Archive of SID

گزارش اثرمهارکنندگی مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین در ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* L.

احمدرضا شاهوردی[1*]، منصور باقری[2]، فرامرز توسلی[3]

۱- استادیارگروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- محقق و رئیس مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی و آبهای معدنی آذربایجان، استان اردبیل
۳- پزشک و محقق، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی
کد پستی ۱٤۱۷٤، تلفن: ٦۱۱۲۳۳۳، نمابر: ٦٤٦۱۱۷۸
پست الکترونیک: Shahverdiar @yahoo.com

چکیده

مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز مقاومت‌های جدید و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا ساخت مشتقات نیمه‌صناعی جدید موثر بر عفونت‌های مقاوم از عمده‌ترین اهداف برنامه‌های توسعه و تحول داروهای موثر در درمان بیماری‌های عفونی محسوب می‌گردد. امروزه یک راه حل جانشین در درمان عفونت‌های مقاوم مطرح شده که عبارت است از مصرف آنتی‌بیوتیک به همراه عوامل از بین برنده مقاومت که مقاومت عوامل بیماری‌زا را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده از بین می‌برند.

در مطالعه غربال‌سازی نمونه‌های گیاهی به منظور دست یافتن به اثر مهار کنندگی مقاومت انتروباکتریاسه‌ها به نیتروفورانتوئین مشخص گردید ترکیبات فرار گیاهی از گونه نعنا می‌تواند این اثر را در شرایط In vitro بروز دهد. در مطالعات گیاه‌شناسی این گیاه(*Mentha longifolia*) شناسایی شد که ترکیبات فرار رقیق شده آن در حضور نیتروفورانتوئین قادر است از رشد باکتری‌های مقاوم اشرشیا، کلبسیلا، پرتئوس، سالمونلا، سیتروباکتر، سراشیا و انتروباکتر جلوگیری نماید در حالی که صرفاً خود این ترکیبات فرار رقیق شده ممانعتی برای رشد باکتری‌های مذکور ایجاد نمی‌نماید.

گل واژگان: نیتروفورانتوئین، انتروباکتریاسه، مقاومت میکروبی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مقاومت فزاینده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، توانایی پزشکان را در درمان بعضی از بیماری‌های عفونی که اغلب مرگ بار هستند محدود نموده است. امروزه مقاومت دارویی دست کم در درمان چهار بیماری عفونی مهم شامل اسهال، مالاریا، سل و عفونت‌های دستگاه تنفسی اختلالات عمده‌ای ایجاد نموده است. اما مشکل فراتر از این چهار نوع بیماری رایج می‌باشد. مرگ ناشی از عفونت‌های بیمارستانی که سالانه تنها عامل چهل هزار مورد مرگ در ایالات متحده است تقریباً ناشی از همین افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد [۱].

بنابراین مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز مقاومت‌های جدید و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار و مورد تأکید سازمان بهداشت جهانی است. کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا ساخت مشتقات نیمه صناعی جدید مؤثر بر عفونت‌های مقاوم از عمده‌ترین اهداف برنامه‌های توسعه و تحول داروهای مؤثر در درمان بیماری‌های عفونی محسوب می‌گردد. امروزه یک راه حل جانشین نیز در درمان عفونت‌های مقاوم مطرح شده که عبارت است از مصرف آنتی‌بیوتیک به همراه عوامل از بین‌برنده مقاومت باکتری که به طور نمونه می‌توان از (Clavulanic acid) نام برد. این دارو قادر است آنزیم پنی‌سیلین آسیلاز ترشح شده از سویه‌های مقاوم را مهار کند و در نهایت مقاومت عوامل بیماری‌زا را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین کاهش دهد [۲، ۳].

امروزه ترکیبات جدیدی به عنوان مهارکننده مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین گزارش شده است [۴، ۵]. همچنین تحقیقات گسترده روی مهارکنندگان پمپ‌های ویژه تبادل مواد در غشا باکتری‌ها منجر به ارایه ترکیبات Efflux Pump Inhibitor شده است که می‌توانند مقاومت باکتری‌ها را به طور همزمان نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک کاهش دهند. این پمپ‌ها باعث بیرون ریختن آنتی‌بیوتیک‌های مهمی مانند تتراسیکلین، کلیندامایسین و یا ایزونیازید از سلول باکتری شده و در نتیجه نوعی مقاومت را در باکتری‌ها ایجاد می‌نماید [۶]. مشابه این پمپ‌ها را در برخی از سلول‌های سرطان نیز می‌توان یافت که مهار این پمپ‌ها به طور مثال با رزرپین باعث کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی در مقابل برخی از داروهای ضدسرطانی شده است[۷].

