



التیام

شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳۳۲۹۱

eltiam.ivsa@yahoo.com

<http://eltiamjournal.ir/>

## ارزیابی اثربخشی نانونیوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در درمان

### کراتیت باکتریایی القا شده با/ستافیلوکوکوس آرنوس در موش صحرایی

خاطره کفشدوزان<sup>۱\*</sup>، نگار خسروی<sup>۱</sup>، حمیدرضا مسلمی<sup>۲</sup>، محمدصادق نوربخش<sup>۳</sup>، نگار نامدار<sup>۲</sup>

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۳. گروه مهندسی پزشکی، دانشکده بیوفناوری، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

\*kafshdouzan@semnan.ac.ir



<https://doi.org/10.30500/eltiamj.13.1.5>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۱



کپی‌رایت © مجله التیام: دسترسی آزاد، کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان. ناشر: انجمن جراحی دامپزشکی ایران.

## چکیده

**زمینه و نوع مطالعه:** کراتیت باکتریایی ناشی از *استافیلوکوکوس آرنوس* یکی از چالش‌برانگیزترین عفونت‌های چشمی است و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نیاز به گزینه‌های درمانی نوین را افزایش داده است. اسانس آویشن شیرازی با دارا بودن تیمول و کارواکرول، خواص ضدباکتریایی و ضدالتهابی قابل توجهی دارد، اما فراربت، آب‌گریزی و سمیت موضعی، کاربرد مستقیم آن را محدود می‌کند. **هدف:** از اینرو با توجه به خصوصیات مطلوب نانونیوزوم‌ها به عنوان سامانه‌های دارورسانی ایده‌آل برای انکپسوله‌سازی ترکیبات آب‌گریز و افزایش زیست‌فراهمی موضعی داروها، هدف از این تحقیق مطالعه اثربخشی نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن شیرازی در کنترل کراتیت باکتریایی القا شده به وسیله *استافیلوکوکوس آرنوس* در نظر گرفته شد.

**روش کار:** ابتدا نانونیوزوم‌های حاوی اسانس با روش فیلم نازک تبخیری و در حضور سورفکتانت غیریونی سنتز شده و اندازه ذرات، پتانسیل زتا، راندمان انکپسوله‌سازی و پایداری فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. ۳۰ قطعه رت نر نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه درمانی شامل: گروه کنترل (دریافت‌کننده نرمال سالین)، گروه دریافت‌کننده نانونیوزوم‌های حاوی اسانس و گروه دریافت‌کننده سیپروفلوکساسین تقسیم شدند. پس از القاء کراتیت باکتریایی در قرنیه یک چشم از هر قطعه موش با *استافیلوکوکوس آرنوس*، اثربخشی درمان با ارزیابی میزان بار باکتریایی در نمونه‌های قرنیه، در روزهای چهارم و هشتم پس از القای عفونت، سنجیده شد.

**نتایج:** در روز چهارم پس از القای کراتیت، میانگین بار باکتریایی قرنیه در گروه دریافت‌کننده نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن  $10^5 \times 5/4$  CFU/Cornea و گروه سیپروفلوکساسین  $10^5 \times 3/4$  به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل  $10^6 \times 6/8$  بود ( $p < 0/05$ )، در حالی که تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه درمانی مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). این الگو در روز هشتم نیز تکرار شد؛ به طوری که هر دو گروه درمانی نسبت به کنترل  $10^8 \times 8/8$  کاهش معنی‌دار بار میکروبی نشان دادند ( $p < 0/05$ ) و اختلاف معنی‌داری بین نانونیوزوم  $10^5 \times 0/5$  و سیپروفلوکساسین  $10^5 \times 1/6$  وجود نداشت ( $p > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری نهایی:** این مطالعه اثربخشی بالای نانونیوزوم‌های حاوی آویشن شیرازی را در درمان کراتیت باکتریایی تأیید می‌کند و پتانسیل آن را به عنوان نسل جدیدی از داروهای چشمی ایمن‌تر و مؤثرتر، مبتنی بر منابع طبیعی و فناوری نانو، برجسته می‌سازد.

**کلمات کلیدی:** نانونیوزوم، آویشن شیرازی، کراتیت باکتریایی، موش صحرایی، رهایش دارو

## مقدمه

کراتیت باکتریایی، نوعی عفونت قرنیه با پیشرفت سریع است که به عنوان یکی از چالش‌برانگیزترین عفونت‌های چشم در بالین به شمار می‌آید. این وضعیت که با التهاب شدید قرنیه مشخص می‌شود، در صورت عدم مداخله درمانی موثر و سریع، می‌تواند به سرعت منجر به آسیب‌های دائمی از جمله ایجاد اسکار قرنیه، کاهش شدید بینایی، و حتی تخلیه چشم گردد. همه‌گیری این عفونت و گستردگی جغرافیایی آن به‌ویژه در مناطقی با وضعیت بهداشتی نامناسب، محدودیت دسترسی به خدمات پزشکی تخصصی، و شیوع استفاده از لنزهای تماسی، باعث شده است که کراتیت باکتریایی به یک اولویت بهداشت عمومی در سطح جهانی تبدیل شود. آمارها نشان می‌دهند که سالانه صدها هزار مورد جدید کراتیت باکتریایی در سراسر جهان رخ می‌دهد که بخش قابل توجهی از آن‌ها منجر به اختلالات بینایی دائمی می‌شوند (۱، ۲).

