جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1390، دوره سوم، شماره دهم، صفحه 34-27

# بررسی اثرات ضد باکتریایی نانولیپوزمهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در شرایط آزمایشگاهی

**امیر قریب[1]، زهره فائزی زاده[1]، مسعود گودرزی[2]**

1. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران
2. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران

نویسنده مسؤول: امیر قریب، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران.
amirgharib@gmail.com

دریافت: 90/7/11 پذیرش: 90/9/22

## چکیده

**زمینه و هدف:** باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به بسیاری از باکتریهای متداول مورد استفاده مقاومت نشان می دهد. مطالعات مختلف نشان داده که مواد موثر گیاهی مانند اپی گالوکاتچین گالات و یک سیستم حمل دارو نظیر نانولیپوزومها می تواند باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک را از بین ببرد. هدف از این مطالعه تهیه و بررسی کارایی نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات در از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی بود.

**روش بررسی:** نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات با بار سطحی منفی به کمک روش تبخیر فاز معکوس تهیه شد. برای تهیه نانولیپوزومها از لسیتین، کلسترول و دی ستیل فسفات استفاده گردید. سپس حداقل غلظت مهار کنندگی محلول نانولیپوزومی حاوی اپی گالوکاتچین گالات برای سوش مقاوم به آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس اورئوس به روش رقت سازی متوالی اندازه گیری شد. در نهایت سرعت مرگ باکتری مذکور در حضور اپی گالوکاتچین گالات به شکل آزاد و نیز محصور در نانولیپوزومها در غلظت برابر با حداقل غلظت مهار کنندگی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** مقدار کارایی محصور سازی برای نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات 0/31±75 درصد تعیین گردید. مقدار حداقل غلظت مهار کنندگی شکل آزاد اپی گالوکاتچین گالات و نیز محصور در نانولیپوزومها برای سوش مقاوم به آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب معادل 50 و 25 میلی گرم بر لیتر بود. همچنین اثرات ضد باکتریایی نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات در زمانهای یکسان بیشتر از شکل آزاد اپی گالوکاتچین گالات بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات تهیه شده به دلیل کارایی بالا می تواند به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردد.

**واژه‌های کلیدی:** اپی گالوکاتچین گالات، نانولیپوزوم، استافیلوکوکوس اورئوس، حداقل غلظت مهار کنندگی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## مقدمه

امروزه بسیاری از مرگ‌ومیرهای ناشی از عفونتها به علت ایجاد سوش‌های مقاوم باکتریایی جدید است که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند. این امر متخصصین را بر آن داشته است که در جهت مقابله و درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی بیوتیک داروهای تازه یا روش‌های درمانی جدیدی را مد نظر قرار دهند (1). استافیلوکوکها باکتری های گرم مثبت با شکل کروی هستند که بیماری های زیادی در انسان ایجاد می نمایند. استافیلوکوکوس اورئوس ( Staphylococcus aureus) یک گونه از این جنس می باشد که عامل عفونتهای فراوانی از جمله عفونتهای پوستی و کشنده می باشد (2). استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها باعث گردیده که نه تنها این باکتری بلکه سایر باکتریهای پاتوژن نیز به انواع آنتی بیوتیکها مقاوم گردند (3). بنابراین امروزه استفاده از ترکیبات جدید و بی خطر ضد باکتریایی و روشهای جدید دارو درمانی در زمینه از بین بردن مقاومتهای باکتریایی امری ضروری و انکارناپذیر به نظر می رسد (4). در مورد ترکیبات جدید شاید اولویت در استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی باشد زیرا این مواد کمترین اثرات سمی و جانبی را در مقایسه با سایر داروهای شیمیایی دارند (5) .

