

بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن BLF1 بورخوردریا سودومالئی با نانوذره PLGA در موش سوری

مهدی دهاتی کهنه‌شهری^۱، حسین هنری^{۱*}، داود صادقی^۱، سید مجتبی آقایی^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: باکتری بورخوردریا سودومالئی عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان بوده و از راه خوراکی، استنشاقی و یا از طریق خراش پوستی به انسان منتقل می‌شود. پروتئین BLF1 این باکتری، در سلول‌های میزبان باعث توقف پروتئین‌سازی می‌شود. PLGA به عنوان پلیمر زیست تخریب، جهت بارگذاری انواع مولکول‌های دارویی و پروتئینی، کاربرد دارد. هدف از این مطالعه، بیان پروتئین BLF1 توسط *E coli* و بارگذاری آن در پلیمر PLGA و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش سوری می‌باشد.

روش بررسی: در این پژوهش، بیان ژن blf1 به وسیله القای IPTG انجام و پروتئین نوترکیب با تکنیک وسترن‌بلات تایید شد. پس از تخلیص پروتئین، آنتی‌ژن در پلیمر PLGA بارگذاری شد. سایز و پتانسیل زتای نانوذره حاوی پروتئین، اندازه‌گیری شد. پروتئین همراه با ادجوانت؛ نانوذره PLGA و PBS در دو و چهار نوبت به گروه‌های موش تزریق شد. میزان آنتی‌بادی در سرم آن‌ها توسط تست الایزا اندازه‌گیری شد. در پایان موش‌ها با سم BLF1 چالش شدند. از نرم‌افزار SPSS version 16 جهت آنالیز آماری استفاده شد.

نتایج: نانوذرات PLGA حاوی پروتئین نسبت به نانوذرات فاقد پروتئین، اندازه PDI بالاتر و پتانسیل زتای منفی‌تری داشتند. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات حدود ۹۵٪ بود. نتایج تست چالش، حفاظت ۵۰٪ گروه حاوی نانوذره و حفاظت ۷۵٪ گروه حاوی پروتئین همراه ادجوانت را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به دفعات تجویز و میزان تیتراژ آنتی‌بادی پروتئین نوترکیب همراه با نانوذره و نتایج حاصله، این پروتئین می‌تواند به‌عنوان کاندید واکسن علیه بیماری میلوئیدوزیس مدنظر باشد.

واژه‌های کلیدی: BLF1، PLGA، میلوئیدوزیس، بورخودریا سودومالئی، کاندید واکسن

ارجاع: دهاتی کهنه‌شهری مهدی، هنری حسین، صادقی داود، آقایی سید مجتبی. بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن BLF1 بورخوردریا سودومالئی با نانوذره PLGA در موش سوری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۲): ۴۲-۸۷۲۹.

۱- مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، پست الکترونیکی: honari.hosein@gmail.com، صندوق پستی: ۱۶۵۱۱۳۶۷۷۱

مقدمه

باکتری *بورخولدريا سودومالئی* یک باسیل گرم منفی بیماری‌زا است که در سراسر جهان در خاک‌های مرطوب، گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شود (۱). این باکتری می‌تواند در شرایط نامساعد محیطی مانند pH پایین، دمای بالا و کمبود مواد غذایی، زنده بماند (۲،۳). باکتری *بورخولدريا سودومالئی* باعث ایجاد بیماری عفونی در انسان، حیوان و بعضی گیاهان می‌شود (۴). تماس با عامل عفونی در انسان می‌تواند به صورت ذات‌الریه شدید، سپتیمیسمی و عفونت‌های پوستی ظاهر شود (۱). این باکتری در سال ۲۰۰۹، جز عوامل رده B بیولوژیک قرار گرفته است (۵). دوره نهفتگی میلیتدوئیس در حدود ۲-۳ روز تا چندین ماه و یا سال متغیر است (۶). توالی‌یابی ژنوم باکتری *بورخولدريا سودومالئی* در سال ۲۰۰۴ کامل گردید. در سال ۲۰۱۱ گروهی از محققان بین‌المللی توسط گروه ویلسون Wilson و گروه رایس Rice در دانشگاه شفلید، اولین فاکتور سیتوتوکسین کشنده در باکتری *بورخولدريا سودومالئی* که باعث غیر فعال‌سازی سنتز پروتئین در میزبان می‌شود را شناسایی کردند (۷). انتقال ارگانسیم از راه‌های مختلفی می‌تواند انجام شود. منبع عفونت انسانی از راه خوراکی، استنشاقی و یا آلودگی از طریق خراش پوستی به بدن بیمار منتقل می‌شود (۸). تشخیص زودهنگام و شروع درمان بسیار مهم است. در مکان‌هایی که امکانات پیشرفته برای تشخیص و درمان وجود دارد، مرگ و میر حدود ۱۰٪ است، ولی در مناطق محروم، بالاتر از ۴۰٪ می‌باشد (۹). آنالیز پروتئوم باکتری *بورخولدريا سودومالئی* مشخص نمود که ۱۴ پروتئین با عملکرد نامشخص در باکتری بیان می‌شوند (۱۰). در سایر مطالعات، بررسی برخی از این پروتئین‌های ناشناخته با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس انجام گردید که سبب تعیین ساختار پروتئین BPSL1545 شد و این پروتئین، اولین سم باکتری *بورخولدريا سودومالئی* می‌باشد که آن را به BLF1 تغییر نام دادند (۷). پروتئین BLF1 به صورت اختصاصی دامیناسیون Gln339 از Eukaryotic initiation factor 4A را به گلوتامیک اسید انجام می‌دهد (۱۱). این

