Original Article

Preparation of niosomal nanostructure containing Brucella trivalent immunogen as a vaccine candidate

Sharif F[1], Nazari R[1], Fasihi-Ramandi M[2*], Taheri RA[3], Zargar M[1]

1- Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. Iran.
2- Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
3- Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2022/12/19 | Accepted: 2023/01/15

Abstract:

Background: Brucellosis is one of the most common diseases between humans and animals. Therefore, the need for prevention and production of an efficient vaccine is necessary. The aim of the present study is to prepare a niosomal nanostructure containing trivalent immunogen (TF, Bp26 and Omp31) of Brucella as a nanovaccine candidate.
Materials and Methods: In this study, after designing the immunogen structure by bioinformatics databases and software, in order to evaluate the immunogenicity of the designed recombinant protein, clone and gene expression were carried out in *E.coli* BL21. The protein extracted from the culture of said cells was purified by Ni-NTA column. Thin layer coating method was used to prepare niosomes carrying trivalent immunogen and were evaluated using DLS and Zetasizer characterization tests. Then, the amount of trivalent immunogen loading and release was calculated.
Results: The results of the characterization confirmed the successful fabrication of niosomal nanosystem containing trivalent immunogen. The results showed that the produced niosomes are in a suitable range of size (100 nm). Trivalent immunogen with high efficiency (81.96%) is encapsulated in the system. The release of trivalent immunogen from Niosomal nanosystem was reported to be 97% after 96 hours. In addition, the trivalent immunogen release pattern of the coated system was more controlled and slower. This confirms the positive effect of the niosome nanosystem.
Conclusion: The use of nisome as a nanovaccine agent has an effective role in controlling antigen release and can be considered as a vaccine candidate and increase the protective immune response against Brucella.

Keywords: Brucella, vaccine, Nanostructure, TF, Bp26, Omp31

***Corresponding Author**
Email: fasihi.m@gmail.com
Tel: 0098 902 902 9868
Fax: 0098 218 755 4555

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2023; Vol. 27, No 1, Pages 21-30

Please cite this article as: Sharif F, Nazari R, Fasihi-Ramandi M, Taheri RA, Zargar M. Preparation of niosomal nanostructure containing Brucella trivalent immunogen as a vaccine candidate. ***Feyz*** 2023; 27(1): 21-30.

تهیه نانوساختار نیوزومی حاوی ایمنوژن سه‌ظرفیتی بروسلا به‌عنوان کاندیدای واکسن

فهیمه شریف [۱]، راضیه نظری [۱]، مهدی فصیحی رامندی [۲*]، رمضانعلی طاهری [۳]، محسن زرگر [۱]

خلاصه:

سابقه و هدف: بروسلوزیس جزو شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. از این‌رو، پیشگیری و تولید واکسن کارآمد لازم و ضروری است. هدف مطالعه حاضر تهیه نانوساختار نیوزومی حاوی ایمنوژن سه‌ظرفیتی (TF، Bp26 و Omp31) بروسلا به‌عنوان کاندیدای نانوواکسن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از طراحی سازه ایمنوژن توسط پایگاه‌ها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، به‌منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب طراحی‌شده، کلون و بیان ژن در *Escherichia coli BL21* انجام پذیرفت. پروتئین استخراج‌شده از کشت سلول‌های مذکور توسط ستون Ni-NTA مورد تخلیص قرار گرفت. برای تهیه نیوزوم‌های حامل ایمنوژن سه‌ظرفیتی، روش آپوشانی لایه نازک به‌کار گرفته شد و با استفاده از آزمون‌های مشخصه‌یابی DLS و Zetasizer مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میزان لود و رهایش ایمنوژن سه‌ظرفیتی محاسبه شد.

نتایج: نتایج حاصل از مشخصه‌یابی، ساخت موفق نانوسامانه نیوزومی حاوی ایمنوژن سه‌ظرفیتی را تأیید کرد. نتایج نشان داد که نیوزوم‌های تولیدشده در محدوده مناسبی از اندازه (۱۰۰ نانومتر) قرار دارند. ایمنوژن سه‌ظرفیتی با راندمان بالایی (۸۱/۹۶ درصد) در سامانه، کپسوله شده است. رهایش ایمنوژن سه‌ظرفیتی از نانوسامانه نیوزومی بعد از ۹۶ ساعت ۹۷ درصد گزارش شد؛ علاوه‌براین الگوی رهایش ایمنوژن سه‌ظرفیتی سامانه پوشش‌دهی‌شده، کنترل‌شده‌تر و آهسته‌تر بود که این موضوع تأثیر مثبت نانوسامانه نیوزومی را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری: استفاده از نیوزوم به‌عنوان عامل نانوواکسن نقش مؤثری در کنترل رهایش آنتی‌ژن دارد و می‌تواند به‌عنوان کاندیدای واکسن و افزایش پاسخ ایمنی حفاظتی علیه بروسلا مطرح باشد.

واژگان کلیدی: بروسلا، واکسن، نانوساختار، نیوزوم، TF، Bp26، Omp31

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۲، صفحات ۳۰-۲۱

مقدمه

بروسلا باکتری داخل سلولی گرم منفی است که می‌تواند بسیاری از گونه‌های حیوانات و انسان را آلوده کند. علائم این بیماری؛ سقط جنین، کاهش باروری در حیوانات یا عفونت‌های مزمن با علائمی مانند تب، آرتریت و استئومیلیت در انسان می‌باشد [۱]. پیشگیری از بروسلوزیز در انسان به ریشه‌کنی یا کنترل در حیوانات وابسته است. اوّلین واکسن مؤثر بروسلا سویه زنده ضعیف‌شده بروسلا آبورتوس S19 بود [۲،۱]. گرچه این واکسن باعث حفاظت دام دربرابر بروسلا آبورتوس می‌گردد؛ ولی عوارض ناشی از آن باعث شده است تا استفاده آن در دام‌ها با احتیاط صورت گیرد و در عین حال تجویز آن در انسان ممنوع می‌باشد [۴،۳].

