



Fabrication of Polymeric PAA, PVA, and PEI Nanoparticles Loaded with the Natural Antibacterial Component, Curcumin, and Their Effectiveness against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Karimian Bahnamiri S.¹ MSc,
Maghsoudi A.^{*1} PhD,
Yazdian F.² PhD

How to cite this article

Karimian Bahnamiri S, Maghsoudi A, Yazdian F. Fabrication of Polymeric PAA, PVA, and PEI Nanoparticles Loaded with the Natural Antibacterial Component, Curcumin, and Their Effectiveness against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):647-654.

ABSTRACT

Aims Curcumin is a natural molecule that due to its various curative effects including antibacterial properties, it can be used as a medicine, albeit after reducing its disadvantages. The aim of the present study is to develop a method for preparation of nanoparticles of curcumin using PAA, PVA, and PEI polymers with a view to improve its stability, increasing bioavailability and aqueous solubility as well as study its effectiveness against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Materials & Methods In order to synthesize polymeric nanoparticles including curcumin with the nano-precipitation method, optimizing the effective concentration of polymer, curcumin, and water were determined by using the Response Surface Method (RSM). Synthesized nanoparticles were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and zeta potential measurement methods. Furthermore, minimal concentration inhibitory of synthesized nanoparticles against the Staphylococcus aureus resistant to methicillin was measured.

Findings The created nanoparticles were round, discrete and smooth in surface morphology and the average particle size for PAA, PVA, and PEI were 149 ± 7 nm, 175 ± 8 nm, and 184 ± 9 nm respectively. The minimum inhibitory concentration for PAA, PVA and PEI nanoparticles against the Staphylococcus aureus were 0.480 ± 0.024 , 0.390 ± 0.019 and 0.340 ± 0.017 mg/ml. The concentration of solvent, polymer, and curcumin was important to obtain small size particles.

Conclusion The results indicated that the water solubility of curcumin significantly improved by particle size reduction up to the nano range. The inhibitory property of curcumin nanoparticles has greatly increased due to the smaller particle size and their increased penetration into the bacteria and nanoparticles loaded with curcumin could be a promising drug carrier for the treatment of cancer, infections and other diseases.

Keywords Curcumin; Nanocurcumin; Methicillin resistant Staphylococcus aureus; Antibacterial

¹Institute of Environmental & Industrial Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran

²Biological Science Engineering Department, New Science & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Institute of Environmental & Industrial Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

maghsoudi.a@gmail.com

Article History

Received: June 12, 2019

Accepted: June 15, 2019

ePublished: December 21, 2019

CITATION LINKS

[1] The global epidemiology of infectious diseases [2] Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus [3] A prospective multicenter study of Staphylococcus aureus bacteremia: Incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance [4] Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake [5] Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study [6] Dose escalation of a curcuminoid formulation [7] Curcumin as potential therapeutic natural product: A nanobiotechnological perspective [8] Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use [9] The growing role of nanotechnology in combating infectious disease [10] The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices [11] Experimental design in chemistry: A tutorial [12] Statistical optimization of process parameters for the extraction of chromium (VI) from pharmaceutical wastewater by emulsion liquid membrane [13] Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets [14] Curcuma longa and curcumin: A review article [15] Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin [16] Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy [17] Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles [18] Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents

ساخت نانوذرات پلیمری PAA، PVA و PEI حاوی ترکیب طبیعی ضدباکتریایی کورکومین و بررسی کارایی آنها علیه باکتری *استافیلوکوکوس* *اورئوس* مقاوم به متیسیلین

سحر کریمیان بهنمیری MSc

پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
و زیست فناوری، تهران، ایران

امیر مقصودی PhD

پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
و زیست فناوری، تهران، ایران

فاطمه یزدیان PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران،
ایران

چکیده

اهداف: کورکومین مولکولی طبیعی است که با توجه به خواص گوناگون درمانی آن از جمله اثر ضدباکتریایی، می‌توان با کاهش معایب کورکومین از آن به عنوان دارویی به منظور درمان بیماری‌های مزمن استفاده کرد. هدف مطالعه حاضر ایجاد روشی برای تهیه نانوذرات کورکومین با استفاده از پلیمرهای پلی‌آکریلیک اسید، پلی‌وینیل الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین با نظر به بهبود ثبات، افزایش زیست‌فراهمی، حلالیت آبی بالا و همچنین بررسی کارایی آن علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین است.

مواد و روش‌ها: به منظور سنتز نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین به روش رسوب‌دهی نانو به پهنه‌سازی غلظت‌های موثر از پلیمر، کورکومین و آب با استفاده از روش سطح پاسخ معین شد. نانوذرات سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، پراکندگی پویای نور و اندازه‌گیری پتانسیل زتا مشخصه‌یابی شدند. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات سنتز شده علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نانوذرات ساخته شده در مورفولوژی سطح کاملاً گرد، جدا از هم و صاف بودند و میانگین اندازه ذرات 149 ± 175 ، 149 ± 175 و 149 ± 175 نانومتر برای پلی‌آکریلیک اسید، پلی‌وینیل الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین و همچنین حداقل غلظت بازدارندگی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین را به ترتیب 0.04 ± 0.02 ، 0.09 ± 0.03 و 0.17 ± 0.04 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: غلظت حلال، پلیمر و کورکومین برای دستیابی به اندازه ذرات کوچک‌تر بسیار مهم است. خاصیت مهارکنندگی نانوذرات کورکومین به دلیل کوچک‌تر شدن اندازه ذرات و افزایش قدرت نفوذ آن در باکتری افزایش چشمگیری یافته و نانوذرات بارگذاری شده با کورکومین می‌توانند حامل‌های دارویی امیدبخشی برای درمان بیماری‌های سرطانی، عفونی و سایر بیماری‌ها باشند.

