

طراحی و ساخت نانو داروهای مهار کننده پمپ افلاکس در جدایه های بالینی اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم

سمانه طاهریان فرد^۱، انوش اقدامی^{۲*}

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پمپ های افلاکس نقش کلیدی را در مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها ایفا می کنند. اسینتوباکتریومانی یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی که به واسطه ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی، مشکلات فراوانی در درمان موفقیت آمیز آن ایجاد شده است. این مطالعه با هدف تعیین نقش بازدارندگی پمپ افلاکس در مقاومت دارویی سویه های اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی ۱۳ ایزوله اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم، از ۶۰ نمونه زخم بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران جمع آوری شد. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نانوذره ها با روش برات میکرو دایلوژن بر طبق CLSI^۱، بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس و اثر مهارتی نانوذره ها بر این پمپ ها با روش کارت ویل آگار اتیدیوم بروماید^۲ انجام شد.

یافته ها: در مطالعه حاضر نانو ذره ی آلبومین ایمی پنم فاقد اثر ضد میکروبی بر اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم بود. اما نانوذره آلبومین ۰/۵ و ۰/۱۰۵ گرم به ترتیب با ۱۶ $\mu\text{g/ml}$ ، $\text{MIC}^3 = 0/125 \mu\text{g/ml}$ دارای اثر مهارتی بر باکتری مذکور بودند. ۷۵٪ از سویه ها دارای پمپ افلاکس فعال بودند. نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم پمپ افلاکس ۳۷٪ از سویه ها را در حداقل غلظت اتیدیوم بروماید^۴ مهار کرد.

نتیجه گیری: نتایج، ارتباط MIC با فعالیت پمپ افلاکس باکتری را نشان داد. هم چنین با توجه به فعالیت ۷۵٪ پمپ های افلاکس در سویه های اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم طراحی و ساخت مهار کننده های پمپ افلاکس حائز اهمیت است.

واژه های کلیدی: اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی پنم، پمپ افلاکس، نانوذره، MIC

نویسنده مسئول:

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

پست الکترونیکی: eghdami49@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

¹ Clinical and Laboratory Standards Institute

² Ethidium Bromide-agar Cartwheel method

³ Minimum Inhibitory Concentration

⁴ Ethidium Bromide

مقدمه

دلیل وفور پمپ‌های افلاکس در *اسینتوباکتریومانی* یافتن داروهای جدید علیه این اهداف نوین درمانی اهمیت دارد (۲).

به‌طور کلی باکتری‌ها از نظر ایجاد مقاومت اکتسابی و ذاتی نسبت به داروهایی که به‌عنوان عوامل درمانی به‌کار می‌روند توانایی ژنتیکی دارند (۷)؛ بنابراین بایستی اقدام‌هایی به‌منظور کاهش مقاومت باکتریایی انجام گیرد که یکی از این راه‌ها، کشف داروهای جدید از منابع طبیعی و صنایع است (۲۶).

در سال‌های اخیر فناوری نانو توانسته است تحول‌های عمیقی در زمینه پژوهش و تولید محصول‌ها ایجاد کند (۵).

نانوذره‌ها، ذره‌هایی پراکنده شده و یا جامد با اندازه‌ای در محدود ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند (۳۷). این ذره‌ها دارای سطح ویژه بالا بوده و خواص منحصر به‌فرد فیزیکی و شیمیایی آن‌ها مثل حلالیت، بار سطحی، اثر کوانتومی، تجمع‌پذیری و ... (۴) به اندازه، شکل و غلظت ذره‌هایشان بستگی دارد (۲۵). این ذره‌ها در چرخه حیات و اکوسیستم پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند. لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد (۲).

در حال حاضر نانوتکنولوژی در زمینه نانوانتی‌بیوتیک نیز سودمند است. این تکنولوژی به‌وسیله دست‌کاری در اندازه و مقیاس باعث افزایش عمل‌کرد این مواد می‌شود (۱).

به‌طور مثال نانوذره‌های آمپی‌سیلین در درمان سالمونلا مؤثرتر از خود دارو بودند (۳۴). نانوذره‌های آمفوتریسین B موجب کاهش نفروتوکسیسیته این دارو شدند (۳۳).

هم‌چنین نانوذره‌ها حاوی آمپی‌سیلین اثر بسیار خوبی بر روی عفونت لیستریوزیس ایجاد شده در موش‌های بدون تیموس داشتند (۳۵).

متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی-تر، خطر افزایش بیماری‌های عفونی جان انسان‌ها را تهدید می‌کند (۲۹). در نتیجه این مطالعه با هدف سنتز نانودارو و به-کارگیری آن برای مهار پمپ‌افلاکس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، انجام شد.

روش کار

در این مطالعه مقطعی که طی ۶ ماه از مردادماه ۱۳۹۵ تا دی-ماه ۱۳۹۵ انجام شد، نمونه‌ها از بیماران بستری در بخش‌های

از زمان شناخت باکتری‌ها، بشر همواره در پی یافتن دارویی موثر علیه عفونت‌های ناشی از آن‌ها بوده است و باکتری‌ها نیز به مکانیسم‌های مؤثر جهت از بین بردن آنتی‌بیوتیک‌ها دست یافتند. امروزه با پیدایش مقاومت دارویی در میان باکتری‌های بیماری‌زا، درمان این دسته از بیماری‌های عفونی با مشکلات بسیاری مواجه شده است (۱۴).

