دانشکده علوم
گروه شیمی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی

عنوان:

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی به صورت جداگانه و توأم با آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، توبرامایسین و سیپروفلوکسازین علیه باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

استاد راهنما:

دکتر راضیه جلال

استاد مشاور:

دکتر الهه گوهرشادی

نگارش:

الناز بای رودی

زمستان ۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

سپاس خدای را که

نومید نیستم از رحمت او

تهیدست نیستم از نعمت او

و نه مأیوس از مغفرت او

و نه سر پیچیده از عبادت او

خدایی که رحمت او پیوسته است و نعمت او ناگسسته

صمیمانه ترین تشکر و قدردانی ها را تقدیم می دارم به:

استاد راهنمای گرانقدرم سرکار خانم دکتر جلال به پاس راهنمایی های ارزنده، حمایت های بی دریغ و زحمات فراوان شان

تقدیر و سپاس فراوان از:

استاد مشاور گرامی ام سرکار خانم دکتر گوهرشادی به پاس رهنمودهای سازنده و راهگشای شان

تقدیر و تشکر فراوان از:

اساتید گرامی جناب آقای دکتر آسوده و جناب آقای دکتر مشرقی به پاس پذیرش زحمت داوری این پایان نامه

با سپاس بی دریغ از:

دوستان عزیز و مهربانم که صمیمانه مرا یاری نمودند.

تقدیم به:

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

که دعای خیرشان، همواره بدرقه راهم بوده است

همسرم

که تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم مدیون همراهی و همدلی اوست

دختر عزیزم... آنیسا

که با آمدنش از امید لبریزم نمود و

با صبوری های کودکانه اش آرامش را به لحظه های زندگی ام هدیه داد.

چکیده:

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. به دلیل مقاومت *P. aeruginosa* به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری اغلب به سختی درمان می‌شوند. یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل استفاده از درمان ترکیبی است. در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی جداگانه و توأم با آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، توبرامایسین و سیپروفلوکسازین علیه *P. aeruginosa* ارزیابی شد. دو سویه از باکتری *P. aeruginosa* شامل یک ایزوله کلینیکی و *P. aeruginosa* ATCC 9027 مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت نانوذرات اکسید روی توأم با هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق محاسبه FICI بررسی شد. سلول‌های باکتری در فاز لگاریتمی به غلظت‌های جداگانه یا توأم از نانوذرات اکسید روی و آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، توبرامایسین و سیپروفلوکسازین اضافه شد تا غلظت نهایی باکتری به 10^5 CFU/ml رسید. نمونه‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^oC انکوبه شدند و میزان رشد باکتری با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید. نمونه کلینیکی نسبت به نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* مقاومت بیش‌تری به نانوذرات اکسید روی و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی توأم با سفتازیدیم و توبرامایسین علیه نمونه‌های استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* به صورت سینرژیسم عمل می‌کند. اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی سینرژیسم و علیه نمونه استاندارد متمایل به سینرژیسم تعیین شد. باکتری *Staphylococcus aureus* نیز توانایی کسب مقاومت به طیف وسیعی از عوامل ضدمیکروبی را دارد که درمان عفونت‌های ناشی از آن را با مشکل روبه‌رو کرده است. به دلیل مقاومت بیش‌تر *S. aureus* به سفتازیدیم در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین و سیپروفلوکسازین، اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه این باکتری، به عنوان یک باکتری گرم مثبت بررسی شد. نتایج نشان داد که نوع اثر توأم بین نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه *S. aureus*، سینرژیسم است.