تغییر فعالیت هلیکازی مورد نیاز باز کردن رشته دوتایی mRNA را برای شروع ترجمه، غیر فعال می‌کند، اما فعالیت ATPase را از eIF4A تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۱۲). PLGA یا (پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید) یکی از توسعه یافته‌ترین پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر است (۱۳). نانوذرات پلیمری زیست تخریب‌پذیر همانند نانوذرات PLGA به دلیل ویژگی‌هایی که در زمینه دارورسانی و نانو واکسن‌ها دارند، بر انواع دیگر حامل‌ها ترجیح داده می‌شوند. این نانوذرات، ویژگی رهاسازی کنترل‌شده، ممتد و اندازه‌ای در ابعاد سلولی داشته و با بافت‌ها و سلول‌ها، زیست‌سازگاری دارند. علاوه بر این، نانوداروها در خون پایدار و غیرسمی بوده و از فاقد مضراتی چون لخته کردن خون، تحریک غیرطبیعی سیستم ایمنی، التهاب‌زایی و فعال کردن نوتروفیل‌ها هستند و برای حمل انواع مولکول‌های دارویی، پروتئینی، پپتیدی و نوکلئیک اسیدی مناسب هستند سیستم‌های نوین دارورسانی در واقع حامل‌های دارویی جدیدی هستند که جهت کاهش دوز مصرفی، کاهش عوارض جانبی و افزایش کارایی داروها به کار می‌روند. با توجه به فقدان واکسن برای این بیماری، با کلون و بیان ژن BLF1 و بررسی روش‌های مختلف ارائه دارو و مشاهده تیتراژ آنتی‌بادی می‌توان کاندید واکسنی علیه این باکتری تولید کرد (۱۴، ۱۱). هدف از این تحقیق استفاده از نانوذرات پلیمری PLGA جهت بارگذاری آنتی ژن BLF1 و بررسی ایمنی‌زایی و حفاظت آن در مقایسه با نمونه فاقد نانوذره است.

روش بررسی

بررسی بیان پروتئین نوترکیب: وکتور PET28 حاوی ژن BLF1 از مرکز زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهیه گردید (۱۵). وکتورهای بیانی PET28(+) دارای ژن نوترکیب BLF1 با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* B121DE3 تراخیخت شدند (۱۶). کلنی‌های نوترکیب با غربالگری به‌وسیله کانامایسین جدا گردید و با PCR مورد تایید قرار گرفت (۱۶). برای این منظور مخلوط واکنش به شکلی که در (جدول ۱) ذکر شده تهیه گردید. برای القاء بیان پروتئین

PAGE ۱۲٪ مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). برای مشاهده باندهای پروتئینی، از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو استفاده گردید (۱۸).

نوترکیب BLF1 از ماده IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار استفاده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۵،۱۷). نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند (۱۸). بیان پروتئین روی ژل SDS-

جدول ۱: ترکیب واکنش PCR

۱ میکرولیتر	پلاسمید استخراج‌شده
۱۲/۵ میکرولیتر	Master Mix
۱ میکرولیتر	پرایمر Forward (pET) CATCATCACAGCAGCGGCC
۱ میکرولیتر	پرایمر Reverse (pET)GGATCTCAGTGGTGGTGGT
۹/۵ میکرولیتر	آب دو بار تقطیر
۲۵ میکرولیتر	حجم کلی واکنش

نانوذرات تولید شده و بررسی پتانسیل زتا (Zeta Potential) از دستگاه DLS مدل Malvern ساخت کشور انگلستان متعلق به دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شد. جهت بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) مدل Quanta FEI 200 ساخت شرکت FEI استفاده شد.

بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات به روش غیر مستقیم

به منظور بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات پس از تهیه نانوذرات، از فرمول ۱ استفاده شد (۲۱).

هم‌چنین در این تحقیق برای تعیین مقدار پروتئین محبوس شده در نانوذرات از روش غیر مستقیم استفاده شد؛ و سپس با استفاده از دو فرمول ۲ و ۳ راندمان احتباس (LE) و ظرفیت احتباس (LC) نانوذرات محاسبه شد. این کار هم برای نانوذرات حاوی BSA و هم نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب انجام پذیرفت.

تایید و تخلیص پروتئین نوترکیب: برای تایید پروتئین‌های نوترکیب، از روش وسترن بلات استفاده شد (۱۸). پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (NI-NTA) جداسازی شد. پس از تخلیص پروتئین مدنظر بر روی ژل ۱۲٪ الکتروفورز شد (۱۹،۲۰). غلظت پروتئین نوترکیب با تکنیک برادفورد و با استفاده از BSA (آلبومین سرم گاوی) به عنوان استاندارد انجام شد (۱۹). تهیه نانوذرات پلیمری PLGA حاوی پروتئین نوترکیب:

برای تهیه نانوکپسول‌ها از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد. این روش بر خلاف روش امولسیون ساده یا یگانه که برای داروهای نامحلول در آب مناسب است، روشی مبتنی بر امولسیون آب-روغن-آب (Water/Oil/Water w/o/w) می‌باشد و یکی از مناسب‌ترین راه‌ها برای بارگذاری داروهای آب‌دوست نظیر پپتیدها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها است. در این روش، محلول بافری دارو به فاز آلی شامل پلیمر اضافه و تشکیل امولسیون اولیه (w/o) را می‌دهد. جهت بررسی اندازه

$$\text{Partical Yield\%} = \frac{\text{Dried nanoparticle weight}}{\text{Theoretical mass (Polymer + linker + protein)}} \times 100$$

فرمول ۱: فرمول محاسبه بازده وزنی نانوذرات

$$\text{Loading Efficeincy\%} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Total amount of protein}} \times 100$$

فرمول ۲: فرمول محاسبه راندمان احتباس

$$\text{Loading Capacity\%} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Dried nanoparticle weight}} \times 10$$

فرمول ۳: فرمول محاسبه ظرفیت احتباس

PCR انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز انجام شد (شکل ۱).

