Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۲۶- ۱۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی گلسنگ فولجنسیا فولجنس در شرایط *in vitro* و *in vivo*

طاهره ولدبیگی *: استادیار زیست‌شناسی، دانشگاه ایلام، ایران، tvaladbigi@yahoo.com
سمیه راشکی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه ایلام، ایران، somaye_rashki@yahoo.com

چکیده

مقدمه: مقاومت روز افزون باکتری‌ها (به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس*) به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه پنی‌سیلین و متی‌سیلین سبب شده است که دانشمندان همیشه به دنبال یافتن داروهای جدید باشند.

مواد و روش‌ها: ۶۰۰گرم فولجنسیا فولجنس از کوه‌های کان‌گنبد در استان ایلام جمع‌آوری و عصاره متانولی آن با استفاده از سوکسله تهیه شد. خواص ضدباکتری عصاره در شرایط *in vitro* به روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن (با تعیین MIC و MBC) روی دو باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس*) و دو باکتری گرم منفی (*سودوموناس آئروجینوزا* و *اشریشیا کلی*) بررسی شد. برای تعیین اثرات ضدباکتری در شرایط *in vivo*، زخمی روی سطح پشتی موش ایجاد و به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده شد. سپس، موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: کنترل، تحت درمان با پماد تترا سایکلین و تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس. در نهایت، مساحت زخم در روزهای سوم، پنجم، هفتم، نهم و یازدهم اندازه‌گیری شد.

نتایج: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۱۱/۲۱ میلی‌متر تا ۰۱ /۳۳ میلی‌متر بود. با توجه به اندازه سطح زخم در روز یازدهم می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین گروه کنترل (۰/۶۳ سانتی‌متر مربع) و دوگروه درمان (۰) وجود داشت ($P\ value$< ۰/۰۵). در حالی‌که بین گروه تحت درمان با پماد تتراسایکلین و گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره تفاوت معناداری وجود نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس می‌تواند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی در درمان عفونت‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد.

واژه‌های کلیدی: پماد تتراسایکلین، *استافیلوکوکوس اورئوس*، متانول، زخم، موش

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/) , which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه یکی از عوامل مهم شکست درمان عفونت‌ها، مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها به علت استفاده بی‌رویه از داروهای ضدمیکروبی است (۱). به عبارت دیگر با تجویز آنتی‌بیوتیک در مقادیر بالا نه تنها نتیجه‌ای حاصل نمی‌شود بلکه عفونت پایدار می‌ماند. میکروب‌ها با ایجاد ژن مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها این مقاومت را از نسلی به نسل دیگر یا حتی از یک گونه به گونه دیگر منتقل می‌کنند. در این بین، *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم‌ها پس از عمل جراحی است (۲). با گسترش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین، پیدایش سویه‌های مقاوم، روز به روز تعداد آنتی‌بیوتیکی‌های در دسترس برای درمان عفونت این باکتری کاهش می‌یابد (۳).این مسأله سبب شده است تا بشر همواره به فکر جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضدمیکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشد (۴).

عفونت با مکانیسم‌های مختلف، توانایی زخم برای التیام (خود به خودی) را مختل می‌سازد. به طوری‌که تمامی مراحل التیام زخم تحت تأثیر عفونت قرار می‌گیرند. به طور کلی عفونت سبب کاهش Po_2 در زخم و طولانی شدن مرحله التهابی می‌شود. همچنین، عفونت شدید (وجود بیش از 10^5 باکتری) موجب اختلال در کموتاکسی، مهاجرت و فاگوسیتوز گویچه‌های قرمز می‌شود. افزون بر این باکتری‌ها سبب می‌شوند تا فرایند رگ‌زایی و اپی‌تلیازه شدن مختل شود. در نهایت، کلاژناز مشتق از باکتری‌ها، کلاژن‌های موجود در زخم را می‌شکند و مقاومت و توان انقباضی زخم را کاهش می‌دهد (۵).

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری بیماری‌زای گرم مثبت است که گستره وسیعی از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌های اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی‌سمی را ایجاد می‌کند. افزون بر این، این باکتری یکی از عوامل شایع عفونت های پوستی پس از عمل جراحی است (۶). گونه‌های باکتریایی زیادی قادرند باعث عفونت زخم شوند اما طبق مطالعات انجام گرفته معمول‌ترین باکتری جدا شده از زخم، *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۷). این باکتری با مکانیسم‌های متفاوتی مانع از انجام مراحل ترمیم زخم می‌شود. سویه‌های بیماری‌زای این باکتری با تولید پیگمان استافیلوگزانتین نقش مهمی در بیماری‌زایی ایفا می‌کنند (۸)؛ زیرا به عنوان آنتی‌اکسیدن عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. شایان ذکر است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط سیستم ایمنی میزبان برای ازبین بردن باکتری‌ها تولید می‌شوند (۹). از عوامل دیگری که سبب به تأخیر افتادن ترمیم زخم می‌شود می‌توان به بیوفیلم اشاره کرد. تشکیل بیوفیلم زمانی رخ می دهد که باکتری به سطح زخم متصل شود یا تشکیل میکروکلونی دهد. سپس، در یک ماتریکس خارج سلولی فرو می‌رود و باکتری‌ها در آن رشد می کنند و بالغ می‌شوند و در این‌حال خارج شدن از میزبان سخت است (۱۰).همچنین، این باکتری، پروتئین چسبنده خارج سلولی[2] را بیان و ترشح می‌کند. این پروتئین با اختلال در فعالیت لکوسیت‌ها و ممانعت از انجام فرآیند التهاب باعث طولانی‌تر شدن روند ترمیم زخم می‌شود (۱۱). التهاب دومین مرحله از مراحل ترمیم زخم است. ماکروفاژها نقش مهمی در پاسخ‌های التهابی بر عهده دارند. آن‌ها فعالیت‌های کلاسیکی را با لیپوپلی‌ساکاریدها و عامل نکروز کننده آلفا انجام

