مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۶، شماره‌ی ۱۱۴، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷، صفـحات ۶۰ تا ۷۰

بارگذاری آنتی بیوتیک سفتازیدیم بر روی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید: بررسی سینتیک رهایش دارو و افزایش اثر ضدمیکروبی آن بر روی *سودوموناس آئروژینوزا*

دکتر علیرضا کاظمی‌زاده[۱]، دکتر مجتبی صلوتی[۲]، اعظم آهنگری[۳]، دکتر ناهید شجری[۱]، معصومه آقایاری[۴]، لیلا صفری زنجانی[۵]

نویسنده‌ی مسئول: گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان alirezakazemizadeh@yahoo.com

دریافت: ۹۶/۲/۲۴ پذیرش: ۹۶/۶/۵

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آید. هدف از تحقیق حاضر تولید یک ترکیب ضد میکروبی جدید (سفتازیدیم بار گذاری شده بر روی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و ارزیابی سینتیک رهایش و اثر ضدمیکروبی آن بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود.*

روش بررسی: *بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) انجام و با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مادون قرمز (FT-IR) تایید شد. نحوه‌ی رهایش دارو با استفاده از روش دیالیز در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۲٤، ٤۸،۷۲ و ۹٦ ساعت پس از بارگذاری سفتازیدیم ارزیابی گردید. اثر ضدمیکروبی ترکیب دارویی جدید بر روی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش‌های انتشار چاهکی و مایکرودایلوشن بررسی شد.*

یافته ها: *اسپکتروسکوپی FT-IR بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA را به میزان ۲٦/۰۱ درصد مول نشان داد. بررسی رهایش سفتازیدیم مشخص کرد که آزادسازی دارو تا ۸ ساعت به آرامی افزایش و پس از ۷۲ ساعت به ۹٦ درصد رسید. آزمایش انتشار چاهکی افزایش معنی‌دار اثر ضدمیکروبی سفتازیدیم را پس از بارگذاری بر روی EDTA نسبت به سفتازیدیم تنها ثابت کرد. MIC و MBC سفتازیدیم تنها به ترتیب، ۲ و ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.MIC ترکیب ضد میکروبی جدید ۰/۵ و MBC آن ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که نشانگر اثر افزایشی EDTA بر روی خاصیت ضدمیکروبی سفتازیدیم بود.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان می‌دهد که EDTA پتانسیل زیادی به عنوان حامل دارویی در رهایش کنترل شده آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم همراه با افزایش اثر ضدمیکروبی آن بر علیه سودوموناس آئروژینوزا دارد.*

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، سفتازیدیم، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، رهایش کنترل شده، خاصیت ضد میکروبی

۱- دکترای شیمی آلی، استادیارگروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان
۲- دکترای فیزیک پزشکی، استاد مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان
۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد هیدج، هیدج
۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه
۵- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش‌های جراحی و سوختگی است. عفونت‌های جراحی و سوختگی ناشی از این باکتری ممکن است باعث منتژیت، سپتی سمی، پنومونی و بیماری‌های کشنده دیگر شوند (۱). آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم جزء نسل سوم از خانواده‌ی سفالوسپورین‌ها است که دارای یک هسته مرکزی به نام ۷-آمینوسفالوسپورانیک اسید است. سفتازیدیم مانع فعالیت آنزیم‌های ترانس پپتیداز شده و از عمل ترانس پپتیداسیون در دیواره‌ی سلولی جلوگیری می‌نماید (۲). به علت افراط در استعمال نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی به تدریج تعدادی از باکتری‌ها در مقابل این داروها مقاوم شده‌اند (۴و ۳). یکی از روش‌های ایجاد مقاومت، کاهش نفوذپذیری جدار باکتری‌ها و دیواره‌ی یاخته‌ای آنها است که در نتیجه آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل شیمیایی نمی‌توانند به آسانی وارد آنها شده و تغییراتی در آنها به‌وجود آورند (۵). برای رفع این مشکل، یکی از راه‌هایی که می‌تواند قابلیت نفوذ به دیواره باکتری‌ها را افزایش داده و مقاومت باکتری‌ها را از بین ببرد و آنها را حساس نماید، به کار بردن اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) به‌عنوان حامل دارو می‌باشد (۶). یکی از اثرات شناخته شده EDTA، ایجاد اختلال در غشای خارجی باکتری‌ها از طریق ایجاد اختلال در غشای نفوذ ناپذیر آنها می‌باشد (۷). استفاده از ترکیب EDTA و آنتی‌بیوتیک‌های مهار کننده‌ی سنتز دیواره‌ی سلولی نظیر سفتازیدیم با نسبتی مناسب می‌تواند کنترل *سودوموناس آئروژینوزا* را بهبود بخشد (۸).

