قياس الفعالية المضادة للميكروبات لمركب الدايوسجنين المعزول من كالس سيقان النبات الطبي الحلبة *Trigonella foenum-graecum* ♦

لمى ذنون صالح*　　مزاحم قاسم الملاح**　　عبد الله نجم النعيمي**

* الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية في نينوى

** قسم علوم الحياة / كلية التربية/ جامعة الموصل

Abstract

This assay pinafore measurement the potency of antibacterial of purified diosgenin compound which isolated from stem callus of *Trigonella foenum-graecum* . Diffusion method in petri dish was used for measuring the potency. This method considered to measurement the potency of antibiotic in drug analysis. Were comparisons the potency of diosgenin with other antibiotics as stander sample (Erythromycin, Gentamycin, Neomycin and Nystatin). The results showed that antimicrobial potency of diosgenin mostly 281.1µg/ mg, and no effect on fungus.

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية من قياس الفعالية المضادة للبكتريا لمركب الدايوسجنين والمعزول من كالس سيقان نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* . واستخدمت طريقة الانتشار المعتمدة في قياس فعالية المضادات الحياتية في شركتي أدوية سامراء ونينوى . وتمت مقارنة الفعالية المضادة لمركب الدايوسجنين مع فعالية المضادات Erythromycin, Gentamycin, Neomycin وNystatin التي اعتبرت عينات قياسية. أظهرت النتائج أن الفعالية المضادة للبكتريا لمركب الدايوسجنين قاربت 281.1 مايكروغرام/ملغم. ولم يظهر المركب فعالية مضادة للفطريات.

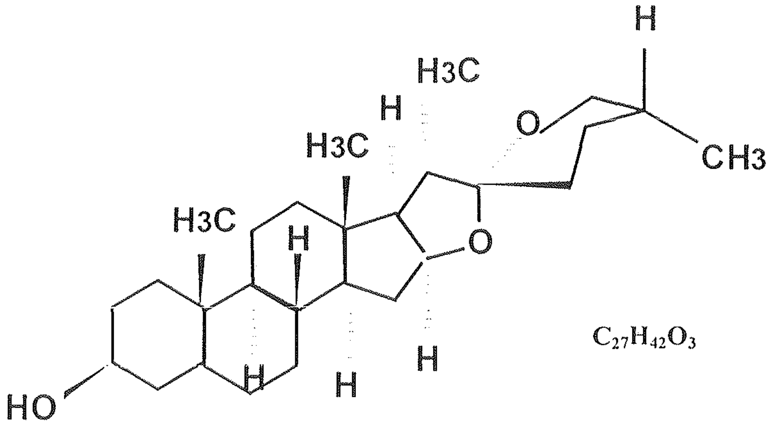
المقدمة

إن أنواع متعددة من النباتات تتراكم في أنسجتها مركبات ايضية مختلفة كالسترويدات والتربينات وتعمل هذه المركبات كمضادات حياتية لحماية النبات من البكتريا والفطريات والفايروسات الممرضة للنبات وحتى كمضادات حشرية. وأثبتت الدراسات أن لهذه المركبات صفات طبية مهمة بالإمكان استخدامها كمضادات حياتية أو كمضادات للفطريات[1]. ومن هذه النباتات نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* [2] إذ يحتوي على نواتج ايضية

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

ثانوية ذات استخدامات طبية أو صيدلانية منها القلويدات كقلويد الترايكونيلين Trigonelline [3] والذي يمتاز بنشاطه المضاد للبكتريا [4] وسترويدات السابونين التي لها فعالية مضادة للأحياء المجهرية [5] كسترويد الدايوسجنين (الشكلA) الذي له فعالية مضادة للالتهابات [6] وله فعالية مضادة للفيروسات [7] وله سمية تجاه بعض خلايا السرطان[8].

