



بررسی تأثیر آنتی باکتریایی نانوذرات طلا بر روی اشرشیاکلای و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین آنتی بیوتیک و تأثیر آن بر روی کبد موش‌های Balb/C

لادن رحیم‌زاده‌ترابی^{۱*}، منیردودی^۲، علی نوری^۳

چکیده

مقدمه: نانو ذرات طلا همانند نانوذرات دیگر دارای خواص کاتالیزستی، مغناطیسی، نوری و بیولوژیکی (ضدمیکروبی) می‌باشد، از طرف دیگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از بزرگترین مشکلات مطرح در سلامت عمومی جهان است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا بر روی اشرشیاکلای و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین آنتی بیوتیک و تأثیر آن بر روی کبد موش‌های Balb/C، انجام شد.

روش بررسی: در این پژوهش از باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلای مقاوم به دارو که از نمونه‌های بالینی از چندین بیمارستان در اصفهان جداسازی شده بود استفاده و سپس اثر سمیت این نانو ذرات بر روی موش‌های نژاد Balb/C بررسی شد. از نانوذرات طلا به صورت کلئیدی در سایز ۱۰ نانومتر به شکل کروی و با غلظت ۲۰۰ ppm و با دو روش چاهک و دیسک‌گذاری استفاده شد و خواص آنتی‌باکتریایی این نانوذره طی زمان‌های یک تا سه روز تحت دمای ۳۷°C مورد ارزیابی قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد هر روز بررسی شد. بخش دیگر این تحقیق نیز بر روی بافت و آنزیم‌های کبدی موش‌های آزمایشگاهی انجام گرفت.

نتایج: بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در اشریشیا- کلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. بیشترین میزان MIC و MBC مربوط به باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک بود. نانوذرات طلا بر روی وزن، میزان آنزیم‌های کبدی و بافت کبدی موش‌های نژاد Balb/C پس از یک ماه تغییرات محسوسی نشان نداد.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر اثر مهاری نانوذرات طلا بر روی میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش در رقت‌های مورد نظر مشاهده شد. اگر چه نتایج آزمایشگاهی به دست آمده امیدوارکننده هستند، اما تحقیقات بیشتر جهت استاندارد کردن روش‌های درمانی لازم است.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات طلا، کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کلای، مقاوم به آنتی‌بیوتیک، کبد، Balb/c

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۵۶۱۸۲۵۷، پست الکترونیکی: negar.rahimz@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۹

مقدمه

در سال‌های اخیر، مقاومت دارویی (Drug Resistance) در بسیاری از باکتری‌های پاتوژن (Pathogen) به طور قابل توجهی افزایش یافته که درمان عفونت‌ها را دشوار کرده است. بنابراین ما به داروهای بی خطر و مؤثر برای درمان عفونت‌های مقاوم به دارو نیاز داریم (۱). مقاومت ضد میکروبی که اغلب به عنوان مقاومت دارویی شناخته می‌شود، هنگامی اتفاق می‌افتد که میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری، ویروس، قارچ و انگل به گونه‌ای تغییر کنند که ارائه داروهایی که قبلاً برای درمان عفونت‌های حاصل از آنها استفاده می‌شده، بی‌اثر شود. کلبسیلا پنومونیه (*Pseudomonas aeruginosa*) و اشریشیا کلای (*Escherichia coli*) هر دو از باکتری‌های پاتوژن انسانی می‌باشند که عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی را ایجاد کرده و حامل مقاومت چندگانه دارویی هستند (۲).

استفاده از نانو ذرات طلا در درمان باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلای به دو دلیل مورد بررسی قرار گرفت؛ اول این که این باکتری‌های ذکر شده از پاتوژن‌های مهم بیمارستانی هستند و منجر به ایجاد عفونت‌های شایع و ثانویه در بدن می‌گردند، دوم این که مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک هستند و باعث تشدید عفونت و شیوع مرگ و میر در بیماران و بیمارستان‌ها می‌شوند (۳). امروزه عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه نسبت به گذشته بیشتر است و به نظر می‌رسد این مسئله به خاطر مقاومت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۴). مقاومت ضد میکروبی که اغلب به عنوان مقاومت دارویی شناخته می‌شود، هنگامی اتفاق می‌افتد که میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری، ویروس، قارچ و انگل به گونه‌ای تغییر کنند که ارائه داروهایی که قبلاً برای درمان عفونت‌های حاصل از آنها استفاده می‌شده، بی‌اثر شود. داروهای ضد میکروبی جزء پرمصرف‌ترین اقلام دارویی در سراسر جهان است که علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا همچون باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها بکار می‌روند (۵). نانو ذرات توانایی بالایی در جذب و پراکنده کردن نور و همچنین سازگاری بالایی با بدن موجودات زنده دارند (۶)، این ویژگی‌های نانو ذرات به ویژه نانو ذرات طلا

دانشمندان علوم نانو مواد را در صدد بر آورده است که از این ذرات برای تشخیص سریع و آسان سلول‌های سرطانی، دارورسانی هدفمند و گرما درمانی استفاده کنند (۷).

در این مطالعه تحقیقاتی ابتدا باکتری‌های، کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلای از چندین بیمارستان و مراکز درمانی در استان اصفهان جمع‌آوری گردیدند و سپس تأثیر رقت‌های مختلف نانوذرات طلا (Nano gold Particle) به سایز ۱۰ نانومتر و به شکل کروی به منظور یافتن حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) مناسب به عنوان عامل ضدباکتریایی مؤثر برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در این پروژه به دنبال اثرگذاری نانو ذرات طلا بر روی آنزیم‌های کبدی و بافت کبدی موش‌های نژاد Balb/c هستیم تا عدم سمیت و عدم سرطانی بودن، این نانو ذرات را اثبات کنیم.

مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است. کلبسیلا پنومونیه بعد از اشریشیا کلای دومین پاتوژن مهم دستگاه ادراری می‌باشد (۸).

در این تحقیق، هدف دستیابی به اثرات ضدباکتریایی نانوذرات طلا ابتدا در شرایط آزمایشگاهی (Invitro) و سپس در شرایط بدن موجود زنده (Invivo) بود. مطابق تحقیقات محققان مختلف مکانیسم‌های از بین بردن باکتری‌ها توسط نانوذرات طلا بدین ترتیب می‌باشد: ابتدا نانو ذرات پیوند محکمی با غشای خارجی باکتری برقرار می‌کنند و مانع فعالیت‌های سلولی از جمله انتقال فعال، فعالیت‌های آنزیم‌های پری پلاسمیک و دهیدروژناز (Dehydrogenase) شده و در نهایت از سنتز DNA، RNA و پروتئین جلوگیری می‌کند و موجب لیز سلولی می‌گردند (۹).

مطالعات صورت گرفته در این زمینه گویای آن است که میان ماکرومولکول‌های بیولوژیکی و نانوذرات فلزی مانند نانوذرات طلا واکنشی رخ می‌دهد و زمانی که اکسیدهای فلزی دارای بار مثبت هستند، میکروارگانیسم‌ها بار منفی دارند، در نتیجه یک واکنش الکترومغناطیس میان آنها به وجود

کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت طلبی است که سبب پنومونی، عفونت های بیمارستانی، عفونت دستگاه ادراریع باکتری می و مننژیت است. کلبسیلا پنومونیه می تواند با خون ریزی وسیع همراه با نکروز و سفت شدن ریه ها همراه باشد. این باکتری گاهها عفونت مجاری ادراری و باکتری می همراه با ضایعات موضعی در بیماران ناتوان ایجاد می نماید (۱۹).

