

بررسی ایمنی زایی کونژوگه PLGA-لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده پروتئوس میرابیلیس بر علیه عفونت ادراری در مدل موشی

المیرا سعیدی^۱، رضا شاپوری^۱، مهدی رهنما^۱، مجتبی صلوتی^۱، جواد ناصریان^۲

۱- گروه میکروبیولوژی و زیست شناسی دانشکده فنی مهندسی و علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. drreza1357@gmail.com

۲- گروه ریاضی و آمار دانشکده فنی مهندسی و علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: پروتئوس، پاتوژن فرصت طلب عامل ۱۰ درصد عفونت‌های دستگاه ادراری است. افزایش مقاومت چند دارویی و عوارض جانبی آنتی بیوتیک‌ها باعث شد یافتن تولید واکسن ضروری به نظر آید. هدف از این پژوهش بررسی ایمنی زایی کونژوگه PLGA و لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده پروتئوس میرابیلیس بر علیه عفونت ادراری در مدل موشی است.

روش کار: در این پژوهش، پس از کشت انبوه پروتئوس میرابیلیس، LPS آن استخراج، تخلیص و دتوکسیفه و نهایتاً با نانوذره PLGA کونژوگه گردید. کونژوگاسیون بادستگاه‌های FT-IR، ZetaSizer، AFM و تایید و واکنش‌سناسیون، ۳ بار به فاصله دو هفته، به صورت عضلانی به ۴ گروه ۳ تایی موش سوری تحت درمان با نرمال سالین (گروه کنترل)، LPS، PLGA و کونژوگه PLGA-LPS انجام شد.

برای انجام تست چلنج، به مثانه موش‌ها 6×10^6 CFU/ml از باکتری تزریق و بعد از یک هفته سنجش باکتری‌ها صورت گرفت یافته‌ها: نتایج حاصل از تست چلنج مبین موفقیت معنی دار کونژوگه PLGA-LPS در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمون بود. به عبارت دیگر، گروه‌های کنترل و PLGA خالص بیشترین میزان رشد را داشتند و میانگین تعداد کلنی‌های رشد کرده به طور قابل توجهی از همه گروه‌ها بیشتر بود. و تعداد کلنی‌های رشد کرده در گروه‌های PLGA (cfu/ml) 10×10^2 ، LPS (cfu/ml) $3/6 \times 10^2$ ، PLGA (cfu/ml) $91/3 \times 10^2$ و NS (cfu/ml) 98×10^2 بود.

نتیجه گیری: می‌توان نتیجه گرفت که نانو واکسن کونژوگه PLGA-LPS دارای ایمنی زایی مناسب بوده و با بررسی عدم سمیت آن در مطالعات پاتولوژیکی می‌تواند کاندید نانو واکسن مناسبی برای پیشگیری از عفونت‌های ادراری ناشی پروتئوس میرابیلیس باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئوس میرابیلیس، پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید، کونژوگاسیون لیپوپلی ساکارید، نانو واکسن.

مقدمه

رویشی به سلول‌های خزننده است (۳۲). ممکن است ترکیباتی مانند پلی ساکاریدها (مانند لیپوپلی ساکارید LPS)، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و اسیدهای چرب نیز در خزیدن پروتئوس میرابیلیس تاثیر بگذارند (۱۶). این باکتری یکی از علل شایع عفونت‌های ادراری است (۷). گرچه درمان اولیه برای عفونت دستگاه ادراری، پیشگیری مداوم با آنتی بیوتیک‌ها است. اما

پروتئوس میرابیلیس، باکتری میله‌ای، گرم منفی از خانواده ی انتروباکتریاسه، با حرکت سوارمینگ و فعالیت اوره از مثبت است (۳۶، ۳۷، ۴۰، ۴۹). در واقع، توانایی خزیدن روی آگار و تشکیل کلنی‌های بسیار منظم و تراس (لبه) دار که ظاهر bulls-eye را دارند، از جمله ویژگی‌های برجسته‌ی این باکتری است. خزیدن این باکتری در نتیجه تمایزهای دوره ای سلول‌های

مقاومت چند دارویی باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها و از طرف دیگر، عوارض جانبی مصرف آنتی بیوتیک ها و شیمی درمانی افزایش یافته است (۲۴). از این رو، جستجوی راه های پیشگیرانه و موارد تقویت کننده سیستم دفاعی بدن، همانند واکسن، ضروری به نظر می آید. طی دهه های گذشته، واکسیناسیون دستخوش تحولی عظیم قرار گرفته است. با پیشرفت بیوتکنولوژی، دنیای علمی حاضر شاهد ظهور سیستم تحویل واکسن نوینی، به نام نانواکسن ها بوده است، که در مقایسه با استراتژی های واکسیناسیون معمول موجب ایمنی هومورال، سلولی و مخاطی می شوند. بسیاری از نانواکسن های مجاز برای استفاده ی انسانی، حامل هایی موثر برای آنتی ژن ها محسوب می شوند. نانوذرات پلیمری، حامل هایی کلئیدی به اندازه ی ۱۰-۱۰۰۰ نانومتر هستند، که عمدتاً شامل پلیمرهای زیست تخریب پذیر می باشند (۴۵). ترکیبات پلیمریک از قبیل پلی لاکتیک گلایکولیک اسید (PLGA) به تازگی پتانسیل قابل توجهی را در ایفای نقش ادجوانت واکسن ها به عنوان رساننده آنتی ژن به علت توانایی شان در زیست تخریب پذیری، احتساب آنتی ژن ها و رهایش کنترل شده آن ها از خود نشان داده اند (۳۳). PLGA معمولاً در چرخه های سلولی اختلالی ایجاد نمی کند و زمان قرارگیری دارو بر روی سلول و مسیر اندوسیتوزی را کاهش می دهد. در واقع در یک جمله می توان گفت که این نانوذرات سدهای بیولوژیک را در می نوردند (۱۲). آنتی ژنیک بودن LPS دلیلی است که می توان از آن برای تحریک سیستم ایمنی بدن و تولید واکسن بهره جست (۲۴، ۵۳). اما واکسن های پلی ساکاریدی در فعال کردن سلول های Th ناتوان هستند و فقط سلول های B را به صورت مستقل از T فعال می کنند، یک راه جهت تحریک مستقیم سلول های Th در پاسخ به آنتی ژن های پلی ساکاریدی، کونژوگه کردن

آنتی ژن با انواعی از حامل ها است (۴). از این رو به منظور ایمنی زایی در برابر عفونت های ادراری ناشی از پروتئوس میرابلیس بر آن شده تا واکسنی متشکل از کونژوگه ی PLGA-LPS را طراحی و ایمنی زایی آن را در مقایسه با LPS در مدل موشی بررسی گردد. چندین فاکتور ویروالانس در بیماری زایی پروتئوس میرابلیس عنوان شده اند که عبارتند از:

- هیدرولیز اوره به وسیله آنزیم اوره آز
- سمیت سلولی به وسیله همولیزین
- جلوگیری از دفاع میزبان به وسیله ی پروتئاز ایمونوگلوبین A
- تخریب سلول های اپی تلیال کلیه به وسیله تهاجم
- حرک سوارمینگ به وسیله فلاژل
- چسبندگی به سلول های اپی تلیال دستگاه ادراری و اپیتلیوم کلیه به وسیله فیمبریا و سایر چسبندگی ها (۱۳).

پروتئوس میرابلیس، مسئول ایجاد ۹۰ درصد عفونت های ناشی از پروتئوس می باشد و می تواند به عنوان یک عفونت همه گیر محسوب شود (۴۳). این باکتری می تواند موجب عفونت هایی چون عفونت دستگاه تنفسی، پوست و باکتری می گردد (۴۴). پروتئوس میرابلیس بر روی کاتتر های ادراری قرار گرفته و با ایجاد بیوفیلم، باعث تشکیل پوسته ای روی کاتتر (سوند ادراری) و مسدود شدن آن در طول عفونت های ادراری می شود و تعداد زیادی از بیماران دارای کاتتر در بیمارستان ها را آلوده می کند. این عفونت معمولاً توسط تجهیزات پزشکی از جمله سوند (کاتتر)، مرطوب ساز (نیولایزر، مسؤل استنشاق)، دستکش معاینه (عفونت زخم) به بیمار منتقل می شود (۴۷، ۴۸). علاوه بر این، نه تنها موجب سیستمیت و پیلونفریت حاد می گردد، بلکه موجب سنگ های ادراری، خصوصاً در افراد با دستگاه

نتایج مطالعاتی که گانگهیم (۲۰۰۹)، یاه (۲۰۰۷)، گالس (۲۰۰۲)، واگنلر (۲۰۰۲) و همکارانشان بر روی گونه های پروتئوس انجام داده اند، بیانگر مقاومت اکثریت آن ها به سپروفلوکساسین است (۱۵،۲۸،۴۹). نتایج بررسی ایشیل و ساتوک (۱۹۹۱) نشان دهنده ی مقاومت اکثر باکتری های پروتئوس ولگاریس به اوفلوکساسین، به علت کاهش تولید پورین، حساسیت کامل (۱۰۰٪) پروتئوس میرابلیس به آمیکاسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، پلی میکسین B و نتومایسین، حساسیت ۸۰ درصدی نسبت به اوفلوکساسین و کلیستین، حساسیت ۲۰ درصدی به جنتامایسین و مقاومت به کانامایسین، سفنازیدیم، اوگراسیلین، آمپی سیلین، تتراسایکین و کلیندامایسین می باشد (۲۴).

