Journal of Military Medicine
2023, Volume 25, Issue 2
Pages: 1806-1814
10.30491/JMM.2023.1001211

Immunological Evaluation of Nisome Nanostructure Containing Three-Component Chimeric Immunogen of Target Antigens as a Candidate for Brucellosis Vaccine

Ahmad Abolfathi [1], Mahdi Fasihi-Ramandi [2], Zeinab Tabanejad [3,4*]

[1] *Research Center for Life & Health Sciences & Biotechnology of the Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran*
[2] *Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Research Center for Trauma in Police Operations, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran*
[4] *Nursing and Midwifery Care Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 8 January 2023 **Accepted:** 16 May 2023

Abstract

Background and Aim: Despite the essential need for T cells to eradicate infection, the protective role of the humoral response is also evident in the defense response. The aim of this study was to investigate the immunogenic and immunogenic role of rTF/Bp26/Omp31 recombinant chimeric protein in *BALB/c* mice as a new vaccine candidate.

Methods: In this experimental study, in order to evaluate the immunogenicity of the designed recombinant protein, clone, and gene expression were performed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The protein extracted from the culture of the mentioned cells was purified by Ni-NTA column. Nisome nanocarriers were made using Tovin and Span surfactants, cholesterol, and chloroform through standard methods, and then mixed with the purified protein and prepared for injection into *BALB/c* laboratory mice.

Results: The evaluation of the immune response indicated the production of antibodies against niosomes containing the recombinant protein, and the amount of antibody production was also different in different injection methods. The statistical data analysis showed the appropriate response of the immune system of laboratory mice.

Conclusion: The results of the study indicate the better efficacy of the nanoniosomes form in the design of the *Brucella* vaccine and its immune function, and this immunogen structure can be suitable for the design of a vaccine against brucellosis.

Keywords: *Brucella*, Nisome, Protein, Vaccine, Recombinant.

*Corresponding author: **Zeinab Tabanejad,** Email: ztabanejad@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۵، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۲
صفحات: ۱۸۱۴-۱۸۰۶
10.30491/JMM.2023.1001211

ارزیابی ایمونولوژیک نانوساختار نیوزوم حاوی ایمونوژن کایمریک سه جزیی آنتی‌ژن‌های هدف به عنوان کاندید واکسن بروسلوزیس

احمد ابوالفتحی[۱]، مهدی فصیحی‌رامندی[۲]، زینب تابانژاد [۳،۴]*

[۱] مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمویت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات تروما در عملیات پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران
[۴] مرکز تحقیقات مراقبت های پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: در جهت ریشه‌کنی عفونت علی‌رغم نیاز ضروری به سلول‌های T، نقش حفاظتی پاسخ هومورال نیز در پاسخ دفاعی مشهود است. این مطالعه با هدف بررسی نقش ایمنی‌زایی و مصونیت‌زایی پروتئین کایمر نوترکیب سه جزیی rTF/Bp26/Omp31 در موش نژاد *BALB/c* به عنوان معرفی یک کاندید واکسن جدید انجام پذیرفته است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب طراحی شده، کلون و بیان ژن در *Escherichia coli* BL21 (DE3) انجام پذیرفت. پروتئین استخراج شده از کشت سلول‌های مذکور توسط ستون Ni-NTA مورد تخلیص قرار گرفت. سپس با استفاده از روش‌های استاندارد مواد مورد نیاز از جمله سورفاکتانت‌های توین و اسپن، کلسترول و کلروفرم نانو حامل‌های نیوزوم ساخته شده و سپس با پروتئین تخلیص یافته مخلوط و جهت تزریق به سرموش آزمایشگاهی *BALB/c* آماده گردید.

یافته‌ها: ارزیابی پاسخ ایمنی تولید آنتی بادی علیه نیوزوم حاوی پروتئین نوترکیب را نشان داد که در روش‌های مختلف تزریق میزان تولید آنتی بادی نیز متفاوت بود. آنالیز داده‌های آماری، حاکی از پاسخ مناسب سیستم ایمنی موش آزمایشگاهی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از اثربخشی بهتر و مناسب‌تر فرم نانونیوزومی در طراحی واکسن بروسلا و عملکرد ایمنی آن است و این سازه ایمونوژن می‌تواند برای طراحی یک واکسن علیه بروسلوزیس مناسب باشد.

کلیدواژه‌ها: بروسلا، نیوزوم، پروتئین، نوترکیب، واکسن.

*نویسنده مسئول: **زینب تابانژاد**. پست الکترونیک: ztabanejad@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۶

مقدمه

شیوع بیماری تب مالت در انسان به عواملی مانند شیوه‌های پرورش دام، عادات غذایی، روش‌های فرآوری شیر و لبنیات و همچنین بهداشت محیط بستگی دارد. بروسلوز از طریق دام آلوده انتقال و عوامل خطر (شیر یا فرآورده‌های لبنی غیر پاستوریزه)، استنشاق، تماس یا خراش‌های پوستی به انسان منتقل می‌شود. تب مالت معمولاً به عنوان یک بیماری شغلی در نظر گرفته می‌شود زیرا بیشتر در کارگران کشتارگاه، دامپزشکان، تکنسین‌های آزمایشگاه، شکارچیان، کشاورزان و تولیدکنندگان دام رخ می‌دهد (۱). شناسایی عوامل اصلی خطرزای ابتلا به تب مالت بسیار مهم است. برای دستیابی به درک جامع از ماهیت بیماری و مسیرهای انتقال آن برای ریشه کنی تب مالت انسانی، شناسایی همه عوامل مرتبط با بیماری مهم است (۲). در حال حاضر هیچ واکسن انسانی ایمن و محافظی در برابر تب مالت وجود ندارد و واکسیناسیون حیوانات در برابر عفونت بروسلا معمولاً با استفاده از سویه‌های بروسلا زنده ضعیف شده، از جمله *Brucella abortus* S19، *Brucella abortus* RB51 و *Brucella melitensis* Rev.1 انجام می‌شود (۳).