کلمات کلیدی: نانوذرات اکسید روی، سفتازیدیم، توبرامایسین، سیپروفلوکسازین، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ باکتری *Pseudomonas aeruginosa* ۲
۱-۲ فاکتورهای بیماری‌زایی در *P. aeruginosa* ۲
۱-۲-۱ سیستم ترشحی نوع III ۲
۱-۲-۲ فرآیند Quorum Sensing ۳
۱-۲-۳ تشکیل بیوفیلم ۴
۱-۲-۴ تاژک ۴
۱-۳ آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر علیه *P. aeruginosa* ۴
۱-۳-۱ آمینوگلیکوزیدها ۵
۱-۳-۲ β-لاکتام‌ها ۷
۱-۳-۲-۱ سفالوسپورین‌ها ۹
۱-۳-۳ فلوئوروکوینولون‌ها ۱۰
۱-۳-۴ پلی‌پپتیدهای حلقوی (پلی‌میکسین‌ها/کُلیستین‌ها) ۱۲
۱-۴ سازوکارهای ایجاد کننده مقاومت به عوامل ضدمیکروبی در *P. aeruginosa* ۱۲
۱-۴-۱ مقاومت ذاتی ۱۲
۱-۴-۱-۱ نفوذپذیری کم غشای بیرونی ۱۲
۱-۴-۱-۲ سیستم Efflux ۱۴
۱-۴-۱-۳ آنزیم‌ها ۱۵
۱-۴-۲ مقاومت اکتسابی ۱۵
۱-۴-۳ مقاومت ژنتیکی ۱۵
۱-۴-۳-۱ مقاومت ژنتیکی به آمینوگلیکوزیدها ۱۶
۱-۴-۳-۲ مقاومت ژنتیکی به β-لاکتام‌ها ۱۶
۱-۴-۳-۳ مقاومت ژنتیکی به کوینولون‌ها ۱۶
۱-۵ روش‌های غلبه بر مقاومت باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی ۱۷
۱-۵-۱ درمان ترکیبی ۱۷
۱-۶ فناوری نانو ۲۰
۱-۷ نانوذرات ۲۰
۱-۷-۱ نانوذرات اکسید روی ۲۰

۱-۸ فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی ۲۱
۱-۹ سمیت انتخابی نانوذرات اکسید روی علیه سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی..... ۲۴
۱-۱۰ سازوکار عمل ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی ۲۵
۱-۱۰-۱ تولید گونه‌های فعال اکسیژن.....۲۵
۱-۱۰-۲ آسیب به دیواره و غشای سلولی باکتری و تجمع نانوذرات اکسید روی در سیتوپلاسم.....۲۶
۱-۱۱ پروژه و اهداف آن ۲۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد ۳۱
۲-۲ تجهیزات آزمایشگاهی ۳۲
۲-۳ سنتز نانوذرات اکسید روی ۳۲
۲-۴ پراکنده کردن نانوذرات اکسید روی ۳۳
۲-۵ گونه‌های باکتری مورد استفاده..... ۳۳
۲-۶ محیط کشت..... ۳۳
۲-۷ تعیین غلظت سلول‌های باکتری ۳۴
۲-۸ رسم منحنی رشد باکتری‌های مورد مطالعه ۳۴
۲-۹ چگونگی بررسی تأثیر عوامل ضدمیکروبی بر رشد باکتری ۳۵
۲-۱۰ بررسی تأثیر نانوسیال اکسید روی علیه باکتری‌های مورد مطالعه و تعیین MIC..... ۳۶
۲-۱۱ بررسی فعالیت ضدباکتریایی سیال پایه و پراکنده‌ساز..... ۳۷
۲-۱۲ تعیین MBC نانوسیال اکسید روی علیه باکتری‌های مورد مطالعه..... ۳۸
۲-۱۳ بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بر رشد باکتری *P. aeruginosa* و تعیین MIC و MBC این آنتی‌بیوتیک..... ۳۹
۲-۱۴ بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک توبرامایسین بر رشد باکتری *P. aeruginosa* و تعیین MIC و MBC این آنتی‌بیوتیک..... ۴۰
۲-۱۵ بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر رشد باکتری *P. aeruginosa* و تعیین MIC و MBC این آنتی‌بیوتیک ۴۱
۲-۱۶ بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *P. aeruginosa*..... ۴۱
۲-۱۷ بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه باکتری *P. aeruginosa*..... ۴۲
۲-۱۸ بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۴۳
۲-۱۹ بررسی اثر آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بر رشد باکتری *S. aureus*..... ۴۳
۲-۲۰ بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۴۳
۲-۲۱ بررسی اثر سیال پایه و پراکنده‌ساز توأم با هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه ۴۴
۲-۲۲ آنالیز داده‌ها ۴۴
۲-۲۲-۱ محاسبه درصد مهار رشد ۴۴
۲-۲۲-۲ محاسبه FICI ۴۵
۲-۲۲-۳ آنالیز ایزوبولوگرام ۴۶

