

Poly(styrene-*alt*-maleic anhydride) Conjugated with Spermine: Synthesis, Antibacterial Activity and Antibiotic Susceptibility

Jalil Javedani Bafekr¹, Razieh Jalal^{1,2*}, Navid Ramezani¹, and Marjan Toghraei¹

1. Department of Chemistry, Faculty of Science, 2. Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology; Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postal Code: 9177948974, Iran

Received: 6 April 2017, accepted: 3 February 2018

ABSTRACT

Hypothesis: In the past decades, the increasing resistance to antibiotics among some nosocomial infection pathogens has been one of the largest challenges of human health. One of the ways to reduce antibiotic resistance in bacteria is the combination use of cationic polymers with antibiotics. Poly(styrene-*alt*-maleic-anhydride) (PSMA) is an alternative biodegradable copolymer which can react with bioactive agents such as alkyl amines through a ring-opening reaction. In this study, for the first time, the antibacterial activity of poly(styrene-*alt*-maleic-anhydride) (PSMA) conjugated with spermine (Spm-PSMA) and its influence on resistance of *Enterococcus faecalis* to ceftazidime and ciprofloxacin antibiotics have been investigated.

Methods: Spm-PSMA was synthesized by reaction of PSMA with spermine in the presence of triethylamine catalyst under argon atmosphere at room temperature and characterized by FTIR and DSC. The antibacterial activity of Spm-PSMA was evaluated against two nosocomial infective bacteria, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) by two-fold microdilution method. Its ability to reduce the resistance of *E. faecalis* to the ciprofloxacin (CP) and ceftazidime (CAZ) antibiotics, active oxygen species (ROS) levels and morphological changes in acidic conditions was evaluated.

Findings: The glass transition temperature of Spm-PSMA (197°C) is higher than that of PSMA (164°C) due to intermolecular hydrogen bonding. Spm-PSMA reduces the growth of Gram-positive *E. faecalis* in a dose-independent manner, whereas it has no significant antibacterial activity against Gram-negative *A. baumannii* in acidic condition. *E. faecalis* susceptibility to ceftazidime and ciprofloxacin antibiotics is increased in the presence of Spm-PSMA at pH 5.5. The SEM results show that Spm-PSMA alone and in combination with antibiotics causes the transformation of *E. faecalis* cells from coccoid to coccobacilli shape. The results of this study show that Spm-PSMA is a biocompatible polymer with antibacterial activity and antibiotic sensitivity against *E. faecalis* bacteria.

Keywords:

poly(styrene-*alt*-maleic-anhydride) conjugated with spermine, antibiotic resistance, ciprofloxacin, ceftazidime, *Enterococcus faecalis*

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: raziieh@um.ac.ir

Please cite this article using:

Javedani Bafekr J., Jalal R., Ramezani N., and Toghraei M., Poly(styrene-*alt*-maleic anhydride) Conjugated with Spermine: Synthesis, Antibacterial Activity and Antibiotic Susceptibility., *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **31**, 15-26, 2018.

پلی(استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید) مزدوج با اسپرمین: سنتز، فعالیت ضدباکتری و حساسیت آنتی بیوتیکی

جلیل جاودانی بافکر^۱، راضیه جلال^{۲*}، نوید رضانیان^۱، مرجان طغرانی^۱

مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴؛

۱- دانشکده علوم، گروه شیمی، ۲- پژوهشکده زیست فناوری، گروه پژوهشی سلولی و مولکولی

دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۷، پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

چکیده

در دهه‌های اخیر، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی از پاتوژن‌های عفونت‌زای بیمارستانی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامت انسان شده است. از راهکارهای کاهش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده هم‌زمان از آنتی‌بیوتیک‌ها با پلیمرهای کاتیونی است. پلی(استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید) (PSMA)، کوپلیمر زیست‌تخریب‌پذیری است که می‌تواند از راه باز شدن حلقه با عامل‌های زیست‌فعال مانند آلکیل آمین‌ها واکنش دهد. در این پژوهش، برای اولین بار، فعالیت ضد میکروبی مزدوج پلیمر PSMA-اسپرمین (Spm-PSMA) و اثر آن بر مقاومت باکتری *انتروکوکوس فکالیس* به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین بررسی شد. مزدوج پلیمر Spm-PSMA از واکنش PSMA با اسپرمین در مجاورت کاتالیزور تری‌اتیل‌آمین زیر جو آرگون در دمای محیط سنتز و شناسایی آن با استفاده از روش‌های زیرقرمز تبدیل فوریه و گرماسنجی پوی تفاضلی انجام شد. فعالیت ضدباکتری مزدوج پلیمر Spm-PSMA علیه دو باکتری عفونت‌زای بیمارستانی *انتروکوکوس فکالیس* و *اسیتوباکتر بومانی* با روش رقیق‌سازی پی‌درپی دو برابر ارزیابی شد. قابلیت آن در کاهش مقاومت باکتری *E. faecalis* به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم، میزان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تغییرات شکل‌شناسی در شرایط اسیدی ارزیابی شد. دمای انتقال شیشه‌ای Spm-PSMA (۱۹۷°C) به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی بیشتر از دمای انتقال شیشه‌ای PSMA اولیه (۱۶۴°C) است. مزدوج پلیمر Spm-PSMA در شرایط اسیدی باعث کاهش رشد باکتری گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* به‌طوری مستقل از غلظت شده و فاقد فعالیت ضدباکتری علیه باکتری گرم منفی *اسیتوباکتر بومانی* است. حساسیت باکتری *انتروکوکوس فکالیس* به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین در مجاورت مزدوج پلیمر Spm-PSMA و pH برابر ۵/۵ افزایش یافت. نتایج میکروسکوپی الکترونی پوی نشان داد، شکل باکتری *انتروکوکوس فکالیس* با وجود مزدوج پلیمر Spm-PSMA به‌تنهایی و هم‌زمان با آنتی‌بیوتیک‌ها از کوکسی به کوکوباسیل تغییر می‌یابد. نتایج این پژوهش نشان داد، مزدوج پلیمر Spm-PSMA پلیمری زیست‌سازگار با فعالیت ضدباکتری و حساسیت آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری *انتروکوکوس فکالیس* است.

واژه‌های کلیدی

مزدوج پلی(استیرن-مالئیک انیدرید)-

اسپرمین،

مقاومت آنتی‌بیوتیکی،

سیپروفلوکساسین،

سفنازیدیم،

انتروکوکوس فکالیس

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

razieh@um.ac.ir

مقدمه

افزایش بروز پاتوژن‌های مقاوم چندارویی به نگرانی جدی برای عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه تبدیل شده است [۱]. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) مقاومت ضد میکروب یکی از سه مشکل جدی سلامت انسان در جهان است [۲]. ظهور بی‌وقفه باکتری‌های مقاوم، نیاز روزافزون به عوامل ضد میکروب جدید کارآمدتر و با اثردهی بلندمدت را ایجاد کرده است. بسیاری از عوامل ضد میکروب مرسوم ترکیباتی با وزن مولکولی کم و اثردهی کوتاه‌مدت هستند که به راحتی باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌ها می‌شوند. در حالی که پلیمرهای ضد میکروب پایدار شیمیایی، اثردهی بلندمدت و فعالیت ضدباکتری بهتری نسبت به عوامل ضد میکروب مرسوم دارند [۳-۵]. به عنوان مثال، پلیمرهای دارای فسفونیم، هیدروکسیل فنولی و گروه چهارتایی آمونیوم با زنجیر بلند آلکیل به عنوان عوامل ضدباکتری فعال در پلیمرها در نظر گرفته می‌شوند که معمولاً در برابر محدوده گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها بسیار مؤثرند [۶]. سازوکارهای متعددی برای فعالیت ضد میکروب پلیمرها مطرح شده است، از جمله: ۱- اتصال گروه‌های فعال موجود در سطح پلیمر با گروه‌های تیول و آمین پروتئین‌های غشایی، ۲- مسدود کردن پورین‌های غشای خارجی (ompF و ompC)، ۳- برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک با بار منفی سطح سلول و ۴- اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی و نشت اجزای سیتوپلاسمی که در نهایت به مرگ سلول منجر می‌شود [۷].

