

ارزیابی ایمنی زایی حاملین نانوذرات PLGA حاوی آنتی ژن لیپوپلی ساکارید دتوکسیفیه شده کلبسیلاپنومونیه K2O1 در مدل عفونت ریوی موش BALB/C

پریوش قادری نیا^۱، رضا شاپوری^۲، کبری رستمی زاده^۳، علیرضا خداوندی^۴، مهدی مهدوی^۵

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز.

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. Rezashapoury@yahoo.com

۳- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران.

۴- گروه زیست شناسی، واحد گجساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گجساران، ایران.

۵- مرکز تحقیقات واکنش‌های نوترکیب، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلاپنومونیه شایع‌ترین باکتری بیماری‌زا در جنس کلبسیلاها است. سالیانه مرگ حدود ۲ میلیون کودک کمتر از ۵ سال از پنومونی گزارش می‌گردد. هم‌چنین کلبسیلاپنومونیه عامل ایجاد پنومونی و عفونت‌های مجاری ادراری، در بیماران با اختلال در سیستم ایمنی و جزء عفونت‌های بیمارستانی است. به دلیل مقاومت اکتسایبی و ذاتی کلبسیلاپنومونیه جداشده در برابر طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها، به نظر می‌رسد کنترل و درمان آن حیاتی است. هدف مطالعه حاضر استفاده از نانو ذرات Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) در طراحی واکنش با آنتی‌ژن دتوکسیفیه شده لیپوپلی ساکارید کلبسیلاپنومونیه K2O1 در مدل عفونت ریوی موش BALB/C است.

روش کار: در مطالعه حاضر آنتی‌ژن لیپوپلی ساکارید از سوبه کلبسیلاپنومونیه به روش سانتریفیوژ با دور بالا استخراج و توسط فنل داغ سم‌زدایی گردید. سپس آنتی‌ژن لیپوپلی ساکارید با نانو ذرات پلی لاکتیک-کولیک اسید کوژوگه شدند. از روش طیف‌سنجی (FT-IR) مادون قرمز و (AFM) میکروسکوپ نیروی اتمی برای تأیید انجام کوژوگاسیون با نانو ذرات استفاده شده است. برای بررسی اندوتوکسین واکنش طراحی شده از روش بررسی کیت (L.A.L) لیمولوس آمیبوسیت لیسیت تست و برای کنترل تب بر روی خرگوش و میزان مرگ‌ومیر بر روی موش‌ها بررسی گردید. موفقیت کوژوگه‌های آنتی‌ژن و نانو ذرات بر اساس اندازه و شارژ نانو ذرات حاوی آنتی‌ژن تأیید شد.

یافته‌ها: نتایج FT-IR و شکل پیک‌های مربوطه حضور گروه‌های عاملی آنتی‌ژن در ساختار نانو ذره و تشکیل پیوند استری را تأیید کردند. تصاویر حاصل از میکروسکوپ نیرو اتمی نانو ذرات حاوی آنتی‌ژن لیپوپلی ساکارید و نانو ذرات قبل از کوژوگاسیون، افزایش سابت‌های اتصالی نانو ذرات را نشان دادند. تغییر از حالت تیزی اولیه به پفکی پس از انجام کوژوگاسیون موفقیت حمل آنتی‌ژن توسط نانو ذرات را اثبات کرد. مشاهده نشدن تب در خرگوش و مرگ‌ومیر در موش‌ها اثبات گردید. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل مؤثر بودن واکنش را در ایمنی‌زایی نشان دادند و بنابراین به‌عنوان کاندیدای واکنشی مناسب علیه بیماری‌های ناشی از کلبسیلاپنومونیه در مرحله اول کارآزمایی بالینی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلاپنومونیه، لیپوپلی ساکارید، نانو ذرات پلی لاکتیک-کولیک اسید، K2O1، واکنش.

مقدمه

دلیل قیمت پایین و سهولت نگهداری از جوندگان کوچک آن‌ها را به حیواناتی جذاب برای این نوع مطالعات تبدیل کرده است. مطالعات گذشته حاکی از این مورد است که تلقیح داخل بینی کلبسیلاپنومونیه به داخل بینی جوندگان باعث پنومونی می‌شود (۱۲). استفاده از

کلبسیلاپنومونیه یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیر متحرک، لاکتوز مثبت، میله‌ای کپسول دار می‌باشد (۸). برای مطالعه عوامل باکتریولوژیک مرتبط با بیماری دستگاه تنفسی تحتانی ناشی از کلبسیلاپنومونیه به

واکسن برای مقابله با عفونت های ویروسی تاریخی طولانی دارد اما مطالعه در مورد ساخت واکسن بر علیه کلبسیلا پنومونیه چندان قدمتی ندارد تلاش های زیادی برای ساخت واکسن در دنیا بر علیه این باکتری انجام شده ولی نتایج رضایت بخشی مشاهده نشده است (۷). استفاده از اپی توپ های مختلف باکتری برای تولید واکسنی کارا مورد مطالعه قرار گرفته و هم چنان مطالعات مختلفی برای شناسایی قسمتی از باکتری که واکسنی کارا بشود از آن برای تولید واکسن استفاده کرده ادامه دارد (۲۰). استفاده از لیپوپلی ساکارید (LPS) در زمینه تولید واکسن بر علیه کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار نگرفته است. لیپوپلی ساکارید LPS از سه قسمت تشکیل شده است. ۱- بخش بسیار حفاظت شده و آب گریز لیپید A که به غشای خارجی لنگر انداخته است. ۲- بخش بسیار متغیر آنتی ژن O و خارجی ترین بخش LPS و ۳- بخش مرکزی پلی ساکاریدی متصل به لیپید A و آنتی ژن O. بخش آنتی ژن O دارای ۹ گروه آنتی ژنی تا به امروز شناسایی شده است (۱۶، ۳۱). آنتی ژن O1 در اکثر گروه های بیماری زا جداسازی شده و در بدن میزبان مانع از فعال سازی ترکیبات کمپلمان و به واسطه ی این عمل از کشته شدن به واسطه ی مسیر کمپلمان جلوگیری می کند (۱۶، ۲۷). لیپید A موجود در LPS توسط آنزیم های موجود در سیتوپلاسم سنتز و توسط سیستم ABC منتقل می شود (۹). لیپید A یا اندوتوکسین خاصیت سمی داشته و روی مونوسیت ها و ماکروفاژها اثر می گذارد. این توکسین موجب آزادسازی TNF، اینترلوکین ها و فاکتور محرک کلنی می گردد (۱). دیواره ی باکتری های گرم منفی از LPS تشکیل شده که در ارتباط با بیماری زایی باکتری می باشد (۱۳). لیپید اولیه ی سطح باکتری های گرم منفی و اصلی ترین جزء دیواره ی آنها بوده و نام دیگر آن اندوتوکسین است و در ارتباط با بیماری های مجاری ادراری می باشد. بخش لیپید A در میان تمامی باکتری های گرم منفی یکسان است بخش

مرکزی O نیز در میان باکتری های گرم منفی مشابه بوده و از نواحی هپتوزی (هفت کربنه) تشکیل شده است. بخش بیرونی ناحیه O به عنوان آنتی ژن تلقی می شود و از یک یا چند واحد الیگوساکاریدی متغیر تشکیل شده که در سرو تایپ های مختلف متفاوت است (۸، ۳۱). LPS قادر به تحریک سلول های دندریتیک می باشد آنتی ژن O1 بیشترین بیماری زایی را در ایزوله ها نشان داده است در تحقیقاتی نشان داده که واکسن سازی علیه آنتی ژن O موجب ایمن سازی در برابر بسیاری از سرو تایپ های کپسولی کلبسیلا می شود (۲، ۹، ۱۶). آنتی ژنیک بودن LPS دلیلی برای تحریک سیستم ایمنی بدن و استفاده از آن در ساخت واکسن می باشد (۲۰). نانو ذرات پلیمری پلی لاکتیک کو-گلایکولیک اسید (PLGA)، با توجه به مزایایی نظیر زیست تجزیه پذیری، دارا بودن تائیدیه FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا) و EMA (آژانس پزشکی اروپا)، از لحاظ ایمن بودن در کاربردهای انسانی، روش تهیه نسبتاً آسان، قابلیت تطبیق پذیری و کنترل آسان بسیار مورد استفاده قرار می گیرد (۷). استفاده از PLGA کمترین سمیت را در کاربردهای دارویی دارد. این پلیمرها تجاری و با جرم مولکولی و ترکیبات کوپلیمری مختلف هستند، زمان تخریب آنها بر حسب جرم مولکولی و کوپلیمریزاسیون بین چند ماه تا چند سال به طول می انجامد (۲۴). نانو ذرات مزایای زیادی نسبت به میکرو ذرات دارند و جذب بالاتری در سلول ها به نسبت میکرو ذرات دارند. نحوه توزیع آنها در بدن تحت تأثیر دو خاصیت فیزیکی و شیمیایی اندازه ذرات و بار سطحی ذرات می باشد. این فرمولاسیون در خون پایدار و غیر سمی می باشد و باعث لخته شدن خون نمی گردد (۳۰). قابلیت هدف گیری نانو دارو با اندازه ذرات، بار سطحی، اصلاح سطح و آب گریزی، تحت تأثیر قرار می گیرد (۱۸). از میان این موارد اندازه نانو ذرات و توزیع آنها، برای تعیین برهمکنش آنها با غشا سلولی و نفوذ آنها از میان موانع

