تولید و کریستالیزاسیون توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم

دکتر رمضانعلی عطائی[۱*]، دکتر علی مهرابی‌توانا[۱]، دکتر غلامحسین ریاضی[۲]

۱- دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا ... (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی ۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه تهران

دریافت: ۸۴/۷/۱۵، پذیرش: ۸۵/۸/۴

Title: *Production and crystallization of Clostridium botulinum type A toxin*

Authors: *Ataee RA, (PhD); Mehrabi Tavana A, (PhD); Riazi GH, (PhD).*

Introduction: *Widespread medical usage of botulinum toxins has increased the need for the precise analysis of its biological activity. The aim of this study was production and crystallization of the botulinum type A toxins.*

Methods: *In this study, Clostridium botulinum was grown and inoculated into the Tripticase Soya Broth culture media, under anaerobic condition and toxin production was monitored. The maximum yield of toxin was obtained after 96 hours, then toxin was harvested by acidifying the whole culture and centrifugation. The period of bacterial growth was extensively checked for toxin activity by mouse assay and crystallization was done at the same time.*

Results: *The results of this study showed that Clostridium botulinum grew in the above condition and produced toxin after 96 hours. The toxin produced in the low pH range of 4– 5.8 was stored as cube-shaped crystals. The crystallized toxin preparation was stable over time and maintained its biological activity after 4 years of storage in a temperature of 4-6°C.*

Conclusion: *Clostridium botulinum type A toxin rapidly becomes inactive in the laboratory environment. Therefore, it is important to find a way to keep its biological activity. According to the results of this study, biological activity of the crystallized toxin remained stable for a long period of time. Thus, this method is useful for both preventive and research applications of botulinum toxin.*

Keywords: *Clostridium botulinum type A, toxin, crystallization, biological activity.*

Hakim Research Journal 2006; 9(3): 25- 31.

* نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، گروه میکروب‌شناسی. تلفن: ۰۹۱۲ ۲۱۹۰ ۴۱۸ نمابر: ۸۸۰۳۹۸۸۳
نشانی پست الکترونیک: ataee@bmsu.ac.ir

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

چکیده

مقدمه: *گسترش روزافزون کاربردهای پزشکی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، ضرورت دست‌یابی به روش‌های تولید و حفظ فعالیت بیولوژیک آن را اجتناب‌ناپذیر کرده است. لذا هدف این تحقیق، تولید و ابقای فعالیت توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم می‌باشد.*

روش کار: *در این تحقیق، کشت ۲٤ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A را به محیط کشت غنی شده تریپتی‌کیز سوی براث تلقیح و در خلال گرم‌خانه‌گذاری تولید توکسین بررسی وتعیین شد. با افزودن اسید سولفوریک به کشت ۹٦ ساعته آن را اسیدی نموده و با سانتریفوژ رسوب حاصل جمع‌آوری گردید. سپس توکسین موجود در آن به صورت کریستالیزه در آورده شد. در جریان عمل، وجود توکسین با استفاده از تزریق به موش سوری تأیید گردید.*

یافته‌ها: *کلستریدیوم بوتولینوم در شرایط ذکر شده، در این آزمایش رشد نموده و توکسین تولید نمود، به‌طوری‌که ۹٦ ساعت گرم‌خانه‌گذاری حداکثر مقدار توکسین تولید گردید. توکسین تولید شده در محدوده pH ٤ الی ۵/۸ به صورت کریستال‌های مکعب مستطیلی شکل تبدیل شد. پایداری توکسین کریستالیزه شده در طول زمان بررسی و تعیین گردید و مشخص شد که نگهداری توکسین کریستالیزه شده در یخچال ٤ تا ٦ درجه سانتی‌گراد، پس از ٤ سال فعالیت بیولوژیک خود را حفظ کرده است.*

نتیجه‌گیری: *توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم در محیط آزمایشگاه به سرعت غیرفعال می‌گردد. بنابراین، حفظ فعالیت بیولوژیک آن برای مدت طولانی از اهمیت زیادی برخوردار است. چنان‌چه نتایج این تحقیق نشان داد، فعالیت بیولوژیک این توکسین در حالت کریستالیزه برای مدت طولانی پایدار باقی می‌ماند. بنابراین، استفاده از این امر هم برای پیشگیری از بوتولیسم و هم کاربردهای تحقیقاتی امکان‌پذیر می‌گردد.*

