www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 65, No.5, P: 2091-2100
Nov –Jan 2023

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره ۵
آذر-دی ۱۴۰۱، صفحه ۲۱۰۰-۲۰۹۱

مقاله اصلی

بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس لاکتوفرین+نقره بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوز، استافیلوکوکوس اورئوس، آسینتوباکتر بومانی و استرپتوکوکوس پیوژنز*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۷

سمیرا کدوغنی ثانی[۱]
مجید جمشیدیان مجاور[۲]
حمیدرضا فرزین[۲*]
محسن نعیمی پور[۳]
محدثه امیری[۴]

[۱]*دانش آموخته ی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، ایران.*
[۲]*استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.*
[۳]*مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار ، سبزوار ، ایران*
[۴]*دانش آموخته کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.*

Email: hrfarzin@yahoo.com

خلاصه

مقدمه: لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین و یکی از مهم‌ترین بیواکتیوهای شیر است که فعالیت ضدباکتری، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدانگلی دارد. پپتیدهای ضد میکروبی به علت برخورداری از خصوصیات و ویژگی‌های مناسب مانند کشندگی سریع، طیف وسیع فعالیت و همچنین اثر بخش آن‌ها نسبت به به مقاومت دارویی، در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش کار: هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس لاکتوفرین نقره بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا ،استافیلوکوکوس اورئوس، آسینتوباکتر بومانی و استرپتوکوکوس پیوژنز* می باشد.

بدین منظور در ابتدا نانوذره نقره بر روی لاکتوفرین بارگذاری شد. سپس جهت تایید بارگذاری نانوذرات نقره بر روی لاکتوفرین، پتانسیل زتای توسط دستگاه تعیین پتانسیل زتا اندازه گیری شد. همچنین با کمک طیف سنجی رامان، FTIR و میکروسکوپ الکترونی روبشی خصوصیات این نانوکمپلکس بررسی گردید. سپس اثر نانوکمپلکس لاکتوفرین+نقره بر روی سلول‌ها بررسی شد تا سمیت این ترکیب بر روی سلول ها مشخص گردد. خاصیت ضدباکتریایی نانوکمپلکس لاکتوفرین+نقره بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس*، باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* و باکتری *آسینتوباکتر بومانی* به روش های تست MTT، تست های MIC،MBC و انتشار در حفره آگار بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که نانوکمپلکس لاکتوفرین+نقره بیشترین اثر کشندگی را بر باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* داشته است و بر باکتری *آسینتوباکتر بومانی* کمترین اثر را داشته است.

نتیجه گیری: سنتز کمپلکس نانوذرات نقره-لاکتوفرین می‌تواند در زمینه پزشکی و صنایع غذایی به عنوان عامل ضد میکروبی نوآورانه، اقتصادی قابل استفاده باشد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، نقره، *استافیلوکوکوس ارئوس، سودوموناس آئروژینوزا، استرپتوکوکوس پیوژنز، آسینتوباکتر بومانی.*

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها از مشکلات پیش روی علم پزشکی می‌باشد. بررسی الگوی حساسیت باکتری‌ها و آشنایی با مقاومت‌های رایج در هر منطقه جهت اتخاذ تدابیر درمانی مناسب کمک کننده می‌باشد (۱). مقاومت به آنتی بیوتیک یعنی میکروب‌های بیماری‌زا که برای مبارزه با آنان آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شوند، با جهش ژنی (موتاسیون) نسبت به این داروها مقاومت پیدا کنند و نسل‌های جدیدی به وجود بیایند که نتوان با آن‌ها مبارزه کرد (۲). امروزه مقاومت آنتی بیوتیک یک چالش مهم در پیشگیری، درمان و کنترل بیماری‌های عفونی است. از مهم ترین علل مقاومت آنتی بیوتیکی می توان به استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک توسط انسان‌ها و همچنین استفاده بیش از اندازه آنتی بیوتیک‌ها در چرخه تولید مواد غذایی می باشد (۳).

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی و باسیلی شکل، شایع‌ترین بیماری زای انسانی در جنس *سودوموناس* است. *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است. این ارگانیسم نسبت به گروه‌های مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می باشد (۴).

