Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2015; 18(98): 21-32

Original Article

Passive Immunity with Recombinant Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Type B Fagellin Antibody in a Burned Mouse Model

Bahador Behrouz[1], Noor Amirmozafari[2*], Mohammad Mehdi Fizabadi[1], Nima Khoramabadi[3], Mahboobeh Bahroudi[1], Mahdi Mahdavi[4]

1- Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 21 Jan 2015, Accepted: 15 Apr 2015

Abstract

Background: Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains produce a polar flagellum that required for motility, adhesion, invasion and secretion of virulence factors. The aim of this study was to evaluate the effect of prevention and treatment with anti-recombinant type B flagellin antibody in a burned mouse model.

Materials and Methods: One hundred twenty six mice were divided into 16 groups injected with different regimen of anti-recombinant type B flagellin antibody. Infections were caused by sub-dermal injection of *P. aeruginosa* PAO1 and PAK strains at the burn site. Groups were monitored for mortality for one week. Additionally, functional activity of this antibody was assessed by motility inhibition and opsonophagocytosis assays.

Results: Immunotherapy with rabbit antisera substantially increased (85.71%) survival rate of mice challenged with a homologous strain PAO1 compared with the control PBS. The mortality rate in mice infected by the heterologous strain PAK was only 28.57%. This antibody increased phagocytosis killing of the homologous strain but it only had a slight effect on the heterologous strain.

Conclusion: Passive immunotherapy protected burned mice challenged with the homologous strain but showed lower efficacy against the heterologous strain.

Keywords: Burn, Passive immunotherapy, *Pseudomonas aeruginosa*, Recombinant flagellin

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: amirmozafari@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۵ (شماره پیاپی ۹۸)، مرداد ۱۳۹۴، ۳۲-۲۱

ایمونوتراپی غیرفعال با آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B سودوموناس آئروژینوزا در مدل موش سوخته

بهادر بهروز[۱]، نور امیرمظفری[۲*]، محمد مهدی فیض آبادی[۱]، نیما خرم آبادی[۳]، محبوبه بحرودی[۱]، مهدی مهدوی[۴]

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- دکترا، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه ایمنی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا دارای یک فلاژل قطبی می‌باشند که برای تحرک، چسبندگی، تهاجم و ترشح فاکتورهای بیماری‌زایی مورد نیاز است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر پیش‌گیری و درمان با آنتی‌بادی ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B در مدل موش سوخته بود.

مواد و روش‌ها: ۱۲۶ موش به ۱۸ گروه تزریقی با رژیم‌های مختلف آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B تقسیم شدند. عفونت با تزریق زیر پوستی سویه‌های PAO1 و PAK سودوموناس آئروژینوزا در ناحیه سوخته ایجاد شد. مرگ و میر گروه‌ها به مدت یک هفته تحت نظر گرفته شد. هم‌چنین فعالیت عملکردی آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B با انجام *تست* مهار حرکت و سنجش اپسونوفاگوسیتوز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ایمونوتراپی با آنتی سرم خرگوشی سبب افزایش قابل ملاحظه (۸۵/۷۱ درصد) بقای موش‌های در چالش با سویه هومولوگ PAO1 در مقایسه با کنترل بافر فسفات سالین شد. میزان مرگ و میر موش‌های آلوده به سویه هترولوگ PAK، ۲۸/۵۷ درصد بود. این آنتی بادی مرگ ناشی از فاگوسیتوز سویه همولوگ را افزایش داد، اما صرفاً تاثیر کمی بر سویه هترولوگ داشت.

نتیجه‌گیری: ایمونوتراپی غیر فعال سبب حفاظت موش‌های سوخته در چالش با سویه هومولوگ گردید، اما کارایی کمتری در برابر سویه هترولوگ داشت.

واژگان کلیدی: سوختگی، ایمونوتراپی غیرفعال، سودوموناس آئروژینوزا، فلاژلین نوترکیب

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروب شناسی

Email: amirmozafari@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقدمه

سوختگی نوعی جراحت پوست یا غشاهای مخاطی بوده که منجر به سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. سطح بافت سوخته محیطی زخم سوختگی، منجر به سرکوب سیستم ایمنی بدن شده و بیماران را به انواع عفونت‌های باکتریایی مبتلا می‌کند(۱). با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه نگهداری بیماران سوخته، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک، سپتی سمی و سندرم اختلال در عملکرد ارگان‌ها منجر به ناخوشی و مرگ بیماران می‌شود(۱). سطح زخم سوختگی یک محیط غنی از پروتئین‌ها شامل بافت نکروز است که محیطی مطلوب برای کلونیزاسیون و تکثیر میکروارگانسیم‌ها فراهم می‌کند(۲). عفونت زخم سوختگی شایع‌ترین علت مرگ و میر در بسیاری از کشورها می‌باشد(۳). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات اپیدمیولوژی کشورهای مختلف، سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن بسیار رایج در عفونت‌های سوختگی است(۴). سودوموناس آئروژینوزا با به کارگیری عوامل ویرولانس متعددی از جمله توکسین‌ها، آنزیم‌ها، پیلی، فلاژل و غیره(۵) موجب عفونت‌های شدید و کشنده در افراد با بیماری‌های زمینه‌ای از جمله سیستیک فیبروز، دیابت، ایدز، سوختگی و موارد دیگر می‌شود(۵).

