DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.6208

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

بررسی علت خاصیت ضدمیکروبی 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]

۱*- 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 دریافت: آبان ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱

چکیده

اغلب ترکیب‌های گیاهی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص علیه باکتریهای گرم منفی، خاصیت ضدمیکروبی بسیار پایین‌تری دارند (MIC = ۱۰۰-۱۰۰۰µg/ml). امروزه دانشمندان معتقدند که پمپ‌های افلوکسی باکتریایی مسئول این مشکل هستند. این پروتئین‌های غشایی قادر به شناسایی و خروج ترکیب‌های ضدمیکروبی مختلف ازجمله 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 ضدمیکروبی پایین آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین علیه سودوموناس آئروجینوزا (نماینده باکتریهای گرم منفی با مقاومت بالای دارویی) بوده‌است. اغلب آلکالوئیدها جزء فیتوآلکسین‌های گیاهی هستند که مقدار آنها در هنگام تهاجم میکروبی افزایش می‌یابد، بدین معنی که عملاً دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند، اما آلکالوئیدهای مورد استفاده در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی هیچ خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان نمی‌دهند. اثر ضدمیکروبی ذاتی (واکنش بین آلکالوئیدها و فنیل آلانین-آرژینین بتانفتیل‌آمید (PAβN) (مهارکننده پمپ‌های افلوکسی باکتریهای گرم منفی)) و خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی (سینرژی بین آلکالوئیدها و لووفلوکساسین (سوبسترای پمپ‌های افلوکسی موجود در سودوموناس آئروجینوزا)) آلکالوئیدهای این تحقیق به‌وسیله آزمایش تیتراسیون چکربورد بررسی شد. نتایج نشان داد که کافئین و وینکامین ذاتاً مواد ضدمیکروبی گیاهی هستند. به‌طوری که با مختل کردن پمپ افلوکسی MexAB-OprM در سویه بسیار مقاوم *nal*B سودوموناس آئروجینوزا توسط PAβN، خاصیت ضدمیکروبی کافئین و وینکامین به‌ترتیب به مقادیر قابل‌توجه ۱۷ و ۸ برابر افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت پمپ‌های افلوکسی باکتریایی مهمترین عامل در تضعیف خاصیت ضدمیکروبی ترکیب‌های گیاهی می‌باشند؛ البته به نظر می‌رسد با مهار فعالیت این پمپ‌ها بتوان عملکرد بالینی این مواد طبیعی را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشید و بدین طریق امید داشت که مواد گیاهی نیز همانند آنتی‌بیوتیک‌ها به زمینه درمان بالینی راه یابند.

واژه های کلیدی: نوسکاپین، کافئین، وینکامین، پمپ افلوکسی، مهارکننده پمپ‌های افلوکسی.

مقدمه

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

خاصیت ضدمیکروبی ضعیفی دارند و به همین دلیل است که این ترکیب ها تا به امروز نتوانسته‌اند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند (Tegos *et al*., 2002؛ De Villiers *et al*., 2010؛ Adebayo & Krettli, 2011).

به‌طور کلی ترکیب‌های گیاهی به دو گروه عمده فیتوآنتی‌سیپین‌ها (Phytoanticipins) و فیتوآلکسین‌ها (Phytoalexins) طبقه‌بندی می‌شوند. فیتوآنتی‌سیپین‌ها در شرایط نرمال در گیاهان یافت می‌شوند، اما مقدار فیتوآلکسین‌ها به هنگام پاسخ به تهاجم میکروبی به شدت افزایش می‌یابد (Jones & Dangl, 2006).

