بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

نیره اکبری[۱]، فاطمه اشرفی*[۲]، میترا صالحی[۲]

۱) گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۳ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۱**

چکیده

مقدمه: نانوذرات حامل آنتی بیوتیک می توانند اثرات سیتوتوکسیک بر باکتری های مقاوم به دارو داشته باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید بر زنده مانی سویه های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه نانوذرات کیتوزان با روش ژلی شدن ساخته و سپس آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید بر روی آن بارگذاری شد و نانوذراتی با ابعاد کمتر ۱۰۰ نانومتر به دست آمد. جهت بررسی تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات بر باکتری ها به روش مایکرودایلوشن غلظت های متوالی ۸-۰/۲۵ از نانوکیتوزان و غلظت های متوالی ۱۲۸-۱ از آموکسی سیلین تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نانو کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک به هر چاهک انتقال یافت. یک میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به آن اضافه گردید. کدورت سنجی در چاهک ها به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانو متر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

یافته های پژوهش: نتایج به دست آمده نشان می دهد که حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید در نمونه حساس ۰/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و در نمونه مقاوم ۳/۶ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ها به ترتیب ۱/۸ و ۷/۲ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده ترکیب حاصل، در مقایسه با کیتوزان و نیز آموکسی سیلین تنها، فعالیت ضد میکروبی بیشتری دارد که این نشان دهنده اثر هم افزایی آموکسی سیلین به همراه کلاولانیک اسید و کیتوزان است.

واژه های کلیدی: نانوذرات کیتوزان، آموکسی سیلین، کلاولانیک اسید، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

Email: mnfa.ashrafi@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

مقدمه

اخیراً میزان شیوع مقاومت ضد میکروبی نسبت به باکتری های مختلف به ویژه سویه های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس در سراسر جهان افزایش یافته و به صورت یک اپیدمی جهانی درآمده است(۱). بنا بر این به منظور کاهش اثرات سوء ناشی از تجویز مکرر آموکسی سیلین، طراحی و تهیه فرمولاسیون های مناسب با هدف افزایش پایداری و مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی این دارو ضروری است که یکی از گزینه های مطرح در این راستا، کمک گرفتن از فناوری نانو می باشد. آموکسی سیلین آنتی بیوتیکی نیمه سنتزی از خانواده پنی سیلین ها و از دسته بتالاکتام ها است. این دارو یکی از مهم ترین و پر مصرف ترین آنتی بیوتیک های خوراکی است که برای درمان طیف گسترده ای از عفونت های باکتریایی به خصوص عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود(۲،۳). هم چنین از این دارو برای پیشگیری از اندوکاردیت قبل از دستکاری های دندان پزشکی مثل جراحی یا کشیدن دندان در افراد مستعد مانند افراد مبتلا به نارسایی دریچه قلبی، جلوگیری از عفونت پنوموکوکی در افراد بدون طحال، پیشگیری و درمان سیاه زخم استفاده می شود(۴).

کلاولانیک اسید اولین مهارکننده بتالاکتامازی می باشد که استفاده بالینی پیدا کرده است و مصرف بالینی آن از سال ۱۹۸۱ آغاز شده است. این مهارکننده محصول طبیعی تخمیر Streptomyces Carligerus بوده و در محافظت از بتالاکتام ها در برابر بسیاری از بتالاکتامازهای مهم از جمله اغلب بتالاکتازهای گروه A و آنزیم های تجزیه کننده کولرکساسیلین در گروه D موثر است. این ترکیب توانایی عبور از دیواره سلولی باکتری ها را دارد و به همین دلیل بتالاکتامازهای درون سلولی و برون سلولی را مهار می کند. کلاولانیک اسید به صورت رقابتی و غیر قابل بازگشت بتالاکتامازها را مهار می کند. این ترکیب به تنهایی دارای فعالیت ضد باکتریایی کمی بوده و تنها در ترکیب با دیگر بتالاکتام ها مورد استفاده قرار می گیرد(۵،۶).

یکی از مهم ترین پلیمرهای محلول در آب جهت ساخت نانو حامل های دارویی، کیتوزان است. کیتوزان پلی ساکاریدی کاتیونی است که از فرآیند استیل زدایی کیتین در شرایط قلیایی به دست می آید(۷). کیتوزان به دلیل ویژگی های مختلفی مثل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، عدم سمیت، قابلیت اتصال به سلول های پستانداران و خواص ضد میکروبی دارای مزایا و کاربردهای زیادی در صنایع مختلف است(۸).

