

التأثير المضاد للمستخلصين المائي والكحولي لنبات السعد على جرثومة
Actinobacillus actinomycetemcomitans

بلند حسام الدين عبدالله
غادة يونس عبد الرحمن
فرع العلوم الاساسية، كلية طب الاسنان - جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/6/15
تاريخ القبول 2005/8/16

ABSTRACT

This study includes the isolations and diagnoses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the patients with periodontal infections , isolation process has been done through using a selective medium named (Dentaid-1). Samples was cultivated anaerobically at 37°C for 48 hours. The aqueous and ethanolic extracts of the *Cyperus rotundus* plant were prepared and their inhibitory effect on the growth of these bacteria was carried on using the disk diffusion method. The results showed significant inhibitory effect on the growth of these bacteria at 50 , 100 and 200 mg /ml compared with tetracycline.

الخلاصة

تناول البحث عزل وتشخيص جرثومة *Actinobacillus actinomycetemcomitans* من المرضى المصابين بالتهابات ما حول السن باستخدام الوسط الانتقائي Dentaid-1 في ظروف لاهوائية اختيارية وكذلك تحضير المستخلصين المائي والكحولي من درنات نبات السعد ودراسة تأثيرهما المضاد لجرثومة *Actinobacillus actinomycetemconitans* المعزولة من التهابات ما حول الاسنان وبأستخدام طريقة الانتشار على الاطباق، وأوضحت النتائج حدوث تثبيط فعال على النمو الجرثومي عند التراكيز 100,50 و 200 مليغرام/سنتيمتر مكعب، وتمت مقارنة التأثير مع المضاد الحيوي التتراسايكلين لكون هذه الجراثيم حساسة له بنسبة 100% .

المقدمة

إن من أهم الصعوبات التي تواجه الطبيب المعالج للأمراض الجرثومية هي مقاومة هذه الجراثيم للعقاقير الطبية المضادة لها . والجرثوم المقاوم قد يكون موجوداً قبل الإصابة ، أي أن مقاومته للمضاد الحيوي المستخدم تكون مقاومة طبيعية ، أو قد تظهر هذه المقاومة أثناء الإصابة وتناول العلاج نتيجة حث المضاد الحيوي . وتعدّ مقاومة جرثومة *Acitnobacillus actinomycetemcomitans* للمضادات الحيوية من المشكلات المهمة التي يجب التصدي لها ، إذ يتوجب باستمرار تطوير الادوية وإنتاج أدوية جديدة لعلاج التهابات ما حول السن المتسببة عن هذه الجرثومة بدلاً من تلك المضادات التي تكون غير فعّالة أو انها فقدت فعاليتها تجاه هذه الجرثومة (1) ، وتمتلك جرثومة *A. Actinomycetecomitans* عدداً من العوامل التي تساعدها على المقاومة مثل امتلاكها للمحفظة ولعدد من آليات النقل الفعّال ، كما أنها قد تقاوم العوامل المناعية لجسم المضيف عن طريق بقائها داخل خلية المضيف ، فضلاً عن أن هذه الجرثومة تستطيع تكوين طبقة جرثومية سميكة مع عدد من أنواع الجراثيم الأخرى الموجودة معها من خلال التصاق سطوحها مع بعضها بعملية تسمى Coaggregation ، مما قد يوفر لها وسيلة دفاعية كذلك ، ويعدّ مركب LPS متعدد السكريات الدهني أحد المستقبلات التي تسهم في هذه العملية (2,3,4) . وهي عسويات دائرية *Coccobacilli* من نوع الجراثيم السالبة لصبغة كرام ، غير متحركة ، لا هوائية اختيارياً مكونة للابواغ و المحفظة (5). تنتمي الجرثومة إلى عائلة *Pasteurellacea* من جنس *Actinobacillus* (6) ولا يمكن تحديد البيئة أو الموطن الطبيعي لهذه الجرثومة ، لكن يعتقد أن المنطقة الواقعة تحت اللثة *Subgingival* داخل فم الإنسان وبقية الثدييات قد تكون البيئة الطبيعية لها . وعادة ما تكون الإصابة بهذه الجرثومة داخلية المنشأ *endogenous* (7) وقد تم التحري عن النباتات الطبية التي لها فعالية مضادة للجراثيم في عدد من الدراسات ، وأظهرت مجموعة من الدراسات امتلاك عدد من المستخلصات النباتية فعالية تشبيطية قوية مقارنة مع المضادات الحيوية القياسية (8,9) ولتجاوز المشكلات الناجمة عن المعالجة بالمضادات الحيوية وأثارها الجانبية الضارة بالإنسان ، عاد الاهتمام مجدداً بالبحث في الطبيعة عن نباتات تفيد في علاج أمراض الأسنان وما حولها من خلال التأثير في الجراثيم المعزولة من إصابات الفم (10). يعرف نبات السعد *Cyperus rotundus* بأنه عشب معمر يحتوي على درنات حرشفية مميزة مغلفة بشعيرات وتكون ذات شكل بيضوي أو مستطيل و تكون سيقان هذا النبات طويلة اسطوانية الشكل ملساء ومجوفة وذات زوايا ثلاثية