در بین باکتری ها، *استاف اورئوس* یکی از مهم‌ترین پاتوژن هایی است که باعث مسمومیت غذایی شده و هرساله صدها هزار نفر از مردم را به این بیماری مبتلا می‌کند. *استافیلوکوکوس اورئوس* توکسین‌های پروتئینی خارج سلولی با وزن مولکولی کم و فاکتورهای بیماری‌زایی مختلفی را تولید می‌کند (۵).

آسینتوباکتر یک باکتری گرم منفی است که شکل آن کوکوباسیل و بی حرکت می باشد. *اسینتوباکتر بومانی* به صورت کم و جزئی سبب عفونت‌های سخت در افراد با سطح ایمنی طبیعی می شود، همچنین کمتر به عنوان فلور طبیعی بدن شخص سالم شناخته شده است (۶).

عفونت‌های بیمارستانی از چند جنبه حائز اهمیت می‌باشند: مرگ و میر و ناخوشی بیماران، افزایش طول مدت بستری بیماران در بیمارستان، افزایش هزینه‌های ناشی از طولانی شدن اقامت بیماران، اقدامات تشخیصی و درمانی. براساس مطالعاتی که در خصوص میزان شیوع و بروز عفونت بیمارستانی در ایران بدست آمده است می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که میزان بروز این عفونت‌ها در حد بالایی قرار دارد(۸و۷).

نقره به دلیل خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی ذاتی که دارد در پژوهش‌های ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفته است.امروزه با فن‌آوری نانو توانسته‌اند نقره فلزی را به شکل ذراتی با سایز کمتر از ۱۰۰ نانومتر به وجود آورند که حاوی حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ اتم‌های نقره است. که آن‌ها را نانو ذرات نقره یا نانونقره می‌نامند. این ذرات خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی ویژه‌ای از خود نشان می‌دهند آنها عوامل ضدباکتریایی مهمی بر علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها هستند (۹و۱۰).

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون است که تمایل زیادی به اتصال با آهن دارد. لاکتوفرین عضوی از خانواده ترانسفرین‌ها و وابسته به پروتئین هایی است که توانایی اتصال و انتقال آهن را دارا می باشد. نام لاکتوفرین از طبقه بندی قدیمی آن به عنوان یک پروتئین مهم متصل شونده به آهن مشتق شده است (۳). لاکتوفرین از یک رشته پلی‌پپتیدی به طول ۶۸۹ اسیدآمینه تشکیل شده است. ساختمان پروتئینی آن شامل دو بخش(lobe)، آمینی (N-lobe)، وکربوکسیلی (c-lobe) است که هر کدام قابلیت اتصال به آهن آزاد را دارا می‌باشند در واقع لاکتوفرین یک آنتی‌اکسیدان است که آهن‌های آزاد را جستجو و اخذ می‌کند و مانع واکنش‌های رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۱و۱۲).

هدف از این مطالعه بررسی توانایی اثر آنتی باکتریال نانوکمپلکس لاکتوفرین-نقره بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

روش کار

سوش میکروبی مورد مطالعه برای بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس لاکتوفرین نقره بر روی باکتری‌های

سودوموناس آئروژینوزا ،استافیلوکوکوس اورئوس، آسینتوباکتر بومانی و استرپتوکوکوس پیوژنز از تست هایی از قبیل طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر، پتانسیل زتا، میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM، تست MTT، تست‌های MIC ،MBC و انتشار در حفره آگار استفاده گردید که در متن اشاره به این روش‌ها شده است (۷).

پودر لاکتوفرین: این پودر به صورت تجاری از سیگما تهیه شد (شماره کاتالوگ L9507-50MG) سپس بارگزاری نانوذره نقره بر روی لاکتوفرین صورت گرفت برای این کار نقره : ۵۰۰ ماکرولیتر نقره با ۵۰۰ ماکرولیتر لاکتوفرین مخلوط کرده و به صورت پوشیده با فویل روی شیکر قرار داده، بعد از ۲۴ ساعت به یخچال منتقل شد و در ادامه استفاده گردید.

در این مطالعه به منظور به دست آوردن اطلاعات فارماکولوژیک و توکسیکولوژی کمی از روش طیف مادون قرمز با تبدیل فوریر استفاده شده است.

برای تعیین پتانسیل زتای نانوکمپلکس‌ها، از دستگاه زتا سایزر استفاده شد. بدین منظور، ابتدا سل دستگاه، دو بار توسط آب دیونیزه شست و شو داده و سپس نمونه به صورت مستقیم توسط سرنگ داخل سل تزریق گردید و سل حاوی نمونه در محفظه مربوطه قرار داده شد و در نهایت پتانسیل زتا توسط دستگاه گزارش شد.

