ORIGINAL ARTICLE

Effects of Cream Containing Rhamnolipid Microbial Surfactants from Pseudomonas aeruginosa MR01 on Growth Inhibition of Staphylococcus aureus

Tooran Bagheri[1],
Kobra Rahimi[2],
Tayebe Bagheri Lotfabad[3]

[1] MSc in Nursing, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] MSc in Chemical Engineering, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

(Received October 5, 2019 ; Accepted March 1, 2020)

Abstract

Background and purpose: Dramatic increase in antibiotic-resistant bacteria highlights the need for new compounds with more effective antibacterial properties and biotechnology could be useful in producing these metabolites. The present study aimed at investigating the effects of rhamnolipid microbial surfactants in a cream-based formulation on growth inhibition of *Staphylococcus aureus* using *in vitro* and animal models.

Materials and methods: The inhibitory effects of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on the growth of *S. aureus* were investigated by disk diffusion method. Then, the effects of dirhamnolipid compounds on the survival and morphology of bacteria were studied using estimation of colony forming units (CFUs) and scanning electron microscopy (SEM). The di-rhamnolipid-containing cream was prepared and its effects on inhibition of the bacterial growth was evaluated in *in vitro* and animal subjects.

Results: Disk diffusion tests showed a minimum inhibitory value of 30mg/disk for aqueous solutions of mono- and di-rhamnolipids, and 20mg/disk and 10mg/disk for mono- and di-rhamnolipid solutions in Dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. The aqueous solution of di-rhamnolipids at 20mg/ml resulted in lack of viable cells of *S. aureus*. SEM images showed changes in spherical shape of *S. aureus* during rhamnolipid treatments. Di-rhamnolipid-containing cream led to inhibition of bacterial growth *in vitro* on agar medium. Moreover, findings in rats indicated inhibition of bacterial growth in wound areas after 20 days of treatment with the cream.

Conclusion: In current study, Di-rhamnolipids demonstrated inhibitory effects on the growth of *S. aureus*. These compounds in cream formulation could also have antibacterial effects.

Keywords: Rhamnolipids, cream, antibacterial, *Staphylococcus aureus*, animal model

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 14-27 (Persian).

*** Corresponding Author: Tayebe Bagheri Lotfabad -** National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran (E-mail: bagheril@nigeb.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 184 اردیبهشت سال 1399 (27-14)

تاثیر کرم حاوی سورفکتانت میکروبی رامنولیپیدی گرفته شده از *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 بر مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*

توران باقری[1]
کبری رحیمی[2]
طیبه باقری لطف آباد[3]

چکیده

سابقه و هدف: افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها، توسعه ترکیبات جدید با ویژگی‌های ضدباکتریایی را ضروری می‌نماید. در این راستا، استفاده از فناوری‌های زیستی به منظور تولید این ترکیبات استراتژی مناسبی می‌باشد. در مطالعه حاضر، تاثیر استفاده از سورفکتانت‌های میکروبی رامنولیپیدی در فرمولاسیون کرم، بر مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی و در مدل حیوانی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر مهارکنندگی رامنولیپیدهای حاصل از باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* MR01، بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. سپس، تاثیر ترکیبات دی‌رامنولیپیدی بر زنده‌مانی و مورفولوژی باکتری‌ها با استفاده از روش شمارش واحدهای کلنی (CFUs) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شد. در ادامه، کرم حاوی ترکیبات دی‌رامنولیپیدی تهیه و تاثیر آن بر مهار رشد باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی و نیز در مدل حیوانی سنجش شد.

یافته‌ها: نتایج انتشار دیسک، بیانگر حداقل مقدار مهار کنندگی 30mg/disk برای محلول‌های آبی مونو و دی‌رامنولیپیدها و 20mg/disk و 10mg/diskبرای محلول‌های مونو و دی رامنولیپیدی در حلال DMSO بود. همچنین، محلول آبی دی‌رامنولیپیدها از غلظت 20mg/ml موجب عدم زنده‌مانی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. تصاویر SEM، تغییر شکل کروی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در طول تیمار رامنولیپیدی نشان داد. کرم‌های حاوی دی‌رامنولیپیدها منجر به مهار رشد باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی روی محیط آگاردار شد. همچنین، نتایج بیانگر مهار رشد باکتری‌ها در محل زخم رت‌های تیمار شده با کرم‌های دی‌رامنولیپیدی در روز بیستم تزریق بود.

استنتاج: ترکیبات دی‌رامنولیپیدی دارای قدرت مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند. استفاده از این ترکیبات در فرمولاسیون کرم می‌تواند موجب تاثیرات ضد باکتریایی در کرم شود.

واژه های کلیدی: رامنولیپیدها، کرم، ضدمیکروبی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، مدل حیوانی

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، مسئول عفونت‌های متعدد مزمن و عودکننده مانند استئومیلیت، اندوکاردیت و عفونت‌های ریوی فیبروز کیستیک و همچنین ترومای نفوذی و عفونت‌های سوختگی، زخم‌های وریدی پا،

مولف مسئول: طیبه باقری لطف آباد - تهران: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری E-mail: bagheril@nigeb.ac.ir
1. کارشناسی ارشد پرستاری، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
2. کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
3. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1398/7/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/8/13 تاریخ تصویب : 1398/12/11

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

زخم‌های فشاری و زخم‌های پای دیابتی می‌باشد. علیرغم این‌که جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشات برون تنی، و اندازه‌گیری‌های حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) حساسیت کامل نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده نشان می‌دهند، اما این عفونت‌ها به سختی درمان می شوند(1). این امر نشان می‌دهد که عوامل محیطی موجود در شرایط درون تنی ممکن است بر حساسیت بیماری‌زاها به آنتی‌بیوتیک تاثیرگذار باشند. در حضور این عوامل که می‌توانند شامل موانع فیزیکی در برابر فعالیت آنتی‌بیوتیکی باشند، مانند نکروز بافت یا بافت‌مردگی و پایین بودن عروق کرونری در محل عفونت یا تکثیر باکتری‌ها در فاگوسیت های میزبان، شکست درمان نمی‌تواند به طور کامل با نفوذ ضعیف دارو توجیه شود، بلکه عوامل محیطی مانند تعامل با میزبان، می‌تواند پاسخ‌های فنوتیپی یا سازگاری‌های ژنتیکی را در باکتری‌ها تحریک نماید و حساسیت آنتی‌بیوتیکی را کاهش دهد(1). بنابراین شناسایی ترکیباتی که از تاثیرگذاری قابل قبولی بر مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط برون تنی و نیز درون تنی برخوردار باشند مورد توجه قرار می‌گیرد.

