



بررسی افزایش هم افزایی درمان‌های ضد میکروبی داروی آمپی‌سیلین متصل به نانولوله کربنی

چند دیواره بر باکتری اش‌ریشیا کلی

نسرین پاکدامن ساوجی^۱ دکتر انوش اقدامی^۲

۱- دانشجو میکروبیولوژی گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ایران

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ایران

Nasrin.pakdaman@yahoo.com

چکیده

بیماری‌های عفونی همچنان یکی از بزرگترین چالش‌های بهداشتی در سراسر جهان است و در پی آن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها با دوز بالا و هزینه سنگین و زمان زیاد برای شناسایی و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید و موثر مشکلاتی را ایجاد می‌کند. این مطالعه کاهش مقاومت *E.coli* را به نانولوله کربنی چند دیواره متصل به آمپی‌سیلین را بررسی می‌کند. در این مطالعه ابتدا پس از اتصال نانولوله کربنی چند دیواره MWNT به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین که به روش (Jiang(2013) انجام شد و اطمینان از اتصال با استفاده از طیف XRD و FT-IR، تست آنتی‌بیوگرام بر روی *E.coli* مقاوم به آمپی‌سیلین به روش میکروبراث دایلوژن در دو گروه آمپی‌سیلین و آمپی‌سیلین متصل به MWNT انجام شد. پیک‌های طیف سنجی FT-IR و XRD نشان دهنده این است که اتصالات جدید صورت گرفته و بیانگر اتصال آمپی‌سیلین به MWNT می‌باشد. و در نتایج آنتی‌بیوگرام باکتری *E.coli* مقاوم به آمپی‌سیلین در این بررسی در حضور آمپی‌سیلین و MIC (MIC >256µg/ml) و میزان (MBC:512µg/ml) می‌باشد و در حضور آمپی‌سیلین متصل به نانولوله کربنی (MIC <64µg/ml) و میزان (MBC:128µg/ml) می‌باشد. مطالعات انجام شده بیانگر این است که روش اتصال نانولوله به آنتی‌بیوتیک روش موثری بوده و اتصال به درستی صورت گرفته است. و در روش آنتی‌بیوگرام میزان MIC و MBC نانودارونسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین افزایش یافته است و تحویل دارو از طریق نانولوله به حل مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کند. هرچند برای مورد استفاده قرار گرفتن نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: نانولوله کربنی، آمپی‌سیلین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *E.coli*

مقدمه:

بیماری‌های عفونی همچنان یکی از بزرگترین چالش‌های بهداشتی در سراسر جهان است. است و در پی آن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها با دوز بالا و هزینه سنگین و زمان زیاد برای شناسایی و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید و موثر مشکلاتی را ایجاد می‌کند. اخیراً عوامل غیر معمولی برای از بین بردن مقاومت‌های دارویی



برخی آنتی بیوتیک‌ها استفاده میشوند، این عوامل کلاس‌های مختلفی از نانوذرات ضد میکروبی و حامل‌هایی در ابعاد نانو برای تحویل آنتی‌بیوتیک هستند. که اثر خود را در نمونه‌های آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی ثابت کرده‌اند.^۱

اشریشیا کلی یکی از شایعترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های انسانی جدا شده است مقاومت دارویی این باکتری اهمیت زیادی به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارد. این باکتری از مهمترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری است و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل سپسیس، عفونت‌های زخم، گاستروانتریت و مننژیت نوزادی به شمار می‌رود. اشریشیا کلی یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی می‌باشد و به علت کسب پلاسمیدهایی که کدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف هستند. به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده‌اند. به همین دلیل، درمان عفونت‌های ناشی از اشریشیا کلی با مشکل مواجه شده است.^۲

نانومواد، از جمله نانو لوله‌های کربنی به طور گسترده به علت خواص منحصر به فرد و گروه‌های عاملی و مولکول‌های هدف، یک زمینه نو ظهور در انتقال دارو و تکنیک‌های جدید داروسازی است.^۳ گروه وسیعی از مولکول‌ها می‌توانند به نانولوله‌ها متصل شوند و به راحتی به سمت سلول‌ها حرکت کنند.^۴

نانولوله‌ها خواص متعددی دارند که از آنها به عنوان داروهای کونژوگه با نانو تیوب استفاده می‌شود. به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی نانو لوله‌های کربنی، به عنوان مواد زیست پزشکی بالقوه برای انتقال ماکرو مولکول‌های زیستی و شیمیایی به داخل سلول و سیستم‌های زنده جهت درمان و تشخیص در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه آنتی بیوتیک آمپی سیلین و آمپی سیلین متصل به نانولوله کربنی چند دیواره (نانو دارو) در غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوتی بر باکتری *E. coli* مقاوم به آمپی سیلین دارا بودند بررسی قرار گرفت.

