

The Effect of Nanoformulation of Amoxicillin on its Antibacterial Activity Against Common Bacterial Strains Involved in Hospital-Acquired Infections

Asma Toraji¹, Mahnaz Hadizadeh^{2*}, Fahimeh Nemati Mansoor³

1. M.Sc in Biotechnology, Department of Biotechnology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, PhD of Biochemistry, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, PhD of Biotechnology, Department of Biotechnology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 9 Dec 2017, Accepted: 28 Feb 2018

Abstract

Background: Nanotechnology offers a great chance to treat drug-resistant microbial infections. The purpose of this study was to synthesize amoxicillin-encapsulated polymeric nanoparticles and compare the antibacterial activity of this nanoformulation with pure amoxicillin.

Materials and Methods: Amoxicillin-encapsulated polymeric nanoparticles were prepared using chitosan as a polymer and alginate as cross linking agent. The obtained nanoparticles were characterized by Fourier transform infrared, dynamic light scattering and scanning electron microscopy. The antibacterial effects of the nanoparticles were evaluated using broth microdilution and well diffusion methods against some common bacterial strains involved in hospital-acquired infections.

Results: The drug-encapsulated nanoparticles were found to be spherical in shape with average size of 96 nm. These nanoparticles had a significant antibacterial effect on all tested bacteria, except for *Pseudomonas aeruginosa*. They also displayed stronger antibacterial activity than the nanocarrier alone or free antibiotic. The highest mean zones of growth inhibition (23.7 mm) for methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and the smallest zone (12.5 mm) for the resistant species of this bacterium were determined. MIC of the nanoformulation against these two strains was respectively determined at 1.5 and 48 µg/ml and for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* at 6.6 and 256 µg/ml.

Conclusion: The results suggest that amoxicillin encapsulation in polymer nanoparticles has the potential to increase its antibacterial activity against bacteria causing nosocomial infections.

Keywords: Amoxicillin, Antibacterial activity, Hospital infections, Nanoformulation.

*Corresponding Author:

Address: Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran,
Email: hadizadeh@irost.ir

تأثیر نانو فرموله کردن آموکسی سیلین بر فعالیت ضدباکتریایی آن بر علیه سوش های باکتریایی شایع در عفونت های بیمارستانی

اسماء تورجی^۱، مهناز هادی زاده^{۲*}، فهیمه نعمتی منصور^۳

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار، دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست فن آوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۳. استادیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۹

چکیده

زمینه و هدف: فن آوری نانو، فرصتی عالی برای درمان عفونت های میکروبی مقاوم به دارو فراهم می کند. هدف از این مطالعه، سنتز آموکسی سیلین انکپسوله شده در نانوذرات پلیمری و مقایسه فعالیت ضد باکتریایی این نانوفرمولاسیون با آموکسی سیلین خالص بود.

مواد و روش ها: نانوذرات پلیمری انکپسوله شده با آموکسی سیلین توسط کیتوزان به عنوان یک پلیمر و آلژینات به عنوان عامل متصل کننده تهیه شدند. نانوذرات حاصله با طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پراکندگی نور دینامیکی و میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخصه یابی شدند. اثرات ضدباکتریایی نانوذرات بر علیه برخی باکتری های شایع در عفونت های بیمارستانی با استفاده از روش های براث میکرودایلوشن و انتشار از چاهک بررسی شدند.

یافته ها: نانوذرات انکپسوله شده با دارو دارای شکل کروی با اندازه متوسط ۹۶ نانومتر بودند. این نانوذرات اثر ضد باکتریایی قابل توجهی بر روی تمام باکتری های آزمایش شده به جزء سودوموناس آئروژینوزا داشتند. همچنین آن ها اثرات ضدباکتریایی قوی تری از نانوحامل به تنهایی یا آنتی بیوتیک آزاد نشان دادند. بزرگترین ناحیه مهار رشد (۲۳/۷) برای استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین و کوچکترین (۱۲/۵) برای نوع مقاوم این باکتری تعیین شد. حداقل غلظت مهارکننده نانوفرمولاسیون بر علیه این دو سویه به ترتیب ۱/۵ و ۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر و برای اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا ۶/۶ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که انکپسوله کردن آموکسی سیلین در نانوذرات پلیمری، پتانسیل افزایش فعالیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری های عامل عفونت های بیمارستانی دارد.