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهند که باعث تولید اکسید نیتریک سنتتاز و اکسید نیتریک می‌شوند و فعالیت آن‌ها به التهاب منجر می‌شود (۱۲). یا ممکن است فعالیت‌های دیگری را توسط اینترلوکین-۴ و اینترلوکین-۱۰ انجام دهند. در این شکل فعالیت آن‌ها سبب تولید L-اورنتین می‌شود که پیش‌ساز مهمی برای رشد سلول‌ها و سنتز کلاژن در بهبود زخم است. بنابراین، پروتئین چسبنده خارج سلولی با داشتن ویژگی ضدالتهابی مسؤول طولانی‌ترشدن فرآیند ترمیم زخم آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۱۳). امروزه به علت بالا بودن میزان عوارض جانبی داروهای شیمیایی و همچنین، مقاوم شدن بسیاری از میکروب‌ها به این داروها توجه بسیاری به منابع گیاهی به ویژه، گلسنگ‌ها معطوف شده است.

گلسنگ ارتباط بین قارچ و جلبک سبز و یا سیانوباکتر است. این موجودات ترکیبات شیمیایی متنوعی (مانند مشتقات پلی کتید[۳]؛ دپسیدها[۴] و دپسیدون‌ها[۵]) دارندکه به ندرت در ارگانیسم‌های دیگر گزارش شده است. برای مثال آثار آنتی‌بیوتیکی اسنیک اسید[۶] (یکی از ترکیبات مهم گلسنگ‌ها) در درمان زخم‌های موضعی و سوختگی‌ها بسیار مؤثرتر از پنی‌سیلیوم[۷] است (۱۴). همچنین، دی بنزوئیل‌اسنیک اسید[۸]خواص مهار کنندگی قابل توجهی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا*[۹]دارد (۱۵). از جمله ترکیبات گلسنگ که اثر درخور توجهی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد می توان به الکتوسارمنتین[۱۰]، اورنیک اسید[۱۱]، متیل β- ارسلینات[۱۲]و مشتقات اسنیک اسید اشاره کرد. به طور کلی باربانیک[۱۳] و اسنیک اسید به عنوان ترکیبات مؤثر علیه میکروارگانیسم‌ها و همچنین، سلول‌های سرطانی و توموری شناخته شده‌اند (۱۶).

اگرچه ابتدا گلسنگ‌ها در فارماکوپه‌های سنتی با ارزش دانسته شدند ولی ارزش آن‌ها در صنعت داروسازی به علت مشکلات در کشت‌های آکسنیک[۱۴] طراحی شده و محدودیت‌های رشد نادیده گرفته شد (۱۷). امروزه این ارگانیسم‌ها به ویژه در کشورهای اروپا و آمریکا، با برطرف شدن مشکلات یاد شده دوباره اهمیت ویژه‌ای یافته اند. به طور کلی، در زمینه کاربرد دارویی گلسنگ‌ها در ایران و همچنین، خواص ترمیم زخم گونه مورد نظر در دنیا مطالعه مؤثری انجام نشده است. بنابراین، در پژوهش حاضر به بررسی آثار دارویی این گلسنگ بومی ایران به ویژه خواص ضد باکتریایی و ترمیم زخمی پرداخته شده است. به این امید که زمینه مناسبی برای پژوهش در این راستا در کشور فراهم شود.

مواد و روش‌ها

in vitro:

جمع‌آوری و شناسایی گونه گلسنگ و تهیه عصاره: ۶۰۰ گرم گلسنگ فولجنسیا فولجنس از کوه‌های کان‌گنبد در استان ایلام جمع‌آوری شد (هرباریوم دانشگاه شهید بهشتی، شماره ۴۸). سپس، با استفاده از کلید شناسایی استاندارد و همچنین، مقایسه با نمونه‌های معتبر در هرباریوم برلین (B) و مونیخ (M) شناسایی شد (۱۸). نمونه‌ها پس از شستشو و خشک شدن در سایه، به شکل پودر درآمدند و عصاره متانولی آن‌ها با استفاده از سوکسله تهیه شد (۱۹).