رامنولیپیدها، گروهی از مواد فعالی سطحی هستند که وقتی در یک سیستم متشکل از دو فاز غیرقابل امتزاج قرار می‌گیرند قادر به بروز ویژگی‌های سورفکتانتی نظیر کاهش کشش سطحی و بین سطحی و خصیصه های امولسیون کنندگی نظیر تشکیل میکروامولسیون و پایداری فاز امولسیون می‌باشند(2). رامنولیپیدها عمدتا توسط سویه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می‌شوند(3). از دیدگاه ساختار شیمیایی، رامنولیپیدها، زیرگروهی از ترکیبات گلیکولیپیدی هستند که دارای یک یا دو حلقه رامنوز در ترکیب با اسیدچرب 3-هیدروکسی می‌باشند و به این ترتیب با عنوان مونورامنولیپیدها و دی رامنولیپیدها اطلاق می‌شوند(4). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای روی پتانسیل داوریی رامنولیپیدها صورت گرفته است. در همین راستا، عملکردهای متعددی پیش‌تر از این برای رامنولیپیدها گزارش شده است، که شامل نقش ضدباکتریایی و ضد قارچی، افزایش دهنده عملکرد آنتی بیوتیکی، تنظیم کننده سیستم ایمنی، عوامل ضدسرطانی و توزیع کننده دارو می‌شود(۵،۳). در زمینه پتانسیل ضدمیکروبی رامنولیپیدها، مطالعات اولیه Itoh و همکارانش در سال 1971، پیشنهاد کرد که رامنولیپیدها روی طیف وسیعی از میکروب‌های گرم مثبت و گرم منفی تاثیر ضد میکروبی دارند (6) و از آن پس گزارشات متعددی در این زمینه ارائه شده است(۸،۷). با توجه به این یافته‌های ارزشمند، بعلاوه این حقیقت که مسیرهای ژنتیکی و متابولیکی سنتز رامنولیپیدها به خوبی مشخص شده است و نیز اینکه رامنولیپیدها قابل تولید از مواد اولیه تجدید پذیر هستند و ترکیباتی زیست تخریب‌پذیر می‌باشند(9)، چشم‌انداز خوبی از بکارگیری گسترده رامنولیپیدها وجود دارد. بنابراین، تکامل مطالعات قبلی می‌تواند سهم قابل توجهی در پیشرفت دستاوردها در این زمینه تحقیقاتی باشد.

در راستای پتانسیل کاربردی رامنولیپیدها، مطالعات پیشین ما در سال 2010 به ارزیابی اثر ضدمیکروبی مخلوط رامنولیپیدی خام حاصل از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 بر گونه‌های متعدد از باکتری‌های گرم منفی شامل *کلبسیلا پنومونیه*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* و باکتری‌های گرم مثبت شامل *انتروکوکوس فکالیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *استرپتوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس*(10) اختصاص یافت. نتایج آزمایشات حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) نشان داد که رامنولیپیدهای حاصل از سویه MR01 تا غلظت 512 µg/ml تاثیری بر رشد باکتری‌های گرم منفی نداشتند اما در غلظت 128 µg/ml تاثیر مهار رشد بر باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شد(10). به این ترتیب، از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

آن‌جاکه نتایج تحقیقات قبلی بیانگر تاثیرگذاری ترکیبات رامنولیپیدی حاصل از سویه MR01 بر مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و اینکه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله مهم‌ترین بیماری‌زاهای انسانی می‌باشد که در زمره علل اصلی عفونت‌های بیمارستانی در دنیا محسوب می‌شوند؛ از این‌رو مطالعه حاضر به تکمیل مطالعات قبلی انجام گرفته در زمینه تاثیر رامنولیپیدهای حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌پردازد. در این مطالعه، رامنولیپیدهای خام حاصل از باکتری‌های MR01 پس از استخراج از محیط کشت با استفاده از کروماتوگرافی ستونی به دو گروه مونورامنولیپیدها و دی‌رامنولیپیدها خالص‌سازی و تفکیک شدند و تاثیر آن‌ها به‌طور مجزا بر مهار رشد سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 با استفاده از روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، تاثیر دی‌رامنولیپیدها بر زنده‌مانی و مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه شد. علاوه بر این تاثیر ترکیبات دی‌رامنولیپیدی به شکل فرمولاسیون کرم رامنولیپیدی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی رت‌های آلوده شده به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که از تیرماه تا اسفندماه 1397 به طول انجامید، تاثیر ضدباکتریایی ترکیبات رامنولیپیدی را بر سویه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه رامنولیپیدها

عصاره خام حاوی رامنولیپیدها با استفاده از کشت سویه *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 روی محیط کشت حاوی روی روغن سویا به روشی که در مطالعات پیشین ما گزارش شده است(11) تهیه و از محیط کشت استخراج گردید. عصاره خام حاصل، با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی که پیش‌تر گزارش نموده‌ایم به دو جزء مونو و دی‌رامنولیپیدی تفکیک و با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد تایید قرار گرفت(10). هومولوگ‌های رامنولیپیدی موجود در بخش‌های مونورامنولیپیدی و دی‌رامنولیپیدی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شد و فعالیت‌های سطحی آن‌ها اعم از توانایی جابجایی روغن، کاهش کشش سطحی، غلظت بحرانی میسل و شاخص امولسیون کنندگی تعیین گردید که جزئیات روش‌های سنجش و نتایج آن‌ها در مقاله دیگری منتشر شده است (12).

سنجش فعالیت ضدمیکروبی رامنولیپیدها

فعالیت ضدمیکروبی مونورامنولیپیدها و دی‌رامنولیپیدها علیه سویه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار که توسط کربی- بائر (Kirby & Bauer) توضیح داده شد(13) ارزیابی گردید. برای این منظور محلول‌های با غلظت 1 mg/µl از مونورامنولیپیدها و دی رامنولیپیدها در آب دیونیزه و در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه شد. از کشت 24 ساعته *استافیلوکوکوس اورئوس* روی محیط جامد لوریا برتانی (LB)، سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک فارلند در محیط مولر هینتون مایع تهیه شد. سپس با استفاده از سوآب روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. دیسک‌های 6/4 میلی‌متری خریداری شده از شرکت پادتن طب روی محیط جامد در فواصل مناسب تعبیه گردید و مقادیر مختلف 10 µl، 20 µl، 30 µl، 40 µl و 50 µl از محلول‌های رامنولیپیدی روی هر دیسک مجزا بارگذاری شد. دیسک کنترل فاقد رامنولیپید بوده و تنها با استفاده از حلال استریل بارگذاری گردید. محیط‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C انکوبه و سپس عکسبرداری با استفاده از دوربین دیجیتال انجام شد. هاله

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

عـدم رشـد بـا اسـتفاده از نـرم افـزار آنـالیز تصـویر Digimizer نسخه 4 تعیین شد. تمامی مراحل آزمایش 3 بـار تکـرار شـد و داده‌هـای بدسـت آمـده، بـه صـورت میانگین مورد ارزیابی قـرار گرفـت. از نـرم‌افـزار SPSS نسخه 16 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتـایج به صورت میانگین ± انحراف معیـار (Mean±SD) بـرای هـر داده بررسـی شـد. بـرای بررسـی آمـاری از آنـالیز واریانس یکطرفـه (ANOVA) تـوام بـا آزمـون تعقیبـی Tukey استفاده شد. P<0/05 به عنوان سـطح معنـی‌داری در نظر گرفته شد.

