



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>



Research Article

Preparation, characterization and determination of antibacterial effects of zeolitic imidazolium frameworks coated by hyaluronic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* bacterial strains

Hadi Bagheri^a, Fakhri Haghi^b, Ali Sadeghi^c, Aziz Maleki^{*d}

^aStudent Research Committee, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan 45139-56184, Iran

^bDepartment of Microbiology, School of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan 45139-56184, Iran

^cDepartment of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan 45139-56184, Iran

^{*d}Zanzan Pharmaceutical Nanotechnology Research Center (ZPNRC), Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan 45139-56184, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 21/Aug/2022

Revised: 01/Dec/2022

Accepted: 24/Dec/2022

Keywords:

Zeolitic imidazolium frameworks, nanoparticle, hyaluronic acid, antibacterial.

ABSTRACT

Objectives: Antibiotic resistance remain a major health challenge that threatens the lives of many people. Recent studies shows that metal nanoparticles, including zeolitic imidazolate frameworks, have good antibacterial properties. In this project, we attempted to synthesize a microporous nanoparticle called ZIF-8 (a subset of a large family of zeolitic imidazolate frameworks) and then functionalized it with silver and hyaluronic acid. It was found that such functionalization could improve antibacterial properties ZIF-8.

Methods: ZIF-8 and ZIF-8/Ag@ZIF-8 were characterized thorough N₂ adsorption-desorption analysis, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, powder X-ray diffraction (PXRD), and scanning electron microscope (SEM). antibacterial properties ZIF-8 and ZIF-8/Ag@ZIF-8 against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* was assessed by method of Microbroth dilution.

Results: Results demonstrated coating of ZIF-8 with Ag and HA could significantly improve antibacterial properties ZIF-8 against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*.

Conclusion: We believe that our findings demonstrate that the use of functionalized zeolitic imidazolate frameworks can be as excellent alternative candidates against bacterial infections.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.28149.2094>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Assistant Professor of Inorganic Chemistry. E-mail address: maleki@zums.ac.ir

How to cite this article: Maleki, A., Bagheri, H., Sadeghi, A., & Haghi, F. (2023). Preparation, characterization and determination of antibacterial effects of zeolitic imidazolium frameworks coated by hyaluronic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* bacterial strains. *Applied Chemistry*, 18(68), 161-176. (in Persian)

تهیه، شناسایی و تعیین اثرات آنتی باکتریایی نانوذرات ایمیدازولی زئولیتی پوشش دار شده با پلیمر هیالورونیک اسید بر روی سه سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به

متی سیلین، سودوموناس آنروژینوزا و اشرشیا کلی

هادی باقری^۱، فخری حقی^۲، علی صادقی^۳، عزیز ملکی^{۴*}

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۲ دانشکده پزشکی زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۳ مرکز تحقیقات نانو فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۴ گروه نانو فناوری دارویی، دانشکده داروسازی زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۰۱/۰۵/۳۰ تاریخ تصحیح: ۰۱/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۰۱/۱۰/۰۳

چکیده

مقاومت آنتی بیوتیکی چالش بزرگی در زمینه سلامت می باشد که جان انسان های زیادی را تهدید می کند. تحقیقات اخیر نشان می دهد که نانو ذرات فلزی؛ و در بین آنها چارچوب های آلی-فلزی خواص ضد باکتریایی خوبی از خود نشان می دهند. در این تحقیق نانوذرات میکرو حفره متخلخل با عنوان 8-ZIF (زیر مجموعه ای از خانواده ی بزرگ چارچوب های آلی-فلزی) سنتز شد و با تغییراتی همچون عامل دار کردن با تفره و در ادامه با پوشش دار کردن با هیالورونیک اسید، خاصیت ضد باکتریایی آنها مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین در ادامه برای شناسایی نانوذره 8-ZIF و نانوذره ای عامل دار شده با تفره و پوشش داده شده با هیالورونیک اسید ($ZIF-8/Ag@HA$) آنالیزهای طیف سنجی مادون قرمز، تخلخل سنجی، پراش پرتوی ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام گرفت. پس از آن اثر ضد میکروبی نانوذرات بر روی سه سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، سودوموناس آنروژینوزا و اشرشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی های ما نشان داد که عامل دار کردن با تفره و پوشش دار کردن با هیالورونیک اسید باعث افزایش اثرات ضد میکروبی نانوذره 8-ZIF می شود. به طوری که نانوذره $ZIF-8/Ag@HA$ بیشترین خاصیت ضد میکروبی را در هر سه گونه باکتری مورد بررسی نشان داد. از مشاهده ی رفتار نانوذرات مختلف 8-ZIF و $ZIF-8/Ag@HA$ این نتیجه حاصل شد که این نانوذرات اثر کشندگی و مهار کنندگی متفاوتی را از خود نشان دادند. علاوه بر این این نانوذرات به دلیل اثر روی طیف های مختلف از باکتری ها اعم از گرم منفی ها و گرم مثبت ها حائز اهمیت ویژه ای هستند. همچنین چیزی که در مطالعه ی حاضر مشاهده شد اثر آنتی باکتریایی خود حامل بود که یک مزیت به القوه محسوب می شود و در راستای کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که عامل دار کردن با تفره و پوشش دار کردن با هیالورونیک اسید چارچوب های آلی-فلزی می تواند کمک شایانی به افزایش اثر ضد میکروبی آن داشته باشد.

کلمات کلیدی: شبکه های زئولیتی ایمیدازولی، هیالورونیک اسید، نانوذره، ضد باکتری.