گیاه چای محتوی ترکیبات فنلی متعددی می باشد که از آن جمله می توان به کاتچین و مشتقات آن نظیر اپی گالوکاتچین گالات و غیره اشاره نمود (6). مطالعات اخیر نشان می دهد که این ترکیبات فعالیتهای زیستی متعددی نظیر خواص ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی دارند (7). خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی اپی گالوکاتچین گالات نسبت به سایر مشتقات کاتچین موجود در چای بیشتر بوده و تحقیقات نشان داده که این ماده تمایل زیادی برای اتصال به پپتیدوگلیکان باکتریهای گرم مثبت دارد (8). یکی از روشهای جدید دارو درمانی استفاده از روش حمل دارو ( *Drug delivery*) و استفاده از نانولیپوزومها برای درمان بیماری‌ها است. نانولیپوزومها گویچه‌های بسیار ریزی هستند که از مولکول‌های چربی و عمدتاً فسفولیپدها تشکیل شده‌اند و قادرند داروها و مواد محلول را در خود محصور نموده و جابجا نمایند (9و 10). مشخص گردیده که نانولیپوزومهای دارای بار سطحی منفی تمایل بیشتری برای اتصال به پپتیدوگلیکان باکتریهای گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس دارند (11). بنابراین با استفاده از لیپیدهای قطبی حاوی بار منفی نظیر دی ستیل فسفات می توان نانولیپوزومها را به نوعی برای اتصال و رها سازی مواد ضد باکتریایی بداخل سلول باکتری گرم مثبت هدف دار نمود که به این نوع هدف گیری، هدف گیری غیرفعال (*Passive targeting*) گویند (12). در این حالت غلظت ماده فنلی در اطراف سلول باکتری و نیز نفوذپذیری آن بداخل سلول باکتری افزایش می یابد و بدین ترتیب اثر ضد باکتریایی این ترکیبات تقویت می گردد (11). هدف از این تحقیق تهیه شکل تازه ای از نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوگاتچین گالات با استفاده از ماده دی ستیل فسفات بود و سپس در ادامه، کارایی آن در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

برخی از مواد به‌کار گرفته شده در این تحقیق شامل لیستین، دی ستیل فسفات، تریتون *X*-100 و اپی گالوگاتچین گالات از شرکت سیگما و کلسترول و دی اتیل اتر از شرکت مرک خریداری گردیدند. همچنین در این تحقیق از دستگاه‌های مختلفی نظیر روتاری اواپوراتور (*Rotary evaporator*) ساخت شرکت *Heidolph* مدل-*ZQF* 85، پمپ خلاء ساخت شرکت *Emerson* مدل 0205، اسپکتروفتومتر مرئی ماوراء بنفش ساخت شرکت *Shimadzu* مدل2200، دستگاه اولترافیلتراسیون ساخت شرکت *Millipore* مدل *G*-200، دستگاه زتا سایزر (*Zeta sizer*) ساخت شرکت *Malvern* مدل *HAS* 3000 و p*H* متر ساخت شرکت *Mettler-toledo* مدل 320 استفاده شد.

**روش تهیه محلول نانولیپوزومی حاوی و فاقد اپی گالوکاتچین گالات:** جهت تهیه نانولیپوزوم های حاوی اپی گالوگاتچین گالات از روش *Fang* و همکارانش استفاده گردید (14)، با این تفاوت که در فرمولاسیون جدید از ماده ستیل دی فسفات نیز استفاده شد. در این روش ابتدا لسیتین سویا، کلسترول و دی ستیل فسفات به ترتیب با نسبت های مولاریته (1:1:4) شامل 0/030 گرم لسیتین سویا، 0/037 گرم کلسترول و 54/7 میلی گرم ستیل دی فسفات در 10 میلی لیتر اتر حل شد و محلول مذکور به یک ظرف پلاستیکی استریل درپوش دار منتقل گردید. سپس در یک لوله آزمایش 800 میلی گرم اپی گالوگاتچین گالات در 3 میلی لیتر بافر فسفات سالین (1/5 مولار با p*H* معادل 7/4) حل گردید و محلول ایجاد شده نیز به