در سال‌های اخیر، سیستم‌های وزیکولی تحویل دارو توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. نیوزوم‌ها (Niosomes) یک سیستم تحویل دارویی مناسب، هدفمند و مؤثر با توانایی بارگیری هر دو داروی آب‌دوست و آب‌گریز هستند. سورفکتانت‌ها به‌عنوان اجزای ساختمانی نیوزوم‌ها نقش مهمی در شکل‌گیری و خواص این نانو حامل‌ها دارند، بنابراین هرگونه پیشرفت در سنتز سورفکتانت‌های جدید که غیر سمی، کم‌هزینه، زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر باشند، باعث افزایش راندمان نیوزوم‌ها خواهد شد (۴).

Polyethyleneimine یا PEI یک خانواده از پلیمرهای کاتیونی است که با اسیدهای نوکلئیک کمپلکس تشکیل داده و پس از اتصال به هپاران سولفات پروتئوگلیکان (HSPG) سطح سلولی باعث تحریک اندوسیتوز می‌شود. اندوزوم تحت فشار اسمزی شکسته شده و کمپلکس وارد سیتوپلاسم می‌شود. علاوه بر ترانسداکشن ژن‌ها، از این سیستم برای افزایش کارآیی DNA واکسن‌ها نیز استفاده می‌شود (۵). حال نکته مبهم در این روش این بود که آیا پلی اتیلن ایمین فقط به عنوان یک ناقل DNA واکسن به داخل سلول عمل می‌کند یا علاوه بر این خاصیت تحریک و القای سیستم ایمنی را نیز بر عهده دارد. از آنجا که پلی اتیلن ایمن به عنوان ناقل اسید نوکلئیک به داخل سلول عمل می‌کند پس این فرضیه نیز شکل گرفت که می‌توان از آن به عنوان ناقل آنتی‌ژهای پروتئینی به سلول‌های اپی تلیالی و سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن نیز استفاده نمود. بدین منظور از آنتی ژن HIV استفاده شده و پلیمرهای خطی و منشعب PEI با وزن مولکولی بالا و پایین حاوی آنتی ژن به داخل بینی موش تزریق شدند. نتایج به‌دست آمده حاکی از افزایش شدید تیتر آنتی بادی IgG سرمی و IgA ترشحی بود. بررسی‌های بافت شناسی هیچ گونه تغییری در بافت اپی تلیوم بینی موش دریافت کننده PEI در مقایسه با دریافت PBS نشان ندادند (۶). علاوه بر این مطالعات حاکی از آن است که استفاده از PEI موجب بلوغ افینیتی آنتی بادی شده، اویدیتی آنتی بادی‌های اختصاصی را افزایش داده و باعث حفظ فرم طبیعی آنتی ژن می‌شود (۷). به عبارت دیگر PEI مانع دناچوره و تجزیه شدن پروتئین در شرایط *in vivo* شده و همچنین سلول‌های T و در نتیجه ایمنی سلولی را هم به صورت موضعی و هم سیستمیک فعال می‌کند (۸).

به نظر می‌رسد به‌دست آوردن آنتی ژنی که دارای توانایی تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی باشد بسیار ایده‌آل باشد. بنابراین در این مطالعه از نانوذرات حاوی آنتی ژن نوترکیب به صورت استنشاقی به موش *BALB/c* تزریق شده و فاکتورهای ایمونولوژیک (هومورال و سلولی) آن‌ها ارزیابی شد.

روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی طراحی گردید. تعداد ۵۰ سر موش *BALB/c* از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهیه شده و به طور مساوی در گروه‌های مختلف به صورت تصادفی تقسیم شدند. واکسن زنده ضعیف شده از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شدند. مطالعات میکروبی در تست چالش حیوان آزمایشگاهی نیز بر روی سویه باکتریایی *B. abortus* 544 و *B. melitensis* 16M تهیه شده از مجموعه میکروبی انستیتو پاستور ایران انجام پذیرفت. میزبان بیانی مورد استفاده در این مطالعه *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) بود.

جهت بیان ژنی مناسب وکتور بیانی pET28a (+) برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب شد. طبق سفارش، ژن کایمر بروسلا سنتز شده در وکتور بیانی pET28a (+) بر روی سویه مستعد شده بیانی *E. coli* BL21 (DE3) تحویل داده شد (BioMatik, Canada). تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با روش دناتوراسیون و حذف اوره روی ستون نیکل در ادامه انجام شد. حذف ایمیدازول با استفاده از روش دیالیز در کیسه‌هایی با منافذ ۱۲ کیلودالتون انجام شد و تغلیظ پروتئین‌های دیالیز شده با جذب مایع درون کیسه‌ها با شکر خشک صورت گرفت. در ادامه برای سنجش غلظت پروتئین از روش اسپکتروفوتومتری (روش برادفورد) استفاده شد. برای تأیید آنتی بادی تولید شده به روش وسترن بلاتینگ به جای آنتی بادی ضد هیستیدین (Anti His tag) از سرم موش‌های ایمن شده استفاده گردید و سپس بررسی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سویه میزبان از نظر محلول بودن یا تشکیل نیوزوم دنبال شد.