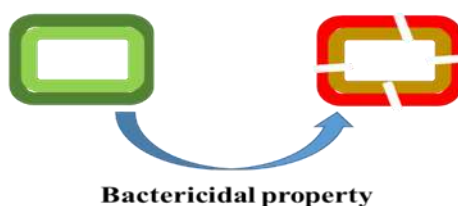
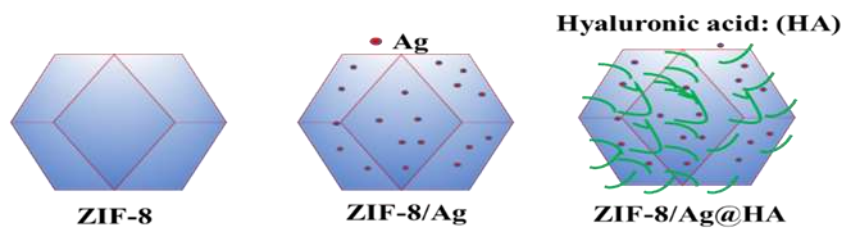
۱- مقدمه

مطالعات اخیر نشان داده است که شمار پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک به صورت چشمگیری رشد کرده است به طوری که به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است. سالانه میلیون ها بیمار با این بیماری های تهدید کننده ی حیات مواجه می شوند که طبق آخرین آمار CDC مقاومت آنتی بیوتیکی سالانه ۲۳۰۰۰ مرگ در آمریکا، ۲۵۰۰۰ مرگ در اروپا و میلیون ها بستری بیمارستان را منجر می شود. مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، بیش از ۵۰ سال است که به رسمیت شناخته شده است، همچنان یکی از دلایل اصلی افزایش بیماری، مرگ و میر و هزینه های مراقبت های بهداشتی است. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها مهمترین عامل موثر است. با این حال، اجرای ضعیف اقدامات کنترل عفونت، بستری طولانی مدت در بیمارستان، بستری شدن در بخش های مراقبت ویژه و استفاده از روش های تهاجمی از دیگر عوامل موثر در این امر هستند [۱].

[۲]. پیش بینی می شود که پاتوژن های مقاوم بیشتری در آینده ی نزدیک بروز می کند و در صورت عدم اقدام به موقع این مساله منجر به تهدید مرگ آور بشریت می شود. ظهور سویه های مقاوم به چند دارو (MDR¹) لزوم ساخت ابزاری اثر بخش برای مقابله با مقاومت های باکتریایی و با احتمال پایین تر ایجاد مقاومت نسبت به آنها را گوش زد کرده و ابزاری اثربخش برای غیرفعال سازی باکتری ها با فرصت کمتر برای ایجاد مقاومت می طلبد. از این رو ساخت نانو ذرات برای مبارزه با باکتری های مقاوم به چند دارو از اهمیت حیاتی برخوردار است. تاکنون تلاش های زیادی برای تولید مواد ضد میکروبی جدید علیه این مشکل جهانی انجام شده است [۳]. از جمله ی این موارد می توان به طراحی و ساخت انواع نانوذرات گوناگون که خواص ضدباکتریایی دارند اشاره کرد از این دسته از نانوذرات می توان به نانوذرات فلزی مثل نقره و شبکه های آلی-فلزی اشاره کرد. نانوذرات نقره (Ag NPs) به عنوان عوامل ضد باکتری موثر با طیف اثر اثبات شده در زمینه ی فعالیت ضد میکروبی می باشند [۳-۵]. اگرچه مکانیسم اثر ضد میکروبی هنوز کاملاً شناخته نشده است، اما اعتقاد بر این است که یونهای Ag آزاد شده از نانوذرات نقره ضمن برهمکنش با غشاء باکتری باعث تخریب غشا، از بین رفتن پروتئین ها و آنزیم های درون باکتری شده و باعث مرگ باکتری می گردند. اخیراً شبکه های آلی-فلزی که از اجتماع یون های فلزی و لیگاند های چند دندانه به وجود می آیند نیز به عنوان کاندیدا های بسیار مناسب به عنوان عوامل ضد باکتریایی معرفی شده اند [۶]. علت این مساله بیشتر به خاطر یون های فلزی موجود در آنها می باشد. در بین این نانوذرات آلی-فلزی شبکه های ژئولیتی ایمیدازولی (ZIF) که از اجتماع یون های فلزی با ایمیدازول ها به وجود می آیند نیز کاربرد بسیار عالی در امر عفونت زدایی و اثرات آنتی باکتریایی پیدا کرده اند [۷].

¹ Multiple Drug Resistance

در مطالعه ی حاضر هدف ما طراحی و ساخت نانوذرات بر پایه ی ZIF می باشد به طوری که ابتدا ZIF-8 تهیه شد و در ادامه جهت افزایش خاصیت ضد باکتریایی با نقره عامل دار شد، همچنین بخاطر تهیه ی یک سامانه ی آنتی باکتریایی قوی تر با خاصیت ترمیمی بالا، نانوذرات بدست آمده با هیالورونیک اسید پوشش دار شدند [۸] (شکل ۱).



شکل ۱: شمایی از نانوذرات ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA و بررسی خواص آنتی باکتریایی

۲- مواد و روش ها

نیترات روی شش آب ، ۲- متیل ایمیدازول، متانول، اتانول ، نقره نیترات و هیالورونیک اسید از شرکت های سیگما-آلدریچ و مرک خریداری شدند. در کلیه ی مراحل از آب دیونیزه استفاده شد. سایر مواد شیمیایی از درجه خلوص بالا بوده و بدون هیچگونه خالص سازی مورد استفاده قرار می گرفت.

۳- روش و تجهیزات شناسایی نانوذرات

برای شناسایی گروه های عامل نانوذرات سنتز شده از دستگاه FT-IR مدل Bruker Tensor27 استفاده شد. همچنین برای شناسایی حالت بلورین ذرات از دستگاه XRD instrument Philips استفاده شد. شناسایی عناصر سازنده به وسیله ی EDAX instrument Tescan انجام شد. همچنین مورفولوژی نانوذرات با دستگاه SEM instrument Quan TA 250 FEG انجام شد. برای هم زدن و سنتز نمونه از Heater-Stirrer Heidolp استفاده گردید. و برای سانتریفیوژ کردن نانوذرات از Centrifuge Eppendorf AG استفاده شد. هم چنین برای سنجش میزان تخلخل نانوذرات از BET instrument Gold APP instruments استفاده گردید.

