CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Sabzevar University of Medical Sciences Electronic Publications

بررسی اثرات ضدّ باکتریایی کلماستین

دکتر سعید واحدی

آزمایشاتی که در مورد بررسی خواصّ ضدّ باکتریایی کلماستین انجام گرفت، نشان داد که حدّاقل غلظت مهارکنندهٔ رشد (MIC) کلماستین برای استافیلوکوک اورئوس، پسودومونا آئروژینوزا و اشرشیاکلی به ترتیب 62/5، 62/5 و 31/25 میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. برای پی‌بردن به اثرات باکتریسیدی این دارو، آزمایش تعیین MBC صورت گرفت و میزان 50 MBC برای استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناآئروژینوزا و اشرشیاکلی، به ترتیب 1/9، 2/1 و 1/1 بدست آمد. بنابراین، بدلیل فعّالیّت ضدّباکتریایی کلماستین، می‌بایست تعدیلی در رابطه با افزودن مادّهٔ محافظ در فراورده‌های حاوی این دارو، بعمل آید.

واژه‌های کلیدی : ***اثرات ضدّباکتریایی ، کلماستین ، استافیلوکوک ، پسودومونا، اشرشیاکلی، حدّاقل غلظت مهارکنندگی ، حدّاقل غلظت کشندگی .***

مقدمه

با پیشرفت روزافزون علم در صنعت داروسازی و فرمولاسیون داروهای جدید، اهمّیّت نیاز به موادّی که فراورده‌های دارویی را از حملهٔ میکرواورگانیسم‌ها حفظ کند؛ به خوبی روشن می‌باشد. موادّ محافظی که به فرآورده‌های دارویی اضافه می‌شود، گاه دارای اثرات ضدّباکتریایی یا ضدّقارچی و در پاره‌ای از موارد، هر دو اثر را نشان می‌دهند. میکروارگانیسم‌هایی که باعث فساد موادّ دارویی می‌شوند در غالب موارد عبارتند از؛ اشرشیا، استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناآئروژینوزا، کاندیدا آلبیکانس و آسپرژیلوس نیجر.

در هرحال، در میان فراورده‌های دارویی به مواردی برمی‌خوریم که به آنها مادّهٔ محافظ افزوده نمی‌شود. به این دسته از داروها "داروی خود استریل شونده" می‌گویند. آنتی‌بیوتیکها از این دسته داروها می‌باشند. در این بررسی، اثرات دارویی یک مادّهٔ غیرآنتی‌بیوتیکی یعنی کلماستین مورد پژوهش قرار گرفته است. در صورت داشتن فعّالیّت ضدّباکتریایی، بدیهی است که در مورد افزودن مادّهٔ محافظ در فراورده‌های حاوی این دارو، باید تعدیلی به عمل آید.

روش پژوهش

این پژوهش از نوع پژوهشهای تجربی است. باکتریهای مورد استفاده در این پژوهش، شامل استافیلوکوک اورئوس (PTcc=1112)، پسودوموناآئروژینوزا و اشرشیاکلی (PTcc=1024) که از مؤسّسهٔ PTcc (Persian type culture collection) خریداری گردید.

از پودر کلماستین فومارات، ساخت شرکت داروسازی ساندوز – بال سوئیس، استفاده شد.

در صورتی که فعالیت ضد باکتریایی‌کلماستین مشخص شوند بایستی در رابطه با افزودن مادّهٔ محافظ در فراورده‌های حاوی این دارو تعدیل بعمل آید.

الف ـ تعیین حدّاقل غلظت مهارکنندگی:

1 – تهیّهٔ تلقیح : سطح محیط کشت تازه و جوان (24 ساعته) با سالین استریل شستشو و به کمک اسپکتروفتومتر، یک سوسپانسیون با غلظت 8 10 میکروب در هر میلی‌لیتر تهیّه شد. از این سوسپانسیون بوسیلهٔ نرمال سالین، رقّت‌های 5 10، 6 10 و 7 10، تهیّه و از رقّت 5 10 جهت تلقیح استفاده گردید.

2 – تهیّهٔ رقّتهای هندسی : محلول ذخیرهٔ کلماستین با غلظت 500 میکروگرم در میلی‌لیتر ساخته شد. برای هر میکروارگانیسم چند لوله که هر کدام حاوی 10 میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشتی نیز در نظر گرفته شد.

