

Comparison of Antimicrobial Activity of Chitosan Nanoparticles Loaded with Amoxicillin with Free Amoxicillin against Some Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Asma Toraji¹, Mahnaz Hadizadeh^{2*}, Fahimeh Nemati Mansoor¹

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

²Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Mahnaz Hadizadeh;
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.

Email:
hadizadeh@irost.ir

Received: 23 Jul, 2017
Accepted: 21 Jan, 2018

Abstract

Background and Objectives: Antibiotic resistance has prepared the way for substituting new therapeutic methods. Studies have indicated that nanoformulated antimicrobial agents have better therapeutic effects. In this study, the antimicrobial activity of chitosan nanoparticles loaded with amoxicillin (ACNs), was assessed in comparison with free amoxicillin against some Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Methods: In this experimental study, the nanoparticles were prepared using the ionotropic gelation technique. The resulting nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The antibacterial activity of amoxicillin and nanoparticles against standard and clinical strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis*, was investigated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and inhibition zone diameters. Data were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

Results: The size of chitosan nanoparticles (CNs) and ACNs was 88 and 106 nm, respectively. ACNs showed higher antibacterial activity compared to amoxicillin and CNs without drug as determined by the smaller MIC (0.375mg/ml) and MBC (2 mg/ml) values and larger zones of inhibition (28mm). The highest and the lowest sensitivity to nanoparticles, were observed for *Enterococcus faecalis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the nanoformulation of amoxicillin may be an appropriate strategy to increase its therapeutic effects. However, precise clinical studies are required for its confirmation.

Keywords: Amoxicillin; Nanoparticles; Anti-bacterial agents.

مقایسه فعالیت ضد میکروبی آموکسی سیلین بار گذاری شده در نانوذرات کیتوزان با آموکسی سیلین آزاد بر علیه برخی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

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

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت آنتی بیوتیکی، زمینه را برای جایگزینی روش های درمانی جدید فراهم کرده است. مطالعات نشان می دهند عوامل ضد باکتریایی در حالت نانوفرموله، اثرات درمانی بهتری دارند. در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی آموکسی سیلین بار گذاری شده در نانوذرات کیتوزان در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد بر علیه برخی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، نانوذرات با روش ژلی شدن یونی تهیه گردید. نانوذرات حاصله توسط پراکندگی نور دینامیکی، میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مشخصه یابی شد. فعالیت ضد باکتریایی آموکسی سیلین و نانوذرات بر علیه سوش های استاندارد و بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین، اشرشیاکلی و انتروکوکوس فکالیس* با تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد، حداقل غلظت کشنده و قطر ناحیه مهار رشد بررسی گردید. داده ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شدند.

یافته ها: اندازه نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان بار گذاری شده با آموکسی سیلین به ترتیب ۸۸ و ۱۰۶ نانومتر تعیین شد. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان بار گذاری شده با آموکسی سیلین، بیشتر از آموکسی سیلین و نانوذرات کیتوزان بدون دارو بود و با مقادیر کمتر حداقل غلظت مهار کننده رشد (۰/۳۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و حداقل غلظت کشنده (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) و نواحی بزرگتر مهار (۲۸ میلی متر) تعیین گردید. همچنین بیشترین و کمترین حساسیت نسبت به نانوذرات به ترتیب مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین* بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد نانوفرموله کردن آموکسی سیلین ممکن است استراتژی مناسبی برای افزایش اثرات درمانی آن باشد، اما برای تأیید آن، مطالعات دقیق بالینی باید انجام گیرد.

کلید واژه ها: آموکسی سیلین؛ نانوذرات؛ عوامل ضد باکتریایی.

گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
گروه زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مهناز هادی زاده؛ گروه زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

hadizadeh@irost.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Toraji A, Hadizadeh M, Nemati Mansoor M. Comparison of antimicrobial activity of chitosan nanoparticles loaded with amoxicillin with free amoxicillin against some gram positive and gram negative bacteria. Qom Univ Med Sci J 2018;12(7):21-31. [Full Text in Persian]

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی، یکی از معضلات بزرگ در حوزه پزشکی محسوب می‌شوند. سازمان بهداشت جهانی میزان ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی را ۵-۱۰٪ بیماران بستری شده در بیمارستان‌های کشورهای توسعه یافته و بیش از ۴۰٪ در کشورهای در حال توسعه اعلام کرده است (۱). عفونت‌های بیمارستانی می‌توانند توسط میکروارگانیسم‌های مختلفی ایجاد شوند، اما باکتری‌ها در این امر نقش بیشتری داشته و مسئول ۹۰٪ عفونت‌های بیمارستانی هستند (۲). اگرچه با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها، انقلابی در تاریخ پزشکی و درمان عفونت‌های باکتریایی ایجاد شد، اما تقریباً حدود یک قرن بعد از معرفی آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان برخی بیماری‌های عفونی مجدداً با مشکلات جدی مواجه گردید. دلیل اصلی این مسئله، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بوده که به صورت یک اپیدمی جهانی به سرعت در حال افزایش است (۳). علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بازده پایین انتقال دارو به محل مورد نظر به دلیل مواجهه با سدهای زیستی، همچنین ناپایداری و کاهش فعالیت ترکیبات ضد میکروبی، از دیگر عوامل مسئله‌ساز در درمان بیماری‌های عفونی محسوب می‌شوند (۴، ۵).