نانوذرات پلی مری

نانوذرات پلی مری دارای مزایایی بیش از میکرو ذرات هستند. این نانومواد دارای ظرفیت بارگذاری بالای دارو بوده و در نتیجه تحویل داخل سلولی را افزایش داده و برای تحویل داخل وریدی گزینه مناسبی هستند. در ۲۵ سال اخیر، پلی مرهای سنتتیک زیست تجزیه پذیر به دلیل زیست سازگاری و زیست تجزیه پذیری که دارند به صورت های گوناگون در ساخت عوامل مولکولی تصویر بردار و سیستم های تحویل دارو و ژن مورد استفاده قرار گرفته اند (۲۵). خصوصاً نانوذرات پلیمری، به نام پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید (PLGA)، یکی از توسعه یافته ترین پلیمرهای زیست تخریب پذیر هستند که به خاطر خواص جذابی که دارند به طور گسترده ای در اهداف دارورسانی، به عنوان سیستم های دارورسان در زمینه های مختلف بیوپزشکی مثل واکسیناسیون، التهاب و سایر بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند (۲۰). این پلیمر دارای خصوصیتی نظیر زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بوده و از طرف دیگر بسته به ساختار شیمیایی آن

اداراری غیر طبیعی نیز می شود. لذا، نگرانی ویژه ای به عنوان عامل عفونت های بیمارستانی، به ویژه با ظهور سویه های مقاوم چند دارویی (MDR)، محسوب می - شود (۲۹، ۳۹، ۳۸). کاهش حساسیت پروتئوس میرابلیس به ایمی ۷-پنم و مقاومت به پلی مکسین ها، تتراسایکلین - ها (از جمله تیگسیکلین) و بتا-لاکتام، موجب محدودیت جدی در گزینه های درمانی شده است (۵).

لیپولی ساکارید (LPS)

لیپولی ساکارید، آنتی ژن باکتریایی سطحی اصلی و غشای خارجی بوده و شامل شمار متعددی از فعالیت های بیولوژیکی، از جمله اثرات پاتوفیزیولوژیکی است (۳۱، ۳۲). LPS و پلی ساکارید های دارای خصوصیات کپسول، نقش مهمی را در عفونت زایی و ایجاد سنگ کلیه و مثانه ایفا می کنند (۳۱، ۳۲). LPS، یک گلیکولیپید پلی آنژیونی با بار منفی است که از ۴ ناحیه ی مرتبط تشکیل شده است که موجب آلفی پاتیک و قطبی شدن آن می شود (۵۰). این مناطق شامل لیپید A، هسته داخلی، هسته خارجی و آنتی ژن O سوماتیک است (۲۱). سیستم های تحویل داروی کلونیدی با ماهیت لیپیدی (لیپوزوم، الاستیک لیپوزوم، اتوزوم، میکرو امولسیون، نانوامولسیون) و پلی مری (نانوذرات پلی مری) از نظر انتقال مواد فعال زیستی (سنتتیک، طبیعی یا در نتیجه ی بیوتکنولوژی)، با تمرکز بر افزایش قابلیت زیستی دارو، تحویل تحت کنترل به منطقه خاص و کاهش سمیت مورد بررسی قرار گرفته اند. با وجود ویژگی های جالب به دلیل عدم پذیرش موقعیت مواد جانبی و مسائلی که در خطوط تولید و طراحی برای تولید مقیاس زیاد وجود دارد، محصولات مبتنی بر نانوذرات پلی مری را در بازار نمی - توان یافت. در حالی که سیستم های حامل مبتنی بر لیپید به دلیل استفاده از چربی ها و روغن های طبیعی و پذیرش از نظر دارویی به طور قابل توجهی افزایش یافته اند (۳۳).

پایداری مناسبی در محیط زیستی دارد. به علت عدم آب دوستی PLGA، اتصال سلول ها به PLGA اغلب به خوبی صورت نمی‌گیرد (۱۰). در پژوهش های انجام شده مشخص گردیده که سیستم دارورسانی خوراکی نانوذره ای برای بسیاری از کاربردهای مختلف از قبیل دارورسانی خوراکی عوامل شیمی درمانی برای درمان سرطان، رساندن موضعی دارو به روده برای درمان بیماری IBD و واکسیناسیون خوراکی موکوسی در حال توسعه است. پروتئین های زیادی، به ویژه انسولین برای درمان دیابت، در نانوذرات برای استفاده به صورت خوراکی بارگذاری شده اند. توسعه موفقیت آمیز نانوذرات برای روش خوراکی می تواند الگوی درمانی بسیاری از بیماری ها را تغییر دهد و تأثیری مهم روی نتایج درمانی در آینده داشته باشد (۳). گاندر و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که PLGA در اتصال با پلی اتیلن گلیکول (PEG) و سوکسینامید (NHS) بهترین گزینه برای اعمال کونژوگاسیون این نانوذره با سایر ترکیبات است (One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles) (۲۸). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ انجام شد نیز، PLGA به عنوان حامل مناسب برای انتشار تسهیل یافته آنتی ژن ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول های هدف و افزایش معنا دار پاسخ های ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵).

مواد و روش ها

در این روش از موش سوری ماده ۶ الی ۸ هفته با وزن ۲۰-۳۰ گرم به عنوان حیوان آزمایشگاهی استفاده شد. باکتری پروتئوس میرابلیس از موسسه انیستیتو پاستور تحویل گرفته شد و در محیط تریپتیک سوی آگار ساب کالچر گردید. نانوذره PLGA در بسته تجاری ۵ میلی- گرمی با قطر متوسط ۵۰۰ نانومتر و حمل در یخ مرطوب و دمای ذخیره سازی ۲۱- درجه سانتی گراد از شرکت

سیگما آلد ریچ خریداری شد. جهت اطمینان از سلامت باکتری پروتئوس میرابلیس خریداری شده آن را در محیط بلاد آگار کشت داده و ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس محیط از نظر رشد و سوارمینگ بررسی گردید. از محیط تریپتیک سوی آگار جهت کشت باکتری و از محیط تریپتیک سوی برات جهت تخلیص مراحل LPS استفاده شد. که پس از ساخت تریپتیک سوی برات ارلن های آماده شده در اتوکلاو قرار داده و پس از تلقیح باکتری به یک ارلن ۳۰۰ سی سی در دمای ۳۷ درجه و دور ۶۱ rpm به مدت ۷۲ ساعت در اتوشیکر قرار گرفت (۳۵، ۳۱).

