مقارنة تأثير العقار المنتج من عزلة محلية لبكتريا *Streptomyces sp.1* والادوية الكيمياوية في تثبيط نمو الطفيلي المصورة النشيطة *Plasmodium vivax* خارج الجسم الحي

أيهان رشيد محمود*   محمد عبد العزيز قادر *   نورية عبد الحسين **
* كلية الطب / جامعة كركوك
** معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحياتية / جامعة بغداد
Ayhan3gb@yahoo.com

تاريخ استلام البحث:2013/12/23   تاريخ قبول البحث:2014/3/30

الخلاصـة

اظهرت عزلة محلية من بكتريا الستربتومايسس*Streptomyces* sp.1 مقدرتها على انتاج مادة مضادة لطفيلي البرداء اذ سببت انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي وقد بلغت نسبة التثبيط خلال 24 و48 ساعة 60.90 و38.83% على التوالي. تمت تنقية المادة المضادة المنتجة من العزلة المحلية المنتخبة *Streptomyces* sp.1 باتباع الخطوات الاتية: الاستخلاص بخلات الاثيل ثم الميثانول وامراره من خلال عمود الترشيح الهلامي باستخدام السفادكس وهلام السليكا التي اسفرت عن مركب ذي لون بني وتم تسمية هذا المركب ب SAN 1.
اظهرت الادوية ومضادات الحيوية والمضاد SAN1 المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp1 المستخدمة في هذه الدراسة مقدرتها على تثبيط نمو الطفيلي *P .vivax* المنمى خارج الجسم الحي وكانت اعلى نسبة تثبيط عند اضافة 1000 مايكروغرام/ مليلتر من العقار trimethoprim والتي بلغت 87.55% ثم العقار chloroquine وprimaquine وchloramphenicol وtetracycline وstreptomycin والمضاد SAN1 المنتج في هذه الدراسة و rifamycin وerythromycin وampicillin وبنسب تثبيط 86.09 و83.81 و81.74 و78.83 و78.66 و78.42 و75.10 و74.27 و74.06% على التوالي.

الكلمات الدالة: الادوية الكيميائية، ستربتومايسس، المصورة النشيطة.

Comparison Between the Effect of Antimlarial Drug Produced by Local Isolate of Streptomyces Sp.1 and Chemical Drugs on Growth Inhibition of *Plasmodium Vivax in Vitro*

Ayhan Rashid Mahmoud   Mohammed Abdul-Aziz Kadir*   Nuria Abdul-Hussein***
** College of Medicine/ Kirkuk University.*
*** Genetic Engineering and Biotechnology Institute/University of Baghdad.*
Received date: 23/12/2013   Accepted date: 30/3/2014

Abstract

Local isolate of *Streptomyces sp.*1 showed ability to produce antimalarial activity against *P.vivax*, it caused a great reduction in the number of the parasite. The inhibition percentages during 24 and 48 hours were 60.90, 88.38 respectively. Purification of antimalarial agent produced by *Streptomyces sp.*1 was done by extraction with ethylacetate followed by methanol, and application of gel filtration (Sephadex LH-20, Silica gel column) which resulted in brownish compound. This compound named as SAN 1.
Drug, antibiotics and SAN1 inhibited the growth of *P. vivax in vitro.* The highest inhibition value (87.55%) was observed when 1000 μ g/ml of trimethoprim was added to cultural medium, followed by chloroquine, primaquine, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, SAN1, rifamycin, erythromycin, ampicillin with inhibition percent 86.09, 83.81, 81.74, 78.83, 78.66, 78.42, 75.10, 74.27 and 74.06% respectively.

Key words: chemical drugs, Streptomyces, *P. vivax*.

المقدمـة

البرداء (الملاريا) من الامراض التي تسببها الابتدائيات (Protozoa) وتنتج عن لسعة البعوضة، اذ ان انثى بعوض الانوفيلس تكيفت لنقل الطفيلي الى الانسان، وتصيب البرداء نصف سكان العالم حيث يموت سنوياً ما بين 1.5 – 2.7 مليون شخص نتيجة التأثيرات المرضية لاحد انواع جنس المصورة (Plasmodium) [1,2] ، ويشكل الاطفال اعلى نسبة وفيات، ثم تليها النساء الحوامل. ويبلغ عدد الاطفال المصابين بالمرض حوالي مليون طفل سنوياً، يموت واحد من كل 20 طفلاً في المناطق المتوطنة بالمرض خاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية [3,4].

تحدث البرداء عند الاصابة بواحد او اكثر من انواع الابتدائيات من جنس المصورة ويوجد اكثر من 100 نوع من الطفيليات التي تصيب الفقريات، اربعة منها فقط تصيب الانسان [5,6] وهي: المصورة النشيطة *Plasmodium vivax* المصورة المنجلية *Plasmodium falciparum*. المصورة البيضوية *Plasmodium ovale*. المصورة الوبالية *Plasmodium malariae* .

