اثرات ضدپلاسمیدی ۵ عصاره گیاهی از گیاهان دارویی بر روی سوشهای مقاوم کلبسیلا پنومونیه

دکتر محمدرضا شکیبایی* - دکتر محمودرضا حیدری** - دکتر محمد احمدی نژاد*** - مصطفی محمدی****

* استادیار ژنتیک ملکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

** استادیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

*** استادیار میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

**** مربی گروه ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

چکیده

اثر ضدمیکروبی (ضدپلاسمیدی) عصاره‌های مختلف ۵ گیاه دارویی (مورد، مرزه، کلپوره، شیرین‌بیان، اکالیپتوس) که در طب سنتی ایران بعنوان برطرف‌کننده عفونتها مورد استفاده می‌باشد بر روی سوشهای حاوی پلاسمید باکتری کلبسیلاپنومونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره‌گیری از طریق استخراج از برگ و ساقه گیاه و به روش الکلی و آبی صورت گرفت. مطالعه کمترین غلظت بازدارنده از رشد (MIC) عصاره‌های استخراج شده نسبت به سوشهای مقاوم کلبسیلاپنومونی نشان داد که تمام عصاره‌های بالا خاصیت ضدمیکروبی داشته و قادر بودند از رشد سوشهای مقاوم کلبسیلاپنومونی جلوگیری کنند. در این میان عصاره برگ گیاه اکالیپتوس دارای بیشترین خاصیت ضدمیکروبی بود (average MIC ۰/۱ mg/ml). همچنین بیشترین غلظت هر عصاره که باکتری در آن رشد می‌کرد [SIC] (Subinhibitory concentration) برای انجام آزمایش Curing (حذف پلاسمید) استفاده شد. مطالعه و بررسی حساسیت دارویی تمام سوشهای در معرض قرار گرفته به عصاره‌ها از رقتهای SIC و مقایسه آنها باسوشهای در معرض قرار نگرفته نسبت به داروهای آمپی‌سیلین (AP)، آموکسی‌سیلین (Amox) و و سفتی‌زوکسیم (CAZ) و سفوتاکسیم (CTX) تغییر زیادی را در MIC و کاهش مقاومت دارویی بوجود نیاورد.

(average MIC AP,128μg/ml,Amox 256μg/ml,CAZ 64μg/ml)

بررسی مورفولوژی باکتریهای در معرض عصاره‌ها قرار گرفته به کمک میکروسکوپ فلورسنت (Nikon optiphot - 2) نشان داد که وقتی سوشهای کلبسیلاپنومونیه در معرض عصاره مورد قرار می‌گیرند باکتری کوچکتر (جمع‌تر) شده و کپسول باکتری نیز از بین رفت.

مطالعه پلاسمیدی موجود در سوشهای حاوی پلاسمید ۹ و ۳ کلبسیلا به کمک ۰/۷ % آگارزژل الکتروفورز و مقایسه آن با سوشهای ۹ و ۳ در معرض قرار نگرفته نشان دهنده حذف انتخابی پلاسمیدها (Curing) نبود و پلاسمیدها همچنان در دو سوش ۹ و ۳ وجود داشتند.

همچنین مطالعه اثر سینرژیک دارو و عصاره ۵ گیاه دارویی بالا بطور همزمان در مقایسه با دارو و عصاره بتنهایی تغییر زیادی را در کاهش MIC و مقاومت دارویی باکتریهای فوق پدید نیاورد و فقط در مورد آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم MIC به ۶۴ μg/ml کاهش یافت.

در نتیجه از مطالعات بالا چنین استنباط می‌شود که عصاره‌های گیاهان دارویی، مورد، کلپوره، مرزه، اکالیپتوس و شیرین بیان هیچگونه اثر ضدپلاسمیدی نداشتند.

کلید واژه‌ها: پلاسمیدها / عصاره گیاه / کلبسیلا پنومونیه / مقاومت دارویی

مقدمه

مقاومت باکتریها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت معمول توسط بیماران مصرف می‌شود یکی از خصوصیات ژنتیکی آنها بوده و عموماً ناشی از وجود DNA خارج کروموزومی (پلاسمید) که چندین ژن مسئول مقاومت دارویی را حمل می‌کند می‌باشد (۱، ۲، ۳).

باکتریهای فرصت‌طلب بیمارستانی مثل کلبسیلاپنومونیه امروزه به سرعت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اندو این اغلب به دلیل استعمال بی‌رویه دارو توسط بیماران و تجویز بی‌رویه توسط پزشکان است (۳).

