مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۳، تیر ۱۴۰۳، ۳۲۱-۳۰۷

خصوصیات ضد باکتریایی و ضدبیوفیلمی نیوزوم‌های بارگذاری شده آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در برابر ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*: یک مطالعه آزمایشگاهی

الهام بازرگان[۱]، فاطمه اشرفی[۲]، الهام سیاسی تربتی[۳]

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۱۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۲/۱۲/۲۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: تولید بیوفیلم از دلایل مقاومت دارویی باکتری‌ها است. هدف مطالعه حاضر سنتز ساختارهای نیوزومی حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و تعیین تأثیر آن بر جدایه‌های مقاوم به داروی *کلبسیلا پنومونیه* در یک سیستم درمانی مؤثر بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، نانونیوزوم حاوی تتراسایکلین (Tet-Nio) با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شد و خصوصیات مورفولوژیکی، آزادسازی دارو بررسی شد. از تست MIC (Minimum inhibitory concentration)، کریستال ویوله، MBEC (Minimum biofilm eradication concentration) برای بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضدبیوفیلمی علیه سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد مطالعه در معرض تتراسایکلین آزاد و Tet-Nio استفاده شد و بیان ژن *mrkA* در ۱۰ جدایه با استفاده از تست Real-Time PCR ارزیابی شد. برای آنالیز داده‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شده است.

یافته‌ها: فرمولاسیون شماره ۲ با اندازه ذرات ۹/۵۵±۱۶۹/۴۵ نانومتر، Polydispersity index برابر ۰/۰۱۰±۰/۱۶۸، میزان زتاپتانسیل برابر ۱/۶۳±۲۴/۵۵-، درصد به‌دام اندازی دارو برابر ۱/۴۸±۷۵/۳۱ و درصد آزادسازی داروی تتراسایکلین در بازه ۴۸ ساعت به میزان ۱/۱۵±۴۵/۳۴ درصد به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. نتایج تست میکروبی نشان داد که ساختار Tet-Nio دارای اثرات ضد باکتریایی بیشتری نسبت به داروی آزاد است. هم‌چنین، بیان شد که فرمولاسیون بهینه Tet-Nio می‌تواند به طور معنی‌داری با کاهش بیان ژن *mrkA* تشکیل بیوفیلم را در باکتری‌های پاتوژن *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به گروه دارویی کاهش دهد ($P<0/001$).

نتیجه‌گیری: نیوزم‌های حاوی تتراسایکلین توانستند تشکیل بیوفیلم را در ایزوله مقاوم به دارو *کلبسیلا پنومونیه* مهار نمایند. بنابراین، می‌توان در مطالعات بالینی از آن‌ها برای مقابله با عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، تتراسایکلین، *کلبسیلا پنومونیه*، بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: بازرگان ا، اشرفی ف، سیاسی‌تربتی ا، خصوصیات ضد باکتریایی و ضدبیوفیلمی نیوزوم‌های بارگذاری شده آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در برابر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه: یک مطالعه آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*، سال ۱۴۰۳، دوره ۲۳ شماره ۴، صفحات: ۳۲۱-۳۰۷.

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۷۷۳۱۹۳۲۷، پست الکترونیکی: Mnfa.ashrafi@yahoo.com
۳- دانشیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) یکی از باکتری‌های گرم منفی با فراوانی بالای مقاومت چند دارویی است که باعث عفونت در بیماران بستری می‌شود (۲، ۱). کلبسیلا، یک پاتوژن گرم منفی، بی‌حرکت، اکسیداز منفی، فرصت‌طلب و دارای کپسول پلی‌ساکاریدی است. این باکتری، فرصت‌طلب، باعث ذات‌الریه، سپتی‌سمی و عفونت‌های مجاری ادراری در بیماران بستری می‌شود. در *کلبسیلا پنومونیه* ژن‌های مقاومت چندداروی افزایش یافته است که باعث درمان دشوار این عفونت بیمارستانی می‌شود. این باکتری به طور گسترده مقاومت چندداروی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول از جمله بتالاکتام‌های با طیف گسترده، فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول نشان داده است. مشخصات ژنی گزارش شده در *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو شامل ژن‌های *blaSHV*، *blaCTX-M*، *blaTEM*، *blaOXA*، و *blaNDM* بتالاکتاماز، کاست ژن اینتگرون کلاس ۱ و ژن پروتئین غشاء خارجی *ompK36* و *ompA*، ژن‌های *fim* (فیمبریا نوع ۱)، ژن‌های *mrk* (فیمبریای نوع ۳) و *ecp* (*E. Coli common pili*) می‌باشد. این ژن‌ها بیشترین گزارش را در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو دارند (۴، ۳).

تولید بیوفیلم یکی از دلایل مقاومت دارویی باکتری‌ها است (۵). به منظور تشکیل یک بیوفیلم، بیشتر سویه‌های این باکتری، فیمبریای نوع ۳ را تشکیل می‌دهند تا به سلول‌های مختلف و سطوح خارج سلولی بچسبند. فیمبریای نوع ۳ از دو جزء تشکیل شده است که شامل فیمبریای اصلی (*Main fimbriae; MrkA*) و فیمبریای چسبنده (*Adhesive fimbriae; MrkD*) می‌باشد (۶). طبق تحقیقات، وجود فیمبریای چسبنده *MrkD* برای رشد روی سطوح حاوی کلاژن ضروری است (۸، ۷). تولید بیوفیلم هم‌چنین توانایی باکتری را برای زنده ماندن در محیط‌های خشن میزبان افزایش می‌دهد و مسئول عفونت‌های مزمن و پایدار است (۹). یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای درمان باکتری‌های مقاوم به دارو استفاده می‌شود، تتراسایکلین است. تتراسایکلین‌ها به دلیل سمیت کم، فعالیت وسیع‌الطیف در برابر پنومونی مولد بتالاکتاماز، تحمل‌پذیری و دسترسی آسان به بازار، به طور گسترده در دام‌ها و انسان‌ها استفاده می‌شوند (۱۰). تتراسایکلین‌ها به طور خاص زیر واحد ریبوزومی S ۳۰ را مهار می‌کنند و مانع از اتصال aminoacyl-tRNA به محل گیرنده در مجموعه mRNA-ریبوزوم می‌شوند. متأسفانه، استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده است. بنابراین، هدف‌مندسازی دارویی تتراسایکلین برای جلوگیری و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۱).

