مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 21 (3) 2008

تثبيط الطفرات المقاومه للمايكونازول Miconazole في خميرة *Candida albicans* بفعل مستخلص البابونك المائي *Matricaria chamomile*

بشرى محمد أمين محمد ، بتول زينل علي ، رعد عبد الهادي نايف
قسم علوم الحياة ، كلية التربية – ابن الهيثم، جامعة بغداد

الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية الى تسليط الضوء على قدرة المستخلص المائي للبابونك Matricaria chamomile في الحد من نمو الطفرات المقاومة للمضاد الحياتي المايكونازول Miconazole وباستعمال عزلتي التهاب المهبل والأظفر من خميرة Candida albicans. لقد وجد أن التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمايكونازول كان 16 مايكروغرام / مل وتم عزل طافرات مقاومة تلقائية للمايكونازول باستعمال تراكيز تعادل خمسة أضعاف التركيز المثبط الأدنى للمايكونازول أي (80) مايكروغرام / مل .
لغرض الوصول الى هدف البحث درس تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص البابونك المائي تراوحت ما بين (0.625 – 50) مايكروغرام/مل في نمو مستعمرات عزلتي الكانديدا ، اذ أظهرت النتائج انخفاضاً تدريجياً في عدد المستعمرات مع زيادة التراكيز. وقد تم انتخاب تركيزاً واحداً من التراكيز المعاملة بها الخلايا ليكون ممثلاً للتركيز الأمثل للمستخلص المائي بحيث أعطى هذا التركيز حيوية مقاربة لحيوية مجموعة السيطرة .
أجريت بعد ذلك اختبارات تداخل فعل التركيز الأمثل للبابونك في نمو المستعمرات المقاومة للمايكونازول وأجرى التداخل بثلاث معاملات (قبل ، بعد ، مع) اضافة المضاد الفطري وأظهرت النتائج أن التركيز الأمثل للبابونك كان ذا كفاية في تثبيط الطافرات المقاومة للمايكونازول وأظهر نجاحاً في اختزال عدد الطافرات المقاومة في المعاملتين (قبل ومع) اضافة المايكونازول وبذلك يمكن اعتبار مستخلص البابونك المائي أحد المثبطات المباشرة Desmutagen لفعل المضاد الحياتي المايكونازول .

المقدمة

تعد خميرة الـ C. albicans من أكثر أنواع الكانديدات أصابة لبطانة المهبل ومسببتا التهابه في سن الاخصاب (1). كما يمكن أن تحدث التهاب ثنيه الأظفر وتسبب تآكله وفصله عن صفيحة الأظفر (2) .

استعملت لعلاج هذه الخمائر العديد من المضادات الحيوية مثل المايكونازول المضاد الفطري الفعال ضد العديد من الأحياء المجهرية وتستعمل علاجا لاصابات Vaginal Candida (3)، والاصابات الجهازية، والسطحية (4)، لكن هذه المضادات الحياتية قد تفشل أحياناً في القضاء على هذه الفطريات لظهور مقاومة من بعضها تجاه هذه المضادات الحياتية (5)هناك دراسات كثيرة استخدمت فيها المستخلصات النباتية أو مركباتها الفعالة لتثبيط نمو الفطريات (6و7) واستخدم في هذه الدراسة الحالية مستخلص أزهار نبات البابونك Matricaria chamomile للكشف عن قدرته في الحد من نمو الطافرات المقاومة لعزلتي الأظفر والمهبل لخميرة Candida .

المواد وطرائق العمل

عزلات الخميرة Candida albicans

تم الحصول على عزلة التهاب المهبل وعزلة الأظفر من قسم التحليلات المرضية / كلية الصيدلة / جامعة بغداد ، بغداد–العراق .

عينات البابونك الألماني Matricaria chamomile L.

تم شراء الأزهار المجففة والمطحونة للبابونك من صيدلية الحضر / بغداد محفوظة في أكياس صغيرة داخل علب مغلقة وهي مجهزة بموافقة وزارة الصحة العراقية – مركز طب الأعشاب.

