

بررسی اثر سینرژیکی نوسکاپین با افلوکساسین در انتروباکتریاسه‌های مقاوم به فلوروکینولونها

عبدالعزیز رستگار لاری^{۱*}، هاجر محمدی^۲، فرامرز مسجدیان^۳ و مسعود محمودیان^۴

۱- استاد میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، پست الکترونیک: lari@iums.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- مربی میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۴- استاد گروه فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*نویسنده مسئول مقاله

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۶

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۶

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۶

چکیده

هر روزه بیماریهای عفونی در جهان سبب گرفتاری میلیونها نفر می‌گردد که روزانه مرگ بیش از هزاران نفر را به دنبال دارد. در سالهای اخیر مقاومت دارویی در باکتریهای بیماری‌زا در سراسر جهان رو به افزایش است. پاتوژنهای باکتریایی مقاوم به دارو نیازمند درمان پیچیده در افراد با نقص سیستم ایمنی، ایدز و بیماران سرطانی می‌باشند. از طرف دیگر، درمان عوامل عفونی مقاوم به چندین دارو، نیازمند مواد ضد میکروبی جدید از منابع خاص می‌باشد تا بتوان بوسیله راهکارهایی قدرت و طیف اثر ضد میکروبی را افزایش داده و یا اینکه اثر ضد میکروبی داروهای موجود را به حداکثر رسانده تا مقاومت میکروبی از بین رفته یا به حداقل برسد. در دو دهه اخیر، برای افزایش طیف اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیکها از ترکیبهای مختلف، از جمله عصاره گیاهان استفاده شده است، در همین راستا، مطالعه‌ای برای بررسی اثر سینرژیک افلوکساسین با نوسکاپین بر روی سوشهای انتروباکتریاسیه‌های مقاوم به فلوروکینولونها صورت گرفت. برای این منظور پس از تشخیص جنس و گونه باکتریها، تعداد ۲۵ اشریشیاکلی جدا شده از بیماران با استفاده از آنتی‌بیوگرام به روش انتشار در آگار مطابق استاندارد NCCLS مقاوم به افلوکساسین جدا گردید. سپس با استفاده از رقت سریال، میزان MIC (حداقل غلظت بازدارنده از رشد) هر یک از سوشها در برابر نوسکاپین و افلوکساسین به تنهایی و توأم، به روش فوق تعیین گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که MIC ۲۵ سوش مورد مطالعه نسبت به افلوکساسین از ۸ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. همچنین MIC آنها نسبت به نوسکاپین ۰/۵ و ۱ میکرومول در میلی‌لیتر بوده است. با توجه به نتایج MIC سوشها نسبت به نوسکاپین، از غلظت ۲۵/۰ میکرومول در میلی‌لیتر برای تعیین اثر سینرژسم با افلوکساسین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده از تأثیر توأم این دو ماده نسبت به سوشهای مورد مطالعه کاهش و MIC به میزان ۲ تا ۸ برابر بوده است که این خود تأثیر نوسکاپین به همراه افلوکساسین را در مهار باکتریهای مقاوم نشان می‌دهد. با انجام مطالعات بیشتر، می‌توان اثر ترکیبهای مشابه را با آنتی‌بیوتیکهای مختلف مورد بررسی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، نوسکاپین، افلوکساسین.

مقدمه

روند روبه افزایش باکتریهای مقاوم به خصوص میکروارگانیسمهای عامل عفونتهای بیمارستانی یکی از معضلات جامعه پزشکی امروز می باشد. مطالعات مختلف نشان می دهد که این افزایش مقاومت نسبت به فراورده های دارویی جدید نیز به آسانی ظاهر می گردد (Ahmad & Beg, 2002).

مقاومت چند دارویی (Multi-Drug Resistance) MDR پدیده ای است که حضور آن در گزارشهای علمی به دفعات به چشم می خورد. باکتریها مکانیسمهای متفاوتی برای مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها از خودشان می دهند. از جمله، می توان به غیرفعال سازی آنزیمی، تغییر هدف، پدیده افلوکس (efflux) و تغییر در نفوذپذیری اشاره کرد.

سیستم پدیده افلوکس از دسته مقاومتهای ذاتی بوده که در باکتریهای نظیر سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و غیره مشاهده شده است و سبب مقاومت این باکتریها نسبت به انواع آنتی بیوتیکها نظیر بتالاکتامها، ماکرولیدها، تتراسایکلین، فلوروکینولونها و کلرامفنیکل می گردد.