کلیدواژه‌ها: کورکومین، نانوکورکومین، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین، آنتی‌باکتریال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۵

*نویسنده مسئول: maghsoudi.a@gmail.com

مقدمه

براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) چهار عامل از ده عامل شایع مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه، بیماری‌های

عفونی است [1]. *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) از مهم‌ترین و فراوان‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان به شمار می‌رود که عامل شمار زیادی از عفونت‌های انسانی از جمله پنومونیا، اندوکاردیت و مننژیت است. پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک امروزه به عنوان یکی از چالش‌های درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها مطرح است [2]. مطالعات نشان داده است بیمارانی که دچار عفونت با سویه‌های مقاوم به متیسیلین یا MRSA می‌شوند نسبت به افرادی که با سویه‌های حساس به متیسیلین یا MSSA بیمار می‌شوند مدت طولانی‌تری در بیمارستان بستری می‌شوند، بنابراین علاوه بر هزینه‌های بیشتر درمانی، پیشرفت عفونت به باکتریایی یا اندوکاردیت نیز بیشتر اتفاق می‌افتد [3]. بنابراین ایجاد مقاومت باکتریایی علیه آنتی‌بیوتیک‌های موجود باعث افزایش تحقیقات در زمینه یافتن مواد ضدباکتریایی جدید در گیاهان شده است. کورکومین (۱) و ۷- بیس- (۴- هیدروکسی- ۳- متوکسی فنیل) هپتا- ۱ و ۶- دیان- ۳ و ۵- دی‌یون) ترکیب فنولی و غیرقطبی مشتق شده از ریشه گیاه کورکوما / لونگا (*Curcuma longa*) است که قرن‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [4]. تحقیقات گسترده طی پنج دهه گذشته نشان می‌دهد که کورکومین دارای اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدتوموری، ضد HIV و ضد میکروبی است [5]. سازمان بهداشت جهانی استفاده از کورکومین را بی‌خطر دانسته‌اند و مطالعات نشان می‌دهند که افراد قادر به تحمل کورکومین در دوزهای بالا به اندازه ۸ گرم در هر روز هستند [6]. همچنین کورکومین توانایی بالایی در مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین دارد. مکانیزم بالقوه مهار باکتریایی کورکومین از طریق انباشت ROS داخل سلولی و آسیب به غشا باکتری و نفوذپذیری آن و در نتیجه مرگ *استافیلوکوکوس اورئوس* صورت می‌گیرد [7]. اگرچه در دسترس بودن گسترده کورکومین، ایمنی، ارزان بودن و توانایی بالقوه آن در پیشگیری یا درمان سرطان و سایر بیماری‌های مزمن، توسعه آن را به عنوان یک دارو تصدیق می‌کند، ولی به دلیل حلالیت پایین در آب و زیست‌دسترس‌پذیری کم آن، در مطالعات بالینی نمی‌توان به نتایج مطلوبی دست یافت [4]. امروزه استفاده از فناوری نانو برای بهبود زیست‌فراهمی کورکومین و افزایش حلالیت آن مورد توجه قرار گرفته است [8]. پلی‌آکریلیک اسید، پلی‌وینیل الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین پلیمرهای سازگار با محیط زیست و زیست‌تخریب‌پذیرند که حامل‌های مناسبی برای رساندن دارو به سلول هدف هستند. ترکیب طبیعی مورد نظر یعنی کورکومین در این پلیمرها محصور شده و در مقدار ثابتی از طریق تخریب ماتریکس پلیمر آزاد می‌شود [9، 10].

هدف مطالعه کنونی ایجاد یک روش برای تهیه نانوذرات کورکومین با استفاده از پلیمرهای پلی‌آکریلیک اسید، پلی‌وینیل الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین با نظر به بهبود ثبات، زیست‌دسترس‌پذیری کم، حلالیت آبی و همچنین بررسی کارایی آن علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین است.

سویه باکتری: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1764 استفاده شده در این پژوهش به منظور بررسی کارایی نانوذرات کورکومین از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. کشت‌های میکروبی به منظور تکثیر این باکتری در محیط کشت اختصاصی لاکتوزبراث (مرک؛ آلمان) حاوی ۱٪ پپتون، ۵٪/۵٪ عصاره مخمر، ۱٪ سدیم کلراید به همراه ۱٪ گلوکز به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C صورت گرفت.

طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ: طراحی آزمایش، شامل مجموعه آزمایش‌هایی است که در آنها، متغیرهای ورودی فرآیند به طور آگاهانه تغییر داده می‌شوند تا از این طریق میزان تغییرات حاصل در پاسخ فرآیند مشاهده و شناسایی شود و امکان بررسی همه شرایط ممکن در یک آزمایش با چندین عامل متغیر فراهم شود. با به کارگیری روش‌های طراحی آزمایش می‌توان عامل‌های ورودی قابل کنترل را تغییر داد و اثر آنها را بر مولفه‌های خروجی ارزیابی کرد. آزمایش‌هایی که به طور آماری طراحی می‌شوند می‌توانند سطوح مناسب متغیرهای قابل کنترل را برای بهینه‌سازی عملکرد فرآیند تعیین کنند^[11]. روش سطح پاسخ یک روش آماری تجربی برای تحلیل چندگانه داده‌های کمی است. در این روش داده‌های چندمتغیره به دست آمده از آزمایش‌های طراحی شده به منظور حل معادلات چندمتغیره به صورت همزمان به کار برده می‌شود^[12]. روش ترکیب مرکزی یکی از متداول‌ترین روش‌های خانواده روش سطح پاسخ است که در تحقیق حاضر نیز از این روش برای تعیین سطح بهینه متغیرها و بررسی اثرات متقابل آنها استفاده شد.

