------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 2، ص1-13، 2006 ------

تأثير مشابهات الفوليت على فعالية أنزيم الدايهيدروفوليت ردكتيز ونمو بادرات وكالس نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L.

حكمت مصطفى الدليمي ساجدة عزيز عبود

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/9/10 ، تاريخ القبول 2006/2/27)

الملخص

تضمنت الدراسة تأثير ثلاثة مركبات من مشابهات الفوليت وهي Sulfanilamide , Trimethoprim و Aminopterin في نمو بادرات نبات الحبة السوداء وكالسها. استخدمت هذه المركبات بتراكيز (10^{-1} -10^{-5}) مولار . تؤكد النتائج في هذا المضمار ان معدلات أطوال الجذور ونسبة إنبات البذور المعاملة بمشابهات الفوليت قبل زراعتها قد تباينت باختلاف تراكيز المشابهات المستخدمة .

وأشارت النتائج ايضاً إلى آن نقل كالس نبات الحبة السوداء إلى أوساط غذائية مجهزة بتراكيز متعددة من مشابهات الفوليت أدى إلى انخفاض واضح في البروتينات والأحماض النووية (DNA و RNA) والوزن الطري للكالس بعمر 15 و 30 يوماً، واتخذ هذا الانخفاض انماطاً مشابهة لحد ما لنمط الانخفاض في الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز وكمية الفوليت الكلية للكالس . ولم تؤثر إضافة السلفانيل اميد في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز عند إضافته إلى الأوساط الغذائية أو إلى نظام التفاعل.

Effect of Folate Analogues on the Activity of Dihydrofolate Reductase and Seedlings, Callus Growth of *Nigella Sativa* L. Plant.

Hekmat M. Al-Dulaimee **Sajida A. Abood**
Department of Biology
College of science
Mosul University

ABSTRACT

The study included the effect of three compounds of folate analogues, sulfanilamide, trimethoprim and aminopterin on the growth of seedlings and callus of *Nigella sativa* plant. These compounds were added at concentration of (10^{-1}-10^{-5}) Molar. The average roots length and the rate of germination in seeds, treated with folate analogues before planting, differed with the type of folate analogue and the concentration used.

The fresh weight and the content of protein, DNA and RNA of callus at 15 and 30 days, were inhibited by the folate analogues.

The decrease in folate content and specific activity of dihydrofolate reductase of callus, grown on media containing inhibitors, was similar to the decrease in fresh weight, protein, DNA and RNA contents. Dihydrofolate reductase activity was not effected by the addition of sulfanilamide either to the In vivo or In vitro system.

- -

المقدمـة

مشابهات الفوليت عبارة عن مركبـات تتـداخل مـع تكـوين المـساعدات الأنزيميـة المـسماة التتراهيدروفوليت والداي هيدروفوليت المشتقة من حامض الفولك ، تعمل هذه المشتقات على نقل وحدات تحتوي على ذرة كربون واحدة مثل المثيلين والمثيل والفورمايل وتشترك في العديد من التفاعلات الحيوية لبناء الأحماض النووية (DNA و RNA) والبروتينات في جسم الكـائن الحـي (Stokstad, 1954) . ان نقصان أو تثبيط تكوين هذه المساعدات الانزيمية يؤدي إلى التأثير في هذه العمليات الحياتية وتثبيطهـا . ويعد السلفانيل أمايد من مشابهات الفوليت وله تركيب كيمياوي يشبه تركيـب P-Aminobenzoic acid مما يؤدي إلى استعمال جزيئة السلفانيل امايد لبناء حامض الفولك وبالتالي تتوقف عملية حياتية مهمة فـي الكائن الحي، لذا استعمل السلفانيل امايد للحد من نمو البكتريا (دلالي، 1983) .

ودرس تأثير السلفانيل امايد على نمو جـذور الـشوفان (Forbes-Jones, 1944) وجـذور نبـات الطماطة (Ball, 1955) وبادرات الحنطة والبازلاء (Iwai et al., 1962) والخلايا المعلقة لنبات الكرافس (Hewertson and Collin, 1984) وخلايا كالس نبات الخس (Mohammad et al., 1991) . وللتـشابه الكبير بين ترتيب الأمينوبترين أحد مشابهات الفوليت وتركيب حامض الفولك ، فقد استخدم هذا المركـب في العديد من الدراسات حول تأثيره على فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من خلايـا

الأحياء المجهرية واللبائن (Esposito et al., 1989; Albrecht and Hutchison, 1970) . ودرس تأثيره على نمو بادرات البازلاء (Suzuki and Iwai, 1970)، ونمو خلايا كالس زهرة الشمس والخس (Mohammad et al., 1989 ; 1991) . وجد ان أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز يرتبط بالترايميثوبريم أحد مشابهات الفوليت 1000 مرة أكثر من ارتباطه بحامض الفولك وذلك للتشابه الكبير بين تركيب الترايميثوبريم وتركيب حامض الفولك . ودرس تأثير الترايميثوبريم على نمو العديد من خلايا الأحياء المجهرية واللبائن (Skold, 2001; Buskin et al., 1999) ، ودرس تأثيره في كالس زهرة الشمس وكالس الخس (Mohammad et al., 1989; 1991) .