با مطالعه‌ی تحقیقات پیشین می‌توان دریافت که تخریب باکتری‌ها عموما به وسیله‌ی مواد ضدمیکروبی و بر اساس یکی از روش‌های تخریب غشای باکتری، تغییر شکل فضایی، تخریب آنزیم‌های باکتری، آسیب به کروموزوم و تخریب دیواره‌ی باکتری انجام می‌شود. EDTA به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی مهم سبب اختلال در غشای خارجی باکتری‌ها از طریق ایجاد اختلال در غشای نفوذ ناپذیر آنها می‌گردد. نخستین بار در سال ۱۹۵۶ رپاسکه (۹) این ماده را برای لیز باکتری‌های گرم منفی به کاربرد و در سال ۱۹۷۲ بارت و آسکر (۱۰) عمل شلاته شدن را روی سودوموناس‌های مقاوم به کاربنی‌سیلین آزمایش کردند و مشاهده نمودند که این باکتری‌ها در اثر عملکرد EDTA قابلیت نفوذشان افزایش یافته و حساس می‌شوند و آنتی‌بیوتیک مزبور به خوبی می‌تواند بر آن‌ها تاثیر نماید. اثر EDTA بر باکتری‌ها را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: ۱- تاثیر آن بر باکتری‌های گرم مثبت ۲- تاثیر آن بر باکتری‌های گرم منفی. در مورد اول EDTA ممکن است با جدا کردن کلسیم و منیزیمی که برای استحکام و نگهداری دیواره‌ی یاخته‌ای لازم است پایداری آن را از بین برده و قابلیت نفوذ آن را نسبت به عوامل شیمیایی افزایش دهد. در مورد دوم به علت عمل شلاته شدن و بیرون کشیدن فلزات از دیواره یاخته‌ای باکتری‌های گرم منفی، باعث آزاد شدن مقادیر زیاد پروتئین و لیپوپلی ساکارید از دیواره‌ی یاخته‌ای آنها شده و قابلیت نفوذ آنها را نسبت به داروهای شیمیایی افزایش می‌دهد. در ضمن باعث تغییرات اسیدهای نوکلئیک و آزاد شدن آنها و نوکلئوتیدها و تجزیه‌ی RNA ریبوزوم‌ها نیز می‌گردد (۱۲و۱۱).

تحقیقات بانین و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان داد که EDTA با شلاته کردن منیزیم لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی، سبب آزاد شدن لیپوپلی ساکارید و مرگ باکتری می‌شود (۱۳). در گزارشی دیگر آقای یوشیزامی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که کمپلکس EDTA با کلسیم و ایمی پنم باعث افزایش اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک ایمی پنم در موش‌های عفونی شده با *اشرشیاکلی* می‌شود (۱۴). رازان حمود و همکارانش در سال ۲۰۱۴ آنتی‌بیوتیک ونکومایسین را با EDTA و تیمول (Thymol) ترکیب کردند و اثر این ترکیب دارویی را بر روی باکتری‌های مقاوم شده به

آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که این ترکیب دارویی جدید باعث افزایش حساسیت *اشرشیاکلی* به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین می‌شود (۱۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیقات انجام شده در این زمینه، هدف از تحقیق حاضر بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA، بررسی سینتیک رهایش سفتازیدیم و بررسی اثر هم افزایی ترکیب دارویی جدید بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

