بررسی هم‌افزایی نانوژل‌های کیتوزان لود شده با وانکومایسین و اینترفرون گاما بر بیان ژن TNF-α در موش‌های آلوده شده با *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

سحر ارکیا[۱]، **جواد آراسته**[۱*]، اردشیر حسامپور[۱]، علی اسرافیلی[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱

چکیده

مشکل فزاینده مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*، تلاش‌های تازه‌ای را برای کشف عوامل ضدمیکروبی جدید برانگیخته است. یکی از این روش‌های نوین، استفاده از نانوذرات است. هدف از این مطالعه، سنتز نانوژل‌های کیتوزان لودشده با وانکومایسین و اینترفرون گاما(IFN-γ) و بررسی بیان ژن TNF-α در موش‌های آلوده به *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشد. پس از سنتز نانوژل کیتوزان و تایید آن، بارگذاری وانکومایسین و IFN-γ در این نانوژل‌ها انجام و توسط آنالیز FTIR تایید شد. سپس، فعالیت ضدباکتریایی نانوژل‌ها ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در مورد نانوژل لود شده با وانکومایسین در pHهای ۶/۵ و ۷/۴، به ترتیب ۸ µg/ml و ۶۴ به‌دست آمد. MIC در مورد نانوژل کیتوزان و نانوژل لود شده با IFN-γ، ۱۰۲۴ و در مورد وانکومایسین آزاد، ۱ µg/ml در هر دو pH محاسبه شد. سپس، ۴۸ راس موش به ۶ گروه کنترل، MRSA، نانوژل، نانوژل دارو، نانوژل IFN-γ و نانوژل‌های (دارو و IFN-γ) تقسیم شدند. پس از آلوده‌شدن گروه‌ها (غیر از کنترل) با MRSA، ۱۰۰mg/kg از نانوژل، نانوژل دارو، نانوژل IFN-γ و نانوژل‌های (دارو و IFN-γ)، به ترتیب به گروه‌های ۳ تا ۶ اضافه شد. در ادامه، در ساعات ۶، ۱۲ و ۲۴، از هر گروه تعدادی موش بیهوش شدند و طحال آن‌ها جهت بررسی بیان ژن TNF-α به روش RT-PCR ارزیابی شد. بر طبق نتایج، در گروه‌های ۴، ۵ و ۶ در مقایسه با گروه MRSA، بیان ژن TNF-α پس از ۲۴ ساعت کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت تزریق همزمان نانوژل دارو و نانوژل IFN-γ در موش‌های آلوده تاثیر بسیار بیشتری در مقایسه با تزریق تکی هر کدام از این نانوژل‌ها دارد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین(MRSA)، نانوژل کیتوزان، وانکومایسین، اینترفرون گاما (IFN-γ)، فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α)

* j.arasteh@iauctb.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است. این مسئله سبب شده است محققان به دنبال جایگزینی موثر برای عوامل ضدمیکروبی همراه با عوارض جانبی کمتر باشند. از جنبه‌های پزشکی، توسعه‌ی مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها توسط میکرواورگانیسم‌های بیماری‌زا، به یک نگرانی جدی تبدیل شده است. مکانیسم‌های مقاومت ایجاد شده که منجر به بروز بیماری‌های عفونی می‌شوند، به دلایل مختلفی از جمله، عوامل آنزیمی و جهش‌های ژنتیکی رخ می‌دهد. این موضوع محققان را به طراحی روشی جدید برای ترکیبات ضدمیکروبی در برابر عوامل بیماری‌زا و کنترل عفونت‌ها ترغیب کرده است (1).

در طی سال‌های اخیر، به سبب ایجاد سویه‌های مقاوم ویروس‌ها، باکتری‌ها، پاتوژن‌های قارچی و پروتوزوا، مقاومت میکروبی نسبت به درمان‌های بالینی مشاهده می‌شود. وجود این سویه‌های مقاوم، منجر به صرف هزینه‌های فزاینده برای سلامتی، افزایش ریسک مرگ‌ومیر و کاهش امید به زندگی می‌شود. برای مقابله با این مساله، نیاز به یک روش جایگزین و عوامل ضدمیکروبی ایمن در برابر سوپرباگ‌هایی از ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزا وجود دارد (2).

در حال حاضر، از میان بسیاری از میکروارگانیسم‌هایی که سویه‌های مقاوم را بروز می‌دهند، *استافیلوکوکوس اورئوس* چالشی جدی برای متخصصان مراقبت‌های بهداشتی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن گرم مثبت است و به‌طور معمول در مجاری تنفسی، زخم‌های باز و مجاری ادراری از جمله موارد دیگر یافت می‌شود (3). این باکتری به دلیل پتانسیل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، یک پاتوژن خطرناک است (4). به‌عنوان مثال، به‌دست آوردن ژن mecA و تولید یک پروتئین خاص بنام پروتئین اتصالی به پنی‌سیلین[1] (PBP2a)، *استافیلوکوکوس اورئوس* را تقویت کرده و در برابر بتالاکتام‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز (متی‌سیلین یا اگزاسیلین) مقاومت می‌کند (5). *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)[2] به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، مانند متی‌سیلین و اگزاسیلین و همچنین، سایر کلاس‌های اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله ماکرولیدها و برخی فلوروکینولون‌ها مقاوم است. MRSA به ایجاد عفونت‌های مزمن زخم معروف است و شایع‌ترین پاتوژن در عفونت‌های پوست و بافت نرم است (6). برای مبارزه با افزایش تعداد عفونت‌های MRSA ، همچنان وانکومایسین به طور گسترده استفاده می‌شود. به‌گونه‌ای که،با وجود سابقه کاربرد ۴۰ ساله، وانکومایسین همچنان درمان استاندارد عفونت‌های ناشی از MRSA است. با این‌حال، گزارش‌هایی در مورد شکست‌های بالینی درمان با وانکومایسین به دلیل ظهور *استافیلوکوکوس اورئوس* با کاهش حساسیت به وانکومایسین منتشر شده است (7).

امروزه تجویز سایتوکاین‌ها یک استراتژی درمانی مهم و موثر برای تحریک سیستم ایمنی و شروع پاسخ‌های محافظتی است که به تعدیل جنبه‌های مختلف پاسخ‌های ایمنی منجر می‌شود (8,9). IFN-γ با توجه به عملکردهای حیاتی و محافظتی ایمنی متعددی خود، یکی از سایتوکاین‌های قوی است که می‌تواند به‌صورت سیستمیک یا موضعی تجویز شود (10). این سایتوکاین عمدتا توسط سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) تولید می‌شود و مجموعه وسیعی از پاسخ‌های پاتولوژیک را تنظیم می‌کند (11). IFN-γ یک سایتوکاین پیش‌التهابی قوی در طول ایجاد واکنش‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی در عفونت‌های میکروبی است (12). این سایتوکاین با توجه به توانایی‌های تعدیل‌کنندگی ایمنی خود، به یک جایگزین درمانی جذاب تبدیل شده است (10).

در عصر حاضر، اولویت حوزه پژوهش، طراحی راهکارهایی برای بهبود پتانسیل ضدمیکروبی عوامل درمانی است (13). سیستم‌های تحویل نانو، یکی از راهکارهای مناسب برای طراحی آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشند تا با باکتری‌های مقاوم به صورت کارآمدتری مبارزه کنند (14).

