Research Paper

Immunogenic effect of PLGA nanoparticles containing *Klebsiella pneumoniae* K2O1 capsule antigen against urinary tract infection in BALB/C mice

Fatemeh Esmaeilzadeh[1], Reza Shapoury[2*], Mohsen Zargar[1], Mehdi Mahdavi[3], Kobra Rostamizadeh[4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University Qom Branch, Qom, Iran
2. Departman of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
3. Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Sciences, Tehran, Iran
4. Zanjan Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran

*** Corresponding author e-mail: drreza1357@gmail.com**

Citation: Esmaeilzadeh F, Shapoury R, Zargar M, Mahdavi M, Rostamizadeh K. Immunogenic effect of PLGA nanoparticles containing *Klebsiella pneumoniae* K2O1 capsule antigen against urinary tract infection in BALB/C mice. Daneshvar Medicine 2022; 29(6):45-57. doi: 10.22070/DANESHMED.2021.15137.1123

Abstract

Background and Objective: *Klebsiella* can cause urinary tract infections that is associated with drug resistance. Capsule production as a means of resistance can prevent host immune system responses. This study investigated the effect of a PLGA nanoparticles vaccine containing capsule antigen.

Materials and Methods: Vaccination of 20 mice with an age of 3-5 weeks (with a weight range of 22±18 g) was performed in four groups of capsules, PLGA, PLGA-capsule combination (PLGA+CPS) and control (PBS). In this study, the fabrication of nanoparticles was investigated by zetasizer and FITR tests. Microbial loading was also performed on the bladder.One-way analysis of variance and Tukey post hoc test were used for statistical analysis .

Results: The results of confirmation tests of zetaiser showed that the nanoparticle size and the size of PLGA nanoparticles containing capsule antigen molecule were 178.7 and 159.4 nm, respectively.The result of FTIR and the shapes of the corresponding peaks confirmed the presence of antigen functional groups in the nanoparticle structure and the formation of ester bonds.The resut of FTIR test also indicates the success of PLGA nanoparticles containing capsule antigen , the results of microbial challenge showed that in the control and PLGA groups, due to the fact that PLGA nanoparticles vaccine contain capsule antigen were not used, a significant increase was observed in terms of the number of colonies compared to other groups ($p<0/05$).

Conclusion: PLGA nanoparticles containing capsule antigen molecules have a better ability than pure capsules and can significantly reduce tissue damage.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, PLGA nanoparticles, vaccine containing capsule antigen, Capsule antigen, PLGA, Microbial challenge

Received: 16 Aug 2021
Last revised: 18 Dec 2021
Accepted: 26 Dec 2021

مقاله پژوهشی

اثر ایمنی زایی نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول کلبسیلا پنومونیه K2O1 علیه عفونت ادراری در موش BALB/C

نویسندگان: فاطمه اسماعیل زاده[1]، رضا شاپوری[2]*، محسن زرگر[1]، مهدی مهدوی[3]، کبری رستمی زاده[4]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳. مرکز تحقیقات واکسن های نوترکیب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

*نویسنده مسئول: رضا شاپوری **Email: drreza1357@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: کلبسیلا میتواند باعث عفونت های ادراری شود که درمان آن با مقاومت دارویی مواجه شده است. کپسول به عنوان یکی از راههای مقاومت میتواند از پاسخ های سیستم ایمنی میزبان جلوگیری کند. این مطالعه، اثر واکسن نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش ها: واکسیناسیون ۲۰ سر موش ۳-۵ هفته ای (محدوده وزنی ۱۸ ±۲۲ گرم)، در چهارگروه کپسول، PLGA، PLGA حاوی کپسول و کنترل انجام شد. در این مطالعه، ساخت نانوپارتیکل با آزمون های زتاسایزر و FITR بررسی گردید. چلنج بار میکروبی نیز بر روی مثانه انجام شد. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید.

نتایج: نتایج آزمون های زتاسایزر نشان داد که اندازه نانوپارتیکل و اندازه **PLGA** حاوی انتی ژن کپسول به ترتیب ۱۷۸,۷ و ۱۵۹,٤ نانومتر بدست آمد .نتایج **FTIR** وشکل پیک های مربوطه ،حضور گزوه های عاملی آنتی ژن در ساختار نانوپارتیکل و تشکیل پیوند استری را تایید کردندو نتیجه **FITR** نشان دهنده موفقیت آمیز بودن **PLGA** حاوی کپسول می باشد. نتایج چلنج میکروبی نشان داد که در گروه های کنترل و **PLGA**با توجه به اینکه از واکسن های **PLGA** حاوی کپسول استفاده نشده بود افزایش معنی داری با توجه به تعداد کلنی ها در مقایسه با سایر گروه ها مشاهده شد (**p<0/05**).

نتیجه گیری: مولکول های **PLGA** حاوی آنتی ژن کپسول توانایی بهتری نسبت به کپسول خالص داشته و می توانند به طور معناداری کاهش تخریب بافتی را بدنبال داشته باشند.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، واکسن **PLGA** حاوی آنتی ژن کپسول، آنتی ژن کپسول، **PLGA**، چلنج میکروبی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷
پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۵

مقدمه

باکتری کلبسیلا، یک پاتوژن فرصت طلب از خانواده انتروباکتریاسه به شمار می‌آید که به شکل باسیل های گرم منفی، حاوی کپسول، فاقد اسپور و بی حرکت می‌باشد. این پاتوژن موجب بیماری های شدیدی مانند باکتریمی، انتریت نوزادان، مننژیت، پنومونی، عفونت دستگاه ادراری (UTI) و عفونت بافت های نرم می شوند (۱). اهمیت کلبسیلا به عنوان پاتوژن انسانی در ایجاد عفونت های بیمارستانی مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است و بیماران بستری دچار نقص سیستم ایمنی و مبتلا به بیماری‌های زمینه ای هدف عمده این باکتری هستند (۲). کلبسیلا پنومونیه به عنوان مهم ترین جنس کلبسیلا از خانواده انتروباکتریاسه مطرح می باشد و همچنین سومین میکروارگانیسم شایع در کشت های خون بیماران مبتلا به سپسیس است که می تواند باعث همه گیری جدی و عفونت های بومی بیمارستانی شود. درمانهای اخیر برای این عفونت با توجه به گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی هنوز موفق عمل نکرده است و کلبسیلا پنومونیه با راههای گریزی که دارد، قادر است نسبت به عوامل آنتی بیوتیکی مقاومت نشان دهد. مقاومت این باکتری به سفالوسپورین‌های نسل سوم، معمولا ناشی از تولید طیف گسترده ای از بتالاکتامازها میباشد. بتالاکتامازها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین ها، مونوباکتام ها و پنی سیلین ها را دارد (۳،٤). در همین راستا، کلبسیلا پنومونیه قادر به ساخت کپسول میباشد که در عفونت زایی این باکتری نقش برجسته ای ایفا میکند. پلی ساکارید کپسولی (CPS) در کلبسیلا پنومونیه سطح باکتری را می پوشاند و از باکتری در برابر پاسخ های التهابی میزبان از اپسونیزه شدن و متعاقب آن فاگوسیت شدن جلوگیری می کند (۵). کپسول کلبسیلا پنومونیه از واحدهای تکرار شونده ی ٤ تا ٦ قندی (گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز و رامنوز) ساخته شده است. این قندها آرایش فضایی گوناگونی دارند و این سبب شده که یک گنجینه‌ی کپسولی متنوعی از ۸۰ آنتی ژن کپسولی مختلف تولید شود (٦).