نانوذرات طلا می توانند به آنتی بیوتیک ها متصل شوند و آنتی بیوتیک ها را قبل از اینکه توسط آنزیم های دفاعی میکروب تخریب شوند به هدف و گیرنده های خود برسانند (۲۰). آنتی بیوتیک های بتالاکتام مانند پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها سبب از هم گسیختگی دیواره سلولی باکتری می شوند اما بسیاری از سوش های باکتری در برابر آنها مقاوم هستند. نانوذرات می توانند بر بسیاری از مکانیسم های مقاومت باکتری با استفاده از حمل دز معین کوفاکتور غلبه کنند (۲۱).

قبل از اینکه کوفاکتور توسط آنزیم های دفاعی شکسته شود، دیواره سلولی از هم گسیخته می شود. سپس نانوذرات می توانند به درون سلول، یعنی جایی که نسخه برداری DNA انجام می شود، وارد شوند (۲۲).

اندازه نانوذرات معمولاً سه تا صد نانومتر بوده و به دلیل اینکه روش های اندازه گیری متعددی همچون جذب نوری، فلورسانس، پخش رامان، نیروی مغناطیسی و جریان الکتریکی می توانند برای تشخیص آنها بکار روند، نشانگرهای خوبی در طراحی بیوحسگرها می باشند (۲۳، ۲۴). گونه های کلبسیلا می توانند دارای پلاسمیدهای مقاوم باشند که باعث مقاومت باکتری در مقابل آنتی بیوتیک هایی چون آمپی سیلین و کربنی سیلین می شود (۲۵). همچنین نشان داده شده است که این باکتری به طور فزاینده ای مقاومت همزمان نسبت به کوئینولون ها و آمینوگلوکوزیدها دارد و این عوامل مقاومت، بر روی پلاسمیدهایی وجود دارند که می توانند به وسیله کوئیزوگاسیون به دیگر سویه ها نیز انتقال یابند (۲۶، ۲۷).

دانشمندان اخیراً نشان داده اند که نفوذ نانو ذرات طلا در داخل سلول اثرات درمانی ویژه ای دارد از آنجایی که تحقیقات

می آید (۱۰). در اثر این تماس، اکسیداسیون باکتریایی صورت می گیرد و در نهایت مرگ سلولی رخ می دهد و مکانیسم دارویی نانو ذرات طلا بدین صورت است که، نانوذرات طلا می توانند به آنتی بیوتیک ها متصل شوند و آنتی بیوتیک ها را قبل از این که توسط آنزیم های دفاعی میکروب تخریب شوند به هدف و گیرنده های خود برسانند (۱۱).

تاکنون پژوهش هایی مبنی بر این که نانو ذرات طلا اثر آنتی باکتریایی دارند انجام شده و مکانیسم تاثیر ضدباکتریایی نانو ذرات طلا بر روی باکتری اشیریشیا کلای مورد بررسی قرار گرفته و این امر به تائید رسیده است (۱۲). از این ذرات در علوم زیستی، پزشکی، بیوسنسورها (Biosensors)، کاتالیست ها، تشخیص دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید (Deoxy Ribonucleic Acid)، پروتئین، میکروارگانیزم ها و غیره استفاده می شود (۱۳).

با توجه به عفونت های ناشی از مقاومت آنتی بیوتیکی برخی از باکتری ها در انسان و رویارویی با علم نانوبیوتکنولوژی (Nano biotechnology) می توان از نانو ذرات طلا به عنوان یک آنتی باکتریال قوی استفاده نمود (۱۴). با علم نانوبیوتکنولوژی می توان باعث حذف یا کاهش مقاومت باکتری های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک (Multi Drug Resistance) شد (۱۵).

از مهم ترین خواص بحث بر انگیز نانو ذرات طلا اندازه بسیار کوچک و در مقابل فضای سطحی بزرگشان است که باعث افزایش فعالیت های شیمیایی و بیولوژیکی، انحلال پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان، توانایی نفوذ به غشا سلول و خاصیت ضدباکتریایی آن است (۱۶). استفاده مداوم از آنتی بیوتیک ها و فشار انتخابی ناشی از این عوامل باعث بروز مقاومت هایی نسبت به آنتی بیوتیک ها و باکتری های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه گردیده است (۱۷). از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامید. همچنین این سازمان در نظر گرفتن موارد مهمی مانند ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها، فروش آنتی بیوتیک ها فقط با نسخه پزشک و پیشگیری و کنترل عفونت را جهت کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی به دولت ها توصیه نموده است (۱۸).

محققان نشان داده که نانوذرات فلزی خاصیت ضدباکتریایی دارند لذا امید است که با کاوش بر روی آنها بتوان به روشی نوین برای مقابله با گسترش مقاومت دارویی باکتری‌ها دست یافت (۲۸).

این مطالعه با هدف یافتن MIC مؤثر از محلول نانوذرات طلا برای نابودی کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک و همچنین بررسی تأثیر هیستو پاتولوژیکی نانوذرات طلا بر روی موش‌های Balb/C و دستیابی به زمان و غلظت مؤثر نانوذرات طلا در مهار رشد باکتری‌های فوق‌الذکر مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع نیمه تجربی می‌باشد. برند و کارخانه سازنده موارد اولیه آزمایشگاهی شرکت مرک آلمان می‌باشد. ارگانیس‌ها:

این مطالعه در زمستان ۱۳۹۱ بر روی ۱۰۲ نمونه بالینی مقاوم به چند دارو شامل ۵۱ نمونه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ۵۱ نمونه اشیریشیا کلای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک که از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های الزهراء، شریعتی، امام موسی کاظم، غرضی و چندین آزمایشگاه خصوصی در مناطق شمال، مرکزی و جنوب اصفهان طی ۴ ماه جمع‌آوری شد و مورد مطالعه قرار گرفت.

ایزوله‌های مورد بررسی از نمونه‌های ادرار، تراشه، خون، کاتتر، خلط، زخم و ترشحات بیماران زن بستری در بخش‌های اورژانس داخلی، اورژانس جراحی، اطفال، گوارش، عفونی، زنان، پوست، ریه و داخلی جنرال، ارولوژی، نفرولوژی، بخش مراقبت‌های ویژه و بیماران سرپایی مراجعه‌کننده، جداسازی شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های میکروبیولوژی تشخیص جنس و گونه باکتری‌های مقاوم به دارو(هر دو سویه باکتری) انجام شد. برای بررسی حساسیت ضد میکروبی و شناسایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای MDR جدا شده از عفونت‌های مختلف و همچنین سویه‌های استاندارد کلبسیلا پنومونیه PTCC ۱۲۹۰ و

اشیریشیا کلای PTCC ۱۲۷۰ آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (E)، توبرامایسین (TOB)، کوآموکسی کلارو (AMC)، آمپی‌سیلین (AM)، سفاتاکسیم (CTX)، آموکسی‌سیلین (AMX)، جنتامایسین (GM)، کوتری ماکسازول (SXT)، سفیکسیم (CFM)، کلوکساسیلین (CX)، سفالکسین (CN)، سیپروفلوکساسین (CP) مورد بررسی قرار گرفتند.

همگی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام ساخت کشور ایران و تحت برند پارس طب می‌باشند. پس از سپری شدن زمان لازم (۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) با یک خط‌کش دقیق قطر هاله عدم رشد ایجاد شده روی پلیت‌ها را بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری کرده و با مقایسه با جدول استاندارد CLSI میزان حساسیت هر یک از سویه‌های باکتریایی به صورت حساس و مقاوم گزارش شد.

