

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات حفاظتی نانوذرات PLGA حاوی لیپوپلی ساکارید سمیت‌زدایی شده باکتری
اسیتوباکتر بومانی (Acinetobacter baumannii) در عفونت ریوی موشافشین قلی زاده^۱، رضا شاپوری^{۲*}، پرویز پاکزاد^۱، حسین دانافر^۳، مهدی مهدوی^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

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

۴- گروه ایمونتراپی، انستیتو علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: rezashapoury@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۴

چکیده

اسیتوباکتر بومانی، باکتری هوازی فرصت‌طلبی است که به عنوان یکی از شایعترین پاتوژن‌های میکروبی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایجاد عفونت تنفسی در بیماران بستری در بخش ICU شناخته می‌شود. ساخت واکسن می‌تواند یکی از راهکارهای موثر در مقابله با این عفونت باشد. این مطالعه، به منظور ارزیابی اثرات حفاظتی نانو ذرات PLGA حاوی لیپوپلی ساکارید (LPS) سمیت‌زدایی شده باکتری اسیتوباکتر بومانی به عنوان واکسن در عفونت ریوی موش انجام شد. برای تکثیر انبوه باکتری از محیط کشت مولر هیتون برآستفاده شد. LPS باکتری به روش آب-فنل داغ استخراج و به کمک NaOH ۰/۲ مولار سمیت‌زدایی شد. انکپسوله کردن LPS سمیت‌زدایی شده در ذرات PLGA به روش تبخیر حلال - امولسیون دوتایی آب - در روغن - در آب انجام شد. ذرات تهیه شده بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر قطر داشتند و دارای بار سطحی منفی بودند. ۴۰ سر موش Balb/C به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی (کنترل)، گروه دریافت‌کننده PLGA، گروه دریافت‌کننده D-LPS و گروه دریافت‌کننده PLGA-D-LPS) تقسیم و تمامی گروه‌ها سه بار به فاصله ۱۴ روز با واکسن تیمار شدند. در روز ۳۵ باکتری‌های زنده از طریق ریه به گروه‌ها عرضه شد و پس از ۴۸ ساعت ریه موش‌ها جهت مطالعات باکتری‌شناسی و هیستوپاتولوژی خارج گردید. کشت عصاره همگن شده بافت ریه، تفاوت معنی‌داری را بین گروه ۴ با سایر گروه‌ها نشان داد ($p < 0/05$). مطالعه بافت‌شناسی نیز اثر حفاظتی نانوذرات PLGA حاوی LPS سم‌زدایی شده را کاملاً نشان داد. این مطالعه نشان داد که ذرات PLGA حاوی LPS سمیت‌زدایی شده اسیتوباکتر بومانی در تحریک سیستم ایمنی موش موفق بوده و می‌تواند به عنوان واکسن استفاده شود.

کلمات کلیدی: اسیتوباکتر بومانی، PLGA، LPS، نانوذرات، عفونت ریوی.

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اخیراً مقاومت میکروبی را به عنوان یکی از سه مورد شناخته شده مشکلات مهم پیش روی سلامت انسان عنوان کرده است (۵). شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای مقاوم به چند

امروزه پدیده پاتوژن‌های میکروبی با مقاومت چند دارویی (MDR) به طور فزاینده‌ای دلیلی برای نگرانی جدی در عفونت‌های بیمارستانی و هم‌در عفونت‌های بدست آمده از جامعه شده است (۲۸). در واقع،

دارو MDR بصورت مخفف ESKAPE، گفته می‌شود که به انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسیتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های مختلف انتروباکتر اشاره دارد (۳۰). اسیتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*) یک باسیل گرم منفی هوازی، پلومورفیک و غیر متحرک بوده و بعنوان پاتوژن فرصت طلب، در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، به ویژه در افرادی که مدت طولانی در بیمارستان اقامت داشته اند می‌باشد (۲۱) که معمولاً با محیط‌های مرطوب بدن در ارتباط است (۳۴). بر اساس مطالعات مختلفی که صورت گرفته اسیتوباکتر بومانی در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) بیمارستان‌های مختلف در خارج و داخل کشور جدا شده است (۴، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۶). در پژوهش‌های متعدد انجام شده مشخص شده بیمارانی که ابزارهای مصنوعی مانند کاتتر، بخیه، دستگاه کمک کننده تنفس استفاده کرده و یا تحت دیالیز بوده و یا در ۹۰ روز گذشته تحت درمان آنتی بیوتیکی قرار گرفته بودند در معرض ابتلا به عفونت‌های اسیتوباکتر بومانی قرار داشته‌اند. مجاری تنفسی، خون، مایع جنب، مجاری ادراری، زخم‌های ناشی از جراحی، دستگاه عصبی مرکزی، پوست و چشم ممکن است مکان‌هایی برای عفونت باشند (۶، ۱۲). ذات‌الریه ناشی از این باکتری ممکن است تهدیدی برای بیمارانی باشد که به تهویه مکانیکی احتیاج دارند. از آنجایی که اسیتوباکتر بومانی توانایی تشکیل بیوفیلم در سطح لوله دستگاه تهویه را دارد، ممکن است در قسمت‌های پایین دستگاه تنفسی سطح نسبتاً بالایی را به خود اختصاص دهد (۷، ۱۸، ۳۶). واکسیناسیون از دو قرن قبل به عنوان موثرترین استراتژی برای مقابله و کنترل اکثر بیماری‌های عفونی به شمار می‌رود. استفاده از واکسن‌ها به عنوان عامل درمانی موثر و کارآمد در

