مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۱۲، اسفند ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدباکتریایی نانو ذره مشتق جدید اسپایرواکس ایندول روی ایزوله‌های اشریشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بیمارستان‌های شهر کرج

پرستو سعادتی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

اکرم سادات طباطبایی بفرویی: استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
a.tabatabaee@iauet.ac.ir

لیلا جبل عاملی: استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

سمیه مکارم: استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل افزایش عفونت دستگاه ادراری ناشی از سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، توسعه عوامل ضد میکروبی موثرجدید به ویژه ترکیبات بیولوژیک مبتنی بر نانوذرات نیاز ضروری می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره یک مشتق جدید اسپایروکس ایندول علیه ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBLs از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری قرار گرفت.

روش کار: این مطالعه مشاهدای – توصیفی روی ۶۰ ایزوله *اشرشیاکلی* بدست امده از بیمارستان‌های شهر کرج، انجام شد. ایزوله‌ها با آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. حساسیت ضدمیکروبی ایزوله‌ها نسبت به سفپیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم توسط روش انتشار دیسک سنجیده شد. مولدین بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آزمون دیسک ترکیبی شناسایی شدند. نانوذرات مشتق جدید اسپایرواکس ایندول با روش الکتروسنتز اماده شدند و توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند. روش میکرودایلوشن براث جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) نانوذرات به کار گرفته شد.

یافته‌ها: مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶۰ ایزوله عبارتند از: سفپیم ۲۳/۳۳٪، سفتازیدیم ۱۶/۶۶٪، سفتریاکسون ۳۰٪ و سفوتاکسیم ۳۱/۶۶٪. بر اساس آزمون تایید فنوتیپی، ۱۴ ایزوله به عنوان *اشرشیاکلی* مولد ESBLs شناسایی شدند. مقدار MIC نانوذرات اسپایرواکس ایندول مورد مطالعه ۵۰ μg/ml بدست امد.

نتیجه‌گیری: با انجام مطالعات بیشتر، می‌توان نانوذره اسپایرواکس ایندول مورد مطالعه را به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی جدید معرفی کرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

کلیدواژه‌ها

نانوذرات اسپایرواکس ایندول، اشرشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، عفونت دستگاه ادراری

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

شیوه استناد به این مقاله:

Saadati P, Tabatabaee Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β-Lactanases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran. Razi J Med Sci. 2020;26(12):56-66.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

Razi Journal of Medical Sciences.2020;26(12):56-66. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β-Lactanases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran

Parastoo Saadati, MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Akram Sadat Tabatabaee Bafroee, Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding author) a.tabatabaee@iauet.ac.ir
Leila Jabalameli, Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Somayeh Makarem, Assistant Professor of Analytical chemistry, Department of chemistry, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background: Due to the increase in urinary tract infection (UTI) caused by Extended-Spectrum β-lactamases (ESBLs) producing *Escheria.coli* strains and their resistance to conventional antibiotics, the development of new effective antimicrobial agents particularly nanoparticle based biological compounds is urgently required. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of a new derivative of spirooxindole nanoparticles against ESBLs producing *E. coli* isolates obtained from patients with UTI.

Methods: This descriptive-observational study was performed on 60 *E. coli* isolates from Karaj city hospitals. Isolates were identified by standard biochemical tests. Antimicrobial susceptibility of isolates against Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, was determined using the Disk Diffusion Method. The new derivative of spiroxindole nanoparticles was prepared by electrosynthesis and examined with a scanning electron microscopy (SEM). ESBLs producing isolates were detected by the Combined Disk test. The broth microdilution method was performed to determine the Minimum inhibitory concentration (MIC) of nanoparticles

Results: Antibiotic resistance of 60 *Escherichia coli* isolates was as follows: Cefepime 23.33%, Ceftazidime 16.66%, Cetfriaxone 30% and Cefotaxime 31.66%. 14 ESBLs producing *Escherchia coli* isolates were identified by a phenotypic confirmatory test. The MIC value of the understudied spirooxindole nanoparticles was obtained to be 50µg/ml.

Conclusion: Undertaking further studies, the understudied spirooxindole nanoparticle can be introduced as a new antibacterial compound.

Conflicts of interest: None
Funding: Islamic Azad University, Kraj Branch

Keywords
Spirooxindole nanoparticles,
Escherichia coli,
ESBLs,
Urinary Tract Infection

Received: 31/08/2019
Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:
Saadati P, Tabatabaee Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β-Lactanases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran. Razi J Med Sci. 2020;26(12):56-66.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

