

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۳۰۹-۳۲۱ (۱۳۹۳)

بررسی علت خاصیت ضد میکروبی پایین چند آلکالوئید گیاهی (نوسکاپین، کافئین و وینکامین) بر روی سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا با مقاومت چند دارویی (MDR)

آسیه آوخ^{۱*}، کرامت‌الله رضایی^۲ و جلیل وندیوسفی^۳

*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، پست الکترونیک: a_avakh@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰

چکیده

اغلب ترکیب‌های گیاهی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص علیه باکتریهای گرم منفی، خاصیت ضد میکروبی بسیار پایین‌تری دارند (MIC = ۱۰۰-۱۰۰۰ μg/ml). امروزه دانشمندان معتقدند که پمپ‌های افلوکسی باکتریایی مسئول این مشکل هستند. این پروتئین‌های غشایی قادر به شناسایی و خروج ترکیب‌های ضد میکروبی مختلف از جمله ترکیب‌های گیاهی با ساختارهای شیمیایی گوناگون از داخل سلول می‌باشند و متعاقباً منجر به بروز مقاومت باکتریها در برابر این مواد می‌گردند. هدف از این تحقیق بررسی علت اصلی خاصیت ضد میکروبی پایین آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین علیه سودوموناس آئروجینوزا (نماینده باکتریهای گرم منفی با مقاومت بالای دارویی) بوده است. اغلب آلکالوئیدها جزء فیتوالکسین‌های گیاهی هستند که مقدار آنها در هنگام تهاجم میکروبی افزایش می‌یابد، بدین معنی که عملاً دارای خاصیت ضد میکروبی هستند، اما آلکالوئیدهای مورد استفاده در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی هیچ خاصیت ضد میکروبی از خود نشان نمی‌دهند. اثر ضد میکروبی ذاتی (واکنش بین آلکالوئیدها و فنیل آلانین- آرژنین بتانفتیل‌آمید (PABN) (مهارکننده پمپ‌های افلوکسی باکتریهای گرم منفی)) و خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی (سینرژی بین آلکالوئیدها و لوفلوکسازین (سوبسترای پمپ‌های افلوکسی موجود در سودوموناس آئروجینوزا)) آلکالوئیدهای این تحقیق به وسیله آزمایش تیتراسیون چکربرد بررسی شد. نتایج نشان داد که کافئین و وینکامین ذاتاً مواد ضد میکروبی گیاهی هستند. به طوری که با مختل کردن پمپ افلوکسی MexAB-OprM در سویه بسیار مقاوم nalB سودوموناس آئروجینوزا توسط PABN، خاصیت ضد میکروبی کافئین و وینکامین به ترتیب به مقادیر قابل توجه ۱۷ و ۸ برابر افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت پمپ‌های افلوکسی باکتریایی مهمترین عامل در تضعیف خاصیت ضد میکروبی ترکیب‌های گیاهی می‌باشند؛ البته به نظر می‌رسد با مهار فعالیت این پمپ‌ها بتوان عملکرد بالینی این مواد طبیعی را به طور قابل توجهی بهبود بخشید و بدین طریق امید داشت که مواد گیاهی نیز همانند آنتی‌بیوتیک‌ها به زمینه درمان بالینی راه یابند.

واژه‌های کلیدی: نوسکاپین، کافئین، وینکامین، پمپ افلوکسی، مهارکننده پمپ‌های افلوکسی.

مقدمه

ممانعت کننده از رشد میکروارگانیسم‌ها (اغلب ترکیب‌های گیاهی برابر ۱۰۰-۱۰۰۰ μg/ml می‌باشد که این مقدار به مراتب بیشتر از MIC آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده‌ای است که توسط باکتریها و قارچ‌ها تولید می‌شود (MIC = ۰/۰۱-۱۰ μg/ml)، در نتیجه بیشتر مواد گیاهی

گیاهان تعداد زیادی متابولیت ثانویه تولید می‌کنند که معمولاً بیشتر آنها برای محافظت از گیاه در برابر پاتوژن‌های میکروبی بکار می‌روند (Dangl & Jones, 2001; Yamane et al., 2010). MIC (حداقل غلظت

باکتریهای گرم منفی شایع ترند (Daugelavicius *et al.*, 2010؛ Westholm *et al.*, 2010). امروزه علت اصلی مقاومت بالای میکروارگانیزمها به بیشتر مواد ضد میکروبی و بالا بودن MIC این ترکیبها و ناکارآمدی آنها در از بین بردن پاتوژنهای مختلف را به فعالیت پمپهای افلوکسی در آنها نسبت می دهند (Webber & Piddock, 2003).

آنها برای اثبات فرضیه خود از فیل آلانین - آرژینین بتانفتیل آمید (Phe-Arg β -naphthylamide) PA β N با نام قبلی (MC-207,110)، مهارکننده سنتزی پمپهای افلوکسی باکتریهای گرم منفی (Lomovskaya *et al.*, 2001) و INF271، مهارکننده پمپهای افلوکسی موجود در باکتریهای گرم مثبت استفاده کردند (Tegos *et al.*, 2008). با سنجش MIC تعدادی از ترکیبهای گیاهی شناخته شده بر روی گروهی از پاتوژنهای انسانی و گیاهی مشاهده کردند که هنگام استفاده همزمان مهارکنندههای پمپهای افلوکسی با ترکیبهای گیاهی، MIC تمامی آنها در برابر پاتوژنهای مختلف به خصوص باکتریهای گرم منفی بشدت کاهش یافت و خاصیت ضد میکروبی نهفته آنها پدیدار گردید. به عنوان مثال فعالیت ضد میکروبی رین (Rhein) استخراج شده گیاه ریواس (*Rheum officinalis*) هنگام استفاده همزمان با مهارکنندههای پمپهای افلوکسی در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ (باتوجه به نوع باکتری) برابر افزایش یافت. همچنین فعالیت ضد میکروبی ترکیبهای گیاهی دیگری مانند پلومباگین (Plumbagin)، گوسی پول (Gossypol)، رزوراترول (Resveratrol)، کومسترو (Coumestrol) و بربرین (Berberine) نیز بر علیه اغلب پاتوژنهای بالینی و گیاهی بشدت افزایش یافت (Tegos *et al.*, 2002). بنابراین می توان نتیجه گرفت که گیاهان برای وارد کردن مواد ضد میکروبی خود به داخل سلول، پاتوژنهایشان دارای تمهیداتی هستند که به این ابزارهای مفید، مهارکنندههای پمپهای افلوکسی باکتریایی می گویند (Tegos *et al.*, 2002).

در پاسخ به سؤال مطرح شده در سطرهای پیشین، باید گفت که در داخل گیاهان ترکیبهایی به صورت همکار با مواد ضد میکروبی عمل می کنند و مسئول مختل کردن عملکرد پمپهای افلوکسی پاتوژنهای گیاهی هستند، ولی در شرایط آزمایشگاهی این همکار حذف می شود. در نتیجه با استفاده همزمان یک مهارکننده مناسب پمپهای

خاصیت ضد میکروبی ضعیفی دارند و به همین دلیل است که این ترکیبها تا به امروز نتوانسته اند جایگزین آنتی بیوتیکها شوند (Tegos *et al.*, 2002؛ De Villiers *et al.*, 2010؛ Adebayo & Krettli, 2011).