10 میلی‌لیتر از محلول ذخیره، به لولهٔ اوّل اضافه و پس از مخلوط کردن، 10 میلی‌لیتر از این لوله به لولهٔ دوّم اضافه و از لولهٔ آخر بعد از مخلوط کردن نیز 10 میلی‌لیتر برداشته و دور ریخته شد. بدین ترتیب، رقّت‌های بدست آمده بطور هندسی نصف شدند.

3 – تلقیح میکروبی محلولهای نمونه : از سوسپانسیون میکروبی 5 10 ، 0/1 میلی‌لیتر به هریک از رقّت‌های تولیدی مرحلهٔ قبل اضافه شد. سپس، لوله‌ها در شرایط متعادل خود در گرمخانه گذاشته شدند. جهت کنترل کار، از یک لولهٔ شاهد و یک لولهٔ بلانک استفاده گردید. لولهٔ شاهد حاوی محیط کشت آبگوشتی و میکروب (بدون کلماستین) و لولهٔ بلانک فقط محتوی 10 میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشتی بود.

ب ـ تعیین حدّاقل غلظت کشندگی 2:

با انجام آزمایشات مقدّماتی، مشخّص شد که مادّهٔ غیرفعّال کنندهٔ دارویی مناسب توئین 80 و مدّت زمان کافی برای تماس دارو و میکروب 30 دقیقه است.

یک محلول ذخیره با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کلماستین تهیّه شد. از این غلظت در سه سری جداگانه (برای 3 نوع میکروب) غلظت‌های هندسی 10، 5، 2/5، و 1/25 (برای اشرشیاکلی غلظت 0/625 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز ساخته شد) تهیّه گردید. به هر سری از لوله‌ها 0/1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت 8 10 میکروب در هر میلی‌لیتر (برای هر سری از غلظتها از یک نوع باکتری) اضافه شد.

پس از این عمل، در هر سری از غلظتهای هندسی، تعداد میکروب به 6 10 میکروب در میلی‌لیتر رسید بعد از 30 دقیقه تماس از این رقّت، یک کمک نرمال سالین توئین در استریل، رقّت‌های 5 10، 4 10، 3 10 و 2 10 میکروب در میلی لیتر تهیّه شد. از رقّتهای 2 10 و 3 10 یک میلی‌لیتر و مقدار کافی محیط کشت آبگوشتی مذاب با درجه حرارت 45 درجهٔ سانتی‌گراد به داخل پلیت استریل اضافه گردید. سپس به مدّت 24 ساعت در گرمخانه قرار داده شد، بعد از این مدّت تعداد کلنی‌ها شمارش شدند.

ج – آزمایش اثر محافظتی کلماستین در فراورده‌های تزریقی آن:

در این آزمایش، ابتدا یک غلظت معادل غلظت محلول تزریقی کلماستین (1 میلی گرم در لیتر) تهیّه و تعداد معیّنی باکتری در شرایط استریل به آن اضافه شد. بعد از مدّت 7، 14، 21 و 28 روز اثر محافظتی مادّهٔ مورد نظر روی باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

از باکتری‌های مذکور، سوسپانسیون‌هایی با غلظت 8 10 میکروب در هر میلی‌متر تهیّه شد. قبل از تلقیح این سوسپانسیون به فراوردهٔ مورد نظر، تعداد میکروارگانیسم‌ها در آن مشخّص شد. بدین منظور، از غلظت میکروبی فوِ، غلظت‌های بعدی را ساخته و از غلظت 2 10 و 3 10 هر کدام یک میلی‌لیتر به داخل پلیت استریل ریخته و به آنها محیط کشت آبگوشتی مذاب با درجه حرارت 45 درجهٔ سانتی‌گراد اضافه و پلیت 5 به مدّت 24 ساعت در درجه حرارت 37 درجهٔ سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده و سپس تعداد کلنی‌ها در پلیت‌ها شمارش شد.

در مرحلهٔ بعد، به هر کدام از 3 لولهٔ تهیّه شدهٔ دارو (با غلظت مشابهی مشابه فرم تزریقی)، 0/1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی 8 10 اضافه و در 25 درجهٔ سانتی‌گراد پس از مدّت 7، 14، 21 و 28 روز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

نتایج MIC حاکّی ازاین نکته است که حدّاقل غلظت مهاری برای رشد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناآئوروژینوزا و اشرشیاکلی به ترتیب عبارتند از: 62/5، 62/5 و 31/25 میکروگرم در میلی‌لیتر.