۰/۳۷، Na₂HPO₄ 06/0، K₂HPO₄ ۱۲/۰، MgSO₄ ۱۳/، محلول یک نرمال NaOH، محلول یک نرمال HCl؛ و گرماگذاری ۳۵ واحد سلسیوس برای ۷-۵ روز و شیکر ۱۰۰ rpm، سپس غیرفعال سازی باکتری با کمک فنل ۹۰٪، ۰.۰۵ سی سی (سی) انجام شد (۸). از بیومس جمع آوری شده کشت انبوه، سوسپانسیون میکروب در آب مقطر تهیه و تا ۶۸ واحد سلسیوس تحت حرارت بن ماری قرارداد شد. سپس فنل ۹۰ درصد به محلول فوق اضافه کرده و در حرارت بن ماری ۶۸ سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده و بعد در آب یخ عمل سرد کردن سریع را انجام گردید. سپس در گرادیان ۲۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ و پس از جداسازی فاز آبی اتانول خالص برابر نصف حجم محلول اضافه و در همان گرادیان ۲۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی جدا شده و سه برابر حجم محلول اتانول خالص اضافه گردید و بعد از سانتریفوژ رسوب LPS تهیه شد (۲). LPS به دست آمده در حداقل محلول NaOH 2/0 حل گردید و به مدت ۳ ساعت در بن ماری بادمای جوش قرار داده شد و pH با NaOH و HCl 1 نرمال در ۷ تنظیم و با کیسه دیالیز ۱۰ کیلو دالتون در برابر بافر آب مقطر با حداقل سه بار تعویض روزانه برای ۲ روز دیالیز و سپس D-LPS با سه برابر اتانول خالص استخراج گردید (۱۹). برای تهیه نانوذره های PLGA حاوی D-LPS ابتدا درون دو بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری یک مگنت قرار داده شد و تقریباً ۵ میلی لیتر از حلال DMF ریخته شد و سپس ۲۰۰ میلی گرم PLGA به درون حلال اضافه شد. ۱۰ دقیقه برای حل شدن PLGA در حلال زمان داده شد. سپس EDC 200 میلی گرم و NHS 50 میلی گرم همزمان به داخل ظرف ریخته می شود و بعد از ۵ دقیقه گذر زمان، آنتی ژن های کپسول و LPS جداگانه به مقدار ۴۰۰ میلی گرم به داخل ظروف و بر روی بقیه مواد اضافه گردید و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاهی به منظور انجام واکنش استریفیکاسیون و

فیزیولوژیکی حائز اهمیت اند. مکانیسم رهاسازی با وزن مولکولی پلیمرهای استفاده شده تغییر می کند. از دیگر خواص منحصر به فرد PLGA این است که معمولاً در چرخه های سلولی اختلالی ایجاد نمی کند و زمان قرارگیری دارو بر روی سلول و مسیر آندوسیتوزی را نیز کاهش می دهد که همین مسئله در بررسی های درمانی بسیار حائز اهمیت می باشد. دارو در مرکز PLGA قرار می گیرد و توسط لیگاند های اتصال PLGA می تواند در مولکول های هدف، به نوعی اتصال و انتشار تسهیل یافته ایجاد کند (۳۰). این موضوع در ردیابی های خاص ضد توموری و در مبحث ایمونولوژی به عنوان پیشنهادی در جهت افزایش ورود آنتی ژن های میکروبی و در راستای آندوسیتوز آن توسط سلول های بیگانه خوار و افزایش تولید آنتی بادی های ضد آن و تولید واکنشی موثرتر مطرح می شود (۷). سیستم واکنش رسانی مخاطی یکی از مسیرهای مهم و جای گزین به خاطر ایجاد هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال می باشد. استفاده از نانو ذرات به عنوان سیستم های نوین واکنش رسانی نه تنها باعث افزایش پایداری آنتی ژن و پاسخ ایمنی می شود بلکه باعث آزادسازی آهسته آنتی ژن و توانایی هدفمند کردن این سیستم به منظور ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی وجود دارد (۳). هدف از تحقیق حاضر ارزیابی ایمنی زایی حاملین نانو ذرات PLGA حاوی آنتی ژن لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده کلبسیلا پنومونیه K2O1 در مدل عفونت ریوی موش BALB/C است.

مواد و روش ها

باکتری کلبسیلا پنومونیه K2O1، ATCC10031، PTCC1053 از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران در محیط مولر هینتون آگار خریداری و کشت انبوه در ارلن های ۱ لیتری با حجم ۲۵۰ cc محیط کشت سنتیک صورت گرفت. ترکیبات محیط کشت: گلیسرول ۱/۱۰، دکستروز ۵/۰، L-گلوتامین

تشکیل کونزوگه ی PLGA با لیپوپلی ساکارید و تشکیل این پیوند استری روی شیکر نگهداری شد. بعد از یک هفته فرمولاسیون آماده نگهداری در یخچال می گردد به منظور تخلیص و جداسازی ماکرومولکول کونزوگه بعد از انجام کونزوگاسیون ، با استفاده از ژل فیلتراسیون و سفادکس G-75 و بافر رقیق کننده PBS با سرعت ۴۰ میلی لیتر در ساعت برقرار گردید و تا زمان عبور مایع ، معادل یک حجم بستر از ستون ادامه یافت. سپس با قرائت جذب فرکشن ها در طول موج ۲۱۰ نانومتر، فرکشن های مربوطه جدا گردید (۷). برای اندازه گیری سایز مولکول PLGA و فرمولاسیون LPS - PLGA از دستگاه Zetasizer ، میکروسکوپ الکترونی AFM و FT-IR برای اندازه گیری و شارژ مولکول PLGA ، LPS-PLGA استفاده شد (۳). ایمن سازی با آنتی ژن های تهیه شده با عمل واکسینه در موش BALB/C به صورت مخاطی انجام گردید. دوره واکسیناسیون شامل ۳ دوز با فاصله دو هفته ای بود. هر گروه شامل ۱۰ سر موش بود که ۵ سر موش برای انجام عمل چالش قرار گرفت و ۵ سر موش دیگر بعد از خون گیری و جداسازی سرم برای بررسی تیتراژ آنتی بادی و سنجش فعالیت اپسینوفاگوسیتوز مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). برای بررسی قدرت اپسینوفاگوسیتوزی آنتی بادی های القا شده (OPS) ابتدا سرم حیوانات ایمن شده را در دمای ۵۶ واحد سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شد در مرحله بعد سریال رقت در پلیت ۹۶ خانه ای آماده گردید و با ساخت بافر هنکس که شامل یک درصد ژلاتین می باشد با باکتری کلبسیلا پنومونیه در ۳۷ واحد سلسیوس و شیکر ۲۲۰ انکوبه شد. سپس به محلول فوق کمپلمان بچه خرگوش اضافه گردید (با غلظت نهایی ۱۲/۵ درصد). و در مرحله اوپسینه شدن در دمای ۳۷ واحد سلسیوس و شیکر 220 rpm به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. حجم نهایی هر چاهک ۴۰ میلی لیتر بود که با اضافه کردن ماکروفاژ تازه جدا شده از موش ، به ۸۰ میلی لیتر رسانده

شد. سپس در مرحله بعد انکوبه ۳۷ واحد سلسیوس با ۲۵۰ rpm به مدت ۴۵ دقیقه انجام گردید. در مرحله آخر رقیق سازی با محلول NaCl سرد ۹٪ با حجم یکسان اضافه شد و از سوسپانسیون چاهک ها بر روی پلیت نوترینت آگار کشت داده شد و بعد از گرما گذاری در ۳۷ واحد سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تعداد کلونی باکتری های رشد کرده شمارش و محاسبه شدند (۱۵). سنجش انفجار تنفسی NO نیتریک اکساید با افزودن ۵۰ میلی لیتر محلول سولفانیلامید (۲×۱۲۵ ml) به نمونه سرم و اضافه کردن ۵۰ میلی لیتر محلول N-1-ناپتیلیندیامین دی هیدروکلراید (۲×۱۲۵ ml). به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به دور از نور انکوبه نموده و توسط پیپت مولتی کانال ترکیب را داخل چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای ریخته و توسط پیپت ۱ میلی لیتر نیتريت استاندارد (۱/۰ نیتريت سدیم) اضافه شد و بادستگاه پلیت ریدر در مدت ۳۰ دقیقه پلیت هارا قرائت شد. بعد از این زمان ممکن است رنگ بنفش محو شود و دیگر رنگی دیده نشود (۲۷). برای تعیین تیتراژ IgM و IgG علیه LPS از تست الیزا از نوع غیر مستقیم به روش تریپلیکیت استفاده شد. در ابتدا LPS را در بافر فسفات X1 با pH ۳/۳ با غلظت نهایی ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و به مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک افزوده و پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ واحد سلسیوس قرار داده شد. پلیت با بافر شستشو سه بار شستشو داده شد (هر بار ۵۰ میکرو لیتر). محلول بلوکه کننده به مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر به چاهک ها افزوده و برای ۶۰ دقیقه پلیت در دمای اتاق انکوبه شد و پلیت با بافر شستشوسه بار شستشو داده شد (هر بار ۱۰۰ میکرو لیتر) (۱۹). به چاهک های ردیف اول، ۲۰۰ میکرو لیتر سرم رقیق شده در بافر PBS با رقت ۱:۱۰ اضافه کرده و به سایر چاهک ها ۱۶۰ میکرو لیتر بافر PBS افزودیم. سپس از چاهک های ردیف اول ۴۰ میکرو لیتر به چاهکهای ردیف دوم افزوده و به همین ترتیب تا آخر ادامه داده و در نهایت ۴۰ میکرو لیتر را دور ریختیم به این

دو ساعت) انجام گرفت (۳۱). برای بررسی و آنالیز آماری از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ به روش واریانس یک طرفه با ANOVA ONE WAY با آزمون آماری TUKEY با انحراف معیار $P < 0.05$ بررسی و نتیجه گیری و گزارش گردید.

