

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 بیوفیلیم 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 و یوله، 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 $169/45 \pm 9/55$ نانومتر، Polydispersity index برابر $0/168 \pm 0/10$ ، میزان زتاپتانسیل برابر $-24/55 \pm 1/63$ ، درصد به‌دام اندازی دارو برابر $75/31 \pm 1/48$ و درصد آزادسازی داروی تتراسایکلین در بازه ۴۸ ساعت به میزان $45/34 \pm 1/15$ 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 بیوفیلیم را در باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونیه نسبت به گروه دارویی کاهش دهد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: نیوزوم‌های حاوی تتراسایکلین توانستند تشکیل بیوفیلیم 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، بیوفیلیم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: بازرگان، اشرفی، ف، سیاسی تربتی، 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: ۳۰۷-۳۲۱.

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

مقدمه

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 داروسازی 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 (۱۳-۱۵).

با توجه به مقاومت دارویی که توسط عفونت‌های بیمارستانی با تولید بیوفیلیم 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

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) یکی از باکتری‌های گرم منفی با فراوانی بالای مقاومت چند دارویی است که باعث عفونت در بیماران بستری می‌شود (۱، ۲). 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 چنددارویی افزایش یافته است که باعث درمان دشوار این عفونت بیمارستانی می‌شود. این باکتری به طور گسترده مقاومت چنددارویی 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* (فیمبری نوع ۱)، ژن‌های *mrk* (فیمبری نوع ۳) و *E. Coli common pili ecp* می‌باشد. این ژن‌ها بیشترین گزارش را در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو دارند (۳، ۴).

تولید بیوفیلیم یکی از دلایل مقاومت دارویی باکتری‌ها است (۵). به منظور تشکیل یک بیوفیلیم، بیشتر سویه‌های این باکتری، فیمبری نوع ۳ را تشکیل می‌دهند تا به سلول‌های مختلف و سطوح خارج سلولی بچسبند. فیمبری نوع ۳ از دو جزء تشکیل شده است که شامل فیمبری اصلی (*Main fimbriae; MrkA*) و فیمبری چسبنده (*Adhesive fimbriae; MrkD*) می‌باشد (۶). طبق تحقیقات، وجود فیمبری چسبنده *MrkD* برای رشد روی سطوح حاوی کلاژن ضروری است (۷، ۸). تولید بیوفیلیم هم‌چنین توانایی باکتری را برای زنده ماندن در محیط‌های خشن میزبان

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 ($n=30$). 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 (Motility, Indole, Sulfur), (Triple Sugar Iron) TSI MR-VP, (Methyl-red VOGES-) و 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 Tween60 و Span60 (بر اساس سه نسبت مختلف Span60 به Tween60) با کلسترول در محلول کلروفرم (خریداری شده از سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) حل شده و تحت خلاء در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد توسط اواپراتور چرخشی (هابدولف، 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) ($pH=7.2$)، 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 روبشی (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 ($14000 \times g$) 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):

$EE\% = \frac{\text{مقدار کل تتراسایکلین اولیه محبوس شده در نیوزوم‌ها} - \text{مقدار تتراسایکلین آزاد}}{\text{مقدار کل تتراسایکلین}} \times 100$.

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 ($pH=7.4$) هم زده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه در فواصل

به مدت ۲۴ ساعت به صورت هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (شیماز، ایران) شدند و OD بیوفیلیم‌ها 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 بیوفیلیم کمتر یا مساوی با OD کنترل منفی را نشان می‌دهد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند (۲۱).

بیان ژن مرتبط با بیوفیلیم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا، برای استخراج RNA، جدایه‌های حاوی ژن بیوفیلیم 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 بیوفیلیم با استفاده از روش Real-Time کمی (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 ژن‌های 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).

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، هیگوجی و کورسمایر-پیس) 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 برات مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی (Clinical & Laboratory Standards Institute; CLSI) تأیید شد (۱۴). علاوه بر این، برای تعیین حداقل غلظت آنتی‌باکتریال (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 بیوفیلیم 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 بیوفیلیم 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 بیوفیلیم‌های از قبل تشکیل شده، با استفاده از MBEC (Minimum biofilm eradication concentration) اندازه‌گیری می‌شود. پس از تشکیل بیوفیلیم 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

با این موضوع، فرمولاسیون شماره ۲ با اندازه ذرات $۱۶۹/۴۵ \pm ۹/۵۵$ نانومتر، PDI برابر $۰/۱۰ \pm ۰/۱۶۸$ ، میزان زتاپتانسیل برابر $-۲۴/۵۵ \pm ۱/۶۳$ ، درصد به دام اندازی دارو برابر $۷۵/۳۱ \pm ۱/۴۸$ و درصد آزادسازی داروی تتراسایکلین در بازه ۴۸ ساعت به میزان $۴۵/۳۴ \pm ۱/۱۵$ 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 ریخت شناسی فرمولاسیون بهینه را کروی، به هم 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).

