فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲٤، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۰۰-۹٤ (۱۳۸۷)

بررسی اثر سینرژیکی نوسکاپین با افلوکساسین در انتروباکتریاسه‌های مقاوم به فلوروکینولونها

عبدالعزیز رستگار لاری*[۱]، هاجر محمدی[۲]، فرامرز مسجدیان[۳] و مسعود محمودیان[٤]

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
٤- استاد گروه فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
*نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸٦ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸٦

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/. میکرومول در میلی‌لیتربرای تعیین اثر سینرژیسم 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.

www.SID.ir

مقدمه

روند روبه افزایش باکتریهای مقاوم به‌خصوص میکروارگانیسم‌های عامل عفونتهای بیمارستانی یکی از معضلات جامعه پزشکی امروز می‌باشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که این افزایش مقاومت نسبت به فراورده‌های دارویی جدید نیز به آسانی ظاهر می‌گردد (Ahmad & Beg, 2002).

مقاومت چند دارویی (Multi-Drug Resistence) MDR پدیده‌ای است که حضور آن در گزارشهای علمی به دفعات به چشم می‌خورد. باکتریها مکانیسمهای متفاوتی برای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکها از خودشان می دهند. از جمله، می‌توان به غیرفعال‌سازی آنزیمی، تغییر هدف، پدیده افلوکس (efflux) و تغییر در نفوذپذیری اشاره کرد.

سیستم پدیده افلوکس از دسته مقاومتهای ذاتی بوده که در باکتریهایی 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 می‌گردد.

پدیده افلوکس موجب خارج شدن میزان زیادی از آنتی‌بیوتیکهای وارد شده به داخل باکتریها شده و سبب کاهش غلظت داخل سلولی آنها و در نتیجه مقاومت باکتریها به داروی مصرفی می‌گردد. به‌نظر می‌رسد عناصر متفاوتی وجود دارند که می‌توانند از کاهش میزان داخل سلولی داروها جلوگیری بعمل آورند. از جمله می‌توان به اعضای خانوده Berberidacae و ترکیب berberine ($C_{20}H_{19}NO_5.6H_2O$) اشاره نمود که یک آلکالوئید می‌باشد. این ترکیب که مانع پدیده افلوکس در سلولها گردیده است، از متابولیتهای ثانویه‌ای گیاهی می‌باشد که باعث حفاظت گیاهان در برابر پاتوژنهای میکروبی شده و غلظت آن در پاسخ به تهاجم میکروبی افزایش می‌یابد (Jaren *et al.*, 2002). در این پژوهش از نوسکاپین ($C_{22}H_{23}NO_7$) که یک آلکالوئید محلول در آب با خاصیت بسیار کم سمی بوده و از گیاه خشخاش (*Opium*) خانواده Papaveraceae تهیه می‌شود، استفاده شد (Zhou *et al.*, 2002). این ترکیب به توبولین‌ها متصل شده و تجمع آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (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 می‌شود (Zhou *et al.*, 2002). در سلولهای سرطانی تخمدان با القای آپوپتوزیس سبب توقف رشد و تکثیر و بهبودی آن می‌گردد (Zhou *et al.*, 2002؛ Scuvee-moreau *et al.*, 2004). در حال حاضر توانایی این ترکیب به‌عنوان درمان بیماران مبتلا به لنفومای غیر هوچکین و لوسمی مزمن که به شیمیوتراپی پاسخ نمی‌دهند، در حال بررسی است. این ترکیب دارای اثر سیتوتوکسین است (Verma 2006) و به‌دلیل قابلیت عبور از سد خونی– مغزی توانایی مهار رشد گلیوبلاستوما (glioblastoma) را دارا می‌باشد. نوسکاپین همچنین باعث مهار رشد سلولهای توموری در میتوز و القای آپوپتوزیس سلولهای توموری در محیط *invitro* می‌گردد (Landen *et al.*, 2004).

با توجه به مکانیسم مقاومت میکروارگانیسمها که به‌علت وجود پدیده افلوکس بوجود می‌آید، استفاده از نوسکاپین با غلظت زیر مهاری به‌عنوان مکمل، همراه با آنتی‌بیوتیک افلوکساسین منطقی به نظر می‌رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

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 هینتون 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 افلوکساسین تأیید شدند، انتخاب و مورد مطالعه بعدی قرار گرفتند.

