بررسی اثر ضدالتهابی و ضد باکتریایی عصاره لیپیدی قلم دریایی (*Virgularia gustavina*) در سواحل بندرعباس

شیلا صفائیان[۱]، اکبر اسماعیلی[۲]
شراره شریفی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۰
تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

در سال‌های ۲۰۰۱- ۲۰۰۲، تحقیقات داروشناسی مواد شیمیایی دریایی گستره‌ی جهانی یافته است. این تحقیقات در سال‌های اخیر نشان داده‌اند که ترکیبات دریایی استخراج‌شده از موجودات دریایی اثرهای مشخص ضدالتهابی و ضدباکتری دارند. قلم‌های دریایی یک گروه خاص از انتوزوآها هستند. این جانوران بنتیک و چسبیده به بسترند. قلم‌های دریایی در تمام آب‌های جهان از مناطق بین جزر و مد تا بالای ۶۱۰۰ متر زندگی می‌کنند.

برای ارزیابی التهابی روش ایجاد تورم در گوش موش با استفاده گزیلن به‌کار گرفته شد. موش‌های نر نژاد NMRI به ۳ گروه کنترل مثبت (دگزامتازون ۱۵mg/kg)، کنترل منفی (نرمال سالین) تجربی تقسیم شدند. به موش‌های گروه تجربی دوزهای (mg/kg ۱۰)، (۲۰ mg/kg) و (۴۰ mg/kg) عصاره‌ی لیپیدی کلروفرمی و هگزانی در گروه‌های مجزا به‌صورت درون‌صفاقی تجویز شد و سپس نتایج، تجزیه و تحلیل آماری شد؛ اثر ضدّ التهابی در غلظت‌های ۱۰-۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در مقایسه با نرمال سالین اختلاف معنی‌داری نشان داد؛ درحالی‌که در مقایسه با دگزامتارون اختلاف معنی‌دار نبود

۱. استادیار گروه بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲. دانشیار گروه بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳. داتشجوی کارشناسی ارشد گروه بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال sharareh_sharifi63@yahoo.com

و عصاره‌های کلروفرمی و هگزانی قلم دریایی که ۵۴/۲ درصد آراشیدونیک اسید دارند، حتی در غلظت‌های کمتر اثرهای زیادی داشتند.

اثر ضدباکتریایی عصاره‌های کلروفرمی و هگزانی به روش آزمون‌های انتشار دیسک و (Minimum Inhibitory Concentration= MIC) و (Minimum Bactericidal Concentration=MBC) انجام شد. نتایج ضدباکتریایی نشان داد که در این آزمایش‌ها بیشترین اثر از عصاره‌های کلروفرمی بود؛ میزان MIC در باکتری Staphylococcus aureus در غلظت µg.ml ، ۱۲۵ و MBC همان باکتری در غلظت µg.ml، ۲۵۰ بود.

واژه های کلیدی: *قلم دریا، عصاره‌ی لیپیدی، فعالیت ضدالتهابی، فعالیت ضدباکتری.*

مقدمه

قلم‌های دریایی یا Pennatulacea یک گروه خاص از آنتوزوآها هستند. آن‌ها جانورانی بنتیک و چسبیده به بسترند و در تمام آب‌های مناطق جهان و معمولاً از مناطق بین جزر و مدی تا بالای ۶۱۰۰ متر زندگی می‌کنند. بعضی گونه‌های عمیق پراکنش جهانی دارند(Williams, 1989).

گونه‌ی موجود در سواحل خلیج فارس (*Virgularia gustavina*) است. وزن متوسط این موجود ۱/۵ گرم و طول متوسط آن ۱۶ سانتی‌متر است و ۲۱/۹۶ درصد چربی دارد. این چربی از ۵۷/۹۵ درصد کلسترول و اسیدهای چربی، مانند Ethyl archidonate , pentadecanoic acid، , Heptadecanoic Octadecanoic acid تشکیل شده است.

بسیاری از لیپیدها اثرات ضد التهابی و خواص تقویت‌کننده‌ی وریدی دارند؛ بنابراین استفاده از بی‌مهره‌های دریایی، مانند قلم دریایی که درصد بالای لیپید دارند، می‌توانند برای متابولیت‌های جدید با فعالیت‌های ضدالتهابی و ضد میکروبی مؤثر باشد.

اسیدهای چرب موجود در قلم دریا، جزو اسیدهای چرب ضروری‌اند که در بدن به مجموعه‌ای از ترکیبات فعال شیمیایی، به‌نام ایگوزانوئیدها تبدیل می‌شوند. این اسیدها در بسیاری واکنش‌های بیولوژیکی بدن نقش دارند، خاصیت ضدالتهابی دارند و مانع آزاد شدن ترکیباتی می‌شوند که در انعقاد پلاکت‌ها و انقباض عروق نقش دارند (Pereira et al., 2002).