جهت بیان پروتئین با القای IPTG، لیز سلولی با کمک بافر دناتوره انجام گرفت و نتیجه حاصل روی ژل الکتروفورز ۱۲٪ بررسی شد. وزن مولکولی پروتئین BLF1 حدود ۲۳ کیلودالتون بود (شکل ۲).

پس از تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل (Ni-NTA) و رهاسازی توسط شیب غلظتی ایمیدازول، باند پروتئین تخلیص شده، خلوص قابل توجهی را نمایش می‌دهد (شکل ۳).

تایید پروتئین نو ترکیب: به منظور تایید محصول پروتئین نو ترکیب از روش وسترن بلات استفاده شد. در این تکنیک از آنتی‌بادی پلی کلونال موشی استفاده گردید (شکل ۴).

بررسی اندازه نانوذرات با استفاده از پراش نور پویا (DLS): پس از آماده‌سازی نمونه، نانوذرات PLGA تولید شده با پروتئین و بدون پروتئین BLF1 از نظر اندازه نانوذرات به وسیله دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده شامل، نانوذرات فاقد پروتئین دارای اندازه ۲۱۷ نانومتر و PDI = ۰/۹۴۰ و نانوذراتی حاوی پروتئین دارای اندازه ۲۸۶ نانومتر و PDI = ۰/۸۵۲ (شکل ۵) بودند.

ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی: مجوز کد اخلاق این پروژه در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی طی کد اخلاق شماره IR. IHU. REC. ۱۴۰۱-۰۴-۱۵ مورخ ۱۴۰۱/۴/۱۵ صادر گردیده است. موش‌های سوری ماده با وزن ۲۲ الی ۲۵ گرم به ۴ گروه ۵ تایی شامل، گروه‌های نانوذرات PLGA حاوی پروتئین و بدون پروتئین، PBS به عنوان شاهد و پروتئین همراه با ادجوانت تقسیم شدند. تزریقات در گروه‌های ادجوانتی و شاهد (PBS) در ۴ نوبت با فاصله زمانی ۱۴ روز به صورت صفاقی انجام گرفت. در تزریق پروتئین همراه با ادجوانت، طی مرحله اول ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن با ادجوانت کامل فروند ترکیب شد و در مراحل بعدی هم این عمل تکرار شد. پس از هر بار خون‌گیری به منظور بررسی تیتراژ آنتی‌بادی، از تکنیک الایزای غیر مستقیم استفاده شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی آماری داده‌های به دست آمده از تیتراژ آنتی‌بادی توسط الایزای غیر مستقیم، از آزمون‌های T-test، ANOVA، Normality و با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام گرفت.

نتایج

تایید حضور قطعه ژن نو ترکیب بوسیله PCR و بررسی بیان پروتئین نو ترکیب: جهت تایید کلنی‌های کشت داده شده،

بررسی پتانسیل زتا نانوذرات PLGA حاوی پروتئین نو ترکیب BLF1: این آزمون نیز از نمونه‌های نانوذرات PLGA که توزیع اندازه ذرات آن‌ها در مراحل قبلی مورد بررسی قرار گرفته بود تهیه شد. نتایج نشان‌دهنده این بود که پتانسیل زتا نانوذرات PLGA فاقد پروتئین دارای یک پیک میانگین در محدوده ۳۱/۳- میلی‌ولت و نانوذرات PLGA دارای پروتئین BLF1 دارای یک پیک میانگین ۳۳/۶- میلی‌ولت بود (شکل ۶).

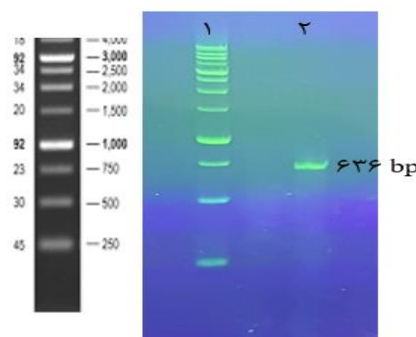
بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی: پس از تولید نانوذرات PLGA، نانوذرات بر روی یک سطح آلومینیومی پخش و سپس توسط لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کروی بودن سطح ذرات حاصل از فرایند تولید نانوذرات در شرایط بهینه را مطلوب نشان داد (شکل ۷).

بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات به روش غیرمستقیم: نتایج به‌دست‌آمده از فرمول‌های بررسی بازده وزنی، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات حاوی و فاقد پروتئین BLF1 از روش غیرمستقیم محاسبه گردید (جدول ۲).

ارزیابی تیتراژ IgG در سرم موش‌های ایمن شده: به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. نمودار میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در هر مرحله شامل موش‌هایی که آنتی‌ژن

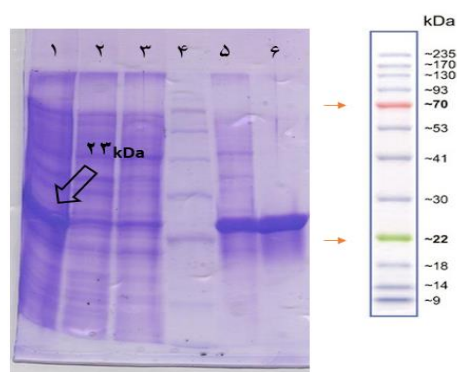
BLF1 همراه با نانوذره را به صورت تزریقی داخل صفاقی دریافت کردند (شکل ۸) و موش‌هایی که آنتی‌ژن BLF1 همراه با ادجوانت را به‌صورت تزریقی داخل صفاقی دریافت نمودند (شکل ۹) می‌باشد. آنالیز آماری حاصل از بررسی تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی توسط الایزای غیرمستقیم در قالب گروه‌های تست و شاهد به کمک نرم‌افزار SPSS version 16 صورت پذیرفت. به جهت انجام آنالیز آماری گروه‌های مختلف شماره‌گذاری شدند (جدول ۳). مقایسه بین گروه‌های مختلف توسط آزمون دانکن (جدول ۴) در سطح خطای پنج درصد ($P < 0.05$) صورت پذیرفت. آنالیز واریانس آنوا یک طرفه آزمون دانکن در بررسی تیتراژ IgG سرم خونی، اختلاف بین گروه‌ها را نشان می‌دهد (جدول ۳). گروه‌های موجود در ستون‌ها در سطح خطای پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