باکتری: باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC1885، *سودوموناس آئروجینوزا PTCC1047*، *انتروکوکوس فکالیس*[۱۵] PTCC2321 و *اشریشیاکلی*[۱۶] PTCC1652 از مرکز کلکسیون باکتری ایران تهیه شد. سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلندی

www.SID.ir

Archive of SID

(۱/۵× ۱۰^{۸} cfu/ml) از باکتری‌ها بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار به شکل خطی کشت داده شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارگرفت (۱۸).

تاثیر عصاره متانولی بر باکتری: برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی از غلظت‌های ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره استفاده شد. سپس، عصاره در دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰ درصد حل و دیسک پیپرپلانک تهیه شده از شرکت رکین به رقت‌های تهیه شده اضافه شد. در ادامه دیسک‌ها در آون ۳۵ درجه قرار داده شد تا خشک شوند (۱۹). سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلندی باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل چمنی کشت داده شد (۲۰). با روش استاندارد انتشار دیسک، دیسک‌ها در فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در محیط کشت قرار داده شدند (۲۱). در نهایت، محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها خوانده شد (۲۲).

تعیین مقدار MIC[۱۷] وMBC[۱۸]: تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) طبق دستور العمل CLSI با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و روش براث میکرودایلوشن انجام شد (۲۳).ابتدا محیط نوترینت براث و سپس، رقت‌های تهیه شده عصاره به هر چاهک اضافه شد (۵۰ میکرولیتر). همچنین، در دو چاهک انتهایی آنتی‌بیوتیک به همراه محیط کشت به عنوان کنترل مثبت و در دو چاهک نیز فقط محیط کشت به عنوان کنترل منفی ریخته شد. سپس، به تمام چاهک‌ها سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. در انتها، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس با مقایسه کدورت چاهک‌ها با چاهک‌های کنترل، میزان MIC مشخص شد (۲۴). به این ترتیب که نخستین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به شکل میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملا متوقف شده بود ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. سپس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت غلظتی که در آن رشدی دیده نشد به عنوان MBC عصاره برای باکتری مورد نظر گزارش شد (۲۵).

in vivo:

باکتری: از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC1885 که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران تهیه شده بود استفاده شد. سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلندی (۱/۵× ۱۰^{۸} cfu/ml) از باکتری روی محیط کشت مانیتول سالت آگار به شکل خطی کشت شد. سپس، باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارگرفت. در نهایت، باکتری کشت شده در سرم فیزیولوژی حل شد (۲۶).

تهیه پماد: برای تهیه پماد ۱۰ درصد، یک گرم عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس خشک با ۹ گرم پایه پماد مخلوط شد (۲۷).

حیوانات: در این مطالعه از ۱۵ سر موش نر نژاد ویستار استفاده شد. موش‌ها در دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. تمام مراحل این پژوهش با در نظر گرفتن اصول اخلاقی حاکم بر کاربرد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

ایجاد زخم: موش‌ها با استفاده از داروی بی‌هوشی دی‌کلرواتان بی‌هوش شدند. سپس، موهای ناحیه پشتی موش با استفاده از تیغ جراحی تراشیده شد. پس از آن با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از تیغ جراحی زخمی به طول ۵ سانتی‌متر ایجاد شد (عمق زخم در همه گروه‌ها یکسان بود). روز جراحی روز صفر در نظر گرفته شد (شکل ۱). پس از ایجاد زخم، سوآپ استریل به باکتری حل شده در سرم فیزیولوژی آغشته شد. سپس سطح زخم با سوآپ، به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده شد (۲۸).

موش‌ها پس از ایجاد زخم به طور تصادفی به سه گروه ذیل تقسیم شدند:

۱) گروه کنترل (**A**).

۲) گروه تحت درمان با پماد تتراسایکلین (**B**).

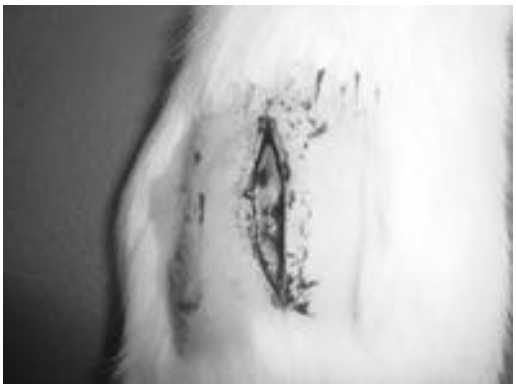
۳) گروه تحت درمان با پماد تهیه شده از عصاره فولجنسیا فولجنس (**C**).

از زخم‌ها قبل از تجویز هر دارو با دوربین دیجیتال عکس تهیه شد. برای محاسبه مساحت زخم برای بررسی مورفومتریک از نرم‌افزار تحلیل تصاویر فرآیند التیام زخم Motic Images ۲۰۰۰۱,۲ استفاده شد (۲۹).

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 21 ارزیابی شدند. برای مقایسه نتایج از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون توکی[19] استفاده شد. نتایج به شکل میانگین ±انحراف معیار ارایه شد. اختلافات بین داده‌ها با در نظر گرفتن $P\ value<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

***in Vitro*:** میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس بیش‌ترین اثر را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله (۳۳/۰۱ میلی‌متر) داشت و بر *انتروکوکوس فکالیس* اثری نداشت (جدول ۱ و شکل ۲). طبق جدول ۲ عصاره در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریسدال (کشندگی) بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت و بر باکتری *انتروکوکوس فکالیس* اثری ضدباکتریایی مشاهده نشد.