در طی مطالعه‌ای که طی سال‌های ۱۳۷۷ لغایت ۱۳۸۱برای غربال‌سازی گیاهان متعدد جهت کشف اثر مهارکنندگی مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه به نیتروفورانتویین انجام پذیرفت ترکیبات فرار گیاهی از گونه نعنا اثر مهارکنندگی مقاومت انتروباکتریاها را به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین نشان داد [۸] که مقاله حاضر نتایج مطالعات تکمیلی در این ارتباط را بیان می‌نماید.

مواد و روش‌ها

غربال سازی اثر مهارکنندگی مقاومت به نیتروفورانتویین

برای غربال سازی اثر مهارکنندگی مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک کافی است عصاره‌ها و یا اسانس‌های رقیق شده گیاهی که در روش سنجش اثرات ضدمیکروبی (Antibiogram) اثر مهاری روی رشد باکتری‌های موردنظر نشان نمی‌دهند مجدداً در محیط مولرهینتون جامد حاوی یک آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مجدد قرار گیرند [۴]. در این مطالعه جهت غربال سازی اثر مهارکنندگی مقاومت از محیط‌های جامد حاوی ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیتروفورانتویین خالص استفاده شد. نمونه عصاره و

www.SID.ir

Archive of SID

یـا اسـانس رقـیق شده‌ای که برروی این محیط واجد آنتـی‌بیوتـیک در مقابـل سـویه مقـاوم *Enterobacter cloacea* اثـرات مهـاری بـه صـورت هالـه عـدم رشد نشان می‌دهد به عنوان نمونه مثبت تلقی گردید.

جداسازی سویه‌های مقاوم گروه انتروباکتریاسه

باسـیل‌هـای گـرم منفی از جنس اشرشیا، کلبسیلا، انتروباکتر، سراشیا، سیتروباکتر و پروتئوس که طبق آزمـایش‌هـای اسـتاندارد سـنجش حـساسیت بـه نیتـروفورانتویین مقـاوم تـشخیص داده شـده‌انـد از بخـش عفونـی بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام دانـشگاه علـوم پزشکی تهران و آزمایشگاه تشخیص طبـی حکیم جدا شد. سویه‌های مقاوم جدا شده مجدداً در آزمایـشگاه طـبق روش اسـتاندارد تـشخیص و تعیـین هـویت و تعیـین MIC شـدند [۹]. این سویه‌ها عـبارت بـودند از اشرشـیاکلی، کلبـسیلاپونومونیه، انتروباکترکلاسـه، انتروباکترآیـروژنوز، سراشـیا مرسـسنس، سـیتروباکتر فروندی، پرتئوس ولگاریس و پـرتئوس میـرابیلیس کـه در آزمایشگاه کشت و در شـرایط مناسـب جهـت انجـام کارهـای بعدی حفظ و ذخیره سازی شدند.

روش بررسـی قـدرت مهارکنندگـی مقاومـت بـه نیتروفورانتویین

قـدرت مهارکنندگـی مقاومـت در سویه‌های مقاوم مـتفاوت جـدا شـده از بالـین عیـناً مانـند روش غـربال‌سـازی در مقابـل آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین انجـام پذیـرفت با این تفاوت که غلظت آنتی‌بیوتیک به کـار بـرده شـده در محـیط کـشت ۳۰ میکروگـرم در میلـی‌لیتـر بـود. از کـشت شبانه سویه‌های مقاوم جدا شـده سوسپانـسیون حـاوی $۱۰^{۷}$ الـی $۱۰^{۸}$ باکتـری معـادل کـدورت سوسپانـسیون اسـتاندارد ۰/۵ مـک فالین تهیه و نمونه‌های میکروبی با استفاده از سوآپ روی محیط جامد مولرهینتون حاوی نیتروفورانتویین کـشت داده شـد. سپس ۳۰ میکرولیتر از نمونه گیاهی غـربال شـده روی دیـسک‌هـای آنتـی‌بیوگرام استریل بارگـذاری گـردید. روی هـر پلـیت کشت داده شده با سـویه‌هـای انتروباکتریاسه مقاوم سه دیسک گذاشته شد و پلیت در ۳۳ درجه سانتی گراد به مدت یک شب گـرمخانه گـذاری گـردید. متوسط قطر هاله عدم رشد دور دیـسک‌های سه گانه بر علیه هر یک از سویه‌های مقـاوم پـس از انـدازه‌گیـری محاسـبه و گـزارش می‌گردید.