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

تلفن: ۰۹۰۲۹۰۲۹۸۶۸ **دورنویس:** ۰۲۱۸۷۵۵۴۵۵۵

پست الکترونیک: fasihi.m@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۱/۱۰/۲۵

بنابراین تحقیق درمورد ساخت واکسن‌های سالم‌تر و مؤثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به‌نظر می‌رسد. با ابداع روش‌های مهندسی ژنتیک و استفاده از واکسن‌های نوترکیب، دیگر نیازی به استفاده از کلّ پیکره پاتوژن به‌عنوان واکسن وجود ندارد؛ بلکه به‌منظور کاهش خطرات واکسن‌های عمومی از ژن‌های به‌خصوص و بیان آن‌ها برای تولید این واکسن‌ها استفاده می‌شود. در طراحی کاندیداهای واکسن، امروزه به پروتئین‌های کایمر توجه خاصّی می‌شود [۶،۵،۱]. پروتئین‌های کایمر دربردارنده زیرواحدهای پروتئینی لینکرها و توالی‌های با خاصیت ادجوانتی، نه‌تنها می‌توانند سبب افزایش خاصیت ایمونوژنیسیتی پروتئین‌های نوترکیب شوند؛ بلکه باعث القا و بروز پاسخ‌های وسیع ایمنی سلولی و هومورال می‌شوند. چنان‌چه پروتئین کایمر واجد چند آنتی‌ژن متفاوت باشد، ترکیب توأم برخی از این ترکیبات باعث افزایش چشمگیر ایمنی‌زایی در مقایسه با این آنتی‌ژن‌ها به‌تنهایی می‌گردد [۷]. براساس پژوهش‌های چاپ‌شده TF، Bp26 وOmp31، دارای فعالیت آنتی‌ژنی مناسبی هستند که باعث شده است کاندیداهای خوبی برای تهیه پروتئین کایمر در واکسن باشند. Omp31 واجد یک لوپ هیدروفوب بسیار حفاظت‌شده در میان گونه‌های بروسلا می‌باشد (اسیدآمینه ۴۸ تا ۷۴) که نقش بسزایی در تحریک پاسخ ایمنی

سلولی Th1 دارد. گروه‌های مختلف پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا به‌واسطه وزن مولکولی و حضور در پیش‌سازهای غشای خارجی تقسیم‌بندی می‌شوند [۸،۷]. پروتئین پریپلاسمی بسیار حفاظت‌شده Bp26 نیز نقش حفاظتی ویژه‌ای علیه عفونت‌های بروسلایی دارد و واجد توانایی تحریک هر دو ایمنی سلولی و هومورال و همچنین فعالیت ادجوانتی می‌باشد. Trigger factor/Tig (TF)-immunophilin، یک پروتئین سیتوپلاسمیک با فعالیت ایموژنسیتی است که نقش مهمّی در پاتوژنز بروسلا دارد [۹،۱۰]. از طرفی دنیای علمی حاضر با پیشرفت بیوتکنولوژی، شاهد ظهور سیستم تحویل واکسن‌های نوینی، به نام نانوواکسن‌ها می‌باشد که در مقایسه با استراتژی‌های واکسیناسیون معمول، موجب ایمنی مطلوبی در هومورال، سلولی و مخاطی می‌شوند. بسیاری از نانوواکسن‌های مجاز برای استفاده انسانی، حامل‌هایی مؤثر برای آنتی‌ژن‌ها محسوب می‌شوند. در روش‌های دارورسانی نوین تاکنون نانوحامل‌ها با جنس، خصوصیات و کاربردهای متفاوت، معرفی و استفاده شده‌اند [۱۱] که در این میان نانونیوزوم‌ها مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته‌اند. نیوزوم‌ها، وزیکول‌های تشکیل‌شده از سورفکتانت‌های غیریونی هیدراته به‌اضافه کلسترول و یا مشتقات آن هستند. غشای حبابچه‌ای نیوزوم‌ها متشکل از ترکیبات روغنی یا الکل است. این وزیکول‌ها می‌توانند به‌عنوان سیستم‌های رهایش آنتی‌ژن‌ها عمل کنند. نیوزوم‌ها زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیرسمّی هستند و توانایی محصورکردن مقدار زیادی از مواد در حجم نسبتاً کمتری از وزیکول‌های دیگر را دارند [۱۲]. استفاده از نیوزوم‌ها باعث بهبود پایداری و به‌تبع آن، افزایش اثرات واکسن و کاهش عوارض جانبی واکسن می‌گردد. بررسی‌ها نشان داده است که نانونیوزوم‌ها از طریق افزایش جذب آنتی‌ژن توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs) باعث بروز پاسخ سیستم ایمنی قوی‌تر به آنتی‌ژن‌های پروتئینی می‌شوند. عوامل مختلفی از قبیل نوع فسفولیپیدهای مصرف‌شده، نوع و میزان بار سطحی نانونیوزوم، اندازه و شکل نیوزوم، میزان کلسترول موجود در فرمولاسیون نانونیوزوم و نحوه استقرار آنتی‌ژن در نانونیوزوم می‌توانند نوع و شدت پاسخ ایمنی را تحت‌تأثیر قرار دهد [۱۳،۱۲]. بنابراین باتوجه به این نکته که یک واکسن مؤثر در برابر بروسلا می‌بایست به‌صورت انتخابی باعث القای پاسخ ایمنی سلولی و هومورال شود؛ می‌توان با انتخاب یک فرمولاسیون نانونیوزومی مناسب به‌عنوان ایمونوادجوانت به‌همراه آنتی‌ژن‌های سه‌ظرفیتی کاندیدا باعث تحریک پاسخ ایمنی موردنظر گردید. درنتیجه هدف مطالعه حاضر، استفاده از نانوذره نیوزوم در ساخت و معرفی نامزدی برای واکسن علیه سه آنتی‌ژن مهم و بیماری‌زای باکتری بروسلا جهت ایجاد حفاظت و مصونیت در برابر این عامل بیماری‌زا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی از خردادماه ۱۴۰۰ تا مهرماه ۱۴۰۱ در مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله واحد تهران با کد مصوبه اخلاق IR.IAU.QOM.REC.1398.026 انجام شد.

