مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شمـاره‌ی ۹۳, مهـر و آبان ۱۳۹۳, صفـحات ۸۶ تا ۹۵

بررسی اثرات ضد باکتری نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

دکتر زهره فائزی زاده[۱]، امیر قریب[۲]، مسعود گودرزی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده‌ی پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی faezizadeh@gmail.com

دریافت: ۹۲/۵/۲۶ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: *باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از پاتوژن‌های مهم در علم پزشکی است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که برخی ترکیبات موثره گیاهی به شکل فرموله شده در یک سیستم حمل دارو نظیر نانولیپوزوم‌ها می‌توانند رشد باکتری‌های مقاوم را مهار نمایند. سیلیمارین ماده‌ی موثره گیاه دارویی خار مریم (Silybum mariunum L) می‌باشد. اهداف این مطالعه شامل تهیه و ارزیابی کارایی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین در از بین بردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی بود.*

روش بررسی: *ابتدا نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین به کمک روش تبخیر فاز معکوس تهیه شدند و کارایی محصور سازی آن‌ها محاسبه گردید. سپس حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) محلول نانولیپوزومی حاوی سیلیمارین برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک با روش رقیق سازی متوالی اندازه‌گیری گردید. در نهایت به کمک رسم نمودار مرگ- زمان میزان مرگ باکتری مذکور در حضور سیلیمارین به شکل محصور در نانولیپوزوم‌ها و آزاد در غلظت برابر با MIC، مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در این مطالعه میزان کارایی محصور سازی برای نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین ۰/۱۷±۸۳ درصد تعیین گردید. حداقل غلظت مهار کنندگی شکل آزاد سیلیمارین و نیز محصور در نانولیپوزوم‌ها به‌ترتیب ۵۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. همچنین اثرات ضد باکتریایی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین در زمان‌های یکسان بیش از شکل آزاد سیلیمارین بود.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که سیلیمارین محصور شده در نانولیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد آن، به دلیل کارایی بالا می‌تواند به عنوان یک انتخاب مناسب در تحقیقات بالینی مربوط به درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار گیرند.*

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، سیلیمارین، کارایی محصور سازی، نانولیپوزوم

مقدمه

گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) حاوی ماده موثره سیلیمارین می‌باشد (۱). این ماده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد آرتریت و نیز اثرات ضد باکتریایی می‌باشد (۳-۱). امروزه علت بسیاری از مرگ‌ومیرهای ناشی از عفونت‌ها، ایجاد سوش‌های جدید مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۴). این امر محققین