به این ترتیب، سه پلیمر پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین به همراه کورکومین و حلال به عنوان سه عامل مستقل برای نرم‌افزار تعریف، مقادیر کمینه و بیشینه برای عامل‌ها انتخاب و در نهایت با در نظر گرفتن مقدار نانوذره کورکومین تولید شده به عنوان پاسخ آزمایش، جدول طراحی آزمایش برای سه فاکتور طراحی شد. تعداد آزمایش‌ها طبق فرمول $2k + k^2 + n$ محاسبه شده است که در آن k و n به ترتیب بیانگر تعداد فاکتورها و نقطه مرکزی است. اهمیت نقطه‌ی مرکزی در ارایه اطلاعات در مورد تغییرات پاسخ در محدوده میانگین، تکرارپذیری آزمایش و به حداقل رساندن خطاهای آزمایش است که در سه مرتبه تکرار شد. مطابق فرمول فوق، ۱۷ آزمایش طراحی و بیشترین مقدار نانوذره کورکومین تولید شده به عنوان پاسخ برای این آزمایش‌ها در نظر گرفته شد.

بر اساس پیش‌آزمایش‌های صورت گرفته غلظت‌های پلیمرهای پلی‌اکریلیک‌اسید (۱۰۰-۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پلی‌وینیل‌الکل (۱۳۲-۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پلی‌اتیلن‌ایمین (۸۴-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، همچنین غلظت‌های مختلف کورکومین (۸۰-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و حجم‌هایی از آب (۲/۱۴۳ میلی‌لیتر) به عنوان متغیر در نظر گرفته شد و با انجام ۱۷ آزمایش طراحی شده هر کدام بهینه شدند.

تعیین منحنی کالیبراسیون کورکومین: به منظور سنتز و بارگذاری دارو به روش ترسیب نانو در در نانوذرات پلیمری (پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین)، نیاز به داشتن معیاری برای مقایسه و درک از میزان بارگذاری دارو در نانوذرات است؛ بنابراین منحنی استاندارد کالیبراسیون دارو (کورکومین) تهیه شد. بررسی میزان بارگذاری دارو و غلظت آن در نانوذرات از طریق قرائت جذب نوری در دستگاه طیف سنجی نوری و در طول موج ۴۲۲ نانومتر (که بالاترین پیک جذبی کورکومین است) و با توجه به معادله رگرسیون به دست آمده از نمودار خطی منحنی استاندارد کورکومین انجام شد. برای تعیین منحنی کالیبراسیون کورکومین مجموعه‌ای از فلاسک‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری انتخاب و مقادیر مناسبی از محلول استاندارد کورکومین تهیه شد. جذب نوری در بیشینه جذب کورکومین یعنی در ۴۲۲ نانومتر و بر ضد محلول شاهد که فاقد کورکومین بود، اندازه‌گیری شد. به استثنای غلظت اول (غلظت صفر)، سایر غلظت‌های تهیه شده دوبرابر رقیق شدند.

سنتز نانوذرات پلیمری بارگذاری شده با کورکومین: پلیمرهای پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین و پودر کورکومین به صورت آماده (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. به منظور ساخت نانوذرات پلی‌مری حاوی کورکومین از روش ترسیب نانو استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از طراحی آزمایش صورت گرفته، بهینه‌ترین حالت برای هر کدام از متغیرهای غلظت پلیمرها، حجم آب و غلظت کورکومین به منظور سنتز نانوذرات در نظر گرفته شد. به این ترتیب برای سنتز نانوذره پلی‌اکریلیک‌اسید ابتدا ۱۰ میکروگرم از پلی‌اکریلیک‌اسید در ۷/۱۴۳ میلی‌لیتر آب روی همزن مغناطیسی (۵۰۰rpm) حل شد. سپس ۶۴ میکروگرم از محلول کورکومین به صورت قطره‌قطره به محلول آبی پلی‌اکریلیک‌اسید همراه با هم‌زدن مداوم در مدت زمان یک ساعت اضافه شد. پس از گذشت چند دقیقه رسوب نانوذرات در ته ظرف شیشه‌ای مشاهده شد. در مرحله بعدی به منظور تبخیر استون، ظرف حاوی محلول به مدت ۱۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. پس از گذشت این زمان برای جداسازی رسوب نانوذرات، از حمام اولتراسونیک مدل W340 (ریحان‌طب؛ ایران) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد. سپس محتویات درون ظرف شیشه‌ای به همراه نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید از درون فیلتر سرنگ مناسب عبور داده شد و به درون فالتون منتقل و در یخچال قرار گرفت. ذراتی که از فیلتر سرنگ عبور کردند همان نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید بودند.

همچنین برای سنتز نانوذرات پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین مشخص شد که ۱۳۲ میکروگرم از پلی‌وینیل‌الکل و ۴۶ میکروگرم از پلی‌اتیلن‌ایمین به طور جداگانه در ۷/۱۴۳ میلی‌لیتر آب روی همزن مغناطیسی (۵۰۰rpm) حل شد و سپس مراحل بعدی به گونه‌ای که پیش‌تر شرح داده شد، صورت گرفت.