حادة بطول 60-150 سم تحمل أوراقاً كثيفة عند القاعدة وفي نهايات قمة هذه السيقان توجد سنيبلات أو عقيدات زهرية يتراوح عددها بين (3-9) سنيبلية غير متساوية بسيطة أو متفرعة تنتظم بشكل أشعة تشبه المظلة ، وتكون الجذور والدرنات عصارية وذات لون أبيض عندما تكون فتية و تصبح بلون أسود عندما تنضج(11) والأسم اللاتيني له هو : *Cyperus rotundus* وينتمي الى العائلة : السعدية *Cyperaceae* والاسم الإنكليزي (Nut grass) والجزء المستعمل طبياً هو الدرنات (12). وبعامه ، فإن هذا النبات شائع الاستعمال في الطب الشعبي اذ يستعمل مضاداً للالتهابات ومضاداً جرثومياً ، فضلاً عن استعماله أخرى كثيرة ، كما برهنت إحدى الدراسات على أن للمستخلص الكحولي لنبات السعد تأثيراً مضاداً للالتهابات Anti-inflammatory(13).

مواد و طرائق العمل

1-العزلات الجرثومية:

عزلت جرثومة *Actinobacillus actinomycetecomitans*

من منطقة ماحول اللثة لأشخاص مصابين بالتهاب اللثة وما حول الاسنان وتم باستخدام الوسط *denta-1* لغرض عزل و تشخيص هذه الجرثومة ، وهو وسط انتقائي يساعد على نمو جرثومة *A. actinomycetecomitans* ويثبط الأنواع الجرثومية الأخرى الموجودة معها وذلك لاحتوائه على المضاد الحيوي *vancomycin*، حيث زرعت العينات المأخوذة على هذا الوسط لغرض تأكيد تشخيص الجرثومة وحضنت في ظروف لاهوائية اختياريًا وفي درجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة (14)

2- تحضير مستخلصات نبات السعد *Preparation of Cyprus Extracts*

تم الحصول على درنات نبات السعد من السوق المحلية ، وبعد غسلها جيداً من الأتربة جففت في الهواء ، ثم طحنت ونخلت للتخلص من الجذور اللينة والشوائب . حضر المستخلص المائي *aqueous extract* لنبات السعد بمزج 40 غم من مسحوق النبات الجاف والمحضر مسبقاً مع 160سم³ من الماء المقطر المعقم أي بنسبة (1: 4) وزن : حجم، وترك المزيج في درجة حرارة الغرفة مدة أسبوع لغرض النقع ، رشح المزيج بعد ذلك من خلال عدة طبقات من الشاش ثم رشح بواسطة قمع بخنر وباستخدام ورقة الترشيح (Whatman No.1) مع التفريغ للتخلص من الأجزاء غير المسحوقة جيداً والألياف، وبذلك نكون قد حصلنا على المستخلص المائي الخام ، وحضر المستخلص الكحولي *ethanolic*

