



## فرمولاسیون و سنتز نانویوزوم حاوی ناپروکسن: بررسی اثرات ضدبیکروبی و ضدبیوفیلمی آن بر روی سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورثوس و آنالیز بیان ژن بیوفیلم: یک مطالعه تجربی

شمیم اشکندری: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سروناز فلسفی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سه‌مامه محبی: گروه زیست فناوری، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی آمل، تهران، ایران

امیر میرزاچایی: گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

نداموسوی نیری: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول)  
n.mousavi@iautmu.ac.ir

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

نانویوزوم،

ناپروکسن،

ضدبیکروبی،

ضدبیوفیلمی،

یک ژن *icaB*

**زمینه و هدف:** یکی از سیستم‌های دارو رسانی هدفمند نانویوزوم‌ها می‌باشد که اخیراً توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. هدف از این مطالعه، سنتز نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن، بررسی اثرات ضدبیکروبی و ضدبیوفیلمی آن و آنالیز بیان ژن بیوفیلم *icaB* می‌باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، فرمولا سیون‌های مختلف نانویوزوم‌های انکپسوله شده با ناپروکسن سنتز گردید. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانویوزوم‌های سنتز شده شامل میزان درصد انکپسولا سیون، میزان رهایش دارو، اندازه و شکل ظاهری مورد بررسی قرار گرفت. اثرات ضدبیکروبی و ضدبیوفیلمی نانویوزوم‌های سنتز شده به ترتیب توسعه روش میکرودایلوشن و میکروتیپلیت انجام شد. در انتها میزان بیان ژن بیوفیلم *icaB* توسط روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد فرمولا سیون بهینه (نسبت لیپید به دارو ۱۰ و نسبت سورفتانت به کلاسترول ۲) دارای اندازه میانگین ۱۲۵/۳ نانومتر، کروی شکل و درصد انکپسولا سیون ۶۶/۸۴٪ بود. هم چنین نتایج نشان داد که میزان رهایش ناپروکسن از نانویوزوم حاوی دارو و ناپروکسن آزاد به ترتیب برابر یا ۶۷/۶٪ و ۱۰۰٪ در مدت زمان ۲۲ ساعت بود. نتایج نشان داد که نانویوزوم حاوی ناپروکسن دارای اثرات ضدبیکروبی و ضدبیوفیلمی معنادارتری نسبت به داروی آزاد بود ( $p < 0.05$ ) و بطور معنادارتری میزان بیان ژن بیوفیلم *icaB* را کاهش داد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج، نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن دارای اثرات ضدبیکروبی و ضدبیوفیلمی معنادارتری نسبت به ناپروکسن آزاد می‌باشد. بنابراین می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر از نانویوزوم‌ها به عنوان یک سیستم دارو رسانی هدفمند جهت اهداف درمانی ضدبیکروبی استفاده نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

#### شیوه استناد به این مقاله:

Ashkezari S, Falsafi S, Mohebbi S, Mirzaie A, Mousavi-Niri N. Formulation and preparation of naproxen loaded nanoniosomes: Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm effects on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and analysis of biofilm gene expression: An Experimental Study. Razi J Med Sci. 2023;30(3): 229-243.

\* انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Formulation and preparation of naproxen loaded nanoniosomes: Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm effects on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and analysis of biofilm gene expression: An Experimental Study

**Shamim Ashkezari:** Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Sarvenaz Falsafi:** Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Sohameh Mohebbi:** Department of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Ale-Taha Institute of higher education, Tehran, Iran

**Amir Mirzaie:** Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

 **Neda Mousavi-Niri:** Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran, (\* Corresponding Author) n.mousavi@iautmu.ac.ir

### Abstract

**Background & Aims:** *Staphylococcus aureus* is one of the human pathogens that causes a wide range of diseases such as endocarditis, blood, bone, skin and soft tissue infections (1). One of the resistant strains of this bacterium is methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA), which has been reported as a serious risk by the Centers for Disease Control and Prevention. One of the pathogenic mechanisms and antibiotic resistance of this bacterium is the formation of biofilm, which causes this bacterium to bind to different surfaces (2). Biofilm-forming strains have become resistant to many antibiotics, so that biofilm-forming strains form extracellular matrices that are immune to the immune system and antibiotics. Various genes are involved in biofilm production, one of which is the *icaB* gene, which plays a key role in the production of poly N-acetyl glucose amine and biofilm production. The design of new antimicrobial drugs for the treatment of this bacterium is important, so finding a suitable treatment option for the treatment of infections caused by this bacterium is one of the challenges of researchers (3). Recent advances in nanotechnology have suggested alternative solutions, such as drug delivery systems, that increase drug specificity and efficiency (4). One of these drug delivery systems is nanosystems, which are composed of bilayer nonionic surfactants. Due to the importance of nanosystems, the aim of this study was to synthesize nanoparticles containing naproxen, to investigate their physicochemical properties and their antimicrobial and antifouling effects against *Staphylococcus aureus* strains.

**Methods:** Nanosomes containing naproxen were synthesized by thin layer hydration method. The confinement efficiency is indicative of the drug encapsulated in the nanosystem structure relative to the drug used. For this purpose, the nanonosomal formulation was first centrifuged at 4 ° C at 14000 g for 45 minutes. The nanosystem containing the drug precipitates and the free drug remains in the supernatant. The absorbance of the supernatant sample at 270 nm was read by a spectrophotometer and the amount of free drug was calculated from the initial value. The Physico-chemical characteristics of prepared nanoniosome encapsulated naproxen was determined using scanning electron microscopy (SEM), Dynamic light scattering (DLS). The *in vitro* drug release study was done using dialysis bag (6). The *Staphylococcus aureus* strains were recovered from 100 clinical samples and their antibiotic resistance patterns were studied using disk diffusion method. The antibacterial activity of nanoniosome loaded naproxen and free naproxen were investigated using well diffusion and micro-dilution methods (7). The *icaB* biofilm gene expression analysis in *S. aureus* isolates which are treated with nanoniosome loaded naproxen and free naproxen were examined using Real Time PCR methods (8). Draw diagrams and Statistical analysis was performed by GraphPad Prism software version 7 and SPSS version 23, and one-way analysis of variance was used for statistical analysis and p <0.05 was considered significant.

### Keywords

Nanoniosomes,  
Naproxen,  
Antimicrobials,  
Anti-biofilm,  
*icaB* gene expression

Received: 08/04/2023

Published: 10/06/2023

**Results:** In this study, using different molar ratios of surfactant, cholesterol and drug, different formulations of nanosystems containing naproxen were synthesized. The optimal niosome size synthesis was measured by DLS method. The results of electron microscopy (SEM) show that the synthesized nanonosomes have a spherical structure. In this study, the dialysis bag method was used to evaluate the drug release pattern. Figure 2 shows the pattern of naproxen release from nanosystems and free naproxen over 72 hours.

Out of 100 clinical specimens, 15 specimens of *Staphylococcus aureus* were isolated and identified using microbiological methods. The results of antibiotic resistance profile test showed that out of 15 strains, 10 strains were methicillin resistant (MRSA).