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین کایمر

براساس مطالعات تجربی و آزمایشگاهی، جهت بیان ژنی مناسب، وکتور بیانی pET28a (+) برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب شد. طبق سفارش، ژن کایمر سنتزشده در وکتور بیانی pET28a (+) برروی سویه مستعدشده بیانی *E.coli* *BL21*(DE3) تحویل داده شد (BioMatik, Canada). این سویه در انجام مطالعات بعدی و به‌منظور استخراج و تخلیص پروتئین‌های تولیدشده، به‌کار رفت. پروتئین نوترکیب تولیدشده به‌واسطه داشتن دنباله پلی‌هیستیدین (6×His-tag) قابلیت اتصال به رزین‌های آگارز حاوی نیکل (Ni-NTA) را دارد و از این خاصیت در تخلیص آن استفاده می‌شود. تغلیظ پروتئین‌های دیالیزشده با جذب مایع درون کیسه‌ها توسط شکر خشک انجام شد. کیسه دیالیز حاوی پروتئین‌های محلول، در شکر خشک غلتانده شد و این کار تا کاهش حجم محلول به‌میزان ۲۵ درصد حجم اوّلیه ادامه یافت. سپس پروتئین‌های نوترکیب تغلیظ‌شده از کیسه دیالیز خارج شدند و با روش اسپکتروفوتومتری در ۲۸۰ نانومتر و SDS-PAGE مورد ارزیابی کمّی و کیفی قرار گرفتند [۹].

تأیید بیان پروتئین‌ها با روش وسترن بلاتینگ

در این روش از آنتی‌بادی Anti His tag و کونژوگه با HRP استفاده شد. پس از تأیید، پروتئین‌های خالص‌شده به‌عنوان آنتی‌ژن به‌کار رفتند [۹].

ساخت نیوزوم‌های حاوی پروتئین نوترکیب

نیوزوم‌های حاوی پروتئین نوترکیب به‌روش آبپوشانی لایه نازک و با نسبت‌های مولی مشخص تهیه گردید که خلاصه آن بدین‌شرح است: در مرحله نخست، فاز لیپید (توئین ۲۰، کلسترول و SPAN-60) در حلّال کلروفرم و در دمای ۴۵ درجه برروی روتاری حل شد و در شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. در مرحله دوم، عمل هیدراته‌کردن با افزودن مقدار مشخصی بافر PBS همراه با پروتئین نوترکیب، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۵۵ درجه انجام شد. در پایان، با استفاده از سونیکیت پروبی با توان‌های ۴۰ و ۶۰ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه کاهش سایز داده شد [۱۴].

تعیین درصد بارگذاری آنتی‌ژن در نیوزوم

برای این منظور، ابتدا نیوزوم‌های حاوی دارو بعد از کاهش سایز، وارد کیسه دیالیز گردید و به‌مدت یک ساعت درون بشری حاوی بافر PBS و در دمای ۴ درجه قرار داده شد تا آنتی‌ژن آزاد و انکپسوله‌شده حذف گردد. سپس نیوزوم‌های ساخته‌شده با نسبت‌های حجمی ۱:۹ با ایزوپروپیل مخلوط شد تا دیواره لیپیدی اطراف آنتی‌ژن شکسته شود و دارو آزاد گردد. در مرحله بعد، میزان جذب آنتی‌ژن انکپسوله‌شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم آنتی‌ژن (480 nm) محاسبه شد. در پایان با به‌کارگیری نمودار استاندارد آنتی‌ژن در ایزوپروپیل و فرمول EE= (A-B)/A ×۱۰۰ درصد درونگیری آنتی‌ژن در نیوزوم محاسبه گردید. A مقدار پروتئین مورد استفاده اوّلیه و B مقدار پروتئین آزاد می‌باشد که در نانوذرات وارد نشده است.

مطالعه رهش پروتئین در شرایط برون‌تن

برای بررسی الگوی رهایش پروتئین نوترکیب، ۳۰ میلی‌گرم از نانوذرات حاوی پروتئین در حجم یک میلی‌لیتر محلول PBS درون میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و با هم‌زدن پراکنده شد. میکروتیوب درون بن‌ماری شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و در فواصل زمانی منظم نمونه‌برداری از محلول انجام شد. برای برداشت نمونه، محلول حاوی نانوذرات به‌مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و ۷۰۰ میکروگرم از محلول رویی برداشته و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به‌میزان محلول جمع‌آوری‌شده، بافر PBS به میکروتیوب اضافه گردید و پس از ورتکس‌کردن در بن‌ماری شیکردار قرار داده شد. نمونه‌برداری در ابتدا هر یک و دو ساعت و در ادامه هر ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از گذشت ۹۶ روز با استفاده از کیت سنجش، غلظت پروتئین تعیین گردید. منحنی درصد پروتئین رهاشده از نانوذرات در مدت‌زمان‌های تعیین‌شده ترسیم شد [۱۵].

بررسی ویژگی‌های نانوذرات

جهت اطمینان بیشتر از صحت تشکیل فرمولاسیون نیوزومی از دستگاه DLS و Zetasizer برای اندازه‌گیری و شارژ مولکول نیوزومی استفاده گردید.

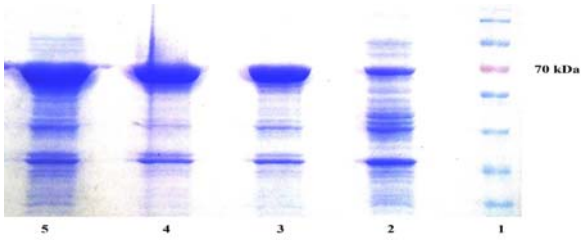
آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

به‌منظور تعیین اندازه نانوذرات، رسوب به‌دست‌آمده از برهم‌کنش، سه مرتبه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از رسوب حاصل، توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل XL 30kw عکس‌برداری گردید.

نتایج

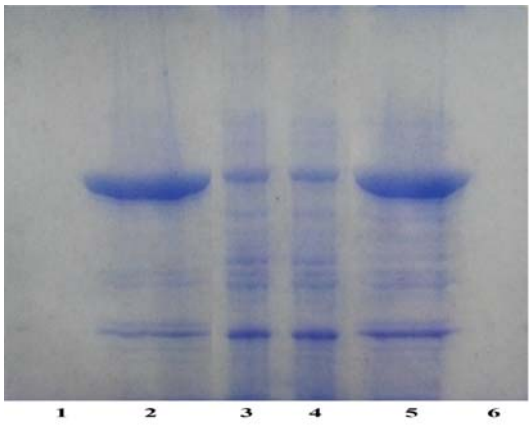
بیان، تخلیص و وسترن بلاتینگ پروتئین کایمر نوترکیب