در خصوص ارزیابی میزان دز بهینه ایمن‌سازی جهت القای بیشترین پاسخ نسبت به پروتئین نوترکیب، ۵ گروه ده‌تایی موش

BALB/c ماده با سن ۴ تا ۶ هفته به صورت تصادفی تقسیم‌بندی و ایمن‌سازی آن‌ها انجام شد. موش‌های مورد مطالعه یک دز ایمن‌سازی ابتدایی (به همراه ادجوانت کامل فروند) و دو دز یادآور (به همراه ادجوانت ناقص فروند) به فاصله ۱۴ روز را به صورت صفاقی دریافت نمودند (روز ۰، ۱۴ و ۲۸). موش‌های مورد مطالعه در سه نوبت با فاصله یک هفته‌ای کشته شده و پاسخ تکثیری لنفوسیتی به روش MTT برای هر گروه و با مقادیر تحریکی بررسی شد. ایمن سازی حیوان آزمایشگاهی با پروتئین نوترکیب در سن ۶-۴ هفته به صورت زیرجلدی اعمال شد. در مرحله بعد نمونه گیری ازحیوان آزمایشگاهی در روزهای ۱۰، ۲۴ و ۳۸ انجام شد. بررسی پاسخ‌های ایمنی در موش‌های واکسینه به روش الایزای غیرمستقیم جهت تعیین میزان آنتی بادی IgG1، IgG2a وIgG علیه پروتئین‌های نوترکیب صورت گرفت. برای سنجش سایتوکاین از کیت R&D استفاده شد. در این مرحله مواجه‌سازی موش‌ها با سویه بیماریزا و شمارش باکتری‌های طحالی برنامه‌ریزی و اجرا شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

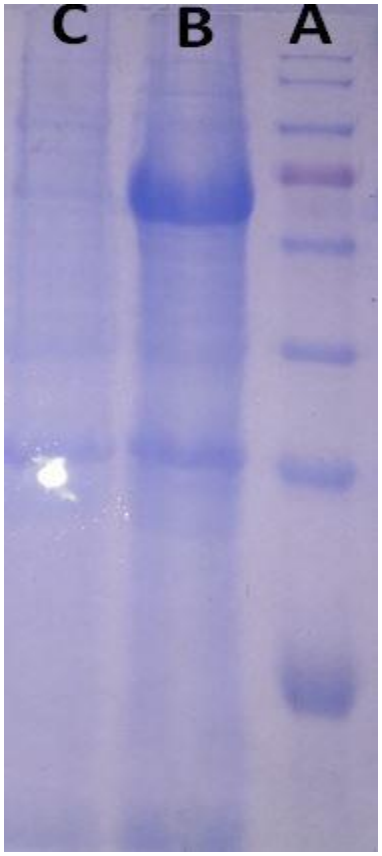
داده‌های مربوط به هرکدام از آزمایشات با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین و شاخص‌های پراکندگی برای داده‌های هرکدام از گروه‌ها محاسبه شد. مقایسه هرکدام از گروه‌ها با همه گروه‌های دیگر از طریق One-way Anova و آزمون Games-Howell و LSD انجام گرفت. مقایسه داده‌های گروه‌ها به صورت دو به دو از روش غیرپارامتریک و مقایسه دو متغیر غیر وابسته انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی

مراحل پژوهش از کمیته اخلاق دانشگاه بقیه الله (عج) با شناسه اخلاق IR.BMSU.REC.1397.373 مورد تأیید قرار گرفته است. کلیه مطالعات بر روی موش، تحت پروتکل هلسینکی (سال ۲۰۰۰) و دستورالعمل انجمن علوم اعصاب آمریکا و زیر نظر کمیته اخلاق پزشکی انجام می‌گیرد. کلیه همکاران دوره و واحد کار با حیوانات آزمایشگاهی را گذرانده و حیوان آزمایشگاهی از گونه و کیفیت مناسب انتخاب شده است.

نتایج

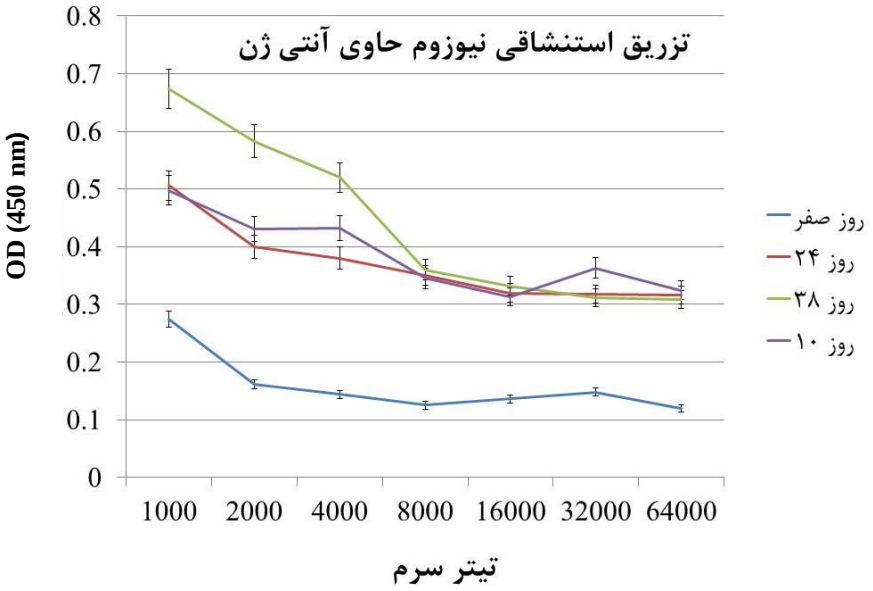
پس از انتقال وکتورهای نوترکیب به باکتری *E. coli* BL21 (DE3)، توسط شرکت سازنده، به منظور القای بیان از IPTG استفاده شد و سپس به منظور بررسی بیان پروتئین، از روش SDS-PAGE استفاده شد (شکل ۱). پس از تائید بیان، محلول بودن یا نامحلول بودن پروتئین‌های نوترکیب بررسی شد که نتایج نشان داد که پروتئین‌های بیانی در وضعیت محلول بیان می‌شوند. پس از استخراج پروتئین با کمک رزین‌های نیکل، پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شدند. در سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید pET28-rTF/Bp26/Omp31، بیان یک پروتئین با