روش کار:

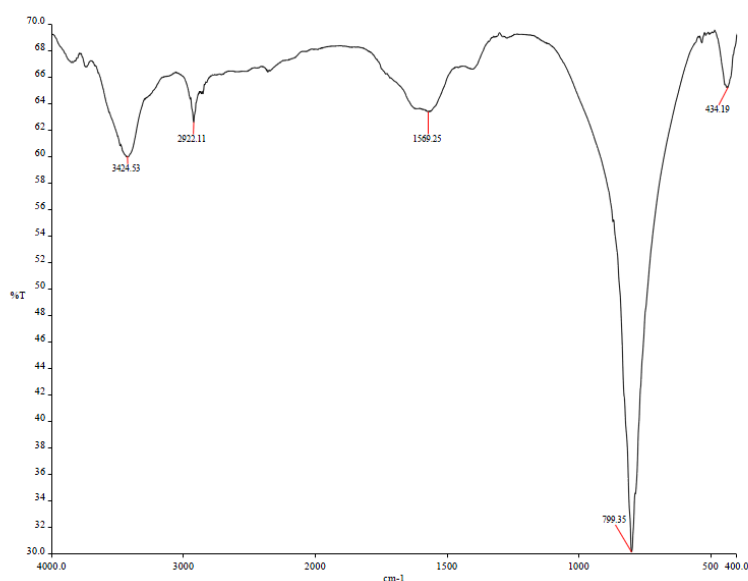
در این مطالعه روش تحقیق علمی و روش مطالعه از نوع توصیفی بوده و به جهت اثر متغیر مستقل بر وابسته بود که در آن متغیر وابسته میزان مرگ سلول و متغیر مستقل داروی متصل شده به نانولوله کربنی چند دیواره بود. در این مطالعه برای اتصال آنتی بیوتیک به نانو لوله کربنی چند دیواره از روش ارائه شده توسط Jiang (۲۰۰۳) استفاده می‌شود. با استفاده از عاملدار کردن نانولوله کربنی تک دیواره و فعالسازی گرو کربوکسیل با استفاده از اسید نیتریک و اسید سولفوریک و سپس طی فرایند دو مرحله‌ای استفاده از EDAC برای ایجاد گروه‌های فعال و NHS برای ایجاد یک پیوند انیدریدی پایدار با آنتی بیوتیک آمپی سیلین انجام شد و برای اطمینان از اتصالات صورت گرفته از دستگاه طیف سنج FTIR و XRD استفاده شد. روش سنجش تعیین حداقل غلظت مهارکننده به طریق میکروبروت با استفاده از محیط کشت مولر هیتتون و پودر آمپی سیلین و نانولوله کربنی چند دیواره متصل به آمپی سیلین و سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند طبق (NCCLS (Committee for Clinical Laboratory Standards انجام گرفت. واز کشتهای ۲۴-۱۸ ساعته باکتری *E. coli* مقاوم به آمپی سیلین جهت کنترل اثر نانو لوله کربنی چند دیواره متصل به آمپی سیلین (به عنوان داروی ضد میکروبی) استفاده شد. در این روش رفتهای متوالی از آنتی بیوتیک مورد نظر، که در اینجا آمپی سیلین و نانو دارو می‌باشد، با غلظت