پلاسمید ماده ژنتیکی است که برای بقاء سلول میزبان ضروری نبوده ولی در محیط خاص (در شرایط تجویز دارو) قادر به ایجاد مقاومت دارویی یا تخریب ترکیبات کمپلکس آنها است (۴). معمولاً پلاسمیدها حاوی یک یا چند ژن مقاومت دارویی متفاوت هستند و تعدادی از آنها دارای سیستم‌های فعالی جهت پایداری در سلول میزبان می‌باشند(۵).

یکی از راههای از بین بردن پلاسمیدها استفاده از گیاهان دارویی است (۶، ۷). از بین بردن پلاسمیدها در درون سلول میزبان (invivo) Curing نامیده می‌شود و موجب ایجاد اخلافی از باکتریها می‌شود که در آنها پلاسمید وجود ندارد. به این طریق می‌توان ژنهای مقاومت دارویی را که توسط پلاسمیدها کُد می‌شوند به طور انتخابی با حذف پلاسمید حذف نمود. در نتیجه میکروب نسبت به داروهایی که تاکنون مقاوم بوده حساس می‌شود.

مطالعات زیادی درباره خاصیت ضدمیکروبی گیاهان دارویی وجود دارد (۸، ۹). شهابی و همکاران (۸) عصاره گیاهان دارویی از جنوب ایران جدا نمودند که خاصیت ضدمیکروبی داشتند. در میان عصاره‌ها، عصاره گیاه Sangnisorba minor از تیره بادام‌زمینی به طور کامل از رشد چهار باکتری متفاوت جلوگیری نمود. معطر واسگری (۱۰) اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف گیاه Pulycaria gnaphalodes از تیره کاسنی که اکثراً تحت نام افسنطین دربازار دارویی ایران عرضه می‌شود و در طب سنتی ایران بعنوان برطرف کننده عفونتها مورد استفاده قرار می‌گیرد بر روی باکتریهای گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دارند. آزمایشات مکرر نشان داد که عصاره الکلی تازه استخراج شده گیاه تابستانه بر روی اکثر باکتریهای ذکر شده دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد.

در تحقیقات قبلی (۳) که بر روی وجود پلاسمید در باکتریهای گرم منفی انجام گرفت وجود پلاسمید در سوشهای ۳ و ۹ کلبسیلاپنومونیه مقاوم جدا شده از بیمارستانهای کرمان بررسی شد. در این تحقیق که به طور invitro انجام گرفت امکان حذف پلاسمید (Curing) توسط عصاره‌های گیاهی بررسی شد. محققین مختلفی با استفاده از ترکیبات شیمیایی مختلف سعی در حذف انتخابی پلاسمید از سلول میزبان و در نتیجه حساس کردن باکتریهای مقاوم به دارو داشته‌اند. بعنوان مثال Bouanchand و همکاران در سال ۱۹۶۹ (۱۱) حذف آنزیم پنی‌سیلیناز در استافیلوکوک مقاوم به وسیله اتیدیوم بromید راگزارش نمودند.

آنها فراوانی از دست رفتن مقاومت در ۹ سوش استافیلوکوک را مورد مطالعه قرار دادند. مارکر مقاومت به‌پنی‌سیلین در ۸ مورد بین ۱۰۰-۸۰ درصد در سوشهای مقاوم حذف شد و در تمامی کلنی‌ها حساس به آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. Laxmi و همکاران (۱۲) با استفاده از عصاره گیاه پلامبوزیلیکنا (Plumbagin) موفق به حذف انتخابی مقاومت دارویی نسبت به پنی‌سیلین G، AP و Amox و تتراسیلکین که بر روی پلاسمیدهای مختلف مثل RP4 و R388 در باکتری E.coli شدند. همچنین Deshpande و همکاران (۱۲) با استفاده از عصاره Plumbagin موفق به حذف مقاومت دارویی و مقاومت فلزی در گونه Acinetobacter شدند. شکیبایی و همکاران (۲) با استفاده از همین عصاره مقاومت نسبت به فلز نقره و ۵ آنتی‌بیوتیک را در سوش مقام A.baummannii BL54 از بین بردند.

در ایران عصاره‌های گیاهی زیادی برای اثر ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند ولی هیچکدام از آنها بر روی سوشهای مقاوم باکتریهای حاوی پلاسمید مورد استفاده قرار نگرفته است. در این طرح تحقیقاتی با استفاده از عصاره گیاهان دارویی سعی در حذف پلاسمید و کاهش مقاومت میکروبی شده است. در نتیجه استفاده از یک دارو مثل آموکسی‌سیلین می‌توان شخص بیمار را درمان نمود.

