مقاله پژوهشی

مجله دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ،جلددوم ،شماره(۱) زمستان ۱۳۶۹

کلماستین به عنوان ماده ضد میکرب : میزان وسعت اثر و مکانیسم عمل

دکتر صدیقه فضلی بزاز* و دکتر سعید واحدی

دانشکدهٔ داروسازی،دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

آزمایشاتی که در مورد بررسی خواص ضد میکربی کلماستین انجام گرفت نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) برای استافیلوکوکوس اورئوس ،پسودومونا آئروژینوزا واشریشیاکلی‌به‌ترتیب ۶۲/۵ ، ۶۲/۵و ۳۱/۲۵ میکروگرم درمیلی لیتر بوده ولی حتی در غلظت های بالا اثری روی کاندیدا آلبیکانز ندارد .

برای پی بردن به اثرات باکتریسیدی‌این دارو آزمایش شمارش میکربهای زنده پس از تماس با دارو صورت گرفت و میزان MBC_{50} برای استافیلوکوکوس اورئوس، پسودومونا آئروژینوزا و اشریشیا کلی بترتیب ۱/۹ ، ۲/۱ ، ۱/۱ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد . آزمایش اثر محافظتی کلماستین در فرآورده های مایی بیانگر این مطلب است که این ماده آنتی هیستامینی دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی بوده ولی بر روی قارچها بی اثر می‌باشد ، بنابراین اضافه کردن ماده محافظ با اثرات ضد قارچی در فرآورده های استریل آن ضروری می‌باشد . در آزمایش بررسی مکانیسم اثر ضد میکربی مشخص شد که کلماستین با تاثیر بر روی نفوذ پذیری غشاء سیتوپلاسمی ، موجب نشت K^+ به خارج سلول شده و احتمالا" از این طریق اثر ضد میکربی خود را اعمال می‌کند .

مقدمه

اولین بار در سال ۱۹۸۲ گزارشی از اثر ضد میکربی کلماستین توسط Delitheos و همکاران به چاپ رسید (۱) .آنها تحقیقی درمورد خواص ضد میکربی موادغیر آنتی بیوتیکی‌از جمله کلماستین انجام دادند . نتایج آنها حاکی‌ازآن‌است‌که این ماده دربرابر میکربهای‌استافیلوکوکوس اورئوس، پسودومونا آئروژینوزا و اشریشیاکلی موثر می‌باشد . آزمایشات آنها براساس تعیین حداقل غلظتهای مهاری رشد بود (۱) .

در این تحقیق لزوم بررسی بیشتر در خواص ضد میکربی کلماستین مورد توجه قرار گرفت . چه در صورتی که این خواص در کلماستین قابل توجه باشد می‌تواند علاوه بر اثر آنتی هیستامینی به عنوان ماده ضد میکرب غیرآنتی ـ بیوتیکی مصرف گردد و در صورتی که در حد مناسبی باشد ممکن‌است‌که فرآورده داروئی‌آن نیاز به ماده محافظ نداشته و به اصطلاح Self-Strilizing باشد .

بخش تجربی

مواد

از میکرواورگانیسمها با شماره AT CC (American Type Culture Collection) ذکر شده در پرانتز مقابل هر میکرب استفاده گردید . استافیلوکوس اورئوس (P ۶۵۳۸) ، پسودومونا آئروژینوزا (۹۰۲۷) ، اشریشیا کلی (۱۰۵۳۶) ، کاندیدا آلبیکانز (۱۰۲۳۱) و آسپرژیلوس نیجر (۱۶۴۰۴) .از محیطهای کشت آگار مغذی (Nutrient Agar-NA) ، آبگوشت مغذی (Nutrient Broth-NB) و سابوراددکستروز

آگار (Sabouraud Dextrose Agar-SDA) ساخت کارخانه دیفکو استفاده شد. پودر کلماستین‌فومارات از شرکت داروسازی ساندوز- بال سوئیس تهیه شد. سایر مواد مورد استفاده با درجه خلوص بالا بودند.

دستگاهها

اسپکتروفتومتر SpG200-Pye unicam، اوون Memert 854 Schabach، اتوکلاو V/o Medexport Type AOB-59، گرمخانه Edelesiahl Rost Feri، ترازوی Metler و آنالینکال H31 AR، سانتریفوژ Hettich Universal ودستگاه‌فتومترشعله Corning 866150 استفاده شد.

