بارگذاری آنتی‌ژن کایمر C-CfTXA-STxB زهر عروس دریایی در کوپلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش سوری

حسین هنری *(Ph.D)، سید مجتبی آقایی (Ph.D)، مهدی حسین زاده (M.Sc)

مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷ honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۵

چکیده

هدف: زهر عروس دریایی حاوی انواع پروتئین‌های فعال زیستی است که می‌تواند جهت تهیه واکسن مورد بررسی قرار گیرد. پلی‌لاکتیک‌اسید، پلیمر زیست تخریب‌پذیر می‌باشد که در سامانه‌های واکسن کاربرد دارد. هدف از این مطالعه کپسوله‌سازی پروتئین کایمر نوترکیب C-CfTX1-STxB زهر عروس دریایی در کوپلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA و بررسی تیتر آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی ایجاد شده در موش سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از تخلیص، تایید پروتئین توسط وسترن‌بلات انجام شد، سپس آنتی‌ژن درکوپلیمر سه‌بلوکه با استفاده از روش تبخیر حلال بارگذاری و خصوصیات نانوذرات تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی و پراش نور پویا مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه آنتی‌ژن کپسوله و آزاد به همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص، PBS و PLA-PEG نانویی شده به موش‌های سوری در چهار نوبت به صورت زیر جلدی تزریق شد. در انتها میزان آنتی‌بادی تولید شده در سرم به دست آمده از حیوان آزمایشگاهی به‌وسیله الایزا غیر مستقیم اندازه‌گیری شد و زنده‌مانی حیوانات ایمن شده در چالش با زهر عروس دریایی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی نانوذرات تولیدی نشان داد که نانوذرات تهیه شده از کمیت و کیفیت خوبی برخوردارند. اندازه نانوذرات تولیدی ۱۷۶/۱ نانومتر و بازده کپسوله‌سازی پروتئین در نانوذرات برابر ۷۱ درصد بود. در انتها نشان داده شد موش‌های ایمن شده پس از چالش با ۵۰ برابر LD50 زهر عروس دریایی زنده ماندند و تیتر آنتی‌بادی تولیدی ارتباط مستقیمی با مقاومت حیوان آزمایشگاهی داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم خاصیت کاردیوتوکسیستی و نوروتوکسیستی پروتئین نوترکیب C-CfTX1-STxB و هم‌چنین نتایج به دست آمده می‌توان نانوذرات PLA-PEG-PLA را به عنوان حامل مناسب جهت تهیه واکسن علیه زهر عروس دریایی برای بررسی‌های بیش‌تر پیشنهاد داد.

واژه‌های کلیدی: واکسن‌ها، Polylactide-polyethylene glycol-polylactide, Scyphozoa. Cnidarian Venoms

مقدمه

عروس دریایی از خانواده بی‌مهرگان و از رده کیسه‌تنان می‌باشد. از میان ۲۰۰ گونه عروس دریایی، بیش از ۱۰۰ گونه برای انسان خطرناک تشخیص داده شده که از این میان خطرناک‌ترین گونه، عروس دریایی جعبه‌ای می‌باشد که بیش‌ترین آسیب را به انسان می‌رساند [۱]. سالیانه حدود ۱۵۰ میلیون مورد گزش با عروس دریایی در سرتاسر جهان گزارش می‌شود [۲]. در سال ۱۳۹۲، ۳۰۵ مورد گزیدگی در آب‌های خلیج فارس توسط عروس دریایی گزارش شده است [۳]. گزش توسط عروس دریایی یک تهدید جدی برای گردشگران و ماهیگیران بوده و از لحاظ اقتصادی و سلامت مهم می‌باشد [۴]. فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در نماتوسیت عروس دریایی جعبه‌ای دو پروتئین CFTX-1 و CFTX-2 با وزن مولکولی ۴۰ و ۴۲ کیلودالتون می‌باشند [۵]. ژن CFTX دارای ۱۴۹۳ جفت باز، ۴۶۱ اسید آمینه و دارای mRNA خطی می‌باشد که پروتئینی به وزن مولکولی ۵۱ کیلو دالتون را کد می‌کند [۴]. در سال‌های اخیر نانوذرات و به ویژه نانوذرات پلیمری به عنوان سیستم‌های رسانش دارو و واکسن مورد توجه قرار گرفته‌اند. این حامل‌های کلوئیدی دارای قابلیت انتقال هدفمند و کنترل شده دارو و واکسن می‌باشند [۶]. پلی‌لاکتیک‌اسید PLA نوعی پلیمر زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر می‌باشد که از منابع تجدیدپذیر به دست می‌آید. می‌توان از طریق تغییر در ترکیب این پلیمر خواص آن را بهبود بخشید. برای مثال در رهایش کنترل شده واکسن و دارو می‌توان با اضافه کردن PEG (پلی‌اتیلن گلیکول) زمان رهایش را تغییر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