به منظور مطالعه ی مدهای چرخشی، ارتعاشی و دیگر مدهای فرکانسی کوتاه در یک سیستم از طیف سنجی رامان استفاده گردید.

به منظور بررسی میکروسکوپی کمپلکس‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM استفاده گردید.

تست MTT

بررسی اثر لاکتوفرین+نقره بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده انجام می‌شود (۱۳). نتایج حاصله به صورت میزان بقایای سلولی و غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود که به عنوان IC۵۰ لحاظ می گردد.

روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط سترون باز و به محیط کشت مایع مولر هینتون براث (مرک-آلمان) انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از سوسپانسیون نهایی برای انجام آزمون حساسیت دارویی، انجام آزمون MIC و ریختن سوسپانسیون به داخل چاهک‌ها استفاده می‌شود.

تعیین MIC به روش میکرودایلوشن

از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای مسطح استریل استفاده شد. بعد از مشخص کردن کدورت نیم مک فارلند، به هر ردیف به شماره‌های ۲ تا ۱۱ مقدار ۵۰ ماکرولیتر محیط مولرهینتون براث استریل اضافه شد. از شماره ۲ تا ۹ به تمام چاهک‌ها مقدار ۵۰ ماکرولیتر از لاکتوفرین+نقره را پاساژ داده شد و به تمام چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰ مقدار ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان میکروپلیت‌ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. چاهکی که مانع رشد باکتری گردیده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین MBC

برای مشخص کردن MBC از چاهک‌ها مقدار ۱ ماکرولیتر برداشته و روی محیط مولرهینتون آگار (مرک آلمان) کشت داده شد. عدم رشد باکتری در هر غلظت نشان دهنده‌ی MBC می‌باشد.

انتشار در حفره آگار

این روش به صورت گسترده‌ای به منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی لاکتوفرین+نقره استفاده می‌شود.

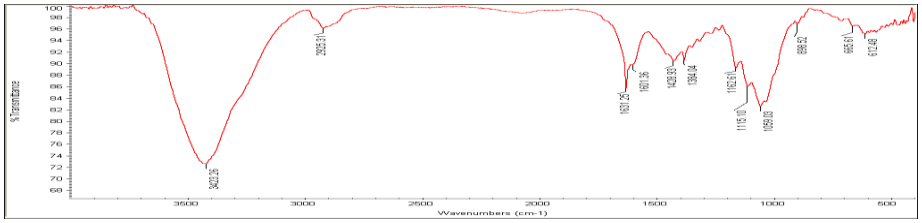
در این روش سوسپانسیون میکروبی را در سطح پلیت آگار طوری پخش نموده که به طور یکنواخت تمام سطح پلیت را

بپوشاند. سپس یک سوراخ با قطر ۸-۶ میلی متر در شرایط استریل با پانچ استریل از آگار برداشته، غلظت معین عامل ضدمیکروبی تهیه شده و داخل حفره‌ها وارد ریخته شد.

پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده و سپس نتیجه بر اساس هاله‌های ایجاده شده اطراف حفره‌ها بررسی می‌شود.

نتایج

نتایج FTIR

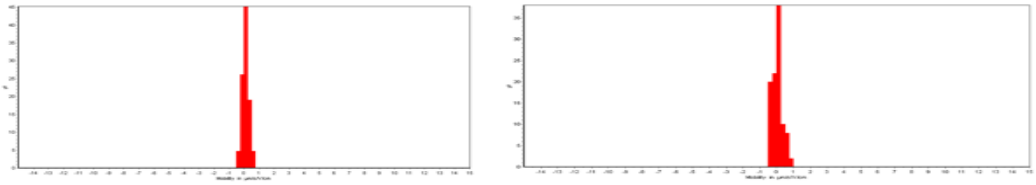


شکل ۱. طیف سنجی مادون قرمز اجزای اصلی سازنده لاکتوفرین+نقره

شکل ۱ نتایج طیف سنجی مادون قرمز اجزای اصلی سازنده لاکتوفرین+نقره را نشان می‌دهد ارتعاش کششی C-O-C در 1384 cm-1 مشاهده می شود. ارتعاشات متقارن و نامتقارن C-C درمحدوده 1000-1200 cm-1 قابل شناسایی است. ارتعاش O-Ag در نواحی بین 400-500 cm-1 به صورت پیک‌های ریز قابل مشاهده است.