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



ظرف بالا منتقل شد. در مرحله بعد محلول مذکور به مدت 10 دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت تأثیر امواج فراصوت $6\mu$ قرار داده شد. در این حالت دو فاز مذکور کاملاً مخلوط شده و یک امولسیون خاص از آن تشکیل گردید که تا مدت 30 دقیقه پایدار بود. این محلول به دستگاه روتاری اواپوراتور منتقل گردید و تحت فشار کم (ناشی از اتصال پمپ خلاء به دستگاه مذکور) در دمای 25 درجه سانتیگراد با چرخش 50 دور در دقیقه تبخیر شد و بدین صورت سوسپانسیون یکنواخت نانولیپوزوم ها در آب تشکیل گردید. در مرحله بعد جهت حذف اپی گالوگاتچین گالات محصور نشده و سایر ترکیبات از محلول نانولیپوزومی، محلول مذکور به مدت 30 دقیقه با دور 12000 دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید. در نهایت جهت یکنواخت نمودن قطر ذرات نانولیپوزومها، محلول بدست آمده از بالا با استفاده از دستگاه اولترافیلتراسیون و فیلتر پلی کربنات با قطر منافذ 100 نانومتر اولترافیلتره گردید. جهت تهیه نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات نیز دقیقاً مانند بالا عمل گردید با این تفاوت که به جای اضافه نمودن یک میلی لیتر فاز آبی حاوی اپی گالوکاتچین گالات سه میلی لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد.

**روش اندازه گیری قطر ذره ای نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات:** جهت تعیین اندازه ذرات نانولیپوزومی از روش *Meng* و همکارانش استفاده گردید (13). در این روش ابتدا 25 میکرولیتر محلول نانولیپوزومی تهیه شده در 3 میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شد و محلول مذکور جهت تعیین قطر ذرات نانولیپوزومی در دمای 25 درجه سانتیگراد با زاویه تفرق 90 درجه با دستگاه زتا سایزر مورد بررسی قرار گرفت.

**روش تعیین درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات:** برای اندازه گیری مقدار اپی گالوکاتچین گالات محصور شده از روش *Zhang* و همکارانش استفاده گردید (15). در این روش ابتدا با استفاده از بافر فسفات سالین (1/5 مولار با $pH$ معادل 7/4) از اپی گالوکاتچین گالات به تفکیک رقتهای 400، 200، 100، 50، 25، 12/5، 6/25، 3/125، 1/562و 0/781 میلی گرم بر لیتر تهیه شد و سپس نمودار استاندارد تغییرات غلظت اپی گالوکاتچین گالات در برابر تغییرات جذبی آن در طول موج 280 نانومتر رسم گردید. سپس با استفاده از یک میلی لیتر محلول0/02 درصد تریتون *X*-100 غشاء نانولیپوزومها در یک میلی لیترمحلول نانولیپوزومی شکسته شده و اپی گالوکاتچین گالات موجود در آن آزاد گردید. در مرحله بعد مقدار جذب این محلول در طول موج 280 نانومتر قرائت شد و در نهایت با استفاده از نمودار استاندارد غلظت اپی گالوکاتچین گالات برحسب میلی گرم در هر میلی لیتر محلول حاوی نانولیپوزومی محاسبه شد. برای اندازه گیری مقدار کارایی (بازده) محصورسازی روش بکار رفته در تهیه نانولیپوزومها از روش *Mugabe* و همکارانش استفاده گردید (1). در این روش با استفاده از معادله زیر مقدار درصد کارایی محصورسازی محاسبه شد:

$$\text{درصد کارائی محصورسازی} = \frac{\text{مقدار اپی گالوکاتچین گالات محصور شده در یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی}}{\text{مقدار اپی گالوکاتچین گالات مصرفی اولیه برای تهیه یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی}}$$