مطالعه این مکانیسم‌ها و متابولیسم پلی ساکارید برای توسعه واکسن های موثر ضروری است و درک مسیرهای تنظیم پلی ساکارید نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در میان پلی ساکاریدهای سطح سلول باکتریایی، پلی ساکارید کپسول، به ویژه حفاظت کننده باکتری از مکانیسم های ایمنی میزبان می باشد که با استفاده از مخفی نگهداشتن آنتی ژن‌ها، باکتری را از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها مصون می‌دارد (۷).

ویلکینسون و همکاران، پلی ساکارید کپسول تعدادی از سویه های متعلق به نوع ٥٤ کپسولی را خالص کرده و نشان دادند که حاوی ۵۰ درصد D-گلوکز، ۱۰٪فروکتوز و ۲۹ درصد گلوکورونیک اسید می باشد (۸). همچنین، نوع I و II کپسولی بیماریزایی قابل توجهی را در موش ها نشان داده است و هنگامی که به پریتوئن موش تزریق میشوند بیماری زایی جدی ایجاد می‌کنند. همچنین کپسول میتواند ایجاد عفونتهای بیمارستانی کند (۹).

در بررسی که اتامنا و همکاران در این مورد انجام دادند، مشخص شد که پلی ساکارید کپسولی (CPS) سروتیپ‌های خاصی از کلبسیلا پنومونیه، موجب اتصال باکتری‌ها به ماکروفاژهای ریوی خوکچه هندی در محیط فاقد سرم شده در نتیجه منجر به هضم و کشته شدن باکتری شدند به طوری که سویه هایی که آنتی ژن کپسولی K1، K2، K4 و K5 را بروز می دهند، بیماریزایی بیشتری را نشان می‌دهند. بررسی ها نشان می دهند که سروتیپ K2 شایع ترین تیپ کپسولی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های مجاری ادراری، باکتریمی و پنومونی می باشد (۱۰).

از آنجاییکه شیوع این باکتری به ویژه در افراد بستری شده در ICU بالا می باشد، نیاز به واکسیناسیون بیش از پیش ضروری بنظر می‌رسد. در واقع، استفاده از واکسن ها به عنوان عامل درمانی مؤثر و کار آمد در درمان بیماری های عفونی، امری ثابت شده است (۱۱).

در این مطالعه، از نانوپارتیکل برای فرمولاسیون واکسن استفاده شده است. تحویل نانوسیستمی قادر به افزایش جذب آنتی ژن ها با محرک ها توسط سلول های عرضه کننده‌ی آنتی ژن (APCS) می‌باشد (AntigenPresenting Cell) و پاسخ های ایمنی بهتری نسبت به همتاهای محلول خود دارد. آنتی ژن هایی چون پروتئین‌ها، پپتیدها، لیپوپپتیدها، ویروس ها یا DNA

پلاسمید در نانوذرات PLGA با موفقیت فرموله شده اند که بدنبال آن، آزادسازی طولانی مدت آنتی ژن ها در واکسیناسیون میتواند پاسخ های التهابی بسیار مؤثری را ایجاد کند (۱۲).

در این پژوهش، نتایج حاصل از جذب آنتی ژن بر روی نانوذرات و سایز نانوواکسن تولید شده توسط آزمون های زتاسایزر و بار (FTIR) بررسی شده است. سپس پس از تزریق به موش، میزان بررسی احتمالی توسط نانو واکسن تولیدی مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوان آزمایشگاهی

تعداد ۲۰ موش ماده ۳ الی ۵ هفته ای (محدوده وزنی ۱۸±۲۲ گرم)، نژاد BALB/C، از موسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه شده است. تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید و کد مصوبه کمیته اخلاق IR.IAU.TMU.REC1397.293 دریافت شد.

تهیه کلبسیلا پنومونیه

باکتری کلبسیلا پنومونیه سویه K2O1 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه و در محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده شد.

مشخصات نانو ذره PLGA

نانو ذره PLGA (poly lactide-co-glycolide Acid) در بسته تجاری ۵ میلی گرمی و حمل در یخ مرطوب و دمای ۲- الی ۸- درجه سانتی گراد از شرکت سیگما آلدریچ با کد اختصاصی ۷۱۹۹۱۹ خریداری گردید.

مشخصات کلی

Resomer RG 752H,poly (D,L-lactide-co-glycolide) Acid terminated, lactide:glycolid 75:25,MW 4000-15000 Synonym: PLGA

استخراج آنتی ژن کپسول

برای تخلیص آنتی ژن کپسول از مواد دکستروز (۱/۲۵ گرم)، گلیسرول (۲/۷۵ میلی لیتر)، سدیم هیدروژن فسفات (۰/۱۵ گرم)، پتاسیم فسفات هیدروزن (۰/۳ گرم)، سولفات منیزیم (۰/۳۳۵ گرم)، محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال و محلول اسید کلریدریک ۱ نرمال استفاده شد. بعد از تنظیم PH=7 و اتوکلاو، کلنی ها را برداشته و به ارلن ها منتقل کرده و ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با ۱۳۰ rpm در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید و سپس به هر ارلن ساولن غلیظ اضافه گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. لوله در دمای ٤ درجه سانتیگراد و ۲۵۰۰ rpm به مدت ٤٥ دقیقه سانتریفیوژ شد. تمامی رسوب ها در یک لوله جمع و درون آب مقطر استریل حل گردید. بعد از سه بار عمل فریز/ذوب، سانتریفیوژ انجام و این بار رسوب دور ریخته شد و به اندازه سه برابر حجم محلول رویی، اتانول خالص ۹٦٪ اضافه شد. نهایتا در یخچال به مدت ۱ روز قرار داده شد و مجدد سانتریفیوز به مدت ٦۰ الی ۹۰ دقیقه گردید و رسوب کپسول جدا شد. سپس مجدد مرحله‌ی سانتریفیوژ به مدت ٦۰ الی ۹۰ دقیقه با 2500 rpm انجام گردید و محلول رویی را دور ریخته، رسوب را درون لوله ریخته و داخل بن ماری ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا رسوب خشک گردید. رسوب کپسولمان در ۲۰۰ سی سی آب مقطر تزریقی حل گردید و داخل بن ماری ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خروج از بن ماری، اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن اضافه شد و با کروماتوگرافی سفارز CL-2B تخلیص شد.

