



بررسی اثر ضد باکتریایی نانوکورکومین در برابر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شرایط پیش بالینی

الهام انصاری^{*}، خسرو عیسی زاده^۲، علیرضا شعاع حسنی^۳

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی، آستاد یار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی، آستاد یار، گروه سلول درمانی (علوم سلولی کاربردی)، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری می و اندوکاردیت، شایع ترین عامل عفونت در استافیلوکوکوس اورئوس می باشند. با توجه به خواص گوناگون دارویی کورکومین از جمله اثر آنتی بیوتیکی آن، می توان با تغییر معایب کورکومین، از آن در شرایط بالینی استفاده نمود. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوکورکومین در برابر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شرایط پیش بالینی در مدل حیوانی موش Balb/C می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت پیش بالینی در مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی در بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. پس از سنتز نانوذرات کورکومین-PLGA، از روش رنگ سنجی (MTT) برای بررسی سمیت آن بر روی سلول ها و از میکروسکوپ الکترونی نگاره برای ارزیابی اندازه آن استفاده گردید. آزمایشات In vitro برای کشت های MRSA توسط روش های MIC و MBC با استفاده از رقیق سازی براث انجام شد. سپس این کار بر روی کشت خون موش آلوده انجام گرفت.

یافته ها: نانوذرات کورکومین-PLGA قادر بودند در شرایط In vitro با غلظت ۶ میکروگرم در میلی لیتر خاصیت ضد باکتریایی بر روی سویه MRSA داشته باشند. این غلظت در درون حیوان آزمایشگاهی برابر با ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین نتایج نشان داد که نانوذرات کورکومین-PLGA هیچ گونه اثر سمی بر روی سلول های طبیعی ندارند و سلول های تیمار شده با بالاترین غلظت توسط نانوذرات بیش از ۷۵٪ زنده ماندند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می توان به صورت ایمن از نانوذرات کورکومین-PLGA برای درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA و پروفیلاکسی باکتری می و اندوکاردیت استفاده نمود.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، نانوکورکومین، اثر ضد باکتریایی

پذیرش برای چاپ: آذرماه ۹۲

دریافت مقاله: مهرماه ۹۲

مقدمه

aureus) را از عفونت های ناشی از اندوکاردیت در بیمارستان جداسازی نموده اند. همچنین این باکتری علاوه بر متی سیلین به بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر نیز مقاوم می باشد (۲) و (۳). مطالعات نشان داده است بیمارانی که دچار عفونت با سویه های مقاوم به متی سیلین یا Methicillin Resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus* می گردند نسبت به افرادی که با سویه های حساس به متی سیلین یا Sensitive MSSA

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، چهار عامل از ۱۰ عامل شایع مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه، بیماری های عفونی می باشد (۱). پزشکان در سال های اخیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus*

(* آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۲۵۴۴۸۶۴۶ پست الکترونیک: elham_ansari83@yahoo.com

شده است. تمرکز نانوتکنولوژی بر فرمولاسیون ترکیبات دارویی در ذرات نانو، سازگار با بدن می‌باشد (۸). پلی‌لاکتید گلایکولیک اسید (PLGA) پلیمری است که گسترده‌ترین تحقیقات برای دارو رسانی را به خود اختصاص داده است. داروی مورد نظر در این پلیمر محصور شده و در مقدار ثابتی از طریق انتشار دارو در پلیمر و تخریب ماتریکس پلیمر، آزاد می‌گردد. نانوذرات PLGA حامل مناسبی برای رساندن دارو به سلول هدف داخل سلولی می‌باشند. بر همین اساس این نانوذرات را می‌توان به صورت سیستمیک و بدون مشکل تجمع در مویرگ‌ها، تجویز نمود (۹). هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوکورکومین در برابر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در شرایط پیش‌بالینی در مدل حیوانی موش Balb/C بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت پیش‌بالینی (Pre-clinical) در آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۹۱ انجام گرفت. الف) سویه‌های باکتریایی: در ابتدا سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و حساس به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامیسین) و سویه ATCC25923 حساس به متی‌سیلین از انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شدند. سویه‌ها به منظور آزمایشات بیشتر در محیط نوترینت براث (Merck, Germany) کشت داده شدند.

ب) آماده‌سازی کورکومین بارگذاری شده در نانوذرات PLGA: بهترین راه برای کپسوله کردن ترکیبات هیدروفوب، تکنیک تبخیر تک‌امولسیون است. بنابراین در مطالعه حاضر از این روش برای سنتز نانو ذرات کورکومین-PLGA استفاده گردید. به طور خلاصه ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از PLGA در یک میلی‌لیتر از اتیل استات حل شد. سپس ۱۰ میلی‌گرم از کورکومین (Sigma-Aldrich) به این ترکیب اضافه و یک ساعت ورتکس گردید. در ادامه ۲ میلی‌لیتر از پلی‌وینیل‌الکل

(Methicillin *Staphylococcus aureus*) عفونی می‌شوند، مدت طولانی تری در بیمارستان بستری می‌گردند. بنابراین علاوه بر هزینه‌های بیشتر درمانی، پیشرفت عفونت به باکتری (Bacteremia) یا اندوکاردیت نیز بیشتر اتفاق می‌افتد (۴). روش‌های درمانی اندوکاردیت، ناشی از MSSA محدود می‌باشد (۴). بنابراین امروزه کاهش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی نامطلوب برای سایر ترکیبات ضد میکروبی جدید، مورد بحث پژوهشگران می‌باشد (۴ و ۵).