وقد ذكرت العديد من الدراسات الأهمية الطبية لنبات الحلبة ونواتجه الايضية المستخلصة منه، فقد ذكرت احدها أن المستخلص الميثانولي لبذور الحلبة أظهر قابلية على خفض سكر الدم عند إعطائه عن طريق الفم للجرذان المصابة بداء السكري المستحدث بمادة الالوكسان [9]. وقد أمكن إثبات الفعل المضاد للالتهابات والمضاد للحمى والمسكن للألم لمستخلص أوراق الحلبة على جرذان مصابة بأورام مستحدثة بالفورمالين [10]. وقد أظهرت نتائج اختبار فاعلية المستخلص المائي لبذور الحلبة المجفد على خمسة أنواع من البكتريا أن التراكيز الكفوءة من المستخلص كان لها نفس تأثير المضادات الحيوية المستخدمة [11]، وذكرت دراسة أخرى أن حقن الفئران المطعمة بخلايا سرطانية، بمستخلص بذور الحلبة الكحولي أعطى تثبيط 70% لنمو خلايا الأورام [12]. ولحظت دراسة أخرى أن مستخلص بذور الحلبة الكحولي كان مثبطا لبعض الأنواع من البكتريا والفطريات مثل *Escherichia coli, Salmonella typhi,* *Candida albicans* بينما المستخلص المائي لهذه البذور ثبط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* فقط [13].



شكل (A): التركيب الكيميائي والصيغة الكيميائية لمركب الدايوسجنين

مواد وطرائق العمل

- **إنشاء مزارع كالس السيقان**

استخدمت قطع السيقان المستأصلة من بادرات الحلبة المعقمة بعمر أسبوعين في تكوين مزارع الكالس في وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر من نفثالين حامض الخليك NAA و2.0 ملغم/لتر من بنزايل ادنين BA [14].

- **استخلاص الدايوسجنين من مزارع الكالس**

اخذ غرام واحد من كالس سيقان الحلبة غير المتمايز الجاف وأضيف إليه 30 مل من 4 عياري حامض الكبريتيك المخفف في 70% كحول ايزوبروبانول. وبقي الكالس فيه مدة ثلاث ساعات. رشح المستخلص من خلال ورق ترشيح (Whatman No.1) ونقل الراشح إلى قمع الفصل وفصل الدايوسجنين باستخدام الهكسان (60 مل × 3) لمدة 5 دقائق / مرة، وغسل المستخلص ثلاث مرات بمحلول 5% هيدروكسيد البوتاسيوم (180 مل / مرة) غسل بالماء المقطر ثلاث مرات (180 مل / مرة) . مرر المستخلص خلال قمع تستقر في أعلاه طبقة من قطن تستند إليها طبقة من مسحوق Na_2SO_4 لسحب الماء المتبقي في المستخلص وركز الراشح بالمبخر الدوار[15].

- **تحضير الأوساط الزرعية ولقاحات البكتريا والفطريات**

تم الحصول على البكتريا والفطريات المستخدمة في الدراسة من الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في نينوى. وحضرت الأوساط الزرعية المبينة في (الجدول 1) وفق الدستور الدوائي البريطاني والدستور الدوائي الأمريكي بإذابة مكونات كل وسط في لتر من الماء المقطر وسخنت إلى درجة الغليان مع التحريك المستمر، ثم ضبط pH كل منها، عقمت في المعقام عند درجة حرارة 121°م وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة.

الجدول 1: مكونات الأوساط الغذائية المستخدمة في تنمية البكتريا والفطريات وفي قياس الفعالية

مكونات الوسط	الكمية (غرام / لتر)			
	وسط11	وسط 19	وسط A	وسطF
Peptone	6.0	9.4	6.0	9.4
Pancreatic Digest of Casein	4.0	4.7	4.0	----
Yeast Extract	3.0	2.4	3.0	4.7
Beef Extract	1.5	----	1.5	2.4
Dextrose	1.0	10.0	----	----
Sodium Chloride	----	10.0	----	10.0
Glucose	----	----	1.0	10.0
Manganese Sulphate	----	----	0.001	----
Agar	15.0	23.5	15.0	23.5
pH	8.3± 0.1	6.1± 0.1	7.9± 0.1	6.0± 0.1