سودوموناس آئروژینوزا دارای یک فلاژل قطبی بوده که نقش‌های مهمی هم‌چون فرار از مواد سمی، توانایی انتقال به سلول‌های میزبانی هدف، کسب جایگاه اتصال مناسب و پاسخ التهابی با واسطه گیرنده شبه زنگوله‌ای ۵ (TLR5) دارد(۶). پروتئین فلاژلین زیر واحد اصلی تشکیل شده فلاژل است که از طریق ژن *fliC* کد می‌شود(۷). به طور کلی فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا دارای دو تیپ آنتی ژنی اصلی A و B است که براساس واکنش با آنتی بادی‌های پلی کلونال و وزن مولکولی تقسیم‌بندی شده‌اند(۸). تیپ B تنها دارای یک سروتایپ آنتی ژنی است، اما تیپ A دارای چندین سروتایپ است. پروتئین فلاژلین سویه‌های تیپ B دارای وزن مولکولی ۵۳ کیلودالتون می‌باشد. وزن مولکولی سویه‌های هترولوگ A متغییر و بین ۵۲ تا ۴۵ کیلودالتون است(۷). سودوموناس آئروژینوزا تنها یکی از این دوتیپ فلاژلین را بیان می‌کند(۹). در میزبان، ترکیب حرکت و کموتاکسی باکتری، دستیابی پاتوژن به بافت مخاطی را امکان‌پذیر سازد. نقش حرکت در پاتوژنز سودوموناس آئروژینوزا و ایجاد عفونت‌های مختلف ثابت شده است، زیرا حرکت موجب افزایش میان‌کنش‌های میزبان- پاتوژن می‌شود(۱۰). هم‌چنین ثابت شده است که تحرک باکتری باعث گسترش و کلونیزاسیون آن در بافت سوخته می‌گردد و سویه‌های متحرک نسبت به موتانت‌های فاقد فلاژل، بیماری‌زایی بیشتری دارند. نتایج تعداد زیادی از مطالعات، فعالیت پیش التهابی فلاژلین را به اثبات رسانیده‌اند(۱۱). مونوسیت و ماکروفاژها، سایتوکاین‌های پیش التهابی عامل نکروز توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و نیتریت اکساید را در پاسخ به فلاژلین تولید می‌کنند(۱۲). در سلول‌های اپی تلیال، فلاژلین باعث ترشح اینترلوکین ۸ (IL-8) که یک سایتوکاین ضروری در ارتشاح نوتروفیل و ماکروفاژها به محل آسیب دیده است می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق داخل رگی دوز بالای فلاژلین (۳۰۰ میکروگرم) در موش باعث ایجاد یک پاسخ شبیه شوک سپتیک شده و سطوح بالایی از TNF-α، اینترفرون گاما (IFN-γ)، اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و IL-6 را به همراه شاخص‌های استرس اکسیداتیو، آسیب کبدی و ارتشاح نوتروفیل‌ها در ریه موجب می‌گردد(۱۳). امروزه با اثبات ماهیت تحریک کنندگی فلاژلین، مطالعاتی برای درک نقش فلاژلین و TLR-5 در حساسیت به برخی از پاتوژن‌ها در حال انجام است(۱۴). با وجود پیشرفت‌های زیادی که در درمان بیماران سوختگی انجام شده است، سوختگی هم‌چنان به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع بشری به حساب می‌آید. مقاومت ذاتی و اکتسابی این باکتری به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج باعث شده است که روش‌های جدید پیش‌گیری و درمان در سر لوحه کار محققان قرار گیرد. هدف از این مطالعه، استفاده از آنتی بادی‌های علیه فلاژلین کامل تیپ B سودوموناس آئروژینوزا

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

به عنوان عامل درمانی عفونت‌های سوختگی ناشی از این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و تأیید سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا

سویه‌های استاندارد POA1 (سویه بیان کننده تیپ B فلاژلین) و PAK (سویه بیان کننده تیپ A فلاژلین) سودوموناس آئروژینوزا از مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند و پس از کشت و احیاء با روش‌های متداول بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند.

بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب فلاژلین تیپ B

ژن فلاژلین تیپ B *(fliC)* سویه PAO1 سودوموناس آئروژینورا به وسیله پرایمرهای اختصاصی جدا شد و با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر گردید و سپس در وکتور بیانی pET28a(+) بین جایگاه برش دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* کلون شد. پلاسمید نوترکیب pET-28a/*fliC* با روش شوک حرارتی به سویه بیانی BL-21(DE3) اشرشیاکلی انتقال یافت. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده ازایزوپروپیل بتا –دی-۱- تیوکالاکتوپیرانوزید (IPTG) ۱ میلی مولار (شرکت سیگما، امریکا) القا شد و برای ارزیابی بیان ژن *fliC*با روش سدیم دودسیل سولفات پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) در ژل ۱۲/۵ درصد و با رنگ آمیزی کوماسی بلو G-250 ارزیابی گردید. عمل تخلیص با حل کردن اجسام انکلوژن در بافر اوره ۸ مولار، جذب با رزین نیکل، حذف اوره با شیب کاهشی اوره در محلول شست و شو و در نهایت جمع‌آوری پروتئین نوترکیب به شکل محلول انجام شد. تایید خصوصیت آنتی ژن پروتئین با وسترن بلات و از طریق آنتی بادی مونوکلونال ضد پلی هیستیدینی صورت گرفت.