نیوزوم‌ها (Niosomes) از جمله پرکاربردترین نانوحامل‌ها در داروسانی هستند که حاوی لیپیدهای آمفی‌پاتیک و سورفکتانت‌های غیریونی هستند. آن‌ها از یک یا چند لایه متراکم تشکیل شده و داروهای محلول در آب و محلول در چربی را در خود محصور می‌کنند (۱۲). نیوزوم‌ها نانوذرات سورفکتانت غیریونی هستند که خواص لیپوزوم را بهبود بخشیده‌اند. مزیت نیوزوم‌ها، تشکیل غشاء توسط سورفکتانت‌های غیریونی به جای فسفولیپیدها (که در لیپوزوم‌ها استفاده می‌شود)، افزایش پایداری و عدم تمایل به اکسیداسیون و کاهش هزینه آن است. نیوزوم‌ها ترکیبات آمفی‌پاتیک هستند و یک غشاء آب‌گریز هسته آبی داخلی آن‌ها را به دام می‌اندازد. این غشاء آب‌گریز دارای نفوذپذیری آب بالا و بار خنثی است. بنابراین، به راحتی با غشاء سلولی ترکیب می‌شود تا ترکیبات دارویی آب‌گریز و آب‌دوست را تحویل دهد (۱۵-۱۳).

با توجه به مقاومت دارویی که توسط عفونت‌های بیمارستانی با تولید بیوفیلم ایجاد می‌شود و هم‌چنین مزایای نانوحامل‌های نیوزومی برای حمل عوامل آنتی‌بیوتیکی، ضرورت استفاده از روش‌های جدید بر پایه نانو برای مقابله با عفونت‌های مقاوم به دارو

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

احساس می‌شود (۱۶). لذا، هدف از این مطالعه تعیین خصوصیات ضد باکتریایی و ضدبیوفیلمی نیوزوم‌های بارگذاری شده آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در برابر ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد ۱۰۰ نمونه شامل ادرار، زخم، مایع مغزی نخاعی، خون و خلط از بیمارستان‌های تهران (شامل بیمارستان بقیه الله و امام خمینی) از مهر ۱۴۰۱ تا فروردین ۱۴۰۲ جمع‌آوری شد که از بین آن‌ها ۳۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شد (n=۳۰). این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال با شناسه IR.IAU.TNB.REC.1402.086 تأیید شده است. تست آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک دیفیوژن برای شناسایی سویه‌های مقاوم انجام شد. سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند SIM (Sulfur، Indole، Motility)، TSI (Triple Sugar Iron)، MR-VP (Methyl-red VOGES-PROSKAUER Broth)، اوره، سیترات، و اکسیداز شناسایی و جداسازی شدند. *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 13884 به عنوان سویه مرجع در این مطالعه استفاده شد.

نیوزوم‌های حاوی تتراسایکلین (Tet-Nio) بر اساس روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شدند. در این روش، مقادیر وزنی Span60 و Tween60 (بر اساس سه نسبت مختلف Span60 به Tween60) با کلسترول در محلول کلروفرم (خریداری شده از سیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) حل شده و تحت خلاء در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد توسط اواپراتور چرخشی (هایدولف، آلمان) (۱ ساعت، ۱۲۰ دور در دقیقه) تبخیر شدند. سپس هیدراتاسیون فیلم تشکیل شده با استفاده از محلول تتراسایکلین ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (تهران دارو، ایران) در بافر فسفات (Phosphate-buffered saline; PBS) (pH=۲/۷)، یک ساعت، ۱۲۰ دور در دقیقه) انجام شد. در نهایت، ترکیبات تهیه شده به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروب (پردازنده اولتراسونیک Hielscher up50H، آلمان) فراصوت شدند. نمونه‌ها برای بررسی‌های بیشتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۱۷).

مورفولوژی Tet-Nio با میکروسکوپ الکترونی رویشی (Scanning electron microscopy; SEM) مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی میانگین اندازه ذرات، شاخص چند پراکندگی (Polydispersity index; PDI) و بار زتا فرمول‌های سنتز شده با تکنیک پراکندگی نور پویا (Dynamic light scattering; DLS) با دستگاه Nano ZS3600 (Malvern Instrument, U.K) در دمای اتاق انجام شد. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون ۱:۱۰۰ نمونه در آب دیونیزه رقیق شد. سپس یک قطره نمونه روی یک فیلم رسانا مانند آلومینیوم پخش شد و در دمای اتاق خشک شد (۱۸).

میزان راندمان به دام افتادن برای فرمولاسیون‌های سنتز شده با تعیین مقدار تتراسایکلین محبوس و تتراسایکلین غیرمحبوس در نیوزوم‌ها با استفاده از روش اولترافیلتراسیون مشخص شد. به طوری که ۱ میلی‌لیتر از Tet-Nio به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (g×۱۴۰۰۰) سانتریفیوژ (سانتریفیوژ Eppendorf® 580R، آلمان) شد. مقدار تتراسایکلین در هر نمونه با محاسبه حداکثر جذب مایع رویی در طول موج ۲۷۲ نانومتر تعیین شد. درصد راندمان جذب (Entrapment efficiency; EE) بر اساس فرمول زیر اندازه‌گیری شد (۱۹):

٪EE = (مقدار کل تتراسایکلین اولیه محبوس شده در نیوزوم‌ها - مقدار تتراسایکلین آزاد) / مقدار کل تتراسایکلین× ۱۰۰.

فرآیند آزادسازی تتراسایکلین از ساختار نیوزوم‌ها با استفاده از ۲ میلی‌لیتر محلول تتراسایکلین و نیوزوم‌های بارگذاری شده با تتراسایکلین در یک غشاء دیالیز (MWCO 12 KDa) مورد بررسی قرار گرفت. کیسه‌های دیالیز سپس به آرامی (۵۰ دور در دقیقه) در ۵۰ میلی‌لیتر بافر PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (pH=۷/۴) هم زده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه در فواصل

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

زمانی معین (۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) گرفته شد و سرعت رهاسازی نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. علاوه بر این، مکانیسم انتشار تتراسایکلین با پروفایل‌های جنبشی آزادسازی مختلف (مدل صفر، مرتبه اول، هیگوچی و کورسمایر-پپس) مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

حداقل غلظت مهارکننده (Minimum inhibitory concentration; MIC) و sub-MIC برای سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد مطالعه در معرض تتراسایکلین آزاد و Tet-Nio با استفاده از روش میکرورقیق‌سازی براث مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی (Clinical & Laboratory Standards Institute; CLSI) تأیید شد (۱۴). علاوه بر این، برای تعیین حداقل غلظت آنتی باکتریال (Minimum antibacterial concentration; MBC)، ۱۰ میکرولیتر از هر چاهک روی مولر هینتون آگار (HiMedia Pvt Ltd، هند) پخش شد و در دمای ۳۷ درجه یک شبه انکوبه شد. سپس با شمارش کلنی‌ها، MBC به عنوان کمترین غلظت نمونه گزارش شد که منجر به کاهش ۹۹/۹ درصدی تلقیح اولیه شد (۱۴).