اسینتوباکتریومانی کوکو باسیل فرصت‌طلب، گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری، اکسیداز منفی و شایع‌ترین گونه‌ای است که به-عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی به‌طور معمول در عفونت‌های مرتبط با وسایل پزشکی از خون، خلط، پوست، مایع پلور و ادرار جدا شده است (۱۹،۶،۳). این باکتری از طریق زخم‌های باز، سوندها و مجاری تنفسی وارد بدن شده و عامل بیماری‌های مهمی چون پنومونی، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، اندوکاردیت و عفونت‌های سوختگی محسوب می‌شود (۷).

اسینتوباکتر دارای مکانیسم‌های بروز مقاومت به اغلب کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز توانایی بالایی برای گسترش مقاومت سریع به داروهای مختلف است. تا به امروز برخی از سویه‌های *اسینتوباکتریومانی* به تمام عوامل ضدمیکروبی موجود مقاوم شده‌اند و از این‌رو داروهای مؤثر به‌منظور درمان بسیار محدود هستند (۲۷). شایع‌ترین عوامل مرتبط با مقاومت در *اسینتوباکتریومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) شامل ژن‌های سفالوسپوریناز AmpC، کارباپنمازهای نوع OXA، متالوبتالاکتامازها [MBLs]، پمپ‌های افلاکس و اینتگرون‌ها هستند. کارباپنم‌ها از جمله اولین انتخاب‌های درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتریومانی* هستند. متأسفانه مقاومت به کارباپنم‌ها بین ایزوله‌های بالینی و محیطی *اسینتوباکتر* بسیار گزارش شده است (۳۶،۲۷).

پمپ‌های افلاکس چند دارویی به‌خاطر تنوع وسیع سوبسترای، اثرهای ناشی از افزایش بیان آن‌ها، همراهی و اثر سینرژیسمی آن‌ها با دیگر مکانیسم‌های مقاومت نقش مهمی در پدیدار شدن سویه‌های MDR دارند (۱۲). این پمپ‌ها نه‌تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) می‌گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها می‌گردند (۲۰). به-

مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۵۵۰ سانتریفیوژ شد؛ سپس ۲ میلی لیتر دیگر از محلول آبی دارو اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. با افزودن گلوکار آلدهید ذره‌ها تثبیت شدند.

عمل اختلاط به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی انجام شد.

برای خالص سازی از سانتریفیوژ یخچال دار (VS-15000CFN) (II) با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

۲- تهیه سوسپانسیون باکتری

سوسپانسیون میکروبی استاندارد براساس ۰/۵ مکفارلند (معادل CFU/ML $10^8 \times 1/5$ باکتری) تهیه شد به این صورت که:

چند کلنی از باکتری /سینتوباکتریومانی مقاوم به ایمنی پنم در ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد و در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد؛ سپس کدورت آن هم به صورت چشمی و هم با دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY 6305) سنجیده شد.

بررسی تشکیل نانوذره‌ها با استفاده از دستگاه FTIR انجام شد.

۳- بررسی اثر ضد میکروبی نانوذره‌ها

بررسی اثر ضد میکروبی با استفاده از روش MIC به طریق میکرو برات دایلوژن انجام شد.

روش سنجش تعیین حداقل غلظت مهارکننده به طریق میکروبراث با استفاده از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک آلمان)، مواد ضد میکروبی (IND و ANPs) و سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند طبق کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (NCCLS) انجام شد.

روش‌های محاسباتی رقت‌ها بر طبق دستور کار انستیتو پاستور ۲۰۱۲ انجام شد به این صورت که ابتدا رقت‌هایی با غلظت نهایی ($20/5 \mu\text{g/ml}$ ، $160/5$ ، $1280/5$) از مواد ضد میکروبی تهیه و پس از آن ۱۴ رقت بعدی ($512/5$ - $0/625$)، از ۴ رقت اولیه تهیه شد. (تمامی مرحله‌ها داخل میکروتیوب‌های استریل انجام شد.)

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر ۱۴ رقت ثانویه ماده ضد میکروبی داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و ۱۰۰

مختلف بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شد. برای جداسازی باکتری‌ها در آزمایشگاه میکروبی شناسی بالینی ایزوله‌های /سینتوباکتریومانی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند؛ سپس به منظور بررسی مقاومت دارویی این باکتری به داروی ایمنی پنم تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (۱۱) برای این آنتی بیوتیک انجام شد.

به دلیل اهمیت بیش تر آنتی بیوتیک‌های کارباپنم و با توجه به اینکه به تازگی باکتری مذکور نسبت به آنتی بیوتیک ایمنی پنم مقاومت دارویی ایجاد کرده است، این مطالعه بر /سینتوباکتریومانی مقاوم به ایمنی پنم^۶ متمرکز شد.

۱- سنتز نانوذره‌ها (۲۴)

تشکیل نانوذره‌ها با استفاده از روش توده‌ای شدن ساده (desolvation) انجام شد.

