

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

جلد چهار، شماره چهار-آ، پاییز ۱۳۸۴، ۲۲۷-۲۲۰

# mekanisem-e-athr-e-pardis-e-mikrobi-e-ecoli-k12-hb101

دکتر احمد غلامحسینیان<sup>۱</sup>، دکتر محمد رضا شکیبایی<sup>۲</sup>، زهرا جمالی<sup>۳</sup>

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۱/۲۱ اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۷/۲۷ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۷/۲۷

## 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 ضد میکروبی، هنوز مکانیسم اثر ضد میکروبی این گیاه به درستی مشخص نشده است. در این تحقیق مکانیسم اثر ضد میکروبی عصاره مтанولی مورد بر روی باکتری *E.Coli* HB101 مطالعه و بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی باکتری *E.Coli* K12 HB101 pBR322 حاوی پلاسمید 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 سونیکاسان و بخ زدن و ذوب کردن، لیز شده و سپس فعالیت کاتالاز، سوپراکسیدیسموتاز (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 به ۰/۴۷±۰/۰۵ واحدهای میلی‌گرم پروتئین کاهش پیدا کرد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، تحت شرایط فوق از ۶۳/۸۶±۵/۲ در نمونه شاهد به ۲۰/۰۴±۱/۶ 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 به ۰/۲ 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 ۰/۹±۰/۷ به ۰/۴±۰/۳ 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 مtanولی مورد، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آنتی‌اکسیدان تام، مالون دی‌آلدیید

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی،  
تلفن: ۰۴۱-۳۲۲۱۶۰۶، فاکس: ۰۴۱-۳۲۲۱۶۷۱، 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

## مقدمه

مکانیسم، مقاومت باکتری‌های نسل بعدی را از میان برده و آن‌ها را نسبت به داروهایی که قبلاً در برابر آن‌ها مقاوم بوده‌اند حساس می‌گردانند [۷]. از طرف دیگر اشکال فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های آزاد، آب اکسیژنه و هیدروکسیل رادیکالی به علت فعالیت فوق العاده زیادشان قادرند با انواع ملکول‌های RNA 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 کفايت در از بین بردن آن باعث استرس اکسیداتیو و نهایتاً باعث تخریب ماکرومکول‌ها 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 ضد اکسیدانی تام سلول و یا اثرات آن بر آنزیم‌های در گیر در این سیستم‌ها مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد سنجش قرار گرفت. علاوه بر آن، نقش عصاره بر اکسیداسیون غشاء سلولی از طریق اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلید<sup>۳</sup> 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<sup>۴</sup> از شرکت E.coli K12 HB101 سیگمای انگلستان تهیه گردید. باکتری

طبی سالیان متمادی گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی از موارد تنها راه درمان بیماری‌ها محسوب می‌شند 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 انسانس فرآری 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 ضد میکروبی قویتری بود. در تحقیقی دیگر که در عراق بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از موارد سوختگی صورت گرفت، مقایسه فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی و ضد پلاسمیدی پنج گیاه دارویی از جمله گیاه مورد بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، نشان داد که مورفولوژی باکتری در معرض عصاره قرار گرفته، آنچنان که با میکروسکوپ فلورستن 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 ضد اکسیدانی به عمل آمده است. از معده‌دود تحقیقات انجام شده به عنوان مثال نشان داده‌اند که پلامباجین<sup>۱</sup> عصاره گیاهی است که می‌تواند باعث به وجود آمدن شکاف در DNA فوق پیچیده<sup>۲</sup> پلاسمید شده، آن را باز کرده و در نتیجه باعث عدم تقسیم پلاسمید گردد. این

3-MDA: Malondialdehyde  
4- Ethyldium Bromide

1 -Palambagin  
2- Supercoil DNA

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 ۵۶۰ nm 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 و ۶۰ 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 سانتریفیوژ 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 اسپکتروفوتومتری [۱۲] صورت گرفت. در این روش به ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ mM میکرولیتر آب اکسیژن 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 ۲۴۰ nm در دقایق صفر، پنجم، دهم و پانزدهم یادداشت گردید. ۱۰٪ واحد کاهش جذب نوری در دقیقه به عنوان یک واحد آنزیمی در شرایط فوق تعريف 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<sup>۶</sup> به عنوان سوبسترا استوار است. روش اندازه‌گیری براساس پروتکل شرکت راندوکس انگلستان با تعیین جذب نوری در طول موج ۵۰۵ nm صورت گرفت.**