کشت میکربها و تهیه سوسپانسیون میکربی

آمپول لیوفیلیزه حاوی هر میکرب را شکسته و با افزایش چند قطره محیط NB به آن سوسپانسیون میکربی تهیه شد. از این سوسپانسیون در پلیت حاوی محیط کشت جامد (N A جهت باکتری و SDA جهت قارچ) کشت داده شد. این کشت مادر جهت تهیه کشت های‌مجددمیکرب استفاده می‌گردد (که البته مرتبا" کشت مادر تجدید کشت می‌شود). جهت تهیه سوسپانسیون میکربی برای آزمایشات، به کشت تازه باکتری و قارچ در پلیت مقداری نرمال سالین (جهت قارچ نرمال سالین حاوی ۱% توئین ۸۰) افزوده و سپس سوسپانسیون را جمع می‌نمائیم. به کمک اسپکتروفتومتر سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^8 میکرب در میلی لیتر تهیه شد (معمولا" جذب در ۶۵۰ nm و قطر سل 1cm برای باکتری ۰/۲، برای کاندیدا ۰/۸ و برای آسپرژیلوس نیجر حدود ۵* است).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC)

از میکرب ها رقت حدود 10^5 میکرب در میلی لیتر با استفاده از نرمال سالین تهیه شد. از کلماستین محلول آزمایش ۵۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر در NB آماده‌گردید. برای هر میکرب چند لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر NB فراهم نموده و به لوله اول ۱۰ میلی لیتر از محلول کلماستین اضافه شد (لوله حاوی $250\ ug.ml^{-1}$ خواهد بود). ده میلی لیتراز لوله اول به لوله دوم و از لوله دوم به‌لوله سوم و . . . اضافه نموده و سری رقتهای نصف تهیه گردید. از لوله آخر ۱۰ میلی لیتر دور ریخته شد. به هر لوله ۰/۱ ml از سوسپانسیون 10^5 اضافه گردید: البته لوله شاهد منفی (تنها محیط کشت) و شاهد مثبت (محیط کشت تنها + میکرب) نیز منظور شد (۲و۳).

شمارش میکربهای زنده بعد از تماس با غلظتهای مختلف کلماستین

طی آزمایشات مقدماتی زمان تماس‌دارو و میکرب ۳۰ دقیقه، و ماده غیر فعال کننده مناسب توئین ۸۰ در نظر گرفته شد.

محلول ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر کلماستین باآب مقطر استریل تهیه نموده و سپس غلظتهای هندسی نصف تهیه شد (از هر کدام ۱۰ میلی لیتر). به هر لوله ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون 10^8 میکرب اضافه شد، لذا در زمان صفرهر لوله حاوی 10^6 میکرب در میلی لیتر می‌باشد. پس از زمان تماس ۳۰ دقیقه لوله ها را رقیق نموده (توسط نرمال سالین توئین دار) و رقتهای کمتر (10^2و10^3)جهت شمارش در پلیت کشت گردید (۳و۴).

اثر محافظتی کلماستین در فرآورده تزریقی

غلظتی معادل‌تزریقی کلماستین در آب مقطر تهیه و مقادیر ۲۰ ml در ۵ لوله در دار استریل ریخته شد. به هر لوله ۰/۱ ml از سوسپانسیون 10^8 میکرب در میلی لیتر از میکربهای اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، پسودومونا آئروژینوزا، کاندیدا آلبیکانز و آسپرژیلوس نیجر اضافه گردید. تعداد میکربها در زمان صفر، و بعد از ۷، ۱۴، ۲۱و ۲۸ روز با روش رقیق کردن و شمارش کلنی ها در پلیت با استفاده از محیط کشت NA و SDAبترتیب برای باکتریها و قارچها انجام شد. نتایج براساس USP

* - جذب سوسپانسیون ۱۰ مرتبه رقیق شده که با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد ۰/۵ است که از سوسپانسیون اولیه آن جهت تلقیح استفاده گردید.

بررسی گردید (۵) .