به طور کلی ترکیبهای گیاهی به دو گروه عمده فیتوآنتی سبینها (Phytoanticipins) و فیتوآلکسینها (Phytoalexins) طبقه بندی می شوند. فیتوآنتی سبینها در شرایط نرمال در گیاهان یافت می شوند، اما مقدار فیتوآلکسینها به هنگام پاسخ به تهاجم میکروبی به شدت افزایش می یابد (Jones & Dangl, 2006).

موتانتهایی از گیاهان که توان تولید یک فیتوآلکسین خاص را ندارند نسبت به گونه های نوع وحشی، به پاتوژنهای میکروبی حساسیت بالاتری نشان می دهند، به عنوان مثال موتانتهایی از گیاه جو (*Hordeum vulgare*) که توانایی تولید ماده آوناسین A-1 (Avenacin A-1) را ندارند به تعداد زیادی از پاتوژنهای قارچی حساسیت نشان می دهند (Papadopoulou *et al.*, 1999). دانشمندان با آزمایش آوناسین A-1 در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بر روی پاتوژنهای قارچی مختلف، دریافتند که به رغم خاصیت ضد میکروبی حتمی در شرایط داخل گیاه (in vivo)، این ماده هیچ گونه اثر ضد میکروبی در شرایط in vitro از خود نشان نمی دهد (Carter *et al.*, 1999). حال در اینجا این سؤال پیش می آید که چگونه یک ترکیب خاص در داخل گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی است، ولی به محض استخراج از گیاه این خاصیت را از دست می دهد؟ Tegos و همکاران (۲۰۰۲) بر آن شدند که به پاسخ این سؤال پی ببرند، فرضیه آنها این بود که پمپهای افلوکسی موجود در میکروارگانیزمها مسئول وجود چنین مقاومتی در برابر مواد ضد میکروبی گیاهی هستند. پمپهای افلوکسی، پروتئینهای موجود در غشاهای سلولی هستند که با صرف انرژی، سبب خروج مواد ضد میکروبی از داخل به محیط خارج سلول میکروارگانیزمها می شوند و با این عمل مانع تجمع مواد ضد میکروبی و رسیدن به هدفهایشان در داخل سلول می شوند (Li & Nikaido, 2009؛ Trepout *et al.*, 2010). پمپهای نامبرده از نظر ساختمانی به ۵ خانواده مختلف تقسیم بندی می شوند که خانواده بزرگ MF (Major facilitator (Mf) superfamily) در باکتریهای گرم مثبت و خانواده RND (Resistance nodulation division (RND) family) در

شده سبب افزایش اثر تعداد وسیعی از مواد ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌ها در برابر باکتریهای گرم مثبت به خصوص سویه‌های مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس می‌شوند، ولی کوچکترین اثری علیه باکتریهای گرم منفی از خود نشان نمی‌دهند (Lewis, 2001؛ Sibanda & Okoh, 2007؛ Garvey et al., 2011). تاکنون تحقیقات بیشماری برای بدست آوردن مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی باکتریهای گرم منفی صورت گرفته‌است، ولی تعداد ترکیب‌های گیاهی که قادر به مهار چنین پمپ‌هایی در باکتریهای گرم منفی باشند بسیار اندک هستند. همچنین با توجه به تمام داده‌های پیشین هنوز هیچ مهارکننده پمپ‌های افلوکسی چه با منشأ گیاهی و چه سنتزی وارد بازار دارویی نشده‌است، زیرا دوز مورد نیاز برای اعمال اثر آنها برای ارگان‌های انسان بسیار سمی می‌باشد (Stavri et al., 2007). Pidcock و همکاران (۲۰۱۰) ثابت کردند که ترکیب‌های آروماتیک دارای نیتروژن (هتروسیکلیک) معمولاً کاندیدای مناسبی به‌عنوان مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی خانواده RND هستند.

هدف از انجام این تحقیق نیز بررسی علت خاصیت ضد میکروبی پایین آلکالوئیدهای گیاهی نوسکاپین، کافئین و وینکامین علیه سویه‌های مختلف و مقاوم سودوموناس آروجینوزا بوده‌است. هر ۳ آلکالوئید ذکر شده دارای خاصیت ضد میکروبی بسیار کمی بر روی بیشتر باکتریهای گرم منفی هستند و با توجه به توضیحات پیشین علت احتمالی آن می‌تواند به دو دلیل زیر باشد.

۱- هر سه دارای اثر ضد میکروبی بالقوه هستند ولی توسط پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریایی که بر روی آنها آزمایش شده‌اند، غیر فعال می‌شوند.

۲- و یا خود دارای اثر مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی باکتریایی هستند (یک مهار کننده پمپ‌های افلوکسی باکتریایی خود به خود خاصیت ضد میکروبی ندارد ولی زمانی که به همراه یک ماده ضد میکروبی استفاده شود، قدرت کشندگی آن ماده را افزایش می‌دهد) (Kamicker et al., 2008). بنابراین هدف این مطالعه بررسی هر دو امکان فوق‌الذکر بود. تمرکز این مطالعه بر روی ترکیب‌هایی بود که پس از حمله میکروبی در گیاه تولید می‌شوند (فیتوآلکسین‌ها)، که یکی از مهمترین فیتوآلکسین‌ها و آلکالوئیدها هستند (Tegos et al., 2002). علت دیگر انتخاب آلکالوئیدهای گیاهی در این تحقیق وجود حلقه‌های آروماتیک نیتروژن‌دار در این مواد بوده‌است (شکل ۱). لازم به ذکر است

افلوکسی به همراه مواد ضد میکروبی گیاهی امید آن می‌رود که این مواد بتوانند به رقابت با آنتی بیوتیک‌های گسترده طیف رایج کنونی بپردازند (Gibbons, 2008؛ Ettefagh et al., 2011). گیاهان خانواده زرشک به همراه بربرین (آلکالوئید معروف با خاصیت ضد میکروبی)، دو ماده دیگر به نام‌های '۵-متوکسی هیدنوکاربین (-5' MHC-D: 5'-methoxyhydnocarpin-D Stermitz et al., 2000a) نیز تولید می‌کنند (Pheophorbide A) MIC بربرین به همراه هر یک از این مواد بر علیه سویه‌ای از استافیلوکوکوس اورئوس با افزایش بیان در پمپ NorA (از مهمترین پمپ‌های افلوکسی عامل مقاومت به مواد ضد میکروبی در این باکتری) بشدت کاهش می‌یابد (از ۲۵۶ μg/ml به ۱۶ μg/ml) (Stermitz et al., 2000b؛ Stermitz et al., 2001)، در نتیجه هر دو ماده اشاره شده دارای خاصیت مهارکنندگی فعالیت پمپ‌های افلوکسی باکتریایی هستند. امروزه دانشمندان موفق به استخراج مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی میکروبی مختلفی از منابع گیاهی گوناگون شده‌اند که در ادامه به تعدادی از مهمترین این مهارکننده‌ها اشاره خواهیم کرد.