بارگذاری آنتی ژن کپسول در نانوذرات[1] PLGA

میزان ۲۰۰ میلی لیتر از PLGA درون یک بالون ژوژه حاوی ۵ میلی لیتر حلال دی متیل فورمامید (DMF) ریخته شد. سپس ۲۰۰ میلی گرم از EDC(1-Ethyl-3-3-dimethylaminopropyl) و ۵۰ میلی گرم از NHS (N-Hydroxysuccinimide) همزمان به داخل ظرف ریخته شد. آنتی ژن های کپسول به مقدار ٤۰۰ میلی گرم به اضافه گردید و به مدت ۱ هفته در دمای آزمایشگاهی به منظور انجام واکنش استریفیکاسیون و تشکیلنانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول روی شیکر نگهداری شد. به منظور تخلیص و جداسازی ماکرومولکول نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول بعد از انجام کونژوگاسیون، با استفاده از ژل فیلتراسیون و سفادکس G-75، با سرعت ٤۰ میلی لیتر در ساعت برقرار گردید و تا زمان عبور مایع، معادل یک حجم بستر از ستون ادامه یافت. در نهایت، با قرائت جذب فرکشن‌ها در طول موج ۲۱۰ نانومتر، فرکشن‌های مربوطه جدا گردید.

[1] Poly Lactide-Co-Glycolide Acid

اندازه گیری سایز و شارژ مولکول PLGA و نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول

متد DLS (Dynamic Light Scattering)

برای اطمینان بیشتر از درستی تشکیل نانوواکسن PLGA حاوی آنتی ژن کپسول از دستگاه Zetasizer مدل Nanovizard Π شرکت Malvern انگلستان برای اندازه گیری اندازه و شارژ PLGA و PLGA-CPS استفاده شد.

متد FITR (Fourier Transform Infared Spectrometer)

تایید انجام نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول با طیف سنجی مادون قرمز مدل (Jasco-FT-IR-6300) از طیف سنجی برای تعیین ترکیبات آلی و گروههای عاملی و پیوندهای کووالانسی موجود در نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول وآنتی ژن کپسول استفاده شد. مقدار ۱ تا ۲ میلی گرم از نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول و PLGA را با پودر KBr به شکل قرص در آورده و سپس توسط دستگاه، جذب را در ناحیه IR بررسی نمودیم.

واکسیناسیون

به منظور واکسیناسیون، ۲۰ سر موش BALB/C، ۳ الی ۵ هفته‌ای (محدوده وزنی ۲۲-۱۸ گرم) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. در هر گروه از ۵ موش استفاده گردید و گروه های آزمون شامل :

گروه اول: گروه کنترل دریافت کننده PBS

گروه دوم: کپسول پلی ساکارید (CPS)

گروه سوم : پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید (PLGA)

گروه چهارم : پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید –کپسول پلی ساکارید (PLGA-CPS)

واکسیناسیون به این صورت بود که ۲۰۰ ماکرولیتر آنتی ژن و ۲۰ میلی گرم نانوذره را داخل نانوذره حل کردیم بعد به مدت ۱۰ دقیقه در سونیکاتور حمامی قرار دادیم و به آرامی PBS pH=7/4 افزوده ودر نهایت ۲۵ میلی لیترپلی ونیل الکل (PVA) اضافه شد و یه مدت ۱ شب روی استیرر قرار داده شد و دوره واکسیناسیون شامل ۳ دوز تزریق ۰/۵ سی سی به صورت عضلانی با فواصل دو هفته‌ای می‌باشد.

چلنج میکروبی

ابتدا در این مرحله محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند ساخته شد که برای ساخت آن از کلرید باریم به مقدار ۰/۰۱ گرم در ۱ میلی لیتر آب مقطر و اسید سولفوریک ۱٪ به مقدار ۰/۵ میلی لیتر در ٤۹/۵ میلی لیتر آب مقطر استفاده گردید و مقدار ۱۵۰ ماکرولیتر را از این محلول دور ریخته شد و باقیمانده محلول بر روی شیکر برده شد و به آرامی مقدار ۱۵۰ ماکرولیتر از محلول حاوی اسید را اضافه کرده و شیک نمودیم و یک محلول کدر رنگ ساخته شد .

پس از ساخت نیم مک فارلند، در مرحله بعد ۱ میلی لیتر نرمال سالین داخل لوله ی آزمایش کشیده و از کلنی های باکتری کلبسیلا پنومونیه به اندازه ای داخل نرمال سالین حل شد که کدورت رنگ آن با کدورت نیم مک فارلند یکسان شود، ۵ موش از هر گروه با استفاده از کتامین (mg/kg 100) و به روش صفاقی، به هر موش ۰/٤ سی سی تزریق شد. شکم موش در شرایط استریل باز شد به مقدار ۰/۱ سی سی با سرنگ انسولین به مثانه تزریق شد و محل جراحی، بخیه زده شد. علائم بالینی در موش ها و وضعیت جسمانی آن ها در تمام روزهای ۱–۷ روز بررسی گردید و در روز آخر موش ها با اتر بی هوش شدند و پس از بی هوشی عمیق و سپس مرگ کامل، کالبد شکافی شدند و مثانه آنها خارج شد. مثانه در بافر PBS pH=7.4 حل شد و بعد از تهیه رقت ها، با آنس استاتدارد استریل از تمام رقت ها در پلیت حاوی محیط تریپتیک سوی آگار(Tryptic Soy Agar) به صورت کشت ادرار، خطی کشت داده شد. سپس به مدت ٢٤ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده و پس از گذشت ٢٤ ساعت تعداد کلنی ها شمارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها از تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و در صورت معنی دار بودن، جهت تعیین تفاوت بین میانگین های دو گروهی از آزمون تعقیبی TUKEY استفاده شد تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح معنی داری ۰/۰۵(P<0/05) انجام شد .