درمان بیماری‌های عفونی ثابت شده است. برای تولید آنتی‌بادی علیه پپتیدهای کوچک و آنتی‌ژن‌های غیر پروتئینی نظیر (قندها، مولکول‌های هاپتینی مانند اکثر داروها)، لازم است این مولکول‌ها به یک حامل بزرگ ایمونوژن کونژوگه شوند. برای تولید آنتی‌بادی علیه این دسته آنتی‌ژن‌ها به ویژه آنتی‌ژن‌های پروتئینی و محلول خصوصاً در مواردی که مقدار کم و جزئی آنتی‌ژن در دسترس بوده و از طرف دیگر نیاز به مقدار زیادی آنتی‌بادی علیه آنها لازم است، معمولاً از ادجوانت‌های قوی و مناسب استفاده شود. استفاده از نانو ذرات به عنوان راهی نو برای ساخت حامل برای واکسن‌های کلوئیدی در جهت مصون‌سازی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۷). در تکنولوژی‌های جدید از واکسن‌هایی استفاده می‌شود که در آن ذرات نانو به صورت حامل یا ادجوانت به کار رفته‌اند که کارایی بسیار بیشتری نسبت به واکسن‌های معمولی موجود در بازار را ارائه می‌دهند. نانوذرات و میکروذرات تقریباً به اندازه ویروس‌ها و باکتری‌ها هستند که سیستم ایمنی آن‌ها را شناسایی می‌کند. همچنین اندازه نانو ذرات مشابه ترکیبات سلولی بوده که با مکانیسم‌های متفاوتی وارد سلول می‌شوند (۳۳). میکرو و نانوذرات PLGA آینده امید بخشی را در زمینه سیستم تحویل واکسن ارائه می‌دهند. PLGA پلیمر استری از دو آلفا هیدروکسی اسید (لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید) است که از ویژگی‌های بسیار خوبی برخوردار بوده و به دلیل داشتن مشخصات ایمنی عالی انسانی (۱۵) توسط FAD (سازمان غذا و داروی آمریکا) برای استفاده در واکسن و همچنین تحویل دارو در مهندسی بافت مورد تایید قرار گرفته است (۱). ذرات PLGA تخریب پذیر بوده و می‌توانند در محیط‌های آبی به مونومرهای تشکیل دهنده خود متابولیزه شوند (۱۹). لایه لیپوپلی ساکارید (LPS) بخشی از ساختار باکترهای گرم منفی است که به

کشت باکتری: برای بدست آورد کشت انبوه، مقدار ۳ لیتر محیط مولر هیتتون براث در ۶ ارلن یک لیتری تهیه و باکتری به آنها تلقیح شد. ارلن‌ها در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷ روز در ۱۲۵ دور در دقیقه انکوبه شدند. برای جمع آوری باکتری‌ها از محیط کشت، ابتدا مقدار یک میلی لیتر ساولون غلیظ به هر ارلن اضافه و کاملاً مخلوط شد و در محیط آزمایشگاه به مدت ۶۰ دقیقه برای کشته شدن باکتری‌ها قرار داده شدند. توده باکتری‌های کشته شده با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hettich- ROTIXA 50RS) در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۴۵ دقیقه جمع‌آوری و برای ادامه کار در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال انکوبه شدند.

استخراج LPS از باکتری‌ها: برای استخراج لایه لیپوپلی ساکارید باکتری از روش آب - فنل داغ استفاده شد (۳۵). بطور خلاصه با استفاده از آب مقطر استریل سوسپانسیون آبی از رسوب باکتری‌ها تهیه شد و در دمای ۶۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه درون بن ماری قرار گرفت. سپس یک سوم حجم محلول، فنل ۹۰ درصد به آن اضافه و دوباره بمدت ۴۵ دقیقه درون بن ماری در دمای ۶۶ درجه سلسیوس قرار گرفت. سوسپانسیون به سرعت سرد شد و برای جدا سازی فاز آبی و فاز فنلی در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب اوت شد. فاز آبی از فاز فنلی جدا و به فاز آبی، الکل سرد ۹۶ درصد افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه قرار گرفت. سپس در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب اوت شد. به محلول روپی به اندازه سه برابر حجم الکل ۹۶ درصد سرد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محلول دوباره به مدت ۹۰

عنوان آندوتوکسین عمل می‌کند و از سه قسمت تشکیل شده است: ناحیه لیپید A یا آندوتوکسین که دارای ساختار دی ساکارید فسفات متصل به اسید چرب است. این قسمت در باکتری‌های گرم منفی تقریباً مشابه بوده و یا تفاوت‌های جزئی دارد؛ پلی ساکارید مرکزی که الیگوساکاریدی فسفریله شده بوده و در محافظت از باکتری‌ها در برابر ترکیبات سمی نقش دارد، در طیف وسیعی از باکتری‌ها مشابه بوده و در مواردی دارای تفاوت‌های جزئی می باشد؛ زنجیره جانبی یا آنتی ژن O که در گونه‌ها و سویه‌های مختلف باکتری‌ها متفاوت است، بخش آنتی ژنی لیپوپلی ساکارید محسوب می‌شود و از واحد های قند تکراری تشکیل شده است که سطح هسته مرکزی را می پوشاند (۸). پژوهش حاضر با هدف مقایسه میزان ایمنی زایی LPS سمیت زدایی شده باکتری اسپیتوباکتر بومانی به تنهایی با زمانی که درون نانوذرات PLGA محصور شده باشد؛ انجام شد.