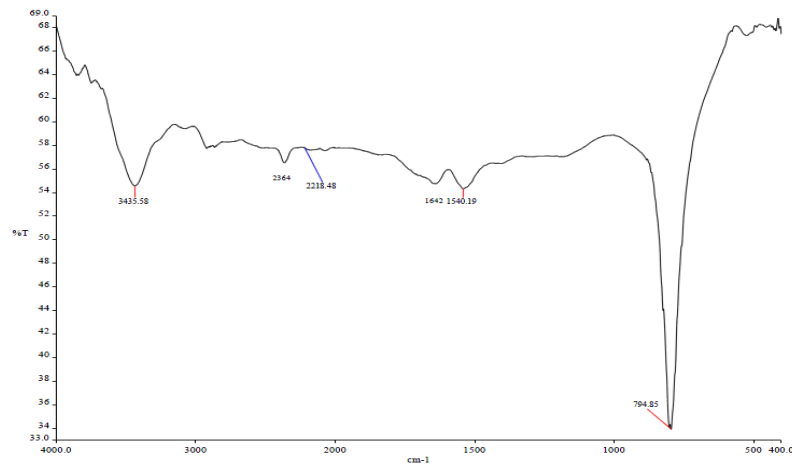
ثابتی از سوسپانسیون باکتری که کدورتی معادل نیم مک فارلند دارد، در میکروپلیت مجاور می شود. بعد از 24 ساعت انکوباسیون کدورت چاهکها بررسی می شود. و کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک و نانو دارو که مانع رشد باکتری گردد به عنوان MIC و کمترین غلظتی از آنها که باعث از بین رفتن باکتری گردد به عنوان MBC در نظر گرفته می شود. در مورد هر یک از رقتها تست میکرو دایلوژن به صورت ۳ با تکرار صورت گرفت.

یافته‌ها:

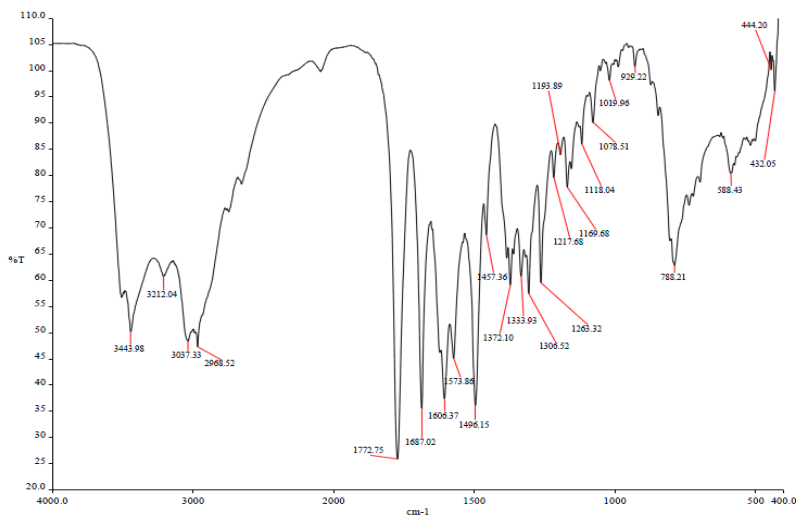
در طیف‌های گرفته شده به وسیله طیف سنج FT-IR طیف ۱ طیفی طیفی از نانو لوله کربنی چند دیواره است، پیک‌های مشاهده شده در نواحی ۲۹۰۰، ۱۵۵۰ و ۳۴۵۰ به ترتیب مربوط به مدهای کششی C-H و O-H و N-H است. در طیف ۲ پیک ۱۶۴۲ مشاهده میشود که نشان می‌دهد گروه کربوکسیل به طور موفقیت آمیزی به سطح نانو تیوپ‌های کربنی متصل شده است. در طیف ۳ که طیفی از آنتی بیوتیک آمپی سیلین است. باندهای ۱۷۷۲ (کربوکسیلیک اسید)، ۳۲۰۰-۳۵۰۰ (NH)، ۱۵۴۰-۱۵۸۰ (OH)، ۱۲۰۰-۱۴۰۰ (CN)، ۱۰۰۰-۱۱۰۰ (CO)، ۱۴۲۰-۱۵۳۰ (C=C) در حلقه آروماتیک) مشاهده می‌شود. طیف ۴ مربوط به اتصال نانو لوله کربنی چند دیواره به آنتی بیوتیک آمپی سیلین است. پیک‌هایی در نواحی ۱۴۰۰ (CN)، ۳۴۰۰ (NH) و ۱۶۰۰ و ۱۱۰۰ (CO) وجود دارد که نشان دهنده اتصال آمپی سیلین به نانو لوله کربنی است.