تحضير المستخلص المائي للبابونك

حضر المستخلص المائي باتباع طريقة (8) ، إذ وزن (20) غم من مسحوق الأزهار المجففة واستخلصت بوساطة جهاز Soxhlet واضيف الماء المقطر بمقدار 150 مل في دورق الاستخلاص واستمرت عملية الاستخلاص مدة ساعتين بدرجة حرارة 60 م°و بعدها رشح المستخلص بورق ترشيح (Whattman No.2) بخر السائل المتبقي

بوضعه في المجففة Drier في أطباق زجاجية مفتوحة وبدرجة (50) م° لحين الجفاف التام . أخذ من المستخلص وزن معلوم لعمل التخافيف التي عقمت بجهاز Millipore filter باستعمال اوراق ترشيح (0.22) مايكرون ووضعت المستخلصات المعقمة في قناني معقمة التي تم استعمالها مباشرة بعد ذلك .

المضاد الحياتي

استعمل المضاد الحياتي Miconazole بشكل مسحوق نقي حيث جهز من معمل أدوية سامراء.

التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائيا باستخدام البرنامج الاحصائي (SAS)، واستخدام الاختبار لتحديد الفروقات بين متوسطات المعاملات وعلى مستوى 5% (17)

النتائج والمناقشة

تأثير مضاد المايكونازول في حيوية خلايا الـ C. albicans :

أظهرت نتائج الشكل (1) انخفاضاً تدريجياً في اعداد المستعمرات بزيادة تركيز المايكونازول حتى التركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimum inhibit concentration الذي كان ممثلاً بالتركيز (16) مايكروغرام/مل ، ويعزى سبب انخفاض عدد المستعمرات مع زيادة تركيز المايكونازول الى ان المايكونازول يثبط تخليق الأركوستيرول Ergestrol وهو أحد مكونات الغشاء الخلوي في الخميرة بعد زيادة نفاذيته فضلاً عن فقدان المكونات الأساسية ،مثل الكلوكوز، والبوتاسيوم وفقدان خصائص الشكل الكروي وتحرر المكونات السايتوبلازمية (9 و 10)

تأثير مستخلص البابونك في عزلتي الخميرة وانتخاب التركيز الأمثل للمستخلص المائي

يتبين من ملاحظة الجدول (1) ان هناك انخفاضاً تدريجياً في عدد المستعمرات النامية لعزلتي الأظفر والمهبل مع زيادة تركيز مستخلص البابونك ويمكن أن يعزى سبب تثبيط نمو مستعمرات العزلات الفطرية مع زيادة تركيز مستخلص البابونك الى احتوائه على مادة Aznlene ذي الأثر المثبط للبكتريا والفطريات (11)

كما أكد احمد (12) أن مستخلص البابونك يحتوي على الزيوت النباتية ذي الأثر المضاد لمختلف أنواع الفطريات فضلاً عن أحتواء المستخلص على الـ Flavonids والـ Opigenin واللتين لهما أثرا مضادا ضد أنواع مختلفة من الفطريات والخمائر ومنها خميرة C. albicans (13) . لقد تم انتخاب التركيز (5) مايكروغرام/مل تركيزا أمثل بالنسبة الى عزلة الأظفر والتركيز الأمثل (3.125) مايكروغرام/مل بالنسبة لعزلة المهبل وذلك لاعطائهما حيوية مقاربة لحيوية مجموعة السيطرة السالبة .

عزل الطافرات المقاومة للمضاد الحياتي

انتخبت الطافرات المقاومة للمايكانزول ذي الحجم الاكبر والنمو الافضل ولوحظ ان الطافرات عموما كانت ابطا نموا من العزلات الاولية ووجد ان المايكانزول يثبط تكوين الخيوط القطرية كما شوهد ان المستعمرات ذا حواف غير منتظمة مع زيادة نسبة الخلايا المفردة وانخفاض في عدد الخلايا المتبرعمة والهايفات الكاذبة نسبة الى معاملة السيطرة مما يشير الى ان اكتساب صفة المقاومة للمضاد الحياتي مرتبط بتغير في الصفات المنظورة للطافرات . ولقد جرى عزل الطافرات المقاومة للمايكانزول على تركيز مقداره خمسة اضعاف التركيز المثبط الادنى الذي بلغ 80 مايكروغرام / مل،اذ تشير بعض البحوث الى ان استعمال التراكيز العالية من المضادات الحياتية من شأنه ان ينتج مقاومة مظهرية ثابتة (14) ويعتقد ان سبب المقاومة للمايكانزول تعزى الى عدم ارتباط المضاد بالانزيم Cytochrom P450 الضروري لبناء الـ Ergesterol في الفطريات (15) .