گل‌واژگان: *کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ، توکسین، کریستالیزاسیون، فعالیت بیولوژیک.*

مقدمه

بیش از یک قرن از شناسایی عامل بیماری مهلک بوتولیسم گذشته (۱) و نشان داده شده است که عامل بیماری یک توکسین پروتئینی است که به دلیل تأثیر بر محل اتصال عصب عضله و ایجاد فلج شل، نوروتوکسین نام گرفته است. در واقع این توکسین یکی از قوی‌ترین سموم شناخته شده می‌باشد (۲). با آن که از بدو شناسایی بوتولیسم تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌های باکتری‌شناسی، سم‌شناسی، درمان و پیش‌گیری از این بیماری انجام شده است؛ با وجود این، از جنبه‌های مختلف بهداشتی، درمانی و بیولوژی (۳) هنوز هم برای بسط و گسترش تحقیق پیرامون توکسین تیپ A بوتولینوم دلایل متعددی ذکر شده است که اهم آنها عبارتند از: استفاده از این توکسین در درمان تعداد زیادی از بیماری‌های اسپاسمودیک که به‌عنوان یک داروی فراگیر با نتایج درخشان همراه بوده است (۶- ۴).

همچنین، تهیه آنتی‌بادی‌های پلی و منوکلونال به منظور درمان بوتولیسم و نیز تحقیق جهت تهیه و تولید واکسن کاراً از اولویت‌های مهم پزشکی درآمده است (۹-۷). شناسایی مکانیسم‌های مختلف بیولوژیک، کاربرد این سم را در پزشکی و نیز در تحقیقات اجتناب‌ناپذیر کرده است (۱۰و ۱۱). به علاوه، کنترل مواد غذایی و جلوگیری از بیماری مهلک بوتولیسم بسیار حایز اهمیت است (۱۲و ۱۳). همچنین، دست‌یابی به روش‌های تشخیص سریع سم بوتولیسم با استفاده از فعالیت کاتالیتیک آن بر سوبسترای اختصاصی از روش‌های معتبر ذکر شده است (۱۴). در تمام این موارد، تولید سم، حذف مواد زاید و ناخالصی‌های همراه آن، به‌طوری‌که خللی در فعالیت بیولوژیک آن وارد نشود، از نکات بسیار ضروری است. به‌عبارت دیگر جلوگیری از کاهش فعالیت، بیولوژیک توکسین بوتولینوم بسیار حائز اهمیت است.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

یکی از روش‌های حفظ فعالیت بیولوژیک این سم نگهداری آن در حالت کریستالیزه است. ازاین رو، هدف این تحقیق تولید و کریستالیزاسیون سم A بوتولینوم در شرایط آزمایشگاه است.

روش کار

در این تحقیق موش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم از انستیتو پاستور ایران، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و پادتن اختصاصی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم از Tarasoich Musco، محیط کشت تریپتیکیز سوی براث[1] سیستئین هیدروکلراید، عصاره مخمر[2]، گلوکز منوهیدرات، هیدروکسید سدیم، کلراید کلسیم، جار و گاز پک از مرک، آمونیوم سولفات، اسید کلریدریک، اتانل، اسید تری‌کلرو استیک اسید، پلی‌آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید، آمونیوم پرسولفات، تمد و آگاروز از سیگما و فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵میکرومتری، فیلتر ۲۰ و ۱۰۰ کیلودالتون از سارتوریوس تهیه گردید.

به‌منظور کشت توکسین ۲ لیتر محیط تولید توکسین تهیه و استریل گردید (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند، به‌مدت ۱۵ دقیقه). سپس به نسبت ۲ تا ۳ درصد با کشت ۲۴ ساعته[3] (حاوی $۶/۳ \times ۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر) تلقیح و در شرایط استریل (زیر هود بیولوژیک) در شیشه‌های مخصوص کشت خون توزیع گردید (۷۰ میلی‌لیتر در هر شیشه) و در شرایط بی‌هوازی (استفاده از جار و گاز پک) گرم‌خانه‌گذاری شدند و در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸،۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۴ ، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۰۸ و ۱۲۰ ساعت، هر یک را از شرایط بی‌هوازی خارج و ۱۰ میلی‌لیتر آن را برداشته و جهت اندازه‌گیری میزان جذب در طول‌موج ۵۴۵ نانومتر، اندازه‌گیری مقدار پروتئین[4] و تعیین نوروتوکسیسیتی به‌کار رفت (۱۵).

