Archive of SID

دانشور
پزشکی

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) بر روی بروسلا ملی تنسیس (Rev1) و بروسلا آبورتوس (S19)

نویسندگان: رضا شاپوری[1]، دکتر مرتضی ستاری[2] و دکتر زهیر محمدحسن[3]

۱. کارشناس ارشد گروه باکتری‌شناسی دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس
۲. استادیار گروه باکتری‌شناسی دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس
۳. استاد گروه ایمنی‌شناسی دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوز، بیماری مشترک میان حیوان و انسان است که درمان آن نیاز به استفاده همزمان از دو آنتی‌بیوتیک دارد که برخی از آثار سوء رژیم درمانی نیاز به بررسی و یافتن مواد ضد میکروبی جدید را برای جایگزین‌سازی در رژیم درمانی بروسلوز مطرح می‌کند. سیر دارای ترکیبات مختلفی است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها آلیسین است و مهم‌ترین ماده سیر با فعالیت ضد میکروبی محسوب می‌گردد.

روش بررسی: در این بررسی، ابتدا عصاره کلروفرمی سیر استخراج و پس از تعیین مقدار کمّی آلیسین در آن، حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کم‌ترین غلظت باکتری کشی (MBC) بر روی دو سویه بروسلا ملی تنسیس Rev1 و بروسلا آبورتوس S19 به روش رقت در لوله و انتشار در آگار (روش چاهکی) تعیین شد.

یافته‌ها و بحث: نتایج به‌دست آمده شامل رقت ۱:۱۶۰ عصاره (حاوی غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین) به‌عنوان MIC و رقت ۱:۸۰ عصاره (۲۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر آلیسین) به‌عنوان MBC برای هر دو سویه S19 و Rev1 بود.

واژه‌های کلیدی: بروسلا، آلیسین، ضد میکروبی

دوماهنامه علمی – پژوهشی دانشگاه شاهد
سال دوازدهم – شماره ۵۳
آبان ۱۳۸۳

مقدمه

جنس بروسلا، باکتری‌های گرم منفی هوازی، درون سلولی اختیاری عموماً به‌شکل کوکوباسیل هستند که گونه‌های آن، باعث ایجاد عفونت در پستانداران مختلف می‌شوند. اگرچه عفونت بیش‌تر در بین حیوانات – وحشی و اهلی – دیده می‌شود، ولی بروسلوز، میان انسان و حیوان است و در انسان باعث تب مواج، اندوکاردیت، آرتریت، استئلومیلیت و منتژیت می‌شود که در برخی موارد حتی کشنده است. ایجاد عفونت پایدار از توانایی بقای داخل سلولی باکتری ناشی می‌شود [۳-۱]. بروسلوز از جمله شایع‌ترین بیماری‌های زئونوز محسوب می‌گردد و ایران یکی از مناطق آندمیک این بیماری است. درمان بروسلوز شامل استفاده از داکسی سیکلین به همراه استرپتومایسین و یا تتراسیکلین با ریفامپسین است. در برخی موارد، با عود بیماری، سمیت و آثار جانبی

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی رو به رو هستیم و بیمار باید یک دوره درمانی طولانی مدت را طی کند [۴-۱].

سیر دارای ترکیبات آلی گوگرددار است که بسیار واکنش‌پذیرند و خاصیت ضدمیکروبی وسیع بر روی باکتری‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین دارند. آلیسین یا دی آلیل دی سولفید اکسید مهم‌ترین ترکیب گوگردی سیر با فعالیت ضدمیکروبی است [۵]. هدف از این بررسی، یافتن مواد جدید با فعالیت ضد میکروبی علیه بروسلا بدون داشتن آثار سوء شدید و نیز یافتن مواد پرزرواتیو و نگهدارنده برای مواد غذایی به‌منظور جلوگیری از ابتلا به انواع مختلف عفونت‌های انسانی است که از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند.