استخراج و تخلیص آنتی ژن لیپو پلی ساکاریدی (LPS)

پس از خارج کردن از اتوشیکر به هر ارلن ۰/۵ سی- سی فنول ۹۰٪ اضافه و در بن ماری ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس محلول فوق با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب برای مرحله بعد نگهداری و اندازه گیری شد. به ازای ۱۶ گرم رسوب ۷۵ سی سی آب مقطر استریل شده اضافه گردیده و داخل بن ماری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سانتی گراد ۷۵ سی سی فنول که حجم ثابتی دارد به محلول فوق اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد. عمل سرد کردن محلول در آب یخ به مدت ۳۰ دقیقه انجام و جهت جدا کردن فاز آبی محلول فوق با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید پس از سانتریفوژ و جداسازی فاز آبی محلول ها یکی شدند. در مرحله بعد حجم محلول اندازه گیری و نصف حجم محلول اتانول ۹۶٪ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محلول فوق با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب حاوی

درون دو بالن ژوژه ی ۱۰۰ میلی لیتری یک مگنت قرار داده شد و تقریباً ۵ میلی لیتر از حلال DMFO ریخته شد، سپس ۲۰۰ میلی گرم از PLGA به درون حلال اضافه گردید. ۱۰ دقیقه زمان برای حل شدن PLGA ها داده شد. سپس ۲۰۰ میلی گرم EDC و ۵۰ میلی گرم EDC همزمان به داخل ظرف ریخته شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه، آنتی ژن LPS به مقدار ۴۰۰ میلی گرم به داخل ظروف و بر روی بقیه مواد اضافه و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاهی به منظور انجام واکنش استریفیکاسیون و تشکیل کونژوگه ی PLGA با لیپو پلی ساکارید و تشکیل این پیوند استری روی شیکر نگهداری شد. بعد از یک هفته کونژوگه آماده نگهداری درون یخچال شد که به منظور تخلیص و جداسازی ماکرومولکول کونژوگه بعد از انجام کونژوگاسیون، با استفاده از ژل فیلتراسیون و سفادکس G-۷۵ و بافر رقیق کننده PBS با سرعت ۴۱ میلی لیتر در ساعت برقرار گردید و تا زمان عبور مایع، معادل یک حجم بستر از طول موج ۲۱۰ نانومتر، فرکشن های مربوطه جدا گردید (۱۸،۲۳)

اندازه گیری سایز و شارژ مولکول PLGA و کونژوگه آن

جهت اطمینان بیشتر از صحت تشکیل کونژوگه از دستگاه FT-IR و Zetasizer و AFM برای اندازه گیری و شارژ مولکول PLGA و LPS-PLGA استفاده گردید.

ایمنی سازی با آنتی ژن های تهیه شده

به منظور واکنسیناسیون ۱۲ عدد موش ماده سوری ۶ تا ۸ هفته با وزن ۲۰-۳۰ گرم، از موسسه دانش بنیان مدزیست خریداری شد. در هر گروه از ۳ موش استفاده گردید و گروه های آزمون شامل:

گروه اول: شامل موش هایی که کونژوگه PLGA با لیپو پلی ساکارید را دریافت می کردند.

پروتئین حذف شد. سپس برابر با حجم محلول ۳ برابر اتانول ۹۶٪ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محلول ها جهت جداسازی رسوب LPS با دور 2500 rpm به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند (۲۷،۵۲)

دتوکسیفیه کردن آنتی ژن لیپوپلی ساکاریدی (D-LPS)

در این مرحله ابتدا از محلول NaOH ۰/۲ نرمال در لوله ی حاوی رسوب LPS به اندازه ای ریخته می شود که فقط رسوب حل شود. سپس محلول فوق را ۳ ساعت در بن ماری جوشان با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از مدت زمان فوق pH آن را روی ۷ توسط NaOH و HCl تنظیم و جهت خالص سازی LPS عمل دیالیز انجام می گیرد (۳۰).

دیالیز و خالص سازی آنتی ژن لیپوپلی ساکاریدی دتوکسیفیه شده

ابتدا محلول مرحله ی قبل که pH آن تنظیم شده بود داخل کیسه های دیالیز با قطر ۱۰ کیلو دالتون ریخته و داخل تنگ حاوی آب مقطر دیونیزه به همراه یک مگنت روی همزن برقی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز قرار داده شد، پس از اتمام این مدت محلول ها را یکی کرده و ۳ برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و روز بعد سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و رسوب حاوی LPS-D دیالیز شده جدا و آب اضافی گرفته شده و در داخل میکروتیوب ها در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد قرار گرفت (۲۶).

کونژوگاسیون LPS با PLGA

مراحل کونژوگاسیون در آزمایشگاه کنترل کیفی اداره کل انتقال خون زنجان انجام شد که به شرح زیر می باشد:

نموده و و با ورتکس هم زده شد (رقت ۰/۱) سپس از هرلوله دو رقت ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تهیه نموده و با آنس استاندارد (۰/۰۱) از تمام رقت ها در پلیت محیط تریپتیک سوی براث به صورت خطی کشت داده شد، و بعد از گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تعداد کلنی ها شمارش گردید.

نتایج

بعد از مشاهده سوآرمینگ کلنی ها بر روی محیط کشت بلاد آگار و انجام رنگ آمیزی گرم از سویه های کشت داده شده باسیل های گرم منفی میله ای شکل مشاهده شد. نمودارهای (۱) و (۲) مربوط به شارژ نانوذره خالص PLGA و کونژوگه لیپولی ساکارید با PLGA می باشد. که عدد ۲/۹۸- مربوط به PLGA و عدد ۰/۴۸۲ مربوط به کونژوگه لیپولی ساکارید با PLGA می باشد و نتایج نمودارها حاکی از مثبت شدن شارژ کونژوگه نسبت به شارژ منفی PLGA است که موفقیت آمیز بودن کونژوگاسیون را تایید می نماید. در نمودار (۳) شکل (الف) نمودار نانوذره PLGA و شکل (ب) نمودار LPS-PLGA می باشد. با توجه به شکل پیک های مربوط به اعداد موجی ۱۰۸۰.۹۰، ۱۲۳۷.۲۹، ۱۳۸۵.۳۳ و ۱۴۶۷.۴۴ نشان دهنده گروه های اتری می باشد. که تقویت آن ها نیز نشان دهنده حضور پیوند های استری است (در کونژوگه و LPS). تغییر سایز سایت های اتصال نانوذره PLGA از ارتفاع ۸ نانومتر قبل از کونژوگاسیون به ارتفاع ۸۱.۳۵ نانومتر در PLGA-LPS و تغییر شکل سایت های اتصال قبل و بعد از انجام کونژوگاسیون جذب سطحی آنتی ژن را در سایت های اتصال نانوذره تایید می نماید و گویای این مطلب است که کونژوگاسیون با موفقیت انجام شده است.

گروه دوم: شامل موش هایی که PLGA خالص را دریافت می کردند.

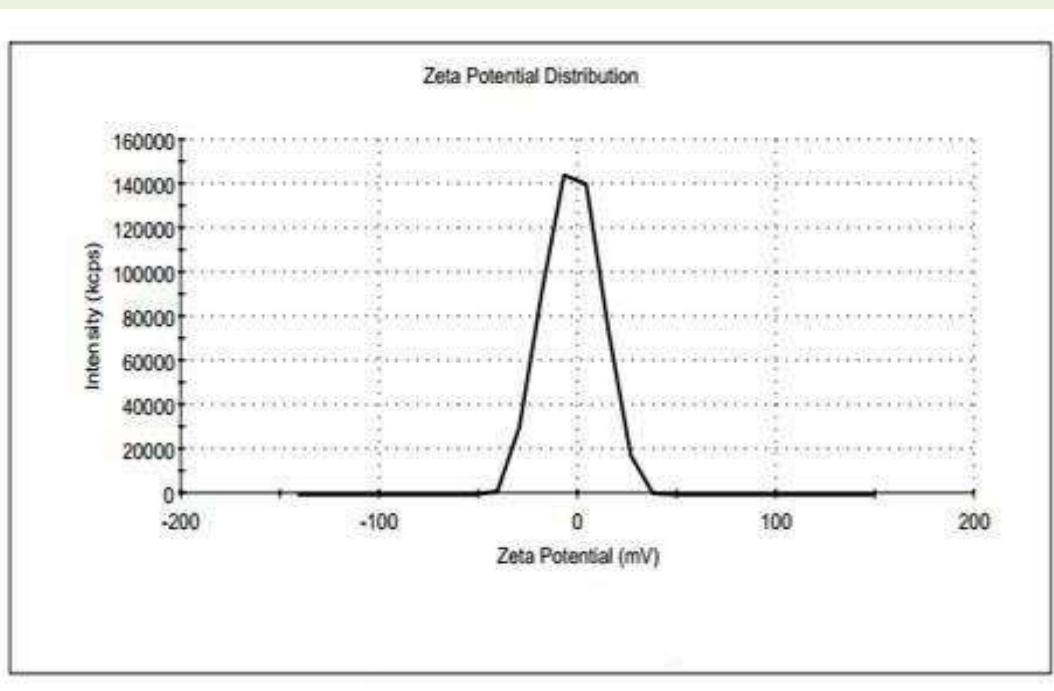
گروه سوم: شامل موش هایی که LPS را دریافت می کردند.

