تأثير خام مركبات الصابونيين المعزولة من أوراق نبات السدر *Ziziphus spina-christi* في نمو بعض الفطريات الجلدية مختبرياً

م.م. محمد هاشم ياسر الموسوي كلية العلوم / جامعة ذي قار
م.م. حسام محمد كريدي كلية العلوم / جامعة ذي قار
م.م. عزت حسين مزعل كلية العلوم / جامعة ذي قار

المقدمة :- Introduction

من المعروف أن النباتات الطبية تطور مصادر الأدوية لأجل المعالجة الكيميائية المتنوعة ، إذ أن هذه النباتات تحوي كثير من النواتج الطبيعية التي يمكن أن تكون المصادر البديلة للعلاج (1) وهذا ما يعطي النواتج الطبيعية من النباتات الدور الكبير والمهم في برامج تطوير الأدوية وصناعتها (2) . وأجريت دراسات عديدة حول تأثير مستخلصات النباتات الطبية على الإحياء المجهرية خاصة الفطريات ، فقد وجد أن المستخلصات المائية لبعض النباتات الحاوية على مواد فعالة لها تأثير على فطريات جلدية مثل ***Trichophyton rubrum*** و ***Microsporum*** **spp.** (3) . كما وجد بأن المستخلصات المختلفة لنبات الميرمية لها تأثير على الفطر ***Trichophyton mentagrophyte*** (4) . ووجد بأن لمستخلصات أوراق نباتات الشوك ***Prosopis fracta*** وبقلة الملك ***Fumaria parviflora*** تأثير مثبط وقاتل للفطر ***Trichophyton mentagrophyte*** عند التركيز (20) ملغم / مل (5) . وثبت بأن لمستخلصات أوراق وبذور النيم ***A zadirachta indica*** تأثير مثبط وقاتل لمجموعة من الفطريات الجلدية (***Trichophyton mentagrophyte*** , ***T. rubrum***) إذ كان التركيز القاتل هو (31) ملغم / مل من مستخلصات بذور النبات (6) .

لذا تم اختيار نبات السدر (***Ziziphus spina-christi***) الذي يكثر في وسط وجنوب العراق (7 و8) والذي يحوي على مركبات الصابونيين التي هي عبارة عن مجموعة مركبات Steroidal alkaloid , Steroid , Glycosylated tritepenoid (9) التي لها تأثير مضاد للفطريات (10 ، 11 ، 12 ، 13) وهذه المركبات تحتوي على سلسلة صغيرة من السكريات في موقع C3 وفي الغالب تحوي السلسلة على خمس جزيئات من السكر الأحادي مثل glucose , arabinose . glucurnic acid , Xylose rhamnose (14) . فلذلك تم اختيار أنواع من الفطريات الجلدية Dermatophytes لاختبار فعالية مركبات الصابونيين المعزولة من أوراق نبات السدر ، إذ تهاجم هذه الفطريات الطبقات الكيراتينية السطحية للجلد والشعر والأظافر في الإنسان والحيوان . ومن الأجناس المسببة لهذه الإصابات هي ***Microsporum*** **sp** , ***Trichophyton*** **sp** إذ تسبب هذه الفطريات نوع من الالتهاب والاحمرار والتقيحات في منطقة الجلد وتساقط الشعر وتنخر أو خلع الأظافر وغيرها من الإصابات السطحية الأخرى (15) .

المواد وطرائق العمل :- Materials and Methods

- أو راق نبات السدر:- *Z.spina-christi*

جمعت أوراق نبات السدر في شهر كانون الثاني لعام 2005 في مدينة الناصرية / العراق ، وجففت بالهواء في مكان ظل وبعد جفافها طحنت بالمطحنة الكهربائية للحصول على مسحوق نباتي يستخدم في طريقة الاستخلاص (16) .

- الفطريات المرضية :-

تم الحصول على الفطريات المرضية من مختبرات جامعة البصرة كلية التربية / قسم علوم الحياة (الدراسات العليا) مشخصة ومنقاة ، ونشطت من خلال زرعها على وسط السابر ويد السائل (sabauroud broth) لأجراء الاختبار عليها (17) .

- طريقة استخلاص خام الصابونيين من النبات :- Extraction

أخذ(550) غرام من أوراق النبات المطحونة ووضعت في (600) مل من 70% Ethanol في درجة حرارة الغرفة لمدة (24)ساعة ثم ركز المحلول إلى حجم (150) مل وأستخلص مع الكلوروفورم(Chloroform) حجم (100) مل ثلاث مرات وبعد ذلك أستخلص المحلول الأصلي مع البيوتانول الاعتيادي حجم (100) مل ثلاث مرات أيضاً ، ثم

تركت طبقة البيوتانول حتى تجف للحصول على خام مركبات الصابونيين الموجودة في أوراق نبات السدر (14 و18) .