نتایج چالش موش‌های ایمن‌شده توسط پروتئین BLF1: ۶۰ روز پس از آخرین تجویز آنتی‌ژن جهت ایمنی‌زایی و پس از تأیید تیتراژ آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن‌شده علیه سم BLF1 توسط روش الایزای موش‌های تست و شاهد در گروه‌های ۴ تایی دسته‌بندی و به هر گروه از موش‌های تست و شاهد غلظت ۵۰ میکروگرم از سم به‌صورت تزریقی تجویز گردید. نتایج به این صورت بود که موش‌های ایمن‌شده با نانوذره حامل پروتئین، حفاظت ۵۰٪ و موش‌های ایمن‌شده با پروتئین همراه ادجوانت حفاظت قابل قبول ۷۵٪ را ایجاد می‌کنند (شکل ۱۰).

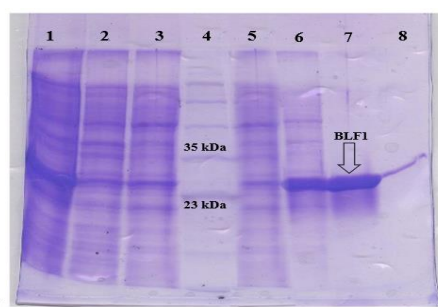


شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تکثیر قطعه ۶۳۶ جفت بازی ژن B1f1 توسط PCR

ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA. ردیف ۲: قطعه DNA

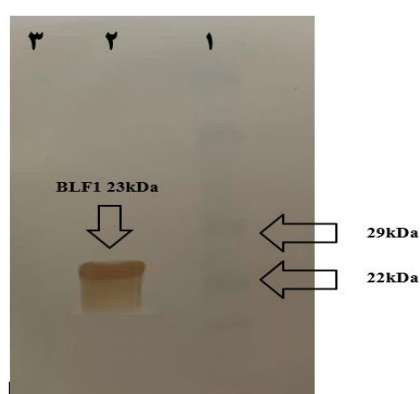


شکل ۲: نتیجه بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪. ستون ۱- نمونه القاء شده توسط IPTG ۱ میلی مولار، ستون ۲ و ۳- نمونه القاء نشده (کنترل منفی)، ستون ۴- نشانگر مولکولی پروتئین سینا کلون، ستون ۵-نمونه تخلیص شده

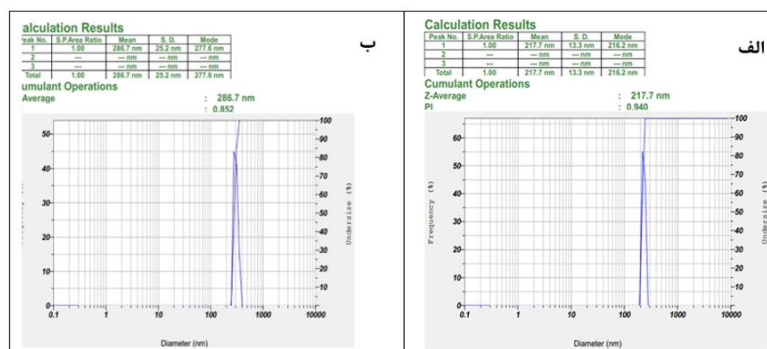


شکل ۳: تصویر الکتروفورز حاصل از تخلیص پروتئین BLF1 از ستون نیکل. با استفاده از ژل ۱۲٪ SDS-PAGE

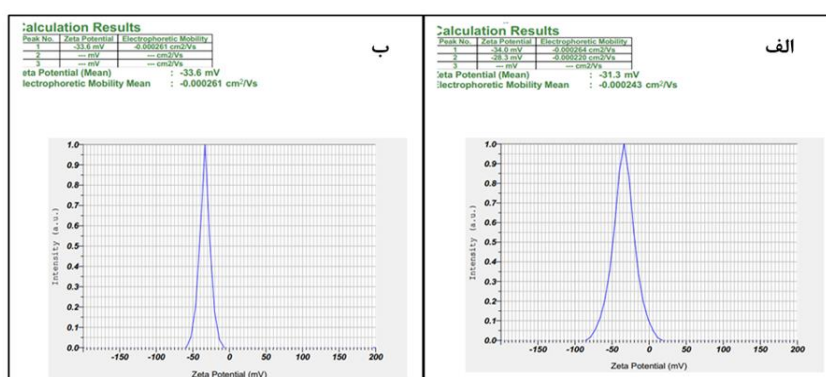
ستون ۱: flow قبل از ستون، ستون ۲: flow ستون، ستون ۳: بافر C، ستون ۴: مارکر شماره SM۳۱۰۰۰۳، ستون ۵: بافر D، ستون ۶: بافر E، ستون ۷: بافر MES، ستون ۸: بافر E250



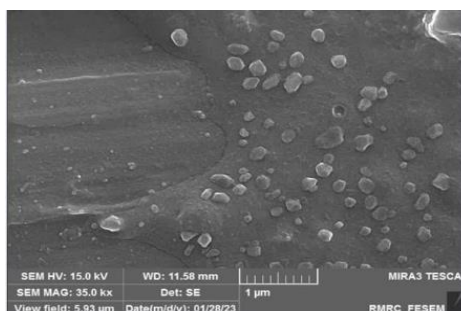
شکل ۴: الگوی آنالیز وسترن بلات تأیید آنتی‌ژن BLF1. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین، ردیف ۲: باند متعلق به آنتی‌ژن BLF1 تخلیص شده از روی ژل، باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۲۳ کیلوالتون نشانگر مولکولی پروتئین می‌باشد، ردیف ۳: BSA به عنوان شاهد منفی.