نتایج MBC در مورد استافیلوکوک، حاکّی از این است که بتدریج با افزودن غلظت دارو، از درصد میکروبهای زنده کاسته و در غلظت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر این مقدار به صفر میرسد (جدول 1).

نتایج MBC در مورد پسودوموناآئوروژینوزا بیانگر این مطلب است که تعداد باکتری‌های زنده در غلظت 1/25 و2/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از دارو به ترتیب به 83 درصد 33 درصد از کلّ مقدار اوّلیّه؛ و در غلظت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر درصد میکروبهای زنده به صفر می‌رسد.

جدول 1 : مقادیر MBC کلماستین برای میکروبهای مختلف

جدول 2 : تعداد باکتریهای به کار رفته در آزمایش موادا محافظ در روز تلقیح

نتایج MBC در مورد اشرشیاکلّی بدین ترتیب است که در غلظت 0/625 میلی‌گرم در میلی‌لیتر درصد میکروبهای زنده به 70 درصد مقدار اوّلیّه در غلظت 1/25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به 44 درصد کاهش و در غلظت 2/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر این مقدار به صفر می‌رسد.

در مورد آزمایش اثر محافظتی کلماستین در فراوردهٔ تزریقی، تعداد کلنی‌ها در روز چهاردهم به 0/1 درصد مقدار روز اوّل رسید و بعد از این مدّت هم، به تدریج از این تعداد کم شده است. به عبارت دیگر، این دارو به عنوان یک مادّهٔ محافظ ضدباکتریایی بخوبی و طبق استانداردهای فارماکوپهٔ امریکا عمل می‌کند (جداول 2 الی 5).

بحث

کلماستین یک آنتی‌هیستامین از گروه بنزهیدریل‌اتر(مشتقّات اتانول آمین) می‌باشد. از لحاظ فیزیکی، پودری سفید، کریستالی، تقریباً بی‌بو که در حدّ فاصل 181-176درجهٔ سانتی‌گراد ذوب می‌شود. حلاّلیّت آن در آب، اتر و کلروفرم خیلی کم است ولی در اتیل الکل کمی محلول است(1). کلماستین یک H 1 آنتاگونیست با اثرات جانبی آنتی‌کولینرژیک و سداتیو (آرامش بخش) می‌باشد. این مادّه با هیستامین برای تداخل با گیرندهٔ سلولهای عمل کننده(H 1) رقابت می‌کند.

کلماستین جزء آنتی‌هیستامین‌های طویل الاثر می‌باشد (طول مدّت اثر 12 ساعت). در داوطلبان سالم بعد از تجویز کلماستین در عرض 5 تا 7 ساعت غلظت خونی دارو به حدّاکثر رسید و بین 12-10 ساعت در همان حال باقی و حدود 24 ساعت در خون باقی می‌ماند(6).

درصد میکروبهای زنده (استافیلوکوک، پسودوموناء اشرشیاکلی) به ترتیب در غلظت های 2/5 ، 2/5 و 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کلماستین، به صفر میرسد.

کلماستین در برطرف کردن آثار موسمی تب یونجه استفاده می‌شود و اکثر افراد مبتلا، به این دارو جواب می‌دهند. هیستامین، یکی از مشهورترین میانجی‌ها برای پاسخ به دستگاه تنفّس به تحریکات می‌باشد و باعث انبساط عروِ و التهاب می‌گردد که این عمل به نوبهٔ خود، باعث تحریک رفلکس عطسه، انسداد بینی و آبریزش از بینی می‌شود که کماستین بخوبی می‌تواند این عوارض را تا حدّ زیادی تخفیف بخشد.

از کلماستین، در حملات حادّ آسم آلرژیک، ادمهای عصبی‌ـ عروقی، واکنشهای حسّاسیّتی، کهیر، خارش، عطسه زدن، رینوره و اشک ریزش استفاده می‌گردد(5).

مقدار یک میلی‌گرم کلماستین نسبت به 4 میلی‌گرم کلرفنیرامین مالئات در روز در پیشگیری از ایجاد کهیر پس از تزریق داخل جلدی (I.D) هیستامین در 6 نفر داوطلب مؤثّر بوده است(4).