پس از انتقال وکتورهای نوترکیب به باکتری E.coli BL21 (DE3)، توسط شرکت سازنده، به‌منظور القای بیان، از IPTG استفاده شد و سپس برای بررسی بیان پروتئین، روش SDS-PAGE به‌کار رفت (شکل شماره ۱). پس از تأیید بیان، محلول‌بودن یا نامحلول‌بودن پروتئین‌های نوترکیب بررسی شد و نتایج نشان داد که پروتئین‌های بیانی در وضعیت محلول بیان می‌شوند (شکل شماره ۲). 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 وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلودالتون در روی ژل دیده شد که با وزن پیش‌بینی‌شده 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 میلی‌لیتر از IPTG) (شکل شماره ۱). نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات)، بیان پروتئین نوترکیب را با وزن تقریبی ۷۰ کیلودالتون و نیز تشابهات آنتی‌ژنی آن را با فرم طبیعی این پروتئین اثبات کرد. نتایج وسترن بلاتینگ پروتئین خالص نوترکیب، نشان‌دهنده وجود یک باند منفرد مرتبط با پروتئین نوترکیب rTF/Bp26/Omp31 در مقایسه با نشانگر (مارکر) وزن مولکولی 70kDa بود. در این بررسی از آنتی‌بادی ضد His-Tag و ترکیبی، از چندین سرم فرد مبتلا به بروسلوزیس استفاده گردید (شکل شماره ۳).



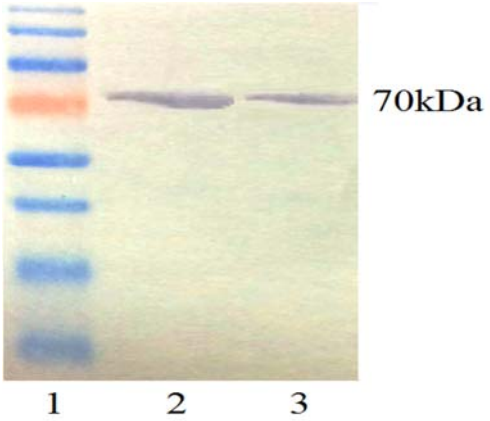
شکل شماره ۱- نتیجه SDS-PAGE

۱. مارکر پروتئینی (Fermentas) SM0671، ۲. سلول‌های E. coli بدون تحریک (کنترل منفی)، ۳. باکتری القاشده با IPTG پس از ۲ ساعت، ۴. باکتری القاشده با IPTG پس از ۳ ساعت و ۵. سلول‌های E. coli تحریک‌شده با IPTG پس از ۴ ساعت در غلظت ۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر



شکل شماره ۲- نتیجه بررسی حلّالیت پروتئین

بیان پروتئین و القای باکتری توسط IPTG در دو دمای ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد: ۱. رسوب حاصل از لیزات باکتریایی القاشده با IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲. محلول رویی حاصل از لیزات باکتریایی القاشده با IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۳. باکتری القانشده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۴. باکتری القانشده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۵. محلول رویی حاصل از لیزات باکتریایی القاشده با IPTG در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۶. رسوب حاصل از لیزات باکتریایی القاشده با IPTG در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد؛ نتایج حاصل از لاین ۲ و ۵ نشان‌دهنده محلولیت پروتئین در هر دو دمای مورد استفاده و پس از القا با IPTG بوده است.

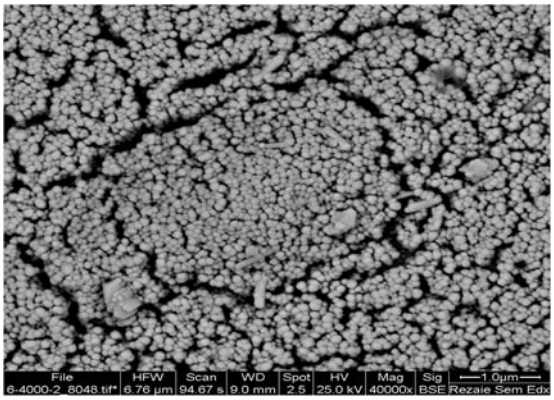


شکل شماره ۳- نتیجه وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی ضدهیستیدین و مجموعه‌ای از سرم افراد بیمار مبتلا به بروسلوزیس

۱. مارکر وزن مولکولی پروتئینی (SM0671 (Fermentas، ۲. واکنش آنتی‌بادی ضدهیستیدین با پروتئین تخلیص‌شده و ۳. وسترن بلاتینگ با سرم افراد مبتلا به بروسلوزیس

بررسی ویژگی‌های نانوذرات و خصوصیات ظاهری آن‌ها

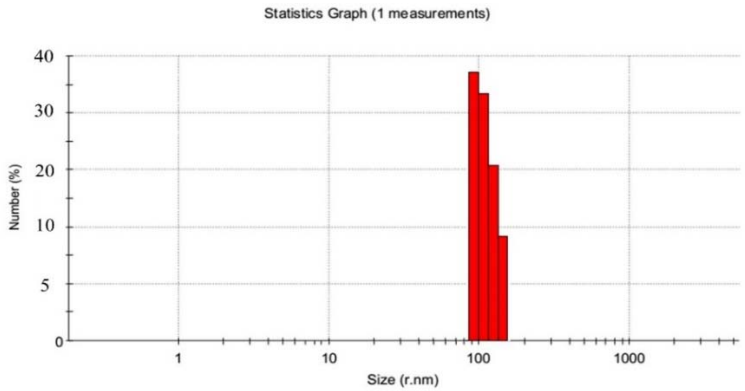
به‌منظور تصویربرداری از نانوذرات، نمونه‌ها بعد از آماده‌سازی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل شماره ۴ ملاحظه می‌گردد، نانوذرات تولیدشده اغلب کروی‌شکل و دارای سطحی نسبتاً صاف هستند و حالت تجمع نانوذرات و تشکیل لخته دیده نمی‌شود.



شکل شماره ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات حاوی پروتئین و مشخصات ذرات سنتزشده

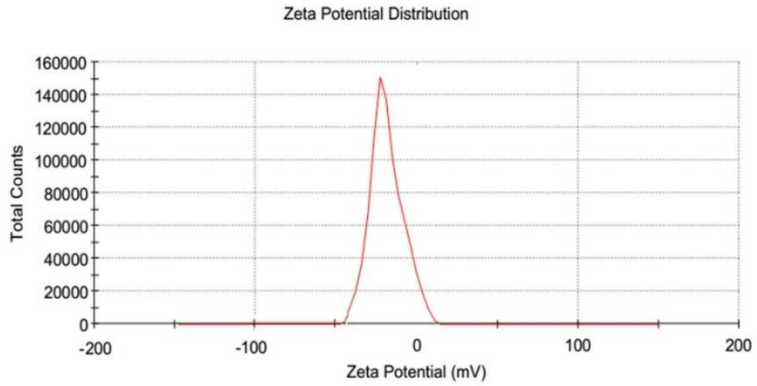
اندازه متوسط توزیع ابعادی نانوذرات و پتانسیل زتای آن‌ها

جهت سنجش بار و سایز سامانه نهایی ساخته‌شده، از تکنیک DLS استفاده شد که نتایج آن‌ها در نمودارهای شماره‌های ۱ و ۲ آمده است. اندازه‌های به‌دست‌آمده درواقع شعاع هیدرودینامیکی ذرات هستند؛ زیرا این روش، شعاع یک ذره کروی را که به‌تنهایی در یک سیال حرکت می‌کند و با لایه‌ای از آب پوشیده شده است، اندازه‌گیری می‌کند.