بررسی مکانیسم عمل‌ضد باکتریایی: نشت مواد داخل سلولی

سوسپانسیون میکربی با افزایش بافر سدیم فسفات (۰/۲ مولار، pH = ۶/۸) به سطح پلیت محیط‌کشت میکرب و جمع‌آوری آن تهیه شد (غلظت سوسپانسیون میکرب 10^{10} میکرب برمیلی لیتر) ،حجم‌های مساوی‌ازسوسپانسیون‌میکربی و غلظتهای مختلف کلماستین رابه مدت یک ساعت در تماس قرار داده و سپس سانتریفوژ گردید. محلول بالائی برای اندازه گیری K^+ به کمک فتومتر شعله استفاده گردید (۴) . البته ابتدا دستگاه توسط محلول KCl با غلظتهای مختلف استاندارد شده و منحنی مربوطه رسم گردید . با استفاده از منحنی غلظت نشر، میزان K^+محلولهای مورد آزمایش اندازه گیری شد .

نتیجه و بحث

نتایج MIC (جدول ۱) حاکی از این نکته است که حداقل غلظت های مهار رشد میکربهای استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناآئروژینوزا و اشریشیا کلی به ترتیب عبارتنداز: ۶۲/۵، ۶۲/۵و ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر در مورد کاندیدا آلبیکانز مشخص شد که غلظتهای خیلی بالا (حدود ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) هم بر روی میکرب یاد شده بی اثر است که MIC بیش از ۱۰ برای آن گزارش می‌شود .

نتایج اثر کشندگی کلماستین بر روی میکربهای زنده (اشکال ۱ـ۳) نیز گویای این مطلب است که کمترین غلظتی از دارو که درصد میکربهای زنده را به صفر می رساند (Minimum Cidal Concentration, MCC) در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناآئروژینوزا و اشریشیا کلی بترتیب ۵، ۵و۲/۵ میلی‌گرم‌در میلی لیتر می‌باشد .در مورد قارچها اثر کشندگی دارو بررسی نشد ، چه آزمایشات MIC نشان داده بود که کلماستین در غلظتهای مصرفی بر روی قارچها بی اثر می‌باشد . جدول ۲ نشانگر مقادیری از کلماستین است‌که درصد باکتریهای‌زنده مزبوررا به ۵۰ درصد می‌رساند که آنهم مطابقت با اشکال ۱ـ۳ دارد .

با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که اثر کلماستین بر روی اشریشیاکلی (گرم منفی) بیشتراز اثر برروی باکتری دیگر ، استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) می‌باشد که شاید به علت نفوذ پذیری زیاد غشاء میکرب اول باشد . البته این نکته لازم به ذکر است که پسودوموناآئروژینوزا (گرم منفی) به علت ساختمان خاص خود مقاوم تر از اشریشیا کلی در برابر این ماده بود . عدم تاثیر این دارو بر روی قارچ‌کاندیدا آلبیکانز راشاید بتوان به استحکام‌بیش از حد دیواره سلولی قارچها که شبیه به ساختمان دیواره سلولی گیاهان آلی است نسبت داد .

در موردآزمایش اثرمحافظتی کلماستین درفرآورده تزریقی ، با توجه به این که تعداد کلنی باکتریها در روز چهاردهم به ۰/۱% تعداد روز اول رسید و تا روز ۲۸ به تدریج از تعداد آن کم شد (جدول ۳) ، می‌توان نتیجه گرفت که به عنوان یک ماده محافظ ضد باکتریایی بخوبی عمل می‌نماید (۵) و لذا در ساخت فرآورده تزریقی آن با توجه به اثر مهار رشد باکتریایی که دارد نیاز به افزایش ماده محافظ از نوع ضد باکتریایی نمی‌باشد . اما در مورد قارچها وضع به این صورت نبوده و تعداد آن بعد از ۱۴ و ۲۸ روز افزایش‌داشت (جدول ۳) ولذا لزوم افزایش ماده محافظ ضد قارچ به فرآورده تزریقی آن تاکید می‌گردد .

نتایج فوق موید اثر ضد باکتریایی (مهار رشد و کشندگی) کلماستین می‌باشد . اما چگونه این اثر را بروز می‌دهد ؟

