

Preparation of Nano Vancomycin antibiotic and Evaluation of inhibitory efficiency against *S. aureus* locally isolated

تحضير المضاد فانكوميسين النانوي وتقييم كفاءته التثبيطية ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محلياً .

* نيران عدنان عبدالكاظم علي عبدالكاظم الغانمي

جامعة كربلاء / كلية العلوم

* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول .

المستخلص:

تم تحضير مركب نانوي هجين Mg/Al-VAN-LDH باستخدام طريقة التبادل الأيوني المباشر بين المضاد فانكوميسين (VAN) Vancomycin antibiotic و طبقات ثنائية الهيدروكسيد (layered double hydroxide , LDH) . تم تشخيص المضاد فانكوميسين النانوي الجديد ، إذ كشفت مطيافية الأشعة تحت الحمراء عن ظهور مجاميع جديدة في طيف المضاد Mg/Al-VAN-LDH مما يشير الى تكوين مضاد فانكوميسين جديد كما أوضحت تقنية حيود الأشعة السينية (X-Ray Diffraction , XRD) ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد Mg/Al-VAN-LDH مقارنة بطيف حيود الطبقات ثنائية الهيدروكسيد . و أثبتت صورتي مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM) (الثانية والثالثة الأبعاد الحصول على مركب ضمن الأبعاد و المقاسات النانوية . كما تم دراسة الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي المحضر ضد عزلات بكتريا *S. aureus* .

الكلمات المفتاحية : النانوي الهجين ، طبقات ثنائية الهيدروكسيد ، المضاد فانكوميسين .

Abstract :

A nanohybrid vancomycin antibiotic Mg/Al-VAN-LDH was prepared by using direct ion exchange method between vancomycin antibiotic (VAN) and layered double hydroxide (LDH) . The new nano vancomycin antibiotic was identified. FT-IR spectroscopy revealed the appearance of new groups in the Mg/Al-VAN-LDH spectrum which indicates the formation of new compound. The X-Ray Diffraction (XRD) spectrum revealed the appearance of new diffraction planes in the nanohybrid vancomycin antibiotics spectrum compare with the spectrum of layered double hydroxide . The two and three dimensional image of the studied compound in atomic force microscope confirmed the formation of new vancomycin antibiotic with nanodimensions. The inhibitory activity of the prepared nanoantibiotic has been studied against *S. aureus* isolates .

Key words : Nanohybrid , Layered double hydroxide , Vancomycin antibiotic

المقدمة :

ينتمي المضاد Vancomycin الى مجموعة مضادات glycopeptides وقد عزل لأول مرة عام 1957 من البكتريا *Streptomyces orientalis* [1] وتم ادخاله الى الاستخدام السريري منذ ما يقرب من 50 سنة لمعالجة الإصابات المتسببة بفعل بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثسلين [2] .

على الرغم من تنوع المضادات الحيوية المستخدمة في علاج بكتريا *S. aureus* الحساسية الا ان علاج النوع المقاوم منها MRSA يكاد يقتصر على استخدام انواع قليلة ومحدودة من هذه المضادات ، يتصدرها المضاد Vancomycin الذي ينتمي الى مضادات glycopeptides والذي يتميز بكفائته التثبيطية العالية ضد بعض انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام فضلاً عن كونه يمثل الخط الدفاعي الأول ضد الإصابات المتسببة بفعل بكتريا MRSA [3] و [4] و [5] .

يتصف الفانكوميسين بكونه ذائب بالماء ويبلغ وزنه الجزيئي 1485 ويمتلك الصيغة الجزيئية $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$. كما انه ضعيف الامتصاص من قبل القناة المعوية (GI tract) وذلك بعد التجريع الفموي (Oral administration) [6] و [7] .

يبيد الفانكوميسين فعالية تثبيطية جيدة ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام الهوائية الكروية منها والعصوية مثل *Staphylococci* و *Streptococci* و *Enterococci* و *Pneumococci* وبكتريا *Corynebacterium* و *Listeria* و *Bacillus spp.* و *Clostridia* فضلاً عن البكتريا الموجبة لصبغة غرام الفموية اللاهوائية. كما يعد هذا المضاد فعالاً ضد بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) وبكتريا *S. epidermidis* المقاومة للمثسلين (MRSE) وبكتريا *Corynebacterium jeikim* المقاومة للبنيسلين وبكتريا *Streptococcus pneumonia* وبكتريا *Clostridium difficile*.

في حين تعد بكتريا *Leuconostoc* و *Lactobacillus* و *Pediococcus* و *Erysipelothrix* مقاومة للفانكوميسين [8].

اكتسبت التقنية النانوية (Nanotechnology) أهمية بالغة في الطب وتطورت تطبيقاتها وتسارعت بشكل ملفت للنظر في غضون عقود قليلة من الزمن . ويهدف الطب النانوي (Nanomedicine) الى تسخير التقنية النانوية بما يصب في تحسين صحة الإنسان وتحقيق رفاهيته ، إذ أن الدقائق النانوية (Nanoparticles) التي تتراوح أبعادها بين (1 – 100) نانومتر قد تم تصميمها لتكون مهيئة للاستخدام لأغراض التشخيص (Diagnosis) والعلاج (Therapeutics) وكأدوات طبية حيوية (Biomedical tools) في المجال البحثي [9].

وبالنظر الى الأهمية الكبيرة للمضاد فانكوميسين فقد هدفت هذه الدراسة الى تحضير مضاد نانوي هجين من هذا المضاد وتقييم كفاءته التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من أماكن مختلفة من أجسام المرضى .

المواد وطرائق العمل :

تم تحضير المضاد النانوي الهجين من طبقات المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO₃LDH) مع المضاد فانكوميسين بطريقة التبادل الايوني المباشر حيث اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [10] مع بعض التحوير في تحضير المضاد النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد فانكوميسين المحضر اعلاه الى محلول الطبقات ثنائية الهيدروكسيد الناتج عن اذابة 1 غم من راسب الطبقات ثنائية الهيدروكسيد في 50 مل من الماء المقطر المزال منه الايونات (وحرك المزيج مغناطيسيا بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة اعقبه فصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 50 درجة مئوية وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيراً خزنه في الثلاجة .