طیف ۱ نانو لوله کربنی چند دیواره (MWNT)

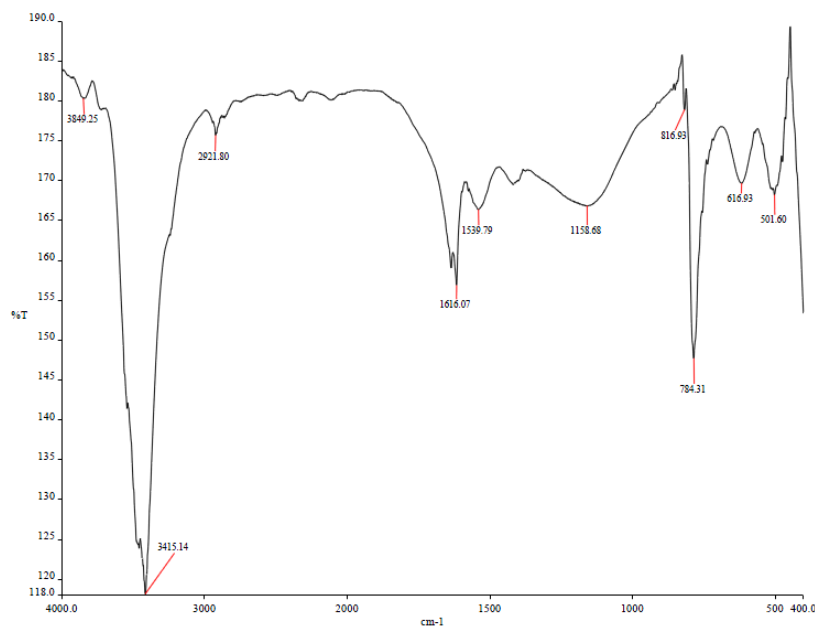


طیف ۲ نانو لوله چند کربنی عامل دار



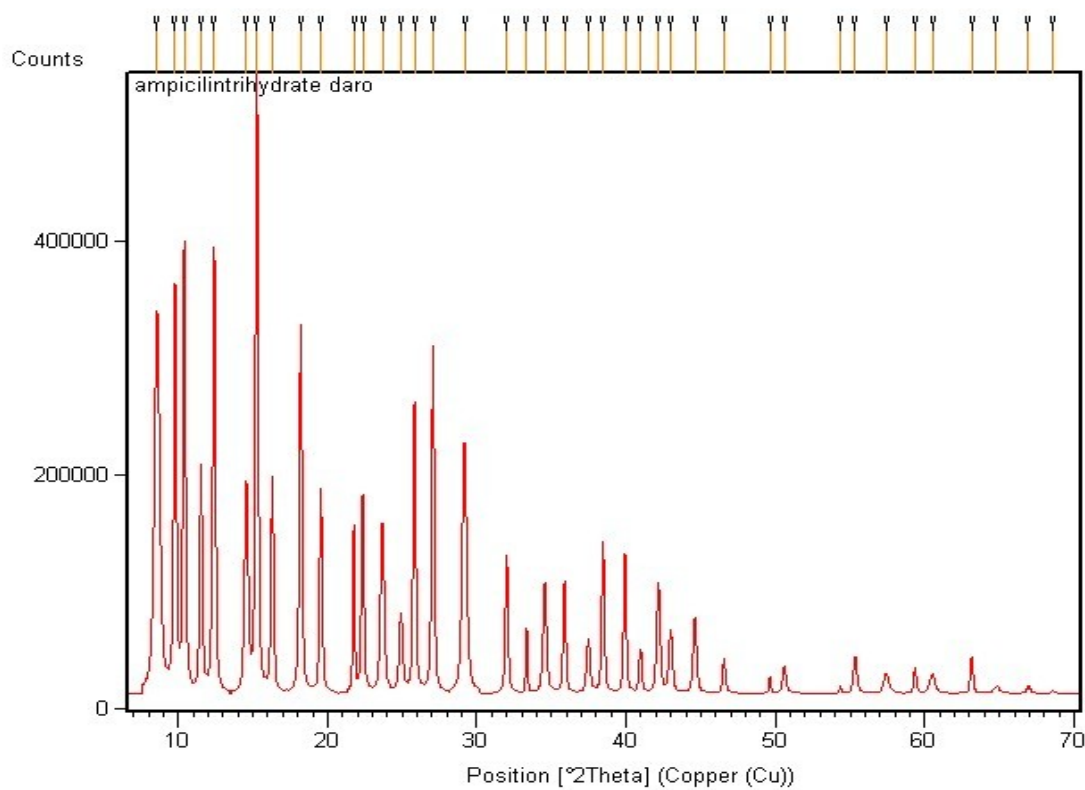
طیف ۳ آمپی سیلین

شده

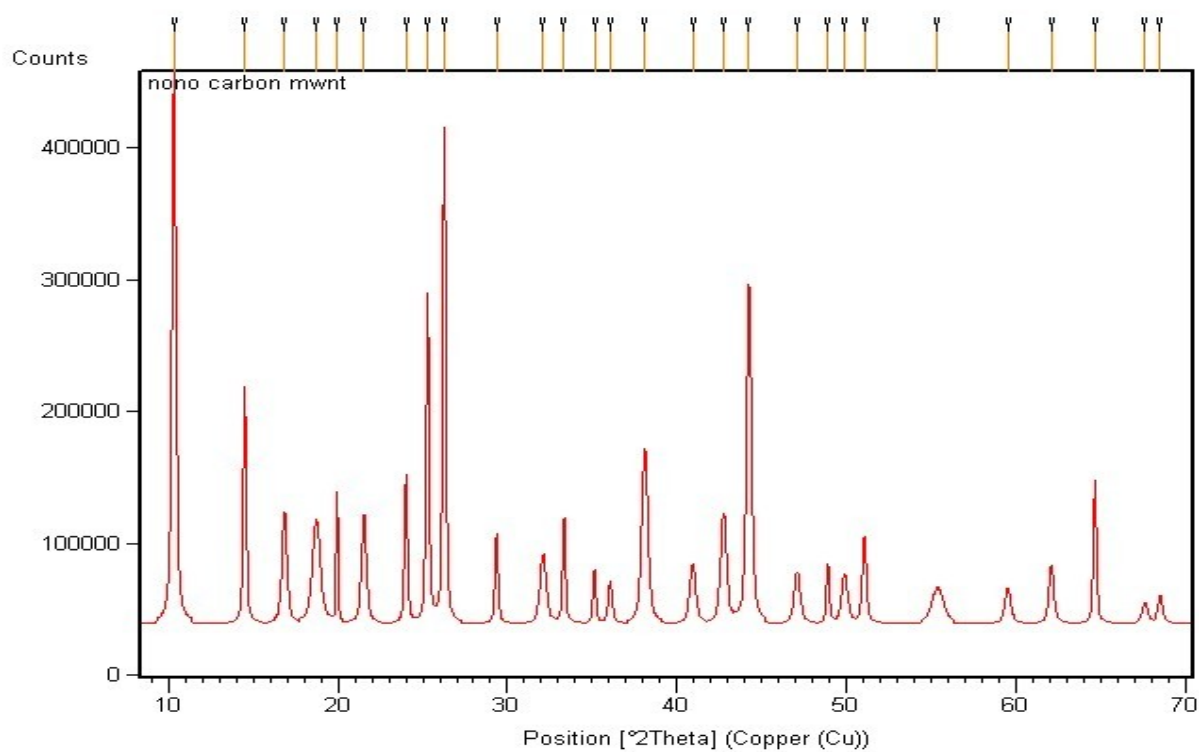


طیف ۴ اتصال نانولوله کربنی چند دیواره به آمپی سیلین

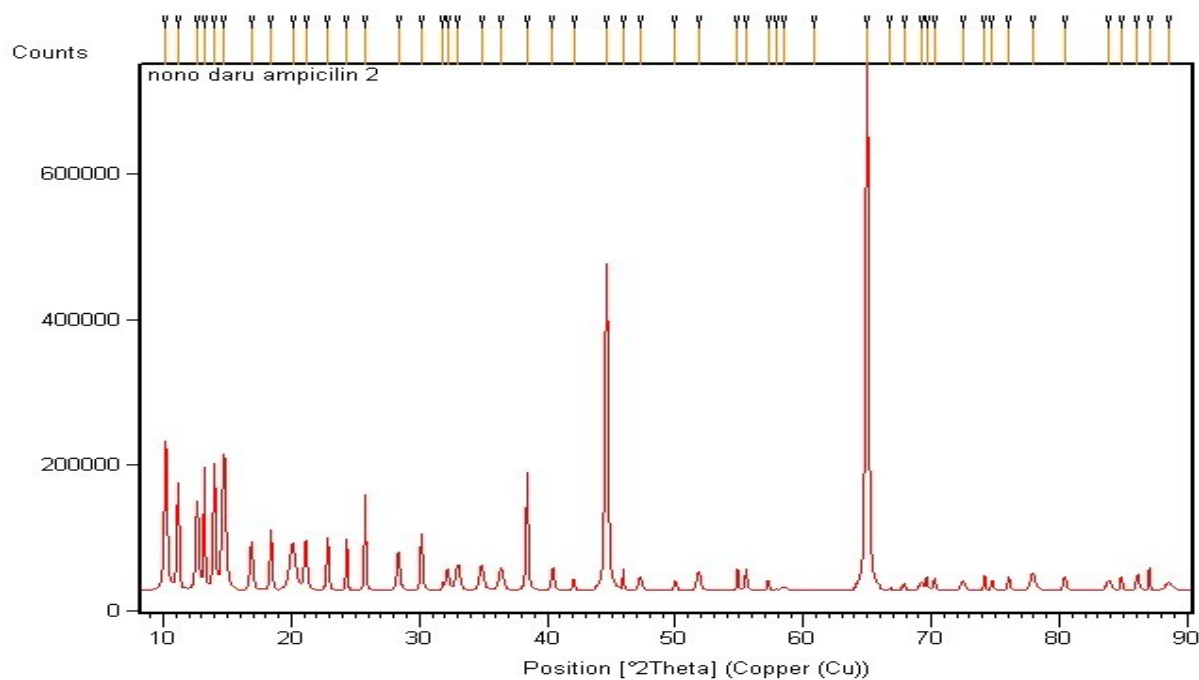
یکی از ویژگی‌های مهم طیف XRD توانایی شناسایی ماده است، اطلاعات مرتبط به هر ماده در دستگاه وجود دارد و با توجه به طیف بدست آمده می‌توان نام ماده را اعلام کرد. در طیف ۵ پیک‌های آنتی بیوتیک آمپی سیلین مشاهده می‌شود. طیف ۶ پیک‌های نانولوله کربنی چند دیواره را نشان می‌دهد. پیک‌های متفاوت در طیف ۷ نشان دهنده اتصال نانولوله کربنی چند دیواره و آمپی سیلین می‌باشد.



طیف XRD آمپی سیلین



طیف ۶ XRD نانو لوله کربنی چند دیواره



طیف ۷ XRD آمپی سیلین متصل به نانو لوله کربنی چند دیواره