مواد ضد باکتریایی با مکانیسمهای متفاوتی سبب نابودی میکربها می‌شوند . یکی از راهها اثر بر نفوذ پذیری غشاء ستیوپلاسمی می‌باشد که با تغییر نفوذ پذیری غشاء مواد حیاتی و مورد نیاز سلول به خارج نشت کرده (leakage) و موجب مرگ باکتری می‌شود . یکی از اولین موادی که به خارج نشت می‌نماید یونهای غیرآلی از جمله K^+ است (۲و۶) . لذا با اندازه گیری مقدار K^+ خارج شده ازسلول می‌توان به بروزاین اثر پی برد . آزمایش اثر کلماستین بر روی‌نشت K^+ از میکرب استافیلوکوکوس اورئوس (شکل ۵) نشان دادکه با افزایش غلظت دارو ، همچنانکه درصد میکربهای زنده کاهش می‌یابد ، میزان K^+ خارج سلولی نیزافزایش یافته وتا غلظت‌حدود ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر افزایش می‌یابد . شروع نشت تقریبا " غلظتی از دارو است که درصد میکربهای زنده به‌حدقابل توجهی کاهش یافته است و سپس با افزایش درصد میکربهای مرده ، میزان نشت داخل سلولی نیز افزایش می‌یابد . در هر حال افزایش نشت داخل سلولی پس از مرگ کلیه سلولهاهمچنان

نیز ادامه داشت .

درخاتمه یادآور، می‌شودکه‌اثرضد باکتریایی این‌دارو آن را به عنوان ماده محافظ ایده‌آل برای ساخت سایر فرآورده های دارویی معرفی نمی‌نماید ، چه خصوصیات دیگر آن نیز جهت این منظور مورد توجه قرار می‌گیرد . در هر حال‌خصوصیت ضدباکتریایی‌آن می‌تواند درساخت‌فرآورده‌های دارویی کلماستین مد نظر باشد .

جدول ۱ ــ مقادیر MIC کلماستین برای میکروارگانیسم های مختلف

نام میکرو ارگانیسم	MIC مشاهده شده ،(میکروگرم بر میلی لیتر)
استافیلوکوک اورئوس	۶۲/۵
پسودوموناآئروژینوزا	۶۲/۵
اشریشیاکلی	۳۱/۲۵
کاندیدا آلبیکانس	بیشتر از ۱۰۰۰۰

جدول ۲ــ مقادیر MBC_{50} کلماستین برای هر میکروارگانیسم (حاصله از اشکال ۱ــ۳)

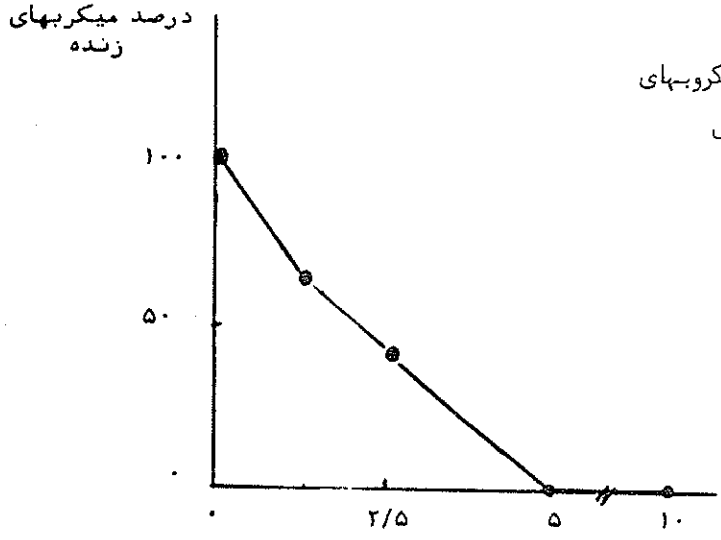
	نام میکروب	(میلی گرم بر میلی لیتر)
روز صفر	استافیلوکوک اورئوس	۱/۹
	پسودوموناآئروژینوزا	۲/۱
	اشریشیاکلی	۱/۱

جدول ۳ــ نتایج آزمایش مواد محافظ ــ تعداد میکروارگانیسم ها در زمانهای مختلف مشخص شده است ،

	نام میکروارگانیسم	تعداد میکروارگانیسم
روز صفر	استافیلوکوک اورئوس	۳×۱۰^{۶}
	پسودوموناآئروژینوزا	۷×۱۰^{۵}
	اشریشیاکلی	$۳/۵\times۱۰^{۴}$
	کاندیدا آلبیکانس	۳×۱۰^{۴}
	آسپرژیلوس نیجر	۴×۱۰^{۴}