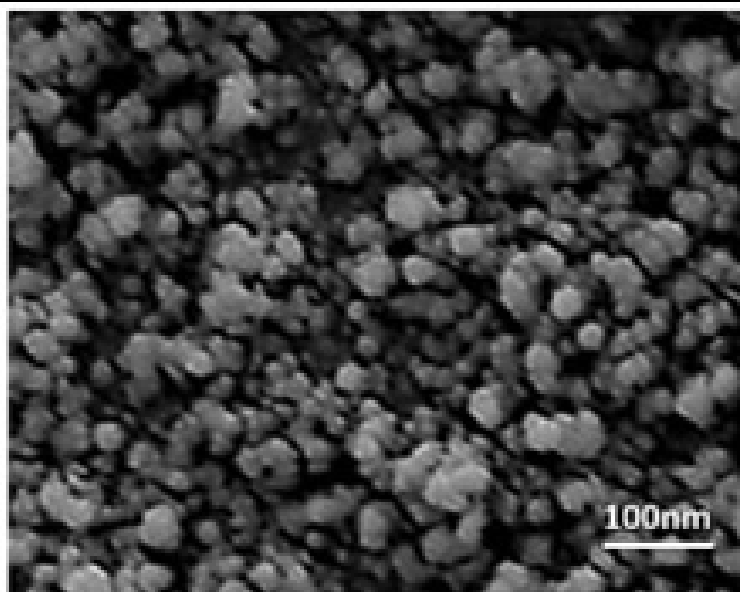
تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون ناپارامتریک Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real-Time PCR و تشکیل بیوفیلم از آنالیز واریانس یک‌طرفه و از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری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

نتایج

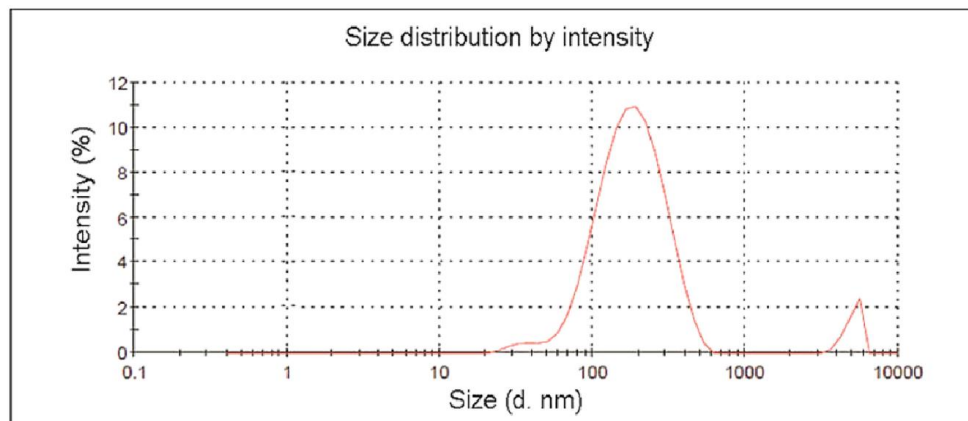
در جدول ۱، فرمولاسیون‌های تهیه شده از Tet-Nio بر اساس نسبت‌های مختلف Span60 به Tween60 نشان داده شده است. فرمولاسیون بهینه مطابق با کوچک‌ترین سایز، کمترین PDI و بیشترین میزان درصد EE و آزادسازی دارو انتخاب می‌شود. مطابق

