

## اثر نانوذرات پلیمری پلی لاکتیک-co-گلایکولیک اسید (PLGA) دارای آنتی بیوتیک بر بیوفیلیم *Pseudomonas aeruginosa*

احیا عبدی عالی\*<sup>۱</sup>، پرستو صبائی فرد<sup>۲</sup>، محمدرضا صعودی<sup>۱</sup>

۱- میکروب شناس، دانشیار دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)

۲- میکروب شناس، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)

\*نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه الزهراء(س)، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۸۵۶۹۲۷۲۶، شماره ۸۸۰۵۸۹۱۲،  
abdialya@alzahra.ac.ir

پذیرش برای چاپ: مرداد نود و پنج

دریافت مقاله: خرداد نود و پنج

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیوفیلیم *Pseudomonas aeruginosa* به دلیل عفونت‌زایی در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک و نیز عفونت‌های مربوط به ابزارهای درون کاشتنی از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به ساختار ویژه بیوفیلیم و نیز گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و رخداد موارد متعدد مقاومت دارویی، روش‌های نوین دارورسانی با هدف افزایش کارایی دارو مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از ناقلین دارویی در ابعاد نانو یکی از این روش‌هاست. هدف از این مطالعه بررسی اثر بخشی نانوذرات پلیمری پلی لاکتیک-co-گلایکولیک اسید (PLGA) حاوی آنتی‌بیوتیک آمیکاسین در حذف بیوفیلیم *P. aeruginosa* است.

**روش کار:** پس از سنتز نانوذرات PLGA با روش امولسیون سازی دوگانه، اثرات ضدباکتریایی (حداقل غلظت مهارکننده رشد یا MIC و حداقل غلظت کشنده رشد یا MBC) و ضدبیوفیلیمی (حداقل غلظت تخریب کننده بیوفیلیم یا MBEC) نانوذرات سنتز شده علیه باکتری *P. aeruginosa* PAO1 بررسی شد.

**یافته‌ها:** نانوذره سنتز شده حاوی مقدار مناسبی از آنتی‌بیوتیک ( $26 \mu\text{g Amikacin/mg Nanoparticle}$ ) با ابعاد مناسب ( $440 \text{ nm}$ ) جهت کاربردهای تزریقی و استنشاقی است. نانوذره همچنین پایداری مناسبی داشته، الگوی رهاسازی آنتی‌بیوتیک برای کاربردهای ضدباکتریایی مناسب بوده و نیز آنتی‌بیوتیک پس از بارگذاری در پوشش پلیمری PLGA همچنان دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد.

**نتیجه گیری:** از آنجا که آمیکاسین به عنوان یک آمینوگلیکوزید دارای سمیت شنوایی و کلیوی است، پوشش دهی آن در ساختار پلیمری حاضر با توجه به حفظ کارایی ضدباکتریایی آن، نانوذره سنتز شده را گزینه‌ای مناسب برای بررسی‌های بیشتر جهت کاربردهای ضدباکتریایی و ضدبیوفیلیمی با اثرات جانبی کمتر می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات پلیمری، PLGA، آمیکاسین، بیوفیلیم، *Pseudomonas aeruginosa*

### مقدمه

بیماری‌های عفونی هنوز با چالش‌های زیادی همراه است (۳). بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و مولکول‌های کوچک به رغم کارایی بالا به دلیل دسترسی زیستی کم، نیمه عمر کوتاه و نیز سمیت بالا، چندان مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (۲). انتقال داروها با استفاده از سیستم‌های انتقال دارو مانند نانوذرات یکی از راه‌های مقابله با این مشکل به شمار می‌آید (۳).

درمان‌های مبتنی بر استفاده از سیستم‌های انتقال داروها دارای پتانسیل بالایی برای پیشگیری و درمان عفونت‌ها هستند. به این منظور، آزادسازی مناسب و ممتد دارو مورد نیاز است،

سودوموناس آروژینوزا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب انسانی است که به عنوان پاتوژن تنفسی با توانایی تشکیل بیوفیلیم به شمار می‌آید (۱). یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تشکیل تجمعات باکتریایی محصور شده در یک ماتریکس تشکیل شده از مواد پلی‌مری خارج سلولی است که بیوفیلیم نامیده می‌شود (۲).

به رغم تلاش‌های زیادی که در قرن حاضر برای تهیه ترکیبات آنتی‌بیوتیکی جدید صورت گرفته است، درمان بسیاری از

$$\text{بارگذاری دارو} = \frac{\text{مقدار دلروی موجود در نمونه}}{\text{مقدار کل نمونه}}$$

$$\times \frac{\text{مقدار دلروی بارگذاری شده به صورت عملی}}{\text{مقدار دلروی بارگذاری شده به صورت تئوری}} = \text{کارایی بارگذاری دارو}$$

۱۰۰

کینتیک رهاسازی دارو در بافر فسفات با pH ۷٫۴ و با استفاده از سیستم دیالیز (۱۴۰۰۰-۱۲۰۰۰ Da) در ۳۷ °C و ۱۲۰ rpm بررسی شد. در فواصل زمانی معین، تمام حجم محفظه دیالیز برای اندازه گیری میزان آنتی بیوتیک رها شده جمع آوری و با بافر فسفات تازه جایگزین شد. میزان آنتی بیوتیک رها شده در هر بازه زمانی با استفاده از واکنشگر OPA تعیین شد.

MIC در محیط (Luria Bertani (LB و به روش Broth microdilution برای نانوذره حاوی آنتی بیوتیک، نانوذره فاقد آنتی بیوتیک و نیز آنتی بیوتیک آزاد تعیین شد. حداقل غلظتی که در حضور آن کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC باکتری *P. aeruginosa* PAO1 در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از چاهک های فاقد کدورت میزان ۱۰ μL بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C گرماگذاری شدند. حداقل غلظتی که در حضور آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۴).

جهت بررسی خواص ضد بیوفیلمی نانوذره مورد نظر از Calgary Biofilm Device (CBD) استفاده شد. برای تشکیل بیوفیلم از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی با جذب OD<sub>600</sub> = ۰٫۱ تهیه و به نسبت ۱:۱۰۰۰ در محیط LB رقیق شد. از سوسپانسیون حاصله، ۱۵۰ μL به هر یک از چاهک های یک پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه تلقیح و CBD مورد نظر روی پلیت قرار داده شد. پلیت آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C و ۱۲۰ rpm گرماگذاری شد [۱۵، ۱۰]. پس از ۲۴ ساعت، CBD برای حذف سلول های پلانکتونی و متصل نشده به بیوفیلم با استفاده از نرمال سالین استریل شستشو داده شد. پلیت میکروتیتر حاوی سلول های پلانکتونی (متصل نشده و رها شده از بیوفیلم یک روزه) جهت تعیین MIC استفاده شد (۱۶). جهت بررسی اثر نانوذرات بر بیوفیلم، CBD به یک پلیت ۹۶ خانه دیگر حاوی رقت های دوتایی از نانوذره حاوی آنتی بیوتیک، نانوذره فاقد آنتی بیوتیک و نیز آنتی بیوتیک آزاد در محیط کشت LB منتقل شد. پلیت آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C و ۱۲۰ rpm گرماگذاری شد. برای تعیین حداقل غلظت تخریب کننده بیوفیلم (MBEC)، CBD شسته شده روی یک پلیت میکروتیتر جدید که هر چاهک آن حاوی ۱۷۰ μL نرمال سالین بود قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک، سونیکه شد. سپس از هر چاهک مجدداً در

به نحوی که غلظت مناسب دارو در خون و بافت ایجاد گردد (۴). امروزه پلیمرهای سنتتیک و ماکرومولکول های طبیعی به طور گسترده به عنوان مواد کلونیدی برای تولید نانوذرات طراحی شده برای اهداف رسانش دارو به کار می روند (۵). از میان پلیمرهای سنتتیک، خانواده پلی استرها مانند پلی لاکتیک-CO-گلایکولیک (PLGA) به دلیل سازگاری زیستی و خاصیت زیست تخریب پذیری بیشتر در حوزه زیست شناسی پزشکی مورد توجه هستند (۵). اتصال یا کپسوله شدن دارو در نانوپلیمرهای PLGA سبب کاهش ویژگی های نامناسب دارو مانند طول عمر کوتاه در گردش خون می شود. داروهایی که به این نحو تهیه می شوند می توانند برای ساعت ها و حتی روزها در گردش خون باقی بمانند (۷و۶). از طرف دیگر، قرارگیری آنتی بیوتیک ها در نانوذرات پلیمری از غیرفعال شدن آن ها ممانعت کرده و از واکنش آنتی بیوتیک با خلط و یا ترکیبات ماتریکس بیوفیلم جلوگیری می کند (۹و۸). این امر در مورد آنتی بیوتیک هایی مانند آمینوگلیکوزیدها که تمایل زیادی برای اتصال به خلط دارند، بیشتر حائز اهمیت است.

این پژوهش با هدف بررسی امکان بارگذاری داروی آمیکاسین در پوشش پلیمری PLGA جهت کاهش احتمالی سمیت دارو و افزایش کارایی آن انجام شد.

#### روش کار

سنتز نانوذرات PLGA حاوی آمیکاسین به روش Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) انجام شد (۱۰). با این تفاوت که از پلورونیک F۶۸ به عنوان سورفکتانت استفاده شد. نانوذره PLGA فاقد آنتی بیوتیک نیز با روشی مشابه سنتز شد. نمونه های سنتز شده در دمای ۲۵ °C و زاویه پراکنش ۹۰ درجه جهت تعیین اندازه و PdI (Polydispersity Index) با دستگاه ZetaPlus بررسی شدند. (ZetaPlus Brookhaven Instruments Corporation, USA). برای اندازه گیری پتانسیل زتا، به سوسپانسیون نمونه ها مقدار جزئی محلول کلرید پتاسیم ۱ mM با pH ۶ اضافه شد و سپس نمونه ها با دستگاه ZetaPlus بررسی شدند.

در گام بعدی، مقادیر معادل ۵ mg از هر نانوذره در ۱ mL سود ۱ نرمال حل و به نسبت ۱:۱۰ در اسید بوریک با pH ۹٫۷ رقیق شدند. نمونه ها با نسبت ۱:۱ با واکنشگر Fluoraldehyde™ o-Phthaldialdehyde Reagent Solution (OPA) ترکیب شدند. سپس با استفاده از دستگاه فلورومتر (Tecan GENios, Switzerland) و با برانگیختگی در ۳۴۰ nm، میزان تابش در ۴۵۰ nm اندازه گیری شد (۱۱). میزان بارگذاری آنتی بیوتیک و کارایی بارگذاری آن مطابق فرمول های زیر محاسبه گردید (۱۲) و (۱۳).

### یافته‌ها

نانوذرات حاوی آنتی‌بیوتیک و فاقد آنتی‌بیوتیک حداقل در سه تکرار مجزا سنتز و مطابق جدول ۱ تعیین مشخصات شدند. مقایسه نانوذره حاوی آنتی‌بیوتیک و نانوذره فاقد آنتی‌بیوتیک نشان داد که نانوذره فاقد دارو به طرز معناداری کوچک‌تر بوده و در عین حال دارای پتانسیل زتای بیشتری می‌باشد.

محیط LB کشت داده شد. پلیت آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شد. پس از این مدت، اولین چاهکی که در آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان MBEC در نظر گرفته شد (۱۰).