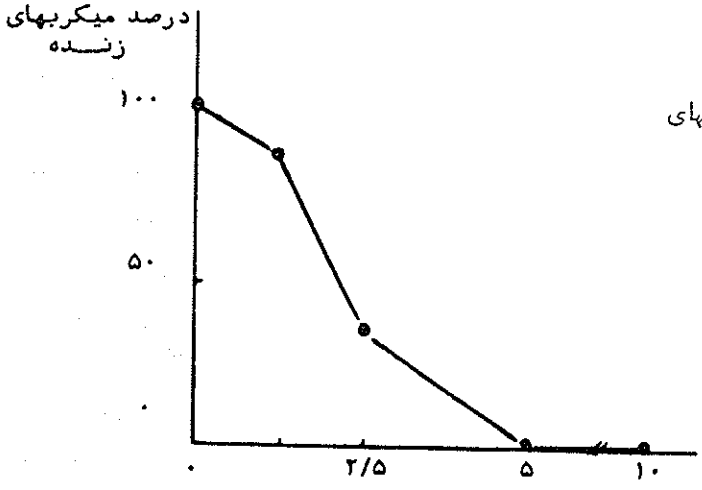
روز ۱۴ نام میکروب	تعداد میکروب ها	درصد نسبی میکروب نسبت به روز اول	تغییرات نسبت به روز اول
استافیلوکوک اورئوس	۲×۱۰^{۳}	۰/۰۶۶	کاهش
پسودوموناآئروژینوز	۵×۱۰^{۲}	۰/۰۷۱	کاهش
اشریشیاکلی	۰	۰	کاهش
کاندیدا آلبیکانس	۶×۱۰^{۴}	۲۰۰	افزایش
آسپرژیلوس نیجر	۸×۱۰^{۴}	۲۰۰	افزایش

روز ۲۸ نام میکروب	تعداد میکروب ها	درصد نسبی میکروب نسبت به روز اول	تغییرات نسبت به روز ۱۴
استافیلوکوک اورئوس	$۱/۷\times۱۰^{۳}$	۰/۰۵۶	کاهش
پسودوموناآئروژینوزا	$۴/۳\times۱۰^{۲}$	۰/۰۶۱	کاهش
اشریشیاکلی	۰	۰	ثابت
کاندیدا آلبیکانس	۵×۱۰^{۴}	۱۶۶	کاهش
آسپرژیلوس نیجر	$۹/۷\times۱۰^{۴}$	۲۴۵	افزایش

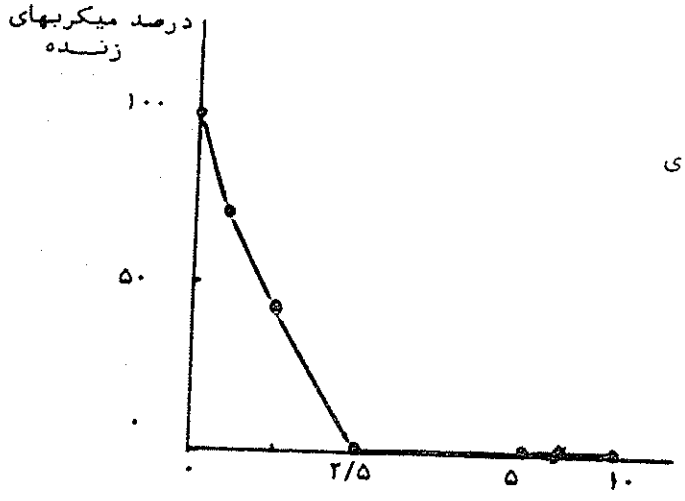


شکل ۱ــ اثر محلول کلماستین بردرصد میکروبهای زنده استافیلوکوکوس اورئـــوس

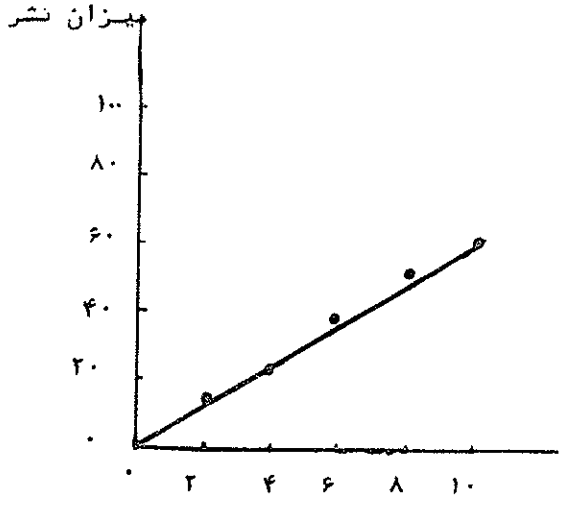
غلظت کلماستین (میلی گرم بر میلی لیتر) .