شکل ۱- روز صفر جراحی

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) و انحراف معیارحاصل از تاثیر عصاره فولجنسیا فولجنس بر باکتری‌های مورد بررسی

غلظت عصاره* / باکتری	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
P. aeruginase	۸/۰۲±۰/۵۶	۹/۲۱±۰/۲۷	۱۴/۱±۰/۰۶	۱۸/۳±۰/۰۸
E. coli	۷/۵۹±۰/۰۷	۹±۰/۵۱	۱۱/۴۶±۰/۰۲	۲۰/۲۲±۰/۱۲
E. paecalis	۶±۰	۶±۰	۶±۰	۶±۰
S. aureus	۱۱/۲۱±۰/۱۷	۲۰±۰/۲۲	۲۶/۶۱±۰/۴۰	۳۳/۰۱±۰/۱۷

* میلی گرم بر میلی‌متر

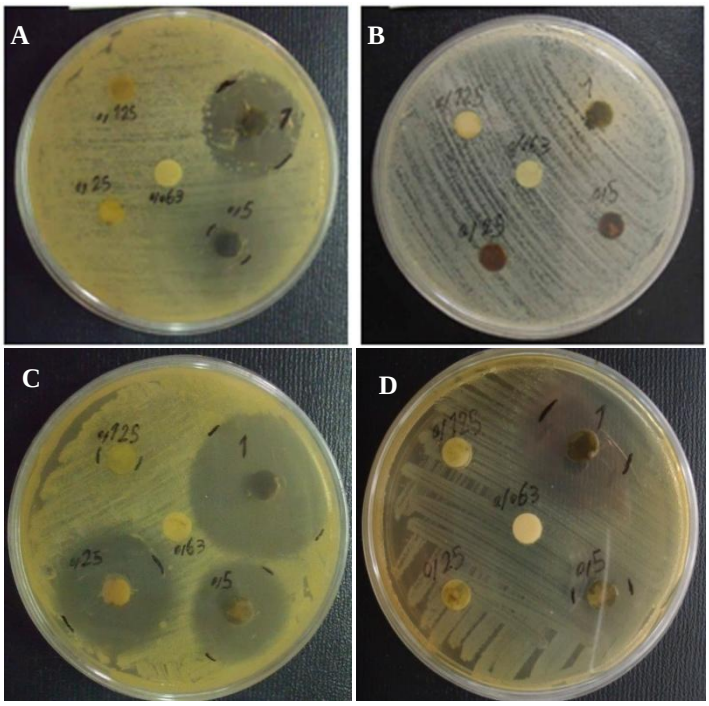
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقدار MIC وMBC (میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره فولجنسیا فولجنس بر علیه باکتری‌های مورد بررسی

باکتری	MIC	MBC
S. aureus	۱۲۵	۲۵۰
E. paecalis	n	n
E. coli	۵۰۰	۵۰۰
P. aeruginase	۱۰۰۰	۱۰۰۰

n: فاقد اثر عصاره روی باکتری



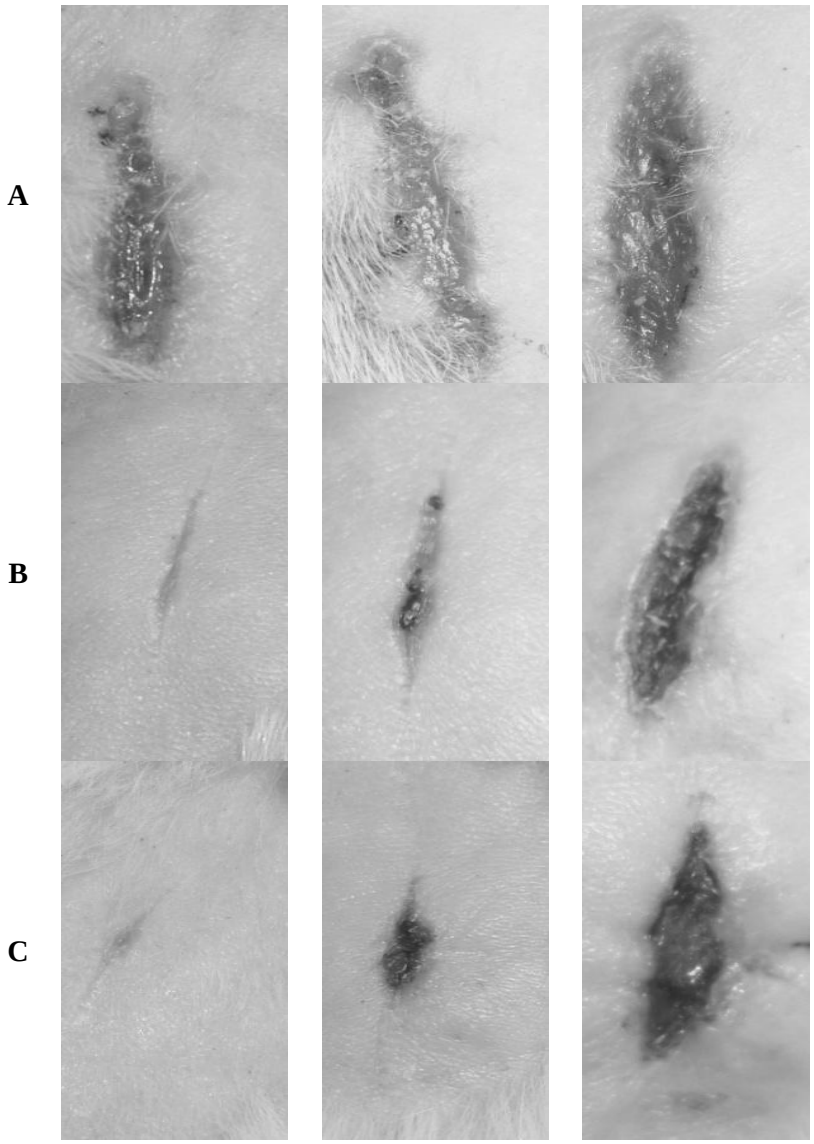
شکل ۲- اثر عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس روی *اشریشیا کلی* (A) ،*انتروکوکوس فکالیس* (B)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (C) و *سودوموناس آئروجینوزا* (D).