در این تحقیق قلم‌های دریایی منطقه‌ی جزر و مدّی خور سورو انتخاب شدند و پس از شناسایی گونه‌ای ترکیبات لیپیدی آن گونه بررسی شد. تا کنون درباره‌ی خواص قلم‌های دریایی ایران، مانند اثرات بیولوژی آن‌ها تحقیقی انجام نشده است. این گونه برای نخستین بار در ایران در خور سورو در منطقه‌ی بندرعباس معرفی می‌شود. خواص

ضدالتهابی این گونه با ایجاد التهاب روی موش‌های سوری بررسی و خواص ضدمیکروبی آن‌ها به روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC و MBC انجام شد.

مواد و روش‌ها

روش جمع‌آوری قلم‌های دریایی: قلم‌های دریایی با گشت‌زنی در ساحل منطقه‌ی بین جزر و مدی در ساحل خور سورو در موقعیت جغرافیایی (+27° 9’ 41.13”, +56° 14’ 0.06") در آبان‌ماه سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری شد. پنج ایستگاه در فواصل ۱ متری بررسی شد. خور سورو سواحل گلی و ماسه‌ای است که قلم‌های دریایی به‌صورت پراکنده در قسمت‌های مختلفی از ساحل در قسمت پایین جزر و مدی آن دیده شدند. نمونه‌ها در روز ۲۸ آبان ۱۳۸۸ جمع‌آوری شدند. برای اندازه‌گیری بیوماس منطقه کوادرات‌های ۳۰×۳۰ سانتی‌متر با فواصل ۱ متری ایجاد شد. وزن به‌وسیله ترازویی با دقت ۰۱.. اندازه‌گیری شد و بیومتری نمونه‌ها با کولیس انجام شد.

فیکس کردن و نگه‌داری نمونه: بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه‌ها برای عصاره‌گیری، در فریزر در دمای ۲۰- منجمد شدند. نمونه‌هایی نیز برای شناسایی گونه‌ای و شناسایی اسپیکول در آب دریا به‌صورت زنده نگه‌داری شدند و به آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی منتقل شدند.

روش سفید کردن یا استخراج اسپیکول: پنج قسمت ۱میلی‌متری از قسمت‌های مختلف نمونه به مدت ۵ دقیقه در معرض ۱۰ میلی‌لیتر مایع هیپوکلریدسدیم قرار داده شد، سپس مایع سفیدکننده خارج شد و مواد باقی‌مانده با آب‌مقطر شست‌وشو داده شد. این کار دو بار انجام شد و سپس آب‌مقطر خارج شد و اتانول ۷۰ درجه به آن اضافه شد و با قطره‌چکان به لام منتقل و فیکس شدند. نمونه‌های فیکس شده با میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ بررسی شد (Williams,1990).

استخراج عصاره‌ی چربی: برای استخراج ترکیبات چربی از روش Blight and Dyer استفاده شد؛ به این صورت که نمونه‌ها کاملاً مخلوط شد و به یک خمیر نرم تبدیل شدند، سپس به نسبت یک به نْه از حلال‌های متانول، کلروفرم و نسبت یک به نْه متانول، نرمال هگزان استفاده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگه‌داری شدند، سپس این محلول از قیف و کاغذ صافی شماره‌ی یک رد شد و به بالن ته‌گرد منتقل و پس از آن به دستگاه تقطیر چرخان در خلأ Rotary Evaporator در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد وصل شد. پس از تبخیر کامل حلال، عصاره‌های به‌دست آمده در ظروف شیشه‌ای کوچک دربسته ریخته شد و در یخچال نگه‌داری شد (Bligh and Dyre, 1959).

شناسایی اسیدهای چرب: شناسایی اسیدهای چرب جدا شده با دستگاه GC-MS مدل (ACME6100) ساخت شرکت Young lin با دتکتورFID از دو روش انجام شد. در ابتدا پیک‌های به دست آمده با استفاده از روش اندیس کوارتز که از فرمول $RI = T_n + 100(\frac{T_x - T_n}{(T_n+1) - T_n})$ به دست می‌آید، شناسایی شد، بعد با استفاده از کتاب Eight peak شناسایی کامل و تأیید شد. (Adams, 1996)

بررسی اثرات ضد باکتری عصاره‌ی قلم دریایی *Virgularia gusaviana*

برای انجام آزمون‌های میکروبی، خواص ضدمیکروبی دو عصاره‌ی هگزانی و کلروفرمی قلم دریایی *Virgularia gustaviana* در برابر چهار گونه باکتری، دو باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilts* (ATCC 6633) و *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923) و دو باکتری گرم منفی، *Pseudomonas areuginosa*(ATCC 27853) و *Escherichia coli* (ATCC 25922) و یک مخمر *Candida* albicans (ATCC 10231) در آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی بررسی شد.

برای بررسی اثر ضدمیکروبی از سه آزمون استفاده شد. ابتدا آزمون انتشار دیسک انجام شد و سپس روی عصاره‌هایی که اثر مطلوب (قطر هاله‌ی عدم رشد بیش از ۹ میلی‌متر) در مرحله‌ی انتشار دیسک داشتند، آزمون MIC وMBC (برای باکتری‌ها) انجام شد.

