

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

غلامرضا طالعی^۱، محمد هادی مشکوه السادات^۲، بهرام دلفان^۱

یافته / سال ششم / شماره ۲۱

چکیده

مقدمه: آلکالوئیدها از مواد بیولوژیکی موثری هستند که در گیاهان از جمله گیاهان دارویی وجود دارند و لذا استخراج و آزمایش اثرات ضد باکتریایی آنها اهمیت فراوانی در پزشکی، صنایع دارویی و غذایی دارد.

مواد و روشها: آلکالوئید استروئیدهای سه گیاه مهم دارویی نیشکر، شوکران و عروسک پشت پرده استخراج و از نظر اثر مهار رشد (MIC) و کشندگی (MBC) باکتریها با روش برات میکرودايلوشن 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 فکالایس و باسیلوس سروس اثر مهار کنندگی رشد درغلظت $MIC=40 \mu g/ml$ و کشندگی $MBC=600 \mu g/ml$ دارد. عصاره شوکران نیز در غلظت $MIC=MBC=600 \mu g/ml$ یا کمتر بر اشرشیاکلی، انتروکک فکالایس استاف اپیدرمیدیس و باسیلوس سروس موثر بود. عروسک پشت پرده فقط بر باسیلوس و اشرشیا کلی اثر باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال داشت و بر باکتریهای دیگر مورد آزمایش اثر باکتریوسیدی مشاهده نگردید. تقریباً هیچیک از آلکالوئید استروئیدهای مورد آزمایش بر استاف ارتوس و سودوموناس ائروژینوزا اثر آنتی باکتریال نداشتند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج فوق می توان پیشنهاد نمود تا با آزمایش بر حیوانات آزمایشگاهی اثرات *in-vitro* آلکالوئید استروئیدهای گیاهان فوق را بررسی نمود.

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

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

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

مقدمه

ابتدا با متانل در دستگاه سوکسله عصاره آن استخراج و در خلاء تغلیظ شده سپس با اسید کلریدریک (2M) گردید و 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 $\text{PH} = 8/5$ بازی گردید.

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

سپس جهت تهیه دیسک برای آزمایش دیسک دیفیوژن (DD)^۱ مورد استفاده قرار گرفتند. دیسکها پس از تبخیر متانل، مصرف شدند. برای آزمایش، برات میکروداپلوشن^{۱۱} متانل در زیر هود لامینار تبخیر و آلکالوئید استروئیدها در ۹۶٪ سرم فیزیولوژی و ۴٪ متانل بازسازی و مورد آزمایش قرار گرفتند (۲).

آزمایش حداقل غلظت مهار کنندگی (باکتریو استاتیک) (MIC) در پلیت ۹۸ خانه استریل (نانک دانمارک)^{۱۲} و با روش برات میکرو داپلوشن انجام شد (۵). به این ترتیب که ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک آلمان) $100 \mu\text{l}$ داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به یک ردیف $100 \mu\text{l}$ عصاره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه دهم رقیق گردید. در ردیف دیگری هم $100 \mu\text{l}$ از آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساین و جنتامایسین مناسب با حساسیت باکتری مورد آزمایش اضافه و طبق روش بالا رقیق شد.

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 ایمنومودولاسیون و ضد مالاریای آن نیز گزارش شده است (۱-۳). مطالعه اثرات ضد باکتریایی آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از برگ و پوست ساقه زیتون^۱ نشان داده است که این مواد بر باکتریهای گرم مثبت بیشتر موثرند تا بر گرم منفی (۲).

حداقل غلظت تاثیر باکتریواستاتیک آنها بر استاف ائروس برابر با $\text{MIC} = 95 \mu\text{g/ml}$ و اثر باکتریوسیدال آنها نیز $\text{MBC} = 180 \mu\text{g/ml}$ گزارش شده است (۲). در این مطالعه تجربی، اثرات ضد باکتریایی به وجود آلکالوئیدی بنام کانسین^۴ نسبت داده شده است (۲). در مطالعه دیگری آلکالوئیدهای گیاه *Hydrastis Canadalis* به کانادالین^۵ و بربرین^۶ نسبت داده شده است (۴). در این پژوهش، اثرات ضد باکتریایی آلکالوئید استروئیدهای تام استخراج شده از نیشکر^۷، شوکران^۸ و عروسک پشت پرده^۹ 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 و برگ و گل آن مورد استفاده قرار گرفت. عروسک پشت پرده از حوالی خرم آباد جمع آوری و میوه و برگ آن مورد استخراج قرار گرفت. ساقه برگ، گل و میوه گیاهان در سایه خشک و پودر گردید.