از هر یک از شیشه‌های کشت که به‌مدت مشخصی گرم‌خانه‌گذاری شده بودند، کدورت‌سنجی انجام شد. بدین‌ترتیب که ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت را در لوله مخصوص (کوت) اسپکتروفتومتر ریخته و ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و در طول موج ۵۴۵ نانومتر میزان جذب آن تعیین گردید (۱۵).

از هر یک از شیشه‌ها که در زمان تعیین شده گرم‌خانه‌گذاری شده بودند، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و سانتریفوژ گردید (۵۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد. سپس با استفاده از روش براد فورد[5] غلظت کل پروتئین (پروتئین توتال) اندازه گیری شد (۱۶).

برای تعیین نوروتوکسیسیتی هر یک از کشت‌ها، پس از ۹۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، ۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استریل شده کشت، به‌صورت داخل صفاقی در موش‌های ۲۲ –۱۸ گرمی تزریق گردید و حداکثر تا ۴۸ ساعت حیوان تحت مراقبت بود. به‌علت محدود بودن تعداد موش از هر نمونه تنها به ۳ موش تزریق می‌شد. این آزمون همیشه با کنترل (۰/۶ میلی‌لیتر حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استریل شده و ۰/۳ میلی‌لیتر آنتی‌توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم) همراه بود (۱۷و ۱۸).

برای جداسازی توکسین، کشت ۹۶ ساعته را با ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مایع رویی را جدا نموده، ابتدا از فیلتر ۲۰ کیلودالتون عبور داده و محلول تغلیظ شده باقی‌مانده از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون عبور داده شد. هر یک از محلول‌های روی فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون، محلول عبور کرده از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون و محلول روی فیلتر ۲۰ کیلودالتون از نظر غلظت نوروتوکسیسیتی مورد بررسی قرار گرفت.

کریستالیزاسیون توکسین تولید شده بر اساس روش سوجی یاما[6] با مختصر تغییراتی در آن طی مراحل زیر انجام شد (۱۹و ۲۰).

۱- کشت ۴ روزه کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A را با اسید سولفوریک اسیدی کرده (pH=۳/۴) و با قرار دادن آن در دمای آزمایشگاه، پس از یک شب محتویات کشت به‌صورت رسوب درآمد.

۲- مایع رویی شفاف شده را خارج کرده، رسوب جمع‌آوری و با آب مقطر استریل شستشو داده شد (نحوه شستشو با سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد).

۳– رسوب حاصل را جدا نموده و در آب مقطر با pH = ۶/۸ حل شد سپس کلراید کلیسم به آن اضافه گردید تا غلظت ۰/۰۷۵ مولار حاصل شود.

۴- pH محلول مرحله ۳ را به ۳/۷ رسانده تا رسوب سمی شیری رنگ تشکیل شود.

۵- رسوب حاصل با سانتریفوژ جدا (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و در بافر فسفات ۰/۰۳ مولار با pH = ۶/۸ حل گردید.

[1] Trypticase soy broth
[2] Yeast extract
[3] Pre- culture
[4] Total protein
[5] Braod ford
[6] Sugiyama

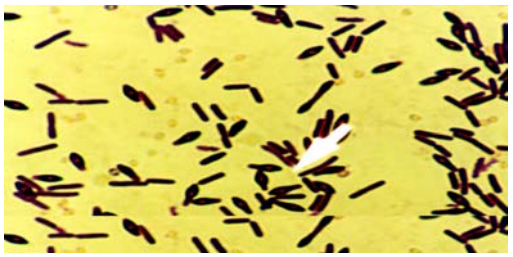
[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

۶- با اضافه کردن سولفات آمونیوم به نسبت ۳۷/۲ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر و نگهداری آن در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۷ روز بلور های کریستالی توکسین تشکیل شد. این عمل با محلول استخراج شده از طریق اولترافیلتراسیون نیز تکرار گردید.

در این تحقیق. میزان همبستگی بین تولید پروتئین کل و رشد باکتری با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید.