۲ـ مواد و روش‌ها

۲ـ۱ـ تهیه سویه‌های باکتری: در این تحقیق از بروسلا ملی تنسیس استرین Rev1 و بروسلا آبورتوس استرین S19 که از انستیتو رازی تهیه گردید استفاده شد. باکتری‌ها پس از کشت بر روی محیط‌های بروسلا براث و آگار، و انجام برخی تست‌های تأییدی (بررسی مورفولوژی باکتری و رنگ‌آمیزی، تست کاتالاز و اکسیداز، اوره آز و مجاورت با سرم رایت مثبت) [۱] در محیط بروسلا براث، حاوی ۲۰-۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۷۰°C- برای کارهای بعدی نگهداری شد.

۲ـ۲ـ تهیه عصاره کلروفرمی سیر: تهیه عصاره کلروفرمی سیر حاوی آلیسین بر طبق منابع [۸-۶] انجام پذیرفت که به‌طور خلاصه، شامل خرد کردن سیر به همراه آب مقطر در مخلوط کن، صاف کردن و سپس افزودن کلروفرم به عصاره آبی در دکانتور، جدا کردن فاز پایینی (فاز کلروفرمی) و قرار دادن آن در دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۵-۴۵ °C برای خالص سازی عصاره و تقطیر کلروفرم بود. سپس عصاره را ۱۸-۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۰ °C برای حذف بقیه کلروفرم قرار دادیم تا در نهایت یک عصاره زرد تا سبز رنگ غلیظ با بوی تند سیر به‌دست آمد.

۲ـ۳ـ تعیین مقدار کمّی آلیسین: مقدار کمی آلیسین استخراج شده توسط کروماتوگرافی با کارآیی بالا (HPLC) انجام گرفت [۹]. در این روش، پس از خرد کردن و انکوباسیون ۱۲ ساعت در ۵۵ °C آنرا آسیاب و ۸ گرم از این پودر را با ۲۰ میلی‌لیتر آب محلول کردیم. پس از سانتریفوژ به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲۵ میلی‌لیتر اسید فرمیک و متانول مخلوط و مجدد سانتریفوژ کردیم (۵ دقیقه با همان دور). از مایع رویی برای HPLC استفاده شد. استاندارد داخلی ۲۰ میلی‌گرم بوتیل پاراهیدروکسی بنزوات (BPB) در یک لیتر حجم مساوی متانول و آب است. با استفاده از فرمول زیر، مقدار کمّی آلیسین محاسبه شد: $\text{Allicin}\% = \frac{s_1 m_2 \times ۲۲/۷۵}{s_2 m_1}$

مقدار ماده مورد آزمایش بر حسب گرم : m_1

سطح زیر منحنی آلیسین: S_1

مقدار BPB برحسب گرم : m_2

سطح زیر منحنی BPB : S_2

۲ـ۴ـ تعیین MIC و MBC عصاره بر روی باکتری: برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارنده از رشد (MIC) و کم‌ترین غلظت باکتری کشی عصاره (MBC) بر طبق استانداردهای میکروب‌شناسی از محیط های مولرهینتون براث و آگار با ۱ درصد هموگلوبین استفاده شد.

در روش رقت در لوله به شیوه ماکرو در مجموع $۵\times۱۰^۵ \text{CFU/ml}$ باکتری به هر لوله تلقیح شد و محیط های کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره، تا ۴ روز در انکوباتور ۳۷ °C به همراه $۷-۱۰\text{CO}_2$ درصد نگهداری شدند و در هر روز از هر لوله بر روی پلیت نیز کشت داده شد [۱۰].

