

گزارش اثر مهارکنندگی مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیتروفوران‌تویین در ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* L.

احمدرضا شاهرودی^{۱*}، منصور باقری^۲، فرامرز توسلی^۳

- ۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۲- محقق و رئیس مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی و آب‌های معدنی آذربایجان، استان اردبیل
 ۳- پزشک و محقق، تهران
 *آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی
 کد پستی ۱۴۱۷۴، تلفن: ۶۱۱۲۳۳۳، نمابر: ۶۴۶۱۱۷۸
 پست الکترونیک: Shahverdiar@yahoo.com

چکیده

مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز مقاومت‌های جدید و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا ساخت مشتقات نیمه‌صناعی جدید موثر بر عفونت‌های مقاوم از عمده‌ترین اهداف برنامه‌های توسعه و تحول داروهای موثر در درمان بیماری‌های عفونی محسوب می‌گردد. امروزه یک راه حل جانشین در درمان عفونت‌های مقاوم مطرح شده که عبارت است از مصرف آنتی‌بیوتیک به همراه عوامل از بین برنده مقاومت که مقاومت عوامل بیماری‌زا را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده از بین می‌برند.

در مطالعه غربال‌سازی نمونه‌های گیاهی به منظور دست یافتن به اثر مهارکنندگی مقاومت انتروباکتریاسه‌ها به نیتروفوران‌تویین مشخص گردید ترکیبات فرار گیاهی از گونه نعنا می‌تواند این اثر را در شرایط *In vitro* بروز دهد. در مطالعات گیاه‌شناسی این گیاه (*Mentha longifolia*) شناسایی شد که ترکیبات فرار رقیق شده آن در حضور نیتروفوران‌تویین قادر است از رشد باکتری‌های مقاوم اشرشیا، کلبسیلا، پرتئوس، سالمونلا، سیتروباکتر، سراشیا و انتروباکتر جلوگیری نماید در حالی که صرفاً خود این ترکیبات فرار رقیق شده ممانعتی برای رشد باکتری‌های مذکور ایجاد نمی‌نماید.

کل واژگان: نیتروفوران‌تویین، انتروباکتریاسه، مقاومت میکروبی

مقدمه

مقاومت فزاینده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، توانایی پزشکان را در درمان بعضی از بیماری‌های عفونی که اغلب مرگ بار هستند محدود نموده است. امروزه مقاومت دارویی دست کم در درمان چهار بیماری عفونی مهم شامل اسهال، مالاریا، سل و عفونت‌های دستگاه تنفسی اختلالات عمده‌ای ایجاد نموده است. اما مشکل فراتر از این چهار نوع بیماری رایج می‌باشد. مرگ ناشی از عفونت‌های بیمارستانی که سالانه تنها عامل چهل هزار مورد مرگ در ایالات متحده است تقریباً ناشی از همین افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد [۱].

بنابراین مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز مقاومت‌های جدید و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار و مورد تأکید سازمان بهداشت جهانی است. کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا ساخت مشتقات نیمه‌صناعی جدید مؤثر بر عفونت‌های مقاوم از عمده‌ترین اهداف برنامه‌های توسعه و تحول داروهای مؤثر در درمان بیماری‌های عفونی محسوب می‌گردد. امروزه یک راه حل جانشین نیز در درمان عفونت‌های مقاوم مطرح شده که عبارت است از مصرف آنتی‌بیوتیک به همراه عوامل از بین‌برنده مقاومت باکتری که به طور نمونه می‌توان از (Clavulanic acid) نام برد. این دارو قادر است آنزیم پنی‌سیلین آسیلاز ترشح شده از سویه‌های مقاوم را مهار کند و در نهایت مقاومت عوامل بیماری‌زا را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین کاهش دهد [۲، ۳].

امروزه ترکیبات جدیدی به عنوان مهارکننده مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین گزارش شده است [۴، ۵]. همچنین تحقیقات گسترده

روی مهارکنندگان پمپ‌های ویژه تبادل مواد در غشا باکتری‌ها منجر به ارایه ترکیبات Efflux Pump Inhibitor شده است که می‌توانند مقاومت باکتری‌ها را به طور همزمان نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک کاهش دهند. این پمپ‌ها باعث بیرون ریختن آنتی‌بیوتیک‌های مهمی مانند تتراسیکلین، کلیندامایسین و یا ایزونیاژید از سلول باکتری شده و در نتیجه نوعی مقاومت را در باکتری‌ها ایجاد می‌نماید [۶]. مشابه این پمپ‌ها را در برخی از سلول‌های سرطان نیز می‌توان یافت که مهار این پمپ‌ها به طور مثال با رزربین باعث کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی در مقابل برخی از داروهای ضدسرطانی شده است [۷].