The antibacterial activity of nanoniosome encapsulated naproxen and free naproxen showed that the MIC was reduced by 2 to 4 times. The results of the well diffusion method showed that nanoniosomes containing naproxen had more significant antimicrobial power than free naproxen, so that the diameter of the growth inhibition zone increased with increasing nanosystem concentration. Real-Time PCR was used to evaluate the effect of nanoniosoms containing naproxen and free naproxen on *icaB* biofilm gene expression in *Staphylococcus aureus* strains. Also, after treating *Staphylococcus aureus* strains with naproxen-containing nanosystem sub-inhibitory concentration, it was shown that the expression of *icaB* gene was significantly reduced compared to the *16S rRNA* reference gene ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In this study, naproxen was encapsulated as a drug compound in the nanoniosome structure and its physical and chemical properties including size, morphology, drug enclosure percentage and drug release were studied. The results of this study showed that the synthesized nanoniosome in the optimal formulation had a spherical shape, the average size was 125.3 nm with a confinement percentage of 66.84%. Drug release results also showed that naproxen in the formulated form in nanonosomes has a much slower release pattern than free naproxen, which is a suitable feature of a drug delivery system. The results of the antimicrobial test showed that naproxen-containing nanoniosome had more significant antimicrobial effects than free naproxen compared to free naproxen, reducing the MIC by 2 to 4 times. One of the antimicrobial mechanisms of nanoniosome containing naproxen is the fusion of nanoniosome with bacterial cell membranes, which can deliberately release the drug into the cytoplasm of the cell and cause bacterial cell death (10). The results of this study showed that nanoparticles containing naproxen have more significant anti-biofilm effects than free naproxen compared to free naproxen and can significantly reduce the expression of biofilm gene (11). One of the reasons for the anti-biofilm effects of naproxen-containing nanosystems is the greater penetration of naproxen-containing nanosystems into the biofilm structure, which can cause the death of bacteria, a decrease in the number of bacteria, and the conversion of biofilms into planktonic cells (12).

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Ashkezari S, Falsafi S, Mohebbi S, Mirzaie A, Mousavi-Niri N. Formulation and preparation of naproxen loaded nanoniosomes: Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm effects on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and analysis of biofilm gene expression: An Experimental Study. Razi J Med Sci. 2023;30(3): 229-243.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

و ترومای بکار می‌رود. برخی از مطالعات، اثرات ضدمیکروبی معنادار ناپروکسن را علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد (۱۲). هم‌چنان توانایی مهار بیوفیلم توسط ناپروکسن و سایر داروهای ضدالتهابی نیز گزارش شده است (۱۳). مکانیسم عملکرد ضدمیکروبی ناپروکسن، تاثیر آنها بر تمامیت ساختار غشای سلولی می‌باشد، بطوريکه خروج یون پتاسیم درون سلولی و تغییر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سطحی باکتری‌ها را نشان داده شده است (۱۴). هم‌چنان مهار سنتز DNA، مهار همانندسازی و مهار ترمیم غشای باکتری نیز گزارش شده است (۱۵). یکی از راه‌کارهای جایگزین در مانی، استفاده از سیستم‌های دارورسانی به منظور افزایش بازدهی داروهای موجود است (۱۶). اخیراً پیشرفت‌ها در نانوتکنولوژی راهکارهای جایگزین مانند سیستم‌های دارورسانی را پیشنهاد داده است که اختصاصیت و بازدهی داروها را افزایش می‌دهند. یکی از این سیستم‌های دارورسانی، نانونیوزوم‌ها می‌باشند که از سورفتانت‌های غیریونی بصورت دولایه تشکیل شده‌اند (۱۷). آنها نسبت به سایر سیستم‌های دارورسانی پایدارتر، تجزیه پذیر، سازگار زیستی، غیر ایمنی‌زا و دارای سمیت سلولی پایین هستند و نیاز به شرایط خاص برای نگه داری نمی‌باشند (۱۸). هم‌چنان خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانونیوزوم‌ها و بازدهی آنها با استفاده از تغییر مواد تشکیل دهنده آن می‌تواند تغییر داده شود تا به سیستم دارورسانی دلخواه تبدیل شود (۱۹). با توجه به اهمیت نانونیوزوم‌ها، هدف از این مطالعه، سنتز نانونیوزوم‌های حاوی ناپروکسن، بررسی خصوصیات فیزیکی-شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی آن علیه سویه‌های استافیلوکوکوس /ورئوس می‌باشد.

## روش کار

**تهییه نانونیوزوم‌ها به روش هیدراسیون لای تازگ:** برای تهییه نمونه‌ها، ابتدا مقادیر مشخص از کلسترول، اسپن ۶۰ و تؤین ۶۰ در مخلوط حلال‌های کلروفرم و متانول (نسبت ۲ به ۱) حل شد. سپس کاملاً محلول حاصل هم زده شد تا اجزا به طور کامل حل شوند. محلول حاصل در بالن مخصوص روتاری ریخته و

## مقدمه

/استافیلوکوکوس /ورئوس یکی از پاتوژن‌های انسانی می‌باشد که طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند عفونت‌های اندوکاردیت، عفونت خون، استخوان، پوست و بافت نرم را ایجاد می‌کند (۱). مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک باعث بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک /استافیلوکوکوس /ورئوس شده است (۲). یکی از انواع سویه‌های مقاوم این باکتری، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین /استافیلوکوکوس /ورئوس (MRSA) می‌باشد که به عنوان خطر جدی توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها گزارش شده است، بطوريکه در سال ۲۰۱۷ تا ۲۰۲۰ مورد مرگ از میان ۳۲۳۷۰۰ بیمار گزارش شده است (۳). هم‌چنان در میان بیماران سوختگی، ۵۵٪ عفونت /استافیلوکوکوس /ورئوس مقاوم به متی‌سیلین گزارش شده است (۴). یکی از مکانیسم‌های بیماری‌زا و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، تشکیل بیوفیلم می‌باشد که باعث اتصال این باکتری به سطوح مختلف می‌شود (۵). هم‌چنان مطالعات In vivo نشان می‌دهد که تشکیل بیوفیلم در این باکتری باعث تاخیر بهبود بیماری می‌شود و عفونت مزمن ایجاد می‌شود (۶). سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند، بطوريکه سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم ماتریکس خارج سلولی تشکیل می‌دهند که از سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها در امان می‌مانند (۷). این ماتریکس‌های خارج سلولی مانع از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل ساختار سلولی شده و بازده عملکردی آنتی‌بیوتیک را کاهش می‌دهند (۸). ژنهای مختلفی در زمینه تولید بیوفیلم نقش دارند که یکی از این ژنهای درگیر در تشکیل بیوفیلم، ژن *icaB* می‌باشد که نقش اساسی در تولید پلی-N-استیل گلوكر آمین و تولید بیوفیلم دارد (۹).

طراحی داروهای ضدمیکروبی جدید برای درمان این باکتری حائز اهمیت می‌باشد، بطوريکه یافتن گزینه درمانی مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، یکی از چالش‌های محققان می‌باشد (۱۰). در سال‌های اخیر، برخی از مطالعات اثرات ضدالتهابی داروهای غیر از آنتی‌بیوتیک شامل داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی مانند ناپروکسن را برای درمان نشان داده‌اند (۱۱). عموماً این داروها اغلب برای درمان آرتربیت

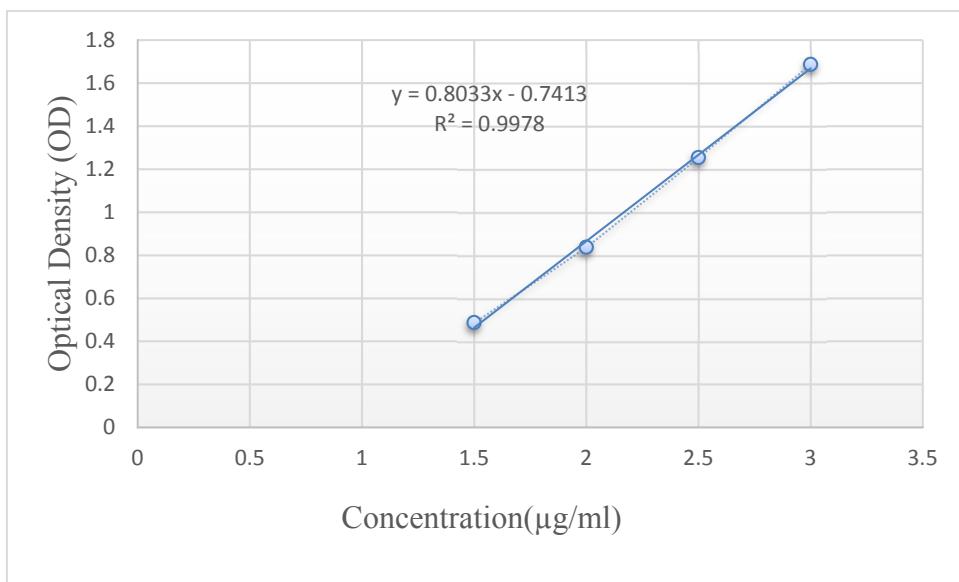
۱۰۰×(میزان دارو اولیه)/(میزان دارو اولیه) هم چنین فرمولاسیون های مختلف نانویوزوم بر اساس غلظت مولی Span 60/Tween 60 تهیه گردید و اندازه نانویوزوم های سنتز شده و میزان درصد انکپسولاسیون نیز انجام گرفت.

**بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانویوزوم های سنتز شده:** به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژی نانویوزوم سنتز شده بارگذاری شده با ناپروکسن از روش میکرو سکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده گردید (پژوهشکده نفت دانشگاه تهران). هم چنین به منظور تعیین سایز از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد. جهت اندازه‌گیری قطر دینامیکی نانوذرات (سایز) از دستگاه زتا سایزر (DLS) استفاده شده است. جهت بررسی سایز ذرات در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد از این دستگاه مجهز به لیزر سبز با طول موج ۶۳۳ نانومتر به روش تفرق دینامیک نور استفاده گردید. اندازه نانوذره در واقع میانگین قطر ذرات است که به صورت Z-Average، SEM، سوسپانسیون نانوذره تهیه شده در آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شده، یک قطره از نمونه بر روی یک فیلم هادی نظری آلومینیوم پخش شده و در دمای اتاق خشک گردید (۲۲).

تحت شرایط مورد نظر (دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰ rpm) تحت خلا قرار داده می‌شود تا حلal کاملاً تبخیر شود. سپس در مرحله هیدراسیون، به فیلم لیپیدی تهیه شده، مقدار ۱۰ سی سی از بافر فسفات حاوی ۱ میلی گرم ناپروکسن (1 mg/mL) در دمای بالای انتقال فاز (۶۰ درجه سانتی گراد) اضافه شد و با استفاده از روتاری با سرعت ۱۲۰ rpm به مدت نیم ساعت برای هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از اتمام مراحل هیدراسیون، به منظور کاهش اندازه ذرهای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۲۰).

**بررسی کارایی محصورسازی ناپروکسن در نانویوزوم:** کارایی محصورسازی بیانگر نسبت به داروی محصور شده در ساختار نانویوزوم نسبت به داروی اولیه مورد استفاده است. بدین منظور، ابتدا فرمولاسیون نانویوزومی در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۴۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار داده شد. نانویوزوم حاوی دارو رسوب کرده و داروی آزاد در سوپرناتانت باقی می‌ماند. جذب نمونه سوپرناتانت در طول موج ۲۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانش شد (شکل ۱) و مقدار داروی آزاد محسوبه شده و از مقدار اولیه کم و از روی آن میزان درصد کارایی محصورسازی محاسبه شد (۲۱):

میزان داروی آزاد- = میزان درصد محصورسازی



شکل ۱- نمودار استاندارد ناپروکسن

مقاآمت آنتی بیوتیکی سویه‌های استافیلکوکوس اورئوس توسط روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گرفت (۲۵). ابتدا غلظت نیم مک فارلنند از تمامی سویه‌ها تهیه شد و در محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت داده شد و میزان حساسیت سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های آمپیسیلین ( $30\text{ }\mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10\text{ }\mu\text{g}$ )، آمیکاسین ( $30\text{ }\mu\text{g}$ )، تتراسایکلین ( $10\text{ }\mu\text{g}$ )، سفوكسی سیتین ( $30\text{ }\mu\text{g}$ )، سیپروفلوکسازین ( $5\text{ }\mu\text{g}$ )، لوفولوکسازین ( $30\text{ }\mu\text{g}$ ) و تری متیپریم سولفاماتکسازول ( $30\text{ }\mu\text{g}$ ) (پادتن طب-ایران) بررسی شد.

#### بررسی اثرات خدمیکروبی

۱- روش میکرودایلوشن: به منظور بررسی اثرات خدمیکروبی نانونیوزوم‌های حاوی ناپروکسن از روش میکرودایلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای بر طبق استاندارد CLSI استفاده شد. به این منظور ابتدا سویه‌های استافیلکوکوس اورئوس جدا سازی شده در محیط کشت مولر-هینتون براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس غلظت‌های مختلف از نانونیوزوم‌های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد شامل  $3/125$  تا  $100$  میکرولیتر در میلی لیتر تهیه شد. به دنبال آن،  $90$  میکرولیتر محیط کشت مولر-هینتون براث (MHB) و  $5$  میکرولیتر از کشت میکروبی و  $100$  میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانونیوزوم‌های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد ( $100$  میکرولیتر در میلی لیتر تا  $3/125$  میکرولیتر در میلی لیتر) در داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. بعد از انکوباسیون در مدت زمان ۲۴ ساعت، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. در واقع، مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی رشد باکتری در نظر گرفته شد (۲۶). این سه تست به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت.

۲- روش انتشار چاهک: به منظور بررسی حساسیت سویه‌های جدا سازی شده استافیلکوکوس اورئوس، از روش انتشار چاهک استفاده شد. ابتدا سویه‌های جدا سازی شده را در لوله حاوی محیط نوترینت براث

بررسی رهایش دارو: بررسی رهایش دارو به صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین صورت که در کیسه دیالیز مقدار ۲ میلی لیتر از نانو حامل نیوزومی بارگذاری شده با دارو و همچنین دارو آزاد (به صورت جداگانه) قرار داده می‌شود. هر یک از کیسه‌ها به صورت معلق در مزور محتوی  $50$  میلی لیتر PBS در دمای  $37$  درجه سانتی گراد قرار داده می‌شوند. مزورهای دارای کیسه محتوی نانو حامل نیوزوم حاوی دارو و محلول دارو بر روی همزن قرار داده می‌شوند. در ساعت های مختلف از مزور نمونه گیری انجام می‌شود، بدین صورت که مقدار ۱ میلی لیتر از PBS حاوی کیسه دیالیز برداشته و  $1$  میلی لیتر PBS با دمای  $37$  درجه جایگزین آن می‌شود. عمل نمونه گیری تا  $72$  ساعت در فواصل زمانی مشخص ( $1, 2, 4, 8, 24, 48$  و  $72$  ساعت) انجام می‌شود. در پایان، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر در طول موج  $270$  نانومتر به روش اسپکتروفوتومتر (شکل ۱) نمودار درصد آزاد سازی تجمعی ناپروکسن از نانونیوزوم در طی مدت زمان  $72$  ساعت رسم شد (۲۳).

#### جadasازی و شناسایی سویه‌های

۱- استافیلکوکوس اورئوس: در این مطالعه، تعداد  $100$  نمونه مشکوک به استافیلکوکوس اورئوس از بیماران مراجعه کننده بیمارستان‌های مختلف (امام خمینی، پارس و شهدای یافت آباد) شامل ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی، خون و خلط جمع آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبشناسی دانشگاه آزاد واحد تهران پژوهشکی روی محیط‌های بلاد آگار (مرک-آلمان) و مانیتول سالت آگار (مرک-آلمان) کشت داده شدند و در  $37$  درجه سانتی گراد به مدت  $24$  ساعت نگهداری شدند. بعد از تهیه لام و مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت، تست‌های بیوشمیایی معمول رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگلаз، DNase، تحمیر مانیتول کشت برد پارکر (Baird parker agar) و تخمیر مانیتول انجام شد (۲۴). در این مطالعه از سویه استاندارد استافیلکوکوس اورئوس ATCC 25923 استفاده گردید.

#### بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی: الگوی

سویه‌های تیمار نشده با نانویوزوم حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد بودند (۲۷).

**بررسی میزان بیان ژن بیوفیلم:** به منظور بررسی میزان تاثیر نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن بر روی بیان ژن بیوفیلم *icaB* و مقایسه آن با ناپروکسن آزاد در سویه‌های استافیلولکوس اورئوس، از روش quantitative Real Time PCR استفاده شد. ابتدا سویه‌های استافیلولکوس اورئوس با غلظت زیر حد مهارکنندگی (SubMIC) (نانویوزوم های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد تیمار شدند و به دنبال آن، استخراج RNA از سویه‌های تیمار شده با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، امریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، امریکا) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مستر میکس شامل ۱ میکرولیتر از ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. هم چنین ژن *16S rRNA* به عنوان ژن خانه دار (کنترل داخلی) مورد استفاده قرار گرفت. در انتهای بیان نسبی ژن *icaB* توسط روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه گردید. توالی پرایمرهای رفت و برگشت (Forward and reverse) ژن هدف *icaB* به صورت ۵'-ATACCGGCGACTGGGTTTAT-3' و ۵'-TTGCAAATCGTGGGTATGTGT-3' بود. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن مرجع *16S rRNA* به صورت ۵'-CGTCTGCCCTATCAACTTCG-3' و ۵'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشت است (۲۸).

**آنالیز آماری:** رسم نمودارها تو سط نرم افزار آماری GraphPad Prism نسخه ۷ و آنالیزهای آماری توسط SPSS نسخه 23 انجام گرفت و از آزمون آماری آنالیز

کشت داده و رسوب میکروب توسط سانتریفیوژ جدا شد و با استفاده از سرم فیزیولوژی سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. سپس بعد از فروبردن سواپ استریل در سوسپانسیون میکروبی، اضافه محلول را با فشار دادن سواپ به کنار لوله گرفته و سپس در سطح پلیت حاوی مولر هینتون آگار، ۳ بار در حالت زاویه ۶۰ درجه، از گونه های باکتریایی مورد نظر کشته داده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۲۵-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بطور جدا گانه مستقیماً بر روی چاهک هایی که بر روی محیط کشته ایجاد شده بود، تلقیح شد. پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از آن قطره هاله عدم رشد اندازه گیری شد.

**بررسی اثرات ضدبیوفیلمی:** برای ارزیابی اثرات ضدبیوفیلمی نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن و مقایسه آن با ناپروکسن آزاد، از روش رنگ سنجی میکروتیترپلیت با استفاده از کریستال ویوله در پلیت های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. سویه های استافیلولکوس اورئوس در پلیت های ۹۶ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشته داده شدند. به دنبال آن، تمامی چاهکها سه بار با سرم فیزیولوژی (PBS) شستشو داده شدند تا سویه های متصل نشده از کف چاهک ها شسته شوند. سویه های استافیلولکوس اورئوس سپس با مقادیر زیر حد مهارکنندگی (Sub-MIC) نانویوزوم های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شدند. سپس کلیه چاهک ها مجدداً با PBS سه بار شسته و به مدت ۱۵ دقیقه با متابول ثابت شدند. پلیت های ۹۶ خانه ای به مدت ۳۰ دقیقه در هوا خشک شدند و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱/۰ درصد کریستال ویوله اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو با آب مقطر، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام شد. مقادیر میانگین جذب هر نمونه محاسبه و با میانگین مقادیر کنترل مقایسه شد. نمونه کنترل در این تست،

(شکل ۲). نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان می‌دهد که نانویوزوم‌های سنتز شده دارای ساختار کروی می‌باشند (شکل ۲).

**بررسی الگوی آزاد سازی دارو:** در این مطالعه، به منظور بررسی الگوی آزادسازی دارو از روش کیسه دیالیز بهره گرفته شد. در شکل ۳ الگوی آزادسازی ناپروکسن از نانویوزوم و ناپروکسن آزاد در مدت زمان ۷۲ ساعت نشان داده شده است. به منظور شبیه سازی محیط آزادسازی به شرایط *In vivo* از محیط آزادسازی PBS برای فاز گیرنده استفاده شد. همانطور که در نمودار مشخص است آزادسازی ناپروکسن از نانویوزوم حاوی ناپروکسن آهسته رهش بوده، بطوریکه ناپروکسن در مدت زمان ۴ ساعت به ترتیب به میزان ۱۷/۷۱٪ و ۲۱/۲۰٪ در صد از نانویوزوم و ناپروکسن آزاد، آزاد سازی

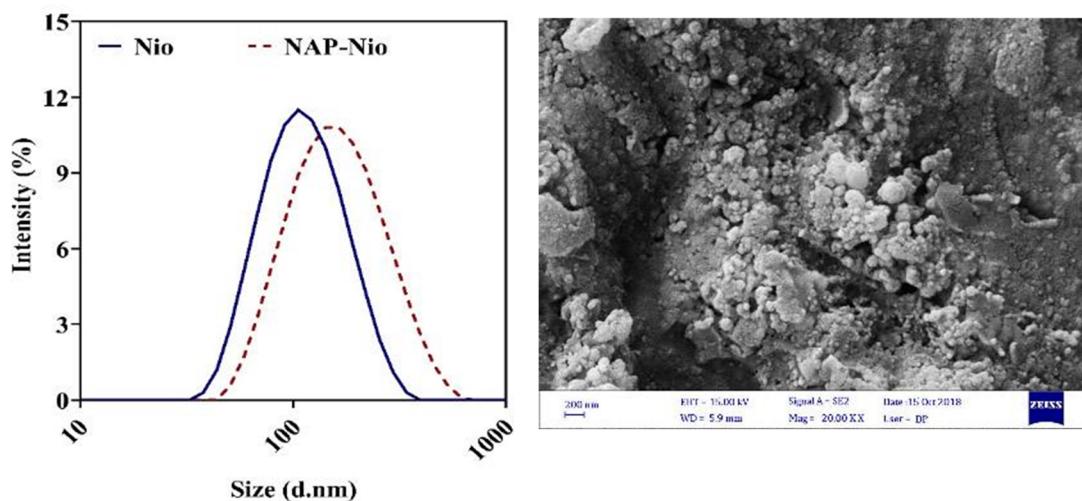
واریانس یک طرفه جهت تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید و  $p < 0.05$  معنادار درنظر گرفته شد.