نمودار شماره ۱- نمودار آنالیز DLS براساس تعداد نانوذرات

میانگین اندازه ذرات نانو حاوی پروتئین نوترکیب در این مرحله براساس تعداد، ۱۰۰ (r.nm) می‌باشد.

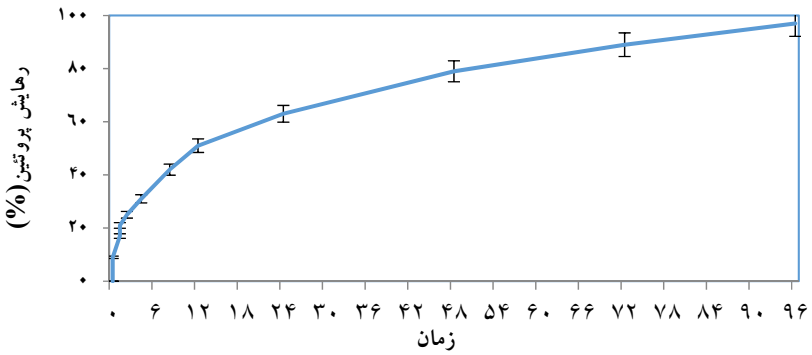


نمودار شماره ۲- تعیین پتانسیل زتای ذرات نانو حاوی پروتئین نوترکیب

پتانسیل زتای ذرات نانو حاوی پروتئین نوترکیب حدود ۲۰- میلی‌ولت به دست آمد.

بازده محبوس‌سازی و رهایش پروتئین

در این مطالعه بازده محبوس‌سازی روش مورد استفاده ۱/۴ ± ۸۱/۹۶ درصد بود. رهایش پروتئین از نانوذرات هم بررسی شد که نتیجه آن در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. با بررسی شکل مشخص می‌شود که نانوذرات در ابتدا دارای رهایش انفجاری هستند که در این مرحله در روز دوم حدود ۲۳ درصد از کلّ پروتئین بارگذاری‌شده در آن‌ها آزاد شد. با توجه به بازده محبوب‌سازی نانوذرات مشاهده شد که در طول دوره بررسی، رهایش پروتئین از نانوذرات حدود ۹۷ درصد از پروتئین محبوس‌شده در آن‌ها بوده است.