مواد و روش ها

باکتری استفاده شده در این پژوهش اسپیتوباکتر بومانی سویه ATCC BAA-747 (PTCC 18555) بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. حیوانات استفاده شده موش‌های ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای نژاد Balb/C ماده بودند که در محدوده ۱۷ تا ۲۰ گرم وزن داشتند و از واحد حیوانات آزمایشگاهی بیمارستان بقیه اله تهران تهیه و قبل از شروع آزمایشات به مدت دو هفته در بخش حیوانی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد زنجان در شرایط استاندارد نگهداری شدند تا استرس ناشی از حمل و نقل در آنها کاهش یابد. PLGA (Poly lactic-co-glycolic acid) با نسبت ترکیبی ۷۵:۲۵ از شرکت سیگما -آلدریچ تهیه شد.

یک شب در روی همزن مغناطیسی با ۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. جمع آوری نانو ذرات به کمک سانتریفیوژ (MPW 350R) در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. نانو ذرات سه بار با بافر فسفات شستشو داده شدند و بصورت لیوفیلیزه در آمده و در ۲۰- سانتیگراد ذخیره گردیدند.

اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات: برای اندازه‌گیری سایز و پتانسیل زتای ذرات، ۱ میلی گرم از نانو ذرات PLGA-D-LPS در ۱ میلی لیتر از آب مقطر دیونیزه حل و به مدت ۱۵ دقیقه درون آب یخ سونیکیت شد. اندازه ذرات و شاخص پراکندگی نور با دستگاه زتا سائزر مشخص گردید. (Malvern Nano ZS)

ظرفیت بارگذاری و کارایی کپسوله سازی D-LPS:

از روش مستقیم استفاده شد (۲). ۱۰ میلی گرم از نانوکپسول های PLGA حاوی D-LPS در ۱ میلی لیتر از دی کلرومتان حل شد و برای تبخیر حلال بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. ماده خشک در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد و به کمک سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه PLGA رسوب کرد. سوپرناتانت که حاوی D-LPS بود به کمک اسپکتوفتومتری فرا بنفش در طول موج ۴۵۰ نانومتر آنالیز شد. از روی منحنی استاندارد بدست آمده، مقدار آن اندازه گیری و به کمک معادله‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{مقدار } LPS \text{ اندازه گیری شده} \\ \text{مقدار } LPS \text{ اولیه} \times 100 = \text{کارایی کپسوله سازی}$$

$$\text{مقدار } LPS \text{ اندازه گیری شده} \\ \text{مقدار نانو ذرات} \times 100 = \text{ظرفیت بارگذاری}$$

دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب LPS بدست آمد.

سم زدایی LPS: برای سم زدایی از LPS باید بخش A آن جدا شود که این کار به کمک NaOH ۰/۲ مولار انجام شد. برای این منظور سوسپانسیون در بن ماری در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس pH آن به کمک HCl ۱ مولار در ۷ تنظیم گردید. سوسپانسیون در کیسه دیالیز ۱۰ کیلودالتونی ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت درون یخچال با دمای ۴ درجه داخل آب مقطر دیونیزه جهت خالص سازی قرار گرفت. آب مقطر از هر ۸ ساعت تعویض می شد. با افزودن الکل سرد و سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه LPS سم‌زدایی شده (D-LPS) جمع‌آوری گردید.

تست LAL: از تست LAL (limulus amebocyte lysate) برای پی بردن به تب‌زا نبودن D-LPS استخراج شده استفاده شد که نتیجه تست منفی بود.

ساخت نانوذرات PLGA حاوی D-LPS: روش

های مختلفی برای انکپسوله کردن مواد در نانوذرات PLGA وجود دارد. در پژوهش حاضر از روش تبخیر حلال - امولسیون دوتایی آب - در روغن - در آب (W1/O/W2) استفاده شد (۱۳). بطور خلاصه ۵۰ میلی گرم از PLGA در ۱۲/۵ میلی لیتر از دی کلرومتان حل شد. سپس برای بدست آمدن امولسیون اولیه مقدار ۰/۱ میلی گرم از LPS سمیت زدایی شده به محلول اضافه و بمدت ۶۰ ثانیه سونیکیت (Hielscher Ultrasonic, Germany) شد. این محلول به ۴ میلی لیتر از پلی ونیل الکل مایع و سرد بعنوان تثبیت کننده اضافه و سه بار، هر بار بمدت یک دقیقه سونیکیت شد تا امولسیون ثانویه بدست آید. امولسیون ثانویه دوباره به ۱۰ میلی لیتر از پلی ونیل الکل اضافه شد و برای تبخیر حلال ارگانیک (دی کلرو متان) بمدت

سلسیوس انکوبه شدند. سپس هر کدام از پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی گردیدند.

بافت‌شناسی: ریه چپ هر یک از موش‌ها پس از قرار گرفتن در فرمالین ۱۰٪ و بلوک پارافینی و تهیه برش‌های نازک ۴ میکرومتری و گذراندن مراحل مرتبط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین توسط پاتولوژیست ماهر آنالیز گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت مقایسه نتایج گروه‌های مورد آزمون از روش‌های آمار توصیفی و آزمون آنوای یک‌طرفه نرم افزار SPSS 23 استفاده شد. سطح معنی دار بودن نتایج با فرض $(p < 0/05)$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتیجه تست LAL برای تب‌زا بودن LPS استخراج شده منفی شد که نشان داد که بخش توکسینی LPS از ساختار آن جدا شده است. نتیجه اندازه‌گیری ذرات و پتانسیل زتای ذرات PLGA قبل و بعد از انکسپوله شدن در جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. بار ذرات تغییر قابل توجهی نداشت ولی اندازه ذرات حاوی D-LPS بزرگتر بودند. میانگین کارایی کپسوله‌سازی (EE%) D-LPS در نانوذرات PLGA که به روش مستقیم بدست آمد برابر ۷۷/۲ درصد شد و ظرفیت بارگیری (LC%) معادل ۱۳/۹ درصد محاسبه شد (جدول ۲). برای پی بردن به نتایج حاصل از مواجهه موش‌ها با باکتری زنده از شمارش تعداد کلنی‌ها در محیط کشت مولر هیتتون آگار استفاده شد. میانگین تعداد کلنی‌ها در هریک از رقت‌ها در جدول ۳ و نمودار ۳ آمده است. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژی در شکل ۳ توضیح داده شده است.