واژگان کلیدی: آموکسی سیلین، فعالیت ضدباکتریایی، عفونت های بیمارستانی، نانوفرمولاسیون

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، گروه زیست فن آوری

Email: hadizadeh@irost.ir

مقدمه

با وجود این که عصر حاضر، عصر فن آوری های جدید و پیشرفته در حوزه پزشکی محسوب می شود، درمان بیماری های عفونی به معضلی بزرگ و پیچیده تبدیل شده است. علیرغم تلاش های گسترده برای توسعه داروهای ضد میکروبی قوی تر متأسفانه به دلیل استفاده بی رویه و کنترل نشده، مقاومت نسبت به این داروها نیز افزایش یافته است، به طوری که اکنون مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها به حد بحرانی رسیده است (۱). یکی از راه کارهای جدید محققان برای غلبه بر این مشکل، به کارگیری فن آوری نانو است.

نانو مواد خصوصیات منحصر بفردی دارند و فعالیت ضد میکروبی ذاتی برخی از آن ها نیز ثابت شده است (۲). علاوه بر آن استفاده از سیستم های جدید نانو ساختار برای تحویل آنتی بیوتیک ها در بهبود فارماکوکینتیک دارو و کاهش اثرات جانبی آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این نانو سیستم ها می توانند با احاطه کردن آنتی بیوتیک در یک ماتریکس پلیمری، مدت حضور آن ها را در جریان خون افزایش داده و در نتیجه دوز مؤثر دارو و فرکانس تجویز آن را به طور قابل توجهی کاهش دهند (۳-۵). علاوه بر این، برخی از این نانوحامل ها می توانند بر مکانیسم مقاومت به آنتی بیوتیک ها غلبه کرده و عوارض جانبی کمتری نسبت به آنتی بیوتیک های معمولی از خود نشان دهند (۶).

نانو حامل های دارویی می توانند متشکل از مواد زیست تخریب پذیر مختلف مانند پلیمرهای طبیعی یا سنتتیک، لیپید یا فسفولیپید باشند. نانو ذرات پلیمری نسبت به لیپوزوم ها دارای مزایای ویژه ای هم چون افزایش پایداری دارو و خاصیت رهایش کنترل شده دارو هستند (۷، ۸). مطالعات متعددی نشان داده است که انکپسوله کردن آنتی بیوتیک های مختلف مثل سیپروفلوکساسین، پرولوکساسین، جنتامایسین و آمپی سیلین در نانوذرات پلیمری می تواند اثر چشمگیری در از بین بردن هدف دار پاتوژن های داخل سلولی داشته و اثربخشی آنتی بیوتیک های مربوطه را چندین برابر افزایش دهد

(۹-۱۲). از آنجایی که نتایج مطالعات مختلف بیان گر پتانسیل فن آوری نانو برای غلبه بر برخی از چالش های مربوط به روش های تشخیص و درمان بیماری های عفونی است، بنابراین، هدف از مطالعه حاضر انکپسوله کردن آنتی بیوتیک بتالاکتامی آموکسی سیلین در نانوذرات یک پلیمر طبیعی و سپس بررسی اثر ضد میکروبی آن در مقایسه با آنتی بیوتیک بدون حامل نانویی بر علیه چند سوش باکتریایی مقاوم به دارو و حائز اهمیت در ایجاد عفونت های بیمارستانی بود.

مواد و روش ها

این مطالعه نیمه تجربی در سال ۱۳۹۶ در سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران انجام شد. ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بخش مراقبت های ویژه بیمارستان طالقانی تهران جداسازی و هویت آن ها با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی تعیین شد (۱۳). برای تهیه نانو ذرات پلیمری از محلول ۰/۰۲ درصد کیتوزان که از حل کردن پودر کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد با pH ۵ به دست آمده بود استفاده شد. سپس محلول ۰/۰۲ درصد آلژینات با pH ۵، با نسبت یک به دو و نیم به آرامی به محلول کیتوزان در حال استیر شدن، به مدت ۳۰ دقیقه اسپری شد. نانوذرات تولید شده با سانتریفیوژ کردن با سرعت ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵۰ دقیقه جمع آوری شدند. نانوذرات حاصله پس از دو بار شستشو با آب دوبار تقطیر، برای نگهداری و انجام آزمایشات بعدی لیوفلیزه شدند (۱۴). برای انکپسوله کردن آنتی بیوتیک در نانوذرات، مقداری از پودر خالص آنتی بیوتیک در محلول ۰/۰۲ درصد کیتوزان حل شد، به طوری که غلظت نهایی آنتی بیوتیک در محلول حاصل ۰/۰۴ درصد باشد. سپس ۲۰ میلی لیتر محلول آلژینات ۰/۰۲ درصد به ۶۰ میلی لیتر محلول کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک به آرامی اسپری شد و سایر مراحل مانند روش سنتز نانوذرات بدون آنتی بیوتیک انجام شد (۱۵). اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات با روش پراکنندگی نور دینامیکی (DLS) به کمک