[1] Penicillin-binding protein 2a

[2] methicillin-resistant Staphylococcus aureus

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

سیستم‌های تحویل آنتی‌بیوتیک با استفاده از نانوذرات مزایای متعددی از جمله توزیع قابل کنترل و نسبتا یکنواخت در بافت هدف، بهبود حلالیت داروهای کم محلول در آب، افزایش نیمه عمر دارو و زمان گردش سیستمیک وکاهش تعداد دفعات و دوزهای تجویز دارو دارد که منجر به کاهش عوارض جانبی و بهبود شرایط بیمار می‌شود (15).

کیتوزان، یک بیوپلیمر طبیعی فراوان مشتق‌شده از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان به دلیل زیست‌سازگاری[1] عالی، زیست تخریب‌پذیری[2]، غیرسمی بودن و خواص ضدمیکروبی ذاتی، به طور موفقیت‌آمیزی در نانوپزشکی به عنوان انواع سیستم‌های تحویل داروهای درمانی، پروتئین‌ها و ژن‌ها استفاده شده است (16,17).

فعال شدن مکانیسم‌های پیش‌التهابی پدیده‌ای معمول در سپسیس[3] است که ممکن است با تغییر در بیان برخی بیومارکرها منعکس شود. سپسیس و شوک سپتیک ایجاد شده توسط برخی میکروارگانیسم‌ها با تغییر در میزان برخی سایتوکاین‌ها، به ویژه فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF-α) و برخی اینترلوکین‌ها همراه است (18). بنابراین، در این پژوهش پس از آلوده کردن موش‌ها با *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، تاثیر نانوژل‌های کیتوزان لود شده با وانکومایسین و اینترفرون گاما بر بیان ژن TNF-α بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سنتز کیتوزان

کیتوزان (شرکت سیگما)، به نسبت ۰/۳ ٪ (w/v) در محلول آبی اسید استیک ۱ ٪ (v/v) تهیه شد و در تمام شب هم زده شد. سپس، pH محلول با استفاده از NaOH 10N بر روی۴/۶ تنظیم شد. تری‌پلی‌فسفات (TPP) نیز در آب خالص با غلظت ۰/۳ ٪ (w/v) حل شد. در مرحله بعد، محلول تری‌پلی‌فسفات با نسبت ۵:۱ و به‌صورت قطره قطره به محلول کیتوزان که همزمان تحت امواج فراصوت بود، اضافه شد. محلول کیتوزان–TPP به‌دست آمده سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min) شد تا نانوذرات از سوسپانسیون استخراج شود. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب با هم‌زدن، دوباره در آب پراکنده شد. سپس، محلول مجددا تحت امواج فراصوت در محدوده ۳۵ KHZ به مدت ۲ min با توان ۲۴۰ W (Elma Sonic,E30H, Germany) قرار داده شد و مرحله سانتریفیوژ تکرار شد. در نهایت رسوب در دمای ۸۰- °C منجمد و توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی[4] (مدل FD-5005-HS-BT- صنعت پرداز دنا- ایران) خشک شد.

بارگذاری داروی وانکومایسین و اینترفرون گاما

ابتدا، ۱ cc داروی وانکومایسین (۲ mg/ml) در ۱۰ cc آب دیونیزه حل شد. سپس، ۱۰۰ mg نانوژل کیتوزان داخل این محلول ریخته شد و ۲۴ h روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۲۴ h تمام محلول داخل یک فالکون ریخته شد و دوبار در دور ۱۴۰۰۰ RPM و دمای ۲۴ °C سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی آن داخل فالکون دیگر برای سنجش مقدار بارگذاری دارو ریخته شد و رسوب حاصل که شامل نانودارو بود جمع‌آوری و توسط دستگاه FT-IR آنالیز شد.

در مورد اینترفرون گاما (شرکت R&D) نیز ۵ cc نانوژل کیتوزان را در یک بشر ریخته و پس از اضافه کردن ۱۰۰ µl اینترفرون گاما (۲۰۰ µg/ml)، دو بار سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ RPM انجام شد. سپس، مایع رویی و رسوب حاصل در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. در پایان، برای به قطعیت رسیدن بارگذاری اینترفرون گاما در نانوژل، از دستگاه FTIR استفاده شد.

تست آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوژل کیتوزان

ابتدا ۴۰ cc بافر PBS (pH 7.4) آماده شد. مقدار ۳ ml نانوژل لود شده با وانکومایسین در کیسه دیالیز با کات‌اف ۲۰ KD ریخته شد و به مدت ۷۲ h در دمای ۳۷ °C، داخل ظرف حاوی بافر PBS قرار داده شد. سپس، مایع جمع‌آوری

[1] biocompatibility
[2] biodegradability
[3] sepsis
[4] Freeze dryer

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

شده از محیط بیرونی کیسه دیالیز توسط دستگاه اسپکتوفتومتر فلورسنس (Hitachi F-4600, Japan) آنالیز شد. در مورد اینترفرون گاما نیز مراحل مانند بالا انجام شد. اما در مورد اینترفرون گاما، زمان انکوباسیون ۲۴ h بود و آنالیز آن توسط کیت الایزای سنجش اینترفرون گاما ساخت شرکت R&D در طول موج ۴۰۵ nm و توسط الایزا ریدر (TECAN– آمریکا) انجام شد. جمع‌آوری مایع حاوی وانکومایسین و اینترفرون گاما تا ۲۴ h و در زمان‌های مختلف انجام شد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوژل‌های ساخته شده

میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] (SEM)

برای بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM KYKY- مدل EM3200 استفاده شد. تصاویر این نانوژل‌ها پس از پوشش با طلا در یک شتاب ولتاژ ۳۰ kV تحت خلاء و تحت فشار (۵–۱۰ Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثبت شد.

پراکندگی نوری دینامیک[2] (DLS)

روش پراکندگی نوری دینامیک، روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون می باشد. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون استفاده می‌شود. برای اندازه‌گیری قطر نانوذرات و پراکندگی آن‌ها، پس از حل کردن نانوژل‌ها در آب، مخلوط حاصل در حمام آب توسط امواج فراصوت به‌صورت پراکنده درآمدند و توسط دستگاه DLS (Malvern instrument Ltd.,UK) آنالیز شدند.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[3] (FTIR)

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، به مطالعه‌ی گروه‌های عملکردی موجود در نانوذرات می‌پردازد. بنابراین، این تکنیک برای تحلیل کیفی مواد استفاده می‌شود. هر گروه عاملی تابع، دارای یک یا چند پیک مشخص در اعداد مختلف موج هستند. برای آنالیز FTIR، نیاز به آماده‌سازی نمونه‌ها بود. بنابراین، مقدار بسیار ناچیزی (حدود ۱ mg یا کمتر) از نمونه جامد کاملا پودر شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ با KBr کاملا خشک، مخلوط شد. سپس، برای ساخت یک قرص شفاف، مقداری از آن‌ها در قالب فلزی مخصوص ریخته شد و با دستگاه پرس هیدرولیک، تحت فشار قرار داده شد. برای خوانش نمونه‌ها در ناحیه طیف IR میانه ($400–4000\ cm^{-1}$)، از دستگاه JASCO FTIR-410 استفاده شد.

