



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

سحر اركيا^۱، جواد آراسته^{۱*}، اردشیر حسامپور^۱، علی اسرافیلی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، 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 ضد میکروبی جدید برانگیخته است. یکی از این روش‌های نوین، استفاده از نانوذرات است. هدف از این مطالعه، سنتز نانوذلهای کیتوزان لود شده با وانکومایسین و اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) و بررسی بیان ژن $TNF-\alpha$ در موش‌های آلوده به *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشد. پس از سنتز نانوذلهای کیتوزان و تایید آن، بارگذاری وانکومایسین و $IFN-\gamma$ در این نانوذلهای انجام و توسط آنالیز FTIR تایید شد. سپس، فعالیت ضدباکتریایی نانوذلهای ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در مورد نانوذلهای لود شده با وانکومایسین در pHهای ۶/۵ و ۷/۴، به ترتیب ۸ و ۶۴ $\mu g/ml$ به دست آمد. MIC در مورد نانوذلهای کیتوزان و نانوذلهای لود شده با $IFN-\gamma$ ۱۰۲۴ و در مورد وانکومایسین آزاد، ۱ $\mu g/ml$ در هر دو pH محاسبه شد. سپس، ۴۸ راس موش به ۶ گروه کنترل، MRSA، نانوذلهای، نانوذلهای دارو، نانوذلهای $IFN-\gamma$ و نانوذلهای (دارو و $IFN-\gamma$) تقسیم شدند. پس از آلوده شدن گروه‌ها (غیر از کنترل) با MRSA، ۱۰۰ mg/kg از نانوذلهای، نانوذلهای دارو، نانوذلهای $IFN-\gamma$ و نانوذلهای (دارو و $IFN-\gamma$)، 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 $TNF-\alpha$ به روش RT-PCR ارزیابی شد. بر طبق نتایج، در گروه‌های ۴، ۵ و ۶ در مقایسه با گروه MRSA، بیان ژن $TNF-\alpha$ پس از ۲۴ ساعت کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت تزریق همزمان نانوذلهای دارو و نانوذلهای $IFN-\gamma$ در موش‌های آلوده تاثیر بسیار بیشتری در مقایسه با تزریق تکی هر کدام از این نانوذلهای دارد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، نانوذلهای کیتوزان، وانکومایسین، اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$)، فاکتور نکروز دهنده تومور ($TNF-\alpha$)

* j.arasteh@iauctb.ac.ir

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است. این مسئله سبب شده است محققان به دنبال جایگزینی موثر برای عوامل ضد میکروبی همراه با عوارض جانبی کمتر باشند. از جنبه‌های پزشکی، توسعه‌ی مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها توسط میکرواورگانیزم‌های 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 آنتزیمی و جهش‌های ژنتیکی رخ می‌دهد. این موضوع محققان را به طراحی روشی جدید برای ترکیبات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی ایمن در برابر سوپراباگ‌هایی از ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزا وجود دارد (2).

در حال حاضر، از میان بسیاری از میکرواورگانیزم‌هایی 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 اتصال به پنی‌سیلین¹ (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 این حال، 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). $IFN-\gamma$ 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 عمدتاً توسط سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) تولید می‌شود و مجموعه وسیعی از پاسخ‌های پاتولوژیک را تنظیم می‌کند (11). $IFN-\gamma$ 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 ضد میکروبی عوامل درمانی است (13). سیستم‌های تحویل نانو، یکی از راهکارهای مناسب برای طراحی آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشد تا با باکتری‌های مقاوم به صورت کارآمدتری مبارزه کنند (14).

² methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

¹ Penicillin-binding protein 2a

محلول کیتوزان-TPP به دست آمده سانتریفیوژ (12000 rpm) به مدت 15 min شد تا نانوذرات از سوسپانسیون استخراج شود. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب با هم‌زدن، دوباره در آب پراکنده شد. سپس، محلول مجدداً تحت امواج فراصوت در محدوده 35 KHZ به مدت 2 min با توان 240 W (Elma Sonic, E30H, Germany) قرار داده شد و مرحله سانتریفیوژ تکرار شد. در نهایت رسوب در دمای 4°C -80 منجمد و توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی⁴ (مدل FD-5005-HS-BT- صنعت پرداز دنا- ایران) خشک شد.