در بررسی نتایج MIC و MBC تاثیر نانو دارو تولید شده و آنتی بیوتیک آمپی سیلین در غلظت‌های متفاوت بر *E.coli* مقاوم به آمپی سیلین نشان داده شده است که در واقع برای تعیین MIC (کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که ممانعت از رشد باکتری می‌کند)، MBC (کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که باعث از بین بردن (کشتن) باکتری شود)، در این بررسی در حضور آمپی سیلین و $(MIC > 256 \mu\text{g/ml})$ و میزان $(MBC: 512 \mu\text{g/ml})$ می‌باشد و در حضور آمپی سیلین متصل به نانو لوله کربنی $(MIC < 64 \mu\text{g/ml})$ و میزان $(MBC: 128 \mu\text{g/ml})$ می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری:

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک آمپی سیلین با موفقیت به نانو لوله کربنی چند دیواره اتصال پیدا کرده و میزان MIC و MBC کلبسیلا پنومونیه در حضور نانو آمپی سیلین نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین کاهش پیدا کرده و نشان از موثر بودن این روش دارد.

Qi. X و همکاران (۲۰۱۲) اعلام کردند نانو لوله چند دیواره دارای خاصیت ضد میکروبی ضعیف است. و همچنین با آزمایش روی هر دو باکتری گرم منفی (اشریشیا کلی و سودوموناس آئروزنازا) و گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) دریافتند که خاصیت ضد باکتری نانو لوله‌های کربنی متصل به سفالوکسین دو برابر خاصیت آن‌ها در زمان دست نخورده بودن است. علاوه بر این ترکیب نانو لوله و سفالوکسین چسبندگی سلولی به صورت بیوفیلم را به طور موثر مهار می‌کنند. باتوجه به این که کامپوزیت سفالوکسین-MWNT روش سنتز ساده و ارزانی دارد، استفاده به عنوان یک عامل ضد باکتریایی و ضد چسبندگی در برنامه‌های زیست محیطی و زیست پزشکی مقرون به صرفه و موثر است.^۵