کورکومین، یک ترکیب پلی‌فنولی استخراج شده از ریشه زردچوبه (*Curcuma longa*) می‌باشد. ترکیب فعال دی‌فنیل‌ولیل متان (۷-۱ بیس-۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل} هپتا-۱ و ۶-دی‌ان-۳ و ۵-دی‌یون) مسئول اثرات فارماکولوژیک کورکومین است. این اثرات دارویی شامل خاصیت ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد دیابتی، ضد آلرژی و فعالیت ضد باکتریایی علیه کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی (*E. coli*), باسیلوس سرئوس (*B. cereus*) و هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) می‌باشد (۶). سازمان خوار و بار جهانی (FAO) و WHO استفاده از کورکومین را بی‌خطر دانسته‌اند. در ۱۵ تا ۲۰ سال اخیر کورکومین وارد فاز I و II مطالعات کارآزمایی بالینی شده است. مطالعات نشان می‌دهد که افراد قادر به تحمل کورکومین در دوزهای بالا به اندازه ۸ گرم در هر روز می‌باشند (۷ و ۸). متاسفانه، کورکومین با حلالیت بسیار پایین، بی‌ثباتی شیمیایی و زیست‌فراهمی (bioavailability) نامناسب شناسایی شده است. امروزه استفاده از فناوری نانو برای بهبود زیست‌فراهمی کورکومین، پائین آمدن سرعت تجزیه و پایداری بالا در جریان خون و کاهش اثرات سمی آن مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً منافع حاصل از شیوه‌های نانوتکنولوژی در میکروبیولوژی به اندازه تمامی شاخه‌های علوم با سرعت زیادی در حال رشد می‌باشد. انگیزه اصلی این پیشرفت، استفاده نانوذرات در درمان بیماری‌های مختلف است. همچنین گام‌های مهمی در راستای توسعه نانو تکنولوژی برای تحویل دارو به بافت مورد نظر نیز برداشته

حساس به متی سیلین می گردد) و جنتامایسین (که باعث از بین رفتن باکتری های مقاوم به متی سیلین می گردد) استفاده شد. در ادامه پس از قرار دادن محیط ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، حداقل غلظت عاملی که منجر به مهار رشد میکرو ارگانیسم می گردد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. این لوله ها مجدداً کشت داده شدند و حداقل غلظتی که باکتری را از بین می برد، به عنوان (MBC) معرفی شد.

همچنین میزان رشد باکتری ها بر اساس غلظتشان در محیط برات با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. برای این منظور، 10^8 باکتری (CFU) به ۱۰ میلی لیتر نوترینت برات اضافه شد. میزان رشد باکتری با استفاده از مقدار OD مشاهده شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-120-01) بررسی گردید. تمامی آزمایشات در نور ملایم و تمامی انکوباسیون ها در انکوباتور تاریک (برای جلوگیری از اثرات سمی نوری کورکومین) انجام گرفت (۱۱).

ه) بررسی های پیش بالینی در موش *Balb/C*. این بررسی در ۵۲ موش از نژاد *balb/C* انجام گرفت. این موش ها با رژیم غذایی استاندارد و دسترسی به آب و غذای کامل و به صورت نامحدود تغذیه شده بودند و به صورت انفرادی در حیوان خانه نگهداری شده بودند. موش ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند: گروه I: گروه کنترل که خود به سه زیر گروه: Ia: کنترل نرمال (موش نرمالی که نه درمان و نه عفونی شده)، زیر گروه Ib: کنترل آلوده (موشی که از طریق تزریق دوز 10^4 باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در رگ دمی آلوده شده، اما درمان نشده)، زیر گروه Ic: کنترل دارویی (جنتامایسین) (موش های غیر آلوده درمان شده با کورکومین (۱۰ میلی گرم روزانه)، درمان شده با PLGA (۱ میلی گرم روزانه) و درمان شده با Cur-PLGA-NP (۱۰ میکروگرم روزانه)). گروه II: گروه آزمایشی، شامل گروه آلوده شده با سویه MRSA که تحت درمان با دوزهای مختلف کورکومین کپسوله شده در نانوذرات (Cur-PLGA-NP) قرار گرفته است. هر گروه از موش های درمان شده با Cur-PLGA-NP، روزانه ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم از

۵٪ در آب (به عنوان سورفکتانت) به مخلوط کورکومین-PLGA در حال ورتکس شدن به صورت قطره قطره اضافه شد. پس از افزودن کامل کورکومین-PLGA این مخلوط به مدت ۱ دقیقه سونیکه (Sanyo Sonyprep Plus, Japan) گردید تا امولسیون یکنواخت حاصل شود. سپس این ترکیب به ۵۰ میلی لیتر پلی وینیل الکل ۰/۳٪ در آب افزوده و با یک همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت، به هم زده شد. مخلوط ذکر شده در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Shimadzu UV-۱۲۰-۰۱) گردید. نانوذرات به صورت رسوب جمع آوری شده و مجدداً در آب مقطر خالص شسته شدند. نانوذرات سنتز شده فریز-درای شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۰).

ج) ویژگی های نانوذرات کورکومین-PLGA با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM، ZEISS- Standard، Germany)، اندازه و مورفولوژی نانوذرات کورکومین-PLGA ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

د) بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات کورکومین-PLGA در شرایط آزمایشگاهی: آنتی بیوگرام نانوذرات کورکومین-PLGA با مشاهده فعالیت ضد میکروبی آنها بر اساس روش spread plate بر روی محیط مولر هیتون آگار و شمارش سلول های زنده در محیط نوترینت برات بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین ارزیابی گردید. به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) کورکومین و نانو ذرات کورکومین-PLGA از روش رقیق سازی برات استفاده گردید (۱۱). برای این منظور ابتدا کورکومین و نانو ذرات کورکومین-PLGA، به صورت رقت های متناوب به یک سری از لوله های حاوی محیط کشت مولر هیتون برات، اضافه شدند. غلظت باکتریایی در هر لوله 5×10^5 CFU/ml محاسبه گردید.