تشکیل بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌ها به روش میکروتیتر پلیت انجام شد. طبق فرمول ارائه شده توسط استپانوویچ و همکاران، جدایه‌ها به سویه‌های کاملاً چسبنده، نسبتاً چسبنده، ضعیف چسبنده و غیر چسبنده تقسیم شدند. ارزیابی مهار تشکیل بیوفیلم در دو مرحله قبل و بعد از درمان (با تتراسایکلین و نیوزوم حاوی تتراسایکلین) با استفاده از روش میکروتیتر پلیت انجام شد (۱۴).

توانایی عوامل آزمایش برای ایجاد اختلال در بیوفیلم‌های از قبل تشکیل شده، با استفاده از MBEC (Minimum biofilm eradication concentration) اندازه‌گیری می‌شود. پس از تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌ها، چاهک‌ها با آب مقطر استریل شسته شدند و ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت آزمایش شده از محلول تتراسایکلین آزاد و نیوزوم‌های بارگذاری شده با تتراسایکلین اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به صورت هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (شیماز، ایران) شدند و OD بیوفیلم‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای کنترل منفی، سویه تریپتیک تلقیح نشده (اکسوئید، ایالات متحده آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت، در حالی که کشت ساده *کلبسیلا پنومونیه* به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. MBEC به عنوان کمترین غلظت تعیین شد که میانگین OD بیوفیلم کمتر یا مساوی با OD کنترل منفی را نشان می‌دهد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند (۲۱).

بیان ژن مرتبط با بیوفیلم در سویه های *کلبسیلا پنومونیه* مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا، برای استخراج RNA، جدایه‌های حاوی ژن بیوفیلم ابتدا با غلظت‌های زیر MIC نمونه‌ها (تتراسایکلین و تتراسایکلین بارگذاری شده در نیوزوم) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس RNA با استفاده از کیت استخراج (Qiagen RNA، ایالات متحده آمریکا) طبق پروتکل استخراج شد. سپس سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده توسط کیت رونویسی معکوس QuantiTect (کیجن، ایالات متحده آمریکا) با استفاده از پرایمرهای هگزامر تصادفی انجام شد. غلظت cDNA های سنتز شده توسط نانو دراپ تعیین و تأیید شد. بیان ژن بیوفیلم با استفاده از روش Real-Time کمی PCR (Applied Biosystems، UK) ارزیابی شد. ترکیبات در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ pmol از هر پرایمر و ۱۰ میکرولیتر Mastermix حاوی سایبر گرین بود که بر روی دستگاه مرحله یک ABI یا Applied Biosystems Real-Time PCR Instruments (ایالات متحده آمریکا) انجام شد. ژن *16srRNA* نیز به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی ژن-های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد. سپس از نرم‌افزار Rest برای محاسبه میزان بیان ژن و ترسیم نمودارهای مربوطه استفاده شد. در نهایت، تجزیه و تحلیل بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 25923) انجام شد (۱۵).

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSSنسخه ۲۰ انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون ناپارامتریک Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real-Time PCR و تشکیل بیوفیلم از آنالیز واریانس یک‌طرفه و از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

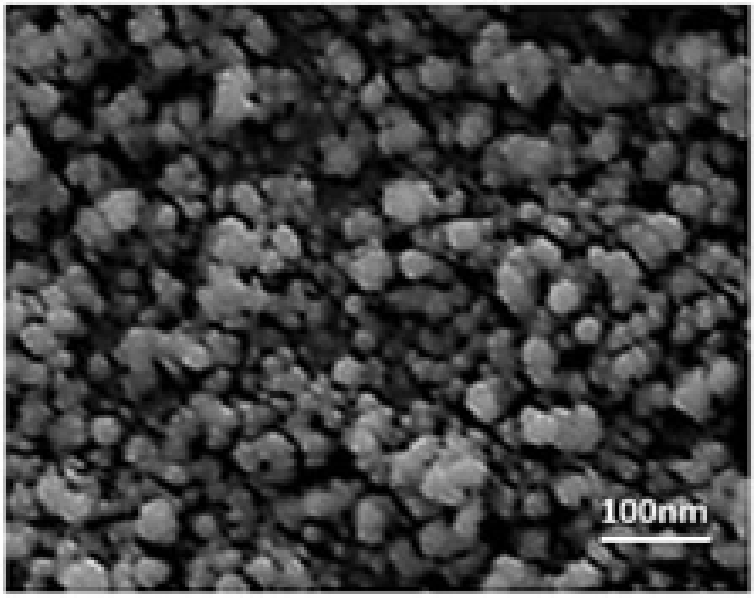
نتایج

در جدول ۱، فرمولاسیون‌های تهیه شده از Tet-Nio بر اساس نسبت‌های محتلف Span60 به Tween60 نشان داده شده است. فرمولاسیون بهینه مطابق با کوچک‌ترین سایز، کمترین PDI و بیشترین میزان درصد EE و آزادسازی دارو انتخاب می‌شود. مطابق با این موضوع، فرمولاسیون شماره ۲ با اندازه ذرات ۱۶۹/۴۵±۹/۵۵ نانومتر، PDI برابر ۰/۰۱۰±۰/۱۶۸، میزان زتاپتانسیل برابر ۲۴/۵۵±۱/۶۳-، درصد به‌دام اندازی دارو برابر ۷۵/۳۱±۱/۴۸ و درصد آزادسازی داروی تتراسایکلین در بازه ۴۸ ساعت به میزان ۴۵/۳۴±۱/۱۵ درصد به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد.

در این مطالعه شناسایی فرمولاسیون Tet-Nio با استفاده از دو تست SEM و DLS انجام شد که تست SEM ریخت‌شناسی فرمولاسیون بهینه را کروی، به‌هم چسبیده و کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر نشان داد (شکل ۱) و تست DLS اندازه ذرات به طور میانگین ۱۶۹/۴۵ نانومتر نشان داد (شکل ۲).