از میان پلیمرهای ضد میکروب، پلیمرهای دو محیط دوست (amphiphilic) کاتیونی سنتزی گزینه‌های امیدوارکننده‌ای برای از بین بردن عفونت‌های بیمارستانی هستند که به دلیل گزینش‌پذیری و بهره‌وری زیاد، قابلیت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشته و خطرهای زیست‌محیطی کمی دارند. این پلیمرها از راه برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و چربی‌دوست غیراختصاصی، سطح سلول باکتری را تخریب می‌کنند و مانع توسعه مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم می‌شوند [۸،۹]. باقرصاد و همکاران برای تولید زخم‌پوش‌های پلیمری ضدباکتری، پارچه‌های ابریشم صمغ‌گیری شده و صمغ‌گیری نشده را که فاقد فعالیت ضدباکتری بودند، با نانوالیاف پلی‌وینیل الکل-سیپروفلوکسازین پوشش دادند. آن‌ها مشاهده کردند، پارچه‌های ابریشم همراه با نانوالیاف فعالیت ضدباکتری دارند. فعالیت ضدباکتری پارچه‌های ابریشمی صمغ‌گیری شده دارای نانوالیاف علیه باکتری گرم مثبت/استافیلوکوکوس/اورئوس و نه باکتری گرم منفی/شرشیاکلی، مشابه پارچه‌های ابریشمی صمغ‌گیری نشده دارای نانوالیاف است [۱۰]. دارورسانی سیتوپلاسمی داروهای زیست‌مولکولی مثل پپتیدها،

پروتئین‌ها و ژن‌ها به سلول‌های هدف چالش بسیار مهمی در اثربخشی داروهاست. این زیست‌مولکول‌ها امکان دارد، طی فرایند جذب به وسیله آنزیم‌های مختلف تخریب شوند و در نتیجه خاصیت درمانی خود را از دست دهند. مزدوج‌های پلیمر-دارو جزئی از سامانه‌های دارورسانی هستند که از پلیمرهای حامل برای بهبود عملکرد دارو یا عامل فعال استفاده می‌شود.

برخلاف سامانه‌هایی که دارو به‌طور فیزیکی به وسیله حامل محصور شده است، در مزدوج‌های پلیمر-دارو، دارو به شکل کووالانسی از راه پیوندهای زیست‌تخریب‌پذیر به پلیمر متصل می‌شود [۱۱]. از مزایای مزدوج‌های پلیمر-دارو می‌توان به کنترل غلظت دارو و تقویت خواص داروی مدنظر مانند جذب، زیست‌سازگاری، مدت زمان عمل، ایمنی، انحلال‌پذیری و پایداری آن‌ها اشاره کرد [۱۲،۱۳]. پلی‌انیدریدها به دلیل زیست‌سازگاری داخل بدن، تخریب به مواد غیرسمی و دفع راحت آن‌ها از بدن در فناوری دارورسانی بسیار سودمند هستند [۱۴]. پلی(استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید) (PSMA) کوپلیمر سنتزی با خواص شیمیایی و زیستی شایان توجه است که سنتز آن با استفاده از روش کوپلیمر شدن رادیکالی انجام می‌شود. از ویژگی‌های اصلی این پلیمر می‌توان به ظاهر شفاف، مقاومت در برابر دمای زیاد، پایداری ساختاری و فعالیت ویژه گروه‌های انیدرید اشاره کرد [۱۵]. گروه‌های عامل‌دار انیدرید در پلیمر PSMA می‌توانند از واکنش‌های آمیددار کردن، استری شدن، تیواستری شدن، آب‌کافت، آب‌زدایی و ایمیدار شدن با گروه‌های هسته‌دوست قوی واکنش دهند [۱۶]. نواحی آب‌گریز کوپلیمر PSMA نقش مهمی در نفوذ آن در دولایه غشاهای سلولی دارد و ناحیه آب‌دوست آن موجب تسریع اتصال و ورود مزدوج پلیمر-دارو به سلول می‌شود [۱۷]. این پلیمرها آب‌دوست هستند، اما واکنش با آلکیل آمین موجب آب‌گریزی و در نتیجه ورود آن‌ها به غشای سلولی می‌شود [۱۸]. کوپلیمرهای مالئیک انیدرید به دلیل زیست‌سازگاری، انحلال‌پذیری در آب، ساختار مناسب و تغییر توازن آب‌دوستی-آب‌گریزی با انتخاب کومونومری مناسب واکنش‌های اضافی روی کوپلیمر در زمینه‌های پزشکی و دارویی کاربرد دارند [۱۹]. گزارش‌هایی مبنی بر قابلیت PSMA و مشتقات آن در انتقال دارو [۲۰-۲۲] و نوکلئیک اسیدها [۲۳]، تقویت ایمنی در حیوانات میزبان [۲۴]، مهار ویروس نقص ایمنی بدن انسان نوع ۱ (HIV-1) [۲۵] و کاهش حرکت اسپرم ارائه شده است [۲۶]. مطالعات نشان داد، PSMA دارای فعالیت ضدباکتری کمی است، اما سمیت آن در ترکیب با برخی از ترکیبات فعال، مانند مشتقات آلدئید و استرهای فنولی افزایش می‌یابد. به عنوان مثال، اتصال عوامل فعال مانند گروه‌های آمین یا هیدروکسیل به PSMA از راه

برای اولین بار، فعالیت ضدباکتری مزدوج Spm-PSMA علیه سویه‌های بالینی اسیتوباکتر بومانی (*A. baumannii*) و انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) و قابلیت آن در کاهش مقاومت باکتری *E. faecalis* به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (CP) و سفنازیدیم (CAZ) در شرایط اسیدی ارزیابی شده است.

تجربی

مواد

سویه‌های بالینی باکتری‌های گرم مثبت انتروکوکوکس فکالیس (*E. faecalis*) و گرم منفی اسیتوباکتر بومانی (*A. baumannii*)، به‌عنوان دو باکتری بیماری‌زای مهم بیمارستانی، از آزمایشگاه تحقیقات میکروبیولوژی بیمارستان قائم (عج) مشهد تهیه شد. تری‌اتیل‌آمین (TEA، ۹۹٪)، محیط کشت آبگوشت مغذی (NB)، محیط کشت جامد آگار (NA)، آنتی بیوتیک‌های سفنازیدیم (CAZ) و سیپروفلوکساسین (CP) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. ۲،۷-دی‌کلروفلوئورسئین دی‌استات (DCFH-DA)، پلی(استیرن-مالئیک انیدرید)، PSMA، با وزن مولکولی ۳۱۵/۰۰۰ g/mol، N.N-N-دی‌متیل فرمامید (DMF، ۹۹/۸٪) و اسپرمین (۹۷٪) از شرکت Sigma Aldrich تهیه شدند.

دستگاه‌ها

خشک‌کن انجمادی، طیف‌نورسنج Shimadzu مدل 4300s، گراموزن‌سنج پوشی تفاضلی (DSC) Mettler Toledo مدل DSC822e، دستگاه ELISA Reader ساخت BioTek مدل Bio Tek-ELx800، طیف‌نورسنج Shimadzu مدل 4300S، طیف‌فلوئورسنج Shimadzu مدل RF-1501، دستگاه Sputter coater (Quorum Tech-) (SEM) مدل SC7620 و میکروسکوپ الکترونی پوشی (SEM) مدل LEO 1450VP به‌کار گرفته شد.

روش‌ها

سنتز و شناسایی مزدوج پلیمر PSMA-اسپرمین (Spm-PSMA)

ابتدا ۶۰/۰ mg از PSMA در ۳/۰ mL حلال DMF خشک حل شد. سپس، به محلول حاصل ۶۰۰/۰ mg اسپرمین و ۰/۳ mL کاتالیزور TEA اضافه و به مدت ۲۴ h زیر جو آرگون در دمای محیط همزده شد. پس از افزودن آب مقطر (حدود ۱۵/۰ mL)، محلول مزبور به مدت ۳۰ min در دمای محیط فراصوت‌دهی شد. سپس، محلول به

واکنش‌های حلقه باز به تولید ترکیبات پلیمری فعال، مانند PSMA مزدوج با ۴-آمینوفنول منجر می‌شود که دارای فعالیت ضدباکتری علیه باکتری‌های اشرشیاکلی (*E. coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) است [۲۷].

پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) و مشابه‌های آن‌ها فعالیت‌های زیستی متنوع، از جمله ضدسرطان، ضدانگل، ضداندوتوکسین و ضد میکروب دارند [۲۸]. آن‌ها نقش مهمی در همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه، فعالیت آنزیم‌ها و نیز در کنترل نفوذپذیری غشا با مسدودکردن کانال‌های پورین غشای خارجی دارند. پلی‌آمین‌ها از راه مهار سنتز پروتئین باعث کاهش رشد میکروارگانیسم‌های مختلف به‌طور عمده باکتری‌های گرم مثبت می‌شوند [۲۹]. مشخص شده است، اسپرمین (SPM) به تنهایی فاقد فعالیت ضد میکروب است و اثرهای متفاوت بر حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها دارد [۳۰]. اسپرمین برون‌زا (exogene) و اسپرمیدین حساسیت باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و کلرامفنیکل را افزایش می‌دهد. در حالی‌که باعث افزایش مقاومت باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی میکسین B و سیپروفلوکساسین می‌شوند [۳۱]. مشابه‌های پلی‌آمین سنتزی، نفوذپذیری غشای خارجی باکتری *P. aeruginosa* را از راه اختلال در یکپارچگی لیپوپلی ساکارید (LPS) غشای باکتری افزایش می‌دهند و سبب افزایش حساسیت *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک‌های آب‌گریز می‌شوند [۳۰]. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش سمیت برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در استفاده هم‌زمان آن‌ها با پلیمرهای ضد میکروب وجود دارد. خلیل و همکاران نشان دادند، پلی‌اتیلن ایمین (PEI) به تنهایی قابلیت مهار رشد باکتری *P. aeruginosa* را ندارد، اما حساسیت این باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، آمپی‌سیلین و نوویوسین افزایش می‌دهد [۳۲].

در پژوهش حاضر، مزدوج پلیمر PSMA-اسپرمین (Spm-PSMA) از واکنش PSMA با اسپرمین در مجاورت کاتالیزور تری‌اتیل‌آمین زیر جو آرگون در دمای محیط سنتز شد. اسپرمین، پلی‌آمین است که در ساختار آن چهار عامل آمین وجود دارد. گروه‌های آمین اسپرمین، نه تنها در اتصال آن به گروه‌های انیدرید پلیمر PSMA نقش دارند، بلکه در شرایط اسیدی پروتون‌دار شده و موجب اتصال مزدوج پلیمر Spm-PSMA به گروه‌های با بار منفی موجود بر سطح باکتری‌ها می‌شوند. اسپرمین به تنهایی فاقد فعالیت ضد میکروب در محیط اسیدی است. گزارش‌هایی مبنی بر قابلیت آن در افزایش حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد [۳۰]. در این پژوهش،

نیز با روش رقیق سازی پی در پی دو برابر در pH برابر ۵/۵ بررسی شد. برای تعیین اثر Spm-PSMA بر فعالیت ضدباکتری آنتی بیوتیک های نام برده، سلول های باکتری *E. faecalis* با CAZ (۳۲ µg/mL) یا CP (۸ µg/mL) در بود و نبود Spm-PSMA (۱۲/۵ µg/mL) به مدت ۱۰ و ۲۰ h عمل آوری شدند و رشد سلول ها طبق روش پیش گفته اندازه گیری شد. محیط کشت NB دارای سلول و بدون Spm-PSMA و آنتی بیوتیک ها به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. فعالیت ضدباکتری به شکل میانگین درصد مهار رشد (GI/%) نسبت به رشد کنترل مثبت بیان شد. در هر غلظت، GI/٪ با توجه به معادله (۱) محاسبه شد:

$$GI\% = \left(100 - \frac{OD_{630} \text{ at the presence of antibacterial agent (s)}}{OD_{630} \text{ of positive control}}\right) \times 100 \quad (1)$$

اندازه گیری گونه های اکسیژن فعال (ROS)

تولید ROS در باکتری *E. faecalis* با استفاده از کاوند DCFH-DA تعیین شد. کاوند DCFH-DA به راحتی از غشای سلول عبور می کند، وارد سلول می شود و به وسیله استراز سلولی استیل زدایی می شود. سپس، در واکنش با ROS، ترکیب دی کلروفلوئورسئین (DCF) با فلوئورسان سبز تولید می کند که شدت فلوئورسان آن با طیف فلوئورسنج اندازه گیری می شود. در این آزمون، 10^8 CFU/mL از سلول های فاز لگاریتمی با DCFH-DA (۱۰ µM) مخلوط شد و به مدت ۳۰ min در ۳۷°C نگه داری شد. برای حذف DCFH-DA اضافی، سلول ها دو بار با PBS شسته شدند. سپس، عمل آوری سلول ها با Spm-PSMA (۱۲/۵ µg/mL) در pH برابر ۵/۵ انجام شد. پس از ۱۶ h نگه داری در لرزاننده انکوباتور (۱۲۰ rpm و ۳۷°C)، مقدار نشر DCF تولید شده در محلول رویی (طول موج های برانگیختگی ۴۸۸ nm و انتشار ۵۲۵ nm) با استفاده از طیف فلوئورسنج اندازه گیری شد.

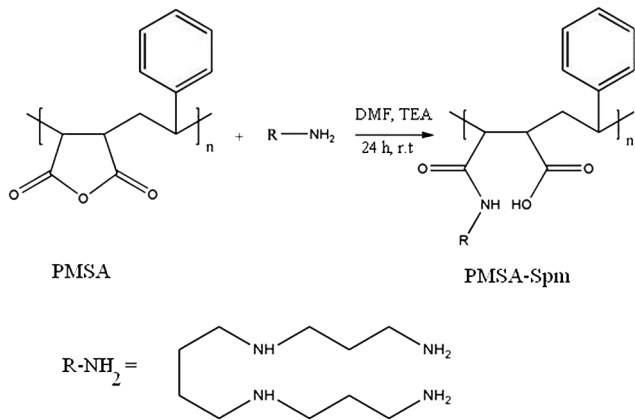
میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)

برای بررسی اثر Spm-PSMA در بود و نبود آنتی بیوتیک های CAZ و CP بر شکل شناسی باکتری *E. faecalis* از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) استفاده شد. به طور خلاصه، سلول های باکتری *E. faecalis* با CAZ (۳۲ µg/mL) یا CP (۸ µg/mL) با Spm-PSMA (۱۲/۵ µg/mL) و بدون آن در pH برابر ۵/۵ عمل آوری شدند. سلول های عمل آوری نشده به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پس از ۱۶ h نگه داری در ۳۷°C، سلول ها با روش مرکزگریزی با سرعت ۸۰۰۰ rpm جمع آوری شده و سه مرتبه با بافر فسفات نمکی (PBS) شسته شدند. سپس، سلول ها در تثبیت کننده اولیه دارای گلو تار آلدهید

کیسه دیالیز ۱۲-دالتون منتقل و عملیات دیالیز به مدت سه روز متوالی در آب یون زدوده انجام شد [۲۳]. محصول کیسه دیالیز به مدت ۴۸ h به وسیله خشک کن انجام دادی خشک شد. Spm-PSMA سنتز شده با روش های طیفسنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) و گرماسنجی پویشی تفاضلی (DSC) بررسی شد. پس از تهیه قرص KBr از Spm-PSMA، طیف FTIR آن در محدوده جذب $4000-400$ cm⁻¹ با استفاده از طیف نورسنج ثبت شد. برای تعیین دمای انتقال شیشه ای Spm-PSMA از دستگاه DSC در محدوده دمایی ۰°C تا ۴۰۰°C با سرعت گرمادهی ۱۰°C/min استفاده شد. از آنجا که مزدوج Spm-PSMA در pH خنثی و بازی حل نشد، محلول ذخیره آن (۱ mg/mL) در pH اسیدی (۵/۵ و ۶/۵) تهیه شد.