المواد وطرائق العمل

تأثير مشابهات الفوليت في نمو بادرات الحبة السوداء

بعد التأكد من حيوية البذور المستخدمة في التجربة عقمت البذور بمعاملتها بمحلول الكحول الأثيلي 96% لمدة دقيقتين، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمرات عدة . ونقلت البذور إلى دوارق زجاجية حاوية على مشابهات الفوليت (السلفانيل أمايد، الترايميثوبريم والأمينوبترين كل على حدا) بتراكيز متعددة (10^{-1} - 10^{-5}) مولار وبرقم هيدروجيني (6.9) . واستعمل الماء المقطر بدلاً من المشابهات كمعاملة مقارنة.

نقلت الدوارق الحاوية على البذور إلى حاضنة النمو في الظلام وبدرجة حرارة 25م . غسلت البذور بالماء المقطر المعقم عدة مرات، ثم وضعت في أطباق بتري حاوية على أوراق ترشيح رطبت بالماء المقطر ، نقلت الأطباق إلى حاضنة النمو في الظلام وبدرجة حرارة (20 ∓ 2°م). بعد ستة أيام من الزراعة حسبت نسبة الإنبات وطول الجذور للبادرات النامية.

تأثير مشابهات الفوليت في نمو كالس نبات الحبة السوداء

نقلت قطع من كالس نبات الحبة السوداء بعمر 35 يوماً وبوزن 0.3 غم تقريباً إلى دوارق زجاجية حاوية على وسط MS مضافاً اليه 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار ومشابهات الفوليت (السلفانيل أمايد، الترايميثوبريم والأمينوبترين) بتراكيز متعددة تراوحت من(10^{-1} إلى 10^{-5} مولار) . قدرت كمية الفوليت الكلية ومحتوى البروتين الكلي وكمية DNA و RNA والوزن الطري للكالس ، وحددت أيضا فعالية إنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من الكالس بعمر 15 و 30 يوماً (50 ، 65 يوماً من بدء استحداث الكالس).

النتائج

تأثير مشابهات الفوليت في نمو بادرات الحبة السوداء

يشير الجدول (1) إلى أن معاملة بذور الحبة السوداء بتراكيز متعددة من مشابهات الفوليت (السلفانيل أمايد، الترايميثوبريم والأمينوبترين) قبل زراعتها أدى إلى انخفاض واضح في معدل أطوال

الجذور بعد فترة نمو 6 أيام، مقارنة بمعدل أطوال الجذور للبادرات النامية من بذور معاملة بالماء المقطر فقط (معاملة المقارنة)، مع ملاحظة انخفاض في نسبة الإنبات.

الجدول 1 : معدل أطوال جذور بادرات الحبة السوداء ونسبة الإنبات للبذور بعد مدة نمو ستة أيام وبعد معاملتها بتراكيز متعددة من مشابهات الفوليت .

مشابهات الفوليت	التراكيز (مولار)	معدل أطوال الجذور (سم)	نسبة الإنبات (%)
السلفانيل أمايد	10^{-5}	1.40(∓0.121)	90
	10^{-4}	1.20(∓0.098)	90
	10^{-3}	0.80(∓0.034)	85
	10^{-2}	0.40(∓0.131)	80
	10^{-1}	0.08(∓0.003)	60
الترايميثوبريم	10^{-5}	1.00(∓0.031)	85
	10^{-4}	0.70(∓0.008)	70
	10^{-3}	0.50(∓0.012)	50
	10^{-2}	-	0
الأمينوبترين	10^{-5}	1.20(∓0.021)	90
	10^{-4}	0.60(∓0.006)	85
	10^{-3}	0.40(∓0.011)	70
	10^{-2}	0.20(∓0.081)	48
	10^{-1}	-	0
معاملة المقارنة		2.0(∓0.021)	100

كل قيمة تمثل معدل عشرين قراءة . - عدم حصول الانبات . (∓) يمثل الخطأ القياسي.