روش بررسی

آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم با کدC3809 از کمپانی سیگمای آمریکا خریداری شد. اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) و حلال آلی ترا هیدرو فوران (THF) و محیط‌های کشت مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton agar) و مولر هینتون براث (Mueller-Hinton broth) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonads aeruginosa* ATCC27853) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA: جهت بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA ابتدا برای خشک کردن حلال آلی THF مورد نیاز، ۰/۲۵گرم فلز سدیم و ۰/۰۰۷ گرم پودر بنزو فنون (Benzophenone) به ۲۵ میلی‌لیتر از حلال THF در یک بالن افزوده شد. سپس محتویات بالن به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه هیتر–استیرر در حمام روغن، رفلاکس گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، محلول THF تغییر رنگ داده و به‌رنگ آبی کاملا پررنگ تبدیل شد که این رنگ نشانگر خشک شدن حلال THF بود. با تقطیر محلول حاصل، حلال خشک THF به دست آمد. در مرحله بعد برای انجام عمل لودینگ به محلولی که از انحلال ۰/۱۱۷ گرم EDTA در ۱۵ میلی‌لیتر حلال THF خشک تهیه شده بود، محلولی شامل ۱ گرم از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم در ۱۰ میلی‌لیتر THF خشک افزوده شد و محتویات بالن به مدت ۱ ساعت بر روی دستگاه استیرر قرار گرفت. سپس مخلوط واکنش در حلال *n*–هگزان رسوب داده شد و در حلال دی کلرومتان حل و مجددا در حلال دی اتیل اتر رسوب داده شد و در نهایت سانتریفیوژ گردید. محصول نهایی فیلتر شده و آنتی‌بیوتیک لود شده بر روی EDTA با استفاده از دستگاه پمپ خلا به صورت پودر تهیه شد (۱۶). برای بررسی میزان بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA، EDTA قبل و بعد از لود شدن وزن شد. سپس طبق فرمول زیر درصد بارگذاری سفتازیدیم بر روی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید محاسبه گردید (۱۶).

۱۰۰× تعداد مول‌های EDTA/تعداد مول‌های سفتازیدیم =درصد بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA

اسپکتروسکوپی FT-IR: برای تایید اتصال اتیلن دی آمین ترا استیک اسید به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، طیف مادون قرمز آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA با استفاده از دستگاه FT-IR مدل Jasco-6300 گرفته شد. بدین منظور هر یک از نمونه‌های مذکور با پودر KBr به‌صورت قرص تهیه و طیف مادون قرمز آنها در محدوده ۴۰۰ تا cm^{-1} ۴۰۰۰، به‌طور جداگانه تهیه و با یکدیگر مقایسه شدند (۱۶).

ارزیابی رهایش دارو: میزان رهاسازی دارو با استفاده از روش دیالیز در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. برای فعال‌سازی کیسه دیالیز مقدار ۴/۲ گرم سدیم بی کربنات در بالن ژوژه ۵۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. سپس مقداری از کیسه دیالیز در داخل این محلول به مدت زمان ۳۰ دقیقه جوشانده شد. در مرحله‌ی بعد ۱/۸۶ گرم EDTA در داخل بالن ژوژه ۵۰۰ میلی‌لیتر به حجم رسانده شد و pH محلول در ۷ تنظیم گردید. سپس کیسه‌ی دیالیز داخل محلول ۱۰ میلی‌مولار EDTA مجددا به مدت زمان ۳۰ دقیقه جوشانده و در الکل ۷۰ درصد تا زمان استفاده نگه داری شد. سپس کمپلکس تهیه شده از اتیلن دی آمین ترا استیک اسید/سفتازیدیم با محلول بافر فسفات استریل (pH=۷) به

حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول آماده شده درون کیسه دیالیز ریخته شد. ۴۰ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات درون یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس کیسه‌ی دیالیز حاوی نمونه به‌حالت معلق در آن قرار داده شد و محتویات بشر بر روی استیرر هم زده شد. بافر بعد از گذشت زمان‌های (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) ساعت تعویض گردید و در هر مرحله از تعویض، بافر داخل لوله آزمایش ریخته شده و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS جهت به دست آوردن غلظت سفتازیدیم رها شده خوانده شد (۱۶).

بررسی اثر ضد میکروبی کمپلکس سفتازیدیم-EDTA: در روش انتشار چاهکی برای بررسی اثر کشندگی کمپلکس سفتازیدیم -EDTA بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه و به ضخامت ٤ تا ۵ میلی‌متر در چند پلیت تقسیم گردید. سپس چاهک‌هایی به قطر تقریبی ۵ میلی‌متر در پلیت‌ها حفر شد. از سوسپانسیون میکروبی که برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بود توسط سواب استریل بر روی آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌ها توسط سمپلر از رقت‌های ۱، ۱:۲ تا ۱:۲۵٦ کمپلکس سفتازیدیم -EDTA (۰/۱ میلی‌لیتر) پر شدند. در سایر پلیت‌ها نیز چاهک‌ها به‌ترتیب با ۰/۱ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم تنها، EDTA تنها، مخلوط EDTA و آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (با غلظت مشابه با کونژوگه EDTA-Ceftazidime) و نرمال سالین به عنوان کنترل پر شدند. سپس پلیت‌ها در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت انکوبه شده و در نهایت قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها بر روی پلیت‌ها در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری گردید. این آزمایش سه بار تکرار شد (۸).