داد. از سوی دیگر PEG دارای مزایایی فراوانی مانند آب‌دوستی خوب، انعطاف‌پذیری، آنتی‌فاگوسیتوز علیه ماکروفاژها و سازگاری با محیط زیست می‌باشد [۶،۷]. حاصل تخریب کوپلیمر پلی‌لاکتیک اسید می‌تواند به چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک وارد شده و از کلیه خارج شود [۸]. استفاده از PEG می‌تواند بارگذاری را افزایش، اثرات مضر را کاهش و زمان ماندگاری واکسن و دارو را طولانی‌تر کند [۹]. توبیو و همکاران در سال ۱۹۹۸ در بررسی نقش انتقالی نانوذرات PLA و PLA-PEG نشان دادند که در هنگام استفاده از نانوذرات PLA-PEG نسبت به PLA تیتر آنتی‌بادی بالاتر بود [۱۰]. یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر کوپلیمر PLA-PEG-PLA همراه با آنتی‌ژن HCV را به عنوان یک کاندید واکسن دهانی بررسی کردند و اعلام نمودند که این کوپلیمر با یک تزریق دارای اثرات ایمنی‌زایی طولانی‌مدت می‌باشد [۱۱]. ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی بررسی‌های انجام شده کوپلیمرهای PEG-PLGA را کاندید مناسبی جهت سازه‌های میسلی به عنوان حامل داروهای نامحلول معرفی کردند [۱۲]. با توجه به صدمات ناشی از سم عروس دریایی و نظر به اهمیت درمانی آن هدف از این مطالعه بررسی ایمنی‌زایی و ارزیابی تیتر آنتی‌بادی تولیدی علیه پروتئین نوترکیب آزاد و کپسوله شده توسط کوپلیمرهای سه بلوکه PLA-PEG-PLA در موش سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری حاوی ناقل بیانی ژن C-cftx1-stxB از مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. ژن‌های خالص‌سازی پروتئین نوترکیب C-CfTXA-STxB: پس از بیان پروتئین نوترکیب C-CfTXA-STxB در باکتری E. coli، آنتی‌ژن تولیدی توسط ستون نیکل خالص‌سازی شد. پس از خالص‌سازی، پروتئین نوترکیب تولید شده توسط وسترن‌بلات تایید شد [۱۳].

کپسوله‌سازی پروتئین نوترکیب در کوپلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA با استفاده از روش تبخیر حلال: آنتی‌ژن نوترکیب C-CfTXA-STxB توسط پلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA با استفاده از روش تبخیر حلال کپسوله شد [۱۴]. برای این هدف ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از پلیمر PLA-PEG-PLA به دو میلی‌لیتر فاز آلی THF اضافه شد. پس از حل شدن کامل پلیمر به مدت یک ساعت با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه، فاز آبی حاوی یک میلی‌گرم پروتئین به صورت قطره قطره به فاز آلی اضافه شد. امولسیون W/O به دست آمده را به فاز آبی حاوی پلی‌وینیل الکل اضافه کرده و برای چند ثانیه ورتکس و پس از آن سونیکیت انجام شد تا امولسیون W/O/W به‌دست آید. امولسیون حاصله به منظور تبخیر فاز آلی به مدت دو ساعت بر روی هم‌زن مغناطیسی هم زده شد تا نانوذرات حاصل شود. این نانوذرات به‌وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری، شسته و لیوفیلیزه گردید.

تعیین بازده کپسوله‌سازی آنتی‌ژن: درصد پروتئین لود شده در نانوذرات تهیه شده به‌وسیله حل کردن نانوذرات در حلال آلی THF به‌دست آمد. محتوای پروتئین لود شده بعد از دو ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۵۰۰ دور به‌وسیله اسپکتروفوتومتر UV/VIS اندازه‌گیری شد.

بازده کپسوله‌سازی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$EE = \frac{m}{m_0} \times 100\%$$

m0= میزان پروتئین اولیه، m= میزان پروتئین لود شده در نانوذرات

تعیین خصوصیات مورفولوژیکی و اندازه نانوذرات: مشخصات مورفولوژیکی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترون روبشی مدل (KYKY-EM3200) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین شاخص پراکندگی نانوذرات با استفاده از پراش نور پویا اندازه‌گیری شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین آزاد و کپسوله شده با استفاده از الایزا غیر مستقیم: از موش‌های سوری به عنوان نمونه آزمون و شاهد به منظور تولید آنتی‌بادی استفاده شد. PBS به همراه ادجوانت فروند کامل و یا ناقص به عنوان شاهد، پروتئین نوترکیب به همراه ادجوانت فروند کامل و یا ناقص، نانوذرات PLA-PEG-PLA-C-CfTXA-STxB و نانوذرات شاهد PLA-PEG-PLA طی چهار نوبت به گروه‌های موشی به ترتیب روز اول (۲۰ میکروگرم)، روز چهارده (۱۵ میکروگرم)، روز بیست و هشتم (۱۰ میکروگرم) و روز چهل و دوم (۱۰ میکروگرم) به صورت زیر پوستی تزریق شد [۱۵]. خونگیری از موش‌ها یک هفته پس از تزریق دوم، یک هفته پس از تزریق سوم، یک هفته پس از تزریق چهارم و روز ۶۰ صورت پذیرفت. پس از جداسازی سرم از خون‌های جمع‌آوری شده، نمونه‌های سرمی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای بررسی تیتر آنتی‌بادی IgG در سرم موش‌های ایمن شده از روش الایزا غیرمستقیم استفاده شد. (جدول ۱)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

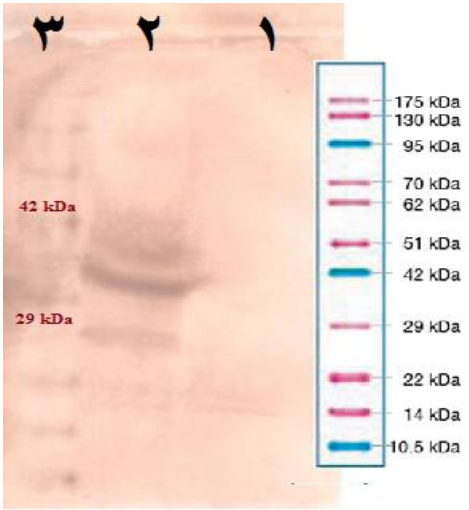
جدول ۱. گروه ها، زمان و مقادیر پروتئینی غیر بارگذاری شده تزریقی در مراحل ایمن سازی

گروه	پروتئین تزریقی	تزریق۱ (۲۰ میکروگرم) روزاول	تزریق۲ (۱۵ میکروگرم) روز۱۴	تزریق۳ (۱۰ میکروگرم) روز۲۸	تزریق۴ (۱۰ میکروگرم) روز۴۲	تعداد موشها در هر گروه	روش تزریق
۱	پروتئین C-CfTXA-STxB	+ ادجوانت کامل	+ ادجوانت ناقص	+ ادجوانت ناقص	+ ادجوانت ناقص	۵ سر در هر گروه	زیرپوستی
۲	پروتئین C-CfTXA-STxB بارگذاری شده در نانوذرات PLA-PEG-PLA	+	+	+	+		
۳	نانوذراتPLA-PEG-PLA	+	+	+	+		
۴	PBS	+	+	+	+		

آنالیز آماری. برای بررسی آماری داده‌های حاصل از تیتر آنتی‌بادی تولید شده توسط الایزای غیرمستقیم در سرم، از آزمون‌های ANOVA و T .test استفاده شد. این آزمون برای مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی نمونه‌ها (آزمون دانکن برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها) در سطح خطای پنج درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

نتایج

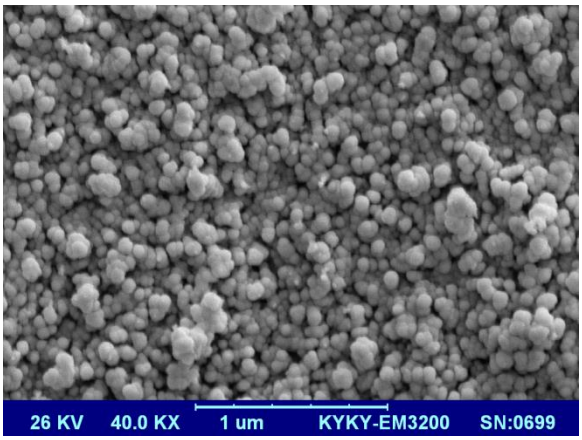
تائید پروتئین نوترکیب C-CfTXA- STxB با استفاده از وسترن‌بلات: پس از انجام این آزمون، رنگ‌پذیری کاغذ نیتروسلولز در مقابل باند ۳۲ کیلو دالتونی نشانگر ملکولی پروتئین انجام شد (شکل ۱).



شکل۱. تصویر آنالیز وسترن بلات تائید آنتی‌ژن کایمر C-CfTX۱-STxB. ردیف ۱: BSA به عنوان شاهد منفی. ردیف ۲: باند متعلق به آنتی‌ژن C-CfTX۱-STxB تخلیص شده از روی ژل. باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۳۲ کیلو دالتون نشانگر مولکولی پروتئین می‌باشد. ردیف ۳: نشانگر مولکولی پروتئین.

تعیین بازده کپسوله‌سازی آنتی‌ژن: پس از ساخت نانوذرات بازده کپسوله‌سازی آنتی‌ژن محاسبه شد. بر اساس نتایج به دست آمده بازده کپسوله‌سازی آنتی‌ژن نوترکیب C-CfTXA-STxB در نانوذرات PLA-PEG-PLA-C-CfTXA-STxB، ۷۱ درصد بود.

تعیین توزیع اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات: با استفاده از DLS اندازه و خصوصیات ذرات در محلول به دست آمد. با تهیه کوپلیمر PLA-PEG-PLA حاوی آنتی‌ژن C-CfTX1-STxB و بررسی ویژگی‌های آن مشخص گردید که ذرات دارای متوسط اندازه ۱۷۶/۱ نانومتر هستند. میزان شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده برابر ۰/۶۵ می‌باشد (شکل ۲).

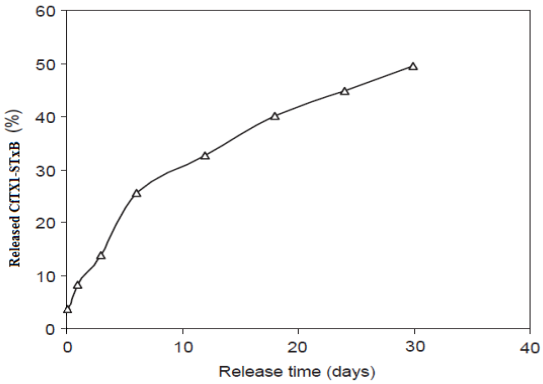


شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM نانوذرات تهیه شده به روش تبخیر حلال.

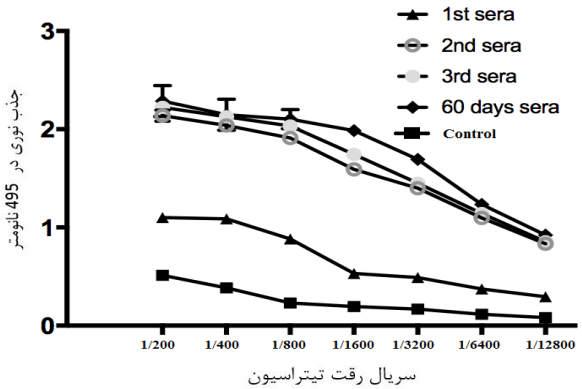
الگوی رهایش آنتی‌ژن C-CfTX1-STxB در محیط آزمایشگاهی: میزان رهایش C-CfTX1-STxB بعد از ۳۰ روز میزان ۴۹/۶ درصد بوده است (شکل ۳).

بررسی تیتر آنتی‌بادی به روش الایزای غیر مستقیم: به منظور ارزیابی تیتر آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. بعد از جداسازی سرم آزمایش الایزا انجام شد. نمودار میانگین تیتر آنتی‌بادی تولیدی در هر مرحله در شکل ۴، ۵، ۶ و ۷ نشان داده شده است. اختلاف تیتر آنتی‌بادی تولیدی بین گروه‌های تزریقی و کنترل معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$).