ایزوله‌های بالینی مقاوم به دارو بعد از جداسازی از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های میکروبیولوژی تشخیص جنس و گونه باکتری‌های مقاوم به دارو انجام شد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، MR، VP، SIM، اوره آگار و سیترات آگار و کشت در محیط EMB و تست آنتی‌بیوگرام با آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده ایزوله‌های بالینی مقاوم به دارو شناسایی شدند. جهت آزمون خواص ضد میکروبی نانوذرات طلا همچنین می‌بایست از سویه‌های استاندارد باکتری‌های مورد آزمایش استفاده می‌شد. بنا به این دلیل سفارشی مبنی بر سویه‌های مورد تقاضا به مرکز پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران که دارای مجموعه‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌های استاندارد جهانی می‌باشد، ارائه داده شد. سپس این مرکز باکتری‌های زیر را به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه در اختیار ما قرار داد. نمونه‌های استاندارد کلبسیلا پنومونیه PTCC ۱۲۹۰ و اشیریشیا کلای PTCC ۱۲۷۰.

جداولی در رفرنس‌های میکروبیولوژی بالینی وجود دارد که آنتی‌بیوتیک‌های مناسب برای انواع میکروارگانیس‌م‌ها در آنها ذکر شده است (۲۹، ۳۰). در این تحقیق میزان قطر هاله عدم رشد باکتری توسط غلظت‌های مختلف محلول کلونیدی نانو

ذرات طلای ۱۰ نانومتری بر روی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای مقاوم به چند دارو در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد.

آزمایش حساسیت در برابر عوامل ضد میکروبی نانو ذرات طلا:

نانو ذرات طلای مورد استفاده در این پژوهش با سایز ۱۰ نانومتر و به شکل کروی و به صورت محلول سوسپانسیون، کلوتیدال با غلظت ۱۰۰ نانومتر بود و از شرکت نوترینو (تهران-ایران) خریداری گردید. به منظور بررسی تأثیر نانو ذرات طلا بر روی باکتری‌های فوق‌الذکر از روش‌های متعددی مانند روش چاهک زدن در آگار و از روش‌های میکروداپلوشن و ماکروداپلوشن استفاده شد (۳۱).

روش انتشار چاهک در آگار (Agar Well Diffusion):

در این تحقیق میزان قطر هاله عدم رشد باکتری توسط غلظت‌های مختلف محلول کلوتیدی نانو ذرات طلای ۱۰ نانومتری بر روی باکتری‌های اشیریشیا کلای و کلبسیلا پنومونیه در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. بدین صورت که از هر کدام از باکتری‌های MDR کشت ۲۴ ساعته تهیه شد و سپس مانند مراحل قبل سه تا پنج کلنی از سویه‌های مورد نظر در محیط کشت TSB به حالت سوسپانسیون در آورده شد و با استاندارد نیم مک فارلند که معادل 1×10^8 cfu/ml باکتری است مقایسه شد. در ادامه تأثیر غلظت‌های ppm ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ تهیه شده از نانو ذرات طلا را، به روش چاهک در آگار بر روی هر دو باکتری کشت داده شده مورد بررسی قرار دادیم، یعنی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده از نانو ذرات طلا به طور جداگانه به هر چاهک افزودیم، سپس با استفاده از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و دیسک آنتی‌بیوتیک ۱۰ میکروگرمی جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه، و در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت میانگین قطر هاله‌های رشد هر دو باکتری را در این بازه‌های زمانی با هم مقایسه شد (۳).

روش ماکروداپلوشن (Macrodilution):

جهت تعیین تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد از نانو ذرات طلا سری‌های رقت در یک میلی‌لیتر مولر هینتون برات تهیه شد، سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردید. لوله‌های کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون نانو ذرات طلا) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری، بدون نانو ذرات طلا) نیز تهیه شدند. در نهایت لوله‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده به صورت چشمی بررسی شدند. کمترین رقت از نانو ذرات طلا که در آن کدورتی مشاهده نگردید به عنوان حداقل رقتی از آنتی‌بیوتیک که جلوی رشد میکروب را می‌گیرد، در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از تمامی لوله‌هایی که در آنها عدم رشد مشاهده شده بود، در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، پس از گرم‌گذاری، اگر باکتری رشد نکرده بود آن تراکم آنتی‌بیوتیک را حداقل تراکم کشنده باکتری (باکتریوساید) در نظر گرفته شد (۳۲).

روش میکروداپلوشن (Microdilution)

این روش طی ۹ مرحله انجام گردید:

۱- تحت شرایط آسپتیک، ۰/۸ میلی‌لیتر مولر هینتون برات را به هر یک از ۲۴ خانه چاهک میکرولیتر پلیت استریل اضافه کرده و پوشش سر جای خود قرار گرفت.

۲- ۰/۱ میلی‌لیتر از هر کشت باکتری‌های MDR را به ۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا رقت 10^{-2} یا ۰/۰۱ حاصل شود.

۳- ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-2} از باکتری‌های MDR، جدا گانه به ۶ ردیف چاهک (جمعاً ۲۴ چاهک) اضافه شد.

۴- جهت تعیین MIC از نانوذرات طلا سری‌های رقت ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ بر حسب ppm تهیه شد. به منظور آماده کردن این رقت‌ها، ۶/۴ میلی‌لیتر از نانوذرات طلا را به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و جهت حل شدن آن، خوب به هم زده و سانتی‌فوژ شد. سپس ۱

آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ گونه رشدی از باکتری‌های مورد آزمایش مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد به منظور تأیید نتایج آزمایش هر نمونه، ۳ بار تکرار انجام شد (۳).

روش آزمایشگاهی تأثیر هیستوپاتولوژیکی نانو ذرات طلا بر روی کبد موش‌های Balb/C :

به منظور بررسی دقیق سمیت نانوذرات فوق‌الذکر در بخش داخل بدن، بر روی موش‌های Balb/C، مطالعه بافت کبد و بررسی تغییرات آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (Alanin Amino transferase)، آسپارات آمینو ترانسفراز (Aspartat Amino transferase) و آلکانل فسفاتاز (Alkalin Phosphatase) صورت گرفت. در شرایط داخل بدن موش‌های نر نژاد Balb/C به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند و نانو ذرات طلای کروی شکل به اندازه ۱۰ نانومتر و غلظتی برابر ۱۰۰ ppm پس از سپری شدن ۶ روز (زمان تطبیق موش‌ها با شرایط آزمایشگاه) به صورت یک روز در میان و به مدت ۶ روز و به صورت تزریق درون صفاقی به موش‌های تحت آزمایش توسط سرنگ انسولینی به گروه تیمار به میزان ۱ سی‌سی از محلول نانوذرات طلا با غلظت ۱۰۰ ppm و به گروه شاهد ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی تزریق شد، تا میانگین غلظت‌های سرمی آنزیم‌های کبدی و تغییرات وزن دو گروه شاهد و تیمار را با هم مقایسه نموده، از آنجایی که در اثر تزریق ۱ سی‌سی از نانوذرات طلا با غلظت ۱۰۰ ppm در طی یک ماه تغییر معنی‌داری در وزن موش‌های Balb/C مشاهده نشد، به منظور بررسی دقیق‌تر نفوذ نانوذرات در بدن این حیوانات و بررسی اثرات جانبی این نانو ذره بر بدن، از بافت کبد موش‌ها مقاطع بافتی تهیه شد.

خونگیری موش‌ها از درون قلب جانور صورت گرفت. غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکانل فسفاتاز (ALK) با استفاده از کیت آنزیم‌های کبدی و دستگاه آنالیز فاکتورهای خونی در بیمارستان الزهراء اصفهان سنجیده شد. سپس میانگین غلظت سرمی هر سه آنزیم کبدی در دو گروه تیمار و شاهد با هم مقایسه گردید.

میلی‌لیتر از این محلول را به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کرده تا غلظت ۶۴ میلی‌لیتر حاصل شود. ۵ میلی‌لیتر از این غلظت را به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کردیم تا غلظت ۳۲ میلی‌لیتر حاصل شود و به همین ترتیب ۴ مرتبه تکرار کردیم تا سایر غلظت‌های باقی مانده به دست آمدند (جدول ۱).

