فرمولاسیون نانوذره قرار گرفت. تأثیر فرمولاسیون نانوذره حاوی آنتی‌ژن بتا در ایجاد پاسخ ایمنی روی مدل حیوانی (موش NIH) مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها نشان دادند که نانوذره PLGA را می‌توان برای طراحی و ساخت نانوواکسن توکسوئیدی که حاوی توکسین باشد مورد استفاده قرار داد و از آن به‌منظور سیستم‌های اتصال آنتی‌ژن در زمینه‌های مختلف استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *کلستریدیوم پرفرنژنس، توکسین بتا، نانوتوکسوئید، الایزا*

[*] پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: tsalehi@ut.ac.ir

مقدمه

باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس یک باکتری بی‌هوازی گرم‌مثبت و تولیدکننده اسپور است که بر اساس تولید چهار نوع توکسین کشنده آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به ۵ تیپ مختلف از A تا E طبقه‌بندی می‌شوند. تمامی این توکسین‌ها ماهیت پروتئینی و عملکرد آنزیمی دارند (۱).

توکسین بتا کلستریدیوم پرفرنژنس یکی از چهار نوع توکسین اصلی محسوب می‌شود که توسط سویه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس نوع B و نوع C تولید می‌شود. این پروتئین در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک بسیار حساس می‌باشد و به همین دلیل در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک روده تغییر ماهیت می‌دهد و باعث افزایش نفوذپذیری مویرگ‌های روده و ایجاد نواحی خونریزی دهنده و زخم مخاطی روده کوچک می‌شود (۲).

به همین دلیل توکسین تولید شده توسط سویه‌های B و C این باکتری می‌تواند باعث التهاب، خونریزی، نکروز شده و بیماری‌های مرتبط با روده از جمله آنتروکولیت نکروزان و انتروتوکسمی را در انسان و حیوانات ایجاد کند (۳).

مدیریت تغذیه و واکسیناسیون تنها راه برای پیشگیری از بیماری است زیرا با توجه به ماهیت حاد بیماری، درمان دارای ارزش محدودی است و واکسن‌های مرسوم مبتنی بر پیکره باکتری‌های غیر فعال یا سوپرناتانت‌های کشت غیر فعال شده با حرارت به‌دلیل واکنش‌های التهابی موضعی، پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و کنترل نشده و ایمنی کوتاه مدت در حیوانات واکسینه شده تا حد زیادی محدود شده است .به همین دلیل ساخت واکسن توکسوئیدی به‌عنوان یک ضرورت در ساخت واکسن بر علیه این بیماری محسوب می‌شود (۴).

یکی از راهکارهای تقویت پاسخ‌های ایمنی بر علیه واکسن‌های توکسوئیدی، ایجاد مکانیسم‌هایی برای انتقال و حمل واکسن می‌باشد. برای این منظور سیستم‌های انتقالی مختلفی در واکسن‌های مختلف نوترکیب و غیر فعال مورد استفاده قرار گرفته است (۵). یکی از بهترین و کاربردی‌ترین مولکول‌هایی که در این موارد به‌کار گرفته شده است، پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر و از جمله پلی‌لاکتید کوگلیکولیک اسید (PLGA) می‌باشد (۶).

در سال‌های اخیر این پلیمر به‌عنوان یکی از کاربردی‌ترین حامل‌های دارو و اکسن مورد استفاده قرار گرفته است و با توجه به این که می‌تواند از آنتی‌ژن موجود در آن در مقابل شرایط نامناسبی مانند pH اسیدی، نمک‌های صفراوی و فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک محافظت کند، استفاده از آنها بسیار مورد توجه بوده است و مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) نیز قرار گرفته است (۷).

هدف از انجام این مطالعه تولید مقدار قابل قبولی از سم بتای کلستریدیوم پرفرنژنس و فرمولاسیون آن در یک سیستم انتقالی بر مبنای نانوذرات حاوی PLGA بوده است. به‌منظور بررسی کارائی این سیستم، پاسخ‌های ایمنی القاشده از آن در مقابل توکسوئید نیز اندازه‌گیری و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری و جداسازی توکسین: بتا توکسین از سویه واکسینال کلستریدیوم پرفرنژنس نوع B که از بخش تولید واکسن‌های بی‌هوازی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده بود تولید گردید. میکروارگانیسم مورد نظر در محیط کشت تیوگلیکولات و در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اولیه، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت به ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط تیوگلیکولات تازه منتقل و برای تولید توکسین، مجدداً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. سوسپانسیون حاصل با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا سلول‌های باکتری از مایع روئی جدا گردند. مایع رویی حاصل در دو مرحله و با استفاده از سولفات آمونیوم به میزان ۵۰ درصد اشباع، برای رسوب‌دهی پروتئین‌ها آماده‌سازی شد و به مدت ۴

ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت هم‌زدن مداوم قرار گرفت.

سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با ۲۰ میلی‌لیتر محلول بافرتریس هیدروکلراید (۲۰ میلی‌مولار) شسته شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت همان بافر دیالیز گردید. در انتها محلول حاصل با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی از فیلتر ۴۵ میکرون عبور داده شد.

پروتئین‌های حاصل از مرحله قبل با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تفکیک شدند. برای این منظور ژل سفادکس G50 با محلول بافرتریس هیدروکلراید شسته شد و سپس ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه پروتئینی به ستون کروماتوگرافی اضافه گردید. خروجی ستون به میزان ۲۰ قطره در دقیقه تنظیم شد و محلول خروجی در لوله‌های آزمایش به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری و بررسی گردید. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. در مرحله بعد الگوی پروتئینی نمونه‌های خالص شده با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE)، سنجیده شد. سپس لوله‌های حاوی پروتئین‌های با خلوص بالاتر شناسایی و ترکیب شدند. میزان پروتئین موجود در این نمونه‌ها نیز با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

در نهایت وجود سم بتا در نمونه خالص شده با به‌کارگیری روش وسترن بلات و استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی‌بتا (120 *IU/ml*) گوسفندی تأیید شد.

اندازه‌گیری حداقل دوز کشنده: رقت‌های ۱/۱۱۰۰ تا ۱/۱۵۰۰ از هر فراکسیون تهیه شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت به‌صورت داخل وریدی به دو موش NIH با وزن ۱۶ تا ۱۸ گرم تزریق شد و مرگ و میر موش‌ها طی چهار روز بررسی شد.

تهیه نانوذرات PLGA حاوی توکسین بتا: نانوذرات PLGA (سیگما) حاوی بتاتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس با روش تبخیر حلال دوگانه امولسیون آب-روغن-آب سنتز شدند. ابتدا، محلول آلی PLGA 1% در استون تهیه شد. سپس، فاز آبی داخلی حاوی بتاتوکسین به محلول PLGA اضافه شد و به‌وسیله همزن با سرعت متوسط همگن گردید. پس از آن، به مدت ۱ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفت تا امولسیون اولیه تشکیل شود. سونیکاسیون باعث تولید نانوذراتی ریزتر و ایجاد توزیع همگن آنها می‌شود.

نانوذرات PLGA (سیگما) حاوی بتا توکسین کلستریدیوم پرفرنژنس با استفاده از روش تبخیر حلال دوگانه امولسیون آب-روغن-آب سنتز شدند. ابتدا محلول آلی PLGA 1% در استون تهیه گردید و سپس فاز آبی داخلی حاوی بتاتوکسین به محلول PLGA اضافه شد و توسط همزن (VELP، ایتالیا) همگن‌سازی شد. سپس امولسیون به مدت ۱ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفت تا اندازه ذرات کاهش یافته و امولسیون به‌طور یکنواخت تشکیل شود. در مرحله بعد، امولسیون حاصل به یک فاز آبی خارجی حاوی ۱/۲۵ پلی‌وینیل الکل (PVA) اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. استون موجود در نمونه در طول یک شبانه‌روز و تحت هم‌زدن مغناطیسی با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه تبخیر شد. نانوذرات ایجاد شده پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند و سپس دو بار با آب شسته شدند تا ترکیبات اضافی حذف شوند. در نهایت، نانوذرات تشکیل شده توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز و بار الکتریکی (DLS، Maven، دانمارک) ارزیابی شدند.

