Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

بررسی سمیت پروتئین نوترکیب آنتی ژن حفاظتی *باسیلوس آنتراسیس* به شکل آزاد و کپسوله شده توسط کوپلیمرهای دوبلوکه PLA-PEG و PCL-PEG بر روی رده سلولی Vero

سید مسیح عتمادایوبی[1]، حسین هنری[2]*، اشکان حاجی نور محمدی[3]، حامد باقری[4]، مجتبی نوفلی[5]

۱- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی.
۲- دانشیار دکتری ژنتیک مولکولی.
۳- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی.
۴- استادیار دکتری مهندسی پلیمر.
۵-استادیار دکتری باکتری شناسی پزشکی.

۱و۲- مرکز علم و فناوری گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
۳-مرکز علم و فناوری گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
۴-دانشکده فن آوری‌های برتر، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۵-بخش تولید واکسن‌های باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج: سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
حسین هنری؛ مرکز علم و فناوری گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷
Email: honari.hosein@gmail.com

چکیده

زمینه وهدف: *با سیلوس آنترا سیس* عامل بیماری مهلک سیاه زخم ا ست. ا ستفاده از واکسن یکی از راه‌های موثر مقابله با سیاه زخم می با شد. واکسن‌های ساخته شده مورد پذیرش باید زیست سازگار و بدون سمیت باشند. هدف این پژوهش تعیین اثر سمیت سلولی پروتئین نوترکیب آنتی ژن حفاظتی *باسیلوس آنتراسیس* به شکل آزاد و کپسوله شده تو سط کوپلیمرهای دوبلوکه PLA-PEG و PCL-PEG بر روی رده سلولی اپی‌تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero) به منظور به دست آوردن میزان تاثیر مخرب این کاندید واکسن می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن حفاظتی *باسیلوس آنتراسیس* (PA63) در باکتری *اکولای* بیان و توسط کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل تخلیص شد. در ادامه PA63 توسط کوپلیمرهای دوبلوکه PLA-PEG و PCL-PEG با ا ستفاده از روش تبخیر حلال کپسوله شد. در نهایت آزمون سمیت سلولی PA63 و نانوذرات به دست آمده با استفاده از آزمون استاندارد MTT بر روی رده سلولی Vero انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون MTT عدم سمیت کاندید واکسن مورد نظر را نشان داد. همچنین میزان مرگ و میر سلول‌های مورد آزمون در مقابل آنتی ژن کپسوله شده در نانوذرات کمتر از آنتی ژن آزاد بوده است.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به د ست آمده می‌توان از فرمولا سیون نانو واکسن تهیه شده برای کاهش اثر سمیت سلولی آنتی ژن تهیه شده در محیط زنده استفاده کرد و در نهایت به واکسن اثرگذار و زیست سازگار مهندسی شده نوترکیب دست یافت.

واژگان کلیدی: باسیلوس آنتراسیس، آنتی ژن حفاظتی، سمیت سولی، PLA-PEG, PCL-PEG.