آلکالوئید رزپین (Reserpine) برگرفته از ریشه گیاه *Rauwolfia vomitoria* دارای اثر مهاری بر روی پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریهای باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنمونیه می‌باشد (Gibbons & Udo, 2000). رزپین با مهار پمپ افلوکسی NorA در استافیلوکوکوس اورئوس سبب افزایش فعالیت آنتی بیوتیک‌هایی مانند نورفلوکسازین، تتراسایکلین، سیپروفلوکسازین، موکسی فلوکسازین و اسپارفلوکسازین علیه این باکتری می‌شود (Gibbons et al., 2003). مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی دیگری نیز از گیاهانی مانند ماریتغال (*Silybum marianum* (L.) gaertn)، گندواش (*Artemisia annua*)، باقالای گرگی (*Lupinus argenteus*)، شمعدانی (*Geranium caespitosum*)، کهور پاکستانی (بیعار) (*Prosopis juliflora*)، چای (*Camellia sinensis*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، فراسیون آبی (*Lycopus europaeus*)، آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و دارابی (گریپ فروت) (*Citrus paradisi*) یافت شده‌اند (Stavri et al., 2007). تمام ترکیب‌های ذکر

PAβN (با درصد خلوص ۹۸/۰٪ (HPLC) و حلال DMSO) از شرکت سیگمای آلمان، آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین (با توان (potency) = ۹۸۰ μg/ml) و حلال آب مقطر + چند قطره NaOH (۸/۰ mol/L)) از شرکت سروای آمریکا و محیط‌های کشت BHI و MHB و همچنین دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک آلمان خریداری گردیدند. لووفلوکساسین و نوسکاپین در ۴°C، PAβN در ۲۰°C- و آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین در دمای اتاق نگهداری شدند.

تعیین MIC آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین علیه سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق

برای اطمینان از نداشتن خاصیت ضد میکروبی آلکالوئیدهای گیاهی بر روی سویه‌های انتخابی این تحقیق، میزان MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی ۴ سویه سودوموناس آئروجینوزا از طریق روش رقت‌سازی در برات (مولر هینتون برات غنی شده با کاتیون‌های کلسیم و منیزیم (CAMHB) برای تقلید از شرایط موجود در سرم انسان) در میکروتیتر پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل مخصوص کشت باکتری و به روش استاندارد شرح داده شده توسط انستیتوی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد. به دلیل اینکه مقدار ۵٪ (v/v) از حلال DMSO سبب جلوگیری از رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا می‌شود (Kuete et al., 2011) و برای پرهیز از این اثر نامطلوب، در ابتدا استوکی غلیظ‌تر (۱۰ برابر غلیظ‌تر) از بیشترین رقت در نظر گرفته و برای آزمایش MIC هر یک از این آلکالوئیدها در حلال‌های مربوطه آنها آماده گردید، بدین طریق حتی بیشترین غلظت باقی مانده از DMSO بعد از رقیق شدن توسط محیط کشت نیز قادر به جلوگیری از رشد باکتریها نخواهد شد. با توجه به اینکه آلکالوئیدهای مورد استفاده در این تحقیق ۱۰۰٪ خالص نبودند، در محاسبه میزان برداشت پودر آنها برای توزین و حل کردن در حلال، این مهم در محاسبات در نظر گرفته شد. ۲۰ رقت برای سنجش MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین در بین مقادیر ۵۰-۱۰۰۰ μg/ml با فاصله ۵۰ μg/ml در نظر گرفته شد، تمامی رقت‌ها از طریق استوک مربوط به هر یک از آلکالوئیدها به میزان ۲ برابر غلیظ‌تر از رقت مورد نظر آزمایش در محیط MHB ساخته شدند و مقدار ۱۰۰ μL از

که آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین به ترتیب از گیاه خشخاش، قهوه و پروانش استخراج شده‌اند. سودوموناس آئروجینوزا نیز به عنوان نماینده باکتریهای گرم منفی که یکی از شناخته شده‌ترین باکتریها در ایجاد مقاومت به اغلب مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها است، برای بررسی اثرات آلکالوئیدهای گیاهی در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفت (Rosenthal et al., 2010). دانشمندان اخیراً علت این مقاومت را به وجود ۴ پمپ افلوکسی عمده در این باکتری نسبت می‌دهند که عبارتند از: Mex CD-OprJ، MexAB-OprM، Mex EF-OprN و MexXY-OprM (Kiser et al., 2010).

مواد و روشها باکتریها

۴ سویه مختلف از باکتری سودوموناس آئروجینوزا در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. سویه K767 یا PAO1 که سویه نوع وحشی (پروتوتروف) بشمار می‌رود، سویه‌های K1455 (nalB) و K1536 (nfxB) که به ترتیب دارای افزایش بیان در پمپ‌های افلوکسی MexAB-OprM و MexCD-OprJ هستند و نیز K2153 که یک جدایه بیمارستانی با مقاومت دارویی بالاست. همچنین از سویه ATCC 27853 به عنوان سویه مرجع برای تعیین میزان صحت نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی علیه سویه‌های فوق‌الذکر استفاده شد. سویه PAO1 دارای افزایش بیان نرمال در پمپ MexAB-OprM خود می‌باشد. تمام سویه‌ها اهدایی از طرف دکتر کیت پول از دانشگاه کوئینز کانادا می‌باشند. سویه‌ها به منظور ذخیره طولانی مدت در محیط برین- هارت اینفیوژن برات (BHI) به همراه ۱۰٪ سرم گوسفندی و ۲۰٪ گلیسرول در ۲۰°C- و ۷۰°C- (۳۰٪ گلیسرول) نگهداری شدند. البته برای استفاده روزانه نیز بعد از تهیه کشت خطی از هر یک از سویه‌ها، یک کلنی تک وارد لوله آزمایش شیشه‌ای قطور حاوی ۲۵ml محیط BHI آگار Slant شد و بعد از ۳۶ ساعت گرمخانه‌گذاری در یخچال (۴°C) نگهداری شدند.