تم تشخيص المضاد النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH بالطرائق الطيفية وفحوصات مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM) وكما يأتي :

1- التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)

تم عمل قرص من المضاد فانكوميسين مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنهما بصورة جيدة وتم قياس طيف الاشعة تحت الحمراء في مدى من الاعداد الموجية (4000-400) سم⁻¹ .

2- التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية (X-Ray Diffraction , XRD)

تم تشخيص الحامض النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH باستخدام طيف حيود الاشعة السينية والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام و بعدها للمضاد الفانكوميسين النانوي الهجين وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda = 2d\sin\theta$ لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها .

3- الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM)

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المضاد النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH و قياس أقطار و حجوم و تجمعات الجزيئات النانوية ، إذ تم إرسال النموذج الى د. عبدالكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصه .

أختبار الفعالية التثبيطية للمضاد فانكوميسين النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH والمضاد فانكوميسين الحر :

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين (Mg/Al-VAN-LDH) والمضاد فانكوميسين الحر (VAN-Free) ضد العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة وبتراكيز (0.005 , 0.01 , 0.1 , 0.25 , 0.5 , 1 , 3) ملغم / مل على وفق طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر [11] .

العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة :

تم الحصول على 18 عزلة من بكتريا *S. aureus* معزولة من أماكن مختلفة من أجسام المرضى و مشخصة بتقنية PCR في دراسة سابقة [12] تضمنت 9 عزلات مقاومة للمثيسلين MRSA في حين كانت التسع المتبقية حساسة . و قد أجريت هذه الدراسة في قسم علوم الحياة - كلية العلوم / جامعة كربلاء في الفترة من 15 / 1 / 2016 و لغاية 15 / 4 / 2016 .

النتائج و المناقشة :

تشخيص المضاد فانكوميسين النانوي الهجين

1- التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء

أ- طيف الاشعة تحت الحمراء لطبقات ثنائية الهيدروكسيد

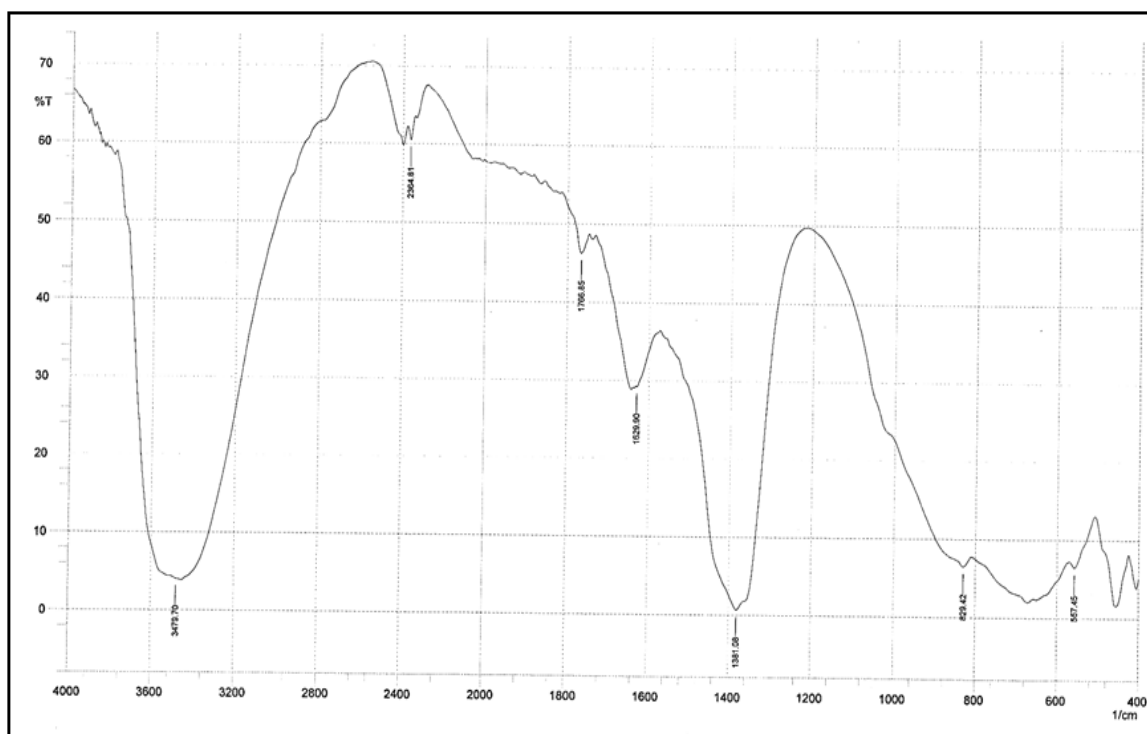
يتضح من الشكل 1 ان طبقات المغنيسيوم /الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد أظهرت العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة، فالحزمة عند 3527 سم⁻¹ تعود الى اهتزاز المطر لرابطة (O-H) ، وهي حزمة مستعرضة لوجود تداخل من انواع مختلفة من الهيدروكسيل مثل هيدروكسيل الطبقة الثنائية و هيدروكسيل الماء المتمز فيزيائيا [13] و [14] . اما الحزمة المميزة عند 1383 سم⁻¹ فتعزى الى مجموعة النترات (NO₃) الموجودة بين الطبقات [15] بينما تعود الحزم الواقعة بين 400-600 سم⁻¹ الى اهتزاز رابطة Mg-O و Al-O [16] .

