

# اثر ضدباکتریایی املاح بیسموت بر هلیکوباکتری پیلوری و تأثیر سینرژیستی آنها با تتراسایکلین و مترونیدازول

دکتر عادل رجبی، دکترای میکروبیولوژی

دکتر بهرام فتح‌الله زاده، دانشیار گروه کلینیکال پاتولوژی بیمارستان امام خمینی

دکتر نسرین معظمی، استاد بخش میکروبیولوژی شناسی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

دکتر اکبر میر صالحیان، استادیار گروه میکروبیولوژی شناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

دکتر فرهاد غفرانی، استادیار بخش گوارش و آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی

## ANTIBACTERIAL EFFECTS OF BISMUTH COMPOUNDS AND IT'S SYNERGY WITH TETRACYCLINE AND METRONIDAZOLE ON HELICOBACTER PYLORI

### ABSTRACT

Bismuth salts and different antimicrobials including Metronidazole & Tetracyclines were used in the assessment of inhibition zone of *Helicobacter pylori* cultures on solid media. Antibiotics were used or in combined in order to find out their possible synergistic effects. It was showed that: only Bismuth substrate and not then salts have antibacterial effects on *Helicobacter pylori* and also on the other bacteria such as staphylococci, salmonella and brulla.

In addition, only Bismuth substances showed remarkable synergistic effects with antimicrobial drugs Against *Helicobacter pylori*. Therefore the data obtained from this investigation confirm previously known effect of combination antibiotic therapy including Bismuth compounds in eradicating *Helicobacter pylori*.

### چکیده

از ۱۳۰ بیمار مبتلا به اختلالات دستگاه گوارش مراجعه کننده به بخش گوارش بیمارستان امام خمینی، بیوپسی معده در مرفع آندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی به عمل آمد و کلیه نمونه‌ها مورد بررسی باکتریولوژیکی قرار گرفت که از این تعداد در ۱۰۰ مورد، هلیکوباکتری پیلوری ایزوله گردید، سپس پنج کشت خالص از موارد فوق را به صورت تصادفی انتخاب شد و اثر ضد باکتریایی املاح بیسموت (نیترات بیسموت، کربنات بیسموت، سیترات بیسموت و ساب سیترات بیسموت) و تأثیر سینرژیستی ساب سیترات بیسموت با تتراسایکلین و مترونیدازول به روش انتشار دیسک روی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. ضمناً به منظور کنترل روش کاری، حساسیت چهار کشت میکروبی استاندارد: استافیلوکوک اورئوس (ATCC: ۲۵۹۲۳)، *S*-۹۹ (CSBPI-A ۱۰۳)، سالمونلاتیفی ۹۰۱-O (CSBPI-B ۱۹۶) و اشریشیاکولی (۲۵۹۲۲-)

ATCC نیز سنجش گردید. در این تحقیق قطر هاله ممانعت از رشد توسط ساب سیترات بیسموت (با غلظت ۱۲۸ میکروگرم در دیسک) در محیط کشت هلیکوباکتری پیلوری برابر  $2/4 \pm$  (mean  $\pm$  SD) ۱۵ و در محیط‌های کشت استاندارد فوق به ترتیب معادل  $2/6 \pm 15$ ،  $3/1 \pm 20$  و  $2/5 \pm 14$  میلی لیتر محاسبه گردید. در حالیکه اشریشیاکولی هیچگونه حساسیتی نسبت به املاح بیسموت از خود نشان نداد. به علاوه، قطر هاله ایجاد شده توسط تتراسایکلین (با غلظت ۳۰ میکروگرم در دیسک) در محیط کشت هلیکوباکتری پیلوری  $2/6 \pm 30$  و در محیط‌های کشت استاندارد به ترتیب  $2/4 \pm 30$ ،  $2/9 \pm 2/40$  و  $2/8 \pm 21$  بود. همچنین قطر هاله ایجاد شده توسط مترونیدازول (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در دیسک) در محیط کشت هلیکوباکتری پیلوری برابر  $1 \pm 4$  و در محیط کشت سوشهای استاندارد به ترتیب  $1/2 \pm 3$ ،  $2/4 \pm 8$  و  $1/38 \pm 3$  بود و اشریشیاکولی نیز مقاوم

لیتر آموتریسین ب، ۲۰-۵ میلی گرم در لیتر تری متوپریم و ۲۵۰۰۰ واحد در لیتر کولیستین یا ۵ میلی گرم در لیتر فسفولودین کشت داده شدند. سپس نمونه‌های کشت به مدت ۴۰۷ روز در دمای  $36 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآتروفلیک انکوبه گردیدند.