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۹ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۷/۸/۱۹ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۷/۸/۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیاه‌زخم بیماری مشترک بین انسان و دام است که به وسیله باکتری *باسیلوس آنتراسیس* (*Bacillus anthracis*) جزو خانواده *با سیلا سه* (*Bacillaceae*) ایجاد می شود (۱, ۲). از ویژگی‌های این بیماری، کشندگی بسیار بالا، تولید و انتشار بسیار آسان آن می‌باشد. واکسن‌های تولید شده علیه *باسیلوس آنتراسیس* یکی از راه‌های محافظت انسان و دام در برابر این باکتری بیماری زا می‌باشد (۳, ۴). از ویژگی‌های واکسن‌های مورد پذیرش، زیست سازگاری و عدم سمیت آنها می باشد. PA یک جزء بسیار مهم از توکسین آنتراکس است که به طور گسترده‌ای به عنوان یکی از کاندیدهای واکسن مورد مطالعه قرار گرفته است (۵, ۶). اما واکسن‌های کنونی به منظور اثر گذاری کامل نیاز به حامل و ادجوانت (Adjuvant) دارند. با وجود این که آلومینیوم هیدروکسید و نمک‌های فسفاته ادجوانت‌های مورد توافق در واکسن‌های آنتراکس می‌باشند نشان داده‌شده است که هیدروکسید آلومینیوم در نگهداری طولانی مدت اثرات نامطلوبی بر روی PA می‌گذارد و اثرگذاری آن را کاهش می‌دهد (۷). همچنین این ادجوانت ها اثرات جانبی و گاهی اوقات سمی نیز دارند (۸). با توجه به دلایل اشاره شده در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از سیستم‌های نانوذره‌ای پلیمری زیست تخریب‌پذیر برای کاربردهای تحویل دارو در حال افزایش بوده‌است (۹-۱۱). پلی‌لاکتیک‌اسید (Polylactic acid) (PLA)، یک پلیمر زیست تخریب پذیر و زیست سازگار سنتزی مورد تایید FDA (Food and Drug Administration) می باشد (۱۲-۱۴). در این پژوهش ابتدا پروتئین نوترکیب آنتی ژن حفاظتی *باسیلوس آنتراسیس* (PA63) در باکتری *اکولای* (*E. coli*) بیان و سپس توسط کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل تخلیص شد. در ادامه PA63 توسط کوپلیمر های دوبلو که PLA-PEG و PCL-PEG با استفاده از روش تبخیر حلال کپسوله شد. در نهایت آزمون سمیت سلولی PA63 و نانوذرات به دست آمده با استفاده از آزمون استاندارد MTT (3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) بر روی رده سلولی Vero انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش عدم سمیت فرمولاسیون کاندید نانو واکسن به دست آمده را نشان داد. در نتیجه می‌توان از فرمولاسیون نانو واکسن تهیه شده برای کاهش اثر سمیت سلولی کاندید واکسن مورد نظر در محیط زنده استفاده کرد و در نهایت نانو واکسن حاصل شده را به عنوان یک واکسن اثرگذار و زیست سازگار مهندسی شده نوترکیب جهت بررسی‌های بیشتر پیشنهاد نمود.

روش بررسی

این پژوهش در آزمایشگاه کشت سلول و سم شناسی گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران صورت پذیرفته است. مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت‌های (مرک (MERCK)، سیگما (Sigma)) تهیه گردید (۱۵).

بیان پروتئین نوترکیب و آماده سازی نانوذرات

پس از بیان PA63 توسط باکتری *اکولای* سوش (*E. coli* BL21-DE3) (تهیه شده از پژوهشگاه رویان، ایران) به روش دناتوره در محیط مایع، آنتی ژن تولیدی توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از ستون نیکل خالص(Shingene چین) سازی شد (۱۶). کوپلیمرهای PLA-PEG و PCL-PEG مورد استفاده در این پژوهش از طریق روش پلیمریزاسیون حلقه باز-(Ring opening polymerization)تهیه شدند (۱۷, ۱۸). نانوذرات PA63-PCL-PEG-NPs و PA63-PLA-PEG-NPs و نانوذرات شاهد PCL-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs از طریق کپسوله‌سازی PA63 توسط کوپلیمر های دو بلوکه PLA-PEG و PCL-PEG با استفاده از روش تبخیر حلال (w/o/w solvent evaporation) تهیه شدند (۸). نانوذرات

www.SID.ir

Archive of SID

حاصله توسط آب مقطر دیونیزه استریل شستشو داده شد و به مدت سه ساعت در فشار ۰/۲۵ میلی بار و دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد لیوفیلیزه (کریست، آلمان) گردید.

تعیین مشخصات مورفولوژیکی و سایز نانوذرات

مشخصات مورفولوژیکی نانوذرات تهیه شده با استفاده ازمیکروسکوپ الکترونی Scanning Electron Microscope)) مدل KYKY-EM3200 مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون سمیت سلولی MTT

به منظور بررسی اثر سمیت پروتئین نوترکیب PA63 به صورت آزاد و کپسوله شده توسط نانوذرات، از روش رنگ سنجی MTT (SRL هند) با سه تکرار بر روی رده سلولی Vero (سلول های اپی تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی) تهیه شده از بانک سلولی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران استفاده شد (۱۹). این روش یک آزمون متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است (۲۰).