نميت البكتريا المختبرة على سطح وسط A (الجدول 1) وحضنت عند درجة حرارة 37 – 39 ْم لمدة سبعة أيام . علقت السبورات المتكونة بالماء المقطر المعقم، سخن المعلق السبوري في الحمام المائي عند درجة حرارة 70 ْم لمدة 30 دقيقة ثم خفف المعلق بالماء المقطر المعقم. حفظ معلق السبورات عند درجة حرارة 4 ْم [17]. نميت الخميرة على سطح وسط F المائل (الجدول 1) وحضنت عند درجة 30 – 37 ْم لمدة 24 ساعة. وعند الاستخدام علقت خلايا الخميرة في كمية مناسبة من المحلول المتكون من 9 غم / لتر كلوريد الصوديوم المعقم [17].

- **تحضير المحاليل الخزنية والمخففة من المضادات الحيوية**

أذيب 20 ملغم من مركب الارثرومايسين النقي في 10 مل ميثانول و 10 مل من المحلول المنظم ذي الرقم الهيدروجيني7.8 اخذ 1 مل من هذا التخفيف وأضيف إليه 8.12 مل من المحلول المنظم، ومن التخفيف الثاني اخذ 4 مل وأضيف إليه 16 مل من المحلول المنظم. واستخدم التخفيف الأخير في قياس الفعالية [17].

وأذيب 20 ملغم من مركب النيومايسين النقي في 20 مل من المحلول المنظم . اخذ 1 مل من هذا التخفيف وأضيف إليه 6.3 مل من المحلول المنظم. ومن التخفيف الثاني اخذ 4 مل وأضيف إليه 16 مل من المحلول المنظم. واستخدم التخفيف الأخير في قياس الفعالية [17].

وأذيب 20 ملغم من مركب الجنتامايسين النقي في 20 مل من المحلول المنظم. اخذ 1 مل من هذا التخفيف وأضيف إليه 6.9 مل من المحلول المنظم. ومن التخفيف الثاني اخذ 4 مل وأضيف إليه 16 مل من المحلول المنظم. واستخدم التخفيف الأخير في قياس الفعالية[17].

وأذيب 20 ملغم من مركب النستاتين النقي في 5 مل من diethyl formanid وأكمل الحجم الى 100 مل بالمحلول المنظم ذي الرقم الهيدروجيني 6.0. اخذ 4 مل من هذا التخفيف وأضيف إليه 16 مل من المحلول المنظم. واستخدم التخفيف الأخير في قياس الفعالية [17].

أذيب 0.122 ملغم من مركب الدايوسجنين المعزول من كالس السيقان في 2 مل كلوروفورم ثم أضيف إلى المحلول 10 مل ميثانول (التركيز العالي للمركب) . أخذ من هذا التخفيف 2 مل وأضيف إليه 2 مل ميثانول (التركيز الواطئ للمركب).

- **طريقة الانتشار لقياس الفعالية المضادة للميكروبات**

تُعتمد هذه الطريقة في قياس فعالية المضادات الحياتية سواء كانت مادة أولية أو كمستحضر دوائي في شركتي أدوية سامراء ونينوى. ومبدأ العمل في هذه الطريقة يتضمن تحضير تركيز عالي وتركيز واطئ من المركب المراد قياس فعاليته. وتحضير تركيز واحد للمضاد القياسي بحيث يعادل التركيز العالي للمركب المراد قياس فعاليته.

حضر وسط الاكار المناسب (جدول 1،2) وعقم ثم برد إلى48 ^{o}م. لقح الوسط بالكائن ألمجهري المناسب (جدول 2) وصب في أطباق بتري قطر 9 سم وبعد تصلب الوسط تم عمل ستة حفر في كل طبق باستخدام انبوب معدني معقم. في 3حفر قطرت المحاليل المحضرة من مركب الدايوسجنين و في الحفر الثلاثة المتبقية قطرت محاليل المضاد القياسي. وتم تقطير المركب والمضاد القياسي على سطح أفقي تماما وتترك الأطباق لمدة ساعتين لحين انتشار المحاليل في الوسط الزرعي .