عوامل میکروبی مسبب ایجاد کراتیت باکتریایی بسیار متنوع هستند، اما گونه‌های خاصی از باکتری‌ها عمدتاً در این عفونت گزارش شده‌اند. در میان آن‌ها، *سودوموناس آئروژینوزا*، یک باسیل گرم منفی فرصت‌طلب و بسیار تهاجمی، به دلیل توانایی در تولید اگزوتوکسین‌های متنوع و آنزیم‌های مخرب بافت نظیر الاستاز و آلکالین پروتئاز، اغلب با شدیدترین و سریع‌ترین اشکال کراتیت مرتبط است. *استافیلوکوکوس اورئوس*، عامل باکتریایی شایع دیگری است که به‌ویژه در عفونت‌های مرتبط با زخم‌های قرنیه و پس از جراحی‌های چشمی، می‌تواند باعث ایجاد ضایعات دردناک و پیش‌رونده شود. علاوه بر این، شواهدی مبنی بر دخالت سایر باکتری‌ها مانند *Streptococcus Moraxella lacunata, pneumoniae* و گونه‌های مختلف باسیل‌های گرم منفی روده‌ای نیز در شرایط خاص در ایجاد کراتیت گزارش شده است. توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تشکیل بیوفیلم، که یک لایه محافظتی چسبنده از پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌هاست، مقاومت آن‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مکانیسم‌های دفاعی میزبان به

شدت افزایش داده و موجب گسترش ضایعات می‌گردد (۲).

در سال‌های اخیر با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در حوزه داروهای ضد میکروبی، درمان کراتیت باکتریایی هنوز با چالش‌های فزاینده‌ای روبرو است. مقاومت دارویی، پدیده‌ای که ناشی از تکامل طبیعی باکتری‌ها تحت فشار آنتی‌بیوتیک‌ها و انتقال ژن‌های مقاومت است، اثربخشی داروهای ضد میکروبی رایج را به طور جدی محدود کرده است. از این رو، ظهور سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها و حتی پپتیدهای قوی‌تر، لزوم بازنگری در استراتژی‌های درمانی و جستجوی عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری ساخته است. علاوه بر این، ویژگی‌های آناتومیکی و فیزیولوژیکی چشم، مانند وجود سد قرنیه، غلظت کم دارو در محل عفونت، و متابولیسم سریع دارو، منجر به نفوذ ناکافی داروها به بافت قرنیه می‌شود. این محدودیت‌ها اغلب مستلزم استفاده از دوزهای بالا و تکرار مکرر دارو خواهد شد که خود می‌تواند منجر به سمیت موضعی، ناراحتی بیمار و عدم پایبندی به درمان شود (۲). در جستجوی راهکارهای نوین و پایدارتر، توجه به ظرفیت‌های داروهای طبیعی و ترکیبات زیست‌فعال گیاهی، به‌ویژه در طب سنتی ایران که سابقه‌ای طولانی در استفاده از گیاهان دارویی دارد، اهمیت ویژه‌ای یافته است. گیاه *Zataria multiflora Boiss*، که در زبان فارسی با نام آویشن شیرازی شناخته می‌شود، یکی از گیاهان دارویی بومی منطقه خاورمیانه با خواص فارماکولوژیکی متنوع از جمله خصوصیات ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی گسترده است. فرآورده‌های مختلف این گیاه، به‌ویژه اسانس آن، حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنولیک مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد. این ترکیبات به دلیل ساختار شیمیایی منحصر به فرد خود، از مسیرهای مختلفی نظیر برهم‌کنش با غشای سلولی باکتری‌ها، اختلال در عملکرد پروتئین‌های حیاتی، و مهار مسیرهای متابولیکی، اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. مطالعات پیشین، طیف وسیعی از فعالیت ضدباکتریایی

اسانس آویشن شیرازی را بر ضد طیف گسترده ای از عوامل بیماریزای انسانی، از جمله سویه های بالینی مقاوم *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* گزارش نموده اند همچنین در برخی پژوهش ها به پتانسیل ضدالتهابی این اسانس اشاره شده است که می تواند در کاهش آسیب های ناشی از عفونت قرنیه مؤثر باشد (۳، ۴).

با وجود ظرفیت بالای اسانس آویشن شیرازی، استفاده مستقیم از آن در فرمولاسیون داروهای چشمی می تواند با چالش های متعددی همراه باشد. فرار بودن ذاتی اسانس های روغنی، که منجر به تبخیر سریع و از دست دادن غلظت فعال در طول زمان می شود، یکی از مهم ترین عواملی است که اثربخشی بالینی آن را محدود می کند. از طرف دیگر ماهیت آب گریز این ترکیبات، انحلال پذیری آن ها را در محیط آبی اشک و محلول های چشمی کاهش داده و در نتیجه، دسترسی زیستی آن ها را به بافت قرنیه محدود می سازد. علاوه بر این، غلظت های بالای اسانس یا ترکیبات فعال آن، ممکن است باعث تحریک قرنیه، سمیت سلولی و بروز عوارض جانبی ناخواسته در چشم گردد. از اینرو این محدودیت ها، ضرورت توسعه سامانه های نوین انتقال دارو را برای کپسوله سازی، محافظت، و رهایش کنترل شده ی اسانس آویشن شیرازی برجسته می سازد (۴).