مشخصه‌یابی نانوذرات

پراکندگی پویای نور و پتانسیل زتا: روشی دیگر به منظور اندازه‌گیری

اندازه نانوذرات روش پراکندگی پویای نور است که یک روش فیزیکی غیرمخرب و سریع است که برای تعیین اندازه ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها در محدوده چند نانومتر تا میکرون استفاده می‌شود. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده به وسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. همچنین به منظور بررسی بار سطحی و پایداری نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد. به این منظور از دستگاه SZ-100z Dynamic Light Scattering & Zeta potential analyzer (Horiba Jobin Yvon؛ ایالات متحده) در دانشگاه تهران استفاده شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی: به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM؛ KYKY؛ چین) استفاده شد. مبنای عملکرد این میکروسکوپ برهمکنش پرتو الکترونی با ماده است که تصاویری با بزرگنمایی بالا به دست می‌آید.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) نانوذرات پلیمری بارگذاری شده با کورکومین روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین: برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده یا MIC نانوذرات پلیمری بارگذاری شده با کورکومین روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین، باکتری در محیط کشت لاکتوز برات گلوکز در دمای 37°C به مدت ۱۸ ساعت در دور ۱۵۰ rpm کشت داده شد. سپس در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه یک میلی‌لیتر از ماده تلقیح و ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، صفر میکرولیتر از محلول نانوذره (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه و پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در 37°C انکوبه شد. جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر ثبت و آزمایش سه بار تکرار شد. MIC نانوذرات برابر است با کمترین غلظت نانوذرات که منجر به جذب نوری کمتر یا مساوی ۰/۵ شود.

یافته‌ها

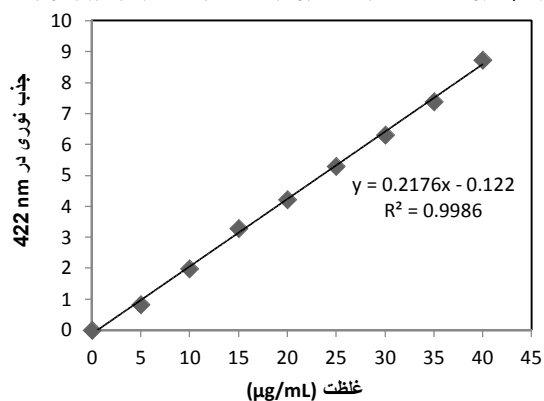
منحنی کالیبراسیون کورکومین: رابطه خطی بین غلظت‌های مختلف تهیه شده از محلول استاندارد کورکومین (محور X) و جذب نوری (محور Y) به صورت ترسیمی ارایه شد. شیب (m)، عرض از مبدا (b) و ضریب همبستگی (R^2) از رابطه خطی ($Y=mx+b$) به وسیله رگرسیون محاسبه شد. نمودار ۱ منحنی کالیبراسیون کورکومین را که با استفاده از طیف‌سنجی نوری اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد.

بررسی اندازه و بار سطحی نانوذرات با استفاده از روش تفرق پویای نور و پتانسیل زتا: پراکندگی پویای نور روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود میانگین اندازه ذره 149 ± 175 ، و 184 ± 9 نانومتر به ترتیب برای پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین به دست آمد. نتایج نشان داد که حلالیت آبی نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین

با کاهش اندازه ذرات به محدوده نانو به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. همچنین برای بررسی بار سطحی و پایداری نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین، پتانسیل زتا این نانوذرات اندازه‌گیری شد. در واقع پتانسیل زتا یک شاخص برای ثبات بالقوه سامانه کلوئیدی است. اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار منفی یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند و تمایلی به هم‌انباشتنی از خود نشان نمی‌دهند. تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد. به‌طور کلی مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین کرد. پتانسیل زتا برای نانوذرات پلیمری پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین به ترتیب برابر $26/0 \pm 1/58$ ، $3/0 \pm 1/83$ و $5/0 \pm 1/10$ میلی‌ولت به دست آمد. به این ترتیب نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید بیشترین و نانوذرات پلی‌وینیل‌الکل کمترین میزان پایداری را دارند (نمودار ۳).

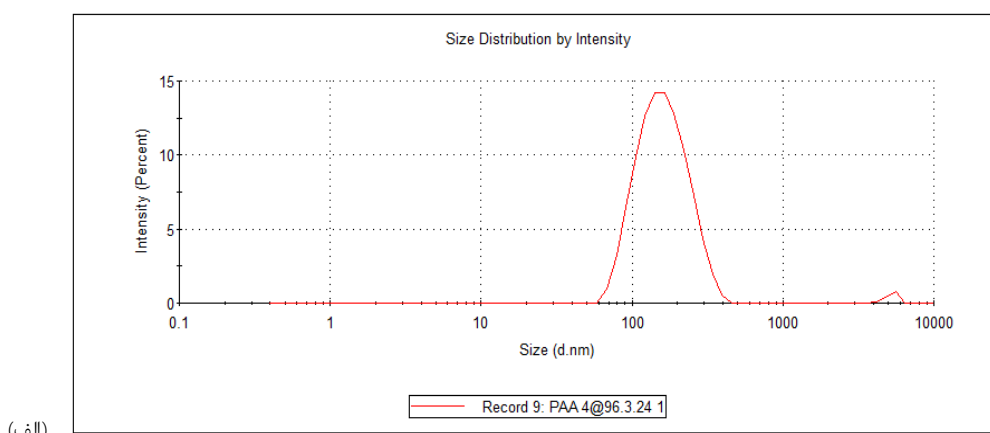
بررسی اندازه و شکل نانوذرات با استفاده از میکروسکپ الکترونی روبشی: میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) یکی از ابزارهای مورد استفاده در فناوری نانو است که با کمک بمباران الکترونی تصاویر اجسامی به کوچکی ۱۰ نانومتر را برای مطالعه تهیه می‌کند. نانوذرات پلیمری پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین کاملاً گرد، مجزا و دارای سطحی صاف بودند. پس از آنالیز نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی اندازه نانوذرات پلیمری پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین به ترتیب $75/2 \pm 3/76$ ، $77/1 \pm 3/08$ و $86/4 \pm 4/32$ نانومتر به دست آمد که این کاهش اندازه نسبت به روش تفرق پویای نور به دلیل کاهش قطر لایه آبی که اطراف نانوذرات را احاطه می‌کند، است (جدول ۱؛ شکل ۱).