بارگذاری داروی وانکومایسین و اینترفرون گاما

ابتدا، 1 cc داروی وانکومایسین (2 mg/ml) در 10 cc آب دیونیزه حل شد. سپس، 100 mg نانوذله کیتوزان داخل این محلول ریخته شد و 24 h روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار داده شد. پس از 24 h تمام محلول داخل یک فالكون ریخته شد و دوبار در دور 1400 RPM و دمای 4°C سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی آن داخل فالكون 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 5 cc نانوذله کیتوزان را در یک بشر ریخته و پس از اضافه کردن 100 µl اینترفرون گاما (200 µg/ml)، دو بار سانتریفیوژ در 1400 RPM انجام شد. سپس، مایع رویی و رسوب حاصل در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. در پایان، برای به قطعیت رسیدن بارگذاری اینترفرون گاما در نانوذله، از دستگاه FTIR استفاده شد.

تست آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوذله کیتوزان

ابتدا 40 cc بافر PBS (pH 7.4) آماده شد. مقدار 3 ml نانوذله لود شده با وانکومایسین در کیسه دیالیز با کاتاف KD 20 ریخته شد و به مدت 72 h در دمای 37°C داخل ظرف حاوی بافر PBS قرار داده شد. سپس، مایع جمع‌آوری

سیستم‌های تحویل آنتی‌بیوتیک با استفاده از نانوذرات مزایای متعددی از جمله توزیع قابل کنترل و نسبتاً یکنواخت در بافت هدف، بهبود حلالیت داروهای کم محلول در آب، افزایش نیمه عمر دارو و زمان گردش سیستمیک و کاهش 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 زیست‌سازگاری¹ عالی، زیست تخریب‌پذیری²، غیرسمی بودن و خواص ضد میکروبی 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 سپسیس³ 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- $TNF-\alpha$ (و برخی اینترلوکین‌ها همراه است (18)). بنابراین، در این پژوهش پس از آلوده کردن موش‌ها با استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، تاثیر نانوذله‌های کیتوزان لود شده با وانکومایسین و اینترفرون گاما بر بیان ژن $TNF-\alpha$ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سنتز کیتوزان

کیتوزان (شرکت سیگما)، به نسبت 0.3٪ (w/v) در محلول آبی اسید استیک 1٪ (v/v) تهیه شد و در تمام شب هم زده شد. سپس، pH محلول با استفاده از NaOH 10N بر روی 4/6 تنظیم شد. تری‌پلی‌فسفات (TPP) نیز در آب خالص با غلظت 0.3٪ (w/v) حل شد. در مرحله بعد، محلول تری‌پلی‌فسفات با نسبت 5:1 و به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان که همزمان تحت امواج فراصوت بود، اضافه شد.

³ sepsis

⁴ Freeze dryer

¹ biocompatibility

² biodegradability

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. جمع آوری مایع حاوی وانکومایسین و اینترفرون گاما تا ۲۴ h و در زمان‌های مختلف انجام شد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذلهای ساخته شده

میکروسکوپ الکترونی روبشی^۱ (SEM)

برای بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM KYKY-مدل EM3200 استفاده شد. تصاویر این نانوذلهای 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^۲ (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 می شود. برای اندازه گیری قطر نانوذرات و پراکندگی آنها، پس از حل کردن نانوذلهای در آب، مخلوط حاصل در حمام آب توسط امواج فراصوت به صورت پراکنده درآمدند و توسط دستگاه DLS (Malvern instrument Ltd., UK) آنالیز شدند.

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^۳ (FTIR)

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، به مطالعه گروه‌های عملکردی موجود در نانوذرات می پردازد. بنابراین، این تکنیک برای تحلیل کیفی مواد استفاده می شود. هر گروه عاملی تابع، دارای یک یا چند پیک مشخص در اعداد مختلف موج هستند. برای آنالیز FTIR

نیاز به آماده سازی نمونه ها بود. بنابراین، مقدار بسیار ناچیزی (حدود ۱ mg یا کمتر) از نمونه جامد کاملاً پودر شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ با KBr کاملاً 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 (۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹)، از دستگاه JASCO FTIR-410 استفاده شد.