در سال های اخیر، فناوری نانوایوزوم، به عنوان یکی از پلتفرم های امیدوارکننده در سیستم های نوین دارورسانی، توجه گسترده ای را به خود جلب کرده است. نانوایوزوم ها وزیکول های نانومتری متشکل از سورفکتانت های غیریونی و کلسترول هستند که به دلیل پایداری بالا، هزینه، ساخت کمتر، و توانایی مناسب در انکپسوله سازی ترکیبات به عنوان حامل های کارآمد در دارورسانی موضعی چشم مطرح شده اند. این نانوحامل ها موجب افزایش پایداری اسانس، بهبود توزیع آن در محیط آبی چشم، ارتقای نفوذ به بافت قرنیه و رهایش کنترل شده دارو می شوند. افزون بر این، نانوایوزوم ها با کاهش تحریک بافتی نسبت به اسانس

آب گریز، به عنوان حامل های کارآمد در دارورسانی موضعی چشم مطرح شده اند. این نانوحامل ها موجب افزایش پایداری اسانس، بهبود توزیع آن در محیط آبی چشم، ارتقای نفوذ به بافت قرنیه و رهایش کنترل شده دارو می شوند. افزون بر این، نانوایوزوم ها با کاهش تحریک بافتی نسبت به اسانس خالص، احتمال بروز عوارض چشمی را کاهش می دهند (۵، ۶).

با توجه به پتانسیل بالای اسانس آویشن شیرازی و مزایای سامانه های نانوایوزومی، ترکیب این دو مؤلفه می تواند راهکاری نوآورانه برای غلبه بر محدودیت های درمانی کراتیت باکتریایی ارائه دهد. با این حال، بررسی متون علمی نشان می دهد که تحقیقات در این زمینه بسیار محدود است. اگرچه مطالعات متعددی به بررسی خواص ضد میکروبی اسانس *Z. multiflora* پرداخته اند و تحقیقات دیگری نیز بر روی کاربرد نانوایوزوم ها در انتقال داروهای چشمی تمرکز داشته اند، اما پژوهشی که به طور خاص به توسعه و ارزیابی سیستم نانوایوزومی حاوی اسانس آویشن شیرازی برای درمان کراتیت باکتریایی بپردازد، وجود ندارد. این خلاء علمی، ضرورت انجام پژوهشی جامع را برجسته می سازد که بتواند پتانسیل این رویکرد درمانی ترکیبی را در محیط بالینی مورد سنجش قرار دهد.

از اینرو، در این مطالعه با هدف رفع این شکاف تحقیقاتی، اثربخشی درمانی نانوایوزوم های حاوی اسانس آویشن شیرازی در مدل کراتیت باکتریایی در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق می تواند گامی مهم در جهت توسعه نسل جدیدی از درمان های چشمی مؤثرتر، ایمن تر، و مبتنی بر منابع طبیعی برای مقابله با کراتیت باکتریایی باشد.

## مواد و روش ها

### تهیه اسانس و ساخت نانوایوزوم حاوی اسانس

#### آویشن شیرازی

اسانس آویشن شیرازی از شرکت طبیب دارو واقع در استان اصفهان، شهرستان کاشان تهیه شد. سپس نانوایوزوم حاوی

اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۳٪ در دانشکده بیوفناوری دانشگاه سمنان با استفاده از روش آب پوشانی لایه نازک (۷) ساخته و مشخصه یابی شد. این روش به دلیل سادگی، کارایی بالا و قابلیت مقیاس پذیری، به عنوان یکی از رویکردهای متداول در سنتز نانونیوزومها شناخته می شود. در تحقیق حاضر، تمرکز اصلی بر ارزیابی اثربخشی ضد میکروبی این نانونیوزوم در مدل حیوانی کراتیت باکتریایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده و داده های مربوط به سنتز و مشخصه یابی نانونیوزوم ذکر نشده است.

### مدل حیوانی

این مطالعه بر روی ۳۰ سر موش صحرایی ویستار نر بالغ (با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم) انجام شد. حیوانات پس از انتقال به مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، به مدت یک هفته در شرایط محیطی کنترل شده برای سازگاری قرار گرفتند. شرایط نگهداری شامل دمای اتاق (۲۰-۲۴ درجه سانتی گراد)، چرخه نوری ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی، و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد آزمایشگاهی بود. تمامی پروتکل های حیوانی مطابق با دستورالعمل های مربوطه برای استفاده از حیوانات در تحقیقات چشمی و بینایی تدوین و توسط کمیته اخلاق در استفاده از حیوانات دانشگاه سمنان با کد اخلاق [IR.SU.REC.1400.11] تأیید گردید.

