الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq

دراسة الفعالية البايولوجية لبعض مستخلصات أوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* L.

عبد الأمير عبد الله الموسوي علي عبود شريف لؤي حسين علي

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة البصرة

الخلاصة

اختبرت الفعالية التضادية لمستخلصات أوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* L. وتضمنت المستخلصات: مستخلص ميثانولي ٧٠% حار ومستخلص ايثانولي ٧٠% حار ومستخلص فلافونويدي ومستخلص الدهون الاساسية ومستخلص الزيوت الطيارة ، اختبرت تلك المستخلصات ضد نوعين من البكتريا وهي *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* . أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك تبايناً ملحوظاً بين فعالية تلك المستخلصات مع وجود أفضلية للمستخلص الفلافونيدي حيث اعطى قطر تثبيط (٢٦ملم) تجاه *E. coli* و(٢٨ ملم) تجاه *Staph. aureus* ، يليه المستخلص الايثانولي٧٠% الحارواعطى قطر تثبيط (١٣ملم) و(١٦ ملم)بالتتابع، ثم المستخلص الميثانولي ٧٠% الحار واعطى قطر تثبيط (١٠ملم) و(١٢ ملم)بالتتابع ، فيما لم يظهر مستخلص الدهون الاساسية ومستخلص الزيوت الطيارة اي فعالية . كما اختبرت الفعالية ضد السرطانية للمستخلص الفلافونيدي لأربع تراكيز(٢٥، ١٢,٥، ٦,٢٥، ٣,١٢٥ ملغم/مل) ولثلاث مكررات ضد خطين من الخلايا السرطانية هما HEP-2 (خلايا سرطان الحنجرة البشري) و AMN3 (خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأري) ، وبينت النتائج ان المستخلص الفلافونيدي لم يظهر أي فعالية ضد الخط(HEP-2) و الخط (AMN3) مقارنة بخط السيطرة ، كما وبينت نتائج الكشوفات النوعية لمكونات اوراق النبات انها تحتوي على فلافونويدات وتانينات وصابونين وفينولات وكاربوهيدرات، وعدم احتوائها على قلويدات وبروتينات.

الكلمات المفتاحية: نبات كف مريم، *Vitex agnus-castus* ، مستخلصات ، فلافونيدات.

المقدمة:

رغم التطور الهائل في علم الأدوية الكيماوية ورواجها وظهور أعداد كبيرة منها للعلاج إلا أن الفترة الماضية شهدت عودة إلى استخدام الإعشاب الطبية في علاج الإمراض كبدائل الطبيعية لأنها تمتلك العديد من الخصائص العلاجية المعروفة (Harborne and Baxter,1995). يعد نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* L. من النباتات الطبية المشهورة وتم اختياره في الدراسة الحالية لوفرته في البيئة العراقية المحلية وكونها من النباتات الطبية شائعة الاستخدام في الطب التقليدي،

وتركزت الدراسات السابقة في دراسة مكونات ثماره واختبار فعاليتها التثبيطية وأهملت بقية أجزاء النبات لذلك تركزت هذه الدراسة على دراسة المكونات الفعالة في أوراق النبات واختبار فعاليتها التثبيطية لاكتشاف خصائص علاجيةً. ونبات كف مريم شجيرة جميلة متساقطة الأوراق يمكن أن تنمو لحوالي ٦,٧ متر(١٠-٢٠ قدم)، وتنتشر على ضفاف الأنهار الرطبة في جنوب أوربا وبلدان المتوسط ووسط آسيا والشرق الأوسط، الأوراق بحجم كف اليد وتحتوي من خمس إلى سبع وريقات تشبه الأصابع ذات لون اخضر غامق لامعة من الأسفل، ويمتلك النبات مقاومة للجفاف وينمو سريعا ويأخذ منظراً بهيجاً عندما يكون الماء متوفراً. الأزهار بنفسجية اللون بشكل نورات عنقودية مركبة ذات رائحة عطرية يمكن أن تنمو لأكثر من ١٢ انج (٨-١٠سم). الجزء الطبي الأكثر استخداماً هو الثمار التي تشبه التوت ولها طعم الفلفل(Townsend *et al.*,١٩٨٠). يحتوي نبات كف مريم على عدة مكونات فعالة أهمها الفلافونيدات والكلايكوسيدات والتربنويدات (Dombek and Lawerence.,١٩٩٦). كما تحتوي الأوراق كميات كبيرة من الفلافونيدات اكثر من ٢,٧% مع زيت طيار تقريبا ١,٥% (Du Mee, 1993; Fleming,1998).