تعددت المواد المستخدمة لعلاج البرداء فقد استخدمت المستخلصات النباتية والمركبات الصناعية ومضادات الحياة المنتجة من الاحياء المجهرية. يستعمل العديد من مضادات الحيوية كمواد مضادة لطفيلي البرداء ومنها Trimethoprim وChloramphenicol وRifampicin وClindamycin وTetracyclin وErythromycin وغيرها [7,8]. واجريت العديد من الابحاث عن امكانية انتاج المواد المضادة لطفيلي البرداء من جنس الاكتينومايسيتات منها انتاج المركب Arteether من بكتريا Nocardia corallina (ATCC 19070) [9] وانتاج مشتقات العقار Artemisinin المضاد للبرداء من بكتريا S. lavendulae L-105 [10].

تعد البرداء من الامراض المتوطنة في العراق ولاسيما في الجزء الشمالي[6] ونظراً للاضرار الصحية التي تصاحب هذا المرض اجرينا هذه الدراسة التي تهدف الى:

انتاج مادة مضادة لطفيلي البرداء من عزلات محلية لبكتريا الستربتومايسس. تنقية المادة المضادة للبرداء المنتجة من بكتريا الستربتومايسس ومقارنة تأثير المادة المضادة لطفيلي البرداء والمنتجة من *Streptomyces sp*.1 مع الادوية المختلفة خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

مضادات الحيوية القياسية استخدمت مسحوق مضادات الحياة المنتجة من قبل شركة Sigma وهي Erythromycin وAmpicillin وRifamycin وStreptomycin و Gentamycin و Chloramphenicol كما استخدمت مضادات الحيوية Trimethoprim وTetracyline المنتجة من قبل مركز الرازي.

جمع نماذج الدم

تم تشخيص الطفيلي بجمع نماذج الدم من الاصبع الثالث للمريض البالغ ومن الابهام في حالة الاطفال الرضع. وعملت مسحات دم رقيقة وسميكة وتم صبغ الشرائح [11].

تنمية مزارع بكتريا الستربتومايسس

تم الحصول على العزلة المحلية من بكتريا *Streptomyces* sp.1 من معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحياتية/ جامعة بغداد. واستخدم وسط مرق التربتون ومستخلص الخميرة السائل (TYB لتنمية *Streptomyces* sp.1 . اتبعت طريقة[12] للكشف عن الفعالية الضد مايكروبية (طفيلي البرداء) في الاوساط السائلة.

فصل وتنقية المادة المضادة لطفيلي البرداء

تم اجراء خطوات التنقية التي تضمنت الاتي:

1- الاستخلاص بخلات الاثيل: تم استخلاص المادة المضادة لطفيلي البرداء بمزج راشح المزرعة الناتج من عملية النبذ المركزي مع خلات الاثيل بنسبة 2:1 .

2- **الاستخلاص بالميثانول:** تم اذابة النموذج المجفف في الخطوة السابقة في 4 مليلتر من الميثانول واجريت له عملية نبذ مركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لفصل الرائق عن الراسب. احتفظ بالرائق الحاوي على المادة المضادة واهمل الراسب .

3- الترشيح الهلامي

أ. الترشيح باستخدام هلام Sephadex LH-20: تم اضافة المستخلص الى قمة عمود هلام Sephadex LH-20 ذي ابعاد (1.6 × 45) سنتمتر واجريت عملية الترشيح الهلامي باستخدام الميثانول كوسط فصل وقد تم جمع الاجزاء المنفصلة وقدرت الفعالية المضادة في هذه الاجزاء لطفيلي البرداء *P. vivax*.

ب- الترشيح باستخدام هلام السليكا (Silica gel): استخدم عمود هلام السليكا ذو ابعاد (1.6 × 25) سنتمتر لغرض تنقية مضاد الحياة المنتج من العزلة المحلية *Streptomyces* sp.1 . بعد ان تم جمع الاجزاء المنفصلة من خطوة الترشيح الهلامي لعمود Sephadex LH-20 وتم تركيزها باستخدام المبخر الدوار استخدم المذيب ميثانول: كلوروفورم بنسبة 25:75 كوسط فصل وجمعت الاجزاء المنفصلة لتقدير الفعالية المضادة في هذه الاجزاء

تأثير مضادات البرداء ومضادات الحياة في نمو الطفيلي *P.vivax* خارج الجسم الحي.

تم زرع الطفيلي حسب ما هو موصوف بطريقة[13] و استعملت تراكيز مختلفة (25، 50، 100، 500، 1000) مايكروغرام/مليلتر، من مضادات البرداء (Chloroquine، Primaquine) ومضادات الحياة (Chloramphenicol، Ampicillin، Rifamycin، Streptomycin، Tetracycline، Trimethoprim، Erythromycin). مع استخدام مجموعة ضابطة من دون عقار.

تحضير التراكيز المختلفة من الادوية

سحقت حبة واحدة من عقار Chloroquine (الحاوي على تركيز 150 ملغرام) في هاون زجاجي واذيبت في 150 مليلتراً من الماء المقطر وبذلك اصبح التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر ومنه حضرت التراكيز الاخرى. اتبعت الطريقة نفسها لتحضير التراكيز المختلفة من الادوية الاخرى المستخدمة في هذه التجربة.

تأثير العقاقير الدوائية في طفيلي البرداء

تم دراسة تأثير العقاقير الدوائية في طفيلي البرداء بما يلي:

1- قدر العدد الكلي للطفيليات في 1000 كرية حمراء من الدم المصاب بطفيلي *P. vivax*.

2- استنبت الطفيلي في صفيحة بلاستيكية (Microtitration plates) تحتوي على 96 حفرة.