- الكشوفات الكيميائية عن مركبات الصابونيين :-

1- حضر محلول مائي من خام مركبات الصابونيين ثم رج حتى تتكون رغوة تبقى لفترة طويلة .
2- أخذ (5) مل من محلول مائي لخام مركبات الصابونيين وأضيف له (5) مل من محلول نترات الفضة الامونياكي ووضع في حمام مائي لمدة (5) دقائق وترك ليبرد وتتكون على السطح الداخلي لأنبوبة الاختبار المرآة الفضية وهذا دليل على وجود مركبات الصابونيين (19) .

قياس تثبيط نمو الفطريات :-

طريقة التخفيف مع الوسط ألزرعي :- Agar dilution

للحصول على التراكيز (7.5 و15 و30و60) ملغم/ مل تم إضافة (0.5 و1 و2و4) مل من خام مركبات الصابونيين بتركيز (300) ملغم / مل إلى أطباق زرعيه حاوية على (19.5 و19 و18 و16) مل من أكار السابرويد المعقم والمضاف له Chloroamphenicol (لمنع نمو البكتريا) بعدها مزج جيداً وترك فترة ليتصلب .
حضرت أقراص فطرية بقطر (5) ملم من مستعمرة فطرية بعمر (10) أيام باستخدام الثاقب الفليني ، ونقلت هذه الأقراص بواسطة إبرة معقمة إلى الإطباق المحضرة سابقاً حيث وضع القرص الفطري في منتصف الطبق وحضنت الإطباق بدرجة حرارة (28) مْ لحين اكتمال نمو الفطر في طبق السيطرة رقم (1) (لا يحتوي على أي مادة فقط الوسط ألزرعي) ، وطبق السيطرة رقم (2) يحوي على المضاد الفطري miconazole بتركيز (60) ملغم / مل (20) . أخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية وطبقت المعادلة التالية للحصول على نسب التثبيط (21) :-

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{معدل قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية النامية في أطباق المقارنة} - \text{معدل قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية النامية في أطباق المعاملة}}{\text{معدل قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية النامية في أطباق المقارنة}} \times 100$$

