فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۲ ص. ۱۰۰-۹۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضد میکروبی نیوزوم حاوی عصاره گیاه مرزه بر روی پاتوژن *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*

فهیمه نجفی[۱*]، فاطمه سادات ولیزاده[۱]، سیمین نبی زاده[۲]، علی اصغر باقری[۲*]، امیر میرزایی[۳]

[۱] گروه شیمی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی رودهن، رودهن، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی رودهن، رودهن، ایران

[۳] گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی پرند، پرند، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): fahimnajafi@Gmail.com; alibio81@yahoo.com

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.9.3 DOI: 10.30495/jdb.2023.1975638.1346

چکیده

گیاه مرزه به خانواده نعناعیان تعلق دارد، گیاهی است یک ساله یا چند ساله که ایران ۱۲ گونه علفی یک ساله یا چند ساله دارد. در مطالعات متعدد، خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد قارچی، ضد اسپاسم، تقویت کننده معده و تسهیل کننده هضم این جنس گزارش شده است. نیوزوم‌ها مزایای متعددی را برای سیستم‌های دارورسانی ارائه می‌دهند، از جمله فعال اسمزی، پایداری شیمیایی و زمان نگهداری طولانی در مقایسه با لیپوزوم ها. در مطالعه حاضر نیوزوم هایاستخراج شده از مرزهبه عنوان داروبه روش کالریمتریک (روش فولین) تعیین شدرهایش به صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. فرمولاسیون نیوزوم حاوی عصاره *Satureja macrantha* در این مطالعه، به منظور رسیدن به فرمولاسیون بهینه، فرمولاسیون‌های مختلفی بر اساس نسبت مولی Span 60/Tween 60، کلسترول و با زمان سونیکاسیون ۷ دقیقه تهیه شد. نیوزوم‌های استخراج شده از گیاه مرزه به شکل معنی داری سبب بازدارندگی فعالیت دو باکتری مورد آزمایش در پژوهش حاضر گردید.

کلیدواژه‌ها: آنتی بیوتیک، مرزه، نیوزوم‌ها بر پایه گیاهی، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*.

مقدمه

نیوزوم یک وزیکول غیر یونی مبتنی بر سورفکتانت است. نیوزوم‌ها عمدتاً توسط سورفکتانت غیریونی و ترکیب کلسترول به عنوان یک ماده کمکی تشکیل می‌شوند. آنها از نظر ساختاری شبیه لیپوزوم‌ها هستند زیرا هر دو دارای دو لایه هستند. با این حال، موادی که برای تهیه نیوزوم‌ها استفاده می‌شوند، آن‌ها را پایدارتر می‌کنند آنها می‌توانند هم داروهای آب‌دوست و هم داروهای چربی دوست را در یک لایه آبی (برای داروهای آب‌دوست) یا در یک غشای تاولی ساخته‌شده از مواد لیپیدی (برای چربی‌دوست) به دام بیندازند [۱]. نیوزوم‌ها ساختارهای لایه‌ای و میکروسکوپی هستند. آنها از سورفکتانت غیر یونی از کلاس آلکیل یا دی آلکیل پلی گلیسرول اتر و کلسترول با هیدراتاسیون بعدی در محیط‌های آبی تشکیل شده‌اند. مولکول‌های سورفکتانت تمایل دارند خود را به گونه‌ای جهت دهند که انتهای آبدوست سورفکتانت غیریونی به سمت

