اثر آنتی باکتریال آلکالوئید استروئیدهای نیشکر، شوکران وعروسک پشت پرده بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت وگرم منفی

غلامرضا طالعی[۱]، محمد هادی مشکوه السادات[۲]، بهرام دلفان[۱]

یافته / سال ششم / شماره ۲۱

چکیده

مقدمه: آلکالوئید ها از مواد بیولوژیکی موثری هستند که در گیاهان از جمله گیاهان داروئی وجود دارند ولذا استخراج وآزمایش اثرات ضد باکتریایی آنها اهمیت فراوانی در پزشکی، صنایع داروئی و غذایی دارد.

مواد و روشها: آلکالوئید استروئید های سه گیاه مهم داروئی نیشکر، شوکران وعروسک پشت پرده استخراج واز نظر اثر مهار رشد (MIC) وکشندگی (MBC) باکتریها با روش برات میکرودایلوشن و دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون وایزوسنسی تست آگار مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج نشان داد که آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از نیشکر برانتروکک فکالیس وباسیلوس سروس اثر مهار کنندگی رشد درغلظت $\mu g / ml$ MIC=۴۰ وکشندگی $\mu g / ml$ MBC= ۶۰۰ دارد. عصارهٔ شوکران نیز در غلظت $\mu g / ml$ MIC=MBC= ۶۰۰ یا کمتر بر اشرشیاکلی، انتروکک فکالیس استاف اپیدرمیدیس وبا سیلوس سروس موثربود. عروسک پشت پرده فقط بر باسیلوس واشرشیا کلی اثر باکتریواستاتیک وباکتریوسیدال داشت و بر باکتری های دیگر مورد آزمایش اثر باکتریوسیدی مشاهده نگردید. تقریبا هیچیک از آلکالوئید استروئیدهای مورد آزمایش بر استاف ارئوس وسودموناس ائروژینوزا اثر آنتی باکتریال نداشتند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج فوق می توان پیشنهاد نمود تا با آزمایش بر حیوانات آزمایشگاهی اثرات in-vitroالکالوئید استروئید های گیاهان فوق را بررسی نمود.

واژه های کلیدی: آنتی باکتریال، گیاهان داروئی،آلکالوئید استروئید

۱- استادیار ـ عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، (دانشکده پزشکی)

۲- استادیار ـ عضو هیئت علمی دانشگاه لرستان، گروه شیمی

www.SID.ir

مقدمه

آلکالوئید استروئیدها یکی از مهمترین ترکیبات آلی نیتروژن دار هستند که داروها و سموم زیادی از آنها ساخته شده است. این مواد بطور طبیعی در گیاهان، میکروبها و موجودات مختلف، بیوسنتز شده و از آنها استخراج می شوند (۱).

پزشکی امروز از آلکالوئید استروئیدها داروهای زیادی برضد درد، سرطان و پارکینسون تهیه می کند و اثرات ایمنومدولاسیون و ضد مالاریای آن نیز گزارش شده است (۳-۱). مطالعه اثرات ضد باکتریائی آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از برگ و پوست ساقه زیتون[1] نشان داده است که این مواد بر باکتریهای گرم مثبت بیشتر موثرند تا بر گرم منفی (۲).

حداقل غلظت تاثیر باکتریواستاتیک آنها براستاف ارئوس برابر با $MIC= ۹۵ \mu g/ml$[2] و اثر باکتریوسیدال آنها نیز $MBC=۱۸۰ \mu g/ml$[3] گزارش شده است(۲). در این مطالعه تجربی، اثرات ضد باکتریائی به وجود آلکالوئیدی بنام کانسین[4] نسبت داده شده است (۲). در مطالعه دیگری آلکالوئیدهای گیاهHydrastis Canadaline به کانادالین[5] و بربرین[6] نسبت داده شده است (۴). در این پژوهش، اثرات ضد باکتریایی آلکالوئید استروئیدهای تام استخراج شده از نیشکر[7]، شوکران[8] و عروسک پشت پرده[9] مورد آزمایش قرار گرفته اند.

مواد و روشها

برای انجام این مطالعه تجربی نیشکر از شادگان جمع آوری و از ساقه آن برای استخراج آلکالوئید استروئید استفاده شد.شوکران از حوالی ازنا جمع آوری وبرگ وگل آن مورد استفاده قرار گرفت. عروسک پشت پرده از حوالی خرم آباد جمع آوری ومیوه وبرگ آن مورد استخراج قرار گرفت. ساقه برگ، گل و میوه گیاهان در سایه خشک و پودر گردید.