۲-۲۳ تحلیل آماری داده‌ها ۴۷

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ تعیین اندازه نانوذرات اکسید روی ۴۹
۳-۲ رسم منحنی رشد نمونه‌های استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۴۹
۳-۳ مطالعه اثر نانوذرات اکسید روی علیه باکتری *P. aeruginosa* ۵۰
۳-۳-۱ تعیین MIC نانوسیال اکسید روی علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۵۰
۳-۳-۲ تعیین MIC نانوسیال اکسید روی علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۵۲
۳-۳-۳ تعیین MBC نانوسیال اکسید روی علیه باکتری *P. aeruginosa* ۵۷
۳-۳-۴ مقایسه فعالیت ضدباکتریایی نانوسیال اکسید روی علیه نمونه استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۵۸
۳-۴ مطالعه اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *P. aeruginosa* ۵۸
۳-۴-۱ تعیین MIC سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۵۹
۳-۴-۲ تعیین MIC سفتازیدیم علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۰
۳-۴-۳ تعیین MBC سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۰
۳-۴-۴ مقایسه اثر سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۱
۳-۴-۵ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۶۲
۳-۴-۶ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۴
۳-۵ مطالعه اثر توأم نانوذرات اکسید روی و توبرامایسین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۶۶
۳-۵-۱ تعیین MIC توبرامایسین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۶۶
۳-۵-۲ تعیین MIC توبرامایسین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۷
۳-۵-۳ تعیین MBC توبرامایسین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۶۸
۳-۵-۴ مقایسه اثر توبرامایسین علیه نمونه استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۶۹
۳-۵-۵ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسیدروی و توبرامایسین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۷۰
۳-۵-۶ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۷۲
۳-۶ مطالعه اثر توأم نانوذرات اکسیدروی و سیپروفلوکسازین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۷۴
۳-۶-۱ تعیین MIC سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۷۴
۳-۶-۲ تعیین MIC سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۷۵
۳-۶-۳ تعیین MBC سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد و کلینیکی *P. aeruginosa* ۷۶
۳-۶-۴ مقایسه اثر سیپروفلوکسازین علیه نمونه‌های استاندارد و کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۷۶
۳-۶-۵ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۷۷
۳-۶-۶ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۷۹
۳-۷ محاسبه FICI برای مطالعه اثر نانوسیال اکسید روی توأم با هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۰
۳-۷-۱ محاسبه FICI برای مطالعه نوع اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۱

۳-۷-۲ محاسبه FICI برای مطالعه نوع اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۳
۳-۷-۳ محاسبه FICI برای مطالعه نوع اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۴
۳-۸ آنالیز ایزوبولوگرام برای مطالعه اثر توأم نانوسیال اکسید روی و هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۵
۳-۸-۱ آنالیز ایزوبولوگرام برای مطالعه اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۶
۳-۸-۲ آنالیز ایزوبولوگرام برای مطالعه اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۸
۳-۸-۳ آنالیز ایزوبولوگرام برای مطالعه اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه باکتری *P. aeruginosa* ۹۰
۳-۹ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۱
۳-۹-۱ تعیین MIC نانوسیال اکسید روی علیه باکتری *S. aureus* ۹۲
۳-۹-۲ تعیین MIC آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۴
۳-۹-۳ بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۴
۳-۹-۴ محاسبه FICI برای مطالعه نوع اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۶
۳-۹-۵ آنالیز ایزوبولوگرام برای مطالعه اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۷
۳-۱۰ بحث و نتیجه‌گیری ۹۹
۳-۱۱ پیشنهادات ۱۰۳