اثر دی‌رامنولیپیدها بر زنده‌مانی و تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌ها

با توجه به نتـایج بـه‌دسـت آمـده از مرحلـه قبـل در تست‌های دیسک دیفیوژن آگار، دی رامنولیپیدها بـرای مطالعات بیش‌تر انتخاب شدند و تاثیر آن‌ها بر زنده مانی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش اصلاح شده بهار علـی و همکـارانش(14) مـورد بررسـی قـرار گرفـت. بـرای ایـن منظـور، سوسپانسـیون سـلولی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئـوس*، از کشـت شـبانه این بـاکتری‌هـا در محـیط لوریـا برتـانی (LB) در دمـای 37 °C و هـوادهی 180rpmتهیـه شـد. سوسپانسـیون سـلولی حاصـل، سـانتریفوژ (دور 4000rpm، 4 °C، به‌مدت 10 دقیقه) شـد تـا رسـوبات سـلولی جمـع آوری شوند و سپس دو مرتبه با استفاده از بـافر فسـفات نمکـی (PBS، pH7.4) شستشو داده شـد. در ادامـه، بـا افـزودن بافر PBS روی توده سلولی جمع‌آوری شده، سوسپانسیون 0/5 مک فارلند تهیه گردید و به میکروتیوب‌هـای مجـزا (هر کدام 1ml) انتقال داده شد و پـس از انجـام سـانتریفوژ، محلول رویی تخلیه گردید. جهت انجام تیمار، بـه تـوده سلولی موجـود در هـر میکروتیـوب، 1ml محلـول PBS استریل حـاوی مقـادیر مختلـف از دی‌رامنولیپید (صفر (کنتـرل)، 10 mg، 20 mg، 30 mg، 40 mg و 50 mg) اضافه شد و بـه مـدت 24 h در دمـای 37 °C و هـوادهی 180rpm انکوبـه گردیـد. پـس از انجـام تیمـار، تعـداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر از نمونه، به روش شـمارش تشـکیل واحـد کلنـی (Colony Forming Unit : CFU) تعیـین گردیـد و درصـد زنـده‌مـانی نسـبت بـه نمونـه کنتـرل محاسـبه شـد. همچنـین، تغییـرات ناشـی از تیمـار دی‌رامنولیپیـدی، بـر مورفولـوژی بـاکتری‌هـای *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس*، بـا اسـتفاده از روش میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

سوسپانسیون سلولی باکتری‌هـای *استافیلوکوکوس اورئوس*، از کشت شبانه این باکتری‌هـا در محـیط لوریـا برتـانی (LB) در دمـای 37 °C و هـوادهی 180rpmتهیـه شـد. 1 میلـی لیتـر از سوسپانسـیون سـلولی حاصـل بـه میکروتیوب‌های مجزا انتقال یافت و دو مرتبه با اسـتفاده از بافر فسفات نمکی (PBS، pH7.4) شستشو داده شـد و رسوبات سلولی با استفاده از سـانتریفوژ (دور 4000rpm، 4 °C، بمدت 10 دقیقه) جمع‌آوری گردید. جهت انجـام تیمار، به توده سلولی موجـود در هـر میکروتیـوب، 1ml محلـول PBS اسـتریل حـاوی مقـادیر مختلـف از دی‌رامنولیپید (صفر (کنتـرل)، 10 mg، 20 mg، 30 mg، 40 mg و 50 mg) اضافه شد و بـه مـدت 24 h در دمـای 37 °C و هوادهی 180rpm انکوبه گردید. پس از انجام تیمـار، تـوده سـلولی جمـع آوری و بـا اسـتفاده از روش توضیح داده شده توسط باقری لطف‌آبـاد و همکـارانش (15) بـرای انجـام آنـالیز میکروسـکوپ الکترونـی روبشـی (Scanning Electron Microscopy: SEM) آماده‌سازی شدند. بـه طـور خلاصـه، تـوده‌هـای سـلولی بـا اسـتفاده از محلـول 3 درصـد گلوتارآلدهایـد در PBS فـیکس شـد و پـس از سـه مرتبـه شستشـو بـا بـافر PBS، با استفاده از محلـول‌هـای الکـل از غلظـت 25 تـا 100 درصـد بتـدریج آبگیـری و سـپس توسـط دسـتگاه میکروسـکوپ الکترونـی (AIS2300c،کـره) مـورد ارزیابی قرار گرفت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

تهیه کرم حاوی دی‌رامنولیپیدها و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن

به منظور بررسی امکان بهره‌گیری از فعالیت ضدباکتریایی دی‌رامنولیپیدها به صورت فرمولاسیون کرم، از پایه اوسرین استفاده شد و کرم حاوی ترکیبات دی‌رامنولیپیدی تهیه گردید. برای این منظور اوسرین با جذب 200 درصد، از داروخانه خریداری شد. محلول حاوی 20 mg دی‌رامنولیپید در 80 µl آب دیونیزه با 80 mg اوسرین ترکیب و مخلوط شد، سپس فعالیت ضدمیکروبی کرم حاصل در شرایط برون‌تنی آزمایشگاه، بررسی شد. به این صورت که کرم رامنولیپیدی روی پلیت مولر هینتون آگار که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با کدورت 0/5 مک فارلند روی آن کشت چمنی داده شده بود، قرار داده شد و در محدوده یک مربع 1/5 × 1/5 روی آن گسترده گردید. محیط‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C انکوبه شد و سپس عدم رشد ایجاد شده توسط کرم بررسی شد. کرم کنترل از اختلاط 100 mg اوسرین با 80 µl آب دیونیزه تهیه شد. همچنین به منظور بررسی تاثیر حلال، آزمایشات فوق با 40 µl حلال DMSO بجای 80µl آب دیونیزه تکرار گردید. در ادامه فعالیت ضدمیکروبی کرم رامنولیپیدی در شرایط درون تنی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات درون تنی با استفاده از کرم رامنولیپیدی حاصل از اختلاط دی‌رامنولیپید، اوسرین و آب دیونیزه و با نسبت 1mg: 4 mg : 4 µl انجام شد. کرم کنترل از مخلوط نمودن اوسرین و آب دیونیزه با نسبت 5 mg: 4 µl تهیه شد. مطالعه تجربی زیر در سال 1397 در آزمایشگاه حیوانات مرکز آموزشی درمانی حضرت فاطمه (س) تهران انجام گرفت و در تمام مراحل آزمایش پروتکل‌های اخلاق در پژوهش جهت کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. تعداد 49 رت نر بالغ نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریبی 250-300 g انتخاب و در قفس‌های جداگانه استاندارد با چرخه نوری 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی و دمای 22-24 °C نگهداری شدند. در این مدت حیوانات دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. پس از ایجاد بیهوشی عمومی با تزریق عضلانی زایلازین (15 mg/kg) و کتامین (60 mg/kg)، موهای ناحیه پشت رت‌ها توسط دستگاه تراش برقی تراشیده شد. سپس زخم‌های تمام ضخامت به ابعاد 1/5 ×1/5 توسط بیستوری شماره 10 بر روی پشت رت‌ها ایجاد و 100 µl از سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 با سرنگ انسولین به بستر زخم‌ها تزریق شد. رت‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه 16 تایی، A، B و C تقسیم شدند و یک رت جهت کشت شاهد نگهداری شد. عمل تلقیح به مدت سه روز تکرار شد و روز چهارم از محل زخم رت شاهد، نمونه برای کشت تهیه گردید و سپس معدوم شد. در گروه A روزانه مقدار 100 mg کرم رامنولیپیدی و در گروه B همین مقدار از کرم کنترل استعمال شد و گروه C بدون درمان باقی ماند. در تمامی گروه‌ها پس از قرار دادن یک لایه گاز استریل بر روی محل زخم، با چسب لکوپلاست پانسمان شد. انجام پانسمان تا 20 روز به صورت یک روز درمیان ادامه یافت. در روز 5 و 15، از 3 رت و در روز 10 و 20، از 5 رت در هر گروه نمونه تهیه و تعداد باکتری‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 در نمونه‌ها با استفاده از روش شمارش واحد تشکیل کلنی (CFU) مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که، نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و وزن آن‌ها یادداشت شد. نمونه مورد نظر در یک فالکون حاوی 1/5 ml نرمال سالین استریل با استفاده از یک میله شیشه‌ای استریل هموژن شد. رقت‌های مختلف از سوسپانسیون حاوی نمونه ساخته شد، سپس 100 µl از هریک از رقت‌ها روی پلیت لوریا برتانی آگار کشت داده شد و پس از پخش روی آن به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 37 °C انکوبه گردید. سپس شمارش واحدهای کلنی‌ها انجام پذیرفت و نتایج به‌صورت CFU/mg (تعداد کلنی باکتری‌های زنده به ازای میلی‌گرم نمونه برداشته

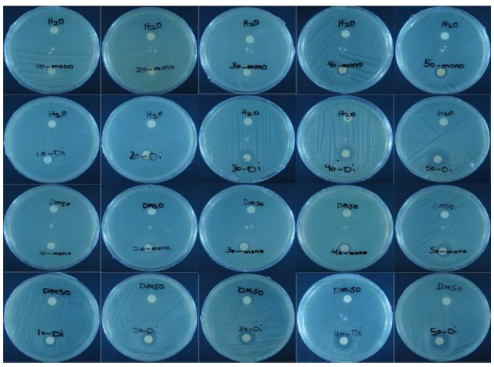
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

شده از زخم رت) گزارش شد. قبل از نمونه‌برداری با استفاده از دوربین دیجیتال Nikon D300 digital camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) و لنز ماکروی 60 mm با درجه بزرگ‌نمایی 1:10 و فاصله 80 cm، در مجاورت خط‌کش از محل زخم‌ها عکس‌برداری شد. پس از انتقال تصاویر به کامپیوتر، وسعت زخم‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ نسخه 1/45 اندازه‌گیری و محاسبه شد. داده‌های گردآوری‌شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه 16، مورد تحلیل آماری قرار گرفت. برای توصیف داده‌های کمی از شاخص مرکزی میانگین و پراکندگی انحراف معیار استفاده شد. توزیع داده‌ها و نرمال بودن آن‌ها سنجیده شد. جهت تحلیل داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، از آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید. P<0/05 از لحاظ آماری معنی‌دار در نظرگرفته شد.

یافته ها

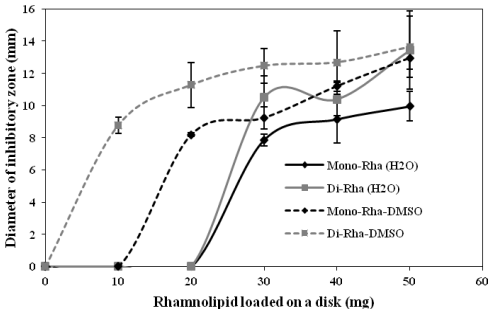
فعالیت ضدمیکروبی رامنولیپیدها

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی محلول‌های مونورامنولیپیدی و دی‌رامنولیپیدی روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که با استفاده از روش انتشار دیسک انجام گرفت میزان مهار رشد باکتری‌ها را در حضور مقادیر مختلف از رامنولیپیدها نشان داد (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: نمایش قطر هاله مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 توسط غلظت های مختلف از مونورامنولیپیدها و دی رامنولیپیدها در آب یا حلال DMSO به روش انتشار دیسک

میزان برآورد شده قطر هاله‌های عدم رشد به صورت نمودار شماره 1 ترسیم شد. این نمودار، میانگین و انحراف معیار قطر نواحی مهار مربوط به رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 را در حضور غلظت‌های مختلف مونو و دی رامنولیپیدها نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یکطرفه توام با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) نشان داد که مینیمم مقدار مهار کنندگی برای محلول‌های آبی مونو و دی رامنولیپیدها و نیز محلول آن‌ها در حلال DMSO معادل با: «مونو-رامنولیپید در آب؛ 30 mg/disk»، «دی-رامنولیپید در آب؛ 30 mg/disk»، «مونو-رامنولیپید در DMSO؛ 20 mg/disk»، «دی-رامنولیپید در DMSO؛ 10 mg/disk» برآورد گردیدند که هریک به ترتیب منجر به مهار رشد با قطرهای 0/35 mm ± 7/86 ، 1/35 mm ± 10/51، 0/13 mm ± 8/19 و 0/5 mm ± 8/78 شدند.



