

## Preparation of PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) nanoparticles Containing *Pseudomonas aeruginosa* Alginate, LPS and Exotoxin A as a Nano-vaccine

**leila Safari zanjani**

Ph.D Student of Microbiology, Faculty Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, leila\_safari\_z2007@yahoo.com

**Reza Shapoury, \***

Assistant Professor of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, rezashapoury@yahoo.com

**Mehrouz Dezfoulian**

Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, dezfoulian@kiau.ac.ir

**Mehdi Mahdavi**

Assistant Professor of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, mahdavic@gmail.com

**Mehdi Shafieeardestani**

Assistant Professor of Pharmacist, Department of Rdiopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Tehran, Iran, shafieeardestani@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is a particular importance due to the numerous factors of pathogenicity and the prevalence of multi-resistance strains throughout the world. Therefore, the need to prevent and produce an effective vaccine seems necessary. The aim of this study was to use PLGA nanoparticles in the design of vaccine with alginate antigens, lipopolysaccharide, and exotoxin, A *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, strain PAO1 of *Pseudomonas aeruginosa* is used. Then, antigens including, alginate, lipopolysaccharide, and exotoxin A were extracted. Then, lipopolysaccharide was detoxified by hot phenol method. Exotoxin A was purified by chromatography and detoxified with formalin. Then, antigens separately conjugated to PLGA. FT-IR and AFM methods were used to confirm conjugation with nanoparticles. A rabbit model was used to study the pyrogenic effects of conjugates. The mortality effect of conjugates on mouse model was tested.

**Materials and methods:** The success of conjugation based on the size and charge of the nanoparticle was confirmed. The presence of antigenic functional groups in the structure of the nanoparticle and the formation of a steric bond confirmed with FT-IR results and the corresponding courier form.

**Results:** The 3D conjugate images of nanoparticles before and after conjugation showed an increase in the height of nanoparticle binding sites. The change from initial sharpness to puff after the conjugation confirmed the success of conjugation. Failure to observe the pyrogenic effects in the rabbit and no mortality observed in mice was proved.

**Discussion and conclusion:** All of the results showed that conjugates were effective in immunization. Therefore, it can be a candidate vaccine with a great potential against *Pseudomonas* causing diseases.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Alginate, Detoxified- LPS, Exotoxin A, PLGA

---

\* Corresponding author

**Received:** May 30, 2017 / **Accepted:** September 12, 2017

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۲۷-۱۱  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

## تهیه نانوذره‌های poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) حاوی آلژینات، لیپولی ساکارید و اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان نانواکسن

**لیلا صفری زنجانی:** دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، leila\_safari\_z2007@yahoo.com  
**رضا شاپوری\*:** استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، rezashapoury@yahoo.com  
**مهرروز دزفولیان:** استادیار ژنتیک مولکولی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، dezfoulia@kiau.ac.ir  
**مهدی مهدوی:** استادیار ایمونولوژی، انسیتو پاستور، تهران، ایران، mahdavidavac@gmail.com  
**مهدی شفیعی اردستانی:** استادیار داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران، shafieeardestani@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** باکتری سودوموناس آئروژینوزا به علت داشتن عوامل متعدد بیماری‌زایی و شیوع سوبه‌های چند مقاومتی آن در سراسر دنیا اهمیت ویژه‌ای دارد و از این رو، نیاز به پیشگیری و تولید واکسن کارآمد برای آن ضروری است. هدف مطالعه حاضر، استفاده از نانوذره‌های poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) در طراحی واکسن با آنتی‌ژن‌های آلژینات، لیپولی ساکارید و اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا است.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر، آلژینات، لیپولی ساکارید و اگزوتوکسین A از سوبه PAO1 استخراج شدند. لیپولی ساکارید به روش فنل داغ تخلیص و سم‌زدایی شد. اگزوتوکسین A به روش کروماتوگرافی خالص‌سازی و با فرمالین سم‌زدایی شد. سپس آنتی‌ژن‌های تهیه شده به‌شکل جداگانه با PLGA کونژوگه شدند. روش‌های FT-IR و AFM برای تأیید انجام کونژوگاسیون با نانوذره‌ها استفاده شدند. برای بررسی تب‌زایی کونژوگه‌ها از الگوی خرگوش استفاده و مرگ‌ومیر ناشی از کونژوگه‌ها روی الگوی موشی آزمایش شد. موفقیت کونژوگاسیون بر اساس اندازه و شارژ نانوذره حاصل تأیید شد.

**نتایج:** نتایج FT-IR و شکل پیک‌های مربوطه، حضور گروه‌های عاملی آنتی‌ژن در ساختار نانوذره و تشکیل پیوند استری را تأیید کردند. تصاویر سه بعدی کونژوگه‌ها با نانوذره‌ها پیش و پس از کونژوگاسیون، افزایش ارتفاع سایت‌های اتصال نانوذره را نشان دادند. تغییر از حالت تیزی اولیه به پفکی پس از انجام کونژوگاسیون، موفقیت کونژوگاسیون را تأیید کرد. مشاهده نشدن تب در خرگوش و مرگ‌ومیر در موش‌ها اثبات شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** تمام نتایج، کارآمد بودن واکسن در ایمنی‌زایی را نشان دادند و بنابراین به‌عنوان نامزدی برای واکسنی با پتانسیل قوی علیه بیماری‌های ناشی از سودوموناس پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، لیپولی ساکارید دتوکسیفای شده، آلژینات، اگزوتوکسین A، PLGA

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، باسیلی گرم منفی، متحرک و دارای سازوکار اکسیداتیو است. این باکتری در خاک وجود دارد و عامل عفونت‌هایی در انسان و گیاه است. این باکتری‌ها نقش مهمی در اکولوژی خاک دارند و به علت توانایی تجزیه انواع مواد آلی مانند برخی مواد زائد سمی، در زیست‌درمانی مفید هستند (۱-۳).

سودوموناس، بیماری‌زای فرصت‌طلبی است که اهمیت بالینی دارد و باعث ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری، تنفسی، آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتری، عفونت استخوان و مفصل، عفونت‌های گوارشی و عفونت‌های سیستمیک به‌ویژه در افراد دارای نقص ایمنی نظیر سوختگی‌های شدید، مبتلایان به سرطان، ایدز و غیره می‌شود (۴-۶).

عواملی که در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا نقش دارند، به دو گروه دسته‌بندی می‌شوند: عوامل بیماری‌زایی سطح باکتری و عوامل بیماری‌زایی ترشحي (۷). عوامل بیماری‌زای سطح باکتری شامل لیپوپلی‌ساکارید، فلاژل، پیلی، آلترینات و عوامل بیماری‌زای ترشحي شامل پیوسیانین، پیووردین، آلکالین پروتئاز، الاستاز، فسفولیپاز C و اگزوتوکسین A هستند (۸ و ۹).

لیپوپلی‌ساکارید، ساختار ویژه سطح باکتری‌های گرم منفی است و در اتصال میکروب به سطوح و سلول نقش دارد. این ترکیب حاوی لیپیدی به نام لیپید A است که به ساختمان پلی‌ساکاریدی ویژه‌ای متشکل از هسته مرکزی و تعدادی واحدهای تکراری انتهایی به نام آنتی‌ژن O متصل است. لیپوپلی‌ساکارید با پیوندهای آبگریز به غشای خارجی متصل می‌شود. لیپید A،

مولکولی متشکل از واحدهای دی‌ساکارید گلوکز آمین فسفریله شده است که به تعدادی اسید چرب بلندزنجیره اتصال یافته‌اند (۱۰). از جمله عملکردهای لیپوپلی‌ساکارید عبارتند از: حفاظت سلول‌های باکتری در برابر اپسونیزاسیون، فاگوسیتوز و مقاومت نسبت به عمل میکروب‌کشی کمپلمان در سرم و ممانعت از نفوذپذیری غشای خارجی است (۱۱ و ۱۲).

آلترینات، پلیمری خطی و آنیونی از گلورونیک‌اسید و مانورونیک‌اسید است که ژل چسبناکی را در اطراف باکتری ایجاد می‌کند. تولید آلترینات اغلب حالت مخاطی ایجاد می‌کند و کلنی‌ها ظاهری مرطوب و براق دارند (۱۳ و ۱۴). این باکتری پس از اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال با تولید ماتریکسی پلی‌ساکاریدی از آلترینات، بیوفیلم تشکیل می‌دهد که از باکتری در برابر دفاع میزبانی و اثر آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند (۱۵).