نمودار شماره ۳- رهایش پروتئین از سامانه سنتزشده

بحث

امروزه بروسلوز مشکلی جهانی است. عدم دسترسی به واکسن مؤثر انسانی و همچنین عوارض ناشی از مصرف واکسن‌های حیوانی، ازجمله عواملی هستند که مانع از ریشه‌کنی این بیماری در سراسر جهان شده‌اند [۷]. با توجه به عفونت‌زایی بروسلا به‌صورت داخل سلولی، پاسخ‌های ایمنی مؤثر علیه بروسلا وابسته به پاسخ‌های سلولی می‌باشد. بنابراین انتخاب آنتی‌ژن (و یا آنتی‌ژن‌ها) در جهت تحریک پاسخ‌های سلولی برای حذف باکتری در بدن بسیار مهم است. طراحی یک واکسن جدید باید براساس الگوی طبیعی بیماری‌زایی در حیوانات مدل آزمایشگاهی و شناسایی ترکیبات ویرولانس سطحی یا درون‌سلولی واجد شاخص‌های ایمونودومیننت ارگانیسم باشد [۱۶]. در این مطالعه، به بررسی عملکرد نانوساختار نیوزومی حاوی ایمنوژن سه‌ظرفیتی (TF، Bp26 و Omp31) بروسلا به‌عنوان کاندیدای نانوواکسن پرداخته شد. براساس پژوهش‌های چاپ‌شده TF، Bp26 و Omp31، دارای فعالیت آنتی‌ژنی خوبی هستند که باعث شده است کاندیداهای مناسبی برای تهیه پروتئین کایمر در واکسن باشند [۱۷-۱۹]. آنتی‌ژن‌های سطح سلول باکتری، اوّلین کاندیداها در ساخت واکسن هستند، چون آن‌ها نقطه اوّلیه تماس بین پاتوژن و میزبان هستند. ازجمله این آنتی‌ژن‌های سطح، پروتئین‌های غشای بیرونی هستند. آنتی‌ژن‌های Omp31، Bp26 و TF ازطریق لینکرهای هیدروفوبی به همدیگر متصل شدند و پروتئین کایمر پس از ارزیابی‌های بیوانفورماتیک و بیان در *E. coli* به‌عنوان واکسن، مورد ارزیابی قرار گرفت. لینکرهای استفاده‌شده در این مطالعه از تکرارهای EAAAK تشکیل شده‌اند که انتظار می‌رود یک آلفا هلیکس هیدروفوب مونومریک تشکیل دهند. پس از طراحی سازه سه‌قسمتی با کمک لینکرهای مذکور، به‌منظور افزایش کارآیی رونویسی و پایداری رونوشت، بهینه‌سازی کدون انجام شد. طی این عمل یک‌سری اصول در نظر گرفته می‌شود: توالی‌های تکراری و جزایر CG، کدون‌های کمیاب، توالی‌های ناپایداری و کلیه عواملی که روی بیان اثر منفی دارند، حذف می‌شوند. در پیشگویی ساختار پروتئین کایمر، مشخص شد که متشکل از ۳ قسمت می‌باشد و به‌وسیله دو لینکر از هم جدا شده است (تشکیل ساختار آلفا هلیکس می‌دهند) و این لینکرها به پروتئین کمک می‌کنند که به یک ساختار نهایی پایدار برسد. همچنین ساختار آلفا هلیکس مرتبط با طراحی سکانس‌های اسیدآمینه‌ای خاص می‌باشد که در نقاط آمینواسیدی ۴۹۵-۴۸۶ و ۵۲۵-۵۲۱ قرار دارند. طبق نتایج مطالعه حاضر احتمال می‌رود پتانسیل بالای پروتئین نوترکیب طراحی و ساخته شده فعلی به‌عنوان یک کاندیدا در طراحی و ساخت واکسن ساب یونیت علیه گونه‌های بروسلا تلقی شود. این پروتئین قابلیت مناسبی در تحریک هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و هومورال در مقایسه با نتایج حاصل از استفاده در گروه کنترل مثبت دریافت‌کننده واکسن‌های زنده ضعیف‌شده *B. abortus RB51* و *B. melitensis Rev.1* دارد. نتایج مطالعه حاضر در راستای سایر مطالعات می‌باشد. در سال ۲۰۱۳، Díaz و همکاران از پروتئین کایمر BLSOmp31 برای اوّلین‌بار به‌منظور ایجاد حفاظت علیه سویه بروسلا اویس استفاده کردند. این پروتئین به‌صورت زیرجلدی و همراه با ادجوانت‌های مختلف در موش Balb/C به‌کار گرفته شد. این پروتئین پاسخ ترکیبی Th1-Th2 را تحریک کرد و توانست علیه سویه ویرولانس *بروسلا کنیس* حفاظت خوبی ایجاد نماید [۱۷]. قدرت ایمنی‌زایی پروتئین‌های کایمر مورد استفاده در این مطالعه، مشابه با نتایج Díaz و همکاران است. دوستی و همکاران (۱۳۸۶) با تزریق عضلانی واکسن ژنی دوگانه حاوی دو آنتی‌ژن پروتئین متصل‌شونده به پریپلاسم (P39) و پروتئین Omp31، بروز ایمنی سلولی را در موش‌های c/BALB نشان دادند. نتایج اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها ازطریق الیزا نشان‌دهنده افزایش سطح اینترفرون گاما و اینترلوکین-۴ در موش‌های واکسینه‌شده در مقایسه با گروه شاهد بود. ابکار و همکاران در سال ۱۳۹۴ طراحی و تولید پروتئین کایمر حاوی Omp31، Omp19 و اوره آز را علیه باکتری بروسلا و نیز ایمنی‌زایی آن را بررسی کردند. در این مطالعه سه پروتئین Omp19، Omp31 و اوره آز ازطریق لینکرهای هیدروفیلی به همدیگر متصل شدند. نتایج نشان داد که مصرف درون‌صفاقی این پروتئین باعث تحریک پاسخ Th1-Th2 می‌شود؛ درحالی‌که مصرف خوراکی آن پاسخ Th1-Th17 را برمی‌انگیزد. ضمن این‌که پروتئین مذکور حفاظت بسیار مناسبی علیه سویه‌های ویرولانس *بروسلا ابورتوس و ملیتنسیس* از خود به نمایش گذاشت [۱۸]. در مطالعه گلشنی و همکاران (۲۰۱۴) یک واکسن با پروتئین کوتاه‌شده (truncated) با کمک مطالعات in silico و مدل‌سازی پروتئین Omp31، ژن Omp31 *B.melitensis* یک کاندیدای بالقوه جهت ساخت واکسن علیه عفونت‌های بروسلایی به‌عنوان واکسن‌های subunitو ژنی معرفی شد [۱۹]. نتایج مشابه به‌دست‌آمده از ایجاد ایمنی با آنتی‌ژن‌های بروسلا در موش‌های c/BALB، ایمنی‌زا بودن و استفاده از Omp31 را جهت تولید و پیشرفت واکسن‌ها تأیید کرده است. در گام بعدی این پروژه کدون‌های ژن‌های موردنظر بعد از طراحی، بهینه‌سازی شدند و سپس ژن‌های مربوط به پروتئین‌های کایمر در وکتورهای بیانی pET28a کلون گشتند و به سلول پذیرنده *اشریشیا کلی* منتقل شدند. سپس این پروتئین بیان شد و در ادامه برای خالص‌سازی پروتئین‌های موردنظر از روش

کروماتوگرافی میل جذبی استفاده شد. در آخر نیز به‌وسیله تکنیک وسترن بلات وزن پروتئین موردنظر حدود ۷۰ کیلودالتون مشخص شد. با توجه به بررسی‌هایی که در مقالات مختلف انجام شده است از تکنیک وسترن بلات اغلب به‌منظور جداسازی و شناسایی پروتئین استفاده می‌گردد [۲۰]. به‌طورکلی موفقیت یک واکسن به چند عامل بستگی دارد: استفاده از آنتی‌ژن‌های مناسب، سیستم تحویل اختصاصی و ادجوانت مناسب [۲۱]. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، واکسن‌های نوترکیب با وجود مزایای فراوان، ایمنی‌زایی کمی دارند، بنابراین جهت تشدید ایمنی‌زایی نیازمند ادجوانت مناسب می‌باشند. در این تحقیق، از نیوزوم به‌عنوان سیستم انتقال‌دهنده به‌منظور افزایش کارآیی واکسن و انتقال مؤثر آن به سیستم ایمنی استفاده شد [۲۲-۲۳]؛ همچنین دستگاه Zetasizer به‌کار رفت. این دستگاه، دستگاه اندازه‌گیری ذرات نانو است که توانایی اندازه‌گیری سه مشخصه ذرات یا مولکول‌ها در محیط مایع را دارد. این سه پارامتر بنیادی عبارتند از: اندازه ذره (Particle size)، پتانسیل زتا (Zeta potential) و وزن مولکولی (Molecular weight) که با به‌کاربردن تکنولوژی منحصربه‌فرد در دستگاه Zetasizer می‌توان این پارامترها را در دامنه وسیعی از غلظت‌ها اندازه‌گیری کرد. در این مطالعه، اندازه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن در حدّ بسیار مطلوبی به‌دست آمد. بیشتر محققان درمورد اندازه مطلوب (۱۰۰ تا ۵۰۰) نانومتر به یک اتفاق نظر واحد رسیده‌اند که متأثر از ماهیت نانوذرات می‌باشد. اندازه کوچک نانوذرات حاوی آنتی‌ژن و پتانسیل زتای مناسب، نشان‌دهنده جذب بهتر آن‌ها به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌باشد و با رهایش تدریجی آنتی‌ژن‌های نوترکیب از نیوزوم، بدن فرصت کافی برای ایجاد ایمنی‌زایی مؤثرتر علیه پاتوژن‌ها را پیدا خواهد کرد. همچنین مشخص شد که بازده محبوس روش مورد استفاده ۱/۴±۸۱/۹۶ درصد بود. در طول دوره بررسی، رهایش پروتئین از نانوذرات حدود ۹۷ درصد از پروتئین محبوس‌شده در آن‌ها بود. نتایج مشابهی نیز در مطالعه Khan و همکاران گزارش شد [۲۲]. Khan در سال ۲۰۲۰ از لووفلوکساسین محصورشده در نانونیوزوم به‌عنوان یک عامل ضدباکتری دربرابر بروسلا استفاده کرد. در این مطالعه، نیوزوم‌های لووفلوکساسین در مقابل بروسلوز با موفقیت سنتز شدند. راندمان کپسوله‌سازی برای نیوزوم‌های Span 40 و Tween 80 به‌ترتیب ۷۸ و ۷۴ درصد بود. در مطالعه حاضر، قطر نیوزوم‌های محصورنشده و محصورشده به‌ترتیب توسط SEM اندازه‌گیری شد؛ نتایج نشان داد که نیوزوم‌ها کاملاً کروی هستند و هیچ اثر شارژی نشان نمی‌دهند که بیانگر عدم وجود ناخالصی‌های آلی باشد [۲۲]. امیری و همکاران در سال ۲۰۱۶ در پژوهشی نیوزوم حاوی سیلیبینین را به دو روش تبخیر فاز معکوس و اختلاط داروی سیلیبینین با کلسترول، پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و span 20 تهیه کردند که قطر نانوذرات در حدود ۱۹۲/۳ نانومتر و میزان لود دارو ۲۲ درصد محاسبه شد. از مقایسه این نتایج با مطالعه حاضر مشخص شد که در پژوهش پیشِ رو سایز نانوذرات کاهش و میزان لود دارو افزایش داشته است. در نتیجه سایز کوچک‌تر ذرات به افزایش رهایش دارو منجر می‌شود. این بررسی‌ها نشان می‌دهند که علاوه‌بر روش ساخت حامل نیوزومی، مقادیر مورد استفاده نیز می‌توانند در اندازه و سایز نانوذرات مؤثر باشند. بررسی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش مقدار کلسترول، اندازه نانوذرات نیز با افزایش همراه بوده است. کلسترول جزء مهمّی از ساختار نیوزوم است، چرا که باعث ایجاد انعطاف‌پذیری و استحکام ساختار و به‌دنبال آن پایداری بیشتر نانوحامل می‌شود [۲۴]. همچنین با توجه به کاهش اندازه به‌دنبال استفاده از توئین ۶۰ در مقادیر کمتر، می‌توان استنباط کرد که کاهش میزان توئین در ساخت نانوحامل سبب کاهش اندازه نانوحامل می‌شود. در مطالعه تیموری در سال ۲۰۱۶ درخصوص ساخت نیوزوم‌های حاوی داروی کارودیلول ثابت شده است که همراهی توئین-۲۰ با سورفکتانت span در ساخت‌های نیوزومی به کاهش اندازه ساختارهای نیوزومی منجر شده است. در این مطالعات با افزایش مقدار توئین-۲۰ اندازه ذرات کاهش بیشتری نشان داده‌اند [۲۵]. با توجه به آن‌که کاهش اندازه به‌دنبال استفاده از توئین-۲۰ میسر می‌گردد، تصمیم بر آن شد تا علیرغم سمّیت توئین-۲۰ از مقادیر ناچیز آن در ساخت‌های نیوزومی استفاده شود. با کاهش سایز ذرات، مساحت سطح آن‌ها به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد. بنابراین گرچه ترکیب نانوذره تغییر نمی‌کند، ولی با تغییر سایز، ذره خصوصیت توکسیسیتی متفاوتی از خود نشان می‌دهد که به‌دلیل تغییر در اندازه ذره و سطح واکنش‌پذیری می‌باشد. علاوه‌براین اندازه ذرات، در مکانیسم رسانش سلولی تفاوت ایجاد می‌کند و توزیع درون‌تن نانودارو را تغییر می‌دهد. ازجمله عواملی که در رهایش دارو دخیل است، اندازه نانوذره می‌باشد. چراکه با افزایش اندازه نانوذره، انرژی سطحی نانوذره با کاهش سطح جانبی آن کاهش می‌یابد و به تغییر خصوصیات نانویی منجر می‌شود. انباشت میزان زیادی دارو در یک وزیکول بزرگ، شانس رهایش دارو در محیط را کمتر می‌کند [۲۶]. حضور کلسترول در ساختار نانوذرات باعث ایجاد سفتی در غشای لیپوزومی می‌شود که این امر موجب می‌گردد نشت دارو هنگام آماده‌سازی نانوذره کم شود و با کاهش ناخواسته درصد بارگذاری دارو طی فرآیندهای آماده‌سازی غلبه کند. علاوه‌براین سبب می‌شود رهایش دارو کندتر شود و سامانه تهیه‌شده آهسته‌رهش باشد. چراکه زنجیره‌های کلسترول فضای خالی بین فسفولیپیدها را می‌پوشانند و باعث استحکام زنجیره‌ها می‌شوند.

همچنین کلسترول سبب پایداری درون‌تن و برون‌تن می‌شود [۲۶]. از برخی محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به دسترسی سخت مواد به‌دلیل کمبود منابع مالی، اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر، فرمولاسیونی بهینه و هدفمند از نانوسامانه نیوزومی دارای آنتی‌ژن‌های بروسلا را پیشنهاد می‌کند که ضمن تأیید ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب آن، دارای انکپسولاسیون بالا و رهایش کنترل‌شده دارو در شرایط برون‌تنی در حالت انکپسوله‌شده در مقایسه با حالت آزاد است. تولید واکسن‌های حامل سه آنتی‌ژن Omp31، Bp26 و TF بروسلا به‌همراه نانوذرات در مطالعه حاضر می‌تواند یک جایگزین بسیار مناسب برای واکسن‌های تجاری کنونی جهت پیشگیری و مقابله در برابر عفونت‌های ناشی از بروسلا باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و تمامی افرادی که در طول اجرای این پژوهش، یاری‌رسان بودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References:

[1] Avijgan M, Rostamnezhad M, Jahanbani-Ardakani H. Clinical and serological approach to patients with brucellosis: A common diagnostic dilemma and a worldwide perspective. ***Microb Pathog*** 2019;129:125-30.

