مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جلد چهار، شماره چهار-آ، پاییز ۱۳۸۴، ۲۲۷-۲۲۰

مکانیسم اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی مورد سبز بر روی باکتری *E.coli* K12 HB101

دکتر احمد غلامحسینیان[۱]، دکتر محمدرضا شکیبایی[۲]، زهره جمالی[۳]

دریافت مقاله : ۱۳۸٤/۱/۲۱ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۷/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۷/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: مورد گیاهی است که خاصیت ضد میکروبی داشته، از رشد باکتری‌ها ممانعت کرده و مرگ بسیاری از پاتوژن‌ها را باعث می‌شود. با توجه به مشخص بودن مکانیسم اثر بسیاری از داروهای ضدمیکروبی، هنوز مکانیسم اثر ضدمیکروبی این گیاه به درستی مشخص نشده است. در این تحقیق مکانیسم اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی مورد، بر روی باکتری *E.Coli* HB101 مطالعه و بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی باکتری *E.Coli* K12 HB101 حاوی پلاسمید pBR322 در محیط مولر هینتون آگار، حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورد (از ۱/۵۶ تا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط کشت) رشد داده شد. باکتری‌ها به وسیله سونیکاسیون و یخ زدن و ذوب کردن، لیز شده و سپس فعالیت کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز(SOD)، آنتی‌اکسیدان تام و مالون دی‌آلدیید سلولی اندازه‌گیری شد. هم‌چنین DNA پلاسمیدی به روش لیزقلیایی تخلیص گردید و تغییر در حرکت پلاسمید، در ژل آگاروز نمونه‌هایی که در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورد، رشد داده شده بودند با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف مورد هیچ‌گونه اثری بر حرکت پلاسمید pBR322 در ژل نداشتند که نشان دهنده عدم تغییر وضعیت فضایی DNA است. با تغییر غلظت عصاره از ۱/۵۶ به ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعالیت اختصاصی کاتالاز در سلول‌های لیز شده از ۰/۷±۲۰/۴۷ به ۲/۹±۵/۱ واحد در میلی‌گرم پروتئین کاهش پیدا کرد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، تحت شرایط فوق از ۵/۲±۶۳/۸۶ در نمونه شاهد به ۱/۶±۲۰/۰۴ واحد در میلی‌گرم پروتئین در بالاترین غلظت عصاره کاهش یافت. همزمان با کاهش فعالیت SOD میزان فعالیت ویژه آنتی‌اکسیدان تام سلولی با افزایش میزان عصاره کاهش یافت، به طوری که از مقدار ۰/۵±۳۶/۲ به ۲/۲±۶/۴۲ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین لیز شده سلولی رسید. اندازه‌گیری مقدار مالون دی‌آلدیید سلولی نشان داد که افزایش غلظت عصاره سبب افزایش مقدار نسبی آن از ۷/۶±۲۳/۰۹ به ۳/۴±۴۹/۹۲ میکروگرم در میلی‌گرم پروتئین می‌گردد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه مورد، اثری روی DNA پلاسمیدی نداشته بلکه با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، سبب صدمه سلولی شده و اثرات ضد میکروبی از خود نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *E.coli* K12 HB101، عصاره متانولی مورد، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آنتی‌اکسیدان‌تام، مالون‌دی‌آلدیید

۱- (نویسندهٔ مسئول) دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی،
تلفن: ۳۲۲۱۶۶۰-۰۳۴۱، فاکس: ۳۲۲۱۶۷۱-۰۳۴۱، پست الکترونیکی: agnajar@yahoo.com
۲- استادیار گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳- کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

مقدمه

طی سالیان متمادی گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی از موارد تنها راه درمان بیماری‌ها محسوب می‌شدند و برای درمان بسیاری از عفونت‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گرفتند [۱]. یکی از این گیاهان، مورد یا مورت است که به صورت درختچه‌ای کوچک با برگ‌های همیشه سبز بوده و تحقیقات زیادی راجع به آن انجام شده است [۲]. این درختچه حاوی اسانس فرّاری بنام "دپانتین" و "میرتنول" است که هر دو در اعضاء مختلف گیاه مخصوصاً در برگ آن یافت می‌شود و اثر درمانی آن نیز احتمالاً مربوط به این وجود ترکیبات است [۳]. در تحقیقی که توسط منصوری و خالقی انجام شد، [۴] الگوی مقاومت استافیلوکوک آرئوس، جدا شده از نمونه‌های کلینیکی برعلیه عصاره‌های گیاهان مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه عصاره گیاهان مختلف، عصاره گیاه مورد، دارای اثر ضدمیکروبی قویتری بود. در تحقیقی دیگر که در عراق بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از موارد سوختگی صورت گرفت، مقایسه فعالیت ضدمیکروبی برخی از عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد نشان داد که عصاره‌های آبی اکالیپتوس و مورد، اثر خوبی در توقف رشد این باکتری‌ها دارند [۵].

در مطالعه دیگری، اثرات ضدمیکروبی و ضدپلاسمیدی پنج گیاه دارویی از جمله گیاه مورد بر روی باکتری کلبسیلاپنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، نشان داد که مورفولوژی باکتری در معرض عصاره قرار گرفته، آنچنان که با میکروسکوپ فلورسنت دیده می‌شود بیانگر کوچکتر شدن باکتری‌ها و از بین رفتن کپسول آن‌ها می‌باشد [۶]. تحقیقات کمی در مورد مکانیسم اثر عصاره این گیاهان و به ویژه عصاره گیاه مورد بر روی DNA سلولی و سایر عوامل مؤثر در بقاء سلول، مانند سیستم دفاعی ضداکسیدانی به عمل آمده است. از معدود تحقیقات انجام شده به عنوان مثال نشان داده‌اند که پلامباجین[1] عصاره گیاهی است که می‌تواند باعث به وجود آمدن شکاف در DNA فوق پیچیده[2] پلاسمید شده، آن را باز کرده و در نتیجه باعث عدم تقسیم پلاسمید گردد. این مکانیسم، مقاومت باکتری‌های نسل بعدی را از میان برده و آن‌ها را نسبت به داروهایی که قبلاً در برابر آن‌ها مقاوم بوده‌اند حساس می‌گرداند [۷]. از طرف دیگر اشکال فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های آزاد، آب اکسیژنه و هیدروکسیل رادیکالی به علت فعالیت فوق‌العاده زیادشان قادرند با انواع ملکول‌های حیاتی واکنش دهند؛ از جمله این مواد به چربی‌ها، RNA, DNA و پیش سازهایشان می‌توان اشاره کرد [۸]. توانایی در تخریب ساختمان غشاء سلول یا شکستن زنجیره DNA یا موتاسیون در آن، نهایتاً باعث پایان بخشیدن به همانندسازی می‌شود. برای کاهش چنین اثرات مخربی، سلول‌ها دارای آنزیم‌هایی هستند که سبب تعمیر و تصحیح شرایط می‌گردند [۹]. اگرچه مقدار کم اشکال فعال اکسیژن برای فعالیت‌های سیستم زنده ضروری است ولی مقدار زیاد آن یا عدم کفایت در از بین بردن آن باعث استرس اکسیداتیو و نهایتاً باعث تخریب ماکروملکول‌ها می‌شود از جمله سیستم‌هایی که در بقاء سلولی نقش دارند می‌توان به آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اشاره کرد [۹].

در تحقیق حاضر مکانیسم اثر عصاره خام گیاه مورد بر ساختمان DNA فوق پیچیده pBR322 در "*E.coli* HB101" مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین اثر همزمان عصاره بر سیستم اکسیدانی - آنتی‌اکسیدانی سلول از طریق اندازه‌گیری قدرت ضداکسیدانی تام سلول و یا اثرات آن برآنزیم‌های درگیر در این سیستم‌ها مانندکاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد سنجش قرارگرفت. علاوه بر آن، نقش عصاره بر اکسیداسیون غشاء سلولی از طریق اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدیید[3] کل مورد سنجش قرار گرفت تا از این راه به مکانیسم احتمالی عصاره گیاه مورد پی برده شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی اسیدبوریک، اسیداستیک، سدیم دودسیل سولفات(SDS)، هیدروکسید پتاسیم، ایزوپروپانول، کلروفرم، فنل، تریس، EDTA، لیزوزیم و بروموفنل بلو از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. اتیدیوم بروماید[4] از شرکت سیگمای انگلستان تهیه گردید. باکتری *E.coli* K12 HB101

1 -Palambagin
2- Supercoil DNA
3-MDA: Malondialdehyde
4- Ethydium Bromide

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

حاوی پلاسمید pBR322 از شرکت سیناژن ایران خریداری گردید. سونیکاتور مدل UP2001 از شرکت Hielscher آلمان و اسپکتروفتومتر UV/VIS مدل Jenway از شرکت LKB سوئد مورد استفاده قرار گرفتند.