افزایش تولید آلترینات به‌ویژه در بیماران مبتلا به سیستمیک فیروزیس (CF) باعث کاهش عملکرد روی و کاهش شانس زنده ماندن بیماران می‌شود. از دیگر عملکردهای بیماری‌زایی آلترینات در سوبیه‌های موکوییدی، مهار و تداخل مستقیم با فاگوسیتوز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم است (۱۶). به علت ویژگی چسبندگی آلترینات، این ساختار در اتصال باکتری و ایجاد بیوفیلم نقش مهمی دارد و با تولید بیوفیلم، فعالیت ضد میکروبی و فاگوسیتوز مهار می‌شود (۱۷).

این باکتری، اگزوتوکسین A را به شکل پروآنزیم تولید می‌کند. این توکسین از ۶۱۳ آمینواسید با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون تشکیل شده است و سیستم ترشحي تیپ دو، آن را به فضای خارج سلولی ترشح

## مواد و روش‌ها

از سویه PAO1 باکتری سودوموناس آئروژینوزا برای خالص سازی و جداسازی سه آنتی ژن آلژینات، لیپولی ساکارید و آگزوتوکسین A استفاده شد.

**جداسازی آنتی ژن آلژینات:** سویه یادشده از محیط نوترینت آگار (مرک آلمان) به محیط سنتتیک (تمام ترکیبات استفاده شده در ساخت این محیط، مرک آلمان هستند) حاوی ۱۰/۱ میلی لیتر در لیتر گلیسرول، ۰/۵ گرم در لیتر دکستروز، ۰/۳۷ گرم در لیتر ال-گلوتامین، ۰/۶ گرم در لیتر  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۰/۱۲ گرم در لیتر  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  و ۰/۱۳ گرم در لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  منتقل شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس با دور ۴۰rpm درون انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس، ۴/۵ میلی لیتر فتل ۹۰ درصد برای غیرفعال سازی باکتری اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس درون بن ماری قرار داده شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی برای جداسازی آلژینات استفاده و سه برابر حجم مایع رویی، اتانول خالص اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال گذاشته شد. پس از سپری شدن زمان یادشده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ و به مدت ۳ ساعت درون بن ماری قرار داده شد. در نهایت، سانتریفوژ برای تغلیظ نهایی آلژینات با اتانول خالص انجام و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سلیسیوس نگهداری شد (۲۴).

**جداسازی لیپولی ساکارید:** سویه یادشده از محیط نوترینت آگار (مرک آلمان) به محیط نوترینت برات (مرک آلمان) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس با ۲۵۰۰rpm درون انکوباتور شیکردار

می کند (۱۸). این توکسین زیرواحدهای اتصالی، آنزیمی و انتقالی دارد و دارای سه ناحیه است که ناحیه یک برای اتصال به گیرنده‌های میزبان، ناحیه دو برای انتقال توکسین به سیتوزول سلول میزبان و ناحیه سه برای اتصال آمیدآدنین دی فسفات ریبوز به عامل طویل شدن و کاتالیز کردن آن استفاده می شود. سازوکار عملکرد این سم مشابه توکسین دیفتری است و سبب مهار مرحله طویل سازی طی فرآیند سنتز پروتئین می شود (۱۹ و ۲۰). این توکسین با ایجاد آسیب‌های بافتی و کاهش فعالیت فاگوسیتوزی، نقش مستقیمی در ایجاد عوارض پوستی در سوختگی‌ها، آسیب قرنیه در عفونت چشم و آسیب بافت در عفونت‌های مزمن ریوی دارد (۲۱).

عفونت سودوموناسی به علت سه عامل بیماری‌زای یادشده، مشکلی جدی در بیماران بستری مبتلا به سرطان، فیروز سیستمیک و سوختگی است. همچنین افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری را نسبت به درمان مقاوم می کند (۲۲). نانوذره پلی‌دی-ال لاکتید-کو-گلیکولاید با قابلیت درهم کنش و ادغام بیشتر در سلول‌های ایمنی، لیگاندشدن اختصاصی با مولکول هدف و افزایش تیترا ایمونوگلوبولین‌ها و افزایش معنادار پاسخ‌های ایمنی، دارای انتهاهای اتصالی بسیاری است و ویژگی ترکیب‌پذیری قوی با داروی مبدأ و سلول هدف دارد (۲۳). هدف مطالعه حاضر، استفاده از نانوذره پلی‌لاکتیک-کوگلیکولیک اسید در ساخت و معرفی نامزدی برای واکنس علیه سه آنتی ژن مهم و بیماری‌زای این باکتری فرصت طلب برای ایجاد حفاظت و مصونیت در برابر این عامل بیماری‌زاست. در این پروژه، از آنتی ژن پروتئینی برای تولید ایمنی بلندمدت در کنار دو آنتی ژن پلی ساکاریدی استفاده شده است.

سنتتیک، مرک آلمان هستند) حاوی ۱ میلی‌لیتر گلیسرول ۱ درصد، ۲/۵ گرم در لیتر دکستروز، ۱/۴۹ گرم در لیتر KCl، ۱/۱۴۱ گرم در لیتر  $K_2HPO_4$ ، ۲/۴۹ گرم در لیتر NaCl، ۰/۱۹۸ گرم در لیتر  $Na_2HPO_4$ ، ۰/۴۹۹ گرم در لیتر  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۰۷۸ گرم در لیتر EDTA، ۰/۰۰۰۲۷ گرم در لیتر  $FeCl_3$ ، ۰/۰۰۴۹ گرم در لیتر  $MnCl_2 \cdot H_2O$ ، ۰/۱۴ گرم ال-آرژنین، ۰/۶۳ گرم ال-آلانین، ۰/۳۴ گرم ال-گلوتامین و ۰/۵ گرم عصاره مخمر انجام و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سیلیسیوس با دور ۲۵۰۰rpm درون انکوباتور شیکردار قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سیلیسیوس با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. برای جداسازی سم، سولفات آمونیوم ۶۰ تا ۸۰ درصد متناسب با حجم مایع روئی اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سیلیسیوس قرار داده شد. از ستون ژل فیلتراسیون سفاکریل HRs200 برای خالص‌سازی نهایی استفاده شد. برای تبدیل توکسین به توکسوئید، گرماگذاری در حضور فرمالین ۰/۲ درصد به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس انجام و از دیالیز برای خارج‌سازی بقایای فرمالین از نمونه استفاده شد (۱۸).

#### کونژوگاسیون نمونه‌های آلژینات، لیپوبلی ساکارید

**دئوکسیفای شده و اگزوتوکسین A به شکل جداگانه با پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید:** درون سه بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری واجد مگنت، ۱۵ میلی‌گرم پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید (شرکت سیگما) ریخته و برای حل شدن آن، از ۴ تا ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل فرامید (شرکت سیگما) استفاده شد. به سوسپانسیون حاصل، ۱۵۰ میلی‌گرم N-۳، دی‌متیل آمینوپروپیل ان-اتیل هیدروکاید (شرکت سیگما) افزوده و برای بهبود عملکرد آن نیز ۵۰ میلی‌گرم N-

قرار داده شد. پس از افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر فنل ۹۰ درصد برای غیرفعال‌سازی باکتری، به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سیلیسیوس درون بن‌ماری قرار داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سیلیسیوس با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب حاصل اندازه‌گیری و به ازای هر ۱۶ گرم رسوب، ۷۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سیلیسیوس دوباره درون بن‌ماری قرار داده شد. سپس ۷۵ میلی‌لیتر فنل ۹۰ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سیلیسیوس درون بن‌ماری قرار داده شد. برای تولید مرحله سه فازی (روئی، فنلی و رسوب)، به مدت ۱۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سیلیسیوس با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. فاز روئی برای جداسازی لیپوبلی ساکارید به کار رفت؛ به میزان یک سوم آن متانل اشباع با سدیم استات اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سیلیسیوس قرار داده شد. سپس، ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سیلیسیوس با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب حاصل برای سم‌زدایی در کمترین مقدار NaOH ۰/۲ نرمال حل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه سیلیسیوس قرار داده شد. پس از شوک سرمایی به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، سه برابر حجم، اتانول اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سیلیسیوس قرار داده شد و در نهایت، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سیلیسیوس با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد (۲۴).

#### جداسازی اگزوتوکسین A: سوبه یادشده از محیط

بروسلا آگار (مرک آلمان) به محیط مولر هینتون براث (مرک آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس با دور ۱۵۰rpm درون انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس انتقال به محیط سنتتیک TSBD (تمام مواد استفاده‌شده در ساخت این محیط

ثبت شد. دماهای ثبت شده با هم جمع شدند و میانگین آنها در نظر گرفته شد. چنانچه افزایش دما در هر خرگوش از ۰/۶ درجه سلیسیوس و در هر سه خرگوش از ۱/۴ درجه سلیسیوس کمتر بود، ماده تزریقی غیرتبزا محسوب شد (۳۳-۳۶).