موتانت‌هایی از گیاهان که توان تولید یک فیتوآلکسین خاص را ندارند نسبت به گونه‌های نوع وحشی، به پاتوژن‌های میکروبی حساسیت بالاتری نشان می‌دهند، به‌عنوان 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 می‌دهند (Papadopoulou *et al*., 1999). دانشمندان با آزمایش آوناسین A-1 در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بر روی پاتوژن‌های قارچی مختلف، دریافتند که به‌رغم خاصیت ضدمیکروبی حتمی در شرایط داخل گیاه (in vivo)، این ماده هیچ‌گونه اثر ضدمیکروبی در شرایط in vitro از خود نشان نمی‌دهد (Carter *et al*., 1999). حال در اینجا این سؤال پیش می‌آید که چگونه یک ترکیب خاص در داخل گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی است، ولی به محض استخراج از گیاه این خاصیت را از دست می‌دهد؟ Tegos و همکاران (۲۰۰۲) بر آن شدند که به پاسخ این سؤال پی ببرند، فرضیه آنها این بود که پمپ‌های افلوکسی موجود در میکروارگانیسم‌ها مسئول وجود چنین مقاومتی در برابر مواد ضدمیکروبی گیاهی هستند. پمپ‌های افلوکسی، پروتئین‌های موجود در غشاهای سلولی هستند که با صرف انرژی، سبب خروج مواد ضدمیکروبی از داخل به محیط خارج سلول میکروارگانیسم‌ها می‌شوند و با این عمل مانع تجمع مواد ضدمیکروبی و رسیدن به هدفهایشان در داخل سلول می‌شوند (Li & Nikaido, 2009؛ Trepout *et al*., 2010). پمپ‌های نامبرده از نظر ساختمانی به ۵ خانواده مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند که خانواده بزرگ MF (Major facilitator (Mf) superfamily) در باکتریهای گرم مثبت و خانواده RND (Resistance nodulation division (RND) family) در باکتریهای گرم منفی شایع‌ترند (Daugelavicius *et al*., 2010؛ Westholm *et al*., 2010). امروزه علت اصلی مقاومت بالای میکروارگانیسم‌ها به بیشتر مواد ضدمیکروبی و بالا بودن MIC این ترکیب‌ها و ناکارآمدی آنها در از بین بردن پاتوژن‌های مختلف را به فعالیت پمپ‌های افلوکسی در آنها نسبت می‌دهند (Webber & Piddock, 2003).

آنها برای اثبات فرضیه خود از فنیل آلانین- آرژینین بتانفتیل آمید (Phe-Arg β-naphthylamide) PAβN) 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 ضدمیکروبی نهفته آنها پدیدار گردید. به‌عنوان مثال فعالیت ضدمیکروبی رئین (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 ضدمیکروبی ترکیب‌های گیاهی دیگری مانند پلومباگین (Plumbagin)، گوسی‌پول (Gossypoll)، رزوراترول (Resveratrol)، کومسترول (Coumestrol) و بربرین (Berberine) نیز بر علیه اغلب پاتوژن‌های بالینی و گیاهی بشدت افزایش یافت (Tegos *et al*., 2002). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان برای وارد کردن مواد ضدمیکروبی خود به داخل سلول، پاتوژن‌هایشان دارای تمهیداتی هستند که به این ابزارهای مفید، مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی باکتریایی می‌گویند (Tegos *et al*., 2002).

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

افلوکسی به همراه مواد ضدمیکروبی گیاهی امید آن می‌رود که این مواد بتوانند به رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های گسترده طیف رایج کنونی بپردازند (Gibbons, 2008؛ Ettefagh *et al*., 2011). گیاهان خانواده زرشک به همراه بربرین (آلکالوئید معروف با خاصیت ضدمیکروبی)، دو ماده دیگر به نام‌های '۵-متوکسی هیدنوکارپین (5'-MHC-D: 5'-methoxyhydnocarpin-D) و فئوفوربید A (Pheophorbide A) نیز تولید می‌کنند (Stermitz *et al*., 2000a؛ Ball *et al*., 2006). 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 ضدمیکروبی در این باکتری) بشدت کاهش می‌یابد (از ۲۵۶µg/ml به ۱۶µg/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 رزرپین (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). رزرپین با مهار پمپ افلوکسی NorA در استافیلوکوکوس اورئوس سبب افزایش فعالیت آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نورفلوکساسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، موکسی‌فلوکساسین و اسپارفلوکساسین علیه این باکتری می‌شود (Gibbons *et al*., 2003). مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی دیگری نیز از گیاهانی مانند مارتیغال (*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 شده سبب افزایش اثر تعداد وسیعی از مواد ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها 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 سمّی می‌باشد (Stavri *et al*., 2007). Piddock 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 ضدمیکروبی پایین آلکالوئیدهای گیاهی نوسکاپین، کافئین و وینکامین علیه سویه‌های مختلف و مقاوم سودوموناس آئروجینوزا بوده‌است. هر ۳ آلکالوئید ذکر شده دارای خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی بالقوه هستند ولی توسط پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریهایی که بر روی آنها آزمایش شده‌اند، غیرفعال می‌شوند.