بیرون باشد، در حالی که انتهای آبگریز روبروی یکدیگر قرار می گیرند تا دولایه را تشکیل دهند [۲]. نیوزوم‌ها مزایای متعددی را برای سیستم‌های دارورسانی ارائه می‌دهند، از جمله فعال اسمزی، پایداری شیمیایی و زمان نگهداری طولانی در مقایسه با لیپوزوم‌ها. شکل گیری و اصلاح سطح آنها به دلیل گروه‌های عملکردی روی سرهای آبدوست آنها بسیار آسان است. آنها سازگاری بالایی با سیستم‌های بیولوژیکی دارند و به دلیل ماهیت غیر یونی، سمیت کمی دارند. زیست تخریب پذیر و غیر ایمنی زا هستند. آنها می‌توانند داروهای چربی دوست را در غشاهای دولایه وزیکولی به دام بیاندازند و می‌توانند داروهای آبدوست را در محفظه‌های آبی به دام بیاندازند. که هر دو می‌توانند به عنوان سیستم‌های دارورسانی عمل کنند [۳]. نویزوم‌ها ساختارهای دولایه‌ای هستند که از سورفکتانت‌های غیریونی ساخته شده‌اند که در داخل بدن مانند لیپوزوم‌ها رفتار می‌کنند. با این حال، آنها پایدارتر، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار، غیر ایمنی زا با سمیت کم هستند و هیچ شرایط خاصی برای جابجایی و نگهداری لازم نیست. بنابراین، آنها بر مشکلات مرتبط با آماده‌سازی لیپوزومی غلبه می‌کنند. فرمولاسیون نیوزومی فعالیت چندین عامل ضد میکروبی را افزایش داده است. فرمولاسیون سیپروفلوکساسین به عنوان نیوزوم، فعالیت آن را در برابر چندین سویه مقاوم از استافیلوکوکوس اورئوس،اشرشیاکلی وسودوموناس آئروژینوزا و همچنین در هدف قرار دادن عفونت‌های داخل سلولی و ریوی افزایش داده است [۴]. درمان عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس با چالش‌های متعددی مواجه است. استافیلوکوکوس اورئوس به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های موجود مقاوم است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) در گزارشی از مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها به‌عنوان یک «تهدید جدی» فهرست شد که در آن ۳۲۳۷۰۰ مورد عفونت تهاجمی MRSA با حدود ۱۰۶۰۰ مرگ مرتبط بین سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۷ گزارش شده است. بروز عفونت‌های MRSA در بین بیماران سوختگی بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه در نواحی مختلف حدود ۵۵ درصد است. وانکومایسین داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های MRSA است. با این حال، استافیلوکوکوس اورئوس با حساسیت کاهش یافته به وانکومایسین ظاهر شده است که استفاده آینده آن را تهدید می‌کند. چالش دیگر در درمان عفونت استافیلوکوکوس اورئوس توانایی آن در تشکیل بیوفیلم است، جایی که باکتری‌های موجود در بیوفیلم‌ها در مقایسه با سلول‌های پلانکتون در برابر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم تر هستند [۵].

در بین میکروارگانیسم‌های مقاوم، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوک مقاوم به ونکومی سین، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین، استرپتوکوک پنومونیه مقاوم به پنی سیلین و اشریشیا کلی از جمله عفونت‌های شایع هستند. در بین این باکتری‌ها، بروز و مرگ و میر استافیلوکوکوس اورئوس و Escherichia coli به طور قابل توجهی بیشتر است [۶]. با توجه به افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که خطر بزرگی برای بشر و بار سنگینی بر دوش جامعه است، جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک ضروری است. داروهای گیاهی می‌توانند چنین نامزدهایی باشند که مزایای بیشتری از جمله عوارض جانبی خفیف و فعالیت ضد میکروبی خود را نشان می‌دهند. مطالعات قبلی نشان داده اند که استخراج کردن عصاره برخی گونه‌های گیاهی در ترکیب با نانوذرات باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی آن شده است. ساختارهای فیتوزومی و لیپوزومی بارگذاری شده با این منابع گیاهی همچنین منجر به تشدید فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی شدند [۷].

گیاه مرزه به خانواده نعناعیان تعلق دارد، گیاهی است یک ساله یا چند ساله که منشاء اولیه ی آن نواحی مدیترانه بوده، اما به علت پراکندگی در تمام جنوب اروپا و نواحی دیگرمشاهده می‌گردد، پراکنش عمده آن در ایران، قفقاز، ترکمنستان، آناتولی و عراق است و در ایران ۱۲ گونه علفی یک ساله یا چند ساله دارد که ۸ گونه آن مختص ایران می‌باشد. مرزه دارای ساقه ای منشعب با ارتفاع ۳۰ - ۱۰ سانتی متر به رنگ سبز متمایل به خاکستری، برگ های نرم و تقریبا بدون دمبرگ، باریک، نوک تیز، پوشیده از کرك و دارای تارهای غده ای اسانس‌دار است در مطالعات متعدد، خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد قارچی، ضد اسپاسم، تقویت کننده معده و تسهیل کننده هضم این جنس گزارش شده است [۸]. در نتیجه هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی نیوزوم حاوی عصاره گیاه مرزه بر روی پاتوژن Staphylococcus aureus و Escherichia coli می‌باشد.