بررسی پاسخ های ایمنی: جهت بررسی ایمنی‌زایی نانوذرات توکسوئیدی تهیه شده، از مدل حیوانی موش آزمایشگاهی استفاده شد. بدین منظور، ۴۰ سر موش Balb/C ماده (۶ تا ۸ هفته‌ای) به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. به هر گروه به‌ترتیب مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات PLGA حاوی توکسین بتا، توکسین بتا، ذرات PLGA و سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرجلدی و

در دو نوبت با فاصله دو هفته تزریق شد. پس از پایان دوره ایمن‌سازی، خون‌گیری از گروه‌های تجربی به‌منظور بررسی پاسخ‌های هومورال انجام شد. نمونه‌های خون سانتریفیوژ شده و سرم‌ها جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از جمع‌آوری کامل سرم‌ها، پاسخ‌های آنتی‌بادی مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ ایمنی در برابر توکسین بتا با استفاده از آزمون الایزای غیر مستقیم تعیین شد. به‌طور خلاصه، توکسین بتای خالص‌شده با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر پوشاننده (بافر کربنات- بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار، pH 9.6) تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا (Nunc) افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها با استفاده از بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد Tween 20) سه بار شسته شدند و محل‌های اتصال غیر اختصاصی با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ (PBS حاوی ۵ درصد شیر بدون چربی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت مسدود شدند. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌های رقیق‌شده (۱:۱۰۰) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgG کونژوگه با HRP ضد موشی (سانتا کروز بیوتکنولوژی) به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس سوبسترای ۳،۳’،۵،۵’- Tetramethylbenzidine (TMB) به نمونه‌ها افزوده شد و بعد از ۱۵ دقیقه، واکنش با استفاده از اسید سولفوریک ۱ نرمال خاتمه یافت. میزان جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان (Biorad، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

تخلیص توکسین بتا: جداسازی و تخلیص توکسین بتا با استفاده از رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی با ستون G50 انجام شد. پس از تخلیص، محصول نهایی و توکسین خام پروتئینی از نظر کمی و کیفی ارزیابی شدند. نتایج MLD (حداقل دوز کشنده) در واحد حجم و الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE برای مقایسه مورد بررسی قرار گرفتند.

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های خالص شده توکسین نسبت به توکسین خام کیفیت بهتری نشان دادند. در الگوی الکتروفورتیک نمونه‌های استخراج شده از ستون کروماتوگرافی و در فراکشن‌های ۶ تا ۱۰، باندهای پروتئینی مشخص و خالص در محدوده ۴۰ کیلو دالتون مشاهده شد که نشان‌دهنده کیفیت بالای فرایند تخلیص توکسین است. به نظر می‌رسد که این روش توانسته است مقدار قابل توجهی از پروتئین‌های آلوده را حذف کند، به‌طوری‌که توکسین‌های مداخله‌گر مانند آلفا و اپسیلون قابل شناسایی نمی‌باشند.

علاوه بر این، آزمایش وسترن بلات نشان داد که پروتئین‌های تخلیص شده علاوه بر خلوص قابل قبول، واکنش‌پذیری بالایی دارند و به‌طور قابل توجهی با آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه توکسین بتا واکنش نشان می‌دهند (شکل ۱).

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که با انجام فرایند تخلیص و کاهش پروتئین‌های غیر اختصاصی، میزان سمیت توکسین افزایش یافته است. بر اساس این نتایج، بالاترین رقتی که باعث مرگ موش‌ها در عرض ۹۶ ساعت شد، رقت ۱:۱۰۰۰ بود. میزان راندمان با توجه به توکسین تصفیه شده نهایی محاسبه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- راندمان توکسین تخلیص شده

توکسین تخلیص شده		توکسین خام		درصد راندمان (Recovery)	
مقدار پروتئین (mg/ml)	MLD	مقدار پروتئین (mg/ml)	MLD	توکسین خام	توکسین تخلیص شده
۲/۳	۱/۸۰۰	۹/۳	۱/۱۰۰	-	۴۰
۲/۵	۱/۸۰۰	۱۰/۸	۱/۱۰۰	-	۴۰
۱/۸۳	۱/۱۰۰۰	۱۰/۹۱	۱/۱۰۰	-	۵۰

ارزیابی نانوذرات حاوی توکسین: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده ذرات *PLGA* بدون حضور آنتی‌ژن، به‌طور متوسط اندازه‌ای در حدود ۱۰۰ نانومتر و شاخص پراکندگی(PDI) ۰/۰۸۲ داشتند. میزان پتانسیل زتا این ذرات نیز در محدوده ۲۳/۸- میلی‌ولت اندازه‌گیری گردید. پس از بارگزاری توکسین، اندازه این ذرات کمی افزایش یافت (۱۲۰ نانومتر) و پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی این ذرات نیز به‌ترتیب در محدوده ۱۸/۲- میلی‌ولت و ۰/۳۵۷ اندازه‌گیری شد.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز نشان‌دهنده کروی بودن و یکنواختی سطح ذرات حاصل از فرآیند تولید نانوذرات در شرایط بهینه می‌باشد (شکل ۲).