برای تعیین MBC نیز ۱۰ میکرولیتر از سه چاهک شفاف ماقبل چاهک MIC برداشته و جداگانه روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از نمونه که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان MBC معرفی شد (۱۶، ۱۷). برای تعیین قطر هاله مهار رشد باکتری نیز ابتدا چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر توسط پیت پاستور استریل در محیط کشت مولر هیتون آگار ایجاد شد. سپس سوسپانسیونی از سویه‌های مورد آزمایش با کدورت معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه شده و به کمک سوآپ استریل با روش کشت سه مرحله‌ای روی محیط کشت مولر هیتون آگار به طور یکنواخت تلقیح شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های نانوذرات پلیمری، آنتی بیوتیک و نانوذرات بارگذاری شده با آنتی بیوتیک در هر چاهک ریخته شد و پس از ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌ها با خط کش اندازه‌گیری و ثبت شد. این آزمایش سه بار تکرار و میانگین آن گزارش شد (۱۸).

یافته‌ها

شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب قطر متوسط و چگونگی توزیع نانوذرات بدون دارو و بارگذاری شده با دارو را نشان می‌دهد.

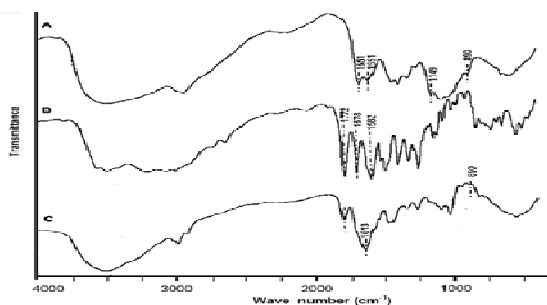
بر اساس نتایج حاصله با استفاده از روش پراکندگی نوری دینامیکی، نانوذرات پلیمری بدون آنتی بیوتیک دارای اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر و اندازه متوسط ۷۳ نانومتر بودند، در حالی که پس از بارگذاری آنتی بیوتیک در نانوذرات، اندازه آن‌ها افزایش یافته و هم‌چنین میزان پراکندگی اندازه ذرات نیز بیشتر شد، به طوری که اندازه متوسط نانوذرات ۹۶ نانومتر تعیین شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نیز ظاهر کروی و اندازه نانومتری ذرات به دست آمده را تأیید کرد (شکل ۳).

دستگاه نانوژتا سایزر ساخت شرکت مالورن در طول موج ۶۳۳ نانومتر و با ضریب شکست ۱/۳۳ تعیین شدند. مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل MIRA\TESCAN و طیف مادون قرمز تبدیل فوریه آن‌ها با استفاده از اسپکترومتر FTIR-8400 مدل شیماتزو در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ بررسی شد. برای بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نانوذرات بدون دارو، آموکسی سیلین و نانوذرات حاوی آنتی بیوتیک با استفاده از روش میکروبراث دایلوژن تعیین شدند.