نتایج پتانسیل زتا

شکل ۲ نتایج پتانسیل زتا توسط دستگاه زتا سایزر را نشان می‌دهد. زمانی که محلول را به داخل سل می کشیم ذرات نانوکمپلکس باردار میشوند و شروع به حرکت میکنند که این حرکات توسط دستگاه گزارش میشود. طبق شکل نقطه ی ایزوالکتریک صفر گزارش شده و تجمع ذرات در همین نقطه وجود دارد.



شکل ۲. نتایج پتانسیل زتا

نتایج طیف سنجی رامان

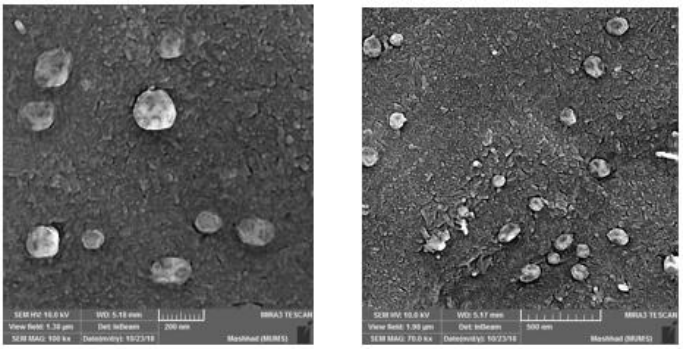
مطالعات اثرات بسیاری از پارامترهای مختلف فیزیکی از قبیل د ما، فشار، تنش و...بر نواسا نات بین اتمی و بین مولکولی تعیین می گردد که این نتایج در شکل شماره ۳ گزارش گردید.

شکل ۳. نتایج طیف سنجی رامان

بر هم کنش بین ذرات نقره و لاکتوفرین می تواند توسط تغییرات در درجه بی‌نظمی ساختار بررسی شود. طیف پیک قوی را در ۱۳۰۰-۱۴۰۰نشان می‌دهد که به ساختار آمیدی مربوط است.

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات و نانوذرات بارگذاری شده با لاکتوفرین، در شکل ۴، نشان داده شده است. به وضوح مشخص است، ساختار نانو امولسیون‌ها در طی فرآیند تولید و بارگذاری لاکتوفرین بسیار همگن با توزیع یکنواخت قطر می‌باشد که مورفولوژی ذرات کروی است و تغییر نکرده است.



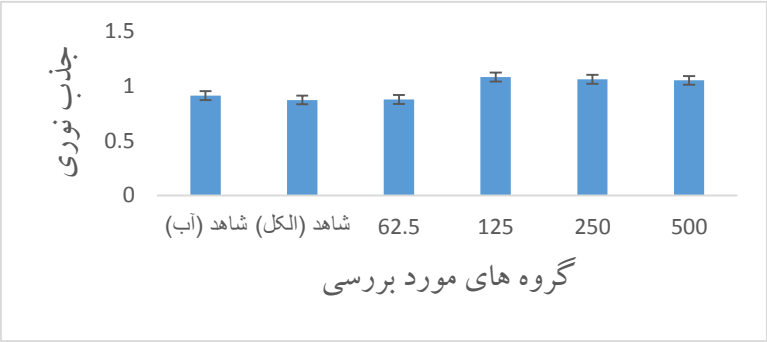
شکل ۴ -نتایج حاصل از بررسی توسط میکروسکوپ روبشی

نتایج MTT

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف لاکتوفرین+نقره بر رده سلولی HeLa از نرم افزار SPSS و تست آماری ANOVA استفاده شد. برای بررسی اثر کشندگی نانوکمپلکس بر رده سلولیHeLa آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد که سطح معناداری برای لاکتوفرین+نقره کمتر از ۰/۰۵ بود و بنابراین لاکتوفرین+نقره اثر کشندگی بر سلول‌ها نداشتند. نتایج در ادامه بیان شده است (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج آنالیز لاکتوفرین+نقره بر رده‌های سلولی با استفاده از نرم افزار SPSS

OD	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.996	4	.499	25.606	.000
Within Groups	.195	10	.019		
Total	2.191	14			