فصل چهارم: منابع و مآخذ ۱۰۴

پیوست‌ها ۱۱۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱– ۱: ساختار هسته مرکزی در آمینوگلیکوزیدها ۵
شکل ۱– ۲: ساختار بخش مرکزی سفالوسپورین‌ها ۱۰
شکل ۱– ۳: ساختار هسته مرکزی کوینولون‌ها ۱۱
شکل ۱– ۴: ورود آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به سلول باکتری با یا بدون دخالت کانال‌های پورین ۱۳
شکل ۱– ۵: نمای کلی از یک سیستم Efflux ۱۴
شکل ۱– ۶: اجزای سیستم mexAB-oprM ۱۵
شکل ۱– ۷: اثر تیمار ضدمیکروبی روی یک جمعیت باکتریایی (a) و یک جهش‌یافته حاضر در جمعیت با فراوانی $۱۰^{-۸}$ (b) ۱۸
شکل ۱– ۸: تصاویر SEM از باکتری *E. coli* قبل از تیمار (a) و بعد از تیمار با ۰/۲ g/l از نانوذرات اکسید روی به مدت ۵ ساعت (b) ۲۷
شکل ۱– ۹: تصاویر TEM برش‌های نازک *E. coli* قرار گرفته در معرض $۱۰^{-۳}$ M از نانوذرات اکسید روی ۲۸
شکل ۳– ۱: توزیع اندازه نانوذرات اکسید روی با استفاده از دستگاه سنجش اندازه نانوذرات ۴۹
شکل ۳– ۲: منحنی رشد نمونه استاندارد (الف) و نمونه کلینیکی (ب) باکتری *P. aeruginosa* ۴۹
شکل ۳– ۳: منحنی رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی ۵۰
شکل ۳– ۴: منحنی رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیال پایه و پراکنده‌ساز ۵۱
شکل ۳– ۵: منحنی رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی ۵۳
شکل ۳– ۶: منحنی رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیال پایه و پراکنده‌ساز ۵۴
شکل ۳– ۷: منحنی رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم ۵۹
شکل ۳– ۸: منحنی رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم ۶۰
شکل ۳– ۹: منحنی رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف توبرامایسین ۶۷
شکل ۳– ۱۰: منحنی رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف توبرامایسین ۶۸
شکل ۳– ۱۱: منحنی رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیپروفلوکسازین ۷۴
شکل ۳– ۱۲: منحنی رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیپروفلوکسازین ۷۵
شکل ۳– ۱۳: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۸۶
شکل ۳– ۱۴: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۸۷
شکل ۳– ۱۵: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۸۸
شکل ۳– ۱۶: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۸۹
شکل ۳– ۱۷: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۹۰
شکل ۳– ۱۸: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۹۱
شکل ۳– ۱۹: منحنی رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی ۹۲
شکل ۳– ۲۰: منحنی رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف سیال پایه و پراکنده‌ساز ۹۳
شکل ۳– ۲۱: منحنی رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم ۹۴
شکل ۳– ۲۲: آنالیز ایزوبولوگرام مربوط به اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۷

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: تقسیم‌بندی ساختاری آمینوگلیکوزیدها ۶

جدول ۱- ۲: ساختار گروه‌های مختلف β-لاکتام‌ها ۸

جدول ۲- ۱: انواع محلول‌های مک فارلند استاندارد و ویژگی‌های آنان..... ۳۴

جدول ۲- ۲: مقادیر سیال پایه و پراکنده‌ساز در غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی..... ۳۸

جدول ۳- ۱: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی..... ۵۱

جدول ۳- ۲: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیال پایه و پراکنده‌ساز ۵۲

جدول ۳- ۳: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی ۵۶

جدول ۳- ۴: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز ۵۶

جدول ۳- ۵ : درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم..... ۵۹

جدول ۳- ۶: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم ۶۰

جدول ۳- ۷: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت..... ۶۲

جدول ۳- ۸: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت..... ۶۳

جدول ۳- ۹: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت..... ۶۴

جدول ۳- ۱۰: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت..... ۶۵

جدول ۳- ۱۱: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف توبرامایسین ۶۷

جدول ۳- ۱۲: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف توبرامایسین ۶۸

جدول ۳- ۱۳: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت..... ۷۰

جدول ۳- ۱۴: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و توبرامایسین به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت..... ۷۱

جدول ۳- ۱۵: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت..... ۷۲

جدول ۳- ۱۶: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و توبرامایسین به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت..... ۷۳

جدول ۳- ۱۷: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیپروفلوکسازین ۷۴

جدول ۳- ۱۸: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف سیپروفلوکسازین ۷۵