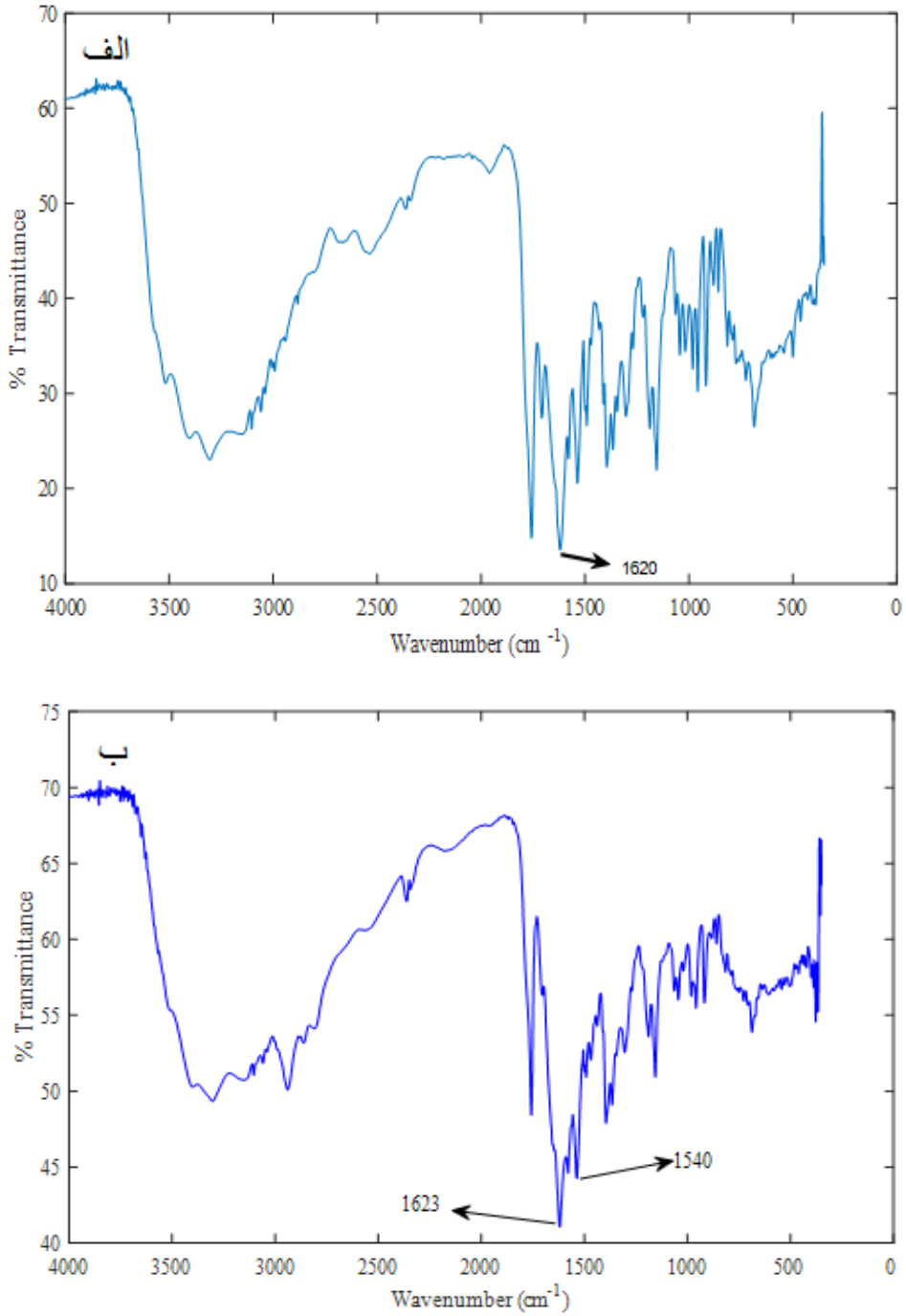
روش براث مایکرودایلوشن برای تعیین MIC و MBC: برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA، سفتازیدیم تنها و EDTA تنها از روش براث مایکرودایلوشن استفاده گردید. در این روش اثر مهاری و کشندگی غلظت های مختلف کمپلکس سفتازیدیم -EDTA، سفتازیدیم و EDTA و مخلوط EDTA با سفتازیدیم شامل ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸ و ۲۵٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط مولر هینتون براث بررسی گردید. بدین‌منظور از کلونی‌های حاصل از کشت استوک *سودوموناس آئروژینوزا* بر روی محیط مولر هینتون براث که پس از ۲٤ ساعت رشد می‌کردند (در این حالت باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند)، سوسپانسیونی تهیه و برابر ۰/۵ مک فارلند به روش مشاهده چشمی در منبع نور استاندارد شد. کدورت باکتریایی ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۱:۱۵۰ رقیق گردید تا تعداد باکتری‌ها 5×10^{5} CFU/ml شود. این بررسی سه بار تکرار شد (۱۵).