در مطالعه حاضر، تمام آزمایش‌ها، نگهداری و تغذیه الگوهای حیوانی موش با استفاده از کتاب Guide for the care and use of laboratory animals انجام شد؛ این کتاب بر مبنای پروتکل NIH است (۳۷).

### نتایج

**خالص سازی کونژوگه سه آنتی ژن آلژینات، LPS دتوکسیفای شده و آگروتوکسین A با نانوذره PLGA به وسیله کروماتوگرافی با روش ژل فیلتراسیون با استفاده از سفاکریل HRs200:** برای خالص سازی کونژوگه سه آنتی ژن آلژینات، لیپولی ساکارید و آگروتوکسین A با نانوذره PLGA از کروماتوگرافی با روش ژل فیلتراسیون با ژل سفاکریل HRs200 استفاده شد. در کروماتوگرافی کونژوگه Alg-PLGA، بررسی فرکشن‌ها با توجه به پلی ساکاریدی بودن آلژینات در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام شد. پیک‌های موجود، انجام کونژوگاسیون را در فرکشن‌های ۲۱ با OD= 0.91 و ۲۲ با OD= 1.53 و انجام نشدن کونژوگاسیون را در فرکشن ۳۰ با OD= 0.66 نشان دادند. در کروماتوگرافی کونژوگه PLGA-LPS، بررسی فرکشن‌ها با توجه به پلی ساکاریدی بودن لیپولی ساکارید در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام شد. پیک‌های موجود، انجام کونژوگاسیون را در فرکشن‌های ۲۰ با OD= 0.86 و ۲۱ با OD= 1.67 و انجام نشدن کونژوگاسیون را در فرکشن ۳۰ با OD=0.72 نشان دادند.

هیدروکسی سوکسینیمید کاربودیمید (شرکت سیگما) اضافه شد. سپس داخل هر بالن ژوژه، ۲۵ میلی گرم آنتی ژن مربوطه ریخته شد. برای انجام استریفیکاسیون و تشکیل پیوند استری، نمونه به مدت ۷ روز در محیط آزمایشگاه روی همزن الکتریکی قرار داده شد. سپس برای خالص سازی هر سه کونژوگه یادشده، ابتدا در حضور آب دیونیزه با سه بار تعویض در روز دیالیز شد (۲۴) و برای خالص سازی ثانویه هر سه کونژوگه، روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفاکریل HRs200 انجام و با استفاده از زتا سایزر، FT-IR و تصویر سه بعدی به ترتیب اندازه و شارژ هر سه کونژوگه و نانوذره به همراه ترکیبات آلی، گروه‌های عاملی و پیوندهای کووالانسی موجود در هر سه کونژوگه و نانوذره و نیز جذب سطحی سه آنتی ژن در سایت‌های اتصال نانوذره ارزیابی شد (۲۵-۲۸).

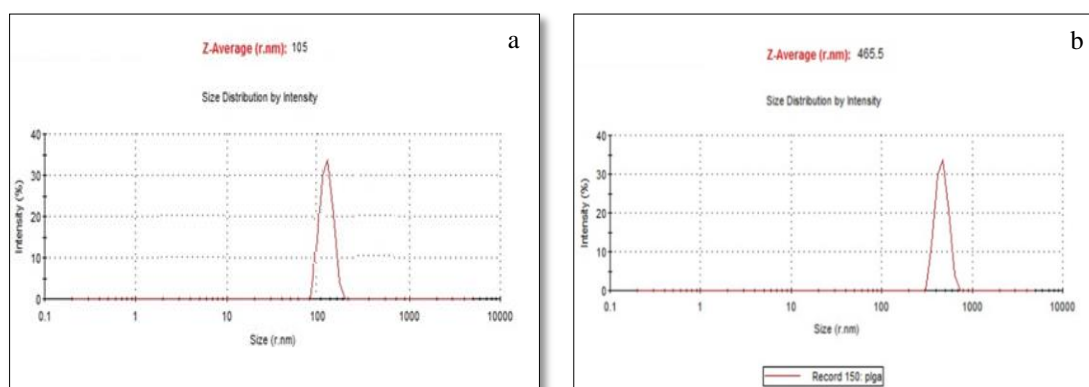
برای بررسی سمی بودن نانواکسن، پنج سر موش سوری ماده انتخاب شدند و ۱۰ میکروگرم واکسن کونژوگه یادشده به شکل داخل عضلانی به هر کدام از الگوهای موشی تزریق شد. پس از گذشت ۷ روز، مرگ و میر در گروه موشی بررسی و نتایج ایمنی سنجی در گروه موشی با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ بررسی شد (۲۹-۳۲).

برای تعیین تبزایی کونژوگه تهیه شده، خرگوش‌ها در گروه‌های سه تایی انتخاب و دمای بدن آنها بررسی شد. به این شکل که پس از ثبت نخستین دما از راه قرار دادن رکتومتر در مقعد حیوان، دماهای بعدی هر ۱۵ دقیقه طی ۱ ساعت اندازه گیری شدند. آخرین دمای ثبت شده پیش از تزریق، دمای اولیه محسوب شد. سپس نمونه از راه ورید مارژینال گوش تزریق و دمای بدن حیوان طی ۳ ساعت و هر ساعت یک بار پس از تزریق

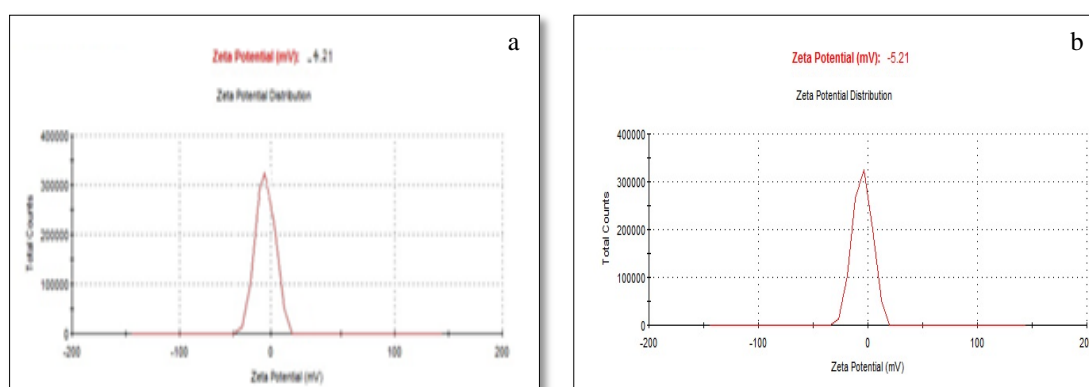
اندازه‌گیری اندازه و شارژ مولکول PLGA و PLGA-ALg استفاده شد (شکل‌های ۱ و ۲). طبق شکل ۱، اندازه نانوذره PLGA، ۱۰۵ نانومتر (نمودار a) و اندازه مولکول کونژوگه، ۴۶۵/۵ نانومتر (نمودار b) است و با وجود افزایش اندازه نسبت به PLGA، اندازه مولکول کونژوگه باز هم در حد نانومتر است و موفقیت کونژوگاسیون و حفظ اندازه نانو را نشان می‌دهد. طبق شکل ۲، منفی‌تر شدن شارژ کونژوگه (نمودار b) نسبت به PLGA (نمودار a) نیز موفقیت کونژوگاسیون را نشان می‌دهد.

در کروماتوگرافی کونژوگه Exotoxin A-PLGA، بررسی فرکشن‌ها با توجه به پروتئینی بودن آگزوتوکسین A در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. پیک‌های موجود، انجام کونژوگاسیون را در فرکشن‌های ۱۶ با OD= 0.97 و ۱۷ با OD= 1.34 و انجام‌نشدن کونژوگاسیون را در فرکشن ۲۹ با OD= 0.89 نشان دادند.

نتایج اندازه‌گیری اندازه و شارژ هر سه مولکول کونژوگه و نانوذره PLGA: برای اطمینان بیشتر از درستی تشکیل کونژوگه، از دستگاه Zetasizer مدل Nanovizard II شرکت Malvern انگلستان برای



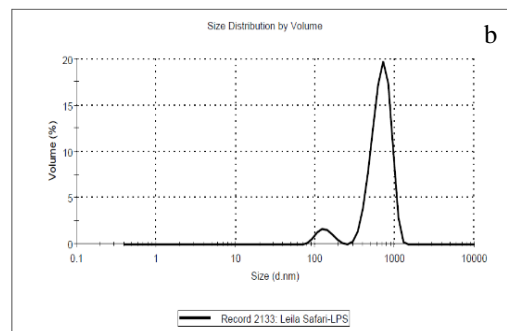
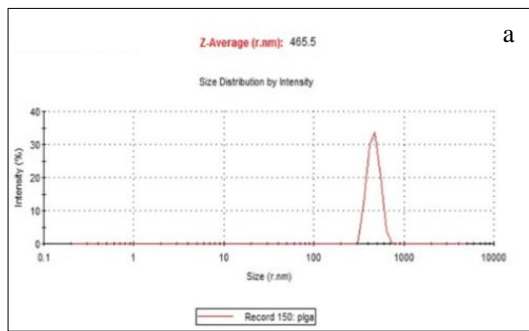
شکل ۱- قطر کونژوگه Alg-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا سایزر. نمودارهای a و b به ترتیب به قطر نانوذره PLGA و کونژوگه PLGA مربوط و به ترتیب ۱۰۵ و ۴۶۵/۵ نانومتر هستند.