بررسی خاصیت ضد میکروبی با تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) نانوذرات پلیمری بارگذاری شده با کورکومین روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین: نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین و همچنین حداقل غلظت بازدارندگی کورکومین خالص بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین در جدول ۲ نشان داده شده است. MIC به عنوان کمترین غلظتی که در آن نانوذرات بارگذاری شده با کورکومین قادر هستند به طور کامل رشد باکتری مورد آزمایش را مهار کنند (جذب نوری کمتر یا مساوی ۰/۵ در ۶۰۰ نانومتر)، گزارش شد. همان‌طور که در جدول نشان داده شده، کمترین میزان MIC نانوذرات پلیمری بهینه شده بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدون حضور آنتی‌بیوتیک متیسیلین مربوط به نانوذره پلی‌اتیلن‌ایمین برابر با $34 \pm 0/17$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. MIC نانوذره پلی‌وینیل‌الکل برابر با $39 \pm 0/19$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید برابر با $48 \pm 0/24$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. همچنین مشخص شد که MIC کورکومین خالص $56 \pm 0/28$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که بیشتر از MIC نانوذرات

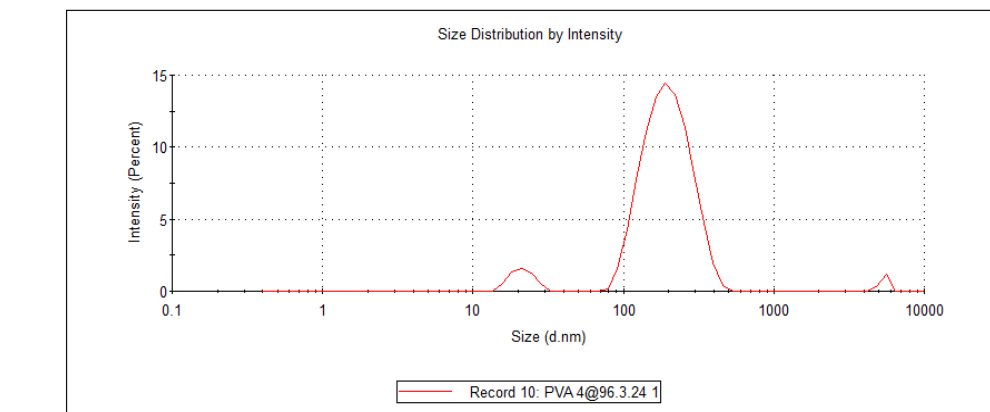


نمودار ۱) منحنی کالیبراسیون کورکومین با استفاده از طیف‌سنجی نوری در ۴۲۲ نانومتر

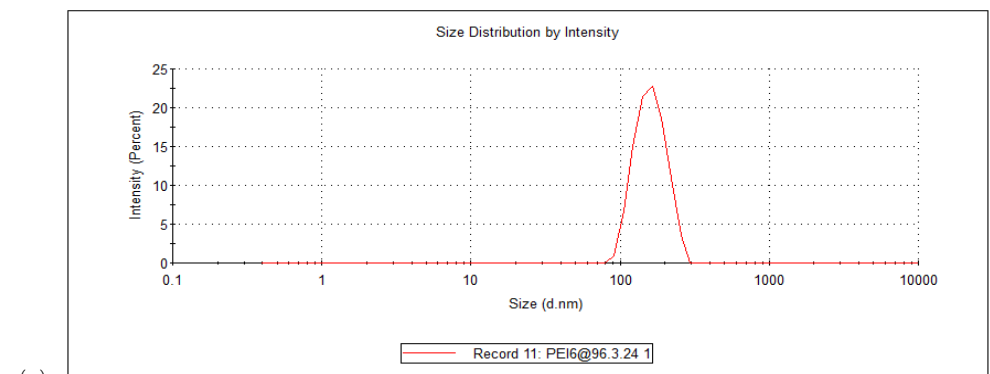
پلیمری بارگذاری شده با کورکومین است. اما آزمایش دوم بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات پلیمری به همراه آنتی‌بیوتیک متیسیلین بود. MIC آنتی‌بیوتیک متیسیلین به تنهایی برابر با 1 ± 0.3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین MIC برای نانوذره پلی‌اتیلن‌ایمین به همراه متیسیلین برابر با 1 ± 0.2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای نانوذره پلی‌وینیل‌الکل به همراه متیسیلین برابر با 1 ± 0.26 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای نانوذره پلی‌اکریلیک‌اسید به همراه متیسیلین برابر با 1 ± 0.33 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید حاوی کورکومین بیشترین میزان مهارکنندگی را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین را در میان نانوذرات سنتز شده دارند.



(الف)

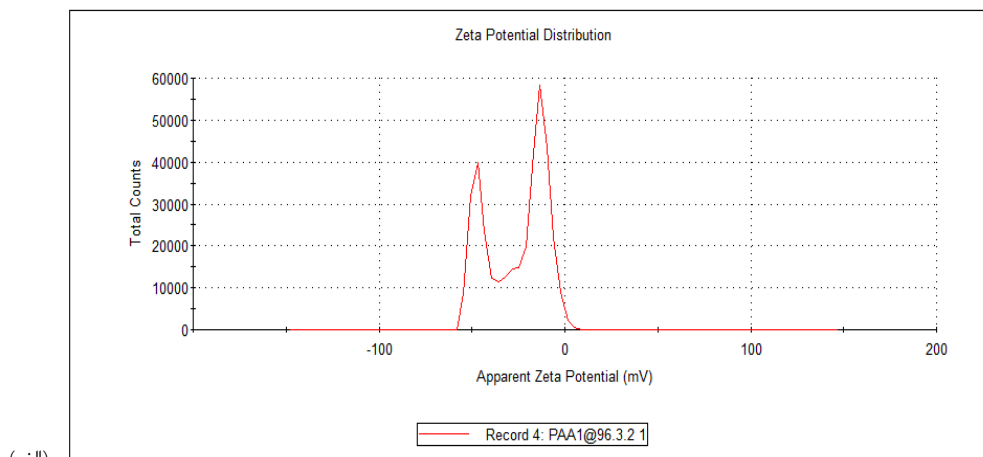


(ب)

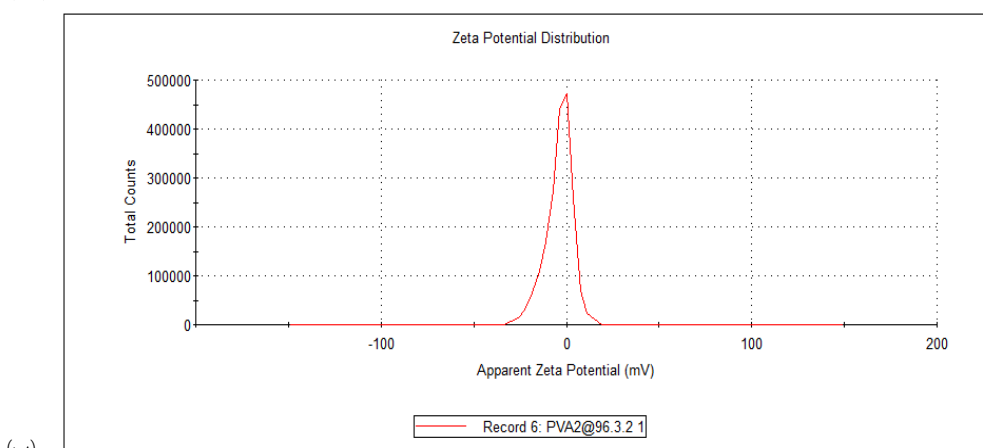


(ج)

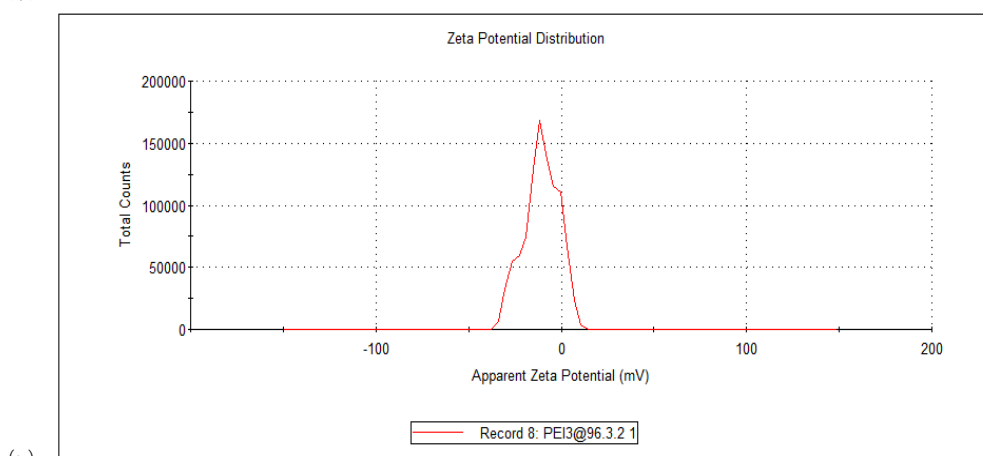
نمودار ۲) تعیین اندازه نانوذرات حاوی کورکومین توسط دستگاه زتاسایزر: (الف) نانوذرات حاوی پلی‌اکریلیک‌اسید حاوی کورکومین، (ب) نانوذرات حاوی پلی‌وینیل‌الکل حاوی کورکومین، (ج) نانوذرات حاوی پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین



(الف)