در این مطالعه از سه نوع کنترل شامل کنترل منفی (ماده ای به غیر از آنتی بیوتیک سرم نرمال است که تاثیری روی هیچ کدام از باکتری ها ندارد)، متی سیلین (تاثیری بر روی باکتری های مقاوم به متی سیلین ندارد اما باعث از بین رفتن باکتری های

MTT اضافه شد. وجود MTT به مدت ۴ ساعت ادامه یافت و سپس محیط دور ریخته شد. برای حل شدن کریستال‌های تشکیل شده فورمازان، DMSO (دی متیل سولفوکساید) افزوده شد. جذب نوری هر حفره در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این نتایج به صورت درصدی منسوب به گروه کنترل درمان شده با DMSO ۰/۱٪ ارائه گردید (۱۳).

ح) ملاحظات اخلاقی: با تمام حیوانات آزمایشات مطابق با دستورالعمل تایید شده توسط کمیته اخلاقی هیئت علمی پزشکی دانشگاه تهران رفتار شد.

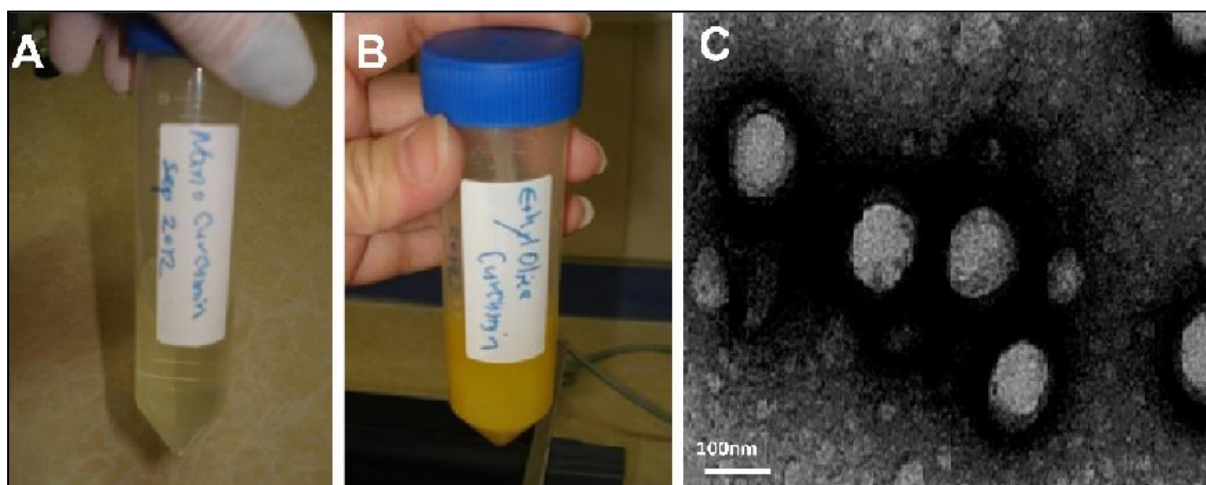
ک) آنالیزهای آماری: داده‌ها با انحراف استاندارد متوسط ثبت شدند. تمامی آزمایشات در حداقل سه نسخه به صورت اختصاصی در بخش نتایج انجام گرفتند. میانگین نتایج برای مفاهیم آماری با استفاده از آزمون t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت‌ها در مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری مورد توجه قرار گرفتند. مقدار حیوانات باقی مانده پس از ۳ ماه با استفاده از نمودار Kaplan-Meier نشان داده شد.

یافته‌ها

الف) سنتز و ویژگی *Cur-PLGA-NP*: کورکومین محصور شده در نانو ذرات PLGA با تکنیک تبخیر حلال با موفقیت سنتز

Cur-PLNG-NP را به مدت ۱۰ روز دریافت نمودند (۱۲).
و) آزمایش بافت شناسی: موش‌ها در صورت زنده ماندن، در روزهای مختلفی پس از آلودگی از طریق قطع نخاع کشته شدند. سپس شریان‌ها بیرون آورده شد و برای انجام آزمایشات بافت شناسی در فرمالین ۱۰٪ تثبیت گردیدند. بافت اندوتلیال در واکس پارافین قرار داده شد و با استفاده از میکروتوم به بخش‌هایی با ضخامت ۴-۶ میلی‌متری، بریده شد. سپس این بخش‌ها برای ارزیابی درجه اتصال باکتریایی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند (۱۲).

ز) سمیت سلولی نانو ذرات کورکومین-PLGA: مقدار سمیت سلولی نانوذرات PLGA (بدون کورکومین)، کورکومین و Cur-PLGA-NP با ارزیابی رنگ سنجی (MTT) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های فیبروبلاست موشی در پلیت‌های ۲۴ چاهکی در DMEM + 10% FBS (modified Eagles mineral essential) (Dulbecco medium) (شرکت سیگما) با غلظت 10^4 سلول به ازای هر چاهک کشت داده شدند. سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلفی از کورکومین، Cur-PLGA-NP انکوبه شدند. سپس به منظور ارزیابی تعداد سلول‌های زنده به آن



شکل ۱: بررسی میکروسکوپی کورکومین و نانوذرات کورکومین-PLGA و حلالیت آن‌ها. (A) نانوذرات کورکومین-PLGA در آب به صورت کاملاً محلول، (B) کورکومین معمولی در آب به صورت نامحلول، (C) تصویر گرفته شده از نانوذرات کورکومین-PLGA به وسیله میکروسکوپ نگاره، اندازه نانوذرات کورکومین-PLGA بین ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر می‌باشد.

