دراسات كيميائية وبيولوجية لبعض أنواع السيكس المنزرعةفي مصر

رسالة مقدمه من

أحمد اسماعيل صبري

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم الصيدلية

(عقاقير)

تحت إشراف

أ.د/ مني حافظ حته
أستاذ العقاقير وعميد كلية الصيدلة – جامعة الفيوم

أ.د/ محمد محمود رضوان
باحث بالمركز القومي لأبحاث المنتجات الطبيعية– كلية الصيدلة – جامعة الميسيسيبي – الولايات المتحدة الأمريكية

أ.د / حسام مختار عبد العظيم
أستاذ العقاقير – كليةالصيدلة– جامعة بني سويف

أ.م.د/ عبير سيد معوض
أستاذمساعد العقاقير– كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

كلية الصيدلة
جامعة بني سويف
٢٠٢٢

الملخص العربي

عائلة سيكاداسي تحتوي علي جنس وحيد هو السيكس والتي يمثلها في مصر تسعة أنواع: سيكس أرميسترونجي، سيكس ريفوليوتا،سيكس سيرسينياليس، سيكس ليتورياليس، سيكس ثوراسي، سيكس ميديا، سيكس تانساكانا، سيكس رامفي وسيكس بيكتيناتا .لكن أشهر أنواع السيكس هم سيكس ريفوليوتاو سيكس سيرسينياليس وقد تم نشر كثير من الدوريات العالمية عنهما فيما يتعلق بمحتوياتها الكيميائية، والأنشطة البيولوجية الخاصة بهما.

وقد تم في هذه الدراسة عمل مسح مرجعي ودراسة مقارنة لثلاثة أنواع للسيكس وهم سيكس أرميسترونجي، سيكس ريفوليوتا و سيكس سيرسينياليس تتناول المحتوي الكيميائي، النشاط البيولوجي والاستخدامات في الطب الشعبي و أيضا دراسة كيميائية مكثفة لسيكس أرميسترونجي حيث أنه لم يتم دراسته كيميائيا أو بيولوجيا من قبل وهذه تعتبر أول دراسة عليه . تشمل الدراسة ثلاثة أجزاء :

الجزء الأول: دراسة مقارنة فيتوكيميائية :

الفصل الأول:مسح كيميائي أولي

نتائج المسح الكيميائي لمستخلص الكحول الايثيلي ٧٠% للأجزاء العلوية (وريقات و حامل وريقات)للثلاثة أنواع : سيكس أرميسترونجي، سيكس ريفوليوتاوسيكس سيرسينياليس كشفت عن :

١- وجودالفلافونيدات ، التانين، كربوهيدرات و/أو جليكوسيدات و أستيرولات فيالأنواعالثلاثة .

٢- وجود الصابونين في جميع الأنواععدا سيكس ريفوليوتا.

٣- غيابالقلويدات،الأنثراكينون والجليكوسيدات القلبية في أي من الأنواع الثلاثة .

الفصل الثاني: تقدير المكونات الفينولية

أسفرت نتائج تقدير المكونات الفينولية للثلاثة انواع من السيكس :تفاوت نسب المركبات الفينولية والفلافونيدات فهي أعلى بكثير في سيكس سيرسينياليستليها سيكس أرميسترونجي ثم سيكس ريفولوتا بينما تتجاوز نسبة التانين (المواد القابضه) في سيكس أرميسترونجي تلك الموجودة في سيكس سيركينياليس و سيكس ريفولوتا.

الجزء الثاني :دراسة مقارنة التحليل الكروماتوجرافى السائل عالى الأداء:

تم تحليل مستخلصاتالأجزاء العلوية (وريقات و حامل وريقات)لأنواع السيكس الثلاثة قيد الدراسةباستعمال LC–HR–ESI–MSوذلك بغرض المقارنة بين محتواها والتي اسفرت عن وجود أنواع مختلفه من المواد منها الفلافونيدات والاحماض الفينوليةواكتشاف ٤٥ مركب ومقارنتهم ببعضهم البعض في كل نوع من أنواع السيكس تحت الدراسةباستعمال تقنيه التنميط الأيضي (MZmine) .