بررسی اثرضد باکتری به روش انتشار دیسک

آزمون انتشار آگار یا انتشار دیسک راهی است برای اندازه‌گیری اثر یک ماده‌ی ضدمیکروبی بر رشد میکروب مورد نظر در محیط کشت آن، به این ترتیب که باکتری در سطح پلیت کشت داده می‌شود، سپس دیسک‌های کاغذی که با ماده‌ی موضوع آزمایش تلقیح شده‌اند، روی سطح آگار قرار داده می‌شوند. ماده از دیسک کاغذی به درون آگار منتشر می‌شود. چنانچه غلظت ترکیب منتشرشده از دیسک به درون آگار بزرگ‌تر یا مساوی غلظت مؤثر باشد، در اطراف دیسک‌ها کلنی رشد نخواهد کرد؛ بنابراین قطر هاله‌ی عدم رشد ایجادشده، معیاری است برای میزان تأثیر ماده، یعنی هر چه هاله‌ی اطراف دیسک بزرگ‌تر باشد، ماده مؤثرتر است (Talaro, 2002).

برای بررسی اثر ضدباکتری دو عصاره‌ی استخراج‌شده از گونه‌ی *Virgularia gustaviana* از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد (Acar,1980) به این منظور از سویه‌های مشخصی از باکتری‌ها استفاده شد که شامل دو باکتری گرم مثبت، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* دو باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* بود. در این آزمایش از دیسک‌های کاغذی استریل‌شده به قطر ۴,۶ میلی‌متر (پادتن طب، ایران) استفاده شد.

ابتدا سویه‌های باکتری تهیه‌شده به محیط کشت نوترینت آگار پاساژ داده شدند و سپس در دمای ۳۷درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شدند، آن‌گاه از هر گونه باکتری سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژی استریل حاوی $1/5\times10^{8}$ *cfu.ml* معادل کدورت استاندارد ۵.. مک فارلند تهیه شد. پس از آن، سواب استریل به این سوسپانسون آغشته شد و روی محیط کشت مولر هینتون آگار که ۲۴ ساعت قبل آماده شده بود، کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند.

به منظور تهیه‌ی دیسک‌های حاوی عصاره، ۱.. گرم از عصاره‌ی خشک در ۱۰ میلی‌لیتر حلال منتانول-کلروفرم و متانول-هگزان حل شد، سپس روی هر دیسک به قطر ۶/۴ میلی‌متر ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول با استفاده از سمپلر افزوده شد. پس از آن دسیک‌ها در شرایط استریل و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند؛ به این ترتیب هر دیسک حاوی یک میلی‌گرم عصاره شد. دیسک‌های آماده‌شده به این روش، روی سطح محیط کشت قرار داده شدند.

دیسک‌های آماده حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین با غلظت ۲۵ میکروگرم در هر دیسک، آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر دیسک، سفالکسین با غلظت ۳۰ میکروگرم در هر دیسک و اریترومایسین با غلظت ۱۵ میکروگرم در هر دیسک (ساخت شرکت پادتن طب، ایران) به‌منظور کنترل مثبت استفاده شدند. دیسک‌های کنترل از بی اثر بودن حلال‌ها نیز با ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از هر حلال (متانول و هگزان نرمال) روی دیسک‌ها و قرار دادن آن‌ها روی پلیت‌های حاوی باکتری تهیه و استفاده شد (McClintock & Gauthier, 1992).

اثر ضدباکتریایی با اندازه‌گیری هاله‌ی ایجادشده در اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر بررسی شد. برای اطمینان از نتایج، همه‌ی ارزیابی‌ها سه بار تکرار شد.

آزمون‌های MIC و MBC

پس از انجام روش انتشار دیسک برای روشن شدن این که عصاره‌ها در چه غلظت‌هایی اثر باکتریواستاتیک و در چه غلظت‌هایی اثر باکتریو سیدال دارند، آزمایش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) انجام شد. آزمایش MBC(Minimum Bactericidal Concentration) تنها روی عصاره‌هایی انجام شد که در مرحله‌ی انتشار دیسک پاسخ مطلوبی (قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر از ۹ میلی‌متر) نشان داده بودند (Baron & Finegold, 1990).

تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) یا حداقل غلظت مهارکنندگی

آزمون MIC در میکروبیولوژی، به معنای تعیین کمترین غلظت لازم برای یک ماده‌ی ضدمیکروبی است که از رشد مشاهده‌شدنی میکروارگانیسم‌ها به‌مدت ۲۴-۴۸ ساعت جلوگیری می‌کند. این آزمون تأییدکننده‌ی میزان مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر یک ماده‌ی ضدمیکروبی است و همچنین برای پایش فعالیت مواد ضدمیکروبی جدید به‌کار می‌رود؛ بنابراین اهمیت دارد (Andrews, 2001).