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

۳- کارشناس ارشد زیست شناسی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

را بر آن داشته است که به منظور درمان این نوع عفونت‌ها همواره به دنبال تولید داروهای تازه یا روش‌های درمانی نوین باشند (۵-۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* (***Staphylococcus aureus***) باکتری گرم مثبتی است که می‌تواند بیماری‌هایی از جمله عفونت ریه (پنومونی)، عفونت‌های مجرای ادرار، عفونت‌های پوستی، التهاب جدار عروق، منتژیت، التهاب استخوان (استئومیلیت) را ایجاد نماید (۶). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که به‌طور اختصار به آن (MRSA) گفته می‌شود به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مثل متی‌سیلین، نافی‌سیلین، اُگزاسیلین مقاوم است، به‌طوری‌که این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از آن اثری ندارند (۴). شیوع استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به‌خصوص در عفونت‌های بیمارستانی، در بیماران دارای زخم باز و همچنین در بیمارانی که ضعف سیستم ایمنی بدن دارند، بیشتر است (۶). استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب گردیده که نه تنها این باکتری بلکه سایر باکتری‌های پاتوژن نیز به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند (۴). بنابراین استفاده از ترکیبات جدید و بی‌خطر که دارای خواص ضد باکتریایی باشند و نیز استفاده از نانوفناوری پزشکی در راستای از بین بردن باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک امری ضروری به نظر می‌رسد (۷). در مورد ترکیبات جدید استفاده از برخی ترکیبات طبیعی و گیاهی پیشنهاد می‌گردد، زیرا این مواد به طور معمول دارای اثرات سمی و جانبی کمتری در مقایسه با سایر داروهای شیمیایی می‌باشند (۸). اگرچه برخی از ترکیبات گیاهی نقش به سزایی در از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارند، اما با این وجود، استفاده از آن‌ها به علت محلولیت کم (و در نتیجه در دسترسی زیستی پایین) و نیز ناپایداری در شرایط ***in vivo*** و ***in vitro*** دارای محدودیت شده است (۸). یکی از روش‌های جدید دارو درمانی استفاده از روش حمل دارو (Drug Delivery) و استفاده از نانو ذرات و نانولیپوزوم‌ها برای درمان بیماری‌ها می‌باشد. نانولیپوزوم‌ها گویچه‌های بسیار کوچکی هستند که از چربی و عمدتا فسفولیپیدها تشکیل شده‌اند. این ذرات قادرند داروها را در خود محصور نموده و جابجا نمایند (۱۰و ۹). مشخص گردیده که نانولیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی تمایل بیشتری برای اتصال به پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند (۱۱). بنابراین با استفاده از لیپیدهای قطبی حاوی بار منفی (مانند دی ستیل فسفات) می‌توان نانولیپوزوم‌ها را برای اتصال و رها سازی مواد ضد باکتریایی به درون سلول باکتری گرم مثبت هدف دار نمود. به این نوع هدف‌گیری، هدف‌گیری غیرفعال (Passive Targeting) می‌گویند (۱۲). در این حالت غلظت ماده موثره در اطراف سلول باکتری و نیز نفوذپذیری آن به درون سلول باکتری افزایش یافته و بدین ترتیب اثر ضد باکتریایی این ترکیبات تقویت می‌گردد (۱۳). تاکنون در دنیا اثر نانو لیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک مطالعه نشده است، لذا این مطالعه با هدف تهیه و ارزیابی کارایی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین در جهت از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در شرایط آزمایشگاهی (***In vitro***) انجام گرفت.

روش بررسی

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده: برخی از مواد به کار رفته در این پژوهش شامل لیستین، دی‌ستیل فسفات، تریتون X-100 و سیلیمارین از شرکت سیگما تهیه گردیدند و موادی از قبیل کلسترول و دی اتیل اتر از شرکت مرک خریداری شدند. در این مطالعه از دستگاه‌های مختلفی نظیر روتاری اواپوراتور (Rotary Evaporator) ساخت شرکت Heidolph مدل-ZQF ۸۵، پمپ خلاء

ساخت شرکت Emerson مدل ۰۲۰۵، اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراء بنفش ساخت شرکت Shimadzu مدل ۲۲۰۰، دستگاه اولترافیلتراسیون ساخت شرکت Millipore مدل ۲۰۰-G، دستگاه زتا سایزر (Zeta sizer) ساخت شرکت Malvern مدل HAS ۳۰۰۰ و pH متر ساخت شرکت Mettler-toledo مدل ۳۲۰ استفاده گردید.

تهیه‌ی نانولیپوزوم‌های حاوی و فاقد سیلیمارین: به منظور تهیه‌ی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین از روش Fang و همکاران استفاده گردید (۱۳). با این تفاوت که در فرمولاسیون جدید از ماده دی‌ستیل فسفات نیز استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۰/۵۳۹گرم لسیتین سویا، ۰/۷۵۲ گرم کلسترول و ۰/۵۴۷ گرم دی ستیل فسفات در ۱۰ میلی‌لیتر اتر حل شد. در لوله آزمایش دیگری ۲۵۰ میلی‌گرم سیلیمارین در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (۱/۵ مولار با pH معادل ۷/٤) حل و به ظرف بالا اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت تاثیر امواج فراصوت ٦μ قرار داده شد. سپس به دستگاه روتاری اواپوراتور منتقل و تحت فشار کم (ناشی از اتصال پمپ خلاء به دستگاه مذکور) در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با چرخش ۵۰ دور در دقیقه تبخیر گردید. به‌منظور حذف سیلیمارین محصور نشده و سایر ترکیبات از محلول نانولیپوزومی، محلول مذکور به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ شد. در نهایت برای یکنواخت نمودن قطر ذرات نانولیپوزوم ها، محلول به دست آمده با استفاده از دستگاه اولترافیلتراسیون و فیلتر پلی کربنات با قطر منافذ ۱۰۰ نانومتر اولترافیلتره گردید. به منظور تهیه‌ی نانولیپوزوم‌های فاقد سیلیمارین نیز دقیقا مانند روش ذکر شده عمل گردید. با این تفاوت که به جای اضافه نمودن یک میلی‌لیتر فاز آبی حاوی سیلیمارین ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد.