میکروسکوپ الکترونی روبشی فرمولاسیون بهینه ابتدا با لایه ی نازکی از طلا پوشیده شده، سپس نمونه ی روکش داده شده در محفظه ی اصلی دستگاه قرار گرفته و آنالیز شد. عکس های لازم با بزرگ نمایی های متناسب از نانوذرات تهیه گردید. طیفهای تبدیل فوریه مادون قرمز توسط طیف سنج مربوطه ثبت شد. طیف ها از ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm-1 جمع آوری شد. الگوی

پراش اشعه ایکس با استفاده از پراش سنج اشعه ایکس ثبت شد. این الگوی بیش از یک دامنه 2θ از ۵ تا ۷۰ درجه با اندازه پله 0.0100 درجه در ثانیه جمع آوری شد. اندازه گیری جذب نیتروژن در جذب با دمای ۷۷ درجه سانتیگراد انجام شد. مساحت سطح و توزیع اندازه منافذ به ترتیب با استفاده از آنالیز بورنر-امت-تلر و میکروپور تعیین شد.

۴- روش انجام کار

۴-۱- سنتز حامل ZIF-8

برای سنتز حامل ZIF-8، ۵۰ میلی لیتر محلول 0.5 مولار از ۲ متیل ایمیدازول^۲ و هم چنین ۵۰ میلی لیتر محلول 0.5 مولار از نیترات روی هگزا هیدرات^۳ در حلال متانول حل شد. طبق محاسبات استوکیومتری و از آنجایی که جرم مولی ۲-متیل-ایمیدازول $82.1 \frac{g}{mol}$ و جرم مولی نیترات روی $297.5 \frac{g}{mol}$ است، ۲۰۰ میلی گرم ۲-متیل ایمیدازول و ۳۷۰ میلی گرم نیترات روی هگزا هیدرات وزن شده و هر کدام در ۵۰ میلی لیتر متانول حل شده و با هم مخلوط می شوند. پس از آن مخلوط حاصل شده به مدت ۱۳ دقیقه در اولتراسونیک قرار داده شد. سپس در سانترفیوژ با دور 15000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس رسوب تشکیل شده جمع آوری شده و جهت خروج حلال و خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در آون خلا قرار داده شد [۷].

۴-۲- تهیه ی ZIF-8/Ag

ابتدا مخلوط 2 mg/ml در آب دیونیزه از حامل ZIF-8 تهیه شد. سپس ۲ میلی لیتر از مخلوط حاصل شده با ۲ میلی لیتر از محلول 0.5 mg/ml نقره در آب دیونیزه مخلوط شد، مخلوط حاصل شده باید به دور از نور قرار گرفته و ۱۲ ساعت بر روی استیر در حال هم خوردن با مگنت قرار گیرد. مخلوط حاصل شده برداشته شد و در سانترفیوژ با دور 15000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت، سپس یکبار دیگر به مقدار ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه بر روی رسوب حاصله ریخته و خوب هم زده شد و بار دیگر در سانترفیوژ با دور و مدت قبلی قرار گرفت و در نهایت رسوب بدست آمده ۲۴ ساعت در آون خلا قرار گرفت [۹، ۱۰].

۴-۳- تهیه ی ZIF-8/Ag@HA

ابتدا استوک 2 mg/ml ZIF-8/Ag در آب دیونیزه تهیه شد. سپس استوک 0.1 mg/ml از هیالورونیک اسید در آب دیونیزه تهیه شد و پس از آن ۳ میلی لیتر از استوک 0.1 mg/ml از هیالورونیک اسید را آرام آرام و حین هم خوردن با مگنت بر روی ۲ میلی لیتر از استوک 2 mg/ml ZIF-8/Ag اضافه شد، پس از ۴ ساعت هم خوردن با مگنت مخلوط حاصل شده در سانترفیوژ با دور 15000 rpm و به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس پودر حاصل شده یک مرتبه با ۱۵ میلی لیتر آب دیونیزه شستشو داده شد و داخل سانترفیوژ با همان دور و زمان قبل قرار گرفت و در نهایت رسوب حاصل شده در آون به مدت ۱۲ ساعت قرار

² 2-Methylimidazole

³ Zinc nitrate hexahydrate

داده شد.

۴-۴- سویه های باکتریایی مورد بررسی

سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین ATCC 43300، *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات بر پایه ZIF مورد استفاده قرار گرفتند. سویه های باکتریایی در محیط کشت تریپتیکیز سوی آگار^۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

۴-۵- تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی در تست تعیین حساسیت میکروبی از استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر محلول کلرید باریوم ۱/۱۷۵٪ به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۱٪ محلول استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند، از چند کلنی تازه و خالص باکتری برداشته و در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل تلقیح گردید. سپس کدورت سوسپانسیون باکتریایی با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند یکسان سازی شد. سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند حاوی $1/5 \times 10^8$ CFU^۵ باکتری است.

۴-۶- تعیین اثرات ضد میکروبی با روش انتشار چاهک

جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات از محیط مولر هینتون آگار^۶ استفاده شد. با استفاده از سوآپ استریل، سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل چاهک هایی بر روی پلیت ایجاد گردید و ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات داخل چاهک اضافه شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و قطر هاله مهار رشد با استفاده از خط کش اندازه گیری شد.

۴-۷- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی^۷ و حداقل غلظت کشندگی^۸

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از روش میکروبراث دایلوژن استفاده شد. برای این کار از میکروپلیت های ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث به تمامی خانه های پلیت اضافه شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از نانوذره ی مورد بررسی به چاهک اول میکروپلیت تلقیح شد. پس از مخلوط کردن نانوذره با محیط کشت، ۱۵۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم انتقال داده شد و به همین ترتیب رقت های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸ و ۱:۲۵۶ در ۹ چاهک و با ۳ بار تکرار، از میکروپلیت ها تهیه شد. سپس ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل $1/5 \times 10^6$ CFU