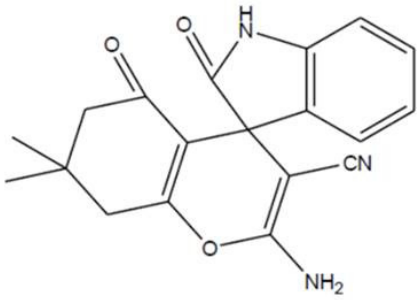
مقدمه

بیماران مراجعه‌کننده به بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها در معرض کسب عفونت‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی خصوصاً با باکتری‌های مقاوم به چند دارو می‌باشند. یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در عفونت‌های بیمارستانی، عفونت با باسیل‌های گرم منفی، ازجمله باکتری *اشریشیا کولای* است که عامل بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های ادراری و یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. از آنجایی که تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل و درمان بیماری‌های عفونی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها از مهم‌ترین اقدامات محسوب می‌شود، مقاومت باکتریایی نسبت به این داروها فواید بالینی این داروها را به خطر می‌اندازد. استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended Spectrum β-- ESBLs Lactanases) می‌باشد، آنزیم‌هایی که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها واسطه ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها (نسل سوم) ازجمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و همچنین منو باکتام‌ها مانند آزترئونام محسوب می‌شوند. میزان تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در انتروباکتریاسه‌ها در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان‌دهنده بیشترین میزان تولید ESBLs به ترتیب توسط *کلبسیلا نمونیه* و *اشریشیا کلی* می‌باشد (۲،۱).

از انجایی‌که، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به سطح بحرانی رسیده و متأسفانه هیچ تضمینی وجود ندارد که با توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید، بتوان به موقع بر گسترش پیوسته و سریع مقاومت غلبه کرد؛ بنابراین، درمان بیماری‌های عفونی نیاز به راه‌حل‌های بلند مدت دارد. اخیراً کشف ساختارهای جدید، به عنوان استراتژی کارآمد برای دست‌یابی به مولکول‌های زیستی اثربخش که بتوانند برخی عوامل بیولوژیکی را مورد هدف قرار دهند، به رسمیت شناخته شده است. ترکیبات اسپایرو به دلیل خواص بیولوژیکی برجسته، ویژگی‌های سازگاری قابل توجه و ساختارهای سه بعدی منحصربه‌فرد و وفورشان در محصولات طبیعی متعدد و مولکول‌های فعال بیولوژیکی، مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. مشخصه ساختاری کلیدی این ترکیبات، حلقه اسپایرو متصل به موقعیت C_3 هسته اکس ایندول با اشکال هتروسیکلیک متنوع می‌باشد. از آنجا که این اسپایرواکس ایندولها همزمان دارای اکس ایندول و اشکال هتروسیک می‌باشند، به نظر می‌رسد کاندیداهای نویدبخش برای کشف دارو باشند (۴،۳). مطالعات نشان داده‌اند، ترکیبات حاوی هسته اسپایرواکس ایندول دارای خواص بیولوژیکی متنوعی نظیر ضد سرطان (۵)، ضد میکروبی (۶)، ضد ویروس (۷) و غیره می‌باشند.

نانو ذرات با خواص ضد میکروبی طیف وسیعی از ذرات را شامل می‌شوند که می‌توان فلزات، اکسید فلزات، سوبستراهای ضد میکروبی طبیعی و نانو مواد بر پایه کربن را نام برد. نانو ذرات به دلیل اندازه کمی که دارند سطح تماس بیش‌تری با فضای بیرون داشته و تأثیر بیشتری بر غشاء سلول‌ها می‌گذارند. افزایش سطح، واکنش‌پذیری نانو مواد را به‌شدت افزایش می‌دهد. این ذرات در زمینه کنترل بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند و پاتوژن‌های میکروبی قادر به توسعه مقاومت در مقابل این ذرات نمی‌باشند (۸، ۹). در دهه‌های اخیر، تعداد زیادی از اسپایرواکس ایندول بر پایه واسطه‌های ایلید در شرایط آزمایشگاهی سنتز شدند و از نظر فعالیت ضدمیکروبی علیه انواع مختلفی از باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که منجر به کشف ترکیباتی با قدرت بالای ضدمیکروبی شد (۱۲،۱۱، ۱۰) ولی تاکنون این دسته از ترکیبات به فرم نانو ذره مورد بررسی قرار نگرفته است؛ بنابراین در این تحقیق، مشتق جدیدی از اسپایرواکس ایندول‌ها (شکل ۱) به صورت نانو ذره سنتز شد و اثرات ضدباکتریایی آن روی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]



شکل ۱- ۲- آمینو-۷و۷-دی متیل-۲و۵-دی اکسو-۵و۶و۷و۸-تتراهیدرو اسپایرو {کرومن-۴و۳-ایندولین}-۳-کربونیتریل

روش کار

مواد: تمامی محیط‌های کشت و مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق از شرکت مرک (کشور المان) تهیه گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند.