موش-هایی که نانوکورکومین دریافت کردند، کاهش قابل توجهی را نشان داد ($p < 0.05$).

ج) نتایج سمیت سلولی: سمیت سلولی نانوذرات با استفاده از سنجش MTT (۳-۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲-۵ دی فنیل تترا زولیوم بروماید) مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که سلول های سرطانی نسبت به کورکومین حساس می باشند، تصمیم گرفته شد که در این مطالعه از سلول های فیبروبلاست موش به منظور آنالیز سمیت سلولی استفاده شود.

سه غلظت مختلف از نمونه های مورد بررسی (نانوذرات PLGA، کورکومین معمولی، نانوذرات کورکومین-PLGA، کنترل منفی) برای مطالعه ۲۴ ساعته در نظر گرفت شد. سپس مقدار جذب خوانده و نتایج محاسبه گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوذرات کورکومین-PLGA هیچ گونه اثر سمی بر روی سلول های طبیعی ندارند (شکل ۲). همچنین سلول های تیمار شده با بالاترین غلظت توسط نانوذرات بیش از ۷۵٪ زنده ماندند.

د) میزان بقای موش ها پس از درمان: تزریق داخل صفاقی با ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم (mg/kg) کورکومین، ۵-۱۰-۲۰ (mg/kg) نانوذرات کورکومین-PLGA، ۵ (mg/kg) جنتامایسین، ۱۰ (mg/kg) PLGA و ۱۰ (mg/kg) سرم، پنج روز قبل از ایجاد عفونت در موش انجام پذیرفت. در موش های درمان نشده پس از ایجاد عفونت، ۶۰٪ موش ها سه

گردید. نانو ذرات سنتز شده کاملاً محلول در آب بودند (شکل 1A). در حالی که کورکومین معلق در آب، نامحلول بود (شکل 1B). نانو ذرات به صورت منفرد پراکنده شدند و از نظر اندازه از ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر متغیر بودند (شکل 1C).

ب) اثر نانوکورکومین بر شمارش باکتریایی: در جدول ۱ میزان MIC و MBC ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه شامل کورکومین، Cur-PLGA-NP آورده شده است. همچنین میزان فعالیت ضدباکتریایی این ترکیبات با آنتی بیوتیک ها مقایسه گردیده است.

در این مطالعه با اندازه گیری میزان OD مشخص گردید که رشد باکتری پس از درمان با نانوذرات کورکومین به مدت ۱۰ ساعت مهار شده است. ترتیب مقادیر OD به صورت PLGA < کورکومین < Cur-PLGA-NP < جنتامایسین می باشد (نمودار 1A). همان گونه که در نمودار 1B نشان داده شده است، از روز اول افزایش تعداد باکتری موجود در خون و بیوپسی موش کنترل آلوده شده با سویه های استافیلوکوکوس قابل مشاهده می باشد (منظور از گروه کنترل، نمونه مربوط به موش بوده که با باکتری آلوده شده (بدون دارو)). این افزایش در روز سوم به اوج خود رسیده که پس از آن تعداد باکتری ها شروع به کم شدن می کند (نمودار 1A). در گروه تحت درمان با کورکومین، کاهشی در تعداد باکتری-ها مشاهده نشد و تعداد، برابر با گروه کنترل بود. در مقابل، تعداد باکتری در

جدول ۱: فعالیت ضد میکروبی (MIC و MBC) کورکومین، Cur-PLGA-NP و مقایسه با آنتی بیوتیک ها