روش عصاره گیری: عصاره گیاه مورد به روش خیساندن در الکل متیلیک ۸۰٪ تهیه شد [۳]. پس از تهیه عصاره خشک در دی‌متیل‌سولفوکساید[1] حل شد و از آن‌جا که این حلال تا حدی بر رشد باکتری اثر بازدارندگی داشت، MIC[2] حلال نیز تحت بررسی قرار گرفت.

تعیین MIC و SIC عصاره گیاه مورد: تعیین کمترین غلظت عصاره ممانعت کننده از رشد (MIC) و بیشترین غلظت عصاره ممانعت کننده از رشد[3] (SIC) مورد، بر ضد باکتری *E.coli* K12 HB101 حاوی پلاسمید pBR322 براساس روش استاندارد [۱۰] انجام شد. در این روش به ۲۵ میلی‌گرم عصاره متانولی خشک، ۲۵۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص اضافه و کاملاً آن در حل شد. سپس با محیط کشت نوترینت برات[4] استریل به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. رقت‌های سریالی ۱:۲ تا ده لوله متوالی تهیه گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقیق شده باکتری حاوی[5] 10^5 CFU به هر یک از لوله‌ها، تزریق و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور نگهداری گردید و در پایان، رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی و تعیین رفتار الکتروفورتیکی پلاسمید: جداسازی DNA پلاسمیدی از باکتری در حضور یا در غیاب عصاره (شاهد) براساس روش لیز قلیایی با استفاده از محلول NaOH/SDS [۱۱] صورت گرفت. الکتروفورز پلاسمید جدا شده با استفاده از آگارز ۰/۷ گرم درصد محلول بافر تریس-بورات- EDTA (TBE) ۲ میلی‌مولار در pH برابر با ۸ در ولتاژ ۵۵ ولت به مدت ۲ ساعت در حضور مارکر DNA به انجام رسید [۱۲].

لیز باکتری: روش توامان یخ زدن و ذوب کردن و سپس سونیکاسیون، برای لیز کردن باکتری نتیجه مطلوب را داد.

1-DMSO: Dimethyl Sulfoxide
2-Minimum Inhibitory Concentration
3-Sub-Minimal Inhibitory Concentration
4-Nutrient Broth
5-CFU= Colony Forming Unit

برای این کار چند پرگنه از باکتری‌های رشد کرده در محیط حاوی عصاره یا بدون عصاره، به لوله‌های جداگانه حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۶) اضافه شد تا هنگامی که جذب نوری لوله در طول موج ۵۶۰nm به ۱ واحد برسد. عمل یخ زدن و ذوب کردن به ترتیب در دمای ۲۰- درجه و ۳۶ درجه سانتی‌گراد سه بار هر بار به فاصله ۱۵ دقیقه انجام گردید. سونیکاسیون به فواصل زمانی ۵، ۲۰، ۴۰ و۶۰ ثانیه در روی پودر یخ صورت گرفت. شدت سونیکاسیون ۰/۸ و با ۰/۵ سیکل ثابت برای همه زمان‌ها انجام گردید. باکتری لیز شده، به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی از نمونه‌های مختلف از رسوب جدا و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت کاتالاز: فعالیت کاتالاز سلولی براساس روش اسپکتروفتومتری [۱۳] صورت گرفت. در این روش به ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰mM (pH=۷)، ۱۵۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ (به عنوان سوبسترا) اضافه کرده و از این محلول سوبسترا به عنوان شاهد نیز استفاده شد. به ۲/۹ میلی‌لیتر از محلول سوبسترای فوق ۱۰۰ میکرولیتر از بخش رویی باکتری‌های لیز شده به عنوان محلول آنزیمی اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۲۴۰nm در دقایق صفر، پنجم، دهم و پانزدهم یادداشت گردید. ۰/۰۱ واحد کاهش جذب نوری در دقیقه به عنوان یک واحد آنزیمی در شرایط فوق تعریف شد.

سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: اساس اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر توانایی آنزیم بر ممانعت از تشکیل رنگ ناشی از مجاورت گزانتین، گزانتین اکسیداز و INT[6] به عنوان سوبسترا استوار است. روش اندازه‌گیری براساس پروتکل شرکت راندوکس انگلستان با تعیین جذب نوری در طول موج ۵۰۵nm صورت گرفت.

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان تام: قدرت ضداکسیدکنندگی تام به طریقه رنگ سنجی آنزیمی با استفاده از کیت شرکت راندوکس انگلستان و براساس پروتکل آن انجام گرفت. در این روش ماده ABTS[7] با استفاده از خاصیت پراکسیدازی مت‌میوگلوبین در حضور H_2O_2 تولید کاتیون رادیکالی

6- INT= 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenol)-5-7-2,2-Azino-di[3-Ethylbenzthiazoline sulfonate]

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

$ABTS^+$ می‌کند که رنگ سبز نسبتا پایداری دارد. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه از تشکیل رنگ جلوگیری کرده و بنابراین باعث کاهش جذب نوری در طول موج ۶۰۰nm می‌شوند.

تعیین مقدار مالون دی آلدیید(MDA)[1] سلولی: مالون دی‌آلدیید که از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می‌شود با اسید تیوباربیتوریک (TBA)[2] کمپلکس رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۵۳۲nm جذب نوری دارد [۱۴]. از تترامتوکسی پروپان به عنوان ماده استاندارد استفاده شد. برای این منظور در لوله‌های درپیچ دار مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد و نمونه ریخته به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۴۰ میکرولیتر SDS(۸/۱g/dl)، ۶۰۰ میکرولیتر محلول TBA(۰/۸g/dl)در اسیداستیک ۲۰٪) اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در حمام آب جوش لوله‌ها را خنک کرده و به هر یک ۱ میلی‌لیتر مخلوط بوتانل- پیریدین (به نسبت ۱۵:۱) اضافه کرده پس از هم زدن فاز رویی حاوی کمپلکس صورتی رنگ را با سانتریفیوژ کردن (۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا کرده و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲nm اندازه گرفته شد. میزان MDA با استفاده از مقدار آن در لوله استاندارد محاسبه گردید.

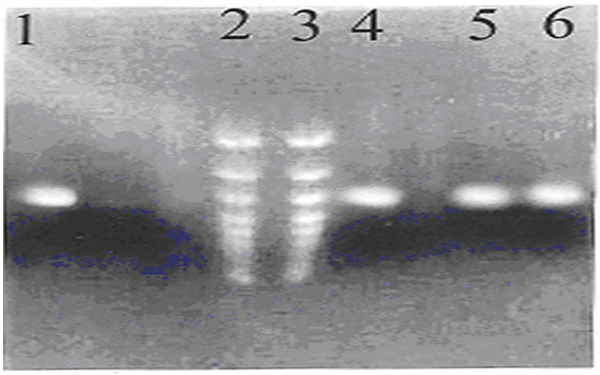
تعیین میزان پروتئین: برای تعیین پروتئین سلولی نمونه از روش فولین شیوکالتو [۱۵] استفاده شد.در این روش ازآلبومین سرم گاو (BSA)[3] به عنوان استاندارد پروتئین استفاده شد.

آنالیز آماری: هر آزمایش حداقل ۵ بار تکرار و نتایج برحسب MEAN±SD بیان گردید. اطلاعات به دست آمده با بکارگیری نرم افزار EPI6 با استفاده از آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفتند، $p<۰/۰۵$ ملاک معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

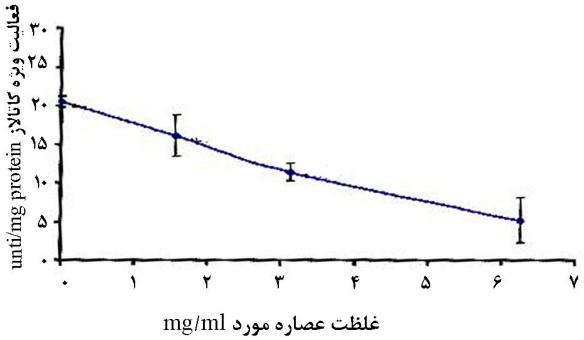
مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره مورد نشان داد که باکتری تحت بررسی در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گیاه مورد هیچگونه رشدی نداشت. بنابراین غلظت مذکور کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) محسوب می‌شود. بیشترین غلظت عصاره که باکتری در آن رشد کرد غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و در این غلظت رشد باکتری کمتر از غلظت‌های ۱/۵ و ۳/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