***in vivo*:** همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، وسعت سطح زخم در گروه کنترل در روزهای سوم تا پنجم بعد از ایجاد زخم روند افزایشی داشت. در روزهای بعدی نیزسطح زخم به کندی کاهش یافت، به گونه‌ای که طبق مشاهدات در روز یازدهم زخم درمان نشد (شکل ۳، A). نتایج کلونی‌کانت در گروه کنترل نشان داد که تا روز یازدهم باکتری همچنان در سطح زخم وجود داشت و هیچ اثری از کاهش کلونی‌ها یافت نشد (جدول ۴). در گروه تحت درمان با آنتی‌بیوتیک از روز سوم تا یازدهم وسعت سطح زخم روند کاهشی چشم‌گیری داشت (شکل ۴ و جدول ۳). به طوری‌که زخم در روز یازدهم به طور کامل ترمیم شد (شکل ۳، B). نتایج کلونی‌کانت این موضوع را تایید می‌کند به طوری که با از بین رفتن باکتری در روز یازدهم ترمیم زخم به طور کامل انجام گرفت (جدول ۴). همچنین، در همه روزهای مورد مطالعه از نظر آماری اختلاف معناداری در سطح (P *value*<۰/۰۵) با گروه کنترل وجود داشت. در گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد،

www.SID.ir

Archive of SID

سطح زخم از روز سوم تا یازدهم کاهش چشم‌گیری نشان داد (شکل ۴ و جدول ۳). به طوری که در روز یازدهم زخم بهبود یافت (شکل ۳، C). همچنین، نتایج کلونی‌کانت کاهش چشم‌گیری در تعداد کلونی‌ها از روز سوم تا یازدهم نشان داد (جدول ۴). به طوری‌که در روز یازدهم اثری از باکتری در سطح زخم یافت نشد و ترمیم کامل زخم شکل گرفت. همچنین، اختلاف معناداری در سطح (*P value* <۰/۰۵) با گروه کنترل وجود داشت. در حالی‌که بین گروه دوم (شکل ۳، B) و سوم (شکل ۳، C) اختلاف معناداری در سطح (*P value* <۰/۰۵) مشاهده نشد. به طور کلی، رابطه مستقیمی بین تعداد کلونی‌ها و مساحت زخم وجود داشت به طوری‌که با کاهش تعداد کلونی‌ها از اندازه سطح زخم کاسته شد و با از بین رفتن کامل باکتری‌ها زخم به طور کامل بهبود یافت.



شکل ۳- وضعیت بهبود زخم (از چپ به راست) در روزهای هفتم، نهم و یازدهم در گروه کنترل (A)، تحت درمان با پماد تتراسایکلین (B) و گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره فولجنسیا فولجنس (C).