واکسناسیون موش‌ها: تعداد ۴۰ سر موش Balb/C ماده پس از گذراندن مراحل اولیه در حیوان خانه مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد زنجان بطور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد، نرمال سالین، گروه دوم PLGA، گروه سوم D-LPS و گروه چهارم PLGA-D-LPS را دریافت کردند. برای تولید مقدار کافی آنتی بادی علیه آنتی ژن تزریق شده در حیوانات آزمایشگاهی باید حداقل سه بار تزریق به فاصله دو هفته‌ای صورت گیرد (۲۵). بنابراین در روزهای ۱، ۱۴ و ۲۸ تزریق به عضله ۴ سران در گروه‌ها انجام شد. در هر بار ۰/۵ میلی-لیتر تزریق صورت گرفت.

مواجهه موش‌ها با باکتری‌های زنده: ابتدا سوسپانسیون نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) از اسپیتوباکتر بومانی در شرایط رشد آزمایشگاهی تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بالا در ۰/۵ میلی-لیتر آب مقطر رقیق و سپس بعد از بیهوشی موش‌های واکسینه شده با دی اتیل اتر، از طریق بینی به آنها عرضه شد. بعد از گذشت ۲ روز موش‌ها با دی اتیل اتر کشته شدند و ریه آنها جهت مراحل بعدی خارج شد. بخش چپ ریه جهت انجام مطالعات بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. باقیمانده بافت در محیط استریل در ۱۰ میلی‌لیتر از نرمال سالین خرد و هموژن شد. برای رقت‌سازی مقدار یک میلی-لیتر از سوسپانسیون هموژن شده به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل اضافه شد و این روند تا سه لوله ادامه پیدا کرد تا رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تهیه گردد. لوله‌ها کاملاً همگن شدند. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌ها در محیط جامد مولر هیتتون آگار بصورت سطحی کشت داده شدند و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

جدول ۱- سایز و بار ذرات قبل و بعد از انکپسوله کردن

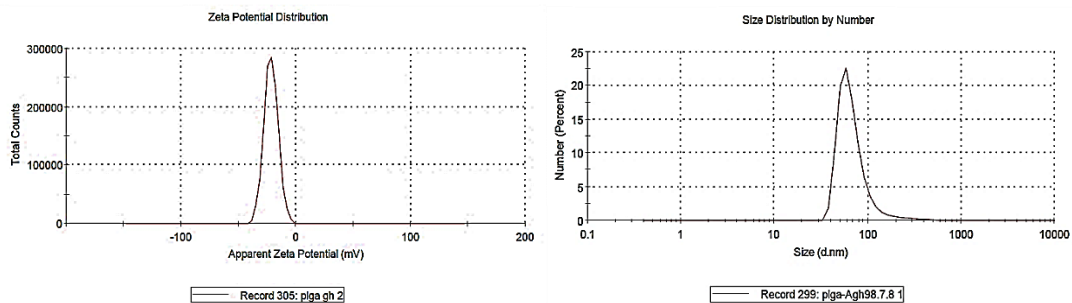
اندازه (نانومتر)	بار (میلی ولت)	نمونه
۱۵۳/۴	-۲۱/۵	PLGA
۱۹۶/۶	-۲۲/۹	PLGA-D-LPS

جدول ۲- بازده کپسوله‌سازی و ظرفیت بارگیری

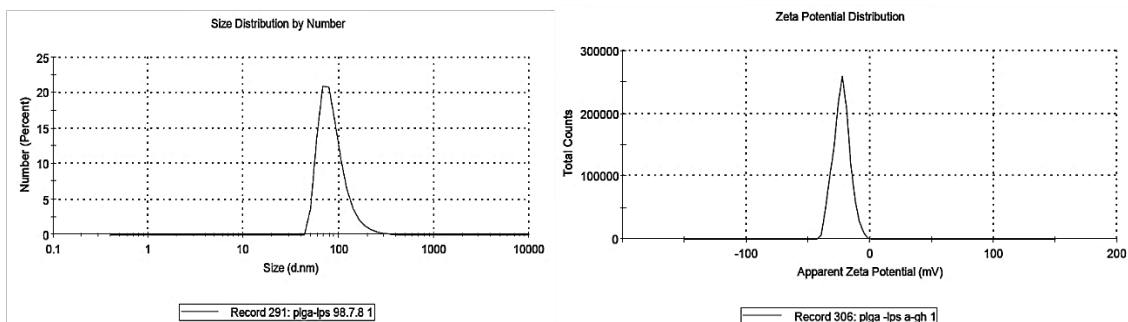
درصد ظرفیت بارگیری	درصد کارایی کپسوله‌سازی	نمونه
۱۳/۹	۷۷/۲	PLGA-D-LPS