اثر ضد میکروبی کیتوزان در مقابل طیف وسیعی از ارگانیسم ها از جمله جلبک ها، باکتری ها، مخمرها و قارچ ها بررسی شده است و مطالعاتی نشان دهنده آن هستند که کیتوزان خاصیت ضد باکتریایی بر سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس دارد(۱۱-۹). تحقیقات نشان می دهند که آموکسی سیلین فعالیت ضد باکتریایی گسترده ای علیه باکتری های گرم مثبت مانند انتروکوکوس فکالیس، گونه های استرپتوکوکوس، استرپتوکوکوس نومونیا و باکتری های گرم منفی مانند اشریشیاکلی، هموفیلوس آنفولانزا، پروتئوس میرابیلیس، نایسریا گونوره آ دارا می باشد(۱۲،۱۳). پژوهش ها نشانگر آن هستند که آموکسیلین به همراه کلاولانیک اسید(آگمنتین) یکی از پر مصرف ترین عوامل ضد میکروبی مورد استفاده در بسیاری از کشورها می باشد(۱۷-۱۴). هم چنین مشاهده شده است که غلظت های بالای آگمنتین اثر درمانی بر بیماری های ایجاد شده توسط سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس دارد(۱۸). نتایج تحقیقات بیانگر آن است که نانوذرات کیتوزان حامل آنتی بیوتیک های β-لاکتامی اثر بسیار موثرتری در کاهش رشد باکتری به خصوص سویه های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس دارا می باشند(۱۹،۲۰). هم چنین نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین اثر ضد میکروبی بر یکی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از خاک دارد(۲۱). در مقابل برخی تحقیقات نشان می دهند که غلظت های پایین آموکسی سیلین موجب القای فنوتیپی بیوفیلم به واسطه eDNA در سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس می گردد و هم چنین بیانگر آن هستند که دزهای پایین آموکسی سیلین خاصیت ضد باکتریایی ندارد(۲۲).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

از آن جایی که نانوذرات کیتوزان در عرصه پزشکی، مهندسی زیستی، سیستم های آزادسازی در دارو درمانی و کاهش سمیت برخی از داروها از اهمیت والایی برخوردار است(۲۳)؛ بر این مبنا مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین و کـــلاولانیک اســـید علیه سویه های مقاوم به متی سیـــــلین استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه نانوذرات کیتوزان: برای ساخت نانوذرات کیتوزان، پلی ساکارید کیتوزان خریداری شده از شرکت سیگما با وزن مولکولی متوسط در یک محلول اسیدی ضعیف حل شده سپس محلول تری پلی فسفات سدیم با نسبت ۱:۳به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان اضافه شد. محلول کلوئیدی حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با شتاب ۱۳۰۰۰ rpm به کمک سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع روی ذرات ته نشین شده، توسط نمونه گیر برداشته شد و ذرات باقی مانده در آن نیز جدا شدند. همه پلت ها در یک ظرف جمع آوری شده و در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد طی مدت یک الی دو روز خشک شد(۲۴).

تهیه نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک: برای ساخت نانوکیتوزان حاوی آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید، ابتدا استوک یک میلی گرم بر میلی لیترکیتوزان با حل کردن ۳۰۰ میلی گرم کیتوزان در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک ۱/۷۵ درصد تهیه شد. محلول حاصله به مدت یک ساعت روی استیرر قرار گرفت تا خوب حل شود و در نهایت فیلتر شد تا هیچ گونه ناخالصی نداشته باشد و pH آن روی ۵ تنظیم شد. از طرف دیگر استوک یک میلی گرم بر میلی لیتر سدیم تری پلی فسفات با حل کردن ۱۰۰ میلی گرم سدیم تری پلی فسفات در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه تهیه شد و pH آن روی ۴ تنظیم شد. سپس ۲۲۵ میلی گرم پودر آموکسی سیلین خریداری شده از شرکت سیگما در محلول کیتوزان حل شد. پس از حل شدن کامل آموکسی سیلین، به محلول، مقدار ۲۲۵ میلی گرم پودر کلاولانیک اسید خریداری شده از شرکت سیگما افزوده و به طور کامل حل شد. سپس روی استیرر، ده میلی لیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات به ۳۰ میلی لیتر محلول کیتوزان به آرامی و به صورت قطره قطره اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و در دمای ۶۰ درجه در آون به مدت ۱ الی ۲ روز به صورت کامل خشک شد(۲۴).

تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک: ارزیابی مورفـــولوژی و اندازه نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین به کمک میکروسکوپ الکترونی رویشی انجام گرفت. برای انجام این آزمایش چند قطره از رقت های تهیه شده نانوذرات حاوی آموکسی سیلین بر روی ورقه ای آلومینیومی ریخته شد و اندازه و مورفولوژی نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی با قدرت بزرگ نمایی ۷۰۰۰۰ برابر مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی ساختار شیمیایی نانوذرات کیتوزان حاوی آموکسی سیلین: برای بررسی ساختار شیمیایی نانوذرات کیتوزان حامل آنـــتی بـــیوتیک آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید از روش طیف سنجی تبدیلی مادون قرمز(FTIR) استفاده شد و پیوندهای مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. انتقال بین سطوح ارتعاشی حالت پایه در ناحیه ۱۰۳ تا ۱۰۵ نانومتر مربوط به جذب در ناحیه فروسرخ است. سطوح ارتعاشی و نیز طیف فروسرخ از ارتعاش گروه های خاص، مانند(SH، OH، NH، CN، CO، ...) ایجاد شده که این مقادیر به ساختمان شیمیایی، آرایش فضایی و عوامل محیطی ملکول و یا ماکرو مولکول بستگی دارند. انرژی اشعه فروسرخ ۲ تا ۱۰ کیلوکالری بر مول است که این مقادیر انرژی سبب ارتعاش پیوندهای کووالان بین دو اتم یک مولکول می گردد. اما این مقدار انرژی موجب ارتعاش در پیوند های متقارت کووالانت مانند H_2CL_2 نمی شود، بلکه باید پیوندهای کووالان غیر متقارن باشند. از این رو، طیف فروسرخ در محدوده پرتوی الکترومغناطیس ۴۰۰–۱۴۰۰ CM^{-1} مورد استفاده قرار گرفت.

محاسبه درصد بارگذاری و ظرفیت بارگذاری دارو در نانوکیتوزان: برای مـــحاســـبه میـــزان داروی آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید بارگذاری شده در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

نانو ذره کیتوزان از دستگاه طیف سنجی جذبی مرئی-فرابنفش استفاده شد و با توجه به منحنی استاندارد جذب به دست آمده مربوط به آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید، غلظت داروی آزاد در محیط محاسبه گردید.

آماده سازی مایع تلقیح باکتری و استوک آنتی بیوتیک ها: برای ارزیابی میزان اثر ضد باکتری نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک از دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس(ATCC25932) و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (ATTCC33591) استفاده شد که هر دو سویه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. به منظور آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح، ابتدا باکتری ها را بر روی محیط برین هارت(BH) کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس لوله های محتوی باکتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با نمونه نیم مک فارلند مقایسه و نمونه مناسب تلقیح تهیه شد. پودر آنتی بیوتیک آموکسی سیلین از شرکت سیگما تهیه گردید. سپس برای تهیه استوک اصلی، هزار میکروگرم از هر آنتی بیوتیک در یک میلی لیتر آب ۲ بار تقطیر حل شد. استوک حاصله به مقادیر کم در شیشه های استریل توزیع و در سرمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید: سنجش اثر ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان به تنهایی، نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید در ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین با روش چاهک گذاری انجام شد. روش چاهک گذاری بدین صورت بود که ابتدا غلظت های مختلف نانوذرات کیتوزان و آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و نانوذرات حاوی آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید تهیه شد. سوسپانسیون باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم نیز به طور جداگانه در محیط کشت برین هارت براث تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ساعت گرم خانه گذاری شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک ها اندازه گیری و با یکدیگر مقایسه شد.

تعیین MIC نمونه ها به روش میکرو دایلوشن: روش روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد با استفاده از پلیت های ۹۶ خانه می باشد. تعیین حداقل غلظت مهاری در این روش بر پایه مشاهده چشمی کدورت و یا تشخیص کدورت با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر می باشد. در مطالعه حاضر نیز از پلیت ۹۶ خانه ته گرد و با حجم ۲۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت های متوالی ۸-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر کیتوزان و غلظت های متوالی آنتی بیوتیک آموکسی سیلین ۱۲۸-۱ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نانو کیتوزان، آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و نانو کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک به هر چاهک انتقال داده شد. سپس یک میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده و به آن اضافه گردید محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط پلیت ریدر مجهز به شیکر مخلوط شد. یکی از چاهک های پلیت که فقط حاوی محیط کشت و باکتری بود به عنوان کنترل مثبت و یکی دیگر از چاهک ها که فقط حاوی محیط کشت بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. در نهایت میکرو پلیت برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید. بعد از اتمام گرم خانه گذاری، کدورت یا عدم کدورت در چاهک ها به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