جدول ۱: مشخصات نانوذرات حاوی آنتی‌بیوتیک و فاقد آنتی‌بیوتیک سنتز شده

اندازه (nm)	PdI	پتانسیل زتا (mV)	بارگذاری دارو ( $\mu\text{g}/\text{mg PLGA}$ )	کارایی بارگذاری دارو (%)
۴۴۶٫۶±۷٫۴	۰٫۲۴±۰٫۰۲	-۲۹٫۸±۱٫۵	۲۵٫۹۶±۱٫۲۹	۷۶٫۷۷±۳٫۸۱
۳۳۹٫۸±۵٫۳	۰٫۲۱±۰٫۰۵	-۴۲٫۸±۱٫۵	-	-

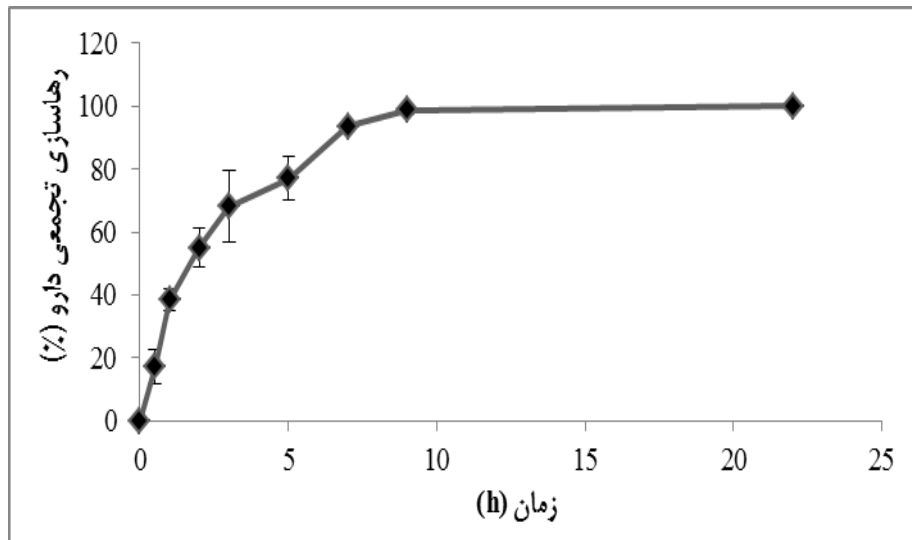
درصد تجمعی آنتی‌بیوتیک رها شده مطابق شکل ۱ تعیین شد. چنان که مشاهده می‌شود کینتیک رهاسازی دارو، پروفایلی دو فازی را نشان داد.

رهاسازی آنتی‌بیوتیک از نانوذره منتخب در فواصل زمانی از پیش تعیین شده (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۲۴ ساعت) بررسی شد.

محاسبه شد. فعالیت ضد میکروبی برای نانوذره فاقد آنتی بیوتیک اهد نشد.

برای آمیکاسین آزاد MIC ، MBC ، و MBEC به ترتیب ۲، ۴ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و برای نان ذرات بارگذاری شده با آمیکاسین به ترتیب ۸، ۳۲، و ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر

شکل ۱: کینتیک رهاسازی آنتی بیوتیک از نانوذره منتخب در بافر فسفات ۷٫۴ pH، در ۳۷ °C و ۱۲۰ rpm