## یافته‌ها

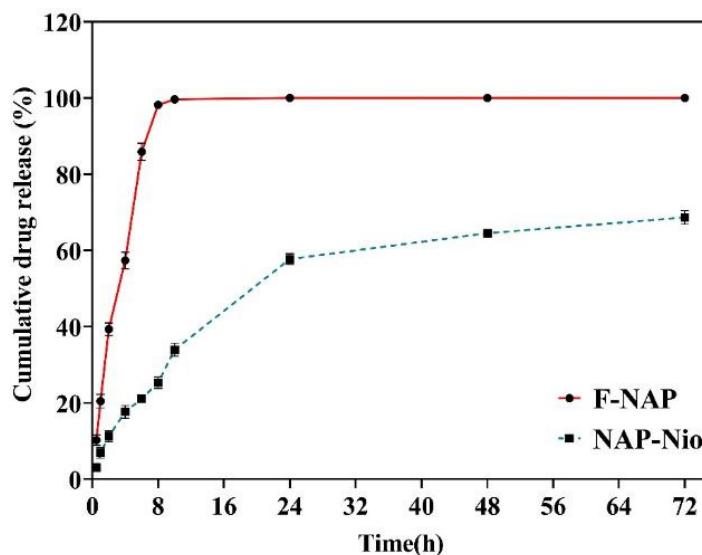
**فرمولاسیون و سنتز نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن:** در این مطالعه، با اسفاده از نسبت‌های مولی مختلف سورفکتانت، کلسترونول و دارو، فرمولاسیون‌های مختلف نانویوزوم حاوی ناپروکسن سنتز گردید (جدول ۱) که از میان فرمولاسیون‌های مختلف، فرمولاسیون F2 با میانگین اندازه  $125/3$  نانومتر و در صد محصور سازی  $66/84$  در صد به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب گردید. اندازه‌گیری سایز نیوزوم بهینه سنتز شده توسط روش DLS انجام گرفت

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف نانویوزوم حاوی ناپروکسن و خصوصیات آنها.

Run	Levels of independent variables		Dependent variables		
	Lipid/Drug, mol ratio	Surfactant: Cholesterol, mol ratio	Average size nm	PDI	Entrapment % (EE/Efficiency)
F1	30	1	197.2	0.342	75.66
F2	10	2	125.3	0.242	66.84
F3	30	2	250.4	0.274	70.93
F4	10	1	149.8	0.240	59.32
F5	10	0.5	220.5	0.292	35.42
F6	30	0.5	293.8	0.432	64.58



شکل ۲- بررسی خصوصیات مورفولوژی و اندازه نانویوزوم‌های سنتز شده. A: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن، B: سایز نانویوزوم‌های سنتز شده توسط روش DLS.



شکل ۳- الگوی آزادسازی ناپروکسن از نانویوزوم بارگذاری شده با ناپروکسن و ناپروکسن آزاد. خط آبی: نانویوزوم حاوی ناپروکسن، خط قرمز: ناپروکسن آزاد.

جدول ۲- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده.

سویه	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	MRSA
S2, S6, S8, S9, S10	CIP, CEF, TET	+
S14, S19, S23, S25, S26	CIP, GEN, AMP	-
S30, S34, S39, S46, S49	AMI, CEF, AMP, TET	+

AMP: آمپی سیلین، GEN: جنتامایسین، TET: تتراسایکلین، CIP: سفوكسی سیتین، CEF: سیپروفلوکساسین

آنٹی بیوتیک سیپروفلوکسا سین (۶۶) و سفوكسی تین (۶۶٪) مشاهده شد.

شده است. ناپروکسن آزاد در مدت زمان ۸ ساعت، ۱۰۰ درصد آزاد شده است در صورتیکه در مدت زمان ۷۲ ساعت تنها ۶۸/۶۷ درصد از دارو آزاد شده است.

### بررسی اثرات ضدمیکروبی

۱- روش میکرودایلوشن: در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی نانویوزوم های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد از روش میکرودایلوشن به منظور تعیین کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) (MIC) استفاده شد. در این، روش سویه های باکتریایی استافیلیوکوکوس / اورئوس تحت غلظت های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانویوزوم های حاوی ناپروکسن نسبت به ناپروکسن آزاد دارای اثرات ضدمیکروبی معناداری بودند، بطوريکه میزان MIC بین ۲ تا ۴ برابر کاهش یافته بود و نانویوزوم حاوی ناپروکسن در کمترین غلظت ۶/۲۵

جدا سازی و پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلیوکوکوس اورئوس: از میان ۱۰۰ نمونه بالینی با استفاده از روش های میکروب شناختی و تعداد ۱۵ نمونه استافیلیوکوکوس / اورئوس جداسازی و شناسایی گردید. نتایج تشخیص میکروبی نشان داد که سویه های جداسازی شده گرم مثبت، کاتالاز کثیت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت، مانیتول مثبت بودند. نتایج تست بررسی پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که از میان ۱۵ سویه، ۱۰ سویه مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند (جدول ۲). هم چنین از میان سویه های MRSA، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به

اورئوس در غلظت‌های مورد استفاده در شکل ۴ و جدول ۳ نشان داده شده است.

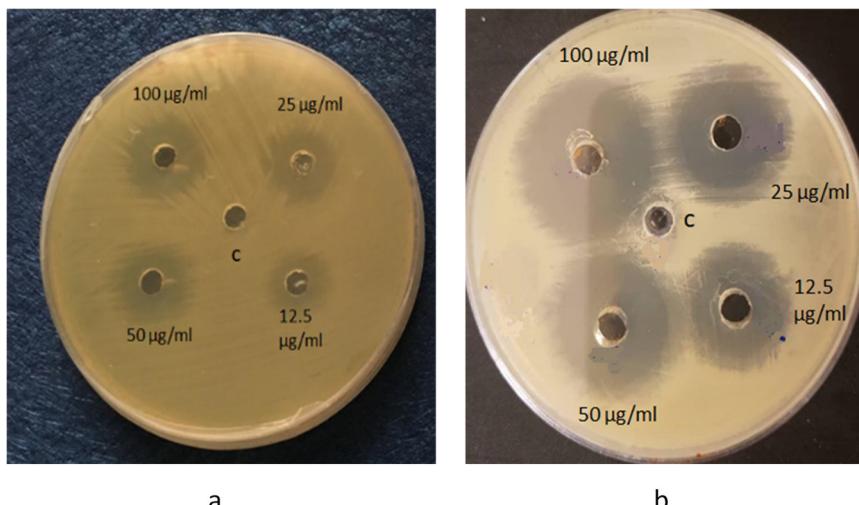
**بررسی اثرات خدبيوفیلمی:** به منظور بررسی اثرات خدبيوفیلمی نانونیوزوم‌های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد، از روش میکروتیترپلیت استفاده شد، بطوریکه سویه‌های تولید کننده بیوفیلم/ستافیلوكوکوس اورئوس با غلظت زیر حد مهار کنندگی تیمار شدند. نتایج نشان داد که پس از تیمار سویه‌های /ستافیلوكوکوس

میکروگرم در میلی لیتر بر روی ایزوله‌ها تاثیرگذار بودند (جدول ۲).

**۲- روش انت شار چاهک:** نتایج مربوط به روش انت شار چاهک نشان داد که نانونیوزوم حاوی ناپروکسن در مقایسه با ناپروکسن آزاد دارای قدرت میکروب کشی معناداریتری بوده بطوریکه طول قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت نانونیوزوم افزایش می یا بد. تغییرات میانگین هاله عدم رشد در سویه‌های /ستافیلوكوکوس

**جدول ۳-** بررسی اثرات خدمیکروبی نانونیوزوم حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد.

ردیف	شماره سویه	MIC ناپروکسن آزاد (میکروگرم در میلی لیتر)	MIC نانونیوزوم حاوی ناپروکسن (میکروگرم در میلی لیتر)
۱	S2, S6, S8, S9	۵۰	۱۲/۵
۲	S10, S14, S19, S23, S25	۵۰	۶/۲۵
۳	S26, S30, S34	۲۵	۳/۱۲۵
۴	S39, S46, S49	۵۰	۳/۱۲۵



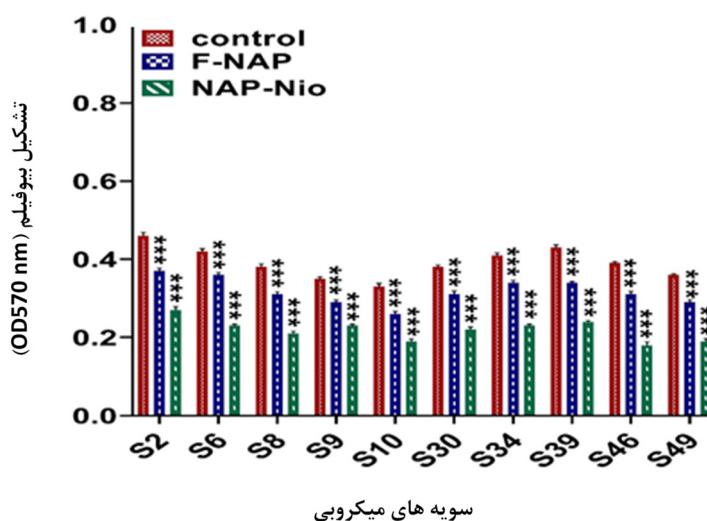
**شکل ۴-** بررسی اثرات خدمیکروبی ناپروکسن (a) و نانونیوزوم حاوی ناپروکسن (b). همانطور که مشاهده می شود با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می شود بطوریکه قطر هاله های عدم رشد نانونیوزوم حاوی ناپروکسن به مراتب بیشتر از ناپروکسن است.