گروه چهارم: شامل موش هایی که نرمال سالین را دریافت می کردند.

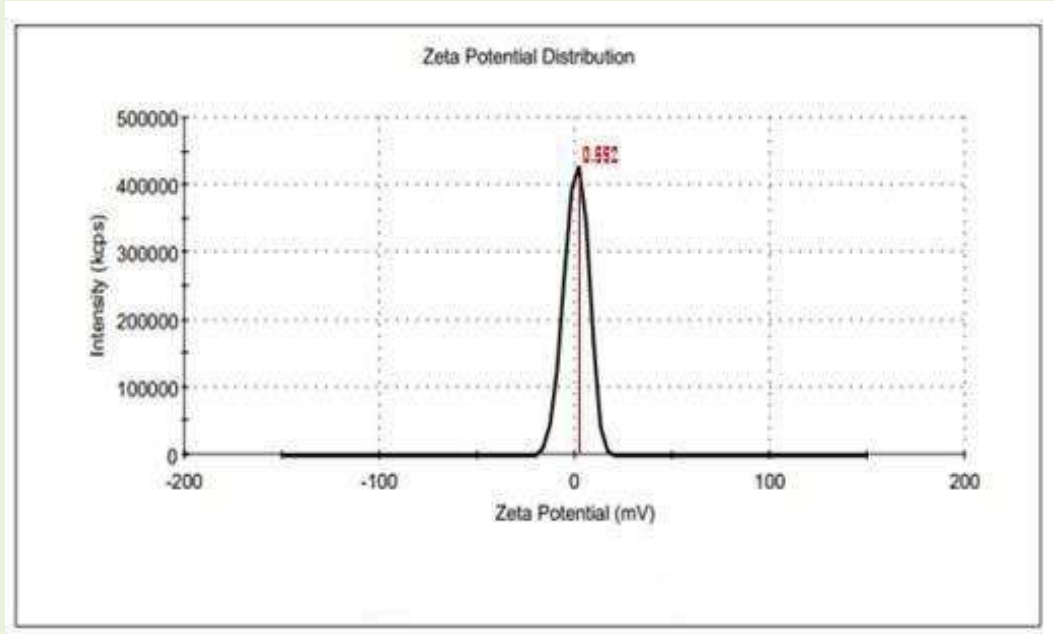
دوره واکسیناسیون شامل ۳ دوز تزریق ۰/۲ سی سی PLGA با غلظت ۵۰ میلی مولار و غلظت آنتی ژن های تزریقی ۱ میکروگرم در هر دوز بود با فواصل دو هفته ای که خونگیری ۲ هفته بعد از آخرین تزریق، از گردن موش انجام گردید و سپس آزمایش چلنج، انجام شد (۲۹،۴۹).

چلنج در موش

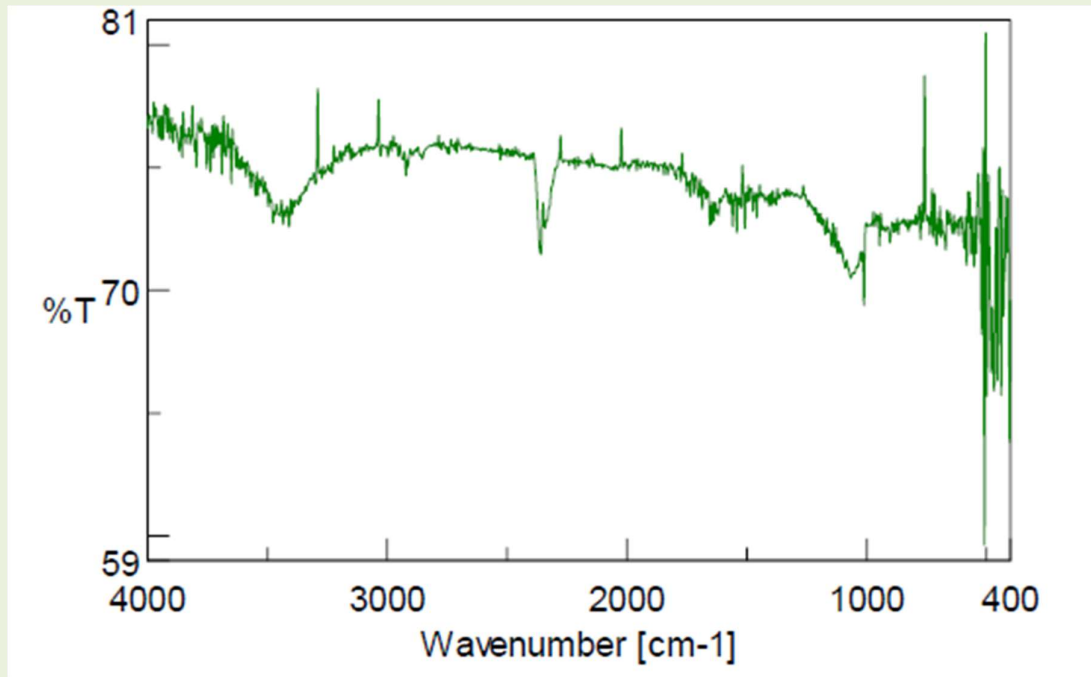
در این مرحله سه موش هر گروه با کتامین ۵۰ mg/kg و زایلازین ۱۰ mg/kg با ۱۰ سی سی سرم فیزیولوژی مخلوط نموده و ۰/۶ سی سی داخل صفاقی به موش تزریق شد. بعد از اطمینان از بیهوشی موش زیر لوب آزمایشگاهی شکم موش را در شرایط استریل باز گردید. باکتری با غلظت ۲ مک فارلند به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر با سرنگ انسولین به مثانه موش سوری تزریق و برای جلوگیری از آلودگی محل جراحی را با بتادین ضد عفونی نموده و با دقت محل بخیه زده شد. موش ها به مرحله ریکاوری انتقال یافتند و بعد از به هوش آمدن به قفسی که قبلاً ضد عفونی شده بود انتقال گردید. علائم بالینی در موش ها و بررسی وضعیت جسمانی آن ها در تمام روزهای ۱ الی ۷ صورت گرفت. در روز آخر موش ها با اتر بیهوشی عمیق و مرگ کامل یافته و کالبدشکافی شده و مثانه آن ها خارج گردید. مثانه را بعد از خرد کردن در ۱۰ سی سی بافر ۷/۲ PBS: حل



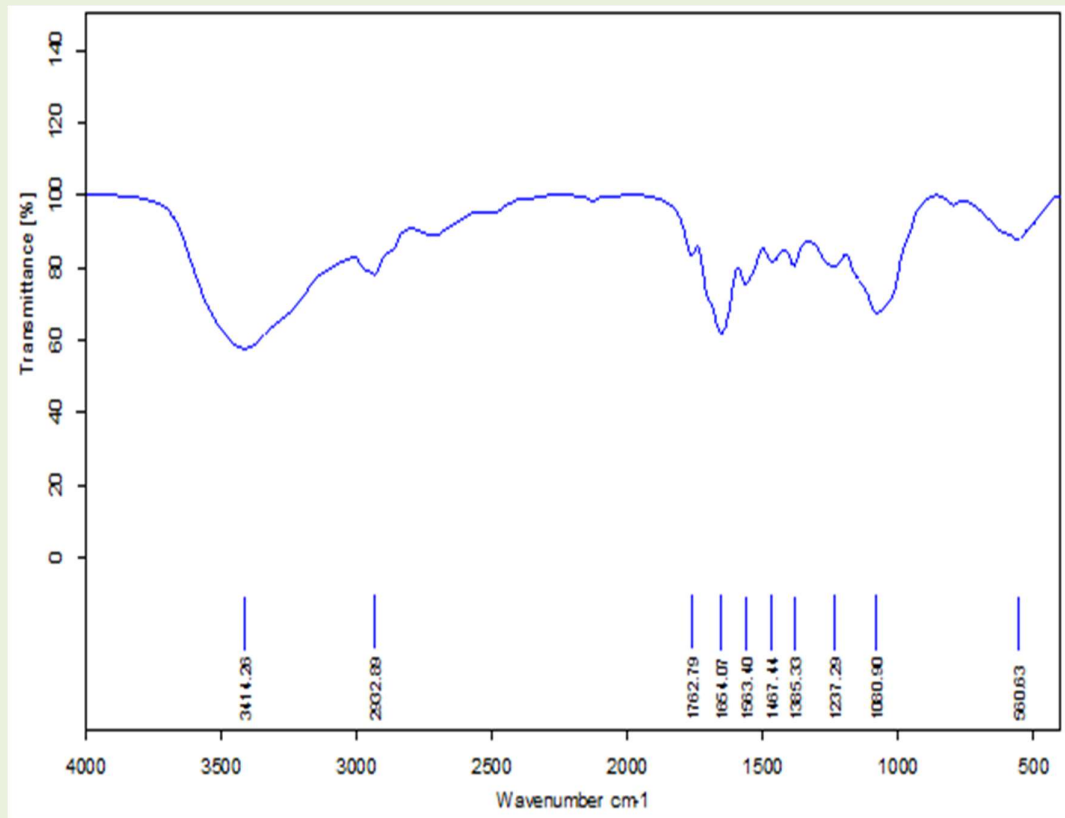
نمودار ۱- نتیجه شارژواکسن ۲/۹۸ :- PLG A خالص