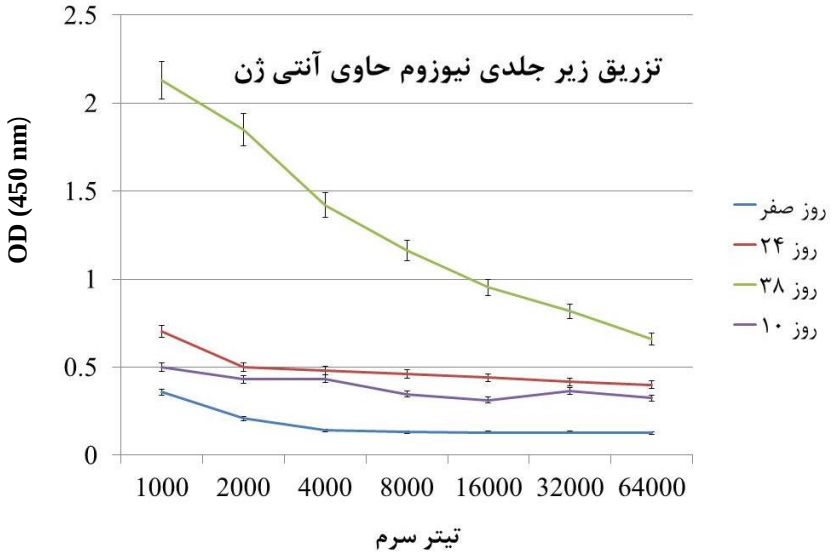
شکل ۱. نتیجه SDS-PAGE. A. سایز مارکر مولکولی پروتئین، B. نمونه پس از القاء، C. نمونه قبل از القاء.

وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلودالتون در روی ژل دیده شد که با وزن پیش‌بینی شده پروتئین نوترکیب همخوانی داشت. بررسی این ژل نشان داد که میزان بیان این پروتئین در ساعت چهارم بعد از القا بیشترین و مناسب‌ترین بیان را داشت (غلظت ۷۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از IPTG) نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات)، بیان پروتئین نوترکیب را با وزن تقریبی ۷۰ کیلودالتون و تشابهات آنتی‌ژنی آن را با فرم طبیعی این پروتئین اثبات کرد. نتایج وسترن بلاتینگ پروتیین خالص نوترکیب نشان دهنده وجود یک باند منفرد مرتبط با پروتئین نوترکیب rTF/Bp26/Omp31 در مقایسه با نشانگر (مارکر) وزن مولکولی 70 kDa بود. در این بررسی از آنتی بادی ضد His-Tag و ترکیبی از چندین سرم فرد مبتلا به بروسلوزیس استفاده گردید.

در بررسی پروتیین به منظور تعیین سمی بودن یا نبودن پروتیین نوترکیب، استریلیتی محلول پروتیینی و تعیین تب‌زایی، نتایج حاکی از عدم سمیت، استریل بودن محلول نهایی تزریق و غیر تب‌زا بودن آن بودند؛ بدین ترتیب که: پس از تزریق صفاقی ۱۰۰ میکروگرم از پروتیین به موش، کاهش وزن و مرگ‌ومیر در حیوانات تحت آزمایش دیده نشد. همچنین پس از کشت نمونه‌های آنتی‌ژن‌های تهیه شده بر روی محیط‌های تایوگلیکولات، نوترینت آگار، بلاد آگار، مکانکی آگار و سابورو دکستروز آگار در شرایط بی هوازی و هوازی، نتایج کشت منفی بودند. نتایج بررسی تعیین تب‌زایی