نتایج

نتایج استخراج آنتی ژن و بارگذاری در حامل نانو ذرات PLGA نشان داد که بعد از استخراج آنتی ژن لیپولی ساکارید کلبسیلا پنومونیه مطابق روشی که شرح داده شد محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آنتی ژن استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS مورد اندازه گیری قرار گرفته شده بود که بیشترین جذب برای این آنتی ژن $OD = 270 \text{ nm}$ گزارش گردید. فرکشن های جمع آوری شده بعد از انجام ژل فیلتراسیون لوله های ۹۸ و ۹۹ در کونزوگه های PLGA-D-LPS و طول موج ۲۷۰ نانومتر مربوط به آنتی ژن لیپولی ساکارید قرائت شد و لوله هایی که بیشترین جذب را در این طول موج داشتند به عنوان فرکشن های حاوی مولکول کونزوگه جمع آوری و با هم ادغام شدند. نتایج اندازه گیری سایز ذرات و شارژ نشان داد که پتانسیل زتای نانو ذرات PLGA برابر با mv ۰۰/۲۱- و کونزوگه PLGA-LPS برابر با $d \text{ nm } 7/18$ و پتانسیل زتای آنتی ژن لیپولی ساکارید دتوکسی فیه شده $mv/26$ بدست آمد (نمودارهای ۱-۲-۳). طبق نمودار ۴ اندازه نانو ذره PLGA، $d \text{ nm } 8/176$ نانومتر و سایز مولکول کونزوگه PLGA+LPS، $d \text{ nm } 3/145$ بدست آمد (نمودار ۵). نتایج نمودار (۱ الی ۵) حاکی از آن است که مولکول کونزوگه علی رغم افزایش سایز نسبت به PLGA، باز هم در حد نانومتراست که موفقیت آمیز بودن بارگذاری آنتی ژن به نانو ذرات PLGA و حفظ سایز نانو را نشان می دهد. نتایج نمودار های به دست آمده از تست FT-IR گروه های PLGA، PLGA-LPS نشان داد، پیک های شاخص به ترتیب برای گراف پلی اتیلن

صورت رقت سازی به نسبت ۱:۵ انجام شد پس از انجام رقت سازی از همه چاهک ها ۶۰ میکرو لیتر را برداشته تا حجم سرم رقیق شده در هر چاهک به ۱۰۰ میکرو لیتر رسید. سپس پلیت برای ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پلیت با بافر شستشوسه بار شستشو داده شد (هر بار ۱۰۰ میکرو لیتر). آنتی بادی Anti Mouse IgA کونزوگه با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBS به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهکها اضافه شد و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. آنتی بادی Anti Mouse IgG کونزوگه با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBS به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهکها اضافه شد و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. آنتی بادی Anti Mouse IgM کونزوگه با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBS به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهکها اضافه شد و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پلیت با بافر شستشوسه بار شستشو داده شد (هر بار ۱۰۰ میکرو لیتر). محلول سوپسترا به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۳۷ واحد سلسیوس انکوبه شد. به هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده اضافه شد. میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت شد (۲۸). چالش با سویه ی ویرولان از مسیر تنفسی در موش انجام یافت به این صورت که در ابتدا موش را با 10 mg kg^{-1} xylazine (10) و کتامین (50 mg kg^{-1}) بیهوش کرده و موش ها با دوز عفونی کننده باکتری از طریق اسپری ریوی آلوده شدند. بعد از سه الی پنج روز مواجه شدن موش ها با سویه بیماری زا بافت های ریه، کبد، طحال از لحاظ وجود علائم عفونی و پاتولوژیک بررسی گردید. همچنین از بافت های مذکور بعد از هموژنیزه کردن در $\text{pH}: 7.5$ PBS بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده و شمارش کلونی ها بعد از گرما گذاری (سی و هفت درجه به مدت هفتاد و

گروه موش BALAB/C ماده ۶-۵ هفته ای مورد بررسی قرار گرفتند بیشترین میزان میانگین مربوط به گروه کنترل بود. در تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه با انحراف معیار ($P < 0/5$) تفاوت معنی داری بین تمام گروه‌های مورد آزمایش مشاهده شد. با استفاده از آزمون تعقیبی TUKEY مشخص شد بین تمامی گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل و نانو ذرات پلی لاکتید کو گلیکولیک اسید تفاوت معناداری وجود دارد. میانگین نتایج اپسینو فاکوسیتوزی در گروه کنترل به طور معناداری از همه گروه‌های دیگر بیشتر بود. در گروه‌های کنترل و نانو ذرات پلی لاکتید کو گلیکولیک اسید با توجه به این که از واکسن استفاده نشده بود تفاوت معناداری با توجه به نتایج در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد که بیانگر این می‌باشد که در گروه‌های واکسینه شده با ترکیب های نانو ذرات و آنتی ژن LPS مقاومت و ایمینی‌زایی مناسبی نسبت به گروه‌های کنترل و نانو ذرات پلی لاکتید کو گلیکولیک اسید داشته است. پاسخ های ایمینی حاصل از اسپری ریوی موش های تحت مطالعه در حذف باکتری ها از ریه بیماران مؤثر دیده شد. برای افزایش کارایی در تولید این واکسن از نانو ذره PLGA (پلی لاکتید کو گلیکولیک اسید) که دارای کمترین سمیت سیستماتیک در کاربردهای دارو رسانی می‌باشد استفاده شد. در این تحقیق پس از بررسی اپسینوفاگوسیتوز و چلنج در مدل موش BALB/C نتایج حاکی از این بود که موش‌هایی که نانو واکسن به همراه آنتی ژن دریافت کرده بودند فعالیت اپسینوفاگوسیتوزی بهتری نسبت به موش‌های گروه کنترل و نانو ذره و آنتی ژن خالص داشتند، همین طور در تست چلنج موش‌های دریافت کننده واکسن، باکتری‌های کمتری در طحال رشد کرده بود که نشان دهنده بهبود سیستم ایمینی بدن می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از تست سنجش انفجارتنفسی نیتریک اکساید نیز نشان داد که برای گروه‌های واکسینه شده از طریق اسپری ریوی، گروه‌های LPS و PLGA-

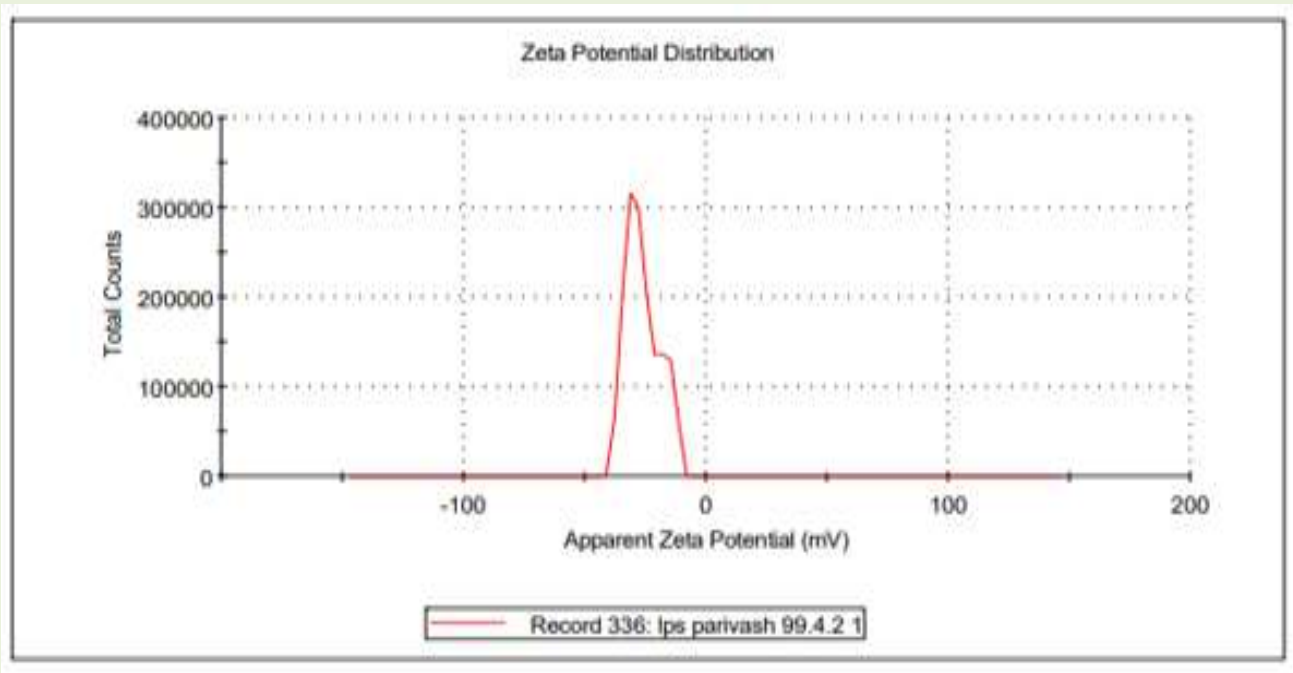
گلیکولیک اسید PLGA جذب 41/3415 cm-1 مربوط به مولکول های آب، جذب 07/2358 cm-1 مربوط به کشش ارتعاشی گروه کربن واکسیژن C-O، جذب cm- 95/1759 1 مربوط به گروه استری پلیمر پلی اتیلن گلیکولیک اسید، جذب 96/1626 cm-1 مربوط به گروه کربونیل C=O، جذب 115/1388 cm-1 مربوط به گروه CH3 متیل، جذب های 127/1187 cm-1 و 47/1092 مربوط به CH گروه اتری می‌باشد. در پیک مربوط به آنتی ژن های لیپوپلی ساکارید LPS باکتری کلبسیلاپنومونیه K2O1 و نانو ذرات پلی اتیلن گلیکولیک اسید PLGA-LPS پیک‌های شاخص مشاهده شده به ترتیب، جذب 132/3459 cm-1 مربوط به مولکول های آب، جذب 182/1758 cm-1 مربوط به گروه استری که هم در ساختار نانوذره و هم در ساختار آنتی ژن می‌باشد، جذب 168/1575 cm-1 مربوط به گروه کربونیل، جذب 11/1422 cm-1 مربوط به گروه متیل آنتی ژن لیپوپلی ساکارید، جذب 69/1094 cm-1 مربوط به پیوند اتری R-O-R' موجود در آنتی ژن لیپوپلی ساکارید و PLGA و جذب 03/650 cm-1 مربوط به اکسپین ساختار فسفات 3-PO4 می‌باشد. نتایج تصویربرداری AFM نیز نشان داد که تغییر شکل سایت‌های اتصال قبل و بعد از انجام بارگذاری آنتی ژن LPS در نانو ذرات PLGA جذب سطحی آنتی ژن را در سایت‌های اتصال نانوذره تأیید می‌نماید و گویای این مطلب است که اتصال با موفقیت انجام شده است. تغییر سایز سایت‌های اتصال نانوذره PLGA از ارتفاع 5/148 nm نانومتر قبل از کونژوگاسیون به ارتفاع 7/179 nm نانومتر در PLGA-LPS و تغییر شکل سایت‌های اتصال قبل و بعد از انجام این اتصال جذب سطحی آنتی ژن را در سایت‌های اتصال نانوذره تأیید می‌نماید و گویای این مطلب است که کونژوگاسیون با موفقیت انجام شده است. نتایج بررسی قدرت اپسینوفاگوسیتوزی آنتی بادی‌های القا شده نشان داد که ۴