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

| آزادسازی (48h, %) Tet | EE (%) Tet | پتانسیل زتا (mV) | PDI | اندازه وزیکل (nm) | Tet (mg/ml) | Span60/Tween60 (mol ratio) | فرمولاسیون |
|-----------------------------|------------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|------------|
| $۵۰/۶۳ \pm ۱/۲۹$ | $۶۴/۲۹ \pm ۱/۲۱$ | $-۲۷/۹۳ \pm ۱/۲۴$ | $۰/۲۱۳ \pm ۰/۱۰۲$ | $۲۰۵/۶۵ \pm ۵/۲۱$ | ۱ | ۷۵:۲۵ | F1 |
| $۴۵/۳۴ \pm ۱/۱۵$ | $۷۵/۳۱ \pm ۱/۴۸$ | $-۲۴/۵۵ \pm ۱/۶۳$ | $۰/۱۶۸ \pm ۰/۱۰$ | $۱۶۹/۴۵ \pm ۹/۵۵$ | ۱ | ۵۰:۵۰ | F2 |
| $۳۴/۹۳ \pm ۱/۶۷$ | $۵۷/۵۳ \pm ۱/۰۶$ | $-۳۰/۳۹ \pm ۱/۱۲$ | $۰/۲۷۳ \pm ۰/۰۲۱$ | $۲۳۱/۲۴ \pm ۶/۳۷$ | ۱ | ۲۵:۷۵ | F3 |



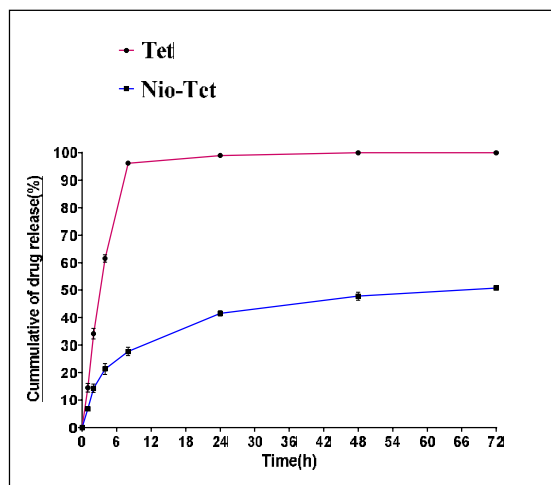
شکل ۱- تصویر SEM فرمولاسیون بهینه Tet-Nio (مقیاس ۱۰۰ نانومتر)



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).



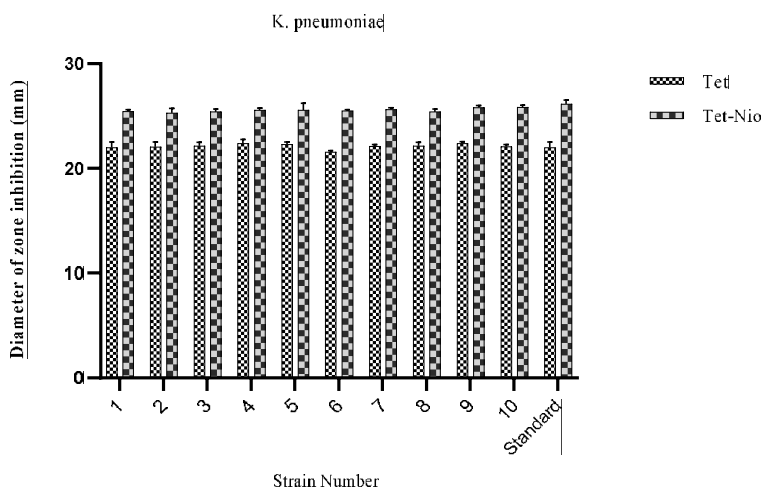
شکل ۳- میزان آزادسازی داروی تتراسایکلین از فرمولاسیون بهینه Tet-Nio در بازه زمانی ۷۲ ساعت از PBS با pH برابر ۷/۴

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

| Korsmeyer-Peppas $M_t/M_\infty = K_t \cdot t^n$ n* | Higuchi $Q = K_H \sqrt{t}$ R ² | First-Order $\text{Log}C = \text{Log}C_0 + K_t/2.303$ R ² | Zero-Order $C_t = C_0 + K_0 t$ R ² | Kinetic Model |
|--|---|--|---|--------------------|
| ۰/۳۹۷۱ | ۰/۷۵۲۳ | ۰/۶۲۷۱ | ۰/۹۳۱۲ | Tet (aq) pH=۷/۴ |
| ۰/۴۳۲۹ | ۰/۹۲۵۸ | ۰/۹۲۶۱ | ۰/۷۹۷۱ | Tet-Nio pH=۷/۴ |

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

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.