تأثير التداخل بين مستخلص البابونك والمضاد الحياتي في حيوية الطافرات المقاومة للمايكونازول

يبين الجدول (2) أن عدد الطافرات المقاومة للمايكونازول قد اختزل عددها وفي المعاملات الثلاث (قبل ، بعد ، مع) اضافة المايكونازول وبشكل أكبر عن المعاملتين قبل ومع استعمال المضاد الحياتي .

لقد وجد عموماً أن مثبطات الطفرات تكون فعالة عند المعاملة مع المضاد الحياتي Simultaneous treatment وقبله Pre-treatment ،اذ تعمل مثبطات مباشرة للمضاد Desmutagen أو المطفر، اذ انها قد تثبط عمل المطفر كيميائياً أو انزيمياً ، و تثبط انزيمات التنشيط الأيضي للمطفر الأولي Promutagenأيضاأو في أثناء مدة دمج المطفر مع المثبط الذي قد يؤدي الى تداخل كيمائي مباشر بينهما قبل اضافتهما معاً

للخلية ، فضلا عن ذلك فإن المثبطات التي تعمل قبل اضافة المطفر يحتمل انها تستحث عمل بعض الانزيمات الايضية والتي بدورها تعمل متطلبات ايضية للمطفر ، أما المثبطات التي تعمل بعد اضافة المطفر post treatment فهي تعمل مضادات حيوية للمطفر Bioantimutagen وتتعلق بعمليات اصلاح الطفرة المستحثة بالمطفر (16) .

المصادر

1. مجيد، هديل عبداللطيف (2004). دراسة تشخيصية ومناعية لانواع المبيضات Candida spp المسببة لألتهابات المهبل Vaginitis. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

2.Nolte, W.A .(1982) . Oral microbiology with basic microbiology and immunology . 4th ed . Mosby . St . Louis .USA.

3.Bodey , G.P. (1991) . Candidiasis pathologenesis , diagnosis and treatment .2nd ed. Raven press . USA .

4.Ingroff , A. E. ; White , T. and Pfaller , M. A. (1999) . Antifungal agents and susccptibity test . eited in : Murray , P. R. ; Baron E. J.; Pfalled, M. A. ; Tehover , F. C. and Yolken , R. H. (Eds.) Manual of clinical microbiology . Washington . 919-1773 .

5.Hoban , D. J. ; Zhanel , G. G. and Karlowsky . J. A. (1999). Antimicrob Agents Chemother . 43 : 1463 – 1464 .

6.Lwu , M. W. ; Duncan , A. R. and Okunji , C. O. (1999) . New antimicrobials of plant origin . eited in : Janic K, J. (ed) , Perspective new crops and new uses . ASHS press . Alexandria , VA : 757 – 46 .

7.Papon,N;Noel,T;Florent,M;Gibot-Leclerc,S;Jean,D. Chastin,C;Villard,JandChapeland-leelerc,F.(2007). Antimicrobial Agents Chemotherapy.51(1):369-371.

8.Sato, J.; Goto, K.; Nanjo, F.; Kowai, S. and Murata, K. (2000) Biosci. Gioeng, 90 (4): 442-446.

9.Kien, C. H. A. and White , T. C. (1999) . Antimicrobial Agent and chemotherapy. 43(4): 763-768.

10.Sanglard,D; Ischer,F ; Parkinson,T; Falconer ,D. and Bille ,J (2003). Antimicrobial Agent and chemotherapy 47(8):2404-12.

