معايرة الديجوكسين بطريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (ELISA) في نبات الديجيتال الأرجواني *Digitalis purpurea* الخاضع لتأثير الملوحة

عصام الشماع*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: يقوم النبات باصطناع المواد الأولية من خلال عمليات الاستقلاب الأولي، وذلك من أجل الاستمرار في العمليات الحياتية الضرورية.

أمَّا في الحالة التي يتعرض فيها النبات إلى تثبيط النمو نتيجة للظروف البيئية الشديدة مثل الملوحة فإن نبات الديجيتال الأرجواني المستخدم في هذه التجربة يغيّر من قدراته الحيوية مثل الاصطناع الحيوي من أجل تشكيل مواد أخرى ضرورية تدخل في عمليات الاستقلاب الثانوي، ومن ثَمَّ تؤثر في اصطناع الغليكوزيدات المقوية للقلب Cardenolides ومنها الديجوكسين.

المواد البحث وطرائقه: زرعت نباتات الديجيتال الأرجواني Digitalis purpure في أوساط زرعية مختلفة تتضمن أربع مجموعات، المجموعة الأولى وهي الشاهد Control ويضاف إلى المجموعات الثلاث الباقية تراكيز من محلول كلور الصوديوم NaCl ، وهي على التوالي 80,40,20 mM خلال مدة زمنية تبلغ عشرين أسبوعاً، ثم جرت مقايسة الديجوكسين بطريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم ELISA.

النتائج: ازدادت محتويات الديجوكسين في أوراق نبات الديجيتال الأرجواني وجذوره والمزروعة في الوسط الشاهد Control أو في المستويات المنخفضة من الملوحة بتركيز 20mM وذلك في الأسبوعين الثالث والعشرين والرابع والعشرين على التوالي، ثم انخفضت بعد ذلك.

تبلغ محتويات الديجوكسين Digoxin في جذور النباتات في الملوحة 40mM حداً أقصى في الأسبوع التاسع عشر، وهذا يتوافق مع قيمة العلاقة الأيونية K^+/Na^+ التي كانت أقل من الواحد، وكذلك عند قيمة العلاقة الأيونية Na^+/Ca^{2+} التي كانت أعلى من 0.35.

الاستنتاج: يؤدي الخلل الأيوني الخفيف إلى تنشيط في تراكم الديجوكسين في الجذر، وبشكل أكبر في أوراق الديجيتال الأرجواني Digitalis purpurea .

كلمات مفتاحية: الديجيتال الأرجواني، الملوحة، الديجوكسين، الغلوكوزيدات المقوية للقلب، ELISA.

* أستاذ مساعد- كلية الصيدلة – جامعة دمشق

Assaying Digoxin by Way of Enzyme Linked Immune Standardized Assaying (ELISA) in *Digitalis Purpurea* Which is Under the Effect of Salinity

Isam Al-Shamma *

Abstract

Background & Objective: The plant creates raw materials through primal metabolism in order to maintain crucial lively operations.

While in the case that the plant is subjected to inhibition of growth as a result to environmental circumstances characterized by a high level of salinity, the Digitalis Purpurea used in this experiment changes its biological potential like bio-creation to form other necessary materials that take part in secondary metabolism operations, and hence affect the creation of glycosides that strengthen the heart, which Digoxin is one of.

Material& methods: Digitalis purpurea plants were planted in different assays including 4 sets, the 1st set is the witness "control", different concentrations of the NaCl solution are added to the three remaining sets, and they are respectively mM 80, 40, 20 within a time period of 20 weeks, then an operation of Assaying Digoxin by way of Enzyme Linked Immune Standardized Assaying (ELISA) was performed.

Results: Digoxin content increased in the leaves and roots of the Digitalis Purpurea plant, planted in the witness "control" assay, or in the low salinity level assays with 20mM concentration in the 23rd and 24th weeks respectively, then it decreased.

Digoxin content in plant roots in 40mM salinity reach its maximum in the 19th week, and that agrees with the ionic relation K^+/Na^+ less than /1/, and at the relation value Na^+/Ca^{2+} higher than 0.35.