در طی مطالعه‌ای که طی سال‌های ۱۳۷۷ لغایت ۱۳۸۱ برای غربال‌سازی گیاهان متعدد جهت کشف اثر مهارکنندگی مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه به نیتروفوران‌توین انجام پذیرفت ترکیبات فرار گیاهی از گونه نعنا اثر مهارکنندگی مقاومت انتروباکتری‌ها را به آنتی‌بیوتیک نیتروفوران‌توین نشان داد [۸] که مقاله حاضر نتایج مطالعات تکمیلی در این ارتباط را بیان می‌نماید.

مواد و روش‌ها

غربال‌سازی اثر مهارکنندگی مقاومت به نیتروفوران‌توین

برای غربال‌سازی اثر مهارکنندگی مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک کافی است عصاره‌ها و یا اسانس‌های رقیق شده گیاهی که در روش سنجش اثرات ضد میکروبی (Antibiogram) اثر مهاری روی رشد باکتری‌های موردنظر نشان نمی‌دهند مجدداً در محیط مولر هینتون جامد حاوی یک آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مجدد قرار گیرند [۴]. در این مطالعه جهت غربال‌سازی اثر مهارکنندگی مقاومت از محیط‌های جامد حاوی ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیتروفوران‌توین خالص استفاده شد. نمونه عصاره و



غربال شده روی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استریل بارگذاری گردید. روی هر پلیت کشت داده شده با سویه‌های انتروباکتریاسه مقاوم سه دیسک گذاشته شد و پلیت در ۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب گرمخانه‌گذاری گردید. متوسط قطر هاله عدم رشد دور دیسک‌های سه‌گانه بر علیه هر یک از سویه‌های مقاوم پس از اندازه‌گیری محاسبه و گزارش می‌گردید.

تهیه گیاه

گیاه مورد نظر در این مطالعه در مرداد ماه ۱۳۷۸ از نواحی کوهستانی اطراف اردبیل جمع‌آوری شد و سپس توسط دکتر فریده عطار، استادیار گیاهشناسی گروه بیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی گردید. مطالعات گیاه‌شناسی روی جنس و گونه این گیاه مؤید جنس نعنا بود و نشان داد نام علمی دقیق این گیاه *Mentha longifolia* (L.) Hudson می‌باشد. نمونه هرباریومی این گیاه به شماره ۲۷۹۳۱ - TUH در هرباریوم مرکزی دانشکده علوم دانشگاه تهران نگهداری می‌گردد.

تهیه اسانس گیاه

گیاه جمع‌آوری شده در سایه و در دمای آزمایشگاه خشک و سپس پودر گردید. اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام شد و اسانس به دست آمده جهت انجام آزمایش‌های تکمیلی به میزان ۱۰ برابر با اتانول رقیق گردید.

نتایج

الف- غربال‌سازی و شناسایی گیاه

در غربال‌سازی منابع گیاهان به منظور یافتن نمونه‌هایی که می‌توانستند مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه را به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین مهار نمایند نمونه ترکیبات فرار نمونه رقیق شده گیاهی از جنس نعنا واجد این اثر شناسایی شد.

یا اسانس رقیق شده‌ای که بر روی این محیط واجد آنتی‌بیوتیک در مقابل سویه مقاوم *Enterobacter cloacea* اثرات مهاری به صورت هاله عدم رشد نشان می‌دهد به عنوان نمونه مثبت تلقی گردید.

جداسازی سویه‌های مقاوم گروه انتروباکتریاسه

باسیل‌های گرم منفی از جنس اشرشیا، کلبسیلا، انتروباکتر، سرایشیا، سیتروباکتر و پروتئوس که طبق آزمایش‌های استاندارد سنجش حساسیت به نیتروفورانتوین مقاوم تشخیص داده شده‌اند از بخش عفونی بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه تشخیص طبی حکیم جدا شد. سویه‌های مقاوم جدا شده مجدداً در آزمایشگاه طبق روش استاندارد تشخیص و تعیین هویت و تعیین MIC شدند [۹]. این سویه‌ها عبارت بودند از اشرشیاکلی، کلبسیلاپونومونیه، انتروباکترکلاسه، انتروباکترآیروژنوز، سرایشیا مرسنس، سیتروباکتر فروندی، پرتئوس ولگاریس و پرتئوس میرابیلیس که در آزمایشگاه کشت و در شرایط مناسب جهت انجام کارهای بعدی حفظ و ذخیره‌سازی شدند.