جدول ۳- میانگین تعداد کلنی‌ها

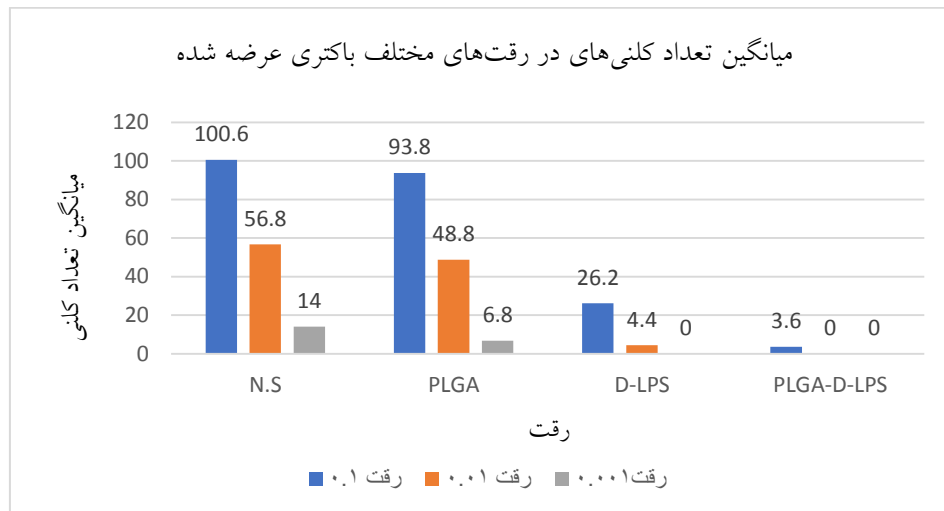
میانگین تعداد کلنی در			گروه‌ها
رقت ۰/۰۰۱	رقت ۰/۰۱	رقت ۰/۱	
۱۴	۵۶/۸	۱۰۰/۶	نرمال سالین
۶/۸	۴۸/۸	۹۳/۸	PLGA
صفر	۴/۴	۲۶/۲	D-LPS
صفر	صفر	۳/۶	PLGA-D-LPS



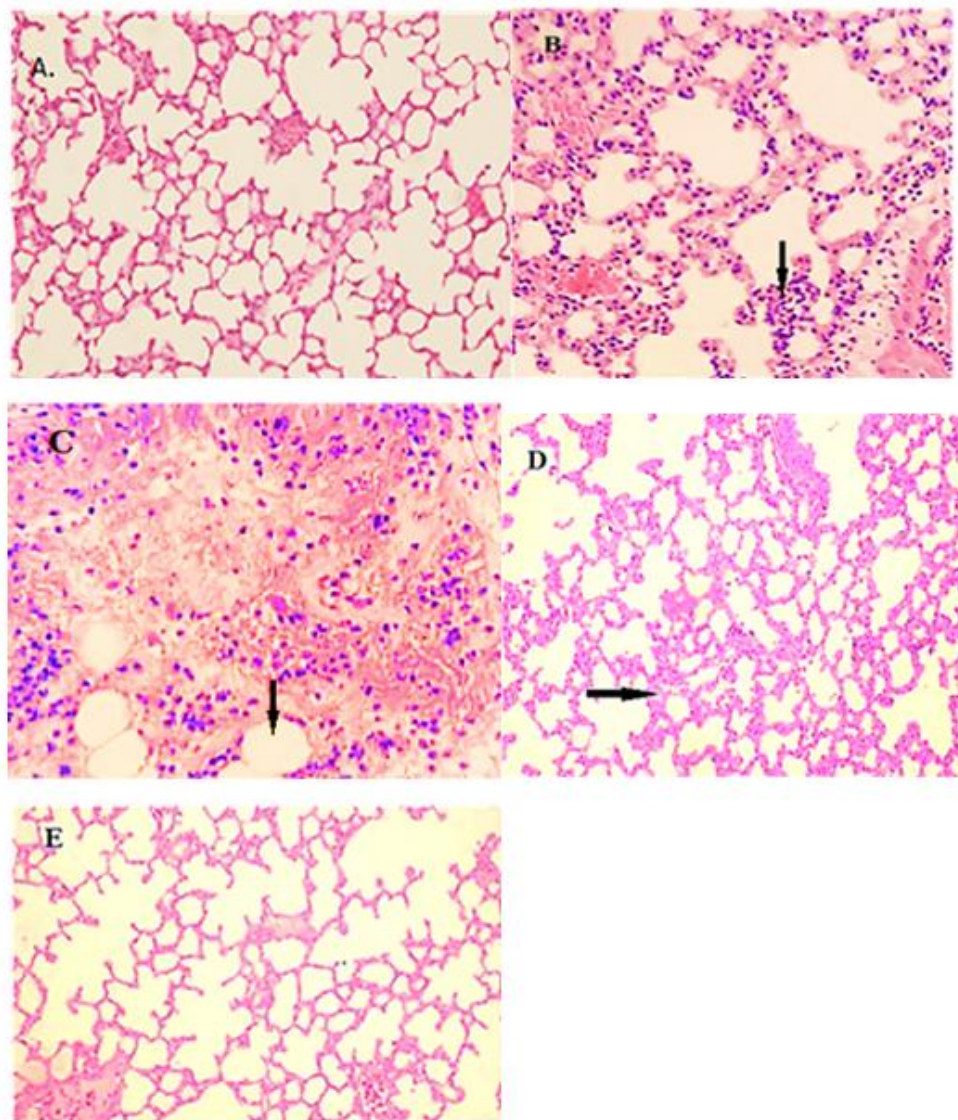
نمودار ۱- منحنی بار و اندازه ذرات PLGA؛ راست: سایز ذرات (نانومتر) و چپ: بار ذرات (میلی ولت)