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی برعلیه توکسین بتا: دو هفته بعد از آخرین تزریق، میزان آنتی‌بادی برعلیه توکسین بتا با استفاده از آزمون الایزای غیر مستقیم اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود. نانوتوکسوئید محصور در *PLGA*، قابلیت ایجاد آنتی‌بادی را برعلیه توکسین بتا دارا می‌باشد هرچند که این میزان از گروه دریافت کننده توکسین خالص کمتر بوده است ($P<0.05$). گروهی که توکسین را به‌صورت خالص دریافت کرده بودند، بیشترین میزان آنتی‌بادی را تولید کرده بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

توکسین بتا که به‌عنوان عامل بیماری‌زای اصلی آنتروکولیت نکروزان و انتروتوکسمی در انسان و حیوانات شناخته می‌شود، توسط انواع *B* و *C* کلستریدیوم پرفرنژنس (*C. perfringens*) تولید می‌شوند. این توکسین منافذ عملکردی ۲۲۸ کیلو دالتون را تشکیل می‌دهد که با سمیت سلولی آن مرتبط است، درک ما از اثر سم بتا در حدت بیماری عفونی تا حد زیادی محدود است و شناسایی مکانیسم عمل آن باید مبنایی برای تحقیقات بیشتر فراهم کند که ممکن است اثر آن را در سطوح مولکولی و سلولی و سهم غالب آن در حدت این بیماری را روشن کند (۸). پیشرفت‌هایی در ساخت واکسن‌هایی علیه بتا توکسین حاصل شده است. واکسن‌هایی با کیفیت‌های متفاوت برای مبارزه با عفونت ایجاد شده توسط این باکتری، برای استفاده حیوانات و انسان‌ها در دسترس هستند.

هدف از انجام این مطالعه طراحی یک سامانه آنتی‌ژن رسانی با استفاده از ذرات پلیمری زیست تخریب‌پذیر *PLGA* بوده است که بدون ایجاد عوارض خاصی بر حیوان منجر به ایجاد پاسخ ایمنی برعلیه توکسین بتای کلستریدیوم پرفرنژنس گردد. بر همین مبنا و در مرحله اول ضمن بهینه‌سازی شرایط، توکسین بتای کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ *B* از سویه واکسینال تخلیص و مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده خلوص بالا و کارائی مناسب توکسین تخلیص شده بود (۹).

مطالعات متعددی در مورد تخلیص توکسین فوق در داخل و خارج کشور انجام شده است که روش‌های متعددی را نیز برای تخلیص مورد استفاده قرار داده‌اند. در سال ۱۹۷۷، جاکورایی و همکارانش نشان دادند که با استفاده از ترسیب سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی با سفادکس G100، می‌توان توکسین بتا را تا ۳۴۰ بار نسبت به کشت اولیه تغلیظ نمود. میزان بهره‌وری در این روش در حدود ۲۴ درصد می‌باشد. در ادامه همین محقق در سال ۱۹۸۷ روش جدیدی را برای تخلیص و تغلیظ این توکسین معرفی نمودند که بر مبنای فراکسیون‌های حاصل از سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد. در این روش توکسین تا ۴۶۰ برابر و با بهره‌وری ۶۰ درصد از کشت اولیه تغلیظ گردید (۱۰).

درمطالعه‌ای که توسط زایرزاده و همکاران انجام شده است، با استفاده از یک روش ۴ مرحله‌ای که با استفاده از ترسیب سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تعویض یونی، و ژل فیلتراسیون انجام شده است، توانسته‌اند با درجه بالایی از خلوص، بازدهی و فعالیت بیولوژیکی جدا نمایند.

در مطالعه دیگری توکسین بتای حاصل از *C. perfringens* تایپ *C* با استفاده از ترسیب آمونیوم

سولفات و کروماتوگرافی سفاروز *DEAE-CL6B* با خلوص بالایی جدا شد (۱۱).