بررسی اثر ضدمیکروبی نانوژل‌ها در In vitro به روش میکرو دایلوشن

برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی نانوژل‌ها از روش حداقل غلظت مهاری (MIC) استفاده شد. در این مطالعه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (ATCC 33591)استفاده شد. برای این هدف، غلظت 5×10^5 CFU/ml از این باکتری تهیه شد و با دارو و نانوژل‌ها در غلظت‌های مختلف (۰/۵–۱۰۲۴ µg/ml) و در دو pH ۷/۴ و ۶/۵ تیمار شدند. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت دارو و نانوژل‌های مهارکننده رشد باکتری مورد آزمایش، تعیین شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

طراحی آزمایش

فاکتور TNF-α، به‌عنوان یک واسطه‌ی پیش‌التهابی قوی، پس از عفونت برای تقویت دفاع میزبان توسط ماکروفاژها تولید می‌شود. تولید TNF-α به شدت در سطوح مختلف تنظیم می‌شود تا التهاب پاتولوژیک و در نتیجه آسیب بافتی به حداقل برسد (19). از سویی فعال شدن مداوم نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها، باعث تنظیم مثبت سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF-α، می‌شود (20). بنابراین، در این پژوهش نیز از MRSA به‌عنوان یه محرک برای ماکروفاژها استفاده شد تا با بررسی بیان TNF-α، میزان تاثیرگذاری نانوژل‌ها بررسی شد.

[1] Scanning electron microscope
[2] Dynamic light scattering
[3] Fourier transform infrared spectroscopy

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

برای انجام این کار، ۴۸ راس موش Bulb/c (۷–۸ هفته‌ای، gr ۲۰–۲۵) از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شدند. موش‌ها در قفس‌هایی با دسترسی آزاد به رژیم غذایی استاندارد و آب و در یک دوره h ۱۲ تاریکی و h ۱۲ روشنایی با دما و رطوبت کنترل شده نگهداری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران به شماره IR.IAU.SRB.REC.1398.101. تایید شده است. موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه (هر گروه ۸ موش) تقسیم شدند:

گروه ۱: گروه کنترل سالم؛ گروه ۲: گروه موش‌های آلوده به باکتری MRSA؛ گروه ۳: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوژل کیتوزان؛ گروه ۴: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوژل دارو ؛گروه ۵: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوژل اینترفرون گاما؛ گروه ۶: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوژل دارو و نانوژل اینترفرون گاما.

به موش‌های گروه‌های ۲ تا ۶، ۵۰ µl سوسپانسیون MRSA در نرمال سالین حاوی 10^6 CFU (به ازای هر موش) به صورت صفاقی تزریق شد. به موش‌های گروه اول ۵۰ µl سرم فیزیولوژی تزریق شد. ۶ ساعت بعد از آلوده کردن موش‌ها، به گروه‌های ۲ تا ۶، ۵۰ µl از نانوژل‌های مختلف (غلظت ۱۰۰mg/kg) به‌صورت صفاقی شد. در نهایت در ساعات ۶، ۱۲ و ۲۴، از هر گروه تعدادی موش بیهوش شده و طحال آن‌ها جهت بررسی بیان ژن TNF-α ارزیابی شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل طحال موش‌های تیمار شده با استفاده از محلول RNSol (شرکت روژه تکنولوژی- ایران) و طبق دستورالعمل این شرکت استخراج شد. برای بررسی کمی RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo scientific- آمریکا) استفاده شد. غلظت RNA در جذب نوری ۲۶۰ nm به ۲۸۰ بین ۱/۹ µg/µl تا ۲/۱ بود که این امر نشان دهنده خلوص RNA استخراج شده بود. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-ROSET (شرکت روژه تکنولوژی- ایران) انجام شد.

جدول۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real time PCR

ژن	توالی پرایمر
TNF-α	Forward: 5'- CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT -3′ Revers: 5'- TCATACCAGGGCTTGAGCTCA -3'
B-actin	Forward: 5’- AGAGCTATGAGCTGCCTGACG -3’ Revers: 5’- CTGCATCCGGTCAGCGATAC -3’

جدول۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش Real-time PCR

مراحل چرخه	دما	زمان	تعداد چرخه
مرحله واسرشت اولیه[1]	۹۴ °C	۴ min	۱
مرحله واسرشت[2]	۹۴ °C	۳۰ s	۴۰
مرحله اتصال[3]	۶۰ °C	۳۰ s	
مرحله طویل شدن[4]	۷۲ °C	۲۰ s	

[1] Initial denaturation
[2] Denaturation
[3] Anneealing
[4] Elongation

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

ارزیابی بیان ژن TNF-α با روش Real-time PCR

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش Real Time PCR با پرایمرهای مربوط به TNF-α و β-actin (به‌عنوان ژن مرجع) انجام شد. توالی ژن‌های TNF-α و β-actin از سایت NCBI به‌دست آمد و پرایمرهای forward و reverse آن‌ها توسط شرکت پیشگام طراحی و سنتز شد (جدول ۲). برای اطمینان از توالی پرایمرها و عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیر اختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، پرایمرها در سایت NCBI، BLAST شدند.

برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه Roche استفاده شد. در این پژوهش از کیت SYBR Premix Ex TaqTM II شرکت TaKaRa استفاده شد. ابتدا مواد کیت (شامل EX TaqTM ، dNTP، Mgcl2، SYBER Green I) به‌صورت master mix تهیه شد. سپس، برای انجام Real Time PCR مخلوطی حاوی، ۱۰λ master mix ، λ ۰/۵ از پرایمرهای forward و reverse ، ۲ λ cDNA و ۷ λ آب DEPC تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی در جدول ۳ نمایش داده شده است. تمام واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد و تغییرات بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری متغیرهای کمی، با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism 9 و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه* و T-test با $p< 0.05$ انجام شد که تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد.

نتایج

بررسی نتایج DLS

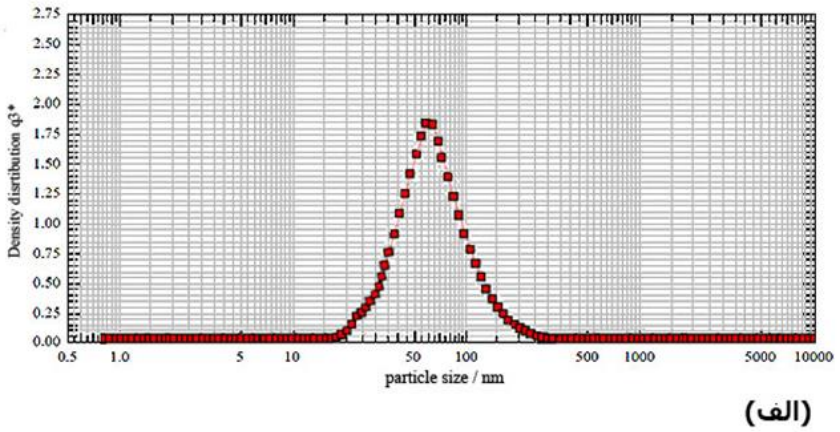
همانطور که عنوان شد، تکنیک DLS، برای تعیین اندازه ذرات استفاده می‌شود. در این پژوهش، شکل ۱-الف، خروجی DLS مربوط به نانوژل کیتوزان را نشان می‌دهد که توزیع ذرات آن برابر با ۶۷/۷۵ nm تخمین زده شده است. در مورد نانوژل لودشده با وانکومایسین، توزیع ذرات برابر با ۲۰۸/۹۸ nm محاسبه شد (شکل ۱-ب) و توزیع ذرات نانوژل لود شده با اینترفرون گاما برابر ۱۶۵/۲۵ nm به‌دست آمد (شکل ۱-ج).