بررسی فعالیت ضدباکتری

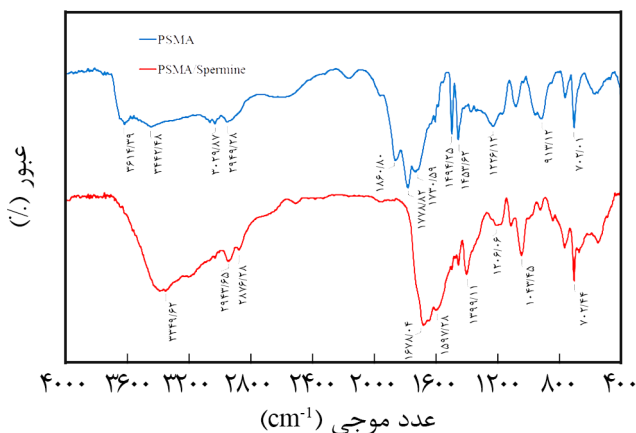
برای بررسی فعالیت ضدباکتری مزدوج Spm-PSMA علیه باکتری های *E. faecalis* و *A. baumannii* در محیط اسیدی، ابتدا منحنی رشد هر یک از باکتری های مزبور در محیط کشت NB در pH های مختلف (۳/۵-۷/۵) و دمای ۳۷°C به دست آمد. با توجه به عدم رشد و کاهش رشد باکتری ها، به ترتیب در pH های ۳/۵ و ۴/۵ و انحلال ناپذیری پلیمر در pH خنثی، فعالیت ضدباکتری پلیمر در pH های ۵/۵ و ۶/۵ بررسی شد. بدین منظور، غلظت های ۵۰-۱۲/۵ µg/mL مزدوج Spm-PSMA به روش رقیق سازی پی در پی دو برابر در pH های ۵/۵ و ۶/۵ تهیه شد. حجم مشخصی از تعلیق سلولی باکتری ها در فاز لگاریتمی، به هر یک از غلظت های پلیمر اضافه شد و ۱۵۰ µL از هر یک از مخلوط های مزبور به چاهک های ظروف کشت ۹۶ خانه ای منتقل شد، به طوری که چگالی سلول در هر چاهک برابر با 3×10^6 CFU/mL شد. محیط کشت NB دارای سلول و بدون Spm-PSMA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای بررسی فعالیت ضدباکتری اسپرمین و PSMA، محیط کشت NB دارای سلول و مقادیر مختلف از اسپرمین و PSMA معادل با غلظت های مختلف مزدوج Spm-PSMA به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در نهایت، ظروف کشت ۹۶ خانه ای در لرزاننده انکوباتور (۱۲۰ rpm و ۳۷°C) به مدت ۲۰ h نگه داری شدند و مقدار جذب در طول موج ۶۳۰ nm (OD₆₃₀) با استفاده از دستگاه ELISA BioTek READER با فاصله زمانی ۲ h اندازه گیری شد. از آنجا که فعالیت ضدباکتری پلیمر در pH برابر ۵/۵ بیشتر از pH برابر ۶/۵ است و به دلیل نبود اثر شایان توجه Spm-PSMA بر رشد باکتری *A. baumannii*، سایر آزمون ها روی باکتری *E. faecalis* در pH برابر ۵/۵ انجام شد. فعالیت ضدباکتری آنتی بیوتیک های CAZ (۶۴-۸) و CP (۶۴-۸) علیه باکتری های *E. faecalis* و *A. baumannii*



طرح ۱- سنتز مزدوج PSMA-اسپرمین از واکنش پلی(استیرن-مالئیک انیدرید) با اسپرمین در مجاورت کاتالیزور تری اتیل آمین و حلال دی متیل فرمامید.

می شود که مربوط به ارتعاش های کششی O-H و N-H است. عدد موجی نیز به 3349 cm^{-1} تغییر پیدا کرده و سطح زیر پیک محصول نسبت به پلیمر پایه افزایش یافته است [۲۷،۳۳]. همان طور که در طیف ها مشاهده می شود، احتمال هم پوشانی این پیک ها وجود دارد. احتمال جذب آب و آبکافت PSMA اولیه به دلیل شرایط خاص نگهداری و انجام واکنش زیر جو آرگون بسیار کم است و نواحی ظاهر شده در پیک می تواند به پیوندهای هیدروژنی حلقه بنزی مربوط باشد.

بررسی گرمایی نمونه ها با استفاده از DSC انجام شد. داده های DSC نشان داد، دمای انتقال شیشه ای PSMA و Spm-PSMA، به ترتیب، حدود 164°C و 197°C است (شکل ۲). دمای انتقال شیشه ای پلیمرها به ساختار شیمیایی پلیمر، وزن مولکولی، توالی پیوند کربن-



شکل ۱- طیف FTIR پلی(استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید) و مزدوج پلیمر PSMA-اسپرمین.

(۲/۵٪) و بافر سدیم کاکودیلات ($0/1 \text{ M}$) به مدت ۴-۶ h نگهداری شدند. پس از سه مرتبه شست و شو با بافر سدیم کاکودیلات ($0/1 \text{ M}$)، به مدت ۹۰ min در بافر تثبیت کننده ثانویه دارای اسیمیم تتراکسید ۱٪ قرار گرفتند. مجدداً سه مرتبه شست و شو با بافر کاکودیلات سدیم ($0/1 \text{ M}$) انجام شد. سپس، آب گیری نمونه ها با قرار گرفتن آنها به ترتیب در اتانول ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ انجام شد. پس از خشک شدن سلول ها در دمای محیط، نمونه ها با دستگاه Sputter coater با لایه نازکی از آلیاژ طلا و پالادیم پوشانده شدند و تصویربرداری با SEM انجام شد.

تحلیل داده ها

درصد مهار رشد باکتری در عمل آوری های مختلف نسبت به کنترل مثبت (عمل آوری نشده) محاسبه شد. تمام آزمون ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. شاخص مرکزی میانگین و شاخص پراکنندگی خطای معیار میانگین از نرم افزار SPSS به دست آمد. میانگین ها با استفاده از آزمون های واریانس یک طرفی (ANOVA) و Tukey تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری، $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

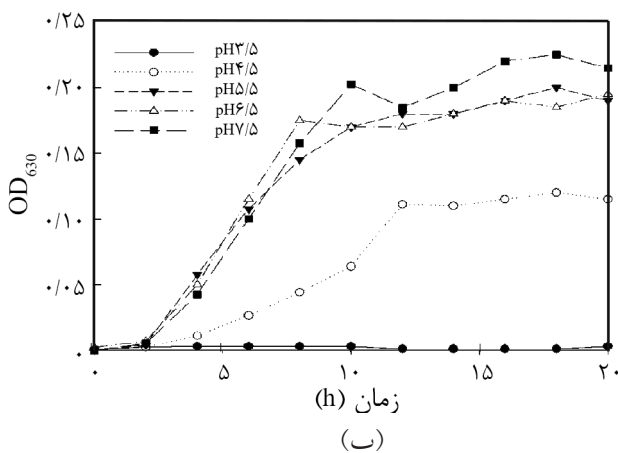
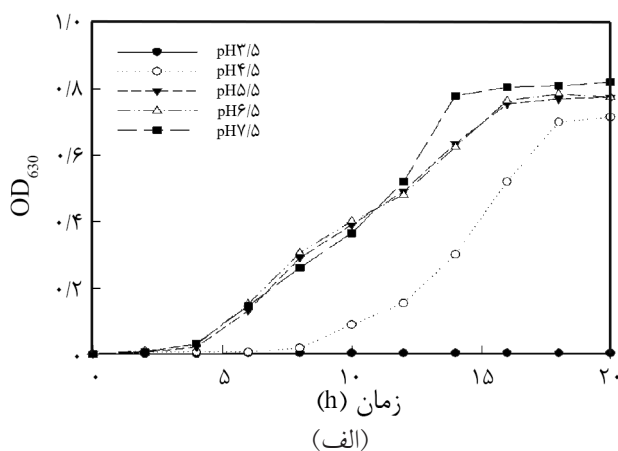
نتایج و بحث

شناسایی مزدوج پلی(استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید)-اسپرمین Spm-PSMA

مزدوج Spm-PSMA از واکنش اسپرمین با PSMA سنتز شد (طرح ۱). شکل ۱، مقایسه طیف FTIR مزدوج Spm-PSMA و PSMA اولیه را نشان می دهد. پیک های پهن ظاهر شده در ناحیه 3349 cm^{-1} مربوط به گروه های ارتعاش کششی O-H اسیدی و H-N آمیدی، در نواحی 2876 و 2943 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه C-H آلیفاتیک، در ناحیه 1678 cm^{-1} مربوط به گروه های C=O اسیدی و H-N آمیدی، در ناحیه 1597 و 1206 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی گروه های N-H آمیدی و کششی C-O اسیدی و در ناحیه 1043 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه N-C آمینی است. پلیمر پایه، PSMA، دارای پیک های 1730 cm^{-1} تا 1860 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی کربونیل در حلقه انیدریدی است. در طیف FTIR مزدوج Spm-PSMA، پیک های دوتایی در 1778 cm^{-1} و 1860 cm^{-1} مربوط به گروه های کربونیل حلقه انیدریدی کاملاً حذف شده و به ناحیه 1678 cm^{-1} جابه جا شده اند که به جذب های کربونیل در آمید و اسید مربوط هستند.