نتایج

باکتری لیوفیلیزه در محیط تریپتیکیز سوی براث حاوی افزودنی‌ها، پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی باعث کدورت محیط شد. انتقال (پاساژ) از کشت ۴۸ ساعته به محیط تریپتیکیز سوی حاوی ۵ درصد آگار و گرم‌خانه‌گذاری آن به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی، پرگنه‌های یکنواخت رشد کرد. رنگ‌آمیزی گرم از آنها باسیل‌های گرم مثبت مشاهده گردید (شکل۱).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی گرم از کشت ۴۸ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در محیط تریپتیکیز سوی حاوی ۵ درصد آگار؛ باسیل‌ها با اسپور نیمه انتهایی نشان داده شده است.

رشد باکتری با روش‌های زیر تأیید گردید:

۱- پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پرگنه‌های مشخص و قابل شمارش در سطح محیط کشت ایجاد گردید.

۲- با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر، روند تغییرات رشد در طی گرم‌خانه‌گذاری تعیین شد.

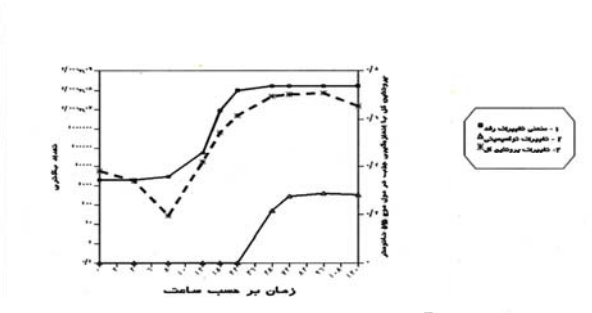
۳- اندازه‌گیری تغییرات پروتئین محیط کشت در طی گرم‌خانه‌گذاری، روند رشد باکتری را نشان داد (نمودار۱).

تولید توکسین نیز با روش‌های زیر تأیید شد:

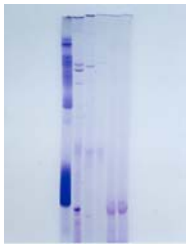
۱- در آزمون ژل دیفیوژن، خط رسوبی ناشی از واکنش توکسین و آنتی‌توکسین ایجاد گردید.

۲- تزریق عصاره استریل شده کشت‌ها به صورت داخل‌صفاقی و مشاهده اثر فلج‌کنندگی نوروتوکسین و مهار این اثرات با آنتی‌سرم اختصاصی، وجود توکسین را تأیید کرد.

۳- الکتروفورز و مشاهده باند ۱۵۰ کیلو دالتون (شکل ۲).



نمودار ۱- منحنی رشد و تغییرات غلظت پروتئین و نیز نوروتوکسیسیتی عصاره کشت کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A پس از ۱۲۰ ساعت گرم خانه گذاری



شکل ۲- SDS- پلی آکریلامید ژل الکتروفورز استاندارد سرم آلبومین و مراحل مختلف استخراج توکسین

در این تحقیق وجود توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم با استفاده از آزمون، ترزیق به موش آزمایشگاهی و مشاهده اثرات نوروتوکسیسیتی و خنثی کردن این اثرات با آنتی‌توکسین اختصاصی انجام شد.

تزریق داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر رقت‌های مختلف عصاره کشت ۹۶ ساعته، باعث ایجاد علایمی از قبیل: افزایش فعالیت عضلات شکمی دخیل در تنفس، انقباض عضلات شکم، بهت‌زدگی، شل شدن اندام انتهایی، فلج کامل و مرگ حیوان شد. بسته به رقت عصاره سمی، شروع علایم ۱ تا ۶ ساعت پس از تزریق ایجاد شد. همچنین، مرگ حیوان نیز ۱۲ تا ۳۰ ساعت بعد روی داد. رقت 10^{-2} عصاره کشت با هم‌حجم آنتی‌توکسین اختصاصی به‌طور کامل از ایجاد علایم در موش جلوگیری کرد.

الکتروفورز مراحل مختلف استخراج توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم در شکل ۲ نشان داده شده است. چنان‌چه مشاهده می‌شود خط ۱، استاندارد سرم آلبومین؛ خط ۲، عصاره کشت تغلیظ شده با فیلتر KDa ۱۰؛ خط ۳، عصاره تغلیظ شده با فیلتر KDa ۲۰؛ خط ۴، عصاره تغلیظ شده کشت ۹۶ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A با فیلتر KDa ۱۰۰؛ خطوط ۵ و ۶ پس‌آب فیلتر ۱۰۰KDa و توکسین استخراج شده از محیط کشت ۹۶ ساعته را نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود،

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

باندهای ۱۵۰ ، ۱۰۰ و ۵۰ کیلودالتون دیده می‌شوند. افزون بر این، باندهای کمتر از ۲۰ کیلودالتون نیز دیده می‌شود.