روش بررسی

آماده سازی عصاره گیاهی

ابتدا نیوزوم‌ها به روش هیدراسیون لایه نازک تهیه می‌شود برای تهیه نمونه‌ها، ابتدا مقادیر مشخص از کلسترول، اسپن و توئین مورد نظر در حلال کلروفرم حل شد. سپس کاملا محلول حاصل هم زده شد تا اجزا به طور کامل در کلروفرم حل شوند. محلول حاصل در بالن مخصوص روتاری ریخته و تحت شرایط مورد نظر تحت خلا قرار داده می‌شود تا حلال کاملا تبخیر شود. سپس در مرحله هیدراسیون، به فیلم لیپیدی تهیه شده، مقادیر معینی از عصاره گیاه Satureja macrantha در بافر فسفات pH= ۷/۲ طبق فرمولاسیون‌های مورد نظر در دمای بالای انتقال فاز اضافه شد و با استفاده از روتاری با سرعت ۱۲۰ rpm به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از اتمام مراحل هیدراسیون، به منظور کاهش اندازه ذره ای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه انجام شدسپس اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات توسط روش تفرق دینامیک نور تعیین شد و مورفولوژی نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد و درصد احتباس دارو به روش کالریمتریک (روش فولین) تعیین شدرهایش دارو به صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین صورت که در کیسه دیالیز مقدار ۲ میلی لیتر از فرمولاسیون نانو نیوزومی حاوی دارو و همچنین محلول دارو (به صورت جداگانه) قرار داده می‌شود.

هر یک از کیسه‌ها به صورت معلق در مزور محتوی ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. مزورهای دارای کیسه محتوی نانونیوزوم فاقد و حاوی دارو و محلول دارو بر روی استیرر قرار داده می‌شوند.

در ساعت‌های مختلف از مزور نمونه‌گیری انجام می‌شود، بدین صورت که مقدار ۱ میلی لیتر از بافر فسفات حاوی کیسه دیالیز برداشته و ۱ میلی لیتر بافر فسفات با دمای ۳۷ درجه جایگزین آن می‌شود. عمل نمونه گیری تا ۷۲ ساعت در فواصل زمانی مشخص (۱ و ۲ و ۴ و ۸ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام می‌شود.

در پایان، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ nm به روش کالریمتریک (روش فولین) خوانده شده و به منظور ارزیابی اثرات عوامل ضد میکروبی می‌توان از روش‌های مختلفی بهره گرفت

روش‌های اندازه گیری و بررسی اثرات عوامل ضد میکروبی را می‌توان به ۳ دسته کلی تقسیم بندی نمود:

فعال کردن سوش‌های میکروبی

بدین منظور، سوش‌های میکروبی که به صورت لیوفیلیزه و فریز شده بودند را به وسیله لوپ به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده و سپس محیط‌های تلقیح شده را داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت میکروارگانیسم‌های مورد نیاز رشد کرده و آماده استفاده بودند. تمامی مراحل کار برای جلوگیری از آلودگی زیر هود و در کنار شعله انجام شد.

تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA[1])

۳۸ گرم ازمحیط را توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ توزین کرده و با یک لیتر آب مقطرمخلوط گردید سپس مخلوط فوق بر روی هیتر برقی قرار داده شد تا کاملا به جوش بیاید و سپس آن را دراتوکلاو در دمای ۱۲۱درجه سانتی گراد و فشار۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا استریل گردد و سپس محیط موردنظر در کنار شعله و زیر هود به داخل پلیت‌های استریل یک بارمصرف انتقال داده شد تا اندازه‌ای که نیمی ازپلیت را پر کند.

تهیه محیط کشت مولر هینتون براث (MHB[2])

از این محیط برای رشد باکتری‌های مورد مطالعه درمیکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. به این صورت که ۲۱ گرم از محیط را توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ توزین کرده وبا یک لیترآب مقطر مخلوط گردید سپس آن را در اتوکلاو دردمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا استریل گردد.