الف - سنتز نانوذره‌های آلبومین^۷

سرم آلبومین گاوی^۸ (مرک آلمان) با دو مقدار ۰/۵ و ۰/۰۵ گرم در دو بشر مجزا در ۱۰ CC محلول ۱۰ میلی مولار کلرید سدیم (NaCl) حل شد و با استفاده از محلول ۰/۱ نرمال هیدروکسید سدیم (NaOH) PH محلول به ۹ رسانده شد. در مرحله بعد اتانول به عنوان ضد حلال به محلول پروتئین اضافه شد. پس از تشکیل نانوذره‌ها با افزودن گلوکار آلدهید^۹ (مرک آلمان) ذره‌ها تثبیت شدند و عمل اختلاط به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی انجام شد.

برای خالص سازی از سانتریفیوژ یخچال دار (VISION) با دور 0rpm ۱۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

ب - سنتز نانوذره آلبومین - ایمنی پنم (نانو داروی ایمنی - پنم^{۱۰})

ابتدا ۰/۱ گرم از سرم آلبومین گاوی در ۵ میلی لیتر از محلول آبی دارو ایمنی پنم^{۱۱} (شرکت سیگما)، در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۰/۵ CC اتانول به عنوان ضد حلال به محلول اضافه شد و داخل لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ریخته شد. این محلول به-

⁶ Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii*

⁷ Albumin Nano Particles

⁸ Bovine Serum Albumin

⁹ Glutaraldehyde

¹⁰ Imipenem Nano Drug

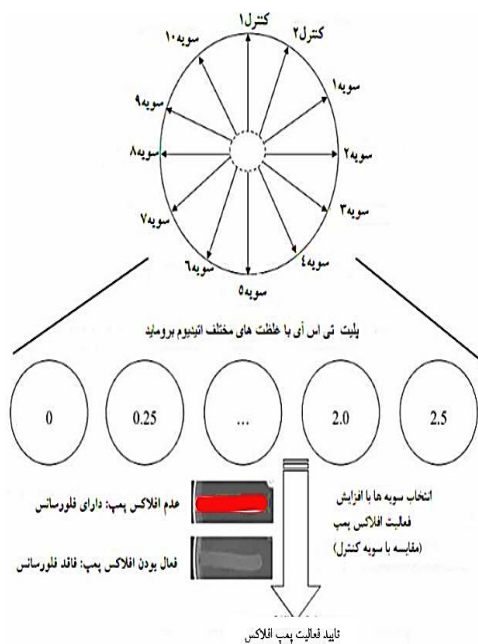
¹¹ Imipenem

سوسپانسیون باکتری *IRA* (مطابق نیم مکفارلند) بر روی محیط کشت TSA با غلظت‌های متفاوت EtBr کشت داده شد.

ب- با عامل ضد میکروبی

میزان مساوی از سوسپانسیون میکروبی باکتری *IRA* (مطابق

نیم مکفارلند) با رقت مشخصی از مواد ضد میکروبی (IND و ANP ۰/۵ gr) مخلوط و بر روی این محیطها کشت داده شد.



تصویر ۱: روش کارت ویل آگار- اتیدیوم بروماید

یافته‌ها

طیف‌سنجی فرورسرخ (FT-IR)

از آن‌جاکه گروه‌های عاملی مختلف، دارای جذب در فرکانس‌های مشخصی هستند، بنابراین طیف سنجی-FT به‌عنوان وسیله‌ای مناسب برای تعیین ساختار و تغییرهای ساختاری در بیوپلیمرها معرفی می‌شود (۱۳).

هدف اصلی از آنالیز طیف سنجی FT-IR در این پژوهش، شناسایی گروه‌های عاملی داروی ایمی‌پنم و نانوذره‌ها آلومین و سپس تشخیص تشکیل نانوذره آلومین- ایمی‌پنم (ساختار جدید) بود.

وجود پیک‌های مربوط به گروه عاملی الکل (ROH) و آروماتیک‌ها در نانوذره‌های آلومین و نانوذره آلومین- ایمی-پنم، پیک‌های مربوط به گروه‌های عاملی کربوکسیل

میکرولیتتر هم از سوسپانسیون باکتری (نیم مکفارلند که ۱۰۰ برابر رقیق شده) به هر چاهک اضافه شد، در نهایت حجم هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتتر شد. میکروپلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد.

میزان کدورت (رشد باکتری) با دستگاه الایزا-2020 (anthos GF2255011) سنجیده شد.

در مورد هر یک از رقت‌ها تست میکرو دایلوژن به صورت ۳ بار تکرار صورت گرفت.

۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی رقیق شده باکتری /اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی‌پنم به‌عنوان کنترل مثبت و ۱۰۰ µl از رقت ۵۱۲ µg/ml مواد ضد میکروبی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

پایین‌ترین غلظتی از ماده ضد میکروبی که مانع رشد باکتری - شد به‌عنوان MIC یادداشت گردید.

۴- بررسی فنوتیپی پمپ‌افلاکس با استفاده از روش کارت ویل آگار- اتیدیوم بروماید

سوبه‌های اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی‌پنم بر روی پلیت-های TSA^{۱۲} (مرک آلمان) حاوی غلظت‌های متفاوت (mg/l) EtBr (۰-۲) (شرکت سیگما) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. میزان فلوروسنت هر جدایه با دستگاه ژل داکت (VILBER LOURMAT (B.P.66 TORCY-Z.I.SUD) اندازه‌گیری شد (۲۲).