**تعیین میزان آنتی‌اکسیدان تام: قدرت ضد اکسیدکنندگی** تام به طریقه رنگ سنجی آنزیمی با استفاده از کیت شرکت راندوکس انگلستان و براساس پروتکل آن انجام گرفت. در این روش ماده ABTS<sup>۷</sup> با استفاده از خاصیت پراکسیدازی متیوگلوبین در حضور H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تولید کاتیون رادیکالی

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

**روش عصاره گیری:** عصاره گیاه مورد به روش خیساندن در الكل متیلیک ۸۰٪ تهیه شد [۳]. پس از تهیه عصاره خشک در دی‌متیل‌سولفوکساید<sup>۱</sup> حل شد و از آن‌جا که این حال تا حدی بر رشد باکتری اثر بازدارندگی داشت، MIC<sup>۲</sup> حل نیز تحت بررسی قرار گرفت.

**تعیین MIC و SIC عصاره گیاه مورد: تعیین کمترین غلظت عصاره ممانع کننده از رشد (MIC) و بیشترین غلظت عصاره ممانع کننده از رشد<sup>۳</sup> (SIC) مورد، بر ضد باکتری استاندارد [۱۰] انجام شد. در این روش به ۲۵ میلی‌گرم عصاره متابولی خشک، ۲۵۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص اضافه و کاملاً آن در حل شد. سپس با محیط کشت نوترینت برات<sup>۴</sup> استریل به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. رقت‌های سریالی ۱:۲ تا ده لوله متوالی تهیه گردید. ۱/۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقیق شده باکتری حاوی<sup>۵</sup> CFU ۱۰<sup>۵</sup> 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. الکتروفوروز پلاسمید جدا شده با استفاده از آگارز ۰/۷ گرم درصد محلول بافر تریس-بورات- EDTA (TBE) ۲ میلی‌مolar در pH 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

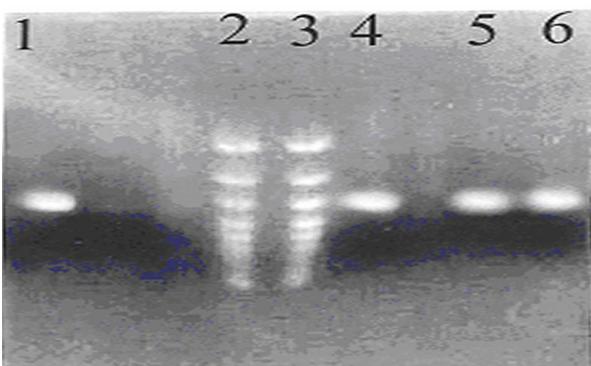
4-Nutrient Broth

5-CFU= Colony Forming Unit

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

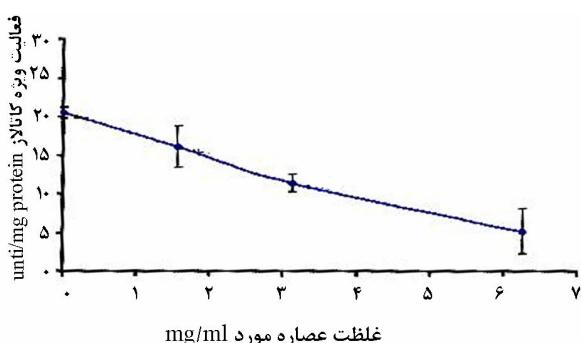
می شود. بیشترین غلظت عصاره که باکتری در آن رشد کرد غلظت ۶/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود و در این غلظت رشد باکتری کمتر از غلظت های ۱/۵ و ۳/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود.