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *اشرشیا کلی*: این مطالعه توصیفی- مقطعی برروی بیماران مشکوک به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی و بیمارستان کسری شهر کرج با رعایت اصول اخلاقی (کد مصوبه کمیته اخلاق IR.IAU.K.REC.1396.031) در فاصله زمانی اسفند ۹۵ تا اخر اردیبهشت ۹۶ صورت گرفت. جهت جداسازی *اشرشیا کلی*، نمونه‌های ادرار بر روی محیط کشت مک کانکی اگار و ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و ایزوله ها با استفاده از تستهای بیوشیمیایی متداول ازجمله آزمایش احیاء نیترات، متیل رد- وژپروسکوور (MR-VP)، بررسی H2S-ایندول- حرکت (SIM) و سیمون سیترات (CS)، اوره و تخمیر گلوکز در محیط تریپل شوگر ایرن اگار (TSI) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳).

غربالگری ایزوله‌های مولد ESBLs به روش فنوتیپی: به منظور غربالگری اولیه ایزوله‌های مولد ESBLs از روش انتشار دیسک در اگار (Disk diffusion method Kirby bauer-) مطابق با دستورالعمل موسسه استاندارد CLSI استفاده شد (۲). بدین صورت که مایع تلقیح استاندارد شده (کدورتی معادل ۰/۵ مکفارلند) ایزوله‌های مورد مطالعه در محیط کشت مولرهینتون اگار تلقیح شدند. سپس دیسکهای آنتی‌بیوتیک در فواصل مشخص روی محیط کشت قرار داده شدند و

جدول ۱- قطر هاله‌های مبنا برای تعیین میزان حساسیت انتی بیوتیکی سویه‌های انتروباکتریاسه

آنتی بیوتیک	حساس (میلیمتر)	میانه (میلیمتر)	مقاوم (میلیمتر)
سفپیم	>۱۸	۱۷-۱۵	<۱۴
سفتازیدیم	>۱۸	۱۷-۱۵	<۱۴
سفتریاکسون	>۲۱	۲۰-۱۴	<۱۴
سفوتاکسیم	>۲۳	۲۲-۱۵	<۱۴

پلیتها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند. پس از گذشت زمان گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش اندازه گیری و تفسیر آن با توجه به جدول CLSI برای *اشرشیاکلی* صورت گرفت (جدول ۱). سویه استاندارد *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲ نیزبه عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل سفپیم (CFP,۳۰ µg)، سفتازیدیم (CAZ, ۳۰µg)، سفتریاکسون (CRO , ۳۰ µg) و سفوتاکسیم (CTX, ۳۰ µg) بودند.

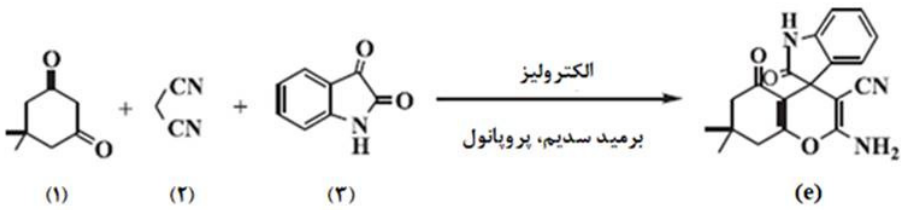
تایید فنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs: تولید ESBLs با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی (Combined Disk test) تعیین گردید (۲). در این روش که مشابه ازمون انتشار دیسک در اگار صورت گرفت، از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتازیدیم - اسید کلاولانیک (۱۰/۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم - اسید کلاولانیک (۱۰/۳۰µg) و سفتریاکسون، سفتریاکسون- اسید کلاولانیک استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله حداقل ۲۴ میلی متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. بعد از گرماگذاری به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی اسید کلاولانیک به عنوان مهار کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف نسبت به بدون اسید کلاولانیک سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی اسید کلاولانیک بزرگتر یا مساوی ۵ میلی متر نسبت به بدون اسید کلاولانیک باشد، ایزوله مورد نظر را میتوان بر طبق استاندارد CLSIبه عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت. از طرفی به پیشنهاد این موسسه، ایزوله‌هایی که در تست فنوتیپی تاییدی اثر بتالاکتاماز در آنها به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

وسیله مهار کننده بتالاکتامازی مهار نمی‌شود، به عنوان مولدین بتالاکتامازهای نوع AmpC محسوب می‌شوند. در این ازمون از سویه استاندارد *اشرشیا کلی* ۲۵۹۲۲ ATCC نیزعنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد.