**جدول ۴-** بررسی اثرات خدمیکروبی به روش انتشار چاهک.

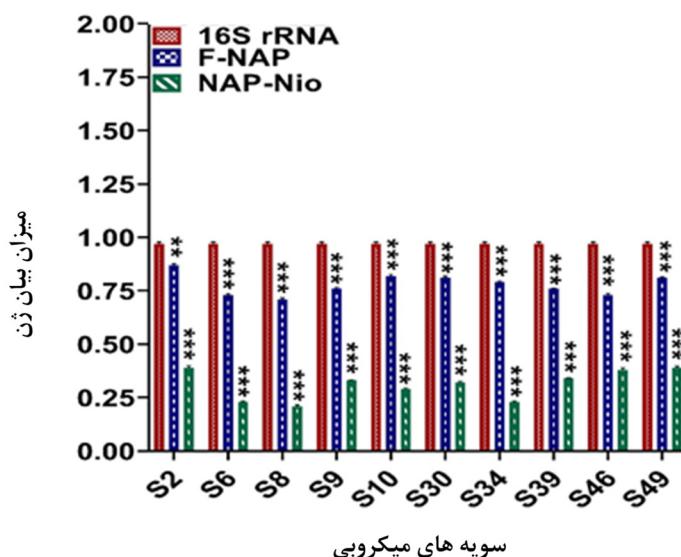
شماره سویه	نانونیوزوم حاوی ناپروکسن (قطر به میلی متر)							
	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰
S39, S14, S8, S9	۴ ± ۰/۵	۹ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۵	۱۳ ± ۰/۵	۹ ± ۰/۰	۱۳ ± ۰/۵	۱۵ ± ۰/۵	۲۲ ± ۰/۵
S10, S6, S46, S23, S34	۵ ± ۰/۵	۸ ± ۱/۰	۱۰ ± ۱/۰	۱۲ ± ۱/۰	۸ ± ۰/۵	۱۴ ± ۱/۰	۱۷ ± ۱/۰	۲۵ ± ۱/۰
S26, S30, S25	۵ ± ۱/۰	۷ ± ۱/۰	۹ ± ۱/۰	۱۱ ± ۱/۰	۷ ± ۰/۵	۱۵ ± ۱/۰	۱۹ ± ۱/۰	۲۴ ± ۱/۰
S2, S19, S49	۷ ± ۱/۰	۱۰ ± ۱/۰	۱۱ ± ۱/۰	۱۴ ± ۱/۰	۶ ± ۱/۰	۱۱ ± ۰/۵	۱۶ ± ۰/۵	۲۱ ± ۰/۵

**بررسی بیان ژن بیوفیلم:** به منظور بررسی تاثیر نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد بر روی بیان ژن بیوفیلم *icaB* در سویه‌های استافیلکوکوس، اثرات Real-Time PCR از روش اورئوس از روشن مرجع *16S rRNA* بطور معناداری کاهش یافته است. همچنین پس از تیمار سویه‌های استافیلکوکوس اورئوس با غلظت زیر حد مهارکنندگی نانویوزوم حاوی ناپروکسن نشان داد که میزان بیان ژن *icaB* نسبت به ژن مرجع *16S rRNA* بطور معناداری کاهش یافته است.

اورئوس با نانویوزوم حاوی ناپروکسن میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به گروه تیمار شده با ناپروکسن آزاد به شدت کاهش یافته (۴-۲ برابر) و ارتباط معناداری بین کاهش جذب نوری بین سویه‌های تیمار شده با نانویوزوم حاوی ناپروکسن و نمونه‌های کنترل وجود داشت ( $p < 0.05$ ) که نشان دهنده اثرات ضدبیوفیلمی معناداری نانویوزوم حاوی ناپروکسن نسبت به ناپروکسن آزاد بود (نمودار ۱).



**نمودار ۱**- اثرات ضدبیوفیلمی نانویوزوم حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد. همانظور که مشاهده می شود اثرات ضدبیوفیلمی نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن (ستون سیز) معنادارتر نسبت به ناپروکسن آزاد (ستون آبی) در مقایسه با نمونه‌های قبل از تیمار (کنترل، ستون قرمز) می باشد. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ .



**نمودار ۲**- بررسی تغییرات بیان ژن بیوفیلم *icaB* در سویه‌های استافیلکوکوس اورئوس تیمار شده با نانویوزوم حاوی ناپروکسن (ستون آبی) و ناپروکسن آزاد (ستون سیز). \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

دارورسانی می باشد. مطالعات مختلفی در زمینه فرمولاسیون ترکیبات ضدمیکروبی در نانوپلزیوم انجام گرفته است. Nidhi Shah و همکارانش ۵ فرمولا سیون نانوپلزیوم حاوی ناپروکسن را سنتز و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون نوع دوم (F2) متشکل از توئین ۲۰، توئین ۸۰ و کلسترونول دارای درصد محصورسازی ۷۴/۵۹ درصد و اندازه میانگین ۳/۸۱ میکرومتر بود. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که میزان رهایش دارو در مدت زمان ۴ ساعت ۲۷/۶۹ درصد و در مدت زمان ۸ ساعت ۵۷/۶۸ درصد بود بطوریکه داروی آزاد در مدت زمان ۸ ساعت ۱۰۰ درصد آزاد شده بود (۳۳). نتایج این مطالعه از نظر آهسته رهش بودن ناپروکسن در ساختار نانوپلزیوم مطابق با نتایج مطالعه ما بوده است. آهسته رهش بودن یکی از خصوصیات مناسب جهت اهداف دارویی می باشد، بطوریکه هم پایداری دارو حفظ می شود و در ساختار نانوپلزیوم ساختار دارو از نظر تجزیه فیزیکی محافظت می شود. Shahira F El-Menshawe و همکارانش داروی ضدالتهابی meloxicam را در نانوپلزیوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک با استفاده از اسپن ۶۰ و کلسترونول انکپسوله کردند و خصوصیات آن را بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان محصورسازی meloxicam در نانوپلزیوم ۵۵ درصد و دارای اندازه میانگین ۱۸۷/۳ نانومتر بود (۳۴). Mohamed Shafik El-Ridy و همکارانش داروی ضدالتهابی غیراستروئیدی Lornoxicam را در ساختار نانوپلزیوم انکپسوله نمودند و ساختار مورفولوژی آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوپلزیوم سنتز شده کروی و دارای اندازه میانگین ۲۹۵ تا ۲۹۸ نانومتر بود. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آزادسازی این دارو در حالت فرموله شده با نانوپلزیوم به مراتب کمتر از داروی آزاد بود. تمامی نتایج مطالعات با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد که نشان دهنده تاثیر نیوزوم در میزان رهایش آهسته دارو دارد (۳۵).