جدول ۳- ۱۹: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت ۷۷
جدول ۳- ۲۰: درصد مهار رشد نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و سیپروفلوکسازین به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت ۷۸
جدول ۳- ۲۱: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت ۷۹
جدول ۳- ۲۲: درصد مهار رشد نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و سیپروفلوکسازین به صورت جداگانه و توأم پس از ۱۰ ساعت ۸۰
جدول ۳- ۲۳: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۸۱
جدول ۳- ۲۴: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۲
جدول ۳- ۲۵: مقادیر FIC نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم و FICI مربوط به اثر توأم آن‌دو علیه باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۲
جدول ۳- ۲۶: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۸۳
جدول ۳- ۲۷: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۳
جدول ۳- ۲۸: مقادیر FIC نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین و FICI مربوط به اثر توأم آن‌دو علیه باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۴
جدول ۳- ۲۹: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۸۴
جدول ۳- ۳۰: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۴
جدول ۳- ۳۱: مقادیر FIC نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین و FICI مربوط به اثر توأم آن‌دو علیه باکتری *P. aeruginosa* ۸۵
جدول ۳- ۳۲: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۶
جدول ۳- ۳۳: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۷
جدول ۳- ۳۴: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۸
جدول ۳- ۳۵: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و توبرامایسین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa*..... ۸۹
جدول ۳- ۳۶: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه استاندارد باکتری *P. aeruginosa* ۹۰
جدول ۳- ۳۷: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سیپروفلوکسازین علیه نمونه کلینیکی باکتری *P. aeruginosa* ۹۱
جدول ۳- ۳۸: درصد مهار رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف نانوسیال اکسید روی ۹۲
جدول ۳- ۳۹: درصد مهار رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف سیال پایه و پراکنده‌ساز ۹۳
جدول ۳- ۴۰: درصد مهار رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف سفتازیدیم ۹۴
جدول ۳- ۴۱: درصد مهار رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف از نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت ۹۵
جدول ۳- ۴۲: درصد مهار رشد باکتری *S. aureus* در حضور غلظت‌های مختلف از سیال پایه و پراکنده‌ساز و سفتازیدیم به صورت جداگانه و توأم پس از ۲۴ ساعت ۹۶
جدول ۳- ۴۳: غلظت‌های توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus*..... ۹۶
جدول ۳- ۴۴: مقادیر FIC نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم و FICI مربوط به اثر توأم آن‌دو علیه باکتری *S. aureus*..... ۹۷
جدول ۳- ۴۵: مقادیر CI در بررسی اثر توأم نانوسیال اکسید روی و سفتازیدیم علیه باکتری *S. aureus* ۹۸

اختصارات

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine triphosphate
CAZ	Ceftazidime
CC_{50}	% 50 Cytotoxic Concentration
CFU	Colony Forming Unit
CI	Combination Index
CIP	Ciprofloxacin
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
% GI	% Growth Inhibition
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
Mex	Multi-drug efflux
OD	Optical Density
Opr	Outer membrane protein
QS	Quorum Sensing
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM	Scanned Electron Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy
TOB	Tobramycin
TSA	Tryptic Soy Agar
ZnO NF	Zinc Oxide Nanofluid
ZnO NP	Zinc Oxide Nanoparticle

فصل اول

مقدمه

۱-۱ باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و هوازی است. این باکتری ۵-۱/۵ میکرومتر طول و ۱-۰/۵ میکرومتر عرض دارد و به دلیل داشتن تاژک قادر به حرکت می‌باشد. از ویژگی‌های آن می‌توان به توانایی رشد در دمای ^{o}C ۴۲، آزمایش اکسیداز مثبت، هیدرولیز آرژینین و احیای نیترات اشاره کرد. بیش‌تر آن‌ها قادر به تولید رنگدانه‌های پیووردین[۱] و پیوسیانین[۲] هستند که با هم رنگ سبز روشنی را ایجاد می‌کنند [۱]. این باکتری می‌تواند در انواع مختلفی از سوبستراها رشد کند و در پاسخ به تغییرات محیطی، ویژگی‌های خود را تغییر دهد. ژنوم بزرگ *P. aeruginosa* (۶/۲۶ مگا جفت باز، کدکننده ۵۵۶۷ ژن) در مقایسه با سایر باکتری‌ها، ماهیت سازش‌پذیری بالای آن را توضیح می‌دهد [۲]. این باکتری قادر به ایجاد بیماری در میزبان‌های متنوع شامل گیاهان، نماتودها، حشرات، موش و انسان می‌باشد [۳]. *P. aeruginosa* مسئول ایجاد ۱۶٪ پنومونیای بیمارستانی، ۱۲٪ عفونت‌های بیمارستانی مجاری ادراری، ۸٪ عفونت زخم‌های جراحی و ۱۰٪ عفونت‌های جریان خون است. این باکتری ظرفیت بالایی برای ایجاد عفونت در میزبان‌های حساس دارد و یک پاتوژن فرصت‌طلب محسوب می‌شود [۴]. *P. aeruginosa* به صورت ژنتیکی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بوده و هم‌چنین می‌تواند در طی درمان با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها جهش‌یافته‌های مقاوم دیگری را نیز تولید کند [۵].

۱-۲ فاکتورهای بیماری‌زایی در *P. aeruginosa*

در بین بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زایی *P. aeruginosa*، سیستم ترشحی نوع III[۳] ، فرآیند Quorum Sensing، تشکیل بیوفیلم و داشتن تاژک بیش‌تر مورد تأکید واقع شده‌است.