۲- و یا خود دارای اثر مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی باکتریایی هستند (یک مهار کننده پمپ‌های افلوکسی باکتریایی خود به خود خاصیت ضدمیکروبی ندارد ولی زمانی‌که به همراه یک ماده ضدمیکروبی 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

که آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین به‌ترتیب از گیاه خشخاش، قهوه و پروانش استخراج شده‌اند. سودوموناس آئروجینوزا نیز به‌عنوان نماینده باکتریهای گرم منفی که یکی از شناخته شده‌ترین باکتریها در ایجاد مقاومت به اغلب مواد ضدمیکروبی 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: MexAB-OprM، Mex CD-OprJ، MexEF-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 (*nal*B) و K1536 (*nfx*B) که به‌ترتیب 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 به‌عنوان سویه مرجع برای تعیین میزان صحت نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین حساسیت ضدمیکروبی 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 به‌منظور ذخیره طولانی مدت در محیط برین- هارت اینفیوژن براث (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 PAβN (با درصد خلوص ۹۸/۰٪ (HPLC) و حلال DMSO) از شرکت سیگمای آلمان، آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین (با توان (potency) =۹۸۰µg/ml و حلال آب مقطر + چند قطره NaOH (۰/۱mol/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 ضدمیکروبی آلکالوئیدهای گیاهی بر روی سویه‌های انتخابی این تحقیق، میزان MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی ۴ سویه سودوموناس آئروجینوزا از طریق روش رقّت‌سازی در براث (مولر هینتون براث 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. به‌دلیل 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 رقّت 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 رقّت برای سنجش MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین در بین مقادیر ۵۰-۱۰۰۰µg/ml با فاصله ۵۰µg/ml در نظر گرفته شد، تمامی رقّت‌ها از طریق استوک مربوط به هر یک از آلکالوئیدها به میزان ۲ برابر غلیظ‌تر از رقّت مورد نظر آزمایش در محیط MHB ساخته شدند و مقدار ۱۰۰µL از

هر یک از رقّت‌ها (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 آلکالوئیدها یک میکروپلیت جداگانه در نظر گرفته شده بود. تهیه رقّت‌هایی ۲ برابر غلیظ‌تر از رقّت دلخواه آزمایش به این دلیل بود که با افزایش متعاقب سوسپانسیون باکتری و با میزان هم حجم (۱۰۰μL) غلظت نصف شود و به رقّت دلخواه برسیم. برای اضافه کردن سوسپانسون باکتریایی میزان ۰/۵ مک‌فارلند (۱–۲ x۱۰^۸cfu/ml) از هر یک از سویه‌ها در سالین استریل تهیه شد و بعد سوسپانسیون حاصل به میزان ۱/۱۰ در محیط MHB رقیق گردید تا تعداد باکتریها به ۱۰^۷ cfu/ml کاهش یابد، با برداشت مقدار ۱۰۰μL از این سوسپانسیون رقیق و اضافه کردن در ۱۰۰μL دیگر از محیط MHB حاوی غلظت‌های مختلف از آلکالوئیدها تعداد باکتریها به میزان دلخواه ۵x۱۰^۵cfu/ml رسیدند و نهایتاً رقّت‌های آلکالوئیدها و تعداد باکتریها به میزان مورد نظر و دقیق این آزمایش باقی ماندند. بنابراین میزان تلقیح نهایی هر یک از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا ۵x۱۰^۵cfu/ml بوده است. بعد از گذشت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، MIC به‌صورت کمترین غلظتی از هر یک از آلکالوئیدها 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 آلکالوئیدها بر روی هر ۴ سویه از سودوموناس آئروجینوزا، برای اطمینان از صحت نتایج بدست آمده ۳ مرتبه بود.