حضنت الأطباق عند الدرجة الحرارية المناسبة لكل كائن مجهري مُستخدم (جدول 2) لمدة 24 ساعة بعدها تم قياس قطر الهالة الدائرية الرائقة المتكونة حول الحفر والتي تمثل مناطق تثبيط النمو[16، 17].

جدول 2 : المضادات الحياتية والكائنات المجهرية المستخدمة وظروف العمل

المضاد الحياتي (العينة القياسية)	الكائن المجهري	الوسط الزرعي	درجة حرارة التحضين (°م)
ارثرومايسين Erythromycin	*Bacillus pumilus*	11	37 – 30
نيومايسين Neomycin Sulphate	*Bacillus pumilus*	11	37 – 30
جنتامايسين Gentamycin Sulphate	*Bacillus pumilus*	11	37 – 30
نستاتين Nystatin	*Saccharomyces cerevisiae*	19	32 - 30

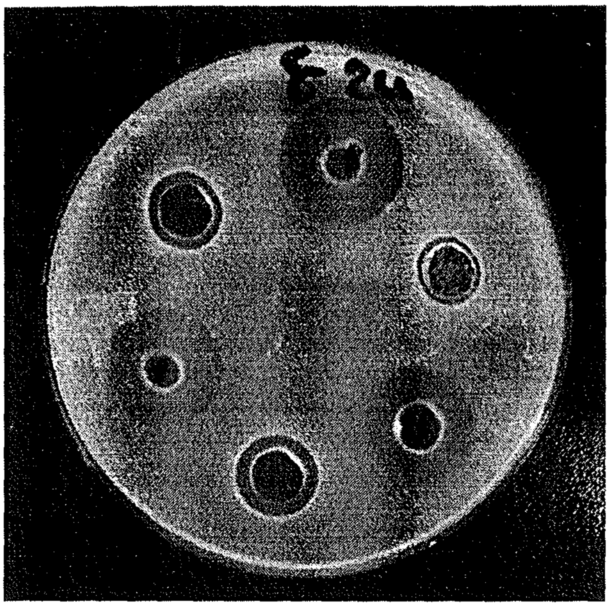
النتائج والمناقشة

- **نسبة مركب الدايوسجنين**

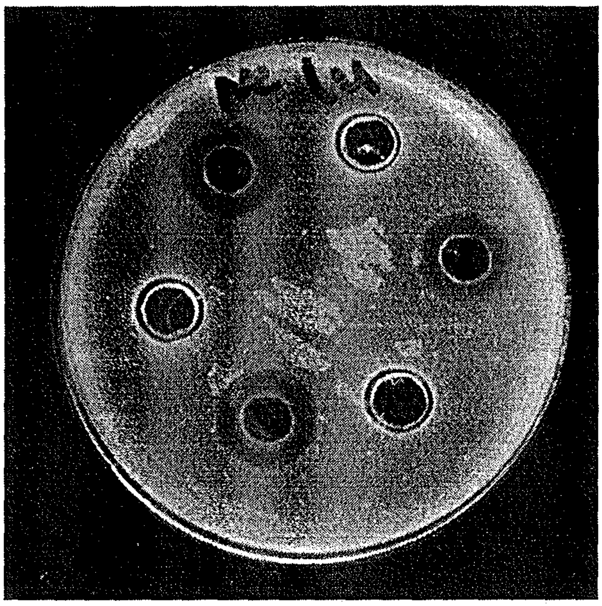
أظهرت نتائج استخلاص الدايوسجنين أن كميته في 1 غم كانت 0.122 ملغم لذا بلغت نسبة تواجده في العينة 12.2%.

