

# ارزیابی مقایسه‌ای پاسخ ایمنی‌زایی نانوانتی‌ژن بتا کلستری‌دیوم پرفرنجنس پوششی یافته با غشاء گویچه قرمز و بدون پوششی در مدل حیوانی خرگوش

• سیما پویان

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

• مهرداد شمس‌الدینی‌بافتی (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و توسعه، شعبه کرمان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

• نادیا کاظمی‌پور

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

• مجتبی علی‌ملایی

بخش تحقیق و توسعه، شعبه کرمان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

• فرخ رخ‌بخش زمین

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران



تاریخ دریافت: ۱۶-۰۷-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۲-۰۹-۱۴۰۱

تاریخ بازنگری: ۰۷-۰۹-۱۴۰۱ تاریخ انتشار: ۰۱-۰۷-۱۴۰۲

Email: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

## چکیده

کلستری‌دیوم پرفرنجنس تیپ C عامل انترتوکسمی در دام‌های جوان و بالغ و از عوامل مهم خسارات اقتصادی به صنعت دامپروری می‌باشد. مهم‌ترین عامل ویرولانسی در این تیپ، توکسین بتا است. در دهه‌های اخیر استفاده از نانوذرات برای بهبود اثر واکسن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. جهت افزایش بقاء نانوذرات، از غشاء سلول‌هایی همچون گویچه قرمز برای پوشش استفاده می‌گردد، لذا تحقیق حاضر باهدف ارزیابی مقایسه‌ای پاسخ ایمنی‌زایی نانوانتی‌ژن بتا کلستری‌دیوم پرفرنجنس پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز و بدون پوشش انجام گرفت. ابتدا نانوانتی‌ژن‌های محبوس در غشاء گویچه‌های قرمز آماده و پس از انجام آزمون‌های استرلیتی و عدم سمیت، به همراه نانوانتی‌ژن‌های بدون پوشش طبق برنامه ایمن‌سازی و در بازه زمانی ۱۵۰ روز، به دو گروه خرگوش تزریق شدند. جهت ارزیابی تیترا آنتی‌بادی از روش الیزای غیرمستقیم استفاده شد. جهت نشان‌دادن قابلیت ایمنی‌زایی نانوذرات پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز، چالش و تست همولیزین انجام شد. تعیین پاسخ آنتی‌بادی، تحریک ایمنی‌زایی بالا و افزایش پایدار تیترا آنتی‌بادی در گروه ایمن با نانوانتی‌ژن‌های محبوس در غشاء گویچه قرمز را نشان داد. ارزیابی چالش و تست همولیزین بیانگر فعالیت مثبت نانوانتی‌ژن بتا پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز در تحریک سیستم ایمنی خرگوش بود. نتایج مطالعه نشان داد که غشاء‌های گویچه قرمز یک لایه ایمن برای مهار نانوتوکسین فراهم می‌کنند و سبب رهایش آهسته و تدریجی آنتی‌ژن‌های کپسوله می‌شوند.

کلمات کلیدی: کلستری‌دیوم پرفرنجنس، توکسین بتا، انترتوکسمی، نانوذرات بیومیمتیک، الیزا

• Veterinary Researches & Biological Products No 140 pp: 51-61

**Comparative evaluation of the immunogenic response of *Clostridium perfringens* beta-antigens coated with RBC membrane and uncoated in rabbit as an animal model**

By: Pooyan, S., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. Shamsaddini Bafti, M., (Corresponding Author) Department of Research and Development, Kerman Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran. Kazempour, N., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. Alimolaei, M., Department of Research and Development, Kerman Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran. and Rokhbakhsh Zamin, F., Department of microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Received: 2021-09-26

Accepted: 2022-03-07

Revised: 2021-09-26

Published: 2023-09-23

Email: m.shamsaddini@rsvri.ac.ir

*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) type C is the cause of enterotoxemia in young and adult cattle and one of the essential factors of economic losses to the animal husbandry industry. The most important virulence factor in this type is beta toxin. In recent decades, the use of nanoparticles to improve the effectiveness of vaccines has been considered. In order to increase the survival of nanoparticles, the membrane of cells such as red blood cells is used for coating. The aim of comparative evaluation of the immunogenic response of *C. perfringens* beta-antigen coated with RBCMs and uncoated. First, nanoantigens trapped in the membrane of RBC were prepared, and then sterility and residual toxicity tests were carried out. Finally, it was injected into two groups of rabbits along with bare nano antigens according to the immunization schedule and within 150 days. The indirect ELISA method was used to evaluate the antibody titer. In order to demonstrate the immunogenicity of nanoparticles coated with RBCMs, the challenge and hemolysin tests were performed. Determining the antibody response showed high immunogenic stimulation and a stable increase in antibody titer in the immune group with nano antigens trapped in the RBCMs. Challenge evaluation and hemolysin test showed the positive activity of beta nano antigens covered with red RBCMs in stimulating the immune system of rabbits. The study results showed that the RBCMs provide a safe layer to contain the nanotoxin and cause the slow and gradual release of encapsulated antigens.

**Keyword:** *Clostridium perfringens*, Beta Toxin, Enterotoxemia, Biomimetic nanoparticles, ELISA

#### مقدمه

کلستریدیوم پرفرنجنس یک باسیل گرم مثبت، غیرمتحرک و اسپورزا است که عامل تعداد زیادی از بیماری‌ها در انسان، دام و حیوانات می‌باشد (۴). این باکتری بی‌هوازی علاوه بر حضور گسترده در خاک و محیط، به‌عنوان جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و تقریباً تمامی حیوانات خونگرم محسوب می‌گردد. پتانسیل بیماری‌زایی کلستریدیوم پرفرنجنس به توانایی آن در تولید بیش از ۲۰ نوع توکسین و آنزیم نسبت داده می‌شود. این باکتری بر اساس توانایی تولید چهار توکسین اصلی کشنده (توکسین‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) و توکسین‌های NetB و انتروتوکسین (CPE) به هفت تیپ (A-G) دسته‌بندی می‌شود (۳، ۱۶، ۲۳). بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس باعث مرگ‌ومیر دام، کاهش رشد، کاهش تولید فرآورده‌های دامی و ضرر و زیان‌های شدید اقتصادی می‌گردند (۲۲). مهم‌ترین تیپ‌های کلستریدیوم پرفرنجنس در دامپزشکی تیپ‌های C و D هستند، زیرا اکثر حیوانات مزرعه را

تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این میان، تیپ C باعث انتروتوکسمی هموراژیک-نکروتیک در گوساله، بره، کره اسب و توله خوک و انتزیت نکروتیک در طیور و بیماری استراک (Struck) در گوسفندان بالغ می‌شود. این تیپ حاوی فاکتورهای ویرولانسی مختلفی است و یکی از مهم‌ترین این فاکتورها، توکسین بتا است. توکسین بتا به پروتئین‌های متصل به گانگلیوزیدها، باند و با ایجاد کانال باعث تورم و لیز سلول می‌شود. باکتری از طریق مدفوع دام آلوده دفع گردیده و خاک را آلوده می‌سازد و از راه دستگاه گوارش وارد بدن می‌گردد. در شرایط مناسب، باکتری به‌سرعت تکثیر یافته و با تولید توکسین بیماری ظاهر می‌گردد و به‌سرعت، بدون هیچ علائم بالینی خاص، مرگ رخ می‌دهد (۱). بر اساس استانداردهای موجود، واکسیناسیون برای پیشگیری از بیماری‌های کلستریدیایی ضروری بوده و استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با این بیماری‌ها است (۲۲).