أظهرت بعض الدراسات أن مستخلصات النبات تحفز أطلاق هرمون Luteinizing (LH) ويثبط أطلاق الهرمون المحفز للجر يبات (Follicle Stimulating Hormone (FSH ويعمل على زيادة التبويض والخصوبة، وينظم عمل الغدة النخامية إذ يعتقد انه يحفز أنتاج هرمون البرولاكتين prolactin (Blumenthal.,١٩٩٨). ويعمل كمنظم، مقشع ، مقوي للكلية، يعالج رطوبة الطحال، منظم لتوازن هرمونات النساء ، يساعد على تسكين الآم الدورة الشهرية، يخفف من الآم انقطاع الطمث ويعمل على توازنها (Christie and ,.١٩٩٧ Walker) ، يقلل من أنتاج هرموني البروجسترون والاستروجين. وقد ورد أيضا بأنه يستخدم لإعادة المشيمة إلى طبيعتها بعد الولادة (Peirce,1999; McGuffin et al,.1997). كما يستخدم لإزالة حب الشباب في مرحلة المراهقة (Amann, 1967)، كما وصف بالطب الشعبي استخدامه كمساعد هضمي وبعض المركبات تمتلك فعلاً مضاد للالتهابات، وذات خواص مسكنة Analgesic properties (Christie and Walker,١٩٩٧ ; Newall *et al.*, 1996).

أن التأثيرات الجانبية تكاد تكون معدومة أو نادرة وتتمثل بصداع وزيادة بالجريان الطمثي عند الإناث(Amann ,1967). ميكانيكية التأثير وبعض مركباته المؤثرة لم تدرس سابقاً(Newall et al.,1996). بينت دراسة (Lal *et al.*,1985) على الرحم المعزول من الجرذان المختبريةأظهرت أن مستخلص نبات كف مريم يثبط الفعالية التلقائية للرحم ولا يظهر أي تأثيرات مضادة للإخصاب.تمكن (الاسدي وعبدالله، ٢٠٠٧) من عزل وتشخيص مركب فلافونيدي من ثمار نبات كف مريم ودراسة فعاليته التضادية، وبينت النتائج أن المركب أعطى فعالية عالية ضد نوعين من البكتريا.

هدفت الدراسة الحالية الى أختبارالفعالية التثبيطية لمستخلصات أوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* L. وتضمنت المستخلصات: مستخلص ميثانولي ٧٠% حار ومستخلص ايثانولي ٧٠% حار ومستخلص فلافونويدي ومستخلص الدهون الاساسية ومستخلص الزيوت الطيارة ، اختبرت تلك المستخلصات ضد نوعين من البكتريا

وهي *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*.

المواد وطرائق العمل:

١-الأنواع الجرثومية المستخدمة في الدراسة:

تم اختيار نوعين جرثوميين هما المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*الموجبة لصبغة كرام والايشيريشيا القولونية *Escherichia coli* السالبة لصبغة كرام. شخصت في مختبر أبحاث البكتريا/ قسم علوم الحياة /كلية التربية/ جامعة البصرة.

٢-جمع أوراق النبات :

جمعت أوراق نبات كف مريم من حدائق كلية التربية ، جامعة البصرة خلال شهري تشرين الأول وتشرين الثاني من العام ٢٠٠٨ ، بعدها غسلت الأوراق جيدا بالماء لإزالة كافة الأتربة والشوائب العالقة بها، ثم تركت لتجف في الظل مع التقليب المستمر لمنعها من التعفن، تم الحصول على مسحوق ناعم لأوراق النبات من خلال طحنها بوساطة مطحنة كهربائية.

٣-تحضير المستخلصات النباتية

أ. مستخلص الزيوت :

عزلت زيوت اوراق نبات كف مريم بطريقة الاستخلاص المستمر Soxhlet Continuous extraction، وبأستخدام الهكسان (n-hexane) كمذيب وذلك بأستخدام (١٠٠ غم) من مسحوق الاوراق الموضوعة في (Thumble) و ٥٠٠ مل من الهكسان حيث اجريت عملية الاستخلاص لمدة ٢٤ ساعة، بعدها ركز المحلول بواسطة جهاز المبخر الدوار (Rotary Evaporater)حيث فصل كل المذيب والحصول على زيت ذو لون بني غامق (Plummer , 1971).

ب .المستخلص الايثانولي والميثانولي ٧٠% :

مزج (٥٠) غم من مسحوق الاوراق المزال عنها الزيوت وفقاً للفقرة (أ) مع ٢٥٠ مل من الايثانول والميثانول المائي٧٠% واجريت عملية الاستخلاص الترجيعي Reflex للمحلول لمدة ١٦ ساعة، ومن ثم برد المحلول ورشح بواسطة اوراق ترشيح ، ثم ركز بواسطة المبخر الدوار الى حوالي ١٠ مل. ثم جفف المستخلص بوضعه في طبق بتري (Petri dish)، بعد ذلك تم جمعه ووضعه في قنينة معتمة لحين الاستخدام (Plummer , 1971).