تهیه گیاه

گیاه مورد نظر در این مطالعه در مرداد ماه ۱۳۷۸ از نواحـی کوهستانی اطراف اردبیل جمع‌آوری شد و سپس توسط دکتر فریده عطار، استادیار گیاهشناسی گروه بیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی گـردید. مطالعـات گیاه‌شناسی روی جنس و گونه این گـیاه مـؤید جنس نعنا بود و نشان داد نام علمی دقیق ایـن گیاه *Mentha longifolia* (L.) Hudson می‌باشد. نمـونه هرباریومـی ایـن گـیاه بـه شـماره TUH – ۲۷۹۳۱ در هـرباریوم مرکزی دانشکده علوم دانشگاه تهران نگهداری می‌گردد.

تهیه اسانس گیاه

گـیاه جمـع‌آوری شـده در سـایه و در دمـای آزمایشگاه خشک و سپس پودر گردید. اسانس گیری بـا دسـتگاه کلونجـر بـه مـدت ۳ سـاعت انجـام شد و اسـانس بـه دسـت آمـده جهـت انجـام آزمـایش‌هـای تکمیلی به میزان ۱۰ برابر با اتانول رقیق گردید.

نتایج

الف- غربال سازی و شناسایی گیاه

در غـربال سـازی مـنابع گیاهان بـه مـنظور یافتن نمـونه‌هایی که می‌توانستند مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسـه را بـه آنتـی‌بیوتـیک نیتروفورانتویین مهـار نماینـد نمـونه تـرکیبات فـرار نمـونه رقیق شده گیاهـی از جـنس نعـنا واجـد ایـن اثـر شناسـایی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

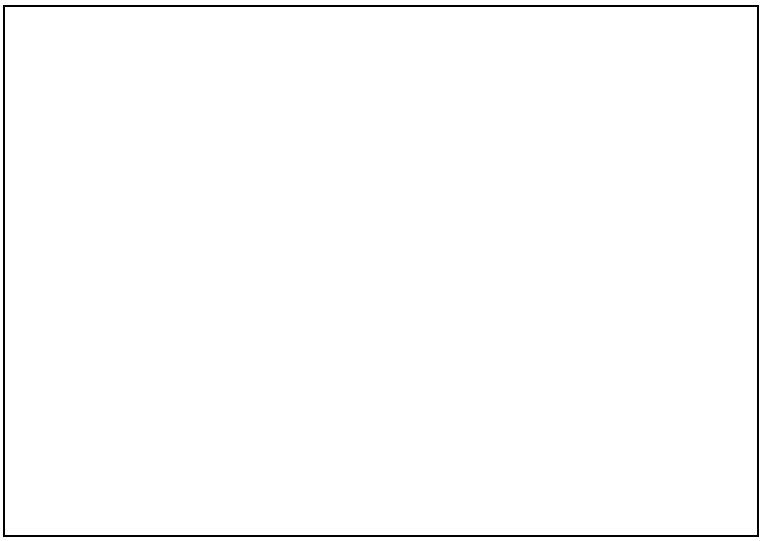
ترکیبات فرار این گیاه قادر بود در حضور آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین از رشد باکتری مقاوم مورد آزمایش *E. colacea* جلوگیری نماید. تصویر شماره ۱، عکس پلیت حاوی دیسک‌های آغشته شده با ترکیبات فرار گیاه از گونه نعنا را در حضور و در غیاب نیتروفورانتویین نمایش می‌دهد. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌گردد ترکیبات فرار رقیق شده این گیاه در این مطالعه بعد از رقیق شدن در آزمون ضد میکروبی علیه سویه مقاوم به نیتروفورانتویین هاله عدم رشدی نشان نمی‌دهد در حالی که در پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین هاله عدم رشد وجود دارد.