تأثير مشابهات الفوليت في الوزن الطري للكالس

أدت التراكيز العالية من المشابهات 10^{-1} مولار من السلفانيل أمايد و 10^{-2} مولار من الترايميثوبريم و 10^{-1} مولار من الأمينوبترين إلى موت معظم خلايا الكالس، بينما أدت (10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} مولار) من السلفانيل أمايد والترايميثوبريم والأمينوبترين على التوالي إلى انخفاض في معدل الوزن الطري للكالس (جدول 2).

الجدول 2 : معدل الوزن الطري لكالس نبات الحبة السوداء بعد مرور 15 و 30 يوماً من النمـو علـى وسط MS المدعم بـ 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار ومشابهات الفوليت بتراكيز متعددة .

مشابهات الفوليت	التراكيز (مولار)	معدل الوزن الطري (غرام)		
		العمر (يوم)		
		15	30	النسبة المئوية للانخفاض %
السلفانيل أمايد	10^{-5}	(0.021∓)1.647	(0.081∓)4.611	15
	10^{-4}	(0.123∓)1.352	(0.122∓)4.113	25
	10^{-3}	(0.082∓)1.268	(0.031∓)3.024	45
	10^{-2}	(0.083∓)1.083	(0.031∓)1.674	69
	10^{-1}	(0.131∓)0.705	(0.088∓)0.736	87
الترايميثوبريم	10^{-5}	(0.099∓)1.653	(0.031∓)4.012	26
	10^{-4}	(0.081∓)1.216	(0.033∓)3.511	36
	10^{-3}	(0.062∓)0.752	(0.021∓)0.921	83
	10^{-2}	(0.072∓)0.441	(0.008∓)0.401	93
الأمينوبترين	10^{-5}	(0.121∓)1.498	(0.032∓)3.869	29
	10^{-4}	(0.092∓)1.101	(0.033∓)3.011	45
	10^{-3}	(0.062∓)0.821	(0.081∓)2.050	62
	10^{-2}	(0.021∓)0.400	(0.021∓)0.450	92
	10^{-1}	(0.031∓)0.311	(0.033∓)0.312	94
الوسـط القياسـي		(0.081∓)1.702	(0.052∓)5.433	0

كل قيمة تمثل معدل عشرة قراءات . (∓) يمثل الخطأ القياسي .

تأثير مشابهات الفوليت في الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز (DHFR)

أدت إضافة مشابهات الفوليت (الترايميثوبريم والأمينوبترين) إلى الأوساط الغذائية النـامي عليهـا كالس نبات الحبة السوداء (In vivo) إلى انخفاض في الفعالية النوعية لأنزيم DHFR المـستخلص مـن الكالس بعد مدة نمو 15 و 30 يوماً علـى تلـك الأوسـاط . وانخفـضت الفعاليـة النوعيـة (65.201 مايكروغرام/دقيقة/ملغرام بروتين) لأنزيم DHFR, المستخلص من الكالس النامي على الوسط القياسـي، إلى (27.022 و 10.112 مايكروغرام / دقيقة / ملغرام بروتين) عند إضافة كل من الترايميثـوبريم (10^{-3} مولار) والأمينوبترين (10^{-2} مولار) على التوالي إلى ذلـك الوسـط . وأدت إضـافة 10^{-2} مـولار مـن الترايميثوبريم و (10^{-1} مولار) من الأمينوبترين إلى الأوساط الغذائية النامي عليها الكالس إلى تثبيط فعالية الأنزيم بنسبة 95% و 97% على التوالي بعد مدة نمو 30 يوماً على تلك الأوساط الغذائية، تشير النتـائج

ايضاً إلى عدم وجود تأثير للسلفانيل أمايد ولجميع التراكيز المستخدمة على فعالية أنزيم DHFR، بدلالـة عدم اختلافها عن فعالية الأنزيم المستخلص من كالس الوسط القياسي (جدول 3) .

يشير الجدول (4) بان إضافة الترايميثوبريم بتركيز 10^{-3} مولار والأمينوبترين بتركيز 10^{-2} مـولار إلى نظام التفاعل (In vitro) الحاوي على أنزيم DHFR للكالس سببت 100% تثبيط فعاليـة الأنـزيم . ويشير الجدول أيضاً إلى عدم وجود أي تأثير للسلفانيل أمايد ولجميع التراكيز المستخدمة في فعالية الأنزيم عند أضافته إلى نظام التفاعل .

الجدول 3 : الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من كالس نبات الحبة الـسوداء بعد مرور 15 و 30 يوماً من النمو على وسط MS المدعم بـ 2,4-D بتركيز 10^{-6} مـولار ومشابهات الفوليت بتراكيز متعددة (In vivo) .