اخیراً، استفاده از نانو سیستم‌ها جهت تحویل هدفمند دارو، از جمله راهکارهای موفقیت آمیزی بوده که برای غلبه بر این مشکلات مورد توجه قرار گرفته است (۶). نانوذرات دارو دارای خواص فیزیوشیمیایی منحصر به فردی همچون اندازه بسیار کوچک، نسبت سطح به حجم زیاد و واکنشگری سطحی بالا می‌باشند (۷). این ویژگی‌ها مزایای زیادی را به آن‌ها به عنوان سیستم‌های مؤثر انتقال و تحویل دارو اعطا می‌کند؛ از جمله آن‌ها می‌توان به انتقال هدفدار دارو به بافت مورد نظر، کنترل حلالیت و رهایش دارو اشاره کرد که در نهایت، به عملکرد بهتر دارو و کاهش اثرات جانبی آن منجر خواهد شد. علاوه بر این، نانوذرات بارگذاری شده با مواد ضد میکروبی، قابلیت نفوذ بهتری از طریق اندوسیتوز به سلول‌ها داشته و می‌تواند دارو را برای درمان عفونت‌های درون سلولی به طور کنترل شده آزاد سازد (۸).

تحقیقات گسترده‌ای در زمینه انتقال آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطانی به وسیله سیستم‌های حامل نانویی انجام شده است (۹-۱۲).

کیتوزان یکی از جالب‌ترین و شناخته شده‌ترین پلیمرهای طبیعی جهت ساخت نانوحامل‌های دارویی می‌باشد. این امر به برخی خواص ایده آل آن مانند زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، عدم سمیت و ارزان بودن مربوط می‌شود. کیتوزان، پلی ساکارییدی کاتیونی است که از استیل زدایی کیتین در شرایط قلیایی به دست می‌آید. کیتین را می‌توان به سهولت از پوسته سخت پوستانی مانند خرچنگ، میگو و یا دیواره سلولی برخی قارچ‌ها به دست آورد (۱۳). علاوه بر خواص ذکر شده، فعالیت ضد میکروبی کیتوزان بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها (مانند باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها) گزارش شده است (۱۴).

از طرف دیگر، آموکسی سیلین، آنتی‌بیوتیکی نیمه سنتزی از دسته بتالاکتام‌ها بوده که در درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های باکتریایی کاربرد دارد (۱۵). آموکسی سیلین با اتصال به پروتئین متصل شونده به پنی سیلین باعث مهار فعالیت ترانس‌پپتیداز و جلوگیری از ساخت پپتید و گلیکان‌های دیواره سلولی شده که نتیجه آن مرگ باکتری به دلیل لیز آن خواهد بود (۱۶)، اما آموکسی سیلین با وجود داشتن طیف ضد باکتریایی وسیع، نیمه عمر زیستی کوتاهی در حدود ۶۰ دقیقه دارد. این امر تجویز مکرر آن را برای حفظ غلظت مؤثرش اجتناب ناپذیر می‌سازد که علاوه بر اثرات جانبی، خطر ایجاد مقاومت باکتریایی نیز در این شرایط وجود دارد (۱۷). گرچه مطالعات متعددی در خصوص تهیه نانوذرات مختلف جهت بارگذاری انواع مواد ضد میکروبی انجام شده، ولی تاکنون پژوهشی در خصوص فعالیت ضد میکروبی آموکسی سیلین به شکل آزاد در مقایسه با شکل نانوفرموله شده آن به وسیله پلیمر طبیعی کیتوزان بر روی پاتوژن‌های شایع بیمارستانی انجام نشده است؛ بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین بر علیه سوش‌های باکتریایی مختلف و مؤثر در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و پاسخ دادن به این سؤال که آیا نانوفرموله کردن آموکسی سیلین می‌تواند باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی و در نتیجه، کاهش دوز مصرفی و اثرات جانبی آن شود یا خیر؟ انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه نیمه تجربی، ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین، *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* از بیماران بیمارستان قلب تهران در سال ۱۳۹۵، جداسازی و با روش‌های استاندارد میکروبی شناسی تعیین هویت شدند. علاوه بر این، از سوش‌های استاندارد نیز برای کنترل کیفی شرایط آزمایش استفاده شد (۱۸).