به‌صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار محیط، کشت داده شدند (تصویر ۱).

اسینتوباکتریومانی استاندارد ATCC19606 به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۲۳).

(هر پلیت (محیط کشت: تریپتیک سوی آگار + اتیدیوم بروماید^{۱۳}) شامل ۸ سوبه از باکتری اسینتوباکتریومانی مقاوم به ایمی‌پنم بود.)

این روش به دو صورت انجام شد:

الف - بدون عامل ضد میکروبی

¹² Tryptic soy agar

¹³ Ethidium Bromide

امروزه پمپ‌های افلاکس فعال به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها مطرح هستند (۱۶).

در این مطالعه ۷۵٪ از سویه‌های *اسینتوباکتریومانی مقاوم* به ای‌می‌پنم دارای پمپ‌افلاکس فعال بودند. نانوذره آلومین-ایمی‌پنم فاقد اثر مهاري بر پمپ‌افلاکس سویه‌های مذکور بود و نانوذره ۰/۵ گرم با MIC = ۰/۱۲۵ µg/ml پمپ‌افلاکس ۳۷٪ سویه‌های مورد مطالعه را در حداقل غلظت EtBr مهار کرد.

این نتایج ارتباط مهار پمپ‌افلاکس با اثر باکتریواستاتیکی ماده ضد میکروبی را نشان می‌دهد. به عبارتی مهار پمپ‌افلاکس باعث کاهش MIC و افزایش قدرت باکتریواستاتیکی و یا باکتریوسایدی ماده ضد میکروبی می‌شود.

در مطالعه Gholami در سال ۱۳۹۲ غیرفعال کردن پمپ-افلاکس سویه‌های *IRA* به وسیله PAβN^{۱۴}، MIC را در ۷٪ از سویه‌ها ۴ تا ۶۴ برابر کاهش داد (۱۵).

Ruzin و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه ایزوله‌های بالینی *اسینتوباکتریومانی* نشان دادند که ارتباط معنی‌داری میان میزان بیان پمپ‌افلاکس و میزان MIC وجود دارد (۱۷). نیک آسا و همکاران در سال ۱۳۸۷ نشان دادند که میزان MIC در حضور ماده مهارکننده پمپ‌افلاکس در سویه‌های *اسینتوباکتریومانی* جدا شده از نمونه‌های بیمارستانی شهر تهران کاهش می‌یابد (۳۰).

Zhu و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که مقادیر MIC در تمامی سویه‌های حساس به داروی ای‌می‌پنم، آمیکاسین و نیتلمایسین با افزودن ماده مهارکننده پمپ‌افلاکس باکتری (CCCP^{۱۵}) کاهش قابل توجهی ندارد. که نشان دهنده فنوتیپ منفی پمپ‌افلاکس در این سویه‌ها است این در حالی-است که در سویه‌های مقاوم به آمیکاسین و نیتلمایسین در بیش از ۹۰٪ سویه‌های مورد مطالعه کاهش مقدار MIC مشاهده شد اما در سویه‌های مقاوم به ای‌می‌پنم کاهشی در مقدار MIC مشاهده نشد (۳۸).

Dal در سال ۲۰۱۴ در ترکیه اثر مهار کننده‌های PAβN و NMP را بر روی ژن Ade B در ۴۰ جدایه *اسینتوباکتریومانی* و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار داد و ملاحظه کرد

(CH) و (RCOOH) در دارو و نانوذره آلومین-ایمی‌پنم؛ شکل‌گیری درست نانوذره آلومین-ایمی‌پنم را تأیید کرد. در ضمن مشاهده پیک جدید با عدد موج ۱۱۲۱ مربوط به گروه عاملی آمین (NH₂ یا NH) نشان دهنده تشکیل ماده‌ای با ساختار جدید (نانو ذره آلومین-ایمی‌پنم) بود (تصویر ۲).

نانوذره آلومین-ایمی‌پنم فاقد اثر مهاري بر باکتری *اسینتوباکتریومانی* مقاوم به ای‌می‌پنم بود (با توجه به کنترل مثبت). نانوذره آلومین ۰/۵ گرم با MIC = ۰/۱۲۵ µg/ml اثر مهاري بیش‌تری نسبت به نانوذره آلومین ۰/۰۵ گرم با MIC = ۱۶ داشت (نمودار ۱).

در روش CW ایزوله‌ها بر طبق فلورسانس گسیلی به سه دسته تقسیم می‌شوند. (در غلظت‌های کم اتیدیوم بروماید، پمپ-افلاکس باکتری فعال بود در نتیجه اتیدیوم بروماید را از خود دور کرده رنگ قرمزی روی سویه‌ها دیده نشد. (بدون فلورسانس گسیلی) اما به تدریج با افزایش میزان اتیدیوم بروماید پمپ‌افلاکس قادر به خارج کردن این میزان اتیدیوم بروماید از باکتری نبود؛ در نتیجه رنگ قرمز روی سویه‌ها دیده شد (گسیل فلورسانس).

CW- (بدون سیستم ایفلاکس فعال): ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را در غلظت EtBr ۱/۵-۰) mg/l نشان می‌دهند. هیچ‌یک از سویه‌ها در این دسته قرار نگرفتند.