بیشترین کلنی مشاهده شده مربوط به گروه‌های کنترل و نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید به تعداد cfu/liver50000 و گروه‌های واکسینه با نانو ذرات و آنتی‌ژن‌ها لیوپلی ساکارید کلبسیلاپنومونیه-PLGA LPS تعداد کلنی‌ها 10cfu/liver عدد دیده شد. در بررسی عضو طحال بیشترین کلنی مشاهده شده مربوط به گروه‌های کنترل و نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید به تعداد 42000 cfu/spleen عدد بود و در گروه‌های واکسینه شده با نانو ذرات و آنتی‌ژن لیوپلی ساکارید تعداد کلنی‌ها صفر ۰ cfu/spleen شده بود و در عضو طحال کاملاً عاری از کلنی بود.

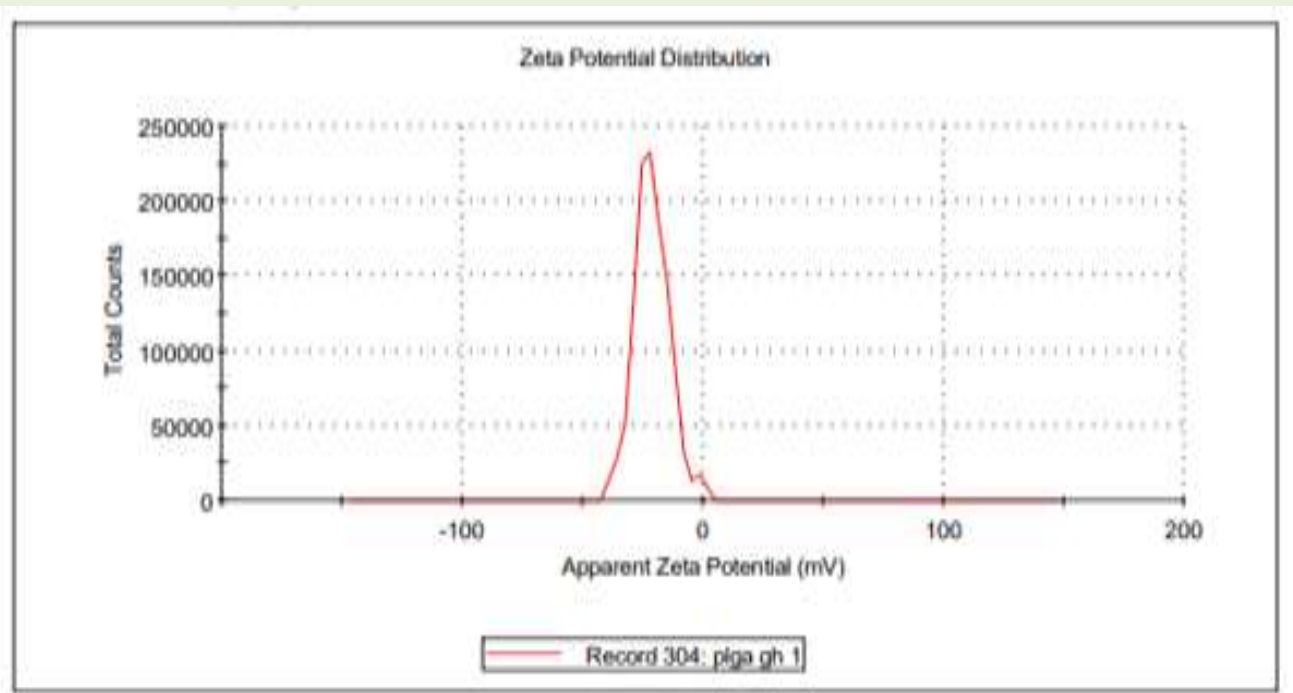
بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت روی هم رفته، کپسوله سازی نانو ذره PLGA با آنتی‌ژن‌های لیوپلی ساکارید (با NHS به عنوان مولکول فاصله دهنده) به روش امولسیون W/O/W می‌تواند تحریک کننده ی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را افزایش داده و بلع باکتری‌ها توسط ماکروفاژها در ریه، طحال، کبد صورت گیرد؛ بنابراین، از نانو واکنش PLGA-LPS به عنوان نامزد واکنش می‌توان در فاز اول کار آزمایی بالینی استفاده کرد. همچنین نامزد واکنش پیشنهادی پتانسیل بالایی برای حفاظت طولانی و پایدار نسبت به LPS خالص داشته و سبب فعال شدن لنفوسیت‌های (T-helper) T می‌گردد و با تحریک سلول‌های T خاطره ای ایمنی ایجاد می‌کند. در ضمن نانو پارسیکل تهیه شده اپی توپ‌های پایداری را ایجاد کرده که با به دام انداختن آنتی‌ژن LPS دتوکسیفیه شده را به نحو بهتری به سیستم ایمنی بدن عرضه می‌نماید و نیز تیتراژ آنتی بادی‌های ترشح شده بر علیه PLGA-LPS را افزایش داد. واکنش طراحی شده با ترشح آنتی بادی ایمنی‌زایی را افزایش داده که همین موضوع واکنش تهیه شده را کاندید مناسبی علیه بیماری کلبسیلازی می‌نماید.

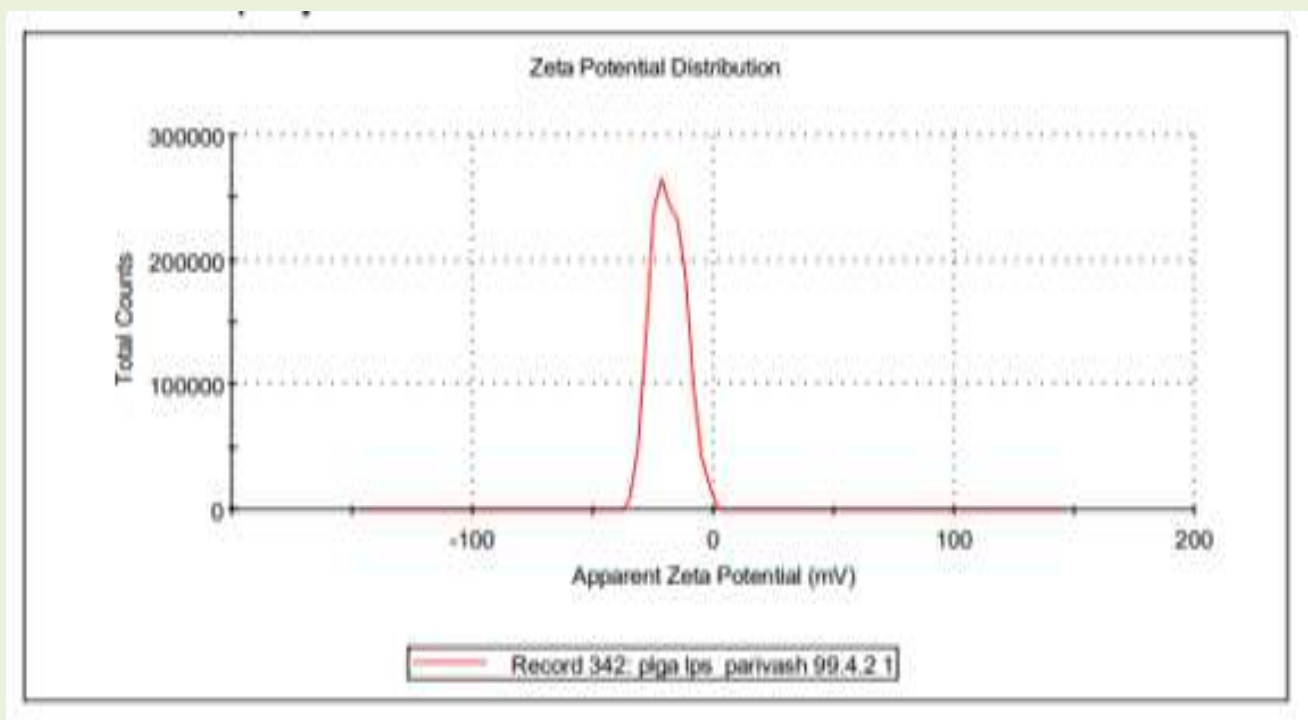
LPS نسبت به گروه‌هایی که با نرمال سالین NS و نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید اسپری ریوی شده بودند با بررسی آنالیز آماری یک طرفه با انحراف معیار $P < 0/05$ اختلاف معناداری داشتند (جدول ۱). نتایج بررسی تیتراژ آنتی بادی‌های IgG و IgM و SIgA در میکروپلیت کت شده با LPS به روش تست الیزانوع غیر مستقیم نیز نشان داد که تیتراژ آنتی بادی IgG در شرایطی که موش‌ها را با ترکیب نانو ذره پلی لاکتیک گلایکولیک و لیوپلی ساکارید کونژوگه شده به صورت اسپری ریوی واکسینه کرده بودند بیشترین تیتراژ آنتی بادی IgG به میزان 321cfu/well و در بررسی تست الیزا آنتی بادی IgM واکنش نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید و آنتی‌ژن لیوپلی ساکارید میزان تیتراژ آنتی بادی در موش‌های واکسینه با PLGA-LPS به مقدار ۳۱۵ تیتراژ سرمی بوده و نتایج تست الیزا برای تیتراژ آنتی بادی SIgA در گروه موش‌های واکسینه شده با PLGA-LPS به میزان 365cfu/well بود و کمترین تیتراژ مشاهده شده مربوط به گروه کنترل نرمال سالین و نانو ذرات PLGA بدست آمد. نتایج تست چلنج و شمارش کلنی‌ها بعد از واکسیناسیون و مواجهه‌ی موش‌ها با باکتری نشان داد که بین تمامی گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل و نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید تفاوت معنی داری وجود دارد. میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده در گروه کنترل به طور معنی داری از همه گروه‌های دیگر بیشتر بود. در بررسی عضو ریه بیشترین کلنی مشاهده شده مربوط به گروه‌های کنترل و نانو ذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید به تعداد 58000cfu/lung و سپس گروه‌هایی که فقط با آنتی‌ژن‌های لیوپلی ساکارید بود که ناحیه ی استنشاقی اسپری ریوی شده بودند و گروه‌های ترکیب نانو ذرات و آنتی‌ژن‌ها PLGA-LPS به نسبت کاهش یافته و به 100cfu/lung کلنی رسیده است. در بررسی عضو کبد



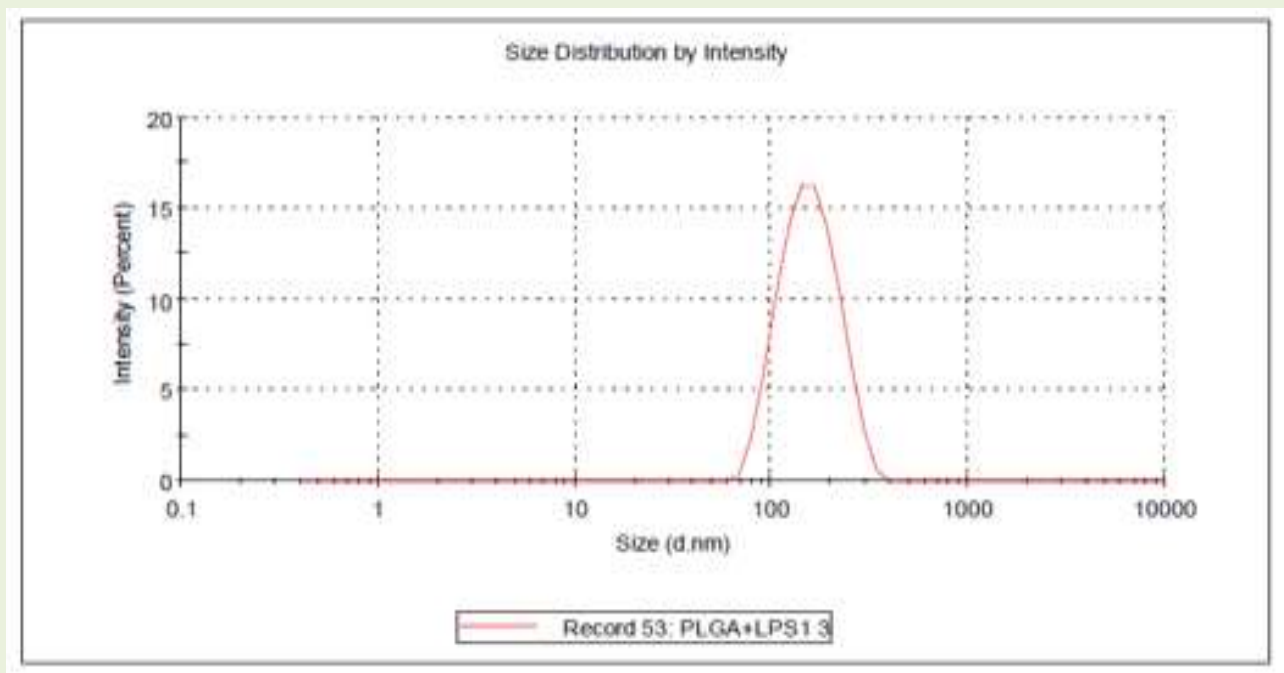
نمودار ۱- مربوط به پتانسیل زتا آنتی ژن کپسول LPS



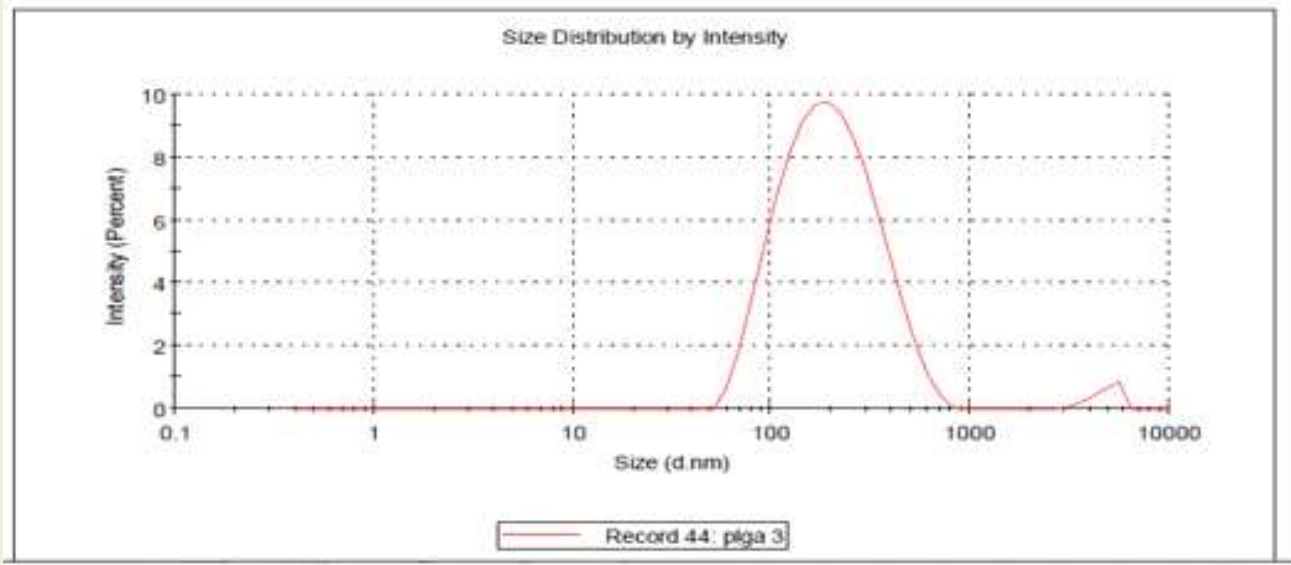
نمودار ۲- مربوط به پتانسیل زتا آنتی ژن کپسول PLGA