نمودار ۲- منحنی بار و اندازه ذرات PLGA حاوی D-LPS؛ راست: اندازه ذرات (نانومتر) و چپ: بار ذرات (میلی ولت)



نمودار ۳- میانگین تعداد کلنی‌ها در رقت‌های مختلف باکتری



شکل ۳- هیستوپاتولوژی ریه موش‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت از عرضه باکتری: A: بافت ریه سالم موش بدون آلودگی (X۱۰۰). B: آسیب هموراژیک و التهاب شدید با حضور نوتروفیل‌ها (پیکان سیاه) در موش‌های که نرمال سالین دریافت کردند (X۴۰۰). C: التهاب شدید همراه با میکروبی بالا و نکروز (پیکان سیاه) در موش‌های دریافت کننده PLGA (X۴۰۰). D: ضخیم شدن دیواره آلوئولها (پیکان سیاه) با مشاهده تعداد کمی نوتروفیل و باکتری در موش‌های دریافت کننده D-LPS (X۱۰۰). F: بافت ریه موش‌هایی که نانوذرات PLGA حاوی D-LPS دریافت کردند تفاوت زیادی با بافت سالم ریه نداشت (X۱۰۰).

بحث

اسیتوباکتری بومانی یکی از ۶ سرده باکتریایی هست که در لیست مقاومت دارویی قرار دارد (۳۰). اسیتوباکتری بومانی یک باسیل گرم منفی هوازی، پلومورفیک و غیر متحرک بوده و بعنوان پاتوژن

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اخیراً مقاومت میکروبی بویژه مقاومت چند دارویی (MDR) را به عنوان یکی از سه مورد شناخته شده مشکلات مهم پیش روی سلامت انسان عنوان کرده است (۵).

ذرات PLGA بارگذاری شد که نتایج حاکی از افزایش تحریک سیستم ایمنی در اثر کنترل رهایش آنتی ژن بود (۳۲). در یک پژوهش دیگر با استفاده از روتاوایروس سویه *SAIL* انکپسوله شده درون ذرات PLGA و استفاده از آلومین سرمی به عنوان تثبیت کننده در طول فرآیند امولسیفیکاسیون، مشخص شد که تک دوز ایمونیزاسیون دهانی با ۲۰ میکروگرم آنتی ژن، تیتربالایی از آنتی بادی های IgG و IgA در مقایسه با حالت محلول آنتی ژن القا کرد (۲۳). در مطالعه اخیر از این روش برای انتقال لیپوپلی ساکارید (LPS) سمیت زدایی شده باکتری اسپینتوباکتر بومانی استفاده شد. ضریب انکپسوله سازی یکی از مواردی است که نشان می دهد چه مقدار از آنتی ژن مورد نظر درون نانوذرات قرار گرفته اند. در پژوهش های مختلف انجام شده مقادیر متفاوتی بیان شده است. برای مثال در پژوهش مربوط به آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B این مقدار در حدود ۷۶ درصد بوده است (۳۲). یا در مثال دیگر میزان انکپسوله شدن توکسوئید کزاز درون ذرات PLGA برابر ۶۹ درصد بود (۲۹). در این پژوهش درصد انکپسوله شدن D-LPS در نانوذرات PLGA برابر ۷۷/۲ درصد بدست آمد که قابل قبول است. طبق پژوهش حاضر از پلیمر PLGA نانوسفرهایی با بار منفی ۲۱/۵ میلی‌ولت بوجود آمد. بر اساس پژوهش‌های دیگر، PLGA در حالت عادی نانوذره های کروی با بار منفی ایجاد می کند که پژوهش حاضر نیز با آن ها همسو بود (۱۷ و ۲۶). لازم به ذکر است که پتانسیل زتا در سطح ذرات PLGA در pH های مختلف متفاوت می‌شود (۱۴). تعیین مقدار پتانسیل زتای نانوذرات PLGA حاوی D-LPS نشان داد که تغییر چندانی در نوع و اندازه بار بوجود نیامده است. با توجه این که D-LPS درون نانوذرات PLGA قرار می گیرند در بار سطحی ذرات تغییری ایجاد نمی شود. با کمال تعجب

فرصت طلب، در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، به ویژه در افرادی که مدت طولانی در بیمارستان اقامت داشته اند می باشد (۲۱). برای مقابله با روند افزایش مقاومت چند دارویی، علاوه بر تحقیقاتی که در مورد تولید آنتی بیوتیک‌های جدید موثر صورت می‌گیرد، تولید واکسن های موثر نیز می‌تواند راهی برای جلوگیری از عفونت توسط این باکتری باشد. برای تولید آنتی‌بادی های موثر علیه پیتیدهای کوچک و آنتی‌ژن‌های غیر پروتئینی نظیر (قندها، مولکولهای هاپتنتی مانند اکثر داروها)، لازم است این مولکول‌ها به یک حامل بزرگ ایمونوژن کونژوگه شوند. پلی لاکتیک -کو- گلیکولیک اسید (PLGA) یکی از پرکاربردترین این ذرات است که قادر به حمل انواعی از آنتی ژن‌ها و داروها می باشد (۱). لایه لیپوپلی ساکارید (LPS) در باکتری‌های گرم منفی یکی از تحریک کننده‌های سیستم ایمنی می‌باشد که می تواند بعنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرد. اثرات لیپوپلی ساکارید در تحریک سیستم ایمنی از طریق واکنش با گیرنده‌های شبه تول ۴ (*Toll Like Receptor 4*) و تمایز لنفوسیت‌های T کمک کننده شناخته شده است. تحریک تکثیر غیراختصاصی لنفوسیت‌های B، ترشح سایتوکاین‌هایی از قبیل فاکتور نکروز کننده تومور (*TNF*)، اینترلوکین‌های ۱ و ۶ (*IL-1, IL-6*) و تولید نیتریک اکسید در ماکروفاژها و سایر بیگانه خوارهای تک هسته ای، از دیگر اثرات قابل ذکر LPS بر سیستم ایمنی می باشد (۲۰).