3- وضعت التراكيز المختلفة من العقار في الحفر مع مراعاة استخدام حفرتين متتالين لكل تركيز.

4- اضيف معلق الخلايا المصابة وغير المصابة في الوسط RPMI – 1640 الحاوي على مصل الدم AB^+ وبمقدار 50 مايكروليتراً لكل حفرة ومن ثم تعد الطفيليات في كل حفرة وذلك باجراء مسحة دموية سميكة.

5- حضنت الصفائح البلاستيكية في وعاء الحضن اللاهوائي مدة 48 ساعة على درجة حرارة 37م.

6- بعد مرور 24 ساعة من الحضن تم التخلص من الجزء الطافي من الحفرة بوساطة ماصة باستور واضيف 100 مايكروليتر من الوسط الحاوي على المصل ثم عملت مسحة سميكة وحسبت الطفيليات في الشريحة.

7-بعد مرور 48 ساعة ازيل الجزء الطافي بوساطة ماصة باستور وعملت مسحة سميكة وحسبت الطفيليات في الشريحة.

8- تم حساب نسبة تثبيط نمو الطفيلي بفعل العقار باستخدام المعادلة الاتية:

$$\text{نسبة تثبيط النمو} = \frac{\text{عدد الطفيليات المتبقي في الحفرة}}{\text{عدد الطفيليات في بداية التجربة}} \times 100$$

9. حضر العينة الضابطة حاوية على الطفيلي البرداء بدون اضافة اي مضاد الحياة.

التحليل الاحصائي

استخدم في تحليل النتائج طريقة تحليل التباين ANOVA و L.S.D لغرض التفريق بين المعدلات [14]

النتائج

تختلف الادوية المستعملة لعلاج البرداء في آلية عملها في اطوار طفيلي البرداء، اذ ان معرفة الطور الذي يتأثر اكثر بالعقار المستعمل يعطي فكرة عن آلية عمل هذا المركب، ويبين ايضاً الوقت اللازم لقتله خارج الجسم الحي فضلاً عن ذلك قد يساعد ذلك في توصيف وتمييز الادوية التي تعمل بسرعة في الجسم الحي.

في هذه الدراسة تم اختيار بعض المركبات والمضادات المستخدمة لعلاج البرداء ومقارنتها مع الفعالية التثبيطية للمادة المضادة المنتجة من العزلة المنتخبة *Streptomyces* sp.1 .

بينت النتائج (جدول1) ان العزلة *Streptomyces* sp. 1 لها القدرة على انتاج المادة المضادة للطفيلي اذ سببت انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي مقارنة بالعزلات الاخرى وقد بلغت نسبة التثبيط خلال 24 و 48 ساعة 60.99% و 88.38% على التوالي.

تتبين من نتائج عملية الاستخلاص ان المضاد يتركز في الجزء العضوي بعد ان تم اختبار اجزاء الاستخلاص على نمو طفيلي البرداء *P.vivax* خارج الجسم الحي، اذ اظهرت النتائج (جدول 2) وجود فروق معنوية بمستوى $P< 0.05$ في اعداد الطفيلي عند معاملتها بالجزء العضوي والمائي الناتج من عملية الاستخلاص خلال 24 و 48 ساعة بالمقارنة مع العينة الضابطة، فقد بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة التثبيط العام للطفيلي 74 (68.24%) و 200.5 (13.94%) على التوالي، اما عدد الطفيلي ونسبة التثبيط خلال 24 ساعة من معاملتها بالجزء العضوي فكان 125 (46.35%) و 23 (90.12%) على التوالي، في حين كان عند معاملتها بالجزء المائي 212 (9.01%) و 189 (18.80%) على التوالي.

اتضح من النتائج (جدول3) ظهور الفعالية في الاجزاء من 18–37، كما وتبين ان اعلى فعالية للمضاد كانت في الجزء 22 و30، اذ بلغ معدل التثبيط العام ونسبة التثبيط العام للطفيلي 42 (81.41%) و 37 و 22 (83.62%) على التوالي.

تبين من نتائج جدول (4) وجود فعالية مضادة لطفيلي البرداء *P. vivax* في الاجزاء 4–11 وبلغت اعلى فعالية في الجزء 9 الذي بلغ فيه معدل التثبيط العام نسبة التثبيط العام للطفيلي 45.5 (86.28%) .

بعد تنقية المادة المضادة المنتجة من بكتريا *Streptomyces* sp.1 وتسميتها بـSAN1 تم دراسة تأثيرها في تثبيط نمو الطفيلي *P.vivax* فقد تبين من نتائج الجدول 5 ان لهذه المادة قدرة على تثبيط نمو الطفيلي وبشكل معنوي بمستوى $P<0.001$ عند التراكيز المستخدمة كافة خلال 24 و48 ساعة، وقد اظهرت النتائج ان التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر له تأثير اكبر في تثبيط نمو الطفيلي مقارنة مع التراكيز الاخرى، اذ بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة التثبيط العام لنمو الطفيلي خارج الجسم الحي 52 (78.42%). كذلك سببت هذه المادة بالتراكيز كافة انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي خلال 48 ساعة بالمقارنة مع 24 ساعة. وقد اظهرت النتائج ايضاً ان لهذه المادة تأثيراً قاتلاً للاشكال الاميبية عند التراكيز 1000 و500 مايكروغرام/ مليلتر وللخلايا المولدة للامشاج عند التراكيز 1000 و 500 مايكروغرام/مليلتر .