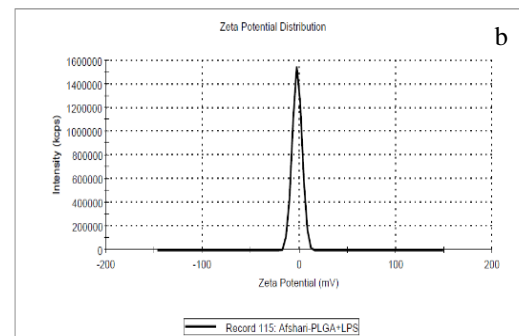
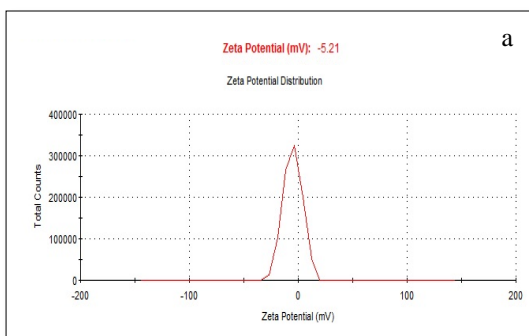
شکل ۲- شارژ کونژوگه Alg-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا شارژر. نمودارهای a و b به ترتیب به شارژ نانوذره PLGA و کونژوگه PLGA مربوط و به ترتیب -۴/۲۱ و -۵/۲۱ هستند.

برای اطمینان بیشتر از درستی تشکیل کونژوگه، از دستگاه یادشده برای اندازه‌گیری اندازه و شارژ مولکول PLGA و ETA-PLGA استفاده شد (شکل‌های ۵ و ۶). طبق شکل ۵، اندازه نانوذره PLGA، ۱۰۵ نانومتر (نمودار a) و اندازه مولکول کونژوگه، ۸۵۲ نانومتر (نمودار b) است و با وجود افزایش اندازه نسبت به PLGA، مولکول کونژوگه باز هم در حد نانومتر است و موفقیت کونژوگاسیون و حفظ اندازه نانو را نشان می‌دهد. طبق شکل ۶، مثبت شدن شارژ کونژوگه (نمودار b) نسبت به PLGA (نمودار a) نیز موفقیت کونژوگاسیون را نشان می‌دهد.

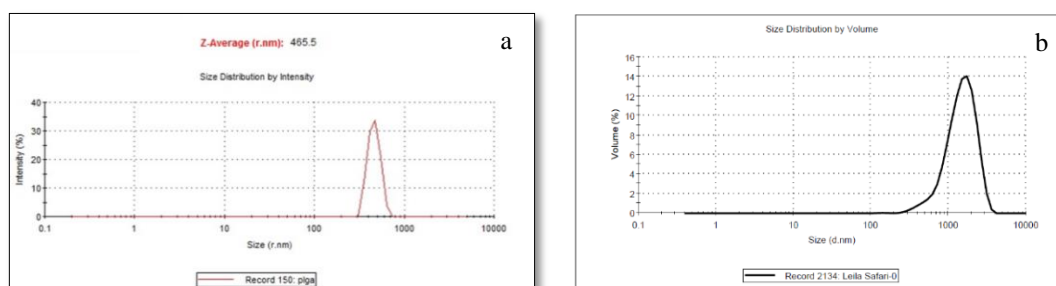
برای اطمینان بیشتر از درستی تشکیل کونژوگه، از دستگاه یادشده برای اندازه‌گیری اندازه و شارژ مولکول PLGA و D-LPS-PLGA استفاده شد (شکل‌های ۳ و ۴). طبق شکل ۳، اندازه نانوذره PLGA، ۱۰۵ نانومتر (نمودار a) و اندازه مولکول کونژوگه، ۳۳۲ نانومتر (نمودار b) است و با وجود افزایش اندازه نسبت به PLGA، مولکول کونژوگه باز هم در حد نانومتر است و موفقیت کونژوگاسیون و حفظ اندازه نانو را نشان می‌دهد. طبق شکل ۴، منفی شدن شارژ کونژوگه (نمودار b) نسبت به PLGA (نمودار a) نیز موفقیت کونژوگاسیون را نشان می‌دهد.



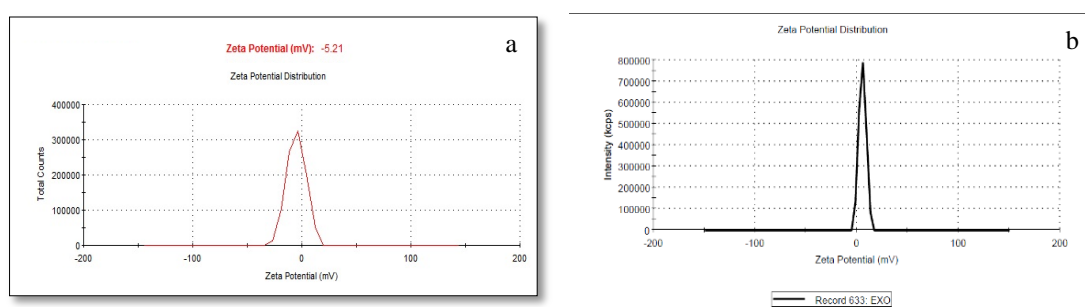
شکل ۳- قطر کونژوگه D-LPS-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا سائزر. نمودارهای a و b به ترتیب به قطر نانوذره PLGA و کونژوگه - D LPS-PLGA مربوط و به ترتیب ۱۰۵ و ۳۳۲ نانومتر هستند.



شکل ۴- شارژ کونژوگه D-LPS-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا شارژر. نمودارهای a و b به ترتیب به شارژ نانوذره PLGA و کونژوگه PLGA-D-LPS مربوط و به ترتیب ۴/۲۱- و ۲/۱۴- هستند.



شکل ۵- قطر کونژوگه ETA-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا سایزر. نمودارهای a و b به ترتیب به قطر نانوذره PLGA و کونژوگه PLGA-ETA مربوط و به ترتیب ۱۰۵ و ۸۵۲ نانومتر هستند.

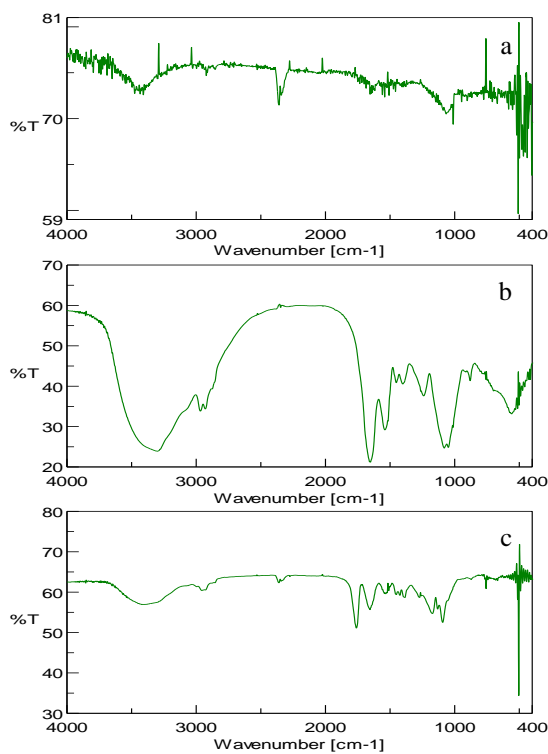


شکل ۶- شارژ کونژوگه ETA-PLGA و نانوذره PLGA به روش زتا شارژر. نمودارهای a و b به ترتیب به شارژ نانوذره PLGA و کونژوگه PLGA-ETA مربوط و به ترتیب ۴/۲۱- و ۵/۵۲- هستند.