مشابهات الفوليت	التراكيز (مولار)	الفعالية النوعية لأنزيم DHFR (مايكروغرام/دقيقة/ملغرام بروتين)*		النسبة المئوية للتثبيط (%)**
		العمر (يوم)		
		15	30	
السلفانيل أمايد	10^{-5}	(0.081∓)44.901	(0.051∓)65.202	
	10^{-4}	***	***	
	10^{-3}	***	***	***
	10^{-2}	***	***	
	10^{-1}	***	***	
الترايميثوبريم	10^{-5}	(0.011∓)41.412	(0.021∓)45.222	31
	10^{-4}	(0.011∓)35.109	(0.021∓)32.660	50
	10^{-3}	(0.051∓)26.211	(0.081∓)27.022	59
	10^{-2}	(0.021∓)5.041	(0.011∓)3.221	95
الأمينوبترين	10^{-5}	(0.081∓)40.224	(0.030∓)43.021	34
	10^{-4}	(0.011∓)27.442	(0.011∓)29.211	55
	10^{-3}	(0.009∓)22.114	(0.022∓)22.442	66
	10^{-2}	(0.031∓)11.211	(0.011∓)10.112	84
	10^{-1}	(0.061∓)8.439	(0.011∓)2.001	97
الوسـط القياسـي		(0.021∓)44.902	(0.021∓)65.201	0

كل قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات . (∓) يمثل الخطأ القياسي .

(*) الفعالية النوعية للأنزيم : كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقـة واحدة من التفاعل لكل ملغرام بروتين .

(**) النسبة المئوية لتثبيط فعالية أنزيم DHFR المستخلص من الكالس بعمر 30 يوماً .

(***) لا يوجد تأثير للسلفانيل أمايد على فعالية أنزيم DHFR .

الجدول 4 : تأثير مشابهات الفوليت في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء بعد مرور 30 يوماً (In vitro) .

مشابهات الفوليت	التراكيز (مولار)	الفعالية النوعية لأنزيم DHFR (مايكروغرام/دقيقة/ملغرام بروتين)*	النسبة المئوية للتثبيط (%)
السلفانيل أميد	10^{-5}	33.412 (∓0.031)	**
	10^{-4}	**	
	10^{-3}	**	
	10^{-2}	**	
	10^{-1}	**	
الترايميثوبريم	10^{-5}	18.111 (∓0.012)	46
	10^{-4}	9.002 (∓0.001)	73
	10^{-3}	0.0	100
	10^{-2}	0.0	100
الأمينوبترين	10^{-5}	17.332 (∓0.022)	49
	10^{-4}	7.666 (∓0.008)	77
	10^{-3}	3.222 (∓0.009)	90
	10^{-2}	0.0	100
	10^{-1}	0.0	100
الوسـط القياسـي		33.414 (∓0.011)	0

قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات . (∓) يمثل الخطأ القياسي .

(*) الفعالية النوعية للأنزيم : كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خـلال دقيقـة واحدة من التفاعل لكل ملغرام بروتين .

(**) لا يوجد تأثير للسلفانيل أميد على فعالية أنزيم DHFR .

تأثير مشابهات الفوليت في المحتوى البروتيني الكلي للكالس

أدت التراكيز العالية من المشابهات إلى انخفاض واضح في بروتينات خلايا الكالس بعد مـرور 30 يوماً من النمو (الجدول 5) .

تأثير مشابهات الفوليت في المحتوى الكلي للأحماض النووية (DNA و RNA)

ازدادت كمية الأحماض النووية بنوعيها (DNA و RNA) بعد نمو الكالس 30 يوماً على الأوسـاط الغذائية الحاوية على 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار (الوسط القياسي)، بينما انخفضت هذه الزيادة في كميـة الأحماض النووية بإضافة تراكيز متعددة من مشابهات الفوليت، وخاصة عند إضافة 10^{-1} و 10^{-2} مـولار من تلك المشابهات إلى الأوساط الغذائية النامي عليها الكالس (الجدول 5).

الجدول 5 : المحتوى البروتيني والحامض النووي الديوكـسي رايبـوزي والحـامض النـووي الرايبوزي لكالس نبات الحبة السوداء بعد مرور 15 و 30 يوماً من النمو على وسـط MS المدعم بـ 2,4-D 2 بتركيز 10^{-6} مولار ومشابهات الفوليت بتراكيز متعددة .