extract لنبات السعد بإضافة (40) غم من مسحوق النبات في (400) سم³ من الكحول الأيثلي بتركيز (95%) وبعد رج المزيج جيداً ترك في الثلاجة مدة أسبوع ، ثم رشح خلال قمع بخنز ، ووضع الراشح في الحاضنة وبدرجة حرارة لا تزيد عن 40°م إلى أن بخر جميع الإيثانول الموجود في المزيج ، اذ تكونت طبقة سميكة من المستخلص . أخذ غرام واحد من المستخلص المائي المحضر وأذيب في (5) سم³ من الماء المقطر المعقم ، وبذلك يكون لدينا مستخلص بنسبة 200 ملغم/سم³ بوصفه تركيزاً قياسياً ، عقم هذا المستخلص باستخدام المرشحات الغشائية Membrane filter 0.22µم لمنع مرور الجراثيم من خلاله وعدّ هذا المركز القياسي مصدراً لتحضير التخافيف اللاحقة والمستخدمة في هذا البحث وحضر المستخلص الكحولي بأخذ (1) غم من المستخلص النباتي المحضر وأذيب في (5) سم³ من الماء المقطر المعقم ، ثم عقم المزيج بطريقة البسترة بدرجة حرارة (62)م° مدة (10) دقائق ، ثم حضرت التخافيف المستخدمة من هذا المركز (15) واختبرت الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لنبات السعد على جرثومة *A. actinomycetemcomitans* وذلك باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص Disk diffusion method (Vandepitt; et; 1991) اذ نقلت (3-5) مستعمرات من الجرثومة إلى المحلول الملحي الفسلجي و ضبط مع الأنبوب الأول من أنابيب ماكفرلاند (10⁸ خلية / مل). ثم نشر المعلق الجرثومي على وسط الأكار المغذي باستعمال مسحة قطنية معقمة ، ثم تركت مدة (5) دقائق ، ولغرض بيان تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات السعد في نمو الجرثومة فقد حضرت أقراص من ورق الترشيح (Whatmann No-1) المشبعة بتركيز مختلفة من المستخلصين المائي والكحولي (50 ، 100 ، 200) ملغم/سم³، وتمّ ذلك بإضافة (0.1) مل من كل تركيز إلى قنينة حاوية ل (10) أقراص معقمة. ثم ثبتت الأقراص بواسطة ملفظ معقم وحضنت في درجة 37°م مدة 24 ساعة تحت ظروف لا هوائية ، بعد ذلك قيس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص ، وقد استخدم المضاد الحيوي Tetracyclin بوصفه عينة سيطرة ، أستخدم اختبار (F) الإحصائي وهو اختبار إحصائي عام لبيان فعالية التراكيز المختلفة في تثبيط الجرثومة بصورة عامة ، كما استخدم الاختبار الإحصائي دنكن Duncan للمقارنة بين تأثير التراكيز المختلفة للمستخلصين المائي والكحولي لبيان أي من التراكيز المستخدمة أكثر فعالية في التثبيط.

النتائج والمناقشة

تم عزل خمسة عشرة عزلة من جرثومة *A. actinomycetemcomitans* والتي استخدمت لاجراء اختبار التأثير التثبيطي للمستخلصين المائي والكحولي لنبات السعد وباستخدام

طريقة الانتشار بلاقراص واطهر الأختبار تأثيراً متابياً ، واختلف هذا التأثير حسب نوع المستخلص والتراكيز المستخدمة . ويبين الجدول -1 النسب المئوية لعزلات *A. actinomycetemcomitans* الحساسة والمتوسطة الحساسية والمقاومة للتراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي والمائي لنبات السعد قياساً على المضاد الحيوي Tetracyclin الذي استخدم مضاداً حيوياً قياسياً للمقارنة ، كما توضح الصورة -1 أقطار التثبيط لتراكيز المستخلص الكحولي حول الأقراص قياساً على قطر التثبيط لقرص المضاد (T) Tetracyclin والصورة -2 توضح ذلك بالنسبة للمستخلص المائي ايضاً.

ويتبين من خلال النتائج أن المستخلص الكحولي قد أظهر تأثيراً تثبيطياً قوياً في نمو جرثومة *A. actinomycetemcomitans* مقارنةً بالمضاد الحيوي القياسي Tetracyclin وكان أعلى تثبيط لهذا المستخلص عند التركيز (200) ملغم/سم³ إذ أثر في عزلات الجرثومة بنسبة (100%)، وقد أبدى التركيزان الأخيرين (100 ، 50) ملغم/سم³ فعالية جيدة في التثبيط كذلك ، وتعود هذه الفعالية للمركبات الذائبة في الماء والموجودة في المستخلص ، كما أن المستخلص المائي أظهر كذلك فعالية تثبيطية مؤثرة وقوية في نمو الجرثومة ، وكان أعلى تثبيط قد حصل عند التركيز (200) ملغم/سم³ ثم يليه التركيز (100) ملغم/سم³ ، أما تأثير المستخلص المائي عند التركيز (50) ملغم/سم³ فقد كان قليل الفعالية إذ أثر على (20%) من عزلات الجرثومة ، كما تبين عند تحليل النتائج إحصائياً وكما يتضح في الجدولين (2) و(3) أن التراكيز المختلفة للمستخلصين المائي والكحولي كانت مؤثرة وبفروق معنوية ، وهذا ما بينه اختبار (F) الإحصائي ، وعند المقارنة بين التراكيز المختلفة باستخدام اختبار دنكن Duncan تبين أن التركيز الأول (200) ملغم / سم³ كان الأكثر فعالية في التثبيط لكلا المستخلصين الكحولي و المائي . وبعامه، يتبين لنا من خلال النتائج أن التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي كان أكثر فعالية من تأثير المستخلص المائي، وقد يعزى السبب في ذلك إلى احتواء هذا النبات على عدد من المواد الفعالة التي قد تكون ذائبة في الكحول أكثر مما هي في الماء. إن الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات السعد قد تعود إلى واحد أو أكثر من الزيوت الطيارة المتوفرة في هذا النبات وبنسبة (0.5-0.9%) التي تضم في الأقل (27) مركباً كيميائياً قد تعمل على تثبيط النمو الجرثومي (16) .