۵- ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های نانوذرات طلا را به چاهک‌های جداگانه اضافه کردیم. میزان جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

۶- میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۷- پس از انکوباسیون، چاهک‌ها را از نظر کدورت بررسی کردیم. ایجاد رشد مبین مقاوم‌بودن ارگانسیم به نانوذرات طلا در غلظت موردنظر بود و عدم ایجاد رشد حساس بودن ارگانسیم به نانو ذرات طلا را نشان می‌داد. بررسی مجدد میزان جذب نوری ایجاد شده توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر پس از گذشت ۲۴ ساعت مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد از انکوباسیون و همچنین بررسی چشمی میزان کدورت ایجاد شده در چاهک‌ها، میزان MIC تعیین گردید. بدین ترتیب مشاهدات خود را به صورت رشد (+) و عدم رشد (-) ثبت کردیم.

۸- با توجه به نتایج خود، حداقل غلظت ممانعت‌کننده (MIC) را در مورد غلظت نانوذرات طلا برای هر گونه باکتری به دست آوردیم. MIC را به عنوان چاهکی که در آن رشد صورت نگرفته، در نظر گرفتیم.

۹- به منظور تعیین MBC عصاره مورد آزمایش، از چاهک‌های مربوط به MIC و چاهک‌های مربوط به غلظت‌های بیشتر که فاقد کدورت قابل تشخیص می‌باشد به وسیله سوآپ استریل بر روی محیط کشت MHA به صورت خطی کشت داده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از طی ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها بررسی گردید. غلظتی از نانو ذره مورد

تهیه مقاطع بافتی از کلیه موش‌های کنترل و تیمار جهت رنگ‌آمیزی:

از آنجایی که در اثر دز تزریقی ۰/۵ سی‌سی از نانوذرات طلا به شکل کروی و به اندازه ۱۰ نانومتر و به غلظت ۱۰۰ ppm تغییر معنی‌داری در وزن موش‌های سوری مشاهده نشد، به منظور بررسی دقیق‌تر نفوذ نانوذرات در بدن این حیوانات و بررسی اثرات جانبی این نانوذرات بر بدن، از بافت کبد موش‌ها مقاطع بافتی تهیه شد.

ابتدا هر دو گروه شاهد و تیمار از موش‌های سوری پس از بیهوشی با اتر، تشریح شده و کبد آنها جدا شد، سپس مقاطع بافتی تهیه و به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شد. برای تهیه مقاطع بافتی از کبد ابتدا بافت کبد به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. سپس برای ۲ ساعت در اتانول آبگیری شد. در نهایت گزینول افزوده شده و در پارافین مذاب قرار گرفت. پس از قالب‌گیری بافت به ضخامت ۵ میکرون برش‌گیری گردیده و روی لام چسبانده شد. سپس ذوب پارافین انجام گرفت و بعد از آن جهت زدودن پارافین و شفاف‌سازی طی ۳ مرحله هر بار به مدت ۲۰ دقیقه در گزینول قرار داده شد و در آخر با اتانول آب‌گیری گردید. برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در ابتدا ۵ تا ۱۰ دقیقه رنگ هماتوکسیلین اضافه شد و پس از شستشو با آب، به آن اسید الکل افزوده گردید. بعد از یک مرحله شستشو رنگ ائوزین برای ۱ دقیقه اضافه شد و در آخر شستشو انجام شد. سپس با چسب انتالن بر روی لام‌ها، لامل قرار گرفته و لام‌ها برای مشاهده با میکروسکوپ نوری آماده شدند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

و به منظور مقایسه میانگین نمونه‌ها و نتایج آنتی‌بیوگرام در سوبه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیاکلای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک و همچنین نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات طلا از آزمون آماری T-test و تست دانکن استفاده شد. برای سنجش آماری داده‌ها نیز از برنامه نرم‌افزاری SPSS 16 استفاده شد.

آنالیز آماری نتایج هیستوپاتولوژیکی نانو ذرات طلا بر روی کبد موش‌های Balb/C
برای سنجش آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد. تمام نتایج به دست آمده به صورت Mean±SD ارائه شده است. از General Linear Models با روش‌های manova برای مقایسه تأثیر نانوذره طلا در سه سطح مختلف بر روی سطح معنی‌داری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تست حساسیت آنتی‌بیوتیک (آنتی‌بیوگرام (Antibiogram))

یافته‌های حاصل از این پژوهش پس از سه بار تکرار برای هر کدام از ۱۰۲ نمونه بالینی مقاوم به چند دارو شامل ۵۱ نمونه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ۵۱ نمونه اشیریشیا کلای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک نشان داد که در بین عفونت‌های مورد بررسی در بیمارستان‌های فوق‌الذکر بالاترین میزان از عفونت‌ها مربوط به نمونه ادرار در اشیریشیاکلای ۳۱/۳۷ درصد و نمونه تراشه از کلبسیلا پنومونیه ۲۹/۴۱ درصد بیشترین درصد نمونه‌ها را در هر باکتری به طور میانگین به خود اختصاص داده بودند و بالاترین درصد فراوانی باکتری‌های مقاوم به دارو در زنان و در بیمارستان فوق تخصصی الزهرا واقع در جنوب اصفهان به دست آمد. هر دو باکتری فوق در تست تعیین حساسیت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند در مقایسه بین این دو باکتری از خانواده انتروباکتریاسه در تحقیق حاضر می‌توان این گونه نتیجه گرفت که نمونه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه از مقاومت بالاتری در تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برخوردار بودند.

نمونه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله اریترومیسین ۹۲٪ و بیشتر از ۹۰٪ نمونه‌های بالینی اشیریشیا کلای نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند که این نتایج با انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای هر باکتری مشخص گردید (جدول ۱).

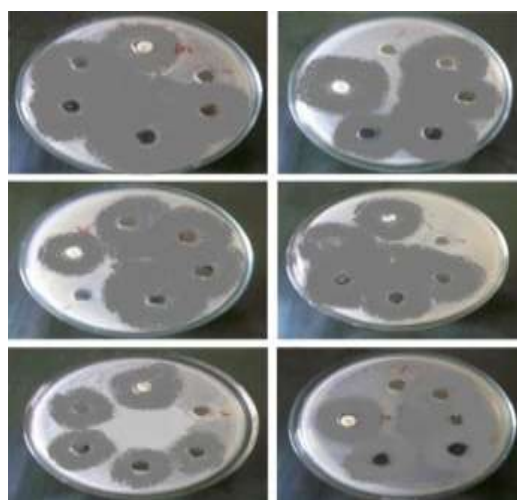
جدول ۱: نتایج آنتی بیوگرام در سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلاهی مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک

نوع آنتی‌بیوتیک	باکتری		کلبسیلا پنومونیه		اشرشیاکلاهی	
	حساس	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	حساس	مقاوم
اریترومایسین (E)	۷/۸۴	۹۲/۱۶	-	۶۸/۶۳	۳۱/۳۷	-
توبرامایسین (TOB)	۲۶/۷۱	۵۲/۹۴	۲۰/۳۵	۷۴/۵۱	۲۵/۴۹	-
کوآموکسی کلاو (AMC)	۳۱/۳۷	۶۸/۶۳	-	۴۷/۰۶	۵۰	۲/۹۴
سفتوتاکسیم (CTX)	۱۳/۷۲	۸۶/۲۸	-	۴۱/۱۸	۴۹/۲۳	۹/۵۹
آموکسی سیلین (AMX)	۲۳/۵۳	۷۶/۴۷	-	۵۰/۹۸	۴۶/۷۸	۲/۲۴
جنتامایسین (GM)	۴۲/۱۵	۵۵	۲/۸۵	۶۶/۶۷	۳۳/۳۳	-
کوتری ماکسازول (SXT)	۳۵/۲۹	۶۰/۷۱	۴	۸۲/۳۵	۱۰	۷/۶۵
سفسکسیم (CFM)	۱۹/۶۰	۸۰/۴۰	-	۲۵/۴۹	۶۱/۵۱	۱۳
کلوکساسیلین (CX)	۳۰	۶۶/۶۷	۳/۳۳	۸۶/۲۸	۱۳/۷۲	-
سفالکسین (CN)	۳۰	۶۰/۷۸	۹/۲۲	۳۹/۲۲	۴۸/۷۸	۱۲
سیپروفلوکساسین (CP)	۳۸	۵۰/۹۸	۱۱/۰۲	۶۴/۷۱	۲۹/۲۵	۶/۰۴
آمپی سیلین (AM)	۲۰	۷۴/۵۱	۵/۴۹	۹۴/۱۲	۵/۸۸	-

نتایج تست چاهک حاصل از تاثیر نانوذرات طلا

قطر هاله عدم رشد در هر ۲ سویه باکتریایی با افزایش رقت نانوذرات طلا و افزایش زمان انکوباسیون رو به افزایش است. نتایج حاصل از چاهک زدن در آگار طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که قطر هاله عدم رشد در این سویه‌های باکتریایی با افزایش غلظت نانوذرات طلا و افزایش زمان انکوباسیون رو به افزایش است، پس می‌توان نتیجه گرفت غلظت و زمان برای تأثیر نانو ذرات طلا رابطه یکسانی را برای باکتری‌های مقاوم به دارو نشان دادند. در مجموع پس از ۳ بار تکرار آزمایشات، نتایج حاصل از روش چاهک در آگار نانو ذرات طلا(با رقت

معادل ۲۰ ppm) نشان داد که کم‌ترین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برابر ۱۶ میلی‌متر و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری اشرشیا کلاهی مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک معادل ۲۱ میلی‌متر است. پس می‌توان به این نتیجه رسید با توجه به این که اشرشیا کلاهی بعد از ۷۲ ساعت بالاترین میانگین قطر هاله عدم رشد را در محیط کشت داشته نانو ذرات طلا تأثیر آنتی‌باکتریالی خوبی بر روی این باکتری داشته است(شکل ۱).



اشرشیاکلاهی

کلبسیلا پنومونیه

شکل ۱: نمایش تأثیر غلظت‌های ۵، ۱۵، ۲۰ و ۱۰۰ ppm نانو ذرات طلا به روش چاهک بر رشد ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلاهی مقاوم به چند دارو

بالاترین میزان MIC و MBC به ترتیب به میزان ۳۲ ppm/ml و ۶۴ مربوط به باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک و کمترین میزان میزان MIC و MBC به ترتیب به میزان ۳۲ و ۱۶ ppm/ml مربوط به باکتری اشیریشیا کلای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک بود (جدول ۲).

نتایج MIC و MBC بر روی نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای جداسازی شده از بیماران به روش میکروداپلوشن: محلول نانوذرات طلا بر روی کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک نامبرده، مشاهده شد که،

جدول ۲: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات طلا به قطر ۱۰ نانومتر و به شکل کروی با روش میکروداپلوشن در نمونه‌های بالینی و استاندارد بر حسب ppm/ml

MBC(ppm/ml)	MIC(ppm/ml)	نمونه بالینی
۶۴	۳۲	کلبسیلا پنومونیه
32	16	اشیریشیا کلای
MBC(ppm/ml)	MIC(ppm/ml)	نمونه استاندارد
۲۶/۶۵	۱۵/۷۸	کلبسیلا پنومونیه ۱۲۹۰
۱۲/۴۹	۷/۸۰	اشیریشیا کلای ۱۲۷۰

تزریق نانوذرات طلا با غلظت ۱۰۰ ppm نمایش داده شده است.

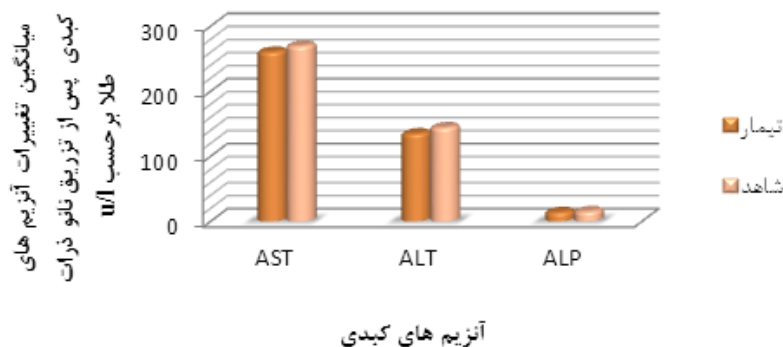
پس از تهیه مقاطع بافتی کبد و لام بافت شناسی، به منظور بررسی تأثیر نانوذرات طلا بر روی بافت کبد، لام‌های بافت‌شناسی کبد موش‌های گروه‌های تیمار و شاهد با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی کلی ۱۰×۴۰ و ۱۰×۱۰ مورد مطالعه قرار گرفتند و تجمع نانوذرات طلا در هپاتوسیت‌ها (Hepatocyte) و سینوزوئیدهای کبدی (Liver Sinusoid) بررسی شد. طبق بررسی‌های انجام شده هیچ گونه اختلالی حاصل از تأثیر نانو ذرات طلا در بافت کبد مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج هیستوپاتولوژیکی نانو ذرات طلا بر روی کبد موش‌های Balb/C:

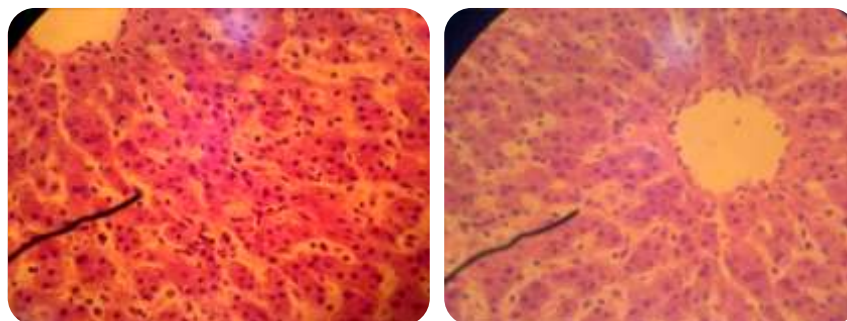
همچنین یافته‌های حاصل از این پژوهش در شرایط داخل بدن بر روی موش‌های نر نژاد Balb/C نشان داد که این نانو ذرات کروی شکل به اندازه ۱۰ نانومتر و غلظتی برابر ۱۰۰ ppm پس از سپری شدن یک ماه از زمان تزریق درون صفاقی به موش‌های تحت آزمایش، تغییرات محسوسی را در وزن و میزان آنزیم‌های کبدی این حیوانات آزمایشگاهی نشان نداد و موجب تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت کبد موش‌های تیمار در مقایسه با موش‌های شاهد نیز نشد. با توجه به جدول ۳ میانگین وزن موش‌های نژاد Balb/C قبل و بعد از

جدول ۳: میانگین وزن موش‌های نر نژاد Balb/C قبل و بعد از تزریق نانوذرات طلا با غلظت ۱۰۰ ppm (P-Value > ۰/۰۵)

گروه	میانگین وزن موش	قبل از تزریق (gr)	بعد از تزریق (gr)
شاهد		۲۵/۳۶±۱۱/۸۷	۳۶/۴۶±۱۵/۴۶
تیمار		۲۹/۱۰±۱۲/۵۹	۳۸/۶۲±۱۷/۵۳