در بخش دیگر از مطالعه، اثرات ضدمیکروبی نانوپلزیوم

$p < 0.05$ ) (نمودار ۲).

## بحث

مقاومت دارویی باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج یکی از معضلات درمانی می‌باشد، بطوریکه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها تاثیر بسزایی در شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. در مان آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مقاوم به چند دارو در سالهای اخیر با چالش مواجه شده است و گزینه‌های درمانی را محدود نموده است (۲۹). یکی از باکتری‌های فرست طلب بیمارستانی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است، استافیلکوکوس /ورئوس می‌باشد، بطوریکه سویه‌های / استافیلکوکوس٪/۷۹/۶ مقاوم به متی سیلین (MRSA) تا میزان ٪/۷۹/۶ گزارش شده است و یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی این باکتری، تشکیل بیوفیلم می‌باشد که درمان را با مشکل مواجه کرده است (۳۰).

یکی از راهکارهای درمانی جهت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده از سیستم‌های دارورسانی می‌باشد بطوریکه سیستم‌های نانوپلزیوم جهت دارورسانی ترکیبات ضدمیکروبی یکی از راهکارهای امیدبخش برای افزایش اثرات داروها می‌باشد (۳۱). در سالهای اخیر استفاده از ترکیبات دارویی غیر از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مورد توجه محققان قرار گرفته است که یکی از این انواع ترکیبات، ترکیبات ضدالتهابی می‌باشد که مطالعات نشان داده است دارای اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی می‌باشند (۳۲). در این مطالعه، ناپروکسن به عنوان یک ترکیب دارویی در ساختار نانوپلزیوم انکپسوله گردید و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن شامل اندازه، مورفولوژی، درصد محصورسازی دارو و رهایش دارو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوپلزیوم‌های سنتز شده در فرمولا سیون بهینه دارای شکل کروی، اندازه میانگین ۱۲۵/۳ نانومتر با درصد محصورسازی ۶۶/۸۴ درصد بود. هم چنین نتایج رهایش دارو نشان داد که ناپروکسن در حالت فرموله شده در نانوپلزیوم به مراتب دارای الگوی رهایش آهسته‌تر نسبت به ناپروکسن آزاد می‌باشد که از ویژگی‌های مناسب یک سیستم

آ سپیرین را نشان دادند. هم چنین نتایج نشان داد که این دارو می‌تواند بیان ژنهای پرووتئاز، توکسین‌ها و تشکیل بیوفیلم را کاهش دهد (۴۰). Cramton و همکارانش نشان دادند که برخی از داروهای ضدالتهابی مانند دیکلوفناک و ملوکسی کام بیان ژن بیوفیلم *icaA* را در سویه‌های استافیلکوکوس/ورئوس کاهش دهد. این ژن متعلق به اپران *icaADBC* می‌باشد که ترکیبات اصلی تشکیل دهنده ماتریکس خارج سلولی بیوفیلم را کد می‌کند (۴۱).

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن سنتز و تعیین ماهیت شدند و به دنبال آن اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی آن بر روی سویه‌های مقاوم به متی سیلین/استافیلکوکوس/ورئوس مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه، انکیپسوله کردن ناپروکین در نانویوزوم باعث آهسته رهش شدن این دارو شد که یک ویژگی مناسب جهت اهداف طراحی نانودارو می‌باشد. هم چنین، نتایج این مطالعه نشان داد که نانویوزوم حاوی ناپروکسن در مقایسه با ناپروکسن آزاد اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی را به نسبت ۲ تا ۴ برابر نسبت به ناپروکسن آزاد افزایش داد. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نانویوزوم‌ها می‌توانند به عنوان یک سیستم دارورسانی مناسب برای داروی ناپروکسن در نظر گرفته شود و با مطالعات بیشتر می‌توان از نانویوزوم‌های حاوی ناپروکسن جهت اهداف داروبی و ضدمیکروبی مورد استفاده قرار بگیرد.

### References

- Mirzaie A, Noorbazargan H, Paseban K, Sadat Shandiz SA. Frequency and analysis of gene expression of norA and norB efflux pump in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using ethidium bromide and Real Time PCR. Med J Tabriz Uni Med Sci. 2019; 6: 64-73.
- Brown NM, Brown EM. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. J Antimicrob Chemother. 2021;76(6):1377-1378.
- Verma R, Verma SK, Rakesh KP, Girish YR,

حاوی ناپروکسن و ناپروکسن آزاد با روش میکرودایلوشن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تست ضدمیکروبی نشان داد که نانویوزوم حاوی ناپروکسن در مقایسه با ناپروکسن آزاد دارای اثرات ضدمیکروبی معنادارتری نسبت به ناپروکسن آزاد است، بطوريکه میزان MIC را بین ۲ تا ۴ برابر کاهش میدهد. یکی از مکانیسم‌های ضدمیکروبی نانویوزوم حاوی ناپروکسن فیوژ شدن نانویوزوم با غشای سلول باکتری می‌باشد که می‌تواند بطور هدفمند دارو را در داخل سیتوپلاسیم سلول آزاد کند و باعث مرگ سلول باکتری شود (۳۶). هم چنین مطالعات نشان می‌دهد که داروهای ضدالتهابی مانند ناپروکسن بر روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد و این به دلیل وجود غشای خارجی و لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که آزادسازی داروهای هیدروفلیل را کاهش می‌دهد (۳۷).

هدف دیگر این مطالعه بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانویوزوم حاوی ناپروکسن بر روی ایزوله‌های استافیلکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین و هم چنین تاثیر آن بر بیان ژن بیوفیلم بود. نتایج این مطالعه نشان داد که نانویوزوم حاوی ناپروکسن در مقایسه با ناپروکسن آزاد دارای اثرات ضدبیوفیلمی معنادارتری نسبت به ناپروکسن آزاد است و می‌تواند بیان ژن بیوفیلم را بطور معناداری کاهش دهد. یکی از دلایل اثرات ضدبیوفیلمی نانویوزوم حاوی ناپروکسن نفوذ بیشتر نانویوزوم حاوی ناپروکسن به درون ساختار بیوفیلم می‌باشد که می‌تواند باعث مرگ باکتری‌ها، کاهش تعداد باکتری‌ها و تبدیل بیوفیلم به سلول‌های پلانکتونی شود (۳۸). Silva و همکارانش نشان دادند که داروهای ضدالتهابی می‌توانند راحت‌تر به ساختار بیوفیلم نفوذ کنند و برهمنکش مستقیم با سلول‌های باکتریایی داشته باشند (۳۹). El-Mowafy و همکارانش اثر مهاری داروهای ضدالتهابی را بر روی فاکتورهای ویرولانس مانند تشکیل بیوفیلم، بیان ژن‌های بیوفیلم و پرووتئاز را بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که مهار فاکتورهای ویرولانس در باکتری سودوموناس آئروژنوزا مانند تشکیل بیوفیلم توسط داروی ضدالتهابی