تهیه آنتی سرم های پلی کلونال علیه فلاژلین نوترکیب

ابتدا ۲ خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن تقریبی ۲ کیلوگرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. خرگوش‌ها با فلاژلین نوترکیب با دوز ۳۰۰ میکروگرم همراه با ادجوانت کامل فروند به شکل زیرپوستی واکسینه شدند. سپس ۱۴ و ۲۸ روز پس از اولین تزریق، واکسن یادآور خود را همراه با ادجوانت ناقص فروند دریافت کردند. برای ایجاد سرم هیپرایمیون، ۲ هفته پس از آخرین تزریق، ۱۰۰ میکروگرم فلاژلین نوترکیب به شکل داخل وریدی به هر کدام از حیوانات تزریق شد تا عیار آنتی بادی افزایش یابد. ۷۲ ساعت پس از این تزریق، از خرگوش‌ها خون‌گیری (قلبی) به عمل آمد. سرم‌ها پس از جداسازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه ایمونوگلوبولین‌ها از سرم خرگوش و حذف برخی ناخالصی‌ها، محلول پروتئینی با سولفات آمونیوم ۳۵ درصد رسوب داده شد.

سنجش سطح IgG توتال

میزان IgG توتال در سرم خرگوش به روش الیزای استاندارد در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (اکستراژن، کره) اندازه‌گیری شد. مقدار ۱۰۰میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فلاژلین نوترکیب (۱ میکرگرم به ازای هر چاهک) در بافر فسفات سالین (pH ۷/۴) به هر چاهک پلیت میکروتیتر اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس، بعد از ۳ بار شست و شو با بافر فسفات سالین- T حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ و بافر فسفات سالین- T حاوی ۵ درصد آلبومین سرم گاوی به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه بلوکه شد و پس از چند بار شست و شو با بافر فسفات سالین- T ، رقت ۱:۱۰۰ از سرم خرگوشی تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از ۴ بار شست و شو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوگه با پراکسیداز IgG ضد موشی خرگوش (سیگما، امریکا) با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از چند مرحله شست و شو، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف رنگزای TMB/H2O2 (انستیتو رازی، ایران) به هر چاهک اضافه شد، فعالیت آنزیمی به کمک اسید سولفوریک ۱ نرمال (مرک، آلمان) متوقف گشت و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر (فارماسیا، فرانسه) خوانده شد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

آزمون اپسونوفاگوسیتوز با ماکروفاژهای موش

پس از کشته شدن موش‌ها با کلروفرم، پوست شکم آن‌ها با الکل ضدعفونی شد و به کمک قیچی تحت شرایط استرایل باز شد. ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 به اضافه‌ی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به آرامی در حفره صفاقی تزریق گردید. مجدداً محیط کشت تا حد ممکن به داخل سرنگ آسپیره شد و به یک فالکون استریل منتقل گردید. سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات سالین سرد و استریل، شست و شو شدند و مرحله آخر در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی معلق گردیدند. در نهایت تعداد سلول‌های زنده با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو شمارش گردید. برای انجام این آزمون، سرم‌های خرگوش‌های ایمن با هم مخلوط و استفاده گردیدند و سپس فعالیت اپسونیک سرم‌های گروه‌های ایمن نسبت به سرم‌های قبل از ایمونیزاسیون با یکدیگر مقایسه شد. ۱۰۰ میکرولیتر سرم خرگوشی حرارت دیده (تحت دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) با رقت ۱:۱۰به همراه ۱۰۰ میکرولیتر ماکروفاژ با تعداد تقریبی 1×10^{7} در میلی‌لیتر با ۱۰۰ میکرولیتر سرم ۴ درصد بچه خرگوش به عنوان منبع کمپلمان و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و PAK با تعداد تقریبی 2×10^{7} در میلی‌لیتر در میکروتیوب‌های استریل مخلوط شدند. تیوب‌های کنترل هر بار فاقد یکی از اجزاء سرم، کمپلمان و یا ماکروفاژ بودند و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گشت. میکروتیوب‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ سانتی‌گراد درجه انکوبه شدند. سپس ۲۵ میکرولیتر از هر تیوب برداشته شد و پس از رقیق سازی در ۲۲۵ میکرولیتر بافر فسفات سالین استریل بر روی محیط مکانیکی آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون یک شبه پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلنی‌های رشد کرده شمارش شد و درصد کشته شدن باکتری‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید و با یکدیگر مقایسه گشت.

$$\text{درصد باکتری کشته شده} = \left[1 - \frac{\text{CFU immune serum at 90 min}}{\text{CFU of preimmune serum at 90 min}}\right] \times 100$$

آزمون مهار حرکت

به منظور ارزیابی فعالیت عملکردی آنتی سرم‌های خرگوشی علیه فلاژلین نوترکیب و مهار حرکت باکتری در شرایط آزمایشگاهی، از تست مهار حرکت باکتری استفاده گردید. ابتدا رقت ۱:۱۰۰ از آنتی سرم‌های خرگوشی در محیط آگار نرم لوریا برتانی (براث+ ۰/۳ درصد آگار) تهیه شد و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای مجزا پخش گردید. پس از سرد شدن چاهک‌ها، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه و فعال سویه PAK و PAO1 در بافر فسفات سالین به هر چاهک اضافه گشت و پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، میانگین قطر هاله گسترش باکتری‌ها در هر پلیت اندازه‌گیری شد.