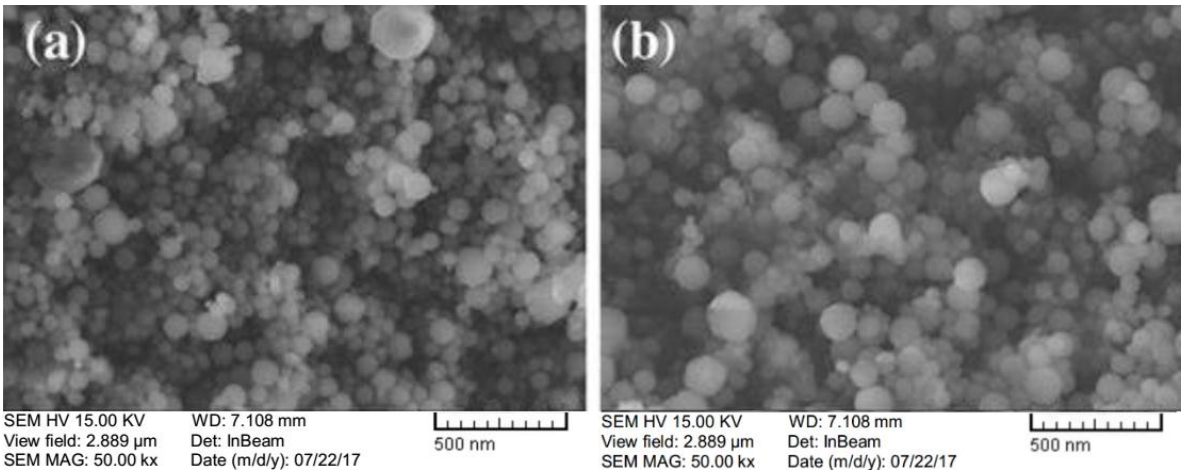
یافته های پژوهش

اندازه و شکل نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی بیوتیک: نتایج نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان حامل آنتی بیوتیک های کمتر از ۱۰۰ نانومتر و با ظاهری کروی بودند. محاسبه درصد بارگذاری و ظرفیت بارگذاری دارو در نانو ذره کیتوزان برای محاسبه میزان داروهای بارگذاری شده در نانو ذره از طیف سنجی فرابنفش-مرئی استفاده شد. بدین صورت که یک بار برای آموکسی سیلین و بار دیگر برای کلاولانیک اسید بررسی شد. درصد بارگذاری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

آموکسی سیلین در نانو ذره کیتوزان ۵۵ درصد و درصد بارگذاری کلاولانیک اسید ۶۵ درصد به دست آمد هم چنین شکل شماره ۱ نشان دهنده نانوذرات کیتوزان حاوی آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید می باشد که توسط میکروسکوپ الکترونی تصویر برداری صورت گرفته است(شکل شماره ۱).



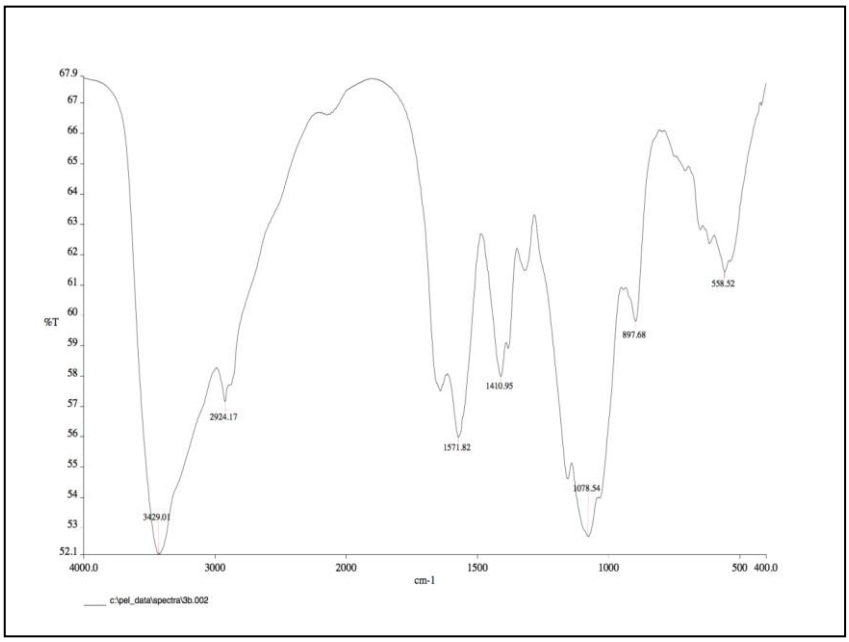
شکل شماره ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید. اندازه نانوذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر و شکل آن ها کروی می باشد.

تایید تشکیل نانوذرات کیتوزان با روش طیف سنجی تبدیلی مادون قرمز: نمودار طیف سنجی تبدیلی مادون قرمز نانوذرات کیتوزان در شکل شماره ۲ و نمودار طیف سنجی تبدیلی مادون قرمز نانوکیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. مطالعه طیف سنجی مادون قرمز کیتوزان و نانوذرات کیتوزان ساختار شیمیایی آن ها را نشان می دهد. در نانو ذره کیتوران باند ۳۴۴۲ cm-1 ارتعاش گروه های OH را نشان می دهد. در نانو ذره کیتوزان انتقال ۳۴۴۲ cm-1 به ناحیه ۳۴۴۲ cm-1 مشاهده می شود و باند دارای عرض کمتر می شود که نشانگر کاهش باندهای هیدروژنی می باشد. کاهش باندهای هیدروژنی در نانوذره کیتوزان کراس لینک شده به دلیل ساختارهای باز بیشتر در نتیجه کراس لینک کیتوزان با سدیم تری یلی فسفات می باشد. باند ۲۸۶۷ cm-۱ در کیتوزان مربوط به کجی محوری گروه C-H می باشد که در طیف سنجی نانوذره این گروه در باند ۲۹۰۸ قرار دارد مشخصه دیگر که می توان گفت کیتوزان به نانوذره تبدیل شده است، انتقال باند ۱۶۵۷ cm-1 و ۱۵۷۶ cm-1 به ۱۶۴۳ cm-1 و ۵۳۶۱ cm-1 در طیف نانو ذره می باشد که نشان دهنده گروه های COOH- می باشد. جا به جایی این دو باند و افزایش شدت باند NH نیز به وسیله سایر محققین گزارش شده است که بر همکنش یونی بین گروه های آمینی کیتوزان با بار مثبت و بار منفی گروه های سدیم تری پلی فسفات را پیشنهاد می دهد. طیف هر دو نمونه کجی محوری گروه C-O مربوط به الکل اولیه در ناحیه ۱۰۸۲ cm-1 را نشان می دهد.