استفاده از نانوذرات PLGA در سیستم تحویل واکسن و عوامل تحریک کننده سیستم ایمنی در موارد مختلف قبلا مطالعه شده است (۲۲). انکپسوله کردن آنتی‌ژن‌ها داخل نانوذرات PLGA یکی از روش‌های مورد استفاده می باشد که قبلا در موارد مختلف از آن استفاده شده است. (۱) برای مثال در یک پژوهش، آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) درون

حفاظت ایمنی داشت. ولی در مورد گروه های دریافت کننده D-LPS و PLGA-D-LPS تشکیل کلنی‌های کم در محیط کشت تاثیر واکسیناسیون را کاملاً نشان داد. اما در مقایسه بین دو گروه اخیر فقط در رقت ۰/۱ تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد و در رقت‌های کم، اثر مشابه داشتند که نشان می‌دهد انکسپوله نمودن لیپوپلی‌ساکارید باکتری در نانو ذرات PLGA نقش حفاظتی بیشتری از D-LPS به تنهایی هنگام حضور باکتری با تراکم بالا در ریه دارد ولی در تراکم محدود اثر آن‌ها مشابه است. این مطلب در مطالعه بافت ریه نیز تایید گردید (شکل ۳). در موش‌های دریافت کننده نرمال سالین آسیب هموراژیک و التهاب شدید و حضور گسترده نوتروفیل‌ها در بافت ریه مشاهده شد. در گروه دوم که PLGA دریافت کرده بودن التهاب شدید همراه با بار میکروبی بالا و نکروز دیده شد. در گروه سوم که D-LPS دریافت کرده بودند ضخیم شدن دیواره آلوئول‌ها با تعداد محدود باکتری و نوتروفیل مشاهده شد و بافت ریه موش‌هایی که نانو ذرات PLGA حاوی D-LPS دریافت کردند تفاوت زیادی با بافت سالم ریه نداشت..

نتیجه‌گیری

نانو ذرات PLGA می‌توانند لیپوپلی‌ساکارید سم زدایی شده (D-LPS) باکتری /سیتوباکتریومانی انکسپوله شده درون خود را به خوبی به سیستم ایمنی موش ارایه داده و به مقدار قابل قبول سیستم ایمنی موش را تحریک کنند و موش را در برابر عفونت ریوی با این باکتری، حفاظت نمایند. پیشنهاد می‌گردد از روش کونژوگه کردن D-LPS در سطح خارجی نانو ذرات PLGA در پژوهش‌هایی بعدی استفاده گردد.

نتایج مطالعات مختلف ارزیابی اثر اندازه ذرات بر ایجاد پاسخ سیستم ایمنی با هم همخوانی ندارند ولی بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ذرات PLGA با اندازه بین ۲۰۰ نانومتر تا ۲ میلی متر می‌توانند پاسخهای ایمنی بهتری ایجاد کنند. ایجاد پاسخهای ایمنی پیچیده است و به پارامترهای مختلفی از جمله مسیرهای واکسیناسیون، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ذرات PLGA (به عنوان مثال، اندازه، بار سطحی و مورفولوژی آن‌ها)، ویژگی‌های آنتی‌ژن و البته موارد دیگر وابسته است (۱). اندازه ذرات در تحقیق حاضر بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر بودند. نشان داده شده که ذراتی با دامنه ۲۰-۲۰۰ نانومتر با سرعت بیشتری از طریق رگ‌های لنفاوی جابجا می‌شوند (۳۱). اهمیت سایز و بار در پژوهش‌های مختلف این گونه است که اندازه و توزیع نانو ذرات در تعیین اینترکشن این ذرات با غشای سلولی و جابجایی آن‌ها در عرض سدهای فیزیولوژیک مهم است. به شکل کلی، اندازه نانو ذرات مشابهت نسبی با اندازه پاتوژن‌ها دارد که به آسانی می‌تواند شناسایی، برداشت و در نهایت موجب تحریک سیستم ایمنی شوند، هرچند نمی‌توان به طور دقیق در این باره اظهار نظر کرد اما دندرتیک سل‌ها ترجیحاً "ذرات بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر را اندوسیتوز می‌کنند، در حالی که ماکروفاژها ذراتی به اندازه ۰/۵ تا ۵ میکرومتر را ترجیح می‌دهند (۲۹).

نقش نوتروفیل‌ها در مقاومت میزبان نسبت به عفونت با این باکتری بررسی شده است (۲۴). مطالعه حاضر نشان داد که از لحاظ آماری ($P < 0.05$) تفاوت معناداری در اثرات نمونه‌های ارایه شده به موش‌ها از نظر محافظت از موش‌ها وجود دارد. بطور کلی گروه کنترل و گروهی که تنها PLGA دریافت کرده بودند شبیه هم بودند و تعداد کلنی‌های رشد کرده حاصل از کشت ریه آن‌ها در رقت‌های متفاوت نشان از عدم