نتایج

آزمون زتاسایزر

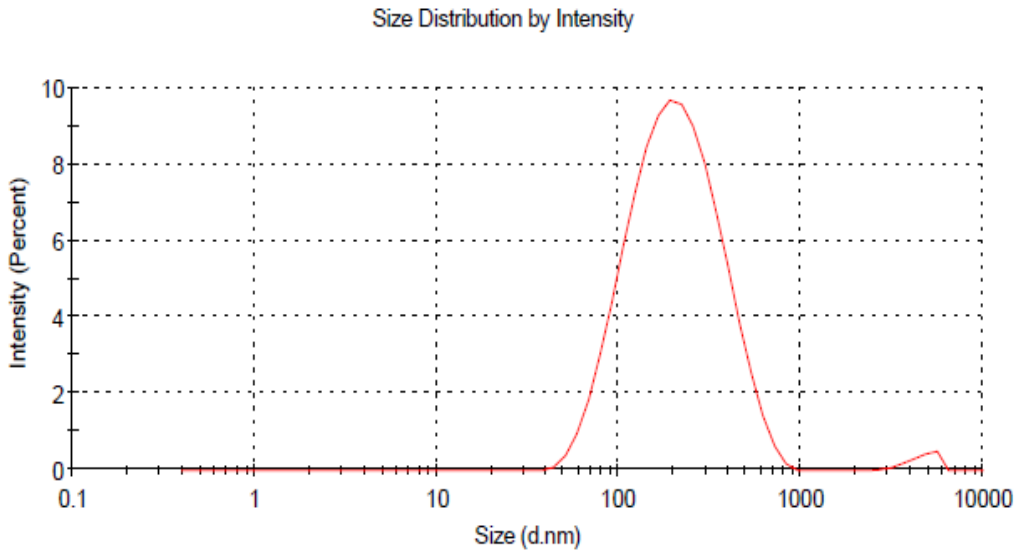
اندازه نانوپارتیکل PLGA و نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول در شکل زیر نشان داده شده است.

طبق نمودارهای ۱ تا ٤، اندازه نانوپارتیکل PLGA، 178.7 نانومتر و سایز مولکول نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول ۱۵۹/٤ نانومتر بدست آمد.

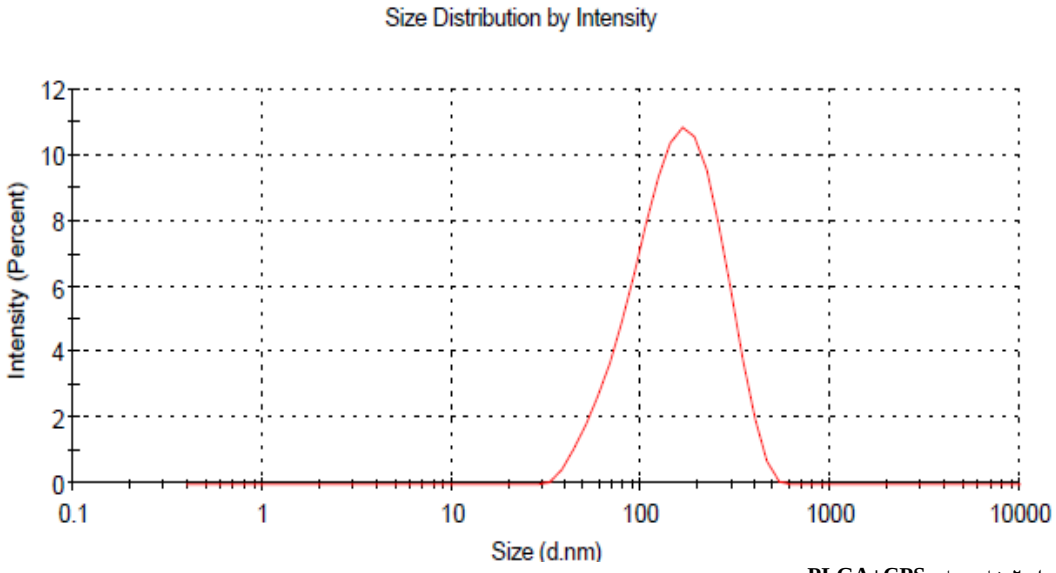
نتایج نمودار حاکی از آن است که اندازه مولکول نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول، در حد نانومتر است که موفقیت آمیز بودن نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول و حفظ سایز نانورا نشان می دهد.

نتایج قطر و بار آنتی ژن کپسول

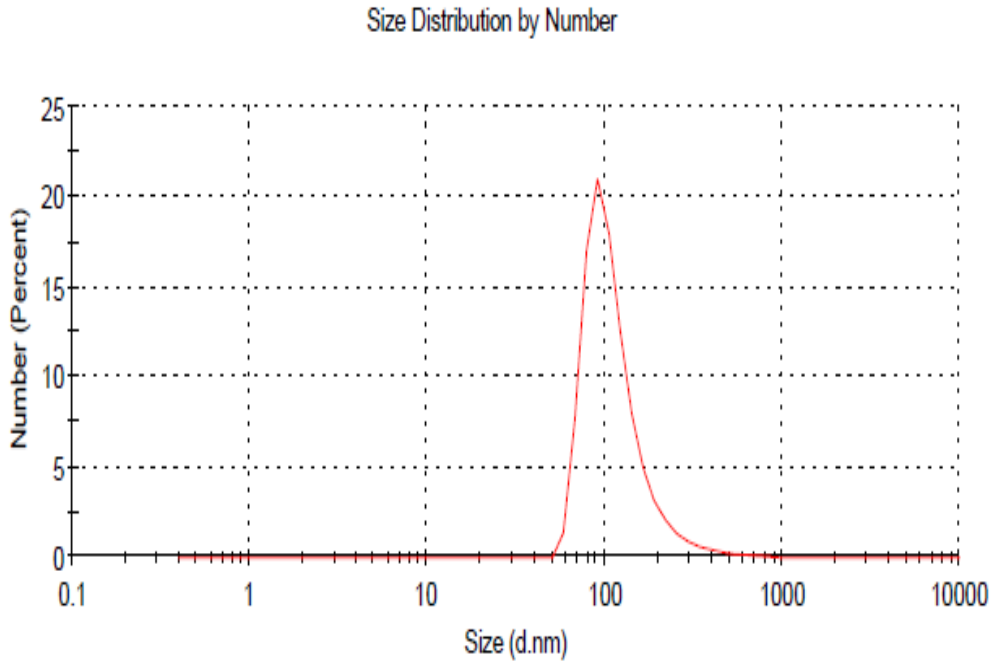
قطر آنتی ژن کپسول ۲۲۱/۵ نانومتر و بار آنتی ژن کپسول ۱۷/۳- mv ثبت گردید.



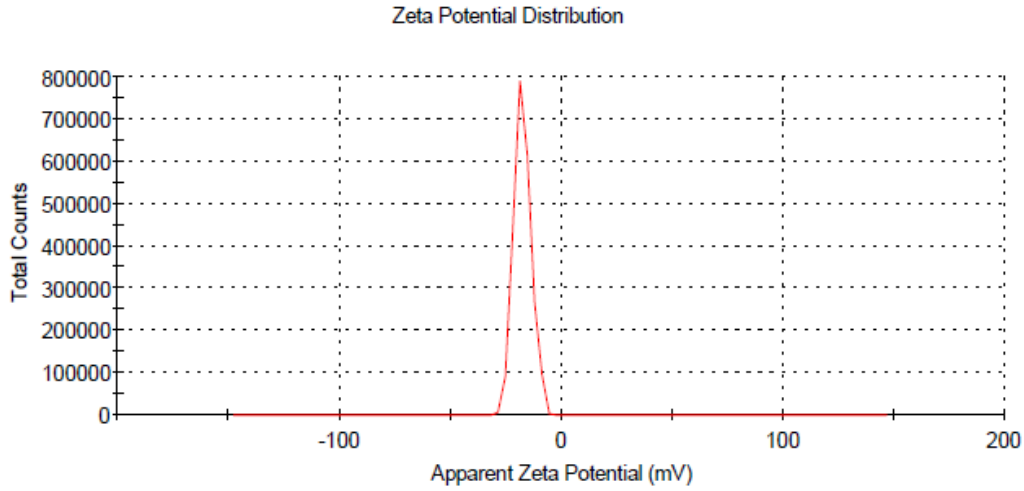
نمودار ۱. نتایج سایز **PLGA**



نمودار ۲. نتایج سایز **PLGA+CPS**



نمودار ۳. نتایج سایز کپسول



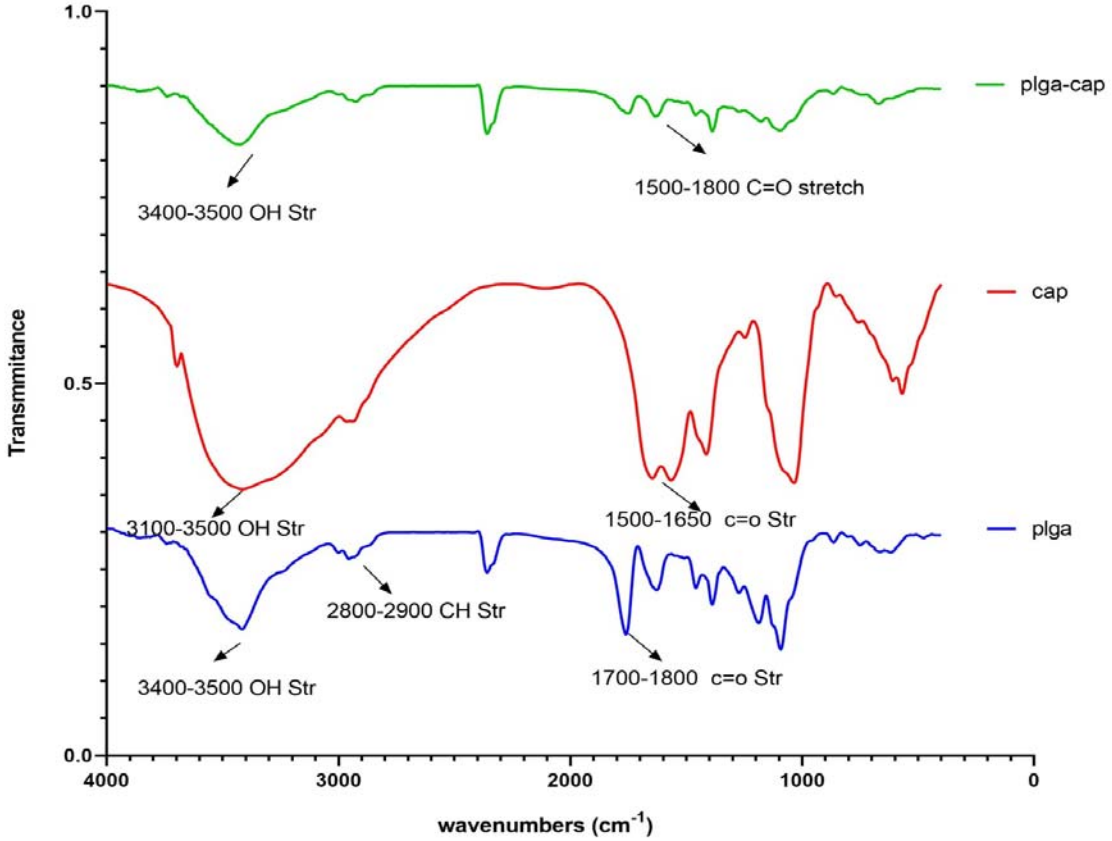
نمودار ٤. نتایج زتا کپسول

آزمون FTIR[1]

در این آزمون نتایج در نمودار شکل ۲ آورده شده است. با توجه به نمودار شکل ۲، پیک های مربوط به اعداد موجی واجد ارتباط مستقیم با فرکانس در نانوپارتیکل PLGA پیک ۱۷۰۰–۱۸۰۰cm^{-1} مربوط به گروه strc=0 (استری) می باشد و در آنتی ژن کپسول، پیک cm^{-1} ۱۵۰۰–۱٦۵۰ مربوط به گروه استری c=o می باشد و پیک ۱۵۰۰–۱۸۰۰cm^{-1} مربوط به گروه استری[2] c=o در نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول (CPS-PLGA) می‌باشد. این مطلب، نشان دهنده موفقیت آمیز بودن نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول می‌باشد.

[1] Fourier Transform Infared Spectrometer

[2] str



شکل ۲. آزمون FTIR. نمودار مربوط به نانوپارتیکل PLGA و نمودار مربوط به آنتی ژن کپسول و نمودار مربوط به نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول (PLGA-CPS) می باشد.

چلنج میکروبی

در گروه های کنترل و PLGA با توجه به اینکه از واکسن‌های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول استفاده نشده بود افزایش معنی داری با توجه به تعداد کلنی‌ها در مقایسه با سایر گروه ها مشاهده شد که بیانگر این می باشد که در گروه های واکسینه شده با ترکیب نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول مقاومت و ایمنی زایی مناسبی نسبت به گروه های کنترل و PLGA داشته است.

جدول ۱. بررسی چلنج میکروبی در مثانه و میانگین و انحراف معیار در موش های گروه مختلف

گروه ها	مثانه	Log CFU/ml	Mean	Std Error bar	Std. Deviation
*Control	36×104 CFU/Spleen	5/55 CFU/ Spleen	434524.1±285475.8	17320.5	30000
CPS	4×103 CFU/ Spleen	3/60 CFU/ Spleen	11452.4±3452.4	1732	3000
*PLGA	22×104 CFU/Spleen	5/34 CFU/ Spleen	294524.1±145475.8	17320.5	30000
PG-CPS	3×102 CFU/ Spleen	2/47 CFU/ Spleen	796.8±196.8	115.4	200

کلیه مقادیر جدول به صورت انحراف استاندارد میانگین می باشد. در گروه های کنترل* و PLGA* افزایش معناداری مشاهده شد.

گروه کنترل در مقایسه با گروه آنتی ژن کپسول افزایش معناداری داشته است و بیشترین تعداد کلنی ها مربوط به گروه کنترل می باشد.

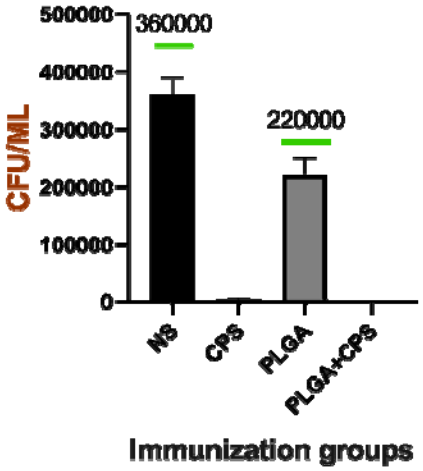
گروه کنترل در مقایسه باگروه واکسن افزایش معناداری داشته است و بیشترین تعداد کلنی ها مربوط به گروه کنترل می باشد.

گروه نانوذره PLGA در مقایسه با گروه آنتی ژن کپسول افزایش معناداری داشته است.

گروه نانوذره PLGA در مقایسه با گروه واکسن افزایش معناداری داشته است.

گروه آنتی ژن کپسولی در مقایسه با گروه واکسن از لحاظ تعداد کلنی ها بیشترین مقدار را داشته و افزایش معنادارتری را نیز داشته است.

در تست چلنج عضو مثانه ٤ گروه موش که در هر گروه ٥ سر موش (n=5) قرار گرفته بودند را مورد بررسی قرار دادیم که بیشترین میانگین مربوط به گروه کنترل بود. در تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه افزایش معنی داری بین تمام گروه های مورد آزمایش مشاهده شد. در عضو مثانه گروه های کنترل و PLGA با توجه به اینکه از واکسن‌های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول استفاده نشده بود افزایش معناداری با توجه به تعداد کلنی‌ها در مقایسه با سایر گروه ها مشاهده شد که بیانگر این می باشد که در گروه های واکسینه شده با ترکیب نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول مقاومت و ایمنی زایی مناسبی نسبت به گروه های کنترل و PLGA داشته است.(P<۰/۰۵)



نمودار ۱. میانگین تعداد کلنی های باکتری به تفکیک گروه های درمان در تست چلنج (مثانه)

گروه کنترل و PLGA بیشترین تعداد کلنی را داشتند ولی در مواجهه با کپسول و واکسن تعداد کلنی ها کاهش نشان داده شده است. نانوپارتیکل PLGA دارای انتهای اتصالی بسیار است و خاصیت ترکیب پذیری بالایی با داروی مبدا و سلول هدف دارد. نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول برای بررسی سرعت پاسخ های ایمنی در تولید آنتی بادی ضدکپسول مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). درواقع، ذکر این نکته در اینجا ضروری بنظر میرسد که تاکنون نانوواکسن تزریقی با آنتی ژن کپسول کلبسیلا با نانوپارتیکل PLGA، بر علیه عفونت های ادراری کلبسیلا ساخته نشده است.

در این مطالعه اما، آنتی ژن کپسول کلبسیلا پنومونیه طراحی شد که در این راستا، از نانوپارتیکل PLGA با قابلیت جذب بالا استفاده شد. همان طور که مطالعات نشان دادند، این نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول می تواند تیتر آنتی بادی های اختصاصی را در خون حیوان آزمایشگاهی افزایش دهد (١٤).

نانو ذرات زیست تخریب پذیر به دلیل فرمولاسیون متنوع، خواص آزادسازی حفظ شده،اندازه کوچک (کمتر از اندازه سلولی) و سازگاری با سلول های مختلف بدن،گزینه مناسبی برای حمل واکسن می باشند (۱۵).

یکی از متداول ترین پلیمرهای مورد استفاده برای تولید نانوذرات پلیمری، نانوپارتیکل پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک

اسید است. پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید یکی از توسعه یافته‌ترین پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیر از خانواده پلی استر های آلیفاتیک به شمار میرود و به خاطر خواص و زیست سازگاری مناسب PLGA از این پلیمر برای کپسوله کردن انواع داروها و مواد زیستی استفاده می شود (١٦).

این پلیمرها سال ها در انسان و حیوان به عنوان یکی از حامل های دارو استفاده می شوند و گمان بر این است که سمی نیستند. این نانوذرات می توانند از آنتی ژن هایی که داخل آن ها جای می گیرند، در مقابل شرایط سخت مانند pH پایین، نمک های صفراوی و فعالیت آنزیم ها محافظت کنند. در چند دهه ی اخیر، واکسن های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول متعددی به منظور القاء حفاظت علیه پاتوژن های حامل بخش پلی ساکارید طراحی شده است (١٦).

در مطالعه ای در سال ٢٠١٠ اثبات شد که آنتی ژن ها و فاکتورهای رشد انسانی به طور موفقیت آمیزی در نانو ذره PLGA یا بستری از آن ترکیب می شوند (١٧).

اداره غذا و دارو امریکا استفاده از PLGA را در داروهای مختلف و به خصوص در داروهای ضد سرطانی مورد تایید قرار داده است (١٨). امروزه استفاده از نانو ذرات به عنوان ادجوانت مناسب از پرکاربردترین روشهای ساخت واکسن های زیر واحدی است. واکسن هایی که از نانو ذرات تشکیل شده اند به عنوان یک کلاس جدید از واکسن ها قلمداد می شوند که کارآمدتر و مقرون به صرفه تر از واکسن های معمولی هستند، چرا که هر دو بازوی ایمنی سلولی و هومورال به میزان بالایی القاء می شوند.انتخاب نوع ادجوانت به منظور آزادسازی آنتی ژن،افزایش قدرت ایمنی زایی یا حداقل سمیت و عوارض جانبی حائز اهمیت می باشد (١٩).