نمودار شماره 1: فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف مونورامنولیپیدها و دی‌رامنولیپیدها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 بر اساس قطر هاله عدم رشد (mm) در روش بررسی انتشار دیسک. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار نتایج تکرار سه آزمایش مجزا بیان شده‌اند

اثر دی‌رامنولیپیدها بر زنده‌مانی و تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌ها

با توجه به تاثیرگذاری بیش‌تر دی‌رامنولیپیدها بر مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و ایجاد هاله عدم رشد با قطر بالاتر، اثرگذاری آن‌ها بر زنده‌مانی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت، به‌طوری‌که نتایج

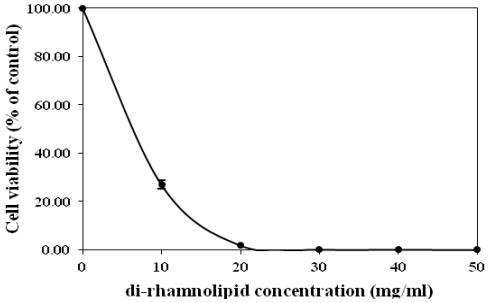
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

شمارش واحدهای کلنی که به صورت درصد زنده‌مانی نسبت به کنترل در نمودار شماره 2 نمایش داده شده است، نشان می‌دهد که تیمار با غلظت 10mg/ml از محلول دی‌رامنولیپیدها پس از 24h موجب افت چشمگیری در زنده‌مانی سلول‌ها شد و تنها 1/75±26/94 درصد از باکتری‌ها زنده ماندند و تیمار با غلظت‌های بالاتر از 20mg/ml از دی‌رامنولیپیدها تقریبا منجر به عدم زنده مانی باکتری‌ها گردید. از طرفی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) موجود در تصویر شماره 4، بیانگر این مطلب است که غشای باکتری‌ها تا غلظت 50 mg/ml از دی رامنولیپیدها تغییر محسوسی نکرده است، اما با بررسی بیش‌تر عکس‌های موجود در تصویر شماره 2، این‌طور به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت دی‌رامنولیپیدها، شکل کروی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌تر به سمت کشیده شدن می‌رود به‌طوری که درغلظت 50 mg/ml از دی رامنولیپیدها تعداد باکتری‌هایی که از فرم کروی تغییر شکل یافته‌اند مشهودتر است.

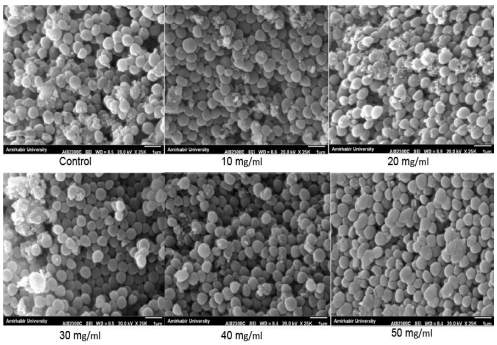
اثرات ضدمیکروبی کرم حاوی دی‌رامنولیپیدها

سنجش فعالیت ضدمیکروبی کرم رامنولیپیدی در شرایط برون تنی روی پلیت مولر هینتون آگار انجام گرفت، عدم رشد درحضور کرم حاوی دی رامنولیپیدها را به‌صورت تصاویر موجود در تصویر شماره3 نمایش می‌دهد.

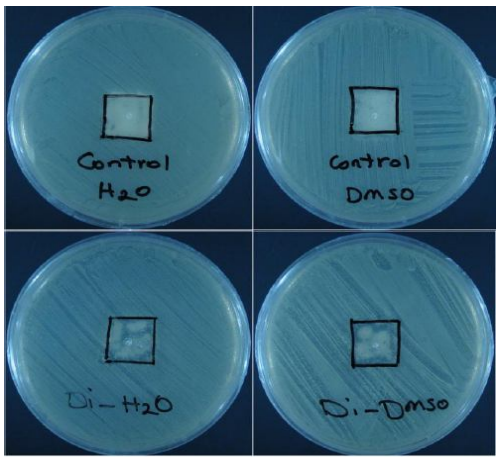
از طرفی تصویر شماره 3، بیان می‌دارد که کرم اوسرین فاقد دی‌رامنولیپید (کرم کنترل) چه در حضور آب و چه حلال DMSO تهیه شده باشد، قادر به مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نمی‌باشد. فعالیت ضدمیکروبی کرم رامنولیپیدی در مدل حیوانی، به‌صورت شمارش واحدهای کلنی باکتری‌های زنده موجود در محل زخم ایجاد شده به ازای میلی‌گرم نمونه برداشته شده از محل زخم، در طی روزهای 5، 10، 15 و 20 از شروع تزریق، ارزیابی گردید. بررسی آنالیز واریانس یک‌طرفه که برای مقایسه بین گروه‌های کنترل و تیمار در روزهای مشخص شده انجام گرفت در جدول شماره 1 ارائه شده است.



نمودار شماره 2: زنده‌مانی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 پس از 24h تیمار با غلظت‌های مختلف از دی‌رامنولیپیدها. مقادیر بصورت mean±SD برای سه بار تکرار (n=3) بیان شده‌اند



تصویر شماره2: تصاویر آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 تیمار نشده و تیمار شده با غلظت‌های مختلف دی رامنولیپیدها (از 10mg/ml تا 50 mg/ml)



تصویر شماره 3: نمایش منطقه مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 توسط کرم دی‌رامنولیپیدی تهیه شده در آب یا حلال DMSO روی محیط مولرهینتون آگار، در مقایسه با کرم کنترل فاقد دی‌رامنولیپید

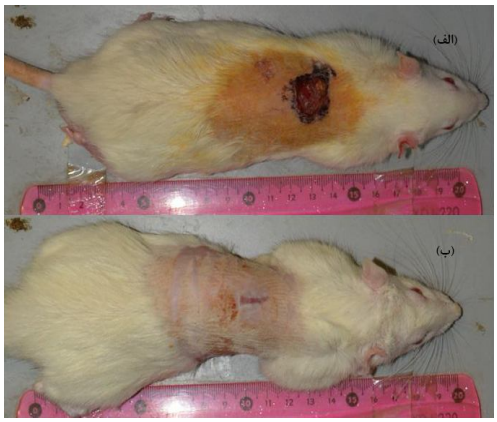
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