شکل ۲ـ اثر محلول کلماستین بر درصد میکربهای زنده پسودوموناغروژنیوزا

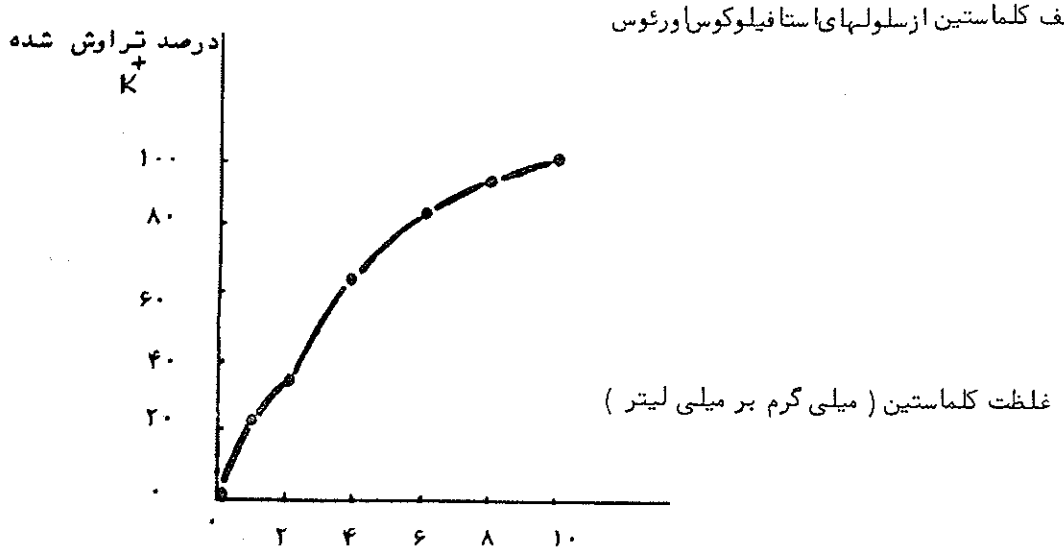


شکل ۳ـ اثر محلول کلماستین بردرصد میکربهای زنده اشریشیاکلی



شکل ۴ـ منحنی استاندارد نشر ـ غلظت

شکل ۵ــ درصد K^+ تراوش شده در مقابل غلظت های مختلف کلماستین ازسلولهای استافیلوکوس اورئوس



منابع

1. Delitheos,A.; Kefalas,S. *Experimenta 1982;* 38,1346-1348.
2. Hugo, W.B.; Russell,A.D. *Pharmaceutical Microbiology;* 4th edition; Blackwell Scientific Publication: Oxford,*1987;* PP 253-280 & 281-287.
3. Collee,J.G.; Duguid,J.P. *Mackie & McCartnay Practical Medical Microbiology;* Churchill Livingston : London, *1989;* Volume 2; PP 161-181 & 240-247.
4. Fazly Bazaz,S. *Local Anaesthetics As Antibacterial Agents* (Ph.D. Thesis) , *1981;* PP 51-69.
5. *United State Pharmacopeia, The National Formulary;* 21st edition; Mack Publishing Co.: Easton, *1985;* PP 1151.
6. Volk,W.A. *Essentials of Medical Microbiology;* 2nd edition; Lipincott Company: New York, *1982;* PP 123-133.

Title : **Clemastine as Antimicrobial Agent: Effectiveness and Mechanism of Action**

Authors : **S.Fazli Bazaz and P. Vahedi**

Address : *School of Pharmacy, Medical Sciences University of Mashhad, Mashhad, Iran*

Abstract

In this investigation, the antimicrobial activity of Clemastine was studied.The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of this drug against some bacteria were determined using tube dilution method.To find out the bactericidal activity of Clemastine, the number of living bacteria in the presence of drug was counted by a culture method (pour plate method). Thereafter, the preservative effectiveness of Clemastine was studied in detail using standard method (USP 1985).The results show a good antibacterial but not antifungal activity.

In considering the mechanism of action of Clemastine, it can be seen that the drug has some effect on cell membrane permeability and causes leakage of intracellular material including the K^+ .Comparing the bactericidal results with the leakage of K^+, shows that the leakage may be due to the bactericidal activity of the drug.