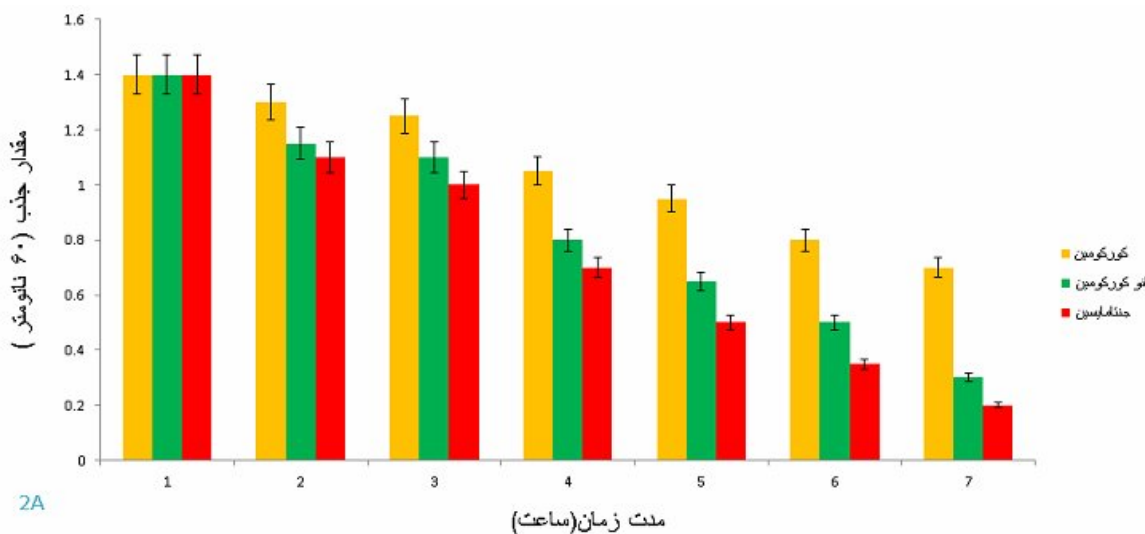
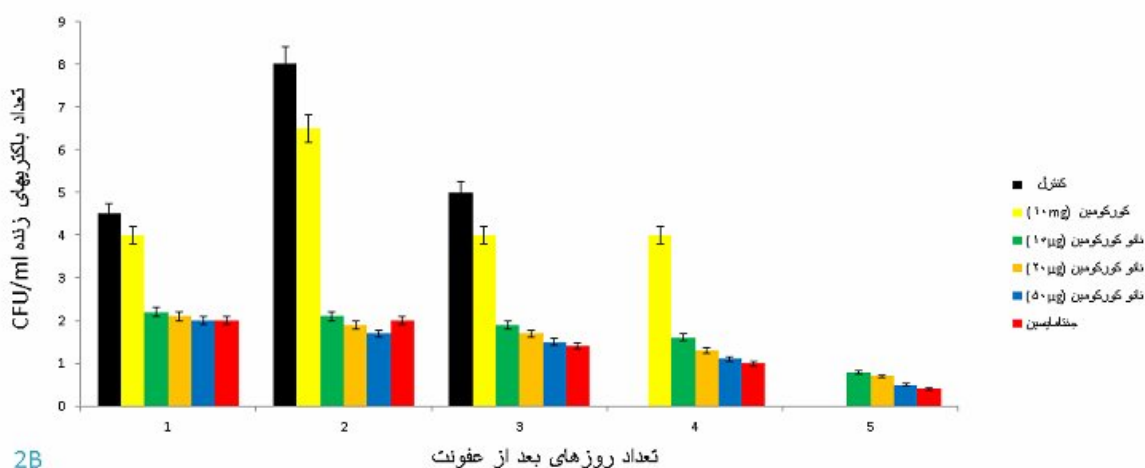
MBC $\mu\text{g ml}^{-1}$	MIC $\mu\text{g ml}^{-1}$	فعالیت ضد میکروبی	نام ماده	میکروارگانیسم
۱۶۰۰	۳۰۰	+	کورکومین معمولی	استافیلوکوکوس حساس به متی سیلین
۱۰	۶	+	نانوذرات کورکومین-PLGA	
۲۵	۱۵	+	جنتامایسین	
۱۰	۵	+	متی سیلین	
۳۵۰۰	۸۰۰	+	کورکومین معمولی	استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین
۲۵	۱۵	+	نانوذرات کورکومین-PLGA	
۴۰	۲۰	+	جنتامایسین	
-	-	-	متی سیلین	

در شرایط پیش بالینی در مدل حیوانی موش Balb/C مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه پس از سنتز نانوزل کورکومینی با واسطه پلی لاکتیک گلایکولیک اسید، اندازه و سمیت آن مورد بررسی قرار گرفت. سپس آزمایشات In vitro و In vivo برای کشت های MRSA توسط روش های MIC و MBC با استفاده از رقیق سازی براث انجام شد و در نهایت این کار بر روی کشت خون موش آلوده انجام گرفت. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نانوذرات کورکومین-PLGA می تواند در شرایط In vitro و In vivo خاصیت ضد باکتریایی بر روی سویه MRSA داشته باشند. همچنین دارای اثر فوق العاده

روز بعد از عفونت مردند. در پایان روز ششم همه آن ها مردند (شکل ۳). PLGA هیچ گونه اثری بر بقای موش های آلوده شده نداشت. کورکومین تا ۲۰٪ بقای موش ها را بهبود بخشید و نانوذرات کورکومین-PLGA در بقای موش ها بسیار مؤثر عمل نمودند (شکل ۳). همچنین اثر نانوذرات کورکومین-PLGA با اثر آنتی بیوتیک قابل مقایسه بود.

بحث

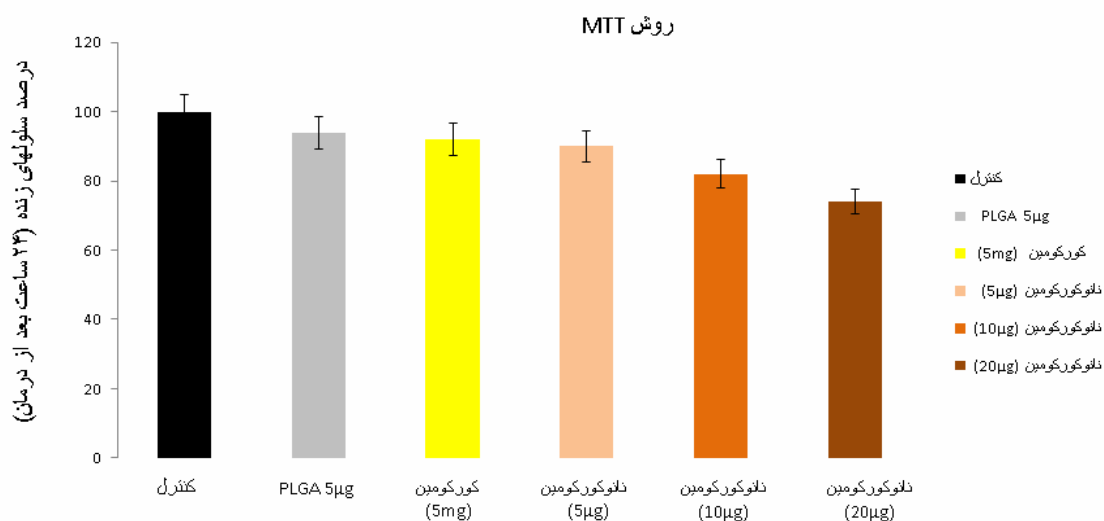
پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوکورکومین در برابر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین



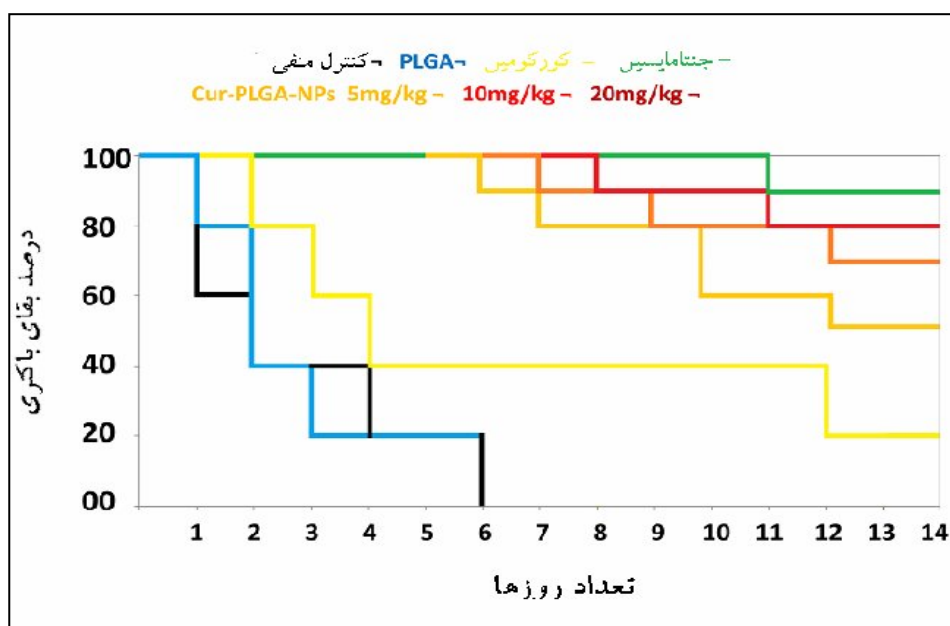
نمودار ۱: تاثیر کورکومین، نانوذرات کورکومین-PLGA و جنتامایسین در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شرایط درون تن

فیزیولوژیکی کاهش می یابد (۱۴). دستورالعمل مقابله و محدود نمودن سویه های MRSA با مقاوم شدن ۴۸٪ از افراد به چالش کشیده شده است. در عفونت های بیمارستانی، حضور سویه های MRSA، نرخ مرگ و میر بالای افراد مبتلا به این سویه ها و نیز هزینه های درمانی بالا به معضل بزرگی تبدیل شده است (۱۴). فتح الله زاده (Fatholahz adeh) و همکاران در سال ۲۰۰۸ سویه های MRSA را علاوه بر متی سیلین به سایر گروه های آنتی بیوتیکی بسیار مقاوم گزارش نمودند (۱۵).

مطلوب بر روی عفونت زخم سودوموناسی بر روی زخم سوختگی درجه دو می باشد و قابلیت تجاری سازی و استفاده بالینی در بیماران مبتلا به سوختگی را دارد. درمان و ریشه کنی پاتوژن های درون سلولی به کمک درمان های متداول، چالشی بزرگ محسوب می شود. زیرا ترکیبات درمانی مورد استفاده قادر به نفوذ به غشای سلولی نمی باشند. از طرفی کاربردهای بالینی نیز با محدودیت هایی مانند دوز تجویزی رو برو است. زیرا حلالیت دوز تجویزی در pH



شکل ۲: نتایج آنالیز سمیت سلولی توسط سنجش MTT، ۲۴ ساعت پس از درمان.



شکل ۳: بقای استافیلوکوکوس اورئوس در موش آلوده شده بعد از درمان.

انحراف معیار زیاد در نتایج به دست آمده در این مطالعه از نقاط ضعف آن بوده و صحت نتایج را به خطر می‌اندازد. گروه‌های تحقیقی بسیاری پلی‌استرهای زیست‌تخریب‌پذیری را مانند پلی‌لاکتیدها و پلی‌لاکتید گلایکولیدها را به عنوان حامل جتتامایسین مورد استفاده قرار دادند تا روند درمانی آن را بهبود بخشند (۲۱). ینیس (Yenice) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که در شرایط *In vivo* مدل بروسلا، میکروکپسول‌های پلی‌لاکتیدی تعداد ارگانسیم‌های زنده را کاهش می‌دهد (۲۲). در مطالعه حاضر، نتایج تزریق نانوذرات کورکومین-PLGA برای درمان عفونت استافیلوکوکی نشان داد که تجویز کورکومین به صورت نانوذرات، توزیع دینامیکی و پایداری درون سرمی این ماده را افزایش داده و ۲۰٪ کورکومین تزریقی در بدن پایدار می‌ماند. بنابراین، از ویژگی کشتن باکتری‌های درون سلولی توسط این ماده می‌توان بهره برد. کورکومین هم چنین به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌تواند در بدن فعالیت‌های ضد باکتریایی دیگری نیز ایفا نماید. با توجه به بررسی‌های انجام شده و مرور منابع علمی موجود مشخص گردید که تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه انجام نشده است.