^۴ Trypticase soya agar

^۵ Colony-forming unit

^۶ Mueller Hinton agar

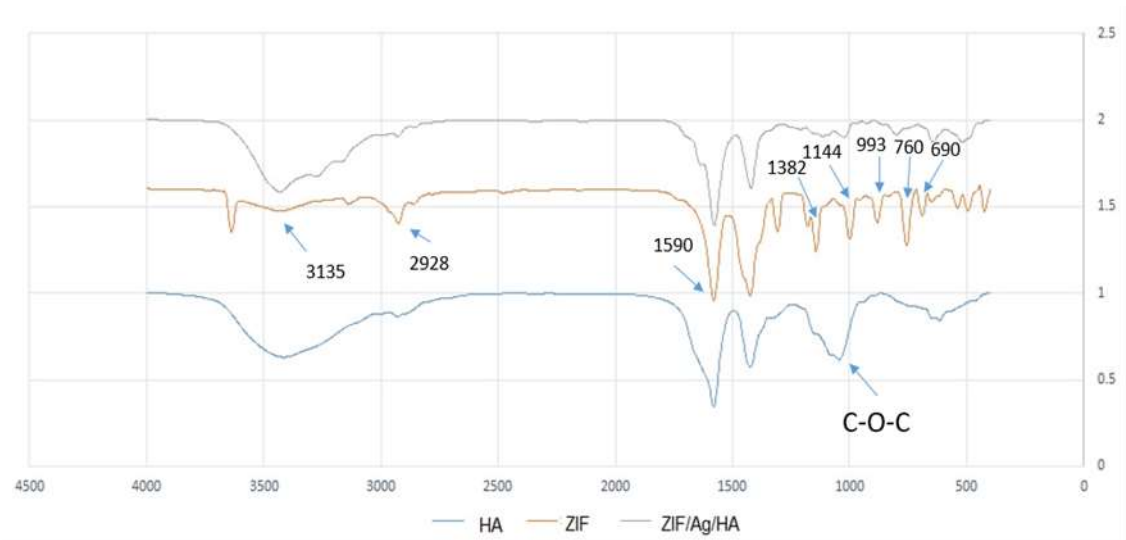
در داخل هر چاهک ریخته شد. همچنین چاهک آخر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود که فاقد نانو ذره بود و فقط از باکتری و محیط کشت تشکیل شده بود و یک چاهک نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده بود که فاقد باکتری و فقط شامل محیط کشت و نانو ذره بود. سپس پلیت داخل انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در ادامه چاهک هایی که رشد باکتریایی در آن ها مشاهده نشد، انتخاب شده و ۳۰ میکرولیتر از آن ها بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد. محیط کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از آن از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. به عبارتی بعد از کشت بر روی پلیت، از چاهک هایی که رشد در آن مشاهده نگردید، کمترین سری رقت که بر روی پلیت رشد مشاهده شد بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC در نظر گرفته شد [۱۱] و پایین ترین رقت که بر روی پلیت رشد مشاهده نشد را بعنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC در نظر گرفته شد.

۵- نتایج و بحث

۵-۱- شناسایی ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA توسط FT-IR

در طیف ZIF-8، نوار جذبی در 1583cm^{-1} ، 1606cm^{-1} و 2927cm^{-1} را میتوان به ترتیب به کشش C-N، کشش C-C و کشش C-H آلیفاتیک از گروه ایمیدازول نسبت داد [۱۰]. در طیف هیالورونیک اسید، نوار جذبی در 3443cm^{-1} نشان دهنده حضور گروه هیدروکسیل در HA است دو پیک در نوار در 1720cm^{-1} و 1650cm^{-1} به ترتیب مربوط به نوارهای کششی کربونیل گروه کربوکسیلیک اسید و آمید می باشد [۱۲] (شکل ۲).

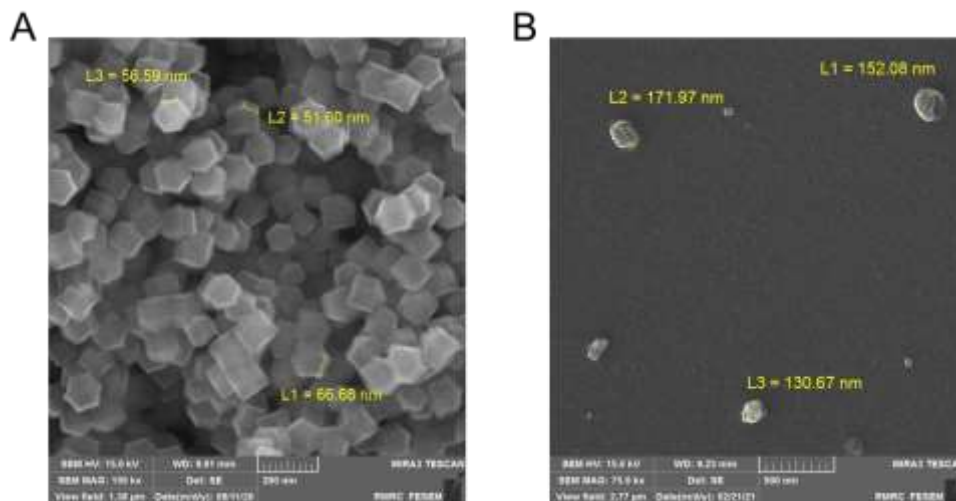
در ترکیب ZIF-8/Ag@HA نوار جذبی گروه هیدروکسیل مجدد ظاهر شده و علاوه بر این پیک های شاخص ZIF-8 در اغلب موارد یا پهن شده و یا اندکی جابجا شده اند [۱۳]. این تغییرات در طیف های FT-IR نشان دهنده پوشیده شدن هیالورونیک اسید بر روی نانو ذره ZIF-8 می باشد. (شکل ۲). هم چنین نانوذره ZIF-8 پس از عامل دار شدن با نقره و پوشش دار شدن با هیالورونیک اسید پیک های شاخص مربوط به هیالورونیک اسید را نشان داد. بعنوان مثال پیک پهن در محدوده 3432cm^{-1} که نشان دهنده ی گروه هیدروکسیل می باشد [۱۳]. هم چنین تعدادی از پیک های نانوذره ی ZIF-8 بین محدوده 500cm^{-1} تا 1500cm^{-1} حذف یا جابجا شده و یا پهن تر شده بودند که تایید کننده ی پوشش دار شدن نانوذره ZIF-8 با پلیمر هیالورونیک اسید می باشد.