اندازه‌گیری قطر ذره‌ای نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین: برای تعیین اندازه‌ی ذرات نانولیپوزومی از روش Meng و همکاران استفاده گردید (۱۴). در این روش ابتدا ۲۵ میکرولیتر محلول نانولیپوزومی تهیه شده در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شد. محلول مذکور به منظور تعیین قطر ذرات نانولیپوزومی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با زاویه‌ی تفرق ۹۰ درجه با دستگاه زتا سایزر مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین درصد کارایی محصورسازی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین: برای اندازه‌گیری مقدار سیلیمارین محصور شده از روش زانک و همکاران استفاده گردید (۱۵). در این روش ابتدا با استفاده از بافر فسفات سالین (۱/۵ مولار با pH معادل ۷/٤) از سیلیمارین رقت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲ و ۰/۷۸۱ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. سپس نمودار استاندارد تغییرات غلظت سیلیمارین در برابر تغییرات جذبی آن در طول موج ۲۸۰ نانومتر رسم گردید. سپس با استفاده از یک میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ درصد تریتون X-100 غشای نانولیپوزوم‌ها در یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی لیز شده و سیلیمارین موجود در آن آزاد شد. در مرحله‌ی بعد مقدار جذب این محلول در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد غلظت سیلیمارین برحسب میلی گرم در هر میلی‌لیتر محلول حاوی نانولیپوزومی محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری مقدار کارایی (بازده) محصورسازی روش به کار رفته در تهیه‌ی نانولیپوزوم ها، از روش موکابه و همکاران استفاده شد (۷). در این روش با استفاده از معادله زیر مقدار درصد کارایی محصورسازی محاسبه گردید:

$$\text{درصد کارایی} = \frac{\text{مقدار سیلیمارین محصور شده در یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی}}{\text{مقدار سیلیمارین مصرفی اولیه برای تهیه یک میلی لیتر محلول نانولیپوزومی}} * ۱۰۰$$

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه استافیلوکوکوس اورئوس: سویه مقاوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (MRSA) از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز اخذ گردید. این سویه از نمونه‌های بالینی بیمارستان گلستان اهواز جدا گردید و توسط تست‌های تکمیلی مورد تایید قرار گرفت. برای بررسی میزان مقاومت باکتری مذکور به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، کربنیسیلین و وانکومایسین از روش انتشار دیسک (Disk Diffusion) استفاده گردید (۱۶). در این روش دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مذکور بر روی محیط کشت باکتری قرار داده شد. فاصله هر دیسک با دیگری حداقل ۲٤ میلی‌متر و فاصله از لبه‌ی پتری بیشتر از ۱۵ میلی‌متر بود. برای اطمینان بیشتر در نتیجه، آزمایش فوق ۵ بار تکرار گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس وجود و یا عدم وجود هاله‌های رشد مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (MIC) محلول نانولیپوزومی حاوی و فاقد سیلیمارین و فرم آزاد آن: برای این منظور از روش رقیق سازی متوالی استفاده گردید (۱۱). ابتدا ۱۰ لوله حاوی یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل برای هر مرحله آزمایش آماده شد. به اولین لوله، ۱ میلی‌لیتر محلول نانولیپوزومی حاوی سیلیمارین (با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن محتویات آن ۱ میلی‌لیتر از آن برداشته و به لوله دوم اضافه گردید. این عمل تا لوله‌ی دهم ادامه پیدا کرد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر از لوله‌ی دهم برداشته و دور ریخته شد. به این صورت یک ردیف رقت در هر ۱۰ لوله تهیه گردید که غلظت سیلیمارین (به فرم محصور در نانولیپوزوم‌ها) در آن‌ها به‌ترتیب ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۲، ۳/۹۰۶، ۱/۹۵۳ و ۰/۹۷۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سوش مقاوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند برابر بود آماده گردید. به هر کدام از لوله‌های فوق یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر لوله به پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. غلظت سیلیمارین موجود در لوله‌ای که این محیط کشت از آن تولید شده بود برابر با MIC محلول نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین بود. برای تعیین MIC محلول سیلیمارین به فرم آزاد و نیز نانولیپوزوم‌های فاقد سیلیمارین همانند روش ذکر شده در بالا عمل شد.