برای تهیه محلول آنتی بیوتیک از پودر خالص آنتی بیوتیک آموکسی سیلین ساخت شرکت سیگما آلدریج آمریکا استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا یک محلول ذخیره از آنتی بیوتیک با غلظت ۴۰۹۶ میکروگرم در میلی لیتر در آب مقطر استریل تهیه شد و رقت‌های سریال از آن در میکروپلیت با استفاده از محیط مولر هیتون براث فراهم شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری بر روی محیط بلاد آگار، سوسپانسیونی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند (10^8 CFU/ml) تهیه و $1:1000$ رقیق شد. در روش میکرو براث دایلوژن، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث تنظیم شده از نظر کاتیون‌های کلسیم و منیزیم (CAMHB) داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات تنها، آنتی بیوتیک تنها و یا نانوذرات بارگذاری شده با آنتی بیوتیک اضافه شد. برای رقیق سازی محتویات چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد و این کار تا چاهک دهم تکرار شد. سپس ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت نهایی 10^5 CFU/ml به همه چاهک‌ها افزوده شد و بعد از ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری میکرو پلیت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت رقیق‌ترین چاهکی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود به عنوان MIC تعیین شد.

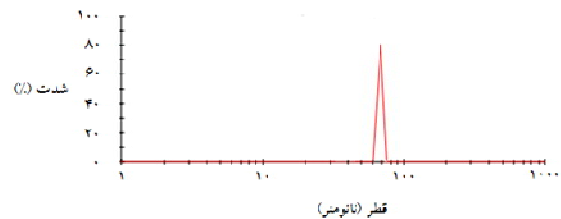
آنتی بیوتیک

از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) برای تعیین میان‌کنش بین نمونه‌ها استفاده شد. در طیف مربوط به کیتوزان (شکل A5)، دو پیک شاخص در 893 cm^{-1} و 1651 cm^{-1} مربوط به ساختار ساکارین و یک پیک در 1149 cm^{-1} مربوط به گروه آمیدی کیتوزان در پلیمر N- استیل شده مشاهده شد. آموکسی سیلین خالص نیز دارای پیک‌های شاخص در 1772 cm^{-1} مربوط به حلقه بتالاکتام، 7886 cm^{-1} مربوط به پیوند CO با NH و 1582 cm^{-1} مربوط به پیوند C=C حلقه بنزن بود (شکل B5). طیف نانوذرات انکپسوله شده با آنتی بیوتیک (شکل C5)، فاقد هر گونه پیک اضافی مربوط به آنتی بیوتیک بود که می‌تواند نشان‌دهنده عدم اینترکشن شیمیایی بین دارو و پلیمر احاطه کننده آن باشد (19).

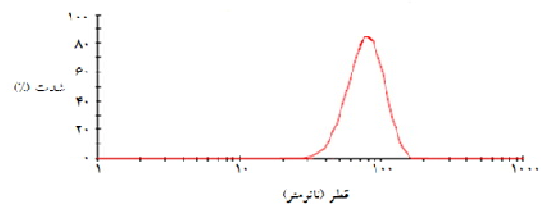


شکل 5. طیف‌های FTIR نانو ذرات پلیمری بدون دارو (A)، آموکسی سیلین خالص (B) و نانو ذرات پلیمری انکپسوله شده با آنتی بیوتیک (C).

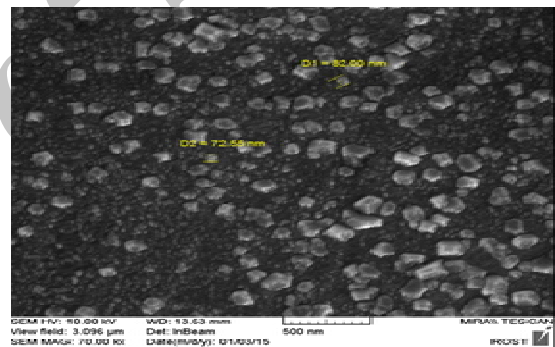
مقادیر MIC و MBC آنتی بیوتیک تنها، نانوذرات تنها و نانوذرات انکپسوله شده با آنتی بیوتیک در جدول 1 نشان داده شده است. نتایج نشان داد که نانوفرموله کردن آنتی بیوتیک در پلیمر کیتوزان باعث افزایش اثربخشی آن بر علیه سوش‌های استاندارد و بالینی اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود، ولی تاثیری بر روی فعالیت آموکسی سیلین بر علیه سودوموناس آئروژینوزا ندارد. بیش‌ترین اثربخشی بر روی سوش‌های استاندارد و بالینی استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین با کاهش