در روش انتشار در آگار بر روی محیط چاهک‌هایی به قطر ۷±۱ میلی‌لیتر حفر شد. پس از کشت باکتری از سوسپانسیون نیم مک فارلند توسط سواب در هر چاهک حدود ۱۰۰ لاندا از رقت‌های مختلف عصاره که در الکل ۹۶ درجه رقیق شده بودند تلقیح شد و یک کنترل برای اثر مهاری الکل نیز در کنار بقیه گذاشته‌شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C به همراه $۷-۱۰\text{CO}_2$ درصد به‌مدت ۵-۴ روز انکوبه [۱۱] و در نهایت هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

۳ـ نتایج

۳ـ۱ـ تعیین مقدارکمّی آلیسین به روش HPLC :

$$\text{Allicin}\% = \frac{s_1 m_2 \times ۲۲/۷۵}{s_2 m_1} = \frac{۷۷۰۰۲۰۰ \times ۰/۰۲۰ \times ۲۲/۷۵}{۲۸۴۶۵۵۳۰ \times ۰/۷۰} = ۰/۱۷ = ۱/۷۶$$

g سیر / mg آلیسین

www.SID.ir

Archive of SID

۳ـ۲ـ نتایج MIC و MBC آلیسین بر روی باکتری

در جدول ۱ نتایج MIC و MBC به روش رقت در لوله آورده شده که MIC عصاره در رقت ۱:۱۶۰ و MBC آن در رقت ۱:۸۰ است. با توجه به مقدارکمّی آلیسین‌به‌دست‌آمده، غلظت‌آلیسین‌در رقت۱:۱۶۰ عصاره (MIC)۱۲۸ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر و در رقت ۱:۸۰ عصاره (MBC) ۲۱۸ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر است. در جدول ۲ قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها آورده شده است.

٤ـ بحث

با توجه به جداول بخش نتایج، کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) برای Rev1 و S19 یکسان و برابر با غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین و حداقل غلظت باکتری کشی نیز برای هر دو سویه برابر با غلظت ۲۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین است. اما در هاله عدم رشد در پلیت دو سویه نتیجه یکسانی از خود نشان ندادند و سویه S19 نسبت به Rev1 حساسیت بیش‌تری نسبت به رقت‌های مختلف عصاره از خود بروز داد که شاید به‌علت تفاوت بین دو سویه و نفوذپذیری عصاره به درون ارگانیسم باشد.

با توجه به غلظت MIC و MBC عصاره این نکته نمایان می‌شود که حتی در غلظت‌های پایین نیز عصاره به‌دست آمده از فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه بروسلا برخوردار است. از طرف دیگر، سیر دارای آثار مفید متعددی است که از جمله می‌توان به آثار آن در کاهش چربی و کلسترول خون اشاره کرد. آلیسین یک ممانعت‌کننده اختصاصی از سنتز استیل‌کوآ و دی‌آلیل دی‌سولفید ممانعت‌کننده ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوتاریل کوآنزیم‌آ است. به این‌ترتیب آلیسین‌و دی‌آلیل دی سولفید مانع بیوسنتز لیپید و کلسترول می‌شوند [۱۲]. سیر سبب رقیق شدن خون، جلوگیری از تصلب شرایین و در نتیجه مانع بروز سکته‌های قلبی و مغزی می‌شود [۱۴-۱۲]. دی سولفیدها و سایر ترکیبات گوگردی حاصل از سیر نقش مهمی در غیرفعال کردن نیتریت‌ها و سایر سموم روده دارند [۱۵].

در مورد آثار ضدمیکروبی سیر می‌توان گفت که سیر یک فعالیت ضد میکروبی با طیف وسیع دارد. سایوام و همکارانش نشان دادند که عصاره کلروفرمی سیر از رشد هلیکوباکتر پیلوری جلوگیری می‌کند [۱۶]. دلاها اثر این عصاره را بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

جدول ۱ اثر رقت‌های مختلف عصاره کلروفرمی بر S19 و Rev1

موارد آزمایش	کنترل مثبت	لوله۱	لوله۲	لوله۳	لوله٤	لوله۵	لوله۶	لوله۷	لوله۹	لوله۹
رقت عصاره	—	۱:۱۰	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰	۱:۱۲۸۰	۱:۲۵۶۰
ایجاد کدورت در لوله (رشد) S19	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+
رشد درساب کالچر روی پلیت (S19)	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+
ایجاد کدورت در لوله (رشد) Rev1	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+
رشد درساب کالچر روی پلیت (Rev1)	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+