برای تشخیص نهایی کشتهای مثبت از تستهای بیوشیمیایی استفاده گردید.

### بررسی تاثیر ساب سترات بیسموت بر روی باکتریها و اثر سینترژیستیک احتمالی آن با تتراسیکلین و مترونیدازول.

**الف - تهیه دیسک:** با استفاده از کاغذ صافی که قبلاً عدم فعالیت احتمالی ضد میکروبی آن بررسی گردیده بود، دیسکهایی به قطر ۶ میلی‌متر تهیه و میزان معینی از محلول ترکیبات فوق به آنها اضافه گردید سپس پلیتھا، در دسیکاتور با پنتاکسید فسفر و یا در هوای آزاد خشک شده و مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور استاندارد نمودن دیسکها، غلظت محلولهای مواد ضد باکتریایی فوق طوری تغییر داده شد که زدن (Zone) حاصله در حد زون شاهد قرار گیرد.

**ب - استاندارد نمودن تعلیق باکتریایی:** جهت استاندارد نمودن تعلیق باکتریایی مورد استفاده در تکنیک انتشار دیسک، کدورت سوپانسیون میکروبی معادل کدورت حاصله از ترکیب ۰/۵ میلی لیتر محلول کلوروفارم ۱/۱۷۵ درصد (W/V) با ۹۹/۵ میلی لیتر از اسید سولفوریک یک درصد انتخاب شد و جهت بررسی قدرت ضد باکتریایی بیسموت استفاده گردید.

### نتیجه

حساسیت دارویی ۵ سوش انتخابی از ۱۰۰ نمونه هلیکوباکترپیلوری بدست آمد و مورد آزمایش قرار گرفت، چنانچه در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، قطر هاله ایجاد شده بوسیله ساب سترات بیسموت با غلظت ۱۲۸ میکروگرم در دیسک بر علیه هلیکوباکترپیلوری و سوشهای حساس شاهد، شامل استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: ۲۵۹۲۳)، بروسلا ابورتوس S-۹۹ (CSBPI-A ۱۰۳)، سالمونلاتیفی O-۹۰۱ (۱۹۶) CSBPI-B) به ترتیب  $15 \pm 2/4$ ،  $15 \pm 2/6$ ،  $20 \pm 3/1$ ،  $14 \pm 2/1$  میلی‌متر ارزیابی گردید، درحالیکه سوش مقاوم اشرشیاکلی (ATCC: ۲۵۹۲۲) هیچگونه حساسیتی از خود نشان نداد. همچنین قطر زون عدم رشد توسط دیسک تتراسیکلین (با غلظت ۳۰ میکروگرم در دیسک) علیه هلیکوباکترپیلوری  $30 \pm 2/6$  و بر علیه کشتهای استاندارد به ترتیب  $30 \pm 2/4$ ،  $40 \pm 2/5$ ،  $21 \pm 2/8$  و  $25 \pm 2/3$  میلی‌متر و قطر زونهای حاصله توسط مترونیدازول (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در دیسک) علیه هلیکوباکترپیلوری برابر  $4 \pm 1$  و علیه سوشهای

گزارش گردید. املاح دیگر بیسموت که در بالا ذکر شد، هیچگونه اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند.

درآزمایشات دیگری که اثر سینترژیستی ساب سترات بیسموت با تتراسیکلین و مترونیدازول (به میزان چهار قسمت ساب سترات بیسموت، یک قسمت تتراسیکلین و شش قسمت مترونیدازول) با غلظت ۳۵۹ میکروگرم مورد بررسی قرار گرفت. هاله ممانعت در محیط کشت لیکوباکتر پیلوری برابر  $40 \pm 3$  و علیه سوشهای شاهد به ترتیب  $42 \pm 2/2$ ،  $45 \pm 2/1$ ،  $35 \pm 2/6$  و  $27 \pm 2/3$  محاسبه گردید. بنابراین ارزیابی یافته‌های فوق نشان می‌دهد که از بین املاح بیسموت، ساب سترات بیسموت نه تنها اثر ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد، بلکه چنانچه همراه تتراسیکلین و مترونیدازول مصرف گردد، فعالیت ضد باکتریایی بسیار موثرتری علیه هلیکوباکترپیلوری و درمان اولسهای پپتیک خواهد داشت.