برای دست یابی به این هدف در ابتدا سلول‌های مورد نظر را برای کشت به فلاسک حاوی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) سیگما (Sigma)و FBS ۱۰ درصد منتقل کرده و فلاسک در انکوباتور ۳۷ درجه با غلظت CO_2 پنج درصد و رطوبت نود و پنج درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا شرایط سلول‌ها به لحاظ رشد و مورفولوژی و اطمینان از عدم وجود آلودگی و همچنین شمارش سلول‌های زنده Vero به‌منظور رسیدن به حجم مناسب توسط لام هموسایتومتر انجام شد. با مناسب شدن وضعیت سلول‌ها به منظور آزمون MTT از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای (اس پی ال ساخت کره) استفاده شد. نمونه‌های مورد تست محلول حاوی پروتئین نوترکیب PA63 و نانوذرات تهیه شده با کمک عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شدند و با غلظت های ۴۰،۲۰ و ۱۰ میگروگرم بر میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. جهت بلانک از چاهک فاقد سلول و حاوی محیط کشت و همچنین از چاهک محتوی سلول و محیط کشت و فاقد محلول حاوی پروتئین نوترکیب با سه تکرار جهت کنترل استفاده شد. در ادامه بعد از ۲۴ ساعت گرما گذاری تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با غلظت CO_2 پنج درصد به هر چاهک مقدار پنج میکرولیتر از محلول MTT با غلظت پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت تا زمان تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان به مدت یک ساعت تحت شرایط تاریکی گرماگذاری گردید. بعد از اتمام زمان گرما گذاری پلیت را از انکوباتور خارج و محیط کشت حاوی MTT را تخلیه و چاهک‌ها دومرتبه با محلول PBS شستشو داده شد. سپس برای حل نمودن کریستال‌های فورمازان، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به هر چاهک اضافه و بعد از تثبیت رنگ تحت شرایط تاریکی به مدت دو ساعت در دمای اتاق، جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۱). در صد زنده ماندن سلول پس از تماس با غلظت های مختلف پروتئین نوترکیب PA63 به صورت آزاد و کپسوله شده به کمک معادله زیر محاسبه گردید (۲۱).

در صد زنده ماندن سلول= / جذب نوری بلانک – جذب نوری سلول های تیمار شده جذب نوری بلانک – جذب نوری کنترل*۱۰۰

در انتها برای بررسی سطح معناداری اختلاف میانگین نتایج به دست آمده با سه تکرار از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و طرح مربع کاملا تصادفی ($p<۰/۰۵$) استفاده شد.

یافته‌ها

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

پس از بیان PA63 در باکتری *اکولای*، آنتی‌ژن تولیدی توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از ستون نیکل خالص سازی شد و جهت بررسی کمیت و

www.SID.ir

Archive of SID

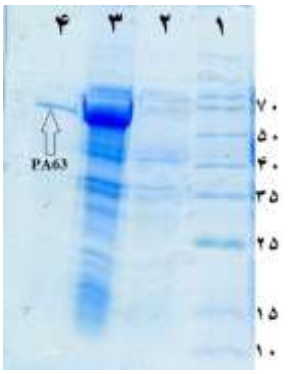
کیفیت پروتئین تهیه شده از ژل SDS استفاده شد (شکل ۱).

بررسی مورفولوژیک نانوذرات سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی کروی بودن سطح ذرات حاصل از فرایند تولید نانوذرات را نشان داد (شکل ۲).