نمودار ۲- نتیجه شارژ نانوواکسن ۰/۴۸۲ :- PLGA-LPS

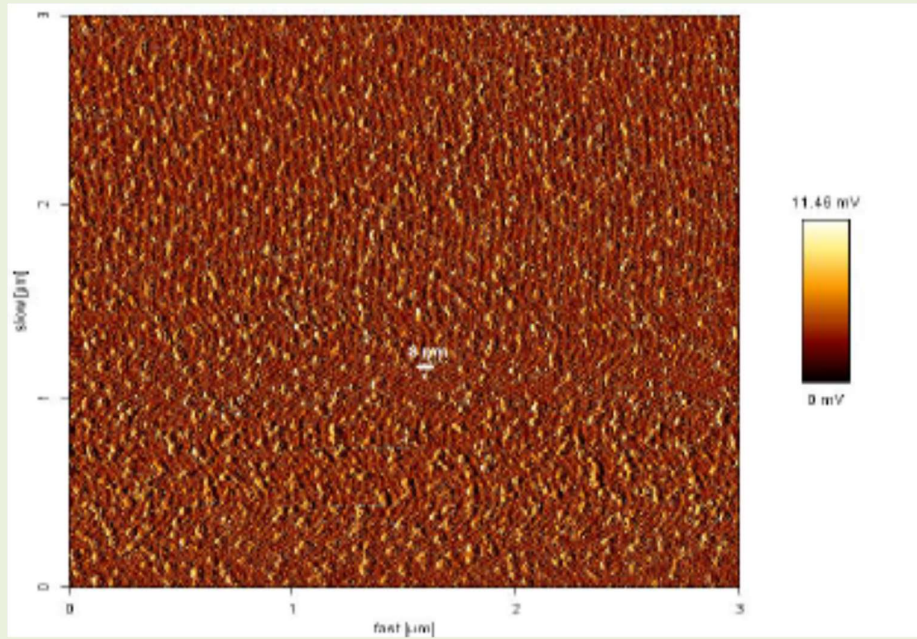


PLGA(الف)



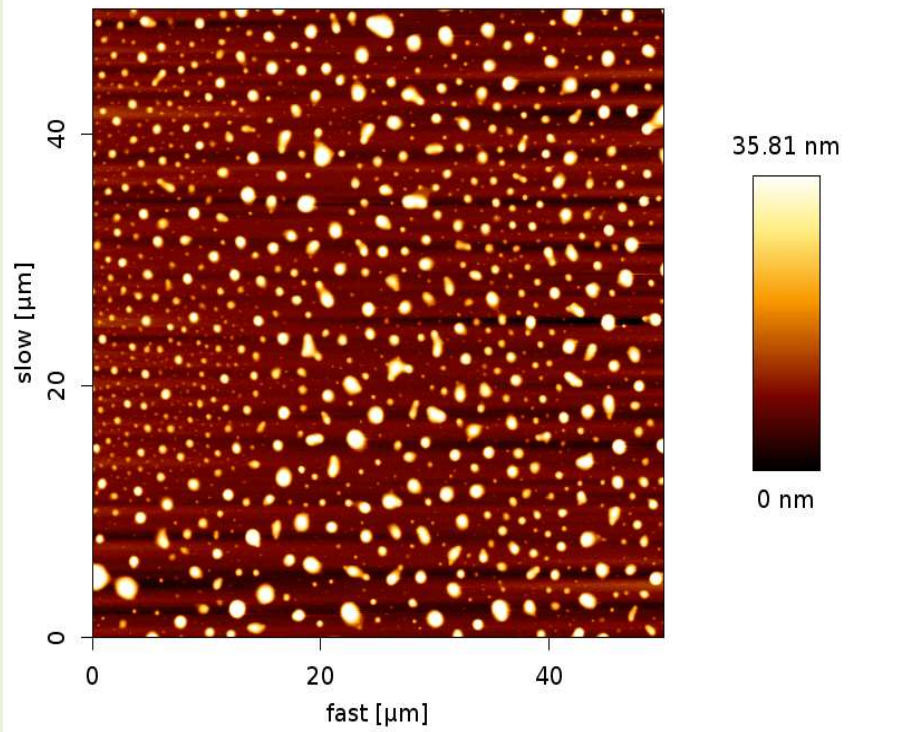
PLGA-LPS(ب)

نمودار ۳- نمودارهای تایید کننده کونژوگاسیون بین LPS و PLGA با طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) برای شناسایی ترکیبات آلی: شکل (الف) PLGA، شکل (ب) کونژوگه لیپوبلی ساکارید با PLGA



PLGA (الف)

Channel: Height (measured); trace



LPS-PLGA (ب)

شکل ۱- توپوگرافی سطحی نانو ذره و کونژوگه با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)
 (الف) PLGA، شکل (ب) کونژوگه لیپولی ساکارید و PLGA

با توجه به شکل ۱ (الف و ب) مشاهده شد که سایت-های نانوذره PLGA از حالت تیزی به حالت کروی و پفکی تغییر شکل پیدا کرده که گواه این مطلب است که کونژوگاسیون با موفقیت انجام گرفته است. در تست چلنج مثانه بیشترین میانگین رشد مربوط به گروه کنترل بود. در تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه که با نرم افزار SPSS انجام گرفت. تفاوت معنا داری بین تمام گروه های آزمون مشاهده گردید ($p < 0.05$). با استفاده از آزمون تعقیبی LSD, Tukey مشخص شد بین تمام

گروه های آزمون در مقایسه با گروه کنترل و PLGA تفاوت معنا دار وجود دارد. میانگین تعداد کلنی های شمارش شده در گروه کنترل به طور معنا داری از تمام گروه ها بیشتر بود. در گروه کنترل و PLGA چون از واکسن کونژوگه استفاده نشده بود تفاوت معناداری از نظر تعداد کلنی با سایر گروه ها بود. این موضوع بیان گر این موضوع بود که ترکیب کونژوگه لیپوپلی ساکارید و PLGA مقاوت و ایمنی زایی مناسبی نسبت به گروه های کنترل و PLGA داشته است.

جدول ۱- آنالیز توصیفی شمارش کلنی های باکتری پروتئوس میرابلیس گروه های آزمون در تست چلنج

تعداد	Mean CFU/ml	Std.Deviation
گروه دریافت کننده نرمال سالمین	۹۸×۱۰ ^۲	± ۲/۰
گروه دریافت کننده PLGA	۹۱/۳×۱۰ ^۲	± ۱/۵۲
گروه دریافت کننده LPS	۳/۶×۱۰ ^۳	± ۰/۵۵
گروه دریافت کننده LPS- PLGA	۶/۲×۱۰	± ۱/۰۵

بحث و نتیجه گیری

پروتئوس میرابلیس، باکتری میله ای، گرم منفی، فرصت طلب و یکی از علل شایع عفونت های ادراری است. این باکتری عامل عفونت در زنان، کودکان، افراد پیر و بیماران دارای سوند به مدت طولانی و افرادی با مشکلات مادرزادی و غیر مادرزادی در مجاری ادرار می باشد. مکانیسم بیماری زایی این باکتری دقیقاً مشخص نیست، اما عوامل ویروالانسی چون فعالیت آنزیم اوره آزه، اتصال به سلول های اوروایی تلیال، همولیزین، حرکت و قدرت تهاجم باکتری را در بیماری زایی آن موثر می دانند (۷، ۳۶، ۳۷). این باکتری مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های معمول مورد استفاده دارد. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری، دلیل اصلی شکست در درمان است (۵). از این رو در این پژوهش به ارزیابی ایمنی زایی