ج .المستخلص الفلافونيدي:

مزج ٥٠ مل من مسحوق الاوراق المزال عنها الزيوت وفقاً للطريقة (أ) مع ٢٥٠ مل من الايثانول المائي ٧٠% واجريت له عملية الاستخلاص الترجيعي (Reflex) لمدة ١٦ ساعة، ثم برد المحلول ورشح بواسطة اوراق ترشيح ، ثم ركز المحلول الى حوالي ٥٠ مل بواسطة المبخر الدوار . وضع المحلول المتبقي في قمع فصل وتم استخلاصه بمذيب خلات الاثيل (٥٠ 3X ml)، بعدها جففت طبقة خلات الاثيل للحصول على الفلافونيدات (Harborne , 1984).

د. مستخلص الزيوت الطيارة:

تم عزل الزيوت الطيارة من العينة النباتية حسب طريقة (Farag *et al*., 1989) وذلك بمزج ٧٠ غرام من العينة مع ٧٥٠ مل من الماء المقطر في دورق سعته ٢ لتر وتم تحضير الزيوت بطريقة التقطير البخاري، تم بعدها جمع الزيت وفصله عن الماء باستخدام قمع فصل بواسطة n-Hexane وبخر بعدها المذيب باستخدام المبخر الدوار Rotary Evaporater وبدرجة حرارة ٤٠ درجة مئوية .

٤-الكشوفات النوعية :

أجريت مجموعة من الكشوفات النوعية للتعرف علـى المكونـات الكيميائيـة فـي مسـتخلص الاوراق الميثانولي ٧٠% :

١. **كشف القلويدات Alkaloid test** : تم الكشف عن القلويدات باستخدام الكواشف الاتية :

أ. كاشف دراكندروف Dragendroff Reagent تم إجراء الكشف حسب طريقة (Harborne , 1984) إذ أضيفت عدة قطرات من الكاشف إلى (١) مل من المستخلص ، وعند ظهور راسب برتقالي تعتبر النتيجة موجبة مما يدلل على وجود القلويدات.

ب. كاشف واكنر Wagner's Reagent : تم اجراء الكشف حسب طريقة (Tyler *et al* .,1988) اذ اضيفت عدة قطرات من الكاشف الى (١) مل من المستخلص ، عند ظهور عكورة تعتبر النتيجة موجبة يدلل على وجود القلويدات .

٢. **كشف الفلافونويدات Flavonoid's test** : تم اجراء الكشف حسب طريقة (Al-Kazraji , 1991) اذ أضيف (١) مل من الكاشف (هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي Ethanolic KOH [5N]) الى (١) مل من المستخلص ، عند ظهور راسب اصفر تعتبر النتيجة موجبة يدلل على وجود الفلافونويدات .

٣. **كشف العفصيات Tannins test** : تم إجراء الكشف حسب طريقة (Jawad , (1997) إذ أضيف (١) مل من خلات الرصاص المائية Lead acetate (1%) إلى (١) مل من المستخلص ، عند تكون راسب ابيض تعتبر النتيجة موجبة يدلل على وجود العفصيات .

٤. **كشف الفينولات Phenol's test** : تم اجراء الكشف حسب طريقة (Gayon , 1972) اذ اذيب (٠,١) غم من المستخلص في (١) مل من الماء المقطر وأضيفت له (١-٢) قطرة من محلول كلوريد الحديديك FeCl3 (١%) ، عند ظهور اللون الازرق او الاخضر تعتبر النتيجة موجبة يدلل على وجود الفينولات .

٥. **كشف الصابونين Saponin test** : تم اجراء الكشف حسب طريقة (Haddad , 1965) اذ أضيف (١) مل من كاشف كلوريد الزئبق المائي (٥%) الى (١) مل من المستخلص ، وعند تكون راسب ابيض تعتبر النتيجة موجبة يدلل على وجود الصابونينات .

٦. **كشف الكاربوهيدرات Carbohydrate test:** تم الكشف عن الكاربوهيدرات باستخدام كاشف مولش ، اذ مزج ١ مل من المستخلص مع ٥ قطرات من الفانفثول الكحولي في انبوبة اختبار وترج جيدا ويضاف بعد ذلك ٢,٥ مل من حامض الكبريتيك وعند تكون حلقة زرقاء تدل على وجود الكاربوهيدرات(Hawk et al., 1954).

٧. **كشف البروتين Protein test:** تم الكشف عن البروتينات باستخدام كشف بايوريت والذي يتكون من والذي من ٨٠% كبريتات النحاس مذابة بالماء المقطر و١ مل من ١٠% من هيدروكسيد الصوديوم مذاب الماء المقطر ثم يخلط ١ مل من المستخلص مع ١ مل من الكاشف وعند تكون اللون البنفسجي فانه يدل على وجود البروتينات (Harborn, 1973).

١. **الفعالية الإحيائية:**

١. **الفعالية ضد الجرثومية:** استخدمت طريقة الانتشار بالحفر حسب طريقة (Perez *et al*.,1990) وذلك لاختبار فعالية المستخلصات الثلاثة حيث صب ٢٠ مل من الوسط (Muller-Hinton agar) لكل طبق زجاجي قياس (9)سم ، ثم لقح الوسط ب(0.1)مل من عالق جرثومي حاوي على ١×١٠ ^{٦}خلية/مل وذلك باستخدام ناشر زجاجي معقم (spreader) ، تركت بعدها الأطباق لمدة(١٥-٣٠)دقيقة لحين الجفاف. بعدها عمل (٣) حفر لكل طبق

بقطر (٨) ملم لكل حفرة وذلك باستخدام ثاقب معدني معقم . تم إضافة (١٠٠) مايكروليتر من المستخلص لكل حفرة باستخدام ماصة دقيقة ذات أغطية محكمة.

٢. الفعالية ضد السرطانية:

٣. تهيئة خطوط الخلايا :

تم الحصول على نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية وهي الخط Hep-2 تمريره(٢٥٣) لخلايا سرطان الحنجرة البشري ، والخط AMN3 لخلايا سرطانه الغدة اللبنية ألفأري تمريره (٦٠) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية /الجامعة المستنصرية.

واجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة حسب طريقة (Freshney,1994) وكالاتي:

- أضيف(٢) مل من محلول التربسين–فرسين المحضر الى وعاء الزرع النسيجي حجم (٥٠) سم٣ الحاوي على الخلايا بعد تفريغه من الوسط الزرعي وغسله بمحلول (PBS) المعقم ، ثم حرك الوعاء برفق وحضنت الاطباق في الحاضنة بحرارة (٣٧)م لمدة (٥–١٠) دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجار الوعاء لحصول على خلايا منفردة.

- عدت الخلايا الحية على وفق (Freshney, 2000) لكل نوع من الخلايا بأستخدام صبغة التريبان الزرقاء(Trypan blue) ، اذا تأخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثوان مما يجعلها سهلة التمييز من الخلايا الحية ذات اللون البراق، ويتم ذلك بمزج (٠,٢) مل من الصبغة مع (١,٦) مل من (PBS).

- اضيف الى الوعاء الحاوي على الخلايا المفككة نحو (١٠) مل من وسط نمو جديد RPMI-1640 ، وتم تحريك الوعاء جيدا وبعدها افرغت محتويات الوعاء الحاوي على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا الى وعاء اخر جديد بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساويا بين الوعائين وبذلك تم الحصول على المزرعة الثانوية (Subculture or Passage).

- حضنت الاوعية بحرارة (٣٧)م بعد ان كتب عليها معلومات كاملة عن نوع الخلايا ورقم التمريرة الجديدة(New Passage) وتاريخ تكوين المزرعة الثانوية، وتمت متابعة اوعية الزرع النسيجي يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث، وان الخلايا بحلة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر مقلوب الطور(Inverted Microscope) . وعندما تصبح الخلايا ذات نمو جيد متمثل بتكوين طبقة احادية كاملة من الخلايا (Confluent monolayers) بذلك تكون الخلايا جاهزة للاستعمال في كل من فحص السمية الخلوية.

٤. اختبار السمية الخلوية للمستخلص الفلافونيدي في نمو الخطوط الخلوية السرطانية:

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة وعاء الزرع النسيجي حجم (٥٠) سم^{٢} بمحلول التربسين– فرسين، ثم اضيف له (٢٠) مل من الوسط الزرعي المزود بالمصل ، وقد تم مزج عالق الخلايا جيدا واخذ منه(٠,٢) مل بعد كل مزجة الى كل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي ذي القعر المسطح (96-Microtiter plates) باستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة، اذ احتوت كل حفرة على (1x١٠^{٥}خلية /مفردة)، ثم تمت ملاحظة تغطية سطح الطبق بورق لاصق شفاف معتم وحرك الطبق بلطف ليتجانس توزيع الخلايا في الحفر.

تركت الاطباق في الحاضنة بحرارة (٣٧)م لمدة تراوحت بين ١٢-١٨ ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر، واضيف (٠,٢) مل من التراكيز الاربع المحضرة انيا من المستخلص الفلافونيدي باستعمال الوسط الخالي من المصل (SFM) وهي (٢٥، ١٢,٥، ٦,٢٥، ٣,١٢٥ ملغم/مل) وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز . كما تم عمل ثلاث مكررات للسيطرة السالبة والتي اضيف لها (٠,٢) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (٣٧)م.

بعد مرور مدة التعرض (Exposure time) المحددة للحضن وحسب طريقة (Mckeehan *et al.*, 1977) اخرج الطبق من الحاضنة واضيف له (µl ٥٠) من صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة واعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة (٢٠) دقيقة، بعدها اخرج الطبق وازيلت محتوياته وغسلت بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة وتركت الخلايا لتجف (اذ ان الخلايا الميتة تأخذ الصبغة اما الحية فلا تأخذها)، قرأت النتائج بأستخدام جهاز المطياف الضوئي باطباق المعايرة الدقيقة عند طول موجي ٤٩٢ نانوميتر.

تم تحديد معدل تثبيط النمو للخلايا السرطانية على وفق المعادلة المشار اليها في ((Gao *et al*., 2003 من خلال تحويل قيم التأثير السمي للمستخلص الفلافونيدي لنبات كف مريم في الخطوط الخلوية السرطانية الى نسب مئوية وكالاتي:

Inhibition Rate(IR)%= (A-B/A) x 100

حيث ان:

IR : النسبة المئوية لمعدل التثبيط

A : الكثافة الضوئية للسيطرة

B : الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار

٣. النتائج :

3. 1 .نتائج التحليل الكيميائي

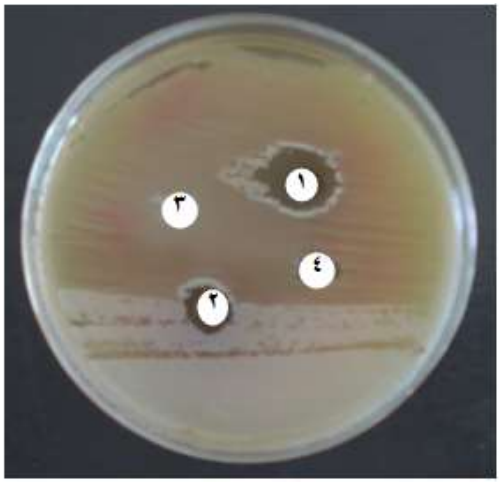
أظهرت نتائج التحليل النوعي الكيميائي الأولي لمستخلص أوراق نبات كف مريم احتوائها على مركبات فلافونيدية وتانينات وصابونين وفينولات وكابوهيدرات حيث أعطى الاختبار نتيجة موجبة ، فيما كانت نتيجة اختبار القلويدات والبروتينات سالبة (جدول١) .

الجدول (١) الاختبارات النوعية الكيميائية لمستخلص أوراق نبات كف مريم

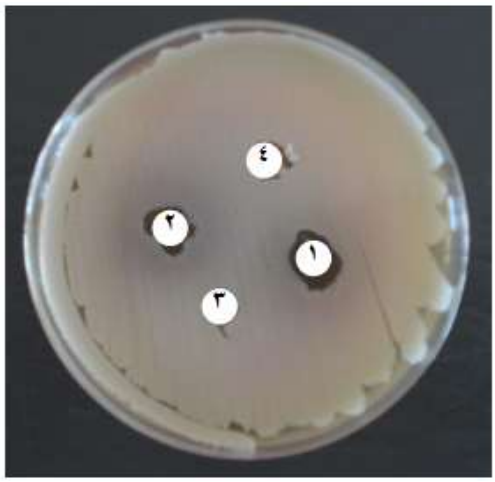
المستخلص الميثانولي ٧٠%	الكشوفات النوعية						
	القلويدات	الفلافونويدات	التانينات	الصابونين	الفينولات	البروتين	الكابوهيدرات
Vitex agnus-castus L	–	+	+	+	+	–	+

٣,٢. **نتائج الفعالية التثبيطية ضد الجرثومية:**

يتبين من نتائج الدراسة الحالية تفوق المستخلص الفلافونيدي لنبات *Vitex agnus-castus* تلاه الايثانولي ثم المستخلص فيما لم يبد مستخلصي الدهون الأساسية و الزيوت الطيارة أي فعالية تثبيطية (الشكل١،٢)(الجدول٢).



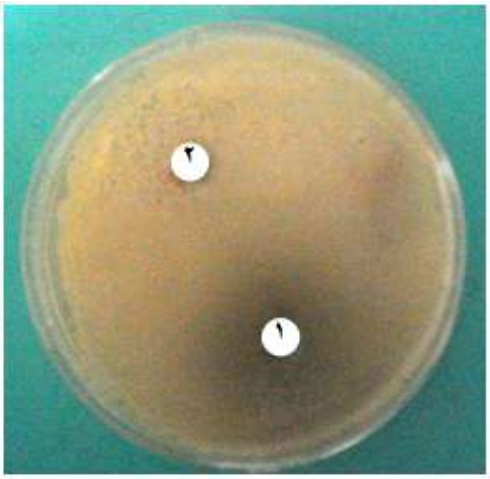
Staph. aureus



E. coli

الشكل (١) الفعاليةالتثبيطية ضد الجرثومية لمستخلصات نبات *Vitex agnus-castus* L.
١. مستخلص ايثانولي ٧٠% حار ٢. مستخلص ميثانولي ٧٠% حار
٣.مستخلص دهون اساسية ٤.مستخلص زيوت طيارة

Staph. aureus



E. coli

الشكل (٢) الفعالية ضد الجرثومية للمستخلص الفلافونيدي لنبات *Vitex agnus-castus* L.
١.المستخلص الفلافونيدي ٢.المذيب(ميثانول)

الجدول (٢) الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات *Vitex agnus-castus*

نوع المستخلص	قطر منطقة تثبيط الجراثيم (ملم)	
	E. coli	*Staph. aureus*
ميثانولي ٧٠ % حار	١٠	١٢
ايثانولي ٧٠ % حار	١٣	١٦
دهون	٠	٠
زيوت طيارة	٠	٠
فلافونويدي	٢٦	٢٨

٣,٣ . نتائج الفعالية ضد السرطانية:

يتبين من خلال نتائج الدراسة ضد السرطانية للمستخلص الفلافونيدي ضد خطين من الخلايا (AMN3 , Hep-2) ان جميع التراكيز المستخدمة للمستخلص لم تظهر أي فعالية تثبيطية للخلايا السرطانية للخطين المستخدمين في الدراسة (الجدولين٣و٤).

الجدول (٣) الامتصاصية الضوئية للمستخلص الفلافونيدي لنبات *Vitex agnus-castus* ضد خلايا Hep-2 السرطانية عند طول موجي٤٢٠ *نانوميتر*

المعاملة	مكرر١	مكرر٢	مكرر٣	المعدل
السيطرة	٠,٤٢١	٠,٤٢٤	٠,٤٠١	٠,٤١٥
التركيز١	٠,٥٨٠	١,٢١٩	٠,٥١٦	٠,٧٧١
التركيز٢	٠,٤٤٧	٠,٥٣٩	٠,٤٦٦	٠,٤٨٤
التركيز٣	٠,٤٢٨	٠,٤٢٠	٠,٥١٢	٠,٤٥٣
التركيز٤	٠,٣٣٧	٠,٣٥٨	٠,٦٨٧	٠,٤٦٠

الجدول (٤) الامتصاصية الضوئية للمستخلص الفلافونيدي لنبات *Vitex agnus-castus* ضد خلايا AMN3 السرطانية عند طول موجي٤٢٠ *نانوميتر*

المعاملة	مكرر١	مكرر٢	مكرر٣	المعدل
السيطرة	٠,٠٦٠	٠,٠٥٦	٠,٠٥٢	٠,٠٥٦
التركيز١	٠,٦٦٢	٠,٧٣٢	٠,٥١٨	٠,٦٣٧
التركيز٢	٠,٩٥٥	١,٠٣٤	٠,٦٠٦	٠,٨٦٥
التركيز٣	١,٠٣١	٠,٩٣٧	٠,٥٦٦	٠,٨٤٤
التركيز٤	٠,٦١٣	٠,٧٦٩	٠,٤٦٠	٠,٦١٤

المناقشة :

تبين من نتائج الدراسة الحالية ان المستخلص الكحولي (الميثانولي والايثانولي) والمستخلص الفلافونيدي لنبات *Vitex agnus-castus* اعطت فعالية تثبيطية مقارنة بمستخلص الدهون الاساسية ومستخلص الزيوت الطيارة (شكل ١،٢)(جدول٢).

ان كفاءة المستخلص الكحولي في تثبيط نمو الجراثيم تعود الى ان الكحول في الاستخلاص يعمل على ترسيب العديد من المركبات الفعالة حيوياً منها القلويدات والفلافونويدات والفينولات والتانينات (Eloff 1998 ,) ، وان كفاءته في استخلاص المركبات الفعالة يمكن ارجاعه الى قطبية المذيب التي تلعب دوراً هاماً في استخلاص بعض المركبات الفعالة دون غيرها مما يؤدي الى ترسيب اكبر كمية ممكنة من المركبات الفعالة اثناء الاستخلاص (Kelmanson *et al.*, 2000) . ومن خلال نتائج الفعالية التثبيطية ضد الجرثومية (الجدول ٢) يظهر أن بكتريا *S.aureu* الموجبة كانت أكثر تحسساً تجاه المستخلصات مقارنة ببكتريا *E.coli* السالبة وهذا يتفق مع العديد من الدراست السابقة Cosentino *et al.*, 1999; Karman *et al.*, 2003).

أن بكتريا *E.coli* السالبة لصبغة كرام تكون أكثر مقاومة للمركبات الفعالة مقارنة ببكتريا *Staph.aureus* الموجبة لصبغة كرام، لان الأولى تحتوي على الغلاف المكون من السكريات الدهنية المتعددة lipoplysaccharide يحيط بالغشاء الخلوي البكتيري (Ratledage and Wilkinson.,1988) وهذا يعطيها القابلية للحد من امتزاج المركبات النافرة للماء (hydrophobic Vaara, 1992).

أظهرت النتائج ان المستخلص الفلافونيدي ابدى فعالية قوية ضد جميع البكتريا المستخدمة في الدراسة حيث اعطى قطر تثبيط (٢٨ملم) تجاه بكتريا *Staph.aureus* و(٢٦ملم) تجاه بكتريا *E.coli* (شكل٢) (جدول٢) . فيما أظهرت نتائج فعالية المستخلص الفلافونيدي ضد خطوط الخلايا السرطانية ان المستخلص الفلافونيدي لم يظهر أي فعالية تثبيطية ضد خطي الخلايا السرطانية (Hep-2, AMN3) ولاربع تراكيز ولثلاث مكررات

مقارنة بخط السيطرة (خلايا سرطانية بدون معاملة) (جدول٤،٣).

فعالية المستخلص الفلافونويدي يمكن ان تعزى الى ان المركبات الفلافونويدية هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع الكاربوكسيل (COOH) ومجوعة او اكثر من مجاميع الهيدروكسيل وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة تلك المجاميع (Geiassman , 1963) . ان مجاميع الهيدروكسيل تمتلك القدرة على الارتباط مع المجاميع الفعالة لانزيمات الاحياء المجهرية بواسطة اواصر هيدروجينية (محمد ، ١٩٨٥؛ Reed , 1995 ;) ، وتعمل المجاميع الهيدروكسيلية كذلك على ترسيب البروتينات بسبب تكوينها اواصر هيدروجينية مع تلك البروتينات وبذلك تعمل على تثبيط انزيمات ضرورية في الكائنات المجهرية (Berkoff, 1998; Yamamoto and Gaynor,2006) ، وكذلك تعمل المركبات الفلافونويدية على تحطيم الغشاء الخلوي للخلية الجرثومية (Cowan , 1999) .

أكدت العديد من الدراسات بان المركبات الفلافونيدية تمتلك فعلا تثبيطيا قويا فهي تعد كمضادات للالتهابات والحساسية(Yamamoto and Gaynor,2006) وتمتلك فعلا مضاداً للميكروبات ، كما تعمل على تثبيط الالتهابات البكتيرية عن طريق تقليل أطلاق الوسائط الالتهابية والعمل على زيادة ثباتية الغشاء الخلوي (Berkoff, 1998).

المصادر:

محمد ، عبد العظيم كاظم (١٩٨٥) . علم فسلجة النبات ، الجزء الثاني ، مطبعة جامعة الموصل ، الموصل ، صفحة ١٩٦٩ .

Alassadi, I.J. and Abd-alla, Z.S.(2007). Isolation and identification of flavonoid compound from vitex aguns- castus L. seed and study of antibacterial activity.

Al-Kazraji,S.(1991) Biopharmacological study of Artemisia herba- alba. ,MSc.Thesis, college of pharma , university of Baghdad .

Amann W. [Improvement of acne vulgaris following therapy with agnus castus (Agnolyt)]. Ther Ggw 1967; 106:124-6.

Blumenthal M. The complete German Commission E monographs : therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council, 1998.

Christie S, Walker A.(1997). Vitex agnus castus, A review of its traditional and modern therapeutic use, current use from a survey of practitioners. Euro. J. Herb. Med., 3:29 -45.

Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. and Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in App. Microbiol., 29: 130-135.

Cowan , M. (1999) . Plant Products as Antimicrobial Agents . Clin. Microbiol. Rev. , 12: 564-582.

Czygan, F.C., Mayer, J.G. (2005) Vitex agnus ctuass L. der oder das keuschlamm. Ein kulturhistorischer essay [in german]. Accessed online at: http://www.Klostermedizin. de/html/moenchspfeffer.html.

Gayon , P. (1972) . Plant phenolics , 11th (ed.) , Oliver and Boye , Edinburge p. 254.

Geiassman , T. (1963) . Flavonoid compound , Tannins , Lignins and related compound , In . Florkin , M. and Stat , Z. Pyrrole pigments , isoprenoid compounds and phenolic plant constituents , Elsevier , New York .

Haddad , D. (1965) . The chemistry of vegetable drug . part 2 , Cairo Univ. press , Cairo , Egypt . pp. 127 .

Harborne , J. (1984) . Phytochemistry methods : a guide of modern teaching use of plant analysis 2th (ed.) , Chapman and Hill , New York , USA .

Jawad , A. (1997) . Ethnological studies in assessing the anti-aggressive effects of some Iraqi medical plants in laboratory mice .PhD.Thesis, Coll. Edu. Univ. Basrah .

Karman, I.; Sahin F.; Gulluce, M.; Ogutcu, H.; Sengul, M. and Adiguzel, A.(2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L. J. Ethnopharmacology, 85: 231-235.

Kelmanson , J. ; Jager , A. and Standen , J. (2000) . Zulu medicinal plants with antibacterial activity . J. Ethnopharmacol. , 69: 241-246 .

Lal R, Sankaranarayanan A, Mathur VS, Sharma PL.(1985). Antifertility and Oxytocic Activity of Vitex-Agnus-Castus Seeds in Female

Dombek C,(1998). ed. Lawerence Anonymous. Chaste Tree Review of Natural Products. St. Louis: Facts and Comparisons.

Du Mee C.(1993). Vitex agnus castus. Aust J. Med. Herbalism. 1993; 5:63-65.

Eloff , J. (1998) . Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial compounds from plants . J . Ethnopharm., 60: 1-8 .

Feeny , P. (1998) . Inhibitory effect of Oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by Trypine . J . Phytochem. , 8: 2119-2126 .

Fleming T. PDR for herbal medicines. Montvale, NJ: Medical Economics Company, Inc., 1998. Harborne , J. (1984) . Phyto chemistry methods : a guide of modern teaching use of plant analysis 2th (ed.) , Chapman and Hill , New York , USA .

Freshney, R. I.(1994). Culture of animal cells. A manual of basic technique . New York, pp.440.

Freshney, R. I.(2000). Culture of animal cells. A manual of basic technique (4^{th} ed).Wiley-liss, A Juhn Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, pp.566.

Geo, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H.(2003). Antiproliferative effect of octreotide on gastric cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroentrol .9:2362-5.

practical guide to natural medicines. New York: William Morrow and Company, Inc.

Plummer , D. (1971) . Introduction to practical biochemistry , McGraw Hill Book Co. LTD. , England pp. 186-190 .

Ratledage, C. and Wilkinson, S.G.(1988). An overview of microbial lipids. Microb. lip., 1:3-22.

Reed , J. (1995) . Nutritional toxicology of tannins and related poly phenols , J . Anim. Soc. , 7: 1511-1528 .

Schulz V, Hansel R, Tyler VE.(1997). Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine.Berlin, Springer, PP.306.

Tyler , V. ; Braady , L. and Robber , J. (1988) . Pharmacology . (19^{th} ed.) , Lea. And Febiger , USA .

Vaara, M.(1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev., 56:395-411.

Yamamoto and Gaynor .(2006).Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. 107: 135 – J.Clinic. Inves.. Ret.,08-30.

Albino Rats. Bulletin of Postgraduate Institute of Medical Education and Research Chandigarh, 19:44-47.

Martini,N.,D., Katerere ,D.R.P.,nd Eloff,J.N.(2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) ,J.Ethnopharmacology,93:207-212.

McGuffin M, Hobbs C, Upton R, Goldberg A.(1997). American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook. Boca Raton. New York: CRC Press, PP.231.

Mckeehan W. L.; Mckeehan, K.A.; Hammond, S.L. and Ham,R.G.(1977). Improved medium for clonal growth of human diploid cells at low concentration of serum protein . In vitro. 3:399-416 (cited by) Freshney (1994).

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD.(1996). Herbal medicines : a guide for health-care professionals. London: Pharmaceutical Press, PP. 296.

Peirce A.(1999). The American Pharmaceutical Association

Biological Activity of some Leaves Extracts of *Vitex agnus-castus* L.

Lauy Hussain Ali Ali Aboud Shareef A.A.AL-Mussawi

Biology department - College of Education - University of Basrah

Abstract

In this study, the antibacterial activity of some Leaves Extracts of (*Vitex agnus-castus* L.)were determinated against two species of bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aurous*, These extracts including hot ethanolic 70% extract , hot methanolic 70% extract flavonoid extract , oil extract and essential oils extracts , and the anticancer activity of flavonoid extract was evaluated against two cancer cell lines (HEP-2, AMN3).

The results showed that flavonoid extract exhibited best antibacterial activity followed by hot ethanolic 70% extract and hot methanolic 70% extract , while oil extract and essential oils extracts showed no antibacterial activity .

Anti cancer activity of flavonoid extract showed no anticancer activity against Hep-2and AMN3 cell lines for three concentrations (3.125,6.25,12,5,25 mg/l) in comparison with negative control. Moreover, a photochemical screening of the methanolic extract was revealed that presence of flavonoids,tannins,saponins,phenols,and carbohydrates and absence of proteins and alkaloids

Key words: Pharmaceutical activity , flavonoid, anticancer, antibacterial, vitex, extract