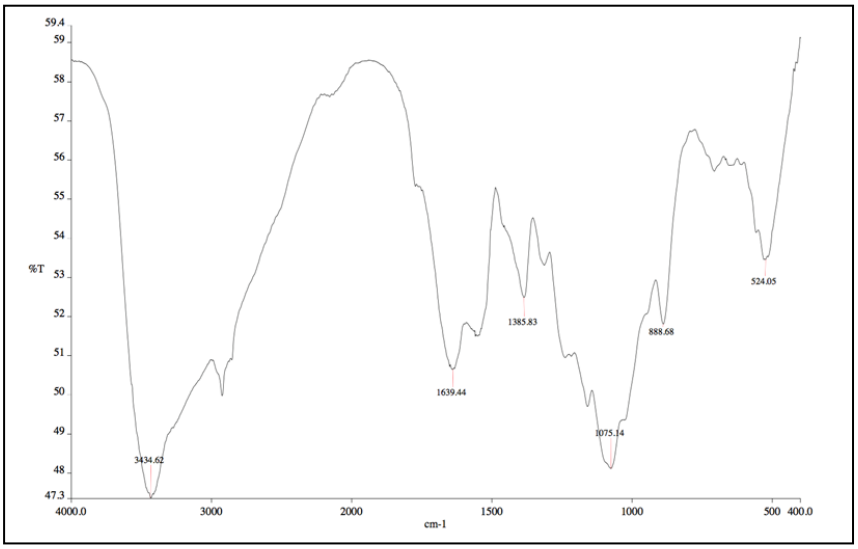
همان طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، آموکسی سیلین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان به همراه کلاولانیک اسید در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد دارای قطر هاله عدم رشد بزرگ تری بر ضد سویه مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. هم چنین با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان حامل دارو، قطر هاله عدم رشد نیز بزرگ تر شده که بیانگر فعالیت ضد باکتریایی بیشتر آن است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]



شکل شماره ۲. طیف FTIR نانوذرات کیتوزان



شکل شماره ۳. طیف FTIR نانو کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید

تعیین MIC و MBC به روش مایکرودایلوشن: جدول شماره ۱ و ۲ به ترتیب بیانگر میزان MIC و MBC برای دو سویه حساس و مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس می باشد که تحت تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات کیتوزان، آموکسی سیلین و نانوذرات کیتوزان حاوی آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید قرار گرفته است.

جدول شماره ۱. مقادیر MIC آموکسی سیلین، نانوکیتوزان و نانوکیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید به روش مایکرودایلوشن

نمونه	استافیلوکوکوس اورئوس حساس	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم
آموکسی سیلین	۲µg/ml	۴µg/ml
نانوذره کیتوزان	۰/۲۵mg/ml	۰/۵mg/ml
نانوذره کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید	۰/۴۵µg/ml	۰/۹µg/ml

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

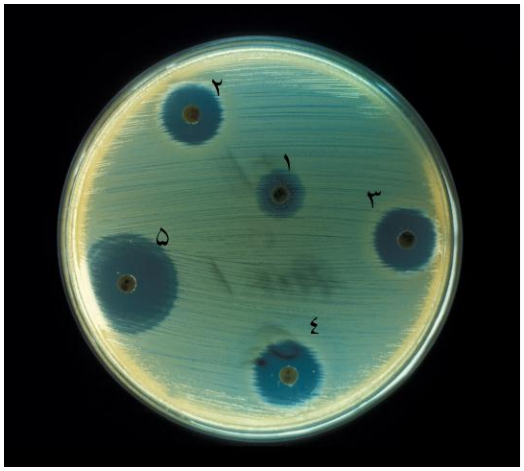
[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

جدول شماره ۲. مقادیر MBC آموکسی سیلین، نانوکیتوزان و نانوکیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید به روش مایکرودایلوشن