تهیه میکروارگانیسم‌های مورد نیاز

[1] Mueller Hinton Agar
[2] Mueller Hinton Broth

سویه‌های مورد استفاده جهت بررسی خواص ضدمیکروبی عبارتند از:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

کشت میکروارگانیسم و تهیه رقت‌های باکتریایی

در مورد میکروارگانیسم‌های استاندارد در محیط کشت‌های اختصاصی، کشت شبانه انجام شد و سپس چند کلنی از هر یک وارد محیط کشت Mueller Hinton broth شد و در دمای ۳۷ به صورت شبانه کشت داده شد. سوسپانسیونی معادل استاندارد ۰/۵ McFarland از هریک از سویه‌های باکتریایی تهیه و سپس با رقیق سازی در محیط کشت مایع تا میزان 1×10^6 CFU/ml بدست آمد.

طرز تهیه محلول نیم مک فارلند

استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم به روش زیر تهیه می‌شود:

۱) ۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریم (BaCl2) ۰/۰۴۸ مول بر لیتر (1.175% W/VBaCl2. 2H2O) را به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ مول بر لیتر (۱% V/V) اضافه کرده و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آمد.

۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکترو فتومتر با طول مسیر نوری ۱ سانتی‌متر مشخص شود. (جذب در ۶۲۵ نانو متر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد).

۳) سوسپانسیون سولفات باریم به مقدار ۴-۶ میلی لیتر در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شد.

۴) درب این لوله‌ها محکم بسته شد و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردید.

حداقل غلظت مهاری (MIC[1])

به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی فرمولاسیون نیوزومی عصاره *Satureja macrantha* و فرم آزاد آن، از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. آزمایش MIC بر اساس استاندارد CLSI[2] به روش رقیق سازی در میکروپلیت انجام گرفت. تست MIC بصورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. برای تعیین MIC نمونه‌ها، از محدوده غلظتی ۱۰۰۰-۷/۸ میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد.

حداقل غلظت مهاری برای میکروارگانیسم‌هایی که به فرمولاسیون نیوزومی عصاره *Satureja macrantha* و فرم آزاد آن حساس بودند، تعیین شد. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانیسم را مهار می نماید، اطلاق می شود.

به دنبال آن پلیت‌های ۹۶ چاهکی به کمك توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولرهینتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی به داخل هر یك از چاهك‌ها فراهم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از نیوزوم حاوی عصاره و محلول آن به چاهك اول هر میکروارگانیسم اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی دیگر نمونه‌ها به داخل ۷ چاهك بعدی انتقال داده شد. چاهك آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث با ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO ۰/۵% و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در تمامی چاهك‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. میکروپلیت با درپوش پلیت استریل پوشانده شد. محتویات هر چاهك روی شیکر به مدت۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج ۶۲۰ nm خوانده شد و آنالیز آماری با نرم افزارSPSS انجام شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM)

میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی برای ایجاد بزرگنمایی بیشتر و توان تفکیک بیشتر پا به عرصه حضور گذاشتند. بدیهی است که برای مشاهده راحت و دقیق‌تر اجسام در فاصله‌های کم، به‌وسیله‌ای که بتواند جسم را بزرگ کند نیاز بوده و در بررسی‌های پیشرفته از میکروسکوپ استفاده می‌شود. میکروسکوپ‌های نوری برای بسیاری از مشاهدات، وسیله‌ای مناسب هستند ولی نیازی به بزرگنمایی بیشتر و توان تفکیک بالاتر، بشر را به ساخت و پیشرفت میکروسکوپ‌های جدیدتر رهنمون کرده که از آن جمله می‌توان به میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) اشاره کرد.

[1] Minimum inhibitory concentration

[2] Clinical & Laboratory Standards Institute

آماده‌سازی نمونه برای SEM

برای تصویربرداری از سطح نمونه‌ها به روش SEM بهتر است که سطح نمونه رسانا باشد، زیرا اگر نمونه عایق باشد الکترون تابانده شده به سطح نمونه دفع نمی‌گردد و در نتیجه روی سطح نمونه باقی مانده و باعث ایجاد بار ساکن می‌شود. الکترون‌های دیگر توسط بار ساکن ایجاد شده به دلیل همنام بودن دفع یا منحرف می‌شوند و در نتیجه موجب ناپایداری تصویر حاصله می‌گردند.