### القای کراتیت باکتریایی

در روز جراحی کلیه حیوانات توسط ترکیب دارویی کتامین هیدروکلراید ۵ درصد (شرکت آلفاسان هلند) با دز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین هیدروکلراید ۲ درصد (شرکت آلفاسان هلند) با دز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. برای القای کراتیت باکتریایی، ابتدا ۲ قطره داروی پروکائین بر روی

### نمونه گیری چشم و جداسازی قرنیه

نمونه گیری در فواصل زمانی ۴ و ۸ روز بعد از جراحی و هر بار از ۱۵ قطعه رت پس از آسان کشی با دوز بالای تیوپنتال،

قرنیه چشم چپ هر موش صحرایی اچکانده شد تا بی حسی سطحی حاصل گردد. سپس، با استفاده از سرنگ انسولین و سوزن گیج ۳۰، ۰/۱ سی سی از سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25922) تلقیح شد. سوزن با زاویه افقی و مماس بر سطح قرنیه وارد شده و تا عمق تقریبی ۰/۲ میلی متر در لایه استروما پیش برده شد، سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت نهایی  $10^8 \times 1/5$  واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر در نرمال سالین استریل تزریق گردید (تصویر شماره ۱، الف و ب). پس از ۲۰-۱۵ دقیقه، حیوانات به هوش آمدند. ۲۴ ساعت پس از تلقیح و قبل از شروع هرگونه مداخله درمانی، القای کراتیت از نظر بالینی توسط یک مشاهده گر که از گروه بندی درمانی بی اطلاع بود (blinded observer)، ارزیابی و تأیید شد. (۸)

### گروه های مورد مطالعه

حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه درمانی (۱۰ سر موش در هر گروه) و دو زیرگروه زمانی (روز چهارم و هشتم) تقسیم شدند. در گروه اول قطره نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن شیرازی، در گروه دوم قطره چشمی سیپروفلوکساسین ۰/۳٪ و در گروه سوم نرمال سالین مورد استفاده قرار گرفت. درمان ها به صورت دو قطره در هر چشم و هر ۶ ساعت یکبار به مدت ۷ روز متوالی تجویز گردید.

### گروه های مورد مطالعه

حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه درمانی (۱۰ سر موش در هر گروه) و دو زیرگروه زمانی (روز چهارم و هشتم) تقسیم شدند. در گروه اول قطره نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن شیرازی، در گروه دوم قطره چشمی سیپروفلوکساسین ۰/۳٪ و در گروه سوم نرمال سالین مورد استفاده قرار گرفت. درمان ها به صورت دو قطره در هر چشم و هر ۶ ساعت یکبار به مدت ۷ روز متوالی تجویز گردید.

صورت گرفت. برای جداسازی قرنیه، ابتدا تحت شرایط استریل چشم ها از حدقه خارج شدند، سپس با استفاده از اسکالپل برش در سطح لیمبوس ایجاد گردید و هر قرنیه جداسازی شده پس از توزین با ترازوی حساس آزمایشگاهی

به میکروتیوب حاوی PBS به صورت جداگانه انتقال داده شد.

### ارزیابی میکروبی

پیش از شروع مراحل اصلی، محیط کشت مانیتول سالت آگار (تولید شده توسط شرکت ایبرسکو) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده تهیه و استریل گردید. سپس، قرنیه‌های منتقل شده به PBS، به منظور همگن‌سازی، به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه ورتکس، مخلوط شدند. از هر سوسپانسیون هموژنیزه، سه مرحله رقت‌سازی متوالی در PBS استریل انجام گرفت و مجدداً با شیکر به خوبی مخلوط گردید. در نهایت، از هر نمونه رقیق شده، حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و به صورت سطحی بر روی محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شد (برای هر نمونه ۳ تکرار). پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی دوره انکوباسیون، پلت‌های حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ عدد کلونی شمارش شدند. پس از محاسبه میانگین تعداد کلونی‌ها برای هر نمونه، نتایج به صورت تعداد واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر قرنیه (CFU/Cornea) گزارش گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های کمی حاصل از گروه‌های درمانی مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۴) تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) ارائه گردیدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های درمانی، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری در تمام محاسبات،  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

تعداد باکتری‌های جدا شده از قرنیه در گروه‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از رابطه استارتفورد و همکاران محاسبه شد. نتایج حاصل از این ارزیابی به صورت میانگین

$\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

بر این اساس در روز چهارم پس از القاء کراتیت باکتریایی، میزان باکتری در گروه درمان شده با سیپروفلوکساسین کمتر از سایر گروه‌ها بود. در حالیکه در گروه کنترل که نرمال‌سالین استریل دریافت کردند، تعداد باکتری‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها مشاهده شد ( $p \leq 0.05$ ). گرچه تعداد باکتری‌های شمارش شده در گروه سیپروفلوکساسین نسبت به گروه نانولیپوزوم حاوی اسانس کمتر بود اما اختلاف آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). نتایج این بخش نشان می‌دهد استفاده از نانولیپوزوم به همراه اسانس در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری باعث کاهش رشد باکتری می‌شود ( $p \leq 0.05$ ).