برای سنتز نانوذرات از روش ژلی شدن یونی استفاده گردید. ابتدا ۳۰ میلی‌گرم کیتوزان در ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۱٪ حل و pH روی ۵ تنظیم شد، سپس محلول ۱/۰٪ تری‌پلی‌فسفات سدیم (TPP) با pH مساوی ۴، به نسبت ۱ به ۳ به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید. محلول کلئیدی حاصل در دمای اتاق (به مدت ۴۵ دقیقه، با دور ۸۰۰ دور در دقیقه) استیر شد، سپس عمل سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. پلیت‌ها پس از جمع‌آوری در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک شدند. برای بارگذاری آموکسی‌سیلین در نانوذرات، ۲۲۵ میلی‌گرم آموکسی‌سیلین در ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۱/۰٪ کیتوزان حل گردید. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر TPP ۱/۰٪ به ۳۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان حاوی آموکسی‌سیلین به صورت قطره‌قطره اضافه و بقیه مراحل مانند روش تهیه نانوذرات کیتوزان اجرا شد. غلظت نهایی دارو، ۵/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (۱۹). اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات با روش پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering, DLS) به کمک دستگاه Nanozeta Sizer (ساخت شرکت Malvern) در طول موج ۶۳۳ نانومتر و با ضریب شکست ۱/۳۳ تعیین گردید. برای این منظور نانوذرات کیتوزان، همچنین نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی‌سیلین به طور جداگانه با آب ۲ بار تقطیر و ۱۰ بار رقیق، به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه، داخل سل دستگاه قرار گرفت و پتانسیل سطح و اندازه ذره به وسیله دستگاه تعیین گردید.

مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، مدل MIRA\TESCAN) بررسی شد؛ بدین ترتیب که نانوذرات کیتوزان، همچنین نانوذرات بارگذاری شده با آموکسی‌سیلین حاصله به نسبت ۱:۱۰۰ با آب ۲ بار تقطیر

رقیق شده و با استفاده از حمام اولتراسونیک سونیکه شد. ورقه آلومینیومی کاملاً صاف با ابعاد ۲ در ۲ برش داده شد و با الکل کاملاً تمیز، در دمای محیط خشک گردید. در نهایت، از محلول رقیق شده نانوذرات کیتوزان و نانوذرات حاوی آنتی‌بیوتیک، یک قطره بر روی ورقه آلومینیومی ریخته شد و اجازه داده شد تا قطره در دمای اتاق خشک گردد، سپس نمونه با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده شد و اندازه و مورفولوژی نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی با قدرت بزرگنمایی ۵۰۰۰۰ برابر مورد ارزیابی قرار گرفت.

طیف‌های FTIR با استفاده از اسپکترومتر (FTIR-8400 مدل Shimadzu) در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ برسانتی‌متر بررسی شدند. برای تهیه نمونه، ۵ میلی‌گرم از نانوذره کیتوزان، نانوکیتوزان بارگذاری شده با دارو و دارو و کیتوزان به صورت جداگانه با پودر پتاسیم بروماید مخلوط، سپس به کمک دستگاه پرس به شکل قرص درآمد. قرص حاصله در داخل سل دستگاه قرار گرفت و طیف FTIR آن ثبت گردید.

آزمایش‌های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی و اسپکترومتري FTIR، در سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران و آزمایش‌های تعیین زتا پتانسیل و DLS در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران انجام شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) نانوذرات و آموکسی‌سیلین بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه، با استفاده از روش میکروبراث دایلوژن تعیین شد؛ بدین ترتیب که در ۱۰ چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث (مرک آلمان) ریخته شد، سپس به چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات کیتوزان (۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی‌سیلین (۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و یا آموکسی‌سیلین (۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) افزوده و پس از مخلوط کردن محتویات چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. این عمل تا آخرین چاهک ادامه یافت و در نهایت، از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد، سپس به همه چاهک‌ها ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی افزوده شد؛ به طوری که غلظت نهایی باکتری در هر چاهک حدود 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلنی در یک میلی‌لیتر بود.

پاستور استریل، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی محیط کشت ایجاد شد. در ادامه، نانوذرات کیتوزان، آموکسی سیلین و نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین، به مقدار ۵۰ میکرولیتر داخل هر یک از چاهک‌ها ریخته شد، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، گرمخانه‌گذاری شدند و تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید.