ابتدا با متانل در دستگاه سوکسله عصاره آن استخراج ودر خلاء تغلیظ شده سپس با اسید کلریدریک(2M) اسیدی وبا کلروفرم شسته شد تا ترکیبات خنثی آن جدا گردید و سپس کلروفرم تبخیر گردید و رسوب در متانل دوباره حل و با آمونیاک تا PH = ۸/۵بازی گردید.

مجددا با کلروفرم آلکالوئیدهای آن چند بار استخراج گردید. مجموع مواد استخراج شده با آب شستشو شدند وروی سولفات سدیم وخلاء خشک گردید تا آلکالوئید تام بدست آمد.این آلکالوئید مجددا در متانل حل واز فیلتر باکتریولوژیک عبور داده شد تا استریل گردد (۲).

سپس جهت تهیه دیسک برای آزمایش دیسک دیفیوژن (DD)[10] مورد استفاده قرار گرفتند. دیسکها پس از تبخیر متانل، مصرف شدند. برای آزمایش، برات میکرودایلوشن[11] متانل در زیر هود لامینار تبخیر و آلکالوئید استروئید ها در ۹۶٪ سرم فیزیولوژی و ۴٪ متانل بازسازی ومورد آزمایش قرار گرفتند (۲).

آزمایش حداقل غلظت مهار کنندگی(باکتریو استاتیک) (MIC) در پلیت۹۸ خانه استریل (نانک دانمارک)[12] و با روش برات میکرو دایلوشن انجام شد (۵). به این ترتیب که ابتدا از محیط کشت مولرهینتون برات (مرک آلمان) μl ۱۰۰ داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به یک ردیف μl ۱۰۰ عصاره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه دهم رقیق گردید. در ردیف دیگری هم μl ۱۰۰ از آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساین وجنتامایسین مناسب با حساسیت باکتری موردآزمایش اضافه وطبق روش بالا رقیق شد.

1. Holarrhena pubescens
2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
3. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
4. Conessine Conessine
5. Canadaline
6. berberine
7. Saccharum officinarum
8. Olenanthe fistulosa
9. Physalis alkekengi
10. Disk Diffusion test (DD)
11. Broth micro dilution test
12. Nunc Denmark

Archive of SID

www.SID.ir

درآخر به همه چاهک‌ها μl ۱۰۰ سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند[1] (۵) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد، بوسیله پایه پلیت[2] که به همین منظور ساخته شد کف پلیت زیر نور مشاهده شد. وجود کدورت که نشان دهنده رشد باکتری یا عدم رشد آن است. در جدول مخصوص یادداشت گردید. طبق تعریف غلظت آخرین (رقیق ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود معادل MICقرار داده شد. کنترل عصاره آلکالوئید محیط کشت ومیکروب نیز جداگانه منظور گردید.

برای تعیین MBC، μl ۱۰۰ از سه خانه ما قبل خانه MICبه طور جداگانه روی محیط مولر هینتون آگار مرک آلمان کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظت از عصاره آنتی بیوتیک که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد (۵).

جهت آزمایش DD، باکتریها را روی محیط ایزوسنسی تست آگار[3] کشت داده یا دیسک های حاوی عصاره و دیسک های آنتی بیوتیک روی آن قرار داده شد. پس از۲۴ ساعت،قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت با خط کش اندازه گیری و نتایج حاصل از آنتی بیوتیکها را با جداول NCCLS[4] مقایسه گردید.

بجز یک مورد،همه باکتریهایی مورد استفاده در این آزمایش ها، باکتریهایی استانداردارای کد از ATCC[5] بودند. از نظر آماری همه آزمایش ها سه بار تکرار شدند و متوسط (میانگین حسابی) نتایج آنها محاسبه و ارائه گردیدند.

یافته ها

آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از نیشکر، شوکران و عروسک پشت پرده در آزمایشات باکتریولوژیک برات میکرودایلوشن، دیسک دیفیوژن بر علیه شش باکتری استاندارد مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج آن ارائه گردیده اند (جداول ۱و۲). آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از نیشکر در رقت پایین $\mu g / ml$ ۴۰ =MIC بر باسیلوس سروس و انتروکک فکالیس اثرباکتریواستاتیک نشان دادکه قابل توجه می باشد. اثر کشندگی این مواد براین دو باکتری در غلظت $\mu g / ml$ MBC=۶۰۰ مشاهده گردید.