بررسی تعداد باکتری‌های جدا شده از قرنیه در روز هشتم پس از القاء کراتیت، روند مشاهده شده در روز چهارم را تأیید کرد. نتایج بررسی تعداد باکتری‌های جدا شده از قرنیه در گروه‌های مختلف نشان داد، که در روز هشتم نیز میزان باکتری‌های جدا شده از گروه درمان شده با سیپروفلوکساسین نسبت به سایر گروه‌ها کمتر بود، در حالیکه این اختلاف بین دو گروه درمان شده با سیپروفلوکساسین و نانولیپوزوم حاوی اسانس معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). با این حال، نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن نیز به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل موجب کاهش رشد باکتری‌ها شد ( $p \leq 0.05$ ) که مجدداً اثربخشی نانولیپوزوم حاوی اسانس را در کاهش بار باکتریایی قرنیه در مقایسه با گروه کنترل (بدون درمان) نشان می‌دهد.

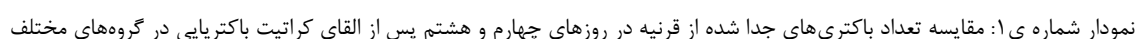
بر اساس تحلیل آماری داده‌ها، در هر دو بازه زمانی (روز چهارم و هشتم)، تفاوت معنی‌داری در تعداد باکتری‌های جدا شده بین گروه‌های مختلف مشاهده شد. اگرچه در هر دو روز، تعداد باکتری‌های مشاهده شده در گروه سیپروفلوکساسین کمتر از گروه نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن بود، اما مقایسه آماری بین این دو گروه نشان داد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نیست ( $p > 0.05$ ). این یافته حاکی از آن است که نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن

( $p \leq 0.05$ ). این اختلاف آماری معنی‌دار بر اثربخشی قابل توجه نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن در مهار رشد و کاهش تعداد *S. aureus* در قرنیه تأکید می‌کند. این نتایج قویاً بیانگر پتانسیل درمانی نانولیپوزوم سنتز شده حاوی اسانس آویشن شیرازی در درمان کراتیت باکتریایی ناشی از *S. aureus* است.



جدول شماره ۱: نتایج حاصل از شمارش باکتریها در روز چهارم و هشتم پس از الفاء کراتیت باکتریایی. در هر ستون بین حروف هم‌نام اختلاف معنی داری وجود ندارد اما بین حروف غیر هم‌نام اختلاف معنی دار می باشد.

| روز چهارم             | روز هشتم                   |
|-----------------------|----------------------------|
| نانونیوزوم حاوی آویشن | $5 \pm 1.5 \times 4/5^b$   |
| سیپروفلوکساسین        | $4 \pm 1.5 \times 3/4^b$   |
| کنترل                 | $5^a \pm 1.6 \times 8/6^a$ |



## بحث و نتیجه گیری

شیوع روزافزون مقاومت میکروبی به عوامل ضد میکروبی، چالشی جهانی در بهداشت عمومی محسوب می شود. از اینرو ضرورت توسعه استراتژی های درمانی نوین و مؤثر بیش از پیش آشکار شده است. گیاهان دارویی، با توجه به تنوع زیستی گسترده و ذخایر عظیم ترکیبات زیست فعال، پتانسیل قابل توجهی را در این زمینه فراهم می آورند. در میان این گیاهان، آویشن شیرازی که بومی مناطق کوهستانی ایران است، به دلیل داشتن ترکیبات فنولیک کلیدی نظیر تیمول و کارواکرول، خواص ضد میکروبی قدرتمندی از خود نشان داده است (۹، ۱۰). کارواکرول، به عنوان یکی از اجزای اصلی اسانس آویشن، مکانیسم های عمل متنوعی را بر ضد طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها ایفا می کند که عمدتاً شامل اختلال در یکپارچگی غشای سلولی، مهار سنتز DNA، RNA و پروتئین، و القای استرس اکسیداتیو می باشد (۱۱، ۱۲).

با این حال، کاربرد مستقیم اسانس های گیاهی در مقیاس بالینی با محدودیت های مهمی روبرو است. سمیت سلولی، واکنش های حساسیتی، ناپایداری در برابر عوامل محیطی (نور، حرارت، اکسیداسیون) و بوی نامطبوع، از جمله موانع اصلی در فرمولاسیون های دارویی محسوب می شوند. فناوری نانو، با توسعه سیستم های نانوحامل، راهکاری کلیدی برای غلبه بر این چالش ها ارائه می دهد. این سیستم ها قادرند با کپسوله کردن ترکیبات فعال، پایداری آن ها را افزایش داده، رهایش کنترل شده را تسهیل کنند، اثرات جانبی را کاهش دهند (۶). در مطالعات پیشین، پتانسیل نانوحامل ها در افزایش اثربخشی اسانس های گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است در مطالعه ای که توسط خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، نشان داده شد که انکپسولاسیون اسانس آویشن در نانوزل کیتوزان-بنزوئیک اسید، منجر به افزایش فعالیت ضد میکروبی و حفظ کیفیت میوه در طول انبارداری می شود. این مطالعه ادعا کرده است که خاصیت آنتی باکتریال سیستم نانو، به طرز معناداری بیش از آنتی بیوتیک بوده