سنتز نانو ذره ۲- آمینو-۷ و ۷-دی متیل-۲ و۵-دی اکسو-۵و۶و۷و۸- تتراهیدرو اسپایرو {کرومن-۴و۳-ایندولین}-۳-کربونیتریل با روش الکتروسنتز: جهت تهیه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول، مخلوطی از دایمدون ۱(ا میلی مول، ۰/۱۴۰ گرم)، مالونونیتریل۲ (۱ میلی مول، ۰/۰۶۶ گرم)، آیزاتین ۳ (۱ میلی مول، ۰/۱۴۷ گرم)، سدیم بروماید (۰/۵ میلی مول، ۰/۵۱۰ گرم) و ۲۵ میلی لیتر پروپانول به مدت ۹۰ دقیقه با جریان ثابت ۰/۵ آمپر در c ۵۰° روی همزن مغناطیسی همگن شدند (شکل ۲). بعد از کامل شدن واکنش، روش کروماتوگرافی لایه نازک (*n*-هگزان/اتانول: ۳/۱) به کار گرفته شد. سپس به محصول، ۲۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه گردید و رسوبات حاصل با سانتریفیوژ جدا شدند. به منظور تایید مورفولوژی نانوذره از تکنیک میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (Scanning Electron Microscope) استفاده شد. در این روش، مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا به وسیله انالایزر axl30 در ولتاژ ۲۰کیلووات، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) نانوذرات -آمینو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۵،۶،۷،۸- تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل علیه ایزوله‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBLs: به منظور تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات مشتق اسپایرواکس ایندول سنتز شده در تحقیق حاضر، روش میکرودایلوشن براث در چاهک ۹۶ خانه ای به کارگرفته شد (۱۵). ابتدا، غلظت‌های ۱۰۰۰-۳/۹ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره مشتق اسپایرواکس ایندول در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث در هرکدام از چاهکها، در هر ردیف تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلند به چاهکها اضافه گردید. محیط کشت مولرهینتون براث با و بدون سوسپانسیون باکتری و همچنین یک چاهک حاوی دی متیل سولفواکساید (Dimethyl sulfoxide -DMSO) (حلال نانوذره مورد بررسی) جهت بررسی خاصیت انتی باکتریال احتمالی حلال در نظر گرفته شدند. میکروپلیتها به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. کدورت تمام چاهکها با استفاده از دستگاه قرائت گرالایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد. پایین ترین غلظتی که از رشد باکتری جلوگیری کرد و فاقد کدورت بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (Minimum Inhibitory Concentration) ماده ضد میکروبی درنظرگرفته شد. این آزمایش ۳ بارتکرار گردید و میانگین داده های به دست آمده به عنوان MIC تعیین گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) (Minimum Bactericidal Concentration) به میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری درآن ها متوقف شده است برداشته شد و به پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار فاقد نانو ذره مورد نظر منتقل گردید و به مدت ۲۴ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس با بررسی پلیت‌ها، پایین ترین غلظتی که درآن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC درنظرگرفته شد.



شکل ۲- سنتز اسپایرواکس ایندول: ۲- آمینو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۵،۶،۷،۸- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

یافته‌ها

نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *اشرشیا کلی*: از نمونه‌های ادراری جمع‌آوری شده، ۶۰ ایزوله *اشرشیا کلی* جداسازی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی رایج تایید شدند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله ها و تایید فنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs: نتایج بررسی آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و سفپیم روی ایزوله‌های *اشرشیا کلی* در جدول ۲، مشخص شده است. در بررسی فنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs ۱۴، ایزوله از ۶۰ ایزوله *اشرشیا کلی* مولد ESBLs بودند.

جدول ۳، تعداد ایزوله‌های *اشرشیا کلی* مقاوم به بیش از دو آنتی‌بیوتیک و الگوی مقاومتی انها را نشان می‌دهد.

نتیجه بررسی مورفولوژی نانوذره نانو۲- آمینو-۷،۷- دی متیل-'۲، ۵- دی اکسو-۵،۶،۷،۸- تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل: نتایج بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان داد که نانوذره سنتز شده، کروی می‌باشد و میانگین سایز ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر است (شکل۳).

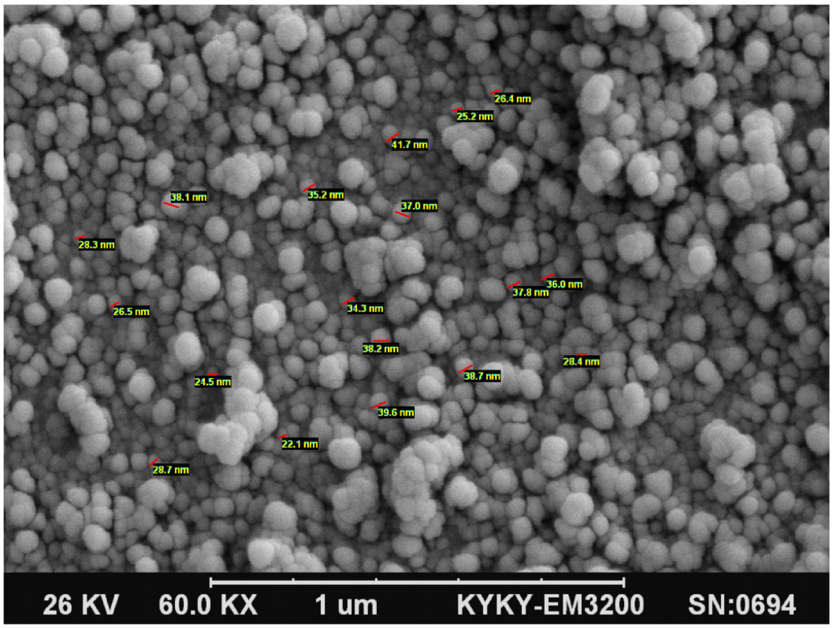
تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و