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذلهای In vitro به روش میکرو دایلوژن

برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذلهای از روش حداقل غلظت مهارى (MIC) استفاده شد. در این مطالعه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (ATCC 33591) استفاده شد. برای این هدف، غلظت ۵×۱۰^۵ CFU/ml از این باکتری تهیه شد و با دارو و نانوذلهای 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 نانوذلهای مهارکننده رشد باکتری مورد آزمایش، تعیین شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

طراحی آزمایش

فاکتور TNF-α، به عنوان یک واسطه‌ی پیش التهابی قوی، پس از عفونت برای تقویت دفاع میزبان توسط ماکروفاژها تولید می شود. تولید TNF-α به شدت در سطوح مختلف تنظیم می شود 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 می شود (20). بنابراین، در این پژوهش نیز از MRSA به عنوان یک محرک برای ماکروفاژها استفاده شد تا با بررسی بیان TNF-α، میزان تاثیرگذاری نانوذلهای بررسی شد.

³ Fourier transform infrared spectroscopy

¹ Scanning electron microscope

² Dynamic light scattering

صورت صفاقی تزریق شد. به موش‌های گروه اول $50 \mu l$ سرم فیزیولوژی تزریق شد. ۶ ساعت بعد از آلوده کردن موش‌ها، به گروه‌های ۲ تا ۶، $50 \mu l$ از نانوذله‌های مختلف (غلظت $100 mg/kg$) به صورت صفاقی شد. در نهایت در ساعات ۶، ۱۲ و ۲۴، از هر گروه تعدادی موش بیهوش شده و طحال آن‌ها جهت بررسی بیان ژن $TNF-\alpha$ ارزیابی شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل طحال موش‌های تیمار شده با استفاده از محلول RNSol (شرکت روزه 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 $260 nm$ به $280 nm$ بین 1.9 تا 2.1 بود که این امر نشان دهنده خلوص RNA استخراج شده بود. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-ROSET (شرکت روزه تکنولوژی-ایران) انجام شد.

برای انجام این کار، ۴۸ راس موش Bulb/c (۷-۸ هفته‌ای، $20-25 gr$) از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شدند. موش‌ها در قفس‌هایی با دسترسی آزاد به رژیم غذایی استاندارد و آب و در یک دوره ۱۲ h تاریکی و ۱۲ h 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 نانوذله کیتوزان؛ گروه ۴: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوذله دارو؛ گروه ۵: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوذله اینترفرون گاما؛ گروه ۶: گروه موش‌های آلوده به باکتری همراه با نانوذله دارو و نانوذله اینترفرون گاما.

به موش‌های گروه‌های ۲ تا ۶، $50 \mu l$ سوسپانسیون MRSA در نرمال سالین حاوی $10^6 CFU$ (به ازای هر موش) به

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real time PCR

ژن	توالی پرایمر
$TNF-\alpha$	Forward: 5'- CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT -3' Revers: 5'- TCATACCAGGGCTTGAGCTCA -3'
B-actin	Forward: 5'- AGAGCTATGAGCTGCCTGACG -3' Revers: 5'- CTGCATCCGGTCAGCGATAC -3'

جدول ۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش Real-time PCR

مراحل چرخه	دما	زمان	تعداد چرخه
مرحله واسرشت اولیه ^۱	$94^{\circ}C$	۴ min	۱
مرحله واسرشت ^۲	$94^{\circ}C$	۳۰ s	۴۰
مرحله اتصال ^۳	$60^{\circ}C$	۳۰ s	
مرحله طولیل شدن ^۴	$72^{\circ}C$	۲۰ s	

^۱ Initial denaturation

^۲ Denaturation

^۳ Annealing

^۴ Elongation

خروجی DLS مربوط به نانوذله کیتوزان را نشان می‌دهد که توزیع ذرات آن برابر با ۶۷/۷۵ nm تخمین زده شده است. در مورد نانوذله لودشده با وانکومایسین، توزیع ذرات برابر با ۲۰۸/۹۸ nm محاسبه شد (شکل ۱-ب) و توزیع ذرات نانوذله لود شده با اینترفرون گاما برابر با ۱۶۵/۲۵ nm به دست آمد (شکل ۱-ج).