الگوی الکتروفورتیکی پلاسمیدی نمونه شاهد و باکتری رشد یافته در غلظت‌های مختلف عصاره مورد، در ژل آگاروز در شکل ۱ نشان داده شده است. از آن جا که هیچ‌گونه تغییری در حرکت پلاسمید pBR322 به دلیل عدم تغییر در توپولوژی آن (تبدیل فرم فوق پیچیده به نوع باز شده) ایجاد نگردید.



شکل ۱: الگوی الکتروفورتیکی باندهای پلاسمیدی نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. ۱و۲و۳ به ترتیب مربوط به نمونه‌های رشد یافته در غلظت‌های ۱/۵۶۲mg/ml، ۳/۱۲۵mg/ml و ۶/۲۵mg/ml، ٤ و ٥ مربوط به مارکر و شماره ٦ مربوط به نمونه شاهد(رشد یافته در غیاب عصاره) است

نمودار ۱ فعالیت ویژه کاتالاز، در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض عصاره مورد قرار گرفته را نشان می‌دهد. همان طور که در این نمودار مشاهده می‌شود میزان فعالیت کاتالاز از ۲۰/۴۷±۰/۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه شاهد غلظت صفر به ۵/۱±۲/۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه رشد یافته در بالاترین غلظت عصاره مورد، کاهش یافته است.

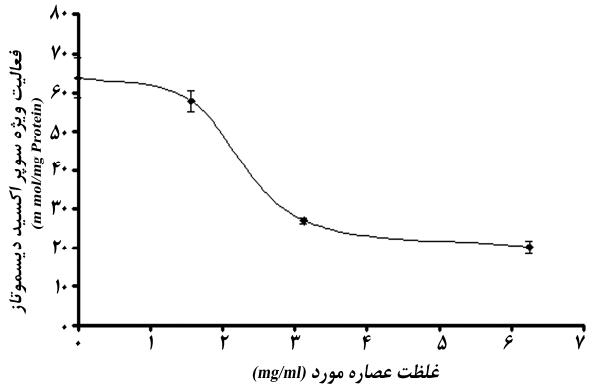


نمودار ۱: نشان دهنده فعالیت ویژه کاتالاز نمونه شاهد و نمونه‌های رشد یافته در سه غلظت مختلف مورد یعنی (۱/۵۶۲(mg/ml)، (۳/۱۲۵(mg/ml) و (۶/۲۵(mg/ml می باشد مقادیر مربوط براساس میانگین ± انحراف معیار به دست آمده است.

1-Malon Dialdehyde
2- Thiobarbitoric Acid
3- Bovine serum Albumin

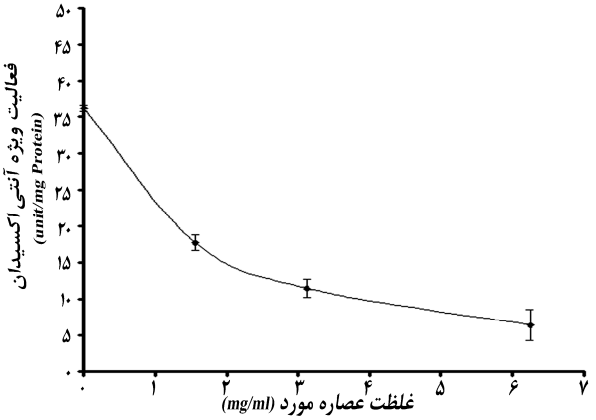
Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

نتایج سنجش SOD سلولی (نمودار ۲) نیز نشان داد که فعالیت SOD از ۶۳/۸۶±۵/۲ واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه شاهد غلظت صفر به ۲۰/۰۴±۱/۶ واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه رشد یافته در بالاترین غلظت عصاره مورد، کاهش یافته است.



نمودار۲ مقادیر فعالیت ویژه سوپراکسیددیسموتاز نمونه شاهد و نمونه‌های رشد یافته در سه غلظت مختلف مورد، یعنی (۱/۵۶۲(mg/ml، (۳/۱۲۵(mg/ml و (۶/۲۵(mg/ml (مقادیر مربوط براساس میانگین ± انحراف معیار به دست آمده است).

نتایج مشابهی در مورد سنجش توتال آنتی‌اکسیدانت سلولی در باکتری *E.coli* در معرض عصاره قرار گرفته و شاهد به دست آمد که در نمودار ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود فعالیت ویژه آنتی‌اکسیدان تام از ۳۶/۲±۰/۵ به ۶/۴۲±۲/۲ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین کاهش یافته است.



نمودار۳: فعالیت ویژه آنتی اکسیدانی کل (قدرت آنتی اکسیدانی تام در میلی گرم پروتئین) نمونه شاهد و نمونه های رشد یافته در سه غلظت مورد تعیین (۱/۵۶۲(mg/ml، (۳/۱۲۵(mg/ml و(۶/۲۵(mg/ml (مقادیر مربوط براساس میانگین ± انحراف معیار به دست آمده است).

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدیید سلولی نشان دادکه مقدار MDA از ۲۳/۰۹±۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در نمونه شاهد، به ۴۹/۹۲±۳/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در نمونه در معرض عصاره مورد قرار گرفته، بجز در غلظت ۱/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مورد، افزایش می‌یابد (جدول ۱).

جدول ۱: ارتباط بین غلظت عصاره گیاه مورد و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء

غلظت عصاره mg/ml	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱/۵۶۲	(۰) شاهد
غلظت MDA µg/mg Protein)	۴۹/۹۲±۴/۳	۲۸/۶۶±۳/۲	۱۰/۴۷±۰/۷۶	۲۳/۰۹±۷/۶

مقدار نسبی پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس نسبت MDA موجود در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

بحث

عصاره گیاه مورد بر روی بسیاری از میکروارگانیزم‌ها مؤثر بوده و باعث مهار رشد و موجب مرگ آن‌ها می‌شود [۳،۵،۱۷]، ولی مکانیسم اثر این گیاه مشخص نیست. در تحقیق کنونی مکانیسم اثرعصاره گیاه مورد، بر روی باکتری *E.coli* K12 HB101 حاوی پلاسمید pBR322 مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید pBR322 یک پلاسمید سوپرکویل منفی با وزن مولکولی ۵/۲kb است که بصورت چندگانه[1]، داخل سلول قرار دارد [۱۶]. از این پلاسمید استفاده شد تا اثر احتمالی عصاره بر روی ساختار DNA بررسی شود. بسیاری از ترکیبات ضدباکتریایی اثرات سمی خود را از طریق حذف پلاسمید انجام می‌دهند که از آن میان می‌توان به مطالعه Baharathi اشاره کرد، که اثرات ۶ ماده مختلف را بر روی وکتورهای پلاسمیدی با طیف وسیع در *E.coli* بررسی کرده و نشان دادند که این مواد به صورت مختلفی علیه پلاسمیدهای خاصی مؤثر هستند. به عنوان مثال SDS و پلامباجین هر دو سبب حذف پلاسمید و نهایتاً عدم تقسیم آن گردیده باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که قبلاً مقاوم بوده‌اند حساس می‌کند [۷]. در مطالعه حاضرنیز عصاره گیاه مورد، برخلاف مطالعه بهاراتی و نیز مطالعه

1- Multicoppy

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

Deshpande [۱۷] نه باعث حذف پلاسمید و نه سبب خطی شدن آن گردید، و نشان داد عصاره گیاه مورد هیچ‌گونه اثری روی پلاسمید ندارد؛ این نتیجه، نتایج قبلی مربوط به پلاسمیدهای طبیعی مسئول مقاومت دارویی را هم تأیید می‌کند [۶]. تحقیقات مختلفی در مورد نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در از بین بردن سلول‌ها توسط عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است. در این راستا Nandi و همکاران [۱۸] با مطالعه اثر تخریبی دو ماده Acaciadide A,B که نوعی ساپونین جدا شده از گیاه فانیکلاکازی[1] هستند، متوجه شدند که اثرات ضد کرمی این عصاره به علت ایجاد رادیکال‌های آزادی است که وقتی در مجاورت SOD و کاتالاز اضافی قرار می‌گیرند آسیب غشایی القاء شده از مواد مؤثر گیاه نیز متوقف می‌شود. نتایج مطالعه Nandi و همکاران، نقش ساپونین‌ها در تولید آنیون‌های سوپراکسید و آغاز پراکسیداسیون لیپید را مطرح نمود [۱۸]. Hu و همکاران [۱۹] با مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تخمیری دانه لوبیا نشان دادند که این عصاره برخلاف عصاره مورد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی برعلیه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع داشته و با ویتامین C و ترولوکس[2] قابل مقایسه است.

کاهش میزان آنتی‌اکسیدان کل با کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و SOD همراه می‌باشد. این امر باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و نهایتاً منجر به آسیب سلولی می‌شود. چنین همراهی در گزارش Delibashvili در هپاتوسیت‌های موش صحرایی پس از تزریق آلوکسان نیز مشاهده شده است [۲۰]. ارتباط منفی این آنزیم‌ها با MDA نیز آنطور که در مطالعه حاضر دیده شده در مطالعه Rukmini و همکاران [۲۱] در سلول‌های اریتروسیت افراد شیزوفرنی گزارش شده است و بنابراین قدرت دفاعی سیستم بیولوژیک در برابر مواد اکسیدان با کاهش آنزیم‌های فوق کاهش یافته و اکسیداسیون چربی‌های غشایی افزایش یافته است. علت کاهش میزان اکسیداسیون غشایی در غلظت پایین عصاره مشخص نیست ولی از آنجایی که آزمایش چندین بار تکرار شده است صرفاً خطای آزمایش نبوده و بایستی مطالعه بیشتری در این غلظت و غلظت‌های بسیار پایین تر با نمونه کامل و نیز تحت اثر عوامل مختلف تخلیص شده از آن صورت گیرد.

اطلاعاتی در مورد مکانیزم اثر ضدمیکروبی عصاره گیاه مورد وجود ندارد. نتایج مطالعه کنونی در واقع اولین تحقیق در این زمینه و با این دیدگاه محسوب می‌شود. براساس این مطالعه، عصاره مورد با کاهش فعالیت کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آنتی‌اکسیدان تام سلولی و هم‌چنین افزایش مالون دی‌آلدیید در باکتری *E.coli* سبب افزایش $O2^-$ و O^- و OH^- (رادیکال‌های آزاد) سلولی و افزایش پراکسیداسیون لیپید غشاء شده و در نتیجه سبب صدمه به سلول و مرگ باکتری می‌شود. عدم تأثیر عصاره گیاه مورد بر پلاسمید pBR322 مشابه نتایج مطالعه Baharathi [۸] است که نشان دادند اثر مواد بر پلاسمیدهای مختلف، متفاوت بوده به طوری که برخی باعث حذف پلاسمید و برخی دیگر بدون تأثیر بر پلاسمید می‌باشند.

نشان داده شده است که یکی از ترکیبات فنلی مؤثر در خاصیت ضدباکتریایی گیاه مورد حتی در غلظتی هزار برابر غلظت مؤثر آن (یک میکروگرم) در حضور خون، توانایی خود را از دست می‌دهد [۲۲].

نتیجه‌گیری

به دلیل بالا بردن میزان رادیکال‌های آزاد در خون که اثرات سمی دارند و احتمال از دست دادن خاصیت ضدباکتریایی عصاره مورد شاید امکان استفاده مستقیم از عصاره کامل به عنوان آنتی‌بیوتیک وجود نداشته باشد. بنابراین مطالعات بیشتری بایستی در *in vivo* و *in vitro* انجام شود تا بتوان از عصاره این گیاه یا مشتقات آن به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از اعضای شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به خاطر تصویب این طرح تحقیقاتی تشکر می کنیم. از همکاری صمیمانه خانم دکتر منیژه عطاپور در انجام آزمایشات و خانم مریم صباغی رحیمی در تایپ این مقاله سپاسگزاری می‌نماییم.

1- *funicleacacia*
2- Terelux

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018

References

[۱] توکلی ص، صداقت م ر. گیاهان دارویی. نوشته هانس فلوک، چاپ پنجم ،نشر طبیب، تهران، ۱۳۷۸، صفحه: ۲۰۲.

[۲] زمان س. گیاهان داروئی. روش‌های کشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ترجمه کتاب ولاگ ژ، استودولا ز، چاپ اول، تهران، انتشارات ققنوس، ۱۳۷۹، صفحات: ۸-۷.

[۳] صالح‌نیا ع‌ن. استخراج و شناسایی مواد مؤثر مورد و بررسی اثرات آن بر علیه میکروارگانیزم های بیماری‌زا. پایان نامه دکترای داروسازی، شماره ۲۶۷۶، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۹.

[4] Mansouri H Khaleghi S. Inhibition of staphylococcus aureus mediated by extract of Iranian plants. *Pharmaceutical Biology.* 1999; 37(5): 375-7.

[5] Al-saimary IE, Bakr SS, Jaffar T, Al-saimary AE, Salim H, Al-Muosawi R. Effects of Some plant extracts and antibiotics on Psendomonas areuginosa isolated from various burn cases. *Saudi Med J*, 2002; 23(7): 802-5.

[۶] شکیبایی مر، حیدری مر، احمدی‌نژاد م، محمدی م. اثرات ضدپلاسمیدی ۵ عصاره گیاهی از گیاهان دارویی بر روی سویه های مقاوم کلبسیلا پنومونیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، بهار و تابستان ۱۳۷۹، سال نهم/ شماره ۳۴/۳۳ ، صفحات: ۸-۱.

[7] Bharathi A, Polasa H. Elimination of broad-host range plasmid vectors in Escheri chia coli by curing agents. *FEMS*, 1991; 68(1): 37-40.

[8] Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair Amst*, 2004; 3(8-9): 1109-15.

[9] Proctor PH. Free-radicals and human disease in: CRC handbook of free radicals and antioxidants.Vol.1 1989; pp: 209-221.

[10] National committee for clinical standards; methods for dilutions in antimicrobial susceptibility tests for bacterial grown aerobically 4th ed. Approved standard M70-A4/NCCLS. 1996.

[11] Dillon JAR, Nestman ER. Recombinant DNA methodology.N.Y.John wiley and sun-press.2nd ed. 1985; pp: 1-4.

[12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG,Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology, volum 1, USA John wiley & Sons, 1990; pp: 2.2.5A.

[13] http:// WWW.Worthington-Biochem.Com/Ctl/Default. Html.Catalase.

[14] Lykkesfeldt J. Determination of Malondialde_ hyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorecence detection: comparison with ultraviolet visible spectrophotometry. *Clin Chem*. 2001; 47(9): 1725-7.

[15] Ghalambor MA. Experimental Biochemistry vol.1, 2nd ed P.U. publication, Shiraz. 1975; pp: 166-70.

[16] Devasagayam TP, Subramanian M, Singh BB, Ramanathan R, Das NP. Protection of plasmid pBR322 DNA by Flavonoids against single-stranded breaks induced by singletmolecular oxygen. *J Photochem photobiol B*, 1995; 30(2-3): 97-103.

[17] Deshpande C, Chopade BA. Plasmid mediated silver resistance in Acinetobacter baumannii. *Biometals*. 1994; 7: 49-56.

[18] Nandi B, Roy S, Bhattacharya S, Babu SPS. Free-radicals mediated membrane damage by saponins, acaciaside-A and B. *Phytother Res*, 2004; 18(3): 191-4.

[19] Hu CC, Hsiao CH, Huang SY, Fu SH, Lai CC, Hong TM, et al. Antioxidant activity of fermented soybean extract. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(18): 5735-9.

[20] Delibashvili D, Kipiani V, Na oradze M. Dumbadze Z. Content of nitric oxide in organs and tissues and its importance in pathogensis of alloxan diabetes. Issue 2-ABRE volume 2, 2002, 145-8.

[21] Rukmini MS, Benedicta D, Vivian D. Superoxide dismutase and Catalase activities and their correlation with malondialdehyde. in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2004; 19(2): 114-8.

[22] Rotstein A, Lifshitz A, Kashman Y. Isolation and antibacterial activity of acylphloroglucinols from Myrtus communis. *Antimicrob Agents Chemother,* 1974; 6(5): 539-42.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 0:53 +0430 on Thursday July 19th 2018