شکل ۵: الف. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات PLGA فاقد پروتئین BLF1 در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS. ب. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات PLGA حاوی پروتئین BLF1 در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS.



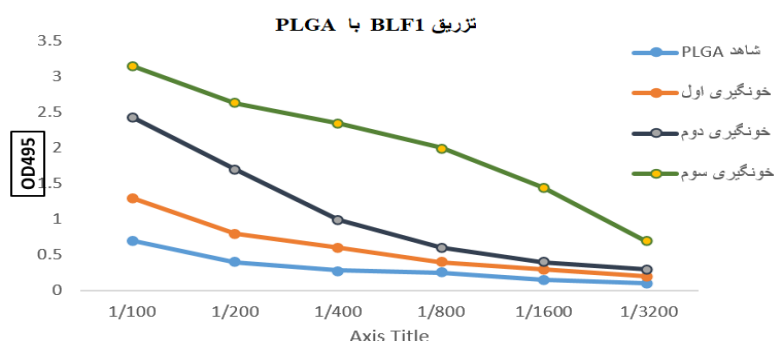
شکل ۶: الف. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات PLGA فاقد پروتئین BLF1 در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS. ب. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات PLGA دارای پروتئین BLF1 در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS.



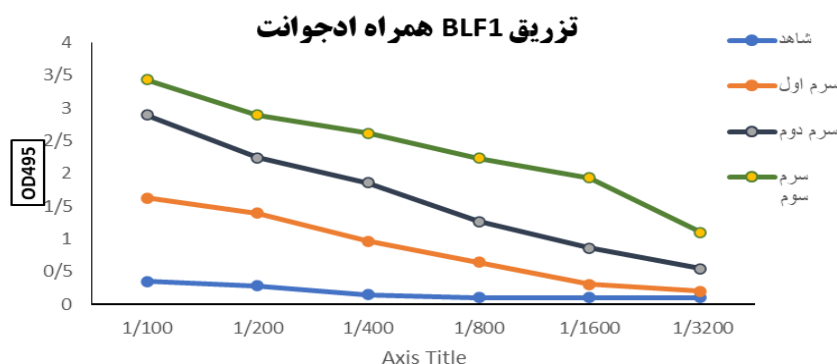
شکل ۷: تصویر میکروسکوپ الکترونی FESEM از نانوذرات PLGA حاوی BLF1 (نانوذرات خشک‌شده بر روی سطح شیشه‌ای، روی گرید قرار گرفته و پس از پوشش دهی با طلا، تصویربرداری شد)

جدول ۲: نتایج فرمول‌های بررسی بازده وزنی، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس

گروه‌ها	LE درصد	PY درصد	LC درصد
نانوذرات PLGA حاوی BSA	۶۲	۵۵	۴/۹
نانوذرات PLGA حاوی BLF1	۹۵	۶۷/۹۷	۹/۲



شکل ۸: تیترآنتی‌بادی تولید شده علیه BLF1 کپسوله شده با PLGA تزریقی به صورت داخل صفاقی در سرم موش‌های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی: جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می‌دهد.



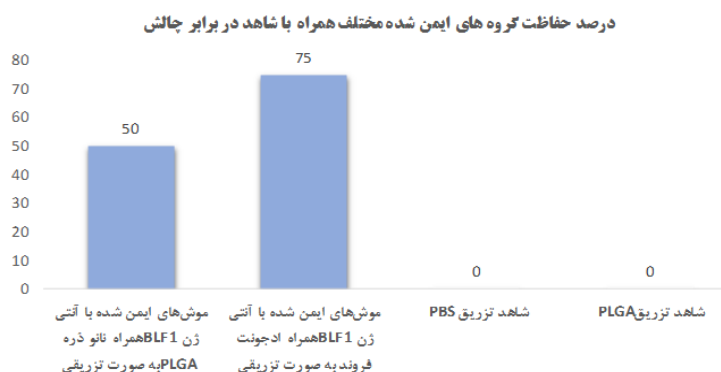
شکل ۹: تیترآنتی‌بادی تولید شده علیه BLF1 همراه با ادجوانت تزریقی به صورت داخل صفاقی در سرم موش‌های ایمن و مقایسه آن با شاهد. محور عمودی جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی سریال رقت را نشان می‌دهد.

جدول ۳: گروه‌های مختلف جهت بررسی آماری.

شماره گروه	گروه مورد آزمون
۱	موش‌های تیمار شده با آنتی‌ژن BLF1 همراه با ادجوانت به صورت داخل صفاقی
۲	موش‌های تیمار شده با آنتی‌ژن BLF1 همراه با نانوذره PLGA به صورت داخل صفاقی
۳	شاهد تزریق PBS
۴	شاهد تزریق PLGA

جدول ۴: مقایسه بین گروه‌های مختلف توسط آزمون دانکن بر روی تیتراژ IgG در سرم موش‌های ایمن‌شده در سطح خطای پنج درصد.