شکل ۲: طیف FT-IR ترکیبات ZIF-8 (طیف نارنجی) و HA (طیف آبی) و ZIF-8/Ag@HA (طیف بنفش)

۵-۲- تصویر نانو ذرات ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA با میکروسکوپ الکترونی روبشی

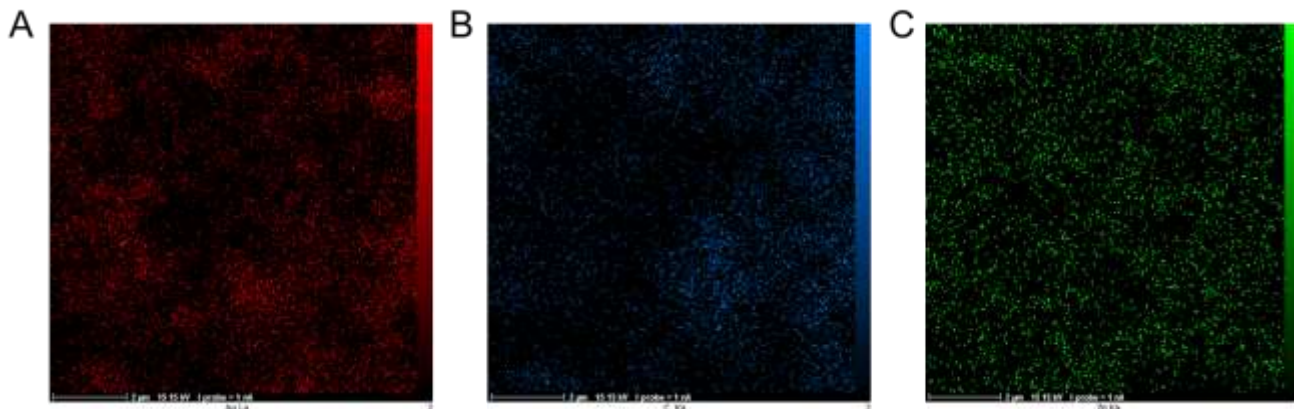
خصوصیات مورفولوژی نانوذرات ZIF-8 و ZIF-8/Ag/HA توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). همان گونه که در شکل مشاهده می شود نانو ذرات ZIF-8 بصورت اشکال چند وجهی با ساختار منظم در سایز حدود ۷۰ نانومتر بدست آمده است. بعد از پوشیده شدن ZIF-8 توسط هیالورونیک اسید، نانو ذرات ZIF-8/Ag@HA با ساختار تقریباً کروی در سایز های حدود ۱۶۰ نانومتر تولید شد. این مشاهده نیز نشانگر پوشیده شدن هیالورونیک اسید بر روی نانو ذره ZIF-8 می باشد [۱۴].



شکل ۳: تصاویر SEM (A ZIF-8 (B ZIF-8/Ag@HA)

۵-۳- تصویر آنالیز عنصری نانوذره ی ZIF-8/Ag@HA

در نتایج تست آنالیز عنصری^۷ به خوبی حضور اتم نقره که نشانگر بارگذاری نقره در ZIF-8 می باشد و نیز اتم کربن که نماینده ی حضور هیالورونیک اسید می باشد را مشاهده می کنیم که این نیز تایید کننده ی صحت انجام مراحل عامل دار کردن با نقره و پوشش دار کردن با هیالورونیک اسید می باشد [۷].

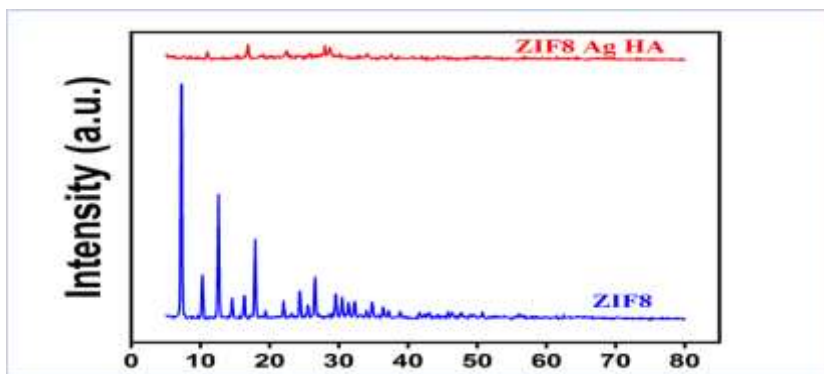


شکل ۴: مربوط به آنالیز آنالیز عنصری به ترتیب (A) نقره (نقاط قرمز) (B) کربن (نقاط آبی) (C) روی (نقاط سبز)

۵-۴- پراش اشعه ایکس نانوذرات ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA

استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس بطور وسیعی برای شناسائی حالت بلورین یک نانوذره مورد استفاده قرار می گیرد. وجود پیک های تیز در این نوع طیف ها نشانگر آن است که نانوذره در حالت بلورین قرار دارد در حالی که حذف این پیک های شاخص و یا ضعیف شدن آنها نشان می دهد که نانوذره از حالت بلورین خارج و به حالت آمورف تبدیل شده است. طیف های پراش پرتو ایکس ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA در شکل ۵ نشان داده شده است. مطابق شکل نانوذره ZIF-8 در حالت بلورین قرار دارد. این مسئله توسط حضور پیک های زیاد و تیز در طیف آن قابل تائید است. آنالیز پراش پرتو ایکس ZIF-8 که دارای پیک های بسیار تیز می باشد نیز به طور کامل با طیف های پراش پرتو ایکس گزارش شده در مطالعات قبلی سازگاری کامل دارد. این واقعیت تایید می کند این ساختار بلوری با موفقیت سنتز شده است [۱۵]. جالب توجه است که پس از پوشیده شدن هیالورونیک اسید بر روی نانو ذره ZIF-8 پیک های شاخص و تیز ZIF-8 حذف می شوند. این واقعیت می تواند دلیل بسیار خوبی جهت تبدیل حالت بلورین ZIF-8 به حالت آمورف قلمداد گردد. مجدد این آنالیز نیز تهیه ZIF-8/Ag@HA از ZIF-8 را تایید می کند.