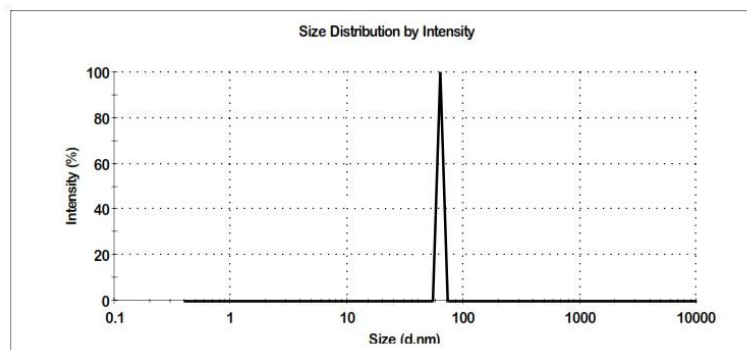
یافته‌ها

براساس نتایج حاصل از آنالیز DLS، نانوذرات کیتوزان بدون دارو و نانوذرات بارگذاری شده با آموکسی سیلین به ترتیب دارای اندازه متوسط ۸۸ و ۱۰۶ نانومتر بودند و میزان پراکندگی هر دو خیلی کم و در حد صفر بود (نمودار شماره ۱ و ۲).

یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی (فاقد عامل ضد میکروبی)، در نظر گرفته شد. بعد از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، اولین چاهکی که از رشد باکتری در آن جلوگیری شد، به‌عنوان MIC معرفی گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC) نیز ۱۰ میکرولیتر از چاهک‌های شفاف برداشته و به محیط مولر هینتون آگار انتقال یافت و اولین رقتی که پس از ۲۴ ساعت باعث از بین رفتن ۹۹/۹٪ باکتری گردید، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

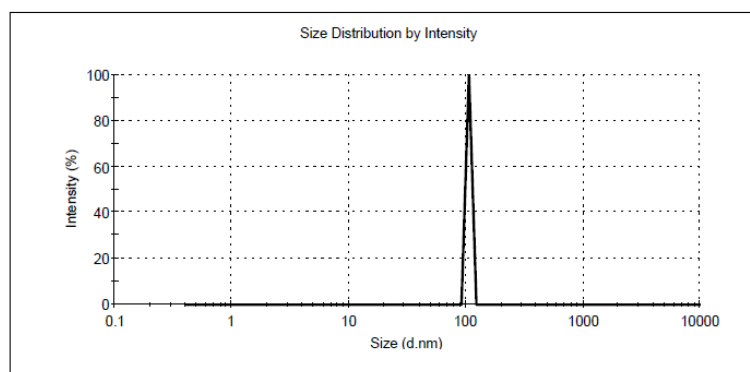
برای تعیین قطر هاله مهار رشد باکتری، از روش انتشار چاهک استفاده گردید؛ بدین ترتیب که با استفاده از سوپ استریل از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس با استفاده از انتهای پیپت

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 4290	Peak 1: 88.0	100.0	0.00
Pdl: 1.000	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Intercept: 1.80	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



نمودار شماره ۱: توزیع اندازه نانوذرات کیتوزان.

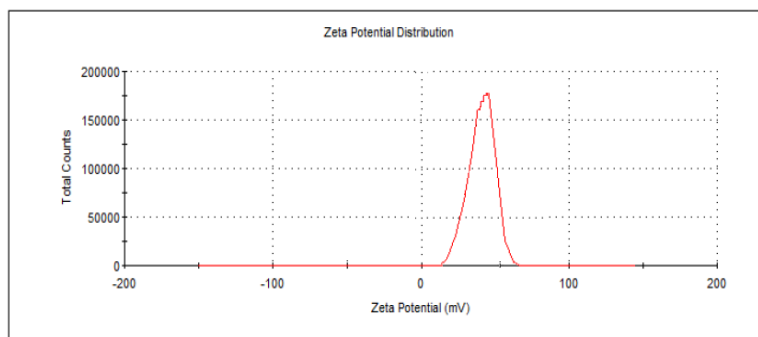
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 4480	Peak 1: 106	100.0	1.35e-6
Pdl: 1.000	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Intercept: 1.09	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



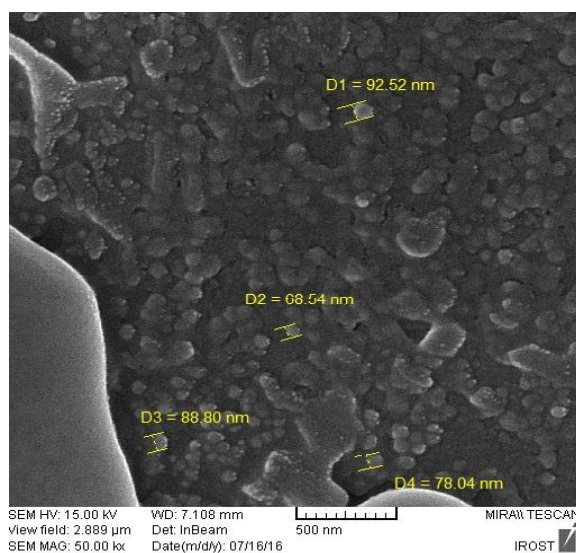
نمودار شماره ۲: توزیع اندازه نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین.