Vossoughi و همکاران (۲۰۰۸) نانو لوله‌های کربنی در بین مولفه‌های امید بخش برای کاربردهای متعدد می‌باشد چون دارای ویژگی‌های منحصر بفرد هستند، جایگزین‌های جدید و کارآمدی برای جابجایی مولکول‌های درمانی می‌باشند چون می‌توانند به راحتی از طریق غشای سلول می‌توانند وارد هسته و سیتوپلاسم گردند، بدون اینکه واکنش ایمونوزنی و تاثیرات سمی ایجاد کنند. در حالیکه کربن‌های آغازین در تمام وقایع غیر محلول هستند عامل دار کردن آلی نانو لوله‌های کربنی برای قابل حل شدن آنها و تاثیر گذاری سیستم‌های زیستی پیش شرط محسوب می‌شود. برای تغییر نانو لوله‌های کربنی که سازگارپذیری و حلالیت آنها را افزایش می‌دهند رویکردهای متفاوتی در کار کردن در CNT ها اعمال خواهد شد. بنابر این عامل دار کردن نانو لوله‌های کربنی مرحله کلیدی برای کاربرد بیشتر آنها می‌باشد. واکنش-های اکسیداسیونی برای تغییر شیمیایی CNTها کاربرد زیادی دارند.^۶

chen و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد میکروبی طیف گسترده‌ی لوله‌های نانوکربنی در باکتری‌های دستگاه گوارش انسان را مورد بررسی قرار دادند نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که CNT ها می‌توانند عامل‌های ضد باکتریایی مؤثر و طیف وسیع در دستگاه گوارش بوده و مصرف و به‌کارگیری گزینشی CNT می‌تواند منجر به کاهش خطرات بالقوه برای باکتری‌های پروبیوتیک گردد.^۷

Ce dric klumpp و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعات خود بیان کردند با توجه به این که نانولوله‌های کربنی دارای توانایی نفوذ به داخل سلول می‌باشند پس از کاربردی شدن نانو لوله‌ها از طریق اتصالات کوالانسی یا غیر کوالانسی با ترکیبات مورد نظر یا مولکول‌های فعال می‌توانند به عنوان انتقال دهنده دارو برای درمان مورد استفاده قرار گیرند.^۸



نتیجه گیری کلی:

۱- استفاده از اتصال نانو لوله کربنی چند دیواره به آنتی بیوتیک آمپی سیلین برای کاهش میزان مقاومت دارویی در باکتری E.coli نسبت به این آنتی بیوتیک موثر بوده است.

منابع:

1. Ae Jung H., Young Jik K. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011; 156: 2: 128-145
2. De Francesco MA, Giuseppe R, Laura P, Riccardo N, Nin M. Urinary tract infections in Brescia, Italy: Etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common Uropathogens. *Med Sci Moni*. 2007;13(6):136-144.
3. Edwin Kamalha, Xiangyang Shi, Josphat I, et all. Nanotechnology and carbon nanotubes; A review of potential in drug delivery. 2012; 20: 9: 891-898
4. Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L. & Klabunde, K. J. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, 2002; 18, 6679-6686.
5. Qi Xiaobao, Gunawan Poernomo , Xu Rong , et all. Cefalexin-immobilized multi-walled carbon nanotubes show strong antimicrobial and anti-adhesion properties. 2012; 84: 552-556
6. Vossoughi I. M. Gojgini. Sh. Kazemi.a. Alemzadeh. i. Majid. Z. Conjugation of Amphotericin B to Carbon Nanotubes via Amide-Functionalization for Drug Delivery Applications. *Engineering Letters*. 2009; 17:4,17-12.
7. Chen H1, Wang B, Gao D, Guan M, Zheng L, Ouyang H, Chai Z, Zhao Y, Feng W. Broad-spectrum antibacterial activity of carbon nanotubes to human gut bacteria. *Small*. 2013 Aug 26;9(16):2735-46.
8. Ce'dric Klumpp a,b, Kostas Kostarelos c, Maurizio Prato b, Alberto Bianco Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. 2005