ب- طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد فانكومايسين

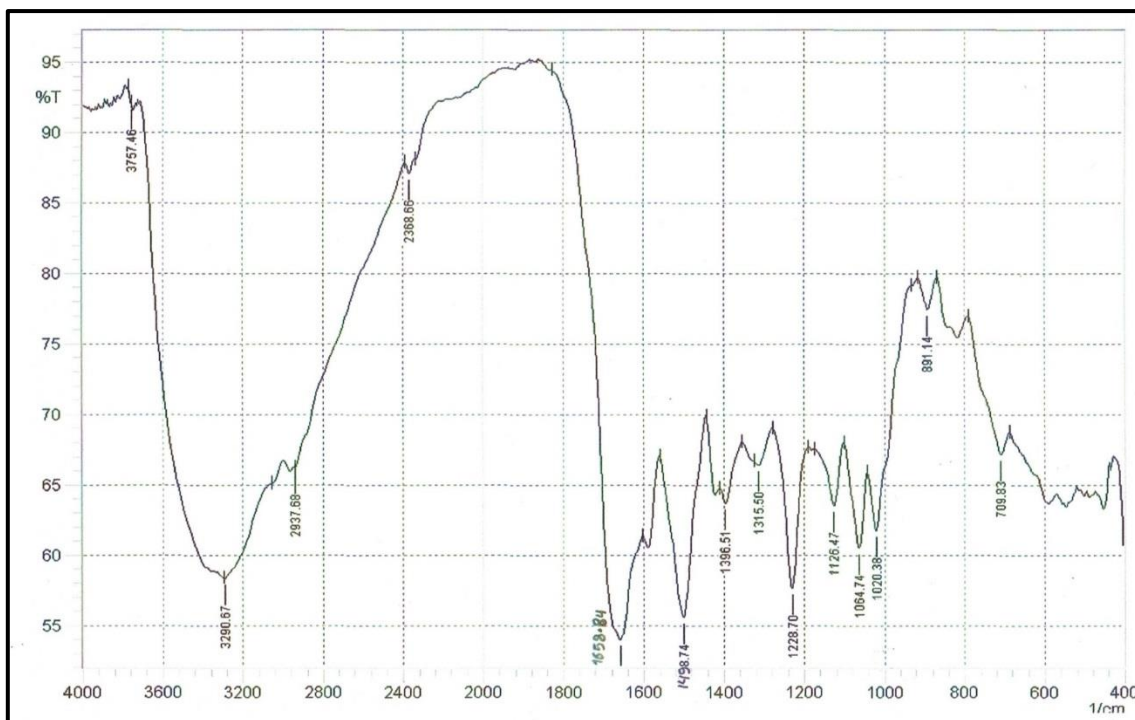
أظهر المضاد الحر VAN-Free العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة اذ يتضح من الشكل 2 ان الحزمة عند التردد 3290 سم⁻¹ تعزى الى اهتزاز المط لرابطة الهيدروكسيل (O-H) [17]. اما الحزمة عند التردد 2937 سم⁻¹ فتعود الى اهتزاز المط لمجموعة (C-H) الاليفاتية، بينما يلاحظ أن اهتزاز مط مجموعة (C-H) الاروماتية يكون متداخلاً مع اهتزاز مط رابطة الهيدروكسيل (O-H). كما يلاحظ من الشكل نفسه ظهور حزمة عند التردد 1658 سم⁻¹ والتي تشير الى اهتزاز لمجاميع الكربونيل (C=O) الحامضية و الأميدية. فيما يشير ظهور الحزمتين عند الترددين (1498 و 1589) سم⁻¹ الى اهتزاز مط هيكلية لحلقة البنزين (C $\equiv$ C) واخيراً تعود الحزمة عند التردد 891 سم⁻¹ الى انحناء مجموعة (C-H) الاروماتية خارج المستوي [17].

ج- طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين (Mg/Al-VAN-LDH)

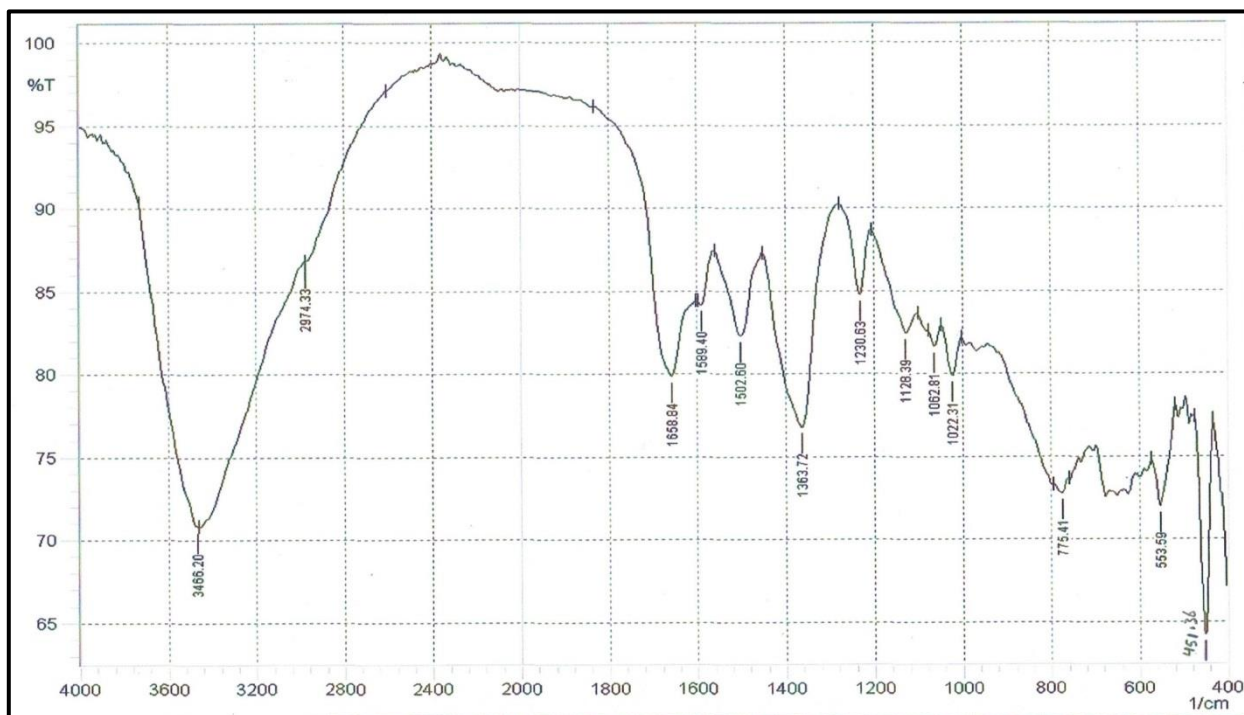
بعد تحميل المضاد فانكومايسين على طبقات ثنائية الهيدروكسيد اوضحت نتائج الفحص بمطيافية FT-IR (الشكل 3) حصول انزياح في ترددات بعض المجاميع الكيميائية، إذ يلاحظ حصول انزياح لمط مجموعة OH العريضة نحو تردد أعلى (3466 سم⁻¹، كما حصل انزياح لمط CH الأليفاتي نحو التردد الأعلى أيضاً (2974) سم⁻¹ أما اهتزاز مط مجموعة (C-H) الاروماتية فيكون متداخلاً مع اهتزاز مط رابطة الهيدروكسيل (O-H). بينما يلاحظ عدم حصول أي انزياح لحزمة مجموعة الكربونيل (C=O) الحامضية و الأميدية إذ ظهرت عند نفس التردد (1656) سم⁻¹. بينما تعود الحزمتان عند الترددين (1589 و 1502) سم⁻¹ الى اهتزاز مط (C $\equiv$ C) لحلقة البنزين فيما يلاحظ حصول انزياح لحزمة حني أواصر (C-H) الاروماتية خارج المستوي الى تردد اوطأ (775) سم⁻¹ بعد أن كانت عند التردد (891) سم⁻¹ في المضاد الحر [17].