جدول ۲- بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشرشیا کلی*

آنتی بیوتیک‌ها	مقاوم	تعداد ایزوله‌ها	
		حساس	میانه
سفتازیدیم	۱۰	۴۲	۸
سفتریاکسون	۱۸	۴۰	۲
سفوتاکسیم	۱۹	۳۹	۲
سفپیم	۱۴	۴۴	۲

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های مقاوم به چند دارو *اشرشیا کلی*

آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله‌های مقاوم
سفتازیدیم (CAZ) – سفوتاکسیم (CTX) سفتریاکسون (CRO) - سفپیم(FEP)	۷
سفتریاکسون (CRO) – سفوتاکسیم (CTX)–سفتازیدیم (CAZ)	۱
سفپیم (FEP)– سفوتاکسیم (CTX)–سفتریاکسون (CRO)	۸
سفوتاکسیم (CTX)– سفتریاکسون(CRO)	۸
جمع	۲۴



شکل ۳- تصویر SEM نانوذره ۲-آمینو-۵-نیترو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۵،۶،۷،۸- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل (۱۴)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

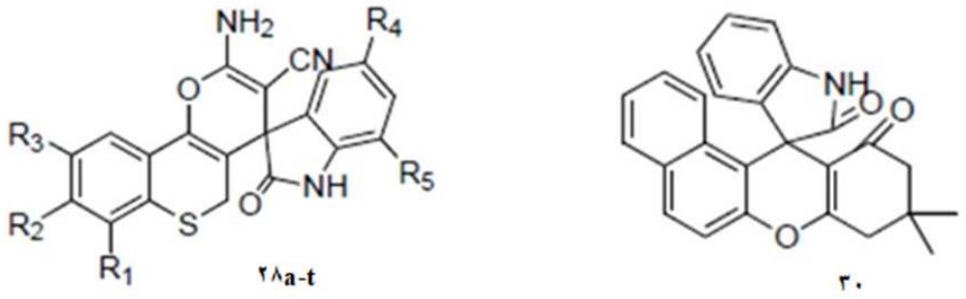
حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات مشتق اسپایرواکس ایندول: با توجه به نتایج روش براث میکرودایلوشن، غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره ۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۲'، ۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل نه تنها از رشد باکتریها جلوگیری کرد بلکه این غلظت منجر به از بین رفتن باکتریها نیز شد؛ بنابراین، مقدار MIC نانوذرات مورد بررسی معادل مقدار MBC آن بدست امد.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میان باکتری‌های پاتوژن موضوعی است که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه است. عفونت دستگاه ادراری از شایع ترین عفونت ها محسوب می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی ازجمله سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سالهای اخیر مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها به دلیل تولید ESBLs افزایش یافته است. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم هایی که قادر به تولید ESBLs هستند باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان شده است (۱۶). یکی از عوامل اصلی مولد عفونت ادراری، باکتری *اشرشیا کلی* می‌باشد. مقاومت های چند گانه آنتی‌بیوتیکی این باکتری، مشکلات پیچیده ای را برای درمان های تجربی عفونت‌های ناشی ازان ایجاد کرده است. بعلاوه، سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است (۱۷)؛ بنابراین، توسعه عوامل ضدمیکروبی موثر جدید، به ویژه بر پایه نانوتکنولوژی هنوز موردنیاز می‌باشد. اسپایروسیکلیکها، ترکیبات دارای ساختار کایرال غیرقطبی، به عنوان عوامل چندکاره در مولکولهای زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور ویژه، اسپایرواکس ایندول‌ها که به فراوانی در محصولات الی یافت می‌شوند به اهداف سنتتیک قابل توجه تبدیل شده اند و به دلیل دارا بودن فعالیت های بیولوژیکی مطلوب، در سنتزالی رایج هستند (۱۸). دراین تحقیق مشتقی از ترکیبات اسپایرواکس ایندول (۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۲'، ۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴،'۳-ایندولین)-۳- کربونیتریل) با استفاده از روش الکتروسنتز، مستقیما از مواد اولیه به شکل نانو سنتز شد. این در حالی است که تاکنون اثرات بیولوژیکی این دسته از ترکیبات به فرم نانو مورد بررسی قرار نگرفته است. در این تحقیق برای اولین بار اثر بازدارندگی این نانو ذره علیه ایزوله‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادراری در شهر کرج مورد بررسی قرار گرفت.