www.SID.ir

Archive of SID

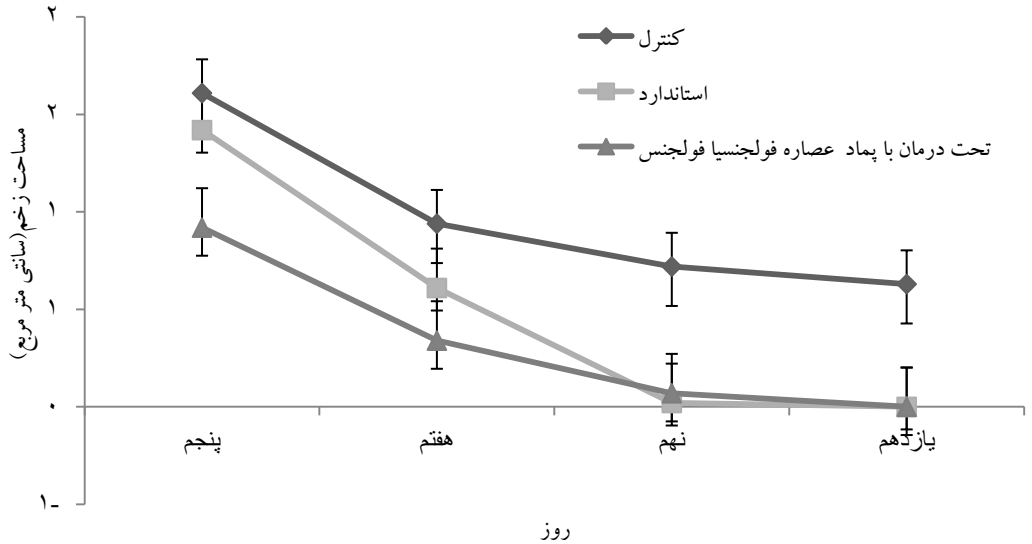
جدول ۳- میانگین مساحت زخم (سانتی‌متر مربع) و انحراف معیار در روزهای سوم تا یازدهم در گروه کنترل (A)، گروه تحت درمان با پماد تتراسایکلین (B) و گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد فولجنسیا فولجنس (C).

روز / گروه	سوم	پنجم	هفتم	نهم	یازدهم
A	۱/۲۴±۰/۰۵	۱/۶۱±۰/۰۵	۰/۹۴±۰/۰۳	۰/۷۲±۰/۰۵	۰/۶۳±۰/۰۶
B	۱/۶۲±۰/۰۲	۱/۴۲±۰/۰۳	۰/۶۱±۰/۰۲	۰/۰۲±۰/۰۳	۰
C	۱/۹۶±۰/۰۱	۰/۹۲±۰/۰۲	۰/۳۴±۰/۰۳	۰/۰۷±۰/۰۵	۰

جدول۴- نتایج شمارش کلونی‌ها (برحسب CFU) در گروه‌های کنترل (A)، تحت درمان با پماد تتراسایکلین (B) و تحت درمان با پماد ۱۰ درصد (C) در روزهای دوم تا یازدهم پس از ایجاد زخم.

روزهای مورد مطالعه / گروه	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
A	*غ	غ	غ	غ	غ	۲۷۵	۲۱۰	۱۶۵	۱۲۵	۱۰۵
B	غ	غ	۲۷۵	۲۱۰	۱۴۲	۷۶	۳۸	۱۵	۰	۰
C	غ	غ	۲۱۰	۱۳۰	۹۴	۶۳	۳۵	۱۵	۰	۰

*غیر قابل شمارش



شکل ۴- نمودار روند بهبود زخم در روزهای هفتم، نهم و یازدهم گروه کنترل (A)، تحت درمان با پماد تترسایکلین (B) وگروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره فولجنسیا فولجنس (C).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

در زمینه خواص ترمیم زخم گونه‌های گلسنگ بومی ایران و همچنین، گونه فولجنسیا فولجنس در شرایط *in vivo* در دنیا تا کنون مطالعه‌ای انجام نشده است. فقط فعالیت ضدباکتری این گونه در شرایط *in vitro* توسط رانکوویک[۲۰] و همکاران در سال ۲۰۱۰، بررسی شده است (۳۰). نتایج آن‌ها فاقد آثار آنتی‌باکتریال در خور توجه برای گونه مورد نظر است. در حالی که نتایج مطالعه حاضر در شرایط *in vitro* نشان می‌دهد که عصاره فولجنسیا فولجنس فعالیت ضدباکتری قابل توجهی علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته و در شرایط *in vivo* (ترمیم زخم) سبب از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح زخم شده (همان‌طور که در مقدمه اشاره شد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با مکانیسم‌های مختلفی سبب تاخیر در روند التیام زخم می‌شود) و در مدت زمان کمی (۱۱ روز) زخم به طور کامل التیام می‌شود. علت این تناقض را می‌توان به این شکل توضیح داد که وجود ترکیبات ضدباکتری در بسیاری از گونه‌ها، به کلیمان و میکروکلیمان‌ها وابسته است. برای مثال *Cladia aggregata* دارای باربانیک اسید[۲۱] به عنوان متابولیت اصلی است. درحالی‌که وجود ترکیبات دیگر مانند استیک تیک[۲۲]، نورستیک تیک[۲۳] و پروتوستراریک اسید[۲۴] در ریسه به محیط و شرایط اکولوژی وابسته است (۷). به همین علت به نظر می رسد که گونه ایرانی دارای ترکیبات ثانویه ویژه‌ای ناشی از شرایط منحصر به فرد اکولوژیک بوده که خواص آنتی‌باکتریال و ترمیم زخمی آن را سبب می‌شود. بنابر این انجام تحلیل‌های شیمیایی (کروماتوگرافی HPLC یاGC-MASS) برای تعیین مواد موثره ریسه این گونه در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های ۶۳ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی فولجنسیا فولجنس بر روی باکتری‌ها و همچنین، مقادیر MBC و MIC نشان می دهد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین باکتری به عصاره متانولی این گلسنگ است. به علت ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و نفوذ بیشتر عصاره به دیواره سلولی، به طور کلی عصاره گلسنگ‌ها اثر بیش‌تری روی باکتری‌های گرم مثبت دارند، اما در مورد انتروکوک‌ها به ویژه *انتروکوکوس فکالیس* مقاومت زیادی در برابر عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌ها دیده می‌شود و به این علت عصاره فولجنسیا اثری روی این باکتری ندارد. به همین علت در قسمت فعالیت ضدباکتریایی در شرایط *in vivo* از *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد و مشخص شد که این عصاره روند ترمیم زخم پوستی آلوده به این باکتری راتسریع می‌کند. این امر ممکن است به علت وجود ترکیبات شیمیایی ویژه در ریسه فولجنسیا فولجنس باشد که ویژگی ضد میکروبی دارند و همان‌طور که پیش از این اشاره شد باید تجزیه و تحلیل شوند. به طور کلی وجود مشتقات فنلی (فنل و فلاونویید) در گلسنگ‌ها نشان دهنده فعالیت آنتی‌میکروبی آن‌هاست. این مواد باعث اسیدی شدن سلول باکتری، به ترتیب تخریب غشای سیتوپلاسم، غیر فعال شدن آنزیم‌ها و اختلال انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شوند (۳۱- ۳۳).