- **قياس فعالية الدايوسجنين**

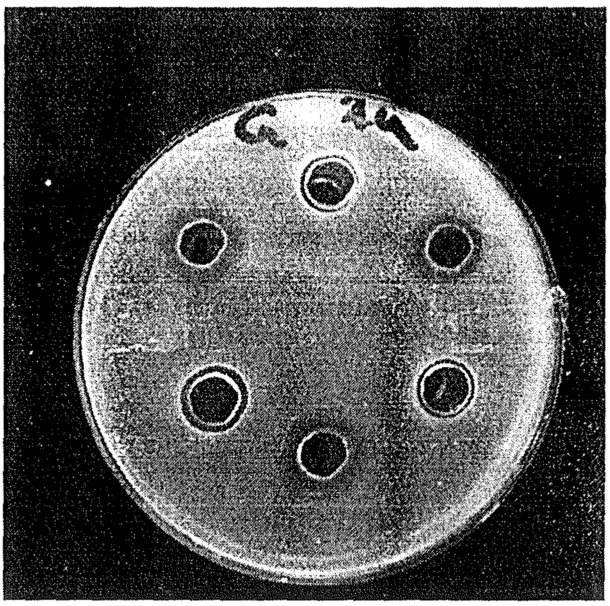
أظهرت النتائج أن لمركب الدايوسجنين فعل تثبيطي للبكتريا (الشكل D,C,B)، بدلالة ظهور مناطق تثبيط حول الحفر التي تحتوي الدايوسجنين في الأطباق الملقحة بالبكتريا (الجدول 3). ولوحظ أن الدايوسجنين ليس له فعل تثبيطي تجاه الفطريات (الشكل E) إذ لم تظهر مناطق تثبيطية في الأطباق الملقحة بخميرة *Saccharomyces cerevisiae* مقارنة بمضاد النستاتين باعتباره مضاد فطري(الجدول 3).



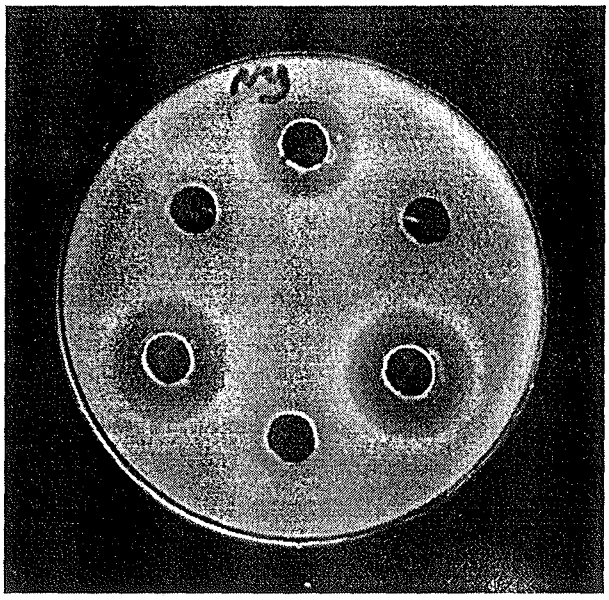
شكل (B)



شكل (C)



شكل (D)



شكل (E)

شكل (B) : مقارنة الدايوسجنين مع المضاد ارثرومايسين ، الحقول المؤشرة تمثل مناطق تقطير المضاد

شكل (C) : مقارنة الدايوسجنين مع المضاد نيومايسين ، الحقول المؤشرة تمثل مناطق تقطير المضاد

شكل (D) : مقارنة الدايوسجنين مع المضاد جنتامايسين ، الحقول المؤشرة تمثل مناطق تقطير المضاد

شكل (E) : مقارنة الدايوسجنين مع المضاد نستاتين ، الحقول المؤشرة تمثل مناطق تقطير المضاد