ب- بررسی قدرت ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* در مهار مقاومت باکتری‌های مختلف انتروباکتریاسه

جدول شماره ۱ اندازه هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* را در حضور نیتروفورانتویین و در غیاب آن نشان می‌دهد. همانطور که در جدول شماره ۱ آمده است ترکیبات فرار این گیاه قادر است در حضور آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین از رشد باکتری‌های متعددی از گروه انتروباکتریاسه جلوگیری کند. باید یادآوری نمود دامنه حساسیت نسبت به نیتروفورانتویین برای باکتری‌های حساس طبق منابع استاندارد کمتر از ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعریف می‌گردد. در حالی که برای باکتری‌های نیمه مقاوم این میزان ۳۰ الی ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری‌های مقاوم از ۱۲۰میکروگرم در میلی‌لیتر تجاوز می‌نماید [۱۰].

لذا با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک در هر آزمایش در حضور ترکیبات فرار گیاه می‌توان انتظار داشت محدوده عدم رشد باکتری گسترش یابد. تصویر شماره ۲ پلیتی حاوی کشت *Proteus vulgaris* را نشان می‌دهد که به شیوه غلظت تدریجی از صفر الی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (gradient plate) تهیه شده است.

همانطور که در تصویر شماره ۲ ملاحظه می‌گردد با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک محدوده عدم رشد باکتری در مجاور ترکیبات فرار گسترش می‌یابد.



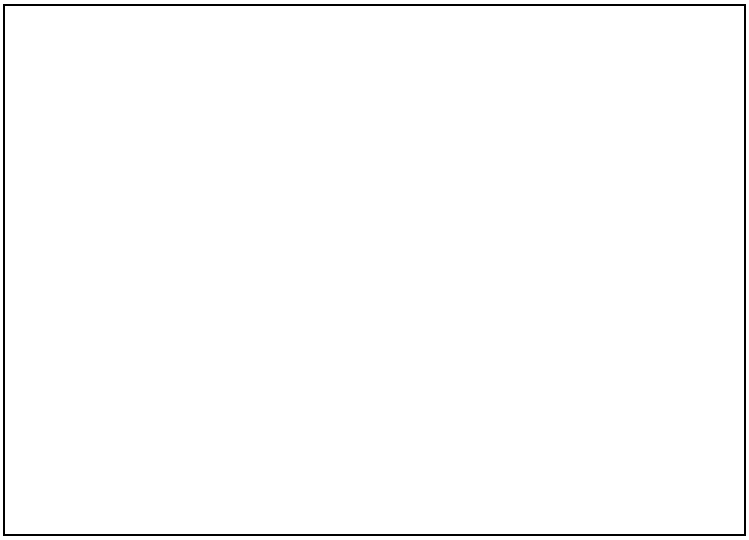
تصویر شماره ۱- دو پلیت کشت میکروبی که یکی واجد و یکی فاقد نیتروفورانتویین می‌باشد هاله عدم رشد در پلیت سمت راست اثر مهارکنندگی ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* را در حضور نیتروفورانتویین بر علیه سویه انتروباکتر کولاسه مقاوم نشان می‌دهد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- اثر مهارکنندگی ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* روی سویه‌های مختلف خانواده انتروباکتریاسه

سویه مقاوم	MIC for Nitrofurantoin µg/mL	متوسط قطرهاله عدم رشد(میلی‌متر)	
		درحضور نیتروفورانتوین	در غیاب نیتروفورانتوین
سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundii*)	۷۵	۱۶	۰
انتروباکتر آیروژنوز (*Enterobacter aerogenes*)	۲۲۵	۱۸	۰
انتروباکتر کلاسه (*Enterobacter cloacae*)	۲۷۵	۱۷	۰
اشرشیا کلی (*Escherichia coli*)	۱۵۰	۱۹	۰
کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)	۲۷۵	۱۸	۰
پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*)	۱۲۵	۱۵	۰
پروتئوس ولگاریس (*Proteus vulgaris*)	۱۲۵	۱۴	۰
سراشیا مرسسنس (*Serratia marcescens*)	۳۰۰	۱۳	۰