میکروکپسول ها به صورت های مختلف و در اندازه های نانوذرات تا میکروذرات ساخته می شوند. این میکروکپسول ها در حقیقت نقش ادجوانت و عرضه کننده آنتی ژن در مقدار کم همراه با ایمنی زایی بالا را به عهده دارند که به این نانوپارتیکل ها مجموعه میکروکپسول های محرک ایمنی می‌گویند. لازم به ذکر است که این میکروپارتیکل‌ها به صورت شبه ذرات عمل کرده و بر اساس خصوصیات ذاتی و ماهیت خود قادرند با مولکول‌های محلول آنتی ژن، تشکیل میکروذراتی را بدهند که با تغییر خصوصیات فیزیکی آنتی ژن، باعث بهتر وسریع‌تر بلعیده شدن آنتی ژن توسط ماکروفاژها شده و سیستم ایمنی را بیشتر تحریک نماید (٢٠).

در مطالعه ای که در سال ٢٠٠٨ توسط Li و همکارانش مشخص شد، فاگوسیتوز PLGA توسط سلول‌های ماکروفاژ آلوئولار در بستری از داروی لیگاند شده با PLGA، که به صورت اسپری کردن خشک در مجاری تنفسی انجام شد، مورد مطالعه قرارگرفت، که نتایج حاصل به طور معناداری افزایش جذب و نفوذ داروی حامل PLGA را نشان می داد (٢١).

Fischer و همکارانش در سال ٢٠٠٩ نشان دادند، نانوپارتیکل ها در افزایش عرضه آنتی ژن درجهت پاسخ‌های آنتی بادی و فاگوسیتوز آنتی ژن ها توسط سلول‌های ایمنی و CTLS همانند سلول های دندریتیک بوده و در افزایش ایمنی ذاتی مورد بررسی قرار گرفته اند (٢٢).

در سال ٢٠١٢، Murtada A Taha و همکاران از نانوذرات زیست تخریب پذیر٨٥/١٥ PLGA به عنوان یک وسیله نقلیه برای تحویل پپتیدهاینو ترکیب MOMP-187 کپسوله استفاده کرد و مشاهده نمود PLGA باعث ارتقاء ظرفیت پپتید برای وارد کردن Th1 برای تولید سایتوتوکسین ها می شود (٢٣).

در مطالعه ای دیگر، این مطلب اثبات شده است که داروی لیگاند شده با PLGA، برای ادغام سلولی و رها شدن دارو در محل هدف، زمان کمتر و انرژی بیشتری را نسبت به داروهای تنها می طلبد (٢٤).

در تحقیقی که در سال ٢٠١١ انجام شد (Arunima Bandyopdhyay) نیز PLGA به عنوان حامل مناسبی برای انتشار تسهیل یافته آنتی ژن ها با قابلیت لیگاند شدن اختصاصی با مولکول های هدف و افزایش تیتر ایمونوگلوبولین ها و افزایش معنادار پاسخ های ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است (٢٥). در مطالعه حاضر نیز، موفقیت نانو حامل PLGA در دوام آن نشان داده شده است.

در جمع بندی کلی می توان گفت سیستم تحویل نانوسیستمی قادر به افزایش جذب آنتی ژن ها یا محرک ها توسط سلول های ارائه کننده آنتی ژن یا APCs[1] می باشد و پاسخ های ایمنی بهتری نسبت به همتاهای محلول خود دارد (۱۹). به طور خاص با استفاده از نانوذرات پلیمری با آنتی ژن محبوس یا جذب شده در آن ها از طریق هدف قرار دادن تحویل آنتی ژن به سلول های دندریتیک می‌توان آزادسازی آنتی ژن و پاسخ ایمنی مورد نظر را بهبود بخشید و از این نانوذرات به طور گسترده در واکسن و برای تحویل کنترل شده عوامل مختلف نظیر پروتئین های DNA، پلاسمید و ترکیبات با وزن مولکولی کم استفاده نمود (۸). از دیگر مزیت های روش نانوسیستمی شامل کاهش عوارض جانبی و امکان کپسوله کردن اپی توپ‌های آنتی ژن های مختلف و یا هر دو آنتی ژن وادجوانت در یک حامل می باشد (۲۶).

نتایج این مطالعه نشان داد که مولکول های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول، توانایی بهتری نسبت به گروه های خالص مانند PLGA و CPS داشته است. مطالعه حاضر، تولید نانو واکسن بر پایه کپسول با استفاده از نانوپارتیکل PLGA در مدل حیوانی موش می باشد که چون در حالت خالص، سمیت LPS بالا میباشد و امکان خطر وجود دارد، از PLGA به عنوان ادجوانت جهت کمک به تحریک قوی و بهتر سیستم ایمنی استفاده شد. در این مطالعه، آنتی ژن کپسول کلبسیلا پنومونیه با استفاده از نانوپارتیکل PLGA با قابلیت جذب سطحی بالا استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچگونه اثر تخریبی و آسیب بافتی در مثانه موش مشاهده نشده است. بنابراین عدم سمیت آن نیز مورد تایید قرار می گیرد. در نتیجه چنین استنباط می شود که تحویل نانوسیستمی به خصوص با استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر مانند PLGA به دلیل داشتن مزایایی همچون داشتن مجوز از FDA روش تهیه و تخلیص آسان، عدم سمیت و عدم تخریب بافت مثانه نسبت به سایر حامل های رایج دارو می توان با تحقیقات بیشتر آن را جایگزین حامل های رایج نمود. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر، از ترکیب نانوپارتیکل PLGA به همراه آنتی ژن کپسول کلبسیلا پنومونیه استفاده شده بود و همانطور که پیشتر گفته شد، نانوپارتیکل PLGA دارای انتهاهای اتصالی بسیاری میباشد. بنابراین، خاصیت ترکیب پذیری بالایی با داروی مبدا و سلول هدف دارد. هم چنین این نانوپارتیکل در خون پایدار و غیرسمی بوده و باعث لخته شدن خون نمی گردد (۲۷).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می دهد که مولکول های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول، توانایی بهتری نسبت به کپسول خالص داشته و می توانند به طور معناداری کاهش تخریب بافتی را بدنبال داشته باشند. در این تحقیق هم چنین مشخص شد که نانوپارتیکل PLGA با خاصیت عدم سمیت و زیست تخریب پذیری، قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان حامل در واکسن‌های نانوپارتیکل PLGA حاوی آنتی ژن کپسول برخوردار است و نانو واکسن PLGA حاوی آنتی ژن کپسول به صورت پایدار صورت می گیرد. وجود این نانوپارتیکل در کنار آنتی ژن کپسول به عنوان عامل موثر در واکسن کاندید مذکور می باشد.