در دهه‌های اخیر، استفاده از نانوذرات به عنوان سیستم انتقال آنتی

از ورید وداج یک سر خرگوش ماده سه ماهه، خون‌گیری (سه میلی‌لیتر) انجام و خون اخذ شده به سرعت به میکروتیوب‌های حاوی ماده ضدانعقاد (۲۰ میکرولیتر سیترات سدیم ۱۵٪ به ازاء هر میلی‌لیتر خون) منتقل گردید. میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر خون، در سانتی‌فیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه سانتی‌فیوژ شدند. سپس توده گویچه قرمز به طور کامل از بافی کوت و پلاسما جداسازی گردید. بلافاصله سه برابر حجم توده گویچه قرمز، بافر ۱X PBS به آن اضافه و سانتی‌فیوژ شد. مایع رویی حذف و مجدداً سه برابر حجم رسوب باقیمانده، بافر ۱X PBS به آن اضافه و سانتی‌فیوژ گردید. مایع رویی جدا گردید و سه برابر حجم رسوب باقیمانده، بافر ۱X PBS به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال، انکوبه شد (جهت تکمیل عمل لیز گویچه‌های قرمز). پس از سانتی‌فیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و دوبار حجم رسوب باقیمانده، بافر ۱X PBS به آن اضافه شد (جهت حذف هموگلوبین) و به مدت سه دقیقه در یخچال، انکوبه و سپس سانتی‌فیوژ گردید. مایع رویی جداسازی و سه برابر حجم رسوب باقیمانده، بافر ۱X PBS به آن اضافه شد و به مدت سه دقیقه در یخچال انکوبه و سپس سانتی‌فیوژ گردید. این مرحله مجدداً دو بار تکرار گردید. در پایان، میکروتیوب‌های حاوی غشاء گویچه قرمز تا زمان انجام آزمایشات در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳، ۱۴).

#### تهیه وزیکول‌های غشاء گویچه قرمز

یک میکروتیوب حاوی رسوب گویچه قرمز از فریزر خارج گردید و به دمای محیط رسید. یک میلی‌لیتر بافر ۱X PBS به آن اضافه و به مدت یک دقیقه، سونیکاسیون (۳۷KHz, ۱۰۰W) انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل با استفاده از دستگاه مینی اکسترودر دستی، از غشاء پلی‌کربنات ۲۰۰ و ۴۰۰ عبور داده شد (۲۴).

#### الحاق نانوانتی‌ژن بتا به وزیکول‌های غشاء گویچه قرمز

۹۰ میکرولیتر از محلول به دست آمده در بالا به ۱۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات با رقت ۱:۱۰ افزوده گردید و مجدداً به مدت یک دقیقه، سونیکاسیون (۳۷KHz, ۱۰۰W) انجام شد. در پایان به منظور پوشش نانو آنتی‌ژن‌ها باغشاء گویچه قرمز، ۲۰۰ میکرولیتر از این محلول با استفاده از دستگاه مینی اکسترودر دستی، از غشاء‌های پلی‌کربنات ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ عبور داده شد (۱۳، ۳۲). نانو توکسین‌های الحاق شده به وزیکول‌های گویچه قرمز از نظر اندازه، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا توسط دستگاه DLS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### ارزیابی نانوانتی‌ژن بتا

میزان پروتئین موجود در نانوانتی‌ژن‌های بتا به روش پروتئین سنجی لوری محاسبه گردید. در این سنجش از پروتئین استاندارد BSA با غلظت اولیه یک میلی‌لیتر بر میلی‌گرم استفاده گردید. برای به دست آوردن میزان پروتئین نمونه مجهول از میزان جذب نور در طول موج ۷۵۰ نانومتر استفاده گردید (۱۲). غلظت نانوذرات برای ایمن سازی خرگوش‌ها بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد و بر مبنای نتایج تعیین میزان پروتئین

ژن‌ها برای بهبود اثر واکنش‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته است (۱۷). نانوذرات مزایای قابل توجهی شامل ثبات بالا، ویژگی بالا، ظرفیت حمل بالا، توانایی رهاسازی کنترل شده، امکان استفاده در مسیرهای مختلف تجویز و قابلیت تحویل مولکول‌های آب دوست و آب‌گریز را دارا هستند (۱۹). پلیمر پلی لاکتیک کولیک کولیک اسید (PLGA) یکی از موفق‌ترین پلیمرهای استفاده شده در این زمینه است (۲). استفاده از PLGA همراه با آنتی‌ژن‌های محبوس مانند پروتئین‌ها، پپتیدها یا DNA یک روش مناسب برای کنترل ترشح آنتی‌ژن‌های واکنش و بهینه‌سازی پاسخ ایمنی مورد نظر از طریق هدف‌گیری انتخابی آنتی‌ژن به سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن (APCs) می‌باشد (۷، ۲۹).

اخیراً جهت افزایش بقاء نانوذرات، از غشاء سلول‌هایی همچون گویچه قرمز برای پوشش دادن نانوذرات استفاده می‌گردد (۱۵، ۲۴). در سال ۲۰۱۱، برای اولین بار از فناوری پوشش غشاء سلولی رونمایی شد، که در آن محققان به طور مستقیم از غشاء کامل گویچه قرمز به عنوان ماده‌ای برای پوشش نانوذرات استفاده کردند (۱۴). ساخت نانوذرات حاوی توکسین با ایجاد راهکارهای درمانی و پیشگیرانه جدید از لحاظ اقتصادی و جنبه خودکفایی کمک بالقوه‌ای به کشور خواهد کرد و می‌تواند به‌عنوان یک زیرساخت مناسب برای مطالعات مرتبط توسط سایر پژوهشگران نیز مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیق حاضر با ارزیابی مقایسه‌ای پاسخ ایمنی‌زایی نانو آنتی‌ژن‌های بتا کلستری‌دیوم پرفرنجنس پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز و نانو آنتی‌ژن‌های بدون پوشش، امکان مطالعات بیشتر در زمینه نانو توکسوئیدهای محصور در غشاء گویچه قرمز و مداخله مؤثر آن‌ها در واکنش‌های ایمن فراهم می‌گردد.

#### مواد و روش‌ها

توکسین بتا استاندارد کلستری‌دیوم پرفرنجنس و آنتی توکسین بتا استاندارد کلستری‌دیوم پرفرنجنس از مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. نانوانتی‌ژن بتا آماده مصرف (Ready to use) به صورت ویال‌های لیوفیلیزه به‌عنوان یکی از دستاوردهای طرح تحقیقاتی طراحی و تکوین پایلوت واکنش جدید نانو توکسوئیدی کلستری‌دیوم از مؤسسه رازی دریافت شد. تعداد ۲۰ سر خرگوش ماده سفید سه ماهه (نژاد New Zealand) با وزن تقریبی ۱۷۰۰-۱۴۰۰ گرم که هیچ دارو یا واکنشی دریافت نکرده بودند، از مؤسسه رازی کرج تهیه و به حیوان خانه مؤسسه رازی شعبه کرمان منتقل و تحت شرایط کنترل شده؛ در قفس‌های پروپیلنی، درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۶۰ درصد، سیکل روشنایی و تاریکی (۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) و با دسترسی آسان به آب و غذای کامل (کنستانت) نگهداری شدند. حیوانات قبل از شروع آزمایش به‌منظور حصول اطمینان از نظر فاکتورهای بالینی سلامت (وضعیت خوردن و آشامیدن، ادرار، شکل مدفوع، پوشش مویی بدن و رفتار) به مدت دوهفته قرنطینه و کنترل شدند.