نمودار ۱. نتایج تاثیر لاکتوفرین نقره بر روی رده سلولی در غلظت‌های مختلف به همراه گروه کنترل

نتایج MIC به روش میکرودایلوشن

MIC سوش باکتری‌ها به روش میکرودایلوشن تعیین شد. چاهک‌های شماره ۱ که حاوی باکتری است به عنوان کنترل منفی و چاهک‌های شماره ۱۱ که حاوی محیط است به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

نمودار۲. نتایج MIC و MBC

جدول ۲- خلاصه نتایج MIC لاکتوفرین+نقره

باکتری	MIC
استافیلوکوکوس ارئوس	۶۲,۵
سودوموناس آئروژینوزا	۶۲,۵
آسینتوباکتر بومانی	۱۲۵
استرپتوکوکوس پیوژنز	۳۱,۲۵

نتایج MBC

برای تعیین MBC، بعد از تعیین MIC (آخرین چاهک شفاف)، رقت‌های قبل و بعد ازآن به روی محیط MHA (مولرهینتون آگار) منتقل و کشت داده شد. بعد از زمان انکوباسیون اولین رقتی که در پلیت آگار رشدی نداشته باشد به عنوان MBC گزارش می‌شود.

جدول۳ – خلاصه نتایج MBC لاکتوفرین+نقره

باکتری	MBC لاکتوفرین+نقره
استافیلوکوکوس ارئوس	۱۲۵
سودوموناس آئروژینوزا	۱۲۵
آسینتوباکتر بومانی	۱۵,۶۲
استرپتوکوکوس پیوژنز	۱۲۵

نتایج انتشار در حفره آگار

نتایج انتشار در چاهک *استافیلوکوکوس آرئوس* نشان داد که در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵،۶۲,۵ به لاکتوفرین+نقره حساس است.

برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵،۶۲,۵ به لاکتوفرین نقره حساس است. همچنین باکتری *آسینتوباکتر* در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵،۶۲,۵ به لاکتوفرین+نقره حساس است.

بحث

سویه‌های باکتریایی مقاوم در برابر داروها یک مشکل جدی در سلامت عمومی است. ظهور مقاومت در باکتری‌ها و هزینه‌های بالای داروهای ضدمیکروبی، پژوهشگران را تشویق به جستجو برای داروهای با طیف گسترده‌ای خاصیت ضدباکتری و مؤثر و اقتصادی می‌کند. بنابراین، توسعه ترکیبات قوی ضد میکروبی جدید بسیار مهم است (۱۴). بنابراین اتصال کاتیون‌های نقره با لیگاندهای زیست فعال روش خوبی برای از بین بردن خواص سمی آنها برای تعامل با سلول‌های انسانی است. از این رو، سنتز نانوذره‌های نقره با لاکتوفرین یک کاربرد نوآورانه در زمینه پزشکی است. نانوکمپلکس لاکتوفرین با نانوذرات نقره همراه با فعالیت زیستی و پزشکی، پتانسیل بسیار بالایی برای کاربردهای مصرفی و دارویی دارد (۱۵و۱۶).

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که نانوکمپلکس لاکتوفرین نقره بر روی رده سلول‌های HeLa خاصیت کشندگی و اثر سمیت نداشته ولی لاکتوفرین نقره بر روی باکتری‌های بیماری‌زا خاصیت ضد باکتری داشته است این نانوکمپلکس لاکتوفرین نقره بیشترین اثر کشندگی را بر باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* داشته است و بر باکتری *آسینتوباکتر بومانی* کمترین اثرداشته است. نتایج MIC لاکتوفرین+نقره بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و باکتری

استافیلوکوکوس ارئوس و باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و باکتری *آسینتوباکتر بومانی* و به ترتیب میزان ۶۲,۵، ۶۲,۵، ۳۱,۲۵ و ۱۲۵ بوده است.

Kumari و همکارن در سال۲۰۱۷ بود که در تحقیق خود به بررسی سمیت نانوکمپلکس لاکتوفرین با نانوذرات بر روی دو رده سلولی سالم و رده سلول سرطانی ملانوما پرداختند. نتایج آنها نشان داد که کمپلکس لاکتوفرین با نانوذرات بر روی رده سلولی سالم خاصیت کشندگی نداشته اما در سلول‌های سرطانی اثر معکوس داشته است(۱۷).