نتایج آزمون MTT

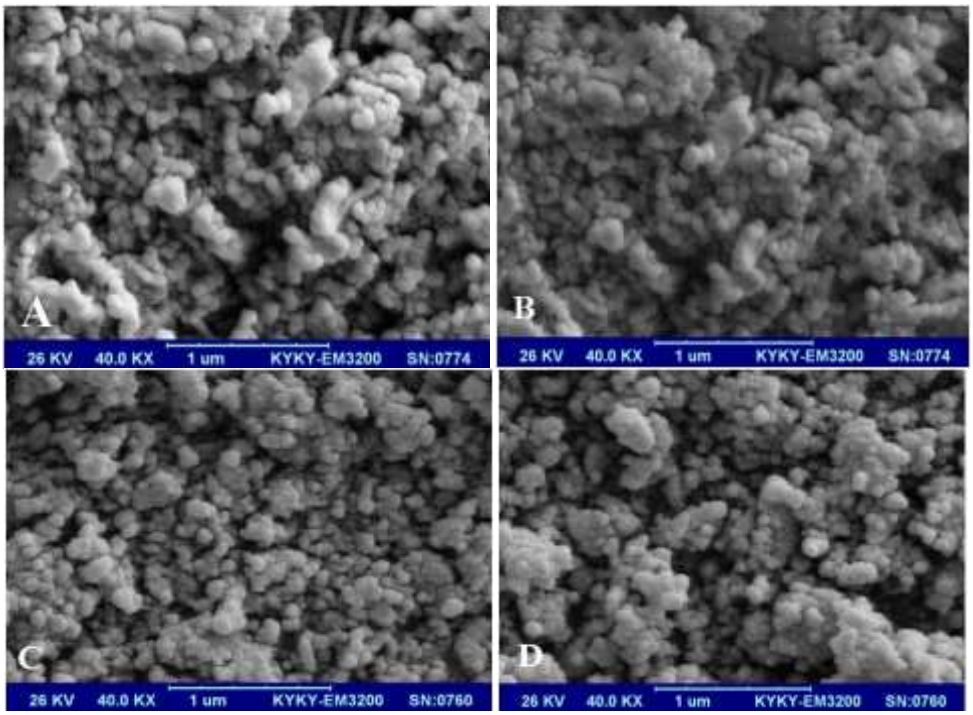
نتایج حاصل از آزمون MTT در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عدم سمیت قابل توجه کاندید واکسن مورد نظر را نشان داد. مقایسه جذب نوری سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب PA63 و جذب نوری سلول‌های گروه PA63-PCL-PEG-NPs و PA63-PLA-PEG-NPs نشان داد که میزان مرگ و میر سلول‌های مورد آزمون در مقابل آنتی ژن کپسوله شده در نانوذرات کمتر از آنتی‌ژن آزاد بوده است. همچنین نانوذرات شاهد PLA-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs بیشترین میزان زنده مانی را نشان دادند (نمودار ۱ و ۲). نمودار ۳ و ۴، درصد مرگ و میر سلول‌های مورد آزمون در مقابل گروه‌های پروتئین آزاد، کپسوله و کنترل را نشان می‌دهد.



شکل ۱: آنالیز SDS-PAGE ۱۲ درصد رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو. ردیف۱: نشانگر مولکولی پروتئین M.W=kDa.ردیف۲: شاهد بیان پروتئین. ردیف۳: پروتئین نوترکیب PA63 بیان گرفته شده در *اکولای*. ردیف۴: پروتئین نوترکیب PA63 خالص سازی شده توسط ستون نیکل.

www.SID.ir

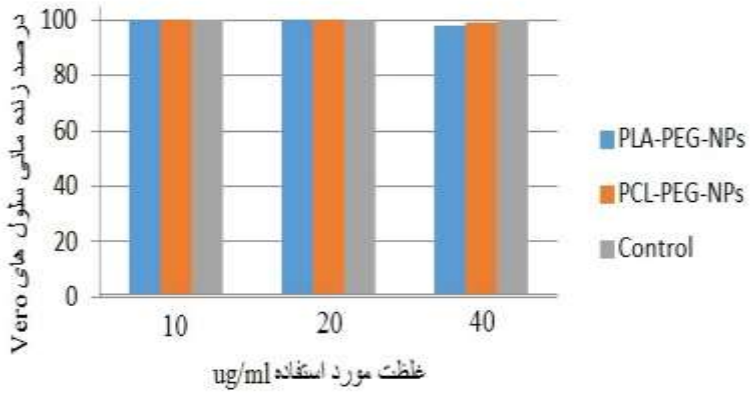
Archive of SID



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM نانوذرات تهیه شده به روش تبخیر حلال.

A: PA63-PCL-PEG-NPs B: PA63-PLA-PEG-NPs

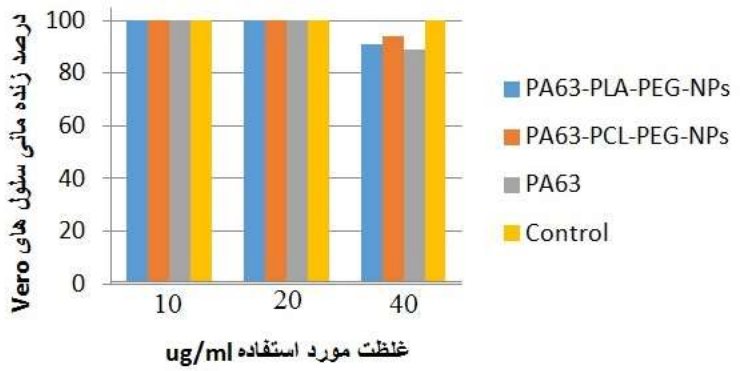
C: PCL-PEG-NPs D: PLA-PEG-NPs.