تجویز آنتی بادی

اثر درمانی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B علیه عفونت سوختگی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا با ایمنی‌زایی غیر فعال ارزیابی شد؛ بدین ترتیب که ابتدا موش‌های نر۶ تا ۸ هفته‌ای نژاد بالب سی به دو دسته تقسیم شدند (انستیتو پاستور کرج) که دسته اول شامل ۹ گروه و هر گروه شامل ۷ سر موش بود. دسته دوم نیز ۹ گروه و هر گروه ۷ سر موش را در بر می‌گرفت. گروه‌بندی دسته‌های موشی به صورت ذیل بود:

دسته اول

*گروه ۱: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به صورت پرو فیلاکسی(قبل از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۲: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

صورت درمانی(بعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۳: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به صورت ترکیب پرو فیلاکسی همراه با درمان(قبل و بعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۴: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت پرو فیلاکسی(قبل از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۵: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت درمان(بعد از عفونت) چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۶: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت ترکیب پروفیلاکسی همراه با درمان(قبل وبعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۷: گروه شاهد (کنترل غیر درمانی بافر فسفات سالین) در چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۸: گروه شاهد(کنترل درمانی ایمی پنم) چالش با سویه استاندارد PAO1

*گروه ۹: گروه شاهد (گروه کنترل سوختگی)

دسته دوم

*گروه ۱: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به صورت پروفیلاکسی(قبل از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۲: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به صورت درمانی(بعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۳: آنتی بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B به صورت ترکیبی پروفیلاکسی همراه با درمان(قبل و بعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۴: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت پرو فیلاکسی(قبل از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۵: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت درمان(بعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۶: آنتی بادی سرم نرمال خرگوشی به صورت ترکیب پروفیلاکسی همراه با درمان(قبل وبعد از عفونت) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۷: گروه شاهد (کنترل غیر درمانی بافر فسفات سالین) در چالش با سویه استاندارد PAK

*گروه ۸: گروه شاهد(کنترل درمانی ایمی پنم) در چالش با سویه استاندارد PAK

بهترین زمان برای ایمنوتراپی با تجویز داخل صفاقی IgG اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B با حجم نهایی ۰/۵ سی‌سی به کمک سه روش مختلف مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در حالت پروفیلاکسی، مقدار ۰/۵ میلی‌گرم آنتی بادی، ۲ و ۲۴ ساعت قبل از عفونت به گروه‌های موشی تجویز می‌شود. در حالت درمانی، مقدار ۰/۵ و ۰/۳ میلی‌گرم آنتی‌بادی به ترتیب ۴ ساعت و ۴ روز بعد از عفونت تجویز می‌شود. در حالت ترکیبی، ۲ ساعت قبل از عفونت و نیز ۴ روز بعد از عفونت به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم تجویز می‌شود.گروه کنترل درمانی، ۴ ساعت بعد از عفونت و تا ۴ روز بعد از عفونت هر روز ۲ بار ۰/۵ میلی‌گرم ایمی پنم را با تجویز داخل صفاقی دریافت نمودند. تجویز سرم نرمال خرگوشی در حالت پروفیلاکسی، درمانی و ترکیبی همانند رژیم‌های درمانی بالا صورت گرفت.

مدل موش سوخته

بر اساس روش ایان آلن هولدر(۱۵)، ابتدا ۲۴ ساعت قبل از سوختگی پشت موش‌ها تراشیده شد. موش‌ها با استفاده از مخلوط کتامین هیدرو کلراید(۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و زایلازین (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در آب مقطر به شکل داخل صفاقی بی‌هوش شدند، سپس با قرار دادن یک ورق آلومینیومی در ابعاد ۱/۵×۱/۵ اینچ، ناحیه عاری از مو با ۰/۵ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ ثانیه سوزانده شد. بدین ترتیب، ۱۲ تا ۱۵ درصد از ناحیه‌ی پشت موش دچار سوختگی درجه ۳ شد. بلافاصله ۰/۵ سی‌سی سالین به شکل زیر جلدی، برای جبران آب از دست رفته پوست در ناحیه‌ی سوختگی تزریق شد. از استامینوفین(۰/۲۵) به عنوان مسکن بعد از سوختگی استفاده گردید. بر طبق این روش، موش‌های سوزانده شده به شدت به عفونت‌های کشنده سودوموناس آئروژینوزا حساسیت نشان دادند و حداقل دوز کشندگی در این حالت بسیار پایین بود.

چالش حیوانات ایمن

به منظور سنجش بقای گروه‌های موش دریافت

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

کننده آنتی‌بادی اختصاصی ضد فلاژلین تیپ B نسبت به گروه‌های موشی غیر درمانی در برابر دوز کشنده سویه‌های PAO1 وPAK سودوموناس آئروژینوزا، از ایمنی‌زایی غیرفعال استفاده شد. دوز کشندگی ۵۰ درصد (LD_{50}) این سویه در عفونت زخم سوختگی توسط دکتر ایان آلن تعیین شد(۱۵) که معادل ۱۰۰ تا۲۵۰ باکتری به شکل تزریق زیر پوستی و$۱۰^{۸}$ باکتری به شکل تماس با ناحیه سوخته بود. گروه‌های موش، با ۳ تا $۵×۱۰^{۲}$ واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) از سویه‌های استاندارد PAO1 وPAK به صورت تزریق جلدی چالش شدند و میزان بقا و مرگ و میر تمامی گروه‌های مذکور به مدت یک هفته پی‌گیری و ثبت گردید.