الجزء الثالث: دراسة مقارنة لتقييم الأنشطة البيولوجية:

الفصل الأول: دراسة بيولوجية داخل المختبر

١.تقييملللنشاطالمضادللميكروبات

٢ .تقييملللنشاطالمضادللملاريا

٣ .تقييملللنشاطالمضادلطفيلياتالليشمانياوالتريبانوسوما

٤ . تقييملللنشاطلازالةالجذورالحرة

النتائج: مسنخلص الكحول الايثيلي الكلي 70 % لنبات السيكس سيرينياليس يحتوي علي أكبر فاعلية يليه أرميسترونجي ثم ريفولوتا في جميع النشاطات المضاده للميكروبات ، الملاريا والمضاده للأكسدة علي التوالي ما عدا التأثير المضاد لطفيليات الليشمانيا والتريبانوسوما حيث أن لنبات السيكس أرميسترونجي نشاطا ملحوظا مضاد للبروتوزول مقارنة مع أنواع السيكس الأخرى يليه سيرينياليس ثم الريفولوتا .

الفصل الثاني: دراسة بيولوجية وبيوكيميائية داخل الحيوان

١- تحديد نسبة السمية الحادة نصف المميتة (الجرعه التي تقتل ٥٠% من الجرذان)

وقد أسفرت نتائج هذه الدراسة علي المستخلصات الكحولية الكلية 70% لسيكس أرميسترونجي،سيكس ريفوليوتا،سيكس سيرسينياليسقيدالدراسةبأنها آمنة حتي جرعة 0.5 جم/كجم من وزن الجسم وأوضحت عدم وجود أي سمية وهي غير قاتلة.

٢- دورمستخلصنباتالسيكسفاستعادةالخلاياالتالفةللمخوالبنكرياسجراءالاشعاع (γ) علىالفئران: وقد أسفرت نتائج هذه الدراسة علي المستخلصات الكحولية الكلية للنباتات تحت الدراسة بفاعليتها في تقليل سمية الاشعاع علي خلايا وأنسجه المخ والبنكرياس لفئران التجارب.

٢.أ. دراسة بيوكيميائية

- **وظائف الكبد والكلي**

- تقليل كل من أنشطه ALT و يوريا الدم (سيكس أرميسترونجي (٦١,٨٪) > ريفولوتا (٦١٪)> سيرينااليس ((٥٦٪))

- تقليل نشاط AST(سيكس ريفولوتا(٥٧,٧٪) > سيرينااليس (٥٦,٦٪) > أرميسترونجي (٥٦,٣٪))

- مستوي اليوريا بالدم ورجوعه الي معدلاته الطبيعية (سيكس أرميسترونجي (٦٠٪) > ريفولوتا (٥١٪> سيرينااليس ((٤٦٪))

- **قياس مستويات السكر والأنسولين**

تسبب الاشعاع في زياده مستوي السكر في الدم بنسبة 67.6% وانخفاض مستوي الأنسولين بنسبة 47.2%

النتائج:- تقليل نسبه السكر في الدم: (سيكس أرميسترونجي = ريفولوتا (٢٩٪)> سيرينااليس (٢٢,٥٪))

- زياده نسبه الأنسولين في الدم : (سيكس ريفولوتا (٨٠٪) > سيرينااليس (٥٣٪) > أرميسترونجي (٤٩٪))

- **قياسعددالصفائحالدموية(سيكس سيرينااليس = ريفولوتا (٣١٪)> أرميسترونجي (٢٦,٨٪))**
- **قياسعددخلايا الدم البيضاء(سيكس سيرينااليس (١٥٧٪) >أرميسترونجي (١٤٢٪)> ريفولوتا (١٠١٪))**
- **الأميلويد أ, IL-18 : تسبب الاشعاع في زيادة ملحوظه في كل من الاميلويد أ وIL-18 بنسبه 153% و677% علي التوالي ولكنها قلت بشكل ملحوظ بعد المعالجه بالمستخلصات قيد الدراسه كاتالي :**

(سيكس ريفولوتا (٥٠,٤٪) >أرميسترونجي(٣٨,٧٪)>سيرينااليس(٢٥,٧٪))

(سيكس ريفولوتا (٦٨,٥٪) >أرميسترونجي(٦٨٪)>سيرينااليس (٥٥٪))

- **عوامل الإجهاد التأكسدي**

-نقص MDA في المخ (سيكس سيرينااليس (٦٢,٦٪) > ريفولوتا (٥٦,٧٪)> أرميسترونجي (٤٦,٧٪))

- زياده GPx في المخ (سيكس أرميسترونجي (١٣٨٪)> سيرينااليس (١٣٧٪) > ريفولوتا (١٣١٪))

- زياده TAC في المخ (سيكس ريفولوتا (١٦٩٪)>أرميسترونجي (١٦٥٪)> سيرينااليس(١٣٧٪))