۱-۲-۱ سیستم ترشحی نوع III

بیش‌تر توکسین‌های تولید شده توسط باکتری‌ها از طریق سیستم ترشحی نوع I و II به محیط خارج‌سلولی اطراف ترشح می‌شوند. با مطالعات اخیر روی باکتری‌های گرم منفی مشخص شد شماری از توکسین‌ها از طریق سیستم ترشحی نوع III مستقیماً به داخل سلول‌های میزبان تزریق می‌شوند. سیستم ترشحی نوع III در چندین باکتری گرم منفی بیماری‌زا مانند *P. aeruginosa* وجود دارد. این سیستم از سه کمپلکس پروتئینی تشکیل شده است که عبارتند از: دستگاه ترشحی، ترنس-لوکون[۴] و توکسین‌های ترشح شده (پروتئین‌های اثرگر[۵]). دستگاه ترشحی، توکسین‌ها را از پوشش سلولی باکتری‌ها عبور می‌دهد

1- Pyoverdine
2- Pyocyanin
3- Type III Secretion System (TTSS)
4- Translocon
5- Effector proteins

و ترنس‌لوکون مسئول تزریق این توکسین‌ها به داخل سلول میزبان است. سه پروتئین PcrV، PopB و PopD برای تشکیل یک ترنس‌لوکون کامل، ضروری هستند [۶].

توکسین‌های ترشح شده توسط سیستم ترشحی نوع III در *P. aeruginosa* عبارتند از: ExoS، ExoT، ExoU و ExoY. ExoS در انتهای آمینوی خود دارای ناحیه فعال‌کننده GTPase است و بدین وسیله در اسکلت سلولی اکتین اختلال ایجاد کرده و مهار فاگوسیتوز را به دنبال دارد. انتهای کربوکسیل این پروتئین نیز به سبب داشتن فعالیت ADP–ریبوزیل ترانسفرازی برای سلول‌های یوکاریوتی سمی است. ExoT مانند ExoS یک پروتئین فعال‌کننده GTPase بوده و فعالیت ADP–ریبوزیل ترانسفرازی آن تنها ۰/۲ درصد این فعالیت در ExoS می‌باشد. ExoY یک آدنیلات سیکلاز است و موجب افزایش سطح cAMP در سلول میزبان می‌شود. ExoU، تنها پس از میانکنش با یک کوفاکتور در سلول میزبان، فعالیت فسفولیپازی نشان می‌دهد و مرگ سریع سلول را به دنبال دارد [۷و۸].

۱-۲-۲ فرآیند Quorum Sensing

باکتری‌های *P. aeruginosa* بسته به این که تنها یا در جمعیت باشند، به طور متفاوتی رفتار می‌کنند. این رفتار متفاوت ناشی از یک فرآیند انتقال پیام بین‌سلولی به نام Quorum Sensing (QS) است. در این فرآیند، ترکیبات کوچکی به نام خودالقاگر[1] به محیط آزاد می‌شوند. باکتری‌های همسایه پس از احساس غلظت‌های خودالقاگر، به وجود باکتری‌های محلی پی می‌برند و بیان ژن خود را مطابق آن تنظیم می‌کنند [۸]. این مولکول‌های پیام‌رسان در *P. aeruginosa* و بیش‌تر باکتری‌های گرم منفی، اسیل هوموسرین لاکتون هستند [۹]. سیستم‌های QS در *P. aeruginosa* تقریباً ۳۵۰ ژن (شش درصد ژنوم) را تنظیم می‌کنند و هم‌چنین در تنظیم بسیاری از فرآیندها از قبیل تشکیل بیوفیلم و تولید توکسین نقش دارند [۸].

دو سیستم QS با نام های Las و Rhl در *P. aeruginosa* شناسایی شده است. سیستم Las، ژن‌های *lasR* و *lasI* و سیستم Rhl، ژن‌های *rhlR* و *rhlI* را در بر می‌گیرد. ژن‌های I رمزکننده دو آنزیم سنتتاز هستند که مولکول‌های پیام‌رسان را در دو سیستم سنتز می‌کنند. ژن‌های R رمزکننده پروتئین‌های تنظیمی هستند که هماهنگ با مولکول‌های پیام‌رسان، بیان شماری از ژن‌های هدف را فعال می‌کنند [۱۰].