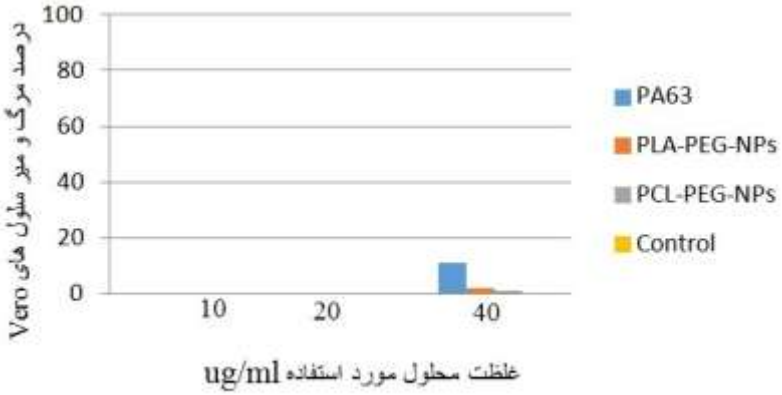
نمودار ۱: درصد زنده مانی سلول‌های رده سلولی Vero با غلظت های مختلف نانوذرات شاهد PLA-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs.

www.SID.ir

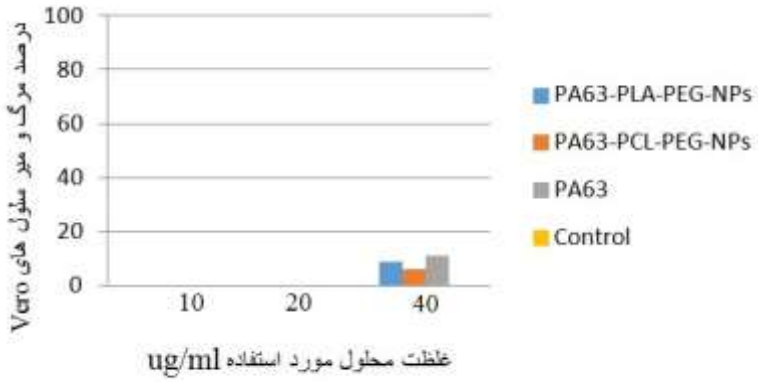
Archive of SID



نمودار ۲: درصد زنده مانی سلول‌های رده سلولی Vero با غلظت های مختلف پروتئین نوترکیب PA63 و نانوذرات PA63-PCL-PEG-NPs ,PA63-PLA-PEG-NPs



نمودار ۳: درصد مرگ و میر سلول‌های رده سلولی Vero با غلظت های مختلف نانوذرات شاهد PLA-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs.



نمودار ۴: درصد مرگ و میر سلول‌های رده سلولی Vero با غلظت های مختلف محلول پروتئین نوترکیب PA63 و نانوذرات PA63-PCL-PEG-NPs ,PA63-PLA-PEG-NPs

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

PA یک جزء بسیار مهم از توکسین آنتراکس است. این پروتئین در ایمنی علیه آنتراکس نقش اصلی را هم بعد از ایمن‌سازی و هم در جریان عفونت بازی می‌کند و دارای خاصیت مهارکنندگی برای فاکتورهای بیماری‌زایLF و EF می‌باشد (۲۲, ۲۳). با توجه به نقش آن، PA به‌طور گسترده‌ای به عنوان یکی از کاندیدهای واکسن مورد مطالعه قرارگرفته است (۵, ۶). معمولا واکسن‌های پروتئینی نیاز به ادجوانت دارند تا پاسخ ایمنی را افزایش‌دهند. با وجود این که آلومینیوم هیدروکسید و نمک های فسفاته ادجوانت‌های مورد توافق در واکسن‌های آنتراکس بر پایه سم می‌باشند نشان داده شده است که هیدروکسید آلومینیوم در نگهداری طولانی مدت اثرات نامطلوبی بر روی PA می‌گذارد. همچنین این ادجوانت‌ها اثرات جانبی و گاهی اوقات سمی نیز دارند (۷, ۸). واکسن‌های مورد پذیرش باید زیست‌سازگار باشند. با توجه به دلایل اشاره شده، در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی استفاده از نانوذرات به‌عنوان حامل واکسن صورت گرفته است (۲۴). پلی‌لاکتیک اسید یکی از انواع پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر می‌باشد که به طور وسیعی در تحویل واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۵). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که از طریق کوپلیمریزاسیون PLA با پلیمرهای هیدروفیل مانند پلی‌اتیلن‌گلیکول می‌توان مشکلات عنوان‌شده را برطرف کرد (۲۶). پلی‌اتیلن گلیکول آبدوستی، انعطاف‌پذیری و زیست‌سازگاری خوبی دارد و مقاوم به شناسایی توسط عوامل ایمنی بدن می‌باشد. این خصوصیات باعث کاهش جذب پروتئین‌های پلاسما به دلیل تشکیل یک لایه آب‌دوست و دارای بار سطحی کم از پلی‌اتیلن‌گلیکول روی سطح کوپلیمر می‌باشد (۲۷).