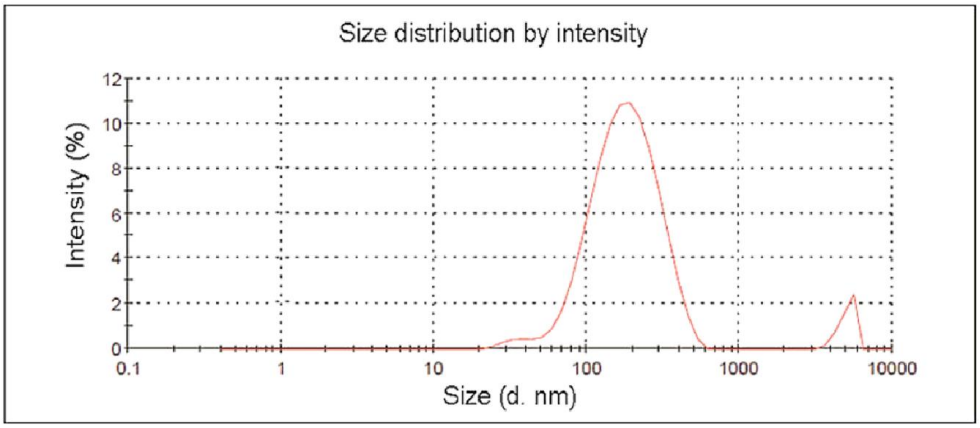
جدول ۱- فرمولاسیون‌های تهیه شده از Tet-Nio بر اساس نسبت‌های مختلف Span60 به Tween60

فرمولاسیون	Span60/Tween60 (mol ratio)	Tet (mg/ml)	اندازه وزیکل (nm)	PDI	پتانسیل زتا (mV)	EE (%) Tet	آزادسازی (48h, %) Tet
F1	۷۵:۲۵	۱	۲۰۵/۶۵±۵/۲۱	۰/۲۱۳±۰/۰۱۲	-۲۷/۹۳±۱/۲۴	۶۴/۲۹±۱/۲۱	۵۰/۶۳±۱/۲۹
F2	۵۰:۵۰	۱	۱۶۹/۴۵±۹/۵۵	۰/۱۶۸±۰/۰۱۰	-۲۴/۵۵±۱/۶۳	۷۵/۳۱±۱/۴۸	۴۵/۳۴±۱/۱۵
F3	۲۵:۷۵	۱	۲۳۱/۲۴±۶/۳۷	۰/۲۷۳±۰/۰۲۱	-۳۰/۳۹±۱/۱۲	۵۷/۵۳±۱/۰۶	۳۴/۹۳±۱/۶۷



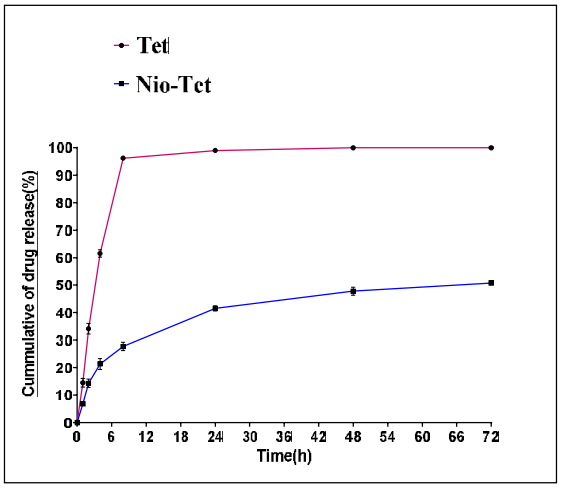
شکل ۱- تصویر SEM فرمولاسیون بهینه Tet-Nio (مقیاس ۱۰۰ نانومتر)

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]



شکل ۲- تصویر DLS فرمولاسیون بهینه Tet-Nio

شکل ۳، میزان آزادسازی داروی تتراسایکلین را از فرمولاسیون بهینه Tet-Nio در بازه زمانی ۷۲ ساعت از PBS با pH برابر با ۷/۴ نشان می‌دهد. مطابق با این شکل، در ۶ ساعت اولیه شاهد رهایش تقریباً ۱۰۰ درصدی داروی آزاد بوده‌ایم، در حالی که رهایش دارو از ساختار Tet-Nio به صورت آهسته بوده و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۴۰/۹۲ درصد، ۴۶/۷۴ درصد و ۵۰/۲۵ درصد گزارش شد. هم‌چنین، مدل کینتیک آزادسازی دارو از ساختار بهینه نشان داد که از مدل Korsmeyer-Peppas با R^2 (ضریب تعیین) برابر ۰/۹۲۵۸ پیروی می‌کند (جدول ۲).



شکل ۳- میزان آزادسازی داروی تتراسایکلین از فرمولاسیون بهینه Tet-Nio در بازه زمانی ۷۲ ساعت از PBS با pH برابر ۷/٤

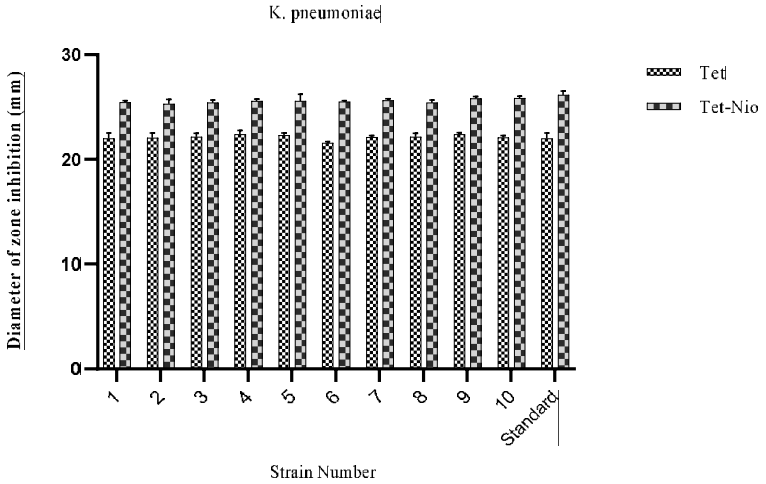
جدول ۲- مدل‌های مختلف کینتیک آزادسازی دارو از فرمولاسیون بهینه Tet-Nio

Korsmeyer-Peppas $M_t/M_\infty=K_t.t^n$		Higuchi $Q=K_H\sqrt{t}$	First-Order $LogC=LogC0+K_t/2.303$	Zero-Order $C_t=C_0+K_0t$	Kinetic Model
n*	R^2	R^2	R^2	R^2	
۰/۳۹۷۱	۰/۷۵۲۳	۰/۶۲۷۱	۰/۹۳۱۲	۰/۴۵۵۲	Tet (aq) pH=۷/۴
۰/۴۳۲۹	۰/۹۲۵۸	۰/۹۲۶۱	۰/۸۵۱۶	۰/۷۹۷۱	Tet-Nio pH=۷/۴

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

از تعداد ۳۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی، ۱۰ سویه که دارای ژن *mrkA* بودند برای انجام مطالعات بعدی انتخاب شدند. در ابتدا با انجام تست دیسک‌گذاری Tet و Tet-Nio اثر ضد باکتریایی فرمولاسیون تهیه شده و داروی آزاد علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱) که نشان داده شد. قطر هاله عدم رشد در مواجهه با Tet و Tet-Nio به طور میانگین در همه سویه‌های بالینی به ترتیب ۲۲ میلی‌متر و ۲۵/۵ میلی‌متر و در سویه استاندارد به ترتیب ۲۲ و ۲۶/۲۵ میلی‌متر تخمین زده شد که نشان می‌دهد Tet-Nio بیشتر از Tet به تنهایی موجب مهار رشد این باکتری می‌شود.