1- Autoinducer

۱-۲-۳ تشکیل بیوفیلم

بیوفیلم‌ها، اجتماعات میکروبی بسیار سازمان یافته، احاطه شده در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی و چسبیده به یک سطح هستند [۸]. شکل‌گیری بیوفیلم‌ها در چند مرحله صورت می‌گیرد که عبارتند از: ۱) چسبندگی باکتری‌ها به سطح ۲) تشکیل تک‌لایه ۳) تشکیل میکروکلنی ۴) ایجاد بیوفیلم بالغ. تاژک و پیلی نوع IV از فاکتورهای ضروری برای آغاز شکل‌گیری بیوفیلم هستند [۱۱].

سلول‌های یک بیوفیلم دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مشخصی هستند و با همتاهای شناور خود تفاوت زیادی نشان می‌دهند. در مراحل آغازی تشکیل بیوفیلم، بیان تعدادی از ژن‌ها تغییر می‌کند. برای مثال در سلول‌های *P. aeruginosa* در بیوفیلم، افزایش بیان ژن *algC* دیده شده است. این ژن برای سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی مورد نیاز است [۱۲و۱۳]. بیوفیلم‌ها به عوامل ضدمیکروبی مقاومت زیادی نشان می‌دهند و در بیماری‌زایی *P. aeruginosa* از اهمیت زیادی برخوردار هستند. علاوه بر این وجود ماتریکس پلی‌مری تولید شده توسط باکتری‌ها در بیوفیلم، از فاگوسیتوز توسط سلول‌های سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می‌کند [۱۴].

۱-۲-٤ تاژک

تاژک در *P. aeruginosa* برای حرکت کردن مورد نیاز است. علاوه بر این، تاژک در پراکندگی سلول‌های بیوفیلم و چسبیدن به سطح سلول‌های میزبان نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این فرآیند در بیماری‌زایی اهمیت دارد. فلاژلین، جزء ساختاری اولیه تاژک، توسط گیرنده خاصی بر سطح سلول‌های میزبان شناسایی می‌شود. این گیرنده با القای سنتز سیتوکین‌هایی از قبیل TNF، IL-6، IL-8 در سلول میزبان، باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود [۸].

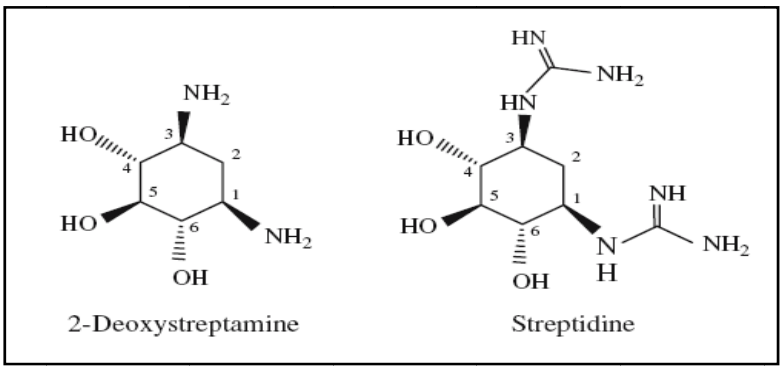
۱-۳ آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر علیه *P. aeruginosa*

طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور درمان عفونت‌های ناشی از *P. aeruginosa* به کارمی‌روند. این آنتی‌بیوتیک‌ها عمدتاً در کلاس‌های آمینوگلیکوزیدها[1]، β-لاکتام‌ها[2]، فلوئوروکوینولون‌ها[3] و پلی‌میکسین‌ها[4] جای می‌گیرند.