پدیده افلوکس موجب خارج شدن میزان زیادی از آنتی بیوتیکهای وارد شده به داخل باکتریها شده و سبب کاهش غلظت داخل سلولی آنها و در نتیجه مقاومت باکتریها به داروی مصرفی می گردد. به نظر می رسد عناصر متفاوتی وجود دارند که می توانند از کاهش میزان داخل سلولی داروها جلوگیری بعمل آورند. از جمله می توان به اعضای خانواده Berberidaceae و ترکیب berberine (C₂₀H₁₉NO₅) مانع پدیده افلوکس در سلولها گردیده است، از متابولیتهای

ثانویه ای گیاهی می باشد که باعث حفاظت گیاهان در برابر پاتوژنهای میکروبی شده و غلظت آن در پاسخ به تهاجم میکروبی افزایش می یابد (Jaren et al., 2002). در این پژوهش از نوسکاپین (C₂₂H₂₃NO₇) که یک آلکالوئید محلول در آب با خاصیت بسیار کم سمی بوده و از گیاه خشخاش (*Opium*) خانواده Papaveraceae تهیه می شود، استفاده شد (Zhou et al., 2002). این ترکیب به توپولینها متصل شده و تجمع آنها را تحت تأثیر قرار می دهد (Laden et al., 2004; Schuler et al., 1999) و همچنین با فعال کردن NK cell (Natural killer cell) و بردن سلول به فاز آپوپتوزیس از فعالیت میتوتیک آنها جلوگیری نموده و سبب مرگ سلول می شود (Zhou et al., 2002). در سلولهای سرطانی تخمدان با القای آپوپتوزیس سبب توقف رشد و تکثیر و بهبودی آن می گردد (Zhou et al., 2002; Scuvee-moreau et al., 2004). در حال حاضر توانایی این ترکیب به عنوان درمان بیماران مبتلا به لنفومای غیر هوچکین و لوسمی مزمن که به شیمیوتراپی پاسخ نمی دهند، در حال بررسی است. این ترکیب دارای اثر سیتوتوکسین است (Verma 2006) و به دلیل قابلیت عبور از سد خونی- مغزی توانایی مهار رشد گلیوبلاستوما (glioblastoma) را دارا می باشد. نوسکاپین همچنین باعث مهار رشد سلولهای توموری در میتوز و القای آپوپتوزیس سلولهای توموری در محیط *invitro* می گردد (Landen et al., 2004).

با توجه به مکانیسم مقاومت میکروارگانیسمها که به علت وجود پدیده افلوکس بوجود می آید، استفاده از نوسکاپین با غلظت زیر مهاری به عنوان مکمل، همراه با آنتی بیوتیک افلوکسازین منطقی به نظر می رسد.

مواد و روشها

تعداد ۱۵۷ نمونه اشریشیاکلی از بیماران بستری و سرپایی در بخشهای مختلف مرکز آموزشی و پژوهشی درمانی حضرت رسول اکرم (ص) جمع‌آوری و با استفاده از محیط‌های مختلف با توجه به تستهای بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند، سپس با استفاده از محیط مولر هیتون آگار و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (شرکت سیناژن) به طریقه انتشار در آگار مطابق استاندارد NCCLS مقاومت سوشها تعیین گردید.

از مجموع سوشهای مورد مطالعه، تعداد ۲۵ عدد اشریشیاکلی که مقاومت آنها به روش انتشار در آگار نسبت به افلوکسازین تأیید شدند، انتخاب و مورد مطالعه بعدی قرار گرفتند.

با استفاده از محیط مولر هیتون مایع یک سری لوله حاوی 1ml از محلول آنتی‌بیوتیکی افلوکسازین با رفتهای مختلف (با استفاده از بافر فسفات) با غلظتهای ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید، سپس ۲۵ سوش مقاوم به افلوکسازین را بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۱۸-۲۴ ساعت، از کلنی‌های جوان در محلول نرمال سالین سوسپانسیونی معادل غلظت نیم مک‌فارلند (معادل 1×10^8 cfu/ml) تهیه گردید. پس از آنکه به