مواد و محیط کشت

نوسکاپین (با درصد خلوص ۹۷/۰٪ (HPLC) و حلال DMSO) از شرکت داروپخش (تماد) ایران، وینکامین (با درصد خلوص ۹۸/۰٪ (HPLC) و حلال DMSO)، کافئین (با درصد خلوص ۹۵/۰٪ (HPLC) و حلال آب مقطر) و

پمپ‌ها انتخاب شد. برای بررسی واکنش احتمالی بین لوفلوکسازین و هر یک از آکالوئیدهای ذکر شده از روش تیتراسیون چکربورد (آزمایش FIC) موجود در دستورالعمل‌های CLSI استفاده گردید. این روش یکی از پرتعدادترین راه‌های ارزیابی واکنش بین داروهاست. لوفلوکسازین در ۱۱ غلظت $8-0.08 \mu\text{g/ml}$ و هر یک از آکالوئیدها در ۳ غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ ، $40 \mu\text{g/ml}$ و $50 \mu\text{g/ml}$ در محیط CAMHB تهیه شدند. برای مقایسه میزان کاهش احتمالی MIC لوفلوکسازین هنگام استفاده همزمان با هر یک از آکالوئیدها، MIC این آنتی‌بیوتیک به تنهایی نیز در هر بار آزمایش بر روی هر ۴ سویه سودوموناس آئروجینوزا اندازه‌گیری شد. بدین منظور در تمام ردیف‌های میکروپلیت، ۱۱ غلظت مختلف لوفلوکسازین اضافه گردید و ردیف‌های A و B به بررسی MIC لوفلوکسازین به تنهایی اختصاص داده شد. در ردیف‌های C و D مقدار $20 \mu\text{g/ml}$ F و E و $40 \mu\text{g/ml}$ و G و H $50 \mu\text{g/ml}$ از هر یک از آکالوئیدها افزوده شد (در هر بار آزمایش یک آکالوئید بر روی یک سویه). چاهک‌های A₁ و B₁ به ترتیب به عنوان کنترل استریل بودن شرایط آزمایش (SC) و کنترل رشد (GC) مورد استفاده قرار گرفتند. در تمامی چاهک‌ها بجز A₁ سوسپانسیون میکروبی تلقیح شد.

در اینگونه آزمایش‌ها باید دقت شود غلظت‌هایی که در ابتدا برای هر یک از ترکیب‌های در نظر گرفته شده، با افزودن یکی بر روی دیگری تغییری نکنند. بنابراین برای تعیین MIC لوفلوکسازین به تنهایی، ۲ برابر غلظت‌های مورد نظر اولیه به چاهک‌های دو ردیف اول تلقیح شد و در باقی ردیف‌های مربوط به تعیین سینرژی بین لوفلوکسازین و آکالوئیدها، ۴ برابر غلظت‌های در نظر گرفته شده هر یک از آنها، چون حجم نهایی برای این آزمایش $200 \mu\text{L}$ در نظر گرفته شده بود. البته میزان $100 \mu\text{L}$ از هر یک از غلظت‌های دو برابری لوفلوکسازین، به ردیف‌های A و B و $50 \mu\text{L}$ نیز از هر یک از غلظت‌های ۴ برابری این آنتی‌بیوتیک، به باقی ردیف‌های میکروپلیت اضافه گردید. در ردیف‌های متناظر به هر یک از ۳ غلظت آکالوئیدها هم میزان $50 \mu\text{L}$ (۴ برابر غلظت در نظر گرفته) اضافه شد. سپس با تلقیح $100 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون حاوی 10^7cfu/ml باکتری، در هر یک از چاهک‌ها به تعداد دلخواه $5 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ رسیدیم. نتیجه این آزمایش پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری مورد بررسی قرار گرفت. میکروپوشناسان در تحقیقات بیشماری با استفاده از

هر یک از رقت‌ها (که حال ۲ برابر غلیظتر هستند) به چاهک‌های در نظر گرفته همان مقادیر در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای تلقیح شدند. برای آزمایش MIC هر یک از آکالوئیدها یک میکروپلیت جداگانه در نظر گرفته شده بود. تهیه رقت‌هایی ۲ برابر غلیظتر از رقت دلخواه آزمایش به این دلیل بود که با افزایش متعاقب سوسپانسیون باکتری و با میزان هم حجم ($100 \mu\text{L}$) غلظت نصف شود و به رقت دلخواه برسیم. برای اضافه کردن سوسپانسیون باکتریایی میزان 0.5 مک‌فارلند ($1-2 \times 10^8 \text{cfu/ml}$) از هر یک از سویه‌ها در سالیین استریل تهیه شد و بعد سوسپانسیون حاصل به میزان $1/10$ در محیط MHB رقیق گردید تا تعداد باکتریها به 10^7cfu/ml کاهش یابد، با برداشت مقدار $100 \mu\text{L}$ از این سوسپانسیون رقیق و اضافه کردن در $100 \mu\text{L}$ دیگر از محیط MHB حاوی غلظت‌های مختلف از آکالوئیدها تعداد باکتریها به میزان دلخواه $5 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ رسیدند و نهایتاً رقت‌های آکالوئیدها و تعداد باکتریها به میزان مورد نظر و دقیق این آزمایش باقی ماندند. بنابراین میزان تلقیح نهایی هر یک از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا $5 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ بوده است. بعد از گذشت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، MIC به صورت کمترین غلظتی از هر یک از آکالوئیدها که جلوی رشد قابل مشاهده با چشم باکتریها (عدم کدورت یا رسوب) را گرفته است، خوانده شد. تعداد تکرار آزمایش میزان MIC هر یک از آکالوئیدها بر روی هر ۴ سویه از سودوموناس آئروجینوزا، برای اطمینان از صحت نتایج بدست آمده ۳ مرتبه بود.

تعیین میزان سینرژی بین آکالوئیدها و آنتی‌بیوتیک لوفلوکسازین

یکی از فرضیه‌های مطالعه پیش‌رو، امکان اثر مهارکنندگی ترکیب‌های نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی پمپ‌های افلوکسی Mex موجود در باکتری سودوموناس آئروجینوزا بوده است. یکی از خصایص مهم مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی کاهش قابل توجه MIC سوبستراهای پمپ‌های افلوکسی مورد هدف خود است. از آنجایی‌که آنتی‌بیوتیک‌های موجود در خانواده فلئوروکوئینولون‌ها سوبسترای پمپ‌های افلوکسی Mex در باکتری سودوموناس آئروجینوزا هستند، آنتی‌بیوتیک لوفلوکسازین از این خانواده به عنوان سوبسترای برای این

مهارکننده‌های مؤثر پمپ‌های افلوکسی و یا حذف ژن‌های کدکننده این پمپ‌ها، به این نتیجه رسیدند که اگر ترکیبی هنگام استفاده همزمان با یک آنتی‌بیوتیک در غلظت $40 \mu\text{g/ml}$ و یا کمتر خود سبب کاهش ۸ برابری یا بیشتر MIC آنتی‌بیوتیک همراه خود در مقایسه با MIC آن آنتی‌بیوتیک به تنهایی علیه باکتریهای مقاوم دارویی دارنده پمپ افلوکسی فعال شود، به احتمال زیاد ترکیب مورد نظر یک مهارکننده بالقوه پمپ‌های افلوکسی است. در میکروبیولوژی این تعریف (Minimum Potentiation) (Nakayama *et al.*, 2003a; Yoshida *et al.*, 2006) MPC₈ نامیده می‌شود. بنابراین مطلوب این آزمایش کاهش ۸ برابری یا بیشتر MIC لوفلوکسازین توسط هر یک از آلكالوئیدها بود.