مواد و روش‌ها

۱ - عصاره‌گیری

۵ گیاه دارویی مورد، مرزه، کلپوره، شیرین بیان و

اکالیپتوس پس از جمع‌آوری و بررسی اولیه خاصیت ضدمیکروبی آنها بر روی باکتریهای حساس به دارو برای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره‌گیری به روش Maceration و همچنین روش الکلی انجام گردید (۱۰). برای اینکه شرایط آزمایش برای همه گیاهان یکسان باشد ۵ گرم از گیاه خشک را در هاون دستی خرد و صلایه گردید. سپس پودر حاصل را در داخل لوله‌های شیشه‌ای درب‌دار ریخته و پس از ثبت کد گیاه بر روی آن ۷-۵ روز آنرا در ۱۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ می‌خیسانیم. برای اینکه عصاره گیاهی بنحو مطلوبی وارد فاز الکلی گردد یک روز در میان لوله‌ها توسط همزن برقی (Vortex) به مدت ۱ دقیقه کاملاً مخلوط می‌گردد. پس از گذشت ۷-۵ روز ۳-۲ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی (Superntant) برداشته و درون لوله‌های به قطر ۳ سانتی‌متر می‌ریزیم. پس از نصب کُد مربوطه توسط دستگاه تقطیر در خلاء (rotary evaporator) در درجه حرارت ۴۵°c-۴۰ تغلیظ نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور متصل به پمپ خلاء قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. عصاره خشک شده تا زمان انجام عملیات بعدی در دمای ۱۵°c نگهداری شد.

۲- میکروارگانیزمهای ایزوله شده و تعیین حساسیت دارویی

سوشهای مقاوم کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاههای بیمارستانهای کرمان ایزوله گردیدند و مورد بررسی باکتریولوژیک و تعیین حساسیت دارویی بر اساس رفرانس (۳) قرار گرفتند.

۳- بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره گیاهی

از روش رقت برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) استفاده گردید (۱۰). با استفاده از محیط کشت مولرهینتون برات عصاره‌های غلیظ الکلی و آبی تازه استخراج شده از گیاهان دارویی بالا به نحوی رقیق شدند که پس از افزایش ۱ml سوسپانسیون میکروبی ۲×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر هر یک از لوله‌ها رقتهای ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۸، ۰/۰۶۴، ۰/۰۳۲، ۰/۰۱۶، ..... ۰/۰۰۱، میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. محیط‌های تلقیح شده مذکور به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷°c اتو نگهداری شوند. پس از طی دوره اتوگذاری حداقل غلظتی از عصاره که در حضور آن رشدی صورت نگرفته بود بعنوان MIC عصاره انتخاب شد. همچنین حداقل غلظتی از ماده ضدمیکروبی که موجب ۹۹/۹ درصد کاهش در تعداد باکتریهای مایه اصلی می‌گردد. بعنوان (Minimal bactericidal Concentration) MBC انتخاب گردید.

۴- Curing (حذف پلاسمید)

برای Curing، باکتریهای رشد یافته در غلظت SIC عصاره را جدا نموده و به صورت سریال رقیق شد (۲-۱۰، ۴-۱۰، ۶-۱۰، ۸-۱۰، ۱۰-۱۰). سپس حدود ۱۰۰ کلنی جدا را به کمک کبریت استریل بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد و همزمان دو کلنی کنترل (بدون درمعرض قرار دادن به عصاره) استفاده شد. این کلنی‌ها برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفتند.

۵- بررسی مورفولوژی باکتریهای در معرض قرارگرفته زیر میکروسکپ

سوسپانسیون باکتریهای در معرض قرارگرفتند (۱۰۹) را روی لام میکروسکپی قرار دارد و زیر میکروسکپ فلورسنت (Nikon Optiphot-2) پس از رنگ‌آمیزی گرم و کپسول مشاهده گردید.

۶- بررسی وجود پلاسمید و آگارزژل الکتروفورز

در این مرحله باکتریهای در معرض قرارگرفته به عصاره (Cured) را به کمک عوامل لیز کننده دیواره غشاء سلولی (۰/۵٪EDTA, ۲٪SDS) پاره نموده و پلاسمیدها جدا شد. ۶۰ml از محلول DNA پلاسمیدی خالص پس از آغشتن با آنزیم RNase در چاهک‌هایی در آگارز ژل ۰/۷٪ ریخته شد و الکتروفروز به شدت ۳۰mA به مدت ۳ ساعت انجام گردید. وجود و عدم وجود پلاسمید در این سوشها و سوشهای وحشی (Uncured) مقایسه گردید.