### مقدمه

به نظر می‌رسد هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل اتیولوژیک زخمهای معده و دوازدهه باشد و مسأله عود هنوز یکی از معضلات درمانی این بیماری است. درمان بیماران به وسیله داروهای رایج نظیر بلوک کننده‌های هیستامینی فقط به مدت محدودی باعث بهبود می‌گردد (۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸)، بنابراین جهت درمان قطعی اینگونه بیماران، توجه محققین به روش‌های درمانی با آنتی بیوتیک، خصوصاً روشهای توأم با ترکیبات بیسموت نظیر ساب سترات و ساب سالیسیلات بیسموت معطوف گردیده است (۸ و ۹ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳). اگرچه گزارشهای متعدد، مؤثر بودن ترکیبات فوق را در معالجه زخم‌های دوازدهه و معده تایید کرده‌اند ولی در مورد چگونگی تاثیر آنها اختلاف نظر چشم‌گیری بین دانشمندان وجود دارد. از این رو برای رفع این ابهام، اثر ضد باکتریایی بیسموت به تنهایی و همچنین تاثیر متقابل داروهای سه‌گانه بیسموت و مترونیدازول و تتراسیکلین با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها

به کمک آندوسکوپیی از ضایعه نسجی دوازدهه بیوپسی به عمل آمد. نمونه‌ها در محیط انتقال (نیوگلیکولات حاوی ۵ نوع آنتی بیوتیک) جهت بررسی‌های باکتریولوژیک به آزمایشگاه منتقل گردید.

### بررسی‌های باکتریولوژیک:

**الف - تهیه گسترش:** نمونه ارسالی را بین دو اسلاید شیشه‌ای له نمودیم و دو گسترش نازک تهیه گردید و به وسیله متیلن بلو و فوشین یک درصد بمدت ده دقیقه رنگ آمیزی گردید.

**ب - کشت:** نمونه‌های بیوپسی را در شرایط استریل، هموزن نموده و روی بروسلا آگار محتوی ۱۰-۵ درصد خون گوسفند همراه با ۳-۶ میلی گرم در لیتر و انکومایسین، ۲-۶ میلی‌گرم در

شاهد به ترتیب  $۳۵ \pm ۲/۶$  و  $۴۵ \pm ۲$  و  $۴۲ \pm ۲/۲$  و  $۲۷ \pm ۲/۲$  میلیتر محاسبه گردید. املاح دیگر بیسموت (کربنات بیسموت، نیترات بیسموت و سیترات بیسموت) اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند.

جدول شماره ۲ نتایج حاصل از مطالعه اثرات ضد باکتریایی ترکیبات مورد بررسی به صورت دو به دو را نشان می‌دهد.

استاندارد به ترتیب  $۳ \pm ۱/۳$  و  $۸ \pm ۲/۴$  و  $۳ \pm ۱/۲$  میلیتر بود و اثرشیا کلی مقاومت نشان داد. در آزمایش دیگری که اثر سینرژیستی ساب سیترات بیسموت توام با تتراسایکلین و مترونیدازول به میزان چهار قسمت ساب سیترات بیسموت، یک قسمت تتراسایکلین و شش قسمت مترونیدازول با غلظت ۳۵۹ میکروگرم در دیسک مورد بررسی قرار گرفت، هاله ممانعت علیه هلیکوباکتری پیلوری برابر  $۴۰ \pm ۳$  و علیه سوشهای حساس

جدول شماره (۱): پتانسی دیسکها بر حسب میکروگرم در دیسک و قطر هاله‌های ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر

دیسک	میزان مواد ضد باکتریایی بر حسب میکروگرم در هر دیسک	قطر هاله ممانعت بر علیه هلیکوباکتری پیلوری بر حسب میلی‌متر			قطر هاله ممانعت بر علیه اشرفایکلی بر حسب میلی‌متر	
		استافیلوکوکوس اورئوس	پروسیلا	سالمونلا	مقاوم	اثر شایکلی
ساب سیترات بیسموت	۱۲۸	$۱۵ \pm ۲/۴$	$۲۰ \pm ۳/۱$	$۱۴ \pm ۲/۱$	مقاوم	
تتراسایکلین	۳۰	$۳۰ \pm ۲/۶$	$۴۰ \pm ۲/۹$	$۲۵ \pm ۲/۳$	$۲۱ \pm ۲/۸$	
مترونیدازول	۲۰۰	$۴ \pm ۱$	$۸ \pm ۲/۴$	$۳ \pm ۱/۳$	—	
داروهای سه‌گانه (ساب سیترات بیسموت تتراسایکلین، مترونیدازول)	۳۵۹	$۴۰ \pm ۳$	$۴۵ \pm ۲/۱$	$۳۵ \pm ۲/۶$	$۲۷ \pm ۲/۲$	

جدول شماره (۲): پتانسی دیسکها بر حسب میکروگرم در دیسک دوگانه و قطر هاله‌های ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر

دیسک دوگانه	میزان مواد ضد باکتریایی در هر دیسک بر حسب میکروگرم	قطر هاله ممانعت بر علیه هلیکوباکتری پیلوری بر حسب میلی‌متر			قطر هاله ممانعت بر علیه اشرفایکلی بر حسب میلی‌متر	
		استافیلوکوکوس اورئوس	پروسیلا	سالمونلا	مقاوم	اثر شایکلی
تتراسایکلین+مترونیدازول	۲۳۰	$۳۳ \pm ۳$	$۴۰ \pm ۴$	$۲۷ \pm ۲/۵$	$۲۴ \pm ۲$	
تتراسایکلین+بیسموت	۱۵۸	$۳۸ \pm ۳/۵$	$۴۲ \pm ۳/۶$	$۳۰ \pm ۲/۷$	$۲۷ \pm ۲/۴$	
مترونیدازول+بیسموت	۳۲۸	$۱۸ \pm ۲/۱$	$۲۶ \pm ۲/۶$	$۱۵ \pm ۱/۸$	$۳ \pm ۰/۵$	

## بحث

مورد هلیکوباکتری پیلوری ایزوله گردید که این نقش هلیکوباکتری پیلوری را در ایجاد زخم دوازدهه بخوبی مشخص می‌نماید. بنابراین مؤثرترین راه درمان و جلوگیری از عود مجدد بیماری را باید در ریشه کن نمودن باکتری فوق جستجو کرد. به این منظور مشخص گردید که املاح بیسموت بویژه ساب سیترات بیسموت توام با موارد ضد باکتری دیگر نتیجه مناسب‌تری را در بر دارد (۱۱)، لکن کیفیت اثر بیسموت کاملاً مشخص نیست و در هاله‌ای از ابهام قرار دارد و همچنین اثرات متقابل داروهای سه

در سالهای اخیر، هلیکوباکتری پیلوری به عنوان یکی از عمده‌ترین عوامل اتیولوژیکی اختلالات معده و دوازدهه شناخته شده، عود بیماری نیز به آن نسبت داده می‌شود و شاید به همین دلیل است که زخم دوازدهه به داروهای متداول جواب قطعی نمی‌دهد (۱۱)، اگرچه در کوتاه مدت ممکن است بهبودی حاصل شود، ولی در دراز مدت بیماری مجدداً عود میکند، جالب اینکه در این مطالعه که بر روی ۱۳۰ بیمار مراجعه کننده به بخش آندوسکپی بیمارستان امام خمینی انجام گرفت، در ۱۰۰