روش بررسی و مقایسه‌ی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی و فاقد سیلیمارین و نیز فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC در شرایط آزمایشگاهی: در این قسمت از مطالعه از روش موگابه و همکاران استفاده گردید (۱۱). ابتدا باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مولر هینتون براث کشت داده شد. پس از رسیدن درجه‌ی کدورت آن به نیم مک فارلند، ۱۰ میکرولیتر از آن برداشته و به یک لوله محیط کشت مولر هینتون براث حاوی یک میلی‌لیتر محلول نانولیپوزومی حاوی سیلیمارین اضافه گردید و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در مدت زمان‌های ۰، ۲، ٤، ٦ و ۱۸ ساعت از محیط کشت مذکور به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل گردید. عمل انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. تعداد کلنی‌های تشکیل شده در محیط کشت جامد و نیز در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع شمارش و محاسبه گردید. نمودار مرگ زمان تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی‌های تشکیل شده در بازه‌های زمانی ذکر شده رسم گردید. این آزمایش در مورد

محلول نانولیپوزوم‌های فاقد سیلیمارین و نیز فرم آزاد آن در غلظت‌های برابر MIC تکرار شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به دست آمده در این مطالعه به صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SD) گزارش گردید. همچنین با استفاده از آزمون T-Test و ANOVA دو طرفه داده‌های به‌دست آمده مورد مقایسه قرار گرفتند. در این پژوهش $P<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار کارایی محصورسازی و قطر ذره‌ای نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین: در جدول ۱، مقدار سیلیمارین محصور شده، درصد کارایی محصورسازی و میانگین قطر ذرات نانولیپوزومی مشاهده می‌گردد. همانطور که مشاهده می‌گردد قطر ذرات نانولیپوزومی کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و از نوع لیپوزوم‌های کوچک (Small Liposomes) می‌باشد.

جدول ۱: مقدار سیلیمارین محصور شده، کارایی محصورسازی و میانگین قطر ذره ای نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین

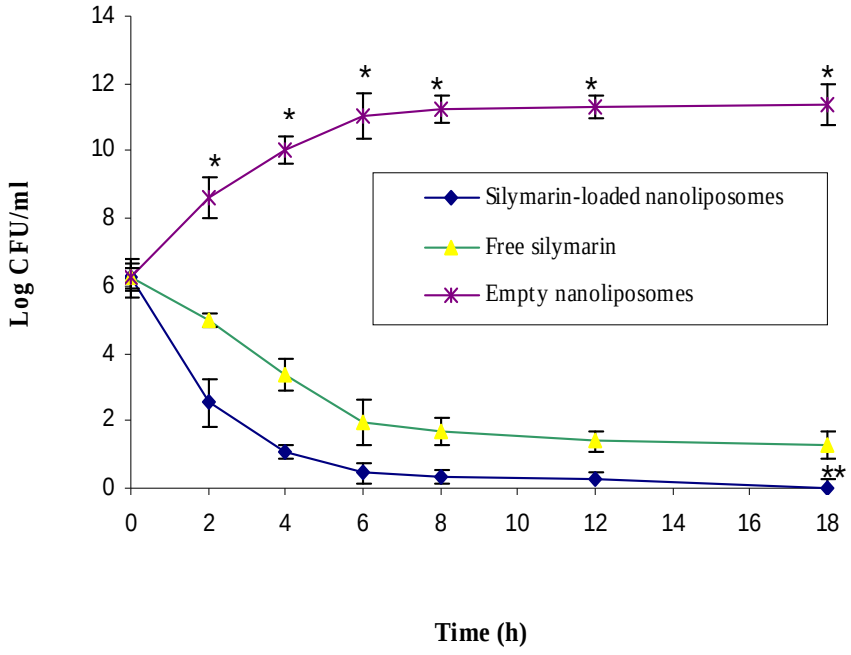
فرمولاسیون	سیلیمارین محصور شده (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	کارایی محصورسازی (درصد)	میانگین قطر ذرات نانولیپوزومی (نانومتر)
نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین	۲۰۷/۵±۰/۱۷	۸۳±۰/۱۷	۹۵±۰/۲۵