هم‌چنین، اثر ضد باکتریایی Tet و Tet-Nio علیه این ۱۰ ایزوله بالینی با روش MIC و MBC با روش میکرودایلوشن انجام شد (جدول ۳) که نشان داده شد Tet MIC و Nio-Tet به ترتیب از ۲۲/۸۱-۹۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌متر و ۴۵/۶۳-۱۱/۴۱ میکروگرم بر میلی‌متر و Tet MBC و Nio-Tet به ترتیب از ۴۵/۶۳-۱۸۲/۵ میکروگرم بر میلی‌متر و ۲۲/۸۱-۹۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌متر علیه سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* گزارش شد.



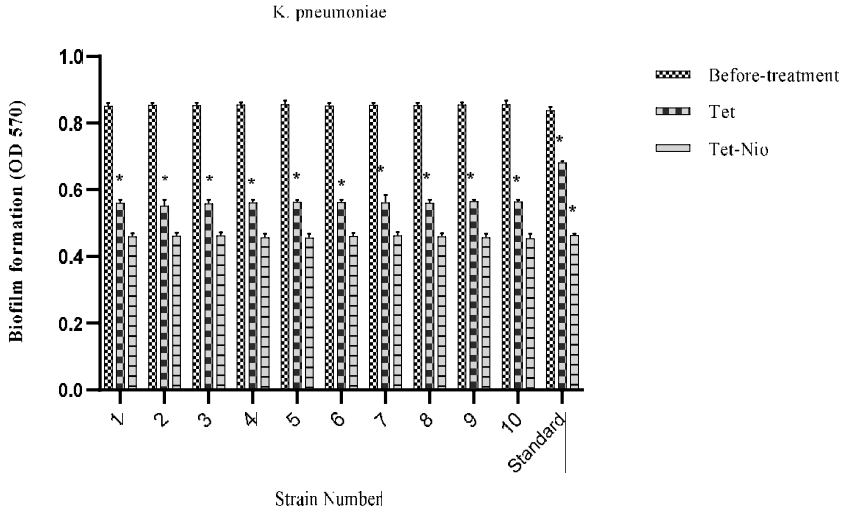
نمودار ۱- تست دیسک‌گذاری برای بررسی اثر ضد باکتریایی فرمولاسیون Tet-Nio و Tet آزاد علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه

جدول ۳- مقادیر MIC و MBC محاسبه شده برای بررسی اثر ضد باکتریایی فرمولاسیون Tet-Nio و Tet آزاد علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه

MBC		MIC		
Tet-Nio	Tet	Tet-Nio	Tet	شماره سویه
۹۱/۲۵	۱۸۲/۵۰	۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۱
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۲
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۳
۹۱/۲۵	۱۸۲/۵	۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۴
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۵
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۶
۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۱۱/۴۱	۲۲/۸۱	۷
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۸
۹۱/۲۵	۱۸۲/۵۰	۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۹
۴۵/۶۳	۹۱/۲۵	۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۱۰
۲۲/۸۱	۴۵/۶۳	۱۱/۴۱	۲۲/۸۱	استاندارد

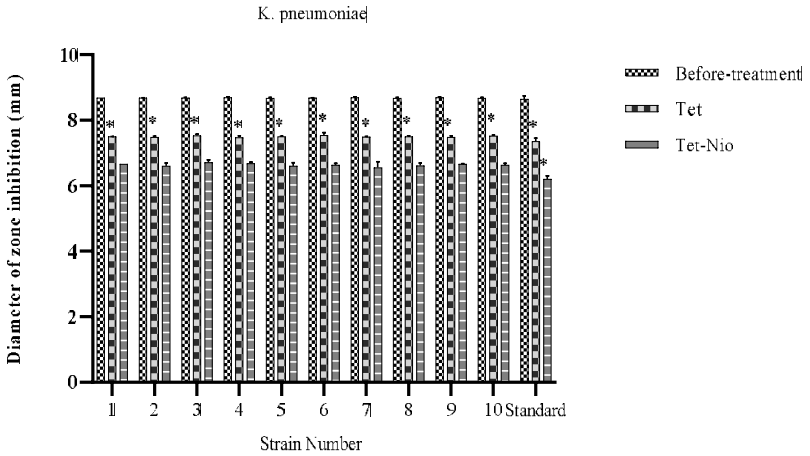
CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

توانایی تشکیل بیوفیلم در ۱۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio محاسبه شد (نمودار ۲) و نشان داده شد تولید بیوفیلم پس از تیمار با هر دو عنصر آنتی‌باکتریال در تمامی سویه‌ها کاهش معنی‌دار داشته است (P<۰/۰۰۱)، که کاهش معنی‌دار مشاهده شده در سویه‌های تیمار شده با Tet-Nio به طور چشم‌گیری بیشتر از این کاهش در سویه‌های تیمار شده با Tet به تنهایی بود. بررسی میزان قطر ناحیه مهار شده در تشکیل بیوفیلم (MBEC) در ۱۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio نتایج تست کریستال ویوله را تأیید کرد که هر دو عامل Tet و Tet-Nio به طور معنی‌داری تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهند (نمودار ۳).



نمودار ۲- توانایی تشکیل بیوفیلم در ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio با استفاده از تست کریستال ویوله با باکتری‌های کنترل (قبل تیمار) مقایسه شده‌اند.

آنالیز واریانس یک‌طرفه، * اختلاف معنی‌دار گروه‌های تحت تیمار با دارو و نیوزوم حاوی دارو با گروه قبل از تیمار یا Before treatment به‌عنوان کنترل (P<۰/۰۵). محور افقی نشان دهنده شماره سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و محور عمودی نشان دهنده میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ می‌باشد.