يتضح من الجدول 5 ان لعقار Chloroquine فعالية مضادة لنمو الطفيلي *P.vivax* باشكاله كافة وبشكل معنوي بمستوى $P<0.01$ عند استعمال تراكيز مختلفة منه خلال 24 و48 ساعة مقارنة بالمجموعة الضابطة كما اظهرت النتائج ان التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر اعطى اعلى فعالية مضادة للطفيلي مقارنة مع التراكيز الاخرى اذ بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة التثبيط العام للطفيلي 33.5 (86.09%). كما تبين ان لهذا العقار فعالية تثبيطية اعلى للطفيلي

عند فترة الحضن 48 ساعة مقارنة بـ 24 ساعة وفي التراكيز كافة. واظهرت النتائج ايضاً ان لمركب الـ Chloroquine تأثيراً مثبطاً لكل اطوار الطفيلي ولكن كان له تأثير قاتل للطور الاميبي عند التراكيز 1000 و500 و100 مايكروغرام/ مليلتر والخلايا المولدة للامشاج عند التراكيز 1000 و500 و100 و50 مايكروغرام/ مليمتر.

اما تأثير المركب Primaquine في نمو طفيلي *P.vivax* خارج الجسم الحي فقد اظهر العقار كفاءة في تثبيط نمو الطفيلي، اذ اظهرت النتائج (جدول 5) انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي بشكل معنوي بمستوى P<0.01 عند استخدام تراكيز مختلفة من العقار Primaquine خلال 24 و48 ساعة مقارنة مع المجموعة الضابطة.

تمت ايضا دراسة تأثير بعض مضادات الحيوية على نمو الطفيلي *P.vivax* خارج الجسم الحي ومنها Ampicillin الذي سبب انخفاضاً في اعداد الطفيلي عند استخدام تراكيز مختلفة منه خلال 24 و48 ساعة بالمقارنة مع المجموعة الضابطة، وقد اظهر اعلى فعالية مضادة للطفيلي عند تركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر. اذ كان معدل التثبيط العام ونسبة تثبيط النمو العام للطفيلي 62.5 (74.06%) وقد اظهر هذا المضاد تأثيراً قاتلاً للخلايا المولدة للامشاج عند تراكيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر (جدول5).

استعمل مضاد Rifamycin وبتراكيز مختلفة لمعرفة تأثيره في نمو الطفيلي *P.vivax* خارج الجسم الحي اذ تبين من النتائج (جدول5) ان للمضاد تأثيراً تثبيطياً معنوياً بمستوى P<0.001 لنمو الطفيلي باشكاله كافة عند مختلف التراكيز خلال 24 و48 ساعة مقارنة مع المجموعة الضابطة. وقد اظهر التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر اعلى فعالية تثبيطية للطفيلي، اذ بلغ معدل ونسبة التثبيط العام للطفيلي 60 (75.10%) .

اما المضاد Chloramphenicol فقد اظهر تأثيراً تثبيطياً فعالاً للطفيلي *P.vivax* بالتراكيز المستعملة كافة وبشكل معنوي بمستوى P<0.001 مقارنة مع المجموعة الضابطة، وان التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر اعطى اعلى نسبة تثبيط لنمو الطفيلي اذ بلغ معدل ونسبة تثبيط النمو العام 44 (81.74%) (جدول5). كما اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بمستوى P<0.001 في اعداد الطفيلي خلال 24 و48 ساعة وبالتراكيز المستخدمة كافة. وقد تبين ان للمضاد Chloramphenicol تأثيراً مثبطاً لكل اطوار الطفيلي وان له تأثيراً قاتلاً في الخلايا المولدة للامشاج اذ ادى الى اختفائه من الوسط عند استخدام التراكيز 1000 و500 و100 مايكروغرام/مليلتر.

كان للمضاد Trimethoprim دوراً ايضاً في تثبيط نمو *P.vivax* خارج الجسم الحي وتبين ان له اعلى فعالية مضادة للمتصورة النشيطة بالمقارنة مع مضادات الحيوية الاخرى المستخدمة في هذه الدراسة، فقد اظهرت النتائج (جدول5) وجود فروق معنوية بمستوى P<0.001 في اعداد الطفيلي خلال 24 و 48 ساعة وبعلاقة عكسية مع تركيز العقار اذ كلما زاد التركيز انخفضت اعداد الطفيلي وبالعكس، فقد بلغ معدل التثبيط العام ونسبة التثبيط العام لنمو الطفيلي عند استخدام التراكيز 1000 و500 و100 و50 و25 مايكروغرام/ مليلتر كالتالي: 30 (87.55%) و45 (81.32%) و 65.5 (72.82%) و79 (67.21%) و94.5 (60.78%).

يتبين من الجدول ايضاً ان للمضاد فعالية تثبيطية لكل اطوار الطفيلي وكانت اعلاها في الطور الاميبي الذي اختفى عند استخدام التركيزين 1000 و500 مايكروغرام/ مليلتر والخلايا المولدة للامشاج التي ابيدت عند تراكيز 1000 و500 و100 و50 مايكروغرام/ مليلتر .