سرعتی کمتر ادامه می یابد به طوری که بیش از ۹۰ درصد آنتی بیوتیک بارگذاری شده در ۹ ساعت اول و تمام آنتی بیوتیک بارگذاری شده طی ۲۴ ساعت آزاد می شود (شکل ۱). سرعت کمتر رهاسازی آنتی بیوتیک می تواند ناشی از آزادسازی آنتی بیوتیک موجود در بخش های عمقی تر نانوذره بوده که در اثر انتشار آنتی بیوتیک و/یا تخریب نانوذره باشد (۱۹). این الگوی رهاسازی آنتی بیوتیک از نانوذره برای کاربردهای ضد بیوفیلمی مناسب است چرا که از افزایش تحمل و مقاومت آنتی بیوتیکی در سلول های باقیمانده پس از تیمار با آنتی بیوتیک ممانعت می کند (۲۰). به رغم آب دوست بودن آمینوگلیکوزیدها، بسیاری از مطالعات رهاسازی بلند مدت آنتی بیوتیک از ناقل های پلیمری PLGA 502H را که در ابعاد نانو سنتز شده اند نشان می دهند (۱۰ و ۱۱). Abdelghany و همکاران رهاسازی جنتامیسین به مدت ۱۶ روز را از

502H را نشان دادند (۱). رهاسازی سریع مقدار زیادی آنتی بیوتیک و متعاقب آن رهاسازی ممتد آنتی بیوتیک در پژوهش حاضر می تواند برای کاربردهای ضد میکروبی بسیار مناسب باشد.

#### بحث

یکی از روش هایی که امروزه برای کاهش سمیت داروها و نیز افزایش کارایی آن ها مورد استفاده قرار می گیرد، بارگذاری داروها در پوشش های پلیمری است (۱۸). آمینوگلیکوزیدها از جمله آمیکاسین به دلیل سمیت بالا یکی از متداول ترین ترکیبات مورد استفاده برای این منظور به شمار می آیند. ویژگی های نانوذره حاوی آمیکاسین سنتز شده از جمله اندازه، پایداری و مقدار آنتی بیوتیک بارگذاری شده در آن، این نانوذره را کاندیدایی مناسب برای کاربردهای استنشاقی و تزریقی می سازد (جدول ۱).

بررسی کینتیک رهاسازی آنتی بیوتیک نشان داد که حدود ۲۴ درصد از آنتی بیوتیک بارگذاری شده در ۳۰ دقیقه اول و حدود ۴۰ درصد از آن طی یک ساعت اول از نانو ذره رها می شود. رهاسازی سریع آنتی بیوتیک می تواند به دلیل حضور آنتی بیوتیک در سطح یا نزدیکی سطح نانوذره باشد (۸). رهاسازی سریع اولیه آنتی بیوتیک با فرمولاسیون تهیه شده با استفاده از PLGA 502H و به روش s/o/w نشان دادند (۱۰). Imbuluzqueta و همکاران کینتیک رهاسازی ۱۰ هفته ای برای جنتامیسین بارگذاری شده در PLGA

آزاد و نانوذره بارگذاری شده با آنتی بیوتیک، ۶۴ بار بیش تر بود (جدول ۲).

#### نتیجه گیری

ویژگی های مناسب نانوذره سنتز شده از جمله اندازه، پایداری، مقدار آنتی بیوتیک بارگذاری شده در آن، پروفایل رهاسازی مناسب آنتی بیوتیک و فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی مناسب، حاکی از آن است که این ذره به طور بالقوه می تواند برای درمان عفونت های ریوی خصوصاً در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک، عفونت های بیوفیلمی ایجاد شده در سایر نواحی بدن و عفونت های سیستمیک ناشی از باکتری *P. aeruginosa* به کار رود.

#### تقدیر و تشکر

تمامی آزمایش های انجام شده با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء<sup>(س)</sup> انجام گرفت.

غلظت بالای آنتی بیوتیک آزاد شده در مرحله اول می تواند غلظتی بالاتر از غلظت مورد نیاز برای مهار رشد باکتری ها در میان دفعات مصرف آنتی بیوتیک ایجاد نماید که این امر می تواند سبب کاهش احتمال رخداد مقاومت دارویی گردد (۸).