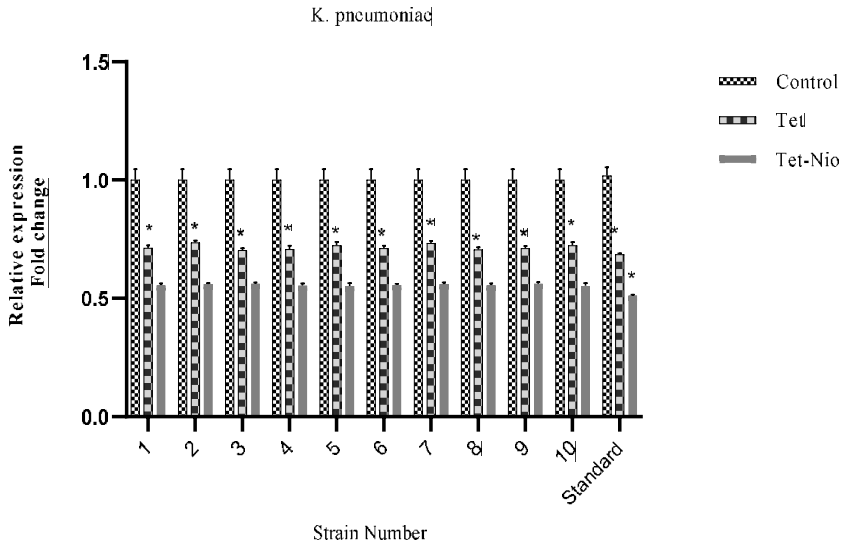


نمودار ۳- میزان قطر ناحیه مهار شده در تشکیل بیوفیلم در ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio با استفاده از تست کریستال ویوله با باکتری‌های کنترل (قبل تیمار) مقایسه شده‌اند.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]
[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

آنالیز واریانس یک‌طرفه، * اختلاف معنی‌دار گروه‌های تحت تیمار با دارو و نیوزوم حاوی دارو با گروه قبل از تیمار یا Before treatment به‌عنوان کنترل (P<۰/۰۵). محور افقی نشان دهنده شماره سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و محور عمودی نشان دهنده قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) می‌باشد.

اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن *mrkA* در سویه‌های تیمار شده *کلبسیلا پنومونیه* با Tet و Tet-Nio با استفاده از تکنیک Real-Time PCR انجام شد که نشان داده شد بیان این ژن در تمامی سویه‌های مورد بررسی پس از تیمار با Tet و Tet-Nio کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) نسبت به ژن مرجع داشته است که این کاهش بیان ژن *mrkA* در سویه‌های تیمار شده باTet-Nio بیشتر به چشم می‌خورد (نمودار ۴).



نمودار ٤- تغییرات بیان ژن mrkA در ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio با استفاده از تکنیک Real-Time PCR نسبت به ژن مرجع آنالیز واریانس یک‌طرفه، * اختلاف معنی‌دار در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۵)

بحث

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی در جامعه است و بار قابل توجهی را بر سیستم‌های مراقبت بهداشتی وارد می‌کند. بیوفیلم این باکتری می‌تواند موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری شود (۱۴). رشد در یک بیوفیلم با ایجاد دفاع در برابر چندین مکانیسم پاک سازی، نقش مهمی در طول عفونت ایفاء می‌کند. ماتریکس بیوفیلم می‌تواند دسترسی انواع خاصی از دفاع‌های ایمنی مانند ماکروفاژها را که نفوذ ناقص به ماتریکس بیوفیلم را نشان می‌دهند، مختل کند (۲۲). علاوه بر این، سلول‌های بیوفیلم افزایش تحمل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند (۲۳). بر خلاف مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارثی، تحمل آنتی‌بیوتیکی مرتبط با بیوفیلم یک حالت گذرا است که در آن باکتری‌ها حساس معمولاً وارد یک فیزیولوژی تغییر یافته می‌شوند که حساسیت را کاهش می‌دهد. هنگامی که این سلول‌ها پراکنده می‌شوند و دوباره وارد حالت پلانکتون می‌شوند، حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبیعی را دوباره به دست می‌آورند (۲۴). از این رو، مقابله با عفونت‌های پنومونیه در هنگام تشکیل بیوفیلم از اهمیت بالایی برخوردار است و هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر Tet-Nio به عنوان یک ساختار درمانی جدید برای مقابله با بیوفیلم این پاتوژن بیمارستانی بود.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

در مطالعه حاضر، آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نانوحامل‌های نیوزومی سنتز شده کپسوله شد. وجود Span60 و Tween60 در ساختار نیوزوم‌های سنتز شده باعث ایجاد پایداری و افزایش راندمان به‌دام افتادن دارو می‌شود (۲۵). اندازه ذرات یکی از ویژگی‌های قابل توجه در کارآیی EE درصد دارو و آزاد شدن آن از نیوزوم است و مقدار ترکیبات نیوزوم مانند کلسترول در آن نقش دارد. در یک مخلوط، PDI اندازه یکنواخت ذرات را نشان می‌دهد که در محدوده ۰-۱ متفاوت است و ذرات با همان اندازه یکنواخت هستند. بنابراین، ترکیبات همگن PDI کمتری دارند که کمتر مستعد تجمع هستند (۱۴). این ویژگی‌ها باعث افزایش ورود تتراسایکلین به داخل سلول‌های میزبان و تجمع تتراسایکلین در سلول‌های میزبان می‌شود. با توجه به معیارهای فوق، فرمولاسیون شماره ۲ با ابعاد و PDI کوچک و هم‌چنین درصد EE بالا با ساختاری کروی و یکنواخت به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد.

بررسی پروفایل انتشار تتراسایکلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۰-۷۲ ساعت از فرمول نیوزوم بهینه نشان داد که انتشار تجمعی در مقایسه با تتراسایکلین آزاد دو فازی است. فاز اولیه و سریع آزادسازی تتراسایکلین به رهایش داروی آزاد در سطح نیوزوم بستگی دارد، در حالی که فاز غیرفعال و آهسته رهش دارو به آزادسازی از طریق لایه‌های نیوزوم مربوط می‌شود (۱۵). مکانیسم انتشار دارو بر اساس شکل خطی مدل‌های جنبشی مختلف برای داده‌های انتشار توضیح داده شده است. یک مدل سینتیکی بهینه دارای ضریب رگرسیون نزدیک به ۱ است. داده‌های کینتیک نشان می‌دهد که آزاد سازی دارو توسط مکانیسم‌های انتشار و فرسایش کنترل می‌شود (۲۶). علاوه بر این، مقادیر n اندازه‌گیری شده نشان دهنده ترشح دارو توسط انتشار فیکیان دیفیوژن است. به طور کلی، ارزیابی نمایه آزادسازی تتراسایکلین نشان دهنده بهبود در نرخ رهاسازی دارو با استفاده از نیوزوم به عنوان حامل دارو است که هم‌چنین با کاهش عوارض جانبی دارو، مدت زمان مصرف دارو را کنترل می‌کند (۲۷).