نمودار شماره ۳، بارسطحی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین را نشان می‌دهد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نیز ظاهر کروی و اندازه نانومتری ذرات به دست آمده را تأیید می‌کند (شکل).

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 39.9	Peak 1: 39.9	100.0	9.60
Zeta Deviation (mV): 9.32	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 2.99	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



نمودار شماره ۳: توزیع بارسطحی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین.



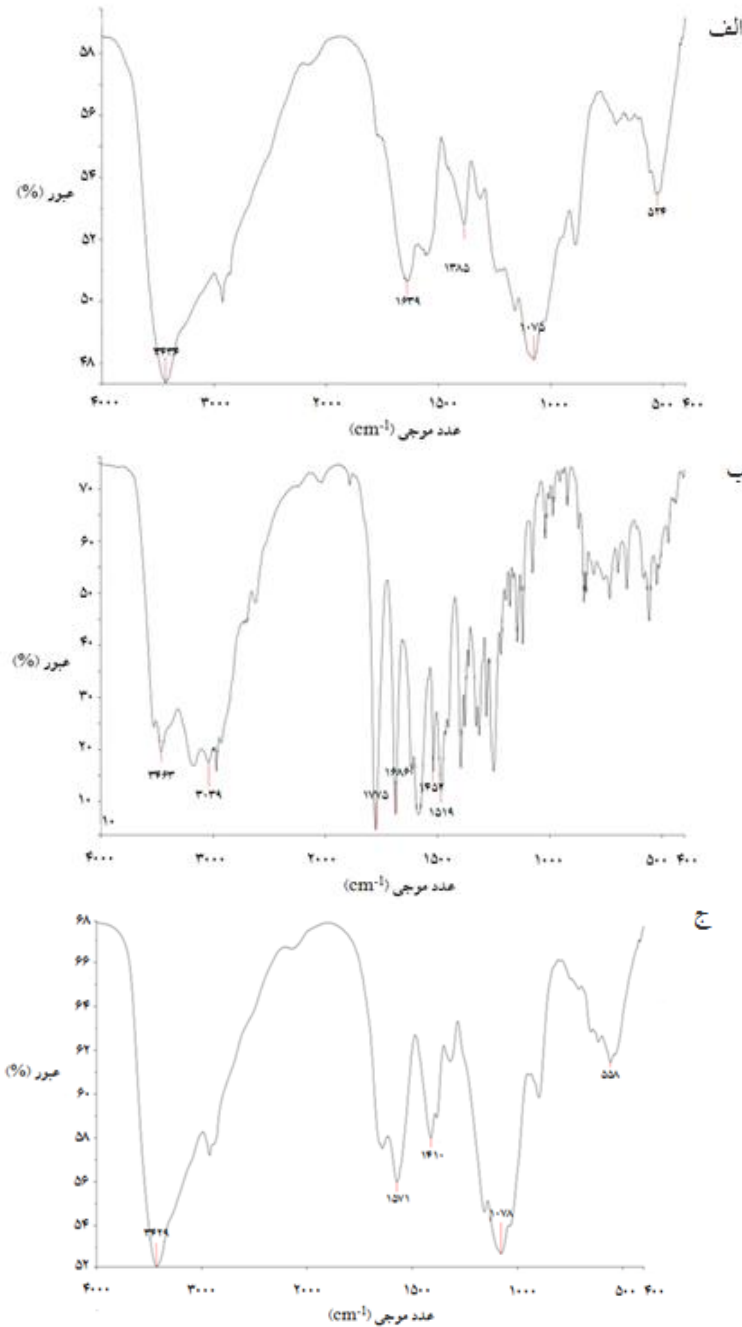
شکل: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین.

همچنین مشخصه‌های طیف FTIR آموکسی سیلین تنها شامل جذب در عدد موجی ۳۴۶۳ و ۳۰۳۹ بر سانتی‌متر به ترتیب مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوندهای گروه‌های آمین، گروه‌های هیدروکسیل و گروه CH حلقه بنزنی آموکسی سیلین می‌باشد. پیک‌های مشاهده شده در ۱۷۷۶ بر سانتی‌متر نیز مربوط به حلقه بتالاکتام، ۱۶۸۶ بر سانتی‌متر مربوط به پیوند CO با NH، ۱۵۱۹ بر سانتی‌متر مربوط به پیوند C=C حلقه بنزن و ۱۴۵۲ بر سانتی‌متر

طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) نانوذرات کیتوزان تنها، آموکسی سیلین تنها و نانوذرات بارگذاری شده با آموکسی سیلین در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. ظاهر شدن دو پیک در ۱۶۳۹ و ۱۳۸۵ بر سانتی‌متر در طیف نانوذرات کیتوزان مربوط به گروه خمشی NH_4^+ و نشان‌دهنده میانکنش بین گروه‌های آمونیوم کیتوزان با گروه‌های فسفات TPP و تشکیل نانوذرات کیتوزان می‌باشد (نمودار شماره ۴: الف)

طول موج‌های کوتاه‌تر و پیک‌های ۱۳۸۵، ۸۸۸ و ۵۲۴ برسانتی‌متر اندکی به سمت طول موج‌های بلندتر شیفت پیدا کردند که نشان‌دهنده تغییر در قدرت پیوندهای مربوطه در اثر میانکشی بین آموکسی با نانوذرات کیتوزان است (نمودار شماره ۴: ج).

مربوط به پیوند ارتعاشی CN در مولکول آموکسی سیلین است (نمودار شماره ۴: ب) (۲۱). در طیف نانوذرات بار گذاری شده با آموکسی سیلین، هیچ پیک اضافی مربوط به دارو مشاهده نشد و تنها پیک‌های ۳۴۶۳ و ۱۶۳۹ برسانتی‌متر، اندکی به سمت



نمودار شماره ۴: طیف‌های FTIR نانوذرات کیتوزان (الف)، آموکسی سیلین (ب) و نانوذرات کیتوزان بار گذاری شده با آموکسی سیلین (ج).

آموکسی سیلین آزاد، قوی‌تر بوده است. همچنین کوچکترین MIC و MBC در مقابل سوش‌های استاندارد و بالینی *انتروکوکوس فکالیس* و بزرگترین آن‌ها برای *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به دست آمد (جدول شماره ۱).

تعیین MIC و MBC نانوذرات کیتوزان نشان داد این ذرات بر علیه تمام سوش‌های مورد آزمایش در این مطالعه دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند. نتایج نشان داد فعالیت ضد میکروبی آموکسی سیلین بار گذاری شده در نانوذرات کیتوزان در مقایسه با

جدول شماره ۱: میزان حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نانوذرات کیتوزان، آموکسی سیلین و نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری	نانوذرات کیتوزان		آموکسی سیلین		نانوذرات بارگذاری شده با آموکسی سیلین	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین*: ATCC 25932	۵۰	۱۰۰	۲	۴	۱	۲
استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین	۵۰	۱۰۰	۲	۴	۱	۴
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*: ATCC 33591	۱۰۰	۲۰۰	۸	۳۲	۶	۱۶
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین	۱۰۰	۲۰۰	۸	۳۲	۶	۲۴
اشرشیاکلی*: ATCC 25922	۸۰	۱۶۰	۴	۸	۲	۴
اشرشیاکلی	۸۰	۱۶۰	۴	۱۶	۲	۶
انتروکوکوس فکالیس*: ATCC 29212	۲۰	۴۰	۰/۵	۴	۰/۳۷۵	۱
انتروکوکوس فکالیس	۲۰	۴۰	۱	۴	۰/۳۷۵	۲

* نوع استاندارد سوش

و انتروکوکوس فکالیس، بزرگترین قطر هاله عدم رشد در مقابل نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین، سپس در مقابل آموکسی سیلین آزاد به دست آمد. کوچکترین قطر هاله مهار رشد نیز مربوط به نانوذرات کیتوزان بدون دارو (۱۵-۹ نانومتر) بود (جدول شماره ۲).

کمترین قطر هاله عدم رشد برای سوش بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مشاهده گردید که به ترتیب ۷، صفر و ۱۶ میلی متر بود. به همین ترتیب در مورد سوش های استاندارد و بالینی استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین، اشرشیاکلی

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین در مقایسه

با آموکسی سیلین آزاد بر روی باکتری‌های مورد آزمایش

باکتری	نانوذرات کیتوزان	آموکسی سیلین	نانوذرات بارگذاری شده با آموکسی سیلین
استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین*: ATCC 25932	۱۲±۰/۲	۲۲±۰/۵	۲۵±۰/۲
استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین	۱۲±۰/۵	۲۱±۰/۵	۲۵±۰/۲
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*: ATCC 33591	۷±۰/۶	۰	۱۷±۰/۲
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین	۷±۰/۶	۰	۱۶±۰/۷
اشرشیاکلی*: ATCC 25922	۹±۰/۴	۱۷±۰/۵	۲۱±۰/۸
اشرشیاکلی	۱۰±۰/۲	۱۷±۰/۹	۲۰±۰/۷
انتروکوکوس فکالیس*: ATCC 29212	۱۴±۰/۴	۲۳±۰/۴	۲۷±۰/۶
انتروکوکوس فکالیس	۱۵±۰/۵	۲۴±۰/۵	۲۸±۰/۸