است، یافته ای که نیاز به بررسی دقیق تر در مدل های بالینی دارد (۱۳). همچنین، مطالعه نگهبان و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان داد که نانوکپسولاسیون اسانس درمنه، اثر دورکنندگی بالایی بر لارو شب پره پشت الماسی داشته و رهایش کنترل شده ترکیب مؤثره، باعث طولانی تر شدن اثر شده است (۱۴). این مطالعات، مؤید نقش مؤثر فناوری نانو در افزایش اثرگذاری و طول عمر اسانس های گیاهی هستند.

در مطالعه ای که توسط هاشمی زاده و همکاران به منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ویژگی های فیزیکی حامل های لیپیدی نانوساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی انجام شد، مشخص گردید حامل های لیپیدی نانوساختار حامل های مناسبی برای انکپسولاسیون عصاره آویشن شیرازی می باشند. نامبرگان بیان داشتند خاصیت آنتی اکسیدانی حامل های لیپیدی نانوساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی نسبت به عصاره آزاد بیشتر بوده است و این مورد می تواند در استفاده مفید از فناوری نانو در افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی مواد غذایی حاوی عصاره آویشن مؤثر باشد (۱۵).

با این حال، مقایسه های مستقیم و نتایج متناقض در ادبیات علمی، پیچیدگی این حوزه را نمایان می سازد. Engel و همکاران در مطالعه ای بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، تفاوت قابل توجهی در خواص ضد میکروبی بین تیمول و کارواکرول آزاد و لیپوزوم مشاهده نکردند (۱۶). از سوی دیگر، بختیاری و همکاران، بیان داشتند قدرت ضد میکروبی کارواکرول در شکل نیوزوم در مقایسه با شکل آزاد افزایش می یابد و پتانسیل آن را به عنوان یک داروی گیاهی قوی برای مبارزه با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین گزارش کردند (۱۷).

در این مطالعه، از نیوزوم ها به عنوان نانوحامل بهره گرفته شد. نیوزوم ها، ساختارهای وزیکولی غیریونی هستند که از تجمع سورفاکتانت های غیریونی در محیط آبی تشکیل می شوند و به دلیل داشتن ماهیت آمفی فیلک، توانایی بالایی در کپسوله کردن ترکیبات با حلالیت های متفاوت

دارند. این ویژگی، آن‌ها را به گزینه‌ای جذاب برای انتقال داروها تبدیل کرده است، زیرا می‌توانند با ایجاد یک لایه محافظ، ترکیبات فعال را از تخریب محافظت کرده و رهایش پایدار و کنترل‌شده‌ای را فراهم آورند. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که نیوزوم‌ها می‌توانند سمیت کمتری نسبت به لیپوزوم‌ها داشته باشند و خواص درمانی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشند (۵، ۱۸).

یافته‌های مطالعه حاضر، در خصوص کاهش قابل توجه تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه درمان شده با نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن، همسویی قوی با مطالعات پیشین دارد که اثربخشی نانوحامل‌ها را بر اسانس‌های گیاهی تأیید کرده‌اند (۱۴، ۱۷). کاهش تعداد باکتری در گروه درمانی این مطالعه، مشابه اثربخشی مشاهده شده در گروه دریافت‌کننده سیپروفلوکساسین، پتانسیل درمانی این فرمولاسیون را برجسته می‌سازد.

این تحقیق، اولین مطالعه‌ای است که عملکرد نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن شیرازی را به طور خاص بر کراتیت باکتریایی القا شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک مدل حیوانی زنده (رت) مورد بررسی قرار داده است. تحقیقات قبلی بیشتر بر ارزیابی‌های *in vitro*، مدل‌های حیوانی دیگر (مانند زخم پوستی)، یا تأثیر بر محصولات غذایی (مانند انبارداری میوه) متمرکز بوده‌اند. این مطالعه، شکاف مهمی را در درک کاربرد بالینی این فناوری در عفونت‌های چشمی پوشش می‌دهد و پتانسیل نانونیوزوم‌ها را در کاهش غلظت مورد نیاز اسانس، افزایش ماندگاری اثر و کاهش سمیت آن در یک سیستم بیولوژیکی زنده تأیید می‌نماید.