تحلیل آماری: به منظور تجزیه وتحلیل آماری نتایج حاصل، آزمون آماری آنالیز واریانس ANOVA و آزمون تعقیبی LSD تحت نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمون $P<$ ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز اسپکتروسکوپی FT-IR: برای تایید اتصال EDTA به آنتی بیوتیک سفتازیدیم، طیف‌های مادون قرمز آنتی بیوتیک سفتازیدیم و کمپلکس سفتازیدیم -EDTA گرفته شد (شکل ۱ الف و ب). در اثر انجام واکنش اسید و باز بین گروه‌های COOH اتیلن دی آمین تترا استیک اسید و گروه NH_2 آنتی بیوتیک سفتازیدیم، انتقال پروتون از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم منجر به ایجاد آنیون کربوکسیلات و کاتیون NH_3^+ می‌گردد که بین این دو یون نیروی جاذبه الکترو استاتیک برقرار می‌شود. نوار خمشی NH در گروه NH_2 سفتازیدیم

در حدود $1620\ cm^{-1}$ ظاهر می‌شود در حالی که برای سفتازیدیم بارگذاری شده با EDTA، دو نوار خمشی متقارن و نا متقارن NH گروه NH_3^+ به ترتیب در ۱۵۴۰ و $1623\ cm^{-1}$ ظاهر می‌گردد.



*شکل ۱. الف) طیف **FT-IR** آنتی بیوتیک سفتازیدیم دارای نوار خمشی در گروه NH_2 در حدود $1620\ cm^{-1}$ می‌باشد، و ب) طیف **FT-IR** سفتازیدیم بارگذاری شده با **EDTA** دارای دو نوار خمشی در گروه NH_3^+ حدود ۱۵۴۰ و $1623\ cm^{-1}$ می‌باشد.*

سپس طبق فرمول ذکر شده، درصد بارگذاری سفتازیدیم بر روی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید محاسبه گردید:

وزن مولکولی EDTA = ۳۷۲/۲۴ g/mol

وزن مولکولی سفتازیدیم = ۶۳۶/۶ g/mol

وزن کمپلکس α = ۰/۱۶۹ g

وزن EDTA قبل از تشکیل کمپلکس β = ۰/۱۱۷ g

وزن سفتازیدیم در کمپلکس $(\alpha - \beta)$ = ۰/۰۵۲ g

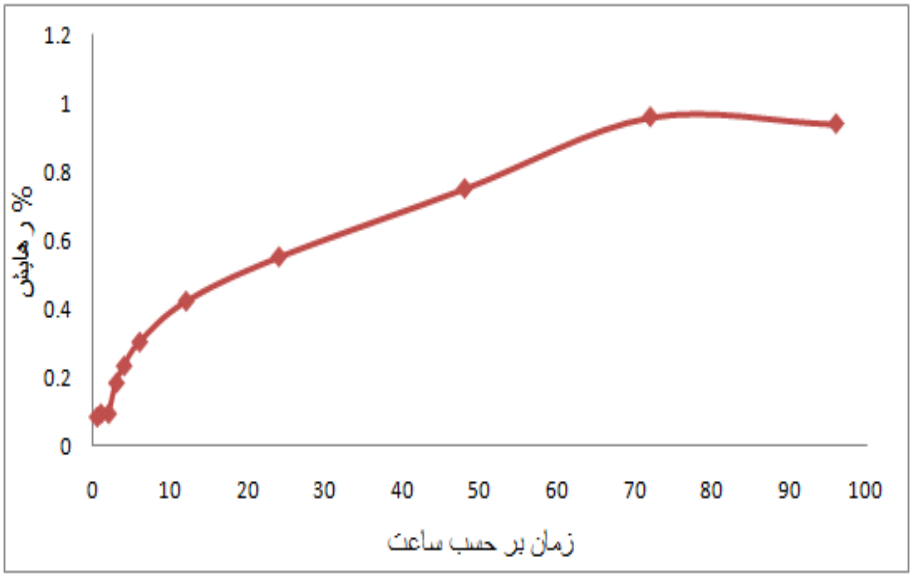
تعداد مول‌های EDTA $= \frac{۰/۱۱۷}{۳۷۲/۲۴} =$ ۰/۰۰۰۳۱۴ mol

تعداد مول‌های سفتازیدیم $= \frac{۰/۰۵۲}{۶۳۶/۶} =$ ۰/۰۰۰۰۸۱۶ mol

درصد $= \frac{۰/۰۰۰۰۸۱۶}{۰/۰۰۰۳۱۴} \times ۱۰۰ =$ ٪۲۶/۰۱۳ mol

بارگذاری سفتازیدیم بر روی EDTA

رهایش سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA: شکل ۲ نحوه‌ی رهایش آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA را نشان می‌دهد. طبق نتیجه به دست آمده رهایش داروی بارگذاری شده تا ساعت هشتم به آرامی افزایش یافت و بیشترین میزان رهایش دارو در ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بود.