همچنین در غلظت $\mu g / ml$ MIC=۱۵۰ رشد استاف اپیدرمیس را نیز متوقف نمود؛ اما در غلظت مورد آزمایش اثر آنتی باکتریال آلکالوئید استروئید نیشکر بر اشرشیاکلی، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوکک ائروس مشاهده نگردید (جدول ۲).

شوکران نیز اثر آنتی باکتریال بر باسیلوس سروس، استاف اپیدرمیدیس و انتروکک فکالیس از خود نشان داد. اثر باکتریواستاتیک $\mu g / ml$ MIC=۱۵۰ بر استاف اپیدرمیدیس و باسیلوس سرویس مشاهده گردید که همراه با اثر باکتریوسیدل $\mu g / ml$ MBC=۶۰۰ برایند و باکتری همراه بود (جدول ۲،۱).

جدول شماره ۱ـ تعیین متوسط (n=۳) غلظت MIC و MBC آلکالوئید استروئیدهای استخراجی از نیشکر،عروسک پشت پرده وشوکران برکوکسی های گرم مثبت (میکروگرم درمیلی لیتر)

	استاف ارئوس ATCC25923		استاف اپیدرمیدیس ATCC 1228		انتروکک فکالیس ATCC 29212	
آلکالوئید استروئید	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
نیشکر	>۶۰۰*	>۶۰۰	۱۵۰	>۶۰۰	۴۰	>۶۰۰
شوکران	>۶۰۰	>۶۰۰	۱۵۰	۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰
عروسک پشت پرده	>۶۰۰	>۶۰۰	۱۵۰	>۶۰۰	۱۵۰	>۶۰۰
سیپروفلوکساین	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۴۹	۰/۱۷	۰/۴۹

*غلظت بیشتر از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آزمایش نگردید.

1. Mc Farland 0.5 Standar
2. Tray – reading stand
3. Isosensitest agar
4. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)
5. American Type and Culture Collection (ATCC)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۲ـ تعیین متوسط (n=۳) غلظت MIC و MBC آلکالوئید استروئیدهای استخراجی از نیشکر، عروسک پشت پرده و شوکران بر باسیلهای گرم منفی و گرم مثبت (میکروگرم در میلی لیتر)

آلکالوئید استروئید	اشرشیاکلی ATCC25923		سودوموناس ائروژینوزا ATCC 1228		باسیلوس سروس	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
نیشکر	۱۵۰	>۶۰۰*	>۶۰۰	>۶۰۰	۴۰	۶۰۰
شوکران	۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	>۶۰۰	۱۵۰	۶۰۰
عروسک پشت پرده	۱۵۰	۶۰۰	>۶۰۰	>۶۰۰	۱۵۰	۱۵۰
سیپروفلوکساسین	۰/۰۸	۰/۴۸	۹۵/۱	۱/۹۵	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
جنتامایسین	–	–	۰/۰۵	۰/۰۵	–	–

* غلظت بیشتر از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آزمایش نگردید.

آلکالوئید استروئیدهای استخراجی از عروسک پشت پرده نیز اثر آنتی باکتریال داشتند، بطوریکه درغلظت $MIC=۱۵۰\ \mu g/ml$ رشد چهار باکتری اشرشیاکلی، استاف اپیدرمیدیس، انتروکک فکالیس و باسیلوس سروس را متوقف نمود (جدول۱و۲). بعلاوه اثر باکتریوسیدال آنها بر اشرشیاکلی، باسیلوس سروس نیز در غلظت $۶۰۰\ \mu g/ml$ =MBC نیز مشاهده شد (جدول ۱و۲). اثر آنتی باکتریال این گیاه با روش دیسک دیفیوژن نیز قابل مشاهده بود به طوریکه هاله مهار رشد برابر با ۱۰ میلیمتر در اطراف کلنی باسیلوس سروس مشاهده گردید.

در آزمایش با روش دیسک دیفیوژن، هاله عدم رشد به قطر ۱۰ میلیمتر در اطراف دیسک حاوی عصارهٔ عروسک پشت پرده مشاهده شد. برای سایر آلکالوئید استروئیدها هاله عدم رشد مشاهده نگردید. در همین آزمایش هاله عدم رشد در اطراف دیسک های کنترل یعنی سیپروفلوکساسین ۲۵ میلیمتر، تتراسایکلین ۲۲میلیمتر و جنتامایسین ۱۸ میلیمتر بود.