آزمایشی بر روی 25 داوطلب سالم جهت اندازه‌گیری اثر کلماستین در جلوگیری از بوجود آمدن کهیر انجام گرفت؛ ابتدا در این افراد هیستامین اسید فسفات با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر داخل جلد تزریق گردید. در این حالت، کهیری به قطر 19/92 میلی‌متر ایجاد شد ولی در افرادی که قبل از تزریق هیستامین، کلماستین با غلظت 7- 10 تا 5- 10 دریافت داشته بودند؛ از ایجاد کهیر جلوگیری به عمل آمد(3).

کلماستین یک داروی آنتی‌هیستامین از گروه بنزهیدریل‌اتر می‌باشد که فرمهای خوراکی و تزریقی آن در طرح ژنریک وجود دارد. موضوع این پژوهش بررسی اثرات ضدّ باکتریایی کلماستین است که در صورت داشتن این اثرات، می‌تواند بعد از مصرف بر فلور طبیعی مناطق مصرفی تأثیر داشته باشد. از این مهمتر، با توجّه به لزوم افزودن مادّهٔ محافظ به فراورده‌های دارویی، چنانچه این دارو دارای اثر ضدّ میکروبی باشد؛ افزودن مادّهٔ محافظ ضدّ میکروب به فراورده‌های حاوی این دارو لزومی ندارد و با توجّه به اینکه در یک فرمولاسیون دارویی می‌بایستی حدّاقل مواد افزودنی اضافه گردد، این نکته از لحاظ کم کردن تداخلات دارویی بین اجزاء موجود در فرمولاسیون حائز اهمّیّت می‌باشد.

اوّلین آزمایش تعیین MIC یا تعیین حدّاقل غلظت مهاری رشد می‌باشد. این آزمایش، بیانگر خصوصیّات باکتریواستاتیک یا فانگی استاتیک دارو می‌باشد و به صورت زیر تعریف می‌گردد:

حدّاقل غلظتی که سبب مهار رشد یک میکروارگانیسم گردد و از آن، غلظت به پایین رشد مشاهده گردد؛ بعنوان MIC برای آن مادّه گزارش می‌گردد(4).

با مراجعه به نتایج MIC ملاحظه می‌شود که اثر کلماستین بر روی اشرشیاکلی (گرم منفی) بیشتر از اثر بر روی باکتری دیگر گرم مثبت می‌باشد. یعنی، احتمالا"، دارو بر روی میکروارگانیسم‌های گرم منفی مؤثّرتر است MIC این دارو برای اشرشیاکلی 31/25 میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش می‌شود ولی برای استافیلوکوک اورئوس «گرم مثبت» مقدار MIC بیش از

این حد می‌باشد). در هر حال، باوجود اینکه پسودومونا آئروژینوزاهم یک باکتری گرم منفی می‌باشد ولی MIC برای آن 62/5 میکروگرم در میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش می‌شود. به عبارت دیگر، این دارو بر روی پسودومونا به مقدار کمتری مؤثّر است. دلیل این امر را می‌توان با توجّه به مقاومت پسودومونا به موادّ ضدّ میکروبی توجیه نمود(2).

جدول 3 : نتایج آزمایش موادّ محافظ ـ تعداد باکتریها در روز هفتم و چهاردهم

جدول 4 :نتایج آزمایش موادّ محافظ ـ تعداد باکتریها در روز بیست ویکم و روز بیست وهشتم

آزمایش بعدی که در رابطه با اثرات ضدّ میکروبی کلماستین صورت گرفت؛ تعیین مقدار MBC (حدّاقل غلظت کشندگی) می‌باشد. در این آزمایش، مادّهٔ دارای اثرات ضدّمیکروبی در مدّت زمان معیّنی در تماس با میکروب قرار داده شد و بعد از بی‌اثر کردن مادّهٔ ضدّمیکروبی توسّط یک بی‌اثر کنندهٔ مناسب که در اینجا محلول 1 درصد تویین 80 می‌باشد؛ تعداد کلنی‌ها شمارش گردید.

بعد از این، مقدار MBC 50 تعیین شد که بیانگر غلظتی از دارو است که قادر به از بین بردن 50 درصد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و نتایج آن در جدول 5 ارائه شده است. همان طوری که از این مقادیر استنباط می‌گردد؛ اثرات باکتریسیدی کلماستین بر روی اشرشیاکلی بیشتر از استافیلوکوک و اثر بر روی استافیلوکوک بیشتر از اثر پسودومونا آئروژینوزا می‌باشد. این نتایج تأیید کنندهٔ نتایج MIC نیز می‌باشد.