الجدول 3: معدل أقطار مناطق تثبيط النمو للعينات القياسية ولمركب الدايوسجنين

المضاد الحياتي (العينة القياسية)	(ملم) معدل قطر منطقة التثبيط			
	العينة القياسية	التركيز العالي للدايوسجنين	العينة القياسية	التركيز الواطئ للدايوسجنين
ارثرومايسين	19.2	12	19.8	11.7
نيومايسين	15.5	11.2	15.9	10.9
جنتامايسين	16.1	11.5	15.3	11.1
نستاتين	21.4	0.0	21.5	0.0

وبعد إجراء الحسابات اعتمادا على دساتير الأدوية الدولية المعتمدة تبين أن الفعالية التثبيطية للدايوسجنين بلغت 89.3 مايكروغرام/ ملغم مقارنة بالارثرومايسين، وبلغت 332.8 مايكروغرام /ملغم مقارنة بالنيومايسين . وكانت 421.3 مايكروغرام/ ملغم مقارنة بالجنتامايسين (جدول 4) وبذلك يكون معدل الفعالية التثبيطية للدايوسجنين 281.1 مايكروغرام/ ملغم.

الجدول4: فعالية المضادات الحياتية والحدود المسموح بها للفالية وفعالية الدايوسجنين

المضاد الحياتي (العينة القياسية)	فعالية المضادات المستخدمة في الدراسة	الحدود المسموح بها لفعالية المضاد	فعالية الدايوسجنين
ارثرومايسين	912 mcg/mg	لاتقل عن 610 mcg/mg	89.3 mcg/mg
نيومايسين	720 mcg/mg	لاتقل عن 680 mcg/mg	332.8 mcg/mg
جنتامايسين	690 mcg/mg	لاتقل عن 590 mcg/mg	421.3 mcg/mg
نستاتين	5218 IU/mg	لاتقل عن 4400IU/mg	0.0

تعرف المضادات الحياتية على أنها مركبات عضوية تنتج من قبل كائنات مجهريه تعمل على قتل أو إيقاف نمو كائنات مجهريه أخرى، غير أن هذا التعريف توسع ليشمل جميع المركبات الكيميائية التي لها نشاط مضاد للكائنات سواء أكانت هذه المركبات منتجة من قبل كائنات أخرى غير الكائنات المجهرية أو مركبات تم تصنيعها كيميائيا أو ناتجة من التلاعب

الكيميائي للبناء الحيوي لبعض المركبات. ولم يقتصر الفعل التثبيطي للمضادات على البكتريا والفطريات وإنما شمل الفيروسات والطفيليات [18] وتعرف قوة المضاد على قتل أو إيقاف نمو الكائن ألمجهري بالفعالية الحيوية Potancy وتقاس بوحدة مايكروغرام (mcg or µg) أو بوحدة الفعالية الدولية International Unit (IU) وهي مقدار الفعالية الموجودة في وزن معين من المضاد الحيوي [16،17] .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن لمركب الدايوسجنين فعل مضاد للبكتريا من خلال تثبيطه لنمو البكتريا في الأطباق الملقحة بها، وكون الدايوسجنين من المركبات الستيرويدية فان نشاط هذه المركبات المضاد للأحياء المهجرية أمكن إثباته في دراسات مختلفة [1،5] وتم قياس الفعالية الحيوية للدايوسجنين مقارنة مع مضادات بكتريا معروفة ومستخدمة في تركيب الأدوية. وبالرغم من أن فعالية الدايوسجنين، التي توصلت إليها هذه الدراسة هي اقل من الحدود المسموح بها لفعالية المضادات القياسية (الجدول 4) فان هذه القيمة يمكن استغلالها طبيا حيث أن المضادات المتداولة في المجال الطبي تظهر البكتريا تجاهها مقاومة باستمرارية تناولها والتداوي بها [18] . لذا تلجأ الدراسات والبحوث الحديثة لإيجاد مصادر جديدة للمضادات الحياتية [13،19]. وأن الدايوسجنين لم يظهر فعالية مضادة تجاه الفطريات ربما يعود ذلك كون الفطريات من الكائنات حقيقية النواة[1].