تحلیل آماری داده ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد و نتایج داده‌های کمی بر اساس میانگین سه بار تکرار و به کمک آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، روش LSD و آزمون تی (تی استیودنت) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و سطح معنی‌داری برابر با $p<۰/۰۵$ گزارش شد.

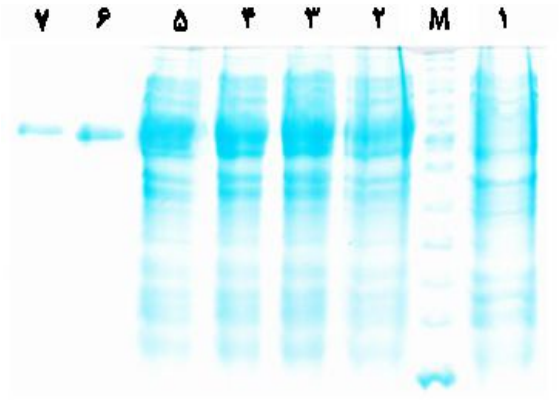
یافته‌ها

شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا

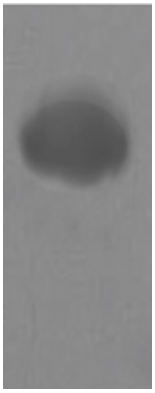
سویه‌های PAO1 و PAK با استفاده از یک‌سری از آزمون‌های بیوشیمیایی مثل اکسیداز، حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، آرژنین د هیدرولاز و تولید پیوسیانین تعیین هویت شدند.

بیان پروتئین نوترکیب فلاژلین تیپ b در اشرشیاکلی

آزمایشات مختلف بر روی مایع رویی کشت و لیزات باکتریایی ثابت کرد که بیشتر پروتئین‌های تولیدی به شکل انکلوژن بادی در داخل سیتوپلاسم باکتری تجمع می‌یابند و بهترین شرایطی که منجر به بیان بالای پروتئین گردد، القاء ۵ ساعته با PTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه می‌باشد. پروتئین نوترکیب با روش دناتوراسیون و متعاقبا شیب کاهشی اوره بر روی ستون Ni-NTA (شرکت کیاژن آلمان) به شکل محلول در بافر حاوی ایمیدازول از ستون جدا شد. بررسی پروتئین خالص شده با روش SDS-PAGE نشان داد که تخلیص پروتئین نوترکیب به خوبی صورت گرفته است(شکل۱). همان‌گونه که شکل ۲ نشان می‌دهد، نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ حاکی از بیان فلاژلین نوترکیب با وزن مولکولی تقریبی ۵۳کیلو دالتون و واکنش آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی با نوترکیب تیپ B است(شکل۲).



شکل ۱. SDS-PAGEپروتئین نو ترکیب تخلیص شده؛ (M) مارکر پروتئینی ؛ چاهک ۱: لیزات باکتریایی حاصل از یک کلون نوترکیب القاء نشده (کنترل بیان)؛ چاهک۲، ۳، ۴ و ۵ : لیزات باکتریایی القاء شده با IPTG، به ترتیب ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت پس از القاء با IPTG ؛ چاهک ۶ و۷: پروتئین نو ترکیب تخلیص شده.

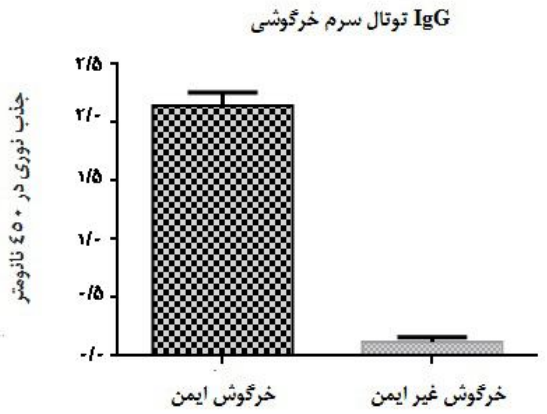


شکل۲. ایمونوبلاتینگ فلاژلین نوترکیب با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی.

نتایج بررسی سنجش آنتی بادی IgG توتال

تحلیل‌های آماری سنجش IgG توتال نشان دادند(نمودار۱) که اختلاف معنی‌داری بین خرگوش‌های ایمن وغیر ایمن وجود دارد($p<۰/۰۰۱$).

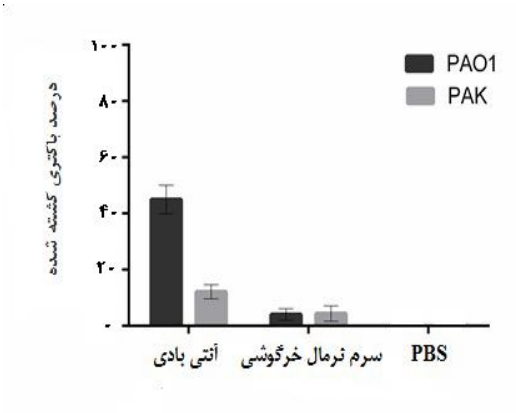
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017



نمودار ۱. جذب نوری اندازه گیری شده IgG توتال سرم خرگوشی تولید شده در میان‌کنش با پروتئین نوترکیب فلاژلین پوشاننده.