در بررسی حاضر، فعالیت ضد میکربی نانوذره PLGA بارگذاری شده با آنتی بیوتیک علیه باکتری *P. aeruginosa* نشان داده شد. این در حالی است که نانوذره فاقد آنتی بیوتیک عاری از هرگونه فعالیت ضد میکربی بود. چنان که انتظار می رفت در مقایسه با آنتی بیوتیک آزاد، غلظت بیشتری از نانوذره حاوی آنتی بیوتیک برای مهار رشد باکتری ها مورد نیاز است. چرا که تمامی آنتی بیوتیک بارگذاری شده در نانوذره به یکباره رها نشده و در معرض تماس با باکتری ها قرار نمی گیرد. Abdelghany و همکاران مقاومت بیشتر سلول های بیوفیلمی *P. aeruginosa* PAO1 را در مقایسه با سلول های پلانکتونی نشان دادند. تیمار هر دو دسته سلول با جنتامیسین آزاد و بارگذاری شده در پلیمر PLGA افزایش مقاومت تا حدود ۳۰ برابر نسبت به هر دو نوع تیمار را نشان داد (۱۰). این در حالی است که در پژوهش حاضر، مقاومت سلول های بیوفیلمی در مقایسه با سلول های پلانکتونی در مورد آنتی بیوتیک

## REFERENCES

1. Drenkard, E., *Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Microbes and infection, 2003. **5**(13): p. 1213-1219.
2. Sharma, et al., *Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets*. Biologicals, 2014. **42**(1): p. 1-7.
3. Abdollahi, S. and F. Lotfipour, *PLGA-and PLA-Based Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery*. Biomedicine International, 2012. **3**(1).
4. Campoccia, D., et al., *Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use*. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6363-6377.
5. Astete, C.E. and C.M. Sabliov, *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**(3)p. 247-289.
6. Acharya, S. and S.K. Sahoo, *PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(3): p. 170-183.
7. Muthu, M., *Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: an overview*. Asian Journal of Pharmaceutics, 2009. **3**(4): p. 266.
8. Cheow, W.S. and K. Hadinoto, *Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **370**(1-3): p. 79-86.

- ۹ Forier, K., et al., *Probing the size limit for nanomedicine penetration into Burkholderia multivorans and Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Journal of Controlled Release, 2014. **195**(0): p. 21-28.
- ۱۰ Abdelghany, S.M., et al., *Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards Pseudomonas aeruginosa infection*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 4053.
- ۱۱ Imbuluzqueta, E., et al., *Novel bioactive hydrophobic gentamicin carriers for the treatment of intracellular bacterial infections*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(4): p. 1599-1608.
- ۱۲ Bilati, U., E. Allémann, and E. Doelker, *Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **24**(1): p. 67-75.
- ۱۳ Gupta, H., et al., *Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery*. Nanomedicine :Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. **6**(2): p. 324-333.
- ۱۴ CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Ninth Edition: Approved Standard M07-A9*. , 2012, Wayne, PA, USA: CLSI.
- ۱۵ Harrison, J.J ,et al., *The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device*. Biological procedures online, 2006. **8**(1): p. 194-215.
- ۱۶ Harrison, J.J., et al., *Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening*. Nature protocols, 2010. **5**(7): p. 1236-1254.
- ۱۷ Schwalbe, R., L. Steele-Moore, and A.C. Goodwin, *Antimicrobial susceptibility testing protocols 2007* :Crc Press.
- ۱۸ Mudshinge, S.R., et al., *Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2011. **19**(3): p. 129-141.
- ۱۹ Narahariseti, P.K., et al., *Gentamicin-loaded discs and microspheres and their modifications: characterization and in vitro release*. Journal of Controlled Release, 2005. **102**(2): p. 345-359.
- ۲۰ Cheow, W.S., M.W. Chang, and K. Hadinoto, *Antibacterial efficacy of inhalable antibiotic-encapsulated biodegradable polymeric nanoparticles against E. coli biofilm cells*. Journal of biomedical nanotechnology, 2010. **6**(4): p. 391-403.