تعیین میزان سینرژی بین آلکالوئیدها و آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین

یکی از فرضیه‌های مطالعه پیش‌رو، امکان اثر مهارکنندگی ترکیب‌های نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی پمپ‌های افلوکسی Mex موجود در باکتری سودوموناس آئروجینوزا بوده‌است. یکی از خصایص مهم مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی کاهش قابل‌توجه 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 لووفلوکساسین از این خانواده به‌عنوان سوبسترایی برای این پمپ‌ها انتخاب شد.برای بررسی واکنش احتمالی بین لووفلوکساسین و هر یک از آلکالوئیدهای ذکر شده از روش تیتراسیون چکربورد (آزمایش FIC) موجود در دستورالعمل‌های CLSI استفاده گردید. این روش یکی از پرطرفدارترین راه‌های ارزیابی واکنش بین داروهاست. لووفلوکساسین در ۱۱ غلظت ۰/۰۰۸–۸μg/ml و هر یک از آلکالوئیدها در ۳ غلظت ۲۰μg/ml، ۴۰μg/ml و ۵۰μg/ml در محیط CAMHB تهیه شدند. برای مقایسه میزان کاهش احتمالی MIC لووفلوکساسین هنگام استفاده همزمان با هر یک از آلکالوئیدها، 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 لووفلوکساسین اضافه گردید و ردیف‌های A و B به بررسی MIC لووفلوکساسین به تنهایی اختصاص داده شد. در ردیف‌های C و D مقدار۲۰μg/ml، E و F ۴۰μg/ml و G و H ۵۰μg/ml از هر یک از آلکالوئیدها افزوده شد (در هر بار آزمایش یک آلکالوئید بر روی یک سویه). چاهک‌های A_1 و B_1 به‌ترتیب به‌عنوان کنترل استریل بودن شرایط آزمایش (SC) و کنترل رشد (GC) مورد استفاده قرار گرفتند. در تمامی چاهک‌ها بجز A_1 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 لووفلوکساسین به تنهایی، ۲ برابر غلظت‌های مورد نظر اولیه به چاهک‌های دو ردیف اول تلقیح شد و در باقی ردیف‌های مربوط به تعیین سینرژی بین لووفلوکساسین و آلکالوئیدها، ۴ برابر غلظت‌های در نظر گرفته هر یک از آنها، چون حجم نهایی برای این آزمایش ۲۰۰μL در نظر گرفته شده بود. البته میزان ۱۰۰μL از هر یک از غلظت‌های دو برابری لووفلوکساسین، به ردیف‌های A و B و ۵۰μL 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 آلکالوئیدها هم میزان ۵۰μL (۴ برابر غلظت در نظر گرفته) اضافه شد. سپس با تلقیح ۱۰۰μL از سوسپانسیون حاوی ۱۰^۷cfu/ml باکتری، در هر یک از چاهک‌ها به تعداد دلخواه ۵x۱۰^۵cfu/ml رسیدیم. نتیجه این آزمایش پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری مورد بررسی قرار گرفت. میکروب‌شناسان در تحقیقات بیشماری با استفاده از

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 ۴۰μg/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 Concentration) MPC_8 نامیده می‌شود (Nakayama *et al.*, 2003a؛ Nakayama *et al.*, 2003b؛ Yoshida *et al.*, 2006). بنابراین مطلوب این آزمایش کاهش ۸ برابری یا بیشتر MIC لووفلوکساسین توسط هر یک از آلکالوئیدها بود.