ارزیابی فعالیت اپسونیک

به منظور بررسی توانایی ارتقاء فاگوسیتوز سودوموناس آئروژینوزا از طریق IgG ضد فلاژلین نوترکیب، این باکتری با آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب (رقت ۱:۱۰)، ماکروفاژهای موشی و کمپلمان خرگوش انکوبه شد. در حضور سرم نرمال خرگوشی (گروه کنترل)، تعداد سلول‌های باکتریایی زنده اندکی کاهش یافت. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که اضافه کردن آنتی‌بادی ضد فلاژلین نوترکیب، فاگوسیتوز سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 را افزایش می‌دهد، به طوری که بعد از ۹۰ دقیقه، تعداد سلول‌های باکتریایی زنده در مقایسه با گروه بافر فسفات سالین به میزان بیشتر از ۴۴/۹۶ درصد کاهش یافت($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲). در مقابل، زمانی که IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B با سویه هترولوگ PAK مواجه شد، تنها به میزان ۴/۰۴ درصد توانست منجر به مرگ ناشی از فاگوسیتوز شود($p<۰/۰۲$) و این نشان دهنده مختص بودن آنتی بادی به تیپ فلاژلین می‌باشد.



نمودار ۲. فعالیت اپسونوفاگوسیتوزی IgG اختصاصی خرگوشی ضد فلاژلین نوترکیب در برابر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و PAK . هر ستون نشان دهنده میانگین سه بار تکرار می‌باشد ($p< ۰/۰۵$).

ارزیابی مهار حرکت

آزمایش ارزیابی مهار حرکت به منظور ارزیابی فعالیت‌های عملکردی آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی ضد فلاژلین نوترکیب در مهار حرکت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAK و PAO1 صورت گرفت. در این روش، سرم خرگوش غیر ایمن و بافر فسفات سالین به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب با رقت ۱:۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل($p<۰/۰۰۱$) قادر به مهار حرکت سویه PAO1 می‌باشد. آنتی بادی پلی کلونال نیز حرکت سویه PAK را در مقایسه با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$) به میزان اندکی مهار می‌کند.

جدول۱. مهار حرکت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و PAK با IgG اختصاصی ضد فلاژلین نوترکیب. داده‌ها به صورت میانگین سه بار تکرار قطر باکتری پخش شده بر حسب میلی متر محاسبه شده است.

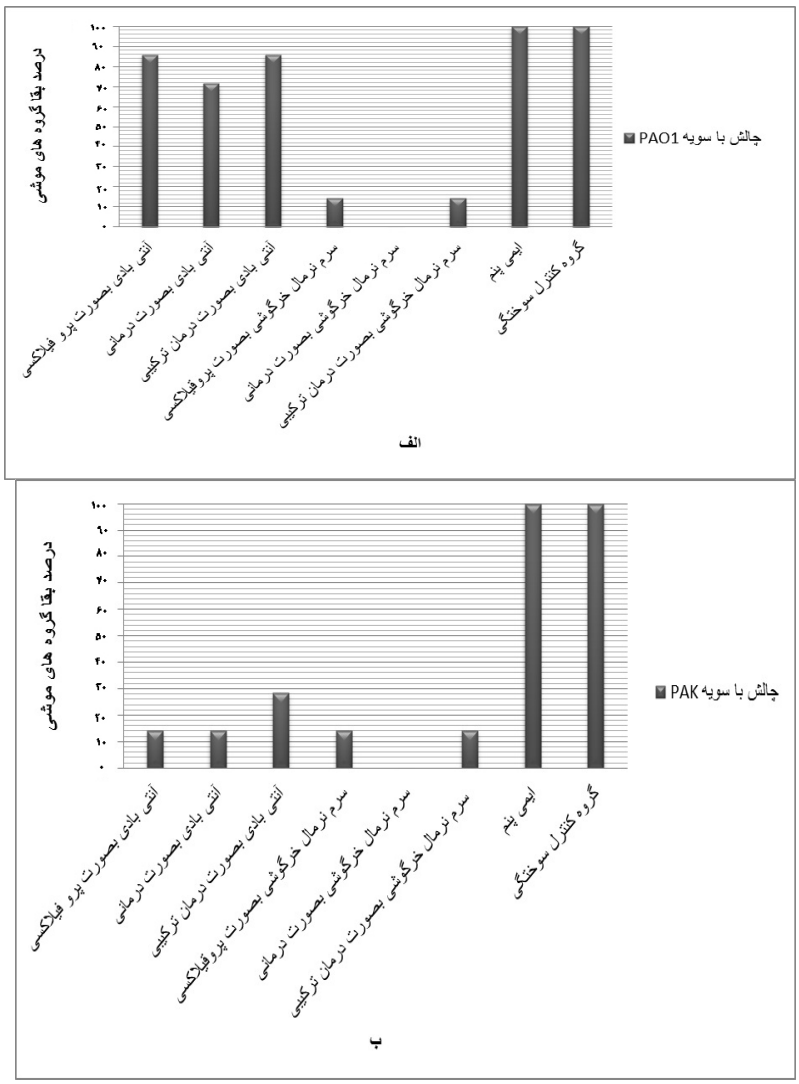
سویه مورد آزمایش	IgG اختصاصی ضد فلاژلین نوترکیب	سرم نرمال خرگوشی	بافر فسفات سالین
PAO1	۴/۱±۰/۴۳۵	۱۴/۳۶±۰/۴۰۴	۱۵/۰۳±۰/۵۰۳
PAK	۱۴/۳۰±۰/۵۲۹	۱۴/۹±۰/۳۰۵	۱۵/۸۳±۰/۱۵۰