برای تعیین MIC غلظت‌های مختلف عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی قلم دریا آماده شد. هشت لوله‌ی آزمایش استریل برای هر سویه باکتری و هشت لوله‌ی آزمایش استریل برای یک سویه‌ی مخمر انتخاب شد. در هر لوله برای باکتری نیم میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث (مرک آلمان)

و برای مخمر نیم میلی‌لیتر محیط کشت سابروز دکستروز براث (مرک آلمان) ریخته شد، سپس در اولین لوله، غلظت (µg.ml ۲۰۰۰) از عصاره‌ی هگزانی تهیه شد، در لوله‌ی دوم، غلظت (µg.mg ۱۰۰۰)، در لوله‌ی سوم، غلظت (µg.ml۵۰۰)، در لوله‌ی چهارم، غلظت (µg.ml۲۵۰)، در لوله‌ی پنجم، غلظت (µg.ml۱۲۵) و در لوله‌ی ششم غلظت عصاره (µg.ml ۵,۶۲) تعیین شد.

دو لوله‌ی آخر نیز برای کنترل استفاده شد (در یک لوله به جای عصاره‌ی لیپید از آب‌مقطر استریل، در یک لوله به جای عصاره‌ی لیپید، حلال هگزانی به‌کار رفت و در تهیه‌ی عصاره افزوده شد) و با آنس استریل سوسپانسیونی معادل cfu.ml $۵,۱\times۱۰^{۸}$ برابر با کدورت استاندارد ۵,۰ مک فارلند برای باکتری‌ها در هر لوله تهیه شد. آنگاه لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور برای باکتری‌ها و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور برای مخمر گذاشته شدند. برای عصاره‌های کلروفرمی نیز به همین روش عمل شد. پس از گذشت زمان فوق، لوله‌ها از نظر داشتن کدورت که نشانگر رشد میکروارگانیسم است، بررسی شدند. میکروارگانیسم‌ها تنها در لوله‌های کنترل و لوله‌هایی که مقدار کافی از ماده‌ی ضدمیکروبی نداشت، رشد کرد و در نتیجه کدورت ایجاد کرد. کمترین غلظت ماده‌ی ضدمیکروبی که از رشد میکروارگانیسم جلوگیری کند و با نداشتن کدورت مشخص شد، MIC یا حداقل غلظت مهارکنندگی قرار داده شد (Baron & Finegold, 1990).

تعیین حداقل غلظت کشندگی[۴]

آزمون MBC برای باکتری‌ها و معادل آن آزمون MFC برای مخمرها به‌کار می‌رود که تعیین‌کننده‌ی حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک یا ضد مخمر لازم برای کشتن میکروارگانیسم است (Mims & Playfair, 1993). برای تعیین MBC از لوله‌های بدون کدورت، مرحله‌ی MIC جداگانه روی محیط کشت نوترینت آگار (مرک آلمان) برای باکتری‌ها و روی محیط کشت سابرود دکستروز آگار (مرک آلمان) برای کشت مخمر با سواب استریل کشت داده شد. پلیت‌ها دوباره در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد باکتری‌ها و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد کاندیدا آلبیکنس قرار گرفتند. پس از این مدت آخرین پلیتی که باکتری یا مخمر مورد نظر در آن رشد نکرده بود، MBC گزارش شد.

آزمون ضد التهابی عصاره‌های *Vigularia gustaviana* حیوانات

در این پژوهش از موش‌های کوچک نر نژاد NMRI با وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد که از مؤسسه‌ی پاستور خریده شده بود. حیوانات در قفس‌های ده‌تایی با دوره‌ی شبانه‌روزی طبیعی و در دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با آب و غذای

1. MBC (Minimum Bactericidal Concentration) or MFC (Minimum Fungicidal Concentration)

کافی نگه‌داری شدند. در هر سری آزمایش ۸ سر موش بررسی شد.

موش‌های نر در آزمون التهاب به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل منفی (دریافت‌کننده‌ی نرمال سالین)، گروه کنترل مثبت (دریافت‌کننده‌ی دگزا متازون ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تجربی که عصاره را با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان، به‌صورت درون‌صفاقی دریافت کردند. برای ایجاد التهاب از گزیلن استفاده شد.(Atta & Alkohafi, 1998). ۱۵ دقیقه بعد از تزریق عصاره، ۰۳,۰ میکرولیتر از گزیلن در سطح قدامی و پشتی لاله‌ی گوش راست حیوانات مالیده شد و حیوانات دو ساعت بعد کشته شدند، سپس با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن برش‌های ۷ میلی‌متری از دو گوش چپ و راست گرفته و وزن شد. اختلاف وزن گوش چپ و راست نشان‌دهنده‌ی میزان التهاب است (Atta & Alkohafi, 1998).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون Tukey-Kramer استفاده شد. برای بررسی نتایج $P<0.05$ مرز استنتاج آماری بوده و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