گروه  $\text{OH-C=O}$  آلزینات، پیک  $1653/66 \text{ cm}^{-1}$  به گروه  $\text{OH-C=O}$  لپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده و پیک  $1541/81 \text{ cm}^{-1}$  به گروه  $\text{OH-C=O}$  اگزوتوکسین A مربوط است. با توجه به طیف مربوط به کونژوگه آلزینات (شکل ۷)، پیک موجود در عدد موجی  $1660/41 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA و پیک موجود در عدد موجی  $1385/06 \text{ cm}^{-1}$  به آلزینات مربوط است و پیک اعداد موجی  $1099/23 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1173/47 \text{ cm}^{-1}$  و  $1263/47 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده حضور پیوندهای استری هستند. با توجه به طیف مربوط به کونژوگه در نمودار c1، پیک موجود در عدد موجی  $1460/81 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA و پیک موجود در عدد موجی  $1653/66 \text{ cm}^{-1}$  به D-LPS مربوط است و پیک اعداد موجی  $1099/23 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1173/47 \text{ cm}^{-1}$  و  $1273/75 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده حضور پیوندهای استری

تأیید انجام کونژوگاسیون هر سه آنتی‌ژن با طیف‌سنجی مادون قرمز (مدل Jasco FT-IR-6300): از طیف‌سنجی IR برای تعیین گروه‌های عاملی موجود در کونژوگه و آنتی‌ژن استفاده شد. با توجه به نتایج، حضور گروه‌های عاملی آنتی‌ژن در ساختار نانوذره و تشکیل پیوند استری تأیید می‌شود. در شکل ۷، نمودار a به نانوذره PLGA و نمودار b به آلزینات مربوط است. در شکل ۸، نمودار b1 به LPS و شکل ۹، نمودار b2 به ETA مربوط است. با توجه به شکل، پیک‌های مربوط به اعداد موجی  $1004/10 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1067/41 \text{ cm}^{-1}$  و  $1260/81 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های اتری مربوط هستند که در نمودار کونژوگه، تقویت آنها نشان‌دهنده حضور پیوندهای استری است (در آلزینات، ETA، LPS و نیز کونژوگه‌ها دیده می‌شود). پیک  $1647/88 \text{ cm}^{-1}$  به

۱۹۸ نانومتر در آلژینات (تصویر c)، ۲۴۷/۴ نانومتر در لیپولی ساکارید دتوکسیفای شده (تصویر e) و ۴۸ نانومتر در آگزوتوکسین A (تصویر g) افزایش یافته است. میزان برجستگی و فرورفتگی‌ها، قابلیت جذب سطحی زیاد PLGA را نشان می‌دهد. در تصاویر b، d، f و h تغییر شکل سایت‌های اتصال PLGA پیش و پس از کونژوگاسیون به خوبی نمایش داده شده است و مشاهده می‌شود که پس از جذب سطحی آلژینات، لیپولی ساکارید و آگزوتوکسین A توسط نانوذره پلی لاکتیک کولیکولیک اسید و انجام کونژوگاسیون، سایت‌ها از حالت تیزی به پفکی تغییر شکل یافته‌اند.



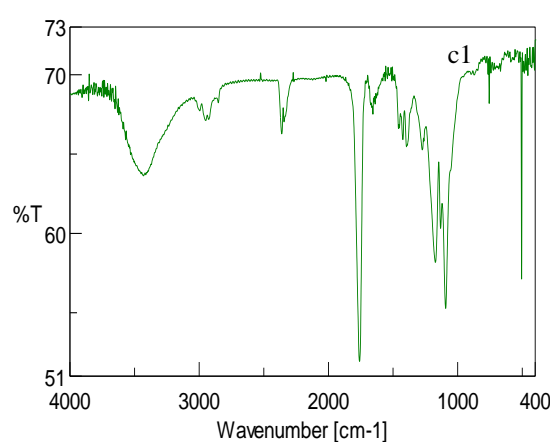
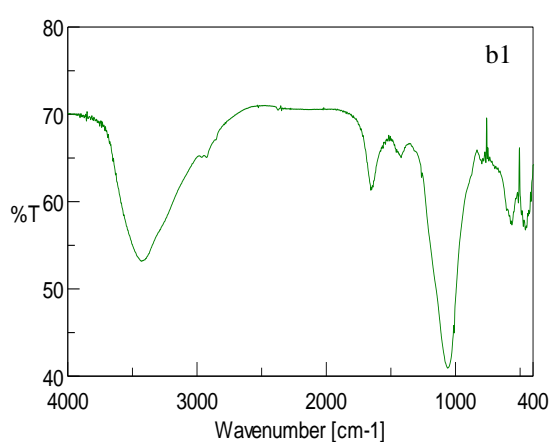
شکل ۷- نمودارهای تأیید کونژوگاسیون با طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR). نمودارهای a، b، c به ترتیب نمودارهای FT-IR نانوذره PLGA و آنتی‌ژن آلژینات و کونژوگه Alg-PLGA هستند و حضور پیوند استری در شکل c نشان‌دهنده موفق بودن کونژوگاسیون و تشکیل پیوند استری بین آنتی‌ژن آلژینات و نانوذره PLGA است.

هستند. همچنین طیف مربوط به کونژوگه در نمودار c، پیک موجود در عدد موجی  $1759/73 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA و پیک موجود در عدد موجی  $1398/14 \text{ cm}^{-1}$  به ETA مربوط است و پیک اعداد موجی  $1092/40 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1173/47 \text{ cm}^{-1}$  و  $1261/51 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده حضور پیوندهای استری هستند. همچنین در Alg، اعداد موجی  $3372/73 \text{ cm}^{-1}$  و  $3382/53 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به گروه‌های OH قندی و گروه‌های OH نانوذره PLGA مربوط هستند. پیک موجود در عدد موجی  $2951/52 \text{ cm}^{-1}$  به CH قندی و پیک موجود در عدد موجی  $2866/62 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA مربوط است. عدد موجی  $3425/92 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های OH قندی،  $3300/72 \text{ cm}^{-1}$  به CH قندی و پیک موجود در عدد موجی  $2951/52 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA مربوط است (D-LPS). عدد موجی  $3425/92 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های OH قندی و  $3315/12 \text{ cm}^{-1}$  به CH قندی و پیک موجود در عدد موجی  $2958/27 \text{ cm}^{-1}$  به PLGA مربوط است (ETA) که با توجه به توضیحات، کونژوگاسیون موفق Alg، D-LPS، ETA و PLGA تأیید می‌شود.

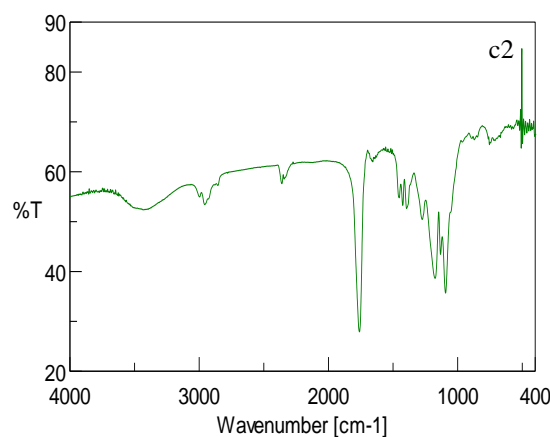
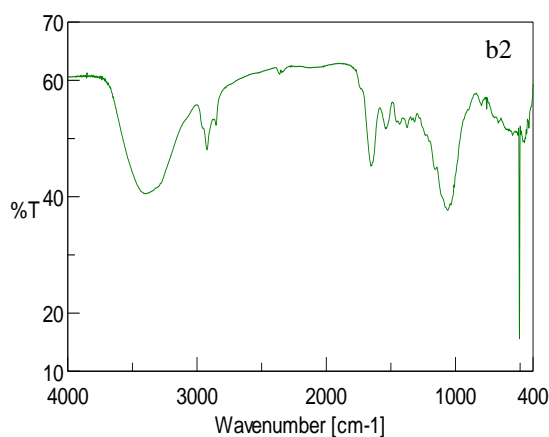
**بررسی جذب سطحی هر سه آنتی‌ژن با میکروسکوپ نیروی اتمی (مدل Nanowidard) ساخت شرکت آلمان (AFM):** تصاویر به دست آمده a، b، c، d، e، f، g و h توسط نرم‌افزار jpk به ترتیب توپوگرافی سه بعدی کونژوگه و نانوذره را پیش و پس از کونژوگاسیون به ترتیب با سه آنتی‌ژن آلژینات، لیپولی ساکارید و آگزوتوکسین A نشان می‌دهند (شکل ۱۰). تصاویر a و c، تصویر سه بعدی نانوذره و کونژوگه هستند؛ در تصویر a، ارتفاع سایت‌های اتصال PLGA بین ۱۲ تا ۲۴ نانومتر در برش ۵ میکرومتری تهیه شده مشخص شده است؛ این ارتفاع‌ها پس از انجام کونژوگاسیون به ۱۶۰ تا

هیچ نشانه ظاهری در اندام‌ها و مرگ‌ومیر در گروه‌های موشی تزریق شده پس از ۷ روز مشاهده نشد. همچنین، با اندازه‌گیری دمای بدن یک خرگوش و سه خرگوش، دما به ترتیب کمتر از  $0/6$  و  $1/4$  درجه سیلیسیوس اندازه‌گیری شد. نتایج، غیرسمی و غیرتبخا بودن واکسن یادشده را نشان می‌دهند.