پاول پوماستوسکی و همکاران، در سال ۲۰۱۶ پژوهشی بر روی تاثیر ضد میکروبی نانوکمپلکس لاکتوفرین نقره انجام دادند، که در آن به بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی لاکتوفرین و همچنین فعالیت ضد باکتریایی مجتمع‌های لاکتوفرین نقره را پرداختند. نتایج بدست آمده از پژوهش پاول پوماستوسکی و همکاران، بیانگر این بود که کمپلکس‌های لاکتوفرین سنتز شده علیه باکتری‌های بالینی منتخب دارای فعالیت ضد میکروبی است (۱۸).

کریمی پور و همکاران در سال ۲۰۱۷ به ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی *اسینتوباکتر بومانی* پرداختند. آنان اعلام کردند که به دلیل مقاومت اسینتوباکتر بومانی نسبت به داروهای ضدمیکروبی در این مطالعه تأثیر نانوذرات نقره بر مهار رشد آن موردبررسی قرارگرفته است.نانوذره با اندازه تقریبی ۲۰ نانو متر تهیه شده و غلظت آن با روش طیف سنجی در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز تعیین شد. خواص ضدمیکروبی نانوذرات با روش MIC و MBC، دیسک دیفیوژن و ول دیفیوژن تعیین شد. با این روش ۲۰ سویه بیمارستانی تهیه شده از بیمارستان امام رضای تبریز، موردبررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج، میزان MIC و MBC به ترتیب ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ ppm برای نانوذرات با اندازه ۲۰ نانومتر ۱۵۶ و ۳۱۲ ppm و برای نانوذرات نقره با اندازه ۵ نانومتر تعیین شد. میزان MIC و MBC به دست آمده برای سویه‌های اسینتوباکتر بومانی بالینی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. اسینتوباکتر بومانی به نانو ذرات نقره حساس بوده، یکسان بودن MIC و MBC در گونه‌های بالینی متعدد نشان می‌دهد که مقاومتی برای نانو ذرات نقره وجود ندارد (۱۹).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که کمپلکس مور مطالعه بر روی رده سلولی HeLa دارای خاصیت کشندگی نمی‌باشد. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گوناگون، لزوم جستجو برای ترکیبات جایگزین مناسب جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها احساس می گردد. ماهیت لاکتوفرین پروتئینی می باشد که دارای عملکردهای متفاوتی است که یکی از نقش‌های آن فعالیت ضدباکتریای علیه طیف گسترده‌ای از گونه‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد. در این مطالعه کمپلکس لاکتوفرین نقره بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *آسینتوباکتر بومانی* خاصیت آنتی باکتریال داشت. این کمپلکس اثر سمیت بر رده سلول یوکاریوتی نداشت. بنابراین سنتز کمپلکس نانوذرات نقره-لاکتوفرین می‌تواند در زمینه پزشکی و صنایع غذایی به عنوان عامل ضدمیکروبی نوآورانه، اقتصادی و محیط زیست قابل استفاده باشد. با توجه به نتایج بدست آمده کمپلکس لاکتوفرین و نانوذرات نقره می‌تواند گزینه‌ای در درمان عفونت‌های میکروبی برای انسان باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه "تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی" شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(2):639-645.