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس: در مطالعه‌ی حاضر میزان **حساسیت سویه** مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کربنیسیلین، متی‌سیلین و وانکومایسین نشان داد که باکتری مورد مطالعه به متی‌سیلین و کربنیسیلین مقاوم بوده و به ونکومایسین حساس می‌باشد.

نتایج اندازه‌گیری مقدار MIC نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین و فرم آزاد آن: مقدار MIC نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین و فرم آزاد آن به ترتیب ۱۲۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که محصور سازی سیلیمارین در نانولیپوزوم‌های هدفدار شده با دی ستیل فسفات کارایی آن را افزایش داده است. همچنین بررسی اثر نانولیپوزوم‌های فاقد سیلیمارین بر روی رشد باکتری مذکور نشان داد که این نانولیپوزوم ها تاثیری در رشد باکتری مذکور نداشته و تعداد کلنی‌های باکتری تشکیل شده در حضور و یا عدم حضور این نوع نانولیپوزوم ها برابر بوده است.

نتایج مقایسه‌ی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی و فاقد سیلیمارین و فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC در شرایط آزمایشگاهی: همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده، نانولیپوزوم های حاوی سیلیمارین توانسته است در بازه‌های زمانی ۲، ۴، ۶ و ۱۸ساعت به ترتیب به میزان ۶۸، ۸۲/۶۷، ۹۹/۹۲ و ۱۰۰ درصد رشد باکتری مذکور را متوقف نماید. در حالی‌که فرم آزاد آن در همین بازه‌های زمانی به‌ترتیب به‌میزان ۱۹/۷۴، ۴۵/۹۰، ۶۸/۶۹ و ۷۹/۴۵ درصد رشد باکتری مذکور را متوقف کرده است. در این پژوهش اختلاف معنی‌داری بین لگاریتم

تعداد کلنی‌های تشکیل شده مشاهده گردید (P=۰/۰۲۵).



نمودار ۱: مقایسه‌ی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی و فاقد سیلیمارین و فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC در شرایط آزمایشگاهی

بحث

در دنیا هر ساله هزاران بیمار در بیمارستان‌ها مورد درمان قرار می‌گیرند (۱۷). در برخی از این افراد عفونت‌های پوستی رخ می‌دهد که ممکن است ناشی از زخم، سوختگی و حتی اعمال جراحی باشد (۱۸). اکثر عفونت‌های مذکور به‌دلیل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*) و *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) گزارش شده‌اند (۱۹و۲۰). از این میان *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دلیل بروز مقاومت‌های دارویی مشکلات زیادی را در درمان عفونت‌های ناشی از آن به وجود آورده است. در سال‌های اخیر سویه‌هایی از این باکتری مشاهده شده است که به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های معمول مانند تتراسایکلین‌ها، ماکرولیدها، لینکوز اسیدها و فلورکوئینول‌ها مقاوم می‌باشند (۶). امروزه استفاده از برخی ترکیبات مؤثر گیاهی به‌دلیل سمیت کمتر نسبت به ترکیبات شیمیایی، به منظور از بین بردن باکتری‌های مقاوم کاربرد وسیعی یافته است (۸). با این وجود یکی از عوامل محدود کننده استفاده از ترکیبات گیاهی، ناپایداری آن‌ها در شرایط درون تن و برون تن می‌باشد. بنابراین محصورسازی آن‌ها در نانوذرات می‌تواند نقص مذکور را برطرف و کارایی این ترکیبات را افزایش دهد (۱۳). همچنین هدف دار نمودن نانوذرات نیز می‌تواند کارایی ترکیبات محصور شده را چندین برابر افزایش دهد (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش فنگ و همکاران، با فرمولاسیونی جدید نانولیپوزوم‌های هدف دار حاوی سیلیمارین تهیه گردید. مطالعات نشان داده است که این روش به دلیل داشتن بازده محصور سازی بالا می‌تواند