الجدول-1: تأثير المستخلصين الكحولي والمائي لنبات السعد في جرثومة

A. actinomycetemcomitans

ت	نوع المستخلص وتراكيزه المستخدمة (ملغم/سم ³)	النسبة المئوية للعزلات الحساسة لكل تركيز	النسبة المئوية للعزلات متوسطة الحساسية	النسبة المئوية للعزلات المقاومة
	المستخلص الكحولي	العدد %	العدد %	العدد %
1	200	15 %100	0 --	0 --
	100	14 %93.3	0 --	1 %1.5
	50	12 %80	1 %1.5	3 %20
المستخلص المائي				
2	200	15 %100	0 --	1 %2
	100	13 %86.6	1 %1.5	1 %6
	50	3 %20	2 %13.3	10 %66.6

قسمت العزلات في الجدول على حساسة ومتوسطة الحساسية ومقاومة بالاعتماد على أقطار التثبيط القياسية للمضاد الحيوي Tetracycline وبحسب قياسات هذا المضاد الحيوي فإن أقطار التثبيط (≥ 19) ملم تعد حساسة ، ($15-18$) ملم تعد متوسطة الحساسية ، (≤ 14) تعد مقاومة . (Bergquist & Barbara; 2000)

الجدول-2: نتائج اختبار دنكن Duncan الإحصائي لتراكيز المستخلص الكحولي لنبات

السعد المؤثرة في جرثومة *A. actinomycetemcomitans*

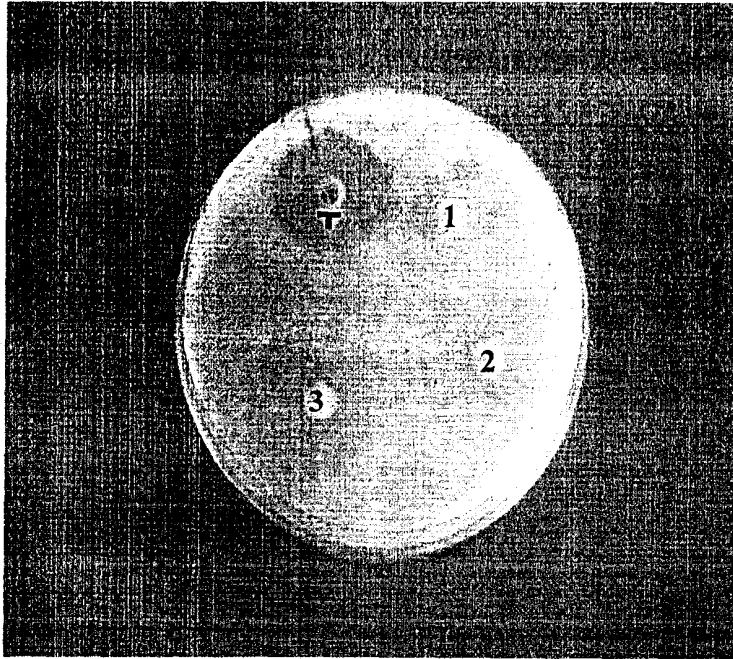
ت	المعاملات (التراكيز المستخدمة)	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	مجموعات دنكن
1	200 ملغم / سم ³	39.66	4.7664	A
2	100 ملغم / سم ³	30.72	9.2252	B
3	50 ملغم / سم ³	22.72	7.4998	C
4	Tetracycline (30 Mg) (عينة المقارنة)	37.22	2.9087	A