با استفاده از محیط مولر هینتون مایع یک سری لوله حاوی 1ml از محلول آنتی‌بیوتیکی افلوکساسین با رقتهای مختلف (با استفاده از بافر فسفات) با غلظتهای ۲۵۶، ۱۲۸، ٦٤، ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید، سپس ۲۵ سوش مقاوم به افلوکساسین را بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۱۸-۲٤ ساعت، از کلنی‌های جوان در محلول نرمال سالین سوسپانسیونی معادل غلظت نیم مک‌فارلند (معادل ۱×۱۰^{۸} 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 ۵×۱۰^{۵} 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 ۱۸-۱٦ ساعت میزان MIC آنتی‌بیوتیک افلوکساسین 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 هینتون براث 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 $۱۰^{٦}$ cfu/ml عدد باکتری در میلی‌لیتر به‌مدت ۱۸-۱٦ ساعت مقدار MIC نسبت به نوسکاپین نیز مشخص گردید. به‌منظور بررسی اثر سینرژیسم بین نوسکاپین و افلوکساسین، همان غلظتهای آنتی‌بیوتیک افلوکساسین 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 ۳-٤ بار تکرار گردید تا میزان واقعی و دقت کار ثابت شود.

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

سوش میکروبی		MIC افلوکساسین Mg/ml			MIC نوسکاپین µmol/ml	MIC افلوکساسین+نوسکاپین ۰/۲۵µmol/ml			MIC افلوکساسین+نوسکاپین ۰/۵ µmol/ml
	تعداد	۱-۱٦	۳۲-٦٤	۱۲۸	۰/۵-۱	۰/۲۵-۰/۵	۱-٤	۱٦-۱۲۸	۰/۲۵ -۰/۵
اشریشیاکلی	۲۵	٤	۱٦	۵	۲۵	۱۸	٤	۳	۲۵

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

۲۵ سوش از جامعه مورد بررسی، اشریشیاکلی مقاوم به افلوکساسین بودند. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۱۰ نمونه از کشت ادرار، ۲ نمونه از کشت خون، ۲ نمونه از بخش قلب، ٤ مورد از اورژانس، ۲ مورد از بخش ICU، ۲ مورد از بخشOP، 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 فلوروکینولونهایی مانند سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نورفلوکساسین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید بود. MIC در روش رقت‌های سریال افلوکساسین در ۵ نمونه µg/ml ۱۲۸، در ۸ نمونه µg/ml ٦٤، در ۸ نمونه µg/ml ۳۲، در ۲ نمونه µg/ml ۱٦، در ۲ نمونه µg/ml ۸ بود که نشان دهنده مقاومت آنها به افلوکساسین می‌باشد (شکل ۲).

در مورد تأثیر MIC نوسکاپین در۱۷ نمونه از جامعه مورد بررسی حداقل غلظت مهاری نوسکاپین µmol/ml ۱ و در ۸ نمونه µmol/ml ۰/۵ بوده است و هیچ کدام از غلظتهای ۰/۲۵ میکرومول مانع رشد نگردید (شکل ۳).

با استفاده از غلظت نوسکاپین µmol/ml ۰/۲۵ که به رقت‌های مختلف افلوکساسین اضافه گردید. در این حالت MIC سوشها نسبت به افلوکساسین در حضور نوسکاپین به‌صورت زیر بدست آمد. شانزده نمونه حداقل غلظت مهاری افلوکساسین به کمتر از µg/ml ۰/۲۵، در چهار نمونه µg/ml ۰/۵، در دو نمونه به µg/ml ۱، در دو نمونه به µg/ml ٤ و در یک نمونه به µg/ml ۱٦ کاهش یافت (شکل ۱). نتایج بدست آمده با استفاده از روش آماری تست X^2 انجام گرفت و در دو گروه مورد مطالعه افلوکساسین و افلوکساسین به همراه µmol/ml ۰/۲۵ نوسکاپین اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید که خود فرضیه اولیه وجود سینرژیسم را در این مطالعه نشان می‌دهد.

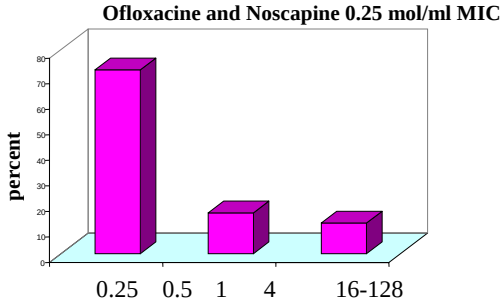
نتایج حاصل از اثر سینرژیسم نوسکاپین ۰/۵ میکرومول بر میلی‌لیتر همراه با غلظتهای مختلف افلوکساسین نشان دهنده عدم رشد باکتری حتی در غلظتهای ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر افلوکساسین می‌باشد (شکل ٤).