نمودار-۱. تزریق استنشاقی نیوزوم حاوی آنتی ژن و میزان جذب در روز ۱۰، ۲۴ و ۳۸

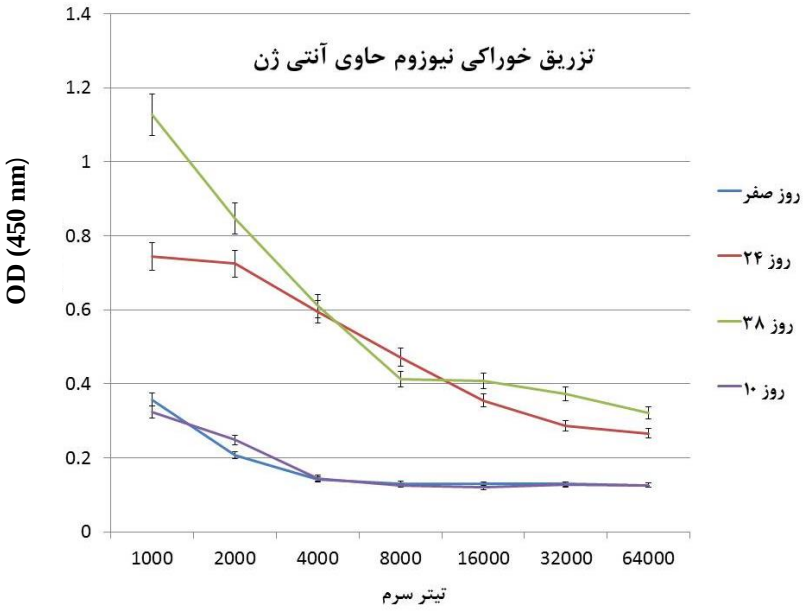


نمودار-۲. تزریق زیر جلدی نیوزوم حاوی آنتی ژن و میزان جذب در روز ۱۰، ۲۴ و ۳۸

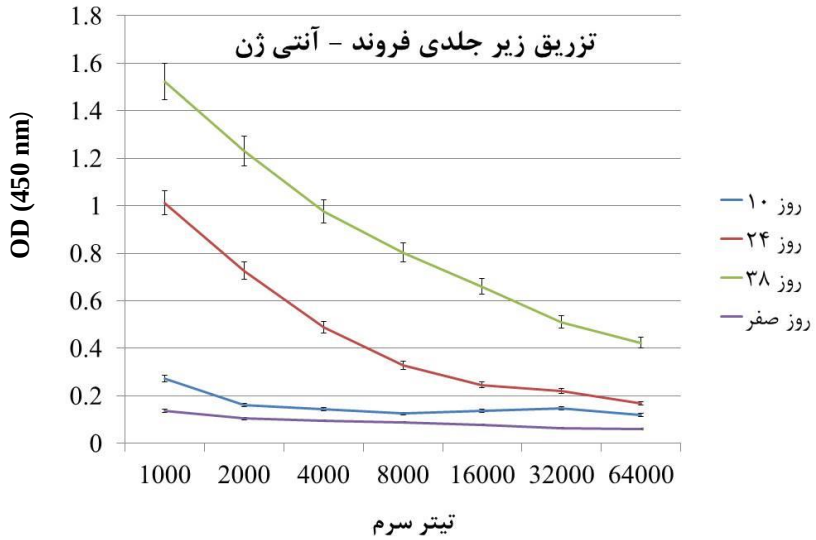
آنتی‌ژن‌های تهیه شده در خرگوش نیز پس از بررسی دمای بدن خرگوش، حاکی از غیر تب‌زا بودن پروتئین تزریقی بود. در این مطالعه ما به بررسی انواع تزریق که شامل خوراکی، استنشاقی، صفاقی، فروند استاندارد و فاقد آنتی ژن در زمان‌های مختلف (روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و خونگیری در روزهای ۱۰، ۲۴، ۳۸) پرداختیم. همانطور که در نمودارهای ۱ الی ۴ مشخص شده است میزان جذب با افزایش رقت کاهش می یابد. از طرفی در شرایط فاقد آنتی ژن مشخص شد که در روز ۱۰ و ۲۴ هرچقدر که رقت افزایش پیدا می‌کند میزان میانگین دز جذبی کاهش می‌یابد. این در حالی است که این شرایط و ترتیب برای روز ۳۸ صدق نمی‌کند.

نتایج حاصل از تزریق جلدی نشان داد که در روزهای ۱۰، ۲۴ و ۳۸ تزریق با افزایش رقت میزان میانگین جذب کاهش می‌یابد. در مورد تزریق خوراکی نیز شرایط برهمین منوال بوده و با افزایش رقت و گذشت زمان از خونگیری میزان میانگین دز جذبی کاهش می‌یابد. در مورد تزریق استنشاقی و فرود هم با افزایش رقت و گذشت زمان میزان دز جذبی کاهش پیدا کرد.

نتایج سنجش تیتر آنتی بادی به روش ELISA در طول موج ۴۵۰ نانومتر (در سرم موش‌های ایمن شده پس از روز ۱۰، ۲۴ و ۳۸ مواجهه با آنتی ژن)، نشان‌دهنده افزایش تیتر در روز ۲۴ بعد از اولین تزریق بود؛ این در حالی است که در سنجش‌های تیتر آنتی بادی در روز ۱۰ و ۳۸ بعد از تزریق افزایش تیتر با افزایش بیشتری در OD همراه بود. دزهای تزریقی شامل ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم از آنتی ژن در همراهی با ادجوانت فروند و در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸ بوده است. تیتر IgG توتال پس از اولین تزریق افزایش یافته و در سنجش روز ۲۸، بیشترین مقادیر را به ترتیب در گروه‌های R-40، R-30 و R-20 نشان می‌دهد. در بررسی ایزوتایپ‌های IgG



نمودار-۳. تجویز خوراکی نیوزوم حاوی آنتی ژن و میزان جذب در روز ۱۰، ۲۴ و ۳۸



نمودار-۴. تزریق زیرجلدی فروند حاوی آنتی ژن و میزان جذب در روز ۱۰، ۲۴ و ۳۸

(IgG1 و IgG2a) به منظور تعیین نوع تحریک ایمنی، نتایج نشان‌دهنده بالا بودن تیتر آنتی بادی در روز ۴۵ پس از اولین تزریق بود که در مقایسه با گروه کنترل منفی حاکی از اختلاف معنادار بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به نسبت میزان تیتر آنتی بادی IgG2a/IgG1، به ترتیب در گروه‌های R-40، R-30 و R-20 با مقادیر ۱/۱، ۱/۰۶ و ۱/۰۳، نتایج نشان‌دهنده تمایل پاسخ مناسب به سمت تحریک پاسخ ایمنی سلول‌های T بود. نسبت IgG2a/IgG1 در گروه‌های ایمن شده میزانی بالاتر از عدد ۱ را نشان می‌دهد که دلالت بر شیفت ایمنی به سمت ایمنی سلولی در موش‌های ایمن شده دارد؛ این نتایج کاملاً منطبق با نتایج حاصل از پاسخ سایتوکاینی کشت سلول‌های طحالی موش‌های تحریک شده با آنتی ژن می‌باشد.

بحث

تاکنون هیچ واکسنی (با مجوز) ضد بروسلا برای انسان تایید نشده است. علاوه بر این، در مورد آزمایشات انسانی واکسن بالینی، اطلاعات و داده‌های مربوطه بسیار کمی وجود دارد. اگرچه تهدیدهای ناشی از بیوتروریسم اخیراً کاهش یافته است، تولید واکسن ایمن و موثر به دلیل ماهیت ناتوان‌کننده بیماری تب مالت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۹). چندین واکسن ضد بروسلا برای استفاده در بروسلوز انسانی پیشنهاد شده است. با این حال، اعتبارسنجی در یک مدل اولیه ممکن است قبل از انجام آزمایشات در مقیاس بزرگ لازم باشد. گزارش‌های موفقیت مربوط به کنترل بیماری تب مالت در انسان در مناطق مختلف جهان ثبت شده است. با این وجود، با افزایش گزارش‌ها و ظهور مجدد بیماری تب مالت

در سراسر جهان، تحقیقات در مورد تولید واکسن‌های منحصر به فرد ایمن، موثر و محافظ انسانی باید گسترش یابد (۱۰).

نیوزوم‌ها ممکن است به عنوان یک پلتفرم فوق‌العاده تحویل نانو وزیکول عمل کند و یک روش امیدوارکننده برای تحویل داروهای شیمیایی، داروهای پروتئینی و مواد ژنی به منظور پیشگیری و درمان بیماری ارائه دهد (۱۱). در مقایسه با لیپوزوم‌ها، نیوزوم‌ها مزایایی دارند که شامل پایداری شیمیایی و فیزیکی خوب، هزینه کم و فرمول‌بندی آسان است. از طرفی نیوزوم‌ها می‌توانند کاندید مناسبی برای استفاده در طراحی واکسن باشند (۱۲).