CW+/-: ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را در غلظت mg/l EtBr ۱/۵-۲) نشان می‌دهند. ۲۵٪ سویه‌ها در این دسته قرار گرفتند.

CW+ (سیستم ایفلاکس فعال): ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را تنها در EtBr ۲/۵ mg/l نشان می‌دهند. ۷۵٪ سویه‌ها در این دسته قرار گرفتند (۳۱).

نانوذره آلومین-ایمی‌پنم فاقد اثر مهاري بر پمپ‌افلاکس باکتری *اسینتوباکتریومانی* مقاوم به ای‌می‌پنم بود (مشاهده رنگ قرمز (گسیل فلورسانس)؛ اما نانوذره آلومین ۰/۵ گرم پمپ-افلاکس ۳۷٪ سویه‌ها را در حداقل غلظت EtBr ۰/۵-۰ mg/l مهار کرد.

بحث

^{۱۴} فنیل آرژنین بتا نفتیل آمید

^{۱۵} carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

در سال ۱۳۹۳ (۹) با این روش به بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس در ایزوله های مختلف باکتریایی مقاوم به دارو پرداختند.

بر اساس این مطالعه ها روش کارت ویل در کنار تعیین فنوتیپی پمپ افلاکس که فنوتیپ MDR را در ایزوله های بالینی باکتری های پاتوژن گرم مثبت و منفی میانجی گری می کند؛ یک مقایسه سریع از فعالیت افلاکس را که در نتیجه جهش های ایزوژنیک در آزمایشگاه (به واسطه پرتو دهی مداوم، حذف یک ژن یا گروهی از ژن ها و یا رشد سویه باکتری در شرایط مختلف (دما، PH و غیره)) ایجاد می شود، فراهم می کند.

در این مطالعه برای اولین بار حضور ماده ضد میکروبی (نانوذره آلبومین - ایمی پنم و نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم) در ترکیب با سوسپانسیون میکروبی در روش EtBr-agar CW برای بررسی فنوتیپی مهار پمپ افلاکس توسط ماده ضد میکروبی، بررسی شد.

در این بررسی مهار افلاکس در حداقل غلظت (۰/۵ mg/l) EtBr دارای اهمیت بود زیرا در این غلظت تمامی پمپ های افلاکس قادر به دفع مقدار حداقلی EtBr هستند در نتیجه ماده ای که بتواند در این غلظت پمپ افلاکس را مهار و فلورسانس را گسیل کند مهار کننده خوبی است.

اگر چه مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است تنها به دلیل فعالیت پمپ های افلاکس چند دارویی نباشد اما با توجه به فعالیت حداکثری پمپ افلاکس در ۷۵٪ سویه های مورد مطالعه و مهار ۳۷٪ آن ها در حداقل غلظت EtBr توسط نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم $MIC = 0.125 \mu g/ml$ و عدم مهار پمپ ها توسط نانوذره آلبومین - ایمی پنم، همکاری و ارتباط بیان پمپ های افلاکس و مقاومت آنتی بیوتیکی نباید نادیده گرفته شود. هر چند بررسی ژنتیکی این پمپ ها و سایر عوامل دخیل از جمله آنزیم های بتالاکتاماز امری ضروری است.

نتیجه گیری

سهم افلاکس در مقاومت دارویی تعدادی از سویه های بالینی یکی از عواملی است که بایستی در طراحی آنتی بیوتیک های جدید یا هر ترکیب فعال دیگر در نظر گرفته شود. چالش اصلی، کشف ترکیبی است که به عنوان مانع افلاکس در روش غیر اختصاصی، طیف وسیعی از سیستم های افلاکس گونه های مختلف باکتریایی را هدف قرار دهد (۲۲).

خاصیت ضد میکروبی برخی آنتی بیوتیک ها همراه با مهار کننده افلاکس به مقادیر قابل توجهی افزایش یافته ولی در آمینوگلیکوزیدها تغییر چشم گیری ملاحظه نمی شود. تأثیر مهار کننده NMP در افزایش خاصیت ضد میکروبی کینولون ها را بیش تر از PABN گزارش کرده است (۸).

تفاوت نتایج در این مطالعه ها را می توان به تفاوت ماده مهار کننده پمپ افلاکس، نوع ژن فعال پمپ افلاکس در باکتری، الفاء متفاوت مقاومت توسط داروهای مختلف، تغییر یا از دست دادن نفوذ پذیری غشاء و غیره نسبت داد. در این مطالعه از IND و ANPs به عنوان ماده ضد میکروبی و مهار کننده پمپ - افلاکس استفاده شد.

نانوذره های زیستی اولین بار در سال ۱۹۷۰ به دست آمد (۱۸). یکی از روش های نوین تولید نانوذره های پروتئینی روش جداسازی مرحله ای است که به وسیله دانشمندان آلمانی کشف شد (۱۰). آلبومین به علت زیست تخریب پذیر بودن در محصول های طبیعی، عدم سمیت، در دسترس و ارزان بودن بیش تر از سایر نانوذره های زیست تخریب پذیر استفاده می شود. هم چنین به علت خصوصیت های فیزیکی و بار سطحی، به عنوان حامل مناسبی برای داروهای آب گریز در آمده است (۲۲).