نمودار ۱: میانگین آنزیم‌های کبدی موش‌های نر نژاد Balb/C، پس از تزریق نانوذرات طلا



شکل ۲: سلول‌های بافت کبد موش‌های تیمار و شاهد پس از تزریق نانوذرات طلا با بزرگنمایی ۱۰×۴۰

بحث

اشریشیا کلاهی عموماً به عنوان یک عامل بیماری‌زای آنتی‌بیوتیک دوست شناخته می‌شود که در طی دو دهه گذشته سیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن، روندی رو به رشد داشته است. عفونت‌های دستگاه ادراری از نظر شیوع، رتبه دوم را پس از عفونت‌های تنفسی دارند (۴). اهمیت عفونت‌های ادراری از نظر عوارض بسیار جدی که در نتیجه عدم تشخیص و درمان نامناسب به وجود می‌آید بر کسی پوشیده نیست (۴). اشریشیا کلاهی از عوامل اتیولوژیک عفونت‌های مجاری ادراری می‌باشد و ۹۵ درصد موارد از این نوع عفونت را به خود اختصاص می‌دهد. آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین در گذشته از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی بودند که در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری در اولویت قرار داشتند ولی با گسترش سریع مقاومت دارویی در سویه‌های اشریشیا کلاهی،

این مطالعه بر روی باکتری‌های گرم منفی مسئول عفونت‌های بیمارستانی انجام گرفت. نوآوری این پژوهش در فعالیت‌های ضدباکتریایی نانوذرات طلا بر علیه باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک می‌باشد. همچنین نانوذرات طلا عاملی نوید بخش برای ژن و دارورسانی بوده و مکمل مفیدی برای بسیاری از ابزارهای انتقال سنتی به حساب می‌آید. ترکیب ویژگی‌هایی نظیر سمیت کم، سطح بالا و پایداری مناسب منجر به ایجاد خواص منحصر به فرد می‌شود و مسیر دارورسانی جدیدی را مهیا می‌سازد. نکته مهم این است که در این چند دهه اخیر از نانوذرات طلا به عنوان یک آنتی‌باکتریال قوی استفاده می‌کنند به طوری که می‌توان گفت نانوذرات به ویژه نانوذرات طلا در حذف باکتری‌های مقاوم به دارو نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۱۵).

هم‌خوانی دارد، شایان ذکر است که روش تعیین مقاومت دارویی باکتری در هر دو مطالعه یکسان بوده است (۴).

کلبسیلاها پاتوژن فرصت طلبی از خانواده انتروباکتریاسه هستند که موجب سپتی سمی، باکتری می، آنتریت نوزادان، مننژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم می‌شوند (۸). کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد (۲۵) و همچنین این باکتری از علل مهم عفونت‌های اکتسابی در جامعه و بیمارستان محسوب می‌شوند (۱۷).

نتایج حاصل از تست حساسیت باکتری‌های تحت آزمایش با نتایج ارائه شده توسط محقق مذکور تا حدودی با هم مطابقت دارند و بیشترین مقاومت باکتری‌های مقاوم به دارو در تحقیق ما با پژوهش فوق‌الذکر تا حدودی یکسان است. Aruguete و همکاران واکنش میان نانوذرات و باکتری‌ها و نقش آنها را بر روی محیط مورد بررسی قرار دادند (۷). با در نظر گرفتن تأثیرات محیطی نانوذرات، این که چگونه آنها بر روی باکتری‌ها تأثیر می‌گذارند فقط دارای اهمیت نیست، بلکه چگونگی تحت تأثیر قرار گرفتن باکتری‌ها از خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات نیز دارای اهمیت است.

واکنش میان نانوذرات و باکتری‌ها به خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانوذرات و شرایط فیزیولوژیکی باکتری‌ها بستگی دارد، در طی این پژوهش مشخص شد که خصوصیات مانند اندازه، شکل، لایه‌ها و شرایط آگلومره شدن، ترکیبات شیمیایی معین و خواص فوتوکاتالیستی نانوذرات می‌تواند تأثیرات مستقیمی بر خواص ضدباکتریایی این نانوذرات داشته باشد. مطالعات Aruguete و همکاران نشان از تأیید خواص ضدباکتریایی نانوذرات طلا داشته و با نتایج حاصل از پژوهش ما نیز هم‌خوانی دارند. به خصوص در مطالعه‌ای که بر روی فیبرهای کتان متاثر از نانوذرات طلا انجام شد، ۹۲ درصد باکتری‌های اشیریشیا کلای تحت خاصیت ضد میکروبی فیبرهای کتان آغشته به نانوذرات طلا از بین رفتند (۲۹). حال اگرچه در بررسی ما بر روی باکتری اشیریشیا کلای درصد کمتری از مهار رشد باکتریایی مشاهده شد ولی این اختلافات

این آنتی‌بیوتیک‌ها کارایی خود را در درمان عفونت‌های ادراری از دست دادند (۱،۳).

مقاومت در بین سویه‌های ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری که از شایع‌ترین عفونت‌ها می‌باشند، افزایش یافته و این امر تا حدود زیادی نگران‌کننده است که علت اصلی آن، مصرف نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و مطالعاتی که بر روی آنها صورت گرفته نشان داده است که درصد بالایی از سویه‌ها، دارای مقاومت چندگانه بوده‌اند (۲۷). چنین مقاومت دارویی، سبب مشکلات پیچیده‌ای در درمان‌های تجربی عفونت‌های ایجاد شده توسط اشیریشیا کلای و کلبسیلا پنومونیه می‌گردد (۱). شجری و همکاران الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از بیماران مبتلا به پنومونی بستری شده در بیمارستان شهید بهشتی کاشان را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعات آنها بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری اشیریشیا کلای نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کوتری ماکسازول، در باکتری کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين و سفوتاکسیم، مشاهده شد (۲).

نتایج حاصل از پژوهش این محقق با نتایج به دست آمده از مطالعه ما در مورد حساسیت باکتری اشیریشیا کلای به آنتی‌بیوتیک اریترومايسين مطابقت دارد و در مطالعه حاضر نیز بیش از ۹۰ درصد از سویه‌های اشیریشیا کلای جدا شده نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و اکثر باکتری‌های اشیریشیا کلای تحت آزمایش به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز مقاوم بودند. روش مورد استفاده برای تست آنتی‌بیوگرام در هر دو مطالعه یکسان بوده است. در ایران الگوی مقاومتی باسیل‌های گرم منفی که عامل عفونت‌های بیمارستانی بودند را مورد بررسی قرار دادند (۴). جهت بررسی آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مذکور از روش انتشار دیسک در آگار استفاده شد. آنها اظهار داشتند که بیشترین مقاومت باکتری کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلای نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود که با نتایج حاصل از بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مذکور در پژوهش ما

می‌تواند مربوط به تفاوت در شکل و قطر نانوذرات طلا باشد و همان‌طور که در مطالعه آروگونه و همکاران اشاره شد خواص هر کدام از نانوذرات متأثر از ویژگی‌های درونی آن از جمله قطر نانوذرات می‌باشد(۷).

گریس و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که افزایش اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌هایی مانند استافیلوکوکوس آرتوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلای در شرایط آزمایشگاهی در نانو ذرات طلا به خوبی مشهود است و در این راستا محققان عنوان کرده‌اند که نانو ذرات طلا علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس آرتوس فعال هستند که دلیل فعال بودن آنها را مربوط به لیگاندهای فسفین تری پودال موجود در این نانو ذره دانسته و معتقدند که این لیگاندها می‌تواند باعث افزایش خاصیت آنتی باکتریایی نانو ذرات طلا گردد(۱۵).