نمونه	استافیلوکوکوس اورئوس حساس	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم
آموکسی سیلین	۸µg/ml	۶۴µg/ml
نانو ذره کیتوزان	۰/۵mg/ml	۱mg/ml
نانوذره کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید	۰/۹µg/ml	۱/۸µg/ml

نتایج به دست آمده با روش مایکرودایلوشن در جدول شماره ۱ و ۲ نشـــان می دهـــد که MIC آموکسی سیلین در نمونه ســـویه حســـاس باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۲ میکروگرم بر میلی لیتر و MBC آن ۴ میکروگرم بر میلی لیتر بوده و سویه مقاوم MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی لیتر و MBC آن برابر با ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. هم چنین MIC نانوذرات کیتوزان در نمونه حساس باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC آن یک میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد و سویه مقاوم، MIC برابر با ۱ میلی گرم بر میلی لیتر داشت و MBC آن ۲ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. MIC نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید در نمونه حساس ۰/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و در نمونه مقاوم ۳/۶ میکروگرم بر میلی لیتر و MBC آن ها به ترتیب ۱/۸ و۷/۲ میـــکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانو کیتوزان، آموکسی سیلین و نانو کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید: شکل شماره ۴ نشانگر تشـــکیل هاله عدم رشد اســـتافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در حضـــور آموکسی سیلین، نانوکیتوزان و نانو کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید می باشد.



شکل شماره ٤. هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در حضور آموکسی سیلین، نانوکیتوزان و نانو کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید. ۱) نانوکیتوزان µg/ml ۳۲، ۲) آموکسی سیلین µg/ml ۳۲، ۳) آموکسی سیلین µg/ml ١٦، ٤) نانوکیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید µg/ml ۸، ۵) نانوکیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید µg/ml ١٦.

بحث و نتیجه گیری

توسعه مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها در آینده نزدیک بیماری های عـــفونی را به یکی از بزرگ ترین چالش های سلامتی در سراسر جهان تبدیل خواهد کرد. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از انواع رایج میکروارگانیسم هایی است که سبب عفونت در جراحات می شود. این پژوهش نشان می دهد که آموکسی سیلین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان به همراه کلاولانیک اسید، در مقایسه با آموکسی سیلین آزاد قطر هاله عدم رشد بزرگ تری بر ضد هر دو سویه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

حساس و مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داد. بنا بر این به طور کلی نتایج آزمایشات میکروبی ما نشان داد که نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید دارای اثرات ضد باکتریایی قوی تری نسبت به نانوکیتوزان تنها و هم چنین آموکسی سیلین می باشند. نتایج ما هم چنین نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات تهیه شده بر ضد سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین بیشتر از سویه مقاوم آن است.

همین طور که در پژوهش ها آمده بود نانوذرات کیتوزان به تنهایی بر بسیاری از میکروارگانیسم ها اثر سیتوتوکسیک دارد و قادر است انواع مختلف باکتری را سرکوب نماید(۲۶). هم چنین مطالعات نشان می دهد که نانوذرات کیتوزان می تواند به عنوان یک عنصر ضد استافیلوکوکی به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین فعالیت ضد باکتریایی داشته باشد(۲۷،۲۸). مطالعات گذشته بیان نمودند که امکان بارگذاری آموکسی سیلین در نانوذرات کیتوزان با روش ژلی شدن یونی وجود دارد. در راستای ادامه یافته ها نانوذرات کیتوزان حامل آنتی بیوتیک های β-لاکتامی از جمله آموکسی سیلین اثر قابل توجهی در کاهش رشد باکتری به خصوص سویه های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس دارا می باشند(۲۱-۱۹). در مقابل برخی از تحقیقات بیانگر آن هستند که حداقل غلظت مهاری نانو کیتوزان، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقابل سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس می باشد که دو برابر مقدار به دست آمده در مطالعات ما بوده و این تفاوت می تواند مربوط به اندازه متفاوت نانوذرات باشد(۲۵). تحقیقات گذشته هم چنین نشان می دهند که غلظت های پایین آموکسی سیلین خاصیت ضد باکتریایی خود را از دست داده اند و حتی در القای فنوتیپی بیوفیلم در سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک نقش به سزایی دارا می باشند(۲۲).

از نظر مکانیسم احتمالی، طبق تحقیقات انجام شده آنتی بیوتیک های بتالاکتامی مانند آموکسی سیلین با اتصال به جایگاه فعال پروتئین متصل شونده به پنی سیلین که باعث اتصال اجزای دیواره سلولی می گردد، مانع سنتز دیواره سلولی می شوند(۲۸). البته مکانیسم دقیق فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان هنوز مشخص نشده است. اما گمان می شود نانوذرات به علت اندازه بسیار کوچک خود خیلی بهتر و راحت تر می توانند با غشاء سلولی میان کنش برقرار کنند و این میانکنش های الکتروستاتیکی سرانجام در نفوذپذیری دیواره غشاء سلولی اختلال ایجاد می کند که نتیجه آن تراوش بخشی از مواد داخل سلول به بیرون و هم چنین جلوگیری از ورود مواد غذایی به داخل سلول است. هم چنین نانوذرات کیتوزان با ورود به داخل سلول و برقراری پیوند با DNA، از سنتز RNA و در نتیجه تولید پروتئین های حیاتی سلول جلوگیری می کنند(۲۹).