#### آماده‌سازی نانوانتی‌ژن بتا پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز

جهت الحاق نانوانتی‌ژن‌های بتا به غشاء گویچه‌های قرمز اقدامات زیر انجام گرفت:

#### تهیه غشاء گویچه قرمز

موجود در نانو آنتی‌ژن‌ها محاسبه شد.

### ارزیابی استریلیتی و عدم سمیت نانوآنتی‌ژن بتا

بررسی استریلیتی نانوژرات بر اساس اصول کلی مندرج در فارماکوپه دامپزشکی اروپا (Ph. ۲۰۱۹.Eur.) و دستورالعمل استاندارد مؤسسه رازی برای این تست (SOP.۰۰۲۲.KBR) انجام شد. بدین منظور، نانو توکسوئید آماده شده به تایوگلیکولات براث مغذی؛ محیط گوشت پخته شده و سابرد دکستروز آگار تلقیح و به جز آخرین مورد که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، باقی کشت‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند. کشت‌ها به مدت ۱۰ روز مشاهده و بررسی شدند تا وجود هرگونه آلودگی احتمالی باکتریایی و یا قارچی مشخص گردد.

عدم سمیت نانوآنتی‌ژن بتا با آزمایش عدم سمیت (Residual toxicity) مطابق با دستورالعمل استاندارد مؤسسه رازی برای این تست (SOP.۰۰۲۲.KBR) انجام شد. بدین منظور، نیم میلی‌لیتر از هر واکسن به‌صورت زیرجلدی به پنج موش سوری با وزن ۱۷-۲۲ گرم تزریق شد و سلامت موش‌ها و ضایعات احتمالی محل تزریق به مدت یک هفته مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

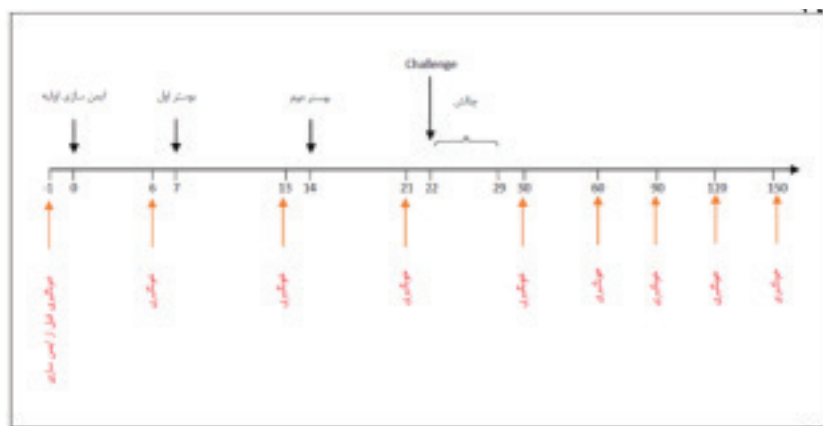
### ایمن‌سازی

این مطالعه تحت اصول اخلاقی سه‌گانه (جایگزینی، کاهش و اصلاح) انجام و حداکثر تلاش برای به حداقل رساندن تعداد حیوانات صورت گرفت. در تمامی مراحل، کارهای انجام شده بر روی خرگوش‌ها، مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود (کد اخلاق: IR.IAU. REC.KERMAN.۱۱.۱۴۰۰). برای بررسی میزان ایمن‌زایی، خرگوش‌ها به صورت تصادفی در چهار گروه دسته‌بندی شدند و به هر گروه پنج سر خرگوش اختصاص داده شد. گروه اول، نانوآنتی‌ژن بتا محصور در غشاء گویچه قرمز (RBC-Nβ)، گروه دوم، نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش

(Nβ)، گروه سوم به‌عنوان کنترل مثبت (C+)، واکسن تیپ C مؤسسه رازی و گروه چهارم به‌عنوان کنترل منفی (C-)، بافر PBS دریافت کردند. میزان دز نهایی تزریق، یک میلی‌گرم بر کیلوگرم و به‌صورت زیرجلدی تجویز گردید. برنامه ایمن‌سازی به‌صورت تزریق اولیه در روز صفر و به دنبال آن یک دز یادآور در روز هفت و یک دز یادآور در روز ۱۴ انجام شد (شکل ۱). خون‌گیری از خرگوش‌ها، یک روز قبل از اولین تزریق و سپس شش روز پس از هر تزریق و متعاقباً به‌صورت ماهیانه انجام شد (شکل ۱). نمونه‌های خون اخذ شده جهت جداکردن سرم، پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط و تشکیل لخته، به مدت هفت دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها تا زمان انجام آزمون‌های ایمن‌زایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تغییرات سطح تیتر آنتی‌بادی در بازه زمانی ۱۵۰ روزه مورد مطالعه قرار گرفت.

### آزمون حداقل میزان کشندگی (MLD)

به‌منظور چالش خرگوش‌های ایمن شده ابتدا حداقل میزان کشنده توکسین بتا محاسبه گردید. برای تعیین حداقل میزان کشندگی توکسین بتا، بر طبق دستورالعمل استاندارد مؤسسه رازی (SOP.۰۰۵۰.ANB)، ابتدا سویه استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ C (CN۲۲۸) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تایوگلیکولات براث در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت شبانه و در شرایط بی‌هوازی کشت شد. جهت تأیید خلوص باکتری از محیط کشت اسلاید تهیه و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. دو میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. از مایع رویی با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت‌های مختلف ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰۰۰ تهیه شد. از هر رقت نیم میلی‌لیتر به دو موش (N.M.R.I) ۱۷-۲۲ گرمی داخل ورید دم تزریق شد. آخرین رقتی که باعث مرگ موش‌ها شد به عنوان نتیجه



شکل ۱- برنامه ایمن‌سازی، فواصل ایمن‌سازی، زمان انجام چالش و زمان‌های خون‌گیری در گروه‌های آزمایش و شاهد.

انکوباسیون، پلیت سه مرتبه با محلول PBS ۱X و یک مرتبه با محلول PBS-TWEEN ۲۰ شستشو داده شد. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر TMB در چاهک‌ها ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در فضای تاریک انکوبه گردید. جهت توقف واکنش ۵۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک یک مولار به چاهک‌ها اضافه و بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۴۵۰ و ۶۲۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Anthos ۲۰۲۰) خوانده شد و نتایج مورد آنالیز قرار گرفت (۲، ۵، ۲۱، ۳۰).