سلواراژ و همکاران، در سال ۲۰۱۰ در مورد تیوگوانین باند شده به نانو ذرات طلا مطالعه کردند و اذعان نمودند که با این عمل اثر ضدسرطانی و ضد میکروبی این نانوذرات بیشتر می‌شود. در طی این تحقیق نانو ذرات طلا همراه با حامل اثر گذارش یعنی تیوگوانین به عنوان دارویی برای درمان سرطان و عفونت‌های باکتریایی استفاده شد(۲۴). تحقیقات مختلفی بر روی فعالیت‌های ضدباکتریایی نانوذرات طلا انجام گرفته است که نشان می‌دهد در حضور حداقل غلظت مهاری، نانوذرات طلا فعالیت‌های ضدباکتریایی بیشتری نسبت به برخی از آنتی بیوتیک‌ها دارند. تحقیقات محققان حاکی از آن است که در مورد اسید نالیدکسیک (Nalidixic Acid)، نانوذرات طلا اثر سینرژیک (Synergic) در فعالیت‌های ضدباکتری در برابر تعدادی از سویه‌های باکتریایی نشان داده است(۱۵،۲۴). شواهد قابل دسترس و حاصل از تحقیق Zharov مکانسیم تأثیر ضدباکتریایی واکنش‌های فوتوکاتالیکی نانوذرات طلا را نشان می‌دهد. در طی مطالعه این محقق و همکاران مشخص شده است که آسیب اکسیداتیو اولیه روی دیواره سلولی رخ می‌دهد که در آن سطوح فوتوکاتالیستی نانوذرات طلا تماس اولیه با سلول سالم را

فراهم می‌آورد. پس از، از بین رفتن حفاظت دیواره سلولی آسیب اکسیداتیو در غشای سیتوپلاسمی صورت می‌گیرد. از طرف دیگر فعالیت فوتوکاتالیستی به تدریج نفوذپذیری سلول را افزایش می‌دهد و محتویات درونی سلول آزاد شده و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. همچنین ممکن است نانوذرات طلای آزاد، دسترسی به غشای سلول‌های آسیب دیده را به دست آورد و حمله مستقیم بعدی بر روی اجزای داخل سلولی می‌تواند مرگ سلول‌ها را تسریع کند(۳۰). Puckett و همکاران ارتباط میان سطوح نانوذرات طلا و اتصال باکتریایی را بررسی کردند. آنها اذعان داشتند که نانوذرات طلا با قطر ۲۰ نانومتر باعث مهار رشد و کاهش چسبندگی باکتری‌هایی مانند استافیلوکوکوس آرتوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. در تحقیق حاضر نیز نانوذرات مذکور با قطری حدود ۱۰ نانومتر مانع رشد باکتری کلبسیلا پنومونیه شدند(۲۱). سمیت و تخریب زیستی نانوذرات طلا را بر روی موش‌های ماده و یستار بررسی کردند. نتایج حاصل از تحقیق آنها نشان داد که نانوذرات طلا که به صورت خوراکی از طریق دهان به این موش‌ها داده شده بود، پس از این که جذب دستگاه گوارش شد، قابلیت انتقال به سایر بافت‌های بدن از جمله کبد، کلیه، طحال و ریه را دارد. البته سایز نانوذرات مورد استفاده در این تحقیق حدود ۲۵ نانومتر بود. در طی این پژوهش اثبات شد که تأثیرات نانوذرات طلا بر روی بافت کبدی باعث تخریب آن و اختلال در میزان آنزیم‌های کبدی شده است(۳۱). در مطالعه‌ای دیگر اثر سمیت نانو ذرات طلا در شرایط آزمایشگاهی بر روی موش‌هایی از نژاد Balb/c را مورد بررسی قرار دادند. این محققان نانو ذرات طلا را در سایزهای ۳ تا ۱۰۰ نانومتر طی ۸ هفته به موش‌ها تزریق کردند. پس از انجام آزمایشات در سایز ۳، ۵، ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر هیچ‌گونه اثر سمیتی در بدن موش‌ها ظاهر نگردید و همچنین با تشریح بافت کبدی، طحال و ریه موش‌ها هیچ‌گونه عارضه‌ای مشاهده نگردید. ولی در سایزهای ۸، ۱۲، ۱۷، ۳۷ نانومتر بیماری در موش‌ها ظاهر گردید و سلول‌های کویپر در بافت کبدی افزایش یافت و بافت ریه و

همچنین بررسی تاثیرات انواع نانوذرات و مقایسه تاثیرات آنتی‌باکتریالی آنها با یکدیگر پرداخت تا بتوان با اطمینان بیشتری از عدم سمیت و آثار جانبی نانو ذرات طلا، از آنها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیکی استفاده نمود.

نتایج حاصل از مقایسه بین این تحقیق و سایر مطالعات نشان می‌دهد نانوذرات طلا به دلیل دارا بودن خواص ضدباکتریایی می‌تواند در درمان بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های بررسی شده مؤثر باشد. البته با توجه به نتایج محققان و با توجه به نتایجی که از این مطالعه به دست آمد، در صورتی می‌توان استفاده گسترده‌ای از نانوذرات طلا برای درمان باکتری‌های عفونت‌زای مقاوم به چندین دارو بکار گرفت که چندین سال نه تنها بر روی موش‌های آزمایشگاهی بلکه بر روی سایر حیوانات آزمایشگاهی نظیر هامستر، خوکچه هندی، میمون چنین مطالعات مشابهی نیز انجام گیرد (۱۵) و اثرات دراز مدت این نانوذرات بررسی شود. همچنین می‌بایست از نظر آلودگی محیط زیست مانند تأثیرات نانوذرات بر روی اکوسیستم‌های آبی و خشکی‌ها و سایر مسائلی که محیط زیست را به مخاطره می‌اندازد، دلایلی بر عدم سمیت این ترکیبات بر روی محیط‌زیست به اثبات برسد. لذا در نهایت می‌توان گفت پس از در نظر گرفتن تمامی این موارد و با توجه به توان بالقوه نانوذرات طلا در زمینه‌های مختلف پزشکی، داروسازی، صنعت و سایر بخش‌ها می‌توان از آنها به طور وسیع استفاده کرد.

سیاسگزاری

ابتدا از خدای منان و سپس از خانم دکتر نقش و سرکار خانم شادی شاهسار مسئول آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و همچنین مرکز پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران و جناب آقای دکتر شکری تشکر ویژه می‌نماییم.

طحال دچار اختلال شدید شدند (۹). در تحقیق حاضر نانوذرات طلا کروی شکل با قطری حدود ۱۰ نانومتر به صورت درون صفاقی به موش‌های ماده نژاد BaLb/C تزریق شد و پس از یک ماه تیمار تغییر معنی‌داری در وزن موش‌های تحت آزمایش و میزان آنزیم‌های کبدی ایجاد نکرد. بدیهی است که این اختلاف در نتایج ممکن است ناشی از اختلاف در نوع، قطر و غلظت نانوذرات و نژاد موش‌های مورد بررسی باشد. اکثر تحقیقات نشان داده‌اند که نانوذرات با اندازه‌ای کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر سمیت بیشتری داشته و دارای خواص ضدباکتریایی قوی‌تری می‌باشد. به خصوص نانوذره نقره که بررسی‌های زیادی بر روی آن انجام شده و بیشتر نتایج حاصل از این بررسی‌ها حاکی از آن است که خواص ضد میکروبی آن بیشتر از سایر نانوذرات از جمله نانوذرات طلا است. مزیت کاربرد نانوذرات طلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم مقاومت باکتری‌ها به این نانوذرات، طیف اثر وسیع و عدم اثرگذاری سوء بر سلول‌های انسانی است (۲۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به توان بالقوه نانوذرات طلا در تاثیر بر ایزوله‌های بالینی بیماری‌زا امکان استفاده از آنها در درمان بیماری می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در صورتی می‌توان استفاده‌های گسترده‌ای از نانوذرات طلا برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها کرد که ابتدا بر روی حیوانات آزمایشگاهی مطالعاتی انجام شود و اثرات دراز مدت این نانوذرات بررسی گردد. همچنین لازم است از نظر آلودگی محیط‌زیست، دلایلی بر عدم سمیت این ترکیبات بر روی محیط زیست به اثبات برسد. در آینده می‌توان به بررسی تاثیر نانوذرات طلا بر روی سایر باکتری‌های مقاوم به دارو و