نتایج به‌دست آمده نشان داد که با استفاده از روش بهینه شده در این مطالعه می‌توان توکسین را با خلوص بالا و با بهره‌وری حدود ۵۰ درصد تغلیظ و تخلیص نمود که این نتایج به میزان زیادی با مطالعات قبلی همخوانی دارد.

توکسین بتای تخلیص شده با اندازه مولکولی حدود ۴۰ کیلو دالتون جداسازی و تخلیص شد که با سایر مطالعات مشابه که وزن مولکولی توکسین تخلیص شده را بین ۳۰ تا ۴۰ کیلودالتون گزارش کرده بودند، همخوانی داشت (۱۲).

استفاده از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر جهت ایجاد سیستم‌های انتقال آنتی‌ژن و دارو در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده است و با موفقیت در مورد بسیاری از داروها و واکسن‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳).

فرناز پورحسن با استفاده از نانو واکسن نوترکیب مبتنی بر کیتوزان علیه توکسین اپسیلون باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس، پاسخ‌های ایمنی را ارزیابی کردند. بر طبق نتایج مطالعه فوق تیتر آنتی‌بادی *IgG* پس از تجویز پروتئین‌های نوترکیب انکپسوله شده با نانوذرات از طریق خوراکی و تزریق داخل وریدی به‌طور قابل توجهی افزایش نشان داد.

در مطالعه دیگری کارایی یک نانو امولسیون آب-روغن حاوی توکسین غلیظ و غیر فعال شده از محیط کشت کلستریدیوم نوویی (C. *novyi*) نوع *B* معرفی و با موفقیت مورد ارزیابی قرار گرفت. این مدل به‌عنوان یک روش ساده و کارآمد برای انتقال آنتی‌ژن برای بیماری‌های مرتبط با سم معرفی شده است.

یکی از بهترین پلیمرهای مورد استفاده در این فرایند پلی‌لاکتیک -کوگلیکولیک اسید (*PLGA*) می‌باشد. از آنجا که این پلیمرها زیست تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار هستند و توسط *USFDA* تأیید شده‌اند، بنابراین در مطالعات متعددی در تحویل و آزادسازی کنترل شده دارو و واکسن استفاده شده‌اند (۱۴).

در این مطالعه با استفاده از توکسین بتای تخلیص شده در درون پلیمرهای *PLGA* انکپسوله گردید تا ضمن کاهش خاصیت توکسیسیتی آن، امکان انتقال آرام و رهاسازی کنترل شده آن در بدن وجود داشته باشد. در این مطالعه، بسیاری از مزایای نانوذرات *PLGA* با تکیه بر برخی مطالعات که نشان‌دهنده خواص مطلوب آنها برای تهیه نانوذرات است، در نظر گرفته شده است. روش تهیه امولسیون آب-روغن-آب (w-o-w) بود و شرایط بهینه نانوذرات با اندازه‌گیری‌های متوالی خواص فیزیکوشیمیایی آنها به دست آمد. در نتیجه نانوذرات کروی و یکنواختی با اندازه حدود ۱۲۰ نانومتر و پتانسیل زتای ۱۸/۲- میلی‌ولت تشکیل شدند که برای ادامه کار بسیار مناسب می‌باشند (۱۵، ۱۶).