جدول شماره 1: آنالیز آماری توسط آنالیز واریانس یکطرفه توام با آزمون تعقیبی توکی، برای مقایسه شمارش باکتری های زنده موجود در زخم موش ها بین گروه های کنترل و تیمار شده با کرم رامنولیپیدی

متغیر وابسته	گروه (I)	گروه (J)	اختلاف میانگین (I-J)	خطای استاندارد	معنی‌داری	فاصله اطمینان 95%	
						حد پایین	حد بالا
Log (CFU/mg)-روز پنج	A	B	1/16667	0/99923	0/512	-1/8992	4/2326
		C	0/85333	0/99923	0/686	-2/2126	3/9192
	B	A	-1/16667	0/99923	0/512	-4/2326	1/8992
		C	-0/31333	0/99923	0/948	-3/3792	2/7526
	C	A	-0/85333	0/99923	0/989	-3/9192	2/2126
		B	0/31333	0/99923	0/948	-2/7526	3/3792
Log (CFU/mg)-روز ده	A	B	0/76400	0/73420	0/567	-1/1947	2/7227
		C	0/54400	0/73420	0/745	-1/4147	2/5027
	B	A	-0/76400	0/73420	0/567	-2/7227	1/1947
		C	-0/22000	0/73420	0/952	-2/1787	1/7387
	C	A	-0/54400	0/73420	0/745	-2/5027	1/4147
		B	0/22000	0/73420	0/952	-1/7387	2/1787
Log (CFU/mg)-روز پانزده	A	B	0/20333	0/68871	0/953	-1/9080	2/3165
		C	-0/14667	0/68871	0/975	-2/2598	1/9665
	B	A	-0/20333	0/68871	0/953	-2/3165	1/9098
		C	-0/35000	0/68871	0/870	-2/4631	1/7631
	C	A	0/14667	0/68871	0/975	-1/9665	2/2598
		B	0/35000	0/68871	/870	-1/7631	2/4631
Log (CFU/mg)-روز بیست	A	B	-3/16000	0/62054	0/015*	-5/3716	-0/9484
		C	-2/15500	0/56648	0/041*	-4/1739	-0/1361
	B	A	3/16000	0/62054	0/015*	0/9484	5/3716
		C	1/00500	0/56648	0/288	-1/0139	3/0239
	C	A	2/15500	0/56648	0/041*	0/1361	4/1739
		B	-1/00500	0/56648	0/288	-3/0239	1/0139

* : معنی دار است

نتایج موجود در جدول شماره 1 بیان می‌دارد که تیمار با کرم رامنولیپیدی پس از روز بیستم منجر به تغییر معنی‌داری در تعداد باکتری‌های زنده موجود در زخم رت‌ها شده است. شایان ذکر است که در انجام آنالیز واریانس از لگاریتم داده‌های مربوط به CFU استفاده شده است. علاوه براین، بررسی سطح زخم‌ها در گروه‌های کنترل و تیمار نشان داد که در همه گروه‌ها، زخم‌ها به‌طور معنی‌داری روند بهبود را در دوره تیمار طی نمودند به‌طوری‌که مساحت زخم‌ها تا روز بیستم به‌صورت چشمگیری کاهش داشت (تصویر شماره 4)، اما آنالیز واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین مساحت زخم‌ها در گروه‌های مختلف در هیچکدام از روزهای مورد بررسی وجود نداشت.



تصویر شماره 4: تصویر زخم آلوده به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 در رت‌ها در روزهای (الف) چهار و (ب) بیستم از شروع تزریق

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

بحث

پیش‌تر از این، Stipcevic و همکارانش در سال 2006 (16)، تاثیر مثبت دی‌رامنولیپیدها بر بهبود زخم‌های سوختگی را در مدل حیوانی گزارش نمودند. مطالعه حاضر، ویژگی ضدمیکروبی رامنولیپیدها را در مدل حیوانی مورد بررسی قرار می‌دهد. در این راستا، ابتدا رامنولیپیدها که نوعی سورفکتانت میکروبی هستند از محیط کشت باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 استخراج شدند و توسط روش کروماتوگرافی ستونی به بخش‌های مونورامنولیپیدی و دی رامنولیپیدی تفکیک شدند. آنالیزهای کروماتوگرافی لایه نازک و اسپکتروسکوپی جرمی، حضور رامنولیپیدها را در محصول به‌دست آمده اثبات نمود و همچنین سنجش کشش سطحی، فعالیت سورفکتانتی محصول را تایید کرد (12). فعالیت ضد میکروبی مونورامنولیپیدها و دی‌رامنولیپیدها علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 که با استفاده از روش انتشار دیسک انجام گرفت و نتایج آن در تصویر شماره 1 و نمودار شماره 1 نمایش داده شده است، نشان می‌دهد که قطر ناحیه مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* وابسته به غلظت رامنولیپیدها می‌باشد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، قطر منطقه مهار تکثیر باکتری افزایش می‌یابد. علاوه بر این، آنالیز واریانس در تعیین حداقل مقدار مونورامنولیپیدها و دی‌رامنولیپیدها که قادر به ایجاد هاله مهار رشد معنی‌دار بود، نشان داد که حلال DMSO موجب افزایش مهارکنندگی رامنولیپیدها شده است، که احتمالا دلیل این امر بر می‌گردد به این حقیقت که در محلول آبی، بیش‌تر رامنولیپیدها به فرم میسل هستند و محلول کدرتری داریم در حالی‌که در حلال DMSO، بیش‌تر رامنولیپیدها به فرم مونومرهای رامنولیپیدی است به‌طوری‌که محلول شفاف‌تری داریم. وجود مونومرهای رامنولیپیدی موجب افزایش سطح تماس بین ملکول‌های رامنولیپیدی با باکتری‌ها شده و لذا قدرت تاثیرگذاری رامنولیپیدها را افزایش می‌دهد. از طرفی چنان‌چه در نمودار شماره 1 مشاهده می‌شود بطورکلی در غلظت‌های مشابه از مونو و دی رامنولیپیدها و در حضور حلال یکسان، قدرت مهارکنندگی دی رامنو لیپیدها از مونو رامنولیپیدها بیش‌تر است که این امر می‌تواند مربوط به حلالیت بهتر دی‌رامنولیپیدها در حلال‌ها به‌دلیل قطبیت بیش‌تر ساختار آن‌ها در مقایسه با مونورامنولیپیدها باشد. زیرا دی رامنولیپیدها با داشتن دو حلقه قند در ساختار شیمیایی خود، در مقایسه با مونورامنولیپیدهایی که دارای دنباله اسیدچرب یکسان هستند اما دارای یک حلقه قند در ساختارشان می‌باشند، از قطبیت ملکولی بالاتری برخوردارند و لذا محلول آن‌ها درون حلال قطبی مانند آب یا DMSO دارای یکنواختی و پخش بهتری خواهد بود. پیش‌تر از این نیز، محققین مختلفی تاثیر ضدمیکروبی مخلوط رامنولیپیدی حاوی مونورامنولیپیدها و دی رامنولیپیدهای حاصل از سویه‌های مختلف باکتریایی را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نموده‌اند که نتایج آن‌ها بیانگر MICهای معادل 128 µg/ml (18،17،10) و 500 µg/ml (14) بوده است. اختلاف در نتایج گزارش شده توسط محققین مختلف، مربوط به تفاوت ناشی از نوع و تعداد هومولوگ‌های رامنولیپیدی است که در محصولات رامنولیپیدی حاصل از سویه‌های باکتریایی مختلف وجود دارد. شایان ذکر است که هومولوگ‌های رامنولیپیدی همان ملکول‌های رامنولیپیدی هستند که نوع و طول زنجیر اسید چرب متصل به حلقه یا حلقه‌های رامنوز در آن‌ها متفاوت است، که این امر می‌تواند در اثر تغییر سویه یا شرایط محیط کشت به وجود آید. تا سال 2010، تقریبا 60 نوع هومولوگ در رامنولیپیدهای حاصل از گونه‌های مختلف سودوموناس و سایر باکتری‌ها شناسایی شدند و از سال 2010 تا 2017، 53 هومولوگ جدید نیز شناسایی و مشخص گردید(3). دو نوع اصلی رامنولیپیدهای تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت مایع عبارت از L-رامنوسیل -3- هیدروکسی دکانوئیل -3- هیدروکسی دکانوئیت (Rha-C_{10}-C_{10}) و L-رامنوسیل -L-رامنوسیل -