References:

- 1-Babypadmini S, Appalaraju B. *Extended spectrum -lactamases in urinary isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae - prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital*. Indian J Med Microbio 2004; 22(3): 172-74.
- 2-Altöparlaku E, Akcay Mn, Celebi F, Kadanali A. *The Time-related changes of antimicrobial resistance patterns*. body flora of burned patients. Burns 2004;7: 660-64.
- 3- Khalili Mb, Sharifi Yazdi Mk, Ebadi M, Sadeh M. *Correlation between urine analysis and urine culture in the diagnosis of urinary tract infection in yazd central laboratory*. tehran Uni Med J 2007; 65(9): 53-8. [persian]
- 4-Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*. Clin. Microb Rev 1998; 11(4); 589-603.
- 5-Fridkin SK, Welbel SF, Weinstein RA. *Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit*. Infect Dis Clin North Am 1997; 11: 479-96.
- 6-Kermanshahi Rk, Hossein Khani B. *Nanobiotechnology and microbiology perspective*. Isfahan, isfahan Uni public 2008. p. 20-63.
- 7-Aruguete DM, Hochella MF. *Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications*. jr. environ Chem 2010; 7(1): 3-9.
- 8-Savas L, Guvel S, Onlen Y, Savas N, Duran N. *Nosocomial urinary tract infections: microorganisms, antibiotic sensitivities and risk factors*. West Indian Med J 2006; 55(3): 188-93.
- 9-Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. *Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology*. Nanotechnol Sci 2008; 1: 17-32.
- 10- Chen A. *Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles*. 2009; 12(4): p. 527-34.
- 11- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. *Gold Nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. small 2005; 1(3): 325-27.
- 12- Fazeli H, Moslehi Z, Irajian GH, Salehi M. *Pattern of drug resistance and betalactamase genes VIM in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients,accidental burns*. J Med Microbio 2009; 3(4): 1-8. [Persian]
- 13- Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Da Silva GJ, Walsh T, Mendo S. *First description of Klebsiella pneumoniae clinical isolates carrying both qnrA and qnrB genes in Portugal*. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(6): 584-86.
- 14- Gannon CJ, Patra CR, Bhattacharya R, Mukherjee P, Curley SA. *Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radio frequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells*. J Nanobiotechno 2008; (6)2: 10-1186.

- 15- Grace AN, Pandian K. *Quinolone Antibiotic-Capped Gold Nanoparticles And Their Antibacterial Efficacy Against Gram Positive And Gram Negative Organisms*. J Bionanoscience 2007; 1(2): 96-105.
- 16- Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. *Structure of New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1)*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2011; 67(10): 1160-64.
- 17- Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. *Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA Methylase Genes Amongst Clinical Klebsiella pneumoniae Isolates Carrying Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants*. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(4): 352-55.
- 18- Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. *World Health Day 2011: Antimicrobial Resistance and Practical Solutions*. Ann Acad Med Singapore 2011; 40(4): 156-52.
- 19- Mustafa OA, Yusuf D. *Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of Klebsiella pneumoniae isolated from urinary system infection*. World App Sci J 2009; 6(5): 630-36.
- 20- Pissuwan D, Cortie CH, Valenzuela SM, Cortie MB. *Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria*. Trends In Biotechno 2010; 28(4): 207-13.
- 21- Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. *The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment*. J biomater 2010; 31(4): 706-13.
- 22- Rai A, Prabhune A, Perry CC. *Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings*. J mater Chem 2010; 20(32): 6789-98.
- 23- Salata OV. *Application of nanoparticles in biology and medicine*. J nano biotechno 2004; 2(1): 3.
- 24- Sellvaraj V. *Antimicrobial And Anticancer Efficiency Of Antineoplastic Agent Capped Gold Nanoparticles* 2010; 15(4): P. 897-900.
- 25- Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in Both Antimicrobial Resistance and Virulence*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(4): 1485-93.
- 26- Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. *Occurrence of qnr-positive clinical isolates in Klebsiella pneumoniae producing ESBL or AmpC-type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China*. FEMS Microbiol Lett 2008; 283(1): 112-16.
- 27- Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. *Presence of qnr gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China*. BMC Infect Dis 2008; 8(1): 1.
- 28- Wang F. *Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multi drug resistance in cancer cells*. 2011; 25(5). p: 79-92.

- 29- Centers for Disease Control and Prevention. *Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States (executive summary)*. Morbid Mortal Wkly Rep 1994; 43(R18).
- 30- Central Intelligence Agency. *The global infectious disease threat and its implications for the United States*. (accessed 2002 July 28).
- 31- Wang Lm, Shen W, Zhang Hf, Wang Gch, Ding W, Qing Wt. *Effect of nanogold particles surface modification on antibacterial properties of cotton fabrics*. J fiber bioengineering informatics 2010; 10: 224-23.
- 32- Zharov Vp, Mercer KE, Galitovskaya EN, Smeltzer MS. *Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles*. biophys J 2006; 90(2): 619-27.

Antibacterial Effects of Gold Nanoparticles on Multi-drug Resistant Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli and Its Effect on the Liver of Balb/C mice

Rahimzade Torabi L (MSc)^{*1}, Douidi M (PhD)², Noori A (PhD)³

^{1,2} Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

³ Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Received: 11 Oct 2015

Accepted: 14 Jan 2016

Abstract

Introduction: The gold nanoparticles as other nanoparticles have catalytic, magnetic, optical, and biological (antimicrobial) properties. On the other hand, resistance to antibiotics is one of the greatest public health problems posed in the world. Therefore, the present study aimed to investigate the antibacterial effects of gold nanoparticles on multi-drug resistant klebsiella pneumoniae as well as escherichia coli and its effect on the liver of balb/c mice.

Methods: In this study, multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli bacteria clinical samples were utilized that were isolated from several hospitals in Isfahan and then the toxic effects of nanoparticles were investigated on the Balb / C mice. Colloidal gold nanoparticles were also applied with spherical shape and a concentration of 200 ppm in size of 10 nm, using two wells and disk agar diffusion method. Antibacterial properties of the nanoparticles were evaluated within 1-3 days with 37 °c temperature, and diameter of inhibitory zone of growth was measured every day. Tissue and liver enzymes of the mice were examined, as well.

Results: The greatest diameter of inhibitory zone was detected in multi drug resistant E. coli. Most of the MIC and MBC were found in multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae bacteria. Gold nanoparticles did not reveal any significant changes on the weight, liver enzymes and liver tissue of Balb / C mice after one month.

Conclusion: As the findings of the current study revealed, inhibitory effect of gold nanoparticles was observed on the axamined microorganism. Although the laboratories findings are promising, more studies should be conducted in regard with therapeutic standardization.

Keywords: Balb/C mice; Escherichia coli; Gold nanoparticles; Klebsiella pneumoniae; Liver; Multi Drug Resistant (MDR)

This paper should be cited as:

Rahimzade Torabi L, Douidi M, Noori A. *Antibacterial effects of gold nanoparticles on multi-drug resistant klebsiella pneumoniae and escherichia coli and its effect on the liver of balb/c mice*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 23(10): 1001-17.

***Corresponding author: Tel: 09135618257, Email: negar.rahimz@gmail.com**