روش بررسی قدرت مهارکنندگی مقاومت به نیتروفورانتوین

قدرت مهارکنندگی مقاومت در سویه‌های مقاوم متفاوت جدا شده از بالین عیناً مانند روش غربال‌سازی در مقابل آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین انجام پذیرفت با این تفاوت که غلظت آنتی‌بیوتیک به کار برده شده در محیط کشت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. از کشت شبانه سویه‌های مقاوم جدا شده سوسپانسیون حاوی 10^7 الی 10^8 باکتری معادل کدورت سوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فالین تهیه و نمونه‌های میکروبی با استفاده از سوآپ روی محیط جامد مولر هینتون حاوی نیتروفورانتوین کشت داده شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از نمونه گیاهی



فرار این گیاه قادر است در حضور آنتی‌بیوتیک نیتروفوران‌تویین از رشد باکتری‌های متعددی از گروه انتروباکتریاسه جلوگیری کند. باید یادآوری نمود دامنه حساسیت نسبت به نیتروفوران‌تویین برای باکتری‌های حساس طبق منابع استاندارد کمتر از ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعریف می‌گردد. در حالی که برای باکتری‌های نیمه مقاوم این میزان ۳۰ الی ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری‌های مقاوم از ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تجاوز می‌نماید [۱۰].

لذا با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک در هر آزمایش در حضور ترکیبات فرار گیاه می‌توان انتظار داشت محدوده عدم رشد باکتری گسترش یابد. تصویر شماره ۲ پلیتی حاوی کشت *Proteus vulgaris* را نشان می‌دهد که به شیوه غلظت تدریجی از صفر الی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (gradient plate) تهیه شده است.

همانطور که در تصویر شماره ۲ ملاحظه می‌گردد با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک محدوده عدم رشد باکتری در مجاور ترکیبات فرار گسترش می‌یابد.

ترکیبات فرار این گیاه قادر بود در حضور آنتی‌بیوتیک نیتروفوران‌تویین از رشد باکتری مقاوم مورد آزمایش *E. colacea* جلوگیری نماید. تصویر شماره ۱، عکس پلیت حاوی دیسک‌های آغشته شده با ترکیبات فرار گیاه از گونه نعنا را در حضور و در غیاب نیتروفوران‌تویین نمایش می‌دهد. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌گردد ترکیبات فرار رقیق شده این گیاه در این مطالعه بعد از رقیق شدن در آزمون ضد میکروبی علیه سویه مقاوم به نیتروفوران‌تویین هاله عدم رشدی نشان نمی‌دهد در حالی که در پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفوران‌تویین هاله عدم رشد وجود دارد.

ب- بررسی قدرت ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* در مهار مقاومت باکتری‌های مختلف انتروباکتریاسه

جدول شماره ۱ اندازه هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* را در حضور نیتروفوران‌تویین و در غیاب آن نشان می‌دهد. همانطور که در جدول شماره ۱ آمده است ترکیبات



تصویر شماره ۱- دو پلیت کشت میکروبی که یکی واجد و یکی فاقد نیتروفوران‌تویین می‌باشد هاله عدم رشد در پلیت سمت راست اثر مهارکنندگی ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* را در حضور نیتروفوران‌تویین بر علیه سویه انتروباکتر کولاسه مقاوم نشان می‌دهد



جدول شماره ۱- اثر مهارکنندگی ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* روی سویه‌های مختلف خانواده انتروباکتریاسه

متوسط قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		MIC for Nitrofurantoin $\mu\text{g/mL}$	سویه مقاوم
در غیاب نیتروفورانتویین	در حضور نیتروفورانتویین		
.	۱۶	۷۵	سیتروباکتر فروندی (<i>Citrobacter freundii</i>)
.	۱۸	۲۲۵	انتروباکتر آيروژنوز (<i>Enterobacter aerogenes</i>)
.	۱۷	۲۷۵	انتروباکتر کلاسه (<i>Enterobacter cloacae</i>)
.	۱۹	۱۵۰	اشریشیا کلی (<i>Escherichia coli</i>)
.	۱۸	۲۷۵	کلبسیلا پنومونیه (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
.	۱۵	۱۲۵	پروتئوس میرابیلیس (<i>Proteus mirabilis</i>)
.	۱۴	۱۲۵	پروتئوس ولگاریس (<i>Proteus vulgaris</i>)
.	۱۳	۳۰۰	سراشیا مرسنس (<i>Serratia marcescens</i>)