-نقص MDA فيالبنكرياس (سيكس ريفولوتا (٥٨٪)> أرميسترونجي (٥٠٪)>سيرينااليس (٤٩٪))

- زياده GPx في البنكرياس (سيكس أرميسترونجي = ريفولوتا (٥٨,٨٪)> سيرينااليس (٤٣٪))

- زياده TAC في البنكرياس (سيكس ريفولوتا (٢٠٩٪) > سيرينااليس (١٤٨٪)>أرميسترونجي (١٠٧٪))

- **الكشف عن إصابة المخ**

-تقليلNFkb (سيكس ريفولوتا (٦٩٪) >أرميسترونجي (٦٢٪)> سيرينااليس (٥٣٪))

- تقليل Cox2 (سيكس أرميسترونجي (٦٠٪)>ريفولوتا (٥٥٪)> سيرينااليس (٥٢٪))

- تقليلGFAP (سيكس أرميسترونجي (٤٢٪)> سيرينااليس (٣٦٪)> ريفولوتا(٣٤٪)).

- تقليل MCP-1 (سيكس ريفولوتا (٣٨,٥٪)>أرميسترونجي (٣٧٪)> سيرينااليس(٣٤٪))

- **الكشف عن إصابة البنكرياس**

عند معالجة خلايا البنكرياس بالمستخلصات الكحوليه لأنواع للسيكس وجد ان لها تأثيرا مضادا للالتهابات :

- تنظيم microRNA216a (سيكس ريفولوتا (٥٩٪)>أرميسترونجي (٥٨٪)> سيرينااليس(٥٠٪))

-تقليل انزيم اللاييباز(سيكس ريفولوتا (٦٢٪)>أرميسترونجي (٦٠,٩٪)> سيرينااليس(٥٧٪))

-تقليل انزيمالأميلاز(سيكس ريفولوتا (٥٧٪)>أرميسترونجي (٥٤٪)> سيرينااليس (٤٩٪))

٢.ب.الفحص الهستوباثولوجي

وتم اختبارذلك علي كل من: • أنسجةدماغالجرذانالبيضاء (الخلاياالعصبيةفيالقشرةالمخية،والجزءالفرعيواللفافةالمسننة،والمخططوالمخيخ)•أنسجةالبنكرياسمنالجرذانالبيضاء (جزرخلايالانجرهانز).

تم استنتاج أن لنبات السيكس أرميسترونجي قدرة ملحوظه علي استعاده خلايا المخ والبنكرياس التالفه جراء الاشعاع مقارنة مع أجناس السيكس الأخرى يليه الريفولوتا ثم سيرينااليس.

الجزء الرابع : دراسة فيتوكيميائيةلنبات السيكس أرميسترونجي

تم اختيار الأجزاء العلوية (وريقات و حامل وريقات)للسيكس أرميسترونجي للدراسة الكيميائية ولفصل المركبات استنادا علي عدد من الأسباب أهمها انها ذات فاعلية ملحوظة في كثير من الأنشطه البيولوجية السابقة مقارنة ببقية الأنواع الأخري وأنه أيضا لم يتم دراستها باستفاضة كيميائية و بيولوجية من قبل وذلك بناءا علي المسح المرجعي السالف ذكره.

الفصل الأول: استخلاص وفصل

- <u>فحصمجزىءالهكسان</u>

دراسة المواد الدهنية لمستخلص الأجزاء العلوية (وريقات و حامل وريقات)لسيكس أرميسترونجي:

تم تجزئة مستخلص الهكسان (١٠ جم) الي مواد غير قابله للتصبن (٣.٧ جم) ومواد متصبنة (٢.٧٥جم) وتم تحليلها كميا وكيفيا باستخدام جهاز كروماتوجرافيا الغازوقد أدتحليلالمادةغيرالقابلةللتصبنإلىتحديد ٤ ٢مكونًا،وكانن- ايكوزانهوالهيدروكربونالرئيسييليهن-نونانديكان،بينماأدتحليلالمادةالقابلةللتصبنإلىتحديد ٢ ١مكونًامنمكوناتالأحماضالدهنية. تمتحديدالأحماضالدهنيةالمشبعةالرئيسيةوكان إسترميثيللحمضهيكساديكانويكأكثرها أهمية بينماإسترميثيللحمضأوكتاديسينويككأهمالأحماضالدهنيةغيرالمشبعة. يليهاستخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات متدرجة القطبية لفصل المواد غير قابلة للتصبن من الجذور وقد تم فصل وتعريف مركبين : بيتاسيتوستيرول , ستيجماستيرول