Conclusion: The slight ionic disorder leads to an increase in the accumulation of Digoxin in the root, and more in the leaves of the Digitalis Purpurea plant.

Key words: Digitalis Purpurea, salinity, Digoxin, heart strengthening glycosides, ELISA.

* Associated prof. Faculty of Pharmacy, Damascus University.

مقدمة:

تمتاز النباتات بقدرتها الفائقة على الاصطناع الحيوي، فضلاً عن أنَّها تعمل على اصطناع المواد الضرورية من أجل الاستمرار في الحياة تقوم أيضاً باصطناع مواد أولية قادرة بدورها على اصطناع عدد كبير جداً من المركبات الأخرى التي تساعد النباتات في عملية التكيف مع البيئة المحيطة بها[1].

يقوم النبات باصطناع المواد الأولية بشكل أساسي، إلاّ أنه وفي الحالة التي يجري فيها تثبيط النمو بشكل جزئي أو بشكل كامل نتيجة لأسباب طبيعية (مثل التوازن الهرموني الذي يؤدي إلى حدوث اختلاف شديد في الصفات الخلوية أو بسبب تأثير الظروف الشديدة لعوامل البيئة أو ما يسمى بتأثير الشدة البيئية) فإن الكمية الزائدة من السلاسل الفحمية التي لم يُستَفَدْ منها في عمليات الاستقلاب الأولي نتيجة الشروط البيئية (تأثير الملوحة) يمكن أن تأخذ منحى آخر، وذلك من أجل تشكيل واصطناع المواد التي تقوم بإنتاج المواد الخاصة بعمليات الاستقلاب الثانوي[2].

لنبات الديجيتال الصوفي ترتيب وراثي خاص يسمح باصطناع المواد الخاصة بعمليات الاستقلاب الأولي، فضلاً عن اصطناع المواد الخاصة بعمليات الاستقلاب الثانوي، ويأتي في مقدمتها المكونات الفعالة ذات الأهمية الصيدلانية المعروفة باسم الغلوكوزيدات المقوية للقلب Cardenolides. [3]

وفي الحالة التي يعرض فيها نبات الديجيتال الأرجواني (وهو نبات كاره للملوحة) إلى ظروف بيئية شديدة الملوحة، فإن النبات عند ذلك يغيّر من قدرته الحيوية على الاصطناع الحيوي وذلك من أجل تشكيل مواد أخرى مناسبة تؤثر في عملية الحَلُول، وذلك من خلال مقاييس تختلف شدتها طبقاً لدرجة الملوحة المطبقة على النبات[4].

ومن جهة أخرى فإن تعطيل عملية النمو يمكن أن يؤدي بالنبات إلى تغيير في عمل مجموعة المواد، وذلك من اصطناع المواد الضرورية للنمو نحو اصطناع المواد المتعلقة بعمليات الاستقلاب الثانوي وتكوينها.

درسنا في هذا البحث الاختلاف الذي سيظهر على النبات بالمقارنة بدرجة الملوحة المطبق عليه. فضلاً عن دراسة تأثير الشدة الملحية في عملية اصطناع الغلوكوزيدات المقوية للقلب Cardenolides، وبشكل خاص الديجوكسين.

تؤدي الملوحة إلى حدوث أضرار بليغة في النباتات، وذلك من خلال الذبول الذي يصيبها والنقصان الكبير في الإنتاج الزراعي. يعتمد الضرر الناتج عن الملوحة في النباتات على كل من التركيز الأيوني وعلى نوعية الأيونات المعنية الموجودة في الخلايا النباتية[5].

تؤثر الملوحة في كل من عمليات النمو والاستقلاب في النباتات، وذلك بصيغة خاصة تختلف بسحب نوع الأيونات التي توجد بكمية زائدة.

يمكن للنبات أن يحافظ على حياته في بيئة مرتفعة الملوحة بواسطة الآلية التي يستخدمها النبات لامتصاص العناصر الضرورية لنموه في بيئة شديدة الملوحة، إذْ إن امتصاص كميات كبيرة من أيونات Na^+ من قبل الجذور النباتية يمكن أن يؤدي إلى حدوث صعوبات تعيق امتصاص عناصر أخرى مثل أيونات K^+ و PO_4 . [6]

يمكن القول: إن الجذور تحافظ على ضغط طولي مناسب لاستمرار حياتها، وذلك عن طريق امتصاص كل من أيونتي K^+ , Na^+ الذي يجري بطريقة تنافسية، مما يؤدي إلى حدوث عوز في أيونة K^+ يجب المحافظة على كمون الغشاء ثابتاً في الخلايا النباتية، وذلك من خلال التوزع النسبي لكل من الأيونات الموجبة والسالبة، ومن ثَمَّ ينبغي الموافقة على النفوذية الاصطناعية وعلى معركة المرور عبر الغشاء.

تحافظ أيونات Ca^{+2} على سلامة تركيب الغشاء الخلـــوي لأن وجود ما يتحكم بدخول الأيونات الموجبة Cationes.[7]

المواد والطرائق المستخدمة:

شروط الزرع:

تم الحصول على بذور الديجيتال الأرجـــواني *Digitalis purpurea* من المعهد النباتي Botanic institute في مدينة برشلونة. غسلت البذور بكمية كبيرة من الماء المقطـــر، بهدف إزالة المواد الشائبة التي تعيق نمـــو النبـــات، ثـــم نشرت (البذور) وتركت لتجف بالهواء الطلق، وذلك لكي تبذر بشكل متجانس فـــي اللحظـــة المناســـبة. ويحـــضر أصيص للزرع وذلك بوضع مزيج مـــن الرمـــل ومـــادة الفيرميكوليـــت Vermiculite بنـــسب متـــساوية، توضـــع الأوعية الخاصة بالزرع في مكان مناسب دون تكييف. ثم يرطب المستنبت بالماء المقطر وتزرع بـــذور الـــديجيتال الأرجواني في المستنبت ويغطى بطبقة رقيقة من المزيج نفسه المماثل الموجود في أصيص الزرع.

تجري المحافظة على الرطوبة بشكل دائم في هذه الأوعية بإضافة المقدار اللازم من الماء المقطر، وعنـــدما تبـــدأ البذور بالإنتاش Germination ترطـــب البـــوادر الفتيـــة الناشئة بمحلول مغذٍ Arnon & Hoagland الـــذي يحتـــوي على العناصر المعدنية المغذية، كما هو مبّين في الجدول (1). يحتوي هذا المحلول على العناصر المعدنية جميعهـــا بنوعيها الندرة والوفرة Macro and Micro element بنسب ملائمة لنمو النباتات بصورة جيدة.

الجدول (1) التركيب الكيميائي للمحلول المغذي Arnon & Hoagland

تركيز المحلول المغذي	العناصر المغذية
2.5000mM	$Ca(NO_3)_2$
2.5000mM	KNO_3
1.000mM	$MgSO_4$
0.5000mM	$KH2PO_2$
5.0000ml	EDTA-Fe
0.235mM	H_3BO_3
0.0072mM	$MnCl_2$
0.0004mM	$ZnCl_2$
0.0002mM	$CuCl_2$
0.0006mM	MoO_3

تجري المحافظة على هذه الشروط من الزراعـــة حتـــى يصبح نمو النباتات ملائماً لأجل عمليـــة نقـــل النباتـــات Transplant (بعد نحو 8 أسابيع من عملية الإنتـــاش). إذْ ينقل النباتات إلى أصص زرعية جديدة تحتوي أيضاً على نسب متساوية من الرمل ومادة الفيرميكوليت.

وزَّعت النباتات إلى أربع مجموعات متساوية على التوالي:

- المجموعة الأولى: تسقى بمحلول المغذي أرنون – هوغلاند [8] Arnon Hoagland ويستعمل بمنزلة شاهد Control.

- المجموعة الثانية: تسقى بالمحلول المغذي السابق نفسه مضافاً إليه ملح NaCl حتى يصبح التركيز 20mM.

- المجموعة الثالثة: تسقى بالمحلول المغذي نفسه السابق مضافاً إليه ملح NaCl حتى يصبح التركيز 40mM.