بهرهبرداری از فناوری نانو برای دارورسانی هدفمند یک رویکرد درمانی مهم است. با استفاده از اندازه محدود آن‌ها در مقیاس نانو، نانوذرات می‌توانند با موفقیت به عنوان ناقل عوامل مهم درمانی عمل کنند. اثربخشی این روش در کنار هزینه منطقی و سهولت استفاده از راه دهان آن‌ها را به یک روش مطلوب تبدیل کرده است. تجویز خوراکی طیف گسترده‌ای از نانو فرمولاسیون‌ها مانند لیپوزوم‌ها، دندریمرها، نیوزوم‌ها، کوبوزوم‌ها، نانوذرات کیتوزان، امولاسیون‌های نانو، نانوکریستال‌ها و غیره که با پروتئین یا دارو پر شده‌اند، در بهبود اثرات منفی بیماری‌های مختلف موثر است. نانوساختارهای خوراکی نه تنها کاربرد خود را در زمینه انتقال دارو بلکه در موارد ژن درمانی و واکسیناسیون نیز دارند. مسیر خوراکی باعث افزایش انتشار کنترل شده و افزایش تأثیر نفوذ پذیری و احتباس (EPR) داروهای نانو می‌شود، در نتیجه به افزایش کارایی آن‌ها به عنوان عوامل درمانی کمک می‌کند. Nigro و همکاران در این رابطه بیان کردند در میان حامل‌های مورد استفاده برای اهداف دارویی و آرایشی، نیوزوم‌ها سیستم‌های زیست سازگار و همه کاره هستند که قادر به افزایش اثرات درمانی داروهای کپسوله شده برای درمان‌های موضعی و ترانس درمال می‌باشند (۱۳). Takzare و همکاران نشان داده‌اند که نیوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس Trachyspermum copticum کاربرد بالقوه‌ای برای درمان سرطان دارند (۱۴).

در سال ۲۰۲۱ در مطالعه castano و همکاران، مشخصات ایمنی سویه کاندیدای واکسن *B. melitensis* 16MΔvjbR در بزها بررسی شد. واکسیناسیون با واکسن Rev.1 موجود، اگرچه کاملاً ایده‌آل هم نیست صورت گرفت. در این مطالعه، ایمنی سویه *B. melitensis* 16MΔvjbR در طی یک دوره ۱۵ ماهه با شروع واکسیناسیون بزهای جوان ارزیابی شد. بزهای نژاد ماده (چهل، ۴ تا ۶ ماهه، ماده سالم) به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. هفت ماه پس از واکسیناسیون، هنگامی که حیوانات از نظر جنسی بالغ شدند، با استفاده از نرهای بدون بروسلوز پرورش داده شدند و اجازه داشتند بارداری را به مدت طولانی ادامه دهند. نمونه خون برای ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال در طول مطالعه جمع آوری شد. تغییرات ناخالص و هیستوپاتولوژیک در همه پرستاران و فرزندان قابل توجه نبود و هیچ شواهدی از وجود بروسلا در جنین وجود نداشت. در مجموع، این داده‌ها نشان می‌دهد که واکسیناسیون با سویه جهش یافته MΔvjbR16 برای استفاده در میزبان اولیه غیر باردار بی خطر است (۱۵).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۲۰ توسط sedighi و همکاران با هدف بررسی نانوذرات کیتوزان مانوسیله شده با آنتی ژن FliC به عنوان یک کاندید واکسن جدید علیه *B. melitensis* و عفونت بروسلا آبورتوس انجام گرفت. در این مطالعه، نانوذرات کیتوزان Mannosylated (MCN) مملو از پروتئین FliC به عنوان یک سیستم تحویل واکسن هدفمند سنتز شدند. ایمنی‌زایی و اثر محافظتی FliC و FliC-MCN در برابر عفونت بروسلا در موش‌های *BALB/c* بررسی شد. پس از شبیه‌سازی، بیان و خالص سازی، پروتئین FliC بر روی MCN بارگذاری شد. اندازه ذرات، بازده بارگیری و انتشار آزمایشگاهی NPs تعیین شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که FliC و FliC-MCN می‌توانند به طور قابل توجهی پاسخ ویژه IgG (عناصر بالاتر IgG2a) را افزایش دهند. علاوه بر این، سلول‌های طحال موش‌های ایمن‌سازی شده سطح بالایی از IFN-γ و IL-2 و سطح پایین سیتوکین IL-10 را تولید کردند. ایمن سازی با FliC و FliC-MCN باعث محافظت قابل توجهی در برابر عفونت‌های *B. melitensis* 16 M و *B. abortus* 544 می‌شود. به طور کلی این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین FliC یک کاندید جدید آنتی ژن بالقوه برای تولید واکسن زیر واحد علیه *B. melitensis* و *B. abortus* است. علاوه بر این، MCN می‌تواند به عنوان سیستم کمکی و هدفمند واکسن استفاده شود (۱۶).

مطالعه دیگر در سال ۲۰۲۰ توسط Mohammadi و Golchin بر روی محافظت بالای موش‌ها در برابر بروسلا آبورتوس با ایمن‌سازی خوراکی با واکسن وکتوری پروبیوتیک نوترکیب *لاکتوباسیلوس کازئی*، انجام شد که بیان پروتئین غشای خارجی OMP19 از گونه‌های بروسلا را در پی داشت. در این مطالعه، ژن رمزگذار آنتی ژن OMP19 در درجه اول تکثیر و به یک وکتور بیانی به نام pT1NX شبیه سازی شد و سپس از طریق روش الکتروپوراسیون به سلول *L. casei* منتقل شد. این بیان با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب از طریق آزمایش غربالگری ایمونولوژیک مانند وسترن بلات و روش ایمونوفلورسانس تایید شد. سرانجام، *L. casei* نوترکیبی به صورت خوراکی به موش خورانده شد. نتایج نهایی نشان داد که گروه موش هایی که واکسن مبتنی بر OMP19 *L. casei* دریافت کرده‌اند، ایمنی عمومی و مخاطی بسیار خوبی را دارند. بنابراین، واکسن تولید شده در این طرح تحقیقاتی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای محافظت در برابر تب مالت باشد (۱۷).