نتایج این مطالعه نشان دادند که ساخت نانوذرات حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید چندین مزیت از جمله افزایش پایداری آموکسی سیلین و پتانسیل افزایش بازده فعالیت ضد میکروبی آن را در پی دارد. کیتوزان با داشتن خاصیت ضدباکتریایی می تواند حداقل غلظت مهاری آنتی-بیوتیک آموکسی سیلین را به خصوص در مقابل سویه مقاوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که امروزه یکی از عمده ترین مسائل در درمان بیماری های عفونی است، کاهش دهد. در نتیجه دوز مصرفی آنتی بیوتیک و متعاقب آن اثرات جانبی نامطلوب دارو می تواند کاهش یابد. از دیگر مزیت های این حامل ها محافظت از دارو و جلوگیری از تجزیه آن، افزایش جذب دارو با تسهیل انتشار از طریق اپیتلیوم و افزایش توزیع درون سلولی دارو است که البته اثبات آن، نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه در مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می باشد. نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، به خاطر حمایت مالی از این طرح، کمال تشکر و قدردانی را می نمایند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

References

1.Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28:603-61.doi: 10.1128/CMR.00134-14.

2.Belal F, Kerdawy M, Ashry S, Wasseef D. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. Farmacology2000;55:680-6. Doi. org/10.1016/S0014-827X(00)00080-X.

3.Eumkeb G, Siriwong S, Thumanu K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant Escherichia coli and mode of action. J Photochem Photobiol Biol 2012; 117:247-53.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.10.006.

4. Rezazadeh M, Yousefimashouf R, Ghaznavirad E. [Antibiotic profile of methicillin resistant Staphylococcus aureus with multiple drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak]. Arak Med Uni J2013;16: 29-37. (Persian)

5.Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. Clavulanic acid a review. Biotechnol Adv 2008;26:335-51. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.002

6.Tancawan AL, Pato MN, Abidin KZ, Mohdasari AS, Thong TX, Kochhar P, et al. Amoxicillin clavulanic acid for the treatment of odontogenic infections a randomised study comparing efficacy and tolerability versus clindamycin. Int J Dent2015; 2015: 472470. doi.org/10.1155/2015/472470.

7.Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources structure properties and applications. Mar Drug 2015;13:1133-74.doi.org/10.3390/md13031133.

8. Lee W, Shin TS, Ko S, Oh HI. Control of dongchimi fermentation with chitosan deacetylated by alkali treatment to prevent over ripening. J Food Sci2010;75: 308-16.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01643.x.

9. Kim JH, Yu D, Eom SH, Kim SH, Oh J, Jung WK, et al. Synergistic antibacterial effects of chitosan caffeic acid conjugate against antibiotic resistant acne related bacteria. Mar Drug2017;8;15: 167. doi: https://doi.org/10.3390/md15060167.

10.Liu N, Chen XG, Park HJ, Liu CG, Liu CS, Meng XH, et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. Carbohydrate polymers. 2006;64:60-5. doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.028.

11. Cui F, Li G, Huang J, Zhang J, Lu M, Lu W, and et al. Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin burn dressing with anti methicillin resistant Staphylococcus aureus and promotion wound healing properties. Drug Del 2011;18:173-80. doi: https://doi.org/10.3109/10717544.2010.509363.

12.Yun J, Olkkola S, Hänninen ML, Oliviero C, and Heinonen M. The effects of amoxicillin treatment of newborn piglets on the prevalence of hernias and abscesses, growth and ampicillin resistance of intestinal coliform bacteria in weaned Pigs. PLos One 2017; 12: 172150. doi.org/10.1371/journal.pone.0172150.

13.Eumkeb G, Siriwong S, Thumanu K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin resistant Escherichia coli and mode of action. J Photochem Photobiol Biol 2012; 117:247-53.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.10.006.

14. Haeseker M, Havenith T, Stolk L, Neef C, Bruggeman C,Verbon A. Is the standard dose of amoxicillin-clavulanic acid sufficient? BMC Pharmacol Toxicol2014; 15: 38. doi.org/10.1186/2050-6511-15-38.

15. Goossens H, Ferech M, Stichele R. ESAC project group outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance a cross national database study. Lancet 2005; 365:579-87. doi: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17907-0.

16. Lazaro BE, Madurga SM, Abajo FJ. Evolucion del consume the antibioticos in Espana 1985-2000. Med Clin Barc 2002; 118:561-8.doi: doi.org/10.1016/S0025-7753(02)72453-6.