آنالیز FTIR

برای نشان دادن برهمکنش اجزای مختلف تشکیل دهنده نانوذرات با یکدیگر از روش FTIR استفاده شد. مشخصات ساختاری به دست آمده برای نانوذله کیتوزان، نانوذله دارو و نانوذله 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 نشان دهنده ارتعاش کششی CH گروه های متیل و متیلن در نانوذله 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 نانوذله کیتوزان می‌باشد (شکل ۲-ب). از آنجایی که وجود پیوندهای آمیدی (آمیدهای I، II و III) و گروه کربوکسیل در FTIR نشان دهنده وجود پروتئین است؛ بنابراین، در مورد نانوذله اینترفرون گاما نیز پیک‌های ۱۲۲۷ و ۱۷۷۹ نیز با گروه آمید III و گروه کربوکسیل مرتبط هستند (شکل ۲-ج).

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 (به عنوان ژن مرجع) انجام شد. توالی ژن‌های TNF- α و β -actin از سایت NCBI به دست 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 SYBER، MgCl₂، dNTP، EX TaqTM، Green I) به صورت master mix تهیه شد. سپس، برای انجام Real Time PCR مخلوطی حاوی، ۱۰ μ l master mix، ۲ μ l cDNA و ۷ μ l از پرایمرهای forward و reverse، ۲۰ μ l 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

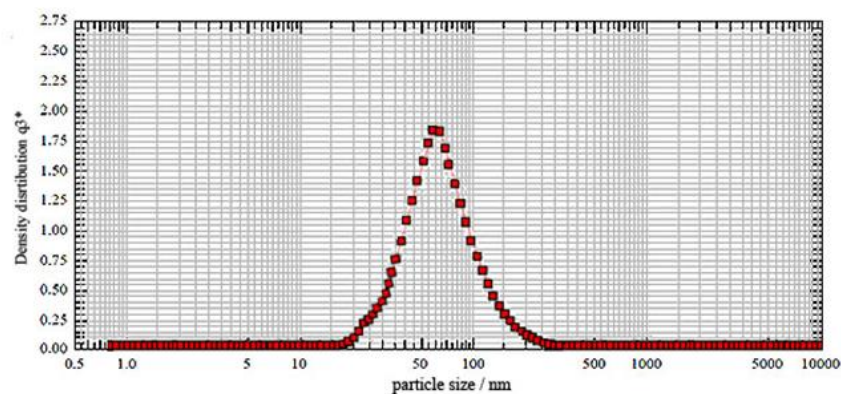
تجزیه و تحلیل آماری متغیرهای کمی، با استفاده از نرم افزار Graph pad prism 9 و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه* و T-test با $p < 0.05$ انجام شد که تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد.

نتایج

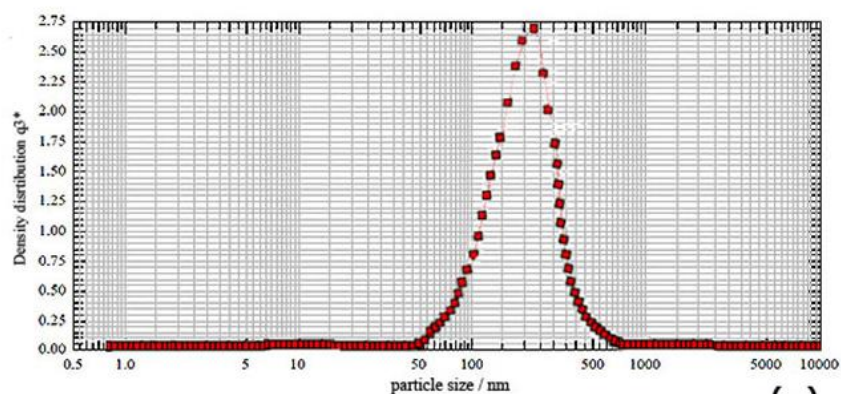
بررسی نتایج DLS

همانطور که عنوان شد، تکنیک DLS، برای تعیین اندازه ذرات استفاده می‌شود. در این پژوهش، شکل ۱-الف،