یکی از بهترین روش‌ها جهت تهیه‌ی نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی باشد (۱۴). به همین دلیل ما نیز در این پژوهش از شیوه مذکور استفاده نمودیم. در مطالعه‌ی حاضر بازده محصورسازی برابر با ۸۳±۰/۱۷ درصد گزارش گردید. این یافته با توجه به نتایج به‌دست آمده در مطالعات منگ و ژیلیانگ (بازده ۶۵ و ۷۰ درصدی) در حد قابل توجه‌ای می‌باشد (۲۱و ۱٤). بررسی‌های مختلف نشان داده است که ترکیبات فنلی می‌توانند با بازده بیشتری در لیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی محصور گردند. زیرا در این حالت تراوایی غشای نانولیپوزوم‌ها نسبت به زمانی که بار سطحی آن‌ها مثبت یا خنثی باشد، به حداقل می‌رسد (۱۴). به همین دلیل در این پروهش نیز از ماده‌ی دی ستیل فسفات در فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها استفاده گردید. که خود می‌تواند توجیه‌کننده‌ی بازده بیشتر محصورسازی در مقایسه با مطالعات مشابه باشد (۱۵و ۱٤). یافته‌های ما نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی شکل آزاد سیلیمارین و نیز محصور در نانولیپوزوم‌ها به‌ترتیب ۵۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. در تحقیقات مشابه گزارش گردیده که لیپوزوم‌های حاوی متیل-ان- متیل انترانیلات و الکل آلفا بیسابول (ترکیبات آلی گیاه *Zanthoxylum tingoassuiba* می‌تواند به خوبی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین را از بین ببرد (۲۲). بر اساس اطلاعات موجود یکی از دلایل کارایی بهتر سیلیمارین محصور در نانولیپوزوم‌ها نسبت به شکل آزاد این ماده، تمایل بیشتر نانولیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی در اتصال به پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (۱۳). در این حالت غلظت ماده فنلی در اطراف سلول باکتری و نیز نفوذپذیری آن به درون سلول باکتری افزایش می‌یابد (۱۵). به‌همین دلیل در این پژوهش، وجود دی ستیل فسفات به‌عنوان یک آنیون در غشای نانولیپوزوم‌ها موجب افزایش کارایی سیلیمارین در از بین بردن باکتری مذکور گردیده است. رسم نمودار مرگ - زمان متداول‌ترین روش برای ارزیابی اثر لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌بیوتیک بر باکتری‌ها می‌باشد (۲۴و ۲۳، ۷). مطالعه‌ی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین در غلظت برابر MIC بر روی سوش مورد آزمایش با رسم نمودار مرگ - زمان نشان داد که اثرات ضد باکتریایی نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین در زمان‌های یکسان بیشتر از شکل آزاد سیلیمارین بوده است. به‌طوری که نانولیپوزوم‌های حاوی سیلیمارین توانسته طی ۱۸ ساعت تمام باکتری‌های موجود در محیط کشت را از بین ببرد. در یک تحقیق مشابه گزارش شده که اسید اولئیک محصور در لیپوزوم در مقایسه با شکل آزاد آن قادر است به‌طور موثرتر و در مدت زمان کوتاهتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را در شرایط درون تن و برون تن از بین ببرد (۲۵). همچنین نانولیپوزوم‌های حاوی اپی گالوکاتچین گالات (ترکیب موثره موجود در چای و انگور) می‌توانند این نوع باکتری از محیط کشت حذف نمایند (۹). چندین نظریه از جمله الحاق جدار نانولیپوزوم‌ها با غشای خارجی باکتری و نیز حساس نبودن سیلیمارین به آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌تواند توجیه‌کننده مکانیسم افزایش فعالیت ضد باکتریایی این فرمولاسیون باشد (۲۵و ۷).

نتیجه گیری

با توجه به اینکه در این تحقیق سیلیمارین محصور در نانولیپوزوم‌ها توانسته سویه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را از بین ببرد، می‌توان فرمولاسیون مذکور را جهت انجام تحقیقات بالینی پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که با حمایت

مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجـام رسـیده است. بدین وسیله از مسوولین دانشگاه، که شرایط اجـرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آورند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (*Silybum Marianum*). *Integr Cancer Ther*. 2007; 14: 6104-9.

2- Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*. 2008; 269: 352-62.

3- Faezizadeh Z, Mesbah-Namin SA, Allameh A. The effect of silymarin on telomerase activity in the human leukemia cell line K562. *Planta Med*. 2012; 78: 899-902.

4- 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: 335-41.

5- Gharib A, Faezizadeh Z, Asghari MH. Preparation and antifungal activity of spray-dried amphotericin B-loaded nanospheres. *DARU*. 2011; 19: 351-5.

6- 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: 281-9.

7- Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharm*. 2006; 307: 244-50.

8- Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100: 80-4.

9- Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. Therapeutic efficacy of epigallocatechin gallate-loaded nanoliposomes against burn wound infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012; 26: 68-75.

10- Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. In vitro and in vivo activities of ticarcillin-loaded nanoliposomes with different surface charges against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29248). *DARU J Pharm Sci*. 2012; 20: 41-9.

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: 269-71.

12- Tsai CC, Chang CH, Chen LC, et al. 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- Fang JY, Hwang TL. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes

incorporating aionic surfactants and ethanol. *Int J Pharm.* 2006; 310: 131-8.

14- Meng J, Wang H, Hou Z, Chen T. Novel anion liposome-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: 2871-8.

15- Zhang L, Shantha LK. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *Euro Poly J.* 2007; 43: 2956-66.

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: 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: 283-91.

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: 34-9.

19- Elhani D. Does the emergence of antibiotic resistance announce the return of the dark ages? *Ann Biol Clin*. 2011; 69: 637-46.

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: 1230-43.

21- Zhiliang S, Xiangxin L, Qinlu L. Pharmacokinetics and bioavailability of catechin liposome in rabbits. *J Tea Sci.* 2004; 24: 44-8.

22- Detoni CB, Cabral-Albuquerque EC, Hohlemweger SV, Sampaio C, Barros TF, Velozo ES. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J Microencapsul.* 2009; 26: 684-91.

23- 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 2391-400.

24- 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: 293-8.

25- Huang CM, Chen CH, Pornpattananangkul D, et al. Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. *Biomaterials*. 2011; 32: 214-21.

Investigation of Antibacterial Activity of Silymarin-Loaded Nanoliposomes against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Faezizadeh Z[1], Gharib A[1], Godarzee M[2]

[1]Dept. of Laboratory Sciences, Broujerd Branch, Islamic Azad University, Brojerd, I.R.Iran

[2]Dept. of Biology, Broujerd Branch, Islamic Azad University, Brojerd, I.R. Iran

Corresponding Author: Faezizadeh Z, Dept. of Laboratory Sciences, Broujerd Branch, Islamic Azad University, Brojerd, I.R.Iran

E-mail: faezizadeh@gmail.com

Received: 17 Aug 2013 **Accepted:** 16 Mar 2014

Background and Objective: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is an important pathogen in medicine. Different studies have shown that some plant-derived materials loaded in a drug delivery system such as nanoliposomes could inhibit growth of resistant bacteria. Silymarin is an effective compound from medicinal plant *Silybum mariunum* L. The aim of this study was to prepare silymarin-loaded nanoliposomes and evaluate their efficacy against resistant *staphylococcus aureus in vitro*.

Materials and Methods: Silymarin-loaded nanoliposomes were prepared by reverse phase evaporation method. Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) of silymarin-loaded nanoliposomes for resistant strain of *Staphylococcus aureus* was determined by broth dilution method. Ultimately, the killing rate of *Staphylococcus aureus* at MIC concentration of silymarin in free and nanoliposomal form was analyzed.

Results: In this study, the encapsulation efficacy for silymarin-loaded nanoliposomes was 83%±0.17. The MICs of free and nanoliposomal form of silymarin against resistant strain of *Staphylococcus aureus* were 500 and 125 mg/l, respectively. The killing rate of silymarin-loaded nanoliposomes was higher than that of free silymarin at identical times.

Conclusion: Our data suggest that the prepared silymarin-loaded nanoliposomes due to high effectiveness would be a good choice for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections.

Keywords: Staphylococcus aureus, Silymarin, Encapsulation efficacy, Nanoliposome