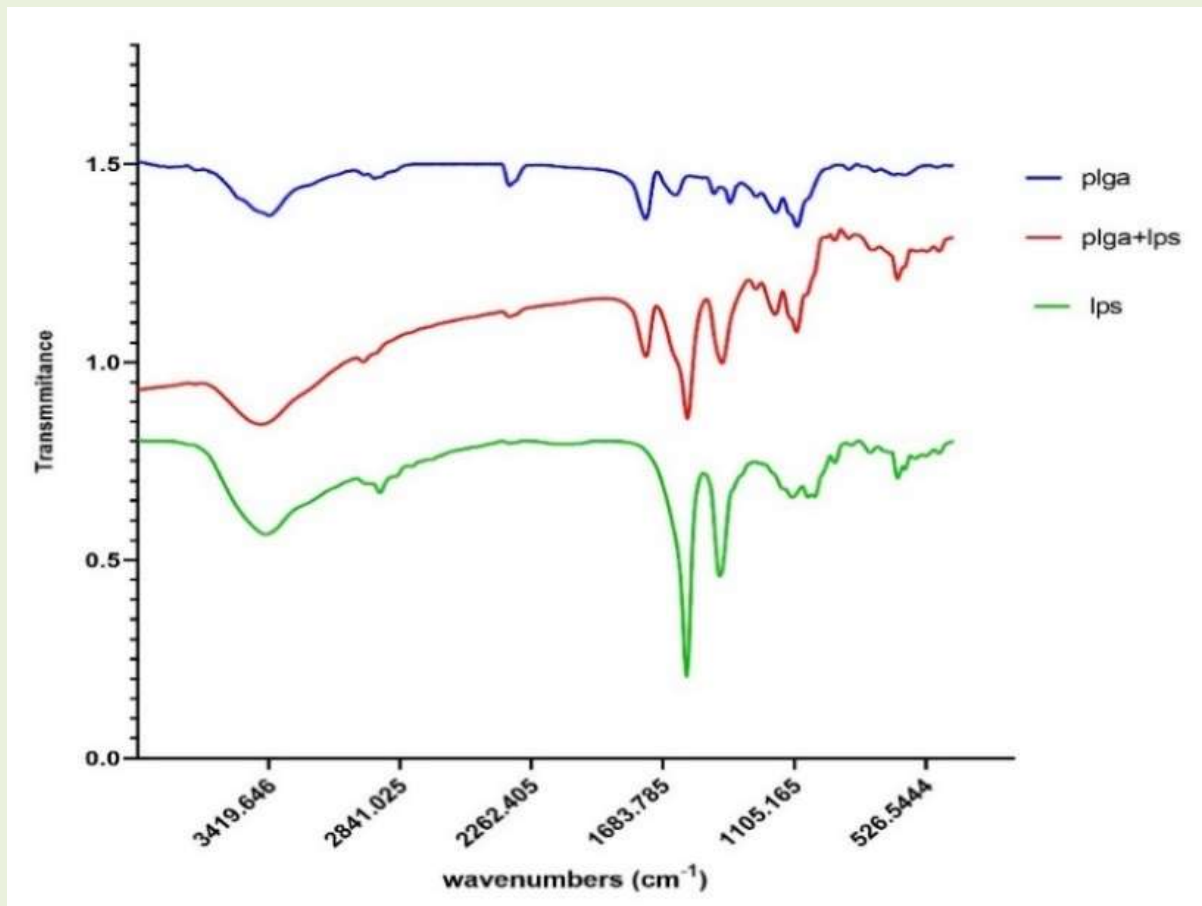
نمودار ۳- مربوط به پتانسیل زتا آنتی ژن کپسول LPS-PLGA



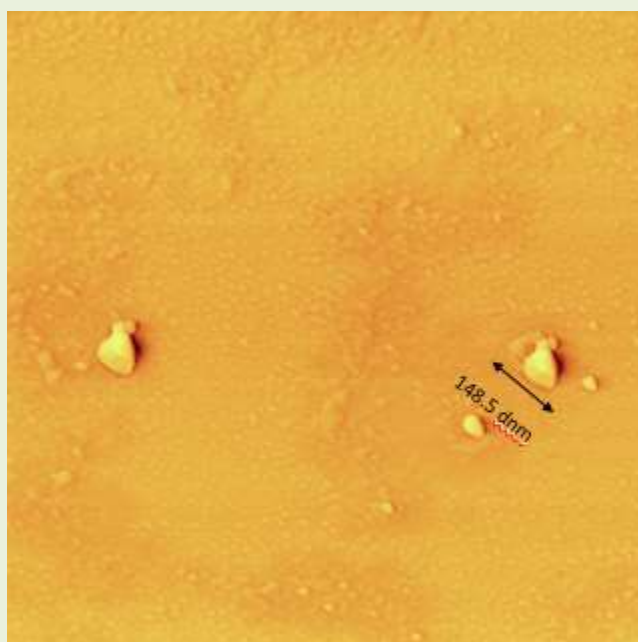
نمودار ۴- مربوط به سایز نانو ذرات LPS-PLGA



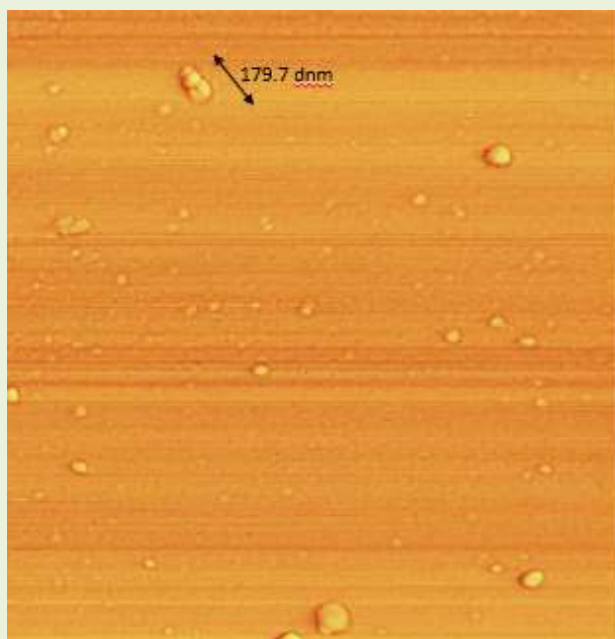
نمودار ۵- مربوط به سایز نانو ذرات *PLGA*



نمودار ۶- مربوط به طیفسنجی FTIR واکسن طراحی شده با نانوذره پلی اتیلن گلیکولیک اسید



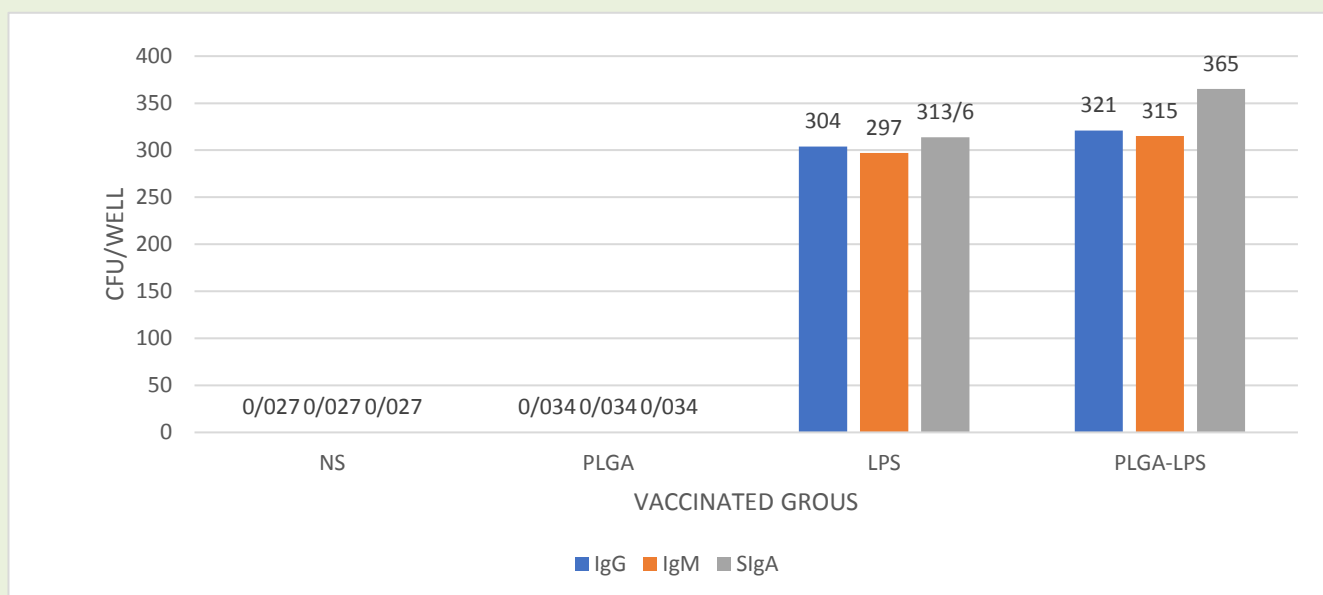
شکل ۱- AFM مربوط به PLGA



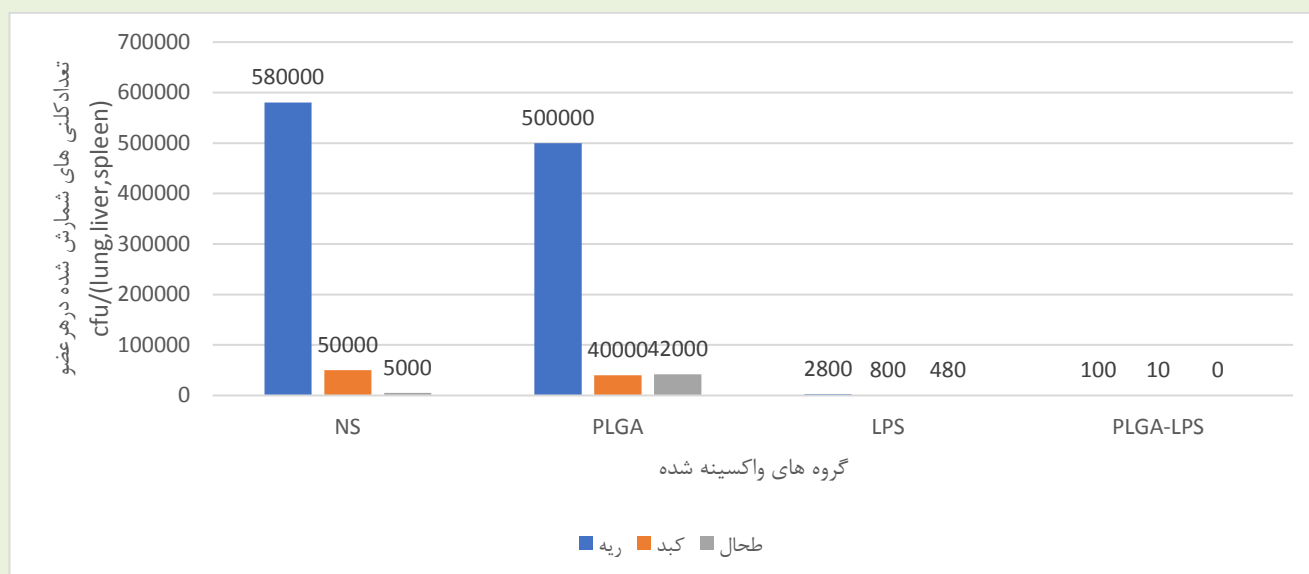
شکل ۲- AFM مربوط به نانو ذرات PLGA-LPS

جدول ۱- میانگین نتایج به تفکیک گروه‌های واکسینه شده به روش اسپری ریوی در تست های اوپسینو فاگوسیتوز و نیتریک اکساید.