محافظت در برابر سویه کشنده

برای بررسی اثرات حفاظتی آنتی‌بادی ضد فلاژلین نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا از مدل موش

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

سوخته در چالش با ۵۰ درصد دوز کشنده سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. میزان مرگ و میر موش‌ها به مدت ۷ روز مداوم بعد از چالش مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده (نمودار ۳ الف)، آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب در حالت پروفیلاکسی و درمان ترکیبی میزان بقاء را در مقایسه با گروه غیر درمانی در چالش با سویه PAO1 تا ۸۵/۷۱ درصد افزایش داد (p<۰/۰۰۰۱). آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب در حالت درمان ترکیبی توانست به میزان ۳۸/۵۷ درصد از موش‌ها در برابر چالش با سویه هترولوگ PAK محافظت کند(نمودار ۳ ب) (p<۰/۰۱). اثر حفاظتی آنتی بادی ضد فلاژلین نوترکیب با گروه مثبت درمانی ایمی پنم سنجیده شد.



نمودار ۳ . الف وب .نتایج حاصل از بررسی میزان مرگ و میر گروه های مختلف موشی در حالت های مختلف درمانی. نمودار الف و ب به ترتیب میزان مرگ و میر گروه‌های موشی را در چالش با سویه‌های PAO1 و PAK نشان می دهند.

بحث

آنتی‌بادی پلی کلونال تولید شده در برابر فلاژلین نوترکیب تیپ B سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1، به طور قابل توجهی باعث کاهش مرگ و میر ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در عفونت زخم سوختگی می‌شود. تجویز آنتی بادی در حالت پروفیلاکسی به اندازه حالت درمانی در حفاظت موش‌ها در برابر چالش با سویه هومولوگ PAO1 کارآمد است. حتی اثبات شد که در گروه کنترل درمان غیر اختصاصی، سرم نرمال خرگوشی در حالت پروفیلاکسی می‌تواند تا حدودی مرگ و میر موش‌ها

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

را در مقایسه با گروه غیر درمانی بافر فسفات سالین کاهش دهد. هم‌چنین مشخص شد که به علت واکنش‌های متقاطع، آنتی بادی فلاژلین نوترکیب تیپ B در حالت درمان ترکیبی می‌تواند باعث محافظت موش‌ها در چالش با سویه هترولوگ PAK شود. امروزه، ایمن سازی فعال و غیر فعال در برابر عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا به طور گسترده مد نظر قرار می‌گیرد(۱۵، ۱۶)؛ چرا که درمان آنتی‌بیوتیکی منجر به مقاومت‌های گسترده ذاتی و اکتسابی شده است(۱۷). از آن جایی که بیماران دچار سوختگی در پاسخ به عوامل عفونی با محدودیت زمانی مواجهند، به نظر می‌رسد که ایمن سازی غیر فعال از بهترین راه‌های درمانی برای پیش‌گیری و درمان این بیماران است(۱۸). به دلیل مقاومت روز افزون سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در مراکز درمانی، استفاده از آنتی بادی به عنوان یک عامل درمانی می‌تواند بسیار کارآمد و موثر باشد(۱۸). در این مطالعه نشان داده شد که آنتی‌بادی IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B حاصل از ایمن سازی فعال در خرگوش می‌تواند باکتری‌ها را اپسونین نموده و فاگوسیتوز را تسهیل نماید. تعداد باکتری‌های زنده سویه PAO1 بعد از ۹۰ دقیقه در حضور IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B به میزان ۴۴/۹۶ درصد در مقایسه با گروه کنترل و تحت شرایط آزمایشگاه کاهش یافت. در مقابل، زمانی که IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B با سویه هترولوگ PAK مواجه شد، تنها به میزان ۴/۰۴ درصد توانست باعث مرگ وابسته به فاگوسیتوز شود و این نشان دهنده اختصاصی بودن آنتی‌بادی به تیپ فلاژلین می‌باشد. در این مطالعه مشخص شد که IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ B در رقت ۱:۱۰۰ می‌تواند حرکت سویه همولوگ PAK را به طور کامل مهار کند و اثر ممانعت کمی بر روی حرکت سویه هترلوگ PAK بگذارد. نتایج حاصل از مطالعه‌ای مشابه که توسط بارنا و همکاران صورت گرفت نشان داد که آنتی بادی مونوکلونال ضد فلاژلین می‌تواند مرگ و میر موش‌ها را به میزان قابل توجهی(۹۶ درصد در برابر ۴ درصد گروه کنترل) کاهش دهد(۱۹). نتایج به دست آمده از تحقیق ما به علت استفاده از pET15BVP به عنوان وکتور و مدل عفونت ریوی با نتایج کامپودونیکو و همکاران متفاوت بود(۲۰). مونتای نشان داد که آنتی‌بادی ضد فلاژلی باعث حفاظت موش در برابر عفونت زخم سوختگی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می‌شود(۹). یکی از روش‌های آزمایشگاهی برای ارزیابی فعالیت عملکردی آنتی‌بادی، آزمون اپسونوفاگوسیتوز می‌باشد. فائزی و همکاران نشان دادند که IgG ضد فلاژلین نوترکیب تیپ A می‌تواند میزان مرگ و میر موش‌ها را در عفونت زخم سوختگی و در چالش با سویه PAK به میزان ۷۵ درصد کاهش دهد، در حالی که این آنتی‌بادی توانست تا حدودی باعث حفاظت موش‌ها در چالش با سویه PAO1 شود(۲۱). تیلاکر و همکاران ثابت کردند که در ارزیابی مرگ اپسونوفاگوسیتیک، آنتی سرم موش‌ها و خرگوش‌های ایمن با کونژوگه ی MEP-KLH در رقت‌های ۱:۴ (خرگوش) و ۱:۸ (موش) می‌تواند باعث مرگ بیش از ۵۰ درصد باکتری‌ها گردد(۲۲). از آن جایی که سودوموناس آئروژینوزا در همه‌جای محیط زیست حضور دارد، احتمال این که خرگوش‌ها در معرض سودوموناس آئروژینوزا قرار گیرند افزایش می‌یابد. از این رو آنتی‌بادی‌های عمومی دارای سودوموناس می‌باشند و شاید این مسئله علت محافظت اندکی باشد که مشاهده شد(۲۳).