همچنین، پیک های پهن در ناحیه 2400 cm^{-1} تا 3400 cm^{-1} مشاهده

پلیمر مزدوج Spm-PSMA قابلیت مهار رشد باکتری *A. baumannii* را در محیط اسیدی ندارد، در حالی که رشد باکتری *E. faecalis* در مجاورت پلیمر و در pHهای ۵/۵ و ۶/۵، به ترتیب، ۳۶٪ و ۲۱٪ کاهش می‌یابد. گزارش‌هایی مبنی بر نقش برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و پیوندهای هیدروژنی بین عوامل ضدباکتری و باکتری‌ها ارائه شده است. اثر ضدباکتری پلی‌آمین‌ها به تعداد گروه‌های آمین اول آن‌ها وابسته است. اسپرمین به مقدار زیادی در pHهای فیزیولوژی و اسیدی پروتون‌دار می‌شود و دارای چهار بار مثبت (+۴) است که می‌تواند با مولکول‌های با بار منفی از راه برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک ارتباط برقرار کند [۳۵]. همچنین، اسپرمین می‌تواند به 16S rRNA زیرواحد کوچک ریبوزوم (30S) متصل شود و باعث افزایش بدخوانی (misreading) رمزهای ژنتیکی شود، جذب پتاسیم را القا کرده و رگولون SigB را خاموش کند و با یون‌ها و گروه‌های فسفات کمپلکس‌های سه‌گانه تشکیل دهد [۳۶-۳۹]. آهن عنصر ضروری برای رشد باکتری است

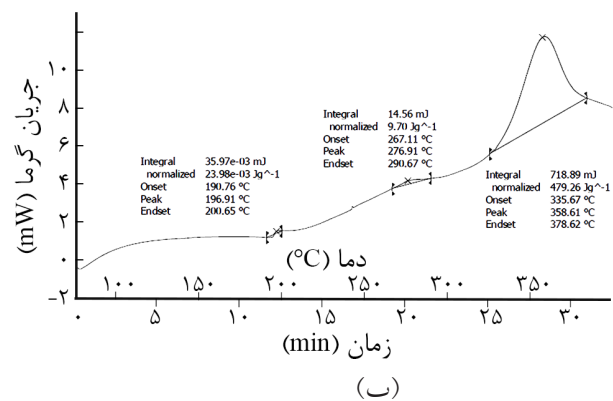
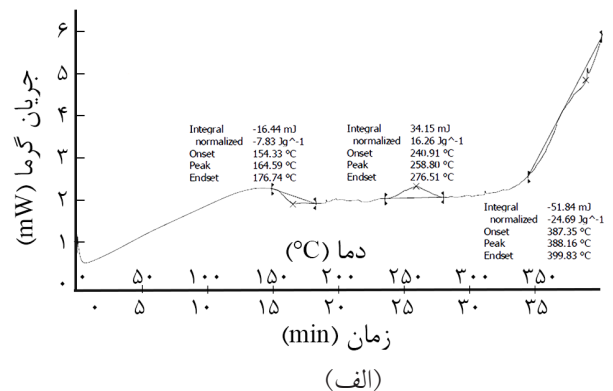


شکل ۳- منحنی رشد باکتری‌های: (الف) گرم-منفی اسیتوباکتر بومانی و (ب) گرم-مثبت اتروکوکوس فکالیس در pHهای مختلف (۳/۵-۷/۵).

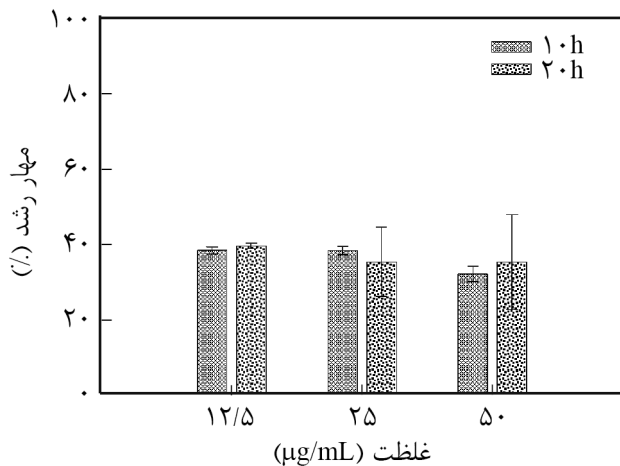
کربن و بلندی زنجیر گروه‌های جانبی آلیفاتیک و پیوند هیدروژنی بستگی دارد که تمام این عوامل در حال رقابت با یکدیگرند. در واقع، هر چه حجم آزاد پلیمر کاهش پیدا کند، تحرک زنجیرها کمتر می‌شود و دمای بیشتری نیاز است تا انرژی لازم برای حرکت زنجیرها فراهم شود [۳۳، ۳۴].

فعالیت ضدباکتری

شکل ۳، نشانگر منحنی رشد باکتری‌های *A. baumannii* و *E. faecalis* در pHهای مختلف (۳/۵-۷/۵) است. نتایج حاصل از بررسی اثر pH بر رشد باکتری‌های مزبور نشانگر عدم رشد هر دو باکتری در pH برابر ۳/۵، کاهش رشد قابل ملاحظه باکتری *E. faecalis* و تأخیر رشد باکتری *A. baumannii* در pH برابر ۴/۵ نسبت به ۷/۵ است. رشد هر دو باکتری در pHهای ۵/۵ و ۶/۵ مشابه رشد آن‌ها در pH برابر ۷/۵ است. با توجه به منحنی رشد و انحلال‌ناپذیری مزدوج Spm-PSMA در pH برابر ۷/۵، فعالیت ضدباکتری پلیمر در pHهای ۵/۵ و ۶/۵ ارزیابی شد. نتایج سنجش فعالیت ضد میکروب نشان داد،



شکل ۲- دمانگاشت DSC: (الف) پلی (استیرن-*alt*-مالئیک انیدرید) و (ب) مزدوج PSMA-اسپرمین.



شکل ۴- درصد مهار رشد (GI%) باکتری *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۰ و ۲۰ h پس از عمل آوری با مزدوج PSMA-اسپرمین (Spm-PSMA) در pH برابر ۵/۵.

E. faecalis در غلظت‌های مختلف از اسپرمین و PSMA (معادل با غلظت‌های مختلف مزدوج Spm-PSMA) در pH برابر ۵/۵، به ترتیب، ۲-۸٪ و ۴-۱۳٪ کاهش می‌یابد که این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نیست ($p > 0.05$). بنابراین، اجزای سازنده مزدوج پلیمر Spm-PSMA فاقد فعالیت ضدباکتری علیه باکتری *E. faecalis* است. نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف (۶۴-۸ µg/mL) آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP بر باکتری *E. faecalis* در pH برابر ۵/۵ نشان داد، رشد این باکتری در غلظت‌های گفته شده از آنتی‌بیوتیک‌های مزبور حدود ۴٪ تا ۱۷٪ کاهش می‌یابد. این کاهش نشانگر مقاوم بودن باکتری *E. faecalis* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP در pH برابر ۵/۵ است. با توجه به اینکه مزدوج Spm-PSMA به‌طور مستقل از غلظت در محدوده ۵۰-۱۲/۵ µg/mL باعث کاهش رشد باکتری *E. faecalis* می‌شود، بنابراین اثر کمترین غلظت مزدوج پلیمر-دارو (۱۲/۵ µg/mL) بر فعالیت ضدباکتری آنتی‌بیوتیک‌های CAZ (۳۲ µg/mL) و CP (۸ µg/mL) علیه باکتری *E. faecalis* در pH برابر ۵/۵ بررسی شد. همان‌طور که در **جدول ۱** مشاهده می‌شود، افزایش زمان از ۱۰ h به ۲۰ h اثر درخور توجهی بر مقادیر GI% مزدوج Spm-PSMA یا آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP به تنهایی ندارد ($p > 0.05$)، در حالی که باعث کاهش چشمگیر مقادیر GI% عمل آوری هم‌زمان باکتری با مزدوج پلیمر-دارو و هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مزبور می‌شود ($p < 0.05$). این آزمون نشان می‌دهد، عمل آوری هم‌زمان باکتری *E. faecalis* با مزدوج Spm-PSMA و آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP، به ترتیب، باعث افزایش ۲/۶ و ۲/۸ برابری فعالیت ضدباکتری آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP در زمان ۱۰ h پس از عمل آوری می‌شود و