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

3- هیدروکسی دکانوئیل -3- هیدروکسی دکانوئیت (Rha-Rha-C10-C10) می‌باشند(4).

با توجه به اینکه در مراحل قبلی نشان داده شد که قدرت مهارکنندگی دی رامنولیپیدها در مقایسه با رامنولیپیدها بیش‌تر است، برای این منظور محلول‌های دی رامنولیپیدی تهیه و تاثیر آن‌ها در محیط مایع بر زنده‌مانی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار با غلظت‌های بالاتر از 20mg/ml از دی‌رامنولیپیدها تقریبا منجر به عدم زنده مانی باکتری‌ها شد. پیش‌تر از این، بهارعلی و همکارانش با استفاده از اندازه‌گیری جذب کریستال ویوله گزارش نموده‌اند که که تیمار با غلظت 3 %w/v (معادل با 30 mg/ml) از رامنولیپیدها منجر به 57 درصد افزایش جذب در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده گردید یا به عبارت دیگر موجب تغییر در غشای یاکتری‌ها و کاهش 57 درصد از سلول‌های زنده شد (14). در ادامه، به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 تحت تاثیر محلول‌های دی‌رامنولیپیدی، باکتری‌های تیمار نشده بودند (کنترل) و نیز باکتری‌های تیمار شده با محلول‌های دی رامنولیپیدی (10mg/ml تا 50 mg/ml) فیکس شده وتوسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تصاویر SEM موجود در تصویر شماره 2، بیانگر این مطلب است که غشای باکتری‌ها تا غلظت 50 mg/ml از دی رامنولیپیدها تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرده است. که این مشاهدات خلاف گزارشی است که توسط بهار علی و همکارانش صورت پذیرفته است. ایشان بیان می‌دارند که 3 %w/v (معادل با 30 mg/ml) از رامنولیپیدها سبب تغییر سطح سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از بافت نرم عادی به ظاهری خشن شده است و این امر را مربوط به از هم گسیختگی غشاء سلول و از بین رفتن یکپارچگی آن دانسته‌اند(14). اما، در تصاویر میکروسکوپ الکترونی این‌طور به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت دی رامنولیپیدها، شکل کروی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌تر به سمت کشیده شدن می‌رود، به‌طوری‌که در غلظت 50 mg/ml از دی رامنولیپیدها تعداد باکتری‌هایی که از فرم کروی تغییر شکل یافته‌اند مشهودتر است. به نظر می‌رسد این امر می‌تواند مربوط به جایگیری ملکول‌های رامنولیپیدی در غشای لیپیدی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد که قضاوت در این خصوص نیاز به مطالعه بیش‌تر دارد.

به منظور بررسی امکان استفاده از دی رامنولیپیدها به صورت فرمولاسیون کرم جهت مهار رشد باکتری‌ها، از پایه اوسرین برای تهیه کرم استفاده شد. برای این منظور، کرم دی‌رامنولیپیدی یک بار با حضور آب و بار دیگر با حضور حلال DMSO به عنوان فاز حامل دی رامنولیپید تهیه گردید. مشاهدات (تصویر شماره 3) بیانگر عدم رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در منطقه‌ای است که از کرم رامنولیپیدی در روی پلیت حاوی محیط آگاردار استفاده شده است، از طرفی، کرم اوسرین فاقد دی رامنولیپید (کنترل) چه در حضور آب و چه حلال DMSO تهیه شده باشد، قادر به مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نمی‌باشد. به این ترتیب، یافته‌ها موید این مطلب است که امکان وارد کردن دی‌رامنولیپید، هم توسط آب و هم توسط حلال DMSO در کرم پایه اوسرین وجود دارد. علاوه براین، مشاهده شد که کرم‌های دی‌رامنولیپیدی تهیه شده در حضور آب یا حلال DMSO، تاثیر مشابهی بر مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. با این‌که نتایج آزمایشات انتشار دیسک بیانگر این بود که به دلیل حلالیت بهتر دی‌رامنولیپیدها در حلال DMSO در مقایسه با آب، در غلظت‌های یکسان از دی‌رامنولیپیدها تاثیرگذاری محلول‌های دی‌رامنولیپیدی در DMSO در مقایسه با محلول‌های آبی آن‌ها نتایج بهتری را در مهار رشد باکتری‌ها دارد، اما در فرمولاسیون کرم، تاثیر مشابهی برای کرم‌های دی‌رامنولیپیدی پایه آبی و پایه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