الشكل 1 : طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم / الألومنيوم ثنائية الهيدروكسيد



الشكل 2 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد فانكومايسين الحر VAN free

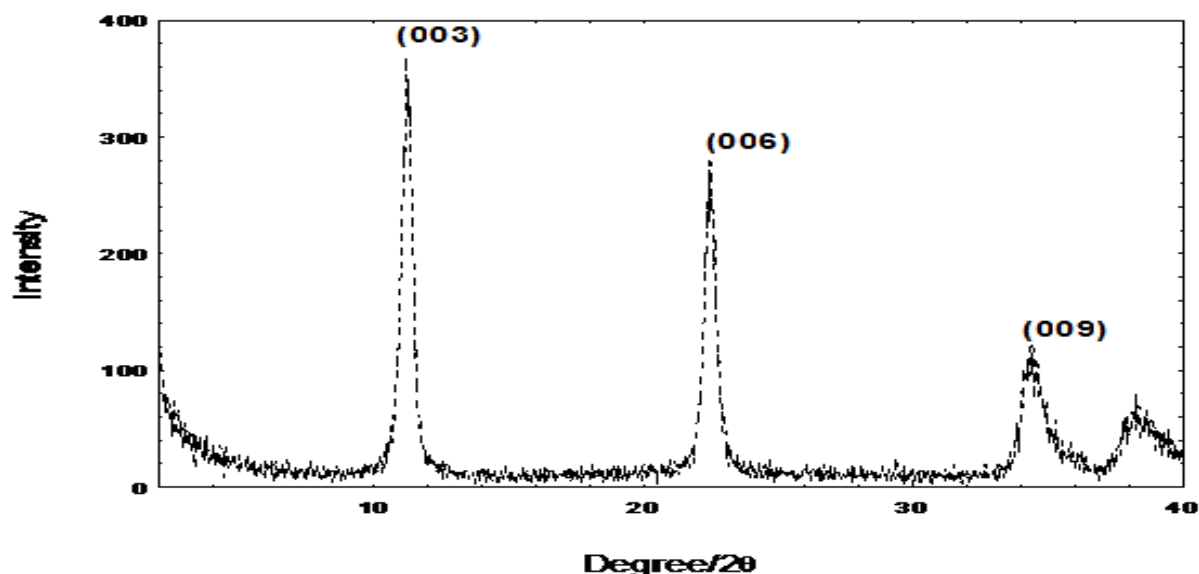


الشكل 3 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي Mg/Al - VAN -LDH

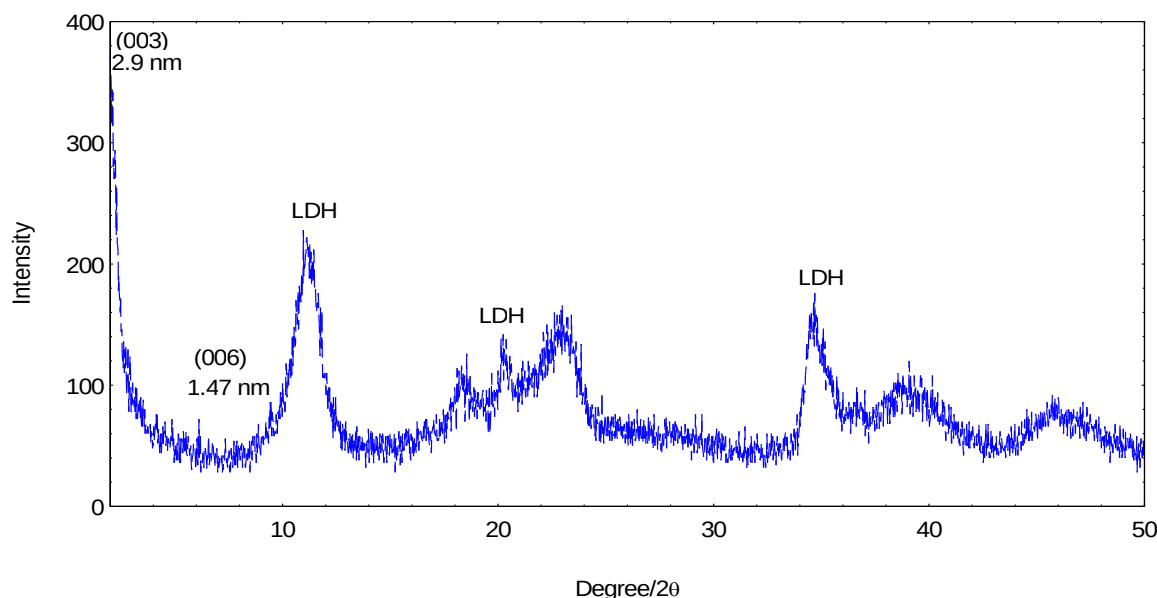
2- التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية

تم دراسة طيف حيود الأشعة السينية للحامض النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH فضلا عن طبقات ثنائية الهيدروكسيد (LDH) لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل وبعد عملية اقحام المضاد فانكومايسين بين طبقات LDH. يبين الشكل 4 طيف حيود الأشعة السينية لطبقة المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO₃-LDH) إذ تلاحظ المستويات البلورية (003) و (006) و (009). فالمستوى (003) يظهر عند الزاوية 10.47° وبمسافة بلورية تساوي 0.84 nm أما المستوى (006) فيظهر عند الزاوية 22.03° وبمسافة بلورية تساوي 0.41 nm، بينما يظهر المستوى (009) عند الزاوية 34.44° وبمسافة بلورية تساوي 0.26 nm. ومن خلال ملاحظة طيف حيود الأشعة السينية للمضاد النانوي

الهجين Mg/Al-VAN-LDH في الشكل 5 يبدو أن عملية الأحماد قد تمت بنجاح إذ يظهر المستوى (003) عند الزاوية 1.5° تقريباً بمسافة بلورية مقدارها 2.9 nm بينما يظهر المستوى (006) عند الزاوية 6° بمسافة بلورية 1.47 nm فيما يبدو أن المستوى (009) يتداخل مع المستوى (003) لطبقة ثنائية الهيدروكسيد بالنظر لتقاربهما في الموقع مما تعذر فصلهما بشكل واضح جداً.



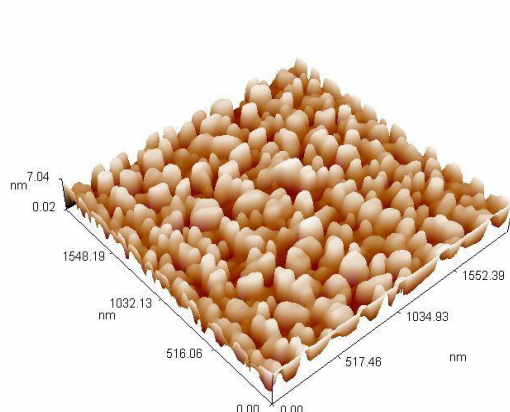
الشكل 4 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقة المغنيسيوم/الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al- NO₃-LDH)



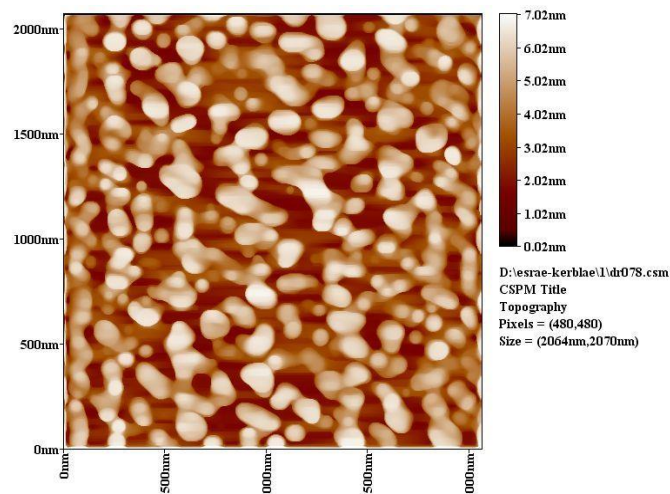
الشكل 5 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للفانكومايسين النانوي الهجين Mg/Al-VAN-LDH

3- الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM)

تم دراسة السطح الخارجي للمضادين النانويين الهجينين قيد الدراسة و يبين الشكل 6a صورة ثنائية الأبعاد للمضاد Mg/Al-VAN-LDH تظهر فيها تجمعات دقائق ذات أشكال شبه كروية . كما يظهر الشكل 6b صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح المضاد النانوي الهجين و يلاحظ فيها ارتفاع التجمعات الدقائقية الذي يكون بحدود 7.04 نانومتر مما يشير الى تصنيع مضاد نانوي هجين من المضاد فانكومايسين الحر و طبقات ثنائية الهيدروكسيد . ويتضح من الجدول 1 أن معدل أقطار دقائق (Means of particles size) للمضاد النانوي Mg/Al-VAN-LDH بلغ 85.81 نانومتر . و قد أدت عملية تحضير هذا المضاد الهجين الى الحصول على دقائق نانوية باقطار محصورة بين (45- 100) نانومتر ، و أن أعلى نسبة لتلك الدقائق النانوية بلغت (12.06 و 12.06) % للدقائق ذات الأقطار (90 و 95) نانومتر ، على التوالي ، فيما بلغت أوطاً نسبة للدقائق 1.01 % للدقائق ذات القطر 45 نانومتر .



(b)



(a)

الشكل 6 : صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Mg\Al-VAN-LDH

الجدول 1 : أقطار وحجوم و تجمعات دقائق المضاد النانوي الهجين Mg/ Al -VAN -LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية .
Avg. Diameter : 85.81 nm

Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)
45.00	1.01	1.01	75.00	4.52	28.14	105.00	7.54	83.92
50.00	2.51	3.52	80.00	7.54	35.68	110.00	5.03	88.94
55.00	2.01	5.53	85.00	9.55	45.23	115.00	4.52	93.47
60.00	5.53	11.06	90.00	12.06	57.29	120.00	4.02	97.49
65.00	4.52	15.58	95.00	12.06	69.35	125.00	2.51	100.00
70.00	8.04	23.62	100.00	7.04	76.38			

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته [18] إذ أن معدل أقطار دقائق المضاد Octylgallate المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد بلغ 82.49 نانومتر ، في حين لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما حصلت عليه [19] إذ أن معدل أقطار دقائق المضاد النانوي الهجين Oxytetracycline المحضر في تلك الدراسة بلغ 76.16 نانومتر .