میزان یک صدم رقیق گردید، به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به هر رقت اضافه گردید تا غلظت نهایی باکتریها 5×10^6 cfu/ml شود. دو لوله به‌عنوان شاهد مثبت و منفی و سوش میکروبی استاندارد *E. coli* ATCC 27929 بکار برده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۸-۱۶ ساعت میزان MIC آنتی‌بیوتیک افلوکسازین تعیین گردید. برای تعیین MIC تأثیر نوسکاپین تهیه شده از شرکت تماد مطابق روش فوق ۰/۲ گرم از پودر آن (با استفاده از اسید استیک گلاسیال به‌عنوان حلال) در ۱۵ ml محیط کشت مولر هیتون برات حل نموده تا غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرومول در میلی‌لیتر و صفر به‌عنوان شاهد بدست آید. پس از توزیع در لوله‌های حاوی محیط کشت و افزودن سوسپانسیون میکروبی معادل 10^6 cfu/ml عدد باکتری در میلی‌لیتر به مدت ۱۸-۱۶ ساعت مقدار MIC نسبت به نوسکاپین نیز مشخص گردید. به‌منظور بررسی اثر سینرژیسیم بین نوسکاپین و افلوکسازین، همان غلظتهای آنتی‌بیوتیک افلوکسازین را به‌روش فوق با غلظتهای ۰/۵ و ۰/۲۵ میکرومول در میلی‌لیتر نوسکاپین برای هر رقت بکار برده شد و نتایج بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی هر یک از آزمایشهای انجام شده جهت تعیین میزان MIC ۳-۴ بار تکرار گردید تا میزان واقعی و دقت کار ثابت شود.

جدول ۱- طیف اثر نوسکاپین و افلوکسازین به تنهایی و همراه یکدیگر

MIC افلوکسازین+نوسکاپین ۰/۵ μmol/ml	MIC افلوکسازین+نوسکاپین ۰/۲۵ μmol/ml	MIC نوسکاپین μmol/ml	MIC افلوکسازین Mg/ml	سوش میکروبی
۰/۲۵ - ۰/۵	۱۶-۱۲۸	۱-۴	۳۲-۶۴	تعداد
۲۵	۳	۴	۱۶	۱-۱۶
		۱۸	۵	۲۵
		۲۵	۱۶	اشریشیاکلی

نتایج

۲۵ سوش از جامعه مورد بررسی، اشریشیاکلی مقاوم به افلوکسازین بودند. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۱۰ نمونه از کشت ادرار، ۲ نمونه از کشت خون، ۲ نمونه از بخش قلب، ۴ مورد از اورژانس، ۲ مورد از بخش ICU، ۲ مورد از بخش OP، یک مورد از بخش داخلی و بقیه نمونه‌ها از سایر بخشهای بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) تهیه شده بودند. ویژگی خاص تمام نمونه‌های میکروبی مقاومت آنها به فلوروکینولونهای مانند سپیروفلوکسازین، افلوکسازین و نورفلوکسازین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید بود. MIC در روش رقت‌های سریال افلوکسازین در ۵ نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۱۲۸، در ۸ نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۶۴، در ۸ نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۳۲، در ۲ نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۱۶، در ۲ نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۸ بود که نشان دهنده مقاومت آنها به افلوکسازین می‌باشد (شکل ۲).

در مورد تأثیر MIC نوسکاپین در ۱۷ نمونه از جامعه مورد بررسی حداقل غلظت مهاري نوسکاپین $\mu\text{mol/ml}$ ۱ و در ۸ نمونه $\mu\text{mol/ml}$ ۰/۵ بوده است و هیچ کدام از غلظتهای ۰/۲۵ میکرومول مانع رشد نگردید (شکل ۳).

با استفاده از غلظت نوسکاپین $\mu\text{mol/ml}$ ۰/۲۵ که به رقت‌های مختلف افلوکسازین اضافه گردید. در این حالت MIC سوشها نسبت به افلوکسازین در حضور نوسکاپین به صورت زیر بدست آمد. شانزده نمونه حداقل غلظت مهاري افلوکسازین به کمتر از $\mu\text{g/ml}$ ۰/۲۵، در چهار نمونه $\mu\text{g/ml}$ ۰/۵، در دو نمونه به $\mu\text{g/ml}$ ۱، در دو نمونه به $\mu\text{g/ml}$ ۴ و در یک نمونه به $\mu\text{g/ml}$ ۱۶ کاهش یافت (شکل ۱). نتایج بدست آمده با استفاده از روش آماری تست X^2 انجام گرفت و در دو گروه مورد مطالعه افلوکسازین و افلوکسازین به همراه $\mu\text{mol/ml}$ ۰/۲۵