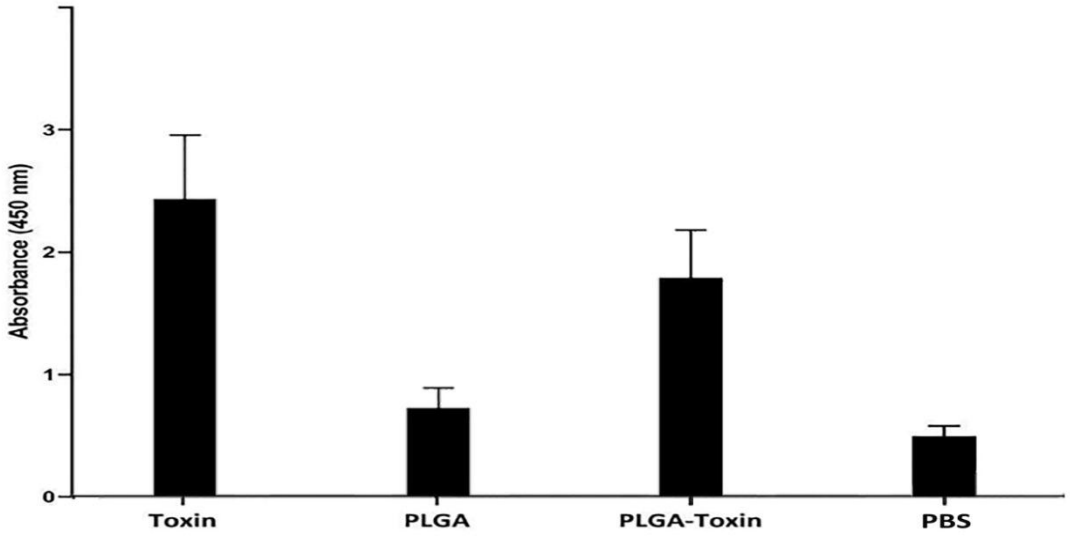
تزریق کمپلکس نانوتوکسوئید محصور در *PLGA* نشان داد که این کمپلکس از نظر ظاهری در محل تزریق بدون علامت بوده و حیوان پس از دریافت محلول این علامت را نشان داد. هیچ بی‌حالی یا بیماری وجود نداشت. متعاقب تزریق نانوتوکسوئید محصور در *PLGA*، آنتی‌بادی برعلیه توکسین بتا قابل ردیابی بود که البته مقدار آنتی‌بادی ایجاد شده کمتر از گروهی بود که توکسین خالص را دریافت کرده بودند. اما با توجه به ماهیت نانوتوکسوئید فوق و عدم وجود عوارض جانبی (مانند نکروز در محل تزریق و بی‌حالی) در حیوانات دریافت‌کننده نانوتوکسوئید در مقایسه با توکسین خالص، می‌توان میزان تولید شده آنتی‌بادی را قابل قبول دانست. بنابراین تزریق نانو واکسن حاوی توکسین بتا می‌تواند ایمنی هومورال را فعال کرده و تیتر آنتی‌بادی *IgG* را افزایش دهد.

در این مطالعه، به‌منظور طراحی و توسعه نانو واکسن توکسوئیدی حاوی توکسین بتا از کلستریدیوم پرفرنژنس، از ذرات پلیمری زیست تخریب‌پذیر PLGA استفاده شد. تخلیص توکسین بتا با استفاده از رسوب‌دهی با سولفات

آمونیوم و کروماتوگرافی ستون G50 انجام شد، که نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده خلوص بالا و کارایی مناسب توکسین تخلیص شده بود. این روش قادر به حذف پروتئین‌های مداخله‌گر و بهبود خلوص توکسین تا حدود ۵۰ درصد بهره‌وری بود که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۷).

نانوذرات PLGA با اندازه حدود ۱۲۰ نانومتر و پتانسیل زتای منهای ۱۸/۲ میلی‌ولت تهیه شدند. این نانوذرات قادر به انکپسوله کردن توکسین بتا و ارائه آن به‌طور کنترل‌شده در بدن بودند، بدون ایجاد عوارض جانبی ملموس. تزریق نانو واکسن حاوی توکسین بتا منجر به تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی در برابر توکسین شد و پاسخ ایمنی هومورال را فعال کرد. اگرچه میزان آنتی‌بادی تولید شده کمتر از گروه دریافت‌کننده توکسین خالص بود، اما عدم وجود عوارض جانبی قابل توجه، نشان‌دهنده مزایای استفاده از نانوذرات PLGA در انتقال توکسین و ایجاد پاسخ ایمنی است (۱۸، ۱۹).

با یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که پلیمر *PLGA* یک کاندید بسیار مناسب برای طراحی و ساخت نانو واکسن توکسوئیدی حاوی توکسین بتا می‌باشد. دانش به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند به‌طور مؤثری تولید واکسن‌های توکسوئیدی برای درمان بیماری‌های حاصل از کلستریدیوم پرفرنژنس را بهبود ببخشد تا بتوان گام بلندی را به سمت واکسن‌های مؤثر و بدون عوارض جانبی برداشت.