آنالیز FTIR

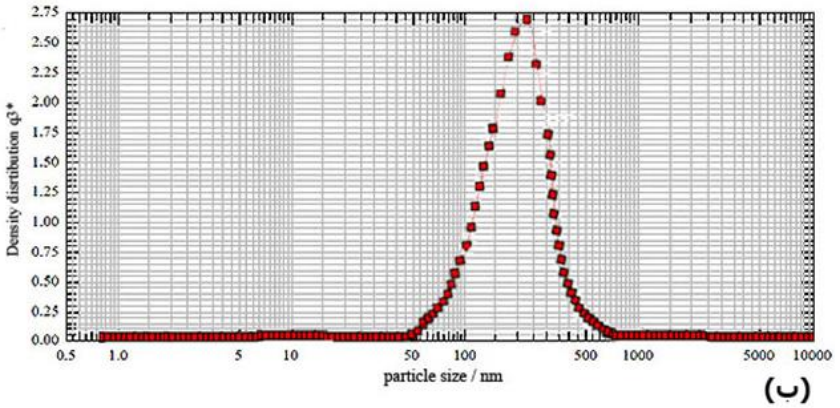
برای نشان دادن برهمکنش اجزای مختلف تشکیل‌دهنده نانوذرات با یکدیگر از روش FTIR استفاده شد. مشخصات ساختاری به‌دست آمده برای نانوژل کیتوزان، نانوژل دارو و نانوژل IFN-γ در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی‌ها نشان داد که وجود پیک در طول موج ۳۴۵۴ nm بیانگر وجود عامل هیدروکسیل (OH) می‌باشد. همچنین، وجود پیک در طول موج ۲۹۲۳ nm نشان‌دهنده ارتعاش کششی CH گروه های متیل و متیلن در نانوژل کیتوزان است (شکل ۲-الف). در مورد وانکومایسین نیز وجود پیک‌های ۱۶۶۵ و ۱۲۲۶ مربوط به گروه‌های C=O و هیدروکسیل فنولیک، نشان دهنده لود شدن این دارو در نانوژل کیتوزان می‌باشد(شکل ۲-ب). از آنجایی‌که وجود پیوندهای آمیدی (آمیدهای I، II و III) و گروه کربوکسیل در FTIR نشان دهنده وجود پروتئین است؛ بنابراین، در مورد نانوژل اینترفرون گاما نیز پیک‌های ۱۲۲۷ و ۱۷۷۹ نیز با گروه آمید III و گروه کربوکسیل مرتبط هستند(شکل ۲-ج).

* One-way ANOVA

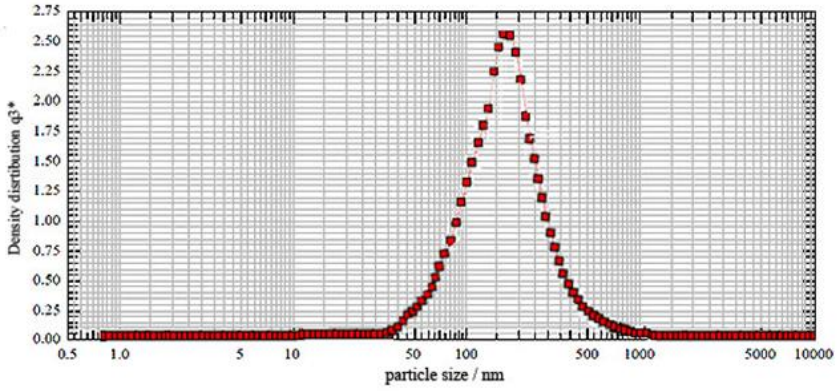
[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



(الف)



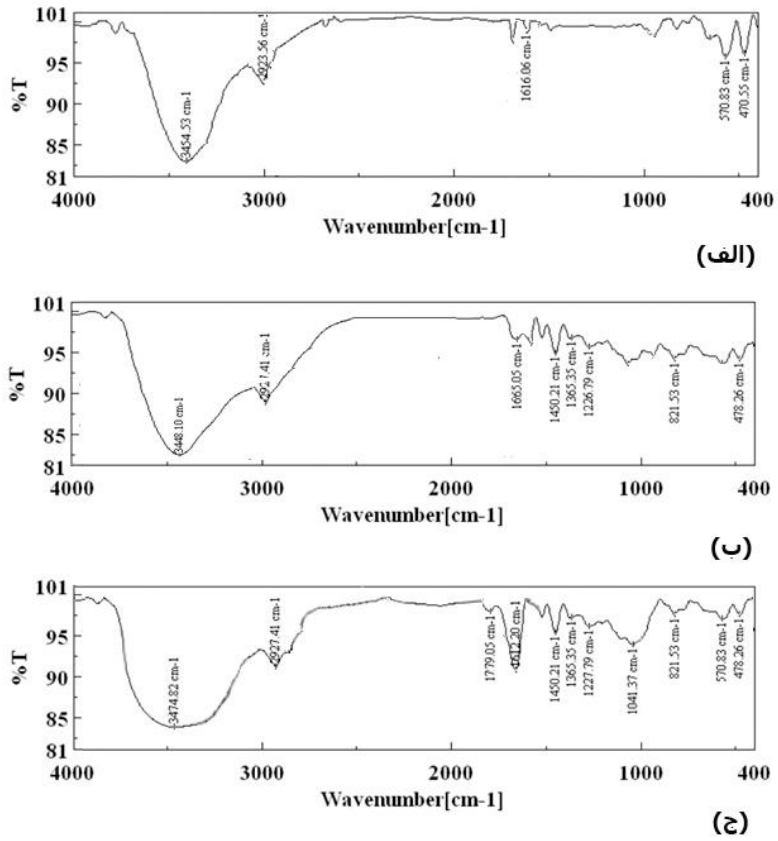
(ب)



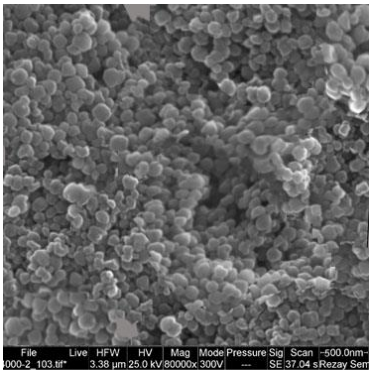
(ج)

شکل ۱. نتـایج دسـتگاه DLS (الف) توزیع ذرات مربوط به نانوژل کیتوزان (ب) نانوژل لودشده با دارو و (ج) نانوژل لود شده با اینترفرون گاما

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل۲. FTIR مربوط به (الف) نانوژل کیتوزان (ب) نانوژل لودشده با دارو و (ج) نانوژل لود شده با اینترفرون گاما



شکل۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از نانوژل کیتوزان لودشده با اینترفرون گاما. اندازه نانوذرات حدود nm ۱۷۰ و شکل آن‌ها کروی می‌باشد.