اما مضاد الحياة Erythromycin فقد لوحظ من خلال نتائج الدراسة في جدول (5) وجود فعالية تثبيطية للمضاد في نمو الطفيلي *P. vivax* خارج الجسم الحي مقارنة مع المجموعة الضابطة اذ تبين وجود فروق معنوية بمستوى P<0.01 في اعداد الطفيلي والتراكيز المختلفة من المضاد خلال 24 و48 ساعة. واظهرت النتائج ايضاً ان لهذا المضاد تأثيراً تثبيطياً لكل اطوار الطفيلي ولكن الخلايا المولدة للامشاج الذكرية كانت اكثر تأثراً في التراكيز 1000 و100 و50

مايكروغرام/ مليلتر التي ادت الى اختفائه فضلاً عن تأثيره القاتل للطور الاميبي عند استخدام التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر.

اما مضاد الحياة Streptomycin فقد اظهر ان له المقدرة على تثبيط نمو المصورة النشيطة خارج الجسم الحي، فقد تبين من نتائج جدول (5) وجود فروق معنوية بمستوى $P<0.01$ في اعداد الطفيلي عند مختلف التراكيز بالمقارنة مع المجموعة الضابطة، وكان للتركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر تأثير قاتل للخلايا المولدة للامشاج في الطفيلي فضلاً عن تأثيره التثبيطي الكبير على الطور الاميبي وكان معدل ونسبة تثبيط نمو الطفيلي العام 51.5 (78.66%). ويظهر ايضاً انخفاض اعداد الطفيلي بشكل كبير خلال 48 ساعة بالمقارنة مع 24 ساعة ولمختلف التراكيز.

اظهر مضاد الحياة Tetracycline فعالية مضادة للطفيلي *P. vivax* خارج الجسم الحي وكان تأثيره مشابهاً لمضاد الحياة Erythromycin . تبين من نتائج الجدول 5 وجود فروق معنوية بمستوى $P<0.01$ في اعداد الطفيلي عند استخدام تراكيز مختلفة من مضاد الحياة Tetracycline بالمقارنة مع المجموعة الضابطة، وان التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر اعطى فعالية مضادة للطفيلي مقارنة بالتراكيز الاخرى اذ بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة تثبيط النمو العام للطفيلي 51 (78.83%) وقد سبب هذا المضاد انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي خلال 24 و48 ساعة في التراكيز كافة. اظهرت النتائج ايضاً ان لهذا المضاد تأثير على اطوار الطفيلي كافة ولكن التأثير الاكبر كان في تثبيط نمو للخلايا المولدة للامشاج وبالتحديد الخلايا المولدة للامشاج الذكرية اذ اختفت هذه الاشكال من الوسط الزرعي في التراكيز 1000 و500 و100 و50 مايكروغرام/ مليلتر .

المناقشة

ان استخلاص مضادات الحياة من راشح المزرعة البكتيرية عادة يتم باستعمال مذيبات غير قابلة للذوبان مع الجزء المائي في الراشح البكتيري، وايضاً للتخلص من الشوائب الذائبة في الراشح [15].

يستعمل المذيب خلات الاثيل بشكل واسع في التحضيرات الصيدلانية، وقد استخدم هذا المذيب في استخلاص مضادات الحياة Indisocin و N-methylindisocin من بكتريا MG323-hF2 *Nocardia blackwellii* والمضاد 4181-A و 4181-B من راشح مزرعة بكتريا *S. griseus* والمضادات Athrocyclines التي تتضمن المضاد FCE21424(2) و FCE24366(3) و FCE24367(4) من بكتريا *S. peucetius* [16] .

استعملت مذيبات اخرى لاستخلاص مضادات الحيوية من بكتريا الستربتومايسس منها استعمال المذيب العضوي ميثانول وكلوريد المثيلين في استخلاص المضاد Rapamycin من مايسيليا بكتريا *S. hygroscopicus* [17]، واستعمل المذيب كلوريد المثيلين في استخلاص المضاد Macrodiolide من بكتريا *Streptomyces* sp. [18]

استعمل عمود الترشيح الهلامي لتنقية مضادات الحياة من قبل العديد من الباحثين، اذ اشار Hopwood and Chater [19] الى ان عمود هلام Sephadex LH-20 مناسب لتنقية مضادات الحيوية التي تتراوح اوزانها الجزيئية 100-1200 دالتون. كما استخدم هذا العمود من قبل [20] في تنقية مضاد الحياة Indisocin المعزول من بكتريا *Nocardia blackwelli* . بينما اشار [21] الى استعمال عمود الهلام Sephadex LH-20 في تنقية مضاد Eponemycin من بكتريا *S. hygroscopicus* بعد ان تم امراره في عمود هلام السليكا.

استعمل هلام السليكا (Silica gel) في تنقية مضادات الحياة Rapamycin المعزول من بكتريا *S. hygroscopicus* واستعمل في وسط الفصل احجام مختلفة من 15% اسيتون في الهكسان [22] . كما استخدم عمود هلام السليكا في فصل مضاد الحياة Sarubicin B من بكتريا *Streptomyces* JA2861 [23]. واستعمال هذا العمود

ايضاً في تنقية مضاد الحياة Macrodiolide وباستخدام وسط فصل كلوريد المثيلين + ايثر بتروليوم بنسبة 9:1 [18] كما ان لهذا العمود اهميته في تنقية مضاد الحيوية 4181-A و 4181-B من بكتريا *S. griseus* وباستعمال وسط الفصل ميثانول: كلوروفورم بنسبة 50:1 [24] . واستخدم ايضاً في فصل مضادات anthracyclines من بكتريا *S. peucetius* [16]، فضلاً عن استخدامه في تنقية مضاد Eponemycin المعزول من بكتريا *S. hygroscopics* ATCC 53709 بعد ان تم ترشيحه على عمود هلام Sephadex LH-20 [21].