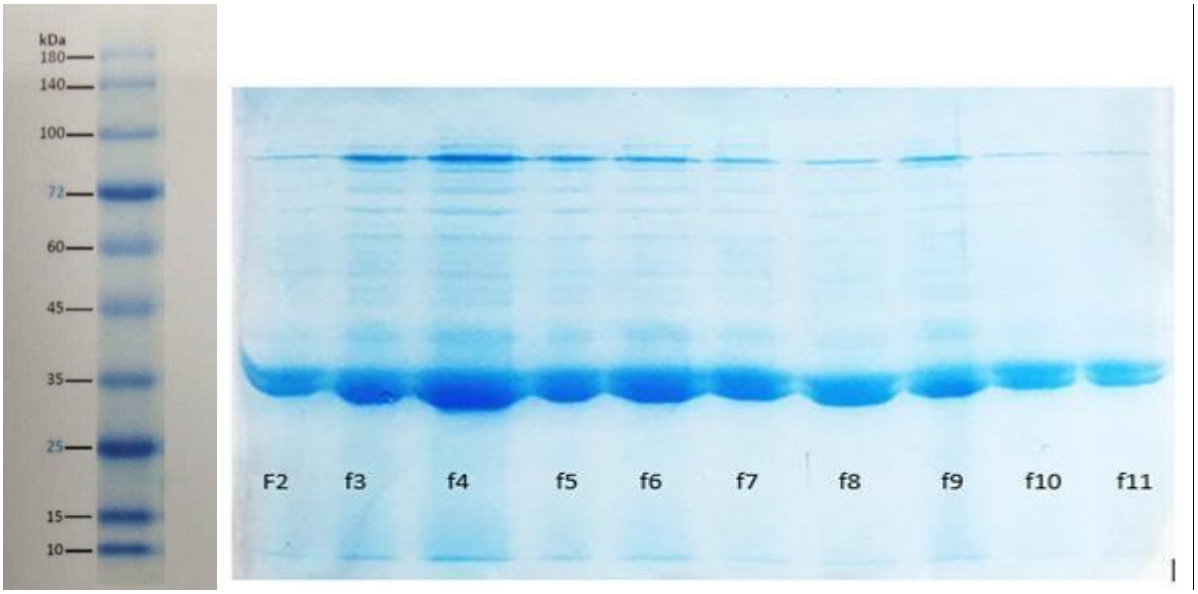
نمودار ۱- مقایسه سطح تولید آنتی‌بادی .توکسین به تنهایی، .نانوذره به تنهایی. ،نانوذره به همراه توکسین و سرم فیزیولوژی به تنهایی

Toxin: بتا توکسین استخراج شده از کلستریدیوم پرفرنژنس

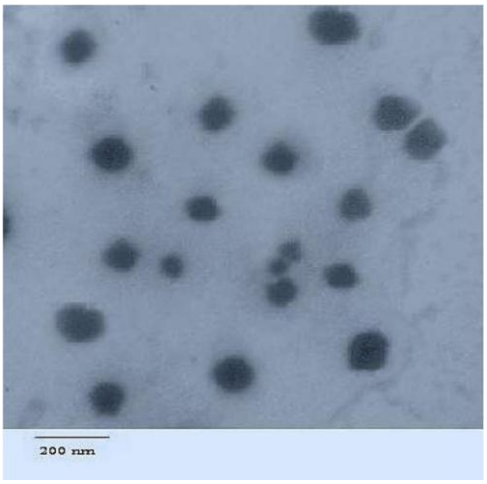
PLGA: نانوذره مورد استفاده

PLGA-Toxin: نانوذره کمپلکس شده با توکسین بتا

PBS: سرم فیزیوتوژی



شکل ۱- فراکسیون‌های جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی



شکل ۲- یکنواختی شکل ذرات حاصل از فرآیند تولید نانوذرات

سپاسگزاری: بدین‌وسیله نویسندگان از رؤسای محترم و کارشناسان بخش‌های تولید واکسن‌های بی‌هوازی و فرمولاسیون واکسن‌های پزشکی مؤسسه رازی تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مصوب اینجانب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با نام تولید نانوتوکسوئید کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ B و ارزیابی آن در مدل حیوان آزمایشگاهی می‌باشد.

References

1- Volk WA, Gebhardt B, Hammaskjold M, Kaomer R. Lippincott-Raven, Philadelphia. *Medical microbiology*. 1995.

2- Steinthorsdottir V, Halldórsson H, Andrésson OS. Clostridium perfringens beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human

endothelial cells. *Microb pathog*. 2000; 28(1): 45-50.

3- McDonel JL. Clostridium perfringens toxins (type a, b, c, d, e). Pharmacology & therapeutics. 1980; 10(3): 617-55.

4- Nilo L. Measurement of biological activities of purified and crude enterotoxin of Clostridium perfringens. *Infect.immun*. 1975; 12(2): 440-2.