الفوليت	التراكيز (مولار)	المحتوى البروتيني الكلي (ملغرام/غرام وزن طري)		كمية DNA (مايكروغرام/غرام وزن طري)		كمية RNA (مايكروغرام/غرام وزن طري)	
		العمر (يوم)					
		15	30	15	30	15	30
	10^{-5}	(0.082∓)0.994	(0.032∓)1.221	(0.121∓)12.612	(0.052∓)15.096	(0.021∓)120.103	(0.025∓)150.316
	10^{-4}	(0.121∓)0.941	(0.021∓)1.001	(0.130∓)12.001	(0.062∓)14.821	(0.081∓)115.892	(0.092∓)143.240
ن أمايد	10^{-3}	(0.082∓)0.899	(0.081∓)0.942	(0.141∓)11.021	(0.008∓)13.211	(0.112∓)112.693	(0.082∓)123.766
	10^{-2}	(0.031∓)0.855	(0.101∓)0.890	(0.081∓)11.002	(0.032∓)11.094	(0.312∓)111.908	(0.112∓)111.929
	10^{-1}	(0.041∓)0.825	(0.102∓)0.801	(0.090∓)10.152	(0.021∓)10.521	(0.041∓)101.640	(0.221∓)101.942
	10^{-5}	(0.081∓)0.922	(0.021∓)1.10	(0.031∓)11.421	(0.021∓)13.421	(0.001∓)113.066	(0.081∓)119.178
وبريم	10^{-4}	(0.091∓)0.901	(0.032∓)0.994	(0.021∓)10.222	(0.032∓)12.622	(0.020∓)97.109	(0.021∓)111.498
	10^{-3}	(0.021∓)0.841	(0.081∓)0.882	(0.092∓)8.420	(0.031∓)9.421	(0.111∓)84.78	(0.921∓)89.241
	10^{-2}	(0.011∓)0.742	(0.061∓)0.531	(0.009∓)6.221	(0.023∓)3.022	(0.021∓)64.551	(0.131∓)27.521
	10^{-5}	(0.021∓)0.904	(0.021∓)1.092	(0.012∓)9.521	(0.021∓)11.244	(0.311∓)85.689	(0.121∓)105.693
	10^{-4}	(0.032∓)0.888	(0.031∓)0.989	(0.111∓)8.841	(0.081∓)10.024	(0.211∓)79.989	(0.02∓)90.015
ترين	10^{-3}	(0.121∓)0.894	(0.081∓)0.921	(0.121∓)7.780	(0.021∓)9.421	(0.021∓)70.728	(0.021∓)78.519
	10^{-2}	(0.003∓)0.825	(0.031∓)0.854	(0.101∓)7.021	(0.002∓)7.542	(0.022∓)63.189	(0.051∓)64.203
	10^{-1}	(0.031∓)0.522	(0.003∓)0.221	(0.081∓)4.925	(0.013∓)1.092	(0.042∓)39.338	(0.032∓)10.521
ـط القياسـي		(0.021∓)1.221	(0.092∓)2.011	(0.031∓)13.011	(0.002∓)19.002	(0.032∓)129.992	(0.121∓)170.942

كل قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات . (∓) يمثل الخطأ القياسي .

تأثير مشابهات الفوليت في محتوى الفوليت الكلي للكالس

يشير الجدول (6) إلى أن مشابهات الفوليت المستخدمة في البحث أدت إلى انخفاض واضح في محتوى خلايا الكالس من الفوليت بعد مدة 30 يوماً من نمو الكالس على الأوساط الغذائية الحاوية على تلك المشابهات. وتتخذ هذا الانخفاض في محتوى الفوليت نمطاً مشابهاً لحد ما لذلك الانخفاض في الفعالية النوعية لأنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز وفي معدل الوزن الطري للكالس والمحتويات الخلوية من البروتينات والأحماض النووية(RNA و DNA) . وكانت نسبة تثبيط بناء الفوليت (78، 94، 97)% عند إضافة كل من السلفانيل أمايد (10^{-1} مولار) والترايميثوبريم (10^{-2} مولار) والأمينوبترين (10^{-1} مولار) على التوالي إلى الأوساط الغذائية النامي عليها الكالس بعد مرور مدة نمو 30 يوماً على تلك الأوساط . وجاءت نسبة التثبيط للترايميثوبريم والأمينوبترين مطابقة لنسب تثبيط فعالية أنزيم DHFR (الجدول 3).

الجدول 6 : كمية الفوليت الكلية المستخلصة من كالس نبات الحبة السوداء بعد مرور 15 و 30 يوماً من النمو على وسط MS المدعم بـ 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار ومشابهات الفوليت بتراكيز متعددة .