چنانچه در شکل ۳ نشان داده شده است، محلول سمی استخراج شده در این تحقیق، قابلیت کریستاله شدن داشت و به کریستال‌های مکعب مستطیلی شکل با ابعاد مختلف در آمد.

شکل ۳- کریستال‌های محلول سمی استخراج شده از کشت کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از ویژگی‌های توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، مقاومت آن به شرایط اسیدی است. لذا، از این خاصیت برای جداسازی توکسین استفاده شده است؛ زیرا توکسین بدون آسیب دیدن در pH= ۳/۵ رسوب می‌کند. از این رو، در سال ۱۹۴۶ میلادی کارل لامانا و همکاران اقدام به کریستالیزاسیون[1] توکسین بوتولینوم نمودند (۲۱).

عوامل متعددی باعث شد، پژوهشگران درصدد تولید و نگهداری توکسین به‌صورت کریستالیزه برآیند. زیرا توکسین کریستالیزه شده خالص نیست. بلکه به‌صورت مولکولی کمپلکس است که متشکل از پروتئین‌های غیرسمی، پروتئین با خاصیت هماگلوتینین و نیز بخش نوروتوکسینی است. نوروتوکسین در این شرایط بسیار پایدار است و برای مدت‌ها فعالیت بیولوژیک خود را حفظ می‌کند (۲۲).

در این تحقیق، روند رشد تولید پروتئین و نیز تولید توکسین نشان داده شد. بین رشد لگاریتمی و تولید پروتئین کل، همبستگی در جهت مثبت وجود دارد (r= ۰/۹۳۵ و p= ۰/ ۰۰۲). در حالی‌که تولید توکسین در انتهای فاز لگاریتمی شروع و تا نیمه‌های فاز سکون ادامه می‌یابد (نمودار ۱). با آن که پروتئین های تولید شده قبل از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری فاقد اثرات نوروتوکسینی هستند. ماهیت آنها برای ما ناشناخته است. با این حال، نقش متابولیسمی آنها در روند رشد، قابل انکار نیست. در این تحقیق، یافته قابل توجه آن است که تولید توکسین بعد از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و در انتهای رشد لگاریتمی و ابتدای مرحله سکون است. با ادامه مرحله سکون، تولید توکسین افزایش می‌یابد. در واقع قبل از این که باکتری وارد مرحله اسپور گذاری شود. تولید توکسین وجود دارد و شروع اسپورگذاری با کاهش غلظت توکسین همراه است. در واقع تولید و ترشح توکسین در انتهای رشد لگاریتمی و ابتدای مرحله سکون رخ می‌دهد. به‌نظر می‌رسد در این موارد باکتری دچار فقر غذایی شده و راهی جز تبدیل شدن به اسپور را نداشته باشد. از این رو، شروع به سنتز پروتئین‌های لازم برای اسپورسازی می‌کند. یکی از این پروتئین‌ها که نوروتوکسین می‌باشد، احتمالاً یک پپتیداز ضروری برای ساخت واحدهای سازنده لایه‌های نفوذناپذیر اسپور باشد. زیرا مولکول‌هایی از توکسین در دیواره اسپور نشان داده شده است (۲۳).

یکی از نکات بسیار مهم در مورد توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، پایداری آن است. از آنجا که دوز کشنده آن بسیار کم است و ۱ – ۰/۱ میکروگرم برای نابودی یک انسان کافی است لذا شرایطی که در آن فعالیت توکسین حفظ گردد، بسیار حائز اهمیت است. انتظار می‌رود، شیوع بوتولیسم زیاد باشد؛ اما با وجود آن‌که ۴ نوع بوتولیسم وجود دارد. به‌نظر نمی‌رسد سالانه بیش از ۳۰۰۰ مورد از این بیماری وجود داشته باشد (۲۴).