در مجموع ۶۰ ایزوله *اشرشیا کلی* از نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده ازبیماران تعدادی از بیمارستان‌های شهر کرج جداسازی و شناسایی شدند و سپس با استفاده از روش انتشار دیسک در اگار، ایزوله ها ازنظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم مورد غربالگری اولیه قرار گرفتند که ۲۳/۳۳٪ به سفپیم، ۳۰٪ به سفتریاکسون، ۱۶/۶۶٪ به سفتازیدیم و ۳۱/۶۶٪ به سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند. همچنین در تحقیق حاضر بررسی ها نشان داد، ۴۰٪ ایزوله ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. به این ترتیب که ۳۳/۳۳٪ به سفوتاکسیم (CTX)– سفتریاکسون(CRO)، ۳۳/۳۳٪ به سفپیم (FEP)– سفوتاکسیم (CTX)– سفتریاکسون(CRO)، ۲۹/۱۶٪ به سفتازیدیم (CAZ) – سفوتاکسیم (CTX) سفتریاکسون (CRO) - سفپیم (FEP) و ۱/۴٪ به سفتریاکسون (CRO) – سفوتاکسیم (CTX)- سفتازیدیم (CAZ) همزمان مقاومت نشان دادند. نتایج تست تایید فنوتیپی (دیسک ترکیبی) ایزوله‌های *اشرشیا کلی* از نظر تولید ESBLs نشان داد که ۲۳/۳٪ انها مولد ESBLs هستند. به واسطه اهمیت *اشرشیا کلی* در بروز عفونتهای ادراری و مقاومتهای چندگانه آنتی‌بیوتیکی گزارش شده، مطالعاتی در خصوص میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری و همچنین تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آن در نقاط مختلف ایران و سایر کشورها انجام گرفته است. واسف و همکاران در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه قاهره گزارش کردند از میان ۱۰۷۳ ایزوله *اشریشیا کلی* ۴۱/۹٪ مولد ESBLs بودند (۱۷). منوچهری و همکاران در سال ۲۰۱۵ ضمن مطالعه ای دریافتند که از ۱۲۰ ایزوله *اشرشیا کلی* بدست امده از نمونه‌های ادرار بیماران در مازندران مبتلا به عفونت ادراری، ۵۵٪ مولد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]



شکل ۴- مشتقاتی از اسپایرواکس ایندول‌ها (۲۳، ۲۴)

ESBLs بودند (۱۹). در مطالعه ای که توسط رحیم ابادی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، مشخص شد از ۱۹۵ *اشرشیا کلی* جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران چند بیمارستان رشت، ۳۶/۹۲٪ انها مولد ESBLs هستند (۲۰). زابلی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ بر روی ۸۴ ایزوله *اشرشیا کلی* نشان دادند که ۵۴ مورد ازایزوله ها تولید کننده ESBLs می‌باشند که ۴۵٪ نمونه ها را تشکیل میدهد (۲۱)؛ بنابراین لزوم بکارگیری ترکیبات ضدمیکروبی جدید جایگزین، برای کنترل این دسته از باکتری‌ها می بایست در اولویت اهداف درمانی قرار بگیرد.

در این مطالعه، نانوذره یه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول به روش الکتروسنتز ساخته شد و پس از تایید مورفولوژی آن با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونیSEM، فعالیت ضدباکتریایی غلظت های مختلف مشتق نانواسپایرواکس ایندول سنتز شده علیه ایزوله‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBLs به روش میکرودایلوشن براث بررسی شد. با توجه به نتایج این تست، کمترین غلظت این نانوذره که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد یا به عبارت دیگر، MIC این نانوذ ره معادل ۵۰µg/mL بود؛ بنابراین مشخص شد که مشتق سنتز شده دارای فعالیت ضدباکتریایی مطلوبی علیه ایزوله‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBLs می‌باشد؛ بنابراین، این ترکیب پس از بررسی های تکمیلی می‌تواند پتانسیل استفاده در درمان را داشته باشد. از مطالعات مرتبط، مطالعه Song و همکارانش در سال ۲۰۱۶ می‌باشد که مشتقی از اسپایرواکس ایندول به نام پلی سیکلیک اسپایرواکس ایندول تتراهیدرو پیران (شکل ۴- ۲۸a - t) را با روش چند جزیی تک مرحله ای سنتز کردند و گزارش کردند که این مشتق دارای خاصیت ضدقارچی مطلوبی علیه *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* و *موکور راسموس* به ترتیب با مقادیر MIC ۱۶،۸،۱۶ µg/mL بود (۲۲). همچنین Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ اسپایرواکس ایندول تتراهیدرو پیران (شکل ۴) را در پروپانول سنتز کردند که علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس البوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس تتراژنوس* و *اشرشیا کلی* فعالیت موثری را نشان دادند که مقادیر MIC به ترتیب معادل µg/mL ۱۰، ۸، ۱۰، ۷، ۱۰و ۱۰ بودند (۲۳).