النتائج والناقشة :- Results and discussion

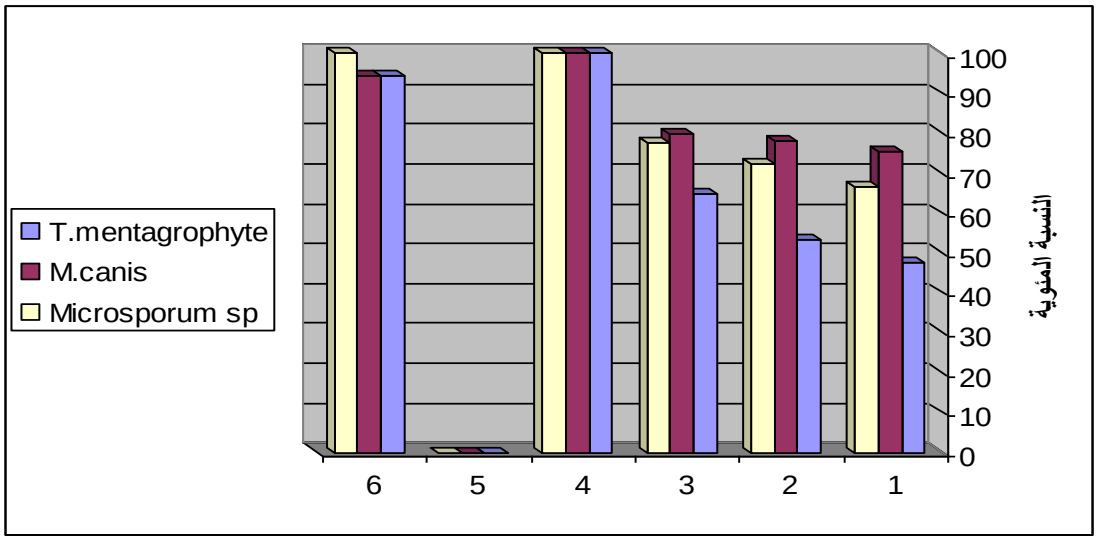
جمعت نتائج الاختبار بعد اكتمال نمو الفطريات في أطباق السيطرة رقم (1) فوجد أن أقطار المستعمرات في الإطباق الحاوية على تركيز (7.5) ملغم / مل هي (47 ، 22 ، 30) ملم للفطريات ***T.mentagrophyte* و *M.canis* و*Microsporum* sp** على التوالي بينما كانت أقطار نمو المستعمرات في تركيز(60) ملغم / مل هي (0.00) ملم لكل الفطريات المختبرة (جدول (1)). أي أن مستخلص خام الصابونيين ذو فعالية تثبيطية مقارنة مع المضاد الفطري miconazole بتركيز (60) ملغم / مل ، الذي أظهر أقطار نمو هي (5 و5 و0.00) ملم على التوالي بالنسبة للفطريات المختبرة . وكان التدرج التثبيطي واضح عند حساب النسب المئوية لتثبيط الفطريات (شكل (1)) .
وسبب التثبيط هو أن الميكانيكية الرئيسية لمركبات الصابونيين كمضاد للفطريات تعتمد على قدرة هذه المركبات على تكوين معقدات مع الـ sterols في غشاء الخلية الفطرية وفي هذه الحالة يفقد غشاء الخلية الفطرية سلامته (22 و23) ، وأن تجمع مركبات الصابونيين مع الـ sterols لتكوين هذه المعقدات يرجع إلى حدوث تداخل بين جزيئات السكر الموجودة في مركبات الصابونيين المرتبطة في موقع C3 وبذلك يفقد غشاء الخلية نفاذ يته ، ولوحظ أن إزالة سلسلة السكر الصغيرة oligosaccharides من الموقع C3 فأن مركب الصابونيين يفقد فعاليته البايلوجية (10 و12 و23 و25 و26) . وهذه النتائج تتطابق مع الكثير من البحوث المنشورة (10 و 27) .
ووجد أيضاً أن لمركبات الصابونيين القدرة على اختزال فعالية المركب fumarat والإنزيم succinate dehydrogenase في عضيه المايتوكوندريا(mitochondria) لبعض الإحياء المجهرية (28) .

جدول(1)معدل أقطار المستعمرات الفطرية النامية مع نسب التثبيط

تركيز المستخلص mg/ml	***T.mentagrophyte***		***M.canis***		***Microsporum* sp**	
	قطر النمو	**نسبة التثبيط**	**قطر النمو**	**نسبة التثبيط**	**قطر النمو**	**نسبة التثبيط**

66.6	30**a**	75.5	22**ab**	47.7	47**ab**	7.5
72.2	25**b**	78.3	19.5**bc**	53.3	42**b**	15
77.7	20**c**	80	18**c**	65	31.5**c**	30
100	0.00**d**	100	0.00**d**	100	0.00**d**	60
0.00	90**e**	0.00	90**e**	0.00	90**e**	Control (1)
100	0.00**f**	94.4	5**f**	94.4	5**f**	Control (2) Miconazole (60) mg/ml

*** المعدلات التي يتبعها نفس الحرف لاتختلف معنوياً (α 0.01)**



شكل رقم (1) النسب المئوية لتثبيط الفطريات بتراكيز مختلفة من خام الصابونيين

الأرقام بالمحور الأفقي ترمز إلى :-

1- المعاملة بتركيز 7.5 ملغم / مل
2- المعاملة بتركيز 15 ملغم / مل
3- المعاملة بتركيز 30 ملغم / مل
4- المعاملة بتركيز 60 ملغم / مل
5- السيطرة رقم (1)
5- السيطرة رقم (2)(إضافة المبيد)

References:-

1- AL-Rawi, A and Chakravarty, H.L. (1964) Medicinal plant of Iraq . 2nd. Ed. Ministry of Agriculture, Baghdad, p(98-99).

2- E. O., Farombi (2003)African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnology approach to the production of bioactive prophylactic agents . J. Biotechnology. Vol.2(12), pp.(662-671).

3- Maoz, M. and Neeman , I. (1998) Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsprum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species . Letters-in- Applied. Microbiology (U.K.).26(1):61-63.

4- الخفاجي ، باسمة ربيع احمد (2000) تأثير مستخلصات نباتات سم الفراخ والميرمية والصفصاف على نمو بعض الفطريات الجلدية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

5- التميمي ، رائد عادل حنون (2001) تأثير مستخلصات نباتي الشوك وبقلة الملك على بعض الممرضات البكتيرية والفطرية المسببة لأمراض جلدية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

6- Natarajan V, Venugopal PV, Menon T(2003) Effect of *azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophyte . J. Medical Microbiology. Official Publication of Indian.