Variables	N	۱	۲	۳	۴
۴	۳	۰/۶۰۶۶۷			
۲	۳		۳/۰۶۳۰۰		
۳	۳			۰/۳۳۶۰۰	
۱	۳				۳/۳۶۶۶۷
Sig.		۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰



شکل ۱۰: حفاظت گروه‌های ایمن‌شده مختلف همراه با شاهد در برابر چالش

کننده‌های سنتز پروتئین (از جمله مهار کننده‌های eIF4A) را می‌توان به عنوان عوامل ضد سرطان استفاده نمود (۷). پروتئین BLF1 (به عنوان یک مهار کننده قوی eIF4A)، ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرد. ژن *blf1* در بورخوردلریا سودومالئی در بیماری‌زایی نقش دارد. با کلون و بیان ژن *blf1* و بررسی روش‌های مختلف ارائه دارو به علاوه ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی پروتئین BLF1 می‌توان کاندید واکسنی علیه این باکتری تولید کرد و هم‌چنین با توجه به مکانیسم، BLF1 می‌تواند کاندیدی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی باشد (۲). در این تحقیق با توجه به مزایای سیستم‌های نانوذرات در کاهش خطرات احتمالی پروتئین BLF1 و هم‌چنین احتمال افزایش ایمنی‌زایی آن به عنوان سیستم‌های تحویل نوین واکسن‌های پروتئینی، از نانوذرات بر پایه پلیمرهای طبیعی و سنتزی استفاده شد (۳۰). نانوذرات PLGA تا حدی از طریق پینوسیتوز فاز مایع و هم‌چنین از طریق اندوسیتوز با واسطه کلاترین در سلول‌ها وارد می‌شوند (۱۴). استفاده از PLGA

بحث

بورخوردلریا یکی از خطرناک‌ترین عواملی می‌باشد که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن تولید نشده است (۲۲). میزان مرگ و میر ناشی از بیماری میلوئیدوزیس از اهمیت بسیاری برخوردار است، به‌طوری که به یک بیماری واگیر در حال ظهور تبدیل شده است (۲۳،۲۴). محققان بر این باور هستند که یک میزبان جوند به عنوان یک عامل مشترک بین انسان‌ها و حیوانات عمل می‌کند (۲۵). تنوع بالینی بسیار زیاد میلوئیدوز، مشکل تشخیص آزمایشگاهی و درمان، آن را به یک بیماری نگران کننده در سراسر جهان تبدیل کرده است (۲۶). عفونت ایجاد شده می‌تواند از طریق تلقیح پوستی، استنشاقی یا بلع بورخوردلریا موجود در آب آشامیدنی آلوده یا به ندرت از فرد به فرد منتقل شود (۲۷). علی‌رغم افزایش شناخت وسیع بورخوردلریا سودومالئی، تقریباً تمام موارد ابتلا مربوط به اقامت یا سفر به مناطق بومی بیماری می‌باشد (۲۸). برای شناسایی یک کاندید مناسب واکسن، مهندسی بیشتر بر روی توکسین BLF1 مورد نیاز می‌باشد (۲۹). مهار

دارای مقدار منفی بود. برای مثال سمیعی و همکاران با این روش، نانوذرات PLGA حاوی آنتی‌ژن را سنتز نمودند که پتانسیل زتا این نانوذرات برابر $21/6$ - میلی‌ولت بود (۲۰). در مجموع با مشاهده تغییرات پتانسیل زتا در نانوذرات می‌توان استنباط نمود که تغییرات قابل ملاحظه‌ای در میزان پتانسیل زتا بین ذرات فاقد آنتی‌ژن و ذرات حاوی آنتی‌ژن رخ نداده است و در هر دو حالت، نانوذرات در محدوده پایداری قرار دارند که مانع از اتصال ذرات و تشکیل ذرات به هم چسبیده می‌شود. البته این نکته نیز حائز اهمیت است که پتانسیل زتا نانوذرات PLGA منفی بود و این بار سطحی نانوذرات، در حذف آن‌ها از بدن موثر است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، استفاده از واکسن برای پیشگیری از بیماری میلوئیدوزیس بهترین روش مبارزه با این بیماری است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فرمولاسیون نانو واکسن حاصل‌شده با تجویز داخل صفاقی، از توانایی خوبی در تحریک سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی برخوردار است. در نتیجه می‌توان فرمولاسیون نانویی حاصل را به‌عنوان حاملی مناسب جهت تولید واکسن پایدار، ایمن، زیست‌سازگار و بدون اثرات سمی و جانبی نسبت به ادجوانت‌های معمول، جهت بررسی‌های بیشتر پیشنهاد نمود. با توجه به عیار آنتی‌بادی تولید شده می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش تیتراژ آنتی‌بادی ضریب ایمنی افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، پروتئین نوترکیب BLF1 می‌تواند به‌عنوان کاندیدای واکسن علیه باکتری *Borrelia burgdorferi* سودومالنی مطرح شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهران تشکر می‌کنند. مقاله حاضر بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد گرایش سلولی مولکولی در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهران است.