الفعالية التثبيطية للمضادات النانوية الهجينة ضد بكتريا *S. aureus* :

1- الفعالية التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من الإدرار :

يتضح من النتائج المبينة في الجدول 2 أن المضاد Vancomycin و بنوعيه الحر والنانوي يبدي أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة 2-U المعزولة من الإدرار بأقطار تثبيط مقدارها (18.5 و 19.75) ملم للمضادات VAN-Mg/Al-VAN-LDH و VAN-Free، على التوالي و ذلك باستخدام التركيز 3 ملغم/مل .
و قد جاءت نتائج التحليل الإحصائي تأكيداً لهذه النتائج إذ كانت العزلة 2-U هي الأكثر حساسية للمضادات المدروسة بالنظر لأعطائها أعلى معدل تثبيط من بين عزلات بكتريا *S. aureus* والذي بلغ 11.285 ملم .
كما أوضحت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول 2 أيضاً أن هناك زيادة معنوية ($P \geq 0.05$) في معدل التثبيط لكل عزلة بزيادة تركيز المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .
ومن جهة أخرى ، فقد ظهر أدنى فعل تثبيطي للمضادات VAN-LDH و VAN-Free ضد العزلات 3-U و 4-U و 4-U و 3-U ، على التوالي بأقطار تثبيط بلغت (13 و 16.25 و 19 و 23.5) ملم ، على التوالي أيضاً .
تشير الدراسات الكيموحيوية الى أن مضادات Glycopeptides تثبط المراحل الأخيرة من تصنيع الببتيدوكلايكان في جدار الخلية البكتيرية ، وعلى المستوى الجزيئي فإن الهدف الرئيس للمضاد فانكومايسين هو النهاية D-ala-D-ala من مولدات (precursors) الببتيدوكلايكان لذا فإن هذا المضاد يقوم بتكوين معقد مع الببتيد الثنائي D-ala-D-ala من خلال تشكيل خمس روابط هيدروجينية ، يعمل هذا المعقد بدوره على منع تفاعلات Transpeptidation بواسطة الإعاقة الفراغية (Steric hindrance) [20] و [21] و [22] و [23] .

الجدول 2 : الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي VAN-LDH و المضاد الحر VAN Free ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الإدرار .

LSD _{0.05} لتركيز المضاد	تركيز المضاد(ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المضاد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيط بالملم								
0.674	18.5	16.25	13.75	12	8.5	0	0	2 –U	VAN- LDH
	13	11	10.75	8	7.5	4	0	3 –U	
	15	10.75	9.5	8	7	3.25	0	4- U	
	19.75	18.5	16.75	16	12.75	5.25	0	2 –U	VAN Free
	18	15.5	12.5	11.75	11	5.5	0	3 –U	
	16.25	13	12.25	10	8.25	4	0	4- U	
	0.569							LSD _{0.05} للمضادات	

العزلة	2-U	3-U	4-U	LSD _{0.05} للعزلات
معدل تثبيط العزلات	11.285	9.178	8.375	0.441

إن دراسات تقييم الفعل التثبيطي للمضادات النانوية ضد بكتريا *S. aureus* نوعاً قليلاً ، ومن بينها وجد [24] أن التركيز المثبط الأدنى للمضاد Ciprofloxacin النانوي ضد بكتريا *S. aureus* بلغ 20 مايكروغرام / مل .

2- الفعالية التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من الحروق والجروح :

من خلال النتائج الموضحة في الجدول 3 يظهر أن عزلة بكتريا *S. aureus* 1-W المعزولة من الجروح هي الأقل حساسية لمضادات Glycopeptides فقد بلغت أقطار تثبيط المضادات VAN-LDH و VAN-Free (16 و 17 و) ملم ، على التوالي .
أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للجدول 3 أن العزلة 1-W هي الأكثر حساسية للمضادات المدروسة إذ بلغ معدل تثبيط هذه العزلة 8.285 ملم ، في حين لم يلاحظ وجود فروقات معنوية ($P \geq 0.05$) بين العزلتين 1-B و 2-B المعزولتين من الحروق .

الجدول 3 : الفعالية التثبيطية للمضادات النانوية VAN-LDH و المضاد الحر VAN Free ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الحروق و الجروح .

LSD _{0.05} لتركيز المضاد	تركيز المضاد(ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المضاد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيط بالملم								
0.717	18.5	16.5	15	14.25	9.75	0	0	1-B	VAN- LDH
	15	13.5	12.5	9.5	8.25	0	0	2-B	
	16	11.75	11	8.5	5.75	0	0	1-W	
	23.5	20	18.5	16	13.5	7.5	0	1-B	VAN Free
	17.5	15.5	14.75	12.75	10	5	0	2-B	
	17	14.25	12.75	12.25	6.75	0	0	1-W	
	0.606							LSD _{0.05} للمضادات	

العزلة	1 -B	2 -B	1 -W	LSD _{0.05} للعزلات
معدل تثبيط العزلات	12.357	9.571	8.285	0.469

و عند المقارنة الإحصائية يتضح أن هناك زيادة معنوية في معدل التثبيط لبعض العزلات بزيادة تراكيز المضادات في حين لم تكن الزيادة معنوية في معدل التثبيط للعزلات الأخرى المستخدمة في هذه الدراسة .

أوضح [25] أن التراكيز المثبطة الدنيا للمضادات Ciprofloxacin و Gentamicin و Tetracycline المحملة على Fibro Gel ضد بكتريا *S. aureus* بلغت (6.25 و 3.25 و 1.56) مايكروغرام/مل للمضادات الثلاثة ، على التوالي .

3- الفعالية التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من المهبل و الأذن :

يلاحظ من الجدول 4 أن عزلة بكتريا *S. aureus* 1-V المعزولة من المهبل كانت الأقل تأثراً بالفعل التثبيطي للمضاد Vancomycin بنوعيه الحر و النانوي الهجين إذ بلغ معدلا قطري تثبيط المضادين VAN-LDH و VAN-Free (15.75 و 18.5) ملم ، على التوالي .

الجدول 4 : الفعالية التثبيطية للمضادات النانوية VAN-LDH و المضاد الحر VAN Free ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من المهبل و الأذن .