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نانوژل‌ها از نظر مورفولوژی از یکنواختی و کروی بودن مناسبی برخوردار هستند (شکل ۳).

نتایج بارگذاری و آزادسازی داروی وانکومایسین و اینترفرون گاما

مقدار بارگذاری وانکومایسین و IFN-γ با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس تعیین شد. مقدار اولیه وانکومایسین

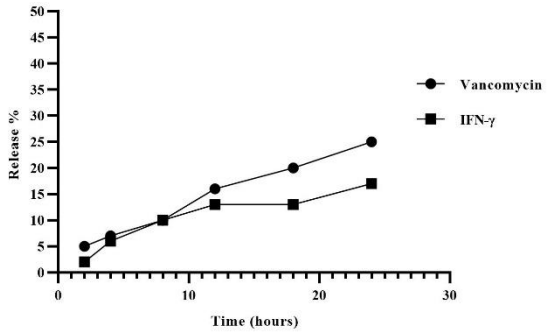
[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

برای بارگذاری ppm ۵۰۰ و مقدار لودنشده، ppm ۶۵/۴۵ محاسبه شد. بنابراین، میزان بارگذاری دارو در نانوژل کیتوزان ppm ۴۳۴/۵۵ بود که نشان‌دهنده راندمان بارگذاری ٪ ۸۶/۹۱ است.در مورد IFN-γ نیز با توجه به اینکه غلظت اولیه و لود نشده آن ppm ۳۰۰ و ۹۲/۴۵ بود، مقدار بارگذاری شده این سیتوکین ppm ۲۰۷/۵۵ محاسبه شد، به‌طوری‌که راندمان بارگذاری این سایتوکاین نیز ٪ ۶۹/۱۸ به‌دست آمد.

آزادسازی وانکومایسین و IFN-γ از نانوژل‌های کیتوزان در pH ۷/۴ و تا h ۲۴ ارزیابی شد. نتایج نشان داد با گذشت زمان، وانکومایسین و IFN-γ بیشتری از نانوژل‌ها آزاد می‌شوند (شکل ۴).

نتیجه تست MIC

بر طبق نتایج به‌دست آمده از تست MIC، حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) وانکومایسین در برابر سویه MRSA، µg/ml ۱ است. این امر نشان می‌دهد که این سویه‌ها به وانکومایسین حساس هستند و برای آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی فرمولاسیون‌های موردنظر مناسب می‌باشند. فعالیت ضدباکتریایی نانوژل کیتوزان و نانوژل‌های لودشده با وانکومایسین و اینترفرون گاما برابر سویه MRSA با استفاده از روش میکرودایلوشن آزمایش شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در مورد نانوژل کیتوزان و نانوژل کیتوزان لود شده با اینترفرون گاما، حداقل غلظت مهارکنندگی µg/ml ۱۰۲۴ در هر دو pH ۶/۵ و ۷/۴ محاسبه شد. در مورد نانوژل کیتوزان لود شده با وانکومایسین در pH ۶/۵ و ۷/۴، حداقل غلظت مهارکنندگی به ترتیب µg/ml ۸ و ۶۴ به‌دست آمد (جدول ۲).



شکل٤. نمودار مربوط به آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوژل در h ٢٤

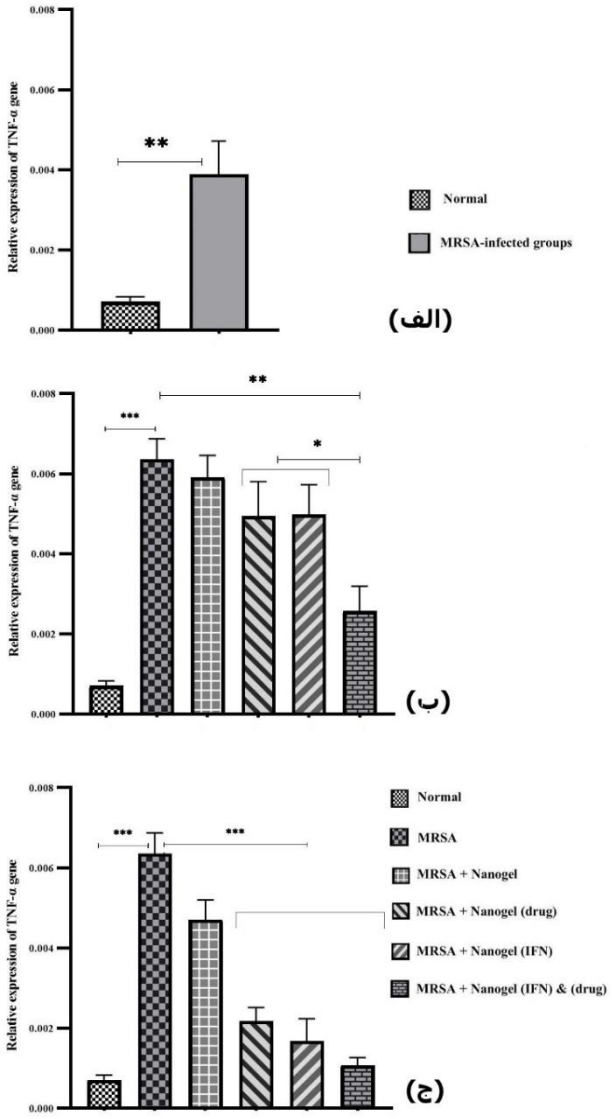
جدول۲. بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) وانکومایسین و نانوژل‌های مختلف در pHهای ٦/٥ و ٧/٤

فرمولاسیون	MIC (µg/ml)	
	pH	
	7.4	6.5
وانکومایسین	1	1
نانوژل کیتوزان	1024	1024
نانوژل دارو	64	8
نانوژل اینترفرون گاما	1024	1024

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

بررسی بیان ژن TNF-α با روش Real-time PCR

بیان ژن TNF-α در موش‌های سالم و آلوده با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) با آنالیز Real-time PCR ارزیابی شد. در این پژوهش بیان این سایتوکاین در سه زمان متفاوت (۶ h، ۱۲ و ۲۴) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد ۶ h پس از آلوده‌کردن موش‌ها با MRSA، میزان بیان ژن TNF-α در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری($p<0.05$) می‌یابد (شکل ۵–الف). پس از ۱۲ h از زمان آلوده شده موش‌ها، در گروه MRSA بیان ژن در مقایسه با زمان ۶ h، باز هم افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. در گروه‌هایی که نانوژل‌های مختلف را دریافت کرده بودند به مرور کاهش بیان این ژن در مقایسه با گروه MRSA مشاهده شد که حتی در گروهی که به طور همزمان نانوژل دارو و نانوژل اینترفرون گاما را دریافت نمودند، این کاهش به‌صورت معنی‌دار ($p<0.05$) نمایش داده شده است (شکل ۵–ب). شکل ۵–ج نیز کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) بیان ژن TNF-α را در گروه‌های نانوژل دارو، نانوژل اینترفرون گاما و نانوژل‌های دارو و اینترفرون گاما را در مقایسه با گروه MRSA پس از ۲۴ h نشان می‌دهد. همچین گروه دریافت کننده نانوژل کیتوزان (نانوژل خالی) هم در مقایسه با گروه MRSA کاهش در بیان ژن مشاهده شد ولی این کاهش معنی‌دار نبود.