مطالعه ای در راستای تحقیق حاضر توسط Ramadoss و همکارانش در سال ۲۰۱۶ (۲۴) صورت گرفته است که مشتقاتی از اسپایرواکس ایندول معمولی (جدول ۴ (a,b,c)) نه به فرم ذرات نانو را از ایزاتین، مالونونیتریل و ترکیبات ۳،۱- دی کربونیل حلقوی از طریق واکنش های چند جزیی تک مرحله ای سبز سنتز کردند که از نظر دارا بودن استخلافهای فلوئور (a)، برم (b) و کلر (c) به جای هیدروژن روی حلقه اریل بخش اکس ایندول از مشتق مورد مطالعه این تحقیق متفاوت بودند. مشتقات سنتز شده از نظر خاصیت ضدمیکروبی علیه *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس ائروجینوزا* با استفاده از روش تهیه رقت سریال در اگار بررسی شدند. تمامی ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتریایی با رنج MIC معادل µg/mL ۱۵۰ – ۵۰ علیه هر سه جنس باکتریایی مورد ازمایش بودند. نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی انها در مقایسه با مشتق سنتز شده در این تحقیق (جدول ۴ (e)) علیه *اشرشیا کلی* به صورت c<b < a <e

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

جدول ۴- مقایسه حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) از رشد مشتقات مختلف اسپایرواکس ایندول مطالعه Ramadoss و همکارانش (۲۰۱۶) (a-c) [۲۵] و نانوذره مشتق سنتز شده در مطالعه حاضر(e) علیه *اشرشیا کلی*

کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) (µg/mL)	ساختار شیمیایی ترکیبات	نام ترکیب	کد ترکیب
E. coli			
۱۰۰		۲-آمینو-'۵-فلورو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۸، ۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳- ایندولین)-۳- کاربونیتریل[۱]	a
۱۲۵		۲-آمینو-'۵-برمو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳- ایندولین)-۳- کربونیتریل[۲]	b
۱۵۰		۲-آمینو-'۵-کلرو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳- ایندولین)-۳- کربونیتریل[۳]	c
۵۰		۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-'۲، ۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۴،'۳- ایندولین)-۳- کربونیتریل[۴]	e

[1]. 2-Amino-5'-fluoro -7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
[2]. 2-Amino-5'-bromo -7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
[3]. 2-amino-5'-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
[4]. 2-amino-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile

می‌باشد. اگر چه مشتقات مطالعه فوق الذکر خاصیت ضدباکتریایی مطلوبی را علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند اما اینکه ایا علیه *اشرشیا کلی* های مولد ESBLs نیز از اثر ممانعت کنندگی کافی برخوردار هستند، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. مشتق سنتز شده در تحقیق حاضر در مقایسه با مشتقات اسپایرواکس ایندول مطالعه فوق، نه تنها از نظر خاصیت ضدباکتریایی قوی تر بود بلکه علیه *اشرشیا کلی* های مولد ESBLs که امروزه به عنوان یک عامل تهدید کننده سلامت بشر محسوب می‌شوند نیز اثر بخش بود. از دلایل این برتری در خاصیت ضد میکروبی احتمالا مربوط به اندازه بسیار ریز و نسبت سطح به حجم بالای این ذرات می باشد که از ویژگی‌های مطلوب نانوذرات است. شایان ذکر است که جهت تایید بیشتر نتایج بدست امده می بایست مطالعات وسیعی در شرایط *in vivo* صورت گیرد.

نانو ذرات در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول مزیت‌های فراوانی در کاهش اثرات جانبی داروها، مقاومت و هزینه های درمان عرضه می کنند. استفاده از نانوذرات می‌تواند به طراحی مواد ضدمیکروبی کمک کند و امید تازه ای برای روش های درمانی جدید علیه معضلات و تهدیدات باکتریایی باشند. با این حال برای اطمینان بیشتر جهت استفاده از این ترکیبات ضدمیکروبی به مطالعات گسترده تری نیازمندیم. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد، نانو ذره اسپایرواکس ایندول سنتز شده دارای اثر بازدارندگی علیه ایزوله‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

اشریشیا کولای مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشد. اگرچه، مطالعه حاضرفقط به ارزیابی اولیه فعالیت ضد میکروبی نانو ذره اسپایرواکس ایندول پرداخته است، اما با مطالعات بیشتر می‌توان مواد ضد میکروبی جدید بر پایه این نوع مشتقات را طراحی کرد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه ازاد اسلامی واحد کرج جهت حمایت از این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

References

1. Koseoglu O, Kocaguz S, Gur D, Akova M. Nosocomial bloodstream infection in Turkish university hospital: Study of Gram-negative bacilli and their sensitivity patterns. Int J Antimicrob Agents. 2001;17(6):477-481.

2. Patel JP, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler A. Laboratory Standards Institute, Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-second Information Supplement, Wayne, Pennsylvania, Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S22; 2012. p: 1-188.

3. Galliford CV, Scheidt KA. Pyrrolidinyl spirooxindole natural products as inspirations for the development of potential therapeutic agents. Angewandte Chemie International Edition. 2007;46(46):8748-58.