-فحصمجزىءثنائيكلوروميثان

تم فصل وتعريف ستة مركبات من مستخلص ثنائي كلوروميثان (٣.٥ جم) باستخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات متفاوتة القطبيةوقد تم تنقية المركبات المفصولة بالطرق الكروماتوجرافية المختلفة و التعرف عليها عن طريق فحص درجه الانصهار وباستخدام الطرق الطيفية المختلفة وهي : نارينجينين, كامبيفيرول, دايهيدروأمينتوفلافون, دايهيدروهينكوفلافون, أمينتوفلافون وبيتاسيتوستيرول جلوكوزايد.

-فحصمجزىءخلاتالايثيل

تم فصل مركبات من مستخلص خلات الايثيل (٤.٢ جم)باستخدام كروماتوجرافيا العمودومذيبات متدرجة.

-فحصمجزىءالبيوتانول

تم فصل وتعريف مركبين (نارينجن و فايتكسينرامنوازايد) من مستخلص البيوتانول(٧ جم) باستخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات متفاوتة القطبية .

-فحصمجزىءالماء

- استخلاص الفينولات:تماستخلاص الفينولات من مستخلصالماءالباقيبعدالبيوتانول بطريقة استخلاص (حمض – قلوي)وفصل وتعريف مركبين (حمض الفانليك, حمض الباراكيوماريك) باستخدام طرق كروماتوجرافيا مختلفة ومذيبات متفاوتة القطبية.

- الفصل الكروماتوجرافي :تم فصل وتعريف أربعة مركبات (كافايين, كاتيكين, ابيكاتيكين, ابيجالوكاتيكين-٣- جالات) من مستخلص الماء الباقي بعد البيوتانول باستخدام كروماتوجرافيا العمود و التحليل الكروماتوجرافى السائل عالى الأداء ومذيبات متفاوتة القطبية.

الفصل الثاني : التعرف علي المركبات المفصولة

تم التعرف علي جميع المركبات المفصولة من المستخلصات السابقة عن طريق فحص درجه الانصهار وباستخدام الطرق الطيفية المختلفة ومقارنة مع البيانات الموضحة بالمسح المرجعي طبقا للجدول رقم ٣٢.

جدول ٣٢: قائمةالمركباتالكيميائيةالمعزولةمنمستخلصاتالأجزاء العلوية (وريقات و حامل وريقات)لسيكس أرميسترونجي .

Compound no. (amount)	Fraction	Structure name	Detection	Note
1(14 mg)	Hexane	***β*-sitosterol**	CO-TLC, ^{1}H NMR, DEPTQ	**First report from *C.armstrongii***
2(11 mg)	Hexane	**Stigmasterol**	CO-TLC, HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}CNMR	
3(12 mg)	Dichlorom ethane	**Naringenin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, DEPTQ, HMQC, HMBC.	
4(5 mg)	Dichlorom ethane	**Kaempferol**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR	
5(22 mg)	Dichlorom ethane	**2,3-Dihydroamentoflavone**	^{1}H NMR	
6 (12mg)	Dichlorom ethane	**2,3-Dihydrohinokiflavone**	^{1}H NMR	
7 (295 mg)	Dichlorom ethane	**Amentoflavone**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HMBC	
8(10 mg)	Dichlorom ethane	***β*-sitosterolglucoside**	CO-TLC	
9 (8 mg)	Ethyl acetate	**Isoginkgetin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, DEPTQ, HMQC, HMBC	
10(16 mg)	Ethyl acetate	**Pruinin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HMQC	
11(10mg)	Ethyl acetate	**Vitexin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, DEPTQ, HMQC, HMBC	
12(15 mg)	*n*-butanol	**Naringin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR,^{13}C NMR, HMQC, HMBC	
13 (10 mg)	*n*-butanol	**Vitexin-2″-rhamnoside**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, DEPTQ, HMQC, HMBC	
14 (12 mg)	Water	**Vanillic acid**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC	
15(17 mg)	Water	***P*- Coumaric acid**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HMQC	
16(3 mg)	Water	**Caffeine**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR	**First report from Cycadaceae family**

17 (15 mg)	Water	**Catechin**	HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPTQ, HMQC, NOESY	**First report from *C.armstrongii***
18 (18 mg)	Water	**Epicatechin**		
19 (20 mg)	Water	**Epigallo-catechin 3-gallate**		**First report from *Cycas* genus**