در مطالعه حاضر نانوذره آلبومین به تنهایی اثر ضد میکروبی بسیار خوبی بر باکتری IRA داشت اما در ترکیب با دارو به عنوان حامل فاقد اثر ضد میکروبی بود.

در مطالعه Serna و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانوذره ها پروتئینی، فعالیت ضد میکروبی قوی و گسترده ای را علیه باکتری های گرم منفی و مثبت بدون هیچ اثر مضر روی سلول های پستانداران نشان دادند (۳۲). رحیم نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که نانوذره های پروتئینی در حدود ۱۰۰ nm با خلوص بالا برای انتقال دارو مناسب هستند (۳۰). Mahal و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ذره های پروتئینی (zein+BSA) در ترکیب با نانوذره ها فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی در برابر انواع سویه ها دارند و مواد زیست محیطی بسیار مهمی هستند (۲۱).

در این مطالعه برای بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس از روش EtBr-agar CW استفاده شد.

Martins و همکاران در طی مطالعه های جداگانه در سال های ۲۰۱۱ (۲۳) و ۲۰۱۳ (۲۲) هم چنین دشتی زاده و همکاران

با توجه به نتایج این مطالعه ترکیب‌هایی مانند نانوذره آلبومین که علاوه بر اندازه و فرمولاسیون متفاوت نسبت به داروهای رایج، قابلیت انحلال در آب را هم دارند و می‌توانند از سد دیواره باکتری‌های گرم منفی عبور کنند گزینه مناسبی برای مهار پمپ‌های افلاکس هستند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از خانم اسلامی و کارشناسان آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات ساوه به دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال امتنان را دارند.

فهرست اختصارات:

1) MIC=Minimum inhibitory concentration

حداقل غلظت مهار کننده

2)CLSI= Clinical and Laboratory Standards Institute

موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی

3)TSA=Tryptic soy agar

4) Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

/اسینتوباکتر بومانی مقاوم به ایمی پنم

5) Imipenem Nano Drug

نانوداروی ایمی پنم(نانوذره ی آلبومین-ایمی پنم)