بحث

شایع دخیل در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بررسی گردید. براساس نتایج مطالعه حاضر، نانوذرات کیتوزان به دست آمده با اندازه متوسط ۸۸ نانومتر، به تنهایی بر علیه همه سوش های مورد بررسی دارای اثر ضدباکتریایی بود. همچنین مقادیر MIC این نانوذرات بر علیه سوش های بالینی و استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد؛ در حالی که Costa و همکاران، MIC نانوذرات کیتوزان با اندازه متوسط ۲۱۴ نانومتر را بر علیه

آنتی بیوتیک‌ها، داروهای ارزشمندی جهت بهبود بسیاری از بیماری‌های عفونی هستند، ولی استفاده نابجا از آنها باعث افزایش مقاومت باکتریایی شده است. بنابراین جایگزینی روش‌های درمانی جدید، از جمله نانوفرموله کردن آنتی بیوتیک‌ها می تواند باعث گشایش افق‌های نوینی در این زمینه شود. در مطالعه حاضر، آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در نانوذرات کیتوزان، بارگذاری و کاربرد این نانوفرمولاسیون بر علیه برخی باکتری‌های

در ارتباط با تهیه نانوذرات کیتوزان به صورت هوموپلیمر یا در کمپلکس با پلیمرها و ترکیبات دیگر نظیر آلژینات و هیارین تهیه و پس از بارگذاری آنتی بیوتیک آموکسی سیلین بر روی این ذرات، اثرات ضد میکروبی قوی تر آن‌ها در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد بر علیه هلیکوباکتریلوری گزارش گردید (۲۸). آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی مانند آموکسی سیلین، با اتصال به جایگاه فعال پروتئین متصل شونده به پنی سیلین، مانع سنتز دیواره سلولی باکتری و در نتیجه لیز آن می‌شوند، اما مکانیسم دقیق فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان هنوز مشخص نشده است؛ البته گمان می‌رود نانوذرات کیتوزان به علت اندازه بسیار کوچک خود، خیلی بهتر و راحت تر می‌تواند با غشای سلولی میانکنش برقرار کند و این میانکنش‌های الکتروستاتیکی، سرانجام در نفوذپذیری دیواره غشای سلولی اختلال ایجاد کرده که نتیجه آن تراوش بخشی از مواد داخل سلول به بیرون، همچنین جلوگیری از ورود مواد غذایی به داخل سلول است. از طرفی، نانوذرات کیتوزان با ورود به داخل سلول و برقراری پیوند با DNA، از سنتز RNA و در نتیجه تولید پروتئین‌های حیاتی سلول جلوگیری می‌کند (۲۹). بنابراین، کیتوزان با داشتن خاصیت ضدباکتریایی خود می‌تواند حداقل غلظت مهاری آموکسی سیلین را به خصوص در مقابل سویه مقاوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که امروزه یکی از عمده‌ترین مسائل در درمان بیماری‌های عفونی است، کاهش دهد. در نتیجه، دوز مصرفی آنتی بیوتیک و متعاقب آن اثرات جانبی نامطلوب دارو می‌تواند کاهش یابد. از دیگر مزایای کاربرد این نانوفرمولاسیون می‌توان به محافظت از دارو و جلوگیری از تجزیه آن، افزایش جذب دارو با تسهیل انتشار از طریق اپی تلیوم و افزایش توزیع درون سلولی دارو اشاره کرد که البته اثبات آن نیاز به تحقیقات بیشتری دارد (۳۰).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه تا حد قابل ملاحظه‌ای، اثر ضدباکتریایی قوی تر نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین را در شرایط برون تنی در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد نشان داد، اما برای اطمینان از اثربخشی و کارایی مناسب این نانوذرات، نیاز به مطالعه بیشتری در شرایط درون تنی می‌باشد.

همه نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (نوع حساس و مقاوم)، ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۲۲). اما در مطالعه دیگری، MIC این نانوذرات (۱۱۵ نانومتر) بر علیه این باکتری، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید (۲۳).