11.Mann,C. and Staba, J.(1986) : The chemistry ,Pharmacology , and commercial formulations of chamomile , In herbs, species and medicinal plants : Recent Advances in Botany ., Horticulture , and

pharmacology , vol.1 , L. E. Craker , and J. E. , Simon . eds. Oryx press , phoenix , Arizona , Pp233 – 280 .
12.Ahmed, F.H ;El Badri, A.A ; Ibrahim, M.M.K , El Shahed, A.S and El Khalafawy, H.M.M .(1994). Grasasy Aceites .45 : 260 – 264 .
13.Avallone , R ; Zanoil , P. ; Puia , G ; Kleins chuitz . M ; Shhreier . P. and Baraldi . M .(2000). Pharmacological Sciences chair of pharmacology and pharmacognosy odena and Reggio Emilia University , 41100 , Modena , Italy . Biochem Pharmacol . 59 (11) : 1387 – 94.
14.Verschure, P. C. E. M., Simons, J. W. I. M. (1982). Somatic cell Genetics. 8(3):307-317.
15.Ghannoum, M. A. and Rice. L. B. (1999) Clinical Microbiology Reviews. , 12 (4): 501-517.
16.Bronzztti , G. (1997). Foreward : J. Environmental Pathology , Toxicology and Oncology . 16(4) : 259 – 262 .
17-المشهداني ،كمال علوان (2002) . تقييم وتحليل التجارب .جامعة بغداد.العراق

جدول (1): تأثير مستخلص البابونك المائي في عزلتي خميرة C .albicans

معدل تراكيز مستخلص البابونك مايكروغرام/مل	معدل عدد المستعمرات النامية لعزلة الأظفر	معدل عدد المستعمرات السيطرة السالبة	معدل تراكيز مستخلص البابونك مايكروغرام/ مل	معدل عدد المستعمرات النامية لعزلة المهبل	معدل عدد المستعمرات السيطرة السالبة
5 *	37	40	3.125 *	47	55
10	36		6.25	42	
20	29		12.5	35	
30	25		25	25	
40	10		50	15	

* يمثل التركيز الأمثل (التركيز المنتخب للاختبارات القادمة)

الجدول (2) تداخل مستخلص البابونك المائي مع المضاد الفطري المايكونازول وبالمعاملات الثلاث (قبل ، بعد ، مع) استعمال ضاد