1- Aminoglycosides
2- β-Lactams
3- Fluoroquinolones
4- Polymyxins

۱-۳-۱ آمینوگلیکوزیدها

اولین آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزید با نام استرپتومایسین[1]، در سال ۱۹۴۴ کشف شد [۱۵]. این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌های هوازی گرم منفی هستند [۱۶]. برخی از آمینوگلیکوزیدها مانند توبرامایسین[2]، استرپتومایسین و نئومایسین[3] از گونه‌های استرپتومیسز[4] و برخی مانند جنتامایسین[5] از گونه‌های میکرومونواسپورا[6] بدست می‌آیند. علاوه بر این، تعدادی از آن‌ها مانند آمیکاسین[7] در شرایط آزمایشگاهی سنتز می‌شوند [۱۷]. در بین آمینوگلیکوزیدها آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین علیه عفونت‌های *P. aeruginosa* بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند. آمینوگلیکوزیدها ترکیبات بازی، بسیار قطبی و دارای بار مثبت هستند و حلالیت آن‌ها در آب بسیار زیاد است [۱۶]. از نظر ساختاری همه آمینوگلیکوزیدها دارای یک حلقه آمینوسیکلیتول بسیار حفظ شده هستند که تعدادی گروه آمینو و هیدروکسیل به آن متصل است. گروه‌های هیدروکسیل جایگاه‌هایی برای اتصال قندآمین‌ها از طریق پیوند گلیکوزیدی را فراهم کرده‌اند. بخش آمینوسیکلیتول، در اکثر آمینوگلیکوزیدهای مهم کلینیکی، استرپتامین یا ۲-دئوکسی استرپتامین (2-DOS) است. به طور استثنا، استرپتومایسین دارای هسته مرکزی استرپتیدین می‌باشد (شکل۱-۱).

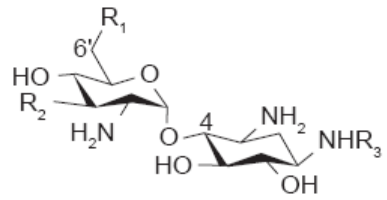
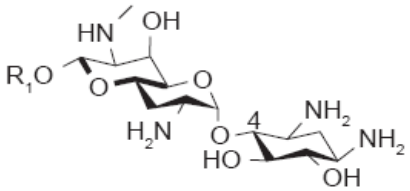
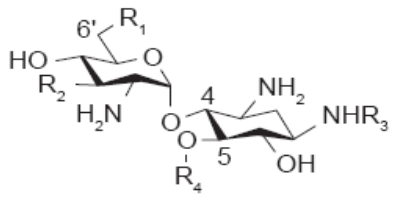
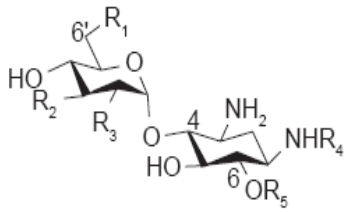
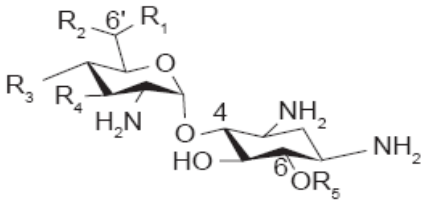


شکل ۱- ۱: ساختار هسته مرکزی در آمینوگلیکوزیدها [۱۸]

آمینوگلیکوزیدها، بسته به موقعیت استخلاف‌های حلقه آمینوسیکلیتول به سه گروه تقسیم می‌شوند: وجود استخلاف در موقعیت چهار، استخلاف در موقعیت چهار و پنج یا استخلاف در موقعیت چهار و شش [۱۸و۱۹] . این تقسیم‌بندی در جدول ۱-۱ نشان داده شده است.

1- Streptomycin
2- Tobramycin
3- Neomycin
4- Streptomyces
5- Gentamicin
6- Micromonospora
7- Amikacin

جدول ۱- ۱: تقسیم‌بندی ساختاری آمینوگلیکوزیدها

آمینوگلیکوزید	ساختار	استخلاف
Neamine Paromamine		4-monosubstituted
Apramycin		
Ribostamycin Butirosin B Neomycin B Paromomycin		4,5-disubstituted
Kanamycin Tobramycin Amikacin		4,6-disubstituted
Gentamicin C1 Gentamicin C2 Gentamicin C1A Geneticin		

آمینوگلیکوزیدها پس از شکستن پل‌های Mg^{2+} بین مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در دیواره سلولی باکتری، از طریق میانکنش‌های الکترواستاتیکی به غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی متصل می‌شوند. این فرآیند به صورت غیرفعال و مستقل از انرژی انجام می‌گیرد. اتصال آمینوگلیکوزیدها به لیپوپلی‌ساکاریدها و غشای بیرونی باعث از دست رفتن پایداری غشای بیرونی و افزایش نفوذپذیری آن می‌شود. عبور این آنتی‌بیوتیک‌ها از غشای سلولی نیازمند کسب انرژی از سیستم انتقال الکترون می‌باشد که یک فرآیند وابسته به اکسیژن است [۱۹]. گروه‌های آمین موجود در ساختار آمینوگلیکوزیدها در محیط‌های بیولوژیکی پروتونه می‌شوند. بنابراین آمینوگلیکوزیدها به عنوان ترکیبات پلی‌کاتیونی، تمایل اتصال به نوکلئیک‌اسیدها را نشان