تعیین میزان سینرژی بین آلكالوئیدها و PaβN

از فرضیه‌های دیگر این تحقیق، امکان خاصیت ضد میکروبی بالقوه آلكالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین بوده است که قسمت اعظم این خاصیت ضد میکروبی به علت وجود پمپ‌های افلوکسی در باکتریها از بین رفته است. بر مبنای این فرضیه اگر به طریقی عملکرد چنین پمپ‌هایی مختل شود، در صورت خاصیت ضد میکروبی هر یک از این آلكالوئیدها، این خاصیت به وضوح آشکار خواهد شد. در این تحقیق برای مهار عملکرد فعالیت پمپ‌های Mex موجود در باکتری سودوموناس آئروجینوزا، از مهارکننده عمومی پمپ‌های افلوکسی بیشتر باکتریهای گرم منفی به نام فنیل‌آلانین - آرژنین بتانفتیل‌امید (PaβN) استفاده شد (Tegos *et al.*, 2002; Kuete *et al.*, 2011; Fernebro, 2011). این آزمایش نیز به روش تیتراسیون چکربورد انجام گردید (CLSI). اگر در ابتدا مقادیر آلكالوئیدها، به روش رقت‌سازی ۲ برابری (تصادفی) معمول آزمایش‌های میکروبی تهیه می‌شدند، در هر بار آزمایش بر روی هر آلكالوئید غلظت‌های بسیاری در فاصله مقادیر $1000-0 \mu\text{g/ml}$ وجود داشتند که درصد بوجود آمدن خطای احتمالی در نتیجه آزمایش بسیار بالا بود. بنابراین برای شروع ۲۰ غلظت با فاصله $50 \mu\text{g/ml}$ ، از هر یک از آلكالوئیدها در دو ردیف از میکروپلیت تهیه شد. در ابتدای کشف PaβN در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که این ترکیب در غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی خود را بر علیه بیشتر سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا (از جمله هر ۴ سویه مورد بررسی در این تحقیق) اعمال می‌کند (Lomovskaya *et*

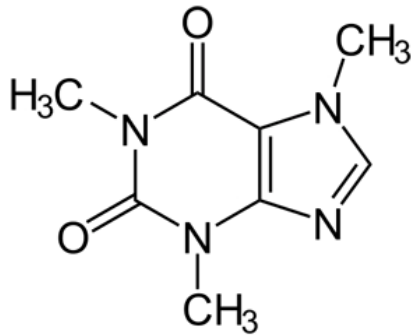
نتایج

همان‌طور که انتظار می‌رفت میزان MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی تک تک سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای مورد استفاده در این تحقیق بسیار بالا و برابر $1000 \mu\text{g/ml}$ بود. به‌طور کلی خاصیت ضد میکروبی ذاتی برای موادی که MIC بالاتر از $200 \mu\text{g/ml}$ دارند رد می‌شود، چون این مقدار بسیار بالاتر است و محدوده انحلال‌پذیری یک ماده محسوب می‌شود (Mohtar *et al.*, 2009; Stavri *et al.*, 2007). در نتیجه آلكالوئیدهای این تحقیق به تنهایی خاصیت ضد میکروبی علیه هیچ یک از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا را ندارند.

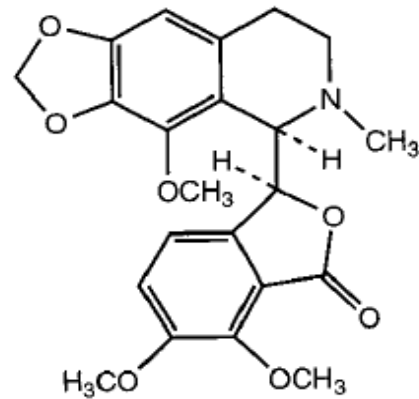
برای بررسی خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی هر یک از آلكالوئیدهای این تحقیق، امکان کاهش MIC لوفلوکسازین در هنگام استفاده همزمان با هر کدام از آنها علیه تمام سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای این مطالعه بررسی شد. هیچ‌گونه تغییری در میزان MIC لوفلوکسازین در

مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی Mex موجود در سودوموناس آئروجینوزا نمی‌باشند (جدول ۱).

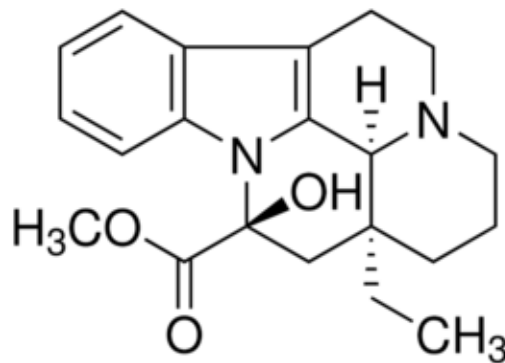
هر سه غلظت بکار رفته از آلکالوئیدها رخ نداد، این بدان معناست که نوسکاپین، کافئین و وینکامین دارای اثر



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۱- ساختار شیمیایی آلکالوئیدهای نوسکاپین (الف)، کافئین (ب) و وینکامین (ج)

مورد استفاده در این تحقیق دیده نشد. کاهش بیشتر MIC کافئین و وینکامین علیه سویه‌های با افزایش بیان در پمپ‌های افلوکسی (سویه‌های بسیار مقاوم دارویی *nalB* و *nfxB*) تأکیدی بر دخیل بودن پمپ‌های افلوکسی این باکتریها در تضعیف خاصیت ضد میکروبی آلکالوئیدهای ذکر شده است. زیرا در این سویه‌ها، پمپ‌های افلوکسی بیشتری نسبت به ۲ سویه دیگر (سویه نوع وحشی و جدایه بیمارستانی) مشغول به فعالیت و بی‌اثر کردن عملکرد مواد ضد میکروبی هستند که با مهار موفق آنها توسط PAβN، کافئین و وینکامین فرصت بروز خاصیت ضد میکروبی خود را بیشتر از قبل پیدا می‌کنند. همچنین اثر ضد میکروبی کافئین ۲ برابر وینکامین علیه تمامی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای این تحقیق بوده است.