6)MDR=Multi drug resistant

مقاومت چند دارویی

7) ANPs=Albumin Nano Particles

نانو ذرات آلبومین

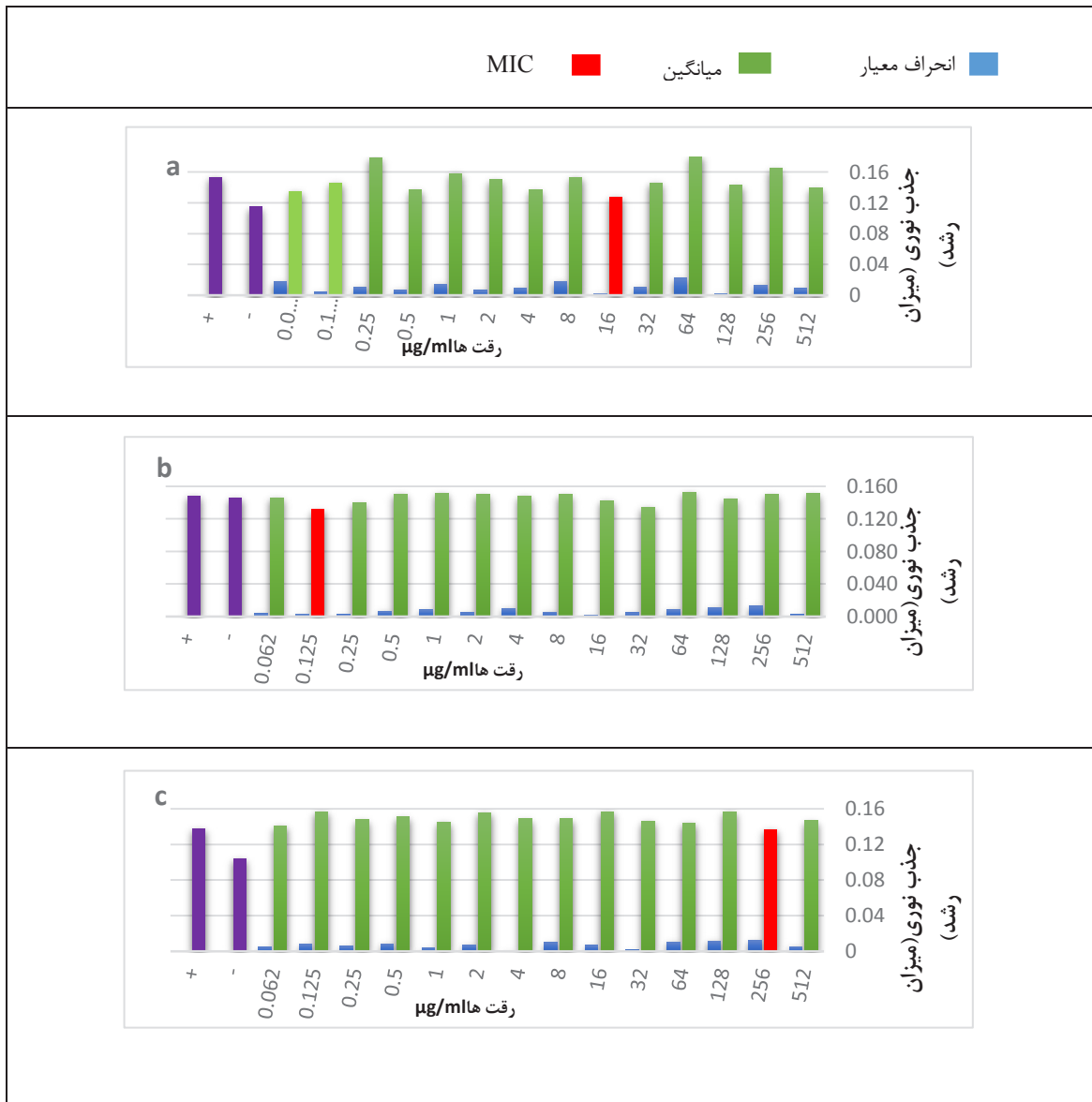
8)BSA=Bovine Serum Albumin

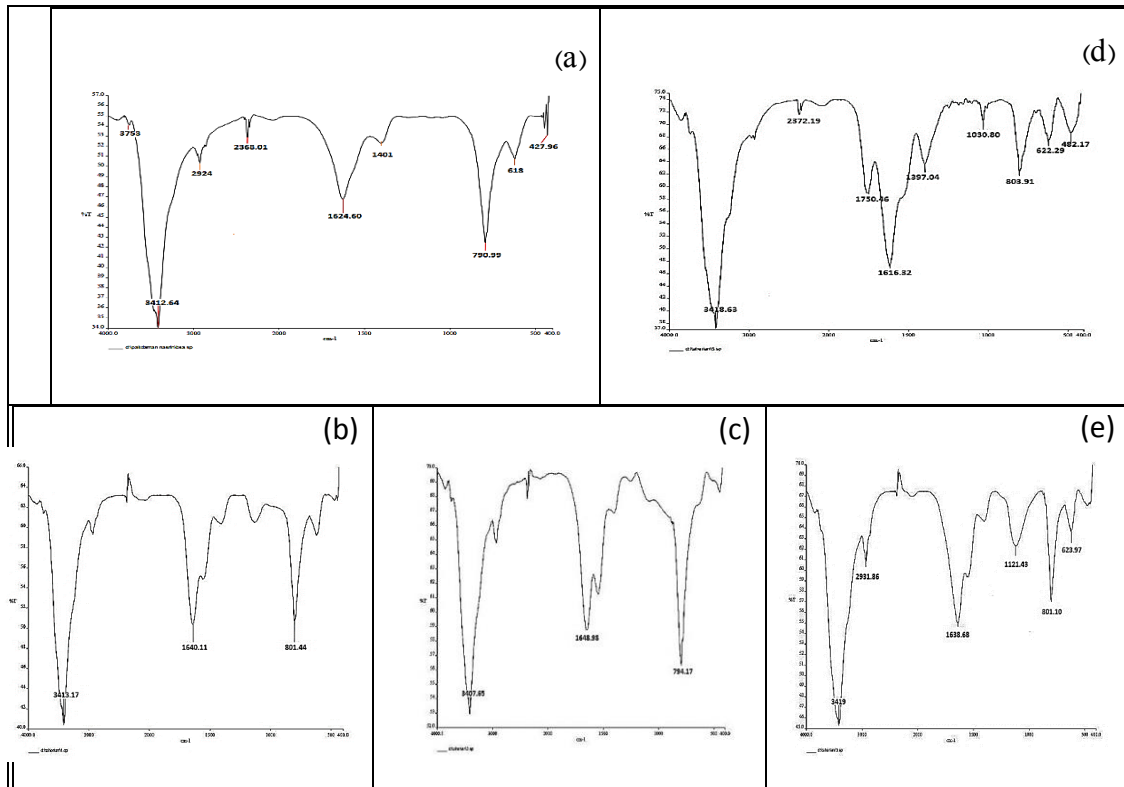
سرم آلبومین گاوی

9)EtBr=Ethidium Bromide

10)CW=Cartwheel

11)IMI=Imipenem


















تصویر ۲: مجموعه طیف‌های FTIR

(a)BSA ,(b) ANP 0.05gr, (c) ANP 0.5gr, (d) IMI, (e) IND

a

EtBr (mg/l)	0	۰,۵	۱	۱,۵	۲
<i>IRA</i>					

b

EtBr (mg/l)	۰	۰,۲۵	۰,۵	۱,۵
ANP 0.5gr+ <i>IRA</i>				
IND+ <i>IRA</i>				

تصویر ۳: نتایج بررسی پمپ افلاکس سویه‌های *IRA* به روش EtBr-agar CW

هر خط رشد متعلق به یک سویه است. رنگ قرمز بیانگر گسیل فلورسانس و مهار پمپ افلاکس و نبود آن بیانگر فعالیت پمپ افلاکس است.