نتایـــج

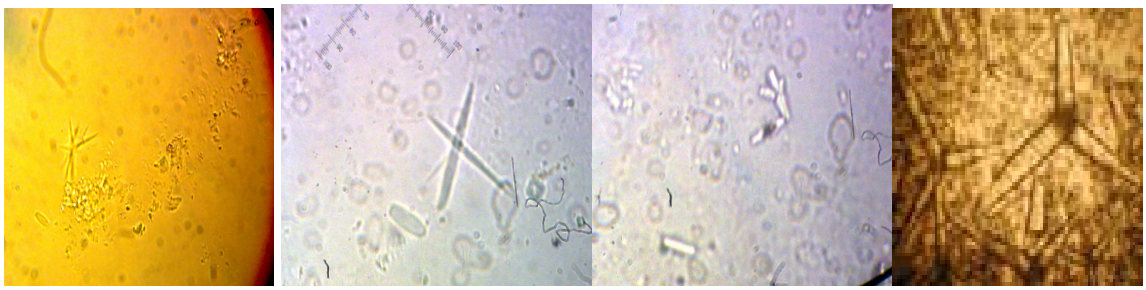
شناسایی قلم‌های دریایی ساحل خور سورو در بندرعباس در موقعیت جغرافیایی (" 9' °27+ 0.06 '14 °56+ ,"41.13) قرار دارد که بستر گلی و ماسه‌ای دارد. قلم‌های دریایی به صورت پراکنده در ساحل دیده شدند. پراکندگی قلم‌های دریایی *Virgularia gustaviana* در ساحل نامتمرکز بود و تجمع تکه‌تکه داشتند. شناسایی قلم‌های دریایی جمع‌آوری شده نشان داد که این جنس تقارن دوطرفه دارد؛ به این صورت که تقارن اندام‌محوری در این جانور در سراسر بدن دوطرفه است، محور بدن کوتاه است و در سراسر طول، کلنی به‌صورت گرد دیده شد، اجزای برگ مانند پولیپ مشخص است و کوتاه و تراکم زیاد در راچیس دیده می‌شود. (شکل شماره‌ی ۲)

قلم‌های دریایی زیر استریو میکروسکوپ با دقت مطالعه و از اندام‌های اتوزوئید، سیفوزوئید، تنداکل و برگ‌های پولیپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ عکس‌برداری شد.

شکل شماره‌ی ۲. نمایی از قلم دریایی جنس *Virgularia gustaviana*

نتایج استخراج اسکلریت‌ها

استخراج اسکلریت‌ها به روش هیپو کلریدسدیم انجام شد و نتایج نشان داد که اسکریت‌ها به صورت باریک و کشیده است و در بعضی موارد سه‌لبه و گاه نیز حالت سوزن‌مانند دیده شد. اسکلریت‌ها در همه‌ی قسمت‌ها مثل راچیس‌ها دیده نشد و بیشتر در برگ پولیپ‌ها و پنداکل‌ها دیده شد. (شکل شماره‌ی ۳) اسپیکول‌های مگا اسکلرها از نوع مونوآکسون، مثل Style و Terractine ، نمونه‌ای از تری آکسون‌ها وTriod از تراآکسون‌ها شناسایی شد.



شکل شماره‌ی۳. نمایی از اسپیکول‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰

شناسایی گونه‌ی *Virgularia gustaviana* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی و شناسایی اسپیکول‌ها با استناد بر کلیدهای شناسایی قلم‌های دریایی انجام شد و برای تأیید به مؤسسه‌ی علمی کالیفرنیا فرستاده شد. در آنجا دکتر گری ویلیامز Williams Gray آن را تأیید کرد. (Williams, G. C., 1995)

تعیین اثرات ضدالتهابی عصاره‌های *Virgularia gustaviana*

تزریق عصاره‌ی لیپیدی هگزانی قلم دریا با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های سوری نر در مقایسه با گروه شاهد که تنها نرمال سالین دریافت کرده بود، سبب کاهش معنی‌دار التهاب نشد. ($P<0.05$) جدول شماره‌ی ۱ تزریق عصاره‌ی کلروفرمی قلم دریا در دوزهای ۴۰-۱۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌دار نداشت. درصد مهار ایجادشده با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی هگزانی شبیه به دگزامتازون بود؛ به ترتیب ۱۲,۹۴ درصد و ۴۸,۹۶ درصد (جدول شماره‌ی ۱).

جدول شماره‌ی ۱. اثر تجویز درون‌صفاقی دوزهای مختلف عصاره‌ی هگزانی، کلروفرمی قلم دریا بر التهاب ایجادشده با گزلین در گوش موش‌های نر NMRI آزمایشگاهی.