شکل 1. نمودار پراکنندگی اندازه نانو ذرات پلیمری بدون آنتی بیوتیک

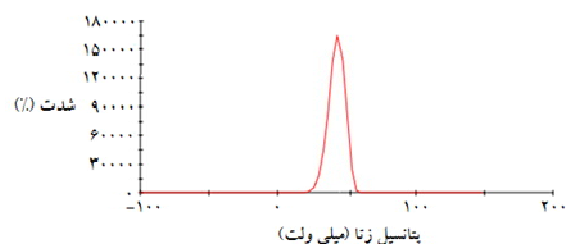


شکل 2. نمودار پراکنندگی اندازه نانو ذرات پلیمری انکپسوله شده با آنتی بیوتیک



شکل 3. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو ذرات پلیمری انکپسوله شده با آنتی بیوتیک

بار سطحی (پتانسیل زتا) همه نانوذرات مثبت و بزرگتر از ۲۰ میلی ولت بود. نمودار بار سطحی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین در شکل 4 نشان داده شده است.



شکل 4. نمودار پتانسیل زتا نانو ذرات پلیمری انکپسوله شده با

از ۱۶ به ۱۴ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد.

MIC از ۲ به ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین اثر برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با کاهش MIC

جدول ۱. میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نانو ذرات، آنتی بیوتیک و آنتی بیوتیک انکپسوله شده در نانوذرات با برحسب میکروگرم بر میلی لیتر.

نانوذره + آنتی بیوتیک		آنتی بیوتیک		نانو ذرات		باکتری
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	
۱۰۲۴	۲۵۶	۱۰۲۴	۲۵۶	۱۰۲۴۰	۲۵۶۰	سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853
۱۰۲۴	۲۵۶	۱۰۲۴	۲۵۶	۱۰۲۴۰	۲۵۶۰	سودوموناس آئروژینوزا
۲۰	۶/۶	۳۲	۸	۳۲۰	۱۶۰	اشرشیا کلی* ATCC 25922
۲۴	۶/۶	۳۲	۸	۳۲۰	۱۶۰	اشرشیا کلی
۱/۵	۰/۷۵	۴	۲	۱۶۰	۴۰	استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین*
۳	۰/۷۵	۴	۲	۱۶۰	۴۰	ATCC 25932
۴۸	۱۴	۶۴	۱۶	۶۴۰	۲۶۰	استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین
۴۸	۱۴	۶۴	۱۶	۶۴۰	۲۸۰	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*
						ATCC 33591
						استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

*: سویه استاندارد

استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین و اشرشیا کلی نیز بزرگترین قطر هاله عدم رشد در مقابل نانوذرات انکپسوله شده با آنتی بیوتیک و پس از آن در مقابل آنتی بیوتیک آزاد به دست آمد و کوچکترین قطرهای هاله مهار رشد (۶/۸ الی ۱۱/۳ نانومتر) برای نانوذرات پلیمری بدون آنتی بیوتیک مشاهده شد (جدول ۲).

قطر ناحیه مهار رشد نیز در حضور نانوذرات تنها، آنتی بیوتیک تنها و نانوذرات حامل آنتی بیوتیک بر علیه سوش های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین اندازه گیری شد. هاله عدم رشد در حضور هیچ کدام از نمونه ها برای سوش بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نشد. در مورد سوش های استاندارد و بالینی

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد (میلی متر) نانو ذرات و آنتی بیوتیک انکپسوله شده در نانو ذرات در مقایسه با آنتی بیوتیک آزاد

نانوذره + آنتی بیوتیک		آنتی بیوتیک		نانو ذرات		باکتری
.	سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853
.	سودوموناس آئروژینوزا
۱۷/۵ ± ۰/۴	۱۴ ± ۰/۸	۱۳/۳ ± ۰/۵	۸/۳ ± ۰/۵	۷/۷ ± ۰/۵	۱۱/۳ ± ۰/۵	اشرشیا کلی* ATCC 25922
۱۷/۳ ± ۰/۵	۱۳/۳ ± ۰/۵	۱۳/۳ ± ۰/۵	۸/۳ ± ۰/۵	۸/۳ ± ۰/۵	۱۱/۳ ± ۰/۵	اشرشیا کلی
۲۳/۷ ± ۰/۵	۲۱ ± ۰/۸	۲۰/۸ ± ۰/۲	۱۰/۸ ± ۰/۲	۱۱/۳ ± ۰/۵	۱۱/۳ ± ۰/۵	استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین*
۲۳/۳ ± ۰/۵	۲۰/۸ ± ۰/۲	۲۰/۸ ± ۰/۲	۱۰/۸ ± ۰/۲	۱۰/۸ ± ۰/۲	۱۰/۸ ± ۰/۲	ATCC 25932
۱۳ ± ۰/۲	.	.	.	۶/۷ ± ۰/۲	۶/۷ ± ۰/۲	استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین
۱۲/۵ ± ۰/۴	.	.	.	۶/۸ ± ۰/۲	۶/۸ ± ۰/۲	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*
						ATCC 33591
						استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