گروه	تکرار	میانگین Cfu/well	
		اوپسینو فاگوسیتوز	نیتریک اکساید
NS	۳	$5/2 \times 10^{11} \pm 0/76$	$0/034 \pm 0/09$
PLGA	۳	$18 \times 10^{11} \pm 1/09$	$0/058 \pm 0/00$
D-LPS	۳	$100 \pm 0/02$	$0/132 \pm 0/06$
PLGA-DLPS	۳	$20 \pm 0/13$	$0/023 \pm 0/61$



نمودار ۷- بررسی تست الایزا آنتی بادی های IgG و IgM و SIgA در میکروپلیت کت شده با LPS



نمودار ۸- بررسی چلنج اعضای ریه ، کبد و طحال در موش هایی که به روش اسپری از ناحیه ی استنشاقی واکسینه شده بودند.

سپتی سمی محافظت ایجاد نمود (۴). نتایج استخراج PLGA در پژوهش حاضر نشان داد که اندازه آنتی ژن لیپوپلی ساکارید کلبسیلا پنومونیه مورد اندازه گیری قرار گرفته شده بود که بیشترین جذب برای این آنتی ژن $OD = 270 \text{ nm}$ گزارش گردید. فرکشن های جمع آوری شده بعد از انجام ژل فیلتراسیون لوله های ۹۸ و ۹۹ در کونژوگه های PLGA-D-LPS و طول موج ۲۷۰ نانومتر مربوط به آنتی ژن لیپوپلی ساکارید قرائت و لوله

تحقیقاتی وجود دارد که از کپسول باکتری به عنوان آنتی ژن برای ساخت واکسن در بدن موجودات زنده استفاده شده است (۱۵). Caroff و همکارانش در مصر، کل مولکول گلیکوپپتیدی دیواره ی باکتری کلبسیلا پنومونیه را که حاوی LPS و OMP بوده را جداسازی و استخراج نموده و توسط حذف اسیدهای چرب، کونژوگه ی LPS و OMP را دتوکسیفیه نمودند و کونژوگه ی حاصل در برابر عفونت های ادراری و

کونژوگه PLGA با لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده پروتئوس میرابیلیس علیه عفونت دستگاه ادراری در مدل موشی نشان داد که کونژوگه PLGA-LPS توانایی بهتری در پیشگیری از عفونت ادراری در موش سوری نسبت به LPS خالص دارد و می‌تواند سیستم ایمنی را بدون آثار مخرب در بافت‌های بدن تحریک کند (۲۶). گادا و همکاران نشان دادند که PLGA در اتصال با پلی اتیلن گلیکول، N - سوکسینامید بهترین گزینه برای اعمال کونژوگاسیون این نانو ذرات با سایر ترکیبات است. در تحقیقی نیز، PLGA به‌عنوان حامل مناسب برای انتشار تسهیل یافته ی آنتی ژن‌ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول‌های هدف و افزایش معنادار پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). جهت استخراج آنتی بادی‌های IgG اختصاصی LPS بر علیه شیگلا دیسانتری تیپ I، SP-O این پاتوژن تخلیص شده و به توکسوئید کزاز اتصال می‌یابد بیشتر ایمونژنیک‌های مورد استفاده یک اصلاح در روش منتشر شده هستند. نتیجه این که کونژوگه‌های TT-SP-O مقاوم بوده و در سطح بالایی از آنتی بادی‌های IgG ضد SP-O را ایجاد کرده و پاسخ‌های قوی تری را در مورد موش‌های جوان به هنگام تزریق زیر جلدی در سالمندان و در دوزی معادل ۱/۱۰ دوز مورد هدف که برای انسان مصرف می‌شود ایجاد می‌کند (۲۹). چون و همکاران در سال ۲۰۱۹ اقدام به تهیه کونژوگه پلی ساکارید O(OSP) شیگلا دیسانتری تیپ ۱ با توکسوئید کزاز به چندین روش نمودند و نشان دادند که روش آمیداسیون در مورد ساختارهای لیپوپلی ساکاریدی بهتر از بقیه ی روش‌ها سبب القای پاسخ‌های ایمنی حفاظت بخش می‌شود که احتمالاً به دلیل ایجاد ساختارهای مشبک در روش آمیداسیون و استفاده از فاصله گذار ADH است (۱۰). در سال ۲۰۰۰ کانادو و همکارانش کونژوگه O - پلی ساکارید

هایی که بیشترین جذب را در این طول موج داشتند به‌عنوان فرکشن‌های حاوی مولکول کونژوگه جمع آوری و با هم ادغام شدند. Chhibber و همکاران از پروتئین‌های سطح سلولی تنظیم کننده ی آهن یا iron regulated cell surface protein برای کونژوگاسیون با LPS کلبسیلا استفاده نمودند که نسبت به ترکیبات صنعتی، اثربخشی بسیار زیادی داشت و هم چنین روشی بی خطر بوده و تب‌زا نمی‌باشد. در نتایج و مقایسه ماکروفاژهای ریه حاوی آنتی ژن کائوگه شده با سایر آنتی ژن‌ها مشخص شد که ایمنی‌زایی به‌واسطه ی افزایش فاگوسیتوز بود (۵). این پژوهش در راستای پژوهش حاضر است. در مطالعه ی دیگری در سال ۲۰۰۵ توسط چیبر و همکارانش پلی ساکارید استخراج شده از LPS کلبسیلا پنومونیه NFC5055 به‌صورت کوآلان به توکسوئید تانوس (کزاز) متصل کردند. محصول کونژوگه در دوز ۱۰۰ میکروگرم غیر سمی بوده و اثر تب‌زایی نداشته و اثر ایمنی‌زایی آن به‌واسطه کاهش باکتری در ریه را نشان دادند. هم چنین خاصیت فعال‌سازی ماکروفاژها در ریه را داشته و موجب فعال شدن ماکروفاژها در این قسمت شدند (۶). Zigterman و همکاران واکسن کونژوگه ای تهیه کردند که از پلی ساکارید کلبسیلا پنومونیه (دو واحد تکراری ترا ساکارید) با سرم آلبومین گاوی (BSA) و KLH یا keyhole limport hemocianin که هر دو آنتی ژن وابسته به تیموس تولید کردند. نتایج این تحقیق حاکی از افزایش چشم گیر مقدار آنتی بادی علیه این آنتی ژن‌ها بود و ایمنی‌زایی علیه موش‌های نر و ماده بررسی گردید و مشاهده شد که در هر دو گروه افزایش آنتی بادی صورت گرفته است. هم چنین در مقایسه با آنتی ژنی که به تنهایی تزریق گردیده، واکسن‌های کونژوگه موجب تولید تیر آنتی بادی بیشتری شده اند (۳۲). شاپوری و همکاران با بررسی ایمنی‌زایی

کارایی بسیار بیشتری نسبت به واکسن های معمولی موجود در بازار ارائه می دهند و به همین سبب تولیدات بیوتکنولوژی، مخصوصاً واکسن سازی به این سمت سوق یافته است. حال به طور مختصر نانو ذرات و نانو واکسن شرح داده خواهد شد. نانو ذرات به هر ذره ای که قطر کمتر از حدود ۱۰۰ نانومتر داشته باشد گفته می شود (۲۵). استفاده از نانو ذرات به عنوان راهی نو برای حامل های واکسن کلونیدی جهت مصون سازی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱). به طوری که نانو ذرات و میکرو ذرات تقریباً به اندازه باکتری ها و ویروس هایی هستند که سیستم ایمنی آن ها را تشخیص می دهد. هم چنین اندازه، ترکیب شیمیایی، شارژ و خصوصیات سطحی حامل های واکسن ویژه را می توان برای تحریک سلول های ارائه دهنده آنتی ژن (APs) و ارائه ایمن آنتی ژن ها تنظیم نمود (۲۲). نانو ذرات زیست تخریب پذیر از دو ماده پلیمری ساخته شده اند که در ترکیبات پزشکی موجود به کار می روند؛ پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید که به نام PLGA شناخته می شود و پلی اتیلن گلیکول که به PEG معروف است. نانو ذرات پلیمری را برای تحویل انواع عوامل ضد میکروبی مورد بررسی قرار داده اند که کارایی درمان را در بسیاری از بیماری های عفونی بالا برده است (۱۴).