همچنین از دیگر فرضیه‌ها در مورد پایین بودن اثر ضد میکروبی یک ترکیب گیاهی بی‌اثر شدن آنها توسط پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریهای است که بر روی آنها آزمایش انجام شده است. در این آزمایش با مهار پمپ‌های افلوکسی خانواده Mex توسط ترکیب PAβN با کمال تعجب مشاهده شد که MIC آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین علیه هر ۴ سویه به‌طور چشمگیری کاهش یافت، در نتیجه کافئین و وینکامین ذاتاً ماده ضد میکروبی گیاهی هستند و دلیل عدم خاصیت ضد میکروبی آنها در شرایط آزمایشگاهی، وجود پمپ‌های افلوکسی در باکتری سودوموناس آئروجینوزا می‌باشد. میزان کاهش MIC کافئین و وینکامین برای هر یک از سویه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. هیچ‌گونه تغییری در میزان MIC نوسکاپین به همراه PAβN علیه سویه‌های

جدول ۱- بررسی سینرژی بین غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین و آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین علیه سویه‌های گوناگون

(از لحاظ مقاومت دارویی) سودوموناس آئروجینوزا

MIC لووفلوکساسین ($\mu\text{g/ml}$) در حضور غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای گیاهی ($\mu\text{g/ml}$)												ژنوتیپ	سویه
۴۰			۲۰			۱۰			۰				
نوسکاپین	کافئین	وینکامین	نوسکاپین	کافئین	وینکامین	نوسکاپین	کافئین	وینکامین	نوسکاپین	کافئین	وینکامین		
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	نوع وحشی	K767
۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	<i>nalB</i>	K1455
۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	<i>nfxB</i>	K1536
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	جدایه بیمارستانی	K2153

جدول ۲- میزان سینرژی غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین در ترکیب با $\text{PA}\beta\text{N}$ ($20 \mu\text{g/ml}$) علیه سویه‌های گوناگون

(از لحاظ مقاومت دارویی) سودوموناس آئروجینوزا

MIC کافئین و وینکامین ($\mu\text{g/ml}$) در حضور $\text{PA}\beta\text{N}$ ($20 \mu\text{g/ml}$)						ژنوتیپ	سویه
میزان کاهش MIC		۲۰		۰			
کافئین	وینکامین	کافئین	وینکامین	کافئین	وینکامین		
۸ برابر~	۴ برابر	۲۵۰	۱۲۴	۱۰۰۰	۱۰۰۰	نوع وحشی	K767
۱۷ برابر~	۸ برابر~	۶۲	۱۲۴	۱۰۰۰	۱۰۰۰	<i>nalB</i>	K1455
۱۷ برابر~	۸ برابر~	۶۲	۱۲۴	۱۰۰۰	۱۰۰۰	<i>nfxB</i>	K1536
۱۰ برابر~	۵ برابر	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	جدایه بیمارستانی	K2153

۱: فنیل آلانین-آرژینین بتانفتیل آمید (مهارکننده پمپ‌های افلوکسی سودوموناس آئروجینوزا)

بحث

با توجه به داده‌های این تحقیق، در صورت مهار پمپ‌های افلوکسی موجود در سودوموناس آئروجینوزا، آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین دارای اثر ضد میکروبی می‌شوند و علت عدم خاصیت ضد میکروبی اولیه آنها وجود پمپ‌های افلوکسی خانواده Mex در این باکتری می‌باشد. نکته جالب در مورد این تحقیق اینست که کافئین با اینکه ساختار هتروسیکلیک ساده‌تری نسبت به وینکامین دارد ولی خاصیت ضد میکروبی‌اش تقریباً ۲ برابر وینکامین بوده است. با توجه به این نکته می‌توان امید داشت در آینده با مطالعه ارتباط ساختار و عملکرد (SAR: Structure-Activity Relationship) چنین ترکیب‌های گیاهی بتوان به یک ساختار واحد و مؤثر با خاصیت ضد میکروبی بسیار بالا دست پیدا کرد.

Tegos و همکاران (۲۰۰۲) برای اولین بار در جهان با مهار پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریهای گرم منفی و مثبت و متعاقب آن افزایش قابل توجه اثر ضد میکروبی ترکیب‌های گیاهی که پیش از آن خاصیت ضد میکروبی ناچیزی داشتند، نشان دادند که پمپ‌های افلوکسی علت اصلی پایین بودن خاصیت ضد میکروبی ترکیب‌های گیاهی علیه بیشتر پاتوژن‌ها اعم از انسانی و گیاهی می‌باشند. در تحقیق نامبرده فقط از سویه‌های نوع وحشی و موتانت‌های فاقد پمپ‌های افلوکسی پاتوژن‌ها استفاده شده بود و نتایج کاهش MIC ترکیب‌های گیاهی همزمان با استفاده از مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی علیه چنین سویه‌هایی گزارش شد، ولی در تحقیق کنونی اثرات ضد میکروبی نوسکاپین، کافئین و وینکامین علاوه بر سویه نوع وحشی، بر روی یک جدایه بیمارستانی و سویه‌های *nalB* و *nfxB* که دارای افزایش بیان در یکی از پمپ‌های افلوکسی مهم خانواده Mex بودند نیز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به آزمایش تعیین میزان MIC لووفلوکسازین به تنهایی بر روی تک تک سویه‌های این تحقیق مشخص شد که سویه‌های *nalB* و *nfxB* دارای مقاومت ضد میکروبی بسیار بالایی هستند، چون سویه‌هایی از سودوموناس آئروجینوزا با $2 \mu\text{g/ml}$ MIC و یا بیشتر از نظر بالینی، سویه‌های بسیار مقاوم دارویی محسوب می‌شوند (Lomovskaya et al., 2001). حال با اینکه سویه‌های *nalB* و *nfxB* بیشترین مقاومت ضد میکروبی را دارا هستند ولی همچنان بیشترین

کاهش MIC کافئین و وینکامین بر روی همین سویه‌ها رخ داده است، در نتیجه بالاترین اثر ضد میکروبی ترکیب‌های گیاهی این تحقیق بر روی مقاومترین سویه‌ها از یکی از مقاومترین باکتریها رخ داده است. پس با توجه به این نتیجه، بار دیگر یافته‌های پژوهش Lewis تأیید می‌شود و می‌توان پمپ‌های افلوکسی را مهمترین عامل مقاومت به مواد ضد میکروبی گیاهی دانست. به عنوان مثال MIC کافئین بر روی هر ۴ سویه سودوموناس آئروجینوزا بسیار بالا و برابر $1000 \mu\text{g/ml}$ بود، ولی هنگام استفاده کافئین به همراه ترکیب $PA\beta N$ ($20 \mu\text{g/ml}$)، MIC این آلکالوئید گیاهی در سویه نوع وحشی به $124 \mu\text{g/ml}$ ، در جدایه بیمارستانی به $100 \mu\text{g/ml}$ و در سویه‌های *nalB* و *nfxB* به میزان $62 \mu\text{g/ml}$ رسید، در نتیجه بیشترین افزایش اثر ضد میکروبی کافئین علیه سویه‌های دارای افزایش بیان در پمپ‌های افلوکسی بوده است که تأییدی بر دخیل بودن پمپ‌های افلوکسی خانواده Mex سودوموناس آئروجینوزا در بی‌اثر کردن خاصیت ضد میکروبی ترکیب‌های گیاهیست. البته باید گفته شود که همانند تحقیق Tegos و همکاران (۲۰۰۲) تاکنون مورد مشابهی انجام نشده بود.