7. Chen N., Zhou M., *et al.*, 2020. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223): 507-513.
8. Erridge C., Bennett-Guerrero E., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, 4(8): 837-851.
9. Farahani K., Moniri R., Shajari GR., Nazem Shirazi M.H., Musavi S., Ghasemi A., 2009. Antimicrobial susceptibility patterns and the distribution of resistance genes among *Acinetobacter* species isolated from patients In Shahid Beheshti Hospital, Kashan. *FEYZ*, 12: 61-67. [In Persian]
10. Ferreira A.E., Marchetti D.P., Cunha G.R., Oliveira L.M., Fuentefria D.B., Dall Bello A.G., 2011. Molecular characterization of clinical multi resistant isolates of *Acinetobacter* sp. From hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6): 725-30.
11. Gökhan M., Pinar Z., Baris O., Ilknur T., Hanife A., Ertugru C., 2020. Emergence of colistin and carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (CCR-Acb) complex in a neurological intensive care unit followed by successful control of the outbreak. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4): 564-570.
12. Gusten W., Hansen E., Cunha B., 2002. *Acinetobacter baumannii* pseudomeningitis. *Heart & Lung*, 31(1): 76-78.
13. Hajavi J., Sankian M., Varasteh A., Hashemi, M., 2017. Synthesis Strategies for Optimizing Sizes of PLGA Nanoparticles Containing Recombinant Chenopodium Album (rChe a 3) Allergen. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(12): 603-608.
14. Hamdy S., Haddadi A., Hung R., Lavasanifar A., 2011. Targeting dendritic

تشکر و قدردانی

از زحمات همه اساتید که راهنمایی و مشاوره این پژوهش را برعهده داشتند و کارکنان بخش تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Allahyari M., Mohit E., 2016. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(3): 806-828.
2. Amini Y., Amel J.S., 2017. Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Bio-Medical Materials and Engineering* 28(6): 613-620.
3. Amjadi I., Rabiee M., Hosseini M.S., 2013. Anticancer Activity of Nanoparticles Based on PLGA and its Co-polymer: In-vitro Evaluation. *Iran Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4): 623-634.
4. Angoti G., Godarzi H., Besharat M., Hajizadeh M., Zarringhalam M., 2014. Evaluation of antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolated of Tabriz hospital by disk diffusion and MIC methods. *Research in Medicine*, 38(2): 106-110.
5. Bassetti M., Ginocchio F., Mikulska M., 2011. New treatment options against gram-negative organisms. *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine*, 1: 501-515.
6. Bayuga S., Zeana C., Sahni J., Della-Latta P., el-Sadr W., Larson E., 2002. Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again. *Heart & Lung*, 31(5): 382-390.

- its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3): 193-209.
23. Nayak B., Panda A.K., Ray P., Ray A.R., 2009. Formulation, characterization and evaluation of rotavirus encapsulated PLA and PLGA particles for oral vaccination. *Journal of Microencapsulation*, 26(2): 154-65.
24. Nielsen T.B., Yan J., Luna B., Spellberg B., 2018. Murine Oropharyngeal Aspiration Model of Ventilator-associated and Hospital-acquired Bacterial Pneumonia. *Journal of Visualized Experiments*, 136: 1-9.
25. Pakzad P., 1391. Principles and methods of production of polyclonal antisera in animals. Third edition. Noor danesh. Tehran:141-142. [In Persian]
26. Patel N.R., Damann K., Leonardi C., Sabliov C.M., 2011. Size dependency of PLGA-nanoparticle uptake and antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Nanomedicine*, 6(8): 1381-1395.
27. Peek L., Middaugh R., Berkland C., 2008. Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8): 915-928.
28. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiol Reviews*, 21(3): 538-582.
29. Raghuvanshi R.S., Katare Y.K., Lalwani K., Ali M., Singh O., Panda A.K., 2002. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 245(1): 109-121.
30. Rice L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8): 1079-1081.
- cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(10): 943-955.
15. Jain S., O'Hagan D.T., Singh M., 2011. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 10(12): 1731-1742.
16. Karakonstantis S., Gikas A., Astrinaki E., Kritsotakis E., 2020. Excess mortality due to pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection*, 106(3): 447-453.
17. Kim H., Uto T., Akagi T., Baba M., Akashi M., 2010. Amphiphilic poly (amino acid) nanoparticles induce size dependent dendritic cell maturation. *Advanced Functional Material*, 20(22): 3925-3931.
18. Lorente C., Del Castillo Y., Rello J., 2002. Prevention of infection in the intensive care unit: current advances and opportunities for the future. *Current Opinion Critical Care*, 8(5): 461-644.
19. Makadia H.K., Siegel S.J., 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3): 1377-1397.
20. Maxwell J., Ruby C., Kerkvliet N., Vella T., 2002. Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity. *Journal of Immunology* 168(9): 4372-4381.
21. Montefour K., Frieden J., Hurst S., Helmich C., Headley D., Martin M., 2008. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Critical Care Nurse*, 28(1): 15-25.
22. Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T.M., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and

34. Turton J.F., Kaufmann M.E., Gill M.J., Pike R., Scott P.T., Fishbain J., 2006. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7): 2630-2634.
35. Westphal O., Jann K., 1965. Bacterial lipopolysaccharides Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5: 83-91.
36. Zheng Y., Chen H., Yao M., Li X., 2018. Bacterial pathogens were detected from human exhaled breath using a novel protocol. *Journal of Aerosol Science*, 117: 224-234
31. Riet E., Ainai A., Suzuki T., Kersten G., Hasegawa H., 2014. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 74: 28-34.
32. Thomas C., Gupta V., Ahsan F., 2009. Influence of surface charge of PLGA particles of recombinant hepatitis B surface antigen in enhancing systemic and mucosal immune responses. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(1): 41-50.
33. Treuel L., Jiang X., Nienhaus G.U., 2013. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(82): 453-468.