تصویر شماره ۲- پلیت گرادیان نیتروفورانتوین از غلظت ۰ تا ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

بحث

نیتروفورانتوین به عنوان یک داروی سنتز شده در گروه نیتروفوران‌ها در جلوگیری و درمان عفونت ادراری به کار گرفته می‌شود. مکانیسم اثر دقیق این دارو هنوز ناشناخته است و بعضی از گزارش‌های اثر احتمالی آن را در تداخل با آنزیم‌های حیاتی باکتری‌ها معرفی می‌نمایند [۱۱]. بیشتر باکتری‌های گروه اشریشیا به این آنتی‌بیوتیک حساس هستند در حالی که اکثر گونه‌های انتروباکتر و کلبسیلا کمتر حساس بوده و مقاومند. همچنین بیشتر سویه‌های پرتئوس نیز به این آنتی‌بیوتیک مقاومت متوسط نشان می‌دهند. نیتروفورانتوین امروزه به عنوان یک داروی خط دوم شناخته می‌شود که بیشتر به عنوان پیشگیری کننده به خصوص در عفونت‌های مزمن و برگشت‌پذیر ادراری کودکان و بزرگسالان تجویز می‌گردد. به هر حال نادر بودن گسترش مقاومت

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به این آنتی‌بیوتیک در طی ۳۰ سال گذشته مزیت فوق‌العاده برای این آنتی‌بیوتیک محسوب می‌گردد [۱۲]. در طی مطالعاتی که بروی غربال سازی گیاهان متعدد جهت کشف اثر مهارکنندگی مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه به نیتروفورانتویین انجام پذیرفت ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* اثر مهارکنندگی مقاومت انتروباکتریاها را به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین نشان داد که در این مقاله برای اولین بار گزارش می‌گردد. تحقیق حاضر می‌تواند راهگشای کشف اولین ساختمان شیمیایی به منظور مهار مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نسبت به نیتروفورانتویین باشد که امروزه به دلیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها رایج از جدی‌ترین عوامل بیماری‌زا در عفونت‌های ادراری محسوب می‌گردند.

منابع

1. Davies J and Webb V. In: the Emergining Infections; Kraause RM, Ed.; Academic press, San Diego. 1998; Chapter 8, pp: 239-73.

2. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chemistry Biology*. 2000; 7: R127–R132.

3. Renau TE, Hecker SJ and Lee VJ. Antimicrobial potentiation approaches: Targets and inhibitors. *Ann. Rep. Med. Chem.* 1998; 33:121-30.

4. Allen NE, Alborn Jr. WE, Hobbs Jr. JN and Kirst HA. 7–Hydroxytropolone: An inhibitor of aminoglycoside-2″-O-adenyltransferase. *Anti-microb. Agents Chemother.* 1982; 22: 824-31.

5. Clancy J, Schmieder BJ, Petitpas JW, Manousos M, Williams JA, Faiella JA, Girard AE and Mcguirk PR. Assays to detect and characterize synthetic agents that inhibit the ErmC methyltransferase. *J. Antibiot.* 1995; 48: 1273-9.

6. Hirata T, Wakatabe R, Nielsen J, Satoh T, Nihira S and Yamaguchi A. Screening of an inhibitor of the tetracycline efflux pump in a tetracycline-resistant clinical-isolate of Staphylococcus aureus 743. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; 21: 678-81.

7. Ahmed M, Borsch CM, Neyfakh AA and Schuldiner S. Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 11086-9.

8. Shahverdi AR and Tavassoli F. First description on the nitrofurantoin potentiation activity. *Daru*, 2002; 10:2, 90

9. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM press. Washington D.C. 1992.

10. Approved Standard NCCLS Document M2-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Fourth Edition. 1990; 10: No. 7, NCCLS, Villanova, PA.

11. McOsker CC, Pollack JR and Andersen JA. Inhibition of bacterial protein synthesis by nitrofurantoin macrocrystals: an explanation for the continued efficacy of nitrofurantoin. Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series, 1989; 154:33-43.

12. McOsker CC and Fitzpatric PM. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994; 33: 23-30.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir