فعالية المستخلصات القلويدية الخام لنبات عنب الذئب *Solanum nigram* في دنا البلازميد PBR322 المرحل في الهلام

محمد عباس فياض

قسم علوم الحياة، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد

الخلاصة

تم استخلاص أربعة مركبات قلويدية خام من ثمار وأوراق النبات المعروف محليا (عنب الذئب *Solanum nigram*) وبنظم مذيبات مختلفة. اختبرت فعاليتها في دنا البلازميد PBR322 باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي للهلام . أظهرت النتائج أن أثنين من تلك المستخلصات لها فعالية هضم كامل لقطع ألدنا والرنا للبلازميد ، وهضما جزئيا للمستخلصين الآخرين .يمكن أن تدل النتائج إلى إن لقلويدات هذا النوع فعالية بيولوجية مضادة للأورام، من خلال هضم قطع ألدنا واطئة الوزن الجزيئي ،فضلا عن فعاليتها كمواد مضادة للأحياء المجهرية التي تم التوصل إليها في دراسة سابقة للباحث .

المقدمة

على الرغم مما تتمتع به الأعشاب البرية للعائلة الباذنجانية Solanaceae family . من أهمية طبية وعلاجية أكدتها كتب التراث ونشريات البحث العلمي ، لمحتواها العالي من القلويدات والمواد الفعالة الأخرى ذات الفائدة العلاجية ،إلا أنها لم تحظ بدراسات علمية عقاقيرية مفصلة داخل القطر ،إذ شملت معظم الدراسات نباتات اقتصادية معروفة . ويمثل نبات عنب الذيب *S. nigram* أنموذجا عشبيا مهما للعائلة لأنه الأكثر انتشاراً في القطر ، ولفوائده الطبية ، ولقلة الدراسات العقاقيرية المفصلة في القطر حوله. فقد تم اختياره للدراسة .

نبات عنب الذئب *Solanum nigram* من الأعشاب الطبية الواسعة الانتشار في بلـدان العالم، ومنها وادي الرافدين، يصنف ضمن نباتات العائلـة الباذنجانيـة Solanaceae. يمتاز النبات بثمار طرية لبيه berry كروية خضراء قبل النضج تتحول إلى اللون الأسود الباذنجاني عند نضجها، بأبعاد (0.3×0.3) سم ،وتتجمع على شكل عناقيد (5–9) ثمـار، ومنها جاءت التسمية(1)،ينتشر في البساتين وحقول الطماطة بكثرة ،وغالبا ماتؤكل ثماره الطرية الناضجة من قبل الفلاحين من دون تأثير يذكر(2) ، في حين تعد ثماره الخضراء غير الناضجة سامة أحيانا(3)، (صورة رقم 1).

تشير المصادر إلى غزارة الأجزاء النباتية للجنس عموما ولهذا النوع خصوصا من المحتوى القلويدي alkaloids ومن النمط الستر ويدي steroidal alk. ومنها قلويـدات solanin,solamargen, solasoden, فضلا عن solanedien إلى جانب عديد مـن المركبات الكيميائية الأخرى (4)،(5).

أما الفعالية البيولوجيه لهذه المركبات، فقد ذكرت في كتب الأقـدمين الكثيـر مـن التأثيرات العلاجية لهذا النوع ،سواء استعمال النبات لوحده، أو مع نباتات، اومـع مـواد أخرى لعلاج الكثير من الأمراض الفسيولوجية أو الناتجة عن مـسبب مرضـي معـين ،جمعت معظمها في رسالة الباحث (6) ، ومنها ما دلت عليها تراثيات الطب القديم أن للنوع المعروف (عنب الذئب أو عنب الثعلب أحيانا أو بتسميات أخرى) فعالية ضد أورام الغدد المتورمة، ومنها الأورام الخبيثة cancers ،والقرح، والطفح الجلدي (7)، ولعـلاج الالتهابات، والأورام، والبواسير، ودهان للأنف، ولعلاج أمراض المعده، والكبد ،ومسكن ومخدر (8) ، إلا إن معظم الدراسات الحديثة قد أغفلت هذه الفعالية ولم نـتمكن إلا مـن الحصول الا على معلومات قليلة تنحصر معظمها في الإشارة إلى سمية النوع.

يعد هذا النوع حديثا ضمن الأعشاب الطبية المهمة لمنطقة الخليج العربي التي تعـالج الأمراض السرطانية، ومنها سرطان الثدي، والقولون، وأجزاء مـن القنـاة الهـضمية. ويعكف الباحثون الآن على استخلاص وتنقية مركباته القلويدية والستيرويدية والبروتينيـة في جامعة العين بدولة الإمارات العربية،ويوصى باستعماله في الطب البديل لمثـل هـذه الامراض (9). واكد ذلك Hartwell (10) من المعهد القومي لبحوث الـسرطان، اذ اوضح أن للعديد من أجناس العائلة الباذنجانية ومنها النوع *S.nigram* استعمالات

واسعة نباتات مضادة للسرطانات ، ومنها سرطان الثدي والمستقيم بشكل عصير نبـــاتي أو مستحضرات أو مسحوق . أما مجيد ومهند (11) فقد عـــزى الفعاليـــة المثبطـــة للأورام لهذا النوع إلى قلويد Solamargine .

أشارت بعض النشريات الحديثة إلى أن قلويدات النوع *S. tuberosum* تقلل من خطر الإصابة بأنواع مختلفة من السرطانات مثـــل: ســـرطان القولـــون، والمستقيم والمعدة، والمرئ، وأعـــضاء أخـــرى ، عنـــد تنـــاول كميـــات كبيـــرة مـــن البطاطا Hopkins(12)

اختبر المستخلص الميثانولي للثمار غير الناضجة Immature berries للنـــوع *S. nigram L.* من قبل *et al* Saijo (13) على خط الخلايا الجرثـــومي Cell line من نوع JTC – 26 Cervical cancer cells. وقـــد وجـــدوا أن ثلاثـــاً مـــن القلويـــدات الـــستيرويدية أعطـــت نتائجـــاً" ايجابيـــة لتثبـــيط الأورام، هـــي desgalactotigonin، و solamargine و solasonine عنـــد التركيـــز 15mug/ml .وفي اليابان توصل الباحثون (14) إلى أن اغلب مركبات الكلايكوسيدات المستخلصة من أنواع الجنس *Solanum* هي أكثر فاعلية من غيرها من المركبات فـــي التأثير المثبط لنوعين من خط الخلايا الجرثومي وهما HCT-116 وPC-12 مما يؤكـــد فعاليتها المضادة للأورام . ومع كل هذه الأهمية للمركبات القلويدية الـــستيرويدية ،إلا إن تطبيقاتها العلاجية دون الحد المطلوب سواء على مستوى الدراســـات داخـــل القطـــر أو خارجه .

ولأهمية المركبات التي تم الحصول عليها من الدراسة السابقة(6) وفعاليتها التثبيطية للأحياء المجهرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام التي تم التوصل إليها، فضلا عن أهمية القلويدات الستيرويدية في التطبيقات الصيدلانية والعلاجية ، وبنـــاء" علـــى التوصـــيات المقترحة، فقد أجريت هذه الدراسة الوراثية لهذه المركبات من خلال دراسة تأثيرها فـــي دنا بدائية النواة . وتعد مثل هذه الدراسات واحدة من الأساليب المعتمـــدة فـــي اختبـــار المركبات موادا" مضادة للأورام وخطـــوة" أولـــى نحـــو تطبيقهـــا فـــي خـــط الخلايـــا الجرثومي Cell line.ويعد ذلك هدفا رئيسا لهذا البحث .

المواد وطرائق العمل

مصدر المستخلصات القلويدية

تم الحصول على المستخلصات القلويدية الخام من الدراسة السابقة للباحث (6) ومن أوراق وثمار النبات وكما يأتي :

المستخلص الأول؛ و رمزله M1LI وحصل عليه من نقع أوراق النبات في نظام مذيب من Methanol+AceticAcid +D.W. وبنسب متساوية.ثم إكمال عملية الاستخلاص بالطريقة المبتكرة من قبل الباحث.

المستخلص الثاني؛ و رمز له M1LII وحصل عليه من نقع أوراق النبات في نظام مذيب من Chloroform+Methanol وبنسب متساوية أيضا.ثم أكملت عملية الاستخلاص بالطريقة نفسها.

المستخلص الثالث؛ و رمز لهM2Bc وحصل عليه من نقع ثمار النبات في مزيج من 90%Ethanol+2%Acetic Acid وأكملت خطوات الاستخلاص اعتمادا على طريقة Bhatnagar&Puri (15) المعتمدة في دستور الأعشاب الهندي (16)لاستخلاص وفصل قلويد السولاسودين Solasodine .

المستخلص الرابع؛ و رمز لهM3Lc وحصل عليه من نقع أوراق النبات و بخطوات طريقة المستخلص الثالث نفسه.

تم التحقق من جميع هذه المركبات على إنها مركبات قلويدية من إجراء الكشوفات المعتمدة لذلك وفقا لما ورد في Harboorn (17) و Harrison (18).

دراسة تأثير مركبات القلويدات الكلية في دنا بدائية النواة :

استعملت تقنية الترحيل الكهربائي في الهلام لمعرفة تأثير تركيز (0.5 mg/ml) من المستخلصات القلويدية الخام (الكلية) والمستخلصة بالطرائق M_1 , M_2 , M_3 لوارده أعلاه . على دنا بدائية النواة المتمثل بالبلازميد PBR322 ، المستخلص من بكتريا *E.coli* HB 101 الحاوية عليه والمستخلص بطريقة التحلل القاعدى الموصوفة من قبل (19) Sambrook *et. al.*.

الترحيل الكهربائي للدنا

1- حضر هلام الاكاروز Agarose Gel بتركيز 0.8% باستخدام دارئ TBE 1X ، مع إضافة 5مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم ، وصب في صفيحة مهيأة لهذا الغرض ، وعُملت حفر في الهلام باستخدام مشط Combخاص وهيأت وحدة الترحيل الكهربائي Electrophoresis unit باستخدام دارئ TBE 1X. وسطا" لأجل إتمام عملية الترحيل .

2- حضرت ستة أنابيب معقمة رقمت من1-6 . وضع في كل منها 10 مايكروليتر من دنا البلازميد PBR 322 .

3- أضيف 5 مايكروليتر (تركيز 0.5 ملغرام / مليلتر) من المستخلصات القلويدية الخام M_3Lc , M_2Bc , M_1L_{II} , M_1L_I إلى كل من الأنابيب 1 - 4 فيما أضيف إلى أنبوب السيطرة الموجبة 5 مايكروليتر من حامض الخليك 2% ، وترك أنبوب السيطرة السالبة من دون معاملة .

4- حضنت جميع الأنابيب بدرجة 37 ° م مدة ربع ساعة. ثم أضيف إلى جميع الأنابيب 5 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer .

5- حملت العينات في هلام الاكاروز المعد في الخطوة أعلاه ، رّحلت تحت فرق جهد 60 فولت مدة ساعة كاملة ثم فحص الهلام باستخدام جهاز الفحص بالأشعة فوق البنفسجية .U.V. Transilluminator لمعرفة تأثير المستخلصات في دنا البلازميد.

النتائج والمناقشة

تبين أن دنا البلازميد غير المعامل يظهر بثلاثة أشكال فيزياوية هي الدنا الحلقي المفتوح Open Circular (OC), و الخطي Linear (L), والحلقي المغلق تساهميا closed Covalently circular (ccc)، فيما ظهر ألدنا الكروموسومي بشكل حزمة ضيقة تكاد تكون معدومة بالقرب من الحفرة . ويرجع ذلك إلى كفاية الطريقة المستعملة (Sambrook *et al.*, 19)فيما أظهرت نتائج معاملة البلازميد بالمستخلصات الخام ، هضما كاملا للدنا المعامل بـ (0.5 ملغرام / مليلتر) من المركبات M_1L_I و M_1L_{II} في

المسارين 1 و 2 على التوالي ، من خلال اختفاء جميع حزم الدنا نتيجة تكسرها وتحولها إلى قطع نيوكليوتيدات صغيرة ، فضلا الى اختفاء حزم الرنا RNA كذلك . أما الدنا البلازميدي المعامل بتركيز مماثل من المركبين M_2Bc و M_3Lc في المسارين 3 و 4 فقد تأثر بالهضم جزئيا والذي ظهر بشكل لطخـــة Smear على طول المسارين . في حين كان تأثير حامض الخليك بتركيز 2 % الذي استعمل في التجربة كسيطرة موجبة تأثيرا حفيفيا . (المسار 5) (صورة رقم2) .

إن هذه النتيجة يمكن أن تفسر على أساس إما تغاير الصيغ الجزيئية للمركبات القلويدية في المستخلصات الخام . أو أنها تشترك في مركب فعال واحد بالأقل تركيزه في المستخلصين M_1L_I و M_1L_{II} أعلى مما هو في المستخلصين الآخرين . كما يمكن أن يعزى الهضم الكامل للدنا والرنا بالمستخلصات إلى قابليتهـــا فـــي إحـــداث كـــسور فـــي الأواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية مع بعضها وفي العمـــود الفقـــري لجزيئة الدنا . ويمكن القول أيضا أن الفعل التثبيطي للأحياء المجهرية التي توصل إليـــه الباحث في (6) يمكن أن يعزى إلى هذه الفعالية من جهة ، كما تؤكد ماذكره Burdiek(20) من أن لبعض القلويدات الستيرويدية فعالية ضد الأحياء المجهريـــة مـــن خلال تأثيرها إما على الدنا أو على جدار الخلية من جهة أخرى، فضلا عن إرجاع الفعل المضاد لـــلأورام إلـــى قابليـــة المركبـــات القلويديـــة أو الكلايكوســـيدات فـــي أنـــواع الجنس *Solanum* على تحطيم الدنا الغريبة واطئة الوزن الجزيئي (13)و(14).

أماعن التطبيقات المختبرية لمثل هذه الطريقة فقد أشار Reynolds *et al*.,(21) إلى أن لبعض مضادات الأورام المنتجة من بكتريا *Streptomyceas* تأثيرا في الدنا ومنها الدنا البلازميدي PBR 322 من خلال ارتباطها بتتابعات معينة فـــي سلسلة ألدنا مما يؤدي إلى إحداث كسور فيه وعرقلة تضاعفه ، واعتمدت هذه الحقـــائق من قبل الكبيسي (22) في إثبات أن للمستخلص الخام لطحلب *Nitzchia palea* فعالية مضادة للأورام وبالتركيز 30 ملغرام / مليلتر، اذ أعطى فيه نتيجة مماثلة لمـــا أحدثه كلا المركبين M_1L_I و M_1L_{II}. ولم نعثر على تطبيق لمثل هذه الطريقـــة لأي من مركبات جنس *Solanum* أو البحوث التي تهتم بالنباتات الطبية ومركباتهـــا ســـواء على مستوى الدراسات داخل القطر اوالعالم .

ومن جهة أخرى ، يمكن أن نستنتج إن كفاية المركبات المفصولة بالطريقة الأولى M_1 أكثر فاعلية ضد الدنا البلازميدي من المركبات المفصولة بالطريقتين الثانية M_2 والثالثة M_3 . كما تعطي مؤشرا إلى تغاير هذه المركبات من الناحية الكيمياوية فضلا عن الحصيلة الكمية للمركبات التي كانت في الطريقة الأولى أكثر مما في الطريقتين الاخريين . كما يمكن أن يعزى فاعليتها ضد الإحياء المجهرية التي تم التوصل إليها إلى قابلية المركبات المفصولة بالطريقة M_1 بتأثيرها في دنا البكتريا مما يمنع نموها وتكاثرها . بينما لا يكون تأثيرها مماثلا للمركبات المفصولة بالطريقتين M_2 و M_3 اذ يتوقع تأثيرها في جدار الخلية من دون الدنا ،وقد يكون تركيز المركبات القلويدية المفصولة فيها اقل مما في الطريقة M1 .كما تدلل هذه الاستنتاجات الأهمية العقاقيرية للمواد التي تم الحصول عليها من هذا النبات وإمكانية الاستمرار في تطبيقاتها بهدف استغلالها موادا" أولية علاجية.

المصادر

1. السامرائي(1983) ، خلود وهيب عبود. توزيع القلويدات وأهميتها التصنيفية في بعض الأنواع البرية في العائلة الباذنجانية Solanaceae في العراق . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة بغداد .

2-Chakravarty, H.L.(1976) Plant Wealth of Iraq, (A. Dictionary of economic plants). Ministry of Agriculture and Agrarian Reform Baghdad, IRAQ. I, P 39-41.

3-Handa, Sukhder S.; Decpak Mundkinajeddu, G.V. R. Joseph; Shecla Joseph, and Gajendra Nager.(1999) Ajoint publication of Regional Research Laboratory and Indian Drug Manufacturers Association. India. II,P. 137-145.

4- Atta- ur- Rahman and M. Iqbol Choudhary.(1998), Copyrigh by Academic press .50. USA.178-191

5-Roddick, J.G.(1980) Isoprenoid Alkaloids – *Solanum* Alkaloids in 8.Secondary plant products, by E. A. Bell and B.V. Charl wood. Encyclopedia of plant physiology, Springier New York.

6-الدليمي،محمد عباس فياض(2003) استخلاص وتنقية مركبات من *Solanum nigrum L.* (Solanaceae) وتأثيراتها على الأحياء المجهرية المرضية .رسالة ماجستير كلية العلوم – جامعةبغداد .

7-Levey, Martin and Noury Al-Khaledy.(1967) The medical formulary of Al-Samargandi , University Pennsylvania press. USA.

8-Mahmood, U. Thakur, R.S. (1971) .Current research on medicinal and aromatic plants (11) , 54 – 150.

9-Amr Amin,Mohaned Mousa (2007).Review Article in Cancer Therapy .5 p55-66.

10-Hartwell, Jonvthan L., (1980) Plants used against cancer. Asurvey. Lioydia ,5 (2):204 – 238.

11-مجيد ، سامي هاشم ؛ مهند جميل محمود(1988) ، النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي . مجلس البحث العلمي . مركز بحوث علوم الحياة قسم العقاقير وتقييم الادوية .

12-Hopkins, J.(1995) . Food Chem. Toxicol. 33(4) : 323 – 339 .

13-Saijo –R.; Murakami- K.; Nohara-T.; Tominatsu T., and sato A.(1982) .J Pharm- Soc. Jap. Yakugakuzasshi 102 March, 300_305.

14-Tsugohi Ikeda,Hidetsugu Tsumagari, Takehiko Honbu and Toshihiro Nohara (2003). Kumamoto University.Biological & Pharmaceutical Bulletin , 26(8): 1198-1201 .

15-Bhathagar, J.K. and Ravinder K. Puri.(1974) . Lloyidia June 318 – 319

16-Handa, Sukhdev S., Decpak Mundkinajeddu and Anupam K. Mangal (1998) ,. Vol I. Ajoint publication of regional research laboratory and Indian Drug Manufacturers' Association. India. P 139 - 146

17-Harborn, J.B.(1973) Phytochemical methods. Chaphan and all ltd. London- New York pp 278.

18-Harrison, D.M.(1986) Steroidal alkaloids in *Solanum* sp. Not. Prod. Rep.3.443 – 450 .

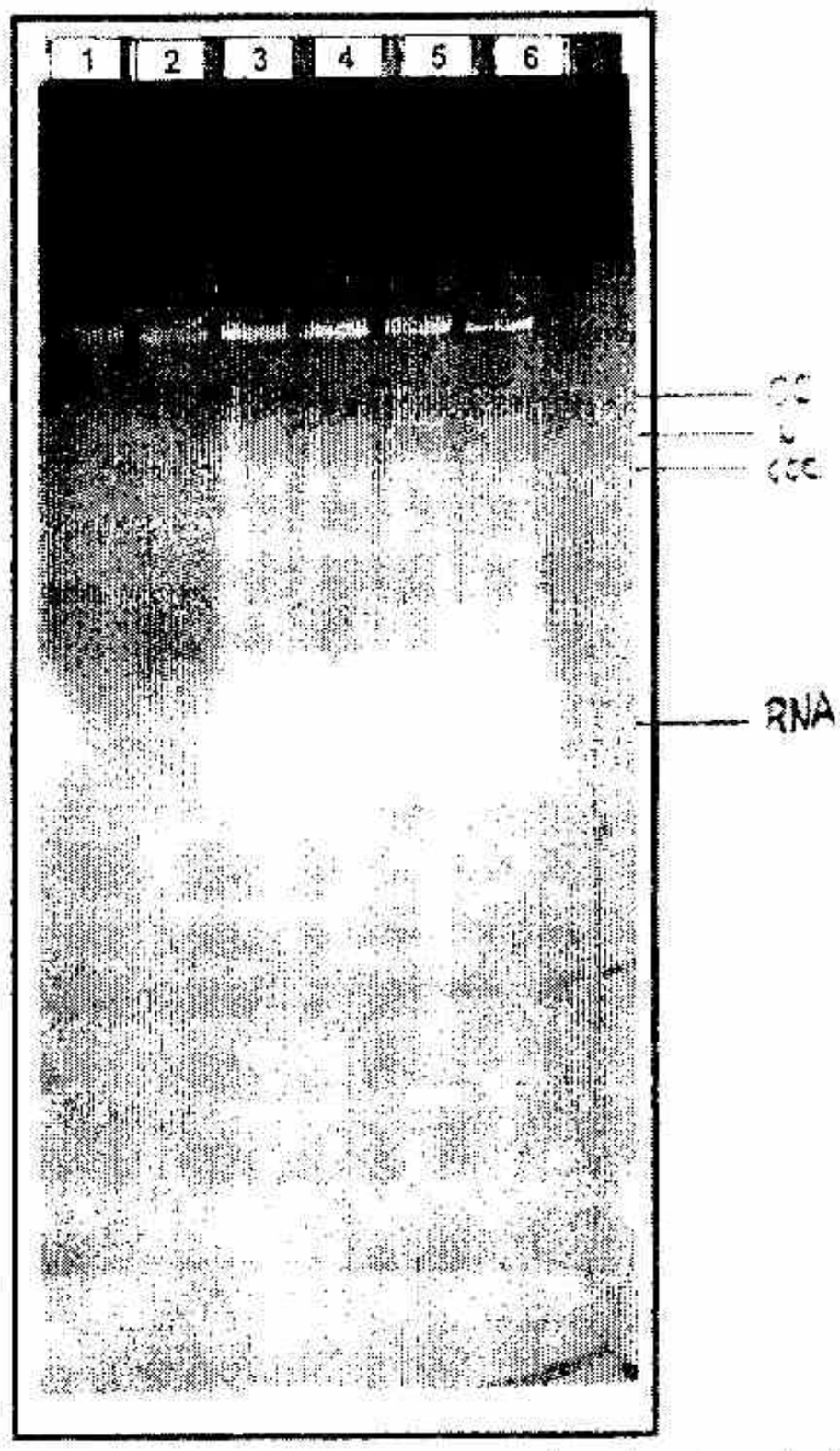
19-Sambrook. J., firt soh. E.F. and Maniatis T.(1989) Molecular cloning alabratory manual . Cold spring harbor (aboratory) cold spring harbor, New York.

20-Burdiek,E.M.(1971).Econ.Bot. 25:363-365.(1971)

21- Reynolds, V.L.; Molineux, I.J., Kaplan, D.J. ; Swenson, D.H. an Thakur. Hurley,L.H.(1985).Journal of BioChem.24:6228- 6237.

22- الكبيسي ، حارث كامل بنية(2001). الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي من الطحلب العصوي المحلي *Nitzschia palea* في السلالات البكتيرية . كلية العلوم- جامعة بغداد .

صورة رقم (1) توضح نموذجا طريا من النبات المعروف
(عنب الذئب *Solanum nigram*) توضح فيه الأجزاء الخضرية



صورة (2) الترحيل الكهربائي لدنا البلازميد PBR 322 المعزول من البكتريا القياسية

E. coli HB 101 موضحا تأثير المستخلصات القلويدية الخام عليه .

المسار (1) تأثير (0.5 ملغرام / ملبلتر) من المستخلص M_1L_I

المسار (2) تأثير (0.5 ملغرام / ملبلتر) من المستخلص M_1L_{II}

المسار (3) تأثير (0.5 ملغرام / ملبلتر) من المستخلص M_2Bc

المسار (4) تأثير (0.5 ملغرام / ملبلتر) من المستخلص M_3Lc

المسار (5) السيطرة الموجبة (2% حامض الخليك)

المسار (6) السيطرة السالبة للدنا البلازميدي بدون معاملة.

ملاحظة : تم تصوير العينة بعد 48 ساعة من إجراء عملية الترحيل . لتعذر تصويرها بعد انتهاء التجربة .

Effect of Alkaloids Extracts From *Solanum nigrum L.(Solanaceae)* in DNA -Plasmid PBR322 by Using Gel Electrophoresis

M. A. Fayidh
Department of Biology, College of Education, Ibn-AL-Haitham, University of Baghdad

Abstract

Four alkaloids compounds were extracted from the fruits and leaves, of plant known locally as (Anab Al-Thebe *Solanum nigram*), by various solvents systems, from an earlier study by the researcher. DNA tested its effect in plasmid PBR322 deportation method using Gel Electrophoresis. Results showed that two of those extract for full effectiveness digestible pieces of RNA and DNA plasmid, and digestive partly of the other alternatives. That could prove results indicate that this type of alkaloids consist of biological effectiveness of anti-tumors, through DNA digestion spare low molecular weight, as well as their effectiveness as antibacterial which had been found previously.