مشابهات الفوليت	التراكيز (مولار)	كمية الفوليت الكلية (مايكروغرام/غرام وزن طري)		النسبة المئوية للتثبيط (%)
		العمر (يوم)		
		15	30	
السلفانيل أمايد	10^{-5}	0.751(±0.081)	0.942(±0.111)	14
	10^{-4}	0.652(±0.022)	0.855(±0.021)	22
	10^{-3}	0.542(±0.062)	0.701(±0.031)	36
	10^{-2}	0.445(±0.071)	0.451(±0.041)	59
	10^{-1}	0.821(±0.082)	0.240(±0.021)	78
الترايميثوبريم	10^{-5}	0.658(±0.011)	0.742(±0.031)	32
	10^{-4}	0.402(±0.003)	0.552(±0.030)	50
	10^{-3}	0.321(±0.002)	0.452(±0.008)	59
	10^{-2}	0.194(±0.001)	0.062(±0.021)	94
الأمينوبترين	10^{-5}	0.502(±0.021)	0.721(±0.031)	34
	10^{-4}	0.406(±0.032)	0.502(±0.011)	54
	10^{-3}	0.295(±0.042)	0.375(±0.061)	66
	10^{-2}	0.194(±0.072)	0.160(±0.051)	85
	10^{-1}	0.102(±0.011)	0.033(±0.012)	97
الوسط القياسي		0.899(±0.211)	1.098(±0.013)	0

كل قيمة تمثل معدل ثلاثة قراءات . (±) يمثل الخطأ القياسي .

المناقشة

تمتاز الكائنات الحية بأنها على مستوى عالٍ من التنظيم، وتعتمد قدرة الكائن الحي على النمو والتكاثر اعتماداً كبيراً على خطوات سير التفاعلات البايوكيمياحياتية المعقدة التي تتم داخل خلاياه وفق نظام خاص ودقيق ، وان تثبيط أي خطوة من خطوات تلك التفاعلات يؤدي بالتالي إلى انخفاض في نمو تلك الخلايا أو موتها (Ekman, 1982). وتعزى أهمية مشابهات الفوليت إلى فعاليتها الإحيائية باستعمالها على نحو واسع كمثبطات لنمو البكتريا والفطريات (Xu et al., 2003; Deering and Michrina, 1982) من خلال عملها في تثبيط عدد من المسارات الأيضية التي تشمل بناء البيورين والثايمدين والمثيونين والسيرين والكلايسين (MuGurre and Bertino, 1981)، فضلاً على دورها في معالجة الإصابة بالأورام السرطانية (Bailey et al., 2003) . أشارت النتائج إلى أن معاملة بذور نبات الحبة السوداء بتراكيز متعددة من مشابهات الفوليت (السلفانيل أمايد, الترايميثوبريم والأمينوبترين) قبل زراعتها أدى إلى انخفاض في معدل نمو البادرات بدلالة انخفاض معدل أطوال الجذور النامية ونسبة إنبات البذور مقارنة بالبادرات النامية من بذور معاملة بالماء المقطر فقط (معاملة المقارنة)، وأدت التراكيز العالية من الترايميثوبريم والأمينوبترين إلى عدم حصول إنبات للبذور نهائياً، وهذا يعزى إلى احتواء البذور الجافة على كميات كبيرة من حامض الفولك والأنزيمين Dihydropteroate synthetase (Jabrin et al., 2003) و Dihydrofolate reductase (Suzuki and Iwai, 1970)، عند تشرب البذور بالماء تتحفز هذه الأنزيمات لبناء مركبات الفوليت الضرورية لانبات البذور ونمو البادرات، ويسبب ارتباط السلفانيل أمايد بالموقع الفعال في أنزيم Dihydropteroate synthatase بدلاً من حامض البارا-أمينوبنزوك، وارتباط الترايميثوبريم بأنزيم Dihydrofolate reductase بدلاً من الداي هيدروفوليت، تثبيط فعالية الأنزيمين السابقين، ويعد التثبيط من نوع التثبيط التنافسي Competitive Inhibition مسبباً منع تكوين التتراهيدروفوليت وبالتالي منع تكوين مركبات الفوليت الضرورية للانقسام والنمو (Jabrin et al, 2003).