**تهیه و روش بررسی میزان مقاومت سوش مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیکهای مختلف:** سوش مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جهت انجام این پروژه از گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز اخذ گردید. برای بررسی میزان مقاومت باکتری مذکور به آنتی بیوتیکهای متی سیلین، کربنیسیلین و وانکومایسین از روش دیسک دیفیوژن (*Disk diffusion*) استفاده گردید (16). در این روش دیسکهای حاوی آنتی بیوتیکهای مذکور بر روی محیط کشت باکتری قرار داده شد. دیسک گذاری به نحوی بود که فاصله هر دیسک با دیگری حداقل 24 میلی متر و فاصله از لبهٔ پتری بیشتر از 15 میلی متر بود. برای اطمینان بیشتر در نتیجه، آزمایش فوق 5 بار تکرار گردید. پس از انجام مراحل ذکر شده، پلیتها در داخل انکوباتور در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت قرار داده شدند، سپس وجود و یا عدم وجود هاله های رشد مورد بررسی قرار گرفت.

**روش اندازه گیری حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (*MIC*) محلول نانولیپوزومی حاوی و فاقد اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن:** برای انجام این بخش از روش رقت‌سازی متوالی استفاده گردید. این روش یکی از دقیق‌ترین روش‌هایی است که برای تعیین حساسیت باکتریها نسبت به مواد ضد باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (4). در این روش ابتدا 10 لوله حاوی یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل برای هر سری

آزمایش آماده شد. به اولین لوله حاوی 1 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، 1 میلی‌لیتر محلول حاوی نانولیپوزومهای اپی گالوکاتچین گالات (با غلظت 800 میلی‌گرم بر لیتر) اضافه گردید و بعد از مخلوط نمودن محتویات آن 1 میلی‌لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم حاوی 1 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید. همین عمل تا لوله دهم ادامه پیدا نمود و در نهایت 1 میلی‌لیتر از لوله دهم برداشته و دور ریخته شد و بدین صورت یک ردیف رقت در هر 10 لوله تهیه گردید که غلظت اپی گالوکاتچین گالات (به فرم محصور در نانولیپوزومها) در آن‌ها به‌ترتیب 400، 200، 100، 50، 25، 12/5، 6/25، 3/125، 1/562 و 0/781 میلی‌گرم بر لیتر بود. سپس 10 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سوش مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز که کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند برابر بود آماده گردید. به هرکدام از لوله‌های فوق یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه گردید و به مدت 24 ساعت در گرمخانه 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از هرکدام از لوله‌ها 100 میکرولیتر به پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و به مدت 24 ساعت پلیت‌ها در گرمخانه 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در یک محیط کشت و محیط‌های بعد از آن رشدی از باکتری مذکور مشاهده نگردید. غلظت اپی گالوکاتچین گالات موجود در لوله‌ای که این محیط کشت از آن تولید شده بود برابر با *MIC* محلول نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات بود. برای تعیین *MIC* محلول اپی گالوکاتچین گالات به فرم آزاد و نیز نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات همانند روش ذکر شده در بالا عمل شد.

**روش بررسی و مقایسه اثر نانولیپوزومهای حاوی و فاقد اپی گالوکاتچین گالات و نیز فرم آزاد آن در غلظت برابر *MIC* در شرایط آزمایشگاهی:** در این قسمت از پروژه از روش *Mugabe* و همکارانشان استفاده گردید (11). در این روش اثرات ضد باکتریایی نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن با بررسی تعداد کلنی تشکیل شده از هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع باکتری در غلظت برابر *MIC* مطالعه گردید. بدین صورت که ابتدا باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر روی محیط کشت مولر هینتون براث کشت داده شد. پس از رسیدن درجه کدورت آن به نیم مک فارلند 10 میکرولیتر از آن برداشته شد و به یک لوله محیط کشت مولر هینتون براث حاوی یک میلی‌لیتر محلول نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات، که مقدار اپی گالوکاتچین گالات محصور در آن برابر با *MIC* محلول نانولیپوزومهای مذکور بود، اضافه گردید و در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در مدت زمان‌های 0، 2، 4، 6 و 24 ساعت از محیط کشت مذکور به مقدار 100 میکرولیتر به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. عمل انکوباسیون برای مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انجام گردید. بعد از آن تعداد کلنی‌های تشکیل شده در محیط کشت جامد شمارش گردید. سپس تعداد کلنی‌های تشکیل شده برای یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع محاسبه شد. بعد از آن نمودار مرگ زمان تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی‌های تشکیل شده در بازه های زمانی ذکر شده رسم گردید. این آزمایش در مورد محلول نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات و نیز فرم آزاد آن در غلظت‌های برابر *MIC* تکرار شد.

**روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** در این تحقیق نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار *(Mean±SD)* گزارش گردید. همچنین با استفاده از آزمون *t-test* و ANOVA دو طرفه داده‌های به‌دست آمده مورد مقایسه قرار گرفت. در این تحقیق $P<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

## یافته ها

**نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار کارایی محصورسازی نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات:** با استفاده از معادله ذکر شده در روش کار و نیز با توجه به مقدار اپی گالوکاتچین گالات محصور شده در یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی تهیه شده (0/31±600 میلی‌گرم)، کارایی محصورسازی روش مذکور معادل0/31±75 درصد تعیین گردید.

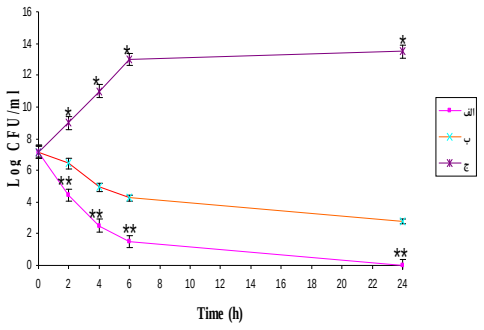
**نتایج اندازه گیری قطر ذره ای نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات:** با توجه به روش به‌کار گرفته شده میانگین قطر ذرات نانولیپوزومی تهیه شده معادل 2/3±96 نانومتر تعیین شد.

**نتایج بررسی میزان حساسیت سوش مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیکهای مختلف:** آزمایش نشان داد که میزان حساسیت سوش مقاوم باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس به سه آنتی بیوتیک کربنیسیلین، متی سیلین و وانکومایسین به ترتیب معادل 150، 250 و 1 میلی گرم بر لیتر می باشد و باکتری مذکور به متی سیلین و کربنیسیلین مقاوم است.

**نتایج اندازه‌گیری مقدار *MIC* نانولیپوزومهای تهیه شده حاوی اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن:** نتایج تحقیق نشان داد که مقدار *MIC* اپی گالوکاتچین گالات برای حالت محصور در نانولیپوزومها معادل 25 میلی گرم بر لیتر بوده و نصف مقدار آن در فرم آزاد می‌باشد. بررسی اثر نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات بر روی رشد باکتری مذکور نشان داد که این نانولیپوزومها تأثیری در رشد باکتری مذکور نداشته یعنی تعداد کلنی‌های باکتری تشکیل شده در حضور و یا عدم حضور این نوع نانولیپوزومها برابر می‌باشد.

**نتایج مقایسه اثر نانولیپوزومهای حاوی و فاقد اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن در غلظت برابر *MIC* در شرایط آزمایشگاهی:** نمودار 1 نشان دهندهٔ تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی‌های تشکیل شده در غلظت‌های برابر *MIC* فرم آزاد اپی گالوکاتچین گالات و نانولیپوزومهای حاوی آن می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات در مدت زمان 24 ساعت توانسته است رشد باکتری مذکور را متوقف نماید، در حالی‌که فرم آزاد آن قادر به این عمل نبوده و اختلاف بین لگاریتم تعداد کلنی‌های تشکیل شده معنی‌دار می‌باشد (P<0/05).