جدول ۲ قطر هاله عدم رشد در پلیت (بر حسب سانتی‌متر)

موارد آزمایش	کنترل حلال (الکل °۹۶)	۱چاهک	۲	۳	٤	۵	۶	۷	۸	۹
رقت عصاره	—	۱:۱۰	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰	۱:۱۲۸۰	۱:۲۵۶۰
قطر هاله عدم رشد سویه S19	۱/۴	۸/۶	۸/۱	۶	۵/۴	۴/۱	۳/۷	۳	۲/۵	۱/۹
قطر هاله عدم رشد سویه Rev1	۱/۶	۶/۲	۵	۴	۳/۵	۲/۵	۲/ ۱	۱/۹	۱/۸	۱/۸

www.SID.ir

Archive of SID

[۸] و دشپاند اثر آن‌را بر مایکوباکتریوم آویوم مورد مطالعه قرار دادند [۱۷]. آثار ضدمیکروبی سیر بر سایر باکتری‌ها مانند سودوموناس آئروژینوزا [۶] شیگلا [۷] اشریشیاکلی انتروتوکسینوژن و حتی بر روی قارچ‌ها و ویروس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است [۱۹و۱۸].

لائو و همکارانش [۲۰] نشان دادند که ترکیبات آلی گوگرددار سیر باعث فعال شدن و تنظیم عملکردهای ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T ـ در موش می‌شوند. این عملکرد در تنظیم فعالیت‌های ماکروفاژی و T- سل‌ها باعث فعالیت ضد توموری و نیز تنظیم و افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن، برای مقابله با ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردد. بیماران مبتلا به بروسلوز باید یک دوره طولانی مدت درمانی (حداقل ۴ تا ۸ هفته) را با مصرف دو آنتی‌بیوتیک که معمولاً داکسی‌سیکلین و استرپتومایسین – و یا جنتامایسین است سپری کنند.

مصرف تتراسیکلین‌ها معمولاً باعث ایجاد عوارض گوارشی‌می‌شود و از طرف دیگر مصرف استرپتومایسین نیز آثار سوء متعددی‌برسیستم‌عصبی‌وشنوایی‌دارد. یافتن ماده ضدمیکروبی جدید که بتواند به راحتی بر باکتری اثر کند و آثار ناخواسته نداشته باشد ضروری است.

می‌توان این‌گونه استنباط کرد که سیر و ترکیبات مختلف آن می‌توانند به‌عنوان ماده ضدمیکروبی در درمان بروسلوز به‌کار گرفته شوند. در این بررسی نیز در حالت in vitro نشان داده شد که حتی در رقت‌های پایین، ترکیبات سیر اثر مهاری و کشنده بر روی بروسلا دارند. همچنین به‌عنوان پرزرواتیو و نگهدارنده می‌توان در رقت‌های پایین آن را به برخی از ترکیبات و فرآورده‌های غذایی برای میکروب‌کشی اضافه کرد. سیر فعالیت ضد میکروبی وسیعی دارد و از این‌رو امروزه با توجه به مشکلات عدیده در درمان عفونت‌های مختلف و افزایش روز افزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی همچنین داشتن قدرت درمانی سیر در سایر بیماری‌ها مانند آرترواسکلروز، بیماری‌های قلبی ـ عروقی و سرطان می‌توان نتیجه گرفت که سیرو فرآورده‌های آن را می‌توان برای مقاصد چند در مانی به‌کار برد.