سببت مشابهات الفوليت انخفاض في المحتويات الخلوية للكالس من البروتينات والأحماض النووية بنوعيها DNA و RNA والفوليت الكلي بدرجات متفاوتة اعتماداً على نوع المثبط المستخدم وتركيزه، ومن دون شك فان الانخفاض في تلك المحتويات الخلوية أدى إلى الانخفاض في الوزن الطري للكالس، وبنمط مشابه لحد ما لنمط الانخفاض في تلك المحتويات الخلوية للكالس، والانخفاض في المحتويات الخلوية السابقة جاء متفقاً مع الانخفاض في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز، مما يؤكد الدور المهم للأنزيم في بناء البروتينات وتكوينها و DNA و RNA، من خلال تحفيزه لبناء مركب التتراهيدروفوليت الشكل الفعال لحامض الفولك، الذي يعد ضرورياً وأساسياً في بناء نيوكليوتيدات البيورين والثايمدين وبعض الأحماض الأمينية (Appling, 1991).

وأشـارت النتـائج ايـضاً بـأن الترايميثـوبريم والأمينـوبترين سـببا تثبـيط 50% تقريباً لفعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز لكالس نبات الحبة السوداء، عند إضـافتهما بتركيـز (10^{-4} مولار)، وهذا التثبيط مختلف عما وجد في حالة الأنزيمات المستخلصة من خلايا النبات، (عبـود، 1997) إلا أنها مشابهة تقريباً لتلك التي وجدت في اللبائن (Haber et al., 1981) وأشارت النتـائج ايـضاً بـان السلفانيل أمايد لم يؤثر في فعالية أنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز لكالس نبات الحبة السوداء حتـى فـي حالة استخدامه بتراكيز عالية جداً وهذا يؤكد بان السلفانيل أمايد مثـبط متخـصص فـي تثبـيط فعاليـة Dihydropteroate synthetase وليس Dihydrofolate reductase (Prabhu et al., 1998) . وأشارت النتائج ايضاً بان تراكيز الترايميثوبريم والأمينـوبترين المـسببة 100% تثبـيط لفعاليـة أنـزيم الـداي هيدروفوليت ردكتيز في حالة إضافتهما مباشرة إلى نظام التفاعل (In vitro)، تقل بأكثر من 1000 مـرة تقريباً عن التراكيز المسببة تثبيط لفعالية الأنزيم عند إضافتهما إلى الوسط الغـذائي (In vivo)، وربمـا يعزى هذا إلى قلة قابلية امتصاص خلايا الكالس للمشابهات من الوسط الغذائي أو إلى تحطم قسم من هذه المشابهات داخل الخلايا أو وجود نوع من المقاومة لتلك المشابهات داخل الخلايـا (Crosti, 1981) . ان انخفاض فعالية أنزيم DHFR خارج النظام (In vitro) وداخل النظام (In vivo) بوجود الترايميثوبريم أو الأمينوبترين يؤكد بأن هذه المشابهات متخصصة في تثبيط أنزيم الداي هيـدروفوليت ردكتيـز (Crosti, 1981).

وبـذلك يمكـن القـول بـأن مـشابهات الفوليـت التـي تمنـع تكـوين التتراهيـدروفوليت أو تقلـل منهـا، تعـد مـواداً سـامة لكـل الخلايـا وخاصـة الخلايـا سـريعة الانقـسام كخلايـا الكالس (Mohammed et al., 1989b ; عبود، 1997) وخلايا المعلقـات الخلويـة (Hewertson, and Collin, 1984) وخلايا السرطان (Bailey et al., 2003) .

المصـادر العربية

الجلبي، قصي عبد القادر، 1991. الأحماض النووية . دار الكتب للطباعـة والنـشر، مطبعـة جامعـة الموصل، العراق.

دلالي، باسل كامل، 1983. فهم الأنزيمات (ترجمة)، مطبعة جامعة الموصل، العراق .

سليمان، أزهار حسين علي، 2001. دور بعض منظمات النمو ومركبات الترايازول مع السلفانيل أمايد في نمـو وتمـايز الكـالس ومحتـوى فيتـامين C فـي نبـات الفجـل *Raphanus sativus* . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

عبود، ساجدة عزيز، 1997. دور حامض الفولك في بناء البريميدينات والبيورينات في كالس نبات الخس (*Lactuca sativa* L.). أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

النعيمي، مها محمد طه حسن، 2004. تأثير تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل أمايد في استحداث ونمو الكالس والمزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.) . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

Albrecht, A.M. and Hutchison, D.J., 1970. Folate reductase of the amethopterin-resistant *Streptococcus faecium* var. durans A.I. inhibition by amethopterin and methosynine a new quinazoline antifolate. Mol. Pharmacol. 6: pp.323-334.

Appling, D.R., 1991. Compartmentation of folate mediated one carbon metabolism in eukaryotes FASEB J. 5: pp.2645-2651.