**نمودار 1. تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی های تشکیل شده در غلظت های برابر *MIC* محلول نانولیپوزومی اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن و نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات به عنوان شاهد (الف-** نمودار مربوط به نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات، ب- نمودار مربوط به اپی گالوکاتچین گالات به فرم آزاد و ج- نمودار مربوط به نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات به عنوان شاهد)

* : اختلاف معنی دار بین تعداد کلنی های تشکیل شده ناشی از تاثیر نانولیپوزومهای فاقد اپی گالوکاتچین گالات در مقایسه با نانولیپوزومهای اپی گالوکاتچین گالات و فرم آزاد آن ($p$<0/01)

** : اختلاف معنی دار تعداد کلنی های تشکیل شده ناشی از تاثیر نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات در مقایسه با فرم آزاد آن ($p$<0/05)

## بحث

سالیانه میلیونها بیمار با صدمات بافتی در جهان مورد درمان قرار می‌گیرند (17). در برخی از این افراد عفونت پوستی رُخ می‌دهد که ممکن است ناشی از زخم، سوختگی و حتی عمل جراحی در طی درمان باشد. برخی از این نوع عفونتها در حالاتی که فرد به مدت طولانی در بیمارستان قرار دارد سبب مرگ بیمار می‌گردد (18). عفونتهای مذکور ناشی از باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت بویژه استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا هستند (19 و 20). استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن فرصت‌طلب می‌باشد و عامل عفونتهای فراوانی از جمله عفونتهای پوستی و کشنده می باشد (2). امروزه یکی از مشکلات اساسی در مورد عفونتهای استافیلوکوکی مقاومت داروئی این باکتری است. سویه هایی از استافیلوکوکها به اغلب آنتی بیوتیکهای معمول مانند تترا سایکلین ها، ماکرولیدها، لینکوز اسیدها و فلورکوئینولها مقاومند (3). امروزه تحقیقات نشان داده که برخی از ترکیبات موثره گیاهی می توانند به خوبی سوش هایی از باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک را از بین ببرند، اما یکی از محدودیتهای مهم استفاده از این گونه ترکیبات ناپایداری آنها است (21 و 22)، که به نظر می رسد با محصور نمودن این ترکیبات درون نانوذرات مانند نانولیپوزومها می توان پایداری و کارایی آنها را در شرایط آزمایشگاهی و in vivo تا دهها برابر افزایش داد (23 و 24). در این کار تحقیقی با استفاده از روش *Fang* و همکارانش نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات تهیه گردید. این روش طبق تحقیقات به دلیل داشتن بازده محصور سازی بالا یکی از بهترین روشها جهت تهیه نانولیپوزومهای