### سنجش همولیز گویچه قرمز

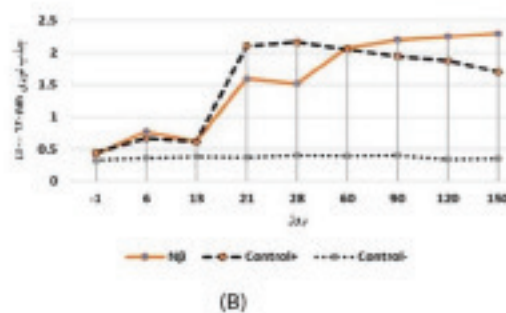
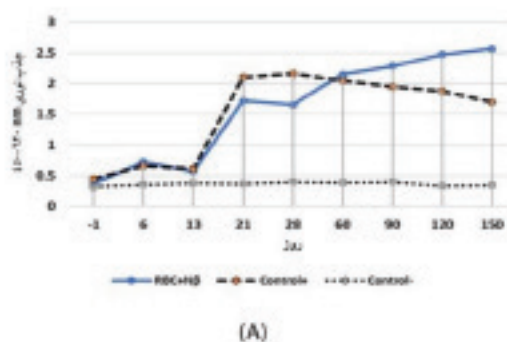
برای تأیید این که تیترهای آنتی‌بادی می‌توانند توکسین اصلی بتا را خنثی کنند، آزمایش سنجش قدرت نانوذرات در همولیز گویچه قرمز انجام گردید. بدین منظور توکسین بتا استاندارد با سرم خون خرگوش‌های واکسینه شده مخلوط و سپس همراه با گویچه‌های قرمز خالص شده، انکوبه شد. سرم خرگوش غیر واکسینه نیز به‌عنوان کنترل استفاده گردید. سپس فعالیت همولیتیک توکسین با اندازه‌گیری مقادیر هموگلوبین آزاد شده تعیین شد (۱۰).

### تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه نتایج در گروه‌های آزمون و شاهد از تست‌های آماری توصیفی و Repeated ANOVA Measures و محاسبات آماری در گروه‌های مختلف چالش با استفاده از تست Pearson Chi-Square در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام گردید (۲۷). براین اساس تعداد کل تلفات در هر یک از گروه‌های تست ایمن شده با گروه‌های کنترل توسط نرم‌افزار ارزیابی و تفاوت‌های آماری مشخص گردید. سطح معنادار بودن نتایج با فرض  $(P < 0.05)$  در نظر گرفته شده است.

### نتایج

#### نتایج ارزیابی نانوانتی‌ژن بتا پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز



شکل ۲- بررسی تحریک پاسخ ایمنی همورال پس از ایمن‌سازی در گروه‌های (A) (RBC-Nβ) و (B) (Nβ) با روش الیزای غیرمستقیم. ایمن‌سازی اولیه در روز صفر انجام و دز یادآور اول در روز هفت و دز یادآور دوم در روز ۱۴ تزریق گردید. گروه اول (RBC-Nβ) ایمن شده با نانوانتی‌ژن بتا پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز، گروه دوم (Nβ) نانوانتی‌ژن بتا بدون پوشش، گروه کنترل مثبت (C+) با واکسن تیپ B مؤسسه رازی و گروه کنترل منفی (C-) با بافر PBS.



بررسی نانوآنتی‌ژن‌های بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز توسط دستگاه DLS نشان داد که ذرات با میانگین اندازه ۱۰۰ نانومتر و شاخص پراکندگی (PDI) برابر با ۰/۳۵۷ تشکیل شده‌اند و پتانسیل زتا نیز ۱۸/۲- تعیین شد.

### نتایج استریلیتی و عدم سمیت

آزمایش استریلیتی به منظور کنترل هرگونه آلودگی باکتریایی -قارچی در شرایط هوایی و بی‌هوایی انجام شد و نتایج نشان داد که فرمولاسیون نانو آنتی‌ژن‌ها فاقد هرگونه آلودگی است. در بررسی عدم سمیت، در میزان تغذیه، علائم بالینی و رفتار موش‌ها پس از تزریق واکسن در تمامی گروه‌ها تغییری مشاهده نگردید. در محل تزریق هم هیچ‌گونه واکنش جلدی دیده نشد و در نتیجه نانو آنتی‌ژن از نظر سلامت تأیید گردید.

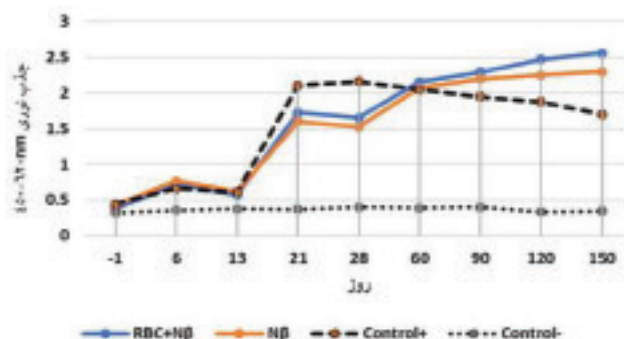
### سنجش آنتی‌بادی‌های تولیدی با روش الیزای غیرمستقیم

به منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی، روش الیزای غیرمستقیم انجام شد. خرگوش‌های تحت تست در هر گروه، میزان آنتی‌بادی‌های متفاوتی را تولید کردند. ایمن‌سازی زیرجلدی خرگوش‌های گروه اول با استفاده از نانوآنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز (RBC-Nβ) (شکل ۲-A) و گروه دوم با استفاده از نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش (Nβ) (شکل ۲-B)، افزایش تیتراژ آنتی‌بادی را در بازه زمانی ۱۵۰ روز نشان داد. گروه (RBC-Nβ) در مقایسه با گروه (Nβ) پاسخ ایمنی مشابه اما بالاتری را نشان داد که نشانگر طولانی‌تر بودن زمان گردش نانوذرات پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز و رهاپس آهسته نانوآنتی‌ژن‌های بتا از غشاء گویچه‌های قرمز است. اگرچه تولید آنتی‌بادی در گروه‌های (RBC-Nβ) و (Nβ) و کنترل مثبت (+C) در روز ۲۱ و پس از تزریق دومین دز یادآور به بیشترین میزان خود می‌رسد ولی در گروه کنترل مثبت (+C) با پایان ماه دوم، کاهش تدریجی تیتراژ آنتی‌بادی مشاهده می‌گردد که در مقایسه با روند صعودی تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌های (RBC-Nβ) و (Nβ) پس از ماه دوم، بسیار چشمگیر است. گروه کنترل منفی (-C) هیچ پاسخ ایمنی

قابل تشخیصی را القاء نکرد. با مقایسه گروه‌های آزمایش به همراه شاهد مشخص گردید که تفاوت نتایج در گروه‌های (RBC-Nβ) و (Nβ) نسبت به گروه‌های کنترل مثبت (+C) و منفی (-C) معنی‌دار است (شکل ۳). در گروه اول (RBC-Nβ) که نانوآنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز را دریافت کرده بودند در مقایسه با خرگوش‌های گروه دوم (Nβ) که نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش را دریافت کرده بودند، همچنان تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. بدین ترتیب مطالعه نشان داد که نانوآنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز بسیار کارآمدتر از انواع بدون پوشش در تحریک پاسخ ایمنی عمل نمودند.