آزمایش بعدی که بر روی این دارو انجام گرفت؛ بررسی اثرات محافظتی آن در فرآوردهٔ تزریقی میباشد. از آنجایی که با انجام آزمایشات قبلی مشخّص شد کلماستین دارای اثرات ضدّ میکروبی می‌باشد و فرآوردهٔ تزریقی آن هم در طرح ژنریک موجود می‌باشد؛ باید دید این دارو می‌تواند در حدّ استاندارد USP ، بعنوان یک فرآوردهٔ "خود استریل شونده" عمل کند؟ بر اساس استاندارد USP مادّهٔ محافظی قابل قبول است که خصوصیّات زیر را دارا باشد:

1 – غلظت باکتریهای زنده بعد از 14 روز کمتر از 0/1 درصد غلظت روز اوّل باشد.

2 – غلظت قارچهای زنده بعد از 14 روز حدّاکثر برابر با غلظت روزاوّل باشد.

3 – غلظت هر میکروب بعد از 28 روز در حدود روز چهاردهم یا کمتر باشد(7).

همانطور که در شرح کار عملی ذکر گردید؛ از کلماستین محلولی با غلظت مساوی با غلظت فرآوردهٔ تزریقی تهیّه شد و آن را در 25 درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری کردیم. از آنجایی که فراورده‌های دارویی معمولاً در 25 درجهٔ سانتی گراد نگهداری می‌شوند، این درجه حرارت برای نگهداری‌محلول‌موردآزمایش‌طیّ‌مدّت 4هفته انتخاب‌شد.

نتایج بدست آمده در مورد استافیلوکوک اورئوس، پسودومونا آئروژینوزا و اشرشیاکلی در روز چهاردهم بیانگر این نکته است که تعداد میکروبهای فوِ به یک هزارم (0/1 درصد) روز اوّل تقلیل یافته و در روز بیست و هشتم تعداد این میکروبها از روز چهاردهم هم کمتر شده است.

با توجّه به نتایج فوق مشخّص می‌شود که کلماستین بخوبی بر روی باکتری‌ها مؤثّر می‌باشد. بنابراین، محلول تزریقی این دارو به تنهایی و بدون مادّهٔ محافظ ضدّباکتری، می‌تواند از رشد باکتریها جلوگیری کند.

Abstract

Survey on Antimicrobial Impact of Clemastine

Experiments carried out about antimicrobial properties of Clemastine demonstrated that the minimal constraining condensity growth of (MIC) Clemastine for Staphylococcus aureus , Pseudomona aeroginosa , Eshorichia coli Were 62.5, 62.5 and 31-25 Microgram per Milliliter , respectively . To find about the bacterioacid effects of this medicine, the experiment for measurement of MBC was done and the rations for MBC so for Staphylococcus aureus, Pseudomona aeroginosa , Eshorichia coli Were obtained as such : 1.9 , 2.1 and 1.1 respectively . Thus for reasons of the antibacterial activity of Clemastine a kind of modification had to be taken in to consideration associated with an increment of the related preservative in corporated in to this medicine products.

Key words: *Antibacterial effects ; Minimal Limiting Condensation ; Minimal Fatal Condensation .*

منابع

1. Hedges A et al. Some central and Peripheral effects of clemastine, a new antihistaminic drug, in man. J Clinic Pharm 1971; 11(2): 112-9.
2. Hilf M, Yu VL, Sharp J et al. Antibiotic therapy for Pseudomonas aeruginosa Bacteremia: outcome correlations in a Prospective study of 200 Patients. Am J Med1989; 85. P. 540.
3. Meyrik TR, Brwne PD. The influence of ranitidine, alone and in Combination with clemastine on histamine-mediated cutaneous wheal and fhare reaction in human skin. Brit J Clinic Pharm 1985; 20. PP. 377-382.
4. Mahon CR, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. W. B Saunders Co. USA. 1995; PP. 66-90.
5. Reynold JEF. Martindale, The extra pharmacopoeia. The pharmaceutical Press, London .1989; P. 449.
6. Tham R, Norlander B, Hagermark O, Fransson L. Gas Chromatograpy of Clemastine. A study of Plasma Kinetics and biological effect. Arzeneim-Forsch/Drug Reynold JEF. Martindale, The extra Pharmacopoeia. London. 1989; P. 449.
7. The united state pharmacopeial convention. The US Pharmacopeia, The National Formulay, US Pharmacopeial convention twinbrood 1985; P. 7751.