نانو واکسنی متشکل از کونژوگه PLGA و LPS دتوکسینای شده پروتئوس میرابلیس در مدل حیوانی مبتلا به عفونت ادراری پرداخته شده است، تا گامی در جهت پیشگیری از عفونت ادراری ناشی از این باکتری برداشته شود. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۰ اثبات شد که آنتی ژن ها و فاکتورهای رشد انسانی به طور موفقیت آمیزی در نانوذره PLGA یا بستری از آن ترکیب می شوند. از سال ۱۹۹۹ اداره غذا و داروی آمریکا استفاده از PLGA را در داروهای مختلف و به خصوص در داروهای ضد سرطانی مورد تایید قرار داده است (۱۲). در این تحقیق نیز از کونژوگه ی PLGA (به عنوان سیستم انتقال دهنده به منظور افزایش کارایی واکسن و انتقال موثر آن به سیستم ایمنی) و لیپوپلی ساکارید (به عنوان آگونیست) TLRs استفاده شد. پپتیدو گلیکان دیواره ی

یکی از توسعه یافته‌ترین پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست تخریب پذیر از خانواده پلی‌استرهای آلیفاتیک است و به خاطر خواص جذابش به یک انتخاب محبوب در برنامه‌های کاربردی دارورسانی تبدیل شده است. با توجه به خواص و زیست‌سازگاری مناسب PLGA از این پلیمر برای کپسوله کردن انواع داروها و مواد زیستی استفاده می‌شود (۱). در پژوهش حاضر نیز آنتی ژن لیپو پلی ساکارید را با نانوذره پلیمری PLGA همراه نموده و کاندید نانو واکسن کوژوگه ی قوی و ایمونوژنی علیه عفونت ادراری ناشی از پروتئوس میرابلیس تولید شود. ابتدا تست های تشخیصی از طریق مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی که تاییدی بر وجود پروتئوس میرابلیس بودند، انجام شدند. سپس به منظور اطمینان از صحت تشکیل کوژوگه از دستگاه Zetasizer استفاده شد. این دستگاه، دستگاه اندازه گیری ذرات نانو است، که توانایی اندازه گیری سه مشخصه ذرات یا مولکول ها در محیط مایع را دارد. این سه پارامتر بنیادی عبارتند از: اندازه ذره (Particle size)، پتانسیل زتا (Zeta potential) و وزن مولکولی (Molecular weight) با به کار بردن تکنولوژی منحصر به فرد در دستگاه Zetasizer می توان این پارامترها را در دامنه وسیعی از غلظت ها اندازه گیری کرد. یکی از خصوصیات بارز این دستگاه ، اندازه گیری های تکرارپذیر و دقیق با کنترل دقیق دما است. نتایج نمودارهای (۱) و (۲) حاکی از مثبت شدن شارژ کوژوگه نسبت به شارژ منفی PLGA بود که موفقیت آمیز بودن کوژوگاسیون را نشان می دهد. تست دیگری که در این پژوهش انجام گرفت، تست FT-IR (طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز) است. طیف سنجی های مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش های ارتعاشی مولکول ها و یون های چند اتمی صورت می گیرد مطابق با نمودار (۳)، پیک عدد موج ۱۶۵۴.۰۷

سلولی یا لیپو پلی ساکارید باکتری های گرم منفی پاسخ ایمنی را علیه آنتی ژن هایی که همراه با آن ها توزیع می شوند، افزایش می دهد. فعالیت آن ها از فعال سازی گیرنده های شبه تول (TLRs) از طریق شروع سیگنال های خطر سیستم دفاعی میزبان، تاثیر می پذیرد. امروزه به کارگیری آگونیست های TLRs در فرمولاسیون واکسن ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این مولکول ها با اتصال به گیرنده های خود در سطح سلول های سیستم ایمنی به ویژه سلول های عرضه کننده آنتی ژن، موجب فعال شدن این سلول ها و آغاز پاسخ های التهابی می شوند. واکسن هایی که از لیپو پلی ساکارید استفاده می کنند، می باید بیشتر تخلیص شده و اغلب سم زدایی شوند (۸). در این پژوهش نیز LPS مطابق روش ذکر شده تخلیص و سپس دتوکسیفه، دیالیز و خالص سازی شد. واکسن های پلی ساکاریدی در فعال کردن سلول های Th ناتوان هستند و فقط سلول های B را به صورت مستقل از T فعال می کنند، یک راه جهت تحریک مستقیم سلول های Th در پاسخ به آنتی ژن های پلی ساکاریدی، کوژوگه کردن آنتی ژن با انواعی از حامل ها است. در چند دهه اخیر واکسن های کوژوگه متعددی به منظور القای حفاظت علیه ارگاناسم های بیماری زا طراحی شده است. از جمله پژوهش هایی که در طی آن ایمنی زایی کوژوگه در مقایسه با LPS بیشتر بوده است، می توان به پژوهش میدیونتر و همکاران اشاره کرد که در آزمایشات خود شاهد ایمنی زایی بیشتر کوژوگه لیپو پلی ساکارید- توکسوئید دیفتری در مقایسه با LPS در موش ها بودند. در آزمایشات کریز و همکاران (۱۹۸۶) نیز میزان ایمنی زایی کوژوگه LPS با توکسوئید دیفتری بیش از LPS بود (۱۹). یکی از متداول ترین پلیمرهای مورد استفاده برای تولید نانو ذرات پلیمری، نانو ذره PLGA، پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید، است. پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA)

مربوط به گروه (O=C-OH) لیپو پلی ساکارید، ۳۴۱۴.۲۶ مربوط به گروه های OH قندی و ۳۲۹۱.۴ مربوط به CH قندی هستند. جابجایی شیمیایی موجود نشان دهنده ی برقراری پیوند کوالان مابین دو مولکول PLGA و LPS و کونژوگاسیون موفق است. به منظور بررسی جذب سطحی آنتی ژن از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) استفاده شد. این میکروسکوپ دستگاهی است که برای بررسی خواص و ساختار سطحی مواد در ابعاد نانومتر به کار می رود. نتایج حاصل از این بررسی نشان دهنده ی تغییر سایز سایت های اتصالی نانو ذره PLGA از ارتفاع ۸ نانومتر قبل از کونژوگاسیون به ارتفاع ۸۱.۳۵ نانومتر در LPS-PLGA و تغییر شکل سایت های اتصالی از حالت تیزی در قبل از کونژوگاسیون به حالت کروی و پفکی در بعد از انجام کونژوگاسیون جذب سطحی آنتی ژن بود، که بیان گر موفقیت آمیز بودن کونژوگاسیون می باشد. همان طور که ذکر شد گروه آزمون اول با کونژوگه PLGA-LPS، گروه آزمون دوم با PLGA خالص، گروه آزمون سوم با LPS تنها و گروه کنترل که نرمال سالین دریافت کردند، ایمنی زایی گروه آزمون با LPS در مقایسه با گروه آزمون با کونژوگه ی LPS-PLGA کمتر بود و واکنس کونژوگه قوی تر و ایمنونژن تر عمل نموده است. این امر نشان دهنده ی همین مطلب است که واکنس های پلی ساکاریدی چون LPS به تنهایی قابلیت ایمنی زایی بالایی ندارند و باید به صورت کونژوگه با ترکیبی دیگر استفاده شوند. واتق (۱۳۹۵)، ایمنی زایی کونژوگه نانوذره پلی لاکتیک گلیکولیک اسید و توکسوئید تانی، دیفتری و انتروتوکسین B استافیلوکوک را در مدل موشی مورد مطالعه قرار داد. نتایج مطالعات او نشان دهنده ی اثر ایمنو مدلاتوری PLGA بود و مشخص شد که این نانوپلیمر به خودی خود بر روی کم و کیف پاسخ ایمنی می تواند تاثیر گذار باشد (۱۱). نتایج این تحقیق نشان داد که ایمنی زایی