عصاره mg/kg	شاهد (نرمال سالین)	شاهد دگزامتازون ۱۵	عصاره هگزانی ۱۰	عصاره هگزانی ۲۰	عصاره هگزانی ۴۰	عصاره کلروفرمی ۱۰	عصاره کلروفرمی ۲۰	عصاره کلروفرمی ۴۰
درصد مهار التهاب	۱۱/۴۰	۹۴/۱۲	۶۰	۹۶/۴۸	۸۰/۵۹	۸۶/۴۸	۷۱/۸۴	۸۴/۱۲

نتایج کروماتوگرافی درباره‌ی عصاره‌ی هگزانی، کلروفرمی قلم دریا ترکیباتی از جمله، آرشیدونیک اسید و هپتادکان را نشان داد. بر اساس تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است، می‌توان این ترکیبات را عاملی بر اثرات ضدالتهابی دانست. (مژدهی و همکاران، ۱۳۷۷)

جدول شماره‌ی ۲. اسیدهای چرب عصاره‌ی هگزانی ٪ به‌دست آمده به روش GC-MS شناسایی، RI یا اندیس کوارتز

NO	اسیدهای چرب	درصد	RI
۱	Octadecanoic acid methyl ester	۱۵/۶	۱۱۰۰/۷۸
۲	Ethyl arachidonate	۵۴/۲	۱۵۰۰/۱۰
	درصد کلی اسیدهای چرب عصاره‌ی هگزانی	۶۹/۸	

جدول شماره‌ی ۳. اسیدهای چرب عصاره‌ی کلروفرمی و درصد به‌دست آمده به روش GC-MSشناسایی،RI یا اندیس کوارتز

No	اسیدهای چرب	%	RI
۱	Heptadecane	۴۴/۳	۹۸۳/۸
۲	Beta-Bisabolene ss Cyclohexene1	۱۸/۲	۱۴۰۰/۳۵
۳	2,6,10-Trimethyl-tetradecane	۱۶/۹	۹۱۰
۴	Hexadecane	۱۰/۰۳	۱۶۲۳/۳
۵	Tetradecanoic acid	۱/۵	۱۶۰۰/۲۰
	درصد کلی اسیدهای چرب عصاره‌ی کلروفرمی	۹۰/۲۳	

نتایج بررسی خواص ضدباکتری عصاره‌ی قلم دریا

نتایج بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره‌ی کلروفرمی و هگزانی استخراج‌شده از گونه‌ی شناسایی‌شده منطقه‌ی جزر و مدی خور سورو (که قطبیت متفاوت دارد) به روش انتشار دیسک، نشان می‌دهد که عصاره‌ها اثرهای مطلوبی بر سویه‌های باکتری گذاشتند. در جدول شماره‌ی ۴ نتایج اثر ضدمیکروبی بر چهار باکتری بیماری‌زا به طور کامل آورده شده است. هر دو عصاره‌ی هگزانی و کلروفرمی روی باکتری‌های گرم منفی به جز باکتری اشریشیا کلی که هاله‌ای در آن دیده نشد، اثرات مطلوب (قطر هاله بیش از ۹ میلی‌متر) داشتند.

جدول شماره‌ی ۴. نتایج آزمون اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ی قلم‌های دریایی *Virgularia gustavina* در منطقه‌ی خور سورو به روش انتشار دیسک و میزان یک میلی‌گرم به هر دیسک. اعداد نشان‌دهنده‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد و انحراف معیار بر حسب میلی‌متر است. .

سویه باکتری / نوع حلال و عصاره	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Pseudomonus aeruginosa* ATCC 27853
عصاره‌ی کلروفرمی 1mg/ Disk	۱۳ ±۳/۰	۲۰ ±۵/۰	۷/۳± ۰/۳	۷/۵± ۰/۱
عصاره‌ی هگزانی 1mg/ Disk	۱۴±۰/۵	۱۲± ۰/۷	۱۳±۰/۷	۷/۵±۰/۱
استرپتومایسین ۳۰ میکروگرم در هر دیسک	۱۳±۰/۱	۱۵±۰/۱	۱۷±۰/۵	R
آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم	۱۶±۰/۱	۲۷±۰/۴	۸±۰/۱	R
هگزان 100 میکرولیتر	R	R	R	R
کلروفرم 100میکرولیتر	R	R	R	R

R، نشانه‌ی عدم تأثیرگذاری عصاره روی باکتری مورد نظر است. مقدار ماده‌ی مؤثر یک میلی‌گرم در هر دیسک است.

نتایج آزمایش MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و آزمایش MBC (حداقل غلظت کشندگی)

پیش از انجام آزمایش MIC جدول شماره‌ی ۲ که در آن نتایج آزمایش‌های انتشار دیسک آورده شده است، بررسی شد و عصاره‌هایی که اثرات مطلوب بر باکتری‌ها (هاله‌ی عدم رشد بزرگ‌تر از ۹ میلی‌متر) داشت، برای انجام آزمایش‌های MIC و MBC انتخاب شد (Baron & Fineglod, 1990).

در جدول شماره‌ی ۵ نتایج آزمایش MIC و MBC بر باکتری‌ها آورده شده است. غلظت اصلی عصاره‌ها یک میلی‌گرم (هزار میکروگرم) در میلی‌لیتر است که به‌ترتیب از سمت راست به چپ غلظت‌های ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲,۵ است.