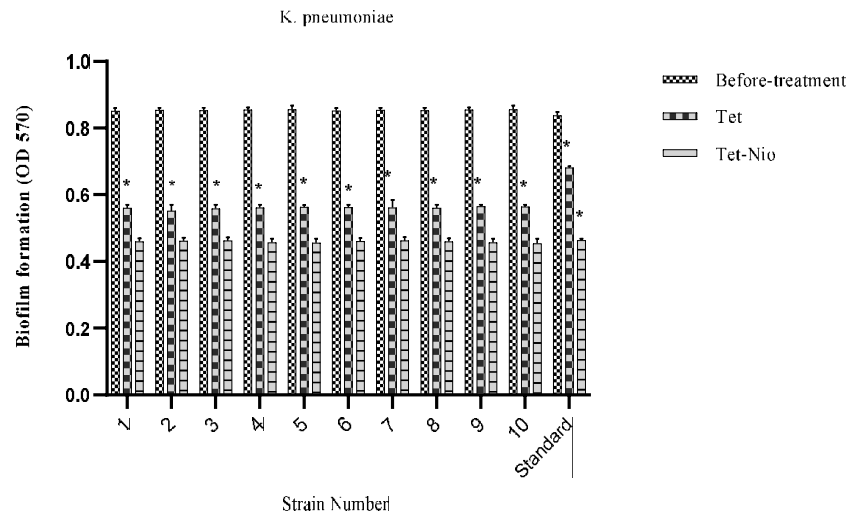
نمودار ۱- تست دیسک‌گذاری برای بررسی اثر ضد باکتریایی فرمولاسیون Tet-Nio و Tet آزاد علیه سویه‌های بالینی و سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه

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

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

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 معنی داری تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهند (نمودار ۳).

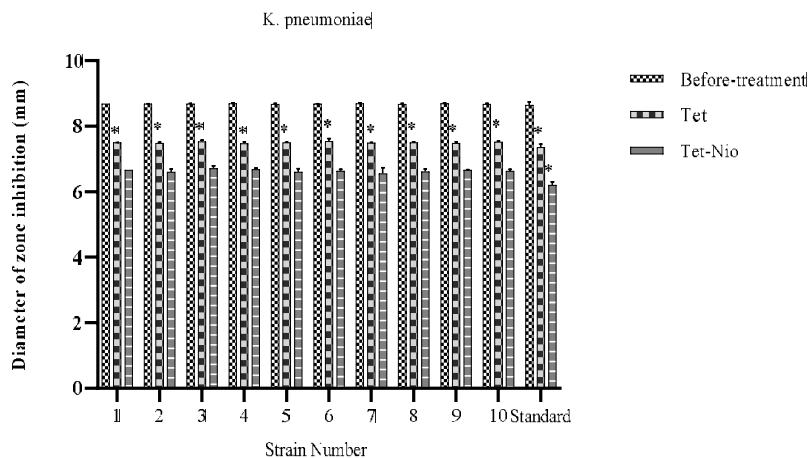
توانایی تشکیل بیوفیلم در ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه بالینی و سویه استاندارد پس از تیمار با Tet و Tet-Nio محاسبه شد (نمودار ۲) و نشان داده شد تولید بیوفیلم پس از تیمار با هر دو عنصر آنتی‌باکتریال در تمامی سویه‌ها کاهش معنی دار داشته است ($P < 0.001$), که کاهش معنی دار مشاهده شده در سویه‌های تیمار شده با Tet-Nio به طور چشم‌گیری بیشتر از این کاهش در



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.

شماره سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و محور عمودی نشان دهنده میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ می‌باشد.

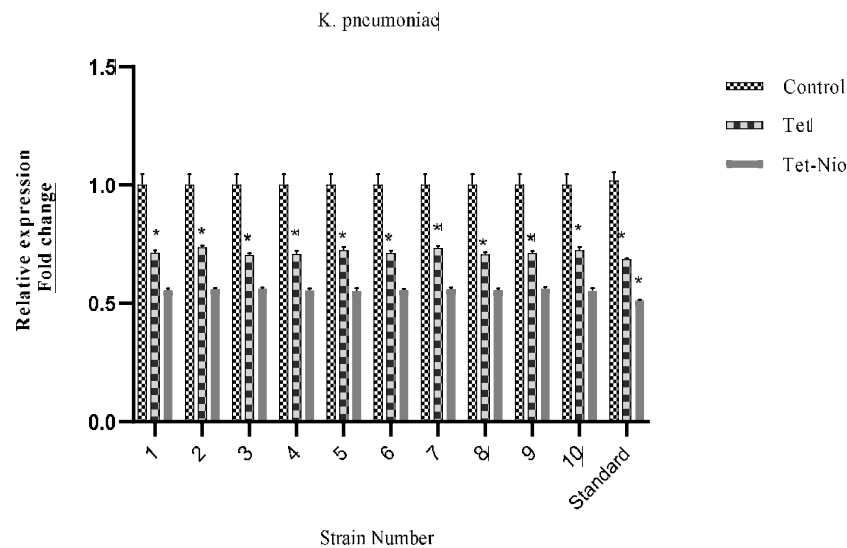
آنالیز واریانس یک‌طرفه، * اختلاف معنی دار گروه‌های تحت تیمار با دارو و نیوزوم حاوی دارو با گروه قبل از تیمار یا Before treatment به‌عنوان کنترل ($P < 0.05$). محور افقی نشان دهنده



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.