*: سویه استاندارد

بحث

تحقیقات علمی نشان داده است که بسیاری از مواد عالی در ابعاد نانو و به صورت نانو ذره خواص ذاتی ضد میکروبی قوی دارند و برخی از آن‌ها حتی می‌توانند با مکانیسم‌های مقاومت موجود در میکروارگانیسم‌ها مقابله کنند. بنابراین در این مطالعه آموکسی سیلین در نانو ذرات پلیمری کیتوزان-آلژینات-انکپسوله و اثرات ضدباکتریایی آن با آموکسی سیلین در شکل آزاد مقایسه شد. نتایج نشان داد که نانو ذرات بدون دارو و نانو ذرات پلیمری انکپسوله شده با آموکسی سیلین به ترتیب دارای اندازه متوسط ۷۳ و ۹۶ نانومتر و پتانسیل زتای حدود ۲۲+ تا ۵۲+ میلی ولت بودند. نانو ذرات پلیمری به تنهایی بر علیه همه سوش‌های مورد بررسی به جزء سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر ضد باکتریایی بودند. اما نانو ذرات انکپسوله شده با آموکسی سیلین در مقایسه با آموکسی سیلین تنها و همچنین نانو ذرات بدون دارو دارای اثر ضدباکتریایی قوی‌تری بودند. اندازه در حدود ۱۰۰ نانومتر و کم‌تر این امکان را فراهم می‌کند که نانو ذره از طریق رگ‌های خونی و عبور از منافذ موجود در دیواره اپیتلیال به بافت نفوذ کند که این امر به عنوان یک مزیت برای نانو ذره جهت دارورسانی محسوب می‌شود (۲۰).

بیشترین اثر ضدباکتریایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و کم‌ترین اثر بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مشاهده شد. به طوری که MIC نانو ذرات بدون دارو بر علیه سوش‌های بالینی و استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب ۴۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این در حالی است که محققان دیگر MIC این نانو ذرات پلیمری با اندازه متوسط ۲۱۴ نانومتر را تقریباً سه برابر نانو ذرات به دست آمده توسط ما تعیین کرده‌اند (۲۱). علی و همکاران نیز MIC این نانو ذرات با میانگین اندازه ۱۱۵ نانومتر را ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کرده‌اند که ۲/۵ برابر مقدار تعیین شده در

آزمایشات ما است (۲۲). در مورد سویه‌های استاندارد اشرشیا کلی (ATCC 25922) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) نیز MIC به دست آمده توسط ما به ترتیب ۱۶۰ و ۲۵۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که دیویا و همکاران مقادیر ۱۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای این دو باکتری گزارش کرده‌اند (۲۳). در مطالعه انجام شده توسط کی و همکارانش، نانو ذرات کیتوزان سنتز شده با اندازه متوسط ۴۰ نانومتر، فعالیت ضد میکروبی قوی بر علیه باکتری‌های مختلف نشان دادند، به طوری که MIC این نانو ذرات بر علیه اشرشیا کلی ATCC 25922، ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر یعنی بسیار کم‌تر از مقادیر به دست آمده توسط ما بود (۲۴). میزان فعالیت ضد باکتریایی متفاوتی که نانو ذرات پلیمری یکسان بر علیه باکتری‌های مورد بحث از خود نشان می‌دهند می‌تواند به دلیل ویژگی‌های متفاوت این نانو ذرات هم چون اندازه، مورفولوژی و میزان پتانسیل زتای آن‌ها باشد (۲۷-۲۵).