ان للعقار الكلوروكوين تأثير علاجياً فعالاً للبرداء في المناطق الموبوءة بها اذ يعمل هذا العقار على قتل الاقسومات التي تتسرب من العضو الى الدم لبدء دورة لا جنسية جديدة كما ويحدد عدد الطفيليات في الدم في حالة الاصابة بالمصورة النشيطة [25] . يظهر من الجدول 5 ان لعقار Chloroquine دوراً تثبيطياً للاشكال الحلقية اذ انخفض عددها من 94 الى 3 خلال 48 ساعة وعند استعمال التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر وهذا يؤكد النتائج التي توصل اليها *Geary et al.*[26] من ان عقار Chloroquine يؤثر بشكل خاص في الاشكال الحلقية في المصورة المنجلية المنماة خارج الجسم الحي عند استعمال تراكيز مختلفة منه. وقد وجد ان الـ Chloroquine يمتص بسرعة وبصورة متكاملة من الجهاز المعدي – الامعائي ثم يتمركز في الانسجة وبالتحديد في لايسوسومات الخلية، اذ يمتلك العقار الفة متخصصة للانسجة المحتوية على صبغة الميلانين ويتركز ايضاً في الكريات الحمر المصابة وان تأثيره الفعال يصل بعد مرور 2-3 ساعات من تناول الجرعة الاولى 600 ملغرام وان هذا العقار يؤثر في كل الاطوار اللاجنسية للطفيلي عن طريق تركيزه في سايتوبلازم الطفيلي، اذ يمتلك مواقع ارتباط عالية الالفة مع المايتوكوندريا ويجمع صبغة Hemozoin في السايتوبلازم كما ويحطم دنا الطفيلي الى اجزاء صغيرة [27, 7]. وعلى الرغم من فعالية مركب Chloroquine العالية ضد طفيليات البرداء لوحظ انتشار تدريجي للمقاومة لهذا العقار منذ 1960 في انحاء مختلفة من العالم [28].

اظهر العقار اعلى فعالية مضادة للطفيلي عند تركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر اذ بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة التثبيط العام للطفيلي 39 (83.81%) . واظهر ايضاً انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي باشكاله كافة خلال 48 ساعة وبالتراكيز كافة مقارنة بالفترة 24 ساعة. وهذا ما اكده [27] الذي اشار الى ان لهذا العقار تأثيراً مثبطاً لكل اطوار الطفيلي، اذ يؤثر على المايتوكوندريا في المتغذيات (Trophozoites) ويعمل على تكون ثنيات (Whorls) متعددة في السايتوبلازم كما ويحطم النظام الانزيمي في المايتوكوندريا ويسبب تغيرات في الشبكة الاندوبلازمية ويوقف انقسام النواة في طور الاستوائي (Metaphase) ويمتص العقار بسرعة ويطرح بسرعة ويصل مستواه في البلازما الى القمة بعد الجرعة الاولى وله تأثيرات جانبية سامة اذ يسبب الاماً في المعدة وتحلل الدم. وقد وجد ان للـ Primaquine تأثيراً مضاداً ومثبطاً لنمو *P.vivax* و *P. falciparam* وباطواره اللاجنسية كافة في الدم ولكن باستخدام جرعات عالية منه اكثر من المقررة وانه مثبط للخلايا المولدة للامشاج (Gametocide) في كل انواع المتصورات التي تصيب الانسان ومضاد ايضا للاطوار المتأخرة في الطفيلي خارج الكرية الحمراء. كما ان الـ Primaquine يمنع عملية التنفس في مايتوكوندريا الطفيلي وبهذه الطريقة قد يؤثر في الاطوار الاولية والثانوية في الكبد وايضا على الاطوار الجنسية اذ يجعلها غير قادرة على التطور في البعوضة التي تتغذى على دم الاشخاص المعالجين بالعقار[7]. ولكن نظرا لتأثيراته الجانبية السامة فانه يستخدم لعلاج حالات الرجعات فقط (Relapses) في *P.vivax* و *P.ovale* .

اشار [26] الى ان اضافة العقار Primaquine الى طفيلي المصورة المنجلية المنمى خارج الجسم الحي ادى الى تثبيط نموه بنسبة 93.2% وهذه النسبة مقاربة لما توصلنا اليه في الدراسة الحالية التي كانت 94.19%.

تبين من النتائج ايضاً ان للمضاد Rifamycin تأثيراً قاتلاً للخلايا المولدة للامشاج عند التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر، اضافة الى تأثيره الفعال في طور المفلوق والاميبي اكثر من الحلقي وهذا ما اكده [26] الذي اشار ان مضاد الـ

Rifamycin يثبط انزيم RNA polymerase في الابتدائيات وفي المايتوكوندريا ويعمل بشكل اسرع في تثبيط نمو الاشكال الناضجة اكثر من الحلقية.