### نتایج حداقل میزان کشندگی و چالش

حداقل میزان کشندگی توکسین بتا کلستریودیوم پرفرنجنس تیپ C مطابق با دستورالعمل استاندارد محاسبه گردید و میزان آن MLD/۱۰۰ تخمین زده شد. پس از تعیین حداقل میزان کشندگی توکسین بتا کلستریودیوم پرفرنجنس، چالش در گروه‌های ایمن شده با ضرب‌های متفاوت از حداقل میزان کشندگی انجام گردید (جدول ۱). بر اساس پروتکل اجرا شده، تلفات به مدت هفت روز و در فواصل زمانی مشخص کنترل و ثبت گردید. بررسی‌های آماری نشان داد که بین هر یک از گروه‌های آزمایش و شاهد مربوطه تفاوت معنادار آماری وجود دارد (P<۰/۰۵). خرگوش‌های گروه (RBC-Nβ) و (Nβ)، پنج برابر حداقل دز کشندگی (۵ MLD) را تحمل کردند و همگی زنده ماندند. درعین حال با تزریق ۱۰ برابر حداقل دز کشندگی (۱۰ MLD) پس از گذشت ۱۶۸ ساعت هیچ مرگی گزارش نشد. اما در چالش با مقادیر بالاتر (۱۰۰ MLD) تمامی خرگوش‌ها مردند. خرگوش‌های گروه کنترل مثبت نیز پنج و ۱۰ برابر حداقل دز کشنده را تحمل کردند. تمامی خرگوش‌های گروه کنترل منفی که پنج، ۱۰ و ۱۰۰ برابر MLD را دریافت کرده بودند تلف شدند (شکل ۴). این امر بیانگر فعالیت مثبت نانوآنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز در تحریک سیستم ایمنی خرگوش‌ها و متعاقباً حفاظت



شکل ۳- مقایسه تحریک پاسخ ایمنی همورال در گروه‌های (RBC-Nβ) و (Nβ). خرگوش‌های گروه اول (RBC-Nβ) ایمن شده با نانوآنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز و خرگوش‌های گروه دوم (Nβ) با نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش، گروه کنترل مثبت با واکسن تیپ C مؤسسه رازی و گروه کنترل منفی (-C) با بافر PBS.

جدول ۱- نتایج چالش با دزهای متفاوت توکسین بتا کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ C.

دز چالش	تعداد خرگوش در هر گروه	تفاوت در هر گروه											
		۳۴ ساعت				۴۸ ساعت				۷۲ ساعت			
		RBC-Nβ	Nβ	Control +	Control -	RBC-Nβ	Nβ	Control +	Control -	RBC-Nβ	Nβ	Control +	Control -
ΔMLD	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰-MLD	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۰-MLD	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مجموع	۵	۰	۱	۱	۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

آن‌ها در برابر دزهای کشنده توکسین‌های بتا کلاستریدیوم پرفرنجنس در مقایسه با سایر گروه‌ها است.

### نتایج آزمون همولیزین

به دنبال مجاورسازی توکسین استاندارد بتا کلاستریدیوم پرفرنجنس با سرم‌های خرگوشی گروه‌های آزمایش و شاهد، نتایج درصد لیز گویچه‌های قرمز از نتایج الیزای غیرمستقیم تبعیت کرد. نتایج حاکی از وجود تیترا خنثی‌کننده آنتی‌بادی تولید شده در گروه دریافت‌کننده نانو آنتی‌ژن بتا پوشش‌یافته با غشا گویچه قرمز در مقایسه با سایر گروه‌ها بود (شکل ۵).

### بحث

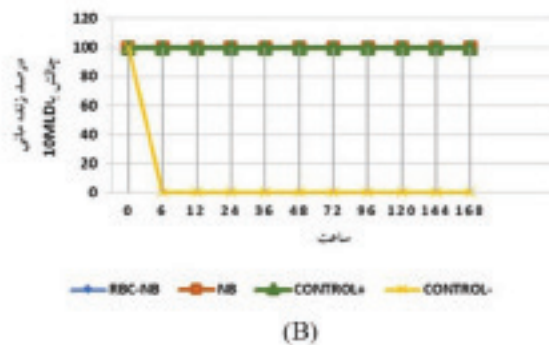
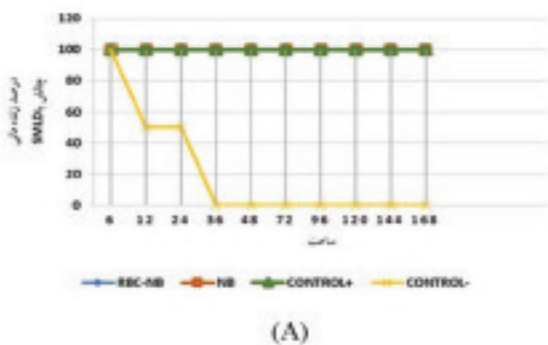
واکسیناسیون یکی از مقرون به صرفه‌ترین مداخلات ضدباکتریایی در نظر گرفته می‌شود. در این راستا، استفاده از فناوری نانو در طراحی واکسن، راه‌حلی مفیدی را در رفع برخی از محدودیت‌های پیش روی فرمول‌های سنتی واکسن ارائه کرده است. در این تحقیق بر آن شدیم تا سطح پاسخ ایمنی همورال نانو توکسوئیدهای بتا کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ C پوشش یافته با غشاء گویچه‌های قرمز مورد مقایسه و ارزیابی قرار گیرد. نتایج نشان داد که نانو توکسوئیدهای بتا محصور در غشاء گویچه‌های قرمز به دلیل رهایش آهسته و طولانی‌مدت، بسیار مؤثرتر و کارآمدتر از نانوآنتی‌ژن‌های بدون پوشش در تحریک سیستم ایمنی عمل می‌نمایند. نانوحامل‌ها می‌توانند با محافظت از آنتی‌ژن‌های کپسوله شده در برابر محیط‌های متخاصم و آزادسازی طولانی‌مدت، به نشانه‌های محیطی پاسخ و ترجیحاً بافت‌ها و سلول‌های موردنظر را هدف قرار دهند. با بهره‌گیری از این ویژگی‌ها، واکسن‌های زیر واحدی و توکسوئیدی علیه باکتری‌ها، از طریق فرمولاسیون به نانوذرات تبدیل شده‌اند. بعلاوه، توسعه نانوذرات بیومیمتیک (Biomimetics) یا زیست تقلید اصلاح شده با غشاء سلولی به دلیل زیست‌سازگاری استثنایی، فرار از سیستم ایمنی و توانایی هدف‌گیری، در سال‌های گذشته به طور گسترده افزایش یافته است. در واقع این نانو پلت‌فرم‌های جدید که به‌عنوان یک حوزه تحقیقاتی پیشرفته در نانو پزشکی شناخته می‌شوند، می‌توانند عملکردهای مختلف سلول‌های اولیه را تقلید کنند، درحالی‌که با موفقیت محموله‌های خود را باهدف افزایش پاسخ‌های ایمنی و کاهش عوارض جانبی تحویل می‌دهند. دهاینی (Dehaini) و همکاران (۲۰۱۶)، سانتوس (Santos) و همکاران (۲۰۲۲) و چکمن (Chekman) و همکاران (۲۰۱۲) فرایند برهم‌کنش مثبت بین اجزای سیستم ایمنی و نانو توکسین‌های بیومیمتیک که عوامل ضدباکتریایی امیدوارکننده‌ای هستند را مورد بحث و بررسی قرار دادند (۶، ۸، ۲۶). مهم‌ترین ویژگی‌های یک واکسن مؤثر شامل حضور موثر آنتی‌ژن‌های محرک سیستم ایمنی، عوامل تشدیدکننده پاسخ سیستم ایمنی و سیستم رهایش برای اطمینان از انتقال و هدف‌گیری صحیح هستند. برای دستیابی به این عوامل، در طراحی نانوذرات بر روی ترکیب شیمیایی، اندازه، بار سطحی و خصوصیات سطحی تمرکز می‌شود، زیرا این موارد برای کنترل توزیع این ذرات در محیط زیستی، رهایش آنتی‌ژن، میزان کارآمدی تحریک سیستم ایمنی و پاسخ نهایی سیستم ایمنی حائز اهمیت هستند. یکی از مزایای برجسته گویچه‌های قرمز به عنوان سیستم تحویل، افزایش زمان گردش