حاوی ترکیبات فنلی می‌باشد (14). بنابراین در این پروژه نیز از این روش استفاده گردید. در این تحقیق بازده محصورسازی جهت تهیه نانولیپوزومهای حاوی اسید اپی گالوکاتچین گالات برابر با 76 درصد بود که با توجه به گزارش بازده 65 و 70 درصدی توسط *Fang* و *Zhiliang* بازده مذکور در حد قابل توجه می‌باشد (14 و 25). تحقیقات مختلف بیانگر این است که ترکیبات فنلی نظیر اپی گالوکاتچین گالات با بازده بیشتری در لیپوزومهای دارای بار سطحی منفی محصور می گردند، زیرا در این حالت تراوایی غشاء نانولیپوزومها نسبت به حالتی که بار سطحی نانولیپوزومها مثبت یا خنثی باشد، حداقل است (14). به همین دلیل در این پروژه نیز از ماده دی ستیل فسفات در فرمولاسیون نانولیپوزومها استفاده گردید که خود می تواند توجیه کننده بازده محصور سازی بیشتر در مقایسه با تحقیقات مشابه باشد (14 و 15). مشخص گردیده که نانولیپوزومهای دارای بار سطحی منفی تمایل بیشتری برای اتصال به پپتیدوگلیکان باکتریهای گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس دارند (13). در این حالت غلظت ماده فنلی در اطراف سلول باکتری و نیز نفوذپذیری آن بداخل سلول باکتری افزایش می یابد (15). لذا در این پروژه، طبق این نظر وجود دی ستیل فسفات به عنوان یک آنیون در غشاء نانولیپوزومهای سبب افزایش کارایی اپی گالوکاتچین گالات در از بین بردن باکتری مذکور گردیده است. استفاده از رسم نمودار مرگ- زمان متداولترین روش جهت بررسی اثر لیپوزومهای حاوی آنتی‌بیوتیک بر باکتریها می‌باشد (1 ، 4 و 26). مطالعه اثر نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات در غلظت برابر *MIC* بر روی سوش مورد آزمایش با رسم نمودار مرگ- زمان نشان داد که نانولیپوزومهای حاوی اپی گالوکاتچین گالات طی 24 ساعت تمام باکتریهای موجود در محیط کشت را از بین می برد. در موارد مشابه گزارش شده که مواد موثره استخراج شده از گیاه Zanthoxylum tingoassuiba به نامهای متیل-N- متیل آنترانیلات و بیسابولول در فرم محصور در لیپوزومها می توانند باکتریهای مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس را در شرایط آزمایشگاهی از بین ببرد (23). همچنین تحقیقات *Huang* و همکارانش نشان داده که اسید اولئیک (اسید چرب موجود در دانه های روغنی نظیر زیتون) محصور در نانولیپوزومها می تواند به راحتی سوش مورد مطالعه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را در شرایط آزمایشگاهی و in vivo حذف نماید (24). چندین نظریه از جمله الحاق جدار نانولیپوزوم با غشاء خارجی باکتری و نیز حساس نبودن این ماده به آنزیمهای بتالاکتاماز می‌تواند توجیه‌کننده مکانیسم افزایش فعالیت ضد باکتریایی این گونه فرمولاسیونها باشد (4 و 27).

## نتیجه گیری

نتایج نشان داد که محصور سازی اپی گالوکاتچین گالات در نانولیپوزومهای تهیه شده با ماده دی ستیل فسفات سبب افزایش کارایی آن در از بین بردن استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین گردیده و بنابراین می توان از این نانولیپوزومها به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان عفونتهای ناشی از باکتری مذکور استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجام رسیده است. بدین وسیله از مسئولین دانشگاه، که شرایط اجرای فعالیت های پژوهشی را فراهم می آورند صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

## References

1. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. *Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics*. Int J Pharm. 2006;307:244–250.
2. Honda H, Doern CD, Dunne M Jr, Warren DK. *The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant Staphylococcus aureus bacteremia*. BMC Infect Dis. 2011;11(1):335.
3. Albrecht N, Jatzwauk L, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. *Clonal Replacement of Epidemic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains in a German University Hospital over a Period of Eleven Years*. PLoS One. 2011;6(11): 281-289.
4. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. *Mechanism of enhanced activity of liposome-entraped aminoglycosides against resistance strains of Pseudomonas aeruginosa*. Anti Agents Chemother. 2006;50(6):2016-2022.
5. Cui Y, Oh YJ, Lim J, Youn M, Lee I, Pak HK, Park W, Jo W, Park S. *AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Food Microbiol. 2012;29(1):80-7.
6. Li S, Hattori T, Kodama EN. *Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step*. Antivir Chem Chemother. 2011; 21(6):239-43.
7. Nakayama M, Shigemune N, Tsugukuni T, Tokuda H, Miyamoto T. *Difference of EGCg adhesion on cell surface between Staphylococcus aureus and*

*Escherichia coli visualized by electron microscopy after novel indirect staining with cerium chloride*. J Microbiol Methods. 2011;86(1):97-103.