که در فرایندهای متابولیسی زیادی از جمله متابولیسم مرکزی و تنفس سلولی درگیر است [۴۰]. جذب آهن به‌وسیله اسپرمین سبب نقص در تولید انرژی و انتقال الکترون می‌شود [۴۱]. مزدوج Spm-PSMA سنتز شده در این پژوهش، باعث کاهش رشد باکتری گرم مثبت *E. faecalis* به صورت غیروابسته به غلظت در محدوده غلظت ۵۰-۱۲/۵ µg/mL در pH اسیدی می‌شود و فاقد فعالیت ضدباکتری علیه باکتری گرم منفی *A. baumannii* است. این مشاهده تأییدی بر مطالعات پیشین است که نشان داده بودند، فعالیت ضدباکتری اسپرمین علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است [۴۲]. اختلاف مشاهده شده در حساسیت باکتری‌های گرم منفی *A. baumannii* و گرم مثبت *E. faecalis* به مزدوج Spm-PSMA می‌تواند به دلیل تفاوت در پوشش سلولی باکتری‌ها باشد. پوشش سلولی در باکتری‌های گرم منفی شامل ساختار چندلایه و بسیار پیچیده است که متشکل از غشای سیتوپلاسم، لایه نازک پپتیدوگلیکان و غشای خارجی دارای لیپوپلی ساکارید است. غشای سیتوپلاسمی در باکتری‌های گرم مثبت با دیواره سلولی متشکل از لایه ضخیم پپتیدوگلیکان و لیپوتیکوئیک اسید احاطه شده است. لیپوتیکوئیک اسید از راه دی‌آسیل گلیسرول به غشای سلول متصل است [۴۳]. مزدوج Spm-PSMA در pH اسیدی دارای بار مثبت است که می‌تواند از راه برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک با بار منفی لیپوپلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی یا لیپوتیکوئیک اسید باکتری‌های گرم مثبت به سطح سلول‌های باکتری متصل شود. با توجه به اینکه لایه پپتیدوگلیکان در سلول‌های گرم مثبت ضخیم‌تر از سلول‌های گرم منفی است، بنابراین احتمالاً مزدوج Spm-PSMA در لایه پپتیدوگلیکان سلول‌های گرم مثبت حبس شده و از راه تجمع مزدوج پلیمر-دارو در غشای سیتوپلاسمی، جذب سلولی آن افزایش می‌یابد [۴۴].

به دلیل نداشتن فعالیت ضدباکتری مزدوج Spm-PSMA علیه باکتری *A. baumannii* و سمیت بیشتر مزدوج مزبور در pH برابر ۵/۵ نسبت به ۶/۵ علیه باکتری *E. faecalis*، آزمون‌های بعدی روی باکتری *E. faecalis* و در pH برابر ۵/۵ انجام شد. همان‌طور که در **شکل ۴** مشاهده می‌شود، مقادیر GI% باکتری *E. faecalis* در غلظت‌های مختلف مزدوج پلیمر Spm-PSMA (۵۰-۱۲/۵ µg/mL) در pH برابر ۵/۵ تغییر شایان توجهی نمی‌یابد ($p > 0.05$). با توجه به انحلال‌ناپذیری مزدوج Spm-PSMA در غلظت‌های بیش از ۵۰ µg/mL در محیط کشت NB و pH برابر ۵/۵، تعیین مقدار حداقل غلظت مهاری (MIC) مزدوج پلیمر-دارو و بررسی فعالیت ضدباکتری آن در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ µg/mL امکان‌پذیر نبود. رشد باکتری

جدول ۱- درصد مهار رشد (GI%) باکتری *انتروکوکوس فکالیس* عمل آوری شده با مزدوج PSMA-اسپرمین به تنهایی و هم‌زمان با آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم پس از ۱۰ h و ۲۰ h.

Spm-PSMA ($\mu\text{g/mL}$)				غلظت ($\mu\text{g/mL}$)	آنتی بیوتیک
۲۰ h		۱۰ h			
۱۲/۵	۰	۱۲/۵	۰		
$42/02 \pm 2/05$	0 ± 0	$41/35 \pm 1/45$	0 ± 0	۰	سفنازیدیم
$51/44 \pm 4/52$	$19/56 \pm 9/47$	$63/47 \pm 4/24$	$24/79 \pm 9/71$	۳۲	
$41/36 \pm 2/44$	0 ± 0	$40/32 \pm 6/18$	0 ± 0	۰	سیپروفلوکساسین
$46/73 \pm 4/16$	$18/46 \pm 7/69$	$63/64 \pm 4/28$	$22/83 \pm 7/27$	۸	

شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، ۱۶ h عمل آوری باکتری *E. faecalis* با مزدوج Spm-PSMA باعث ۳۹٪ کاهش مقدار ROS نسبت به سلول‌های عمل آوری نشده می‌شود. کاهش سطح ROS در سلول‌های عمل آوری شده با مزدوج ممکن است به دلیل وجود اسپرمین باشد که به‌عنوان زداینده ROS شناخته شده است [۴۵].

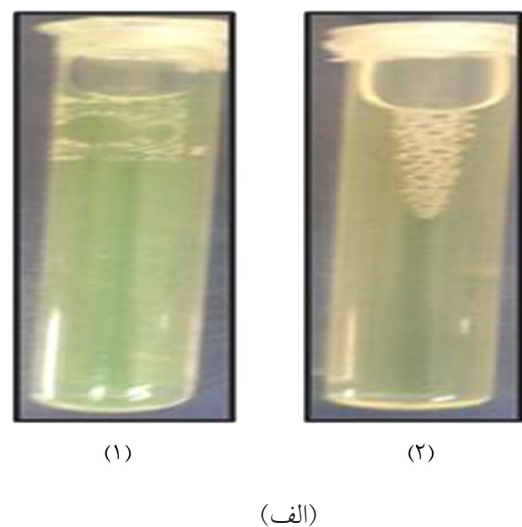
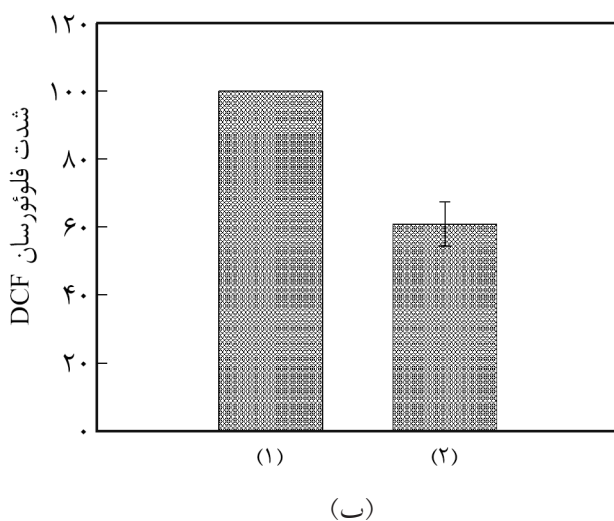
میکروسکوپ الکترونی پویشی

تغییرات شکل‌شناسی سلول‌های *E. faecalis* عمل آوری شده با پلیمر مزدوج Spm-PSMA و آنتی بیوتیک‌ها، به تنهایی و هم‌زمان، با استفاده از SEM بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، عمل آوری سلول‌های *E. faecalis* با مزدوج Spm-PSMA به تنهایی یا هم‌زمان با آنتی بیوتیک‌های CAZ و CP در pH برابر ۵/۵ باعث

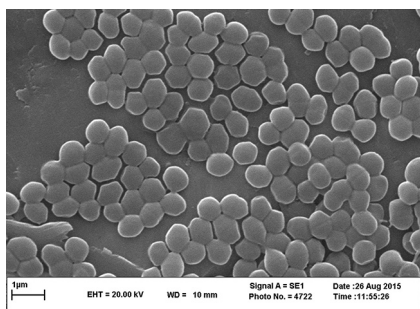
فعالیت ضد باکتری پلیمر را حدود ۱/۵ برابر افزایش می‌دهد. قابلیت مزدوج Spm-PSMA در کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی با یافته‌های سایر پژوهشگران مبنی بر قابلیت پلی آمین‌ها در افزایش حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها سازگار است [۳۰، ۳۱]. Kwon و همکاران نشان دادند، اسپرمین حساسیت باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* را به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام و کلرامفنیکل افزایش می‌دهد که این عمل احتمالاً در اثر مسدود شدن پورین‌های غشایی به‌وسیله اسپرمین و حبس آنتی بیوتیک‌ها داخل سلول، افزایش استیل‌دار شدن پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی سیلین (PBP) و کاهش بیان PBP است [۳۰].