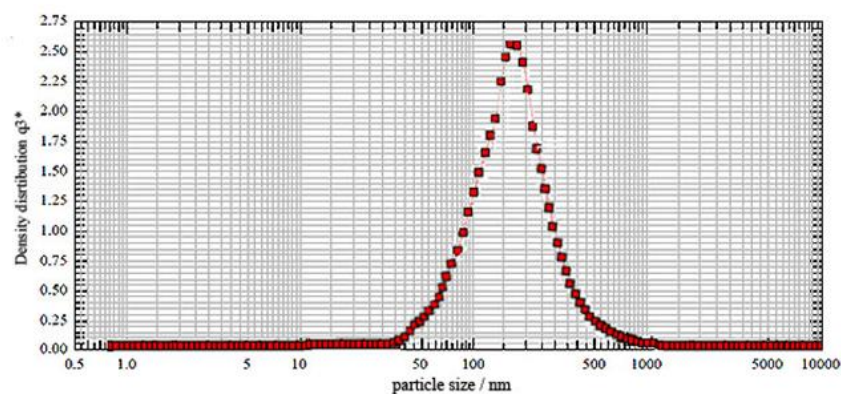
* One-way ANOVA



(الف)

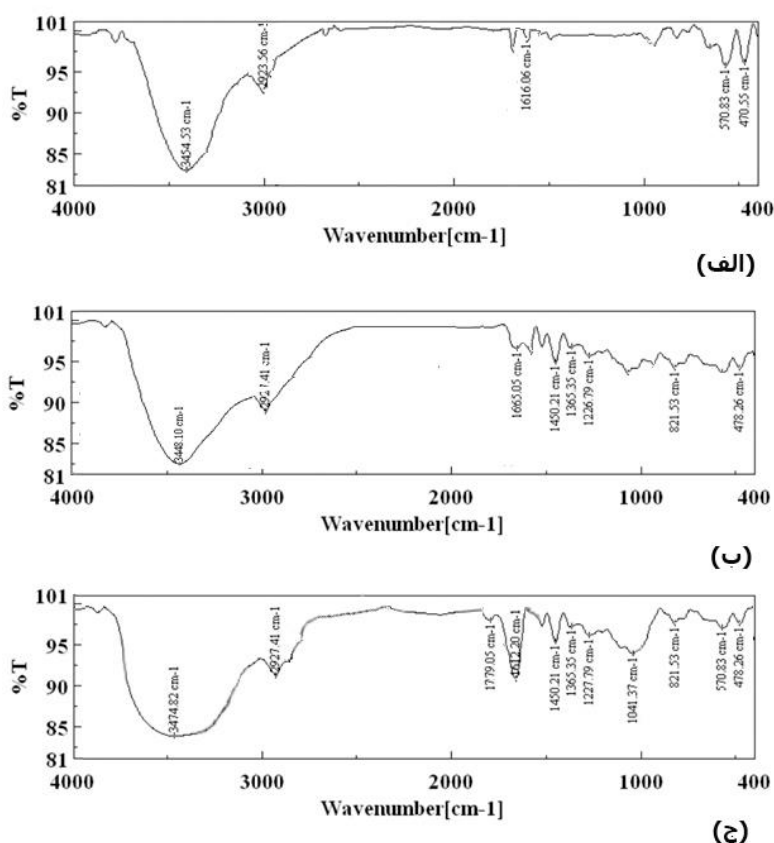


(ب)

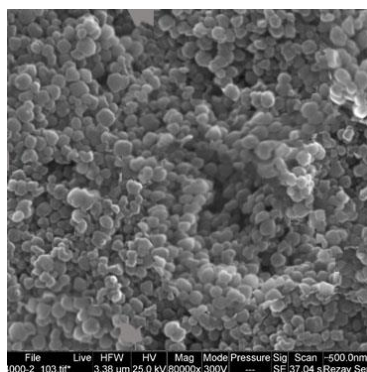


(ج)

شکل ۱. نتایج دستگاه DLS (الف) توزیع ذرات مربوط به نانوذله کیتوزان (ب) نانوذله لود شده با دارو و (ج) نانوذله لود شده با اینترفرون گاما



شکل ۲. FTIR مربوط به (الف) نانوذله کیتوزان (ب) نانوذله لودشده با دارو و (ج) نانوذله لود شده با اینترفرون گاما



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذله کیتوزان لودشده با اینترفرون گاما. اندازه نانوذرات حدود ۱۷۰ nm و شکل آن‌ها کروی می‌باشد.