نتایج تست میکروبی نشان می‌دهد که ساختار Tet-Nio دارای اثرات ضد باکتریایی بیشتری نسبت به داروی آزاد است به طوری که میزان MIC و MBC آن حداقل نصف میزان MIC و MBC محاسبه شده برای داروی آزاد است که این اصل با انجام تست دیسک‌گذاری نیز تأیید شد. هم‌چنین، بیان شد که فرمولاسیون بهینه Tet-Nio می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای تشکیل بیوفیلم را در باکتری‌های پاتوژن *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به تیمار با داروی آزاد کاهش دهد (تست کریستال ویوله وMBEC) که این امر با کاهش معنی‌دار در بیان ژن *mrkA* تأیید گردید. مکانیسم‌های متفاوتی برای اثر ضد باکتریایی و ضدبیوفیلمی بیشتر Tet-Nio نسبت به داروی آزاد پیشنهاد شده است که می‌توان به افزایش نفوذپذیری غشاء باکتری، افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک در سلول باکتری در اثر جذب وزیکول، همجوشی بین وزیکول نیوزوم و اجزای با بار مثبت در غشاء باکتری، کاهش تعداد سلول‌های زنده در بیوفیلم اشاره داشت (۲۸). مطالعه Rahmati و همکاران نشان داد که نیوزوم حاوی آمیکاسین اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به آمیکاسین آزاد در برابر سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارد و هم چنین اثر ضد بیوفیلمی خود را با کاهش شدید در بیان ژن *mrkD* اعمال می‌کند (۱۴). هم‌چنین، در مطالعه دیگری نشان داده شد نیوزوم حاوی ونکومایسین و جینجرول اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به دو دارو در سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به کرباپنم‌ها دارد و هم‌چنین اثر ضد بیوفیلمی خود را با تأثیر بر بیان ژن *mrkD* در این سویه های بالینی ایجاد می‌کند (۱۵). نتایج Abo Kamer و همکاران نشان داد که وزیکول‌های سورفکتانتی قادر بودند مقادیر MIC فرمولاسیون نانوحامل حاوی ارتاپنم را تا ۹ برابر نسبت به فرم‌های آزاد دارو علیه سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* کاهش دهند (۲۹).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

با توجه به محدودیت‌های پیش رو از لحاظ تعداد نمونه‌های محدود باکتریایی، در دسترس نبودن ابزارها و تکنیک‌های به‌روز آزمایشگاهی و محدودیت زمانی برای انجام پژوهش، پیشنهاد می‌شود تکنیک‌های بیشتری برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی نانوحامل سنتز شده اتخاذ شود و هم‌چنین اثرات این نانوحامل‌ها در شرایط in vivo و بالینی نیز بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، نیوزوم‌های حاوی تتراسایکلین (Tet-Nio) ساخته شدند و از لحاظ مورفولوژیکی ساختار آن‌ها تأیید شد. روی هم رفته نشان داده شد که ساختار Tet-Nio بهینه شده آزادسازی دارو را برای عملکرد ضد باکتریایی کنترل کرد و موجب رهایش کنترل شده دارو در باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* شد. نفوذ Tet-Nio به سلول‌های باکتریایی به طور قابل توجهی بیان ژن مربوط به بیوفیلم را در جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* مهار کرد. بنابراین، این نانوساختارها می‌توانند عفونت‌های مزمن ناشی از باکتری کلبسیلا مقاوم به دارو را مدیریت کرده و پتانسیل درمانی تتراسایکلین را بهبود بخشند و از این رو ممکن است بتوان در مطالعات بالینی از آن‌ها برای مقابله با عفونت‌های بیمارستانی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

تشکر و قدردانی: از تمامی همکاران و مسئولین دانشگاه اسلامی آزاد واحد تهران شمال که ما را در مسیر یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می شود.

تعارض در منافع: مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی نداشت.

حامی مالی: این مطالعه هیچ بودجه‌ای نداشت.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال با شناسه IR.IAU.TNB.REC.1402.086 تأیید شده است.

مشارکت نویسندگان:

طراحی ایده: فاطمه اشرفی

-روش کار: فاطمه اشرفی

– **جمع‌آوری داده‌ها:** الهام بازرگان

-تجزیه و تحلیل داده‌ها: الهام سیاسی

-نظارت: الهام سیاسی

-مدیریت پروژه: فاطمه اشرفی

-نگارش – پیشنویس اصلی: الهام بازرگان

-نگارش – بررسی و ویرایش: فاطمه اشرفی

References

1. Arcari G, Raponi G, Sacco F, Bibbolino G, Di Lella FM, Alessandri F, et al. Klebsiella pneumoniae infections in COVID-19 patients: a 2-month retrospective analysis in an Italian hospital. Int J Antimicrob Agents 2021; 57(1): 106245.

2. Serra-Burriel M, Keys M, Campillo-Artero C, Agodi A, Barchitta M, Gikas A, et al. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. PLoS One 2020; 15(1): e0227139.

3. Flores-Valdez M, Ares MA, Rosales-Reyes R, Torres J, Girón JA, Weimer BC, et al. Whole genome sequencing of pediatric Klebsiella pneumoniae strains reveals important insights into their virulence-associated traits. Front Microbiol 2021; 12: 711577.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

4. Lev AI, Astashkin EI, Kislichkina AA, Solovieva EV, Kombarova TI, Korobova OV, et al. Comparative analysis of Klebsiella pneumoniae strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. Pathogens and global health 2018; 112(3): 142-51.

5. Provenzani A, Hospodar A, Meyer A, Leonardi Vinci D, Hwang E, Butrus C, et al. Multidrug-resistant gram-negative organisms: a review of recently approved antibiotics and novel pipeline agents. Int J Clin Pharm 2020; 42: 1016-25.

6. Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev 2016; 80(3): 629-61.

7. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. BMC Microbiol 2010; 10: 1-10.

8. Jagnow J, Clegg S. Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. Microbiology 2003; 149(9): 2397-405.

9. Wang Q, Chang C-s, Pennini M, Pelletier M, Rajan S, Zha J, et al. Target-agnostic identification of functional monoclonal antibodies against Klebsiella pneumoniae multimeric MrkA fimbrial subunit. The Journal of Infectious Diseases 2016; 213(11): 1800-8.

10. Ahmadi Z, Noormohammadi Z, Ranjbar R, Behzadi P. Prevalence of tetracycline resistance genes tet (A, B, C, 39) in Klebsiella pneumoniae isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Medical Microbiology 2022; 16(2): 141-7.

11. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65(2): 232-60.

12. Saini A, Panwar D, Panesar PS, Bera MB. Encapsulation of functional ingredients in lipidic nanocarriers and antimicrobial applications: a review. Environ Chem Lett 2021; 19: 1107-34.

13. Abdelkader H, Wu Z, Al-Kassas R, Alany RG. Niosomes and discomes for ocular delivery of naltrexone hydrochloride: morphological, rheological, spreading properties and photo-protective effects. Int J Pharm 2012; 433(1-2): 142-8.

14. Rahmati M, Babapoor E, Dezfulian M. Amikacin-loaded niosome nanoparticles improve amikacin activity against antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae strains. World J Microbiol Biotechnol 2022; 38(12): 230.

15. Karbalaeiheidar H, Ashrafi F. Vancomycin-gingerol encapsulated niosomal formulation against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Biomedical Materials 2023; 18(4): 045015.