۷- بررسی اثر سینرژیک دارو و عصاره

عصاره‌های استخراج شده از گیاهان دارویی بالا با نسبت ۰/۳۲mg/ml و ۲۵۶mg/ml دارو (سفوتاکسیم، سفتی‌زوکسیم، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین) رامخلوط نموده و درمحیط غذایی حاوی باکتری ریخته و MIC را اندازه‌گیری شد. اگر دارو و عصاره اثر سینرژیک داشته باشد MIC نسبت به کنترل (دارو و عصاره به تنهایی) کاهش قابل ملاحظه‌ای می‌کند.

نتایج

۱- بررسی حساسیت سوشهای کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده نسبت به عصاره‌های گیاهی

جدول ۱- حساسیت سوشهای کلبسیلاپنومونیه ایزوله شده را نسبت به ۵ عصاره گیاهان دارویی مورد، شیرین‌بیان، کلپوره، مرزه و اکالیپتوس نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد عصارهٔ اکالیپتوس دارای بیشترین اثر ضدمیکروبی و شیرین‌بیان دارای کمترین اثر ضدمیکروبی بود.

جدول ۱- بررسی حساسیت سوشهای کلبسیلاپنومونیه پس نسبت به عصاره‌های گیاهی

عصاره	آزمایشات / سوش کلبسیلا	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K_6	K_7	K_8	K_9	K_{10}
آکالیپتوس	MIC	۰/۰۱	۰/۰۶	۰/۰۰۲	۰/۵	۰/۰۶	۰/۰۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۵	۰/۰۱
	MBC	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۰۲	۰/۵	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱	۰/۰۲
	SIC	۰/۰۰۵	۰/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۲۵	۰/۰۳	۰/۰۰۵	۰/۲۵	۰/۱	۰/۲۵	۰/۰۵
مورد	MIC	۰/۱	۰/۵	۰/۵	>۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵
	MBC	۰/۵	۰/۵	۰/۵	>۰/۲۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
	SIC	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱	۰/۲۵
مرزه	MIC	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	ND	۰/۲۵	۰/۲۵
	MBC	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	ND	۰/۲۵	۰/۲۵
	SIC	۰/۱	۰/۲۵	۰/۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	ND	۰/۱	۰/۱
کلپوره	MIC	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵
	MBC	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵	رقیق نشده	۰/۵	رقیق نشده	رقیق‌نشده	۰/۵	رقیق‌نشده
	SIC	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۲۵	۰/۱	۰/۱
شیرین بیان	MIC	>۰/۵	>۰/۵	>۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵	>۰/۵	۰/۵	>۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵
	MBC	>۰/۵	>۰/۵	>۰/۵	۰/۵	۰/۵	>۰/۵	>۰/۵	رقیق نشده	۰/۵	۰/۵
	SIC	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱

MIC (mg/ml)= کمترین غلظت ممانعت از رشد عصاره

MBC= حداقل غلظت باکتری‌سیدال عصاره

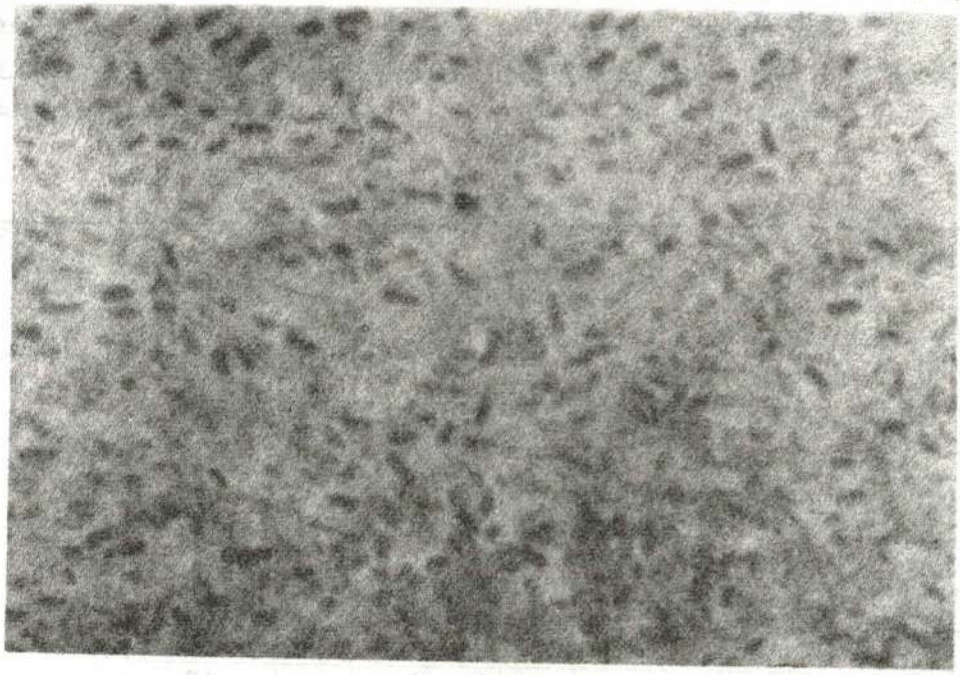
SIC= بیشترین غلظت عصاره که باکتری در آن رشد می‌کند