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

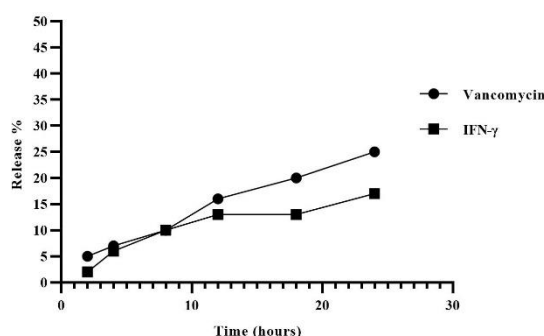
نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی

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

بر طبق نتایج به‌دست آمده از تست MIC، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) وانکومایسین در برابر سویه MRSA، $1 \mu\text{g/ml}$ است. این امر نشان می‌دهد که این سویه‌ها به وانکومایسین حساس هستند و برای آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی فرمولاسیون‌های موردنظر مناسب می‌باشند. فعالیت ضدباکتریایی نانوذله کیتوزان و نانوذله‌های لود شده با وانکومایسین و اینترفرون گاما برابر سویه MRSA با استفاده از روش میکرودايلوشن آزمایش شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در مورد نانوذله کیتوزان و نانوذله کیتوزان لود شده با اینترفرون گاما، حداقل غلظت مهارکنندگی $1024 \mu\text{g/ml}$ در هر دو pH 6/5 و 7/4 محاسبه شد. در مورد نانوذله کیتوزان لود شده با وانکومایسین در pH 6/5 و 7/4، حداقل غلظت مهارکنندگی به ترتیب $8 \mu\text{g/ml}$ و $64 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد (جدول ۲).

برای بارگذاری 500 ppm و مقدار لود نشده، $65/45 \text{ ppm}$ محاسبه شد. بنابراین، میزان بارگذاری دارو در نانوذله کیتوزان $434/55 \text{ ppm}$ بود که نشان‌دهنده راندمان بارگذاری $86/91 \%$ است. در مورد $IFN-\gamma$ نیز با توجه به اینکه غلظت اولیه و لود نشده آن 300 ppm و $92/45$ بود، مقدار بارگذاری شده این سیتوکین $207/55 \text{ ppm}$ محاسبه شد، به‌طوری‌که راندمان بارگذاری این سایتوکاین نیز $69/18 \%$ به‌دست آمد. آزادسازی وانکومایسین و $IFN-\gamma$ از نانوذله‌های کیتوزان در pH 7/4 و تا 24 h ارزیابی شد. نتایج نشان داد با گذشت زمان، وانکومایسین و $IFN-\gamma$ بیشتری از نانوذله‌ها آزاد می‌شوند (شکل ۴).

نتیجه تست MIC



شکل ۴. نمودار مربوط به آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوذله در 24 h

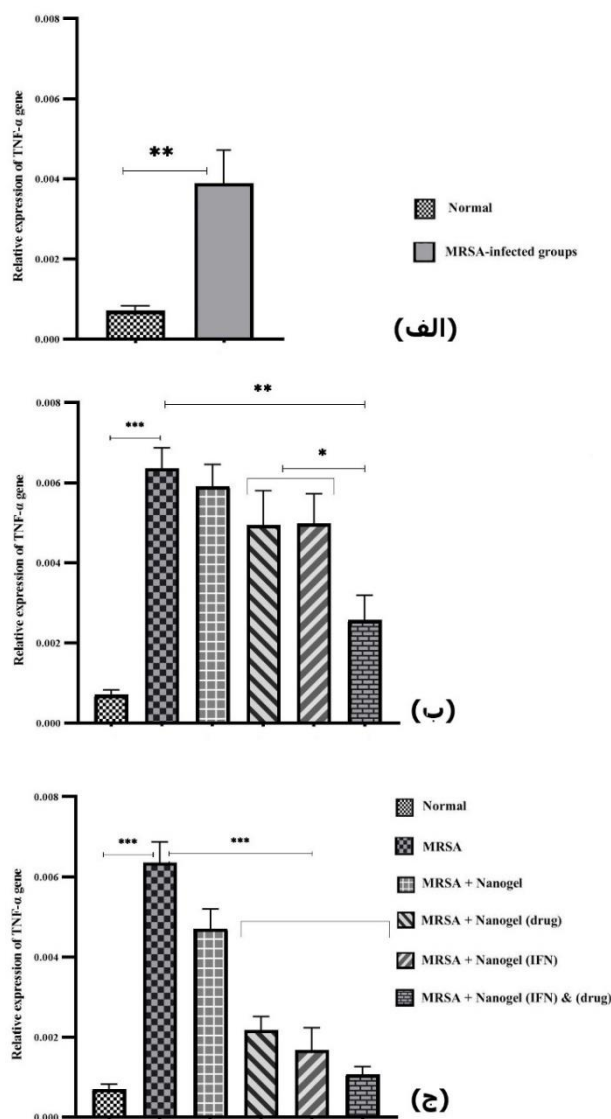
جدول ۲. بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) وانکومایسین و نانوذله‌های مختلف در pH 6/5 و 7/4

MIC ($\mu\text{g/ml}$)		فرمولاسیون
pH		
6.5	7.4	
1	1	وانکومایسین
1024	1024	نانوذله کیتوزان
8	64	نانوذله دارو
1024	1024	نانوذله اینترفرون گاما

کرده بودند به مرور کاهش بیان این ژن در مقایسه با گروه MRSA مشاهده شد که حتی در گروهی که به طور همزمان نانوذله دارو و نانوذله اینترفرون گاما را دریافت نمودند، این کاهش به صورت معنی دار ($p < 0.05$) نمایش داده شده است (شکل ۵-ب). شکل ۵-ج نیز کاهش معنی دار ($p < 0.05$) بیان ژن $TNF-\alpha$ را در گروه های نانوذله دارو، نانوذله اینترفرون گاما و نانوذله های دارو و اینترفرون گاما را در مقایسه با گروه MRSA پس از ۲۴ h نشان می دهد. همچنین گروه دریافت کننده نانوذله کیتوزان (نانوذله خالی) هم در مقایسه با گروه MRSA کاهش در بیان ژن مشاهده شد ولی این کاهش معنی دار نبود.

بررسی بیان ژن $TNF-\alpha$ با روش Real-time PCR

بیان ژن $TNF-\alpha$ در موش های سالم و آلوده با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) با آنالیز Real-time PCR ارزیابی شد. در این پژوهش بیان این سایتوکاین در سه زمان متفاوت (۶، ۱۲ و ۲۴ h) اندازه گیری شد. نتایج نشان داد ۶ h پس از آلوده کردن موش ها با MRSA، میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری ($p < 0.05$) می یابد (شکل ۵-الف). پس از ۱۲ h از زمان آلوده شده موش ها، در گروه MRSA بیان ژن در مقایسه با زمان ۶ h، باز هم افزایش معنی داری را نشان می دهد. در گروه هایی که نانوذله های مختلف را دریافت



شکل ۵. بررسی بیان ژن $TNF-\alpha$ در زمان های مختلف. (الف) ۶ h، (ب) ۱۲ h و (ج) ۲۴ h پس از آلوده شدن با MRSA

بحث

مقاومت چند دارویی یک مشکل روبه رشد در سراسر جهان می‌باشد. استفاده‌ی گسترده و غیرقابل کنترل از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی 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 به‌طور گسترده در برابر عفونت‌های MRSA استفاده می‌شود (7) ولی امروزه دوزهای وانکومایسین مورد نیاز برای درمان MRSA در حال افزایش است علاوه بر این، استفاده از رژیم درمانی وانکومایسین با دوز بالا در برابر عفونت‌های شدید تأثیر کمی بر ریشه‌کنی MRSA دارد. 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 این حال، 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 کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در این زمینه بسیار مورد توجه است (24). به‌نظر می‌رسد کیتوزان با بار مثبت می‌تواند با غشای سلولی با بار منفی تعامل کرده و اتصالات محکم بین سلول‌های اپی تلیال را باز کند و باعث انتقال ماکرومولکول‌ها در بافت اپی تلیال شود. بنابراین، می‌تواند جذب داروهای ماکرومولکول

آبدوست را افزایش دهد (25). در این پژوهش نیز از ترکیب درمانی وانکومایسین و اینترفرون گاما در قالب نانوذله کیتوزان استفاده شد.

یکی از موارد مورد بررسی در این پژوهش، بحث آزادسازی وانکومایسین و اینترفرون گاما از نانوذله کیتوزان بود. نتایج نشان داد به مرور زمان میزان رهاسازی این دارو از نانوذرات افزایش می‌یابد. Lee و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای نشان دادند که آزاد شدن وانکومایسین از هیبریدهای کیتوزان-سلیکا زروزل^۱ 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 نانوذله هیالورونیک اسید در مدت 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 $TNF-\alpha$ در گروهی که تنها نانوذله کیتوزان را دریافت کرده بودند در مقایسه 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 $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ 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 $TNF-\alpha$ به نوعی با عفونت استافیلوکوک ارتباط مستقیم دارد. در این مطالعه، همچنین از $IFN-\gamma$ جهت درمان موش‌های آلوده به

¹ Silica xerogel-chitosan hybrids

MRSA استفاده شد. نتایج گروه‌هایی که نانوزل اینترفرون گاما را دریافت کرده بودند، نشان داد این سایتوکاین به تنهایی نیز می‌تواند در روند بهبود و کاهش بیان ژن $\text{TNF-}\alpha$ نقش داشته باشد. این امر می‌تواند با عملکرد ماکروفاژها به عنوان یکی از منابع مهم تولید $\text{TNF-}\alpha$ 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 اندوستی ماکروفاژ به خوبی بررسی شده است (34). مطالعات مختلفی نشان داده است که اثربخشی فعالیت باکتری‌کشی ماکروفاژ علیه *استافیلوکوک* در شرایط آزمایشگاهی با سیگنال‌دهی $\text{IFN-}\gamma$ افزایش می‌یابد (35). همچنین، نقش سیگنال‌دهی $\text{IFN-}\gamma$ 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 $\text{IFN-}\gamma$ در گروهی که نانوزل 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 نانوزل‌های لود شده با وانکومایسین در pH 6/5 در مقایسه با pH 7/4 پایین‌تر می‌باشد. مطالعات مختلفی در این زمینه انجام شده است که نشان می‌دهد در pH‌های 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 از CSSNP‌ها را در pH 6/5 و در مقایسه با pH 7/4 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 به عنوان 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 5/4 آزاد شد، در حالی که، این مقدار در pH 7/4 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 متی‌سیلین (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 دیواره سلولی باکتریایی است. وانکومایسین به طور غیر کووالانسی به یک پیش‌ساز در بیوسنتز دیواره سلولی باکتری، متصل شده و سنتز پپتیدوگلیکان را مهار می‌کند. این عمل، مراحل ترانس‌گلیکوزیلایسیون و ترانس‌پپتیداسیون را مهار می‌کند. از آنجا که، باکتری‌ها باید ترانس‌گلیکوزیلایسیون 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، $\text{IFN-}\gamma$ یک فعال‌کننده اصلی ماکروفاژها است و توانایی آن‌ها را در کشتن میکروارگانیسم‌ها با تولید واسطه‌هایی، از جمله تولید اکسید نیتریک و سوپراکسید افزایش می‌دهد (39). همچنین، $\text{IFN-}\gamma$ 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 می‌دهند. 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

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.

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 وانکومايسين در بسترهای نانو، یک سیستم دارورسانی موثر برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو می‌باشد که می‌تواند فعالیت ضد میکروبی بالایی داشته باشد (16). بنابراین، با توجه به خصوصیات خود نانوذرات و همچنین عملکرد ضد میکروبی وانکومايسين و تاثیر اينترفرون گاما بر افزایش فعالیت ماکروفاژها، در این پژوهش نیز گروه‌هایی که نانوذله‌های دارو و اينترفرون گاما را به‌طور همزمان دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری در بیان ژن $TNF-\alpha$ 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 نانوذرات به‌عنوان حامل به شدت در حال گسترش است. نتایج این پژوهش نشان داد که قرار دادن داروی وانکومايسين و اينترفرون گاما در پوشش کیتوزان و تزریق تکی یا همزمان آن‌ها در موش‌های آلوده با MRSA می‌تواند بیان ژن $TNF-\alpha$ 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

- 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, Esrafil 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. Hermesen 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

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.

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

Sahar Arkiya¹, **Javad Arasteh**^{1*}, Ardeshir Hesampour¹, Ali Esrafilizadeh²

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 vancomycin 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 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The MIC was calculated to be 1024 $\mu\text{g/ml}$ for chitosan nanogels and IFN- γ -loaded nanogels and 1 $\mu\text{g/ml}$ 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