تعیین میزان سینرژی بین آلکالوئیدها و PaβN

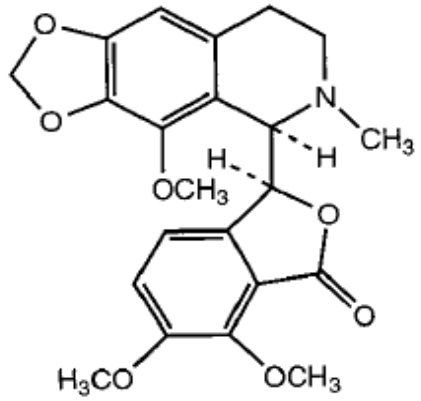
از فرضیه‌های دیگر این تحقیق، امکان خاصیت ضدمیکروبی بالقوه آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین بوده‌است که قسمت اعظم این خاصیت ضدمیکروبی به علت وجود پمپ‌های افلوکسی در باکتریها از بین رفته‌است. بر مبنای این فرضیه اگر به طریقی عملکرد چنین پمپ‌هایی مختل شود، در صورت خاصیت ضدمیکروبی هر یک از این آلکالوئیدها، 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- آرژینین بتانفتیل‌آمید (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 آلکالوئیدها، به روش رقّت‌سازی ۲ برابری (تصاعدی) معمول آزمایش‌های میکروبی تهیه می‌شدند، در هر بار آزمایش بر روی هر آلکالوئید غلظت‌های بسیاری در فاصله مقادیر ۱۰۰۰μg/ml-۰ وجود داشتند که درصد بوجود آمدن خطای احتمالی در نتیجه آزمایش بسیار بالا بود. بنابراین برای شروع ۲۰ غلظت با فاصله ۵۰μg/ml، از هر یک از آلکالوئیدها در دو ردیف از میکروپلیت تهیه شد. در ابتدای کشف PAβN در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که این ترکیب در غلظت ۲۰μg/ml خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی خود را بر علیه بیشتر سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا (ازجمله هر ۴ سویه مورد بررسی در این تحقیق) اعمال می‌کند (Lomovskaya *et al.*, 2001)، بنابراین PAβN با یک غلظت ثابت برای انجام این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و به چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف از آلکالوئیدها، مقدار ۲۰μg/ml از این ترکیب اضافه شد. این آزمایش برای هر یک از سویه‌ها و همچنین هر یک از آلکالوئیدها ۳ مرتبه انجام شد. در این آزمایش نیز برای پرهیز از برهم خوردن غلظت‌های دلخواه در حجم‌های مورد نظر، رقّت‌ها با توجه به رقت نهایی دلخواه، غلیظ‌تر از مقدار واقعی بکار برده شدند. هر گونه کاهش در میزان MIC آلکالوئیدها از مقدار اولیه ۱۰۰۰μg/ml (به قسمت نتایج مراجعه شود)، به معنای افزایش فعالیت این آلکالوئیدها با همکاری PAβN محسوب شد. بعد از مشاهده کاهش در MIC آلکالوئید، در بازه رقّتی بین غلظتی از ماده گیاهی به همراه PAβN که جلوی رشد باکتریها را گرفته و غلظت بعدی، مقادیر دیگری از آلکالوئیدها به همراه غلظت ثابت PAβN نیز مورد آزمایش قرار گرفت تا به میزان دقیق MIC آنها به روش رقّت‌سازی ۲ برابری پی برده شود. برای تمام آزمایش‌های شرح داده شده در این تحقیق از سویه ATCC 27853 به‌عنوان کنترل کیفیت و صحت آزمایش استفاده شد. میزان MIC لووفلوکساسین بر علیه این سویه مشخص و برابر ۰/۵μg/ml می‌باشد. بنابراین با بکار بردن این سویه به‌عنوان کنترل آزمایش می‌توان به میزان صحت آن در هر بار تکرار پی برد.

نتایج

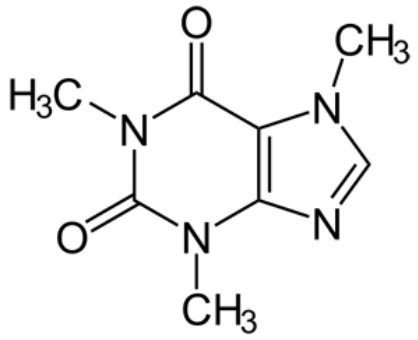
همان‌طور که انتظار می‌رفت میزان MIC نوسکاپین، کافئین و وینکامین بر روی تک تک سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای مورد استفاده در این تحقیق بسیار بالا و برابر ۱۰۰۰μg/ml بود. به‌طور کلی خاصیت ضدمیکروبی ذاتی برای موادی که MIC بالاتر از ۲۰۰μg/ml دارند رد می‌شود، چون این مقدار بسیار بالاتر است و محدوده انحلال‌پذیری یک ماده محسوب می‌شود (Mohtar *et al.*, 2009؛ Stavri *et al.*, 2007). در نتیجه آلکالوئیدهای این تحقیق به تنهایی خاصیت ضدمیکروبی علیه هیچ یک از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا را ندارند.