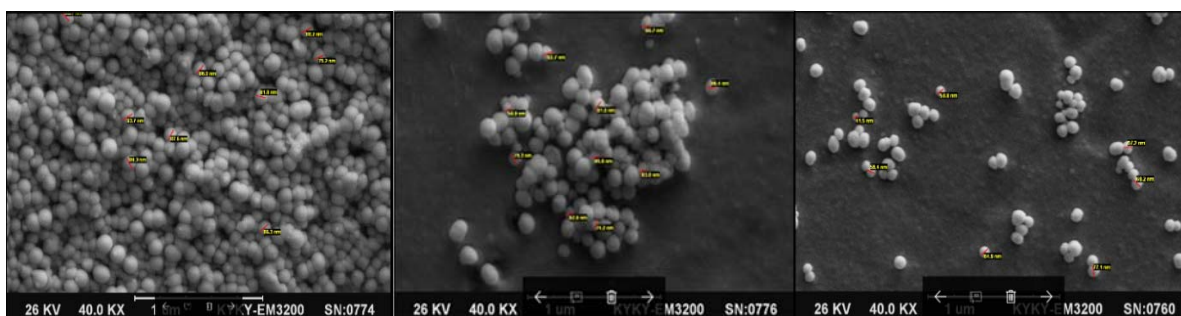


(ب)



(ج)

نمودار ۳) تعیین پتانسیل زتا نانوذرات حاوی کورکومین: (الف) نانوذرات پلی‌اکریلیک اسید حاوی کورکومین، (ب) نانوذرات پلی‌وینیل الکل حاوی کورکومین، (ج) نانوذرات پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین



شکل ۱) تصویر SEM از نانوذرات حاوی کورکومین (الف) نانوذرات پلی‌اکریلیک اسید حاوی کورکومین (ب) نانوذرات پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین (ج) نانوذرات پلی‌وینیل‌الکل حاوی کورکومین

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
جذب نوری (نانومتر)	۰	۰/۸۳	۱/۹۸	۳/۲۹	۴/۲۳	۵/۳۱	۶/۳۱	۷/۳۹	۸/۷۳

جدول ۲) فعالیت ضد میکروبی نانوذرات پلیمری بارگذاری‌شده با کورکومین، کورکومین خالص و متیسیلین خالص روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین

باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین
MIC پلی‌اتیلن‌ایمین	۰/۳۴
MIC پلی‌وینیل‌الکل	۰/۳۹
MIC پلی‌اکریلیک‌اسید	۰/۴۸
MIC کورکومین خالص	۰/۵۶
MIC پلی‌اتیلن‌ایمین با متیسیلین	۰/۲
MIC پلی‌وینیل‌الکل با متیسیلین	۰/۲۶
MIC پلی‌اکریلیک‌اسید با متیسیلین	۰/۳۳
MIC متیسیلین خالص	۰/۳

بحث

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین صورت پذیرفت. کورکومین دارای خواص ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، ترمیم زخم و آنتی‌اکسیدانی است که توانایی القای آپوپتوز را در بسیاری از سیستم‌های سلولی دارد.^[13] اما به دلیل زیست‌فراهمی پایین و سرعت تجزیه بالای آن در سیستم‌های بیولوژیکی، فاقد تأثیرات بالینی است.^[15] تحقیقات صورت گرفته روی نانومواد حاکی از آن است که نانوکورکومین دارای قابلیت‌های زیستی بالایی است. مشخص شده که اندازه ذرات پارامتر مهمی است زیرا می‌تواند به‌طور مستقیم بر پایداری فیزیکی، جذب سلولی و انتشار دارو از نانوذرات تأثیر بگذارد.^[16] زمانی که کورکومین به شکل نانوذره در می‌آید اندازه آن نسبت به اندازه کورکومین بسیار کاهش می‌یابد، این امر موجب نفوذ بهتر و جذب بالاتر آن توسط سلول یا باکتری می‌شود. همچنین سنجش‌های زیستی آزمایشگاهی به روشی نشان داده که تبدیل شدن به فرم نانویی تا حدود زیادی انحلال‌پذیری در آب و کارایی کورکومین را به‌عنوان عامل ضدباکتریایی افزایش می‌دهد.^[17] با توجه به نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی اندازه نانوذرات پلیمری پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین به ترتیب $75/2 \pm 3/76$ ، $77/1 \pm 3/08$ و $86/4 \pm 4/32$ نانومتر به دست آمد. اندازه‌گیری پتانسیل زتا پایداری بالای نانوذرات سنتز شده را در محیط‌های کلئیدی نشان می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد نانوذرات پلیمری حاوی کورکومین می‌توانند خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین داشته باشند. همچنین مشخص شد به واسطه کاهش اندازه نانوذرات کورکومین نسبت به کورکومین خالص، حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات کورکومین پایین‌تر از