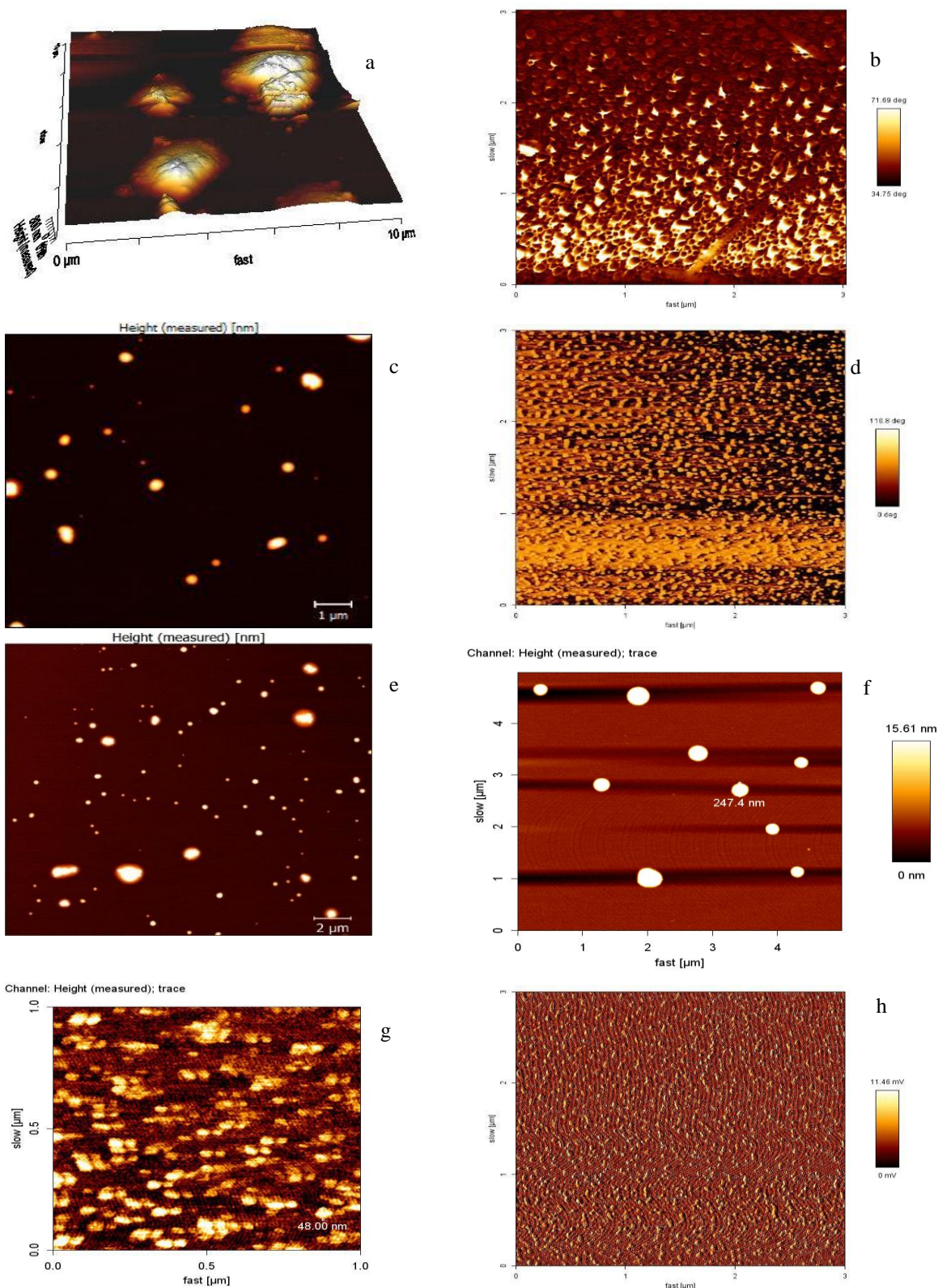
به طور کلی تغییر اندازه سایت‌های اتصالی نانوذره از ارتفاع ۱۲ نانومتر پیش از کونژوگاسیون به ارتفاع‌های ۱۶۰، ۲۴۷/۴ و ۴۸ نانومتر و تغییر شکل سایت‌های اتصالی پیش و پس از انجام کونژوگاسیون، جذب سطحی آنتی‌ژن را در سایت‌های اتصالی نانوذره و موفقیت انجام هر سه کونژوگاسیون را تأیید می‌کند.



شکل ۸- نمودارهای تأیید کونژوگاسیون با طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR). نمودارهای a (شکل ۷)، b1 و c1 به ترتیب نمودارهای FT-IR نانوذره PLGA، آنتی‌ژن D-LPS و کونژوگه D-LPS-PLGA هستند و حضور پیوند استری در نمودار c نشان‌دهنده موفق بودن کونژوگاسیون و تشکیل پیوند استری بین آنتی‌ژن D-LPS و نانوذره PLGA است.



شکل ۹- نمودارهای تأیید کونژوگاسیون با طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR). نمودار a (شکل ۷)، b2 و c2 به ترتیب نمودارهای FT-IR نانوذره PLGA، آنتی‌ژن ETA و کونژوگه PLGA-ETA هستند و حضور پیوند استری در نمودار c نشان‌دهنده موفق بودن کونژوگاسیون و تشکیل پیوند استری بین آنتی‌ژن ETA و نانوذره PLGA است.



شکل ۱۰- توپوگرافی سطحی نانوذره PLGA با آنتی ژن‌های آلژینات (Alg)، لیپولی ساکارید دتوکسیفای شده (D-LPS) و آگروتوکسین A (ETA) با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM). تصاویر a و b. مربوط به نانوذره قبل از کونژوگاسیون و c و d. مربوط به Alg-PLGA، e و f. مربوط به D-LPS-PLGA، g و h. مربوط به ETA-PLGA پس از کونژوگاسیون

## بحث و نتیجه‌گیری.

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژنی فرصت‌طلب و عامل اصلی مرگ‌ومیر در عفونت‌های ریوی و بیماران مبتلا به CF است. آلزینات، لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده و آگزوتوکسین A مهم‌ترین شاخص‌های بیماری‌زایی این گونه هستند که ایمنی ایجاد شده علیه آنها در حذف کلنی‌های باکتری از ریه بیماران مبتلا مؤثر است. سویه‌های موکونیدی واجد آلزینات، اصلی‌ترین عامل مرگ‌ومیر در عفونت‌های ریوی و بیماران مبتلا به CF هستند و بنابراین آلزینات، نخستین آنتی‌ژن انتخابی در مطالعه حاضر است. به علت سمیت لیپید A در LPS برای ایجاد شوک و تشدید بیماری‌زایی در بیماران مبتلا به سوختگی و CF و همچنین وجود زنجیره‌های جانبی آنتی‌ژن O در ساختار LPS، بهترین نامزد برای نانواکسن محسوب می‌شود. از سوئی سودوموناس آئروژینوزا به کانال پروتئینی یون کلر به نام CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) متصل می‌شود؛ ژن کدکننده این پروتئین در بسیاری از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس دچار جهش می‌شود. هسته مرکزی پلی ساکارید LPS باکتری به CFTR متصل می‌شود. باکتری یادشده با این آنتی‌ژن به سلول‌های ریه متصل می‌شود و سپس به آنها حمله می‌کند و از این رو، خالص‌سازی و جداسازی آن در ساخت واکسن کونژوگه به‌عنوان دومین آنتی‌ژن بررسی شد (۱۲). با توجه به اینکه آگزوتوکسین A، عامل کشنده‌ای در ایجاد باکتری‌می در قربانیان سوختگی محسوب می‌شود و به دنبال تولید عفونت در بیماران دارای نقص ایمنی، با تأثیر روی گلبول‌های سفید و تغییر عملکرد و تعداد آنها حائز اهمیت و یکی از عوامل مرگ‌ومیر است

(۲۰)، سومین آنتی‌ژن استفاده‌شده در ساخت واکسن است.

هدف مطالعه حاضر، کونژوگاسیون آنتی‌ژن‌های آلزینات، لیپوپلی ساکارید دتوکسیفای شده و آگزوتوکسین A در سودوموناس آئروژینوزا با نانوذره زیست‌تخریب‌پذیر پلی لاکتید گلیکولاید با قابلیت جذب سطحی زیاد نامزدی برای نانواکسن است.