دلیل سد انتشاری ارائه شده توسط پوشش لیپیدی، پروفایل آزادسازی پایدارتری را در مقایسه با نانوذرات پلیمری بدون پوشش مشابه نشان داده‌اند. انتظار می‌رود سینتیک آزادسازی محموله از نانوذرات پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز حتی تدریجی‌تر باشد، زیرا غشاء گویچه قرمز سد لیپیدی دولایه و متراکم‌تری را در برابر انتشار ایجاد می‌کند (۲۸، ۲۷، ۲۰). غشاء گویچه قرمز به دلیل توانایی در اجتناب از سیستم ایمنی و گردش طولانی‌مدت، به طور گسترده برای اصلاح نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته است. هو (Hu) و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز در مقایسه با نانوذرات بدون پوشش و نیز وزیکول‌های غشاء گویچه قرمز، زمان گردش بسیار طولانی‌تری دارند (۱۳). بدون پوشش غشاء گویچه قرمز، نانوذرات بدون پوشش به سرعت و ظرف چند دقیقه پس از تزریق داخل وریدی، در سرم تجمع می‌یابند. این نتایج نشان می‌دهند که وارد کردن یک هسته جامد به وزیکول‌های غشاء گویچه قرمز، به انسجام ساختاری بالاتر و پایداری ذرات کمک می‌کند و منجر به طولانی‌تر شدن زمان گردش نانوذرات پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز می‌گردد. علاوه بر این، پوشش غشاء گویچه قرمز به دلیل حضور پروتئین‌های سرکوبگر سیستم ایمنی که ماکروفاژها را مهار می‌کنند، در به تعویق انداختن پاکسازی در شرایط درون تنی، برتری دارد. در مقایسه با بسیاری از داده‌های منتشر شده در مورد گردش نانوذرات در مدل‌های موش که اکثر آنها احتیاس خونی ناچیزی را پس از ۲۴ ساعت نشان می‌دهند، نانوذرات پوشش داده شده با غشاء گویچه قرمز، زمان ماندگاری بالاتری را نشان می‌دهند که حاکی از پتانسیل فوق‌العاده برای کاربردهای زیست‌پزشکی می‌باشد (۱۸، ۳۱، ۳۲). وو (Wu) و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعات خود پتانسیل بالای غشاء‌های نوترکیب گویچه‌های قرمز برای تولید پلت فرم تحویل قابل‌کنترل و چندوجهی نانوذرات محبوس در غشاء گویچه‌های قرمز را گزارش و مقایسه نموده‌اند (۳۱).

در خون بر اساس انواع نشانگرهای تعدیل‌کننده ایمنی بیان شده بر روی غشای سلولی آن است. از این رو، انتظار می‌رفت گروه ایمن شده با نانوآنتی‌ژن پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز در مقایسه با گروه ایمن شده با نانوآنتی‌ژن بدون پوشش زمان گردش طولانی‌تری داشته باشند. با ادامه تعیین تیترا آنتی‌بادی، با یک کاهش جزئی در تیترا آنتی‌بادی در پایان ماه اول، تعیین پاسخ آنتی‌بادی در پایان ماه دوم (روز ۶۰) تحریک ایمنی‌زایی بالا و افزایش تیترا آنتی‌بادی را در گروه‌های آزمایش نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل مثبت، تفاوت چشمگیر بود. کاهش تدریجی تیترا آنتی‌بادی برای گروه کنترل همراه با سیر صعودی و افزایش تیترا آنتی‌بادی در بازه زمانی ۱۵۰ روز برای گروه‌های تست، پایدار بود. در تمامی قرائت‌ها، جذب نوری گروه ایمن شده با نانوآنتی‌ژن پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز نسبت به گروه ایمن شده با نانوآنتی‌ژن بدون پوشش بالاتر بود و نشان داد که قوی‌تر و ایمن‌تر عمل نموده است. این نتایج مزایای استفاده از آنتی‌ژن‌های محبوس در غشاء گویچه قرمز را برای واکسیناسیون نشان می‌دهد.

زیو (Xiao) و همکاران (۲۰۱۹) در دو مطالعه مجزا، آزادسازی یکنواخت و پایدار آنتی‌ژن از نانوذرات محبوس در غشاء گویچه قرمز را در شرایط آزمایشگاهی اثبات نمودند. وی با پوشاندن سطح آنتی‌ژن-PLGA با غشاء گویچه‌های قرمز، آزادسازی در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت پروتئین غشایی، جذب سلولی در شرایط آزمایشگاهی و سنجش‌های فارماکوکینتیک برای ارزیابی رهایش پایدار و گردش طولانی‌مدت را مورد آزمایش قرار دادند (۲۴، ۳۲). نتایج نشان می‌دهد که غشاء گویچه قرمز یک لایه ایمن برای مهار توکسین فراهم می‌کند و سبب پردازش آنتی‌ژن‌های کپسوله، بدون ایجاد عوارض بالقوه مرتبط با ایمنی ضد حامل می‌شوند.

در مطالعات والنسیا (Valencia) و همکاران (۲۰۱۰)، ون (Van) و همکاران (۲۰۱۰) و لیو (Liu) و همکاران (۲۰۰۹)، نانوذرات محبوس در غشاء به



شکل ۴ - درصد زنده‌مانی خرگوش‌ها پس از چالش با توکسین بتا (۱۰ و ۵) کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ C. میزان بقای خرگوش‌ها طی یک دوره هفت روزه پس از تزریق زیرپوستی دو میلی‌گرم بر کیلوگرم از پنج برابر حداقل دز کشندگی توکسین کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ (A) و C و ۱۰ برابر حداقل دز کشندگی توکسین کلاستریدیوم پرفرنجنس تیپ C، گروه اول (RBC-Nβ) ایمن شده با نانوآنتی‌ژن بتا پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز، گروه دوم (Nβ) با نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش، گروه کنترل مثبت (C+) با واکسن تیپ C مؤسسه رازی و گروه غیر ایمن کنترل منفی (C-) با بافر PBS.



### نتیجه گیری

با توجه به اینکه مبنای تولید واکسن‌های توکسوئیدی استفاده از تکنیک‌های تخلیص و تغلیظ می‌باشد لذا کارایی بالاتری نسبت به واکسن‌های کشته شده بدلیل حضور آنتی‌ژن‌های مداخله‌گر دارند. با این وجود هر دوی این واکسن‌ها نیازمند استفاده از تکنیک‌های غیرفعال‌سازی توکسین هستند که ظرفیت آن‌ها برای تحریک درازمدت و قدرتمند پاسخ‌های ایمنی را محدود می‌سازد، لذا به نظر می‌رسد استفاده از توکسوئیدهای غیرفعال شده با ذرات نانو (نانوتوکسوئید) بر مبنای تکنیک‌های پوشش یافتن با غشاء گویچه قرمز، بدلیل عدم نیاز به فرایند غیرفعال‌سازی با فرمالدئید، در مقایسه با واکسن‌های کشته شده و توکسوئیدی ارجحیت داشته باشد که نتیجه مطالعه عدم سمیت نانوآنتی‌ژن بتا این موضوع را اثبات کرده است.