بحث

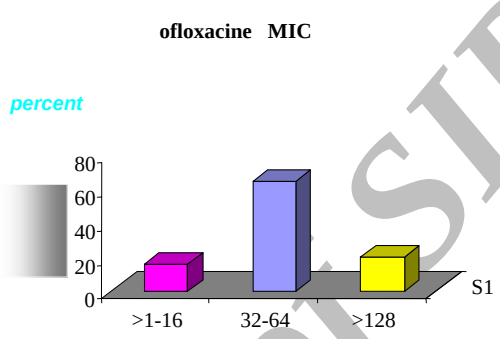
مسئله حائز اهمیت در این مطالعه، این است که تأثیر ۰/۲۵ میکرومول بر میلی‌لیتر نوسکاپین همراه با افلوکساسین نشان داده شده که تنها یک سوش باکتری تغییراتی در MIC آن نسبت به افلوکساسین دیده نشده است، اما کاهش چشمگیری در میزان MIC در حضور نوسکاپین در بقیه سوشها نسبت به افلوکساسین مشاهده گردید. به عبارتی، در ۲۰ نمونه (۸۰٪) از سوشهای مورد مطالعه، افلوکساسین در حضور نوسکاپین باعث کاهش MIC سوشها نسبت به افلوکساسین از ٤ تا ٦٤ مرتبه می‌گردد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، کلیه سوشهای مورد بررسی دارای MIC بالاتر یا مساوی µmol/ml ۰/۲۵ می‌باشند. همچنین تمام سوشها مقاومت به بیش از ٤ میکروگرم در میلی‌لیتر افلوکساسین را نشان می‌دهند. بر همین اساس، به نظر منطقی می‌رسد که برای تعیین اثر سینرژیسم نوسکاپین و افلوکساسین از غلظتهای کمتر از ۰/۵ میکرومول در این مطالعه، اثر سینرژیکی نوسکاپین همراه با افلوکساسین کاملاً مشهود بوده و نتایج بدست آمده مقدمه‌ای برای مطالعات بعدی است، از جمله بررسی اثر سینرژیسم در محیط *invivo* و همچنین

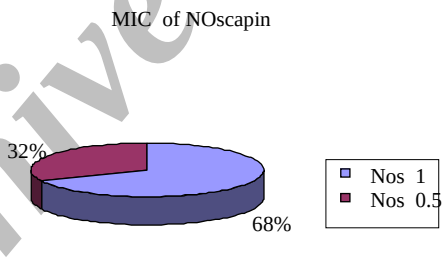
Archive of SID
www.SID.ir



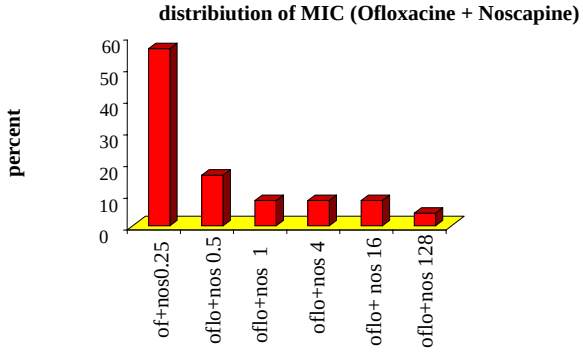
شکل ۱- مقایسه میزان اثر نوسکاپین با افلوکساسین



شکل ۲ - میزان اثر MIC افلوکساسین



شکل ۳- طیف اثر نوسکاپین با غلظت متفاوت



شکل ٤- مقایسه میزان اثر نوسکاپین و افلوکساسین

Archive of SID
www.SID.ir

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.
- 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 Electrotrophysiological 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 ovarion cancer cells undergo c-Jun NH_2-terminal kinase medicted apoptosis in response to Noscapine, Journal of Biological Chemistry, 277(42): 39777-39785.

Archive of SID

www.SID.ir

Synergistic effects of noscapin and ofloxacin in fluoroquinolone resistant enterobacteriaceae

A.A. Rastgar Lari[1], H. Mohammadi[1], F. Masjedian[1] and M. Mahmoodian[2]

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 synergestic 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.

Archive of SID

www.SID.ir