سنجش گونه‌های ROS

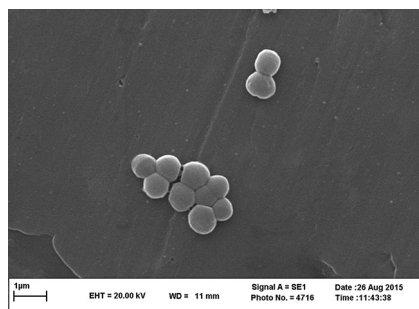
اثر مزدوج Spm-PSMA بر تولید ROS در سلول‌های *E. faecalis* با استفاده از کاوند DCFH-DA به‌وسیله طیف‌فلوئورسنج اندازه‌گیری



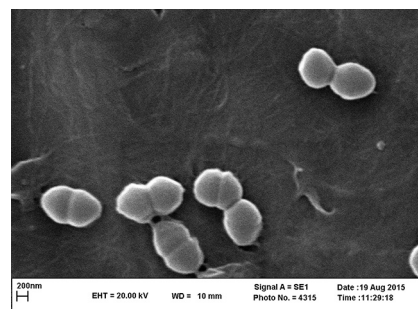
شکل ۵- (الف) تصویر و (ب) درصد شدت فلوروسانس دی‌کلروفلوئورسئین سلول‌های *انتروکوکوس فکالیس* با رنگ‌آمیزی DCFH-DA: (۱) عمل آوری نشده (کنترل) و (۲) عمل آوری شده با مزدوج PSMA-اسپرمین در pH برابر ۵/۵.



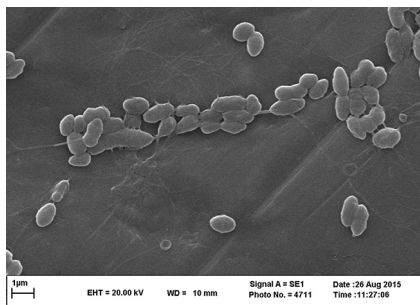
(ج)



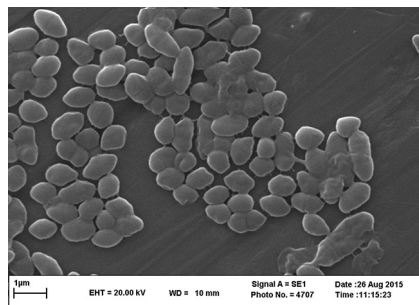
(ب)



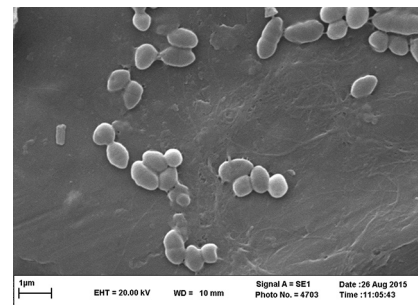
(الف)



(و)



(هـ)



(د)

شکل ۶- تصاویر SEM سلول‌های باکتری *انتروکوکوس فکالیس*: (الف) عمل‌آوری نشده (کنترل) و عمل‌آوری شده با (ب) سفتازیدیم ($32 \mu\text{g/mL}$)، (ج) سیپروفلوکساسین ($8 \mu\text{g/mL}$)، (د) پلیمر Spm-PSMA ($12/5 \mu\text{g/mL}$)، (ه) با مزدوج Spm-PSMA ($12/5 \mu\text{g/mL}$) و سفتازیدیم ($32 \mu\text{g/mL}$) هم‌زمان و (و) مزدوج Spm-PSMA ($12/5 \mu\text{g/mL}$) و سیپروفلوکساسین ($8 \mu\text{g/mL}$) Spm-PSMA: مزدوج PSMA-اسپرمین هم‌زمان.

اثری بر رشد باکتری *A. baumannii* ندارد و فعالیت ضدباکتری آن علیه باکتری *E. faecalis* در pH برابر ۵/۵ بیشتر از pH برابر ۶/۵ است. همچنین، مزدوج Spm-PSMA قابلیت کاهش مقاومت باکتری *E. faecalis* به آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP را در محیط اسیدی دارد. اندازه‌گیری مقدار ROS در باکتری *E. faecalis* عمل‌آوری شده با مزدوج Spm-PSMA نشان داد، سطح ROS تولید شده به وسیله سلول‌ها کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل وجود اسپرمین است. تصاویر SEM نشان داد، باکتری *E. faecalis* که کوکسی شکل است، با وجود مزدوج Spm-PSMA به تنهایی یا هم‌زمان با آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP به کوکوباسیل تغییر شکل می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش، برای اولین بار، فعالیت ضدباکتری مزدوج Spm-PSMA علیه سویه بالینی *E. faecalis* و قابلیت آن در افزایش حساسیت باکتری مزبور به آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP را در شرایط اسیدی ثابت کرد.

قدردانی

از دانشگاه فردوسی مشهد برای تأمین اعتبار مالی این پژوهش (شماره طرح‌های ۳۱۴۷۳/۳ و ۳۳۳۷۵۰) تشکر و قدردانی می‌شود.

تغییر شکل برخی از سلول‌ها از کوکسی به کوکوباسیل می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های CAZ و CP به تنهایی در pH اسیدی اثری بر شکل سلول‌های *E. faecalis* ندارند. شرایط تنش مانند محدودیت مواد مغذی، تنش اکسایشی، آسیب DNA و قرار گرفتن در معرض عوامل ضدباکتری باعث تغییر DNA، تکثیر و تقسیم سلولی باکتری‌ها می‌شوند. برخی باکتری‌ها در این شرایط شکل‌شناسی خود را تغییر می‌دهند و طول آن‌ها افزایش می‌یابد. فنوتیپ طولیل شدن باکتری‌ها با بهینه‌سازی تعاملات سلول‌ها با یکدیگر و با سطوح و نیز حفاظت آن‌ها در برابر محیط‌های کشنده در ارتباط است [۴۶].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، مزدوج Spm-PSMA از واکنش اسپرمین با پلیمر PSMA در مجاورت کاتالیزور تری‌اتیل‌آمین تهیه شد. طیف‌های FTIR و DSC سنتز مزدوج Spm-PSMA را تأیید کرد. فعالیت ضدباکتری آن بر باکتری‌های *E. faecalis* و *A. baumannii* در pH اسیدی (۵/۵ و ۶/۵) بررسی شد. پلیمر Spm-PSMA