4. Hong L, Wang R. Recent Advances in Asymmetric Organocatalytic Construction of 3, 3′-Spirocyclic Oxindoles. Adv Synthes Catalys. 2013;355(6):1023-52.

5. Arun Y, Saranraj K, Balachandran C, Perumal PT. Novel spirooxindole–pyrrolidine compounds: Synthesis, anticancer and molecular docking studies. Eur J Med Chem. 2014;3:74:50-64.

6. Smith PW, Sollis SL, Howes PD, Cherry PC, Starkey ID, Cobley KN, et al. Dihydro-pyrancarboxamides related to zanamivir: A new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 1. Discovery, synthesis, biological activity, and structure− activity relationships of 4-guanidino-and 4-amino-4 H-pyran-6-carboxamides. J Med Chem. 1998;41(6):787-97.

7. Hiramoto K, Nasuhara A, Michikoshi K, Kato T, Kikugawa K. DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. Mut Res/Genetic Toxicol Environ Mutagen. 1997;395(1):47-56.

8. Sundar S, Kumar Prajapati V, Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. Curr Med Chem. 2012;19(19):3196-3202.

9. Alijanian Z, Talebian N, Doudi M. Bactericidal activity of copper oxide nanocomposite/bioglass for in vitro clindamycin release in implant infections due to staphylococcus aureus. Avicenna J Med Biochem. 2016;4:1-10.

10. Bhaskar G, Arun Y, Balachandran C, Saikumar C, Perumal PT. Synthesis of novel spirooxindole derivatives by one pot multicomponent reaction and their antimicrobial activity. Eur J Med Chem. 2012;51:79-91.

11. Yu B, Yu DQ, Liu HM. Spirooxindoles: Promising scaffolds for anticancer agents. Eur J med chem. 2015;97:673-98.

12. Bhaskar G, Arun Y, Balachandran C, Saikumar C, Perumal PT. Synthesis of novel spirooxindole derivatives by one pot multicomponent reaction and their antimicrobial activity. Eur J med chem. 2012;51:79-91.

13. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Updates. 2000;3(5):303-11.

14. Darvish ZM, Mirza B, Makarem S. Electrocatalytic multicomponent reaction for synthesis of nanoparticles of spirooxindole derivatives from isatins, malononitrile, and dimedone. J Heterocycl Chem. 2017;54(3):1763-6.

15. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluatingantimicrobialactivity: A review. J Pharma Analys. 2016;6:71–79.

16. Demirel I, Kinnunen A, Önnberg a, Söderquist B, Persson K. Comparison of host response mechanisms evoked by extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing uropathogenic E. coli. BMC Microbiol. 2013;13(181):1471-2180.

17. Molazade A, Gholami MS, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Mansuri A. Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Isolated Gram-Negative Bacteria from Urine Culture of Hospitalized patients in Different Wards of Vali-Asr Hospital in Fasa During the Years 2012 and 2013. J Fasa Uni Med Sci. 2014;4(2).

18. Yang YT, Zhu JF, Liao G, Xu HJ, Yu B. The development of biologically important spirooxindoles as new antimicrobial agents. Curr Med Chem. 2018;25(19):2233-44.

19. Wassef M, Behiry I, Younan M, EL Guindy N, Mostafa S, Abada E. Genotypic identification Of AmpC beta-lactamase production in gram-negative bacilli isolates. Jundishapuer J Microbiol. 2014;7(1):1-9.

20. Manouchehri M, Ahanjan M. Detection of CTX beta-lactamase gene in Escherichia coli isolated from urinary tract infection using polymerase chain reaction. J Mazandaran Uni Med Sci.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

2015;25(129):36-45.
21. Asadpour K, Hashemitabar Gh, Mojtahedi A. Antibiotic-resistance Patterns in E.coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Rasht. J Guilan Uni Med Sci. 2016;96 (22-29).
22. Mansuri A. Evaluation of antibiotic resistance pattern of isolated gram-negative bacteria from urine culture of hospitalized patients in different wards of vali-asr hospital in Fasa during the years 2012 and 2013. J Fasa Uni Med Sci. 2014;4(3):275-83.
23. Guan Z, Guochao L, Yifan Z, Xiaoyan H, Guofeng C, Yali S. Ultrasound promoted synthesis of novel substituted spirooxindole compounds containing thiochroman moiety with antifungal activity. Chinese J Organ Chem. 2016;36(1):143-50.
24. Du-Lin K, Jie J, Lu-Yong W, Xiang-Hui W, Zai-Feng S, Ming-Shu W, et al. Synthesis, Structure and Antimicrobial Activity of 9, 9-Dimethyl-9, 10-dihydrospiro [benzo [a]-xanthene-12, 3´-indoline]-2´, 11 (8H)-dione. Chinese J Struct Chem. 2016;35(1849-1854).
25. Ramadoss H, Saravanan D, Sudhan SP, Mansoor SS. Synthesis and antimicrobial evaluation of diversely substituted spirooxindole derivatives. Der Pharma Lett. 2016;8(1):25-9.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]