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



شکل ۱: الگوی الکتروفورتیکی باندهای پلاسمیدی نمونه های مورد بررسی را نشان می دهد. او ۲۰۳ به ترتیب مربوط به نمونه های رشد یافته در غلظت های ۱/۵ ۳/۲۵ ۶/۲۵ mg/ml و ۱۲/۵ mg/ml و ۵ مربوط به مارکر و شماره ۶ مربوط به نمونه شاهد (رشد یافته در خیاب عصاره) است

نمودار ۱ فعالیت ویژه کاتالاز، در نمونه شاهد و نمونه های در معرض عصاره مورد قرار گرفته را نشان می دهد. همان طور که در این نمودار مشاهده می شود میزان فعالیت کاتالاز از ۲۰/۴۷ $\pm$ ۰/۷ واحد در میلی گرم پروتئین در نمونه شاهد غلظت صفر به ۱/۱ $\pm$ ۰/۹ واحد در میلی گرم پروتئین در نمونه رشد یافته در بالاترین غلظت عصاره مورد، کاهش یافته است.



نمودار ۱: نشان دهنده فعالیت ویژه کاتالاز نمونه شاهد و نمونه های رشد یافته در سه غلظت مختلف مورد یعنی (۱/۵ ۳/۲۵ ۶/۲۵ mg/ml) می باشد مقادیر مربوط بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار به دست آمده است.

ABTS<sup>+</sup> می کند که رنگ سبز نسبتاً پایداری دارد. آنتی اکسیدان های موجود در نمونه از تشکیل رنگ جلوگیری کرده و بنابراین باعث کاهش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm می شوند.

تعیین مقدار مالون دی آلدیید (MDA)<sup>۱</sup> سلولی: مالون دی آلدیید که از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می شود با اسید تیوباربیتوریک (TBA)<sup>۲</sup> کمپلکس رنگی تولید می کند که در طول موج ۵۳۲ nm جذب نوری دارد [۱۴]. از تترامتوکسی پروپان به عنوان ماده استاندار استفاده شد. برای این منظور در لوله های در پیچ دار مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از هر یک از محلول های استاندار و نمونه ریخته به هر کدام ۱۰۰ ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطیر، ۴۰ میکرولیتر SDS (dl/g/8، ۱/۱ g/dl) اضافه میکرولیتر محلول TBA (g/8 dl/۰.۰۴) در اسیداستیک ۲۰٪ اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در حمام آب جوش لوله ها را خنک کرده و به هر یک ۱ میلی لیتر مخلوط بوتائل - پیریدین (به نسبت ۱:۱۵) 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 ۵۳۲ nm اندازه گرفته شد. میزان MDA با استفاده از مقدار آن در لوله استاندار محاسبه گردید.

تعیین میزان پروتئین: برای تعیین پروتئین سلولی نمونه از روش فولین شیوکالتو [۱۵] استفاده شد. در این روش از آلبومین سرم گاو (BSA)<sup>۳</sup> به عنوان استاندار پروتئین استفاده شد.

آنالیز آماری: هر آزمایش حداقل ۵ بار تکرار و نتایج بر حسب MEAN $\pm$ SD بیان گردید. اطلاعات به دست آمده با بکارگیری نرم افزار EPI6 با استفاده از آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفتند.  $p < 0.05$  ملاک معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

## نتایج

مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره مورد نشان داد که باکتری تحت بررسی در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره گیاه مورد هیچ گونه رشدی نداشت. بنابراین غلظت مذکور کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) محسوب

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

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدید سلولی نشان داد که مقدار MDA از  $23/0.9 \pm 7/6$  میکروگرم در میلی‌لیتر در نمونه شاهد، به  $49/92 \pm 3/4$  میکروگرم در میلی‌لیتر در نمونه در معرض عصاره مورد قرار گرفته، بجز در غلظت  $1/562$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مورد، افزایش می‌یابد (جدول ۱).

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

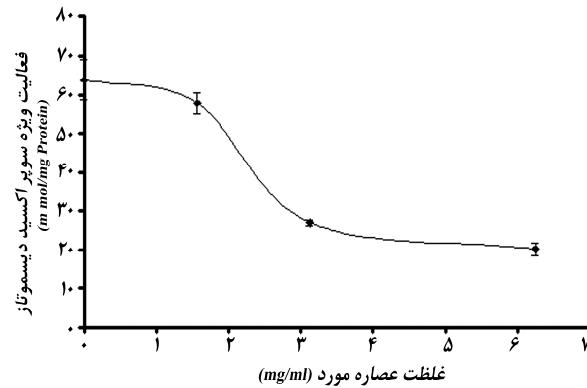
غلظت عصاره mg/ml	غلظت MDA $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Protein)	نمونه شاهد (+) شاهد ۱/۵۶۲	غلظت عصاره mg/ml	غلظت MDA $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Protein)	نمونه شاهد ۲۳/۰.۹ $\pm ۷/۶$
۳/۱۲۵	۶/۲۵		۱۰/۴۷ $\pm ۰/۷۶$	۲۸/۶۶ $\pm ۳/۲$	$49/92 \pm 4/3$

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

### بحث

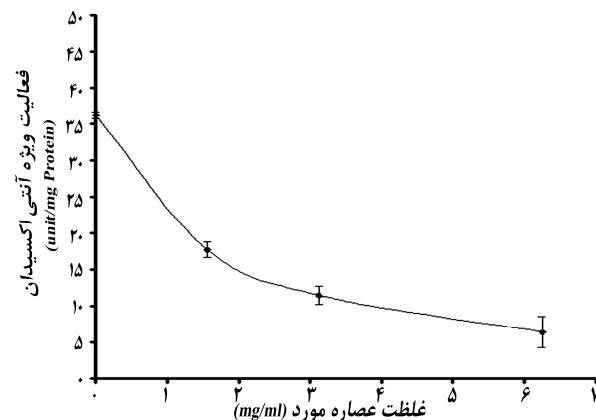
عصاره گیاه مورد بر روی بسیاری از میکروارگانیزم‌ها مؤثر بوده و باعث مهار رشد و موجب مرگ آن‌ها می‌شود [۱۷، ۳۵، ۳۶]. ولی مکانیسم اثر این گیاه مشخص نیست. در تحقیق کنونی مکانیسم اثر عصاره گیاه مورد، بر روی باکتری pBR322 HB101 E.coli K12 حاوی پلاسمید pBR322 مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید یک پلاسمید سوپرکویل منفی با وزن مولکولی  $2/5\text{kb}$  است که بصورت چندگانه<sup>۱</sup>، 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 قبلًا مقاوم بوده‌اند حساس می‌کند [۱۷]. در مطالعه حاضر نیز عصاره گیاه مورد، برخلاف مطالعه بهاراتی و نیز مطالعه

نتایج سنجش SOD سلولی (نمودار ۲) نیز نشان داد که فعالیت SOD از  $2/86 \pm 5/2$  واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه شاهد غلظت صفر به  $4/20 \pm 1/6$  واحد در میلی‌گرم پروتئین در نمونه رشد یافته در بالاترین غلظت عصاره مورد، کاهش یافته است.



نمودار ۲: مقادیر فعالیت ویژه سوپر اکسید دی‌سیماتاز نمونه شاهد و نمونه‌های رشد یافته در سه غلظت مختلف مختلط موردن، یعنی  $1/562(\text{mg}/\text{ml})$ ،  $3/125(\text{mg}/\text{ml})$  و  $6/25(\text{mg}/\text{ml})$  (مقادیر مربوط بر اساس میانگین  $\pm$  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  $5/26 \pm 0/5$  به  $2/42 \pm 2/2$  میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین کاهش یافته است.



نمودار ۳: فعالیت ویژه آنتی‌اکسیدانی کل (قدرت آنتی‌اکسیدانی) تمام در میلی‌گرم پروتئین (نمونه شاهد و نمونه‌های رشد یافته در سه غلظت موردن تعیین  $6/25(\text{mg}/\text{ml})$ ،  $3/125(\text{mg}/\text{ml})$  و  $1/562(\text{mg}/\text{ml})$ ) (مقادیر مربوط بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار به دست آمده است).

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، سوپراکسیدیسموتاز و آنتیاکسیدان قام سلولی و همچنین افزایش مالون دی‌آلدیید در باکتری *E.coli* سبب افزایش  $O_2^-$  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 سلول آنیون‌های سوپراکسید و آغاز پراکسیداسیون لیپید را 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 ضدبакتریایی 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 بدن میزان رادیکال‌های آزاد در خون که اثرات سمی دارند و احتمال از دست دادن خاصیت ضدبакتریایی عصاره مورد شاید امکان استفاده مستقیم از عصاره کامل به عنوان آنتی‌بیوتیک وجود نداشته باشد. بنابراین مطالعات بیشتری بایستی در *in vitro* و *in vivo* 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 می‌کنیم. از همکاری صمیمانه خانم دکتر منیزه عطاپور در انجام آزمایشات و خانم مریم صباغی رحیمی در تایپ این مقاله سپاسگزاری می‌نماییم.

[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 بدن 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 جدأ شده از گیاه فانیکلاکاری<sup>۱</sup> 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 لوبيا نشان دادند که این عصاره برخلاف عصاره مورد، فعالیت آنتیاکسیدانی قوی برعلیه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشبع داشته و با ویتامین C و ترولوکس<sup>۲</sup> 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 صحرابی 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 آکسیداسیون 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

1- *funicleacacia*

2- *Terolux*

## References

- [۱] توکلی ص، صداقت م.ر. گیاهان دارویی. نوشته هانس فلوك، چاپ پنجم، نشر طبیب، تهران، ۱۳۷۸، صفحه: ۲۰۲.
- [۲] زمان س. گیاهان داروئی. روش‌های کشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ترجمه کتاب ولاغ ژ، استودولا ز، چاپ اول، تهران، انتشارات ققنوس، ۱۳۷۹، صفحات: ۷-۸.
- [۳] صالح‌نیا عن. استخراج و شناسایی مواد مؤثر مورد و بررسی اثرات آن بر علیه میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا. پایان نامه دکترای داروسازی، شماره ۲۶۷۶، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۹.
- [۴] Mansouri H Khaleghi S. Inhibition of staphylococcus aureus mediated by extract of Iranian plants. *Pharmaceutical Biology*. 1999; 37(5): 375-7.
- [۵] Al-saimary IE, Bakr SS, Jaffar T, Al-saimary AE, Salim H, Al-Muosawi R. Effects of Some plant extracts and antibiotics on Pseudomonas areuginosa isolated from various burn cases. *Saudi Med J*, 2002; 23(7): 802-5.
- [۶] شکیبایی مر، حیدری مر، احمدی نژاد م، محمدی م. اثرات ضدپلاسمیدی ۵ عصاره گیاهی از گیاهان دارویی بر روی سویه‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، بهار و تابستان ۱۳۷۹، سال نهم / شماره ۳۴/۳۳، صفحات: ۱-۸.
- [۷] Bharathi A, Polasa H. Elimination of broad-host range plasmid vectors in Escherichia coli by curing agents. *FEMS*, 1991; 68(1): 37-40.
- [۸] Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair Amst*, 2004; 3(8-9): 1109-15.
- [۹] Proctor PH. Free-radicals and human disease in: CRC handbook of free radicals and antioxidants. Vol.1 1989; pp: 209-221.
- [۱۰] National committee for clinical standards; methods for dilutions in antimicrobial susceptibility tests for bacterial grown aerobically 4th ed. Approved standard M70-A4/NCCLS. 1996.
- [۱۱] Dillon JAR, Nestman ER. Recombinant DNA methodology. N.Y. John Wiley and Sons-press. 2nd ed. 1985; pp: 1-4.
- [۱۲] 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.
- [۱۳] <http://WWW.Worthington-Biochem.Com/Ctl/Default.Html.Catalase>.
- [۱۴] Lykkesfeldt J. Determination of Malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet visible spectrophotometry. *Clin Chem*. 2001; 47(9): 1725-7.
- [۱۵] Ghalambor MA. Experimental Biochemistry vol.1, 2nd ed P.U. publication, Shiraz. 1975; pp: 166-70.
- [۱۶] 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.
- [۱۷] Deshpande C, Chopade BA. Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Biometals*. 1994; 7: 49-56.
- [۱۸] 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.
- [۱۹] 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.
- [۲۰] Delibashvili D, Kipiani V, Naoradze M, Dumbadze Z. Content of nitric oxide in organs and tissues and its importance in pathogenesis 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.