در مطالعه دیگری که Suz و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام دادند، از توکسین حساس به حرارت باکتری *E. coli* و آگزوپروتئین A سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان حامل پروتئینی برای افزایش تیتراژ آنتی‌بادی علیه آلزینات و ایجاد ایمنی سلولی بهتر استفاده شد. ارزیابی ایمنی‌زایی با استفاده از تریق به موش و سنجش تیتراژ آنتی‌بادی IgG با استفاده از رادیوایمونواسی (RIA) انجام شد (۲۸). در مطالعه حاضر، برای سرعت‌بخشیدن به انجام واکنش از دو لینکر N-۳، دی‌متیل آمینو پروپیل ان-تیل هیدروکید و N-هیدروکسی سوکسینیمید کاربردیمید استفاده شد. همچنین به‌جای استفاده از آنتی‌ژن پروتئینی دو باکتری مختلف، از دو آنتی‌ژن پلی ساکاریدی در کنار یک آنتی‌ژن پروتئینی استفاده شد. آزمون انجام‌شده در مطالعه Suz، بررسی تیتراژ آنتی‌بادی IgG بود و در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی تیتراژ آنتی‌بادی، بررسی سیتوکین‌های در ارتباط با ایمنی هومورال نیز انجام خواهد شد که جزو مطالعه‌های بعدی است.

Cryz و همکاران در سال ۱۹۹۱ روی بهبود ایمنی‌زایی آلزینات با استفاده از کونژوگاسیون آلزینات با پروتئین تنانی به‌عنوان حامل مطالعه کردند. نتایج آنها نشان دادند که آنتی‌بادی IgG بیشتری علیه آلزینات کونژوگه با حامل پروتئینی تولید می‌شود

تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی و همچنین افزایش جذب و نفوذ دارو از خود نشان داد. بنابراین، یکی از مهم‌ترین مسائل در واکسیناسیون، نیاز به ادجوانت جدید و سیستم‌های تحویل واکسن است که امن‌تر، مفیدتر و مقرون‌به‌صرفه‌تر از واکسن‌های قدیمی باشند و بتوانند هر دو بازوی سیستم ایمنی هومورال و سلولی را به نحو مطلوبی تحریک کنند که در این میان، تحویل نانو سیستمی با نانوذره‌های زیست تخریب پذیر PLGA مناسب به نظر می‌رسد (۳۰).

از سال ۱۹۹۹، اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) استفاده از PLGA را در داروهای مختلف و به‌ویژه داروهای ضد سرطانی تأیید کرده است (۳۳). در مطالعه حاضر سعی شد آنتی‌ژن‌های کونژوگه‌ای از آلژینات، لیوپلی ساکارید دو تکسیفای شده و آگزوتوکسین A سودوموناس آتروژینوزا طراحی شوند که میزان آنتی‌بادی اختصاصی تولیدشده در میزبان را افزایش دهند و برای این منظور، از نانوذره PLGA با قابلیت جذب سطحی زیاد استفاده شد. کونژوگه تهیه شده، سیستم ایمنی را با تولید سلول‌های خاطره‌ای به میزان زیادی تحریک می‌کند و به ایمنی‌زایی زیاد منجر می‌شود. در مطالعه حاضر، نبود مرگ و میر در موش و نبود تب‌زایی در خرگوش بر سمی نبودن واکسن یادشده دلالت داشت. در نتیجه تحویل نانو سیستمی به‌ویژه با استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر مانند پلی لاکتید کو گلیکولاید به علت وجود مزایایی نظیر داشتن مجوز از آمریکا، روش تهیه و خالص سازی آسان، سمی نبودن، تخریب نکردن بافت اندام‌های حیاتی، تحریک چشمگیر سیستم ایمنی و القای حفاظت و ایمنی بهتر و پایدارتر نسبت به سایر حامل‌های رایج الویت دارد و با پژوهش‌های بیشتر،

(۲۹). در مطالعه حاضر، برای کونژوگاسیون از لینکرهای N=۳، دی‌متیل آمینو پروپیل ان-اتیل هیدروکسید و N-هیدروکسی سوکسینیمید کاربردیمید استفاده شد که در مقایسه با سایر مطالعه‌ها، کونژوگاسیون زیاد با موفقیت و بازده زیاد را نشان می‌دهد. همچنین به جای استفاده از آنتی‌ژن‌های دو باکتری متفاوت، از سه آنتی‌ژن مهم سودوموناس استفاده شد.

بر اساس مطالعه‌های پیشین، واکسن‌های کونژوگه به‌ویژه نانو واکسن‌ها که کلاس جدیدی از واکسن‌ها هستند، کارآمدتر و مقرون‌به‌صرفه‌تر از واکسن‌های معمولی هستند و قادرند به شدت سیستم ایمنی هومورال را القا کنند. بنابراین، پلی ساکاریدهایی مانند آلژینات و LPS به تنهایی قادر به تحریک ایمنی هومورال و القای تولید آنتی‌بادی‌ها توسط لئوسیت‌های B هستند، هر چند قادر به فعال کردن لئوسیت‌های T (T-helper) نیستند. دوام پاسخ ایمنی کوتاه خواهد بود و ایجاد سلول‌های خاطره‌ای و تکامل میل ترکیبی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن توسط این نوع از آنتی‌ژن‌ها رخ نمی‌دهد. از این رو، آگزوتوکسین A در کنار دو آنتی‌ژن پلی ساکاریدی به منظور فعال شدن لئوسیت‌های T برای تولید سلول‌های خاطره‌ای برای تولید و تحریک ایمنی بلندمدت انتخاب شد.

نانوذره پلی لاکتید کو گلیکولاید قابلیت خارق‌العاده‌ای در کپسوله کردن پروتئین ۲۷۸ غشای خارجی کلامیدیا تراکوماتیس، آزادسازی کنترل شده و حامل هدفمند در ره‌ایش داروی دو ستاکسل (با نام تجاری تاکسوتر که به تازگی برای درمان سرطان پستان استفاده می‌شود) و رهایی آن به محل هدف و افزایش ماندگاری دارو در برابر تجزیه توسط آنزیم‌ها و

گزینشی آنتی‌ژن به سلول‌های دندریتیک (DCs) می‌توان رهاسازی آنتی‌ژن و پاسخ ایمنی مد نظر را بهبود بخشید (۳۲). همچنین این نانوذره‌ها به‌طور گسترده به‌عنوان حامل در رهایی واکسن و برای تحویل کنترل‌شده عوامل مختلف از جمله پروتئین‌ها، DNA، پلاسمید و ترکیبات با وزن مولکولی کم استفاده می‌شوند. از دیگر مزیت‌های روش نانوسیستمی، کاهش عوارض جانبی و امکان هم‌کاری کپسوله‌سازی اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌های مختلف و یا هر دو آنتی‌ژن و ادجوانت در یک حامل است. از سوی دیگر، راهبردهای اخیر برای توسعه پیشگیرانه و درمانی واکسن در توانایی ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های دندریتیک، بر شیوه‌ای هدفمند و طولانی‌مدت با استفاده از نانوذره‌ها متمرکز است، زیرا نانوذره‌ها موجب افزایش طول عمر آنتی‌ژن دست‌نخورده و افزایش دستیابی به آن و فرصت به DC برای جذب و پردازش آنتی‌ژن می‌شوند. سلول‌های دندریتیک، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند و نقش مهمی در شروع پاسخ ایمنی سلولی دارند. این سلول‌ها در ایجاد ایمنی سلولی از طریق سیستم‌های MHC کلاس یک و دو نقش دارند و پس از آن، ارائه پپتیدهای آنتی‌ژنی به سلول‌های CD4<sup>+</sup> و CD8<sup>+</sup> را برعهده دارند. بنابراین هدف گرفتن سلول‌های دندریتیک با سیستم ارائه آنتی‌ژن، پتانسیل فوق‌العاده‌ای در تولید واکسن‌های جدید فراهم می‌کند. جذب آنتی‌ژن به وسیله نانوذره‌های پلیمریک توسط سلول‌های دندریتیک مزیت بیشتری دارد و از همه مهم‌تر، ذره‌های آنتی‌ژنی نسبت به آنتی‌ژن‌های محلول در القای پاسخ‌های ایمنی مؤثرتر هستند و با استفاده از تغییر اندازه ذره‌ها، ساختار شیمیایی، آبگریزی سطح و ادجوانت استفاده‌شده، تحویل واکسن به وسیله نانوذره‌ها هدفمند می‌شود.