شکل ۲: رهایش داروی بارگذاری شده بر اساس درصد سفتازیدیم آزاد شده در طول زمان بر حسب ساعت

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA روش انتشار چاهکی: میزان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA، سفتازیدیم تنها و EDTA تنها، به روش انتشار چاهکی با اندازه گیری قطر هاله‌ی عدم رشد تعیین شد. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود قطر هاله ی عدم رشد ترکیب سفتازیدیم با EDTA نسبت به سفتازیدیم تنها و EDTA تنها افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. همچنین نتایج به دست آمده نشانگر افزایش معنی‌دار اثر ضد میکروبی سفتازیدیم در حالت کونژوگه شده با EDTA نسبت به حالت ترکیب سفتازیدیم با EDTA تا رقت ۱:۱۶ است. این بررسی تایید کننده‌ی افزایش اثر ضدمیکروبی کمپلکس سفتازیدیم با EDTA بر روی *سودموناس ائروژینوزا* نسبت به سفتازیدیم تنها بود.

جدول ۱: نتایج مربوط به انتشار چاهکی

گروه ها	EDTA-Ceftazidime Complex							سفتازیدیم	EDTA	مخلوط EDTA با سفتازیدیم	نرمال سالین
رقت	۱	۱:۲	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲	۱:۶۴	۱:۱۲۸	۱:۲۵۶				
میانگین	۳۵/۳۳	۳۴/۶۶	۳۲/۶۶	۳۰/۶۶	۲۹	۲۶/۳۳	۲۴	۲۳/۳۳	۲۲/۶۶	۱۸/۳۳	۹	۲۵	۰
± انحراف معیار	± ۰/۶	± ۱/۱	± ۱	± ۰/۶	± ۱	± ۱	± ۰/۶	± ۰/۶	± ۱/۱	± ۰/۶	± ۱	± ۰/۵	۰

نتایج تعیین MIC و MBC سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا*: میزان MIC و MBC سفتازیدیم، EDTA، مخلوط EDTA با سفتازیدیم و کمپلکس سفتازیدیم -EDTA بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط مولر هینتون براث که در غلظت‌های ۲۵۶ تا ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده بود بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج مربوط به روش براث مایکرودایلوشن برای تعیین MIC و MBC

فاکتور مورد نظر / نمونه	MIC	MBC
EDTA	۸ µg/ml	۱۶ µg/ml
سفتازیدیم	۲ µg/ml	۴ µg/ml
مخلوط EDTA با سفتازیدیم	۱ µg/ml	۲ µg/ml
کمپلکس سفتازیدیم-EDTA	۰/۵ µg/ml	۱ µg/ml

بحث

در تحقیق حاضر، بارگذاری آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بر روی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) صورت پذیرفت و سپس با استفاده از روش اسپکتروسکوپی FT-IR مورد تایید قرار گرفت. برای بررسی میزان آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم لود شده بر روی EDTA از روش محاسبه وزن مولکولی مطابق استفاده شد. میزان آنتی بیوتیک لود شده بر روی EDTA برابر (۲۶/۰۱ مول) مول درصد بود. جهت بررسی رهایش دارو از کیسه‌ی دیالیز استفاده شد. بررسی رهایش سفتازیدیم نشان داد که رهایش دارو تا ۸ ساعت به آرامی افزایش یافته و در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین میزان را داشته و به ۹۶ درصد رسیده است. این الگو می‌تواند بیانگر نحوه‌ی رهایش مناسب سفتازیدیم در بدن باشد (۱۷).