سالمونلا پارا تیفی را به توکسوئید کزاز متصل نمودند. در این روش دو نوع مولکول کونژوگه تهیه شد. در نوع اول از فاصله گذار ADH استفاده شد و در نوع دوم پروتئین مستقیماً به O- پلی ساکارید متصل گردید. ارزیابی ایمنولوژیکی با تزریق به موش مورد بررسی قرار گرفت و در هر دو مولکول کونژوگه آنتی بادی IgG ضد لیپوپلی ساکارید افزایش یافت. میزان تحریک تولید آنتی بادی توسط مولکول کونژوگه نوع اول در گروه سنی ۱ تا ۴ سال به مراتب بیشتر از مولکول نوع دوم بود (۱۷). در سال ۲۰۱۲ فایلی و همکاران نانو ذرات زیست تخریب پذیر PLGA را به عنوان یک وسیله نقلیه برای تحویل پپتیدهای نو ترکیب MOMP-187 کلامیدیا تراکوماتیس بررسی نمودند و نشان دادند که به طور موفقیت آمیز می توان MOMP را در PLGA کپسوله کرد و مهم تر از آن، PLGA موجب ارتقای ظرفیت پپتید برای وادار کردن Th1 برای تولید سایتوکاین ها می شود (۱۱). در سال ۲۰۱۹ لیلا صفری زنجانی و همکاران در کار تحقیقاتی خود از کونژوگه ی PLGA و آگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا به عنوان واکسن کار کردند (۲۳). در تکنولوژی های جدید واکسن سازی از واکسن هایی استفاده می شود که در آن ذرات نانو به صورت حامل یا ادجوانت به کار رفته اند و

منابع

1. Abboud, R., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. (2017). Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review. Epub.
2. Aytenfisu, AH., Simon, R., MacKerell, AD. (2019). Impact of branching on the conformational heterogeneity of the lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*: Implications for vaccine design. Epub.
3. Berti, F., Micoli, F. (2020). Improving efficacy of glycoconjugate vaccines: from chemical conjugates to next generation constructs. Epub.
4. Caroff, MG., Karibian, D. (1990). Several uses for isobutyric acid-ammonium hydroxide solvent in endotoxin analysis. Applied and Environmental Microbiology, 56(6);1957.
5. Chhibber, S., Bajaj, J. (1995). Polysaccharide-iron—regulated cell surface protein conjugate vaccine: its role in protection against *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia. Vaccine, 13(2); 179–184.
6. Chhibber, S., Rani, M., Yadav, V. (2005). Immunoprotective potential of polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in *Klebsiella pneumoniae* induced lobar pneumonia in rats. Epub.
7. Choipang, C., Chuysinuan, P., Suwanton, O., Ekabut, P., Supaphol, P. (2018). Hydrogel wound dressings loaded with

- PLGA/ciprofloxacin hydrochloride nanoparticles for use on pressure ulcers. Epub.
- 8.Clegg, S., Sebghati, TAS. (2002). 77 - *Klebsiella pneumoniae*. In: Sussman M, editor. Molecular Medical Microbiology. London: Academic Press; 1655–1680.
- 9.Clements, A., Tull, D., Jenney, AW. (2007). Secondary Acylation of *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide Contributes to Sensitivity to antibacterial peptides. Journal of Biological Chemistry 282(21); 15569–15577.
- 10.Cohen, D., Meron-Sudai, S., Bialik, A. (2019). Serum IgG antibodies to Shigella lipopolysaccharide antigens—a correlate of protection against shigellosis. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 15(6); 1401–1408.
- 11.Fairley, SJ., Singh, SR., Yilma, AN. (2013). *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP encapsulated in PLGA nanoparticles triggers primarily T helper 1 cellular and antibody immune responses in mice: a desirable candidate nanovaccine. Epub.
- 12.Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., Hatton, PV. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. International Journal of Molecular Sciences, 15(3); 3640–3659.
- 13.Gomelsky, M., Hoff, WD. (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. Trends in Microbiology, 19(9); 441–448.
- 14.Grilló, MJ., Manterola, L., De Miguel, MJ. (2006). Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. Vaccine, 24(15); 2910–2916.
- 15.Hussein, KE., Bahey-El-Din, M., Sheweita, SA. (2018). Immunization with the outer membrane proteins OmpK17 and OmpK36 elicits protection against *Klebsiella pneumoniae* in the murine infection model. Epub.
- 16.Kelly, SD., Clarke, BR., Ovchinnikova, OG. (2019). *Klebsiella pneumoniae* O1 and O2ac antigens provide prototypes for an unusual strategy for polysaccharide antigen diversification. Journal of Biological Chemistry, 294(28); 10863–10876.
- 17.Konadu, EY., Lin, F-YC., Hó, VA. (2000). Phase 1 and phase 2 studies of *Salmonella enterica* serovar paratyphi A O-specific polysaccharide-tetanus toxoid conjugates in adults, teenagers, and 2-to 4-year-old children in Vietnam. Infection and Immunity, 68(3); 1529–1534.
- 18.Martora, F., Pinto, F., Folliero, V. (2019). Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. Epub.
- 19.Micoli, F., MacLennan, CA. (2020). Outer membrane vesicle vaccines. Epub.
- 20.Pallach, M., Lorenzo, FD., Facchini, FA. (2018). Structure and inflammatory activity of the LPS isolated from *Acetobacter pasteurianus* CIP103108. Epub.
- 21.Peek, LJ., Middaugh, CR., Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 60(8);915–928.
- 22.Rice-Ficht, AC., Arenas-Gamboa, AM., Kahl-McDonagh, MM., Ficht, TA. (2010). Polymeric particles in vaccine delivery. Current Opinion in Microbiology, 13(1); 106–112.
- 23.Safari Zanjani, L., Shapoury, R., Dezfulian, M., Mahdavi, M., Shafieeardestani, M. (2018). Preparation of PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) nanoparticles Containing *Pseudomonas aeruginosa* Alginate, LPS and Exotoxin A as a Nano-vaccine. Biological Journal of Microorganism, 7(26); 11–27.
- 24.Schöll, I., Kopp, T., Bohle, B., Jensen-Jarolim, E. (2006). Biodegradable PLGA particles for improved systemic and mucosal treatment of type I allergy. Immunology and Allergy Clinics of North America, 26(2); 349–364.
- 25.Sekhona, BS., Saluja, V. (2011). Nanovaccines-an overview. Int J Pharm Front Res, 1(1); 101–109.
- 26.Shapouri, R. (2020). Evaluation of immunogenicity of PLGA - *Proteus mirabilis* detoxified lipopolysaccharide conjugate against urinary tract infection in mice, The Quarterly Journal of Animal Physiology and Development, 13 (4); 99-115.
- 27.Tomas, JM., Camprubi, S., Williams, P. (1988). Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1:K1 serotype strains. Microbial Pathogenesis, 5(2);141–147.
- 28.Tomazi, T., Tomazi, ACCH., Silva, JCC. (2021). Immunization with a novel recombinant protein (YidR) reduced the risk of clinical mastitis caused by *Klebsiella* spp. and decreased milk losses and culling risk after *Escherichia coli* infections. Epub.
- 29.Wileman, B. (2010). Preharvest *Escherichia coli* o157: h7 vaccination of beef cattle:

industry-wide acceptance through a beef production lifecycle approach. Epub.

30. Wu, G., Ji, H., Guo, X. (2020). Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. 2020 Epub.

31. Wu, M., Li, X. (2015). Chapter 87 - *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas*

aeruginosa. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Boston: Academic Press; 1547–1564.

32. Zigterman, J., van Dam, J., Snippe, H. (1985). Immunogenic properties of octasaccharide-protein conjugates derived from *Klebsiella serotype 11* capsular polysaccharide. *Infection and Immunity*, 47(2); 421–428.

..

Immunogenical Evaluation of PLGA Nanoparticles Contain *Klebsiella pneumoniae* K2O1 Detoxified Lipopolysaccharide Antigen in Pulmonary Infection Model of BALB/C Mice

P. Ghaderini¹, R. Shapouri², K. Rostamizadeh³, A. Khodavandi⁴, M. Mahdavi⁵

1. Department of Microbiology, College of Science agriculture and modern technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

2. Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

rezashapoury@yahoo.com

3. Zanjan Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran.

4. Department of Microbiology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, Iran.

5. Recombinant Vaccine Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 2020.28. 12

Accepted: 2022.16.1

Abstract

Introduction & Objective: *Klebsiella pneumoniae* is the most common pathogenic bacterium in the genus *Klebsiella*. Every year, about 2 million children under the age of 5 die from pneumonia. Due to the acquired and inherent resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated against a wide range of antibiotics, its control and treatment appear to be critical. The aim of the present study was to use Polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles in vaccine design the LPS antigen of *Klebsiella pneumoniae* K2O1. So far, no work has been done on this strain of bacteria to make the PLGA-LPS vaccine. In the study, the results obtained from the tested mice showed that the mice were vaccinated. Immunized and titrated antibodies of IgM 315 cfu / well, IgG 321 cfu / well, and SIgA 365 cfu / well, elevated and in mice with invasion factor in patients and spleen and lung tissues, number of people compared to unvaccinated mice is. Has gone to zero.

Material and Method: In the present study, the LPS antigen was extracted from *Klebsiella pneumoniae* K2O1 by centrifugation and detoxified with phenol. Then the LPS antigen was conjugated to polylactic-co-glycolic acid nanoparticles. Infrared spectroscopy (FT-IR) and atomic force microscopy (AFM) were used to confirm conjugation with nanoparticles. To evaluate endotoxin of the vaccine designed Tested by Limolus amoebocyte lysate assay (LAL test). success of antigen and nanoparticles conjugates based on the size and charge of antigen-containing nanoparticles was confirmed by the zetasizer.

Results: FT-IR results the shape of the corresponding peaks confirmed the presence of antigen-functional groups in the nanoparticle structure and the formation of bonds. AFM microscopic images of nanoparticles containing LPS antigen and nanoparticles before conjugation showed an increase in the binding sites of nanoparticles after conjugated. Change from initial sharpness to puffiness after conjugation proved the success of antigen transport by nanoparticles. Fever was not observed in rabbits and mortality was confirmed in BALB/C mice.

Conclusion: The results showed that the vaccine was effective in immunogenicity and therefore suggested as a candidate for an effective vaccine against *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* K2O1, LPS Antigen, PLGA Nanoparticles, Vaccine.