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

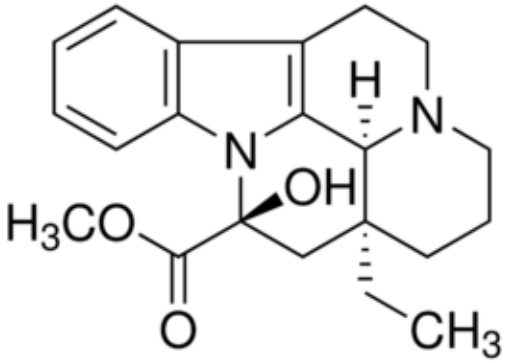
هر سه غلظت بکار رفته از آلکالوئیدها رخ نداد، این بدان معناست که نوسکاپین، کافئین و وینکامین دارای اثر مهارکنندگی پمپ‌های افلوکسی Mex موجود در سودوموناس آئروجینوزا نمی‌باشند (جدول ۱).



(الف)



(ب)



(ج)

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

همچنین از دیگر فرضیه‌ها در مورد پایین بودن اثر ضدمیکروبی یک ترکیب گیاهی بی‌اثر شدن آنها توسط پمپ‌های افلوکسی موجود در باکتریهایی 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 ضدمیکروبی گیاهی هستند و دلیل عدم خاصیت ضدمیکروبی 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 در آورده شده‌است. هیچ‌گونه تغییری در میزان MIC نوسکاپین به همراه PAβN علیه سویه‌های 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 *nal*B و *nfx*B) تأکیدی بر دخیل بودن پمپ‌های افلوکسی این باکتریها در تضعیف خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی هستند که با مهار موفق آنها توسط PAβN، کافئین و وینکامین فرصت بروز خاصیت ضدمیکروبی خود را بیشتر از قبل پیدا می‌کنند. همچنین اثر ضدمیکروبی کافئین ۲ برابر وینکامین علیه تمامی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای این تحقیق بوده‌است.

سینرژی بین غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای نوسکاپین، کافئین و وینکامین و آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین علیه سویه‌های گوناگون (از لحاظ مقاومت دارویی) سودوموناس آئروجینوزا

MIC لووفلوکساسین (µg/ml) در حضور غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای گیاهی (µg/ml)											
۰			۱۰			۲۰			۴۰		
کافئین	نوسکاپین	وینکامین	کافئین	نوسکاپین	وینکامین	کافئین	نوسکاپین	وینکامین	کافئین	نوسکاپین	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
۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱

یزان سینرژی غلظت‌های مختلف آلکالوئیدهای کافئین و وینکامین در ترکیب با PAβN (۲۰µg/ml) علیه سویه‌های گوناگون (از لحاظ مقاومت دارویی) سودوموناس آئروجینوزا

MIC کافئین و وینکامین (µg/ml) در حضور PAβN[1] (µg/ml)					
۰		۲۰		میزان کاهش MIC	
وینکامین	کافئین	وینکامین	کافئین	وینکامین	کافئین
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۲۴	۲۵۰	۴ برابر	۸ برابر~
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۲۴	۶۲	۸ برابر~	۱۷ برابر~
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۲۴	۶۲	۸ برابر~	۱۷ برابر~
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵ برابر	۱۰ برابر~

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 ضدمیکروبی می‌شوند و علت عدم خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی‌اش تقریباً ۲ برابر وینکامین بوده‌است. 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 قابل‌توجه اثر ضدمیکروبی ترکیب‌های گیاهی که پیش از آن خاصیت ضدمیکروبی ناچیزی داشتند، نشان دادند که پمپ‌های افلوکسی علت اصلی پایین بودن خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی نوسکاپین، کافئین و وینکامین علاوه‌بر سویه نوع وحشی، بر روی یک جدایه بیمارستانی و سویه‌های *nal*B و *nfx*B 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 لووفلوکساسین به تنهایی بر روی تک تک سویه‌های این تحقیق مشخص شد که سویه‌های *nal*B و *nfx*B دارای مقاومت ضدمیکروبی بسیار بالایی هستند، چون سویه‌هایی از سودوموناس آئروجینوزا با ۲μg/mlMIC و یا بیشتر از نظر بالینی، سویه‌های بسیار مقاوم دارویی محسوب می‌شوند (Lomovskaya *et al*., 2001). حال با اینکه سویه‌های *nal*B و *nfx*B بیشترین مقاومت ضدمیکروبی را دارا هستند ولی همچنان بیشترین کاهش MIC کافئین و وینکامین بر روی همین سویه‌ها رخ داده است، در نتیجه بالاترین اثر ضدمیکروبی ترکیب‌های گیاهی این تحقیق بر روی مقاومترین سویه‌ها از یکی از مقاومترین باکتریها رخ داده‌است. پس با توجه به این نتیجه، بار دیگر یافته‌های پژوهش Lewis تأیید می‌شود و می‌توان پمپ‌های افلوکسی را مهمترین عامل مقاومت به مواد ضدمیکروبی گیاهی دانست. به‌عنوان مثال MIC کافئین بر روی هر ۴ سویه سودوموناس آئروجینوزا بسیار بالا و برابر ۱۰۰۰μg/ml بود، ولی هنگام استفاده کافئین به همراه ترکیب PAβN (۲۰μg/ml)، MIC این آلکالوئید گیاهی در سویه نوع وحشی به ۱۲۴μg/ml، در جدایه بیمارستانی به ۱۰۰μg/ml و در سویه‌های *nal*B و *nfx*B به میزان ۶۲μg/ml رسید، در نتیجه بیشترین افزایش اثر ضدمیکروبی کافئین علیه سویه‌های دارای افزایش بیان در پمپ‌های افلوکسی بوده‌است که تأکیدی بر دخیل بودن پمپ‌های افلوکسی خانواده Mex سودوموناس آئروجینوزا در بی‌اثر کردن خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 (Islam *et al*., 2009؛ Higgins *et al*., 2003)، در نتیجه با استفاده از مواد ضدمیکروبی گیاهی به همراه مهارکننده