بحث

آلکالوئید استروئیدهای استخراجی از ساقه نیشکر در غلظت پائین بر رشد انتروکک فکالیس و باسیلوس سروس اثر مهارکنندگی و کشندگی قابل ملاحظه‌ای داشت. اثر مهار کنندگی بر اشرشیاکلی و استاف اپیدرمیدیس نیز در غلظت کمی بالاتر نیز مشاهده شد (جدول ۲،۱). شوکران نیز اثر آنتی باکتریال متوسطی بر استاف اپیدرمیدیس و باسیلوس سروس داشت که این اثر بر انتروکک فکالیس و اشرشیاکلی کمتر مشاهده شد (جدول ۲،۱).

عروسک پشت پرده بر باسیلوس سروس اثر باکتریو استاتیک و کشندگی که مقادیر $۱۵۰\ \mu g/ml$ برای هر دو شاخص یکسان بود. این اثر با روش دیسک دیفیوژن نیز مشاهده گردید. هر چند اثر باکتریواستاتیک متوسطی از آلکالوئید استروئیدهای این گیاه بر روی بعضی از باکتریها مشاهده شد؛ اما در مقادیر آزمایش شده آلکالوئیدهای عروسک پشت پرده بر بیشتر باکتریها اثر باکتریوسیدال نداشت (جدول ۲،۱).

در بررسی مقالات منتشر شده گزارشی از اثر آنتی باکتریال این گیاهان ملاحظه نگردید. اثرات تحریک ایمنی مواد استخراجی از قند بر روی موش مشاهده شده است (۶). عصاره آبی استخراج شده از میوه عروسک پشت پرده دارای مواد آنتاگونیست استروژن میباشد (۷).در مقایسه با آلکالوئید استروئیدهای گیاهان داروئی گزارش شده (۲، ۳، ۴)، اثرات ضد باکتریایی گیاهان مورد آزمایش نیز بیشتر بر باکتریهای گرم مثبت قابل مشاهده بود تا گرم منفی. همچنین اثر باکتریواستاتیک نیز فراوانتر و قویتر از باکتریوسیدال مشاهده میشود. روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با دو روش دیگر کمتر حساس و اختصاصی بوده و لذا به تنهائی مورد استناد نمی باشد. تعیین ترکیب و درصد آلکالوئید استروئیدهای مورد آزمایش نیازمند استفاده از روشهای HPLC وGC/MS است که در گزارشات در دسترس ترکیبات مذکور ملاحظه نشده است. اثرات سینرژیستیک بین آلکالوئیدهای گیاهان گزارش شده است (۴). با توجه به مصرف عمومی طولانی مدت نیشکر در انسان، استخراج و خالص سازی آلکالوئیدهایی

Archive of SID

www.SID.ir

آن و بررسی اثرات متقابل آنها و آزمایش بالینی آنها در درمان عفونتهای بعضی از باکتریها مانند عفونتهای مقاوم به آنتی بیوتیک انتروکک فکالیس بسیار مفید می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری خانم مهین بهزادی و آقای اسماعیل رادسری تشکر و قدردانی می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Rathbone DA, Bruce NC. Microbial transformation of alkaloids. Current Opinion in Microbiology, 2002; 5 : 274 – 281
2. Chakraborty A, Brantner AH. Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of Holarrhena pubescens. J of Ethnopharmacol 1999; 68: 339 – 344
3. Brantner A, Chakraborty A. In vitro antibacterial activity of alkaloids isolated from Adhatoda vasica Ness. Pharm. Pharmacol 1998; 8: 137-139
4. Scazzocchio F, Cometa M, Tomassini L. Antibacterial activity of hydrostis canadensis extract and its major isolated alkaloids. Planta Medica 2001; 67 : 561 – 564
5. Mahon CR, Manoselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. chapter 3, 2nd Ed, W.B Saunders Company, 2003: 62–95
6. Amer S, Na K, El-Abasy M. Immunostimulating effects of suger can extracton X-ray-radiation induced immunosuppression in the chicken. Int, Immunopharmacol, 2004; 4:71-77
7. Vessal M, Yazdanian M. Presence of an estrogen antagonist in the aqueous extract of Physalis Alkekengi. Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol, 1995; 112 : 229-236

Archive of SID

www.SID.ir