- المجموعة الرابعة: تسقى بالمحلول المغذي السابق نفسه مضافاً إليه ملح NaCl حتى يصبح 80mM.

تترك البادرات النباتية لتنمو في الشروط مدة زمنية تزيد عن أربعة أسابيع (البيئة الجديدة) ومنذ هذه اللحظة يتم البدء باستخراج العينات النباتية التي جُذِّرت خلال الأسابيع التالية من النمو 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25.

تستخرج النباتات من الأصص الزرعية بحذر شديد خوفاً من إصابة الجذور بالتلف، ثم يفصل الجذر عن الجزء الهوائي.

استخدمت معايير لقياس النمو، وذلك من خلال تحديد الوزن الجاف والوزن الرطب وطول النبات. فضلاً عن معايرة محتويات الأيونات الآتية: الصوديوم Na^+، البوتاسيوم K^+، الكالسيوم Ca^+ (استخدمت طريقة Videl, 1985) [9].

معايرة الأيونات Ca^+, K^+, Na^+

استخدمت طريقة Videl, 1985 . تجري معايرة الأيونات Ca^+, K^+, Na^+ بواسطة التحليل الطيفي بالقذف بواسطة البلاسما (غاز مؤين يحتوي على أعداد متساوية من الأيونات والإلكترونات الموجية) استخدام جهاز التحليل الطيفي (مقياس الطيف Spectrometer) متعدد الأقنية/متسلسل من طراز Plasma lcp sy 70 plus يعطى الاسم الخاص بالبلاسما إلى غاز مشحون جزئياً، حيادي من الناحية الكهربائية ضمن مجموعة ويحجز في حقل كهرمغناطيسي. وتكون درجات الحرارة في البلاسما (10000-4000°C) وهي أعلى بشكل واضح من اللهب الكيميائية. وهذا بدوره يشكل أساس الفائدة في تطبيقه كمصدر للقذف في مقياس الطيف إذْ ينبغي تفكيك التركيبات الكيميائية وحلّها.

استخلاص الغلوكوزيدات المقوية للقلب: Extroccion of cardenolides

تتمثل إحدى الصعوبات في تحليل الستيروئيدات في الخلاصات النباتية هو وجود كميات لابأس بها من المواد الدسمة الأخرى والمواد المشابهة الأخرى التي يمكن أن تتداخل في مثل التحاليل المذكورة آنفاً.

جرت عملية الاستخلاص في هذا البحث بالاعتماد على طريقة Orosz & col.[10]

توضع الأجزاء النباتية (الأوراق والجذور) وتجفف في محم بدرجة 60°C حتى الوزن الثابت ثم تطحن في هاون زجاجي حتى الحصول على مسحوق ناعم ومتجانس.

ينقع مقدار غرام واحد من المسحوق السابق في الميثانول 70% مدة 3 دقائق ثم يمزج ويرج جيداً مدة دقيقة.

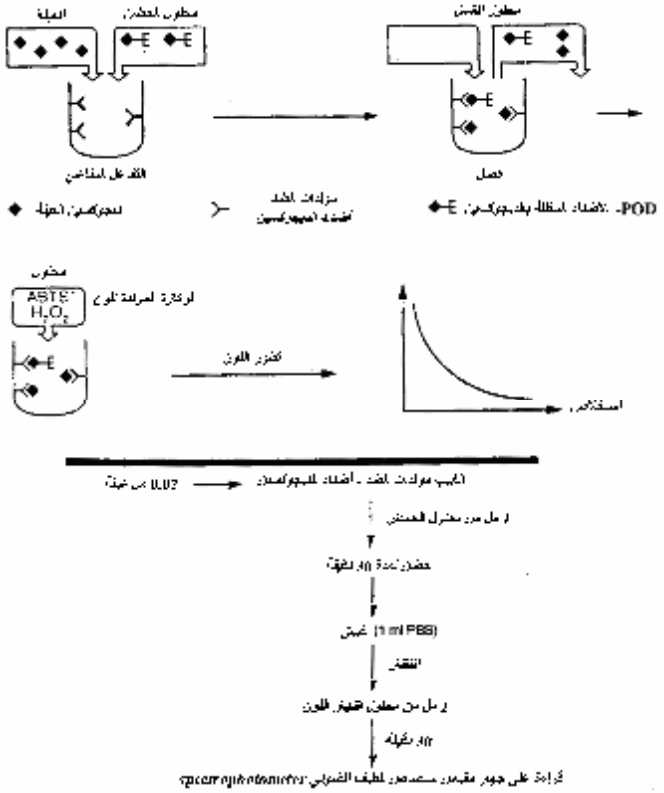
يفيد وجود الميتانول في تجنب عملية تحول الغلوكوزيدات الأولية إلى غليكوزيدات ثانوية بواسطة الإنزيمات الخاصة لتحويل الغلوكوزيدات الأولية إلى غلوكوزيدات ثانوية [11].