17. Campos J, Ferech M, Lazaro E, de Abajo F, Oteo J, Stephens P, et al. Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

data and reimbursement data. J Antimicrob Chemother 2007; 60:698-701.doi.org/10.1093/jac/dkm248.
18.Nworie A, Onyema AS, Okekpa SI, Elom MO, Umoh NO, Usanga VU, et al. A Novel Methicillin resistant Staphylococcus aureus t11469 and a poultry endemic strain t002 are present in chicken in ebonyi state Nigeria. Biomed Res Int2017; 2017: 2936461. doi. org/10.1155/2017/2936461.
19. Lee DS, Eom SH, Kim YM, Kim HS, Yim MJ, Lee SH, et al. Antibacterial and synergic effects of gallic acid grafted chitosan with β lactams against methicillin resistant Staphylococcus aureus. Can J Microbiol2014;60:629-38. Doi. org/10.1139/cjm-2014-0286.
20.Tin S, Lim CS, Sakharkar MK, Sakharkar KR. Synergistic combinations of chitosans and antibiotics in Staphylococcus aureus. Let Drug Des Discove2010; 7:31-35.doi.org/10.2174/15701801078-9869406.
21. kumar DA, Dharmendra S, Jhansee M, Shrikaut N, Shiv P. Development and chakacterization of chitsan nano particles loaded with amoxicillin. Int Res J Pharm2011; 2: 45-15.
22. Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, Farmer JT, Endres JL, Marchand M, et al. Effects of low dose Amoxicillin on Staphylococcus aureus USA300 biofilms. Antimicrob Age Chemother 2016; 60: 2639-51. doi: 10.1128/AAC.02070-15.
23. Ghadi A, Mahjoub S, Tabandeh F, Talebnia F. Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles potential applications in nanomedicine and biomedical engineering. Caspian J Int Med2014; 5: 156-61.
24. Cerchiara T, Abruzzo A, Cagno M, Bigucci F, Brandl A, Parolin C, et al. Chitosan based micro-and nanoparticles for colon targeted delivery of Vancomycin prepared by alternative processing methods. European J Pharmaceut Biopharmaceut 2015; 92:112-9. doi. org/10.1016/j.ejpb.2015.03.004.
25.Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. Carb Pol2011;83:438-46. doi. org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004.
26. Chavez LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on Streptococcus mutans biofilms. Appl Environ Microbiol2011; 77: 3892-5. doi: 10.1128/AEM.02941-10.
27. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha MS. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. Fib pol2017; 18:221-30. doi.org/10.1007/s12221-017-6690-1
28. Costa EM, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro PM, Veiga M, etal. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. Mate Sci Eng Biol Appl2017 1;79: 221-226. doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.047.
29. Soares GS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, et al. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. J Appl Oral Sci 2012; 20: 295-304. doi.org/10.1590/S1678-7757201200 0300002

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]

Antibacterial Effects of Chitosan Nanoparticles Loaded with Amoxicillin and Clavulanic acid against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Strains

Akbari N[1], Ashrafi F[2], Salehi M[2]*

(Received: December 4, 2017 Accepted: May 22, 2018)

Abstract

Introduction: Antibiotic-carrying nanoparticles have cytotoxic effects on drug-resistant bacteria. The aim of the present study was to evaluate the effect of chitosan nanoparticles carrying amoxicillin and clavulanic acid on the viability of staphylococcus aureus strains.

Materials & Methods: In this study, chitosan nanoparticles were prepared by ionic gelation method and were loaded by amoxicillin and clavulanic acid leading to the production of nanoparticles with dimension less than 100 nm. To evaluate the effect of different nanoparticle concentration on the bacteria, chitosan and amoxicillin concentrations of 0.25-8 and 1-128 µg/ml were prepared, respectively, using the microdilution method. Subsequently, 100 nm of different chitosan nanoparticle concentration with antibiotic was transferred to each well and 1 µl of bacterial suspension was added to the wells. Turbidity in the wells was observed without armed eye and the light absorbance was read in the wavelength range of 630 nm by enzyme-linked immunosorbent assay.

Findings: The results showed that minimum inhibitory concentrations of chitosan nanoparticles carrying amoxicillin and clavulanic were 0.9 and 3.6 µg/ml in susceptible and resistant specimens, respectively. Moreover, their minimum destructive concentrations were obtained at 1.8 and 7.2 µg/ml, respectively.

Discussion & Conclusions: According to the results, the obtained combination showed more antibacterial effectiveness, compared to chitosan and amoxicillin alone. This reveals the synergistic effect of amoxicillin with clavulanic acid and chitosan.

Keywords: Amoxicillin, Chitosan nanoparticles, Clavulanic acid, Methicillin resistant Staphylococcus aureus

1.Dept of Microbial biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
2. Dept of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University , Tehtan North Branch, Tehran, Iran
** Corresponding author Email: mnfa.ashrafi@yahoo.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-07-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.2.187]