هدف یک سیستم تحویل دارویی هدفمند، افزایش تحویل دارو در منطقه مورد نظر و کاهش اثر آن بر بافت های غیر هدف است به گونه‌ای که یک حالت پایدار در خون ایجاد کند و یا در بافت هدف، سطحی از درمان را که موثرتر و غیر سمی‌تر باشد و مدت زمان طولانی‌تری را شامل شود را ایجاد کند که در این را ستا طراحی یک دوز مناسب دارویی عنصر مهم در رسیدن به این هدف می‌باشد (۲۸).

بررسی سمیت دو پلیمر تجزیه پذیر پلی لاکتیک اسید (PLDLA) و پلی لاکتیک-کو-گلیکولید (Poly lactide-co-glycolide) توسط آزمون MTT بر روی سلول‌های فیبروبلاست موشی L929 (L929 mouse fibroblasts) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج MTT هر دوماده استفاده شده هیچ علائمی از سمیت نشان ندادند و بیان شد که PLDLA و PLGA دارای سازگاری زیستی رضایت بخشی هستند (۲۹).

نتایج آزمون MTT پژوهش حاضر نشان داد که هیچ کدام از فرمولا سیون‌های محلول پروتئین غیرکپسوله و کپسوله سمیت سلولی قابل توجهی ندارند همچنین نتایج به دست آمده و نتایج پژوهش‌های انجام شده در گذشته مطابقت دارند. با توجه به این که پروتئین مورد نظر این پژوهش به روش نوترکیب تولید شده است و نیز عملکرد پروتئین نوترکیب PA63 در تولید تیتر آنتی‌بادی (۱۶)، می‌توان این پروتئین را به عنوان یک کاندید واکسن مناسب جهت پژوهش‌های آینده پیشنهاد داد.

مقایسه نتایج آزمون MTT درصد زنده ماندن و نرخ مرگ و میر سلول‌های رده سلولی Vero با غلظت های مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول پروتئین نوترکیب PA63 و نانوذرات کاندید نانو واکسن PA63-PCL-PEG-NPs و PA63-PLA-PEG-NPs نرخ مرگ و میر کمتر کاندید نانو واکسن مورد نظر ما را نشان داد. با توجه به نتایج بالا می‌توان بیان داشت که فرمولاسیون نانو واکسن مورد پژوهش را می توان به عنوان حاملی مناسب جهت تولید واکسن، ایمن و

www.SID.ir

Archive of SID

بدون اثرات سمی و جانبی ادجوانت‌های معمول پیشنهاد نمود.

نتایج آزمون MTT نانوذرات شاهد PLA-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs نیز کمترین میزان مرگ و میر را نشان دادند. در پژوهش انجام شده مربوط به تاثیر نانوذرات شاهد مورد استفاده بر میزان تولید تیتر آنتی بادی پس از خون‌گیری و تهیه سرم از خون به دست آمده از حیوانات آزمایشگاهی و انجام آزمون الایزا نشان داده شد که نانوذرات مورد نظر که به عنوان شاهد استفاده شد کمترین میزان تحریک سیستم ایمنی را داشت (۱۸) این نتایج نشان دهنده زیست‌سازگاری بالای پلیمر مورد استفاده در تهیه نانوذرات می‌باشد. این ویژگی به علت هیدرولیز ساده باند استری این پلیمر و تولید هیدروکسیل-کربوکسیلیک اسید می‌باشد که از طریق سیکل اسید سیتریک به آب و دی‌اکسی‌کربن متابولیزه می شود (۳۰). در انتها برای بررسی سطح معنا داری اختلاف میانگین نتایج به دست آمده با سه تکرار از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و طرح مربع کاملا تصادفی استفاده شد که نتایج در سطح ۵ درصد معنادار می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعات قبلی، استفاده از واکسن برای پیشگیری از سیاه زخم بهترین روش مبارزه با این بیماری می‌باشد. هدف این پژوهش بررسی سمیت فرمولاسیون نانو و بدون ادجوانت واکسن نوترکیب سیاه زخم می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده حاصل از غلظت های مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده، کاندید نانو واکسن مورد نظر سمیت قابل توجهی را نشان نداد و نسبت به پروتئین آزاد PA63 از میزان مرگ و میر کمتری در سلول های مورد آزمون برخوردار بود. همچنین نانوذرات شاهد PLA-PEG-NPs و PCL-PEG-NPs بیشترین میزان زنده مانی را نشان دادند، که نشان دهنده زیست سازگاری نانوذرات مورد استفاده می باشد. به طور کلی نتایج این پژوهش عدم سمیت فرمولاسیون کاندید نانو واکسن به دست آمده را نشان داد. در نتیجه می‌توان از فرمولاسیون نانو واکسن تهیه شده برای کاهش اثر سمیت سلولی کاندید واکسن مورد نظر در محیط زنده استفاده کرد و در نهایت نانو واکسن حاصل شده را به عنوان یک واکسن ایمن تر و زیست سازگار مهندسی شده نوترکیب جهت بررسی‌های بیشتر پیشنهاد نمود.

قدردانی

از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

1-Ahmadi A H HH, Ebrahim Minaei M. Cloning, fusion and expression of domain a-1 protective antigen (PA20) of Bacillus anthracis and N-Terminal ipaD gene of Shigella in E. coli. . Qom Univ Med Sci. 2015;9(4): 20-9
2-Schmidt TR, Scott EJ, Dyer DW. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the Bacillus cereus species-group. J BMC genomics. 2011;12(1):430.
3-Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, et al. Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02. J Journal of Applied Microbiology. 1999;87(2):261-2.
4-Gupta P, Waheed S, Bhatnagar R. Expression and purification of the recombinant protective antigen of Bacillus anthracis. Protein expression purification. 1999;16(3):369-76.
5-Singh Y, Ivins BE, Leppla SH. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of Bacillus anthracis. J Infection immunity. 1998;66(7):3447-8.
6-D. GJ. Vaccines: countering antrax: vaccines and immunoglobulins. . Clin Infect Dis 2008;46: 129–36.

www.SID.ir

Archive of SID

7-Wagner L, Verma A, Meade BD, Reiter K, Narum DL, Brady RA, et al. Structural and immunological analysis of anthrax recombinant protective antigen adsorbed to aluminum hydroxide adjuvant. J Clinical Vaccine Immunology. 2012:CVI. 00174-12.
8-Manish M, Rahi A, Kaur M, Bhatnagar R, Singh S. A single-dose PLGA encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulation protects mice against Bacillus anthracis spore challenge. J PloS one. 2013;8(4):e61885.
9-Lassalle V, Ferreira ML. PLA nano-and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. Macromolecular bioscience. 2007;7(6):767-83.
10-Venkatraman SS, Jie P, Min F, Freddy BYC, Leong-Huat G. Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. J International journal of pharmaceutics. 2005;298(1):219-32.
11-Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Advanced drug delivery reviews. 2012;64:206-12.
12-Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. Polymers in nanomedicine: Springer; 2011. p. 31-64.
13-Anderson JMS, M S, . Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Advanced drug delivery reviews. 1997;28(1):5-24.
14-Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. J Polymers. 2011;3(3):1377-97.
15-Haji Noor Mohammadi A KM, Kamyab A R, Zargan J. Effect of 1% Oxygen Concentration on Conexin 43 Gene Expression in Mouse Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells C57 (BL / 6). Journal of the Medical Council of the Islamic Republic of Iran. 2016;33:205-11.
16-E'temad Aubi S M HH. Cloning and Recombinant Expression modified protective antigen from Bacillus anthracis In E. coil. . Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016; 23.
17-Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. J Chemical reviews. 1999;99(11):3181-98.
18-E'temad aubi S M HH, Baqeri H, Nofeli B. Evaluation of PLA-PEG nanoparticles as vaccine delivery system for modified protective antigen of Bacillus anthracis. . Unpublished data 2018.
19-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):55-63.
20-Shokrzadeh M EP, Omidi M, Shadburestan A, Zal Zar Z. Investigation of the toxicity of Docetaxel nanoparticles using HepG2 Cancer Cells. J Mazandaran University of Medical Sciences 2012; 22:2-10.
21-Hayon T DA, Spielberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemo sensitivity in leukemia. Leuk Lymphoma 2003;44(11):1957-62.
22-Honari H MH, Saadati M, Minaie ME. Production of polycolonal antibody against domain 2-4 of protective antigen of Bacillus anthracis in laboratory animal. J ShahrekordUni Med Sci 2014;15(6):35-43.
23-P T. anthrax vaccines: past, present and future. Vaccine 1991;9: 533-9.
24-Nazarian S GS, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. . A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. . Microbiol Res 2014;169((2-3)):205-12.
25-Arvind K. Jain ea. Synthesis, characterization and evaluation of novel triblock copolymer based nanoparticles for vaccine delivery against hepatitis B. Journal of Controlled Release 2009:161–9.
26-Dong Y FSS. Nanoparticles of poly (D, L-lactide)/methoxy poly (ethylene glycol)-poly (D, L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006 78(1):12-9.
27-Stolnik S DSE, Garnett M C, Davies M C, Coombes A G, Taylor D C, Illum L. Surface modification of poly (lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly (lactide)-poly (ethylene glycol) copolymers. Pharmaceutical research. 1994;11(12):1800-8.
28-E. A. The study of the effect of cytotoxicity of artemisinin nanosilver on breast cancer cells. Journal of Breast Disease 2013;5 (4): 7-12.
29-Ignatius AA CL. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (L, DL-lactide) and poly (L-lactide-co-glycolide). . Biomaterials. 1996;17(8):831-9.
30-Xiao R Z ZZW, Zhou L, Wang J J, Li F Z, Wang A. M. Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles. International journal of nanomedicine. 2010;5:1057.

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of Cytotoxicity of *Bacillus anthracis* Recombinant Protective Antigen in Free and Encapsulated Forms by Double-block PLA-PEG and PCL-PEG Copolymers on Vero Cell

Seyed Masih Etemad Aubi[1], Hosein Honari[2*], Ashkan Hajinourmohamadi[3], Hamed Bagheri[4], Mojtaba Noofeli[5]

1-PhD Student of Nanobiotechnology.
2-Associate Professor of Molecular Genetic.
3-MSc of Molecular Genetics
4-Assistant professor of Polymer Engineering.
5-Assistant Professor of Medical Bacteriology.

1,2-Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran.
3-Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran.
4-School of of Technology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
5-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj Iran.

**Corresponding author:*
Hosein Honari; Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran.
Tel:+989123848187
Email: honari.hosein@gmail.com

Abstract

Background and Objectives: *Bacillus anthracis* is the cause of the fatal anthrax. Use of vaccine is one of the effective ways to combat anthrax. Vaccines should be biocompatible and non-toxic. The purpose of this study was to investigate the cytotoxicity effect of free and encapsulated forms of *Bacillus anthraise* recombinant protective antigen by double-block PLA-PEG and PCL-PEG copolymers on the epithelial cell line of the African green monkey (Vero).

Subjects and Methods: In this experimental study, the *Bacillus anthraise* recombinant protective antigen (PA63) was expressed in *E. coli* and purified by nickel column affinity chromatography. Subsequently PA63 was encapsulated by PLA-PEG and PCL-PEG double-block copolymers using water-in-oil-in-water solvent evaporation method. Finally, PA63 and nanoparticles cytotoxicity test were performed using the standard MTT test on the Vero cell line.

Results: Results of the MTT test revealed the non-toxicity of the candidate vaccine. Also, the mortality rate of the cells tested against the encapsulated antigen in the nanoparticles was lower than the free antigen.

Conclusion: The nano-vaccine formulation can be used to reduce the toxicity of a vaccine produced and eventually acquire an effective and biocompatible recombinant vaccine.

Keywords: *Bacillus anthracis*, Protective antigen, Cell cytotoxicity, PLA-PEG, PCL-PEG.

►*Please cite this paper as:*
Etemad Aubi SM, Honari H, Hajinourmohamadi A, Bagheri H, Noofeli M. Assessment of Cytotoxicity of Bacillus anthracis Recombinant Protective Antigen in Free and Encapsulated Forms by Double-block PLA-PEG and PCL-PEG Copolymers on Vero Cell. Jundishapur Sci Med J 2018; 17(4):377-386.

Received: June 30, 2018 **Revised: Nov 10, 2018** **Accepted: Nov 11, 2018**

www.SID.ir