مترونیدازول و تتراسیکلین) ایجاد شد از قطر حاصله بوسیله تک تک ترکیبات فوق بیشتر بود که بخوبی نشانگر این است که این ترکیبات، اثرات ضد باکتریایی همدیگر را تقویت می‌نمایند. چنانچه ملاحظه می‌شود، تاثیر مترونیدازول به تنهایی چندان قابل توجه نیست که شاید به دلیل مقاومت باکتریایی ایجاد شده در برابر آن باشد. در جدول ۲ افزایش ناچیزی در تاثیر توام (بیسموت، مترونیدازول) و (تتراسیکلین، مترونیدازول) نسبت به تاثیر تک تک این مواد مشاهده می‌شود. در این مطالعه به خوبی مشخص گردید که نه تنها بعضی ترکیبات بیسموت اثرات ضد باکتریایی دارند و قادر به جلوگیری از رشد باکتری می‌باشند بلکه چنانچه با ترکیبات دیگر ضد میکروبی نظیر مترونیدازول و تتراسیکلین مصرف شوند، اثرات همدیگر را تقویت می‌نمایند همچنین مشخص شد که بیشترین اثر سینرژیستیک مربوط به تتراسیکلین و بیسموت می‌باشد. لازم به ذکر است که کلیه محاسبات بر اساس مقایسه با باکتریهای حساس استاندارد نظیر استافیلوکوک، پروسلا و سالمونلا انجام گردیده است.

### مراجع

1. Dooley CP, MD: Helicobacter pylori infection. gastroenterology clin. Of north america. 1993; 22: 24-70.
2. Walter L. Peterson MD: Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. New England Journal of Medicine. 1991; 32:1943-1047.
3. Patchett S et al: Helicobacter pylori and duodenal ulcer recurrence. Am. J. gastroenterology. 1992; 87:24-27.
4. Patchett S. et al: Helicobacter pylori and BMJ. 1991; 303:1238-1240
5. Dooley EP: Helicobacter pylori, Review of research finding. Aliment phamacol. ther. 1991; 1:129-43.
6. Flier J S. MD: Pathogenesis of peptic ulcer and implication for therapy. new England J Med. 322:909-916.
7. Murray. PD : Pathophysiology and epidemiology of infection by helicobacter pylori. Rev. Infect. Dis. 1991; 13:691-5.
8. Goodwan C S, Armstrong A, Marshall B J: Campylobacter pyloridis gastritis, and peptic ulceration. J. clin. path 1986; 39:353-365.
9. Valle J, Seppala K: Disappearance of gastritis after eradication of helicobacter pylori. scand J. Gastroenrop 1991; 10:1053-1056.
10. Sherwood L. Gorbach: Bismuth therapy in gastrointestinal disease. Gastroenterology. 1990; 96:863-875.
11. Dviad Y et al: Factors influencing the eradication of helicobacter pylori with triple therapy. Gastroenterology. 1992; 102:493-396.
12. Wagner S. et al : Bismuth subsalicylate in the treatment of H2 blocker resistant duodenal ulcer, role of helicobacter pylori. Gut. 1992; 33:179-183.
13. Lambert JR: Effect of antiulcer drugs on Helicobacter pylori. Drug invest. 2:52-55.

\* \* \*

گانه بیسموت، مترونیدازول و تتراسیکلین نیز مورد تردید بودند. در مورد کیفیت اثر بیسموت نظرات متفاوتی ارائه گردیده است. گروهی از مولفین عقیده دارند که ترکیبات بیسموت اثرات حفاظتی دارد و با ایجاد لایه‌ای بر روی زخم آن را از اثرات تخریبی اسید و پپسین محافظت می‌نماید. بعضی دیگر اظهار نموده‌اند که ترکیبات بیسموت به عنوان معادل آنتاگونیست گیرنده‌های هیستامینی عمل می‌نمایند و از ترشح اسید جلوگیری می‌کند و برخی دیگر از دانشمندان عقیده دارند که ترکیبات بیسموت اثرات ضد باکتریایی دارد و باریشه‌کن نمودن باکتری از عود بیماری جلوگیری می‌نماید (۳، ۷، ۱۰، ۱۱) لذا برای رفع این ابهام تصمیم گرفتیم که اثر احتمالی ضد باکتریایی ترکیبات بیسموت و اثر سینرژیستیک ترکیباتی که توام با بیسموت مورد استفاده قرار می‌گیرند، بطور *in vitro* و با استفاده از تکنیک انتشار دیسک در محیط جامد بررسی گردد. همانطور که در جدول شماره ۱ مشخص است، ساب سترات بیسموت بر روی هلیکوباکتریلوری موثر می‌باشد و همچنین قطر هاله ممانعت از رشد که توسط دیسک سه گانه (ساب سترات بیسموت،