(a) بدون عامل ضد میکروبی (b) با عامل ضد میکروبی

منابع

1. Athirah Nur A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2012; 6(7):258-261.
2. Binyu Yu. Synthesis of Ag-TiO₂ composite nano thin film for antimicrobial application. Nanotechnology 2011; 22:115603.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. The United States: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2007.
4. Chang Y N , Zhang M , Xia L , Zhang J. and Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. Materials, 2012, 5: 2850-2871.
5. Colvin V. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. Nature Biotechnol J, 2003; 21(10):1166-1170.
6. Consales G, Gramigni E, Zamidei L, Bettocchi D, De Gaudio AR. A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: Antimicrobial and organizational strategies. J Crit Care. 2011; 26(5): 9-453.
7. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-82.
8. Dal T, Aksu B, Page's J.M and Over-Hasdemir U. Expression of the adeB gene and responsiveness to 1 (1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanyl arginylb- naphthylamide in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2013; 1-3.
9. Dashti Zadeh Y, Moattari A, Gazzin G. Evaluation of phenotypic and genetic outbreaks of the episodes of pump and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among burn patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital. J World News ,2014; 2(19):118-127.
10. Elber DL. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. Acta Biomater 2011 Jan; 7 (1): 31-56.
11. Erfani Y, Safdari R, Choobineh H, Mirsalehian A, Rasti A, Einollahi N, Mirafshar M, Yazdan Yad H, Hamidian M, Soltanian A. Comparison of two methods of E.test and disc diffusion agar in determination of antibiotic susceptibility of *E. coli* strains isolated from patients with urinary tract infection referred to Shariati Hospital of Tehran. J Ibn Sina Clinical, 2008; 2(48):27-31.
12. Aslami K, Molaabas-Zade H, Hamidi M, BahmanAbadi R. Patern of sensitivity and resistant of *Acinetobacter* isolated from Azad hospital in Tehran 2010-2011. Iranian J of Infectious Dis 2014;19(46):1-5.
13. Filippove, M. P., 1992, Practical infrared spectroscopy of pectic substances, Food Hydrocolloids, 6, 115-142.
14. Garcia L, Juan C, Domenech A, Alberti S. Role of *Klebsiella pneumonia* LamB porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Age Chem 2011; 5-55:1803.
15. Gholami M. 2013, Phenotypic and Molecular Analysis of AdelaBC and AdelJK Infrared Pneumatics from Aminopenyl Resistant *Acinetobacter* Strains Isolated from Burned Patients Referring to Shahid Motahari Hospital in 2011-12, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.
16. Goodarzi H, Douraqi M, Dabiri H, Ghalavand Z. Evaluation of the expression and function of efflux pumps gene of multi-drug resistant isolates in non-cluster *Acinetobacter bemanemia*. J Research in Medicine, 2013;2:107-112.
17. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2010; 93-65:1589.
18. Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomed Nanotech Biol Medicine 2005 Mar;1(1):22-30.
19. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med. 2010;30(5): 498-506.
20. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3375-80.

21. Mahal A¹, Goshisht MK, Khullar P, Kumar H, Singh N, Kaur G, Bakshi MS. Protein mixtures of environmentally friendly zein to understand protein-protein interactions through biomaterials synthesis, hemolysis, and their antimicrobial activities. *Phys Chem Chem Phys*. 2014 Jul 21;16(27):14257-70.
22. Martins M¹, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol J*. 2013 Mar 22;7:72-82.
23. Martins M¹, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo*. 2011 Mar-Apr;25(2):171-8.
24. Moradi S. 2015, Molecular study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the samples of hospital infections and the study of the synergistic effect of the albumin-amino-penicillin nano-protein on it, Faculty of Agriculture, Saveh Branch Azad University.
25. Nakasao K, Okuyama M, Shimada S, Pratsinis E. Effect of reaction temperature on CVD-made TiO₂ primary particle diameter. *Chemical Engineering Science*., 2003, 58: 3327-3335.
26. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000; 31: 247-56.
27. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(9):826-36.
28. Rahimnejad M, Najafpour G, Jahan Shahi M. Production of protein nanostructures as drug carriers and optimization from top to bottom. *J Qazvin Uni of Med Sciences*, 2013; 6(71): 4-9.
29. Rancovic B, Kosanic A. Antimicrobial activities of different extracts of *lecanoramuralis parmeliasulcata* and *parmeliopsisambigua*. *Pakistan J Botan*2012; 44: 429-37.
30. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. RT-PCR and statistical analyses of *adeABC* expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *Microb Drug Resist*2010;87:16-89.
31. S. Costa S, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2013,2,83-99.
32. Serna N, Sanchez-Garcla L, Sanchez-chardi A, Unzueta U, Roldan M, Manges R, Vazquez E, Villaverde A. Protein-only, antimicrobial peptid-containing recombinant nanoparticles with inherent built-in antibacterial activity. *Acta Biomater*. 2017 Jul 19. pii: S1742-7061(17)30464-6. doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.027.
33. Tiyaboonchai W., Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan dextran sulfate nanosuspensions, *Int. J. pharm.*, 2008, 329: 142-149.
34. Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58: 1532-1555.
35. Youssef M., Fattal E., Alonso M.J. Roblot-Treupel L., Sauzie`res J., Tancre`de C., et al. Effectiveness of nanosuspension-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice, *Antimicrob Agents Chemother*, 1998,32:1204-1207.
36. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: The molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(5):335-41.
37. Zhang G, Niu A, Peng S, Jiang M, Tu Y, Li M, et al. Formation of novel polymeric nanoparticles. *Acc Chem Res*. 2001; 34(3): 249-56.
38. Zhu W¹, Wang H², Zhang JP². A comparison of *adeB* gene expression levels under conditions of induced resistance by different drugs in vitro in *Acinetobacter baumannii*. *Exp Ther Med*. 2017 May; 13(5): 2177-2182.