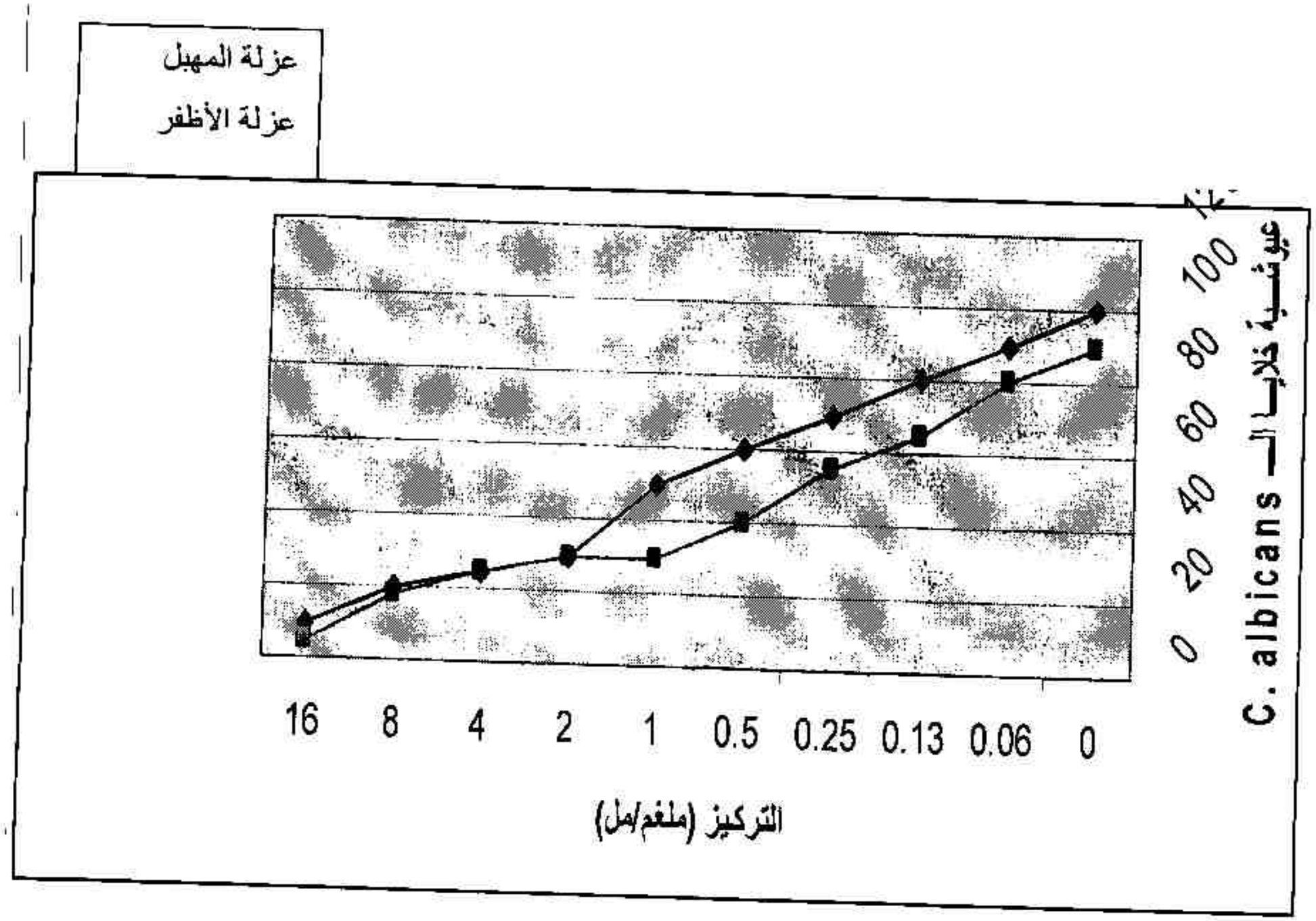
نوع المعاملة	معدل عدد المستعمرات الناميةوالخطأ القياسي لعزلة الاظفر(5 مايكروغرام/مل) S.E ± المتوسط الحسابي	معدل عدد المستعمرات الناميةوالخطأ القياسي لعزلة المهبل (3.125 مايكروغرام/مل) S.E ±المتوسط الحسابي
المايكونازول لوحده	35±1.155	35±1.155
قبل المعاملة	20±1.55 B	25±1.155 B
بعد المعاملة	30±1.155 B	28±1.55 B
مع المعاملة	15±0.577 C	20±1.155 B

B = أقل معنوية

C = عالي المعنوية

S.E = الخطا القياسي

المتوسط الحسابي= معدل عدد المستعمرات .



الشكل (1): تأثير مضاد المايكونازول Miconazole في عيوشية خلايا C. albicans

Inhibition of Miconazole – resistant mutants of *Candida albicans* by aqueous extract of *Matricaria chamomile*

B.M. Mohammed , B. . Z. Ali , R. A. Naef
Department of Biology, College of Education Ibn Al-Haitham , University of Baghdad

Abstract

The study has shad a light on the ability of aqueous extract of *Matricaria chamomile* for eliminating growth of miconazole resistant mutant of *Candida albicans* which isolated from human nail and vagina .The minimum inhibition concentration (MIC) is 16 µg/ml. Spontaneous resistant mutations for miconazole were also isolated by using 80 µg/ml of miconazole. This concentration is five times more than the MIC .Different concentrations of aqueous extract of *M.chamomile* ranging between 0.625 and 50 µg/ml were also used .The effects of these concentrations on the growth of isolated Candida colonies were showed a gradual decreasing in the colonies numbers after increasing the aqueous extract concentrations. One concentration of aqueous extract was selected as optimal concentration. .This selected concentration was gave similar viability for the Candida isolates in comparison with the control group. The test of interacting impact for the optimal concentration with Candida colonies growth were studied with three treatments; befor, after and with the miconazole antibiotic. The results showed that the optimal selected concentration of aqueous extract was quite efficient in reducing the number of miconazole resistant mutants colonies before and in the presence of miconazole . In conclusion, the aqueous extract of *M. chamomile* was considered as one of the direct inhibitors for the miconazole resistant mutants of *Candida albicans*.