ان سبب انخفاض اعداد الطفيلي عند استخدام مضاد Chloramphenicol قد يعود الى تثبيط بناء البروتين في رايبوسومات المايتوكوندريا في الطفيلي في اثناء عملية الانقسام اللاجنسي للطفيلي التي تكون الاقسومات [26, 29].

وكان للتركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر تأثير قاتل للخلايا المولدة للامشاج في الطفيلي فضلاً عن تأثيره التثبيطي الكبير على الطور الاميبي وكان معدل ونسبة تثبيط نمو الطفيلي العام 51.5 (78.66%). ويظهر ايضاً انخفاض اعداد الطفيلي بشكل كبير خلال 48 ساعة بالمقارنة مع 24 ساعة ولمختلف التراكيز.

ان لهذا المضاد تأثيراً كتثبيط بناء البروتينات في الرايبوسومات 70S، فقد اشار [26] الى ان المضادات الامينوكلايكوسيدية لها فعالية تثبيطية للطفيلي اقل من مضادات الحيوية الاخرى

عند استخدام تراكيز مختلفة من مضاد الحياة Tetracycline بالمقارنة مع المجموعة الضابطة، وان التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر اعطى فعالية مضادة للطفيلي مقارنة بالتراكيز الاخرى اذ بلغ معدل تثبيط النمو العام ونسبة تثبيط النمو العام للطفيلي 51 (78.83%) وقد سبب هذا المضاد انخفاضاً كبيراً في اعداد الطفيلي خلال 24 و48 ساعة في التراكيز كافة. اظهرت النتائج ايضاً ان لهذا المضاد تأثير على اطوار الطفيلي كافة ولكن التأثير الاكبر كان في تثبيط نمو للخلايا المولدة للامشاج وبالتحديد الخلايا المولدة للامشاج الذكرية اذ اختفت هذه الاشكال من الوسط الزرعي في التراكيز 1000 و500 و100 و50 مايكروغرام/ مليلتر .

ان هذه النتائج تؤكد ما اشار اليه [7] من ان لمضاد Tetracycline تأثيراً قاتلاً للخلايا المولدة للامشاج في المصورة المنجلية المنماة خارج الجسم الحي واشاروا ايضاً ان لـ Tetracycline لا يسبب شفاءاً تاماً في المصورة النشيطة، كما ان للمضاد تأثيراً مضاداً على اطوار الطفيلي الاولية خارج الكرية الحمراء للانواع الاخرى من طفيليات البرداء اتي تصيب الانسان.

وقد وجد ان لمضاد الـ Tetracycline تأثيراً في تثبيط بناء البروتينات على الرايبوسومات نوع 80 S وان تأثيره المثبط يعود الى وجوده بنسبة عالية داخل الطفيلي فضلاً عن دوره كمادة كلابية للكالسيوم، فقد كانت الاقسومات الناتجة بعد معاملتها بالتتراسايكلينات تمتلك مايتوكوندريا ضعيفة او ناقصة وقد تم التوصل الى هذه النتيجة بمتابعة عملية بناء البروتين في المايتوكوندريا [26].

وقد اظهرت النتائج ايضاً ان لهذه المادة تأثيراً قاتلاً للاشكال الاميبية عند التراكيز 1000 و500 مايكروغرام/ مليلتر وللخلايا المولدة للامشاج عند التراكيز 1000 و 500 مايكروغرام/مليلتر.

ان التأثير التثبيطي للمادة المضادة المنتجة من العزلة المنتخبة *Streptomyces* sp.1 لطفيلي *P.vivax* قد يعود الى تأثيرها القاتل للمنقسمات (Merozoites) الناتجة من تحطم كريات الدم الحمر الحاوية على المفلوقات الامر الذي يؤدي الى منع اصابة المزيد من كريات الدم الحمر بهذه الطفيليات مسبباً بذلك انخفاض اعداد الطفيلي باشكاله كافة، اذ لوحظ تحلل الكريات الحاوية على الطور المفلوق واختفاء المفلوقات التي تحتويها عند معاملتها بالمادة المضادة المنتجة من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces* sp.1 .

نستنتج من هذه الدراسة ان المضاد SAN1 المنتج من العزلة *Streptomyces* sp.1 قد يكون مضاداً جديداً لانه يمتلك صفات مخالفة لصفات المضادات المستعملة في علاج البرداء. ونوصي استخدام طيف الكتلة (Mass Spectroscopy) وطيف الرنين المغناطيسي (Nuclear Magnatic Resonance) لاستكمال تشخيص المضاد SAN1 واستعمال الحيوانات المختبرية لمعرفة مدى صلاحية المادة المضادة قيد الدراسة للاستعمال البشري.

المصادر

[1] RBM. (2000). The African sumitt on roll back malaria. WHO/CDS/ RBM/ 2000. 17. WHO. Geneva.

[2] Clark, I.a.; Alleva, I.M.; Mills, AC., and Cowden, WB. (2004). Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. Clin. Microbiol. Rev., 17, 509- 39.

[3] Alnwick, D. (2000). Roll back malaria- what are the prospects? Bull. WHO. 78(12): 1377.