16. Hetta HF, Ramadan YN, Al-Harbi AI, Ahmed AE, Battah B, Abd Ellah NH, et al. Nanotechnology as a promising approach to combat multidrug resistant bacteria: A comprehensive review and future perspectives. Biomedicines 2023; 11(2): 413.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

17. Thabet Y, Elsabahy M, Eissa NG. Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. Methods 2022; 199: 9-15.

18. Akbarzadeh I, Yaraki MT, Bourbour M, Noorbazargan H, Lajevardi A, Shilsar SMS, et al. Optimized doxycycline-loaded niosomal formulation for treatment of infection-associated prostate cancer: An in-vitro investigation. *J Drug Deliv Sci* Technol 2020; 57: 101715.

19. Ahmadi S, Seraj M, Chiani M, Hosseini S, Bazzazan S, Akbarzadeh I, et al. In vitro development of controlled-release nanoniosomes for improved delivery and anticancer activity of letrozole for breast cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine* 2022; 17: 6233.

20. Mirzaie A, Peirovi N, Akbarzadeh I, Moghtaderi M, Heidari F, Yeganeh FE, et al. Preparation and optimization of ciprofloxacin encapsulated niosomes: A new approach for enhanced antibacterial activity, biofilm inhibition and reduced antibiotic resistance in ciprofloxacin-resistant methicillin-resistance Staphylococcus aureus. Bioorg Chem 2020; 103: 104231.

21. Haddadian A, Robattorki FF, Dibah H, Soheili A, Ghanbarzadeh E, Sartipnia N, et al. Niosomes-loaded selenium nanoparticles as a new approach for enhanced antibacterial, anti-biofilm, and anticancer activities. *Sci Rep* 2022; 12(1): 21938.

22. Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. Front Immunol 2014; 5: 37.

23. De la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Curr Opin Microbiol 2013; 16(5): 580-9.

24. Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in cellular and infection microbiology 2014; 4: 178.

25. Hajiahmadi F, Alikhani MY, Shariatifar H, Arabestani MR, Ahmadvand D. The bactericidal effect of lysostaphin coupled with liposomal vancomycin as a dual combating system applied directly on methicillin-resistant Staphylococcus aureus infected skin wounds in mice. *International Journal of Nanomedicine* 2019: 5943-55.

26. Marandi A, Ashrafi F, Bakhtiari N. Preparation and Evaluation of Anti-Cancer Effect of Lactobacillus Casei-Containing Niosome on Breast Cancer Cells Viability. *Iranian Journal of Science* 2023; 47(4): 1029-38.

27. Cortesi R, Ravani L, Rinaldi F, Marconi P, Drechsler M, Manservigi M, et al. Intranasal immunization in mice with non-ionic surfactants vesicles containing HSV immunogens: a preliminary study as possible vaccine against genital herpes. *Int J Pharm* 2013; 440(2): 229-37.

28. Abdelaziz AA, Elbanna TE, Sonbol FI, Gamaleldin NM, El Maghraby GM. Optimization of niosomes for enhanced antibacterial activity and reduced bacterial resistance: in vitro and in vivo evaluation. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2015; 12(2): 163-80.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

29. Abo Kamer AM, Amer NM, Abdelmegeed AA, Maghraby GM El, Gamaleldin NM. Surfactant nanovesicles for augmented antibacterial activity against carbapenemase resistant enterobacteriaceae and extended spectrum beta-lactamases producing bacteria: in vitro and in vivo evaluation. *BMC Microbiol* 2023; 23(1): 1-14.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]

CCBY-NC.4.0 DEED

Antibacteria and Antibiofilm Properties of Tetracycline Loaded Niosomes against *Klebsiella Pneumoniae* Isolates: A Laboratory Study

Elham Bazargan[1], Fatemeh Ashrafi[2], Elham Siasi Torbati[3]

Received: 05/11/23 Sent for Revision: 13/03/24 Received Revised Manuscript: 22/06/24 Accepted: 24/06/24

Background and Objectives: Biofilm production is one of the reasons for drug resistance in bacteria. The aim of the present study was to synthesize niosomal structures containing tetracycline antibiotic and determine its effect on *Klebsiella pneumoniae* drug-resistant isolates in an effective treatment system.

Materials and Methods: In this laboratory study, nanoniosomes containing tetracycline (Tet-Nio) were synthesized using the thin layer hydration method, and the morphological characteristics of drug release was investigated. MIC (Minimum inhibitory concentration), crystal violet, MBEC (Minimum biofilm eradication concentration) tests were used to investigate the antibacterial and anti-biofilm effects against *Klebsiella pneumoniae* strains under study exposed to free tetracycline and Tet-Nio, and the expression of *mrkA* gene in 10 isolates using was evaluated by real-time PCR test. One-way analysis of variance was used to analyze the data.

Results: Formulation No.2 with the particle size of 169.45±9.55 nm, polydispersity index (PDI) equal to 0.168±0.010, Zeta-potential equal to -24.55±1.63, entrapment efficacy equal to 75.31%±1.48%, and tetracycline drug release percentage in 48 hours equal to 45.34%±1.15% was chosen as the optimal formulation. The microbial test results showed that the Tet-Nio structure has more antibacterial effects than the free drug. Also, it was stated that the optimal formulation of Tet-Nio can significantly reduce the formation of biofilm in *Klebsiella pneumoniae* pathogenic bacteria by reducing the expression of the *mrkA* gene compared to the drug-treated group ($p<0.001$).

Conclusion: Niosomes containing tetracycline were able to inhibit biofilm formation in drug-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Therefore, they can be used in clinical studies to deal with nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* isolate.

Keywords: Niosome, Tetracycline, *Klebsiella pneumoniae*, Biofilm, Antibiotic resistance

Funding: This study did not received any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical Considerations: The Ethics Committee of the Islamic Azad University, Tehran North Branch, approved the study (IR.IAU.TNB.REC.1402.086).

Authors' Contributions:

- Conceptualization: Fatemeh Ashrafi

- Methodology: Fatemeh Ashrafi

- Data collection: Elham bazargan

Formal analysis: Elham siasi

Supervision: Elham siasi

Project administration: Elham siasi

Writing – original draft: Elham bazargan

Writing – review & editing: Fatemeh Ashrafi

Citation: Bazargan E, Ashrafi F, Siasi Torbati E. Antibacteria and Antibiofilm Properties of Tetracycline Loaded Niosomes Against *Klebsiella Pneumoniae* Isolates: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2024; 23 (4): 307-21. [Farsi]

1- PhD Student in Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author) Tel: (021) 77319327, E-mail: mnfa.ashrafi@yahoo.com

3- Associate Prof., Dept. of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

CCBY-NC.4.0 DEED

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-08-29]

[DOI: 10.61186/jrums.23.4.207]