برای تحویل داروها و کاربردهای زیست‌پزشکی با کمترین سمیت سیستمیک همراه است (۳۰). درصد محصورسازی دارو در فرمولاسیون حاضر برای آنتی‌ژن BLF1 در حد 75% بوده بود. با توجه به اینکه اندازه ذرات کوچک می‌باشند و کاهش اندازه ذره‌ای و افزایش نسبت سطح به حجم منجر به کاهش بارگذاری دارو می‌گردد، بنابراین درصد محصورسازی بالا است و می‌تواند میزان قابل‌توجهی از دارو را با استفاده از مقدار کمتری از ماتریکس پلیمری به بافت هدف برساند. در تحقیق انجام شده توسط هالایکا و همکاران، کلورپرومازین هیدروکلراید (CPZ-HCl) و پرفنازین (PPH) در نانوذرات PLGA با روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال بارگذاری شدند. میانگین اندازه نانوذرات PLGA حاوی CPZ-HCl و PPH به ترتیب برابر 347 و 325 نانومتر بود. در تحقیق آقای هالایکا از پلی‌وینیل‌الکل $0/3$ تا $0/7$ استفاده شده است (۳۱). در این مطالعه از پلی‌وینیل‌الکل $2/5\%$ استفاده شد که می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش پلی‌وینیل‌الکل در مطالعه حاضر خود یکی از عوامل کاهش سایز نانوذرات PLGA می‌باشد. در مطالعه دیگری توسط نظریان و همکاران، یک پروتئین نوترکیب کایمر با استفاده از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال در نانوذرات PLGA بارگذاری شد که اندازه نانوذرات تولید شده در این مطالعه در محدوده 170 نانومتر گزارش گردید (۳۲). مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر نشان‌دهنده اندازه مناسب نانوذرات تولید شده می‌باشد با توجه به رهش نانوذره PLGA، در این تحقیق تعداد تزریقات برای ایجاد ایمونی‌زایی به دو بار کاهش پیدا کرد. در مجموع بررسی شکل و اندازه نانوذرات هر سه پروتئین توسط میکروسکوپ الکترونی SEM نشان دهنده این واقعیت بود که شکل نانوذرات قابل قبول بود. هم‌چنین نتایج بررسی اندازه نانوذرات توسط SEM تأییدکننده نتایج به‌دست آمده از توزیع اندازه دستگاه DLS بود. پتانسیل نانوذرات PLGA نیز منفی و برای نانوذرات حاوی و فاقد پروتئین در محدوده $31/3$ - و $33/6$ - بود. در مقالات مشابه نیز نانوذرات PLGA تولید شده با روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال،

مشارکت نویسندگان

مقاله، حاصل پایان‌نامه بوده که دکتر حسین هنری در ارائه ایده، و در طراحی تحقیق، و آقایان دکتر داود صادقی، سید مجتبی آقایی بعنوان همکار و مهدی دهاتی به‌عنوان دانشجو در انجام کار آزمایشگاهی و در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

حامی مالی: این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهران انجام شده است.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه جامع امام حسین(ع) تایید شده است (کد اخلاق به شماره : ۱۵-۰۴-۱۴۰۱ REC. IR.IHU).

References:

- 1-Moran CL, Debowski A, Vrieling A, Stubbs K, Sarkar-Tyson M. *N-Acetyl-B-Hexosaminidase Activity Is Important for Chitooligosaccharide Metabolism and Biofilm Formation in Burkholderia Pseudomallei*. Environ Microbiol 2024; 26(1): e16571.
- 2-Lee SH, Chong Ch, Lim BS, Chai SJ, Sam KK, Mohamed R, et al. *Burkholderia Pseudomallei Animal and Human Isolates from Malaysia Exhibit Different Phenotypic Characteristics*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2007; 58(3): 263-70.
- 3-Dejsirilert S. et al. *Growth and Survival of Pseudomonas Pseudomallei in Acidic Environments*. Jpn J Med Sci Biol 1991; 44(2): 63-74.
- 4-Nandi T, Ong C, Singh AP, Boddey J, Atkins T, Sarkar-Tyson M, et al. *A Genomic Survey of Positive Selection in Burkholderia Pseudomallei Provides Insights Into the Evolution of Accidental Virulence*. PLoS Pathogens 2010; 6(4): e1000845.
- 5-Coenye T, Vandamme P. *Diversity and Significance of Burkholderia Species Occupying Diverse Ecological Niches*. Environ Microbiol 2003; 5(9): 719-29.
- 6-Currie BJ, Ward L, Cheng AC. *The Epidemiology and Clinical Spectrum of Melioidosis: 540 Cases from the 20 Year Darwin Prospective Study*. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(11): e900.
- 7-Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuik PJ, Baker PJ, Bokori-Brown M, Chang CT, et al. *A Burkholderia Pseudomallei Toxin Inhibits Helicase Activity of Translation Factor Eif4a*. Science 2011; 334(6057): 821-4.
- 8-Kanaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamongkol Y, Naigowit P, Dance DA, Smith MD, et al. *Serology and Carriage of Pseudomonas Pseudomallei: A Prospective Study in 1000 Hospitalized Children in Northeast Thailand*. J Infect Dis 1993; 167(1): 30-3.
- 9-Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, Currie BJ, Peacock SJ, Dance DAB, et al. *Melioidosis*. Nat Rev Dis Primers 2018; 4: 17107.
- 10-Wongtrakongate P, Mongkoldhumrongkul N, Chaijan S, Kamchonwongpaisan S, Tungpradabkul S. *Comparative Proteomic Profiles and the Potential Markers Between Burkholderia Pseudomallei and Burkholderia Thailandensis*. Mol Cell Probes 2007; 21(2): 81-91.