کاتاس و همکاران اثر اندازه نانو ذرات کیتوزان را بر میزان فعالیت ضدباکتریایی این نانو ذرات نشان داده‌اند. در مطالعه آن‌ها مشخص شد که کاهش اندازه نانو ذرات کیتوزان از ۷۰۰ به ۴۰۰ نانومتر باعث بیش از ده برابر افزایش در میزان فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی می‌شود. این افزایش اثر ضد میکروبی می‌تواند به علت افزایش نسبت سطح به حجم ذرات کوچک‌تر و در نتیجه افزایش سطح تماس نانو ذرات با سلول باکتری و اعمال اثر مهارتی بیشتر باشد (۲۸).

از طرف دیگر نتایج ما نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات انکپسوله شده با آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در مقایسه با آنتی بیوتیک به شکل آزاد بر علیه همه باکتری‌های مورد آزمایش در این مطالعه قوی‌تر (۱/۱۴ تا ۲/۷ برابر) بود. با توجه به جستجوهای انجام شده در منابع علمی، مطالعه در مورد بررسی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات کیتوزان

نفوذپذیری دیواره غشاء سلولی و در نتیجه، تراوش بخشی از الکترولیت‌ها و پروتئین‌های داخل سلول به بیرون شود که نتیجه آن لیز سلول باکتری و مرگ آن خواهد بود. بنابراین اثربخشی بیشتر آموکسی سیلین نانوفرموله در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد بر علیه باکتری‌های مورد آزمایش در این مطالعه به خصوص بر روی استافیلوکوکوس مقاوم به آنتی بیوتیک را می‌توان به دلیل ویژگی ضد میکروبی ذاتی کیتوزان دانست (۳۰).

با این وجود برای استفاده از این نانوفرمولاسیون در مبارزه با بیماری‌های عفونی راهی طولانی در پیش است، هم- چون: بررسی سمیت این نانوذرات، کینتیک رهایش دارو، پایداری نانوحامل در شرایط برون و درون تنی و تعیین مکانیسم دقیق عملکرد این نانوذرات بر روی باکتری‌های مختلف.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه امید است که با انکپسوله کردن آموکسی سیلین در نانو ذرات پلیمری بتوان باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی این آنتی‌بیوتیک بر علیه برخی از باکتری‌های شایع در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مانند اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص نوع مقاوم آن به آنتی‌بیوتیک شد. به عبارت دیگر، نانو فرموله کردن آموکسی سیلین قابلیت غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دارد، ولی برای تعیین مکانیسم آن نیاز به تحقیقات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از گروه زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این تحقیق کمال تشکر را دارند.

انکپسوله شده با آنتی بیوتیک آموکسی سیلین بر روی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین پیدا نشد. ولی در تحقیق انجام شده توسط کانچانا و همکاران، آموکسی سیلین در نانوذرات کیتوزان انکپسوله شده و اثرات ضد باکتریایی آن بر علیه اشرشیا کلی و کلبسیلا نومونیا بررسی شده است. نتایج این محققان نیز حاکی از اثر بخشی بیشتر نانوذرات حاوی آموکسی سیلین در مقایسه با آنتی بیوتیک بدون پوشش نانوذره‌ای بود، به طوری که میزان MIC نانوذرات تنها بر علیه اشرشیا کلی ۴ میکروگرم بر میلی لیتر و نانوذرات حاوی آموکسی سیلین ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۲۹).

گرچه مکانیسم دقیق فعالیت ضد میکروبی کیتوزان هنوز شناخته نشده است، ولی با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و تحقیقات سایرین می‌توان علت اثر ضد باکتریایی قوی‌تر نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین را در مقایسه با داروی آزاد، اثر هم افزایی کیتوزان و آموکسی سیلین دانست. آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی با اتصال به جایگاه فعال پروتئین متصل شونده به پنی سیلین از سنتز دیواره سلولی باکتری جلوگیری کرده و در نتیجه باعث مرگ آن در اثر لیز سلولی می‌شوند.

از دیگر مکانیسم‌های مهم مقاومت به آنتی بیوتیک-ها، کاهش جذب و افزایش جریان خروجی داروها از باکتری‌ها است. غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی نیز به عنوان مانع اضافی در مقابل جذب برخی آنتی بیوتیک‌های آب‌گریز مانند بتالاکتام‌ها عمل می‌کند. نانوحامل‌های پلیمری مانند کیتوزان می‌توانند از آنتی بیوتیک‌ها در مقابل تجزیه آنزیمی محافظت کنند و با میان‌کنش با غشاء پلاسمایی باکتری، پمپ‌های انتقال دهنده دارو را به صورت اشباع در آورند.