کورکومین خالص است به‌طوری که این میزان برای نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین به ترتیب $24/0 \pm 48/0$ ، $19/0 \pm 39/0$ و $17/0 \pm 34/0$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است در حالی که این میزان برای کورکومین خالص برابر $28/0 \pm 56/0$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. پژوهش‌های صورت گرفته نشان داده است که نانومواد که با آنتی‌بیوتیک‌ها پیوند خورده‌اند غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها را در محل عفونت افزایش داده و اتصال آنها را به باکتری تسهیل می‌کنند. به همین علت ترکیب نانومواد با پپتیدهای ضد میکروبی و اسانس‌های روغنی یک سینرژی واقعی علیه مقاومت باکتریایی ایجاد می‌کند.^[18] همچنین مشخص شده است که کورکومین علاوه بر این که به تنهایی دارای خاصیت ضدباکتریایی است بلکه دارای اثر سینرژیسمی با آنتی‌بیوتیک‌ها نیز است. بررسی اثر سینرژیسمی نانوذرات کورکومین به همراه آنتی‌بیوتیک متیسیلین در این پژوهش نشان داد که MIC آنتی‌بیوتیک متیسیلین به تنهایی $1/0 \pm 3/0$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین به همراه آنتی‌بیوتیک متیسیلین به ترتیب $1/0 \pm 33/0$ ، $1/0 \pm 26/0$ و $1/0 \pm 2/0$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که نشان می‌دهد اثر مهار نانوذرات کورکومین و آنتی‌بیوتیک متیسیلین به همراه هم بیشتر از اثر مهار هر کدام به تنهایی است. مان و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر سینرژیسمی کورکومین و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نروفلوکساسین، اگزاسایکلین و آمپیسیلین روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین پرداختند و بیان داشتند استفاده از کورکومین به همراه هر کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در مهار رشد باکتری می‌شود.^[2] نتایج حاصل از پژوهش‌های /دون و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد تغییر اندازه نانوذرات کورکومین باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت ضدباکتریایی این ترکیب می‌شود. حداقل غلظت مورد نیاز برای از بین بردن باکتری نانوکورکومین بسیار پایین‌تر از کورکومین خالص برای تمام سویه‌های استفاده‌شده در پژوهش گزارش شد. همچنین به دلیل بالارفتن میزان حلالیت نانوکورکومین نسبت به کورکومین خالص، میزان حداقل غلظت مهار آن علیه باکتری‌ها نیز افزایش می‌یابد.^[17] باسنیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان داشتند که باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی نسبت به نانوذرات کورکومین حساس‌تر هستند که به دلیل تفاوت این دو گروه در ساختار دیواره سلولی آنها است.^[5] تحقیقات /دوهن و همکاران روی سویه‌های باکتری‌های گرم منفی /شرشیا کلی و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد نانوذرات کورکومین بیشترین اثرگذاری خود را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند.^[17] همچنین تحقیقات جین و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز با تصدیق یافته‌های

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2013;20(8-9):714-8.
- 3- Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: Incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine*. 2003;82(5):322-32.
- 4- Liu J, Xu L, Liu Ch, Zhang D, Wang S, Deng Z, et al. Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. *Carbohydr Polym*. 2012;90(1):16-22.
- 5- Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem*. 2011;59(5):2056-61.
- 6- Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6(1):10.
- 7- Shome S, Talukdar AD, Choudhury MD, Bhattacharya MK, Upadhyaya H. Curcumin as potential therapeutic natural product: A nanobiotechnological perspective. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(12):1481-500.
- 8- Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm*. 2009;6(5):1388-401.
- 9- Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*. 2011;2(5):395-401.
- 10- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.
- 11- Leardi R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2009;652(1-2):161-72.
- 12- Rajasimman M, Sangeetha R, Karthik P. Statistical optimization of process parameters for the extraction of chromium (VI) from pharmaceutical wastewater by emulsion liquid membrane. *Chem Eng J*. 2009;150(2-3):275-9.
- 13- Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(2):85-94.
- 14- Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: A review article. *Rom J Biol Plant Biol*. 2010;55(2):65-70.
- 15- Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. In: Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia Sh, editors. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. Boston: Springer; 2007. pp. 453-470.
- 16- Feng SS. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Rev Med Devices*. 2004;1(1):115-25.
- 17- Adahoun MA, Al-Akhras MAH, Jaafar MS, Bououdina M. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(1):98-107.
- 18- Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(11):1035-52.

قبلی نشان می‌دهد با کاهش اندازه نانوذرات کورکومین نفوذپذیری آن در باکتری و جذب آن توسط سلول‌ها افزایش می‌یابد [8].

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر روشی نوین برای تولید نانوذرات کورکومین به‌منظور بهبود ثبات، افزایش زیست‌فراهمی و حلالیت آبی ذرات کورکومین مشخصه‌یابی و گسترش داده شد. بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات پلی‌اکریلیک‌اسید، پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌ایمین حاوی کورکومین نشان داد به‌دلیل کاهش اندازه ذرات کورکومین، افزایش حلالیت آبی و افزایش جذب آن توسط باکتری‌ها، توانایی این ماده در مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متیسیلین افزایش یافته و می‌توان از این نانوذرات به‌صورت ایمن به‌منظور درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده کرد. همچنین در میان نانوذرات سنتز شده در این پژوهش نانوذره پلی‌اکریلیک‌اسید حاوی کورکومین کمترین اندازه، بیشترین میزان پایداری در محیط‌های کلونیدی و بیشترین میزان مهارکنندگی را علیه باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متیسیلین را دارد. این پژوهش بر این نکته تأکید دارد که با افزایش حلالیت و پایداری کورکومین در حامل‌های نانویی می‌توان از این ماده به‌طور موثر در درمان بیماری‌های سرطانی و سایر بیماری‌های مزمن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با شماره ۵۴۶ تحت عنوان ساخت نانوذرات پلیمری PAA (پلی‌اکریلیک‌اسید)، PVA (پلی‌وینیل‌الکل) و PEI (پلی‌اتیلن‌ایمین) حاوی ترکیب طبیعی ضدباکتریایی کورکومین و بررسی کارایی آنها علیه باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متیسیلین است. از همکاری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای حمایت مالی این طرح کمال تشکر را داریم.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: سحر کریمیان بهنمیری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ امیر مقصودی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ فاطمه یزدیان (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۳۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بوده است.

منابع

- 1- World Health Organization. The global epidemiology of infectious diseases. Murray CJL, Lopez AD, Mathers CD, editors. 4th Volume. Geneva: World Health Organization; 2004.
- 2- Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against