أن آليات التثبيط تتباين بين المضادات الحيوية إذ أن قسما منها يعمل على تثبيط بناء جدار الخلية أو بناء الأحماض الأمينية أو بناء البروتين كما هو الحال مع المضادات Erythromycin, Gentamycin, Neomycin [20] لذا يتوقع أن يكون تأثير الدايوسجنين على البكتريا إلى إحدى هذه الآليات. وإن فشل مضاد حيوي في تأثيره على الكائن ألمجهري يرجع إلى وجود حاجز تركيبي أو تشريحي يحول دون تفاعل هذا المضاد وتداخله مع مراكز تأثيره في الخلية وقد يعزى السبب إلى انعدام النظام الناقل المناسب لهذا المضاد في خلية الكائن ألمجهري ومن ثم فشله كمضاد حيوي[21] وهذا ربما يفسر فشل الدايوسجنين في تثبيطه للفطريات.

المصادر

1. Simons, V.; Morrissey, J.; Latijnhouwers, M.; Cleaver, M.; Yarrow, C. and Osbourn. A.. J. Antimicrobe Agents Chemoth. 50: 2732-2740 (2006).

2. الكاتب، يوسف منصور "تصنيف النباتات البذرية"، الطبعة الثانية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل (2002) .

3. Christen, P. *Trigonella* species: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 51 Medicinal and Aromatic Plant XII (ed. By T. Nagata and Y. Ebizuka) Springer-Verlag Berlin Heidlberg (2002).

4. مجيد، سامي هاشم ومحمود، مهند جميل "النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي". مطبعة دار الثورة، بغداد، العراق(1988).

5. Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. and Kamel, C. J. Dairy Sci. 89: 761-771(2006).

6. Wu, R. T.; Lin, W. J.; Chiang, H. C.; Horng, L. Y. and Chung, Y. M. J. Ocut. Pharm. 6: 301-311(1990)

7. Aquino, R.; Conti, C.; Desimone, F.; Orsi, , N.; Pizza, C. and Stein, M.L. J. Chemoth. 3: 305-309

8. Chiang, H. C.; Tseng, T. H.; Wang, C. F. and Kan, W. S. L. Anticancre Res, 11:1911-1917(1991).

9. Vast, V.; Grover, J. K. and Rothi, S. S. J. Ethnopharm. 79: 95-100 (2002).

10. Ahmadiani, A.; Javan, M.; Semnanian, S.; Barat, E. and Kamalinejad, M. J. Ethnopharm. 75: 283-286 (2001).

11. الملاح، مزاحم قاسم وسليمان، خضر داؤد مجلة التربية والعلم، 43: 51-54 (2000).

12. Sur, P.; Das, M,; Gomes, A.; Vedasiromoni, J. R.; Sahu, N.P.; Banerjee, S.; Sharma, R. M. and Ganguly, D. K. Phytoth. 15: 257-259 (2001).

13. Mustafa, E. A.; Al-Haliem, S. M. and Taha, M. Y. J. of Veterinary Sciences, 17: 137-148 (2003).

14. احمد، جاسم محمد ياسين التحول الوراثي في نباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* بواسطة بلازميد Ti وRi لبكتريا *Agrobacterium* . رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (2000).

15. Tepfer, D. A. and Tempe, J. Acad. Sci. Paris. Ser. III 292: 212-218 (1981).

16. United State Pharmacopoeia, 2000.

17. British Pharmacopoeia, 2005.

18. Greenwood, D.; Slack, R. and Peutherer, J. "Medical Microbiology", sixteenth edition. London (2002).
19. Leite, S.; Vieira, J.; Medeiros, P.; Leite, R.; Lima, V.; Xavier, H. and Lima, E. Based Complement Alternat Med 3: 261-265(2006).
20. Laurence, D.R.; Bennett, P. N. and Brown, M. J. "Clinical Pharmacology" 8th Ed Churchill Livingstone, London (1997).
21. الجبوري، محيميد مداالله "علم البكتريا الطبية". دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل(1990).