K= سوشهای کلبسیلاپنومونیه ایزوله شده از بیمارستانهای کرمان

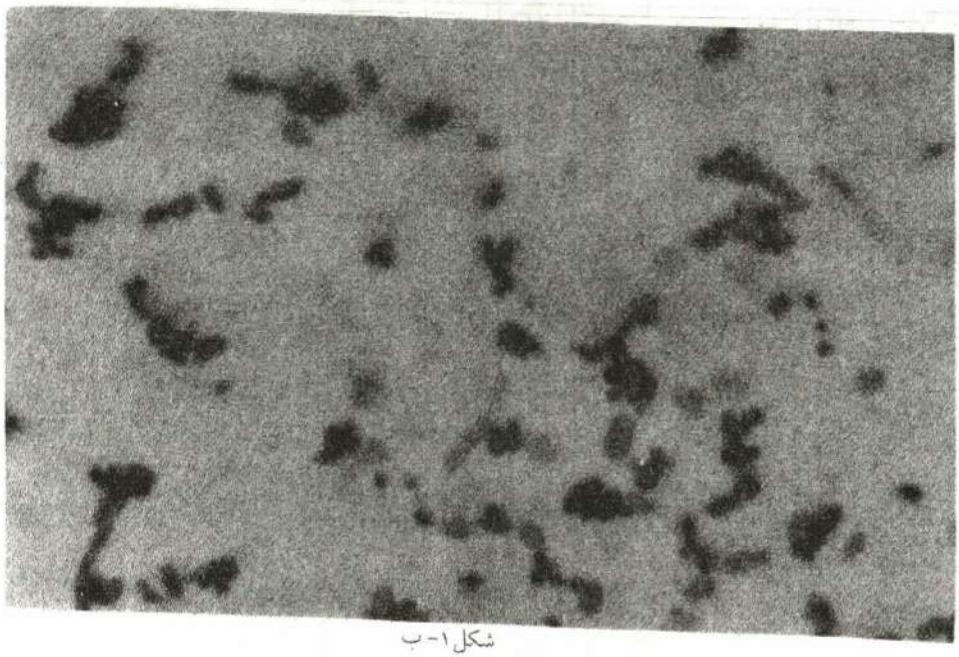
نتایج بالا معدل سه بار آزمایش یکسان است.

۲- بررسی مورفولوژی سلولی و وجود کپسول در سوشهای در معرض عصاره قرار گرفته

شکل ۱- سوش ۹ کلبسیلاپنومونیه که در معرض عصاره قرار گرفته با اخلاف در معرض قرار نگرفته به عصاره مورد را نشان می‌دهد. همانطورکه در شکل مشاهده می‌شود باکتری فشرده‌تر شده (جمع‌تر) و کپسول خود را از دست داده است. در مورد عصاره‌های دیگر هیچگونه تغییری در مورفولوژی سلولی پدید نیامد.



شکل ۱- الف



شکل ۱- ب

شکل- ۱: مورفولوژی باکتری کلبسیلا. الف- قبل از در معرض قراردادن با عصاره مورد.
ب: بعد از در معرض قراردادن باعصاره مورد.

۳- تعیین حساسیت (MIC) سوشهای کلبسیلاپنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیکهای آموکسی سیلین و آمپی‌سیلین و گلوکزاسیلین و سفتی‌زوکسیم و سفوتاکسیم پس از در معرض قرار دادن به عصاره‌های گیاهی

کلنی‌های رشد یافته از رقتهای SIC هر عصاره را جدا نموده و برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار گرفت نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

لازم به ذکر است که MIC سوشهای در معرض قرارگرفته به هر عصاره به تنهایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بالا به طور جداگانه موردبررسی قرارگرفت و نتایج مشابه‌ای بدست آمد.