- Ashrafizadeh M, Sharath Kumar KS, Rangappa KS. Pyrazole-based analogs as potential antibacterial agents against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its SAR elucidation. *Eur J Med Chem.* 2021; 212:113134.
4. Dad V, Ahmadrajabi R, Esfahani S, Saffari F. Comparative study of *Staphylococcus aureus* from burn patients and healthcare workers in a burn center, Yazd, Iran. *Wien Med Wochenschr.* 2021 Aug 2. doi: 10.1007/s10354-021-00863-5.
5. Kaneko H, Nakaminami H, Ozawa K, Wajima T, Noguchi N. In vitro anti-biofilm effect of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) agents against the USA300 clone. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021; 24:63-71.
6. Ronco T. Efficacy of a novel antimicrobial hydrogel for eradication of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* from preformed biofilm and treatment performance in an in vivo MRSA wound model. *JAC Antimicrob Resist.* 2021;3(3):dlab108.
7. Wang B, Yao Y, Wei P, Song C, Wan S, Yang S, Zhu GM, Liu HM. Housefly Phormicin inhibits *Staphylococcus aureus* and MRSA by disrupting biofilm formation and altering gene expression in vitro and in vivo. *Int J Biol Macromol.* 2021; 167:1424-1434.
8. Liu T, Luo J, Bi G, Du Z, Kong J, Chen Y. Antibacterial synergy between linezolid and baicalein against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in vivo. *Microb Pathog.* 2020; 147:104411.
9. Qiao J, Zheng L, Lu Z, Meng F, Bie X. Research on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* after cold stress. *Microorganisms.* 2021; 9(7):1534.
10. Hamdi SMM, Kalhor N, Mirzaie M. Anti-biofilm effects of zinc oxide nanoparticles synthesized by leaf extract of *Typha latifolia* on biofilm gene expression in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Rafsanjan Uni Med Sci.* 2020; 20: 3-22.
11. Zimmermann P, Curtis N. Antimicrobial effects of antipyretics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, e02268-16.
12. Chan EWL, Yee ZY, Raja I, Yap JK. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017, 10: 70–74.
13. Abdul-Hussein, Z.R.; Zainab, R. Antibacterial effect of non-steroidal. Available online: <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aid=98815> (accessed on 4 January 2019).
14. Umaru, T.; Nwamba, C.O.; Kolo, I.; Nwodo, U.U. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. *Afr J Biotechnol.* 2009, 8, 7332–7339.
15. Shirin H, Kancherla S, Kancherla K, Holt PR, Sordillo EM, Moss SF, Weinstein IB. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have bacteriostatic and bactericidal activity against *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006, 21, 1388–1393.
16. Hassan Noorbazargan, Sobhan Amintehrani, Aghigh Dolatabadi, Ainaz Mashayekhi, Nazanin Khayam, Pooria Moulavi, Mohammad Naghizadeh, Amir Mirzaie, Mahsa Kavousi. Anti-cancer & anti-metastasis properties of bioorganic-capped silver nanoparticles fabricated from *Juniperus chinensis* extract against lung cancer cells. *AMB Express.* 2021. 11: 1-14.
17. Mehrabi M, Faezi Ghasemi M, Rasti B, Falahati M, Mirzaie A. Mesoporous iron oxide nanoparticle synthesis: Study of its biological effects on lymphocytes and chronic myelogenous leukemia cells K562. *Applied Biology.* 34: 148-162.
18. Moghtaderi M, Mirzaie A, Zabet N, Moammeri A, Mansoori-Kermani A, Akbarzadeh I, Eshrat Yeganeh F, Chitgarzadeh A, Bagheri Kashtali A, Ren Q. Enhanced antibacterial activity of *Echinacea angustifolia* extract against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* through Niosome Encapsulation. *Nanomaterials.* 2021. 11: 1573.
19. Hedayati Ch M, Targhi AA, Shamsi F, Heidari F, Moghadam ZS, Mirzaie A. Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomed Mat Res Part A.* 2021. 109: 966-980.
20. Dabaghian Amiri A, Mirzaie M, Ali Asgari E, Mahmoudzadeh A. Preparation of niosome loaded *Artemisia chamamelifolia* extract: antibacterial and anti-cancer activities and apoptosis gene expression analysis in breast cancer cell line (MCF-7). *Feyz.* 2021. 25: 839-849.
21. Fatemeh Heidari, Iman Akbarzadeh, Dariush Nourouzian, Amir Mirzaie, Haleh Bakhshandeh. Optimization and characterization of tannic acid loaded niosomes for enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Adv Powder Technol.* 2021. 31: 4768-4781.
22. Mirzaie A, Peirovi N, Akbarzadeh I. Preparation and optimization of ciprofloxacin encapsulated niosomes: A new approach for enhanced antibacterial activity, biofilm inhibition and reduced antibiotic resistance. *Bioorgan Chem.* 2021. 103: 104231.
23. Khosravi M, Mirzaie A, Bagheri Kashtali A, Noorbazargan H. Antibacterial, anti-efflux, anti-biofilm, anti-slime (exopolysaccharide) production and urease inhibitory efficacies of novel synthesized gold nanoparticles coated *Anthemis atropatana* extract. *2020. 2022: 2105-2115.*
24. Ezati Sh, Mirzaie A, Zandi M. Evaluation of anti-efflux activity of *Anthemis atropatana* extract against ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus*

- isolates. *Journal of Medicinal Plants.* 2018; 17: 122-134.
25. Hsueh PR, Ko WC, Wu JJ, Lu JJ, Wang FD, Wu HY, et al. Consensus statement on the adherence to clinical and laboratory standards institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae in clinical microbiology laboratories in Taiwan. *J Micro Immun Infect.* 2010;43(5): 452-5.
26. Behdad R, Pargol M, Mirzaie A, Zare Karizi S, Noorbazargan H, Akbarzadeh I. Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Basic Microb.* 2020; 60: 494-507.
27. Sabahi M, Hamdi SMM, Mirzaie A. Antibiofilm activity of synthesized silver nanoparticles using *Asphodelus dendroides* extract against antibiotic resistant and biofilm forming *Klebsiella pneumoniae* clinical. *J Rafsanjan Uni Med Sci.* 2020; 18: 1233-1252.
28. Salman Sahab Atshan. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 976972.
29. Bongiorno D, Lazzaro LM, Stefani S, Campanile F. Share in vitro activity of Dalbavancin against refractory multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* isolates. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(12):865.
30. Kaneko H, Nakaminami H, Ozawa K, Wajima T, Noguchi N. Share In vitro anti-biofilm effect of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) agents against the USA300 clone. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021; 24:63-71.
31. Abo El-Ela FI, Hussein KH, El-Banna HA, Gamal A, Rouby S, Menshawy AMS, et al. Treatment of brucellosis in guinea pigs via a combination of engineered novel pH-responsive curcumin niosome hydrogel and doxycycline-loaded chitosan-sodium alginate nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2020;21(8):326.
32. Leão C, Borges A, Simões M. NSAIDs as a drug repurposing strategy for biofilm control. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(9):591
33. Shah N, Gupta MK. Characterization, optimization and formulation of niosome containing naproxen. *J Biomed Pharma Res.* 2016; 5: 1-6.
34. El-Menshawe SF, Hussein AK. Formulation and evaluation of meloxicam niosomes as vesicular carriers for enhanced skin delivery. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(4):779-86.
35. El-Ridy MS, Yehia SA, Mohsen AM, El-Awdan SA, Darwish AB. Formulation of niosomal gel for enhanced transdermal Lornoxicam delivery: in-vitro and in-vivo evaluation. *Curr Drug Deliv.* 2018;15(1):122-133.
36. Abdelaziz AA. Optimization of niosomes for enhanced antibacterial activity and reduced bacterial resistance: in vitro and in vivo evaluation. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(2):163-80.
37. Abbas HA, Gad AI. Eradication of biofilms formed by bacteria isolated from diabetic foot infections by potential anti-biofilm agents alone and in combination with ciprofloxacin. *Afr J Microbiol Res.* 2014; 8, 3882-3892.
38. Kashef MT. The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist.* 2020; 13: 1619–1629.
39. Lima-E-Silva A, Silva PM. Non-antibiotic compounds: The activity of the NSAID diclofenac on bacteria—A review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2018; 7, 340–351.
40. El-Mowafy SA, El Galil KH, El-Messery SM, Shaaban MI. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2014; 74, 25–32.
41. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols, W.W, Goötz, F. The Intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 1999; 67, 5427–5433.