تصویر شماره ۲- پلیت گرادیان نیتروفورانتویین از غلظت ۰ تا ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

بحث

نیتروفورانتویین به عنوان یک داروی سنتز شده در گروه نیتروفوران‌ها در جلوگیری و درمان عفونت ادراری به کار گرفته می‌شود. مکانیسم اثر دقیق این دارو هنوز ناشناخته است و بعضی از گزارش‌های اثر احتمالی آن را در تداخل با آنزیم‌های حیاتی باکتری‌ها معرفی می‌نمایند [۱۱]. بیشتر باکتری‌های

گروه اشریشیا به این آنتی‌بیوتیک حساس هستند در

حالی که اکثر گونه‌های انتروباکتر و کلبسیلا کمتر حساس بوده و مقاومند. همچنین بیشتر سویه‌های پروتئوس نیز به این آنتی‌بیوتیک مقاومت متوسط نشان می‌دهند. نیتروفورانتویین امروزه به عنوان یک داروی خط دوم شناخته می‌شود که بیشتر به عنوان

گیاه *M. longifolia* اثر مهارکنندگی مقاومت انتروباکتریها را به آنتی بیوتیک نیتروفورانتوین نشان داد که در این مقاله برای اولین بار گزارش می‌گردد. تحقیق حاضر می‌تواند راهگشای کشف اولین ساختمان شیمیایی به منظور مهار مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نسبت به نیتروفورانتوین باشد که امروزه به دلیل مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها رایج از جدی‌ترین عوامل بیماری‌زا در عفونت‌های ادراری محسوب می‌گردند.

پیشگیری کننده به خصوص در عفونت‌های مزمن و برگشت‌پذیر ادراری کودکان و بزرگسالان تجویز می‌گردد. به هر حال نادر بودن گسترش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک در طی ۳۰ سال گذشته مزیت فوق‌العاده برای این آنتی بیوتیک محسوب می‌گردد [۱۲]. در طی مطالعاتی که بروی غربال سازی گیاهان متعدد جهت کشف اثر مهارکنندگی مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه به نیتروفورانتوین انجام پذیرفت ترکیبات فرار

منابع

1. Davies J and Webb V. In: the Emerging Infections; Krause RM, Ed.; Academic press, San Diego. 1998; Chapter 8, pp: 239-73.
2. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chemistry Biology*. 2000; 7: R127-R132.
3. Renau TE, Hecker SJ and Lee VJ. Antimicrobial potentiation approaches: Targets and inhibitors. *Ann. Rep. Med. Chem*. 1998; 33:121-30.
4. Allen NE, Alborn Jr. WE, Hobbs Jr. JN and Kirst HA. 7-Hydroxytropolone: An inhibitor of aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase. *Anti-microb. Agents Chemother*. 1982; 22: 824-31.
5. Clancy J, Schmieder BJ, Petitpas JW, Manousos M, Williams JA, Faiella JA, Girard AE and Mcguirk PR. Assays to detect and characterize synthetic agents that inhibit the ErmC methyltransferase. *J. Antibiot*. 1995; 48: 1273-9.
6. Hirata T, Wakatabe R, Nielsen J, Satoh T, Nihira S and Yamaguchi A. Screening of an inhibitor of the tetracycline efflux pump in a tetracycline-resistant clinical-isolate of *Staphylococcus aureus* 743. *Biol. Pharm. Bull*. 1998; 21: 678-81.
7. Ahmed M, Borsch CM, Neyfakh AA and Schuldiner S. Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. *J. Biol. Chem*. 1993; 268: 11086-9.
8. Shahverdi AR and Tavassoli F. First description on the nitrofurantoin potentiation activity. *Daru*, 2002; 10:2, 90
9. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM press. Washington D.C. 1992.
10. Approved Standard NCCLS Document M2-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Fourth Edition. 1990; 10: No. 7, NCCLS, Villanova, PA.
11. McOsker CC, Pollack JR and Andersen JA. Inhibition of bacterial protein synthesis by nitrofurantoin macrocrystals: an explanation for the continued efficacy of nitrofurantoin. Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series, 1989; 154:33-43.
12. McOsker CC and Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J. Antimicrob. Chemother*. 1994; 33: 23-30.