LSD _{0.05} لتركيز المضاد	تركيز المضاد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المضاد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيط بالملم								
0.644	15.75	13.5	12.75	11	7	3	0	1-V	VAN- IND
	21	15.5	15	12.5	11	5.5	0	2-V	
	18.5	16.5	14.25	13	9	0	0	1-E	
	18.5	17.25	16	14.5	12	7	0	1-V	VAN- Free
	23.25	20.5	18	17	15	10.5	0	2-V	
	22.5	18.5	17.5	16.75	15	11	0	1-E	
	0.544							LSD _{0.05} للمضادات	

العزلة	1 -V	2 -V	1 -E	LSD _{0.05} للعزلات
معدل تثبيط العزلات	10.589	13.196	12.321	0.421

ومن ناحية التحليل الإحصائي يبين الجدول 4 أن هناك زيادة معنوية ($P \geq 0.05$) في معدل التثبيط لكل عزلة بزيادة تراكيز المضادات كما يتضح أيضاً أن العزلة 2-V المعزولة من المهبل هي الأكثر تأثيراً بالفعل التثبيطي للمضادات المدروسة و بفروقات معنوية ($P \geq 0.05$) عن العزلتين 1-V و 1-E إذ بلغ معدل التثبيط للعزلة 2-V (13.196) ملم .
في دراسة قام بها [26] إتضح أن الفعالية التثبيطية لخمس مستحضرات من المضاد Gentamicin المحمل على Chitosan-gelatin ضد بكتريا *S. aureus* تراوحت بين (22.9-31) ملم .

4- الفعالية التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من الدم :

تشير النتائج الموضحة في الجدول 5 الى أن العزلة البكتيرية 3-S *S. aureus* المعزولة من الدم كانت الأقل تأثيراً بفعل المضاد فانكوميسين بنوعيه الحر و النانوي الهجين بقطري تثبيط بلغا (14 و 15.5) ملم للمضادين VAN-LDH و VAN-Free ، على التوالي .

و بالرجوع الى الجدول ذاته يتضح من خلال المقارنة الإحصائية وجود زيادة معنوية ($P \geq 0.05$) في معدل تثبيط العزلات بزيادة تراكيز المضادات . وعلى الرغم من وجود فروقات معنوية بين العزلتين 3-S و 2-S إلا أن هاتين العزلتين كانتا الأكثر تحسناً لفعل المضادات المدروسة مقارنة بالعزلة 3-S التي بلغ معدل تثبيطها 8.839 ملم .
أشارت إحدى الدراسات السابقة الى أن هناك فعلاً تثبيطياً ضد كل من بكتريا *S. aureus* و *S. epidermidis* بواسطة المضاد Gentamicin المحمل على PLGA إذ تراوح مقدار التثبيط بين (32-39) ملم [27] .

الجدول 5 : الفعالية التثبيطية للمضادات النانوية VAN-LDH و المضاد الحر VAN Free ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الدم .

LSD _{0.05} لتركيز المضاد	تركيز المضاد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المضاد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيط بالملم								
0.484	16.7 5	14	12.5	11.5	9	0	0	1-S	VAN- LDH
	16.5	13.25	12	9.5	9	3.5	0	2-S	
	14	13.25	10.5	9	8	3.5	0	3-S	
	15.5	14.75	14	12.5	10.5	4.75	0	1-S	VAN Free
	19	14.5	13.75	12.25	10.5	6.5	0	2-S	
	15.5	13	11.75	11.25	9	5	0	3-S	
	0.409							LSD _{0.05} للمضادات	

العزلة	1-S	2-S	3-S	LSD _{0.05} للعزلات
معدل تثبيط العزلات	9.696	10.017	8.839	0.317

5- الفعالية التثبيطية ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من الأنف :

عند التمعن في الجدول 6 يتضح أن عزلة بكتريا *S. aureus* 11-N المعزولة من الأنف هي الأقل حساسية للمضاد Vancomycin بنوعيه الحر و النانوي الهجين بقطري تثبيط (14 و 16.75) ملم للمضادين VAN-LDH و VAN-Free ، على التوالي .

أثبتت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول 6 أن العزلة 68-N هي الأكثر حساسية لفعل المضادات المدروسة بمعدل تثبيط 12.089 ملم تليها العزلات 64-N و 11-N و 8-N و 73-N و 10-N بمعدلات تثبيط (8.125 و 8.285 و 9.321 و 11.482 و 8.142 و 8.125) ملم ، على التوالي .

يتبين من خلال الدراسة التي أجراها [28] أن المضاد Gentamicin المحمل على gelatin-alginate كان فعالاً ضد بكتريا *S. aureus* بقطر تثبيط مقداره 29 ملم .

الجدول 6 : الفعالية التثبيطية للمضادات النانوية VAN-LDH و المضاد الحر VAN Free ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الأنف .

LSD _{0.05} لتركيز المضاد	تركيز المضاد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المضاد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيط بالملم								
0.553	14	13	11.25	10	6.5	0	0	11-N	VAN- LDH
	18	15	12	9.25	8	2	0	10-N	
	14.5	11	9.75	7	6.5	3	0	8-N	
	19	15.75	14.5	12	11	0	0	68-N	
	18	14.5	13.75	10.5	9	0	0	64-N	
	15	12.75	11.5	9.5	8.5	0	0	73-N	
	16.75	15.5	15.25	13	9.75	5.5	0	11-N	VAN Free
	18	15.5	13.75	13	11.25	6	0	10-N	
	14.25	13	11.75	11.25	9.5	4	0	8-N	
	22	20.25	18.75	16	13	7	0	68-N	
	21.25	19.25	18.25	16	14.75	5.5	0	64-N	
	15.25	12.5	11.5	10.5	7	0	0	73-N	
	0.468							LSD _{0.05} للمضادات	

العزلة	11-N	10-N	8-N	68-N	64-N	73-N	LSD _{0.05} للعزلات
معدل تثبيط العزلات	9.321	8.125	8.285	12.089	11.482	8.142	0.512

نستنتج من هذه الدراسة كفاءة المضاد فانكومايسين بنوعيه الحر و النانوي الهجين في تثبيط عزلات بكتريا *S. aureus* الحساسة منها و المقاومة MRSA .