8. Gaffari, MA, Dabbagh, MA, Gharib, A. *Human erythrocyte superoxide dismutase encapsulated in positively charged liposomes.* Iran J Pharm Sci. 2005; 1:153-160.
9. Mirzaee M, Owlia P, Mehrabi M, Gharib A. *In Vitro Bactericidal Activity of Encapsulated Amikacin in Liposome.* Iranian J Path. 2009; 4: 151-156.
10. *Fang JY, Hung CF, Hwang TL, Huang YL. Physicochemical characteristics and in vivo deposition of liposome-encapsulated tea catechins by topical and intratumor administrations.* Drug Target. 2005; 13(1):19-27.
11. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. *Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis*. J. Antimicrob. Chemother. 2005; 55:269–271.
12. Tsai CC, Chang CH, Chen LC, Chang YJ, Lan KL, Wu YH, Hsu CW, Liu IH, Ho CL, Lee WC, Ni HC, Chang TJ, Ting G, Lee TW. *Biodistribution and pharmacokinetics of Re-liposomes and their comparative therapeutic efficacy with 5-fluorouracil in C26 colonic peritoneal carcinomatosis mice.* Int J Nanomed. 2011; 6:2607-19.
13. Meng J, Wang H, Hou Z, Chen T. *Novel anion lhposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and rescues mice from lethal sepsis by targeting mec A.* Anti Agent Chemoter. 2009; 53, 7:2871-2878.
14. Fang JY, Hwang TL. *Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating aionic surfactants and ethanol*. Int J Pharm. 2006;310: 131-138.
15. Zhang L, Shantha LK. *Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants.* Euro Poly J. 2007; 43: 2956-2966.
16. Datta S, Kumar Pal NK, Nandy AK. *Inhibition of the emergence of multi drug resistant Staphylococcus aureus by Withania somnifera root extracts.* Asian Pac J Trop Med. 2011; 4(11):917-20.
17. Capparelli R, Nocerino N, Medaglia C, Blaiotta G, Bonelli P, Iannelli D. *The Staphylococcus aureus Peptidoglycan Protects Mice against the Pathogen and Eradicates Experimentally Induced Infection*. PLoS One. 2011; 6(12):28-37.
18. Kitara L, Anywar A, Acullu D, Odongo-Aginya E, Aloyo J, Fendu M. *Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus in suppurative lesions in Lacor Hospital, Uganda.* Afr Health Sci. 2011;11(1):34-39.
19. Elhani D. *Does the emergence of antibiotic resistance announce the return of the dark ages*? Ann Biol Clin. 2011;69(6):637-646.
20. Rivera AM, Boucher HW. *Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Select Gram-Positive Organisms: Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Penicillin-Resistant Pneumococci, and Vancomycin-Resistant Enterococci.* Mayo Clin Proc. 2011; 86(12):1230-43.
21. Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA. *Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum.* J Food Sci. 2007; 72(9):341-345.
22. Cushnie TP, Lamb AJ. *Antimicrobial activity of flavonoids.* Int J Antimicrob Agents. *2005;26(5):343-56.*
23. Detoni CB, Cabral-Albuquerque ECM, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF, Velozo EF. *Essential oil from Zanthoxylum tingoassuiba loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents.* J Microencapsul. 2009; 26:684-691.
24. Huang CM, Chen CH, Pornpattananangkul D, Zhang L, Chan M, Hsieh MF, Zhang L. *Eradication of drug resistant Staphylococcus aureus by liposomal oleic acids.* Biomaterials. 2011; 32:214-221.
25. Zhiliang S, Xiangxin L, Qinlu L. *Pharmacokinetics and bioavailability of catechin liposome in rabbits.* J Tea Sci. 2004;24: 44-48.
26. Sandberg A, Jensen KS, Baudoux P, Van Bambeke F, Tulkens PM, Frimodt-Møller N. *Intra- and extracellular activities of dicloxacillin against Staphylococcus aureus in vivo and in vitro.* Anti Agent Chemother. 2010;54(6):2391-400.
27. Alipour M, Halwani M, Omri A, Suntres ZE. *Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant gram-negative bacterial strains.* Int J Pharm. 2008; 355(1-2):293-8.