برای سطوح نارسانا مثل سطوح غیرفلزی، یک لایه‌ی نازک طلا یا گرافیت روی سطح رسوب داده‌شده و بدین طریق سطح رسانا می‌شود. همچنین نمونه‌های ریز (نظیر پودرها) باید روی یک فیلم هادی نظیر آلومینیوم پخش شده و کاملا خشک شوند. سوسپانسیون نانوذره تهیه شده در آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شده، یک قطره از نمونه بر روی یک فیلم هادی نظیر آلومینیوم پخش شده و در دمای اتاق خشک گردید.

نتایج

فرمولاسیون نیوزوم حاوی عصاره *Satureja macrantha*

در این مطالعه، به منظور رسیدن به فرمولاسیون بهینه، فرمولاسیون‌های مختلفی بر اساس نسبت مولی Span 60/Tween 60، کلسترول و با زمان سونیکاسیون ۷ دقیقه تهیه شد (جدول ۱):

نتایج حاصل از تست SEM نیوزوم‌های حاوی *Satureja macrantha*

میکروسکوپ الکترونی روبشی یك میکروسکوپ الکترونی معمولی نیست که در آن تصویر الکترونی از یك جسم شفاف توسط عدسی‌های الکترونی به بزرگنمایی بالاتری رسانده شود. در این میکروسکوپ هیچ سیستم نوری- الکترونی برای تشکیل تصویر و بزرگنمایی وجود ندارد؛ بلکه تصویر از مشاهده نقطه به نقطه پدیده‌های سطحی منتج از اثر متقابل پرتوی الکترونی با سطح نمونه تشکیل می‌گردد. در حالی که طول موج الکترون‌ها کمتر از ۵ آنگستروم بوده و حداکثر بزرگنمایی تئوری قابل حصول با پرتوی الکترونی فراتر از ۸۰۰۰۰۰ X می‌باشد. در یك SEM تجاری محدودیت‌های وضوح قدرت تفکیك، بزرگنمایی عملی و

جدول ۱. فرمولاسیون‌های نیوزومی حاوی *Satureja macrantha*.

Formulation	Type of Surfactant	Span60:Tween60 (mol ratio)	Lipid (µmol)	Satureja macrantha (mg/ml)	Sonication time (min)	Surfactant: Cholesterol (molar ratio)
F1	Span 60	100:0	200	1	7	1:1
F2	Span 60	50:50	200	1	7	1:1
F3	Span 60	0:100	200	1	7	1:1
F4	Span 60	100:0	200	1	7	2:1
F5	Span 60	0:100	200	1	7	2:1
F6	Span 60	50:50	200	1	7	2:1

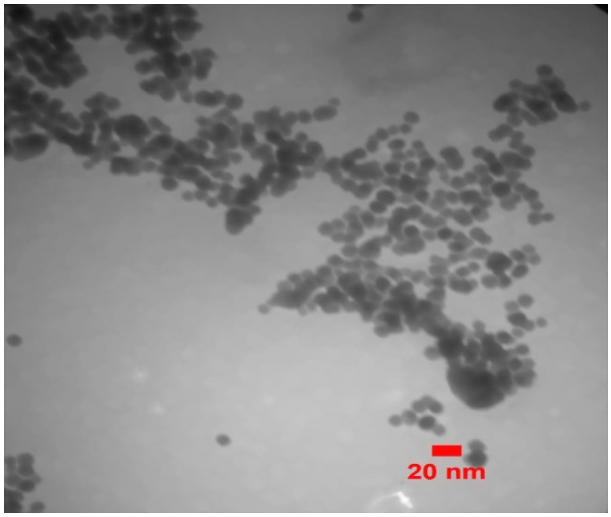
جدول ۲. نتایج سنتز فرمولاسیون‌های نیوزومی حاوی عصاره مرزه با استفاده از روش هیدراتاسیون فیلم نازک