جایگزین حامل‌های رایج می‌شود. در پژوهش حاضر بر اساس فرکشن‌های حاصل از دو کونژوگه آلزینات و لپوپلی ساکارید در طول موج ۲۶۰ نانومتر و آگزوتوکسین A در ۲۸۰ نانومتر، میزان خلوص سه کونژوگه یادشده تأیید شد. همچنین برای تکمیل بررسی میزان خلوص کونژوگاسیون در آگزوتوکسین A به‌عنوان مهم‌ترین آنتی‌ژن انتخابی در مطالعه حاضر، از ژل فیلتراسیون HRs200 استفاده شد. با توجه به آزمون‌های زتا سائزر، FT-IR و تصویر سه بعدی توسط میکروسکوپ اتمی، به ترتیب اندازه و شارژ هر سه کونژوگه، وجود گروه‌های عاملی دخیل در تشکیل پیوند استری در سه کونژوگه و جذب سطحی هر سه آنتی‌ژن روی نانوذره پلی‌لاکتیک گلیکولیک‌اسید تأیید شد. از طرفی نانوذره پلی‌لاکتید گلیکولاید با ویژگی سمی نبودن و زیست‌تخریب‌پذیری، قابلیت مناسبی برای استفاده به‌عنوان حامل و عرضه‌کننده آنتی‌ژن در واکسن‌های کونژوگه دارد. بنابراین در صورت موفقیت کونژوگه‌های نانوذره‌شده در آزمایش‌های سنجش ایمنی‌زایی الگوی حیوانی که جزو مراحل بعدی مطالعه حاضر هستند، می‌توان گفت که ترکیبات آنتی‌ژنی تهیه‌شده نامزد مناسبی برای پیشگیری و مقابله در برابر عفونت‌های ناشی از سودوموناس در الگوی حیوانی هستند.

در جمع‌بندی کلی، سیستم تحویل با اندازه نانو قادر به افزایش جذب آنتی‌ژن‌ها یا محرک‌ها توسط سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن یا APCs (Antigen presenting cells) است و واکنش‌های ایمنی بهتری نسبت به مشابهان محلول خود دارد. به‌طور کلی با استفاده از نانوذره پلیمری با آنتی‌ژن محبوس یا جذب‌شده در آنها از طریق هدف قرار دادن ارائه

## References

- (1) Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et Maladies Infectieuses* 2006; 36(2):78-91.
- (2) Mitov I., Strateva T., Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41(3):588-595.
- (3) Guedes Stehling E., Dias W., Silva D. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extrapulmonary infection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008; 12(1):86-95.
- (4) Mital R., Aggarwal S., Chhibber S. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Amino review of Infect and Public Health* 2009; 201(1): 101-111.
- (5) Fazeli N., Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iran Red Crescent Medical Journal* 2014; 201(2): 81-90.
- (6) Claud V., Gallant T., Tracy L., Olson J., Woods D., Story D. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP ribosyl transferase activity and cytotoxicity. *International Journal Medical Microbiol* 2000; 146(1): 1891-1899.
- (7) Bleves S., Viarre V., Salacha R., Gerard PF., Michel F., Alain Filloux A., et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa* A wealth of pathogenic weapons. *International Journal Medical Microbiology* 2010; 300(1): 534-543.
- (8) Tokajian S., Timani R., Issa N. Molecular characterization, Multiple drug resistance and virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Lebanon. *Brazilian Microbiology Rеспiratory journal* 2012; 26(2): 243-250.
- (9) Nikbin VS., Aslani MM., Sharafi Z., Hashemipour M., Shaheherughi F., Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infection origins. *Iranian Journal Microbiology* 2012; 4(3): 18-23.
- (10) Schulert GS., Feltman H., Rabin SD. Secretion of the toxin exoA is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolated obtained from patients with hospital acquired Pneumonia. *Journal Infectious Disease* 2003; 188(11): 695-706.
- (11) Matar G., Ramlawi F., Hijazi Nkhneisser. Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene and severity of symptoms in patients with otitis externa. *Current Microbiology* 2002; 45(5): 350-354.
- (12) Ernst RK., Adams KN., Moskowits SM. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase selection for expression and loss with the cystic fibrosis airway. *Microbiology Journal Bacteriology* 2006; 188(2): 191-201.
- (13) Qiu D., Eisinger VM., Rowen DW., Yu HD. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS Science Sessions* 2007; 104(19): 8107-8112.
- (14) Kashef N., Behzadian-Nejad Q., Najar-Peerayen SH., Mousavi-Hosseini K., Moazeni M., Hourri R. Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Microbiology* 2005; 55(4): 279-282.
- (15) Kashef N., Behzadian-Nejad Q., Najar-Peerayen SH., Mousavi-Hosseini K., Moazeni M., Hourri R. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate TT conjugate. *The Veterinary Journal of Microbiology* 2006; 55(3): 144-146.
- (16) Cbristopber M., Pillarand Jeffery A., Hobden. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A a keratitis in Mice. *Annals of Microbiology* 2002; 43(6): 1-8.

- (17) Larry F., Hanne T., Timothy R., Barbara HI. Locus of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A gene. *Journal of Bacteriology* 1983; 154(33): 383-386.
- (18) Chao-Weiliao L., Chi-An CH., Chien-Nan L., Yi-Ningsu M., Ming-Cheng CH., Ming-Houg S., et al. Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generate potent immunologic responses and antitumor effects. *The Veterinary Journal of Microbiology* 2015; 65(19): 9089-9090.
- (19) Yousefi Mashouf R., Esmaeili R., Yousef Alikhani M., Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran University Medical Journal* 2014; 72(3): 167-173.
- (20) Valad Beigi H., Sadeghifard N., Rafiei Tabatabaei R., Maleki A. A Study on the frequency of toxin A, alginate genes and of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2012; 20(1): 58-64.
- (21) Lambert PA. Mechanisms of antibiotics resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Intelligent Ventilation Since* 2002; 5(41): 22-26.
- (22) Satti L., Abbasi SH., Ahmad Kumar T., Khan MSH., Hashemi AZ. *In Vitro* efficacy of cefepime against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* an alarming situation in our setup. *The Open Drug Resistance Journal* 2011; 1(1): 12-16.
- (23) Najafzadeh F., Jaberi GH., Shapoury R., Rahnema M., Karimi-nik A., Kianmehr A. Immunogenicity comparison of conjugate vaccine composed of alginate and LPS of *Pseudomonas aeruginosa* bound to diptheria toxoid. *Iranian Journal of Microbiology* 2013; 6(5): 317-323.
- (24) Song KP., Chan TK., Ji ZL., Wong SW. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* from ocular isolated by PCR using exotoxin A specific prime. *Molecular Cell Probe* 2000; 14(4): 199-204.
- (25) Abigail A., Dixie D. *Bacterial pathogenesis*. 2nd ed. New york: Scientific American; 2000.
- (26) Deretic V., Konyecsni WM. Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginos*: transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene *algQ*. *Journal of Bacteriology* 1989; 171(8): 3680-3688.
- (27) Gerald B., Fadie TC., Simone Mueschenborn S., Nicolas L., Martha Grout M., Gerald BP. Construction & characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *American Society for Microbiology* 2000; 85(6): 3875-3884.
- (28) Szu SC., Taylor D., Andrew CT., John D., Clements D., Joseph Shiloach J., et al. Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Infection and immunity* 1994; 62(10): 4440-4444.
- (29) Cryz SJ., Lang A., Rudeberg A., Wedgewood J., Que JU., Furer E., et al. Immunization of cystic fibrosis patients with a *P. aeruginosa* O-polysaccharid-toxin A conjugate vaccine. *Erupe PMC* 1997; 98(1): 345-349.
- (30) Taha A., Murtada R., Shree A. Biodegradable PLGA 85/15 nanoparticle as a delivery vehicle for *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP-187 peptide. *Nanotechnology* 2012; 32(8): 1-7.
- (31) Grillo M., Manerola L., Miguel MJ., Pilar M., Blasco JM., Moriyon L., et al. Increases of efficacy as vaccine against *Broucella abertus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth *bvrS/bvrR* and rough *wbKA* mutants Vaccine. *Science Direct* 2006; 24(15): 2910-2916.

- (32) Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugates vaccines. *British Medical Bulletin* 2004; 70(1): 1-14.
- (33) Fischer S., Christian Foerg CH., Sabine Ellenberger S., Hans P., Merkle P., Bruno Gander B. One step preparation of polyelectrolyte coated PLGA microparticles and their functionalization with model mice. *Journal of controlled release* 1999; 111(1-2): 131-144.
- (34) Douglas C., Watson J., Robbins B. Protection of mice against *Salmonella typhimurium* with a no-specific polysaccharide protein conjugate vaccine. *American Society for Microbiology* 1992; 34(3): 231-236.
- (35) Mei MH., Fatme M., Barbara B. Physico-chemical and immunological examination of the thermal stability of *Tetanus* toxoid conjugate vaccine. *Vaccine Journal* 2002; 64(3): 3509-3522.
- (36) Paoletti LC., Kasper DL., Michon F. Effects of chain length on the immunogenicity in rabbits of group B *Streptococcus* type III oligosaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Journal Clinical Investigate* 1992; 89(1): 203-209.
- (37) Janet C., WayneBarbee K., Bielitzki T., Clayton LA., Donovan JC., Coenraad FM. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8rd ed. Washington DC: The National Academies; 2011.