جدول شماره‌ی ۵. تعیین MIC و MBC عصاره‌ی کلرفرمی و هگزانی قلم دریا (*Virgularia gustavina*) با تأثیر مطلوب (قطر هاله‌ی عدم رشد بیش از ۹ میلی‌متر) در مرحله‌ی انتشار دیسک

میکروارگانیسم‌ها	MIC µg.ml		MBC µg.ml	
	هگزان	کلروفرم	هگزان	کلروفرم
Escherichia coli	۵۰۰	۵۰۰	۱	۱
Staphylococcus aureus	۵۰۰	۱۲۵	۱	۲۵۰
Bacillus subtilis	۵۰۰	۵۰۰	۱	——

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از لیپیدها اثرات ضدالتهابی دارند که با مهار آزادشدن سرتونین و هیستامین عمل می‌کنند، اسیدهای چرب موجود در قلم دریا جزئی از اسیدهای چرب ضروری است که در بدن به یک‌سری ترکیبات فعال شیمیایی، به‌نام *ایکوزانوییید* تبدیل می‌شود و مانع آزاد شدن ترکیباتی می‌شود که در انعقاد پلاکت‌ها و انقباض عروق نقش دارد (Pereira et al., 2002).

در میان ترکیبات به دست آمده از عصاره‌ی هگزانی، اسید آراشیدونیک مهم‌ترین ترکیب است و بیشترین درصد مربوط به آن است. آراشیدونیک‌اسید یک اسید چرب ۲۰ کربنه (C_{20}) با چهار پیوند دوگانه است که در موقعیت امگا -۶ شروع می‌شود و یک ۵ و ۸ و ۱۱ و ۱۴ ایکوز اتترااانوییک اسید (این ترکیب را به صورت ۴-۶: ۲۰ نشان می‌دهند) را ایجاد می‌کند. برای آن که یک ایکوزانوییید ساخته شود، ابتدا باید آرشیدونیک‌اسید

آزاد شود یا در اثر یک یا چند لیپاز از نوع فسفولیپاز A_2 (یا PlA_2) از فسفولیپیدهای غشایی شود.

دست‌کم سه فسفولیپاز واسطه‌ی آزادشدن آرشیدنات از لیپیدهای غشایی‌اند: PLA_2CPLA_2 سیتوزدلی و PLA_2 ترشحی، مانند این فسفولیپیدها هستند (مژدهی و همکاران، ۱۳۷۷). محصولات مشتق شده از آرشیدونیک اسید که پنج پیوند دوگانه دارد، از نظر کمّی متفاوت است؛ این اساس استفاده از اسیدهای چرب جداشده از بدن ماهی و گیاهان، مکمل غذایی است. X_2 ۱ که از آرشیدونات ساخته می‌شود، یک تتراانوییک اسید یک تنگ‌کننده‌ی قوی عروقی و جمع‌کننده‌ی قوی پلاکت‌هاست (مژدهی آذر، ۱۳۷۷).

آراشیدونیک‌اسید با درصد ۵۴,۲ از عصاره‌ی هگزانی استخراج شد. آرشیدونیک‌اسید یک اسید چرب مهم برای بدن است. با توجه به مکانیسم عمل آن می‌توان از این عصاره در داروهای ضدالتهابی و ضدعروقی استفاده کرد (صفاییان و همکاران، ۱۳۸۹).

نتایج آزمون، اثر ضدالتهابی قلم دریا *Virgularia gustavina* را در التهاب حاد نشان داد. با توجه به آزمون تزریق عصاره‌ی لیپیدی قلم دریا *Virgularia gustavina* با غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های نر در مقایسه با گروه شاهد که تنها نرمال سالین دریافت کرده بودند، سبب کاهش معنی‌دار التهاب شد. ($P<./۰۵$)

درصد مهار ایجادشده با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی هگزانی شبیه به دگزامتازون بود. ۹۴/۱۲ درصد و ۹۶/۴۸ درصد و عصاره‌ی کلروفرمی در دوز ۱۰ میلی‌گرم درصد مهار ۸۶/۴۸ درصد بود. مشابه این آزمایش را Fenical و همکاران او در سال ۱۹۸۵ روی *Pseudopterogorgia elisabethae* گونه‌ای از Octocorollinaها از خانواده‌ی Sea whip انجام داد. عصاره‌ی لیپیدی این جانور اسیدآرشیدونیک است و اثرات ضدالتهابی روی موش سوری از خود نشان داده است(Fenical et al., 1985) .

نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که عصاره‌های کلروفرمی و هگزانی که از قلم های دریایی *Virgularia gustaviana* تهیه شدند جواب‌های درخور توجه دارند و خواص ضد باکتریایی دارند. در این تحقیق بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به عصاره‌ی کلروفرمی بر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* با قطر ۲۰ میلی‌متر بود. نتایج آزمایش‌های MIC نشان داد که عصاره‌ی کلروفرمی در غلظت µg.ml ۱۲۵روی همان باکتری بهترین جواب را داشت و نسبت به باکتری‌های گرم منفی تأثیر بیشتری داشته است؛ بنابراین میزان تأثیر عصاره‌ی کلروفرمی بر باکتری گرم مثبت بیشتر از دو باکتری گرم منفی است. تحقیقاتی که W. Sylvester Fredrick and S.Ravichandrom در سال ۲۰۱۰ روی گزنه‌سانان گونه‌ی *Propita propita* انجام دادند، نشان داد که عصاره‌ی لیپیدی این گونه خواص ضدمیکروبی دارد. این عصاره بیشترین رشد را روی باکتری *Kelebsilla penuemania* با قطر هاله‌ی عدم رشد mm ۱۶ و کمترین تأثیر را بر باکتری *Escherchia coli* با قطر هاله‌ی mm 12 داشته