آلی مشاهده شد. دلیل آن می‌تواند مربوط به این امر باشد که در فرمولاسیون کرم، با یک سیستم دو فازی مواجه هستیم که ملکول‌های دی‌رامنولیپیدها چه در حلال آبی حل شده باشند و چه در حلال DMSO، وقتی در فرمولاسیون کرم وارد می‌شوند به شکل امولسیون کننده عمل نموده و در فصل مشترک دو فاز موجد در فرمولاسیون کرم قرار می‌گیرند. اما در آزمون انتشار دیسک، با یک سیستم تک فازی متشکل از یک حلال مواجهیم و بنابراین دی رامنولیپیدها در یک فاز قرار می‌گیرند و لذا بسته به ساختاری که در هر حلال دارند رفتار متفاوتی نشان می‌دهند. به‌عنوان مثال در غلظت مورد استفاده در این مطالعه، در سیستم آبی به‌صورت ساختار میسل هستند و محلول کدری ایجاد می‌کنند، در حالی‌که وقتی با همان غلظت مشابه وارد سیستم آلی DMSO می‌شوند به حد تشکیل میسل نرسیده و محلول شفافی دارند که منجر به دسترسی بهتر آن‌ها به باکتری‌ها و ایجاد مهار رشد بالاتر در آزمون انتشار دیسک می‌گردد. البته فرضیات ارائه شده نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد.

بررسی تاثیر کرم رامنولیپیدی در آزمایشات درون‌تنی در مدل حیوانی نشان داد که در روز بیستم، تعداد باکتری‌های زنده موجود در محل زخم رت‌های تیمار شده با کرم رامنولیپیدی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش یافت. که این مشاهدات موید یافته‌های آزمایشگاهی روی پلیت حاوی محیط آگاردار است و بیان می‌دارد که رامنولیپیدها قادر به مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند. از طرفی، بهبود زخم‌ها در طی روزهای تیمار در گروه‌های مختلف می‌تواند مربوط به حضور عضله پانیکولوس کارنوسوس که در زیر لایه چربی پوست و بالای بافت چربی زیر جلدی و فاسیا قرار دارد دانست. نقش مهم این عضله در انقباض زخم‌های سطحی در پستانداران رده پایین، پیش‌تر از این توسط محققین گزارش شده است(19). به نظر می‌رسد جهت بررسی تاثیر تیمار مورد نظر بر ترمیم زخم، مستلزم حذف اثر مداخله‌ای این عضله در آزمایشات است، که چگونگی اجرای این امر توسط محققین متعدد با روش‌های پیشنهادی گوناگون در دست بررسی می‌باشد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که یافته‌های این مطالعه نشان داد که دی‌رامنولیپیدهای تهیه شده از *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 می‌توانند به صورت موثر و معنی‌داری رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار نمایند. همچنین فرمولاسیون دی‌رامنولیپیدها به صورت فرمولاسیون کرم ارائه شده، از قابلیت استفاده در مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار می‌باشند. با توجه به نتایج نوید بخش این مطالعه، توسعه فرمولاسیون‌های متفاوت جهت بهره‌گیری از پتانسیل ضدباکتریایی دی‌رامنولیپیدها در شکل‌های کاربردی مالیدنی (کرم، پماد و قطره) و تزریقی در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که موجبات انجام این تحقیق را فراهم آورده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماید. کد اخلاق IR.NIGEB.EC.1398.6.24 D توسط کمیته اخلاق زیستی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به این مطالعه اختصاص یافت، بدین وسیله از زحمات اعضای این کمیته محترم تشکر می‌شود. از کارمندان مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران واقع در بیمارستان حضرت فاطمه (س) سپاسگزاری می‌شود. علاوه براین، از سرکار خانم دکتر پروین شریعتی، عضو هیات علمی پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، جهت ارائه مشاوره در خصوص تهیه باکتری‌های استاندارد به منظور انجام آزمون‌های ضدباکتریایی تشکر می‌گردد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

References

1. Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, et al. Pseudomonas aeruginosa exoproducts determine antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus. PLOS Biology 2017; 15(11): 1-25.
2. Varjani SJ, Upasani VN. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. Bioresour Technol. 2017; 232: 389-397.
3. Chen J, Wu Q, Hua Y, Chen J, Zhang H, Wang H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. Appl Microbiol Biotechnol 2017; 101(23-24): 8309-8319.
4. Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA, Villemur R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. Biochim Biophys Acta 1999; 1440(2-3): 244-252.
5. Gudiña EJ, Rangarajan V, Sen R, Rodrigues LR. Potential therapeutic applications of biosurfactants. Trends Pharmacol Sci 2013; 34(12): 667-675.
6. Ito S, Honda H, Tomita F, Suzuki T. Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). The J Antibiot 1971; 24(12): 855-859.
7. Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044. Biotechnol Bioeng 2003; 81(3): 316-322.
8. Elshikh M, Funston S, Chebbi A, Ahmed S, Marchant R, Banat IM. Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. N Biotechnol 2017; 36: 26-36.
9. Li Q. Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. Frontiers of Chemical Science and Engineering 2017; 11(1): 27-36.
10. Lotfabad TB, Abassi H, Ahmadkhaniha R, Roostaazad R, Masoomi F, Zahiri HS, et al. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. Colloids Surf B: Biointerfaces 2010; 81(2): 397-405.
11. Partovi M, Lotfabad TB, Roostaazad R, Bahmaei M, Tayyebi S. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using Pseudomonas aeruginosa MR01. World J Microbiol and Biotechnol 2013; 29(6): 1039-1047.
12. Rahimi K, Lotfabad TB, Jabeen F, Mohammad Ganji S. Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa MR01 on MCF-7 human breast cancer cells. Colloids Surf B: Biointerfaces 2019; 181: 943-952.
13. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology 1966; 45(4): 493-496.
14. Bharali P, Saikia JP, Ray A, Konwar BK. Rhamnolipid (RL) from Pseudomonas aeruginosa OBP1: A novel chemotaxis

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

and antibacterial agent. Colloids Surf B: Biointerfaces 2013; 103: 502-509.

15. Bagheri Lotfabad T, Ebadipour N, Roostaazad R, Partovi M, Bahmaei M. Two schemes for production of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol-gel immobilized cells. Colloids Surf B Biointerfaces 2017; 152: 159-168.
16. Stipcevic T, Piljac A, Piljac G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. Burns 2006; 32(1): 24-34.
17. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas a eruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. Langmuir 2001; 17(5): 1367-1371.
18. Costa SGVAO, Nitschke M, Lépine F, Déziel E, Contiero J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa L2-1 from cassava wastewater. Process Biochemistry 2010; 45(9): 1511-1516.
19. Naldaiz-Gastesi N, Goicoechea M, Alonso-Martín S, Aiastui A, López-Mayorga M, García-Belda P, et al. Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. Stem Cell Reports 2016; 7(3): 411-424.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]