Formulation	Size (nm)	PDI	EE (%)
F1	268.5	0.248	69.45
F2	157.7	0.168	91.32
F3	269.2	0.291	57.54
F4	242.5	0.231	71.34
F5	189.2	0.191	77.92
F6	3362.8	0.324	62.14

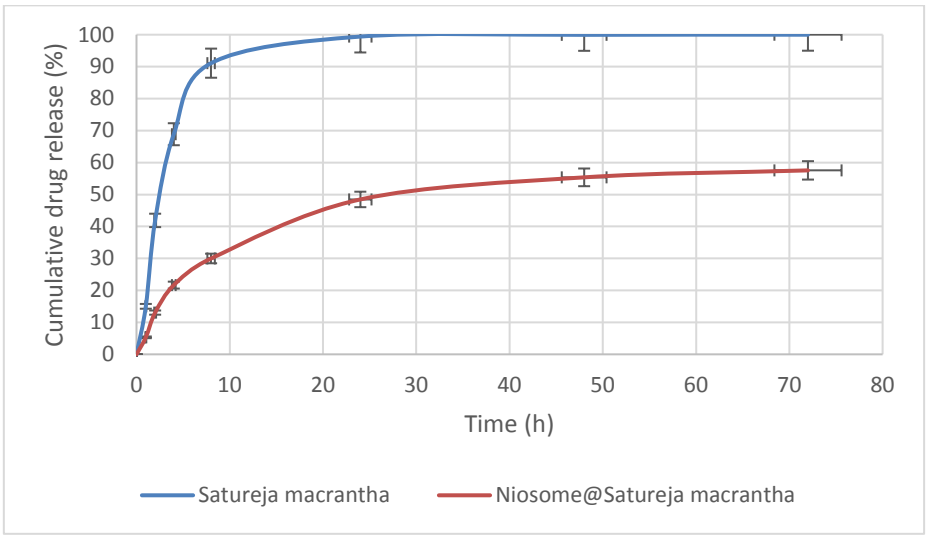
عوامل ابزاری در ۷۵۰۰۰ X و ٤٠ آنگستروم است. در این مطالعه پس از سنتز نانوذرات، به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات سنتز شده، از روش میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شده شد که نتایج نشان داد نانوذرات از ساختا کروی برخوردار هستند (شکل ۱).

بررسی روند آزادسازی عصاره

شکل ۲ نشان دهنده روند آزادسازی تجمعی فرم عصاره در محیط آزادسازی و نانوحامل حاوی عصاره در محیط آزادسازی PBS-SDS در طی ۷۲ ساعت می‌باشد. برای شبیه سازی و نزدیک کردن محیط آزادسازی برون‌تنی به شرایط واقعی و درون تنی از محیط آزادسازی PBS-SDS برای فاز گیرنده استفاده شد که همانطور که در شکل ۲ مشهود است، آزادسازی عصاره از فرم نانوحامل (۵۰%) کمتر از عصاره (۱۰۰%) طی مدت ۷۲ ساعت آزادسازی بود. در آزادسازی عصاره *Satureja macrantha*، ۸۲% دارو طی ۸ ساعت اول در محیط آزادشدند ولی برای نانو حامل حاوی عصاره طی ۸ ساعت آزادسازی مقدار ۲۹% دارو از نانونیوزوم آزاد شده است. در ۲۴ ساعت اول ۹۵٪ عصاره در عصاره تنها، آزاد شده است ولی در نیوزوم حاوی عصاره ۴۳٪ آزاد شده است. در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان ٪۵۲ و ٪۵۵ عصاره از نیوزوم حاوی عصاره آزاد شده است.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نیوزوم‌های سنتز شده.



شکل ۲. روند آزادسازی عصاره *Satureja macrantha* و نیوزوم حاوی آن در فاز گیرنده PBS-SDS و زمان‌های مختلف.

بررسی اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی نیوزوم حاوی عصاره *Satureja macrantha*

به منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی نیوزوم حاوی عصاره *Satureja macrantha* از میکرودایلوشن به منظور دستیابی به کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) استفاده گردید. نتایج

ضدمیکروبی نشان داد که نیوزوم حای عصاره دارای اثرات ضدمیکروبی معنادرتری نسبت به عصاره تنها بود بطوری که میزان MIC به میزان ۴ برابر کاهش پیدا کرده بود (جدول ۴).