آلکالوئیدهای گیاهی اغلب دارای هدف داخل سلولی هستند و DNA پاتوژن‌ها را هدف می‌گیرند، بنابراین برای اعمال این اثر باید بتوانند وارد سلول پاتوژن‌ها شده و در آنها تجمع یابند، اما پمپ‌های افلوکسی از این تجمع جلوگیری می‌کنند. به احتمال زیاد هدف آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین نیز مختل کردن DNA موجود در باکتری سودوموناس آئروجینوزا بوده است، اما پمپ‌های افلوکسی اجازه ورود آنها به داخل سلول این باکتری را نمی‌دادند، ولی با از کار انداختن فعالیت پمپ‌های افلوکسی موجود در این باکتری، آلکالوئیدهای ذکر شده دوباره اثر ضد میکروبی خود را بازیافتند و خاصیت کشندگی خود را بروز دادند. بنابراین آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین در زمان تهاجم میکروبی به گیاهان قهوه و پروانش دارای نقش محافظتی در برابر پاتوژن‌ها هستند.

در تحقیقات مختلف بیان شده است که بیشتر جدایه‌های بیمارستانی سودوموناس آئروجینوزا نیز دارای افزایش بیان در حداقل یکی از پمپ‌های افلوکسی Mex خود هستند (Higgins et al., 2003; Islam et al., 2009)، در نتیجه با استفاده از مواد ضد میکروبی گیاهی به همراه مهارکننده

پیشنهاد پژوهش پیش رو به محققان دیگر اینست که در آینده به هر نوع گل و گیاه به چشم منبعی برای یافتن مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی باکتریایی و نیز ماده ضد میکروبی بنگرند و برای این منظور از آزمایش‌های شرح داده شده در این تحقیق استفاده کنند.

سپاسگزاری

با تشکر فراوان از دکتر کیت پول از دانشگاه کوئینز کانادا به دلیل سویه‌های باکتریایی که در اختیار ما نهادند، اگر کمک‌های انسانی و دلسوزانه ایشان نبود هرگز این پژوهش شکل نمی‌گرفت.

منابع مورد استفاده

- Adebayo, J.O. and Krettli, A.U., 2011. Potential antimalarials from Nigerian plants: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 289-302.
- Ball, A.R., Casadei, G., Samosorn, S., Bremner, J.B., Ausubel, F.M., Moy, T.I. and Lewis, K., 2006. Conjugating berberine to a multidrug efflux pump inhibitor creates an effective antimicrobial. *ACS Chemical Biology*, 1(9): 594-600.
- Carter, J.P., Spink, J., Cannon, P.F., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E., 1999. Isolation, characterization, and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3364-3372.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6829): 826-833.
- Daugelavicius, R., Buivydas, A., Sencilo, A. and Bamford, D.H., 2010. Assessment of the activity of RND-type multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* using tetraphenylphosphonium ions. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3): 234-238.
- De Villiers, B.J., Van Vuuren, S.F., Van Zyl, R.L. and Van Wyk, B.E., 2010. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 129(2): 189-196.
- Etefagh, K.A., Burns, J.T., Junio, H.A., Kaatz, G.W. and Cech, N.B., 2011. Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Medica*, 77(8): 835-840.
- Fernebro, J., 2011. Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resistance Updates*, 14(2): 125-139.
- Garvey, M.I., Rahman, M.M., Gibbons, S. and Pidcock, L.J.V., 2011. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(2): 145-151.
- Gibbons, S. and Udo, E.E., 2000. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps,

پمپ‌های افلوکسی می‌توان از شیوع عفونت‌های حاصل از این باکتریهای مقاوم جلوگیری کرد و همچنین با استفاده از مهارکننده پمپ‌های افلوکسی می‌توان امید این را داشت که به سایر مواد ضد میکروبی گیاهی که قابلیت آنها در این زمینه پنهان مانده است دست یابیم. در داخل گیاهان این مواد ضد میکروبی به همراه مهارکننده پمپ‌های افلوکسی پاتوژن‌های خود قرار دارند که با تبانی هم از تهاجم میکروبی جلوگیری می‌کنند. در پاتوژن گیاهی سودوموناس سیرینی (*Pseudomonas syringae*) یک پمپ افلوکسی دقیقاً مشابه پمپ MexAB-OprM موجود در سودوموناس آئروجینوزا وجود دارد (Stoitsova *et al.*, 2008). پس مطمئناً گیاهان مورد حمله این پاتوژن (از جمله گوجه‌فرنگی و حبوبات) دارای هم مواد ضد میکروبی و هم مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی مؤثر بر روی این باکتری هستند.

اغلب محققان بر روی خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی علیه میکروارگانیسم‌های مختلف کار می‌کنند و اکثراً هم عصاره‌های نامبرده MIC بالایی از خود نشان می‌دهند و اغلب تحقیقات در سطح بررسی عصاره‌های خام گیاهی باقی می‌ماند. اگر آزمایش فقط بر روی عصاره‌های گیاهی راهی مفید برای یافتن مواد ضد میکروبی گیاهی بود، تا به امروز باید حداقل یک ماده گیاهی با خاصیت ضد میکروبی مشابه معمولی‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها به زمینه استفاده بالینی راه می‌یافت. اما تنها ماده ضد میکروبی گیاهی که مجوز استفاده بالینی گرفته است ترکیب پیریتین است که به‌عنوان ماده گذرزا در شامپوهای Head and Shoulders استفاده می‌شود (Tegos *et al.*, 2002). در نتیجه بررسی عصاره‌های گیاهی برای یافتن مواد ضد میکروبی قدم اول در این راه است و مهمترین قدم پیدا کردن ترکیب‌های مؤثر با خاصیت ضد میکروبی در این عصاره‌هاست. استفاده همزمان یک مهارکننده پمپ‌های افلوکسی به همراه یک ترکیب ضد میکروبی گیاهی مناسب، نه تنها سبب بازگرداندن فعالیت از دست رفته مواد ضد میکروبی کنونی می‌شود، بلکه می‌تواند به‌طور چشمگیری میزان عدم موفقیت درمان بیمارها را کاهش دهد و از شیوع بیماریهای جدید و بازگشت بیماریهای عفونی دوران کهن جلوگیری بعمل آورد. همچنین با استفاده همزمان مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی با منشأ گیاهی به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کنونی نیز می‌توان به مبارزه با مقاومت باکتریایی پرداخت.