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 ضدمیکروبی گیاهی که قابلیت آنها در این زمینه پنهان مانده است دست یابیم. در داخل گیاهان این مواد ضدمیکروبی 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 (ازجمله گوجه‌فرنگی و حبوبات) دارای هم مواد ضدمیکروبی و هم مهارکننده‌های پمپ‌های افلوکسی مؤثر بر روی این باکتری هستند.

اغلب محققان بر روی خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی گیاهی بود، تا به امروز باید حداقل یک ماده گیاهی با خاصیت ضدمیکروبی مشابه معمولی‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها به زمینه استفاده بالینی راه می‌یافت. اما تنها ماده ضدمیکروبی گیاهی که مجوز استفاده بالینی گرفته است ترکیب پیریتیون است که به‌عنوان ماده گندزدا در شامپوهای Head and Shoulders استفاده می‌شود (Tegos *et al*., 2002). در نتیجه بررسی عصاره‌های گیاهی برای یافتن مواد ضدمیکروبی قدم اول در این راه است و مهمترین قدم پیدا کردن ترکیب‌های مؤثر با خاصیت ضدمیکروبی در این عصاره‌هاست. استفاده همزمان یک مهارکننده پمپ‌های افلوکسی به همراه یک ترکیب ضدمیکروبی گیاهی مناسب، نه تنها سبب بازگرداندن فعالیت از دست رفته مواد ضدمیکروبی کنونی می‌شود، بلکه می‌تواند به‌طور چشمگیری میزان عدم موفقیت درمان بیماریها 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.

پیشنهاد پژوهش پیش‌رو 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 ضدمیکروبی 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.
- Ettefagh, 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 Piddock, 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,

- 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 WJ., 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'-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: Berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Nattural 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'-methoxyhydnocarpin, 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 Wretlind, 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 Dangl, 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., Folefocc, G.N., Nguemevingc, 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., Nitanai, H., Zhang, J.Z., Lee, V.J. and Watkins, W.J., 2006. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomon asaeruginosa.* Part 6: Exploration ofaromatic 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 Microiology, 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 (noscapine, caffeine and vincamine) on various strains of multidrug resistance *Pesudomonas aeruginosa*

A. Avakh[1*], K. Rezaei[2] and J. Vand Yusefi[3]

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=100-1000µg/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 structually unrelated antimicrobial agents including plant compounds from the bacterial cell and subsequenly 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; noscapine, caffein and vincamine, against representative highly resistant Gram negative bactria (*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 noscapine, caffein and vincamine did not actually show any antimicrobial activity in a direct susceptibility tests in vitro. Intrinsic antimicrobial activity (intraction between alkaloids and PAβN (inhibitor of Gram negative bacteria)) or efflux pump inhibitory properties (synergy between alkaloids and levofloxacin (substrate of the efflux pumps in (*Pseudomonas aeruginosa*) of noscapine, affeine 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 *nal*B highly resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* by PAβN, 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: Noscapine, caffeine, vincamine, efflux pump, efflux pump inhibitor.