[2] Chaudhuri P, Saminathan M, Ali SA, Kaur G, Singh SV, Lalsiamthara J, et al. Immunization with Brucella abortus S19Δper Conferred Protection in Water Buffaloes against Virulent Challenge with B. abortus Strain S544. ***Vaccines*** 2021; 9(12): 1423.

[3] Jawetz M. Medical Microbiology 27 edition: Lange; 2016**.**

[4] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology E-book: Elsevier Health Sciences; 2020.

[5] Gomez G, Adams LG, Ficht AR, Ficht TA. Host-Brucella interactions and the Brucella genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. ***Frontiers Cell Infect Microb*** 2013; 3: 17.

[6] Kumar DR, Sivalingam J, Mishra SK, Kumar A, Vineeth M, Chaudhuri P, et al. Differential expression of cytokines in PBMC of Bos indicus and Bos taurus× Bos indicus cattle due to Brucella abortus S19 antigen. ***Animal Biotech*** 2020; 31(2): 148-54.

[7] Atabey T, Acar T, Derman S, Ordu E, Erdemir A, Taşlı PN, et al. In Vitro Evaluation of Immunogenicity of Recombinant OMP25 Protein Obtained from Endemic Brucella abortus Biovar 3 as Vaccine Candidate Molecule Against Animal Brucellosis. ***Protein Peptide Lett*** 2021; 28(10): 1138-47.

[8] Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Lotfi AS. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against Brucella melitensis infection. ***Int J Nano***. 2017;12:8769.

[9] Abdollahi A, Mansouri S, Amani J, Fasihi-Ramandi M, Ranjbar R, Ghasemi A, et al. A Recombinant Chimera Protein as a Novel Brucella Subunit Vaccine: Protective Efficacy and Induced Immune Response in BALB/c Mice. ***Jundishapur J Microbiol*** 2018; 11(1): 1-9. [in Persian]

[10] Gopalakrishnan A, Dimri U, Saminathan M, Yatoo M, Priya GB, Gopinath D, et al. Virulence factors, intracellular survivability and mechanism of evasion from host immune response by brucella: an overview. ***J Animal Plant Sci*** 2016; 26(6).

[11] Abkar M, Alamian S, Sattarahmady N. A comparison between adjuvant and delivering functions of calcium phosphate, aluminum hydroxide and chitosan nanoparticles, using a model protein of Brucella melitensis Omp31. ***Immunol Lett*** 2019; 207: 28-35.

[12] Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. ***J Controlled Release*** 2014; 185: 22-36.

[13] Hasan AA, Madkor H, Wageh S. Formulation and evaluation of metformin hydrochloride-loaded niosomes as controlled release drug delivery system. ***Drug Delivery*** 2013; 20(3-4): 120-6.

[14] Bagheri-Josheghani S, Bakhshi B. Formulation of selenium nanoparticles encapsulated by alginate-chitosan for controlled delivery of Vibrio Cholerae LPS: A novel delivery system candidate for nanovaccine. ***Int J Biol Macromol*** 2022; 208: 494-508.

[15] Fasihi-Ramandi M, Ghobadi-Ghadikolaee H, Ahmadi-Renani S, Taheri RA, Ahmadi K. Vibrio cholerae lipopolysaccharide loaded chitosan nanoparticle could save life by induction of specific immunoglobulin isotype. ***Artif Cells Nanomed Biotechnol*** 2018; 46(1): 56-61.

[16] Sekhavati MH **,**Heravi RM, Tahmoorespur M, Yousefi S, Abbassi-Daloii T, Akbari R. Cloning, molecular analysis and epitopics prediction of a new chaperone GroEL Brucella melitensis antigen. ***Iran J Basic Med Sci*** 2015; 18(5): 499.

[17] Díaz AG, Clausse M, Paolicchi FA, Fiorentino MA, Ghersi G, Zylberman V, et al. Immune response and serum bactericidal activity against Brucella ovis elicited using a short immunization schedule with the

polymeric antigen BLSOmp31 in rams. ***Vet Immunol Immunopathol*** 2013; 154(1-2): 36-41.
[18] Abkar M, Lotfi A, Amani J, Ghorashi S, Brujeni G, Kamali M. Design of a chimeric DNA vaccine against Brucella spp. ***Minerva Biotec*** 2014; 26(4): 223-33.
[19] Ghasemi A, Ranjbar R, Amani J. In silico analysis of chimeric TF, Omp31 and BP26 fragments of Brucella melitensis for development of a multi subunit vaccine candidate. ***Iran J Basic Med Sci*** 2014; 17(3): 172.
[20] Ahmed IM, Khairani-Bejo S, Hassan L, Bahaman AR, Omar AR. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from Brucella melitensis in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. ***BMC Vet Res*** 2015; 11(1): 1-0.
[21] Pakzad I, Rezaee A, Rasaee MJ, Hossieni AZ, Tabbaraee B, Kazemnejad A. Protection of BALB/C mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with combination of recombinant human serum albumin-l7/l12 (Brucella abortus ribosomal protein) and lipopolysaccharide. ***Romanian Arch*** 2010: 5.
[22] Khan S, Akhtar MU, Khan S, Javed F, Khan AA. Nanoniosome-encapsulated levoflaxicin as an antibacterial agent against Brucella. ***J Basic Microbiol*** 2020; 60(3): 281-90.
[23] Mukherjee F, Prasad A, Bahekar VS, Rana SK, Rajendra L, Sharma GK, Srinivasan VA. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a liposome containing Brucella abortus S19 outer membrane protein in BALB/c mice. ***Iran J Vet Res*** 2016; 17(1): 1.
[24] Amiri B, Ebrahimi-Far M, Saffari Z, Akbarzadeh A, Soleimani E, Chiani M. Preparation, characterization and cytotoxicity of silibinin-containing nanoniosomes in T47D human breast carcinoma cells. ***Asian Pac J Cancer Prev*** 2016; 17(8): 3835-8. [in Persian]
[25] Taymouri S, Varshosaz J. Effect of different types of surfactants on the physical properties and stability of carvedilol nano-niosomes. ***Adv Biomed Res*** 2016; 5.
[26] Amoabediny G, Haghiralsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhoundi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, Zandieh-Doulabi B. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. ***Int J Polym Mater*** 2018 ; 67(6): 383-400.