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای را با هدف بررسی تاثیر واکسن سویه *B. suis* 2 انجام دادند. در این مطالعه مشخص شد که استرس در شبکه آندوپلاسمی ایجاد شده که بر تکثیر داخل

سلولی در سلول‌های تروفوبلاست بز تأثیر می‌گذارد. عفونت و تکثیر واکسن سویه ۲ واکسن *B. suis* (*B. suis* S2) در سلول‌های تروفوبلاست بز (GTCs) و پاسخ‌های سلولی و مولکولی ناشی از آزمایشگاه را بررسی کردند. مطالعه نشان داد که *B. suis* S2 قادر به آلوده و تکثیر شدن بوده و مانع تکثیر GTCs و القای op آپوپتوز به دلیل استرس ER می‌باشد. تونیکامایسین (Tm)، دارویی است که به شدت آپوپتوز ناشی از استرس ER را کنترل کرده، و تکثیر *B. suis* S2 را در GTC مهار می‌کند. علاوه بر این، ۴ اسید فنیل بوتیریک (4-PBA)، یک داروی منتخب بوده که باعث کاهش آپوپتوز ناشی از استرس ER می‌شود و به طور قابل توجهی تکرار *B. suis* S2 را در GTC افزایش می‌دهد. کاهش بیان پروتئین‌های phosphoIRE1α و IRE1α با Irestatin 9389 (آنتاگونیست IRE1) در GTCها بر تکثیر *B. suis* S2 تأثیر نمی‌گذارد. اگرچه پیوند GTC تحت تأثیر عفونت B. suis S2 قرار نگرفت، ولی ترشح پروژسترون سرکوب شد و ترشح پرولاکتین و استروژن افزایش یافت. این اثرات با تغییر در بیان ژن‌های آنزیم‌های کلیدی استروئیدزایی همراه بود. این مطالعه به طور سیستماتیک مکانیسم سقط جنین در عفونت بروسلا را از نظر تهاجم پاتوژن، استرس ER و غدد درون‌ریز باروری بررسی کرد. یافته‌های حاصل ممکن است بینش جدیدی برای درک مکانیسم‌های موجود در سقط جنین بز ناشی از عفونت بروسلا فراهم کند (۱۸).

Gupta و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطالعه‌ای با هدف تزریق واکسن غیرتهاجمی در ترانسفرسوم‌ها، نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها انجام دادند. در مطالعه حاضر، از ترانسفروزوم‌های وزیکول الاستیک، وزیکول‌های سورفاکتانت غیر یونی (نیوزوم‌ها) و لیپوزوم‌ها برای بررسی پتانسیل نسبی آن‌ها در تحویل غیرتهاجمی توکسوئید کزاز (TT) استفاده شد. وکتور، نیوزوم و لیپوزوم تهیه و برای شکل، اندازه و کارایی مشخص شد. این وزیکول‌ها از طریق فیلتر پلی‌کربنات (اندازه منافذ ۵۰ نانومتر) برای ارزیابی کشش وزیکول‌ها اکسترود شدند. فعالیت تحریک ایمنی ترانسفرانسوم، نیوزوم و لیپوزوم با اندازه‌گیری تیتر ضد TT IgG سرم به دنبال ایمن سازی موضعی مورد مطالعه قرار گرفت. پاسخ ایمنی استخراج شده توسط واکسیناسیون موضعی با پاسخ همان دز توکسوئید کزاز جاذب آلوم (AATT) داده شده در عضله مقایسه شد. مطالعه *in vivo* نشان داد که به صورت موضعی TT حاوی ترانسفروم، پس از واکسیناسیون ثانویه، می‌تواند پاسخ ایمنی (ضد TT-IgG) ایجاد کند که معادل پاسخی است که به دنبال واکسیناسیون مبتنی بر TT جذب عضلانی آلوم تولید می‌شود. در مقایسه با ترانسفرم‌ها، نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها پاسخ ایمنی ضعیف‌تری را به همراه داشتند. بنابراین ترانسفر به بدن نوید تحویل موضعی موثر و غیرتهاجمی آنتی ژن (ها) را می‌دهد (۱۹). نتایج حاصل از مطالعه شریف و همکاران در سال ۱۴۰۲ ثابت نمود که مشخصه‌یابی، ساخت موفق نانوسامانه نیوزومی حاوی ایمنوژن سه ظرفیتی را تأیید می‌نماید. علاوه براین الگویی مطرح نمودند که رهایش ایمونوژن سه ظرفیتی سامانه پوشش‌دهی شده، کنترل شده‌تر و آهسته‌تر بوده که این موضوع تأثیر مثبت نانوسامانه نیوزومی را تأیید می‌کند و استفاده از نیوزوم به عنوان عامل نانوواکسن نقش مؤثری در کنترل رهایش آنتی ژن دارد و می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن و افزایش پاسخ ایمنی حفاظتی علیه بروسلا مطرح باشد (۲۰).