PLGA به طور معناداری ($p < 0.05$) با گروه کنترل متفاوت بود. در تست چلنج پژوهش حاضر نیز گروه های کنترل بیشترین میزان رشد را داشتند و میانگین تعداد کلنی های رشد کرده آن به طور معناداری از تمام گروه-ها بیشتر بود. طبق آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه که با نرم افزار SPSS انجام گرفت، بین تمام گروه ها تفاوت معناداری ($p < 0.05$) وجود داشت و بر اساس آزمون Tukey, LSD نیز ایمنی زایی PLGA به طور معناداری با گروه کنترل متفاوت بود. لذا، نتایج بررسی-های پژوهش حاضر را می توان در تطابق با پژوهش های دیگر انجام شده دانست. نتایج ارزیابی ایمنی زایی کونژوگه ریبوزیل ریبتول فسفات هموفیلوس آنفولانزای تیپ b با پروتئین Keyhole Limpet Hemocyanin و نانوذره PLGA توسط اردستانی و همکاران (۱۳۹۲) نشان داد که اضافه شدن PLGA به کونژوگه RPR-KLH باعث افزایش نفوذپذیری و جذب آن در سلول های ایمنی شده است (۱۲). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، PLGA به عنوان حامل مناسبی برای انتشار تسهیل یافته آنتی ژن ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول های هدف و افزایش تیرایمونوگلوبولین ها و افزایش معنی دار پاسخ های ایمنی مطرح شد (۱۵). با بررسی اثر ادجوانتی نانوذرات طلا بر ایمنی زایی نورو توکسین بوتولینوم تیپ E نشان دادند که این نانوذرات هم می توانند همانند PLGA در این مطالعه، باعث تحریک سیستم ایمنی و در نتیجه بروز پاسخ شوند (۲۲). چرا که در این پژوهش نیز بین گروه کنترل و PLGA که واکنس کونژوگه استفاده نشده بود، با سایر گروه ها تفاوت معناداری از نظر تعداد کلنی مشاهده شد. لذا، مطابق با سایر پژوهش های ذکر شده، این امر نشان دهنده ی ایمنی زایی و مقاومت مناسب این کونژوگه و مناسب بودن PLGA به عنوان حامل آنتی ژنی LPS است. زیرا، نانوذره PLGA دارای

حاضر نیز در مثانه موش هایی که کونژوگه LPS-PLGA را دریافت کرده بودند باکتری کمتری در مقایسه با بقیه گروه ها رشد کرد بود. در این پژوهش برای اولین بار از باکتری پروتئوس میرابیلیس جهت ایجاد عفونت ادراری که به طور مستقیم به مثانه تزریق شده استفاده گردید و در نهایت نتایج بیان گر آن بود که کونژوگه LPS-PLGA توانایی بهتری در پیشگیری از عفونت ادراری در موش سوری نسبت به گروه های خالص مثل LPS، PLGA، نرمال سالین دارد و می تواند سیستم ایمنی بدن را تحریک کند. هم چنین مشخص شد نانوذره به کار رفته PLGA قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان حامل در ساخت واکسن دارد. بنابر این کونژوگه تهیه شده به عنوان کاندید نانوذره واکسن برای پیشگیری از عفونت ادراری در موش سوری موثر خواهد بود.

انتهاهای اتصال بسیار است و خاصیت ترکیب پذیری بالایی با داروی مبدا و سلول هدف دارد. به طور کلی، این مشاهدات بر اساس اطلاعات به دست آمده در شرایط آزمایشی مختلف (مدل های درون تنی و برون تنی مختلف، پروتئین های مختلف، غلظت های متفاوت، پلیمرهای مختلف و غیره) بوده است و نمی توان نتایج مختلف را به طور کامل با هم مقایسه کرد و در مواردی با هم دچار اختلاف و تضاد هستند. مسنی و همکاران (۱۳۹۶) با بررسی ایمنی زایی ترکیب کونژوگه نانو ذره PLGA به همراه آلژینات سودوموناس آئروژینوزا به عنوان کاندیدای نانو واکسن در مدل خرگوشی پرداخت و مشخص نمود که در تست چلنج خرگوش هایی که نانو واکسن دریافت کرده بودند باکتری های کمتری در طحال رشد کرده بود که نشان دهنده بهبود سیستم ایمنی بدن می باشد (۹). در تحقیق

منابع

- ۱- استفاده از نانو ذرات پلیمری برای دارورسانی هدفمند. روزنامه صمت، شماره ۵۱۶. ص ۶. <http://www.smtnews.ir/industry/20896>
- ۲- جابری، غ، شاپوری، ر، کریمی، ن. ۲۰۱۳. ایمنی زایی کونژوگه آلژینات سودوموناس آئروژینوزا و توکسوئید دیفتری در موش. فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروب ها، ۱۴۷-۱۳۸.
- ۳- جانفرا، س، رضوی، ح. ۱۳۹۴. فناوری نانو ذرات پلیمری برای دارورسانی خوراکی. سایت ستاد ویژه توسعه فناوری نانو www.nano.ir
- ۴- رضویان، پ، شاپوری، ر. ۱۳۹۳. بررسی ایمنی زایی کونژوگه OPS، یرسینیا انتروکولیتیکا: O با توکسوئید دیفتری به عنوان نامزد واکسن در موش. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۱۵(۲): ۱۸۹-۱۹۷.
- ۵- رنجبر، ا، ارزنلو، ا، مظفری، ن، شکری، ه، امانی، خ. ۱۳۹۳. مطالعه اثر ضد میکروبی آلیسین در مقابل ایزوله های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۱۵(۱): ۱۰۶-۱۱۷.
- ۶- سلطان دلال، م. ۱۳۹۴. بررسی الگوی مقاومت دارویی سویه های پروتئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۱(۳): ۴۸-۴۰.
- ۷- عاملی، ف، ملک زاده، ف. ۱۳۸۴. بررسی اثر Sub-minimal concentration آمپی سیلین، جنتامایسین و نالیدیکزیک اسید بر رشد، تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره آز پروتئوس میرابیلیس. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۱(۱): ۳۱-۴۰.
- ۸- فومنی، ق، اسدپور، ل، سراجی ع، آقاصادقی، م. ۱۳۹۱. انواع ادجوانت و مکانیسم عمل آن ها. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۱۲(۳): ۲۷۶-۲۹۱.
- ۹- مسنی، م، صلوتی، م، شاپوری، ر. ۱۳۹۶. بررسی ایمنی زایی ترکیب کونژوگه نانو ذره PLGA به همراه آلژینات سودوموناس آئروژینوزا به عنوان کاندیدای نانو واکسن در مدل خرگوشی، سومین کنفرانس ملی تازه های سلولی

(1992). Capsule structure of *Proteus mirabilis* (ATCC 49565). *Journal of Bacteriology*, 174(7); 2172-2177.

18. Brandhonneur, N., Cheanne, F. (2009). Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36; 474-48.

19. Cryz, S.J., Jr., Fürer, E., Germanier, R. (1984). Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* burnwound sepsis by immunization with lipopolysaccharide and high-molecular-weight polysaccharide. *Infect Immun*, 43(3); 795-9.

20. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Pr eat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2); 505-522.

21. Drago-Serrano, M. E., de la Garza-Amaya, M., Luna, J. S., Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology*, 12(1); 1-9.

22. Ebrahimi, F., Rabiee, A. (2013). Study of adjuvant capability of the gold nanoparticles on immunity of botulinum neurotoxin serotype E in mouse. *ADST Journal*, 4(2); 87-92.

23. Fisher, S., Foerg, Ch. (2006). All on-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles and their functionalization with model ligands. *Journal of Controlled Release*, 111; 135-144.

24. Forbes, B., Sahn D.F., Weiss Feld, A.S. (2012). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 07 th ed, Mosby; p0196-0161.

25. Gadad, A. P., Vannuruswamy, G., Sharath Chandra, P., Dandagi, P. M., Mastiholimath, V. S. (2012). Study of different properties and applications of poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanotechnology: an overview. *Indian drugs*, 49(12); 5-22.

26. Gerald, B. (2003). Construction & Characterization of a *Pseudomonas* Vaccine. *American Society for Microbiology*, 71; 3875-3884.

27. Greaterix, J. S., Thorne, G. M. (1994). Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* 0157 lipopolysaccharide n

مولکولی و اولین سمپوزیوم بین المللی ژنو میکس و پروتئومیکس، اردبیل،

۱۰-میرزاخانلویی، ساسان. ۱۳۹۰. ساخت و تعیین ویژگی های نانوالیاف بر پایه کوپلیمر پلی لاکتیک گلایکولیک اسید (PLGA) با استفاده از روش الکتروریسی به منظور به کارگیری در کشت سلول های بنیادی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم و فناوری های نوین. دانشگاه اصفهان.

۱۱-واثق، روح ا... ۱۳۹۵. ارزیابی پاسخ های ایمنی (سلولی و همورال) بر علیه کونژوگه نانوذره پلی لاکتیک گلایکولیک اسید (PLGA) و توکسوید تتانی، توکسوید دیفتری و انترتوکسین B استافیلوکوک در مدل موشی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم پزشکی. دانشگاه تربیت مدرس.