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

آن ارائه گردیده اند (جدول ۱ و ۲). آلکالوئید استروئیدهای استخراج شده از نیشکر در رقت پایین $40 \mu\text{g/ml}$ MIC= بر باسیلوس سروس و انتروکوک فکالیس اثرباکتریواستاتیک نشان داد که قابل توجه می باشد. اثر کشندگی این مواد بر این دو باکتری در غلظت $\mu\text{g/ml}$ MBC=۶۰۰ مشاهده گردید.

همچنین در غلظت $\text{MIC}=150 \mu\text{g/ml}$ رشد استاف اپیدرمیدیس را نیز متوقف نمود؛ اما در غلظت مورد آزمایش اثر آنتی باکتریال آلکالوئید استروئید نیشکر بر اشرشیاکلی، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوکوک ارئوس مشاهده نگردید (جدول ۲).

شوکران نیز اثر آنتی باکتریال بر باسیلوس سروس، استاف اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس از خود نشان داد. اثر باکتریواستاتیک $\text{MIC}=150 \mu\text{g/ml}$ بر استاف اپیدرمیدیس و باسیلوس سرویس مشاهده گردید که همراه با اثر باکتریوسیدل $\text{MBC}=600 \mu\text{g/ml}$ بر ایند و باکتری همراه بود (جدول ۲، ۱).

جدول شماره ۱- تعیین متوسط ($n=3$) غلظت MIC و MBC آلکالوئید استروئیدهای استخراجی از نیشکر، عروسک پشت پرده و شوکران بر کوکسی های گرم مثبت (میکروگرم در میلی لیتر)

انتروکوک فکالیس ATCC 29212 MBC MIC	استاف اپیدرمیدیس ATCC 1228 MBC MIC		استاف ارئوس ATCC25923 MBC MIC		آلکالوئید استروئید
	>600 40	>600 150	>600 >600*	>600 >600	
600 600	600 150	>600 >600	>600 >600	شوکران	
>600 150	>600 150	>600 >600	>600 >600	عروسک پشت پرده	
0/49 0/17	0/49 0/12	0/05 0/04	0/05 0/04	سیپروفلوکساین	

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

در آخر به همه چاهکها $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند^۱ (۵) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد، بوسیله پایه پلیت^۲ 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 MIC قرار داده شد. کنترل عصاره آلکالوئید محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور گردید.

برای تعیین MBC، $100 \mu\text{l}$ از سه خانه ما قبل خانه MIC به 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^۳ کشت داده یا دیسک های حاوی عصاره و دیسک های آنتی بیوتیک روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت با خط کش اندازه گیری و نتایج حاصل از آنتی بیوتیکها را با جدول NCCLS^۴ مقایسه گردید.

بجز یک مورد، همه باکتریهای مورد استفاده در این آزمایش ها، باکتریهای استاندارد دارای کد از ATCC^۵ 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 میکروداپلوشن، دیسک دیفیوژن بر علیه شش باکتری استاندارد مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج

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)

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 $150 \mu\text{g/ml}$ 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 دارویی 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 تنهایی مورد استناد نمی باشد. تعیین ترکیب و درصد آلکالوئید استروئیدهای مورد آزمایش نیازمند استفاده از روشهای HPLC و GC/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

جدول شماره ۲- تعیین متوسط ($n=3$) 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 اتروژینوزا ATCC 1228		باسیلوس سروس	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
نیشکر	۱۵۰	>۶۰۰*	>۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۴۰
شوکران	۶۰۰	۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	۱۵۰
عروسک پشت پرده	۱۵۰	۶۰۰	>۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۱۵۰
سیپروفلوکساسین	۰/۰۸	۰/۴۸	۱/۹۵	۹۵/۱	۰/۰۲	۰/۰۲
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 در غلظت $MIC=150 \mu\text{g/ml}$ رشد چهار باکتری اشرشیاکلی، استاف اپیدرمیدیس، انتروکک فکالیس و باسیلوس سروس را متوقف نمود (جدول ۱ و ۲). بعلاوه اثر باکتریوسیدال آنها بر اشرشیاکلی، باسیلوس سروس نیز در غلظت $600 \mu\text{g/ml}$ = MBC نیز مشاهده شد (جدول ۱ و ۲). 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 عصاره 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 ۲۲ میلیمتر 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 ملاحظه ای داشت. اثر

تشکر و قدردانی

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

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

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 *Hydrocotyle 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 sugar cane extract on X-ray-radiation induced immunosuppression in the chicken. *Int, Immunopharmacol*, 2004; 4:71-77
7. Vessal M, Yazdani M. Presence of an estrogen antagonist in the aqueous extract of *Physalis Alkekengi*. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*, 1995; 112 : 229-236