2. Amiri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. Int J Enteric Pathog. 2017;5(4):100-5.
3. Jamshidian-Mojaver, M., Amiri, M., Farzin, H. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolones resistance in Klebsiella pneumoniae isolates from urinary tract infections in Bojnourd city. medical journal of mashhad university of medical sciences, 2020; 63(3): 2335-2340.
4. Motaghi B, Najafipour S. Outer membrane protein D gene in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and its role in antibiotic resistance. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016 10;5(4):501-7.
5. Wei CC, Adappa ND, Cohen NA. Use of topical nasal therapies in the management of chronic rhinosinusitis. The Laryngoscope. 2013;123(10):2347-59.
6. Karimipour SN, Tanomand A, Rostamnia S. The antibacterial activity evaluation of the nanoparticles of silver on *Acinetobacter baumannii*. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016;6(2):264-70.
7. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Nejad Shahrokh Abadi K. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by Staphylococcus epidermidis. JRUMS. 2015; 14 (2) :125-136.
8. Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. Biometals. 2010;23(3):365-76.
9. Mosmann,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Immunol. Methods. 1993; 6(5):55-63.
10. Legrand, D., & Mazurier, J.. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. Biometals,2010; 23(3), 365-376.
11. Schneider G, Schweitzer B, Steinbach A, Pertics BZ, Cox A, Kőrösi L. Antimicrobial Effi-cacy and Spectrum of Phosphorous-Fluorine Co-Doped TiO2 Nanoparticles on the Foodborne Path-ogenic Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterohaemorrhagic E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Foods. 2021;10 (8):1786.
12. Gifford, J. L., Hunter, H .N., & Vogel, H. Lactoferricin. Cellular and molecular life sciences,2005; 62(22), 2588.
13. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Nejad Shahrokh Abadi K. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by Staphylococcus epidermidis. JRUMS. 2015; 14 (2) :125-136
14. Mayeur S, Spahis S, Pouliot Y, Levy E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. Antioxidants & redox signaling. 2016;24 (14):813-36.
15. paweł Pomastowski, Myroslav Sprynskyy, Petar Žuvela, Katarzyna Rafińska, Maciej Milanowski, J. Jay Liu, Myunggi Yi∞, Bogusław Buszewsk, Journal of the American Chemical Society,2016;23(8):300-315.
16. Satti, L., Abbasi, S., Qumar, T. A., Khan, M. S., & Hashmi, Z. A.. In Vitro Efficacy of Cefepime against Multi-Drug Resistant Pseudomonas aeruginosa–an alarming situation in our setup. The Open Drug Resistance Journal, 2011;25(4): 200_206.
17. Kumari S, Kondapi AK. Lactoferrin nanoparticle mediated targeted delivery of 5-fluorouracil for enhanced therapeutic efficacy. International journal of biological macromolecules. 2017;95:232-7.
18. Pomastowski P, Sprynskyy M, Žuvela P, Rafińska K, Milanowski M, Liu JJ, Yi M, Buszewski B. Silver-lactoferrin nanocomplexes as a potent antimicrobial agent. Journal of the American Chemical Society. 2016;138(25):7899-909.
19. Karimipour SN, Tanomand A, Rostamnia S. The antibacterial activity evaluation of the nanoparticles of silver on *Acinetobacter baumannii*. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016;6(2):264-70.

Original Article

Investigating the Antibacterial Effect of Lactoferrin + Silver Nanocomplex on Pseudomonas Aeruginosa, Staphylococcus Aureus, Acinetobacter Baumannii and Streptococcus Pyogenes Bacteria

Received: 09/11/2021 - Accepted: 08/12/2022

Samira Kadoughani Sani[1]
Majid Jamshidian-Mojaver[2]
Hamidreza Farzin[2*]
Mohsen Naeemipour[3]
Mohadese Amiri[4]

[1]*Master of Microbiology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.*
[2]*Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.*
[3]*Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.*
[4]*MSc Bacteriology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.*

Email: hrfarzin@yahoo.com

Abstract

Introduction

Lactoferrin is a glycoprotein and one of the most important bioactives of milk, which has antibacterial, antiviral, antifungal and antiparasitic activity. Antimicrobial peptides have been receiving a lot of attention in recent decades due to having suitable properties such as fast killing, wide spectrum of activity and also their effectiveness in relation to drug resistance.

Material and Method

The purpose of this study is to investigate the antibacterial effect of silver lactoferrin nanocomplex on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Streptococcus pyogenes*.

For this purpose, silver nanoparticles were first loaded on lactoferrin. Then, to confirm the loading of silver nanoparticles on lactoferrin, the zeta potential was measured by the zeta potential determination device. Also, with the help of Raman spectroscopy, FTIR and scanning electron microscope, the properties of this nanocomplex were investigated. Then the effect of lactoferrin + silver nanocomplex on cells was investigated to determine the toxicity of this compound on cells. The antibacterial properties of lactoferrin + silver nanocomplex on Pseudomonas aeruginosa bacteria, Staphylococcus aureus bacteria, Streptococcus pyogenes bacteria and Acinetobacter baumannii bacteria were investigated by MTT test, MIC, MBC tests and diffusion in agar hole

Results

The results show that lactoferrin + silver nanocomplex had the most lethal effect on *Streptococcus pyogenes* bacteria and the least effect on *Acintobacter baumannii* bacteria

Conclusion

Synthesis of silver-lactoferrin nanoparticle complex can be used as an innovative, economic antimicrobial agent in the field of medicine and food industry.

Key words

Lactoferrin, silver, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*

Acknowledgement: There is no conflict of interest