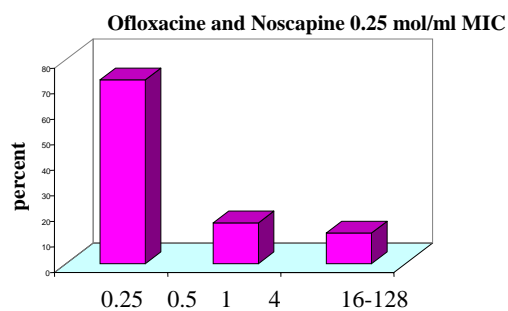
نوسکاپین اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید که خود فرضیه اولیه وجود سینرژیسم را در این مطالعه نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از اثر سینرژیسم نوسکاپین ۰/۵ میکرومول بر میلی‌لیتر همراه با غلظتهای مختلف افلوکسازین نشان دهنده عدم رشد باکتری حتی در غلظتهای ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر افلوکسازین می‌باشد (شکل ۴).

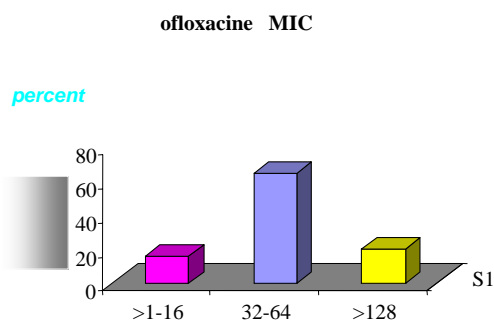
بحث

مسئله حائز اهمیت در این مطالعه، این است که تأثیر ۰/۲۵ میکرومول بر میلی‌لیتر نوسکاپین همراه با افلوکسازین نشان داده شده که تنها یک سوش باکتری تغییراتی در MIC آن نسبت به افلوکسازین دیده نشده است، اما کاهش چشمگیری در میزان MIC در حضور نوسکاپین در بقیه سوشها نسبت به افلوکسازین مشاهده گردید. به عبارتی، در ۲۰ نمونه (۸۰٪) از سوشهای مورد مطالعه، افلوکسازین در حضور نوسکاپین باعث کاهش MIC سوشها نسبت به افلوکسازین از ۴ تا ۶۴ مرتبه می‌گردد.

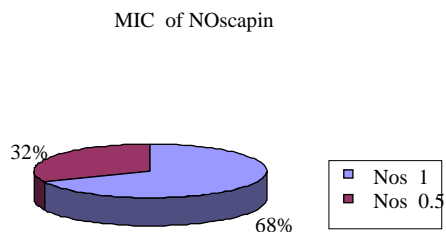
با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، کلیه سوشهای مورد بررسی دارای MIC بالاتر یا مساوی $\mu\text{mol/ml}$ ۰/۲۵ می‌باشند. همچنین تمام سوشها مقاومت به بیش از ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر افلوکسازین را نشان می‌دهند. بر همین اساس، به نظر منطقی می‌رسد که برای تعیین اثر سینرژیسم نوسکاپین و افلوکسازین از غلظتهای کمتر از ۰/۵ میکرومول در این مطالعه، اثر سینرژیکی نوسکاپین همراه با افلوکسازین کاملاً مشهود بوده و نتایج بدست آمده مقدمه‌ای برای مطالعات بعدی است، از جمله بررسی اثر سینرژیسم در محیط *invivo* و همچنین



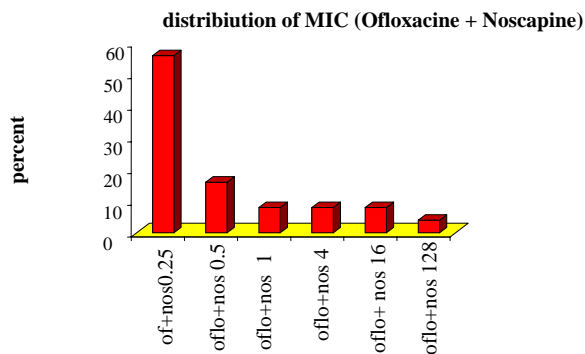
شکل ۱- مقایسه میزان اثر نوسکاپین با افلوکساسین