۴ - بررسی اثر سینرژیک دارو و عصاره

بر اساس تحقیقات قبلی (۱۲) ۰/۳۲mg/ml از عصاره خشک شیرین بیان و مورد، اکالیپتوس، مرزه و کلپوره را با

جدول ۲- بررسی اثر سینرژیک دارو و عصاره

عصاره	سوش کلبسیلا / آنتی‌بیوتیک (MIC)	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K_6	K_7	K_8	K_9	K_{10}
شیرین بیان	CTX	۰/۵	۶۴	۶۴	۱۲۸	۶۴	۱۲۸	۱۶	ND	۱۲۸	۲۵۶
	CAZ	۰/۵	۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸	۶۴	۱۲۸	۱۶	ND	۲۵۶	۱۲۸
	Am	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸	۲۵۶	۲۵۶	۶۴	ND	۲۵۶	۱۲۸
	AP	۶۴	۲۵۶	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸	۲۵۶	ND	۲۵۶	۱۲۸
مرزه	CTX	۰/۲۵	۱	۳۲	۱۲۸	۶۴	۶۴	۱۲۸	ND	۱۲۸	۶۴
	CAZ	۰/۲۵	۲	۶۴	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۲۸	ND	۶۴	۱۲۸
	AM	۶۴	۲۵۶	۲۵۶	۶۴	۱۲۸	۶۴	۲۵۶	ND	۱۲۸	۲۵۶
	AP	۶۴	۲۵۶	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸	۲۵۶	ND	۲۵۶	۱۲۸
مورد	CTX	۰/۵	۴	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴	۱۲۸	ND	۱۲۸	۲۵۶
	CAZ	۰/۵	۸	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲	۱۲۸	ND	۱۲۸	۲۵۶
	Am	۱۲۸	۲۵۶	۲۵۶	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۲۵۶	ND	۲۵۶	۲۵۶
	AP	۶۴	۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	ND	۲۵۶	۲۵۶
اکالیپتوس	CTX	۰/۲۵	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶	۶۴	۳۲	ND	۱۲۸	۶۴
	CAZ	۰/۲۵	۲۵۶	۶۴	۶۴	۳۲	۱۲۸	۱۶	ND	۱۲۸	۶۴
	Am	۳۲	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۳۲	۱۲۸	۲۵۶	ND	۲۵۶	۱۲۸
	AP	۳۲	۱۲۸	۱۲۸	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۱۲۸	ND	۲۵۶	۱۲۸
کلپوره	CTX	۰/۵	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۱۲۸	۶۴	ND	۱۲۸	۶۴
	CAZ	۶۴	۱۲۸	۶۴	۳۲	۲۵۶	۲۵۶	۶۴	ND	۲۵۶	۱۲۸
	Am	۰/۲۵	۳۲	۱۲۸	۶۴	۶۴	۱۲۸	۶۴	ND	۱۲۸	۶۴
	AP	۳۲	۳۲	۲۵۶	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸	ND	۲۵۶	۱۲۸

ND=Not Determined

MIC= μg/ml

آزمایش بالا برای سه بار تکرار شد و نتایج مشابهی حاصل گردید.

۲۵۶ mg/ml آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین سفوتاکسیم و سفتی‌زوکسیم پس از حل کردن در حلال مربوطه، حساسیت با هم ترکیب شدند و حساسیت هر سوش (MIC) به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده شد عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های بالا یا هیچگونه اثر سینرژیک نداشته یا اثر خیلی کمی دارند در نتیجه می‌توان گفت که کاهش MIC در مواردی به دلیل اثر ضدمیکروبی دارو و عصاره جدا از هم بوده و یا اثر سلولی متفاوتی را دارند.

آگارز ژل الکتروفورز

بررسی ژل آگارز DNA پلاسمیدی از سوشهای در معرض قرار گرفته و نگرفته نشان‌دهندهٔ حذف انتخابی پلاسمید در سوشهای در معرض عصاره قرار گرفته نیست و همچنان پلاسمیدها در ژل مشاهده گردیدند.

بحث و نتیجه گیری

در مورد بررسی اثر ضدمیکروبی گیاهان دارویی در بسیاری از کشورها مطالعات زیاد و گسترده‌ای در حال انجام است اما متأسفانه تحقیقات در سطح وسیع در کشور ما هنوز صورت نگرفته و مهمتر اینکه هیچگونه عصاره گیاهی برای از بین بردن مقاومت دارویی پلاسمیدی بکار برده نشده است. در این تحقیق از ۱۰ سوش مقاوم کلبسیلاپنومونیه ایزوله شده از بیمارستانهای کرمان که دوتای آن حاوی پلاسمید بودند (۳) برای بررسی اثر ضدپلاسمیدی ۵ گیاه دارویی مورد، اکالیپتوس، شیرین بیان، کلپوره و مرزه استفاده شد. عصاره‌های آبی و متانولی همه گیاهان فوق فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان دادند. در این میان عصاره اکالیپتوس دارای بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در مقایسه با عصاره‌های دیگر بود.

با خنثی سازی عصاره‌های آبی فوق با سود دسی نرمال مشخص گردید که اثر ضدمیکروبی مربوط به خاصیت اسید نمی‌باشد و به احتمال قوی به دلیل وجود ترکیباتی با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد. مطالعه روی Curing و حذف پلاسمید در سوش‌های ۳ و ۹ و همچنین اثر ضدمیکروبی عصاره‌های بالا نشان داد که کاهش کم MIC داروهای آمپی‌سیلین، آموکسی سیلین، سفتی‌زوکسیم و سفوتاکسیم پس از در معرض قرار گرفتن باکتریها به عصاره به دلیل حذف پلاسمید در درون آنها نیست. نکته مهم از دست دادن کپسول باکتری و کوتاه شدن طول آن پس از در معرض قرارگرفتن به عصاره مورد بود. این ممکن است به دلیل خاصیت مورتاژنیک قوی عصاره بر روی ژنوم سلول باکتری باشد. نکته دیگر اینکه هیچگونه تغییری در خاصیت رنگ‌آمیزی باکتریهای بالا بوجود نیامد و باکتریها خاصیت گرم منفی خود را حفظ نمودند.

هنگام الکتروفورز روی ۰/۷٪ آگارز ژل هیچگونه حذف فیزیکی پلاسمید مشاهده نگردید و دیگر نتایج بالا را اثبات می‌کند.

بررسی اثر سینرژیک دارو و عصاره یکی از مهمترین جنبه‌های این تحقیق بشمار می‌رود چون امکان از دست رفتن پلاسمید و حساس شدن باکتری به دارو در اثر حذف انتخابی آن همزمان با عمل دارو در یک زمان درون سلول یکی از مهمترین اهداف سرکتهای دارویی به شمار می‌رود و می‌تواند کمک مؤثری به درمان و از بین بردن باکتریهای مقاوم کند.

این بررسی بر روی گیاهان دارویی بالا نشان داد که در معرض قرار دادن باکتری به دارو و عصاره به طور همزمان اثر ضدمیکروبی شدیدی را پدید نمی‌آورد و کمک بزرگی به کاهش MIC نمی‌کند.

بر اساس نتایج بالا مشخص می‌شود که عصاره‌های گیاهان دارویی مورد، کلپوره، شیرین‌بیان، مرزه و اکالیپتوس هیچگونه اثر ضدپلاسمیدی روی سوشهای کلبسیلا پنومونیه حاوی پلاسمید نداشتند اگر چه خاصیت ضدمیکروبی از خود بجای می‌گذارند. تحقیقات کمی در مورد اثر ضد پلاسمیدی عصاره‌های گیاهی بر روی DNA پلاسمیدی انجام شده است. به عنوان مثال پلامباجین (۲) یک عصارهٔ گیاهی است که باعث بوجود آمدن شکاف در DNA سوپرکویل پلاسمید می‌شود و آنرا باز می‌کند. این سبب عدم تقسیم پلاسمید بدون اثر بر روی کروموزوم باکتری می‌شود. در نتیجه اخلاف بعدی باکتری مقاوم به دلیل عدم تقسیم DNA پلاسمیدی ژنهای مقاومت خود را از دست داده و نسبت به داروهایی که قبلاً مقاوم بوده‌اند حساس می‌شوند (۱۲). در ایران تحقیق بالا اولین پژوهش در این زمینه محسوب می‌گردد. امید است بتوان با این تحقیقات راهی برای کاهش مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیکها یافته شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران در آزمایشگاه مرکز

تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمان و گروه میکروب‌شناسی که ما را یاری نموده‌اند و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که هزینهٔ این طرح را تصویب وتقبل نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1. Shakibaie MR, Munsouri S, Hakak S. Plasmid Pattern of Antibiotic Resistance in B Lactamase Producing Staphylococus Aureus Strains is Olated from Hospitals in Kerman, Iran. Arch Iran med 1992: 2(2): 93-7.
2. Shakibaie MR, et al. Plasmid Mediated Silver and Antibiotic Resistance in Acinetobacter Banmunnii 2Bl54. Iran J Med Sci 1999: 23(1): 30-36.
3. Shakibaie MR, Beig AH. Plasmid Mediated Cefotaxime and Ceftizoxime Resistance in Ten Strains of Klebsiella Pneumoniae is Olated from Hospitals in Kerman, Iran . Iran J Med Sci 1999: 6(1): 29-38.
4. Furnmai T, Takeda K, Okanishi M. Function of Plasmid the Production of Aureothricin: Elimination of Plasmids and Alteration of Phenotypes Caused by Protoplast Regeneration in Streptomyles Kasugansis. J Antibiotic Tokyo 1982: 35 (10): 1367-73.
5. May STD, et al. Novel Antibiotic Resistance Transfer in Bacteroids: Antimicrob Agents. Chemother 1982: 2(1): 110-8.
6. Novick R, et al. Involvement of the Cell Envelope in Plasmid Maintenance: Plasmid Curing During the Regeneration of Protoplasts. Plasmid 1982:3(3): 348-58.
7. Sinha PP. A New Simple Method of Curing Plasmids in Lactic Streptococei. FEMS Microbiol Lett 1989: 48(3): 343-58.
8. Sharma S, Metha BK. In-Vitro Antimicrobial Efficacy of Centratherum Anthelminticum Seeds Extracts. J Hyg Epid Microbiol and Immnnol 1991: 2: 157-62.

۹. معطر، فریبرز؛ عسگری، مرتضی: بررسی اثر ضدمیکروبی گیاه Pnlycaric gmaphalodes. مجله دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۱۳۶۹، شماره ۳، صص: ۱۴۱-۱۳۶.

10. Boncanchand DH. etal. (1969). Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacteriacae and Staphylocci. J Gen Microbiol 1969: 417-425.
11. Laxmi VV, Padmas, Polasa H.Elimination of Multidrug Resistance Plasmid Inbacteria by Plumbagin, Acompound Drived from a Plant. Curr Microbiol 1987: 16: 159-163.
12. Deshpande, Chopade. Plasmid Mediated Silver Resistance in A. Baummannii BL54. Biometals 1994: 7: 49-56.

Plasmid Curing Activity of Five Plant Extracts on Multiple Resistant Plasmid Bearing Klebsiella Pnumoniae Strains

Shakibaiee MR, Heydari MR, Ahmadinezhad M, Mohammadi M

ABSTRACT

The curing of five medicinal plant extracts (Satureia hortensis, Gly cyrrhiza glabra,Teucrium Pollium, Myrtus Communis, Eukalypetus globolus) on plasmid bearing strains of klebsilla pnenmoniae resistance to multiple antibiotics were investigated.

Alcoholic and maceration extraction were carried out from leaves, fruits or roots of the above plants. Mimimum inhibitory concentrations (MIC) of each plant extract indicated that all of them have antimicrobial activity and were able to inhibit the growth of resistant strains of kleb. pneumoniae. Furthermore the eucalypetus extract had highest antimicrobial activity as compared to other plant extracts (avrage MIC 0.1mg/ml). At the same time the subinhibitory concentration (SIC) and minimum bactricidal conctration (MBC) activity of each plant extract was carried out in order to cure plasmids from plasmid bearing strains. Curing experiments were performed from SIC tubes which then diluted serially (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}) and 100 well isolated colonies were then master plated with sterile tooth pikes.

The sensitivity of the strains treated with SIC of each plant extracts to ampicillin amoxicillin, cefotaxime,and ceftizoxime indicated that there were no change in MIC of antibiotics compared to unexposed one.

The morphological investigation with flouresent microscope (Nikon, optiphota-2) and capsule staining indicated that when cells treated with Myrtus Communis extract, the cells aggregated and change their morphology, similarly, production of cupsule was also lost.

The agarose gel electrophoresis (0.7%) of the treated cells and untreated one and observation of the gel with U.V. gel documentation system indicated that there were any physical loss of plasmid band on the gel.

Similarly, the synergistic action of plant extract and antibiotics were investigated and it was found that these was no synergy between the above plant extracts and antibiotics (MIC remained unchanged).

From above data it could be concluded that the above plants extract though they have

antibacterial activity they didnot exert any curing effect on the plasmid bearing microoganisms isolated from hospitals in kerman Iran.

Key words: Drug Resistance/ Klebsiella Pueumoniae/ Plant Extracts/ Plasmids