بر اساس مطالعه ما، کشت‌های نوترینت بر اثر نشان‌دهنده اثر باکتریوستاتیک و سمیت روی باکتری بوده و به ما کمک نمود تا حداقل غلظت مهار نانوذرات کورکومین سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی را مشخص نماییم. این آزمایش نشان داد که رشد استافیلوکوکوس اورئوس در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از کورکومین ادامه خواهد یافت. اما در حضور ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوکورکومین، رشد باکتری یاد شده متوقف می‌گردد. افزایش تعداد باکتری‌های نمونه‌های خون و بیوپسی موش‌های گروه کنترل آلوده شده با استافیلوکوکوس اورئوس از روز اول مشاهده گردید. این افزایش در تعداد باکتری‌ها در روز سوم به بالاترین مقدار خود رسید و هیچ‌گونه کاهشی در تعداد باکتری‌های گروه کنترل مشاهده نگردید. در مقابل، تعداد باکتری در موش‌هایی که نانوکورکومین دریافت کرده بودند کاهش قابل توجهی داشت.

اتصال استافیلوکوکوس اورئوس به بافت میزبان برای انتقال سم پاتوژن ضروری است. این اتصال به واسطه حضور گلیکوپروتئین‌های سطحی به خصوص فیبرونکتین در باکتری صورت می‌گیرد. وجود فیبرونکتین باکتریایی به وسیله $\alpha_5\beta$ -integrin سلول‌های اندوتلیال مشخص می‌شود (۱۶). دیواره رگ‌های آلوده شده به این باکتری موجب استقرار و انتشار استافیلوکوکوس اورئوس می‌گردد. همچنین فاکتور von Willebrand، که برای تثبیت پلاکت ضروری است می‌تواند موجب اتصال استافیلوکوکوس اورئوس گردد (۱۷). کلاژن تیپ ۱ و ۴ موجود در دیواره سلول‌های اندوتلیال توسط باکتری‌ها به عنوان ابزاری در اتصال مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم چنین مولکول‌های سطحی غیرپروتئینی نیز ممکن است به عنوان اتصال درون رگی مورد استفاده باکتری‌ها قرار گیرند (۱۸).

سنجش‌ها در شرایط آزمایشگاهی بر پایه کشت سلول‌ها امکان شمارش باکتری‌های متصل شده را داده است. در حالی که مدل‌های اندوکاردیت امکان تعیین تعداد باکتری‌های متصل شده به دیواره رگ را نمی‌دهد. در مطالعه حاضر با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس می‌توان استافیلوکوکوس اورئوس را که با ایزوتیوسیانات فلورسنت نشان‌گذاری شده به صورت داخل سرخرگی به موش تزریق کرد و درمان با نانوذرات کورکومین-PLGA در برابر اتصال درون رگی باکتری‌ها را مورد بررسی قرار گرفت. در باکتری‌هایی که درمان نشده بودند هم‌تک باکتری‌هایی متصل شده و هم جمعیت باکتریایی متصل شده به سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها قابل رویت بود. اما در موش‌های درمان شده اثری از اتصال استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد. همچنین استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از پلاکت‌های خونی می‌تواند به زخم‌ها نیز اتصال یابد و ایجاد آلودگی نماید (۱۹). فعالیت ضد باکتریایی کورکومین در برابر استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه تولید پراکسید هیدروژن که برای باکتری سمی است، مربوط می‌شود (۲۰).

تعداد CFU‌های متغیر با تعداد اندک موش در هر گروه و

مناسبتی داشته و نحوه آزادسازی شان در شرایط آزمایشگاهی مناسب بود. با اینکه پیش از این، نانوذرات کورکومین-PLGA در درمان عفونت مورد استفاده قرار نگرفته بودند، اما مشخص گردید که این نانوذرات نسبت به خود کورکومین، مؤثرتر عمل می نمایند. این نانوفورمولاسیون ممکن است زمان زیست فراهمی و زمان بقای کورکومین در بدن را بهبود بخشد و اثر آن بر روی سویه های MRSA را افزایش دهد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نتایج آزمایشات In vivo و In vitro نشان داد که می توان به صورت ایمن از نانوذرات کورکومین-PLGA برای درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA و پروفیلاکسی باکتری می و اندوکاردیت استفاده نمود. علاوه بر ماهیت ایمن و طبیعی کورکومین، تاریخچه طولانی در استفاده از این ماده به عنوان دارو و هزینه پائین آن موجب شده تا نانوکورکومین کاندید نوید بخشی برای استفاده در بالین باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز علوم و تحقیقات پزشکی دانشگاه تهران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

بنابراین می توان نتیجه گرفت که درمان با نانوذرات کورکومین-PLGA، می تواند خون را از وجود باکتری پاک نماید. دلیل این امر را می توان چنین توجیه نمود که به واسطه حضور نانوذرات کورکومینی، اتصال باکتری ها از طریق فرآیند حساسیت جمعیتی (quorum sensing) و به دنبال آن تشکیل بیوفیلم مهار می گردد. بر همین اساس نتیجه مطالعه رودرپا و بایاس (Rudrappa and Bais) در سال ۲۰۰۸ نشان داد که کورکومین قادر به کنترل فاکتور های بیماری زا و ژن های شروع کننده تولید بیوفیلم در سودوموناس ائروجنینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) می باشد (۲۳).

با توجه به نتایج ارزیابی سمیت سلولی مشخص گردید که نانوذرات کورکومین-PLGA هیچ گونه اثر سمی بر سلول های طبیعی ندارند. به طوری که سلول های درمان شده با بالاترین غلظت توسط نانوذرات، بیش از ۷۵٪ زنده ماندند.