در مرحله‌ی بعد آزمایش انتشار چاهکی جهت بررسی اثر ضد میکروبی ترکیب دارویی جدید بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد. با توجه به نتایج جدول ۱ مشاهده شد که میانگین قطر هاله عدم رشد برای سفتازیدیم به تنهایی ۰/۵۷ ±۱۸/۳۳ میلی‌متر می‌باشد که بعد از ترکیب با EDTA به ۰/۵۲ ± ۲۵ و پس از بارگذاری بر روی EDTA به میزان ۰/۵۷± ۳۵/۳۳ میلی‌متر (در بیشترین غلظت) افزایش یافته است. طبق این بررسی می‌توان به اثر افزایشی خاصیت ضد میکروبی سفتازیدیم بارگذاری شده بر روی EDTA پی برد، زیرا اثر داروی بارگذاری شده بیش از اثر اتیلن دی آمین استیک اسید و سفتازیدیم به تنهایی و به‌صورت ترکیب است. در واقع EDTA به‌علت خاصیت ضد میکروبی سبب فروپاشی غشا *سودوموناس آئروژینوزا* شده و خود می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی قوی عمل نماید که در نهایت با بارگذاری آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بر روی آن باعث افزایش اثر دارو می‌گردد. نتایج مشابهی با تحقیق حاضر در افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد آنتی بیوتیک‌ها بعد از ترکیب باEDTA توسط محققان دانشگاه تنتا مصر در سال ۲۰۰۶ گزارش گردیده است (۸). این محققان گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل تتراسیکین، کلرامفینیکل، گارامایسین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین و ریفامایسین را با EDTA ترکیب

نمودند و اثر ضد میکروبی کمپلکس EDTA با آنتی‌بیوتیک‌ها را بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* از طریق آزمایش انتشار چاهکی بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک‌های ترکیب شده با EDTA بیشتر از آنتی بیوتیک‌های ازاد می‌باشد (۸). نتایج بررسی اثر ضد میکروبی کمپلکس EDTA با سفتازیدیم به روش براث مایکرودایلوشن نیز نشان داد که MIC و MBC سفتازیدیم بعد از ترکیب با EDTA به ترتیب از ۲ به ۰/۵ و از ۴ به ۱ کاهش یافته است که این نتایج نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار اثر ضد میکروبی سفتازیدیم بار گذاری شده بر روی EDTA نسبت به سفتازیدیم آزاد بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. رعد و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ترکیب EDTA با مینوسایکلین را برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کاندیدا آلبیکانس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این دو باعث کاهش شدید باکتری‌های بیوفیلم می‌شوند (۱۸). چنین نتیجه‌ای در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید. لامبرت و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را با EDTA ترکیب کردند و اثر ضد میکروبی آن را بر روی *سودوموناس آئرروژینوزا* به‌روش براث مایکرودایلوشن بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که MIC آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین ۳ الی ۱۰ برابر و آمپی‌سیلین ۷۰ برابر بعد از ترکیب با EDTA کاهش یافته است. نتایج آزمایش آنها حاکی از اثر هم افزایی EDTA بر روی آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود (۱۹). مشابه با کار لامبرت در این تحقیق میزان MIC سفتازیدیم بعد از ترکیب با EDTA کاهش یافت که مبنی بر افزایش اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک کونژوگه شده می‌باشد. لباکس و همکارانش در سال ۲۰۱۵ آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکومایسین و آمیکاسین را با EDTA ترکیب کرده و اثر ضد میکروبی آن را بر علیه بیوفیلم‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که ترکیب EDTA با این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش اثر ضدمیکروبی آنها بر علیه این باکتری‌ها می‌شود (۲۰). در تحقیق حاضر نیز افزایش اثر ضد میکروبی سفتازیدیم بعد از ترکیب با EDTA مشاهده گردید. در تحقیقی دیگر لیو و همکارانش در سال ۲۰۱۷ اثر ضد میکروبی ترکیب EDTA با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین را برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط برون تنی و درون تنی مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که MIC این آنتی‌بیوتیک‌ها بعد از ترکیب با EDTA نسبت به آنتی‌بیوتیک تنها کاهش یافت. علاوه بر این در شرایط درون تنی مشاهده کردند که ترکیب EDTA با سیپروفلوکساسین اثر ضد میکروبی قویتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تنها بر روی بیوفیلم ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* داشت (۲۱). در مقایسه با کارلیو در تحقیق حاضر نیز افزایش اثر ضد میکروبی سفتازیدیم پس از بار گذاری شده بر روی EDTA بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده گردید.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کونژوگاسیون سفتازیدیم بر روی EDTA تاثیر قابل توجهی در افزایش معنی‌دار اثر ضدمیکروبی این آنتی‌بیوتیک بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* خواهد داشت. همچنین EDTA پتانسیل بزرگی به‌عنوان حامل دارویی در رهایش کنترل شده آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات بیولوژی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان که امکان

اجرای این مطالعه را فراهم آورده اند، کمال تشکر و قدردانی را به جا می‌آورند.