^۷ Elemental mapping

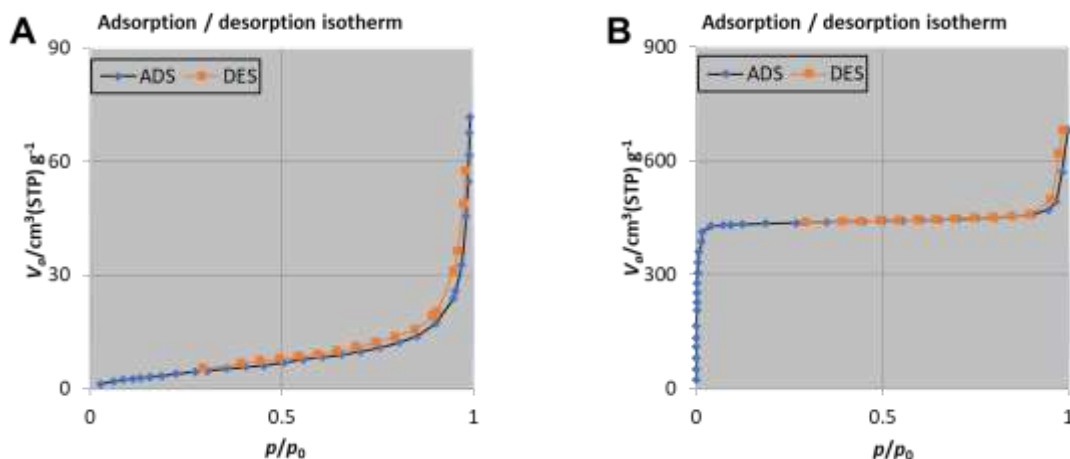


شکل ۵: نمودار XRD ZIF-8 (نمودار آبی) و ZIF-8/Ag@HA (نمودار قرمز)

۵-۵- بررسی میزان تخلخل و مساحت سطح ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA توسط آنالیز تخلخل سنجی جذب و واجذب نیتروژن

یکی از آنالیزهای بسیار مهم که برای شناسایی میکرو حفرات ترکیبات متخلخل مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از روش تخلخل سنجی می‌باشد. با استفاده از این آنالیز می‌توان به مساحت سطح و حجم حفرات پی برد. علاوه بر این در اثر جذب مواد در داخل حفرات این ترکیبات باید مساحت سطح و حجم قابل دسترس از حفرات نیز کاهش یابد. نتایج آنالیز جذب و واجذب نیتروژن برای ترکیب ZIF-8 از سنتز موفق این ترکیب حکایت می‌کند. منحنی جذب و واجذب گرفته شده از ترکیب ZIF-8 با مشخصات ترکیبات میکرو حفره هماهنگی دارد. مطابق طبقه‌بندی اتحادیه ی بین المللی شیمی محض و کاربردی (IUPAC)^۱ ایزوترم موجود در شکل ۶ مخصوص ترکیبات میکرو حفره بوده و ایزوترم نوع I می‌باشد. این در حالی است که بعد از تهیه ZIF-8/Ag@HA ایزوترم نوع I از بین رفته و ایزوترم جدید تولید شده که مشخصه ترکیبات بدون حفره می‌باشد. این مشاهده نیز پوشیده شدن هیالورونیک اسید بر روی نانو ذره ZIF-8 را نشان می‌دهد [۱۴]. در تست تخلخل سنجی مشاهده می‌کنیم که سطح مقطع نانوذره ی ZIF-8 برابر با $1856/5 \text{ m}^2/\text{g}$ بوده است که عدد قابل توجهی می‌باشد و نشان دهنده ی تخلخل بالای نانوذره ی ZIF-8 است و سطح مقطع نانوذره عامل دار شده با نقره و پوشش دار شده با هیالورونیک اسید ZIF-8/Ag@HA برابر با $16/337 \text{ m}^2/\text{g}$ شده بود که این کاهش بسیار زیاد سطح مقطع پس از پوشش دار کردن با هیالورونیک اسید نشان دهنده پوشش داده شدن خوب و کامل حفرات نانوذره توسط هیالورونیک اسید می‌باشد.

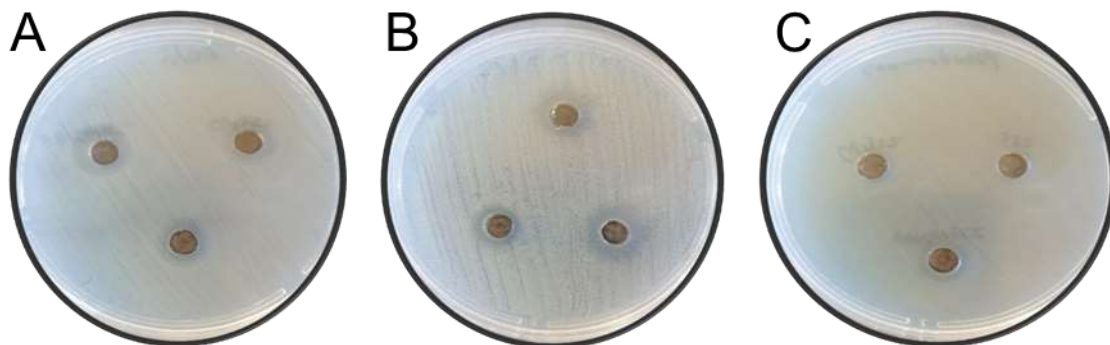
^۱ International Union of Pure and Applied Chemistry



شکل ۶: ایزوترم جذب/ و جذب نیتروژن مربوط به (A) ZIF-8/Ag@HA (مساحت سطح = $337 \text{ m}^2/\text{g}$) (B) ZIF-8 (مساحت سطح = $16/5 \text{ m}^2$)