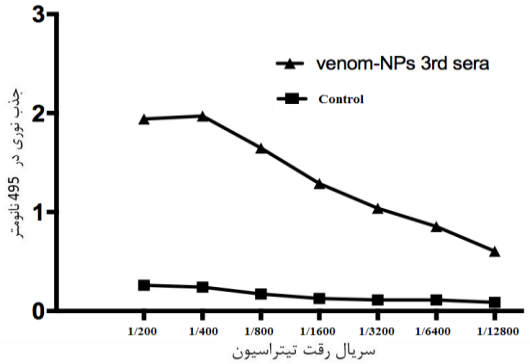
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



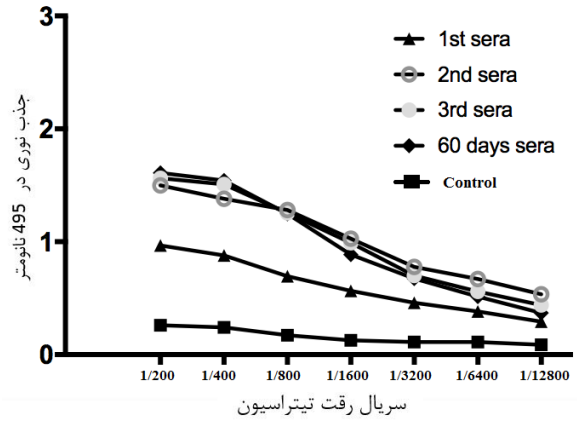
شکل ۳. پروفایل رهایش آنتی‌ژن C-CfTX۱-STxB از نانوذرات در محیط آزمایشگاهی. هشت درصد پروتئین کپسوله شده در روز اول رهایش پیدا کرد و میزان رهایش در روز ۷، ۲۱ و۳۰ به ترتیب ۲۵، ۴۱ و ۴۹,۶ درصد بوده است.



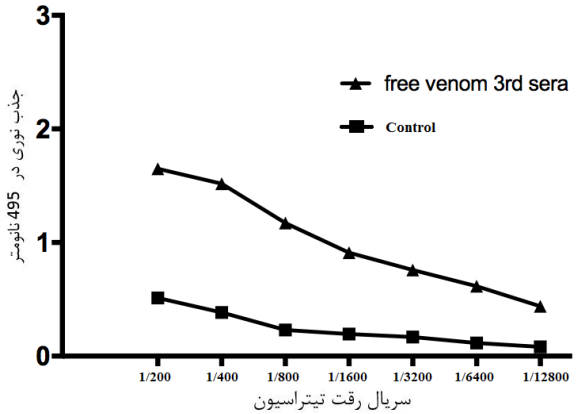
شکل۴. نمودار بررسی تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه نمونه آنتی‌ژن C-CfTX۱-STxB آزاد به همراه ادجوانت.



شکل ۵. نمودار بررسی تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه آنتی‌ژن C-CfTX۱-STxB کپسوله شده.



شکل ۶. نمودار بررسی تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده یک هفته پس از چهارمین تزریق (سرم حاصل از خون‌گیری سوم) در موش سوری علیه نمونه زهر عروس دریایی آزاد تزریقی به همراه ادجوانت.



شکل ۷. نمودار بررسی تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده یک هفته پس از چهارمین تزریق (سرم حاصل از خون‌گیری سوم) در موش سوری علیه زهر عروس دریایی کپسوله.

چالش موش‌های ایمن با استفاده از زهر خام عروس دریایی: پس از استحصال زهر خام عروس دریایی و پس از محاسبه میزان نیمه دُزکشنده (LD50)، سم با غلظت ۵۰ برابر به موش‌های ایمن شده تزریق شد. نتایج چالش مقاومت موش‌ها را نشان داد [۱۶].

بحث و نتیجه‌گیری

پیچیدگی زهر CfTX عروس دریایی نشان‌دهنده یک چالش درمانی منحصر به فرد هست که نیاز به ابداع روش‌های درمانی و پیشگیری را یادآوری می‌کند. در حال حاضر بخش عمده‌ای از اطلاعات در مورد زهر کیسه‌تنان از شقایق دریایی و مرجان نرم به دست آمده و اطلاعات کم‌تری مربوط به عروس دریایی وجود دارد [۱۷،۱۸]. بنابراین ارزشمند هست که زهر عروس دریایی با هدف درمانی، برای درمان گزیدگی یا