- 11-Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB. **Crystal Structure of Yeast Initiation Factor 4A, A DEAD-Box RNA Helicase**. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(24): 13080-5.
- 12-Howe C, Sampath A, Spotnitz M. **The Pseudomallei Group: A Review**. J Infect Dis 1971; 124(6): 598-606.
- 13-Marintchev A. **Roles of Helicases in Translation Initiation: A Mechanistic View**. Biochim Biophys Acta 2013; 1829(8): 799-809.
- 14-Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. **PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications**. J Control Release 2012; 161(2): 505-22.
- 15-Masoudi Kerahroudi M, Honari H, abdollahi M. **Expression of Blf1-Stx B Gene Cassette in E. Coli and Investigation Antibody Titer in Mice**. SSU_Journals 2017; 24(11): 876-86.
- 16-Russell DW, Sambrook J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th ed. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4th ed. Available at: www.molecularcloning.org Cold Spring Harbor Protocols, www.cshprotocols.org, 2001. Accessed April 21, 2025.
- 17-Ahmadi AH, Honari H, 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 J 2015; 9(4): 20-9. [persian]
- 18-Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. **Recombinant and Truncated Tetanus Neurotoxin Light Chain: Cloning, Expression, Purification, and Proteolytic Activity**. Protein Expr Purif 1999; 15(2): 221-27.
- 19-Bollag DM., Rozycki MD, Edelstein SJ. **Protein Methods**, 1996. 2th ed, John Wiley & Sons, New York; 1996.
- 20-Samiei A, Bianeh H, Nazarian S, Sadeghi D, Hojjati Razgi AS, Zafarmand Samarin M. **PLGA Nanoparticles Containing Intimin-Flagellin Fusion Protein for E. Coli O157:H7 Nano-Vaccine**. Journal of Immunological Methods 2023; 520 (113517): 1-8.
- 21-Tsolou A, Angelou E, Didaskalou S, Bikiaris D, Avgoustakis K, Agianian B, et al. **Folate and Pegylated Aliphatic Polyester Nanoparticles for Targeted Anticancer Drug Delivery**. International Journal of Nanomedicine 2020; 15: 4899-918.
- 22-Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. **Public Health Assessment of Potential Biological Terrorism Agents**. Emerg Infect Dis 2002; 8(2): 225-30.
- 23-Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. **Increasing Incidence of Human Melioidosis in Northeast Thailand**. Am J Trop Med Hyg 2010; 82(6): 1113-7.
- 24-Dance DA. **Melioidosis as an Emerging Global Problem**. Acta tropica 2000; 74(2-3): 115-9.
- 25-Gassiep I, Armstrong M, Norton R. **Human Melioidosis**. Clin Microbiol Rev 2020; 33(2): e00006-19.
- 26-Currie BJ. **Melioidosis and Burkholderia Pseudomallei: Progress in Epidemiology, Diagnosis , Treatment and Vaccination**. Curr Opin Infect Dis 2022; 35(6): 517-23.
- 27-Alhatmi H, Alharbi A, Bosaeed M, Aldosary O, Aljohani S, Alalwan B, et al. **Melioidosis: Case**

- Reports of Confirmed Burkholderia Pseudomallei in Saudi Arabia.** J Infect Public Health 2020; 13(5): 824-6.
- 28-Dawson P, Duwell MM, Elrod MG, Thompson RJ, Crum DA, Jacobs RM, et al. **Human Melioidosis Caused by Novel Transmission of Burkholderia Pseudomallei from Freshwater Home Aquarium, United States.** Emerging Infectious Diseases 2021; 27(12): 3030.
- 29-Malina A, Cencic R, Pelletier J. **Targeting Translation Dependence in Cancer.** Oncotarget 2011; 2(1-2): 76-88.
- 30-Shakya AK, Al-Sulaibi M, Naik RR, Nsairat H, Suboh S, Abulaila A. **Review on PLGA Polymer Based Nanoparticles with Antimicrobial Properties and their Application in Various Medical Conditions or Infections.** Polymers 2023; 15(17): 3597.
- 31-Rezvantab S, Mihandoost S, Rezaiee M. **Machine Learning Assisted Exploration of the Influential Parameters on the PLGA Nanoparticles.** Sci Rep 2024; 14(1): 1114.
- 32-Nazarian S, Mousavi Gargari L. **Immunogenicity Evaluation of PLGA Nanoparticles Contains Recombinant Cfab Protein from Enterotoxigenic Escherichia Coli.** J Babol Univ Med Sci 2017; 19(9): 39-44.

Investigating the Immunogenicity of the BLF1 Antigen from *Burkholderia Pseudomallei* with PLGA Nanoparticle in Mice

Mahdi Dehati¹, Hossein Honari^{†1}, Davoud Sadeghi¹, Seyed Mojtaba Aghaie¹

Original Article

Introduction: The bacterium *Burkholderia pseudomallei* causes melioidosis in humans and can be transmitted to the patients through oral ingestion, inhalation or skin scratches. The BLF1 protein from this bacterium stops protein synthesis within host cells. PLGA serves as a biodegradable polymer for incorporating various pharmaceutical and protein molecules. The aim of this study was to express the BLF1 protein in *E. coli* and load it into PLGA polymer, and investigate its immunogenicity in mice. **Methods:** In this research, the *blf1* gene expression was induced by IPTG, and the presence of the recombinant protein was confirmed using the western blot technique. Antigen was loaded in PLGA polymer. The size and zeta potential of nanoparticles containing protein were measured. Protein with adjuvant; nanoparticles PLGA and PBS were administered to the groups of mice in two and four doses. The level of antibody in their serum was measured using the ELISA test. Ultimately, mice were exposed to BLF1 toxin. The data were analyzed utilizing SPSS 16 software.

Results: PLGA nanoparticles with protein exhibited a higher PDI size and a more negative zeta potential compared to those without protein. The amount of protein loading in nanoparticles was about 95%. The results of the challenge test indicated 50% protection of the group with nanoparticles and 75% protection of the group with protein plus adjuvant.

Conclusion: According to the administration frequency and the antibody titer of the recombinant protein with nanoparticles, along with the results obtained, this protein may be considered as a potential vaccine candidate for melioidosis.

Keywords: BLF1, PLGA, melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, vaccine candidate.

Citation: Dehati M, Honari H, Sadeghi D, Aghaie S.M. Investigating the Immunogenicity of the BLF1 Antigen from *Burkholderia Pseudomallei* with PLGA Nanoparticle in Mice. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2025; 33(2): 8729-42.

¹Research Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Tel: 09123848187, Email: honari.hosein@gmail.com