جدول ٤. بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره Satureja macrantha و نیوزوم عصاره.

نام باکتری	MIC عصاره تنها (میکروگرم در میلی لیتر)	MIC نیوزوم حاوی عصاره (میکروگرم در میلی لیتر)
Staphylococcus aureus ATCC 25923	۵۰۰	۳۱/۲٤
E. coli ATCC 25922	۲۵۰	٦۲/۵

بحث

همانطور که بخش نتایج اشاره گردید نیوزوم‌های استخراج شده از گیاه مرزه به شکل معنی‌داری سبب بازدارندگی فعالیت دو باکتری مورد آزمایش در پژوهش حاضر گردید. از داروهای گیاهی در زمینه‌های مختلف طب سنتی استفاده شده است. در حال حاضر، کارایی آنها با استفاده از تکنیک‌های جدید برای تجزیه و تحلیل و شناسایی ساختار شیمیایی آنها با شواهد علمی نشان داده شده است. فرمولاسیون نیوزومی عوامل ضد میکروبی ابزاری امیدوارکننده برای افزایش فعالیت آنها است [۹]. افزایش فعالیت نیوزوم‌ها به جذب وزیکول به سطح میکروبی با انتشار بعدی دارو در نزدیکی سلول باکتری یا جذب و جذب داروی محصور در سیستم چربی دوست توسط اندوسیتوز نسبت داده شد. عامل مهم دیگر در افزایش فعالیت نیوزوم‌ها آنها است. اندازه نانو، که حمل و نقل آنها را تسهیل می‌کند. این مکانیسم‌های پیشنهادی افزایش با فقدان فعالیت ضد میکروبی نیوزوم‌های خالی تأیید شد که با یافته‌های مطالعات دیگر مطابقت داشت [۱۰-۱۲]. از جمله مزایای نانو آنتی بیوتیک‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های معمولی افزایش حلالیت و تخریب مناسب در بدن است. بنابراین، اثر درمانی مطلوب را می‌توان با بهبود فراهمی زیستی در دوزهای پایین تر به دست آورد [۱۳]. فرضیه‌های زیادی در مورد مکانیسم‌های ضد میکروبی نانو آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد. به نظر می‌رسد افزایش نسبت سطح به حجم باعث افزایش سطح تماس با باکتری می‌شود. این آنتی بیوتیک‌ها همچنین مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌کنند و فرمول منحصر به فرد آنها آزادسازی دارو از باکتری‌ها را کاهش می‌دهد. توجه زیادی به سیستم‌های دارورسانی تاولی مانند لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها شده است. مطالعات نشان می‌دهد که نیوزوم‌ها نسبت به لیپوزوم‌ها سیستم‌های دارورسانی موثر، هدفمند و طولانی مدت هستند [١٤]. به دلیل ماهیت غیر یونی، نیوزوم‌ها نسبت به سایر سیستم‌های دارورسانی سازگارتر و کمتر سمی هستند. مطالعات نشان می‌دهد که نوع و غلظت سورفکتانت‌های مورد استفاده برای سنتز نیوزوم‌ها نقش اساسی در کپسوله‌سازی و رهاسازی داروها از نانوذرات دارد. با افزایش طول زنجیره سورفکتانت، نرخ کپسولاسیون افزایش می‌یابد [۱۳]. تفاوت در اثر گذلری نیوزوم‌ها بر گونه‌های مختلف باکتریایی به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری مربوط می‌شود. باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های دفاعی خود، مانند تولید بتالاکتاماز و افزایش پمپ‌های وابسته به غلظت، ساختار آنتی‌بیوتیک را تخریب کرده و غلظت آن را در محیط کاهش می‌دهند. سپس باکتری هایی که از دارو فرار کرده‌اند به سرعت تکثیر می‌شوند. یکی از اثرات ضروری بارگذاری آنتی‌بیوتیک بر روی نانوذرات، پایداری و حفظ ساختار دارو است [۱۵]. مکانیسم دیگری که باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات مملو از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، نفوذ نانوذرات به داخل سلول باکتری است. نیوزوم‌ها از طریق همجوشی و جذب با سلول‌های باکتریایی تعامل دارند. همچنین کاهش اندازه نیوزوم‌ها باعث تعامل بهتر با غشای باکتری و کاهش مقادیر MIC می‌شود. لایه لیپیدی نیوزوم‌ها با غشای خارجی باکتری ترکیب می‌شود و دارو در سلول باکتری تجمع می‌یابد. تجمع نانوذرات و داروها در سلول‌های باکتریایی نیز باعث بی‌نظمی در غشای سیتوپلاسمی و پارگی آن می‌شود [١٦].