References

1- Moreno A, Salgado H. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. *Physic Chem*. 2012; 2: 6-11.

2- Schultz MJ, Speelman P, Zaat SA, Hack CE, Van Deventer SJ, Van der Poll T. The effect of *Pseudomonas* exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 29: 227-32.

3- Barriere SL. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 16: 151-53.

4- Bancroft EA. Antimicrobial resistance: it's not just for hospitals. *JAMA*. 2007; 298: 1803-4.

5- Ozseven AG, Sesli Çetin E, Ozseven L. Do different interpretative methods used for evaluation of checkerboard synergy test affect the results? *Mikrobiyol Bul*. 2012; 46: 410-20.

6- Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 30: 627-34.

7- El-Sharif AA, Hussain MH. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Microbiol*. 2011; 62: 739-45.

8- Hussein MZ, Amara AA. Case-by-case study using antibiotic-EDTA combination to control *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Pharm Sci*. 2006; 19: 236-43.

9- Repaske R. Lysis of gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim biophys Acta* 1958; 30: 225-32.

10- Barrett E, Asscher AW. Action of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on carbenicilin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 1972; 5: 355-59.

11- Lefebvre E, Vighetto C, Di Martino P, Larreta Garde V, Seyer D. Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antiseptics, enzymes and EDTA: a study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 48: 181-8.

12- Junka A, Bartoszewicz M, Smutnicka D, Secewicz A, Szymczyk P. Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test. *Int Wound J*. 2014; 11: 730-4.

13- Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Enviroment Microbiol*. 2006; 72: 2064-2069.

14- Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM, et al. Efficacies of calcium–EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by

Escherichia coli with NDM-1 b-lactamase. *J Infect Chemother*. 2013; 19: 992-95.

15- Razan Hamoud R, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. *Phytomedicine* 2014; 21: 443-47.

16- Namazi H, Motamedi S, Namvari M. Synthesis of new functionalized citric acid-based dendrimers as nanocarrier agents for drug delivery. *BioImpacts*. 2011; 1: 63-69.

17- Aghayari M, Salouti M, Kazemizadeh AR, et al. Enhanced antibacterial activity of ceftazidime against *pseudomonas aeruginosa* using poly (propyleneimine) dendrimer as a nanocarrier. *Scientia Iranica F*. 2015; 22: 1330-36.

18- Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, et al. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3580-3585.

19- Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2004; 96: 244-53.

20- Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo J, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70: 1704-12.

21- Liu Z, Lin Y, Lu Qi, et al. In vitro and in vivo activity of EDTA and antibacterial agents against the biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection* 2017; 45: 23-31.

Ceftazidime Loading on Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Release Kinetic and Enhanced Antimicrobial Effect on *Pseudomonas aeruginosa*

Kazemizadeh AR[1], Salouti M[2], Ahangari A[3], Shajari N[1], Aghayari M[3], Safari Zanjani L[4]

[1]Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

[2]Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

[3]Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Hidaj Branch, Hidaj, Iran

[4]Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

Corresponding Author: Kazemizadeh AR, Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

E-mail: alirezakazemizadeh@yahoo.com

Received: 14 May 2017 **Accepted:** 27 August 2017

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of nosocomial infections. This study was planned to produce a new antimicrobial complex (ceftazidime loaded EDTA) and assess its release kinetic and antimicrobial effects on *P. aeruginosa.*

Materials and Methods: The loading of ceftazidime on EDTA was performed and confirmed by FT-IR spectroscopy. The evaluation of drug release was performed by using dialyze method at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 h after ceftazidime loading on EDTA. The antimicrobial effect of the new drug on *P. aeruginosa* was investigated by macrodilution and well diffusion methods.

Results: FT-IR spectroscopy demonstrated ceftazidime loading on EDTA about 26.01 mol%. Evaluation of ceftazidime release indicated a gradual rise in drug release up to 8 h reaching 96% after 72 h. Well diffusion assay demonstrated an enhanced antimicrobial effect of ceftazidime after loading on EDTA in comparison with ceftazidime alone. MIC and MBC of ceftazidime alone determined 2 and 4 µg/ml, respectively. MIC of the new antimicrobial complex was 0.5 µg/ml and its MBC was 1 µg/ml signifying the enhancement effect of EDTA on antibacterial activity of ceftazidime.

Conclusion: Our results showed that EDTA is potentially advantageous in controlling the release of ceftazidime as well as enhancing its antimicrobial effect against *P. aeruginosa*.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Ceftazidime, EDTA, Controlled release, Antimicrobial effect