مراجع

1. Peleg A.Y., Seifert H., and Paterson, D.L., *Acinetobacter Baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 538-582, 2008.
2. Bassetti M., Ginocchio F., and Mikulska M., New Treatment Options Against Gram-Negative Organisms, *Crit. Care*, **15**, 1, 2011.
3. Dong C., Ye Y., Qian L., Zhao G., He B., and Xiao H., Antibacterial Modification of Cellulose Fibers by Grafting β -Cyclodextrin and Inclusion with Ciprofloxacin, *Cellulose*, **21**, 1921-1932, 2014.
4. Majumdar P., He J., Lee E., Kallam A., Gubbins N., Stafslin S.J., Daniels J., and Chisholm B.J., Antimicrobial Activity of Polysiloxane Coatings Containing Quaternary Ammonium-Functionalized Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane, *J. Coat. Technol. Res.*, **7**, 455-467, 2010.
5. Xue Y., Xiao H., and Zhang Y., Antimicrobial Polymeric Materials with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 3626-3655, 2015.
6. Lee Y.S. and Byoun Y.S., Poly(styrene-co-4-vinylbenzyl chloride) Conjugated with 3-(dimethylamino) Phenol: Synthesis and Antibacterial Activity, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 1833-1835, 2002.
7. Kenawy E.R., Worley S.D., and Broughton R., The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review, *Biomacromolecules*, **8**, 1359-1384, 2007.
8. Sovadinova I., Palermo E.F., Urban M., Mpiga P., Caputo G.A., and Kuroda K., Activity and Mechanism of Antimicrobial Peptide-Mimetic Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives, *Polymers*, **3**, 1512-1532, 2011.
9. Zasloff M., Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms, *Nature*, **415**, 389-395, 2002.
10. Baghersad S., Mansurnezhad R., Ghasemi Mobarakeh L., Mola Hosseini H., and Morshed M., Coating of Silk Fabrics by PVA/Ciprofloxacin HCl Nanofibers for Biomedical Applications, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 171-184, 2016.
11. Elvira C., Gallardo A., Roman J., and Cifuentes A., Covalent Polymer-Drug Conjugates, *Molecules*, **10**, 114-125, 2005.
12. Csákvári É., Azori M., and Tüdös F., Physico-chemical Studies of Polymeric Carriers, *Polym. Bull.*, **12**, 553-556, 1984.
13. Venditti I., Morphologies and Functionalities of Polymeric Nanocarriers as Chemical Tools for Drug Delivery: A Review, *J. King Saud University-Science*, In Press, 2017.
14. Katti D.S., Lakshmi S., Langer R., and Laurencin C.T., Toxicity, Biodegradation and Elimination of Poly(anhydrides), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 933-961, 2002.
15. Larson N., Greish K., Bauer H., Maeda H., and Ghandehari H., Synthesis and Evaluation of Poly(styrene-co-maleic acid) Micellar Nanocarriers for the Delivery of Tanespimycin, *Int. J. Pharm.*, **420**, 111-117, 2011.
16. Johnson D., *New Applications for Poly(ethylene-alt-maleic anhydride)*, PhD Thesis, Durham University, 2010.
17. Oda T. and Maeda H., Binding to and Internalization by Cultured Cells of Neocarzinostatin and Enhancement of Its Actions by Conjugation with Lipophilic Styrene-Maleic Acid Copolymer, *Cancer Res.*, **47**, 3206-3211, 1987.
18. Henry S.M., El-Sayed M.E., Pirie C.M., Hoffman A.S., and Stayton P.S., pH-responsive Poly(styrene-alt-maleic anhydride) Alkylamide Copolymers for Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules*, **7**, 2407-2414, 2006.
19. Duncan R., Ringsdorf H., and Satchi-Fainaro R., Polymer Therapeutics-Polymers as Drugs, Drug and Protein Conjugates and Gene Delivery Systems: Past, Present and Future Opportunities, *J. Drug Target*, **14**, 337-341, 2006.
20. Mu Y., Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S.I., Tsutsumi Y., Maeda M., Kawasaki K., Nomizu M., and Yamada Y., Bioconjugation of Laminin Peptide YIGSR with Poly(styrene-co-maleic acid) Increases Its Antimetastatic Effect on Lung Metastasis of B16-BL6 Melanoma Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 75-79, 1999.
21. Greish K., Sawa T., Fang J., Akaike T., and Maeda H., SMA-doxorubicin, a New Polymeric Micellar Drug for Effective Targeting to Solid Tumours, *J. Control. Rel.*, **97**, 219-230, 2003.
22. Alex M.A., Nagpal N., Kulshreshtha R., and Koul V., Synthesis and Evaluation of Cationically Modified Poly(styrene-alt-maleic anhydride) Nanocarriers for Intracellular Gene Delivery, *RSC Adv.*, **5**, 21931-21944, 2015.
23. Jackman J.G., Juwarker H., Poveromo L.P., Levinson H., Leong K.W., and Sullenger B.A., Polycationic Nanofibers for Nucleic Acid Scavenging, *Biomacromolecules*, **17**, 3706-3713, 2016.
24. Winek C.L. and Burgun J.J., Acute and Subacute Toxicology

- and Safety Evaluation of SMA 1440-H Resin, *Clin. Toxicol.*, **10**, 255-260, 1977.
25. Fang W., Cai Y., Chen X., Su R., Chen T., Xia N., Li L., Yang Q., Han J., and Han S., Poly(styrene-*alt*-maleic anhydride) Derivatives as Potent Anti-HIV Microbicide Candidates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1903-1907, 2009.
 26. Singh H., Jabbal M.S., Ray A.R., and Vasudevan P., Effect of Anionic Polymeric Hydrogels on Spermatozoa Motility, *Biomaterials*, **5**, 307-309, 1984.
 27. Jeong J.H., Byoun Y.S., and Lee Y.S., Poly(styrene-*alt*-maleic anhydride)-4-Aminophenol Conjugate: Synthesis and Antibacterial Activity, *React. Funct. Polym.*, **50**, 257-263, 2002.
 28. Dewangan R.P., Joshi S., Kumari S., Gautam H., Yar M.S., and Pasha S., N-Terminally Modified Linear and Branched Spermine Backbone Dipeptidomimetics Against Planktonic and Sessile Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 5435-5447, 2014.
 29. Grossowicz N., Razin S., and Rozansky R., Factors Influencing the Antibacterial Action of Spermine And Spermidine on *Staphylococcus aureus*, *Microbiology*, **13**, 436-441, 1955.
 30. Kwon D.H. and Lu C.D., Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 1623-1627, 2006.
 31. Kwon D.H. and Lu C.D., Polyamine Effects on Antibiotic Susceptibility in Bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 2070-2077, 2007.
 32. Khalil H., Chen T., Riffon R., Wang R., and Wang Z., Synergy Between Polyethylenimine and Different Families of Antibiotics Against a Resistant Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1635-1641, 2008.
 33. Jeong J. H., Byoun Y.S., Ko S.B., and Lee Y.S., Chemical Modification of Poly(styrene-*alt*-maleic anhydride) with Antimicrobial 4-Aminobenzoic Acid and 4-Hydroxybenzoic Acid, *J. Ind. Eng. Chem.*, **7**, 310-315, 2001.
 34. Rajput S.R., Rupainwar D.C., and Singh A., A Study on Styrene Maleic Anhydride Modification by Benzoic Acid Derivatives and Dimethyl Sulfoxide, *Int. J. Chemtech. Res.*, **1**, 915-919, 2009.
 35. Barawkar D.A., Rajeev K.G., Kumar V.A., and Ganesh K.N., Triplex Formation at Physiological pH by 5-Me-dC-N4-(spermine) [X] oligodeoxynucleotides: Non Protonation of N3 in X of X* G: C Triad and Effect of Base Mismatch/Ionic Strength on Triplex Stabilities, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1229-1237, 1996.
 36. Bachrach U. and Weinstein A., Effect of Aliphatic Polyamines on Growth and Macromolecular Syntheses in Bacteria, *Microbiology*, **60**, 159-165, 1970.
 37. Yao X. and Lu C.D., Characterization of *Staphylococcus aureus* responses to Spermine Stress, *Curr. Microbiol.*, **69**, 394-403, 2014.
 38. Mills J. and Dubin D.T., Some Effects of Spermine on *Escherichia coli*, *Mol. Pharmacol.*, **2**, 311-318, 1966.
 39. Marzabadi M.R. and Lovaas E., Spermine Prevent Iron Accumulation and Depress Lipofuscin Accumulation in Cultured Myocardial Cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 375-381, 1996.
 40. Haley K.P. and Skaar E.P., A Battle for Iron: Host Sequestration and *Staphylococcus aureus* Acquisition, *Microb. Infect.*, **14**, 217-227, 2012.
 41. Joshi G.S., Spontak J.S., Klapper D.G., and Richardson A.R., Arginine Catabolic Mobile Element Encoded speG Abrogates the Unique Hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to Exogenous Polyamines, *Mol. Microbiol.*, **82**, 9-20, 2011.
 42. Fair W.R. and Wehner N., Antibacterial Action of Spermine: Effect on Urinary Tract Pathogens, *Appl. Microbiol.*, **21**, 6-8, 1971.
 43. Wiley J.M., Sherwood L.M., and Woolverton, C.J., *Prescott's Microbiology*, McGraw Hill Education, USA, 42-82, 2013.
 44. Malanovic N. and Lohner K., Gram-positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on the Activity of Antimicrobial Peptides, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1858**, 936-946, 2016.
 45. Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., and Casero R.A., The Natural Polyamine Spermine Functions Directly as a Free Radical Scavenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11140-11145, 1998.
 46. Justice S.S., Hunstad D.A., Cegelski L., and Hultgren S.J., Morphological Plasticity as a Bacterial Survival Strategy, *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 162-168, 2008.