است. با توجه به اینکه قلم‌های دریایی ترکیبات لیپیـدی مـؤثری دارند، نتـایج به دست آمده در این پـژوهش تـا حدی متفـاوت از دیگـر تحقیقات، (Mc Caffery &Endean,1985) (Bergquist & Bedford, 1978) است و این تضاد نیز به علت تفاوت در خانواده و ترکیبات موجود در قلم دریا و منطقه موضوع بررسی است.

درباره‌ی خواص بیولوژیک قلم دریا در دنیا و به‌ویژه در خلیج فارس تحقیق نشده است؛ بنابراین این تفاوت را می‌توان طبیعی دانست. با توجه به کسب نتایج رضایت‌بخش که از مطالعه‌ی قلم‌های دریایی بین جزر و مدی در خلیج فارس در منطقه‌ی خورسورو به دست آمد، می‌توان نتیجه گرفت که سواحل ایرانی خلیج فارس پتانسیل بالایی برای شناسایی و مطالعه‌ی آنتوزوآها از نظر خواص زیستی دارند.

تحقیق پیشِ رو اولین تحقیق در زمینه‌ی خواص زیستی ضدمیکروبی، ضدالتهابی قلم دریا گونه *Virgularia gustavian* در دنیا و همچنین اولین پژوهش برای شناسایی گونه‌ای و مطالعه و شناسایی لیپیدهای قلم دریا سواحل ایرانی خلیج فارس است و می‌تواند در کشف داروهای جدید از قلم دریایی (منابع دریایی) در صنعت داروسازی کشور راه‌گشا باشد.

منابع

صفائیان، شیلا. اسماعیلی، ا و شریفی، ش. (۱۳۸۹) بررسی ترکیبات لیپیدی قلم‌های دریایی جنس *Virgularia gustaviana*در خور سور، بندر عباس، مجله دانشکده‌ی علوم فنون دریایی، (زیرچاپ).

برترام، کاتزونگ. (۱۳۷۷) فارماکولوژی پایه و بالینی کاتزونگ، ترجمه همایون مژدهی آذر، مهران نیایش و فرزاد مدرس موسوی، چاپ اول، تهران.

Acar Jf.; (1980). The disc susceptibility test in: Antibiotics in laboratory medicine. Lorian, V.(eds).Williams& Wilkins, Baltimor, London. 24-54.

Adams, R. P; (1996). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography.Mass Spectroscopy. Allured publ.Corp., Carol Stream. IL

Atta, A. H. and Alkofahi, A.; (1998). Anti-nociceptive and Antiinflammatory effect of some Jordanian medicinal plant extract. Journal of Ethnopharmacology. 60:117-124.

Andrews,J. M.; (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.48(1): 5-16.

Baron, E.J. and S. M. , Finegold; (1990). Diagnostic Microbiology. Mosby Publication, United States of America. 861.

Bergquist, R.P. and J.J., Bedford; (1978). The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae: systematic and geographic considerations.Mar Biol., .46: 215-221.

Bligh,E.G. and Dyer,W.J.; (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*. 37:911-917

Fenical W.,Jacobs R. S., Look.,S.A.And Claredy J.; (1985). The pseudopte-rosins: antiinflammatory and analgesic natural products from the sea whip Pseudopterogorgia elisabe-thae, Marine natural product. USA: 82, 604-607. 6240

McCaffrery, E.J. and R. ,Enden,; (1985). Antimicrobial activity of tropical and subtopical sponges.Marine Biology. 89:1-8.1

McClintock, J.B. and J.J., Gauthier; (1992). Antimicrobial activities of Antactic sponges. Antractic Science. 4(2): 179-183.

Mims & Playfair; (1993). en. Wikipedia. org. wiki. Minimum – Backericidal - Concentration.

Talaro,k. P.,Talaro,A.; (2002). Foundation in microbiology. Pub. McGrewHill, USA, 834.

Pereira, M.S., Vilela-Silva, Ac.,Valente, A.P., Mourao, P.A.; (2002). A2-sulfared, 3-linked alpha-L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. carbohydr. Res. 337,2231-2238.

Williams CG.; (1990). The pennatulacea of southern Africa(coelenterate, Anthozoa). Annals of the south African Museum 99: 31-119.

Williams, G. C.,(1995). Living genera of sea pens (Coelenterata: Octocorallia: Pennatulacea): Illustrated key and synopses. Zool. J. Linn. Soc., 113 : 93-140.

Williams GC; (1989). The Pennatul-acean genus Cavernularia Valenciennes (Octocorallina,Veretillidae). Zoological Journal of the linnean Socity 95:285-310.