۵-۶- بررسی هاله عدم رشد باکتری ها

با توجه به نتایج بدست آمده در بررسی قطر هاله ی عدم رشد بیشترین هاله ی عدم رشد درمورد ترکیب ZIF-8/Ag@HA در هر سه باکتری مورد بررسی مشاهده شد. در مورد سودوموناس آئروژینوزا همانطور که در جدول مشاهده می شود ترکیبات ZIF-8/Ag و ZIF-8 اثری را از خود نشان نداده اند. هم چنین نتایج هر دو تست چاهک و پلیت همسو با یکدیگر بود و همدیگر را تصدیق کردند. جدول ۱ قطر هاله ی عدم رشد مربوط به ترکیبات مورد بررسی در هر سه باکتری را نشان می دهد:



شکل ۷: مربوط به قطر هاله ی عدم رشد مربوطه به نانوذره ZIF-8/Ag@HA (به ترتیب از راست: A) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (B) اشرشیا کلی (C) سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۱: قطر هاله ی مهار رشد

نانوذرات	استافیلوکولوس اورئوس مقاوم به متی سیلین	اشرشیا کلی	سودوموناس آئروژینوزا
ZIF-8	۱۰mm	۱۰mm	۰mm
ZIF-8/Ag	۱۱mm	۹mm	۰mm
ZIF-8/Ag@HA	۱۴mm	۱۲mm	۹mm

۵-۷- تعیین MIC و MBC به روش میکروبراث دابلوشن

در جدول ۲ حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی ترکیبات مورد بررسی ذکر شده است. همسو با نتایج حاصل از تست انتشار چاهک، بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی ترکیبات مورد بررسی مربوط به ZIF-8/Ag@HA بود. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی در مورد ترکیب ZIF-8/Ag@HA بر روی *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* $90/3 \mu\text{g/ml}$ و در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین $81/7 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد. در این مطالعه از گونه‌ی مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد، بدین دلیل که این باکتری با توجه به دارا بودن آنزیم هیالورونیداز موجب تجزیه پوشش هیالورونیک اسید نانوذره‌ی سنتز شده می‌شود که در نتیجه‌ی آن یون نقره در معرض تماس با باکتری قرار می‌گیرد و به طور موثرتری اثر ضد باکتریایی نانوذرات اعمال می‌شود. در بررسی تست‌های میکروبی که به صورت دو تست چاهک و تعیین MIC و MBC انجام شده بود، نتایج مشاهده شده مطابق با هدف گذاری و پیش بینی صورت پذیرفته بود بدین صورت که با توجه به اینکه خود اتم روی دارای اثر ضد باکتریایی است، از نانوذره‌ی ZIF-8 به تنهایی اثر آنتی باکتریایی قابل توجهی مشاهده نشد ولی پس از عامل دار کردن نانوذره با اتم نقره مشاهده شد که اثر آنتی باکتریایی نانوذره بصورت چشمگیری افزایش پیدا کرد که علت این امر وجود یون نقره بر روی نانوذره‌ی ZIF-8 و هم افزایی اثر آنتی باکتریایی اتم نقره با نانوذرات است. همانطور که پیش بینی می‌شد پس از پوشش دار کردن نانوذره‌ی عامل دار شده با هیالورونیک اسید اثر آنتی باکتریایی بر روی هر سه سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بصورت فزاینده‌ای افزایش پیدا کرد که با بررسی‌های انجام شده طی مطالعات مختلف علت این امر می‌تواند بخاطر اثرات حضور هیالورونیک اسید؛ همچون اثر آنتی باکتریایی آن و همچنین اثر مهاری آن باشد. با توجه به مقایسه نتایج مربوط به مقادیر P-value بدست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات، مشخص گردید که بین نتایج آنتی باکتریایی مربوط به ZIF-8 و سایر ذرات (ZIF-8/Ag و ZIF-8/Ag@HA) تفاوت معناداری وجود دارد، در صورتی که بین دو گروه ZIF-8/Ag و ZIF-8/Ag@HA تفاوت معناداری مشاهده نشد. لازم به ذکر است معناداری به صورت $P\text{-value} < 0.05$ تعریف گردید.

در مطالعه‌ی ای که توسط لی^۹ و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام شد از ترکیب ZIF-8 که توسط ید بارگذاری شده بود به عنوان یک عامل ضد میکروب استفاده شد [۱۶]. نتایج آنها تنها روی دو نوع سویه‌ی باکتری یعنی *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده در حالی که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که در مطالعه‌ی ما انجام شده بود در مطالعه‌ی آنها وجود نداشت. هم چنین یکی دیگر از مزایای سیستم حاضر را می‌توان در عدم استفاده از هیچ نوع داروی آنتی باکتریال بیان کرد این در

^۹ Lee

حالی است که در اغلب سامانه های دارویی بر پایه ی ZIF-8 از یک آنتی بیوتیک مثل ونکوماپسین [۱۷]، فیزیگون^{۱۰} [۱۸]، کورکومین [۱۹] استفاده شده است. علاوه بر این با توجه به اینکه سامانه آنتی باکتریایی حاضر در این مطالعه به وسیله ی هیالورونیک اسید پوشش دار شده است باید به مراتب سمیت کمتری در مقایسه با سیستم هایی که این پوشش را ندارند داشته باشد [۱۶]. در حال حاضر تلاش ما بر این است که سمیت سلولی این سیستم بر روی سلول های فیبروبلاست سنجیده شده و همچنین مطالعات حیوانی در مورد ترمیم زخم عفونی انجام شود.

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات

نوع نانوذره	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MIC, MBC)	اشرشیا کلی (MIC, MBC)	سودوموناس آئروژینوزا (MIC, MBC)
ZIF-8	۲۵۰ μg/ml	۲۵۰ μg/ml	۵۰۰ μg/ml
ZIF-8/Ag	۶۲/۱۵ μg/ml	۹۰/۳ μg/ml	۹۰/۳ μg/ml
ZIF-8/Ag@HA	۸۱/۷ μg/ml	۹۰/۳ μg/ml	۹۰/۳ μg/ml