5- Los FC, Randis TM, Aroian RV, Ratner AJ. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Biol*. 2013; 77(2): 173-207.

6- Worthington R, Mülders M. The partial purification of Clostridium perfringens beta toxin. *OJVR*. 1975; 42(3): 91-19.

7- Freedman JC, Theoret JR, Wisniewski JA, Uzal FA, Rood JI, McClane BA. Clostridium perfringens type A–E toxin plasmids. *Res Microbiol*. 2015; 166(4): 264-79.

8- Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of action and cell death associated with Clostridium perfringens toxins. *Toxins*. 2018; 10(5): 212.

9- Fang RH, Luk BT, Hu C-MJ, Zhang L. Engineered nanoparticles mimicking cell membranes for toxin neutralization. *Adv Drugdeliv Rev*. 2015; 90: 69-80.

10- Avgoustakis K. Polylactic-co-glycolic acid (PLGA). Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. 2005; 1(1): 1-11.

11- Ebrahimi Samani S, Asghari S, Naderimanesh H, Hoseinkhani S. Optimization of Preparation of PEG-PLGA Nanoparticles by Solvent Evaporation Method. *Modares J Biotech*. 2018; 9(2): 201.

12- Erbetta CDAC, Alves RJ, Magalh J, de Souza Freitas RF, de Sousa RG. Synthesis and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer. 2012.

13- Luk BT, Hu C-MJ, Fang RH, Dehaini D, Carpenter C, Gao W, *et al*. Interfacial interactions between natural RBC membranes and synthetic polymeric nanoparticles. *Nanoscale*. 2014; 6(5): 2730-7.

14- Fang RH, Hu C-MJ, Zhang L. Nanoparticles disguised as red blood cells to evade the immune system. Taylor & Francis. 2012.

15- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLd, Pessoa Junior A. Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. *APSB*. 2004; 40(2): 151-64.

16- Sakurai J, Duncan C. Purification of beta-toxin from Clostridium perfringens type C. *Infect and immun*. 1977; 18(3): 741-5.

17- Coskun O. Separation techniques: chromatography. *NCI*. 2016; 3(2): 156.

18- Zayerzadeh E, Fardipour A, Jabbari A. A New Purification Method for Beta-Toxin of Clostridium perfringens Type C Vaccinal Strain. *J Med Bacteriol*. 2014; 3(3-4): 8-13.

19- Xia Q, Zhang Y, Li Z, Hou X, Feng N. Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles: A novel drug delivery system for antitumor application. .*APSB*. 2019; 9(4): 675-89.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 1, Spring & Summer 2024, pages: 143-152

Evaluation of the immunogenicity of the PLGA-based nano vaccine of clostridium perfringens beta toxin in a mouse model

Ebrahim Abbasi[1], Taghi Zahraei Salehi[2*], Majid Tebyanian[3], Reza Pilehchian Langroudi[4], Ramak Yahyaraeyat[5]

1- PhD Student, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Associate Professor, Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
5- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: August 22, 2024; Revise: September 3, 2024; Accept: September 3, 2024

10.22034/nfvm.2024.473829.1253

Summary

In recent years, a strategy based on nanoparticles has shown that non-denatured protein toxins can be used to enhance the appropriate immune response. The toxin does not bind to its ligand on the cell surface. The results of the nanoparticle and toxin complex show that the nanoparticles facilitate the internal release of the toxin. Clostridium perfringens beta toxin is a toxin produced by Clostridium perfringens type B and C and the most important disease is bloody diarrhea of newborn lambs. The toxin loses its lethality due to its involvement, so it becomes a toxoid. The nanoparticle used in this research is PLGA, which is one of the most developed biodegradable polymers. The purpose of this study is separate, Production and purification of Clostridium perfringens beta toxin and production of its complex with PLGA nanoparticles in order to form a non-toxic structure.In this study, beta-Clostridium perfringens type B and C toxins were isolated by ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography. Purified was calculated to be 10 mg / ml. In this study, beta toxin antigen was used as a basis for the preparation of nanotoxoid candidate with nanoparticle formulation. When nanoparticles are injected into mice with beta toxin, they turn the toxin into a toxoid that has no toxicity effects, and in fact the toxin cannot bind to its receptors and reveal its effects, so the mice showed no signs of disease.

Keywords: *Beta-Toxin,Closteridium perfringens,Nanoparticles,Poly lactic-co-glycolic acid*