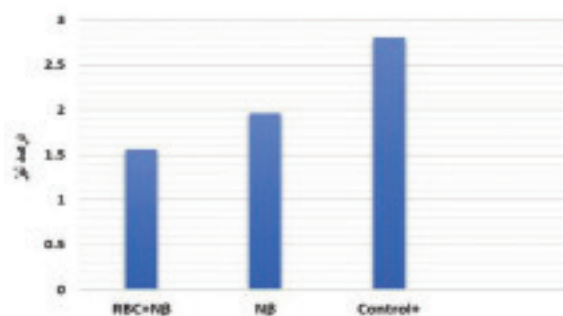
تزریق آنتی‌ژن به‌تنهایی، توانایی القای پاسخ آنتی‌بادی در بازه زمانی طولانی را ندارد. این در حالی است که با تزریق توکسین بصورت نانوذرات، میزان ایمنی هومورال و پاسخ آنتی‌بادی به طور قابل‌توجهی با گذر زمان افزایش می‌یابد.

همچنین زمانی که نانوذرات در پوشش غشاء گویچه قرمز تزریق شود میزان تیتراژ آنتی‌بادی در طولانی‌مدت افزایش چشمگیری دارد. با توجه به اینکه در آنالیز آماری بین گروه‌های آزمایش، اختلاف معناداری بین نانوذرات پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز و نانوذرات بدون پوشش مشاهده شد، لذا می‌توان از غشاء گویچه قرمز با توجه به خواص زیست‌سازگاری استثنایی و فرار از سیستم ایمنی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای تقویت پاسخ‌های ایمنی موضعی و بهبود سازگاری در سیستم‌های تحویل نوآورانه و غیرتهاجمی استفاده نمود. از آنجایی که رویکرد مهار توکسین به واسطه نانوذرات، فرمولاسیون واکسن با قدرت بالاتر را نوید می‌دهد، انتظار می‌رود پلت فرم RBC-NP به نسل جدیدی از واکسن‌های نانو توکسوئید تبدیل شود که می‌تواند مدیریت بیماری‌های عفونی را بهبود بخشد. با ارتقاء ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی، رویکرد واکسیناسیون می‌تواند وقوع عفونت‌های میکروبی را بدون اتکا به آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش دهد. با حرکت رو به جلو، این پلت فرم نانو توکسوئیدی را می‌توان برای انواع دیگر ذرات پوشش داده شده با غشاء سلولی و برای خنثی‌سازی و تحویل سایر توکسین‌های قوی برای ایجاد طیف وسیعی از واکسن‌های ایمن و مؤثر تعمیم داد. با این وجود قابلیت استفاده از نانوآنتی‌ژن‌های پوشش‌یافته با غشاء به عنوان یک کاندید واکسن نیازمند ارزیابی‌هایی ایمنی‌زایی قوی‌تر و دقیق‌تر می‌باشد تا تاثیر نانوذرات و پوشش اطراف آن بر القاء پاسخ ایمنی معین گردد.

### منابع مورد استفاده

- 1- Abdolmohammadi Khiav, L. and A. Paradise. 2021. Molecular and Toxigenic Characteristics of *Clostridium Perfringens* Type B Isolates from Sheep and Lamb. *Journal of Veterinary Research* 76: 268-276.
- 2- Abdolmohammadi Khiav, L., A. Paradise and A. Hagh Roosta. 2020. Designing of an Indirect ELISA Method for the Detection of Beta Antitoxin of *Clostridium perfringens* Type C in Rabbit Serum.

در این مطالعه، جهت نشان‌دادن قابلیت ایمنی‌زایی نانوذرات پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز از رابطه میزان تولید آنتی‌بادی و مقدار توکسین خنثی شده توسط آن استفاده گردید. مقایسه بین نتایج حاصل از چالش و میزان زنده ماندن موش‌ها و تیتراژ سرم در تست الیزا بیانگر قابلیت بسیار بالای نانوذرات پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز تهیه شده در تحریک سیستم ایمنی حیوان مدل و کارایی بالا برای محافظت حیوان بر علیه توکسین بود (۵). نتایج نشان داد که سرم خروگوش‌های ایمن با نانو توکسوئیدهای پوشش‌یافته با غشاء گویچه قرمز در خنثی‌کردن توکسین قوی‌تر است. به دلیل سیر نزولی تیتراژ آنتی‌بادی از پایان ماه اول در گروه کنترل مثبت و تأییدیه آزمون سنجش همولیز و همچنین نتایج چپو (Chiu) و همکاران (۲۰۲۱)، و واثق همکاران (۲۰۱۸) الموافی (Elmowafy) و همکاران (۲۰۱۹) در زمینه نانو واکسن‌ها و معایب واکسن‌های توکسوئیدی تجاری و محدودیت‌های در فرایند تولید، مراحل سم‌زدایی و کنترل زمان بر و شرایط ایمنی سختگیرانه و تولید حداقل تیتراژ آنتی‌توکسین بتا، نانوذرات و به‌ویژه نانوذرات محبوس در غشاء گویچه‌های قرمز جایگزین‌های امیدوارکننده‌ای برای کنترل بیماری‌های ناشی از کلستری‌دیوم پرفرنجنس تیپ C هستند (۷، ۹، ۲۹). فتحی‌نجفی و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی اثربخشی نانوذرات در ساخت واکسن توکسوئیدی، گزارش کردند که نانوذرات نه‌تنها هیچ‌گونه عوارض جانبی بر روی بافت‌های موضعی یا عمومی ندارند، بلکه می‌توانند کمک خوبی برای تحریک سیستم ایمنی بدن باشند. توکسوئیدها به‌راحتی توسط سیستم ایمنی تشخیص داده می‌شوند و ایمنی موردنظر را بدون هیچ تغییر عمده‌ای در عوامل سیستم عمومی ایجاد می‌کنند (۱۰). کرول (Kroll) و همکاران (۲۰۱۷) و گاوو (Gao) و همکاران (۲۰۱۵) نیز در بررسی کاربرد نانوذرات پوشش داده شده با غشاء سلولی از جمله غشاء گویچه‌های قرمز، بر نقش آنها در دارورسانی، سم‌زدایی و تعدیل ایمنی مؤثرتر و کارآمدتر تأکید دارند (۱۱، ۱۸). بدین ترتیب استفاده از غشاهای سلولی برای پوشش نانوذرات به عنوان یک رویکرد قدرتمند و انعطاف پذیر برای تشکیل نانو ساختارهای فعال توصیه می‌گردد.



شکل ۵- نتایج سنجش همولیز گویچه‌های قرمز. گروه (RBC-NP) ایمن شده با نانوآنتی‌ژن بتا پوشش یافته با غشاء گویچه قرمز، گروه (NP) با نانوآنتی‌ژن بتا بدون پوشش، گروه کنترل مثبت (C+) با واکسن تیپ C مؤسسه رازی.