علاوه بر آن نانوحامل پلی کاتیونی مانند کیتوزان می‌تواند از طریق میان‌کنش الکتروستاتیکی با بارهای منفی موجود بر روی غشاء باکتری باعث ایجاد اختلال در

12. Türelı NG, Torge A, Juntke J, Schwarzd BC, Schneider-Daum N, Türelia AE, et al. Ciprofloxacin-loaded PLGA nanoparticles against cystic fibrosis *P. aeruginosa* lung infections. *Eur J Pharm Biopharm* 2017; 117: 363-371.

13. NCCLS 2004. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2004.

14. Calvo P, Lopez CR, Jato JLC, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Poly Sci* 1997; 63: 125-132.

15. Douglas KL, Tabrizian MJ. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J Biomater Sci Polymer Ed* 2005; 16: 43-56.

16. Mahon C R, Manoselis G, Textbook of Diagnostic Microbiology, Chapter 3, 2nd edition WB. Saunders Company; 2000. 62-95.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S22; CLSI: Wayne, PA, USA, 2012.

18. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: Matthew AW, Franklin RC, William AC, Micheal ND, George ME, David WH, et al., editors. Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A9. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. 16-34.

19. Wang K., He Z. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int J Pharm* 2002; 244(1): 117-126.

20. Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids*

منابع

1. Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 2006; 34(5 Suppl 1):S3-10.

2. Hoseinzadeh E, Makhdoumi P, Taha P, Hossini H, Stelling J, Kamal MA et al. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Curr Drug Metab* 2017; 18(2): 120-128.

3. Xiong M-H, Bao Y, Yang X-Z., Zhu Y-H, Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014; 78: 63-76.

4. Lecaroz C, Gamazo C, Blanco-Prieto MJ. Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 3296-3302.

5. Toti US, Guru BR, Hali M, McPharlin CM, Wykes SM, Panyam J, et al. Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 6606-6613.

6. Zhu X, Radovic-Moreno AF, Wu J, Langer R, Shi J. Nanomedicine in the Management of Microbial Infection -Overview and Perspectives. *Nano Today* 2014; 9(4): 478-498.

7. Yogita P. Nanoparticles: Smart drug delivery systems. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci* 2018; 11(3): 555815-17.

8. Han J, Zhao D, Li D, Wang X, Jin Z, Zhao K. Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. *Polymers* 2018, 10(1):1-14.

9. Lecaroz C, Gamazo C, Blanco PMJ. Nanocarriers with Gentamicin to Treat Intracellular Pathogens. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 3296-02.

10. Bosnjakovic A, Mishra MK, Ren W, Yunus EK. Poly(amidoamine) dendrimer erythromycin conjugates for drug delivery to macrophages involved in periprosthetic inflammation. *Nanomed* 2011; 7: 284-94.

11. Imbuluzqueta E, Gamazo C, Ariza J, Blanco PMJ. Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections. *Frontiers Biosci* 2010; 15: 397-17.

- and Surfaces B: Biointerfaces. 2005; 44(2): 65-73.
21. Costa E, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro P, Veiga M, et al. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mater Sci Eng C* 2017;79:221-6.
22. Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydr Polym* 2011; 83(2):438-46.
23. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha MS. Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity. *Fibers and Polymers* 2017; 18(2): 221-230.
24. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004; 339(16):2693-700.
25. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144(1): 51-63.
26. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 2011; 27(7): 4020-8.
27. Penders J, Stolzoff M, Hickey DJ, Andersson M, Webster T. Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 2457-2468.
28. katas H, Mohamad A, Zin NN. Effects of Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles on Antibacterial Activity against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Journal of Medical Sciences* 2011; 11: 192-197.
29. Kanchana M, Malathy BR, Jeevitha D, Reema O, Sonia S. Synthesis and evaluation of amoxicillin and cephalexin encapsulated chitosan nanoparticles against urinary tract infection causing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *World journal of pharmaceutical research* 2014; 3(2): 2512-2526.
30. Li J, Wu Y, Zhao L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. *Carbohydr Polym* 2016; 148: 200-205.