خانم حسامی [۶] در بررسی خود نشان داده است که عصاره کلروفرمی سیر اثر سینرژیسمی با جنتامایسین بر سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد و این نکته خود لزوم استفاده از سیر را در درمان بروسلوز به همراه این آنتی‌بیوتیک می‌رساند. با توجه به مطالعه حاضر که در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت، لازم است نتایج در مدل حیوانی نیز مطالعه و ارزیابی شوند.

منابع

1. Shapiro D.S., and Wong J.D., *Brucella*, In Manual of clinical microbiology, Murrary P.R., Baron E.J;, and et al., 7 th ed., ASM press, 1999.
2. Dornand J.,Gross A., and et al., The innate immune response against *Brucella* in humans, Vet. Microbio, 2002: 90:383-394.
3. Gorvel J.P., Moremo E., *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication, Vet. Microbio, 2002: 90:281–297.
4. Acocella G., Bertrand A., and et al., Comparision of three different regimens in the treatment of acute brucellosis: a multicenter multinational study, J. Antimicrob. Chem, 1990: 23:433-439.
5. Block E., The organosulfur chemistry of the genus Allium-implications for the organic chemistry of sulfur. Angew. Chem. Internal. Edit, 1992: 31(9): 1011-1264.
۶. حسامی. شهره. بررسی تغییرات مورفولوژی و بیوشیمیایی سودوموناس ائروژینوزا در مجاورت عصاره کلروفرمی حاوی آلیسین. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۸.
۷. صابری‌نجفی. محسن. بررسی اثر عصاره کلروفرمی حاوی آلیسین سیر در توکسین زایی شیگلاهای انتروپاتوژن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد باکتری شناسی. دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۷۵.
8. Delaha D.C., Garagusi V.F., Inhibition of *Mycobacterium* by garlic extracts (Allium sativum). Antimicrob. Agents Chemother, 1985: 27(4): 482-486.
9. Block E., Naganthan S., Putman D. Allium Chemistry HPLC Analysis of Thiosulfinates from Onion, Garlic, Wild Garlic, Leek, Scallion, Shallot, Elephant Garlic, Chive and Chinese Chive. J. Agri. Food Chem, 1992: 40:2418-2430.
10. Ahsam M.J., and et al., In vitro activities of five new ntimicrobial agents against *Brucella melitensis*, Antimicrobiel Agents, 1999: 12: 185-186.
11. Igbal Ahmad, Antimicrobial & phytochemical studies on 45 Indian medicianal plants against multi-drug resistant human pathogens, J.Ethnopharmacology, 2001: 74:113-123.
12. Ernst E., Cardiovascular effects of garlic (Allium sativum): A review. Pharmathera, 1987: 5: 83-89.
13. Bordia A., Effect of dietary garlic and onion on serum lipid profile in the jain community. Ind. J. Med. Res., 1979: 69: 776-780.
19. Silagy C.A. & Neil A.W., A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. J.Hyperten, 1994: 12: 463-468.
15. Criss W.E., et al., Inhibition of tumor growth with low dietary protein and with dietary garlic extracts. Fed. Proc, 1982: 41:281.
16. Sivam G.P., Lampe W., Ulness B., Swanzy S.R., *Helicobacter pylori* in vitro suscep tibity to garlic (Allium sativam) extract. Nut.and cancer, 1997: 27(2): 119-121.
17. Deshpande R.G., Khan M.B., Bhat D.A., Indhibition of *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients by garlic (Allium satirum). Antimicrob. Agents chemother, 1993: 32(4): 629-639.
18. Formtling R.A., and Balmer G.S., In vitro effect of aqueas extract of garlic (Allium sativum) on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. Mycolo. 1978: 70:397-405.
19. Weber N.D., Andersoen D.O., North J.A., and et al., In vitro virucidal effects of Allium satiuam (garlic) extract and componds. planta. Med., 1992: 58(s): 417-423.
20. Lau B.H., Yamasaki T., Gridley D.S., Garlic compounds modulate macrophage and T-lymophocyte functions. Mol. Biother, 1991: 3(2):103-107.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir