

اثرات ضد میکروبی ترکیبات سه گونه از سرده وینکا بر برخی از میکروبهای بیماری زا

دکتر صدیقه مهربابان^۱، دکتر احمد مجد^۱، دکتر تارا تمدن^۲

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، کاندیدا آلبیکانس، وینکا، آلکا لوئید

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره این گیاهان بر برخی میکروبهای بیماری زا است که معمولاً دارای مقاومت دارویی شدید می باشند و شامل کاندیدا آلبیکانس، استافیلوکوکوس اورئوس و پseudomonas آئروژینوزا هستند. اثر ضد میکروبی عصاره متانولی پودر خشک ساقه، ریشه و برگ هر سه گونه حاوی الکلوئید بر میکروبهای مورد پژوهش مطابق روش Kirby Baver سنجیده شد. نتایج حاصل از بررسی های ضد میکروبی نشان داد که عصاره متانولی قسمت های مختلف گیاهان مورد آزمایش دارای خاصیت ضد میکروبی است و میزان اثر ضد میکروبی، بستگی به نوع میکروارگانیسم مورد آزمایش دارد. عصاره متانولی برگ سه گونه گیاه مورد مطالعه بر باکتری های پseudomonas آئروژینوزا نسبت به عصاره ساقه و ریشه اثر ضد میکروبی بیشتری دارد. در مورد کاندیدا آلبیکانس عصاره متانولی ساقه نسبت به برگ و ریشه موثرتر است. در مورد کاندیدا آلبیکانس عصاره متانولی ریشه خاصیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به برگ و ساقه نشان داد. شاید الکلوئیدهای هر قسمت از گیاه متفاوت و اثر بیوشیمیایی ویژه داشته باشد. بطور کلی عصاره متانولی گونه پیچ تلگرافی برگ ریز از دو گونه دیگر موثرتر است.

سراغاز

گیاهان تیره خرزهره چوبی یا علفی با برگهای متقابل و به ندرت منفرد می باشند. فرمول کلی گل ۵ گاسبرگ + ۵ گلبرگ + ۵ پرچم + مادگی دو برچه ای با تخمک های واژگون است. پروانش، پنج تلگرافی برگ ریز و پیچ تلگرافی برگ درشت سه گونه از سرده وینکا و از تیره خرزهره هستند. این گیاهان با داشتن ترکیبات شناخته شده ای چون ترپنوئیدها، استروئیدها، الکلوئیدها و فنل ها از گیاهان دارویی با ارزش به شمار می آیند. این گیاهان منبع چند داروی مهم ضد سرطان هستند (۳). الکلوئیدهای گیاه پروانش از جمله وینیلستین و ویندزین برضد تکثیر سلول های ملانومای انسانی عمل می کنند. اثر سمی ناولیین با دو الکلوئید دیگر مقایسه و مشخص شده که ناولیین نسبت به ویندزین، اثر سمی کمتری دارد (۸). در بررسی های انجام شده مشخص گردیده است که

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

۲- دانشکده داروسازی واحد تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

وینلاستین و وینکریستین آزاد سازی هیستامین را تحریک می کنند. آزادسازی هیستامین با حضور کلسیم خارج سلولی تشدید می شود (۶). اثر ضد میکروبی سه گونه وینکا بر برخی از قارچ ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. این گیاهان بر قارچ های فوزاریوم ، آلترناریا و پنی سیلیوم اثر قارچ ایستایی ، نشان می دهند (۱).

نمونه گیری و روش بررسی

پروانس^۱ ، پیچ تلگرافی برگ ریز^۲ و پیچ تلگرافی برگ درشت^۳ سه گونه از سرده وینکا و از تیره خرزهره^۴ هستند.

استافیلوکوکوس اورئوس گرام مثبت و کروی شکلی بوده که به صورت تک ، جفت یا خوشه های نامنظم قرار می گیرند. این باکتری ها در انواع مختلفی کشت و تکثیر یافته و دارای فعالیت متابولیکی شدیدی هستند.

برحسب نیاز ، مقداری از برگ و ساقه و ریشه هر سه گونه مورد مطالعه در فصل تابستان در سه نوبت در ماههای تیر و مرداد و شهریور جمع آوری و در شرایط یکسان و در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد ، تا به طور کامل خشک شود. سپس آنها را به صورت پودر درآورده و جهت تهیه عصاره در شیشه های مجزا نگاه داری کردیم . ۵۰ میلی لیتر متانول را به ۱۰ گرم پودر برگ یا ساقه یا ریشه افزوده و مخلوط را ۴۸ ساعت در یخچال نگاه می داریم.

عصاره خام متانولی را در خلاء تبخیر نموده و ته مانده تبخیر را با اسید کلریدریک رقیق و کلروفرم مخلوط نموده و در فازآب اسید الکلوئیدها و ترکیبات فنلی حل می گردد. فازآبی حاوی الکلوئیدها را به وسیله هیدروکسید آمونیوم قلیایی کرده و کلروفرم به آن افزوده گردید. فازکلروفرمی که حاوی الکلوئیدهاست ، برای بررسی ضد میکروبی به کار برده شد (۶).

باکتری های مورد نیاز استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳۳۷) و سودوموناس اثرژنوزا (۱۰۷۴) از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و کاندیدا آلبیکانس (۲۱۵۷) از آزمایشگاه تحقیقاتی داروپخش تهیه شد.

جهت کشت قارچ کاندیدا آلبیکانس از محیط رایج سابورودکستروزآگار^۵ استفاده شد و باکتری های مورد پژوهش در محیط موثر هینتون^۶ آگار کشت شدند.

سنجش حساسیت مطابق روش بوئروکربی^۷ انجام شد. میکروارگانسیم های مورد مطالعه در فاز لگاریتیمی رشد و غلظت استاندارد^۸ ۱۰ میکروارگانسیم در میلی لیتر بود. در هر جهاک ۰/۰۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی با غلظت ۱۰۰ mg/ml وارد نمودیم . پس از اینکوباسیون اقدام به اندازه گیری قطر هاله عدم رشد می کنیم (۴).

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| 1- Vinca rosea | 3- Vinca major |
| 2- Vinca minor | 4- Apoeyna ceae |
| 5- Sabour dextrose agar | 6- Muller hinton agar |
| 7- Bauer & Kirby | |

این پژوهش روی موثرترین عصاره مورد آزمایش مطابق روش بوئروکری انجام شد و کمترین رقت عصاره که هاله عدم رشد نشان داد¹ MIC می باشد.

یافته ها ، گفتگو و بهره گیری پایانی

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره حاوی آلکالوئید گونه پیچ تلگرافی برگ ریزی ، پیچ تلگرافی برگ درشت و پروانس بر رشد میکروب های فرصت طلب بیماری زای مورد آزمایش استافیلوکوکوس اورئوس ، سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا آلبیکانس اثر ضد میکروبی دارد. این اثر در مورد باکتری ها به صورت باکتری کش¹ و در مورد کاندیدا آلبیکانس قارچ ایستایی² است.

مقایسه اثر عصاره متانولی ساقه ، برگ و ریشه این سه گونه گیاهی بر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که هر سه گونه فوق براین باکتری اثر دارد. با اندازه گیری هاله عدم رشد مشخص گردید که اثر ضد میکروبی ساقه شدیدتر بوده و بعد به ترتیب برگ و ریشه می باشد. (نمودار شماره ۱) ضمناً هاله عدم رشد حاصل از عصاره سه گونه گیاهی در هیچ مقطع زمانی تغییر نکرد.

بررسی اثر عصاره ساقه ، برگ و ریشه سه گونه گیاهی مورد پژوهش بر سودوموناس آئروژینوزا را نشان داد ، این باکتری نیز تحت تاثیر این عصاره قرار گرفته و هاله عدم رشد باکتری ، در مدت ۲۱ روز کنترل شد و رشد ثانویه مشاهده نشد. در نتیجه رشد آن به صورت باکتری کشی متوقف می گردد. هاله عدم رشد اطراف چاله دارای عصاره برگ شدیدتر از ساقه و ریشه می باشد (نمودار شماره ۲).

مقایسه اثر عصاره متانولی ساقه ، برگ و ریشه این سه گونه گیاهی بر قارچ کاندیدا آلبیکانس نشان داد که عصاره متانولی برگ هیچ یک از سه گونه مورد پژوهش اثری بر رشد قارچ مزبور ندارد. هاله عدم رشد عصاره ریشه این سه گونه گیاهی اثر ضد قارچی شدیدتری نشان داد. در مورد عصاره ساقه نیز هاله عدم رشد مشاهده شد. هاله عدم رشد در اطراف چاله دارای عصاره ثابت نبود و به تدریج کوچک تر و سرانجام ناپدید گشت و رشد قارچ در منطقه هاله کامل شد. اثر این سه گونه گیاهی به حالت قارچ ایستایی است (نمودار شماره ۳).

در این بررسی به طور کلی نشان داده شد که این سه گونه گیاهی دارای اثر ضد میکروبی می باشند اما به نظر می رسد آلکالوئیدهای ذخیره در هر قسمت متفاوت است. زیرا در مورد میکروارگانیسم های مختلف قسمت های گوناگون گیاه اثر ضد میکروبی متفاوتی نشان داد ، که نتایج با تحقیقات دیگران همسوی دارد(۶). این پژوهش نشان داد آلکالوئیدها در قسمت های مختلف گیاه متفاوت بوده و معمولاً آلکالوئیدها در محل سنتزشان ذخیره نمی شوند. به عنوان مثال نیکوتین در ریشه تنباکو ساخته شده اما در برگ های آن ذخیره می شود.

1- Minimum inhibitory concentration

2- Bactericide

3- Fungistatic

پژوهشگران نشان دادند که آندل آلکالوئیدها دربرگ ساخته شده اما دراندام های دیگر نیز می توانند ساخته شود. آلکالوئیدهای آجمالیسین و سرپانتین در برگ و ریشه ساخته می شوند ولی بیشتر در ریشه ذخیره می گردند (۵).

(مرسی ۱۹۸۵) نشان داد که برخی آلکالوئیدها مانند ویندولین در گونه های وینکا در سلول های ایدیوبلاست^۱ جمع می شوند. ایدیوبلاست ها عموماً در سلول های میان برگی^۲ نردبانی قرار دارند.

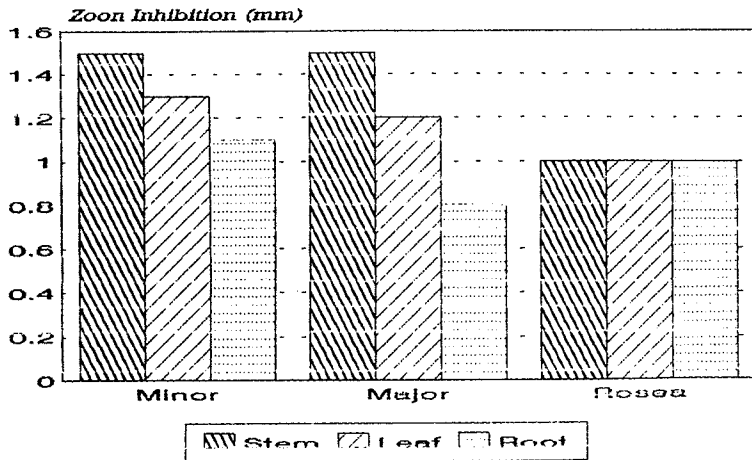
مورری بر نتایج اثر ضد میکروبی عصاره متانولی برگ، ساقه و ریشه پیچ تلگرافی برگ ریز، پیچ تلگرافی برگ درشت و پروانش مشخص می کند که غلظت های به کار گرفته شده گونه پیچ تلگرافی برگ ریز دارای بیشترین اثر ضد میکروبی است. در حالی که گونه های پیچ تلگرافی برگ درشت و پروانش اثر ضد میکروبی کمتری دارند. با توجه به بررسی ها و تحقیقات انجام شده توسط پژوهشگران در مورد آلکالوئیدهای گونه پیچ تلگرافی برگ ریز و پروانش، مشخص می شود که ترکیب های آلکالوئیدها اثر بیوشیمیائی ویژه ای دارند (۱۰) در یک تحقیق دیگر اعلام شده است که اثر آلکالوئید وینکاروبین گونه پیچ تلگرافی برگ ریز بر روی بازدارندگی اثر بیوسنتز اسیدهای هسته ای و پروتئین ها، پنج برابر بیشتر از اثر آلکالوئید وینلاستین گونه پروانش است (۹). اثر ضد میکروبی شدید گونه پیچ تلگرافی برگ ریز در تجربیات ما به احتمال می تواند به نوع آلکالوئیدهای این گونه نسبت داده شود. از این نتیجه حاصل می شود که آلکالوئیدهای گونه پیچ تلگرافی برگ ریز، اثر ضد میکروبی شدیدتری نسبت به آلکالوئیدهای دو گونه دیگر دارد. اثر ضد میکروبی سه گونه گیاه مورد پژوهش به ترتیب بر باکتری گرم مثبت موثرتر از گرم منفی بوده و در مورد قارچ اثر ضد میکروبی کمتری نشان داد.

حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره ساقه سه گونه گیاهی مورد آزمایش بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس تا رقت $1/8$ و معادل $12/5 \text{ mg/ml}$ بوده و قطر هاله مهار رشد در مورد سه گونه گیاه مورد پژوهش نشان داد که اثر ضد میکروبی پیچ تلگرافی برگ ریز شدیدتر از دو گونه گیاهی دیگر است.

حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره ساقه سه گونه گیاهی بر سودوموناس آئروژینوزا در مورد پیچ تلگرافی برگ ریز غلظت $1/8$ برابر $12/5 \text{ mg/ml}$ اما در مورد دو گونه دیگر 50 mg/ml می باشد. حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره برگ سه گونه گیاهی مورد پژوهش بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا تا رقت $1/8$ و معادل $12/5 \text{ mg/ml}$ بوده اما قطر هاله مهار رشد نشان می دهد که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سودوموناس آئروژینوزا حساسیت بیشتری نشان می دهد.

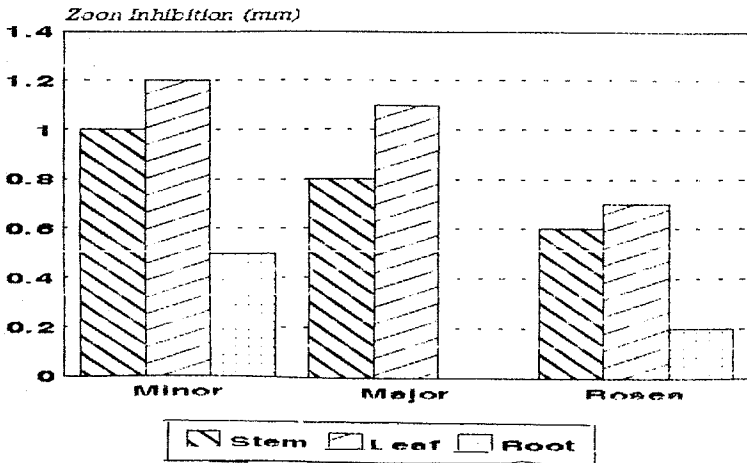
با توجه به اینکه در تجربیات ما سه گونه وینکا اثرات ضد میکروبی متفاوت نشان داده اند، مناسب است که باندهای آلکالوئیدی تفکیک و جداسازی و اثر ضد میکروبی آن به طور جداگانه بررسی شود. این اثر خصوصاً در مورد سایر ارگانسیم ها از جمله باکتری های فرصت طلب بیماری زا که اکثر آنها نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشند، قابل توجه خواهد بود.

The Antimicrobial Activity of Vinca Against Staphylococcus Aureus



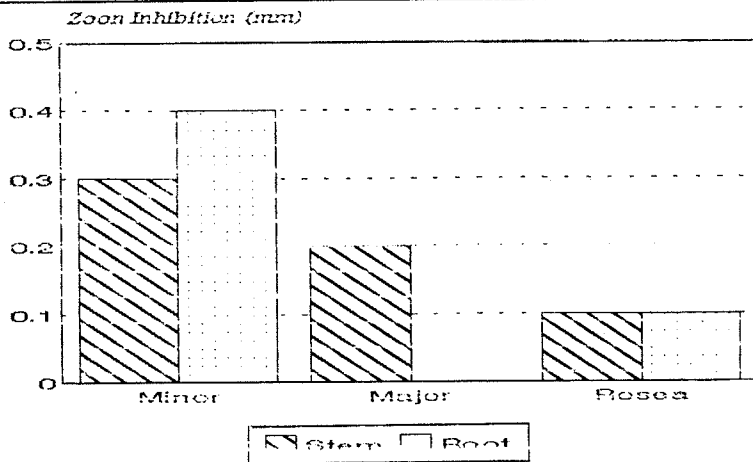
نمودار ۱ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات سه گونه از سرده وینکا بر استافیلوکوکوس اورئوس

The Antimicrobial Activity of Vinca Against Pseudomonas Aeruginosa



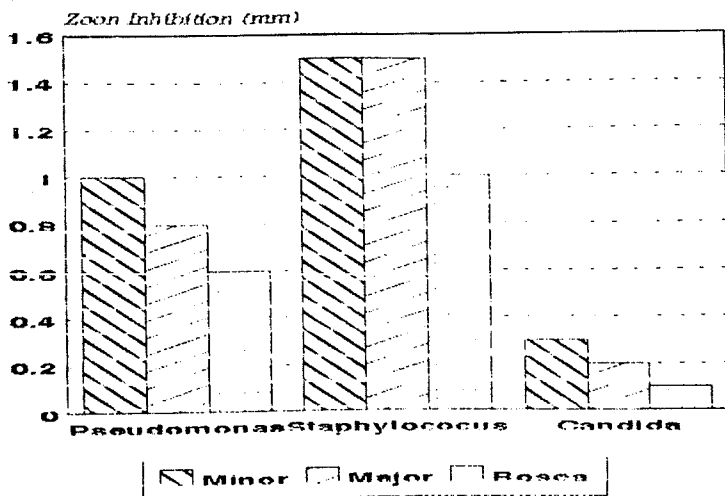
نمودار ۲ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات سه گونه از سرده وینکا بر سودوموناس آئروژینوزا

The Antifungi Activity of Vinca Against *Candida Albicans*



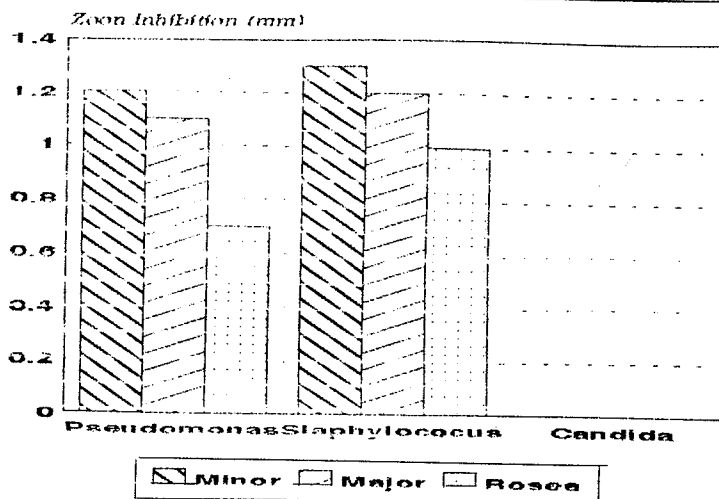
نمودار ۳ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات سه گونه از سرده وینکا بر کاندیدا آلبیکانس

The Antimicrobial Activity of Vinca Stem



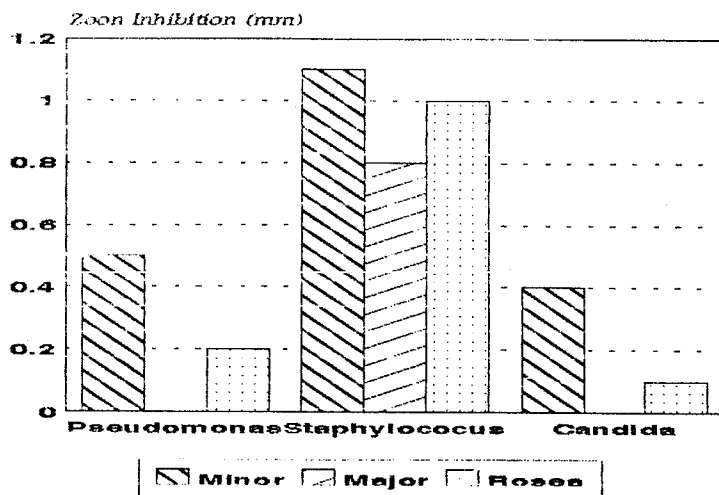
نمودار ۴ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات ساقه سه گونه از سرده وینکا بر میکروبیهای مورد پژوهش

The Antimicrobial Activity of Vinca Leaf



نمودار ۵ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات برگ سه گونه از سرده وینکا بر میکروب های مورد پژوهش

The Antimicrobial Activity of Vinca Root



نمودار ۶ - اثرات ضد میکروبی ترکیبات ریشه سه گونه از سرده وینکا بر میکروب های مورد پژوهش

کتابنامه

- ۱- اربابیان ، صدیقه (۱۳۷۳): اثرات ضد قارچی ترکیبات سه گونه از سرده وینکا بر برخی قارچ های آلوده کننده کشت های گیاهی . پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی و احد تهران شمال.
- ۲- ادیب فر ، پرویز (۱۳۶۸): میکروپ شناسی پزشکی ، ناشر مولف چاپ دوم .
- ۳- زرگری ، علی (۱۳۶۸): گیاهان دارویی جلد سوم ، ناشر دانشگاه تهران .
- 4-Brock , Thomas , D. (1986): Basic microbiology with application , (third Edition). P.122.
- 5-Dixon , D.C., Cutt , G. R. , Klessig , D. F. (1991): Differential targeting of the tobacco pr-1 pathogenesis related proteins to the extracellular space vacuoles of crystal idioblasts: *Embo journal* 10(6) , 1317- 1324.
- 6-Goodwin , T.W. and Mexcer , E.I. (1985): Introduction to plant Biochemistry. Second Edition Pergamon press.
- 7-Mersey , B.G and culture A.J. (1986): Differential distribution of catharasanthus roesu. *Can. J. Bot.* Vol. 64. 1036 , 1045.
- 8-Photiou, A. , Sheikh , M.N. , Bafaluros , D. , Restsas , S. (1992): Antiproliferative activity of vinorebine (Navelbine) against six human melanoma cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology* 118 (4): 292-354.
- 9-Proska , B. Uhrin , D. , Grossman , E. , Voticky , Z. (1989): Nw qiaatermaru alkalodis from vinca Minor. *Planta medica* vol 55: 189-190.
- 10-Ramawat, K.G. , Bhardway , L. , Tewnri , M.N. (1992): Antitumor drug produced by tissue culture. *Bionature* 12(1-2) 33-41.