نتیجه گیری

آنتی‌بادی‌های پلی کلونال خرگوشی ضد فلاژلین تیپ B با مهار حرکت و افزایش مرگ اپسونیک سودوموناس آئروژینوزا منجر به سطح بالایی از حفاظت در برابر عفونت سوختگی ناشی از این باکتری می‌گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران که حمایت مالی این طرح را با شماره ۲۴۳۲۰-۱۲-۰۱، ۹۳ برعهده داشت، تقدیر و تشکر می‌شود.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

منابع

1. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clinical microbiology reviews. 2006; 19(2):403-34.
2. Jeschke MG, Pinto R, Kraft R, Nathens AB, Finnerty CC, Gamelli RL, et al. Morbidity and Survival Probability in Burn Patients in Modern Burn Care*. Critical care medicine. 2015; 43(4): 808-15.
3. Altoparlak U, Erol S, Akcay MN, Celebi F, Kadanali A. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. Burns. 2004; 30(7): 660-4.
4. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. Burns. 2004; 30(4):357-61.
5. Gellatly SL, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease. 2013; 67(3): 159-73.
6. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends in microbiology. 2004; 12(11):509-17.
7. Brimer CD, Montie T. Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin ofPseudomonas aeruginosa a-Type Strains. Journal of bacteriology. 1998; 180(12):3209-17.
8. Allison JS, Dawson M, Drake D, Montie TC. Electrophoretic separation and molecular weight characterization of Pseudomonas aeruginosa H-antigen flagellins. Infection and immunity. 1985; 49(3):770-4.
9. Montie T, Craven R, Holder I. Flagellar preparations from Pseudomonas aeruginosa: isolation and characterization. Infection and immunity. 1982; 35(1):281-8.
10. Drake D, Montie TC. Flagella, motility and invasive virulence of Pseudomonas aeruginosa. Journal of general microbiology. 1988; 134(1): 43-52.
11. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Eugene CY, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature. 2001; 410(6832): 1099-103.
12. McDermott PF, Ciacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. Infection and immunity. 2000; 68(10): 5525-9.
13. Honko AN, Mizel SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. Immunologic research. 2005; 33(1):83-101.
14. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. The Journal of experimental medicine. 2003; 198(10): 1563-72.
15. Neely AN, Holder IA, Warden GD. Then and now: studies using a burned mouse model reflect trends in burn research over the past 25 years. Burns. 1999; 25(7):603-9.
16. Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for Pseudomonas vaccines. Human vaccines. 2011; 7(10):999-1011.
17. Sood P, Seth T, Kapil A, Sharma V, Dayama A, Sharma S, et al. Emergence of multidrug resistant acinetobacter blood stream infections in febrile neutropenia patients with haematological cancers and bone marrow failure syndromes. Journal of the Indian Medical Association. 2012; 110(7):439-44.
18. Gottlieb D, Cryz SJ, Furer E, Que J, Prentice H, Duncombe A, et al. Immunity against Pseudomonas aeruginosa adoptively transferred to bone marrow transplant recipients. Blood. 1990; 76(12):2470-5.
19. Barnea Y, Carmeli Y, Neville LF, Kahel-Reifer H, Eren R, Dagan S, et al. Therapy with anti-flagellin A monoclonal antibody limits Pseudomonas aeruginosa invasiveness in a mouse burn wound sepsis model. Burns. 2009; 35(3):390-6.
20. Campodónico VL, Llosa NJ, Grout M, Döring G, Maira-Litrán T, Pier GB. Evaluation of flagella and flagellin of Pseudomonas aeruginosa as vaccines. Infection and immunity. 2010; 78(2):746-55.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:52 +0430 on Thursday September 21st 2017

21. Faezi S, Sattari M, Mahdavi M, Roudkenar MH. Passive immunisation against Pseudomonas aeruginosa recombinant flagellin in an experimental model of burn wound sepsis. Burns. 2011;37(5):865-72.
22. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infection and immunity. 2003; 71(7): 3875-84.
23. Neely AN, Holder IA, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against Pseudomonas aeruginosa challenge. Burns. 2005; 1(2):153-8.