نتیجه‌گیری

نیوزوم‌های استخراج شده از گیاه مرزه به شکل معنی‌داری سبب بازدارندگی فعالیت دو باکتری مورد آزمایش در پژوهش حاضر گردید.

منابع

[1] Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. Advances in Pharmacological Sciences. 2018;2018:6847971.

[2] Singh TG, Sharma N. Chapter 7 - Nanobiomaterials in cosmetics: current status and future prospects. In: Grumezescu AM, editor. Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: William Andrew Publishing; 2016. p. 149-74.

[3] Mukherjee B, Chakraborty S, Mondal L, Satapathy BS, Sengupta S, Dutta L, et al. Chapter 7 - Multifunctional drug nanocarriers facilitate more specific entry of therapeutic payload into tumors and control multiple drug resistance in cancer. In: Grumezescu AM, editor. Nanobiomaterials in Cancer Therapy: William Andrew Publishing; 2016. p. 203-51.

[4] Akbarzadeh I, Keramati M, Azadi A, Afzali E, Shahbazi R, Chiani M, et al. Optimization, physicochemical characterization, and antimicrobial activity of a novel simvastatin nano-niosomal gel against E. coli and S. aureus. Chemistry and physics of lipids. 2021;234:105019.

[5] Kashef MT, Saleh NM, Assar NH, Ramadan MA. The Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin-Loaded Niosomes against Ciprofloxacin-Resistant and Biofilm-Forming Staphylococcus aureus. Infect Drug Resist. 2020;13:161.۲۹-۹

[6] Shirvany A, Rezayan AH, Alvandi H, Barshan Tashnizi M, Sabahi H. Preparation and Evaluation of a Niosomal Drug Delivery System Containing Cefazolin and Study of Its Antibacterial Activity. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2021;15(6):638-5.۷

[7] Moghtaderi M, Mirzaie A, Zabet N, Moammeri A, Mansoori-Kermani A, Akbarzadeh I, et al. Enhanced Antibacterial Activity of Echinacea angustifolia Extract against Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae through Niosome Encapsulation. Nanomaterials. 1573:(6)11:2021..

[8] Hagh LG, Arefian A, Farajzade A, Dibazar S, Samiea N. The antibacterial activity of "Satureja hortensis" extract and essential oil against oral bacteria. Dental research journal. 2019;16(3):153-9.

[9] Yeo PL, Lim CL, Chye SM, Kiong Ling AP, Koh RY. Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. Asian Biomedicine. 2017;11(4):301-14.

[10] Barakat HS, Kassem MA, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. Vancomycin-eluting niosomes: a new approach to the inhibition of staphylococcal biofilm on abiotic surfaces. AAPS PharmSciTech. 2014;15(5):1263-74.

[11] Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. Adv Pharmacol Sci. 2018;2018:6847971.

[12] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006.

[13] Jamil B, Syed MA. Nano-antimicrobials: A Viable Approach to Tackle Multidrug-Resistant Pathogens. In: Rai M, Alves dos Santos C, editors. Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 31-54.

[14] Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2011;1(4):208-19.

[15] Ahmaditabar P, Momtazi-Borojeni AA, Rezayan AH, Mahmoodi M, Sahebkar A, Mellat M. Enhanced Entrapment and Improved in Vitro Controlled Release of N-Acetyl Cysteine in Hybrid PLGA/Lecithin Nanoparticles Prepared Using a Nanoprecipitation/Self-Assembly Method. Journal of cellular biochemistry. 2017;118(12):4203-9.

[16] Wu ZL, Zhao J, Xu R. Recent Advances in Oral Nano-Antibiotics for Bacterial Infection Therapy. Int J Nanomedicine. 2020;15:9587-610.