- Nakayama, K., Ishida, Y., Ohtsuka, M., Kawato, H., Yoshida, K., Yokomizo, Y., Hosono, S., Ohta, T., Hoshino, K., Ishida, H., Yoshida, K., Renau, T.E., Léger, R., Zhang, J.Z., Lee, V.J. and Watkins, W.J., 2003a. MexAB-OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(23): 4201-4204.
- Nakayama, K., Ishida, Y., Ohtsuka, M., Kawato, H., Yoshida, K., Yokomizo, Y., Ohta, T., Hoshino, K., Otani, T., Kurosaka, Y., Yoshida, K., Ishida, H., Lee, V.J., Renau, T.E. and Watkins W.J., 2003b. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 2: achieving activity in vivo through the use of alternative scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(23): 4205-4208.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E., 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2): 12923-12928.
- Piddock, L.J.V., Garvey, M.I., Rahman, M.M. and Gibbons, S., 2010. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6): 1215-1223.
- Rosenthal, V.D., Maki, D.G., Jamulitrat, S., Medeiros, E.A., Todi, S.K., Gomez, D.Y., Leblebicioglu, H., Abu Khader, I., Miranda Novales, M.G., Berba, R., Ramírez Wong, F.M., Barkat, A., Pino, O.R., Dueñas, L., Mitrev, Z., Bijie, H., Gurskis, V., Kanj, S.S., Mapp, T., Hidalgo, R.F., Ben Jaballah, N., Raka, L., Gikas, A., Ahmed, A., Thu le, T.A. and Guzmán Siritt, M.E., 2010. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008. *American Journal of Infection Control*, 38(2): 95-104.
- Sibanda, T. and Okoh, A.I., 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology*, 6(25): 2886-2896.
- Stavri, M., Piddock, L.J.V. and Gibbons, S., 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6): 1247-1260.
- Stermitz, F.R., Tawara-Matsuda, J., Lorenz, P., Mueller, P., Zenewicz, L. and Lewis, K., 2000a. 5'-Methoxyhydrnocarpin-D and pheophorbide A: Berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*, 63(8): 1146-1149.
- Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L. and Lewis, K., 2000b. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4): 1433-1437.
- Stermitz, F.R., Beeson, R.D., Mueller, P.J., Hsiang, J.F. and Lewis, K., 2001. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a Berberis and a on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. *Phytotherapy Research*, 14(2): 139-140.
- Gibbons, S., Oluwatuyi, M. and Kaatz, G.W., 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1): 13-17.
- Gibbons, S., 2008. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74(6): 594-602.
- Higgins, P.G., Fluit, A.C., Milatovic, D., Verhoef, J. and Schmitz, F.J., 2003. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5): 409-413.
- Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Hoiby, N. and Wretling, B., 2009. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1): 60-66.
- Jones, J.D.G. and Dangel, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323-329.
- Kamicker, B.J., Sweeney, M.T., Kaczmarek, F., Dib-Haj, F., Shang, W., Crimin, K., Duignan, J. and Gootz, T.D., 2008. Bacterial efflux pump inhibitors. *Methods in Molecular medicine*, 142(1): 187-204.
- Kiser, T.H., Obritsch, M.D., Jung, R., MacLaren, R. and Fish, D.N., 2010. Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy*, 30(7): 632-638.
- Kuete, V., Alibert-Francob, S., Eyongc, K.O., Ngamenid, B., Folefoc, G.N., Nguemvingc, J.R., Tangmouoc, J.G., Fotsoc, G.W., Komguemc, J., Ouahouoc, B.M.W., Bollab, J.M., Chevalierb, J., Ngadjui, B.T., Nkengfack, A.E. and Pagès, J.M., 2011. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5): 156-161.
- Lewis, K., 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2): 247-254.
- Li, X.Z. and Nikaido, H., 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69(12): 1555-1623.
- Lomovskaya, O., Warren, M.S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H. and Lee, V.J., 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1): 105-116.
- Mohtar, M., Johari, S.A., Li, A.R., Isa, M.M., Mustafa, S., Ali, A.M. and Basri, D.F., 2009. Inhibitory and resistance-modifying potential of plant-based alkaloids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current Microbiology*, 59(2): 181-186.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1798(10): 1953-1960.
- Webber, M.A. and Piddock, L.J., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1): 9-11.
 - Westholm, D.E., Marold, J.D., Viken, K.J., Duerst, A.H., Anderson, G.W. and Rumbley, J.N., 2010. Evidence of evolutionary conservation of function between the thyroxine transporter Oatp1c1 and major facilitator superfamily members. *Endocrinology*, 151(2): 5941-5951.
 - Yamane, H., Konno, K., Sabelis, M., Takabayashi, J., Sassa, T. and Oikawa, H., 2010. Chemical defence and toxins of plants. *Comprehensive Natural Products II*, 4(1): 339-385.
 - Yoshida, K.I., Nakayama, K., Yokomiz, Y., Ohtsuka, M., Takemura, M., Hoshino, K., Kanda, H., Namba, K., Nitani, H., Zhang, J.Z., Lee, V.J. and Watkins, W.J., 2006. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 6: Exploration of aromatic substituents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(24): 8506-8518.
 - Mahonia (*sensu strictu*) species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(8): 793-798.
 - Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S. and Weingart, H., 2008. Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11): 3387-3393.
 - Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O. and Lewis, K., 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10): 3133-3141.
 - Tegos, G.P., Masago, K., Aziz, F., Higginbotham, A., Stermitz, F.R. and Hamblin, M.R., 2008. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9): 3202-3209.
 - Trepout, S., Taveau, J.C., Benabdelhak, H., Granier, T., Ducruix, A., Frangakis, A.S. and Lambert, O., 2010. Structure of reconstituted bacterial membrane efflux pump by cryo-electron tomography.

In vitro evaluation of the reason(s) of low level antimicrobial activity of some plant-based alkaloids (noscapsine, caffeine and vincamine) on various strains of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa*

A. Avakh^{1*}, K. Rezaei² and J. Vand Yusefi³

1*- Corresponding author, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran
E-mail: a_avakh@yahoo.com

2- Department of Food Science, Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Department of Microbiology, Islamic Azad University Karaj Branch, Karaj, Iran

Received: November 2011

Revised: July 2012

Accepted: July 2012

Abstract

Most plant compounds have very low level of antimicrobial activity than antibiotics especially against Gram-negative bacteria (MIC=100-1000 μ g/ml). Recently, scientists believe that the bacterial efflux pumps are responsible for this problem. These transmembrane proteins (efflux pumps) are capable of recognizing and expelling a variety of structurally unrelated antimicrobial agents including plant compounds from the bacterial cell and subsequently conferring resistance to these compounds. The aim of this study was to investigate the main reason(s) of low level antimicrobial activity of plant-based alkaloids; noscapsine, caffeine and vincamine, against representative highly resistant Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*). Most alkaloids are the part of plant phytoalexins which their levels increase strongly in response to microbial invasion, this means that most alkaloids are plant antimicrobial agents but noscapsine, caffeine and vincamine did not actually show any antimicrobial activity in a direct susceptibility tests in vitro. Intrinsic antimicrobial activity (interaction between alkaloids and PA β N (inhibitor of Gram negative bacteria)) or efflux pump inhibitory properties (synergy between alkaloids and levofloxacin (substrate of the efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*) of noscapsine, caffeine and vincamine were assessed by a checkerboard titration assay. Results showed that caffeine and vincamine were intrinsically the plant antimicrobial compounds. With disrupting the function of MexAB-OprM in *nalB* highly resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* by PA β N, antimicrobial activities of caffeine and vincamine were increased by 17- and 8-fold, respectively. Therefore, it could be said that bacterial efflux pumps are a major factor in the weakening of antimicrobial activity of plant compounds. It appears that inhibition of these pumps may significantly improve the clinical performance of these natural compounds and thereby hoped that plant antimicrobials similar to systemic antibiotics will find its way to the field of clinical treatment in future.

Key words: Noscapsine, caffeine, vincamine, efflux pump, efflux pump inhibitor.