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

نیش‌زدگی و یا به عنوان ترکیباتی برای طراحی دارو مورد استفاده قرار گیرد [۴]. اغلب مطالعات انجام شده برای درمان گزیدگی عروس دریایی با هدف تولید پادزهر انجام شده است. تهیه پادزهر یکی از راه‌های درمانی در مقابل زهر عروس دریایی می‌باشد، اما این درمان دارای مشکلاتی است. دلایل زیادی برای عدم تاثیر مناسب پادزهر وجود دارد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، تاثیر سریع زهر و کاردیوتوکسیک و نوروتوکسیک بودن ونوم عروس دریایی می‌باشد که استفاده از ایمنی غیر فعال برای آن موضوعیت ندارد [۱۷]. قسمت ۵۷۶ جفت‌بازی پروتئین CfTX-1 زهر عروس دریایی به‌عنوان یک ایمونوژن غالب مطرح می‌باشد و می‌توان آن را به عنوان کاندید واکسن نوترکیب مورد بررسی قرار داد [۲۳،۲۱]. پایداری آنتی‌بادی طی مراحل مختلف و تحت شرایط فیزیولوژیک برای استفاده موفقیت‌آمیز از آن در بحث درمان از طریق ایمنی غیرفعال بسیار اهمیت دارد. در طی دهه اخیر، استفاده از نانومواد در کاربردهای وسیعی از حوزه‌های متعدد پزشکی به‌سرعت توسعه یافته است که یکی از این حوزه‌ها طراحی سامانه‌های واکسن و دارورسانی ویژه مبتنی بر حامل‌های نانویی می‌باشد [۱۹،۲۰]. این حامل‌های نانو دارای قابلیت انتقال هدفمند و کنترل شده دارو و واکسن و هم‌چنین کاربرد در کپسوله‌سازی داروهای نامحلول در آب می‌باشند [۲،۳]. حدوداً تخمین زده می‌شود که ۴۰ درصد داروهایی که ساخته می‌گردند در آب نامحلول هستند که این امر کاربرد ترکیبات را به دلیل دسترسی پایین زیستی آن‌ها، محدود می‌کند [۵]. نانوذرات پلیمری که برای سیستم‌های دارورسانی به کار می‌روند لازم است از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار تشکیل شده و دارای اندازه ذرات معین و توزیع اندازه مناسبی باشند تا حامل دارویی عملکرد مناسبی داشته باشند و پس از رهایش دارو بتواند به‌راحتی از بدن دفع شود [۷،۲۲]. چنین ویژگی‌هایی باعث بهبود اثر درمانی یک دارو و کاهش سمیت و اثرات جانبی آن می‌گردد. پس از بررسی ویژگی‌های پلیمرهای طبیعی متعدد و ارزیابی عملکرد آن‌ها در دارورسانی کنترل‌شده از طریق مسیر زیرجلدی کوپلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA جهت کپسوله‌سازی کاندید واکسن مورد نظر انتخاب گردید. این پلیمر به سبب ویژگی‌های متعدد و منحصربه‌فردی که دارد می‌تواند انتخاب مناسبی برای رهایش کنترل‌شده و تحریک پاسخ ایمنی باشد. کامس و همکاران با اتصال مولکول اندوکولیدین به انتهای زنجیره PEG-PLA رویکرد جدیدی برای توسعه سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن را بررسی کردند [۲۲]. در این پژوهش بارگذاری پروتئین نوترکیب در کوپلیمر سه بلوکه PLA-PEG-PLA با استفاده از روش تبخیر حلال نتایج مناسبی را نشان داد. با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی PLA-PEG-PLA، نتایج الیزا در خونگیری دوم و سوم و ۶۰ روزه و نتایج هنری و همکاران در سال ۱۴۰۰ و یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ [۲۲،۱۱]. با کاهش تعداد دوزهای تزریقی مورد استفاده می‌توان به ایمنی‌زایی مورد نظر رسید.

نتایج تیتر آنتی‌بادی نشان داد در گروه‌های تزریقی میزان تیتر آنتی‌بادی IgG در هر مرحله افزایش یافته است و گروه کنترل و نانوذرات شاهد فاقد آنتی‌ژن تیتر آنتی‌بادی قابل توجهی را نشان ندادند. اختلاف تیتر آنتی‌بادی تولیدی بین گروه‌های تزریقی و کنترل معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$). در ادامه چالش موش‌های نژاد سوری توسط آنتی‌ژن کایمر C-CfTX1-STxB به شکل آزاد و بارگذاری شده در نانوذرات PLA-PEG-PLA حاکی از نتایج موفقیت‌آمیزی بود. چنان که موش‌ها تا ۵۰ برابر متوسط دوز کشنده را تحمل کردند. اختلاف میزان تیتر آنتی‌بادی IgG به شکل آزاد و بارگذاری شده ناشی از آزاد شدن پایدار آنتی‌ژن به‌وسیله ادجوانت و نانوذره می‌باشد. رهایش آنتی‌ژن به‌وسیله ادجوانت در مدت زمان کوتاه ۴۵ روزه بهتر از آنتی‌ژن به‌وسیله نانوذره بوده ولی با مطالعه آن در زمان طولانی عملکرد متغیر نانوذره نسبت (به‌دلیل رهایش طولانی‌مدت) به ادجوانت بهتر خواهد بود. در انتها با توجه به عدم خاصیت کاردیوتوکسیستی و نوروتوکسیستی پروتئین نوترکیب C-CfTX1-STxB و هم‌چنین نتایج به دست آمده می‌توان نانوذرات PLA-PEG-PLA را به عنوان حامل مناسب جهت تهیه واکسن علیه زهر عروس دریایی برای بررسی‌های بیش‌تر پیشنهاد داد.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع)، که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاس‌گزاری می‌شود.

مشارکت و نقش نویسندگان

آقای حسین هنری: نویسنده مسئول مقاله، ارائه طرح اصلی و صاحب پروژه طرح. آقای سید مجتبی آقایی: جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله و همکار طرح. آقای مهدی حسین‌زاده: کمک در انجام طرح و کارهای آزمایشگاهی و دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد مرکز.

منابع

[1] Brinkman DL, Konstantakopoulos N, McInerney BV, Mulvenna J, Seymour JE, Isbister GK, Hodgson WC. Chironex fleckeri (Box Jellyfish) venom proteins. J Biol Chem 2014; 289: 4798-4812.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

delivery applications. J Control Release 2014; 183: 77-86. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.026 PMid:24675377

[13] Honari H, Aghaee SM, Hosseinzadeh M. Subcloning and expression of the chimeric antigen C-CFTX1-STxB of the jellyfish venom and its antigenicity assessment in syrian mice. J Ilam Univ Med Sci 2019; 27: 24-36. (Persian). https://doi.org/10.29252/sjimu.27.5.24

[14] Locatelli E, Comes Franchini M. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. J Nanopart Res 2012; 14: 1-7. https://doi.org/10.1007/s11051-012-1316-4

[15] Honari H, Minaei M, Mirhaj H, Etemad- Ayoubi M. Antibody titers of PEG-PLA block copolymer nanosphere containing chimeric recombinant protein of protective antigen and lethal factor of Bacillus anthracis. Koomesh 2021; 23: 441-448. (Persian). https://doi.org/10.52547/koomesh.23.4.441

[16] Jafari H, Honari H, Zargan J, Tamadoni Jahromi S. Extraction the venom of Rhopilema nomadica from the Persian Gulf coast and the investigation of its hemolytical activity. Yafte 2019; 21: 86-95. (Persian).

[17] Isbister GK. Antivenom efficacy or effectiveness: The Australian experience. Toxicology 201; 268: 148-154. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.013 PMid:19782716

[18] Mariottini GL. Hemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish-an overview. J Venom Res 2014; 5: 22-32.

[19] Singh NA, Mandal AK, Khan ZA. Fabrication of PLA-PEG nanoparticles as delivery systems for improved stability and controlled release of catechin. J Nanomaterials 2017; 2017. https://doi.org/10.1155/2017/6907149

[20] Xiao RZ, Zeng ZW, Zhou GL, Wang JJ, Li FZ, Wang AM. Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles. Int J Nanomedicine 2010; 5: 1057-1065. https://doi.org/10.2147/IJN.S14912 PMid:21170353 PMCid:PMC3000205

[21] Ding Y, Feng W, Lu B, Wang P, Wang G, Ji J. PLA-PEG-PLA tri-block copolymers: Effective compatibilizers for promotion of the interfacial structure and mechanical properties of PLA/PBAT blends. Polymer 2018; 146: 179-187. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.05.037

[22] 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. PLoS One 2013; 8: 0061885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061885 PMid:23637922 PMCid:PMC3639271

[23] Honari H, Aghaie SM, Jalilpour H. Immunogenicity of N-CfTX-2 antigen of chironex fleckeri jellyfish in mice. Qom Univ Med Sci J 2018; 12: 47-57. (Persian). https://doi.org/10.29252/qums.12.9.47

https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534149 PMid:24403082 PMCid:PMC3931041

[2] Currie BJ. Marine antivenoms. J Toxicol Clin Toxicol 2003;41(3):301-8. PubMed https://doi.org/10.1081/CLT-120021115 PMid:12807313

[3] IRNA news magazine, News Date: 2014/01/26, Tehran "Director of public relation and relief organization of the red crescent society warned the Persian gulf travelers about the Nowruz. from the beginning of Nowruz, 305 passengers and tourists have been swimming in the glacial waters of the Persian Gulf On the beaches of the cities of Konarak and Chabahar were selected by the Sea of Jucas". the code is: 80597606 (3226534) (Persian).

[4] Alam MJ, Ashraf KU. Prediction of an epitope-based computational vaccine strategy for gaining concurrent immunization against the venom proteins of australian box jellyfish. Toxicol Int 2013; 20: 235-253. https://doi.org/10.4103/0971-6580.121677 PMid:24403734 PMCid:PMC3877492

[5] Brinkman D, Konstantakopoulos N, McInerney M, Mulvenna J, Seymour J, Isbister G, Hodgson WC. Chironex fleckeri (box jellyfish) venom proteins: expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. J Biol Chem 2014; 289: 4798-4812. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534149 PMid:24403082 PMCid:PMC3931041

[6] Kim K, Yu M, Zong X, Chiu J, Fang D, Seo YS, et al. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly (D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. Biomaterials 2003; 24: 4977-4985. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00407-1

[7] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf B Biointerfaces 2010; 75: 1-18. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001 PMid:19782542

[8] Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (L,DL-lactide) and poly (L-lactide-co-glycolide). Biomaterials 1996; 17: 831-839. https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)81421-9

[9] Lee BK, Yun Y, Park K. PLA micro- and nano-particles. Adv Drug Deliv Rev 2016; 107: 176-191. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.020 PMid:27262925 PMCid:PMC5133193

[10] Tobío M, Sánchez A, Vila A, Soriano II, Evora C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. Colloids Surf B Biointerfaces 2000; 18: 315-323. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00157-5

[11] Yang Y, Kuang Y, Liu Y, Li W, Jiang Z, Xiao L, Li M. Immunogenicity of multiple-epitope antigen gene of HCV carried by novel biodegradable polymers. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2011; 34: 65-72. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.02.003 PMid:20542567

[12] Zhang K, Tang X, Zhang J, Lu W, Lin X. PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 24, Issue 4 July and August 2022, 538 - 543

C-CfTXA-STxB chimeric antigen loading in PLA-PEG-PLA tri-block copolymers and its immunization in mice

Hosein Honari (Ph.D) *, Seyed Mojtaba Aghaie (Ph.D), Mahdi Hoseinzadeh (M.Sc)
-Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 9123848187 honari.hosein@gmail.com Received: 19 Jun 2021; Accepted: 6 Dec 2021

Introduction*:* The venom of Jellyfish venom contains a variety of bioactive proteins that can be studied for vaccine application. Poly-Lactic Acid is a biodegradable polymer that is used in vaccine systems. The aim of this study was to encapsulate the C-CfTX1-STxB protein into PLA-PEG-PLA three-block copolymer and its immunogenicity study in mice.

Materials and Methods*:* After purification, the protein was confirmed by Western Blot. Then, the antigen was loaded in the three-block copolymer using the solvent evaporated method and prepared nanoparticles characteristics by SEM electron microscopy and DLS. Following encapsulated and free antigen with complete and incomplete adjuvant, PBS and PLA_PEG-PLA nano were injected subcutaneously into the mice four times. In the end, the amount of antibody produced was measured by indirect ELISA and the survival of immunized animals against challenges by jellyfish venom was studied.

Results: The results showed that the prepared nanoparticles have good quality and quantity. The size of the nanoparticles was 176.1 nm and the protein encapsulation efficiency was 71%. In the end, it was shown that immunized mice survived the challenge with the venom and the production of antibody titers was directly related to laboratory animal resistance.

Conclusion: Regarding the lack of cardiotoxicity and neurotoxicity of the recombinant C-CfTX1-STxB protein, as well as the results, PLA-PEG-PLA nanoparticles could be suggested as suitable carriers for the preparation of a vaccine against jellyfish venom for further investigation.

Keywords*:* Vaccine, Polylactide-polyethylene glycol-polylactide, Scyphozoa. Cnidarian Venoms

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]