نتیجه‌گیری

فناوری نانو پایه‌های مهم تشخیص، درمان و پیشگیری سرطان را تغییر خواهد داد. استفاده از مواد مهندسی در مقیاس نانو جهت درمان سرطان، حذف ترجیحی سلول‌های سرطانی بدون آسیب جدی به سلول‌های طبیعی را فراهم می‌کند. استفاده از علم نانوتکنولوژی در زمینه پزشکی و داروسازی توانسته پنجره امیدی در افزایش کارایی سیستم‌های دارویی و درمانی، تشخیص به هنگام بیماری، پیشگیری، کاهش عوارض جانبی دارو و تهیه واکسن های مختلف را به روی محققین باز کند. نانولیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌ها توانسته‌اند بخش وسیعی از تحقیقات را به خود اختصاص دهند. نانوتکنولوژی بستری را برای تحویل هدفمند دارو، ژن و پروتئین به بافت‌های توموری را فراهم می‌کند، بنابراین سمیت عوامل ضد سرطان در بافت‌های سالم کاهش می‌یابد. نتایج این مطالعه نشان از اثربخشی بهتر و مناسب‌تر فرم نانونیوزومی در طراحی واکسن بروسلا و عملکرد بهتر ایمنی آن داشت. به دلیل اینکه این مطالعه نخستین پژوهش در زمینه طراحی واکسن بروسلا براساس نانونیوزوم‌ها بوده و از طرفی عملکرد پاسخ های ایمنی نیز در آن لحاظ گردیده می‌تواند به عنوان پایلوت برای طراحی مطالعات آینده مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- تولید واکسن‌های منحصر به فرد ایمن، موثر و محافظ انسانی باید جهت کنترل بیماری‌های بازپدید گسترش یابد.
- فرم نانونیوزومی در طراحی واکسن‌ها بویژه بروسلا بواسطه عملکرد بهتر در ایجاد ایمنی نقش مهمی می‌تواند داشته باشد.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A. A history of the development of *Brucella* vaccines. BioMed Research International. 2013; 2013:749509. doi:10.1155/2013/743509
2. Esmaeili H. Brucellosis in Islamic republic of Iran. Journal of Medical Bacteriology. 2014;3(3-4):47-57.
3. Mostafavi E, Asmand M. Trend of brucellosis in Iran from 1991 to 2008. Iranian Journal of Epidemiology. 2012;8(1):93-100. [In Persian]
4. Kavussi HR, Miresmaeili SM, Lotfabadi NN. Niosomes from Preparation to Application in Drug Delivery. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2020;28(2):2324-33. doi:10.18502/ssu.v28i2.3473
5. Goenka R, Scholz JL, Sindhava VJ, Cancro MP. New roles for the BLyS/BAFF family in antigen-experienced B cell niches. Cytokine & growth factor reviews. 2014;25(2):107-13. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.01.001
6. Rossetti CA, Drake KL, Siddavatam P, Lawhon SD, Nunes JE, Gull T, et al. Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. PloS one. 2013;8(12): e81719. doi:10.1371/journal.pone.0081719
7. Wong S, Tumari HH, Ngadi N, Mohamed NB, Hassan O, Mat R, et al. Adsorption of anionic dyes on spent tea leaves modified with polyethyleneimine (PEI-STL). Journal of Cleaner Production. 2019; 206:394-406. doi:10.1016/j.jclepro.2018.09.201
8. Martín R, Martín C, Escobedo S, Suárez JE, Quirós LM. Surface glycosaminoglycans mediate adherence between HeLa cells and *Lactobacillus salivarius* Lv72. BMC Microbiology. 2013;13:210. doi:10.1186/1471-2180-13-210
9. Hashtarkhani S, Akbari M, Jarahi L, Etminani K. Epidemiological characteristics and trend of incidence of human brucellosis in Razavi Khorasan province. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2016;58(9):531-8. [In Persian]
10. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Journal of Veterinary Science. 2017;18(S1):281-90. doi:10.4142/jvs.2017.18.S1.281
11. Ghashghaei M, Akhlaghi M. Investigation of nanoniosomal formulation containing doxorubicin effect on ovarian cancer cell line (OVCAR-3 cell line). New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2021;11(43):46-62. [In Persian]
12. Ge X, Wei M, He S, Yuan WE. Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. Pharmaceutics. 2019; 11(2):55. doi:10.3390/pharmaceutics11020055
13. Nigro F, Cerqueira Pinto CD, dos Santos EP, Mansur CR. Niosome-based hydrogel as a potential drug delivery system for topical and transdermal applications. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 2022;71(6): 444-61. doi:10.1080/00914037.2020.1848833
14. Takzare A, Ghafoor DD, Siddiqi AF, Ravali S, Shalbaf M, Bakhtiar M. Trachyspermum copticum essential oil incorporated niosome for cancer treatment. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2019;52:818-24. doi:10.1016/j.jddst.2019.05.046
15. Castaño-Zubieta MR, Rossetti CA, García-González DG, Maurizio E, Hensel ME, Rice-Ficht AC, et al. Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MΔvjbR strain in goats. Vaccine. 2021;39(3):617-25. doi:10.1016/j.vaccine.2020.11.033
16. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Azizi M, Bouzari S. Mannosylated chitosan nanoparticles loaded with FliC antigen as a novel vaccine candidate against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. Journal of biotechnology. 2020;310:89-96. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.01.016
17. Mohammadi E, Golchin M. High protection of mice against *Brucella abortus* by oral immunization with recombinant probiotic *Lactobacillus casei* vector vaccine, expressing the outer membrane protein OMP19 of *Brucella* species. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2020;70:101470. doi:10.1016/j.cimid.2020.101470
18. Wang X, Lin P, Li Y, Xiang C, Yin Y, Chen Z, et al. *Brucella suis* vaccine strain 2 induces endoplasmic reticulum stress that affects intracellular replication in goat trophoblast cells *in vitro*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2016;6:19. doi:10.3389/fcimb.2016.00019
19. Gupta PN, Mishra V, Rawat A, Dubey P, Mahor S, Jain S, Chatterji DP, Vyas SP. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. International journal of pharmaceutics. 2005 Apr 11;293(1-2):73-82. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.022
20. Sharif F, Nazari R, Fasihi-Ramandi M, Taheri RA, Zargar M. Preparation of niosomal nanostructure containing *Brucella* trivalent immunogen as a vaccine candidate. KAUMS Journal (FEYZ). 2023;27(1):770-8. [In Persian]