بدون شک یکی از علل کاهش شیوع بوتولیسم، پیشرفت‌های بهداشتی در جهان است. با وجود وفور باکتری‌های عامل بوتولیسم در محیط، آمار سالیانه این بیماری چندان قابل توجه نیست. لذا، آسیب‌پذیری توکسین در محیط از اهمیت زیادی برخوردار شده است. گزارش‌های متعددی در خصوص آسیب‌پذیری توکسین وجود دارد. با آن که تاکنون، نیمه‌عمر توکسین بوتولینوم گزارش نشده اما عقیده بر این است که پروتئین‌های همراه سم به‌عنوان محافظت‌کننده سم از عوامل محیطی از جمله: اکسیداسیون، آنزیم‌های هیدرولیزکننده و مواد احیاءکننده را می‌توان نام برد (۲۵). در هر حال، توکسین به صورت کمپلکس (نوروتوکسین همراه مولکول غیرسمی و نیز مولکول هماگلوتینین) پایدارتر از توکسین خالص است. افزون بر آن سمیت دهانی توکسین کمپلکس بیش از توکسین خالص است. زیرا توکسین خالص تحت تأثیر شیره‌معده از بین می‌رود. با آن‌که خاصیت ایمنی‌زایی آن باقی است، فاقد اثرات سمی می‌باشد (۲۶). به‌علاوه توکسین کمپلکس در شرایط اسیدی (pH= ۳/۵ – ۵) مدت‌ها پایدار است (۲۷).

از این‌رو، دست‌یابی به روش‌هایی که بتواند ساختار کمپلکس توکسین را حفظ کرده و باعث پایداری آن گردد، بسیار حایز اهمیت است. لذا، روش کریستالیزاسیون ابداع شده است. توکسین کریستالیزه شده نیز برای سال‌ها در شرایط معمولی

[1] Crystallization

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

(۱۰ –۴ درجه سانتی‌گراد) پایدار مانده و برای تخلیص به‌کار می‌رود (۲۰). در حالی که سم خالص به سرعت غیرفعال می‌گردد. علت غیرفعال شدن سم در غلظت نانوگرم معلوم نیست.

به‌نظر می‌رسد، اکسیداسیون خود به‌خود باعث ایجاد تغییرات ساختمانی گردد که نتیجه‌اش غیرفعال شدن سم و تبدیل آن به توکسوئید است. بنابراین انتخاب شرایط فیزیکوشیمیایی مناسب و محافظت‌کننده‌ای که بتواند در غلظت بسیار کم مانع غیرفعال شدن سم گردد، افزایش مدت نگهداری توکسین را موجب می‌شود (۲۸).

در هرحال، غیرفعال شدن سریع نوروتوکسین تیپ A بوتولینوم، کاربردهای پزشکی آن را با مشکل مواجه کرده است و در صورتی که مکانیسمی برای پایداری توکسین ایجاد شود. کاربرد آن را در پزشکی تسهیل کرده و مشکلات موجود را کاهش می‌دهد (۲۹).

در این تحقیق، پس از دست‌یابی به شرایط مطلوب برای رشد، تولید توکسین از آن تأیید شد. با آن‌که روش‌های متعددی برای تشخیص توکسین کلستریدیوم بوتولینوم وجود دارد؛ در این تحقیق توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم با استفاده از روش‌های زیر تشخیص داده شد:

الف- روش بیولوژیک (تزریق داخل صفاقی به موش) و مشاهده علایم فلجی و مرگ حیوان و جلوگیری از این علایم با آنتی‌توکسین اختصاصی.

ب- استفاده از واکنش رسوب توکسین با آنتی‌توکسین اختصاصی (ژل دیفیوژن)

ج- الکتروفورز و مشاهده باند ۱۵۰ کیلو دالتونی.

به‌این ترتیب توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم از محیط کشت مایع جداسازی شده و به صورت تقریباً خالص تهیه گردید و پس از آن کریستالیزه شد. تولید کریستال در شرایط آزمایشگاه و دمای اتاق، بعد از ۷ روز حاصل گردید.

در هر حال، نتیجه این تحقیق نشان داد، توکسین کلستریدیوم بوتولینوم پس از استحصال می‌تواند در شرایط اسیدی به‌صورت کریستالیزه در آمده و برای مدت‌ها پایدار و دارای فعالیت نوروتوکسینی باشد که با آنتی‌سرم اختصاصی تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم غیرفعال گردید.

این امر باعث می‌شود امکان تولید انبوه و نگهداری طولانی‌مدت مقدار زیادی توکسین با شرایط یکسان و فعالیت بیولوژیک مشخص فراهم گردد و بنابراین به درمان بیماری‌هایی که توسط توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد می‌شود رونق بهتری ببخشد.

References

1- Melling J, Hambleton P, Shone CC. *Clostidium botulinum* toxin: nature and preparation for clinical use. Eye 1988; 2: 16- 23.

2- Jankovic J, Brin FM. Therapeutic uses of botulinum toxin. N Eng J Med 1991; 324(17): 1186- 1194.

3- Sand J, Nordback I, Arvola P, et al. Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an *in vivo* and *in vitro* study. Gut 1998; 42: 507- 510.

4- Restivo DA, Marchese- Ragona R, Louria G, et al. Boutulinum toxin treatment for oropharyngeal dysphagia associated with diabetic neuropathy. Diabetes Care 2006; 29(12): 2650- 2653.

5- Felber ES. Botulinum toxin in primary care medicine. J Am Osteopath Assos 2006; 106 (10): 609- 14.

6 Moore C, Rackley R, Goldman H. Urologic applications of botox. Curr Urol Rep 2005; 6 (6):419-23.

7- Kozaki S, Miki A, Kamata Y, et al. Immunological characterization of apain- induced fragments of *Clostidium botulinum* type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synapsomes. Infect Immun 1989; 57(9): 2634- 2639.

8- Shone C, Wilton- smith P, Appleton N, et al. Monoclonal antibady- based immunoassay for type A *Clostidium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. Appl Environ Microbiol 1985; 50(1): 63- 67.

9- Chen F, Kuziemko MG, Amersdorfer P, et al. Antibody mapping to domains of botulinum nerutoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms. Infect Immun 1997; 65(5): 1626- 1630.

10- Nifu F, Lomneth BR, Cai S , et al. Role of zinc in the structure and Toxin activity of botulinum neurotoxin. Biochemistry 1998; 37: 5267- 5278.

11- Sesardic D, Melellan K, Ekong AT, et al. Refinment and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin. Pharmaco Toxicol 1996; 78: 283- 288.

12- Ahnert-Higer G, Bigalke H. Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. Prog Neurol 1995; 46: 83- 96.

13- Cammack R, Joannou CL, Cui X, et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Biochemica Biophysica Acta 1999; 1411: 475- 488.

14- Wictome M, Newton AK, Jameson K, et al. Development of *in vitro* assays for the detection of botulinum toxins in foods. FEMS Immun Med Microbiol 1999; 24: 319- 323.

15- Panikov NS. *Microbial growth kinetics.* London, United Kingdom: Chapman and Hall Ltd; 1995: 378.

16- Wallker JM. The protein protocols. NewJersey: Handbook Human Press; 1996: 7.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]

17- Reed JL, Muench H A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. Am J Hygiene 1938; 27 (3): 493 – 497.

18- Pearce B, Borodic EG, First RE, et al. Measuremant of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 128: 69 –77.

19- Sugiyama H, Moberg JL, Messer LS. Improved procedure for crystallization of *Clostridium botulinum* type A Toxin complexes. Appl Environ Microbiol 1977; 33: 963– 966.

20- Moberg JL, Sugiyama H. Affinity chromatography purification of type A Botulinum Neurotoxin from crystaline toxin complex. Appl Environ Microbiol 1978; 35(5): 878- 880.

21- Lamanna C, Mcelroy EO, Usnr LT, et al. The purification and crystallization of *Clostridium botulinum* type A toxin. Science 1946; 103(2681): 613 – 616.

22- Sugii S, Sakaguchi G. Molecular construction of *Clostridium Botulinum* type A toxin. Infect Immun 1975; 12(6): 1262- 1270.

23- Call JE, Cook PH, Miller AJ. In situ characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. J Appl Bacteriol 1995; 79: 257 – 263.

24- Reames RH, Kadull JP, Housewright DR, et al. Studies on botulinum toxoid, type A and B: III. Immunization of man. J Immunol 1945; 55: 309 – 324.

25-Walker ST. Sanders text and review series; Microbiology. Philadelphia: WB Sanders Company; 1998: 272– 274.

26- Ohishi I. Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type A and B Toxins from different strains. Infect Immun 1984; 43(2): 487- 490.

27- Krysinski EP, Sugiyama H. Nature of interacellular type A botulinum neurotoxin. Appl Envirun Microbiol 1981; 41(3): 675 – 678.

28- Inoue K. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin. Infect Immun 1996; 64(5): 1586 – 1594.

29- Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxity and immunology. Muscle Nerve Suppl 1997; 6: S146 –68.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-03-14]