بدیهی است که با توجه به نتایج مثبت حاصل از این مطالعه در درمان عفونت‌های استافیلوکوکوسی و همچنین، عوارض جانبی کمتر عصاره فولجنسیا فولجنس

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، نیاز به مطالعات گسترده‌تری در مورد کاربرد اثرات دارویی این گونه روی حیوانات بیشتر و در مرحله بعدی انسان است. در آخر نیز پیشنهاد می‌شود که فعالیت ضدباکتری عصاره بر علیه سایر باکتری‌ها منجمله *اشریشیا کلی* در شرایط *in vivo* مطالعه و بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از پروفسور هری سیپمن[۲۵] (مسئول هرباریوم گلسنگ برلین، آلمان) برای آماده کردن زمینه یازده ماه مطالعه در هرباریوم گلسنگ برلین و همچنین، داگمار تریبل[۲۶] (مسئول هرباریوم گلسنگ مونیخ، آلمان) برای همکاری در شناسایی نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus.* Clinical *Microbiology and Infection* 2006; 12 (1): 3- 8.

(2) Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition and Food Research* 2004; 48 (7): 479- 87.

(3) Granslo H., Gammelsrud KW., Fredheim EA., Flaegstad T., Klingenberg C. Coagulase- negative staphylococci-biofilm and antibiotic resistance. *Tidsskrift for praktisk Medicin, Organ for Den norske lægeforening* 2008; 128 (23): 2746- 9.

(4) Fabricant DS., Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109 (1): 69- 75.

(5) Lee CK., Hansen SL. Management of acute wounds. *Surgical Clinics of North America* 2009; 89 (3): 659- 76.

(6) Bode LG., Kluytmans JA., Wertheim HF., Bogaers D., Vandenbroucke-Grauls CM., et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362 (1): 9- 17.

(7) Lilani SP., Jangale N., Chowdhary A., Daver GB. Surgical site *infection* in *clean* and *clean-contaminated cases*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2005*;* 23 (4)*:* 249- 52.

(8) Zhu J., Lu C., Standland M. Single mutation on the surface of *Staphylococcus aureus* Sortase A can disrupt its dimerization. *Biochemistry* 2008; 47 (6): 1667- 74.

(9) Clauditz A., Resch A., Wieland KP., Peschel A., Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and Immunity* 2006; 74 (8): 4950- 3.

(10) Schierle CF., De la Garza M., Mustoe TA., Galiano RD. *Staphylococcal biofilms* impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound repair and regeneration* 2009; 17 (3): 354- 9.

(11) Hussain M., Becker K., von Eiff C., Peters G., Herrmann M. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8 (6): 1271 -6.

(12) Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in Plastic Surgery* 2003; 30 (1): 37- 45.

(13) Athanasios NA., Economopoulou M., Orlova VV., Sobke A., Schneider D., et al. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 2006; 107 (7): 2720- 7.

www.SID.ir

Archive of SID

(14) Madamombe IT., Afolayan AJ. Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from South African *Usnea barbata. Pharmaceutical Biology* 2003; 41 (3): 199- 202.

(15) Melgarejo M., Sterner O., Castro JV., Mollinedo P.More investigations in potent activity and relationship structure of the lichen antibiotic (+) -usnic acid its derivate dibenzoylusnic acid. *Revista Boliviana de Quimica* 2008; 25 (1): 24- 9.

(16) Martins MCB., Gonçalves de Lima MJ., Silva FP., Azevedo-Ximenes E., Henrique da Silva N., et al. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010; 53 (1): 115- 22.

(17) Kosanić M., Ranković B. Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro. *Kragujevac Journal of Science* 2010; 32: 65- 72.

(18) Valadbeigi T. Collection and Identification lichens Zirab area [Dissertation]. Tehran: Shahid Beheshti Univ.; 2004.

(19) Manojlovic NT., Solujic S., Sukdolak S. Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaereri. The Lichenologist* 2002; 34 (1): 83- 5.