*Veterinary Researches & Biological Products* 33: 21-30.

3- Abdolmohammadi Khiav, L., R. Pilehchian Langroodi and A. Paradise. 2021. Recently acquired for NetB and TpeL toxins for vaccine production to protect against avian necrotic enteritis. *Veterinary Researches & Biological Products* 34: 26-37.

4- Amini, M., M. Shamsaddini Bafti, B. Kheirkhah and F. Rokhbakhsh-Zamin. 2021. Comparison of toxin production power in different types of *Clostridium perfringens* among sheep and goats isolates by ELISA. *Veterinary Researches & Biological Products*.

5- Bagheripour, M. J., F. Ebrahimi, A. Hajizadeh, S. Nazarian and M. A. Arefpour. 2016. Preparation of chitosan based botulinum neurotoxin e recombinant nanovaccine and evaluation of its immunogenicity as oral & intradermal route in mice. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 14: 923-938.

6- Chekman, I. and P. Simonov. 2012. Structure and Function of Biological Membranes: The Impact of Nanoparticles. *International Journal of Physiology and Pathophysiology* 3: 187-208.

7- Chiu, H. I., N. A. Samad, L. Fang and V. Lim. 2021. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. *RSC Advances* 11: 9433-9449.

8- Dehaini, D., R. H. Fang and L. Zhang. 2016. Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery. *Bioengineering & translational medicine* 1: 30-46.

9- Elmowafy, E. M., M. Tiboni and M. E. Soliman. 2019. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 49: 347-380.

10- Fathi Najafi, M., M. Hemmaty, J. Navidmehr, M. Afsharian, M. Farhoodi and S. Zibae. 2020. Improvement in the Growth and  $\alpha$ -toxin Production of *Clostridium septicum* by Magnesium Sulfate. *Archives of Razi Institute* 75: 219-225.

11- Gao, W. and L. Zhang. 2015. Engineering red-blood-cell-membrane-coated nanoparticles for broad biomedical applications. p. 738-746.

12- Golchinfar, F., R. Madani, T. Emami, H. Zoufagharian, A. Zare and N. Mouhammadpour. 2016. Designing a competitive ELISA for evaluation of anti-snake venom serum potency. *Veterinary Researches & Biological Products* 29: 9-16.

13- Hu, C.-M. J., R. H. Fang, B. T. Luk and L. Zhang. 2013. Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination. *Nature Nanotechnology* 8: 933-938.

14- Hu, C.-M. J., L. Zhang, S. Aryal, C. Cheung, R. H. Fang and L. Zhang. 2011. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 10980-10985.

15- Izzati Mat Rani, N. N., Z. M. Alzubaidi, H. Azhari, F. Mustapa and M. C. Iqbal Mohd Amin. 2021. Novel engineering: Biomimicking erythrocyte as a revolutionary platform for drugs and vaccines delivery. *European Journal of Pharmacology* 900: 174009.

16- Kamali, M., M. B. Salehi, M. Tavalaei, G. H. Olad and M. Musavi. 2009. Fast detection of *Clostridium perfringens* Type A, B, C and D by Multiplex PCR. *Veterinary Researches & Biological Products* 22: 63-71.

17- Kheirollahpour, M., M. Mehrabi, N. M. Dounighi, M. Mohammedi and A. Masoudi. 2020. *Nanoparticles and Vaccine Development*. *Pharmaceutical Nanotechnology* 8: 6-21.

18- Kroll, A. V., R. H. Fang and L. Zhang. 2017. Biointerfacing and applications of cell membrane-coated nanoparticles. *Bioconjugate chemistry* 28: 23-32.

19- Liu, J., Z. Liu, Y. Pang and H. Zhou. 2022. The interaction between nanoparticles and immune system: application in the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Nanobiotechnology* 20: 127.

20- Liu, J., A. Stace-Naughton, X. Jiang and C. J. Brinker. 2009. Porous nanoparticle supported lipid bilayers (protocells) as delivery vehicles. *Journal of the American Chemical Society* 131: 1354-1355.

21- Paradise, A. R. and L. Abdolmohammadi Khiav. 2020. Evaluation of Epsilon Antitoxin of *Clostridium Perfringens* Type D in The Rabbit Serum By Indirect ELISA. *Veterinary Researches & Biological Products* 33: 17-30.

22- Pilehchian, L. R., A. R. Jabbari, S. M. Moosawi and A. Pardis. 2015. A Production of pentavalent Clostridial toxoid vaccine and its comparison to conventional bacterin vaccine.

23- Poudineh Morref, M., M. K. Koochi, M. Alimolaei, T. Emami and J. Hassan. 2022. A New Practical Purification Method for Type D *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin by Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Ultrafiltration (UF). *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 16: 178-187.

24- Que, X., J. Su, P. Guo, Z. Kamal, E. Xu, S. Liu, J. Chen and M. Qiu. 2019. Study on preparation, characterization and multidrug resistance reversal of red blood cell membrane-camouflaged tetrandrine-loaded PLGA nanoparticles. *Drug delivery* 26: 199-207.

25- Rahman Mashhadi, M., N. Atyabi, M. Hemmaty, M. Fathi Najafi and M. H. Fallah Mehrabadi. 2018. A comparative hematological, biochemical and immunological factors study following pentavalent toxoid vaccine containing *Clostridium novyi* with black disease bacterin/toxoid vaccine injection. *Veterinary Researches & Biological Products* 31: 66-71.

26- Santos, H. A. 2022. Biomimetic platelet membrane-coated

- nanoparticles for targeted therapy Huijie Han, Raquel Bártolo, Jiachen Li, Mohammad-Ali Shahbazi. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 172: 1-15.
- 27- SPSS Statistics for Windows. 2021. Armonk, NY, IBM Corp.
- 28- Valencia, P. M., P. A. Bašto, L. Zhang, M. Rhee, R. Langer, O. C. Farokhzad and R. Karnik. 2010. Single-step assembly of homogenous lipid-polymeric and lipid-quantum dot nanoparticles enabled by microfluidic rapid mixing. *ACS nano* 4: 1671-1679.
- 29- Van Schooneveld, M. M., A. Gloter, O. Stephan, L. F. Zagonel, R. Koole, A. Meijerink, W. J. M. Mulder and F. M. F. De Groot. 2010. Imaging and quantifying the morphology of an organic-inorganic nanoparticle at the sub-nanometre level. *Nature nanotechnology* 5: 538-544.
- 30- Vasegh, R., M. Ebtekar, M. Shafiee Ardestani and M. Gholamzad. 2018. Comparison of Humoral and Cell-Mediated Immune Response to Tetanus toxin Coated PLGA in Mice. *mdrsjrn* 22: 7-19.
- 31- Vasegh, R., M. Ebtekar, M. Shafiee Ardestani and M. Gholamzad. 2018. Comparison of Humoral and Cell-Mediated Immune Response to Tetanus toxin Coated PLGA in Mice. *Pathobiology Research* 22: 7-19.
- 32- Wu, P., X. Jiang, S. Yin, Y. Yang, T. Liu and K. Wang. 2021. Biomimetic recombinant of red blood cell membranes for improved photothermal therapy. *Journal of nanobiotechnology* 19: 1-13.
- 33- Xia, Q., Y. Zhang, Z. Li, X. Hou and N. Feng. 2019. Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles: a novel drug delivery system for antitumor application. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 9: 675-689.