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 ($P < 0.001$) نسبت به ژن مرجع داشته است که این کاهش بیان ژن *mrkA* در سویه‌های تیمار شده با Tet-Nio بیشتر به چشم می‌خورد (نمودار ۴).

آنالیز واریانس یک‌طرفه، * اختلاف معنی‌دار گروه‌های تحت تیمار با دارو و نیوزوم حاوی دارو با گروه قبل از تیمار یا Before treatment به‌عنوان کنترل ($P < 0.05$). 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-



نمودار ۴- 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 ($P < 0.05$)

به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند (۲۳). بر خلاف مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارثی، تحمل آنتی‌بیوتیکی مرتبط با بیوفیلیم 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 بیوفیلیم از اهمیت بالایی برخوردار است و هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر Tet-Nio به عنوان یک ساختار درمانی جدید برای مقابله با بیوفیلیم این پاتوژن بیمارستانی بود.

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. بیوفیلیم این باکتری می‌تواند موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری شود (۱۴). رشد در یک بیوفیلیم با ایجاد دفاع در برابر چندین مکانیسم پاک‌سازی، نقش مهمی در طول عفونت ایفاء می‌کند. ماتریکس بیوفیلیم می‌تواند دسترسی انواع خاصی از دفاع‌های ایمنی مانند ماکروفاژها را که نفوذ ناقص به ماتریکس بیوفیلیم را نشان می‌دهند، مختل کند (۲۲). علاوه بر این، سلول‌های بیوفیلیم افزایش تحمل نسبت

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 و MBEC) 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 هم‌چنین 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 سویه‌های 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).

در مطالعه حاضر، آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نانوحامل‌های نیوزومی سنتز شده کپسوله شد. وجود Tween60 و Span60 در ساختار نیوزوم‌های سنتز شده باعث ایجاد پایداری و افزایش راندمان به‌دام افتادن دارو می‌شود (۲۵). اندازه ذرات یکی از ویژگی‌های قابل توجه در کارایی 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

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 هیچ گونه تعارض منافی نداشت.

حامی مالی: این مطالعه هیچ بودجه ای 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

- جمع آوری داده ها: الهام بازرگان

-تجزیه و تحلیل داده ها: الهام سیاسی

-نظارت: الهام سیاسی

-مدیریت پروژه: فاطمه اشرفی

-نگارش - پیشنهاد نویسی اصلی: الهام بازرگان

-نگارش - بررسی و ویرایش: فاطمه اشرفی

با توجه به محدودیت های پیش رو از لحاظ تعداد نمونه های محدود باکتریایی، در دسترس نبودن ابزارها و تکنیک های به روز آزمایشگاهی و محدودیت زمانی برای انجام پژوهش، پیشنهاد می شود تکنیک های بیشتری برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی نانوحامل سنتز شده اتخاذ شود و همچنین اثرات این نانوحامل ها در شرایط *in vivo* و بالینی نیز بررسی گردد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، نیوزوم های حاوی تتراسایکلین (Tet-Nio) ساخته شدند و از لحاظ مورفولوژیکی ساختار آن ها 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 رهائش کنترل شده دارو در باکتری های کلبسیلا پنومونیه شد. نفوذ Tet-Nio به سلول های باکتریایی به طور قابل توجهی بیان ژن مربوط به بیوفیلیم را در جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه مهار کرد. بنابراین، این نانو ساختارها می توانند عفونت های 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 آن ها برای مقابله با عفونت های بیمارستانی استفاده کرد.

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.

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, Meccas 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. Karbalaieheidar 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 Allah NH, et al. Nanotechnology as a promising approach to combat multidrug resistant bacteria: A comprehensive review and future perspectives. *Biomedicines* 2023; 11(2): 413.

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.

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.

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

Elham Bazargan¹, Fatemeh Ashrafi², Elham Siasi Torbati³

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 $75.31\% \pm 1.48\%$, and tetracycline drug release percentage in 48 hours equal to $45.34\% \pm 1.15\%$ 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