7- Backer, J. ; Boris. R. ; Cate, B. ; Cordell, G. A. ; Soejarto, D.D. ;Cragg G.M. ; Gupta, M.P. Iwu, M.M. ; Madulid, D.R. and Tyler, G.A.(1995) Natural product drug discovery and development new perspective on international collaboration .J.Nat. prod. 58: 1325-1356.

8- Duke , J.A. and Ayensu, E.S. (1985) Medicinal plants of China .2:537-540 .

9- Hussian, S.M. and Kasim, M.H. (1975) Cultivated plants of Iraq . university of Mosusl . press, 275pp.

10- Hostettmann, K. A., and A. Marston (1995) Saponins chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge university Press, Cambridge. United Kingdom .

11- Osborne, A.E. (1996) Saponins and plant defense soap story . Trends plant Science . 1:4-9 .

12- Price, K.R. ; I. T. Johnson and G.R. Fenwick (1987) The chemistry and biological significance of saponins in food and feeding stuffs .J. food science . 26 : 27-133.

13- Morrissey , J.P. and A.E. Osborne (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as mechanism of pathogenesis .J. Microbial biologist . 63: 708-724 .

14- Ivan , K. ; D. Dincher ; G. H. Rentsch ; V. Dimitor and A. Ivanovo(2002) Two new sulfuted furostanl saponins from Tribulus terrestris .Zeitschrift Naturforsch. 57:33-38 .

15- K.J. Kown-chung and J.E. Bennett (1992) Medical mycology . London .

16- Bajwa , R . ; A . Khalid and T . S . Cheema(2003) Antifungal activity of some Allelopathic plant extracts III : growth Response of some pathogenic fungi to aqueous extracts of ***Parthenium hysterophorus*** . J . plant pathology 2(3) : 145-156.

17- A.G.,Lourenco ; M.G., Cardoso; J.E., Brasil ; P.E., Saoza and N.D., Filho(2003) Fungi toxic activity avaliation of Hexane and methanol extracts of copaiba plant leaves . Universidad Federal de Lavias (UFLA).

18- F. H. Reginatto , C. Jan ; D. Guillaume ; G. Geosmann and E. P. Schenkel (2001) Biochemistry Vol.12:32-36 .

19- Shihata, I.M. (1951) A pharmacological study of *anagllis arrensis* . Cairo university .

20- M. Nasser and R. Hassan (2005) Antifungal and antibacterial effects of *Nigella sativa* extracts against *Staphylococcus aurous, Pseudomonas aeroginosa* and *Candida albicans* .J. medical science. Vol. 21:47-52.

21- Rai, M.K. ; Qireshi, S. and Pandey, A.K. (1999)Invitro susceptibility of opportunistic *Fusarium* spp. To essential oils .J. mycosis. Vol.42:97-101.

22- Butty, P. ; Lebeca, J.C.; Matlic, M. and Bastide, J.M. (1995) Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs. J. Medicinal mycology. Vol. 33:403-409 .

23- Keukens, E.A.J. ; Vrije, C. ; Van den Boom, P. ; Waard,H.H. ; Plasmna, F. T. ; V., Chupin ; W.M.F.Jongen and B.de. Kruijff(1995) molecular basis of glycooalkaloid induced membrane disruption .Biochemistry .1240:216-228.

24- Nishikawa, M. ; S. Nojima ; T. Akiyama ; U. Sankawa and K.Inoue (1984) Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol .J. Biochemistry . 96:1231-1239.

25- Adday, M. ; Rashan, L.J. and Sulayman, K.D. (1989)Antimicrobial activity of different extracts from the seeds of penganum harmula . J. photochemistry . 4:363-366.

26- Roddick, J.G. and A.L.Rijnenberg (1987) Synergistic Between the potato glycoalkaloids -solanine and - chaconine in relation to lyses of phospholipids sterol liposomes .J. photochemistry. 26:1325-1328.

27- Mert-Turk, F. (2005) Saponins versus plant fungal pathogens. cell and molecular biology . 5:13-17.

28- R.L.,Juan ; M.Siliva ; M.S. Jose ; I. Laura ; G.L. Javier ; P. Jose ; V.Basilio and R. Luis (2004) Fungus- Elicited metabolites from plants as an Enriched source for new Leishmanicidal agents ; Antifungal phenyl-phenalenone phytoxalexins from the Banana plant (*Musa acuminate*) Target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes .Madrid .Spain .