شکل۵. بررسی بیان ژن TNF-α در زمان‌های مختلف. (الف) ٦ h، (ب) ١٢ h و (ج) ٢٤ h پس از آلوده شدن با MRSA

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

بحث

مقاومت چند دارویی یک مشکل روبه رشد در سراسر جهان می‌باشد. استفاده‌ی گسترده و غیرقابل کنترل از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مقاومت در برابر عوامل ضدمیکروبی شایع برای بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی شده و تهدید جدی برای سلامتی است. به‌عنوان مثال در برخی کشورها ، ۲۵٪ از ایزوله‌های استافیلوکوکی خطرناک، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) است (21). وانکومایسین همچنان به‌طورگسترده در برابر عفونت‌های MRSA استفاده می‌شود (7) ولی امروزه دوزهای وانکومایسین مورد نیاز برای درمان MRSA در حال افزایش است علاوه براین، استفاده از رژیم درمانی وانکومایسین با دوز بالا در برابر عفونت‌های شدید تأثیر کمی بر ریشه‌کنی MRSAدارد. در نتیجه، چشم انداز عوارض جانبی مرتبط با درمان (به ویژه سمیت کلیوی) باید برای ادامه درمان موفق در نظر گرفته شود (22,23). از سویی، استفاده از سایتوکاین‌ها نیز یک راهکار درمانی مهم و موثر برای تحریک سیستم ایمنی و شروع پاسخ‌های محافظتی است. با وجود محبوبیت زیاد تجویز سایتوکاین در ایمونوتراپی سرطان، اما قابلیت استفاده از چنین رویکردی به دلیل عوارض جانبی آن محدود شده است. زیرا تجویز سیستمیک ممکن است منجر به عواقب نامطلوب شود. با این‌حال، در برخی بیماران این نوع درمان، مزیت‌های بسیار زیادی داشته است و پیش‌آگهی بهتری را در شرایط خاص به‌دست آورده‌اند(9). کپسوله کردن مواد دارویی در نانوذرات پلیمری می‌تواند اثرات جانبی آن‌ها را کاهش دهد و باعث بهبود اثرات درمانی آن‌ها شود و کیتوزان به‌عنوان یک نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله‌کردن بهتر، رهاسازی کنترل‌شده و سمیت پایین در این زمینه بسیار مورد توجه است(24). به‌نظر می‌رسدکیتوزان با بار مثبت می‌تواند با غشای سلولی با بار منفی تعامل کرده و اتصالات محکم بین سلول‌های اپی‌تلیال را باز کند و باعث انتقال ماکرومولکول‌ها در بافت اپی‌تلیال شود. بنابراین، می‌تواند جذب داروهای ماکرومولکول آبدوست را افزایش دهد(25). در این پژوهش نیز از ترکیب درمانی وانکومایسین و اینترفرون گاما در قالب نانوژل کیتوزان استفاده شد.

یکی از موارد مورد بررسی در این پژوهش، بحث آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوژل کیتوزان بود. نتایج نشان داد به مرور زمان میزان رها سازی این دارو از نانوذرات افزایش می‌یابد. Lee و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای نشان دادند که آزاد شدن وانکومایسین از هیبریدهای کیتوزان–سلیکا زروژل[1] به مرور زمان افزایش می‌یابد به‌طوری‌که بعد از ۳۱ روز بیشترین میزان رهاسازی این دارو از این هیبریدها را مشاهده کردند(26). همچنین، در مطالعه دیگری، قرجی و همکاران نیز نشان دادند که آزاد شدن اینترفرون گاما از نانوژل هیالورونیک اسید در مدت h ۲۴ به مرور افزایش می‌یابد (27).

بر طبق مطالعات گذشته نانوذرات کیتوزان به تنهایی بر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها اثر کشندگی دارند و می‌توانند انواع مختلف باکتری را سرکوب کنند(28) همچنین، مطابق با مطالعات این نانوذرات می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب ضد استافیلوکوکی به ویژه، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین فعالیت ضدباکتریایی داشته باشند (29,30). نتایج این پژوهش نیز بیان کرد که بیان ژن TNF-α در گروهی که تنها نانوژل کیتوزان را دریافت کرده بودند در مقایشه با گروه MRSA کاهش داشت. از سویی، نشان داده شده که ماکروفاژهای صفاقی تحریک شده با *استافیلوکوکوس اورئوس*، گونه‌های فعال اکسیژن (مانند سوپراکسید، اکسید نیتریک و پراکسید هیدروژن) و سایتوکاین‌های مختلف از جمله TNF-α و IL-1β تولید می‌کنند (31). این سایتوکاین‌ها نیز به‌ترتیب به گیرنده‌های مربوطه خود، TNFR1 و IL-1R در سطح سلول متصل می‌شوند و انتقال سیگنال التهابی را آغاز کرده و بیان سایتوکاین‌ها و سایر ژن‌های التهابی را تنظیم می‌کنند(32). بنابراین، کاهش یا افزایش بیان ژن TNF-α به نوعی با عفونت استافیلوکوک ارتباط مستقیم دارد. در این مطالعه، همچنین از IFN-γ جهت درمان موش‌های آلوده به

[1] Silica xerogel-chitosan hybrids

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

MRSA استفاده شد. نتایج گروه‌هایی که نانوژل اینترفرون گاما را دریافت کرده بودند، نشان داد این سایتوکاین به تنهایی نیز می‌تواند در روند بهبود و کاهش بیان ژن TNF-α نقش داشته باشد. این امر می‌تواند با عملکرد ماکروفاژها به عنوان یکی از منابع مهم تولید TNF-α مرتبط باشد(33). از سویی، عملکرد باکتری‌کشی ماکروفاژها در دفاع در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، با در نظر گرفتن پتانسیل *استافیلوکوکوس اورئوس* در تداوم در بخش‌های اندوسیتی ماکروفاژ به خوبی بررسی شده است(34). مطالعات مختلفی نشان داده است که اثربخشی فعالیت باکتری‌کشی ماکروفاژ علیه استافیلوکوک در شرایط آزمایشگاهی با سیگنال‌دهی IFN-γ افزایش می‌یابد(35). همچنین، نقش سیگنال‌دهی IFN-γ و IL-17 و مسیرهای مرتبط در عفونت‌های استافیلوکوکی در انسان گزارش شده است. مطالعات نشان داده بیمارانی که دچار اختلالات التهابی و نقص‌های ایمنی هستند، حساسیت بیشتری نسبت به عفونت‌های استافیلوکوکی دارند (36). همچنین، در این مطالعه نشان داده شد که با گذشت زمان میزان اثربخشی IFN-γ در گروهی که نانوژل لودشده با اینترفرون گاما دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه MRSA افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. از سویی، مطالعات In vitro در این پژوهش نیز نشان داد MIC نانوژل‌های لود شده با وانکومایسین در pH ۶/۵ در مقایسه با pH ۷/۴ پایین‌تر می‌باشد. مطالعات مختلفی در این زمینه انجام شده است که نشان می‌دهد درpH های پایین‌تر، آزاد شدن دارو بیشتر اتفاق می‌افتد. Kalhapure و همکاران با استفاده از AGS ، نانوپارتیکل‌های کیتوزان حساس به pH بارگذاری شده با وانکومایسین (CSSNPs) را سنتز کردند. آن‌ها افزایش آزادسازی وانکومایسین ازCSSNPها را در pH ۶/۵ در مقایسه با pH ۷/۴ مشاهده کردند (14). Karakeçili و همکاران (۲۰۱۹) نیز یک سیستم حامل دارو برای استفاده در درمان عفونت‌های استخوانی مانند استئومیلیت تهیه کردند. آن‌ها وانکومایسین را به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک در نانوکریستال‌های ZIF8 برای آزادسازی کنترل شده حساس به pH (ZIF8/VAN) بارگذاری کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که وانکومایسین بارگذاری شده در نانوکریستال‌های ZIF8 به روش pH کنترل شده از داربست‌های کیتوزان آزاد می‌شوند. همچنین، مشاهده شد که حدود ۷۰٪ از وانکومایسین در طول ۸ h در pH ۵/۴ آزاد شد، در حالی‌که، این مقدار در pH ۷/۴ در حدود ۵۵٪ بود که نشان دهنده افزایش آزادشدن وانکومایسین در شرایط اسیدی می‌باشد (37). بنابراین، به نظر می‌رسد pH، محرک جذابی برای تحویل هدفمند آنتی‌بیوتیک باشد، زیرا برخی از باکتری‌ها مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) و باکتری‌های عامل پوسیدگی، در جایگاه عفونت ناشی از پاسخ‌های ایمنی میزبان و متابولیسم باکتری، اسید تولید می‌کنند (14).

اثر فارماکولوژیک وانکومایسین به دلیل توانایی آن در مهار بیوسنتز دیواره‌سلولی باکتریایی است. وانکومایسین به طور غیرکووالانسی به یک پیش‌ساز در بیوسنتز دیواره‌سلولی باکتری، متصل شده و سنتز پپتیدوگلیکان را مهار می‌کند. این عمل، مراحل ترانس‌گلیکوزیلاسیون و ترانس‌پپتیداسیون را مهار می‌کند. از آنجا که، باکتری‌ها باید ترانس‌گلیکوزیلاسیون و ترانس‌پپتیداسیون را در طول مونتاژ دیواره سلولی انجام دهند، بنابراین، دیواره سلولی ناپایدار و لیز می‌شود. علاوه بر این، وانکومایسین نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری را افزایش می‌دهد و سنتز RNA را مهار می‌کند(38). از سویی، IFN-γ یک فعال‌کننده اصلی ماکروفاژها است و توانایی آنها را در کشتن میکروارگانیسم ها با تولید واسطه‌هایی،از جمله تولید اکسید نیتریک و سوپراکسید افزایش می‌دهد (39). همچنین، IFN-γ سبب القا چندین سیستم efflux می‌شود که پاتوژن‌ها را از کاتیون‌های ضروری محروم می‌کند و در نتیجه رشد آنها را در میزبان محدود می‌کند (40). از سویی دیگر، بر طبق مطالعات، نانوذرات کیتوزان به دلیل ویژگی خاص نانوذرات، فعالیت ضدباکتریایی بالاتری نسبت به کیتوزان از خود نشان می دهند. بار منفی سطح باکتری‌ها محل هدف پلی‌کاتیون است. بنابراین، نانوذرات پلی‌کاتیونی کیتوزان با چگالی بار سطحی بالاتر نسبت به خود کیتوزان با باکتری‌ها تعامل دارند

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

و می‌توانند به شدت بر روی سطح باکتری‌ها جذب شوند. این موضوع سبب کاهش ضخامت دیواره سلولی، و در نتیجه آزادسازی پتاسیم درون سلولی و نشت اجزای داخل سلولی می‌شود و به این ترتیب، باکتری‌ها را از بین می‌برند (16). بنابراین، عنوان شده است که بارگذاری وانکومایسین در بسترهای نانو، یک سیستم دارورسانی موثر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به دارو می‌باشد که می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی بالایی داشته باشد (16). بنابراین، با توجه به خصوصیات خود نانوذرات و همچنین عملکرد ضدمیکروبی وانکومایسین و تاثیر اینترفرون گاما بر افزایش فعالیت ماکروفاژها، در این پژوهش نیز گروه‌هایی که نانوژل‌های دارو و اینترفرون گاما را به‌طور همزمان دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری در بیان ژن TNF-α نشان دادند. این موضوع بیانگر اثر سینرژیک این دو ترکیب در روند بهبودی موش‌های آلوده با MRSA می‌باشد.

نتیجه‌گیری

امروزه، با توجه به افزایش مقاومت دارویی، استفاده از روش‌های ترکیبی درمانی کاربرد فراوانی پیدا کرده است. همچنین، دوزهای بالای داروها و سایتوکاین‌ها به‌صورت آزاد منجر به ایجاد عوارض جانبی در میزبان می‌شود. بنابراین، استفاده از نانوذارت به‌عنوان حامل به شدت در حال گسترش است. نتایج این پژوهش نشان داد که قرار دادن داروی وانکومایسین و اینترفرون گاما در پوشش کیتوزان و تزریق تکی یا همزمان آن‌ها در موش‌های آلوده با MRSA می‌تواند بیان ژن TNF-α را کاهش دهد. این مورد خود نیز می‌تواند یکی از نشانه‌های بهبودی در این موش‌ها باشد.

منابع

1. Singh P, Kim YJ, Singh H, Wang C, Hwang KH, Farh MEA, et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. International Journal of Nanomedicine. 2015;10.

2. Yah CS, Simate GS. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015;23

3. Hibbitts A, Lucía A, Serrano-Sevilla I, De Matteis L, McArthur M, De La Fuente JM, et al. Co-delivery of free vancomycin and transcription factor decoy-nanostructured lipid carriers can enhance inhibition of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). PLoS ONE. 2019;14(9).

4. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: The role of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2015;13

5. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2016;11.

6. Abramowicz M, Zuccotti G, Pflomm JM. Drugs for MRSA skin and soft-tissue infections. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2014; 312

7. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. The Lancet. 2013;382

8. Bhutiani N, Li Q, Anderson CD, Gu T, Egilmez NK. Combined oral cytokine therapy effectively treats colon cancer in a murine model. Cancer Res. 2017; 77 (13_Supplement):1605.

9. Ardolino M, Raulet DH. Cytokine therapy restores antitumor responses of NK cells rendered anergic in MHC I-deficient tumors. OncoImmunology. 2016;5(1).

10. Yang PM, Chou CJ, Tseng SH, Hung CF. Bioinformatics and in vitro experimental analyses identify the selective therapeutic potential of interferon gamma and apigenin against cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Oncotarget. 2017;8(28).

11. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. Nature Reviews Immunology. 2015;15.

12. Swindle EJ, Brown JM, Rådinger M, Deleo FR, Metcalfe DD. Interferon-γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to Staphylococcus aureus. Immunology. 2015;146(3).

13. Ghaffar I, Imran M, Perveen S, Kanwal T, Saifullah S, Bertino MF, et al. Synthesis of chitosan coated metal organic frameworks (MOFs) for increasing vancomycin bactericidal potentials against resistant S. aureus strain. Materials Science and Engineering C. 2019;105.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

antibacterial properties. Carbohydrate Polymers. 2017;157.

25. Yang Z, Liu J, Gao J, Chen S, Huang G. Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation. International Journal of Pharmaceutics. 2015;495(1).

26. Lee EJ, Jun SH, Kim HE, Kim HW, Koh YH, Jang JH. Silica xerogel-chitosan nano-hybrids for use as drug eluting bone replacement. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010;21(1).

27. Faraji N, Esrafili A, Esfandiari B, Abednezhad A, Naghizadeh M, Arasteh J. Synthesis of pH-sensitive hyaluronic acid nanogels loaded with paclitaxel and interferon gamma: Characterization and effect on the A549 lung carcinoma cell line. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021;205.

28. de Paz LEC, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on Streptococcus mutans biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 2011;77(11).

29. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha MS. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. Fibers and Polymers. 2017;18(2).

30. Costa EM, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro PM, Veiga M, et al. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. Materials Science and Engineering C. 2017;79.

31. Dey S, Bishayi B. Killing of Staphylococcus aureus in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin. Journal of Inflammation Research. 2015;8.

32. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. 2014;1843.

33. Popa C, Netea MG, Van Riel PLCM, Van Der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF-α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. Journal of Lipid Research. 2007;48.

34. Nalos M, Santner-Nanan B, Parnell G, Tang B, McLean AS, Nanan R. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2012;185.

35. Smith RP, Baltch AL, Ritz WJ, Michelsen PB, Bopp LH. IFN-γ enhances killing of methicillin-

14. Kalhapure RS, Jadhav M, Rambharose S, Mocktar C, Singh S, Renukuntla J, et al. pH-responsive chitosan nanoparticles from a novel twin-chain anionic amphiphile for controlled and targeted delivery of vancomycin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017;158.

15. Honary S, Ebrahimi P, Hadianamrei R. Optimization of particle size and encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology. Pharmaceutical Development and Technology. 2014;19(8).

16. Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P, Roy S. In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant Staphylococcus aureus. International Journal of Pharmaceutics. 2012;436(1–2).

17. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. Marine Drugs. 2015;13.

18. Spyropoulos V, Chalkias A, Georgiou G, Papalois A, Kouskouni E, Baka S, et al. Initial Immune Response in Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Candida albicans Bacteremia. Inflammation. 2020;43(1).

19. Gao F, Reynolds MB, Passalacqua KD, Sexton JZ, Abuaita BH, O'Riordan MXD. The Mitochondrial Fission Regulator DRP1 Controls Post-Transcriptional Regulation of TNF-α. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021;10.

20. Sim H, Jeong D, Kim HI, Pak S, Thapa B, Kwon HJ, et al. Cd11b deficiency exacerbates methicillin-resistant staphylococcus aureus-induced sepsis by upregulating inflammatory responses of macrophages. Immune Network. 2021;21(2).

21. Saeb ATM, Alshammari AS, Al-Brahim H, Al-Rubeaan KA. Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. Scientific World Journal. 2014;

22. Tongsai S, Koomanachai P. The safety and efficacy of high versus low vancomycin trough levels in the treatment of patients with infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta-analysis. BMC Research Notes. 2016;9(1).

23. Hermsen ED, Hanson M, Sankaranarayanan J, Stoner JA, Florescu MC, Rupp ME. Clinical outcomes and nephrotoxicity associated with vancomycin trough concentrations during treatment of deep-seated infections. Expert Opinion on Drug Safety. 2010;9(1).

24. Li P, Zhao J, Chen Y, Cheng B, Yu Z, Zhao Y, et al. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

resistant Staphylococcus aureus by human monocytes more effectively than GM-CSF in the presence of daptomycin and other antibiotics. Cytokine. 2010;51(3).

36. Barin JG, Talor M V., Schaub JA, Diny NL, Hou X, Hoyer M, et al. Collaborative Interferon-γ and Interleukin-17 Signaling Protects the Oral Mucosa from Staphylococcus aureus. American Journal of Pathology. 2016;186(9).

37. Karakeçili A, Topuz B, Korpayev S, Erdek M. Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds. Materials Science and Engineering C. 2019;105.

38.Dasgupta A. Advances in antibiotic measurement. In: Advances in Clinical Chemistry. 2012;56.

39. Yamaguchi R, Kawata J, Yamamoto T, Ishimaru Y, Sakamoto A, Ono T, et al. Mechanism of interferon-gamma production by monocytes stimulated with myeloperoxidase and neutrophil extracellular traps. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2015;55(2).

40. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases. Vol. 9, Biomolecular Concepts. 2018;9.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

Synergistic effect of vancomycin and interferon-gamma-loaded chitosan nanogels on TNF-α gene expression in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) -infected mice

Sahar Arkiya[1], **Javad Arasteh[1*]**, Ardeshir Hesampour1, Ali Esrafili2

[1] Department of Biology, Faculty of science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Increasing antibiotic resistance of Staphylococcus aureus has led to attempts to discover new antimicrobial agents, including the use of nanoparticles. The aim of this study was to synthesize vanosomycin and interferon gamma (IFN-γ) loaded chitosan nanogels and to evaluate the expression of TNF-α gene in mice infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). After synthesis and confirmation of chitosan nanogels, loading of vancomycin and IFN-γ in these nanogels was performed and confirmed by FTIR analysis. Then the antibacterial activity of nanogels was evaluated. At pHs of 6.5 and 7.4, the minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin-loaded nanogels was 8 and 64 µg/ml, respectively. The MIC was calculated to be 1024 µg/ml for chitosan nanogels and IFN-γ-loaded nanogels and 1 µg/ml for free vancomycin. Then 48 mice were divided into 6 groups: control, MRSA, nanogels, drug nanogels, IFN-γ nanogels and nanogels (drug and IFN-γ). After infecting the groups (except control) with MRSA, 100 mg/kg of nanogels, drug nanogels, IFN-γ nanogels and nanogels (drug and IFN-γ) were added to groups 3 to 6, respectively. Finally, at 6, 12 and 24 hours, a number of mice from each group were anesthetized and their spleen was evaluated for TNF-α gene expression by RT-PCR. The results showed that in groups 4, 5 and 6, compared to the MRSA group, TNF-α gene expression showed a significant decrease after 24 hours. Therefore, it could be concluded that simultaneous injection of drug nanogels and IFN-γ nanogels in infected mice is much more effective than single injection of each of these nanogels.

Keywords: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Chitosan nanogels, Vancomycin, Interferon-gamma (IFN-γ), Tumor necrosis factor (TNF-α)

* j.arasteh@iauctb.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]