(20) Karagoz A., Dogruoz N., Zeybek Z., Aslan A. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 2009; 3 (12): 1034- 9.

(21) Kirmizigül S., Koz Ö., Anil H., Icli S. Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish Lichens. *Turkish Journal of Chemistry* 2003; 27 (4): 493- 500.

(22) Ranković B., Kosanić M. Antimicrobial activities of different extract of *Lecanora atra Lecanora muralis, Parmelia saxatilis, Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua. Pakistan Journal of Botany* 2012; 44 (1): 429- 33.

(23) Candan M., Yýlmaz M., Tay T., Erdem M., Türk AÖ. Antimicrobial activity of extracts of the Lichen *Parmelia sulcata* and its Salazinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung A* 2007 (7-8); 62: 619- 21.

(24) Choi MJ., Yohannes SB., Lee SJ., Damte D., Ahsanur Reza MD., et al. The in vitro antibacterial activity of enrofloxacin-trimethoprim combination against five bacterial species. *The Pakistan Veterinary Journal* 2012; 32 (3): 363- 6.

(25) Rahman M., Kuhn I., Rahman M., Olsson-Liljequist B., Mollby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70 (4): 2398- 403.

(26) Androw JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 7 (5): 48-57.

(27) Radika S. Development of treated bandage using lichen extract for wound healing. *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 2013; 2 (2): 163- 6.

(28) Gupta N., Jain UK. Investigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of Mimusops elengi Linn. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* 2011; 8 (2): 98- 103.

(29) Edwards R., Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current opinion Infectious Diseases* 2004; 17 (2): 91- 6.

(30) Rankovič B., Rankovic D., Maric D. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology* 2010; 79 (6): 809-15.

(31) Conover MA., Mierzwa R., King A., Loebenberg D., Bishop W., et al. Usnic acid amide a phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidum henningsii*. *Phytochemistry* 1992; 31 (9): 2999- 3001.

www.SID.ir

Archive of SID

(32) Randhir R., Lin YT., Shetty K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry* 2004; 39 (5): 637- 46.

(33) Vattem DA., Lin YT., Labbe RG., Shetty K. Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus Lentinus edodes and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2004; 5 (1): 81- 91.

[1]- *Staphylococcus aureus*
[2]- Eap
[3]- Polyketides
[4]- Depside
[5]- Depsidon
[6]- Usnic acid
[7]- Penicillium
[8]- Dibenzoyl usnic acid
[9]- *Pseudomona aeroginosa*
[10]- Alectosarmetin
[11]- Uronic acid
[12]- Methyl- β orsellinate
[13]- Barbatic acid
[14]- Axenic cultures
[15]- *Entrococcus faecalis*
[16]- *Escherchia coli*
[17]- Minimum inhibitory concentration
[18]- Minimum bactericidal concentration
[19]- Tukey
[20]- Rankovič
[21]- Barbatic acid
[22]- Stictic acid
[23]- Norstictic acid
[24]- Protocetraric acid
[25]- Harrie Sipman
[26]- Dagmar Triebel

www.SID.ir

Archive of SID

Survey of Antibacterial Effect of Methanolic Extract of *Fulgensia fulgens* through in Vitro and in Vivo Conditions

Tahereh Valadbeigi *
Associate Professor of Biology- Lichenology, Ilam University, Iran, tvaladbeigi@yahoo.com
Somaye Rashki
M.Sc. of Microbiology, Ilam University, Iran, somaye_rashki@yahoo.com

Abstract

Introduction: Daily increasing of bacteria resistance (specially *Staphylococcus aureus*) to various antibiotics in particular penicillin and methicillin has always led the scientists to look for new medicines.

Materials and methods: 600 g of *Fulgensia fulgens* was collected from KaneGonbad mountains in Ilam province, the methanol extract was prepared by soxhle. In vitro antimicrobial activity of the extract against two gram-positive bacteria (*S. aureus* and *Entrococcus faecalis*) and two gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherchia coli*) was tested by the use of disc diffusion method and microdilution (with determination of MIC and MBC). Wound was made on the dorsal surface of therat and wound infections caused by *S.aureus* for determination of in vivo antibacterial effect. Than rats were randomly divided into three groups; control, treated with tetracycline ointment and treated with 10% ointment of *F. fulgens* extract. Finally, wound areas where measured on days 3, 5, 7, 9 and 11.

Results: Average inhibitory zone diameter of methanolic *F. fulgens* extract against *S. aureus* ranged between 11.21 mm to 33.01 mm. According to the wound area on 11th day, it could be concluded that there was a statistically significant difference between the control group (0.63 cm^2) and two treatment groups (0) (*P value*<0.05). There was no significant difference between a group treated with tetracycline ointment and a group treated with 10% ointment of extract.

Discussion and conclusion: According to the results, the methanol extract of *F. fulgens* in the treatment of infections as *S. aureus* can be replaced by chemical antibiotics.

Key words: Ointment tetracycline, *Staphylococcus aureus*, Methanol, Wound, Rat

* Corresponding author
Received: December 1, 2013 / **Accepted:** March 16, 2015

www.SID.ir