[4] Kotwal. RS; wenzel, RB; Sterling, RA; porter, WB;Jordan, NN; Petrucceeclli, BP. (2005). An outbreak of malaria in US army rangers returning from Afghanistan. JAMA, 2005, 293(2), 212-216.

[5] Fernandez, C. M. (2001). Malaria. Med. J. 2(6): 1-5.

[6] Kadir, MA. (2013). Common human parasites in Iraq. 1st edit. Ishtar Bureau, Baghdad, Iraq .

[7] Bruce- Chwatt, L. J.; Black, R. H.; Canfield, C. J.; Clyed, D. F.; Peters, W. and Wernsdorfer. (1986). Chemotherapy of malaria. 2nd ed. WHO. Geneva.

[8] Mehaffey, P. C.; Barrett, M. S.; Putnam, S. D. and Jones, R. N. (1995). Anti-gonococcal activity of 11 drugs used for therapy or prophylaxis of malaria. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 23 (1-2): 11-13.

[9] Lee, I. S.; Elsohly, H. N. and Hyfford, C. D. (1990). Metabolism studies of the antimalarial drug arteether. Pharm Res. 7(2): 199-203.

[10] Khalifa, S. I.; Baker, J. K.; Rogers, R. D.; Ferely, F. S. and Hufford, C. D. (1994). Microbiol and mammalian metabolism studies of the semisynthetic antimalarial, anhydro artemisinin. Pharm. Res. 11(7): 990-4.

[11] Reyburn, h.; Mbakilwa, H.; Mwangi, R.; Mwerinde, O.; Olomi, R.; Drakeley, C.; Whitty, C.J.M .(2007). Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomized trial. Brit. Med. J., 334:403-406.

[12] Wright, L. F. and Hopwood, D.A. (1976). Identification of the antibiotic determined by the SCPI plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 95: 96-106.

[13] Kadir, M. A., and Salman, Y.G. (1999). In vitro culture of Iraqi strain of *Plasmodium vivax*. J. Fac. Med. Baghdad. 41:316-324.

[14] Daniel, W.W. (2005). Biostatistics a foundation for analysis in the health sciences 8th . edit., Wiley and Sons, Inc. Georgia state, USA, 284 pp.

[15] Egorov, N. S. (1985). Antibiotic a scientific approach. Mir publishers Moscow.

[16] Cassinelli, G.; Arlandini, E.; Ballabio, M.; Bordoni, T.; Geroni, C.; Giuliani, F.; Grein, A.; Merli, S. and Rivola, G. (1990). New biosynthetic anthracyclines related to barminomycins incopporating barbiturates in their moiety. J. Antibiot. XLIII (1): 19-28.

[17] Vezina, C.; Kudelski, A. and Seghal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22, 989), anew antifungal antibiotic 1. Taxonomy of the active principle . J. Antibiot. XXVIII (10): 721-726.

[18] Jois, H. R. Y.; Sarker , A. and Gurusiddaiah, S. (1986). Antifungal macrodiolide from *Streptomyces* sp. Antimicrob. Agents. Chemother. 30: 458-464.

[19] Hopwood. D. A. and Chater, K. F. (1989). Genetic of bactorial diversity. Academic press. New York.

[20] Isshiki, K.; Takahashi, Y.; Okado, M.; Sawa, T.; Umezowa, H.; Naganawa, H.; Takita, T.; Hamada, M.; Yamamoto, M. and Tatsuta, K. (1987). A new antibiotic indisocin and N-methyl indisocin. J. Antibiot. XL(8): 1195-1198.

[21] Sugawara, K.; Hatori, M.; Nishiyama, Y.; Tomita, K.; Kamel, H.; Konishi, M. and Oki, T. (1990). Eponemycin, a new antibiotic active against B^{16} melanoma: production, isolation, structure and biological activity. J. Antibiot. XLIII(1): 8-18.

[22] Sehgal, S. N.; Baker, H. and Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22, 989), a new antifugal antibiotic 11- fermentation, isolation and characteri-zation. J. Antibiot. XXVIII(10): 727-732.

[23] Eckardt, K.; Tresselt, D.; Ihn, W.; Bradler, G. and Reinhardt, G. (1982). Sarubicin B, a new antibiotic, isolated from fermentation of broth of *Streptomyces* strain- J. Antibiot. XXXV(12): 1638-1640.

[24] Otani, T.; Yamawaki, I.; Matsumoto, H.; Minami, Y. and Yamada, Y. (1988). New antibiotics 4181-A and B from *Streptomyces griseus;* Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. J. Antibiot. XLI(3): 275-281.

[25] Philips, E. J. Keystone, J. S. and Kain, K. C. (1996). Failure of combined chloroquine and high dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Gyana, south America. Clin. Infect. Dis. 23: 1171-1175.

[26] Geary. T. G.; Divo, A. A. and Jensen, J. B. (1989). Stage specific actions of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* culture. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40(3): 240-244.

[27] Kreier, J. P. (1980). Malaria epidemiology, chemotherapy, morphology, and metabolism. Academic Press. London.

[28] WHO. (2000). Management of sever malaria. A practical handbook. 2nd ed. pp. 7-40.

[29] Ross, D. S.; Crawford, M. J.; Donald, R. G.; Kissinger, J. C.; Klimczak, L. J. and Striepen, B. (1999). Origin, targeting, and function of apicomplexan plastid. Current opinion in microbiology. 2: 426-432.