همچنین مشخص گردید که نانوذرات کورکومین-PLGA با غلظت ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم تزریق درون صفاقی، در بقای موش ها بسیار مؤثر هستند. به طوری که در این مطالعه اثر نانوذرات کورکومین-PLGA با اثر آنتی بیوتیک قابل مقایسه بود. از نظر دارویی، نقطه ضعف کورکومین، نامناسب بودن آن برای استفاده خوراکی است. اولین بار آماده سازی نانوذرات توسط لیو (Liu) و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام پذیرفت (۲۳). نانوذرات تولیدی آن ها از لحاظ فیزیکی شرایط

References

1. Mathers C, Boerma T. The World Health Organization, The global burden of disease. Available at: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004_update_full.pdf (2004).
2. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE. Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control. 2007; 35: 619-622.
3. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med. 2002; 162(19): 2229-2235.
4. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, O'Donnell A,

- Wagener MM, Yu VL. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2003; 82(5): 322-332.
5. Shoaie Hassani A, Amirmozafari N, Ghaemi A. Virulence increasing of *Salmonella typhimurium* in Balb/c Mice after heat-stress induction of phage shock protein A. *Curr Microbiol*. 2009; 59: 446-450.
 6. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Eep Med Biol*. 2007; 595: 105-125.
 7. Nose M, Koide T, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. Trypanocidal effects of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull*. 1998; 21: 643-645.
 8. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Aguiar NE. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*. 2001; 21(4): 2895-2900.
 9. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) devices. *Biomaterials*. 2000; 21(23): 2475-2490.
 10. Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto I, Yoshida Y, Maekawa T, Venugopal K, Kumar S. Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-1 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e32616.
 11. Cartiera MS, Ferreira EC, Caputo C, Egan ME, Caplan MJ. Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin. *Mol Pharm*. 2010; 7(1): 86-93.
 12. Said DE, Elsamad LM, Gohar YM. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. *Parasitol Res*. 2012; 111(2): 545-54
 13. Chang PY, Peng SF, Lee CY, Lu CC, Tsai SC, Shieh TM, Wu TS, Tu MG, Chen MY. Cell death through regulation of the function of MDR1 and reactive Curcumin-loaded nanoparticles induce apoptotic oxygen species in cisplatin-resistant CAR human oral cancer cells. *Int J Oncol*. 2013; 43(4): 1141-1150
 14. Syng Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3(9): 1101-1108.
 15. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, Nouri K, Sedaghat H, Feizabadi MM. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist*. 2008; 14(3): 217-220.
 16. Que YA, Francois P, Haefliger JA, Mondain V, Durant J, Pradier C, Bernard E. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun*. 2001; 69(10): 6296-6302.
 17. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study*. J

- Am Coll Cardiol. 1997; 29(3): 630-634.
18. Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peters G. Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 1997; 176(4): 984-991.
19. Preissner KT, Chhatwal GS. Extracellular matrix and host cell surfaces: potential sites of pathogen interaction. In: Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (Eds): Cellular. Mi, ASM-Press, Washington D.C; 2005: 87-104.
20. Suzuki M, Nakamura T, Iyoki S, Fujiwara A, Watanabe Y, Mohri K, Isobe K, Ono K, Yano S. Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities. Biol Pharm Bull. 2005; 28(3): 1438-1443.
21. Lecaroz MC, Blanco-Prieto MJ, Campanero MA, Salman H, Gamazo C. Poly(DL-lactide-co-glycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics, pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. Antimicrob Agent Chemother. 2007; 51(4): 1185-1190.
22. Yenice I, Calis SC, Atilla B, Kas HS, Ozalp M, Ekizoglu M. In vitro/in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. J Microencapsul. 2003; 20(2): 705-717.
23. Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. J Agric Food Chem. 2008; 56: 1955-1962.



A study to investigate antibacterial effect of Nanocurcumin against pre-clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection

Elham Ansari¹, Khosro Issazadeh², Alireza Shoaie Hasani³

¹ MS.c., Department of Microbiology, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

³ Assistant Professor, Department of Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine (SATiM), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Bacteremia and endocarditis are the most commonly infection in *Staphylococcus aureus*. Due to curative effects of curcumin, including as an antibiotic, it can be used as a medicine albeit after reducing its side effects. This study aimed to investigate antimicrobial effects of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in an animal model (Balb/C mice).

Materials and Methods: This pre-clinical study was performed in the department of scientific research and clinical technology of Khomeini Hospital, Tehran. Following synthesis of curcumin-PLGA nanoparticles, their size were measured using scanning electron microscopy and their toxicity were determined by a colorimetric method (MTT). In vitro studies to analyze the effects of this compound on MRSA were performed firstly based on MIC and MBC tests and broth dilution. Next, a same procedure was conducted on blood cultures obtained from infected mice.

Results: A concentration of 6 micrograms of urcumin-PLGA nanoparticles per millimeter showed Antibacterial activity on MRSA strains. A same effect was observed in vivo in mice after treatment by 10 µg/ml urcumin. Furthermore, based on this results, there were no side effects on the normal cells and 75% of the cells treated with the highest concentration of this particle were survived.

Conclusion: these results show that curcumin-PLGA nanoparticles can be used safely for the treatment of bacteremia and endocarditis prophylaxis of infections caused by MRSA.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Nano-curcumin, Antibacterial effect.

Correspondence to: Elham Ansari

Tel: +989125448646

E-mail: elham_ansari83@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(1): 26-37.