Bailey, L.B., Gail, C.R. and Gail, P.A.K., 2003. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer, evolving science. J. Nutr. 133: pp.1961-1968.

Ball, W., 1955. Inhibition of excised tomato roots by sulfanilamide and its reversal by P-aminobenzoic acid and n-pteroylglutamic acid. Plant. Physiol. 30: pp.151-153.

Buskin, S.E., Newcomer, L.M., Konisky, L.A., Hootom, T.M., Spach, D.H. and Hopkins, S.G., 1999. Effect of trimethoprim-sulfaamethoxazole as *Pneumocystis cariarivi pnemonia prophyloxis* on bacterial illness. *Pneocystis cannii*. Pneumonia and death in presons with AIDS.J. Acquir. Imm Defic, Syndr. Hum. Retrovirol.20:pp.201-206

Crosti, P., 1981. Effect of folate analogues on the activity of dihydrofolate reductase and on the growth of plant organisms. J. Exp. Bot., 32: pp.717-723.

Deering, R.A. and Michrina, C.A., 1982. Inhibition of DNA precursor metabolism in *Dictrostelim discoideum.* Antimicrobial agents and Chemoth. 21: pp.764-769.

Ekman, B.T., 1982. Studies on dihydrofolate reductase and trimethoprim resistance in *E.coli*. Acta Universitatic Upsaliensis, Abstracts of Uppsala Dissertations Faculty of Pharmancy. pp.1-41.

Esposito, D., Go, G. Szabo, P., De Angelis, P., Weksler, M. and Siniscalco, M., 1989. Chromosomes of older humans are more prone to aminopterine-induced breakage. Proc. Natt. Acad. Sci. USA. 86: pp.1302-1306.

Forbes-Jones, R., 1944. P-aminobenzoic acid its on the sulfanimide inhibition of the growth of oat roots. Nature, 153: pp.379-380.

Haber, A.D., Beverly, M.S., Kiely, L.M. and Sckimke, T.R., 1981. Properties of an altered dihydrofolate reductase encoded by amplified genes in cultured mouse fibroblast. J. Biol. Chem.: 286: pp.2501-2510.

Hewertson, N.A. and Collin, H.A., 1984. Mechanism of action of asulum in celery tissue cultures. Weed. Res. 24: pp.79-83.

Hinton, G.C.F. and Maulood, B.K., 1979. A modified membrane filtration methods for Phytolankton enumeration in marine and fresh water ecosystem. Trop. Eco. 192:194p.

Iwai, K., Nakagawa, S. and Okinaka, O., 1962. The growth inhibition of the germination seeds. The growth inhibition of the germination by sulfonamides and its reversal by folic acid analogues. J. Vitaminol. 8: pp.20-29.

Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R. and Rebeille, F., 2003. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. Plant. Physiol. 131: pp.1431-1439.

Mohammad, A.M.S., Abood, S.A. and Al-Salih, H.S., 1991. Effect of folate analogous on protein, RNA and DNA contents of lettuce callus. Iraqi. J. Biol. Sci. 11: pp.5-25.

Mohammed, A.M.S., Al-Chalabi, K.A. and Abood, S.A., 1989. Effect of folate analogues on the activity of dihydrofolate reductase and callus growth of sunflower. J. Exp. Bot. 40: pp.70-706.

MuGuire, J.J. and Bertino, J.R. 1981. Enzymetic synthesis and function of polyglot-ametes. Mol. Cell. Biochem. 38: pp.19-48.

Prabhu, V., Chatson, K.B., Lui, H., Abrams, G.D. and King, J., 1998. Effects of sulfanilamide and methotrexate on ^{13}C Fluxes through the glycine decarboxylase / serinehydroxymethyltransferase enzyme system in Arabidopsis. Plant Physiol. 116: pp.137-144.

Ravanel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R. and Rebeille, F., 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants. Molecular and functional. Characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folypolyglutamate sunthetase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol. 98:15360-15365.

Skold, O., 2001. Resistance to trimethoprime and sulfoamide. Vet. Res. 32: pp.261-273.

Stokstad, E.L.R., 1954. The Vitamins Chemistry, Physiology and Pathology. Eds., Seberell, W.H.Jr. and Harris, R.S.III. Academic press, New York.

Suzuki, N. and Iwai, K., 1970. The occurrence and properties of dihydrofolate reductase in pea seedling. Plant and Cell Physiol. 11: pp.199-208.

Xu, Y., Georges, F., Gerday, G. and Glansdorff, N., 2003. Moritella cold-active dihydrofolate reductase: Are there natural limits to optimization of catalytic efficiency at low temperature. J. Bacteriol. 185: pp.5519-5526.