در مطالعه حاضر، آزمایش سنجش ایمنی زایی در دست انجام است و هم چنین به جای استفاده از یک آنتی ژن پلی ساکاریدی از دو آنتی ژن پلی ساکارید هم استفاده شده است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

[1] Antigen Presenting Cells

منابع

1. Agyeman AA, Bergen PJ, Rao GG, Nation RL, Landersdorfer CB. A systematic review and meta-analysis of treatment outcomes following antibiotic therapy among patients with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections. International Journal of Antimicrobial Agents 2020 ;55(1):105833. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.10.014.
2. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2018; 8:4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004.
3. Zhu WM, Yuan Z, Zhou HY. Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection relative to two types of control patients: a systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance & Infection Control 2020;9(1):1-3. doi:10.1186/s13756-020-0686-0.
4. Wu D, Huang X, Jia C, Liu J, Wan Q. Clinical manifestation, distribution, and drug resistance of pathogens among abdominal solid organ transplant recipients with Klebsiella pneumoniae infections. InTransplantation proceedings 2020 :289-294. doi:10.1016/j.transproceed.2019.11.023
5. Choi M, Hegerle N, Nkeze J, Sen S, Jamindar S, Nasrin S, et al. The diversity of lipopolysaccharide (o) and capsular polysaccharide (K) antigens of invasive Klebsiella pneumoniae in a Multi-Country collection. Frontiers in Microbiology 2020; 11:1249. doi:10.3389/fmicb.2020.01249.
6. Adwan GM, Owda DM, Abu-Hijleh AA. Prevalence of Capsular Polysaccharide Genes and Antibiotic Resistance Pattern of Klebsiella pneumoniae in Palestine. Jordan Journal of Biological Sciences 2020 ;13(4).
7. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. Future Microbiology 2014 ;9(9):1071-81.doi:10.2217/fmb.14.48.
8. Williams P, Lambert PA, Brown MR, Jones RJ. The role of the O and K antigens in determining the resistance of Klebsiella aerogenes to serum killing and phagocytosis. Microbiology 1983 ;129(7):2181-91. doi:10.1099/00221287-129-7-2181.
9. Xu Y, Zhang J, Wang M, Liu M, Liu G, Qu H, Liu J, Deng Z, Sun J, Ou HY, Qu J. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Genome Medicine. 2021;13(1):1-5. doi:10.1186/s13073-021-00936-5.
10. Athamna AB, Ofek IT, Keisari Y, Markowitz S, Dutton GG, Sharon N. Lectinophagocytosis of encapsulated Klebsiella pneumoniae mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. Infection and Immunity 1991 ;59(5):1673-82. doi:10.1128/iai.59.5.
11. Khurana S, Utreja P, Tiwary AK, Jain NK, Jain S. Nanostructured lipid carriers and their application in drug delivery. International Journal of Biomedical Engineering and Technology 2009; 2(2):152-71. doi:10.1504/IJBET.2009.022913.
12. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and surfaces B: biointerfaces 2010;75(1):1-8. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
13. Ghitman J, Biru EI, Stan R, Iovu H. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. Materials & Design 2020 ;193:108805. doi:10.1016/j.matdes.2020.108805.
14. Sahu R, Dixit S, Verma R, Duncan SA, Coats MT, Giambartolomei GH, Singh SR, Dennis VA. A nanovaccine formulation of Chlamydia recombinant MOMP encapsulated in PLGA 85: 15 nanoparticles augments CD4+ effector (CD44high CD62Llow) and memory (CD44high CD62Lhigh) T-cells in

immunized mice. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2020 ;29:102257. doi:10.1016/j.nano.2020.102257.

15. Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2019 ;53:101174. doi:10.1016/j.jddst.2019.101174.
16. Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. Materials Science and Engineering: C 2018 ;92:1041-60. doi:10.1016/j.msec.2017.12.036.
17. Song X, Zhao X, Zhou Y, Li S, Ma Q. Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles. Current drug metabolism. 2010 ;11(10):859-69.doi:10.2174/138920010794479682.
18. Tabatabaei Mirakabad FS, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y, Joo SW. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2014;15(2):517-35.doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517.
19. Feray A, Szely N, Guillet E, Hullo M, Legrand FX, Brun E, Pallardy M, Biola-Vidamment A. How to Address the Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System. Nanomaterials 2020;10(3):425.doi:10.3390/nano10030425.
20. Badkas A, Frank E, Zhou Z, Jafari M, Chandra H, Sriram V, Lee JY, Yadav JS. Modulation of in vitro phagocytic uptake and immunogenicity potential of modified Herceptin®-PLGA nanoparticles contain capsule antigen PLGA-PEG nanoparticles for drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018:271-8. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.12.001.
21. Li H, Wang J, Zhou T, Zhang Y, Zhang Z. An investigation of the effects of nanosize delivery system for antisense oligonucleotide on esophageal squamous cancer cells. Cancer Biology & Therapy 2008 ;7(11):1852-9. doi:10.4161/cbt.7.11.6879.
22. Fischer S, Schlosser E, Mueller M, Csaba N, Merkle HP, Groettrup M, Gander B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. Journal of Drug Targeting 2009 ;17(8):652-61. doi:10.1080/1061186090311965 6.
23. Taha MA, Singh SR, Dennis VA. Biodegradable PLGA85/15 nanoparticles as a delivery vehicle for Chlamydia trachomatis recombinant MOMP-187 peptide. Nanotechnology 2012;23(32):325101. doi:10.1088/0957-4484/23/32/325101/meta.
24. Zhang K, Tang X, Zhang J, Lu W, Lin X, Zhang Y, Tian B, Yang H, He H. PEG–PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. Journal of Controlled Release 2014:77-86. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.026.
25. Bandyopadhyay A, Fine RL, Demento S, Bockenstedt LK, Fahmy TM. The impact of nanoparticle ligand density on dendritic-cell targeted vaccines. Biomaterials 2011 ;32(11):3094-105. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.054.
26. Simón-Yarza T, Tamayo E, Benavides C, Lana H, Formiga FR, Grama CN, et al. Functional benefits of PLGA particulates carrying VEGF and CoQ10 in an animal of myocardial ischemia. International Journal of Pharmaceutics 2013;454(2):784-90. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.015.
27. He Z, Shi Z, Sun W, Ma J, Xia J, Zhang X, et al. Hemocompatibility of folic-acid-PLGA nanoparticles contain capsule antigen amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for co-delivery of cisplatin and paclitaxel: treatment effects for non-small-cell lung cancer. Tumor Biology 2016; 37(6):7809-21. doi:10.1007/s13277-015-4634-1.