علی‌رغم نتایج امیدوارکننده، این مطالعه دارای محدودیت‌هایی است که باید در نظر گرفته شوند. اولاً، یافته‌های حاصل از مدل حیوانی، هرچند ارزشمند، نیازمند اعتبارسنجی در مطالعات بالینی انسانی برای تأیید ایمنی و اثربخشی در بیماران است. دوماً، مکانیسم‌های مولکولی دقیق که منجر به کاهش تعداد باکتری در چشم می‌شود، نیاز به بررسی عمیق‌تری دارند. همچنین ارزیابی تأثیر بر

تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، که یکی از عوامل کلیدی در عفونت‌های مزمن و مقاوم به درمان است، ضروری به نظر می‌رسد. ثالثاً، ارزیابی جامع سمیت، شامل سمیت چشمی (مانند التهاب، آسیب قرنیه) و سمیت سیستمیک، برای اطمینان از ایمنی بلندمدت فرمولاسیون، حیاتی است. در نهایت، مطالعات فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک برای تعیین دوز بهینه، فواصل درمانی، و پروفایل غلظت-اثر، برای طراحی رژیم‌های درمانی مؤثر و ایمن، ضروری خواهند بود.

بر اساس یافته‌های این تحقیق و محدودیت‌های ذکر شده، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده بر محورهای نظیر ارزیابی پتانسیل نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن در ترکیب با سایر عوامل درمانی، از جمله داروهای ضدالتهاب و ضد درد، به منظور درمان جامع‌تر علائم کراتیت باکتریایی، انجام کارآزمایی‌های بالینی فاز I و II برای ارزیابی ایمنی و اثربخشی نانونیوزوم آویشن به عنوان قطره چشمی در بیماران مبتلا به کراتیت باکتریایی، انجام مطالعات دقیق و پیشرفته سمیت (چشمی و سیستمیک) و مطالعات فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک برای بهینه‌سازی پروفایل دارویی فرمولاسیون، تحقیق در مورد مکانیسم‌های دقیق مولکولی در سطح سلولی و مولکولی مسبب اثرات ضد میکروبی و ضدالتهابی نانونیوزوم آویشن و ارزیابی توانایی نانونیوزوم آویشن در مهار تشکیل یا تخریب بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* متمرکز شوند. در مجموع، این تحقیق گامی مهم در جهت توسعه راهکارهای نوین مبتنی بر نانوتکنولوژی برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی، به ویژه در حوزه چشم‌پزشکی، محسوب می‌شود و پتانسیل قابل توجهی برای کاربردهای بالینی آینده دارد.

### نتیجه گیری کلی:

در این مطالعه، فرمولاسیون نانونیوزومی حاوی اسانس آویشن شیرازی به عنوان یک رویکرد نوین و کارآمد برای درمان کراتیت باکتریایی ارزیابی شد و نتایج نشان داد که انکسپولسه‌سازی اسانس در نانوحامل‌ها می‌تواند با افزایش پایداری، بهبود زیست-فراهمی و کنترل رهایش، اثربخشی

پیش‌بالینی گسترده‌تر و کارآزمایی‌های بالینی آینده فراهم سازد.

### تعارض منافع:

نویسندگان در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی را شناسایی نکرده‌اند.

ضدبakterیایی را به‌طور معناداری تقویت کند. ترکیب خواص ضد میکروبی قدرتمند تیمول و کارواکرول با قابلیت نفوذ و زیست‌سازگاری نانویوزوم‌ها منجر به کاهش بیشتر بار باکتریایی، در مدل *in vivo* شد؛ عملکردی که قابل مقایسه با درمان آنتی بیوتیکی رایج بود. بنابراین، این سیستم دارورسانی می‌تواند گزینه‌ای نویدبخش برای توسعه درمان‌های جایگزین، ایمن و مبتنی بر منابع طبیعی در مدیریت عفونت‌های قرنیه باشد و زمینه را برای مطالعات

### منابع

1. Ting DSJ, Ho CS, Deshmukh R, Said DG, Dua HS. Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. *Eye (Lond)*. 2021; 35: 1084–1101. doi: 10.1038/s41433-020-01339-3
2. Ung L, Chodosh J. Foundational concepts in the biology of bacterial keratitis. *Experimental Eye Research*. 2021; 209: 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108647>
3. Alipour-Eskandani M, Misaghi A, Akhondzadeh-basti A, Zahraei-Salehi T, Bokaie S, Noori N. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil on the growth of Bacillus Cereus ATCC 11778 in a commercial barley soup. *Journal of Veterinary Research*. 2009; 64: 29–32.
4. Ahani N, Sangtarash MH, Alipour Eskandani M, Houshmand M. Zataria multiflora Boiss. Essential Oil Induce Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines (HCT116 & SW48). *Iranian Journal of Public Health*. 2020; 49(4): 753–762. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i4.3183>
5. Arumugam K, Payal B, Jitendra S, Salonee C. Niosomes: A Novel Carrier Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2021; 11: 162–170. <https://doi.org/doi:10.22270/jddt.v11i1.4479>
6. Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nanoniosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*. 2014; 185(10): 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>
7. Dwived A., Mazumder A, Nasongkla N. Layer-by-layer nanocoating of antibacterial niosome on orthopedic implant. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 547(1-2), 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.075>
8. Barequet IS, Habet-Wilner Z, Keller N, Smollan G, Ziv H, Belkin M, Rosner M. Effect of Amniotic Membrane Transplantation on the Healing of Bacterial Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008; 49(1):163-167. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1005>
9. Akhondzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of Zataria multiflora Boiss. Essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. *LWT Food Science and Technology*. 2007; 40: 973-981. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.07.07>
10. Dadazadeh A, Nourafcan H. The Effect of Zataria multiflora Boiss Leaves Essential Oil on Some Pathogenic Bacteria as an