المصادر :

- 1- Griffith , R.S.(1981). Introduction to vancomycin. Rev Infect Dis 3 (Suppl) : s200-4 doi: 1093/clinids/3.Supplement. S200.
- 2- Robles-Piedras , A.L.; Gonz and lez-Lpezz, E.H. (2009). Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin. Proc West Pharmacol Soc; 52:21-3.
- 3- Srinivasan , A.; Dick, J. D.and Perl, T. M. (2002). Clin. Microb. Reviews, 15, 430 .
- 4- Woodford , N.(2005). Clin. Microbiol. Infection, 11, 2. (citted from Vila et al., 2007) .
- 5- Menichetti , F.(2005). Clin. Microbiol. Infection, 11, 22. (citted from Thati et al., 2010).
- 6- Rubinstein , E. and Keynan, Y.(2014) . Vancomycin revisited – 60 years later . Department of internal medicine . University of Minitoba . Winnipeg. MB, Canada .doi: 10.3389/fpubh.2014.00217.
- 7- Loveymi , B.D.; Jelvehgari, M.; Zakeri- Milani, P. and Valizadeh, H.(2012). Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability. Advanced pharmaceutical Bulletin, 2(1), 43-56.
- 8- Liu , C.; Bayer, A.; Cosgrove, S.E.;Daum,R.S.; Fridkin, S.K.;Gorwitz, R.J.et al. (2011). Clinical practice guidelines by the infectious disease society of America for the treatment of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis 52(3): e18-55.doi: 10. 1093/cid/ciq 146. (citted from Rubinstein and Keynan 2014).
- 9- Surendiran, A.; Sandhiya, S.; Pradhan, S.C. and Adithan, C.(2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. Indian J Med Res.130:689-701.
- 10- Bashi , A.M.; Haddawi, S.M. and Mezaal, M.A. (2013). Layered Double Hydroxide Nanohybrid Intercalation with Folic Acid Used as Delivery System their Controlled Release Properties. Arab J Sci Eng . 38:1663-1680.
- 11- Egorove , N.S.(1985).Antibiotics ascientific approach. Mir Publishers, Moscow.
- 12- Al-Jubory, N.A and Al-Ghanimi, A.A.(2016). Isolation *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in Sacred Kerbela governate and diagnosis in PCR technology (بحث مقبول للنشر)
- 13- Cheng , D.R. ; Zhu, S. Y. ; Yin, Z. H.; Ding,W.W.; Mu, Z.X. ; Su, Z.R. and Sun, H.C.(2010) . Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis.African Journal of Microbiology Research Vol.4(11)pp.1110-1116
- 14- Parida , K.M ; Sahoo, M. and Singha, S. (2010) . Synthesis and characterization of a Fe (III)- Schiff base complex in a Zn-Al LDH host for cyclohexane oxidation . Journal of Molecular Catalysis A : Chemical 329 : 7-12 .
- 15- Arizaga, G.G.C.; Gardolinski, J.E.F.d.C.; Schreiner, W.H.and Wypych, F. (2009) . Intercalation of an oxalatoxonioate complex into layered double hydroxide and layered zinc hydroxide nitrate. Journal of Colloid and Interface Science, 330:352–358.
- 16- Feng, Y.; Li, D.; Wang, Y.; Evans, D.G.and Duan, X. (2006) . Synthesis and characterization of a UV absorbent-intercalated Zn–Al layered double hydroxide. Polymer Degradation and Stability, 91:789–794.
- 17- Silverstein, R.M. ; Webster, F.X. and Kiemle, D.J.(2005). “Spectrometric Identification of organic compounds “ 7th Ed. John Wiley & Sons . INC. Printed in the United States of America .
- 18- القتلاوي ، صلاح هاشم شهيد (2014) . تهجين مركبات نانوية مع مادة أوكتيكالكليت الحافظة للأغذية ودراسة بعض فعاليتها الحيوية. رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .
- 19- الحمداني ، ميساء صالح مهدي (2015) . تحديد الكفاءة التثبيطية لمضادي الأوكسي تتراسايكلين والتايلوسين المحضرين نانويًا ضد البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الأبقار في محافظة كربلاء المقدسة . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .
- 20- Arthur , M. ; Reynolds, P. and Courvalin, P. (1996) . Glycopeptide resistance in enterococci. Trends Microbiol 1996 Oct ; 4 (10): 401-7.
- 21- Loll , P.J. and Axelsen, P.H. (2000) .The structural biology of molecular recognition by vancomycin. Annu Rev Biophys Biomol Struct; 29: 265-89 .

- 22- Reynolds , P.E.(1989) . Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Nov; 8 (11): 943-50 .
- 23- Williams , D.H. and Waltho, J.P. (1988) . Molecular basis of the activity of antibiotics of the vancomycin group. Biochem Pharmacol Jan 1; 37 (1): 133-41.
- 24- Patra , P. ; Mitra , S. ; Debnath , N.; Pramanik , P. and Goswami , A. (2014) . Ciprofloxacin conjugated zinc oxide nanoparticles : A camouflage towards multidrug resistant bacteria . Bull. Master. Sci. Vol. 37, No. 2, pp.199-206 .
- 25- Prathap , M. ; Noorjahan ,S.E.; Sastry , T.P. and Kumari , B.D. (2014) . In Vitro Release of Antibiotics from A Wound Dressing Material-Fibrogel . Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research . Issue 4(Vol. 4) .
- 26- Binddu , H. ; Vidyavathi , M. , Kavitha , K. and Sastry , T.P. (2011). Prerparation and evalution of gentamicin loaded Chitosan – gelatin composite films for wound healing activity . International journal of applied Biology and Pharmaceutical Technology . ISSN 0976-4550 .
- 27- Posadowska , U. ; Brzychczy-Wloch , M. and Pamula , E. (2015) . Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment . Acta of Bioengineering and Biomechanics , Vol. 17, No. 3.
- 28- Princely , S. ; Basha , N.S. ; Nandhakumar , S. and Dhanaraju , M.D.(2015). Design and evaluation of controlled release gentamicin incorporated gelatin-alginate matrices for wound management . Des Pharmacia letter , 7(1) : 145-153 .