در این مطالعه MIC به دست آمده برای سویه‌های استاندارد *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب ۸۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود؛ در حالی که سلیمانی و همکاران مقادیر ۷۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر را برای این دو باکتری گزارش کردند (۲۴). نتایج متفاوت به دست آمده در خصوص فعالیت ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان می‌تواند به خواص متفاوت این نانوذرت که تحت شرایط آزمایشگاهی متفاوتی تهیه شده، مربوط باشد. در تحقیقات دیگری، تأثیر اندازه، میزان بارسطحی و سایر خصوصیات نانوذرات بر فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها ثابت شده است (۲۵، ۲۶). در آزمایش‌های انجام شده در مطالعه حاضر، پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان حاوی آموکسی سیلین با نانوذرات کیتوزان بدون دارو تفاوتی نداشت و هر دو مثبت و حدود ۴۰-۳۹ میلی ولت بود که نشانگر پایداری نانوذرات و امکان نگهداری طولانی آن می‌باشد. پتانسیل زتا که همان بار سطحی است، به طور عمده می‌تواند بر پایداری ذره در سوسپانسیون از طریق دافعه الکتروستاتیک بین ذرات تأثیرگذار باشد. مطالعه Honary و همکاران نشان داد نانوذرات با بار سطحی بالای ۳۰ میلی ولت، پایداری بوده که این مسئله از به هم چسبیدن ذرات جلوگیری کرده و منجر به افزایش پایداری آن‌ها می‌شود (۲۷).

در مطالعه حاضر فعالیت نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین آزاد بر علیه باکتری‌های فوق‌الذکر بررسی و مقایسه گردید؛ نتایج، حاکی از فعالیت قوی تر این نانوذرات در مقایسه با آنتی بیوتیک آزاد بود. با توجه به خاصیت ضد میکروبی ذاتی کیتوزان، اثر قوی تر نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین در مقایسه با داروی آزاد می‌تواند به دلیل تأثیر هم افزایی کیتوزان و آموکسی سیلین باشد. با توجه به جستجوهای انجام شده در منابع علمی، گزارشی مبنی بر ارزیابی عملکرد نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین بر روی *اشرشیاکلی*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یافت نشد؛ البته تعداد محدودی مطالعه

تشریح و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب (به شماره ۹۴۰۱۴۳۱۰) با حمایت بنیاد ملی علوم ایران (INSF) انجام شد.

References:

1. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015;5(7):509-14. Link
2. Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001;135(1):41-50. PubMed
3. Hawkey P. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008;62 (suppl_1):i1-i9. PubMed
4. Bosch F, Rosich L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* 2008;82(3):171-9. PubMed
5. Van Epps HL. René Dubos: Unearthing antibiotics. *J Exp Med* 2006;203(2):259. PMC
6. Sharma A, Kumar Arya D, Dua M, Chhatwal GS, Johri AK. Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opin Drug Deliv* 2012;9(11):1325-32. PubMed
7. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release* 2013;166(2):182-94.
8. Kim J-E, Shin J-Y, Cho M-H. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch Toxicol* 2012;86(5):685-700. PubMed
9. Gao P, Nie X, Zou M, Shi Y, Cheng G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *J Antibiot (Tokyo)* 2011;64(9):625-34. PubMed
10. Li L-L, Xu J-H, Qi G-B, Zhao X, Yu F, Wang H. Core-shell supramolecular gelatin nanoparticles for adaptive and "on-demand" antibiotic delivery. *ACS nano* 2014;8(5):4975-83. Link
11. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007;2(12):751-60. PubMed
12. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release* 2015;200:138-57. PubMed
13. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar drugs* 2015;13(3):1133-74. PubMed
14. Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 2009;19(3):241-7. Link
15. Rolinson GN. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(6):589-603. PubMed
16. Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, Dalhoff A, Botzenhart K, Döring G. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(1):196-202. PubMed
17. Tavares W. Problem gram-positive bacteria: Resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(3):281-301. Link
18. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. p. 17. Link

19. Cerchiara T, Abruzzo A, di Cagno M, Bigucci F, Bauer-Brandl A, Parolin C, et al. Chitosan based micro-and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;92:112-9. PubMed
20. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004;339(16):2693-700. Link
21. Singh SK, Chidrawar VR, Ushir YV, Vadalia KR, Sheth NR Singh S. Pharmaceutical characterization of amoxicillin trihydrate as mucoadhesive microspheres in management of H. pylori. *Int J PharmTech Res*.2010;2(1):348-58. Link
22. 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. Link
23. 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. Link
24. Soleimani N, Mobarez AM, Olia MSJ, Atyabi F. Synthesis, characterization and effect of the antibacterial activity of chitosan nanoparticles on vancomycin-resistant Enterococcus and other gram negative or gram positive bacteria. *Int J Pure App Biosci* 2015;26(1):14-23. Link
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. PubMed
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. Link
27. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 2). *Trop J Pharm Res* 2013;12(2):265-73. Link
28. Saahil Arora S, Gupta S, Narang RK, Budhiraja RD. Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for H. Pylori. *Sci Pharm* 2011;79(3):673-94. PMC
29. Chen S, Wu G, Zeng H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. *Carbohydr Polym* 2005;60(1):33-8. Link
30. Yien L, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J biomater* 2012;2012:1-9. Link