- Alternative for Conventional Antibiotics. Crescent Journal of Medical and Biological Sciences. 2022; 9(3): 173–183. <https://doi.org/10.34172/cjmb.2022.29>
11. Wang Y, Chen F, Lu Z, Ye L, Yang X, Gichure JN, et al. Inhibitory effect of carvacrol nanoemulsions on *Staphylococcus aureus* and its biofilms. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2025; 20: 357-369. <https://doi.org/10.1007/s00003-025-01573-5>
  12. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. Letters in Applied Microbiology. 2003; 36(3): 162-167. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>
  13. Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhavah S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. LWT-Food Science and Technology. 2015; 60(1): 502-508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
  14. Negahban M, Moharramipour S, Zand M, Hashemi SA. Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* L. larvae. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2013; 29(4): 909-924. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2014.4314>
  15. Hashemizade S, Ganbarzadeh Hojgani B, Hamisheh Kar H. Antimicrobial and physical Properties of Nanostructured Lipid Carriers(NLC) Containing *Thymus vulgaris* L. Innovative Food Technologies. 2017; 4(2): 141-149. <https://doi.org/10.22104/jift.2016.423>
  16. Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, da Silva Malheiros, P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. International Journal of Food Microbiology. 2017; 252: 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003>
  17. Bakhtiari R, Shiri M, Mohammadi MR, Pourmand MR, Mirzaie A, Taghiabadi Z. Enhanced antimicrobial effects of carvacrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains using niosome formulations. Argentinean Journal of Microbiology. 2025; 57(1): 1-86. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.10.001>
  18. Pires PC, Paiva-Santos AC, Veiga F. Liposome-Derived Nanosystems for the Treatment of Behavioral and Neurodegenerative Diseases: The Promise of Niosomes, Transfersomes, and Ethosomes for Increased Brain Drug Bioavailability. Pharmaceuticals. 2023; 16:1424. <https://doi.org/10.3390/ph16101424>

## Abstracts in English

**Efficacy of Nano-niozome Containing *Zataria multiflora* Essential Oil in the Control of Bacterial Keratitis Induced by *Staphylococcus aureus***

Khatereh Kafshdouzan<sup>1\*</sup>, Negar Khosravi<sup>1</sup>, Hamid Reza Moslemi<sup>2</sup>, Mohammad Sadegh Nourbakhsh<sup>3</sup>, Negar Namdar<sup>2</sup>

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Department of Biomedical Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan, Iran

\*kafshdouzan@semnan.ac.ir

**Background:** Bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* is one of the most challenging ocular infections, and the increasing spread of antibiotic resistance has intensified the need for novel therapeutic approaches. *Zataria multiflora* essential oil, due to the presence of thymol and carvacrol, possesses considerable antibacterial and anti-inflammatory properties; however, its volatility, hydrophobicity, and local toxicity limit its direct clinical application.

**Objectives:** Considering the favorable characteristics of nanoniosomes as ideal drug delivery systems for encapsulating hydrophobic compounds and enhancing the topical bioavailability of drugs, the present study aimed to investigate the efficacy of nanoniosomes containing *Zataria multiflora* essential oil in controlling *Staphylococcus aureus*-induced bacterial keratitis.

**Methods:** Essential oil-loaded nanoniosomes were synthesized using the thin-film hydration method in the presence of a nonionic surfactant. Particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, and formulation stability were evaluated. Thirty male Wistar rats were randomly divided into three treatment groups: a control group receiving normal saline, a group receiving essential oil-loaded nanoniosomes, and a group receiving ciprofloxacin. Following induction of bacterial keratitis in one eye of each rat using *Staphylococcus aureus*, treatment efficacy was assessed by measuring bacterial load in corneal samples on days 4 and 8 after infection induction.

**Results:** On day 4 after keratitis induction, the mean corneal bacterial load in the essential oil-loaded nanoniosome group ( $4.5 \times 10^5$  CFU/cornea) and the ciprofloxacin group ( $4.3 \times 10^5$  CFU/cornea) was significantly lower than that of the control group ( $6.8 \times 10^6$  CFU/cornea) ( $p \leq 0.05$ ), while no statistically significant difference was observed between the two treatment groups ( $p > 0.05$ ). A similar pattern was observed on day 8, where both treatment groups demonstrated a significant reduction in microbial load compared with the control group ( $8.8 \times 10^7$  CFU/cornea) ( $p \leq 0.05$ ), and no significant difference was found between the nanoniosome group ( $5.0 \times 10^5$  CFU/cornea) and the ciprofloxacin group ( $1.6 \times 10^5$  CFU/cornea) ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** This study confirms the high efficacy of *Zataria multiflora* -loaded nanoniosomes in the treatment of bacterial keratitis and highlights their potential as a new generation of safer and more effective ophthalmic therapeutics based on natural compounds and nanotechnology.

**Keywords:** Nano-niozome, *Zataria multiflora*, Bacterial keratitis, Rat, Drug delivery