شکل ۲ - میزان اثر MIC افلوکساسین



شکل ۳- طیف اثر نوسکاپین با غلظت متفاوت



شکل ۴- مقایسه میزان اثر نوسکاپین و افلوکساسین

- Scuvee-Moreau, J., Boland, A., Graulich, A., Van Overmeire, L., D'hoedt, D., Graulich-Lorge, F., Thomas, E., Abras, A., Stocker, M., Liegeois, J.F. and Seutin, V., 2004. Br Electrophysiological characterization of the SK channel blockers methyl-laudanosine and methyl-noscapine in cell lines and rat brain slices. *Journal of Pharmacology*, 143(6): 753-764.
- Verma, A.K., Bansal, S.J., Tiwari, R.K., Kasi, S.V. and Tandon, C.R., 2006. Synthesis and in vitro cytotoxicity of haloderivatives of noscapine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(19): 6733-6736.
- Wayne, P.A., 2000. Methods for antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, National committee for clinical laboratory standards.
- Zhou, J., Gupta, K., Yao, J., Ye, K., panda, D., Giannakakou, P. and Soshi, H.C., 2002. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells undergo c-Jun NH₂-terminal kinase mediated apoptosis in response to Noscapine, *Journal of Biological Chemistry*, 277(42): 39777-39785.

مطالعه همین عصاره با سوشهای دیگر باکتریها و همچنین دیگر عصاره‌های گیاهی که دارای اثر مشابه و یکسانی هستند، می‌تواند مد نظر قرار گیرد (Wayne, 2000).

این مطالعات می‌تواند ما را در استفاده از داروهای گیاهی همراه با آنتی‌بیوتیک در بیماران مبتلا به عفونتهای باکتریایی مقاوم، یاری نماید.

منابع مورد استفاده

- Ahmad, I.Z. and Beg, A., 2002. Antimicrobial and Phytochemical studies on 45 Indian Medicinal Plants against multi-drug resistant human pathogen. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 113-123.
- Jaren, W., Lang L.R., McMahon, S.J., Rusan, N.M., Yvon, A.M., Adams, A.W., Sorcinelli, M.D., Campbell, R., Bonaccorsi, P., Ansel, J.C., Archer, D.R., Cheryl, P.W., Armstrong, A. and Joshi, H.C., 2002. Noscapine alters microtubule dynamics in living cells and inhibits the progression of melanoma. *Cancer Research*, 62: 4109-4114.
- Landen, J.W., Hau, V., Wang, M., Davis, T., Ciliax, B., Wainer, B.H., Van Meir, E.G., Glass, J.D. and Joshi, H.C., 2004. Noscapine crosses the blood-brain barrier and inhibits glioblastoma growth. *Clinical Cancer Research*, 10(15): 5187-5201.
- Schuler, M., Muehlbauer, P., Guzzie, P. and Eastmond D.A., 1999. Noscapine hydrochloride disrupts the mitotic spindle in mammalian cells and induces aneuploidy as well as polyploidy in cultured human lymphocytes *Mutagenesis, Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 14(1): 51-56.

Synergistic effects of noscapin and ofloxacin in fluoroquinolone resistant enterobacteriaceae

A.A. Rastgar Lari¹, H. Mohammadi¹, F. Masjedian¹ and M. Mahmoodian²

1- Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, E-mail: lari@iums.ac.ir

2- Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences

Abstract

Infections diseases afflict millions of people every day inflicting over thousands of death each day. Antibiotic resistance in pathogenic bacteria has been occurring with increasing proportions in all parts of the world. This can complicate therapeutic approaches especially in people with immunodeficiencies, AIDS patients, and in cancer victims. This problem also necessitates introduction of new antimicrobial agent with increased potency or trying to maximize therapeutic potencies of the available drugs in order to counter the problem of antimicrobial resistance. Plant extracts have been used in the last two decades to increase the antimicrobial potencies of various antibiotics. In this survey, the synergistic effect of Noscapin on Ofloxacin has been tested on a range of clinical Enterobacteriaceae isolates which were resisted to fluoroquinolones. Twenty five *Escherichia coli* strains isolated from sick people which were resistant to ofloxacin according to agar diffusion NCCLS advised methods were collected. Subsequently, the minimal inhibitory concentration (MIC) of each of the isolate, performed by serial dilution method, was determined toward Ofloxacin alone or in combination with Noscapin. The results indicated that the MIC of the 25 *E. coli* isolates towards Ofloxacin alone was in the range of 8-128 µg/ml. The MIC values to Noscapin alone were in the ranges of 0/5-1.0 µmol/ml. According to these results, Noscapin was used at the final concentration of 0.25 µmol/ml for all of the synergistic studies. Combination of Noscapin with ofloxacin was able to decrease the MIC values 2-8 fold for the *E. coli* isolates. This clearly points to the additive and synergistic effect of Noscapin on Ofloxacin against drug-resistant bacteria. By performing further studies, the additive effects of other plant extracts on various antibiotics can be studied.

Key words: *Eshersia coli*, noscapin, ofloxacin.