الجدول-3: نتائج اختبار دنكن Duncan الإحصائي لتراكيز المستخلص المائي لنبات السعد

المؤثرة في جرثومة *A. actinomycetemcomitans*

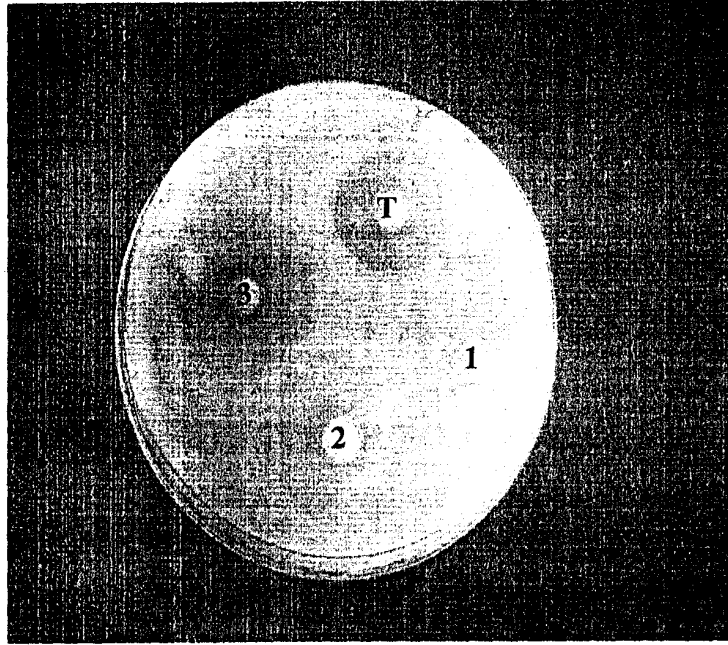
ت	المعاملات (التراكيز المستخدمة)	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	مجموعات دنكن*
1	200 ملغم / سم ³	34.36	6.6523	B
2	100 ملغم / سم ³	28.30	8.3036	C
3	50 ملغم / سم ³	21.30	8.3305	D
4	Tetracycline (30 Mg) (عينة المقارنة)	37.22	2.9087	A

* الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية .



الصورة (1) : الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات السعد

على جرثومة *A. actinomycetemcomitance*



الصورة (2) : الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لنبات السعد

على جرثومة *A. actinomycetecomitance*

T: Tetracyclin

1: 200 mg/ml

2: 100 mg/ml

3: 50 mg/ml

REFERENCES

1. Kim K J, Jeong S I, Shin H S, Lee B M, Yang C H, Han S H & You Y O, Microbiology and Immunology (2004).
2. Eick S , Seltman T & Pfister W., J. Clin. Periodontal, 31: 376-383, Blackwell Co. (2004).
3. Rosen G, Iva N, Helcer M & Sela M., Infection & Immunity; P. 3652-3 (2003).
4. Richard J & Yilamaz O., In Or Out: The Invasiveness of Oral Bacteria Periodontology, Vol.30, P.61-69(2002).
5. Lindhe J, Karring T & Lang N P., Clinical Periodontology and Implant dentistry, 4th. ed.; Blackwell Company(2003).
6. Holt J G, Krieg N R, Sneath PH, Staley JT & Williams ST., Bergis Manual of Determinative Bacteriologu. 9th. ed., Williams & Wilkins Company (1996).
7. Samarnayake L P, Jones B M, Scully C., Essential Microbiology for Dentistry. 2nd. ed., London: Churchill Livigstone(2002).

8. حامد ، غادة يونس عبدالرحمن . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل (2001).
9. عبدالباقي ، إنعام عبدالمنعم. التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية في بعض أنواع الجراثيم المعزولة من الجروح الخمجية ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2001).
10. Kim N C, Desjardins A E & Kinghorn A D., J. Nat. Prod. 62 (10): 1379-1384. Difco Manual(1999).
11. Chakravarty H L., Sree Sarasaty Press Ltd. Calcutta, India, Vol. 1, P. 189-195(1976).
12. الزبيدي ، زهير نجيب وهدى عبدالكريم وفارس كاظم. دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية . شركة آب للطباعة الفنية المحدودة (1996).
13. Chang M H & Hay But P P., Pharmacology and Application of Chines Material Medical. Vol. 29, PP. 893-895(1987).
14. عبدالله، بلند حسام الدين. رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الموصل(2004).
15. النعمان. ، أدبية يونس شريف. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل (1998).
16. مجيد ، سامي هاشم ومهند جميل محمود . النباتات والأعشاب العراقية . بيت الطب الشعبي والبحث العلمي . دار الثورة للصحافة والنشر ، ص 37-38 (1988).