۶- نتیجه گیری

در این تحقیق نانوذرات ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA سنتز شدند و با استفاده از آنالیزهای FT-IR, BET, SEM, XRD به صورت خوبی مورد شناسایی قرار گرفتند و مشخص شد که نانوذرات ما فاکتور های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد خود را دارا می باشند. نانوذرات در طیف FT-IR پیک های شاخصی از خود نشان دادند که نماینگر تشکیل نانوذره و قرار گیری گروه های عاملی بر روی آن بود. علاوه بر آن تصاویر حاصل از XRD و SEM به ترتیب نشانگر حالت بلورین و کریستالی نانوذرات و اشکال شش ضلعی به صورت سه بعدی که نتیجه ی سنتز ذرات ZIF-8 بود را نشان داد. نتیجه آنالیز جذب و جذب نیتروژن هم نشان داد که پلیمر هیالورونیک اسید بر روی نانوذرات ZIF-8 پوشیده شده است. هم چنین پس از مواجه و بررسی این نانو ذرات با باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی مشاهده شد که نانوذرات پوشش داره شده با هیالورونیک اسید بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را از خود نشان می دهند که این مقایسه و برآورد از مشاهده ی رفتار نانوذرات مختلف ZIF-8 و ZIF-8/Ag@HA حاصل شد که اثر کشندگی و مهار کنندگی متفاوتی را از خود نشان دادند. علاوه بر این این نانوذرات به دلیل اثر روی طیف های مختلف از باکتری ها اعم از گرم منفی ها و گرم مثبت ها حائز اهمیت ویژه ای هستند. همچنین چیزی که در مطالعه ی حاضر مشاهده شد اثر آنتی باکتریایی خود حامل بود که یک مزیت به القوه محسوب می شود و در راستای کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد.

^{۱۰} physcion

۷- تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی زنجان (۲-۱۱۴۳-۱۲-A) پشتیبانی شده است. مؤلفان هیچ وابستگی یا مشارکت مالی دیگری با هر سازمان یا نهاد با منافع مالی یا درگیری مالی با موضوع یا مطالب مورد بحث در دست نوشته جدا از موارد فاش شده، ندارند.

۸- مراجع

- [1] Li, X., Bai, H., Yang, Y., Yoon, J., Wang, S., & Zhang, X. (2019). Supramolecular antibacterial materials for combatting antibiotic resistance. *Advanced Materials*, 31(5), 1805092.
- [2] Mohammadpour, M., Pourahmad, A., & Asadpour, L. (2018). Synthesis, characterization and antibacterial property of Ag₂O/ Large Mordenite nanocomposite. *Applied Chemistry*, 13(47), 301-312. (in persian)
- [3] Ang, J. Y., Ezike, E., & Asmar, B. I. (2004). Antibacterial resistance. *The Indian Journal of Pediatrics*, 71, 229-239.
- [4] Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636-1653.
- [5] Rizzello, L., & Pompa, P. P. (2014). Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chemical Society Reviews*, 43(5), 1501-1518.
- [6] Mousavi-Kamazani, M. (2019). The effect of silver nanoparticles on antimicrobial activity of Syrian rue alcoholic Extract against Escherichia coli bacteria. *Applied Chemistry*, 14(51), 277-286. (in persian)
- [7] Maleki, A., Shahbazi, M. A., Alinezhad, V., & Santos, H. A. (2020). The progress and prospect of zeolitic imidazolate frameworks in cancer therapy, antibacterial activity, and biomineralization. *Advanced healthcare materials*, 9(12), 2000248.
- [8] Zhang, Y., Wang, F., Ju, E., Liu, Z., Chen, Z., Ren, J., & Qu, X. (2016). Metal-organic-framework-based vaccine platforms for enhanced systemic immune and memory response. *Advanced Functional Materials*, 26(35), 6454-6461.
- [9] Sohrabnezhad, S., & Esfandiyari Takas, M. (2018). Synthesis and Characterization of CuO nanoparticles in porous clay heterostructure and study of its antibacterial properties. *Applied Chemistry*, 13(47), 131-144.
- [10] de Oliveira, S. A., da Silva, B. C., Riegel-Vidotti, I. C., Urbano, A., de Sousa Faria-Tischer, P. C., & Tischer, C. A. (2017). Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *International journal of biological macromolecules*, 97, 642-653.
- [11] Ravinayagam, V., & Rehman, S. (2020). Zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) doped TiZSM-5 and Mesoporous carbon for antibacterial characterization. *Saudi journal of biological sciences*, 27(7), 1726-1736.

- [12] Banerjee, R., Phan, A., Wang, B., Knobler, C., Furukawa, H., O'Keeffe, M., & Yaghi, O. M. (2008). High-throughput synthesis of zeolitic imidazolate frameworks and application to CO₂ capture. *Science*, 319(5865), 939-943.
- [13] Carneiro, J., Döll-Boscardin, P. M., Fiorin, B. C., Nadal, J. M., Farago, P. V., & Paula, J. P. D. (2016). Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 645-651.
- [14] Cravillon, J., Münzer, S., Lohmeier, S. J., Feldhoff, A., Huber, K., & Wiebcke, M. (2009). Rapid room-temperature synthesis and characterization of nanocrystals of a prototypical zeolitic imidazolate framework. *Chemistry of Materials*, 21(8), 1410-1412.
- [15] Makhetha, T. A., Ray, S. C., & Moutloali, R. M. (2020). Zeolitic imidazolate framework-8-encapsulated nanoparticle of ag/cu composites supported on graphene oxide: Synthesis and antibacterial activity. *ACS omega*, 5(17), 9626-9640.
- [16] Au-Duong, A. N., & Lee, C. K. (2017). Iodine-loaded metal organic framework as growth-triggered antimicrobial agent. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 477-482.
- [17] Chowdhuri, A. R., Das, B., Kumar, A., Tripathy, S., Roy, S., & Sahu, S. K. (2017). One-pot synthesis of multifunctional nanoscale metal-organic frameworks as an effective antibacterial agent against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*, 28(9), 095102.
- [18] Soomro, N. A., Wu, Q., Amur, S. A., Liang, H., Rahman, A. U., Yuan, Q., & Wei, Y. (2019). Natural drug physcion encapsulated zeolitic imidazolate framework, and their application as antimicrobial agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110364.
- [19] Dutta, T., Bagchi, D., & Pal, S. K. (2018). Bimetallic zeolitic imidazolate framework as an active excipient of curcumin under physiological condition. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(5), 055004.