۱۲-یاوری، ح، سیادت، سیدداور، شاپوری، ر، شفیی اردستانی، م. ۱۳۹۴. تهیه واکسن کونژوگه پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b با پروتئین Keyhole Limpet Hemocyanin و نانوذره Poly lactic-co-glycolic acid و ارزیابی ایمنی آن در مدل حیوانی. <https://civilica.com/doc/783299>

13. Bahrani, F. K., Johnson, D. E., Robbins, D. A. V. I. D., Mobley, H. L. (1991). *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: isolation, purification, N-terminal analysis, and serum antibody response following experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 59(10); 3574-3580.

14. Bale, M. J., Mclaws, S. M., Matsen, J. M. (1985). The spot indole test for identification of swarming *Proteus*. *American Journal of Clinical Pathology*, 83(1); 87-90.

15. Bandyopadhyay, A., Fine, R. L., Demento, S., Bockenstedt, L. K., Fahmy, T. M. (2011). The impact of nanoparticle ligand density on dendritic-cell targeted vaccines. *Biomaterials*, 32(11); 3094-3105.

16. Belas, R. O. B. E. R. T., Erskine, D., Flaherty, D. (1991). *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. *Journal of Bacteriology*, 173(19); 6279-6288.

17. Beynon, L. M., Dumanski, A. J., McLean, R. J., MacLean, L. L., Richards, J. C., Perry, M. B.

- hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects, *Journal of Clinical Microbiology*, 32; 1172-1177 .
28. Guggenheim, M., Zbinden, R., Handschin, A. E., Gohritz, A., Altintas, M. A., Giovanoli, P. (2009). Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: a 20-year study (1986–2005). *Burns*, 35(4); 553-560.
29. Handschin, A. E. (1994). Immunization-induced human polyclonal antibodies to lipopolysaccharide subtypes of *Pseudomonas aeruginosa* Serogroup 06. *Infection and Immunity*, 62; 1137-1143.
30. In, Z. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* .Pathogenicity & Antibiotic Resistance, 2nd ed, 56:1 .
31. Kadurugamuwa, J., Lam, J. S., Beveridge, T. J. (2003). Interaction of gentamicin with the a band and b band. *Clinical Microbiology*, 79(3); 65-78.
32. Kearns, D. B., Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(3); 581-590.
33. Khurana, S., Utreja, P., Tiwary, A. K., Jain, N. K., Jain, S. (2009). Nanostructured lipid carriers and their application in drug delivery. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*, 2(2); 152-171.
34. Knirel, Y., Kaca, W., Rozalski, A., Sidorchuk, Z. (1999). Structure of the O-antigenic polysaccharides of *Proteus* bacteria. *Polish Journal of Chemistry*, 73(6); 895-907.
35. Konadu, E. Y., Parke, J. C., Tran, T. I. (1998). Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157, Phase 1 study of o157 specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein conjugates in adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 177; 383 .
36. Krieg, N. R., Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*.-vol. 1. William and Wilkins, Baltimore, London.
37. Li, X., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Lane, M. C., Warren, J. W., Mobley, H. L. (2004). Development of an intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, 72(1); 66-75.
38. Li, X., Zhao, H., Lockett, C. V., Drachenberg, C. B., Johnson, D. E., Mobley, H. L. (2002). Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 70(1); 389-394.
39. O'fallon, E., Gautam, S., D'agata, E. M. (2009). Colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. *Clinical Infectious Diseases*, 48(10); 1375-1381.
40. Penner, J.L. (1992). The genera *proteus*, *providencia* and *morganella*. In *The Prokaryotes*, p 2849–2853. Springer, Berlin.
41. Perry, M. B., MacLean, L. L. (1994). The structure of the polysaccharide produced by *Proteus vulgaris* (ATCC 49990). *Carbohydrate Research*, 253; 257-263.
42. Pier, G.B., Koles, N. L., Meluleni, G. (2000). Specificity and function of murine monoclonal antibodies. *Carbohydrate Research*, 280; 257-263
43. Ramsay, J. W. A., Garnham, A. J., Mulhall, A. B., Crow, R. A., Bryan, J. M., Eardley, H. N. (1989). Biofilms, bacteria and bladder catheters A clinical study. *BJU International*, 64(4); 395-398.
44. Rasko, D. A., Moreira, C. G., Li, D. R., Reading, N. C., Ritchie, J. M., Waldor, M. K. T. (2008). Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, 321(5892); 1078-1080.
45. Ray, S., Suar, M. (2014). Vaccine nanocarriers: The future ahead. *handbook of research on diverse applications of nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering*, 221.
46. Różalski, A., Sidorchuk, Z., Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61; 65–89.
47. Sharp, P. M., Saenz, C. A., Martin, R. R. (1974). Amikacin (BB-K8) treatment of multiple-drug-resistant *Proteus infections*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5(5); 435-438.
48. Stickler, D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., Winters, C. (1993). *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological Research*, 21(6); 407-411.

49. Torzewska, A., Budzyńska, A., Białczak-Kokot, M., Różalski, A. (2014). In vitro studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microb Pathog*, 71– 72; 25–31.

50. Van Amersfoort, E. S., Kuiper, J. (2007). B18 receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*, 383.

51. Wasfi, R., El-Rahman, O. A., Mansour, L. E., Hanora, A. S., Hashem, A. M., Ashour, M. S.

(2012). Antimicrobial activities against biofilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract infections. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(1); 76.

52. Wells, M., Gaffin, S.L. (1987). Anti-Pseudomonas activity of anti lipopolysaccharide hyperimmune equine plasma. *Clin.exp.Immunol*, 68;86-92.

53. Wolf, P., Elsasser-Beile, U. (2116). Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol*, 266(3); 090-7.



Evaluation of Immunogenicity of PLGA – *Proteus mirabilis* Detoxified Lipopolysaccharide Conjugate Against Urinary Tract Infection in Mice

E. Saeidi¹, **R.Shapouri**¹, M. Rahnema¹, M. Salouti¹, J. Nasserian²

1. Microbiology & Biology Department, Engineering and Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan, Iran. drreza1357@gmail.com

2. Mathematical & Statistics Department, Engineering and Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Received: 2020.13.7

Accepted: 2020.22.9

Abstract

Introduction & Objective: Spermatogonial stem cells (SSCs) as adult stem cells are crucial for spermatogenesis. Electromagnetic fields (EMF) leads to biological activity disruption of these cells and spermatogenesis. Antioxidants like vitamin C can reduce the damage caused by EMF through oxidative stress reduction. Recent studies also reported the key role of Sertoli cell paracrine signaling in regulating the maintenance and differentiation of SSCs. Thus, we examined and compared the effect of vitamin C and exosomes derived from Sertoli cells on damage induced by EMF in SSCs.

Materials and Methods: In the present study, after the massive cultivation of *Proteus mirabilis*, its LPS was extracted, purified and detoxified and ultimately conjugated with PLGA nanoparticle. This conjugation was confirmed with Zeta Sizer, FTIR and AFM devices. Vaccination was injected intramuscularly, 3 times in two weeks, to 4 groups of 3 mice treated with normal saline (control group), LPS, PLGA and PLGA-LPS conjugate. To perform the challenge test, mice were anesthetized and operated with ethical rights in sterile conditions and 6×10^7 CFU concentrations of *Proteus mirabilis* bacteria was injected into their bladder. After one week of injection, their bladder was removed and suspended in a salt buffer.

Results: The results of the challenge test confirmed the success of the PLGA-LPS conjugate in comparison with other groups. In other words, the control and PLGA groups had the highest growth rates, and the average number of colonies was significantly higher than all of the groups. And the number of colonies grown in groups were LPS-PLGA (6.2×10^3 CFU/ml), LPS (3.6×10^3 CFU/ml), PLGA (91.3×10^2 CFU/ml) and NS (98×10^2 CFU/ml). According to one-way ANOVA, which was done by SPSS software, there was a significant difference between all groups ($P < 0.05$). The PLGA immunogenicity was significantly different with the control group.

Conclusion: Therefore, it can be concluded that the PLGA-LPS conjugate has an appropriate immunity and, by examining its non-toxicity in pathologic studies, can be a candidate of nano-vaccine for prevention of urinary tract infection caused by *Proteus mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*, Co-glycolic poly lactic acid, Lipopolysaccharide conjugation, Nano-vaccine.