تجري عملية تنبيذ المنقوع السابق بسرعة تقدر بـ 2000 دورة في الدقيقة مدة 15 دقيقة، حتى الحصول على سائل طافٍ يستخدم في تحديد كمية الديجوكسين بطريقة ELISA.

مقايسة الديجوكسين: Determination of digoxin

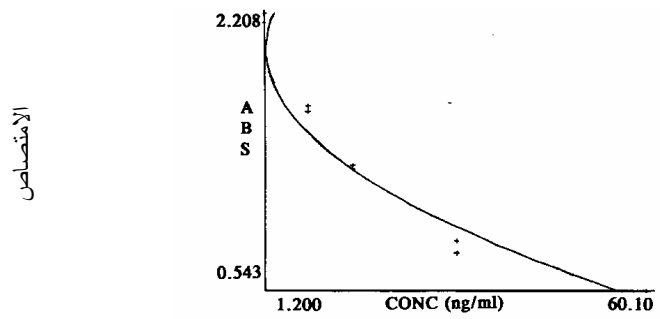
جرت مقايسة الديجوكسين بطريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم ELISA (enzyme immunoassay) (Hoffsurmmer,1986) (لشركة بهرنغرمانهايم Bohringer

(Mannheim) لمقايسة الديجوكسين بشكل كمي. تعتمد هذه الطريقة على مبدأ المنافسة بين الديجوكسين الموجود فـــي العينات النباتية المسجلة والديجوكسين الموسوم بالأضـــداد Antibody للارتباط مع المستضدات Antigen المثبتة على الجدران الداخلية للأنابيب[12]. شكل (1).



الشكل (1) مخطط المراحل المتبعة في مقايسة الديجوكسين بطريقة الـــ ELISA

يضاف إلـــى الأنابيـــب البلاســـتيكية المغطـــاة بأضـــداد الديجوكسين Anti-body مقدار 0.02 مل من الخلاصـــات النباتية ثم يضاف بعد ذلك مباشرة مقدار 1 مل من محلول الحـــضن (الحـــاوي علـــى مستـــضدات Antigen مـــع الديجوكسين المرتبط بإنزيم البيروكسيداز الذي يرمز لـــه بـــ POD) مدة 20 دقيقة، وذلك بدءاً من لحظـــة وضـــع العينات. ثم تُحضن مدة 30 دقيقة ثم يشفط المحتـــوى ثـــم تملأ الأنابيب بعد مدة عشر دقائق بمحلول الغسل (دارئـــة PBS) ثم تعاد مدة الانتظار. بعدها يؤخذ بواسطة 1 مـــل من محلول مولد اللون الأنبوب بعد 10 دقائق ثم يحـــضن العينات النباتية من الديجيتال الأرجواني مـــدة 30 دقيقـــة دون تحريك بحيث تجري عملية تجنب التعرض المباشر لأشعة الشمس بعد انقضاء الوقت المحدد، تقـــرأ الكثافـــة الضوئية بموجة طولها 420nm في أنابيب من الزجاج مع تحضير المنحنى العياري للسلسلة العيارية، وذلك بالمقارنة بمحلول شاهد Control ذي تركيز محدد (1 نانوغرام لكل ميليغرام من الوزن الجاف للنبات).



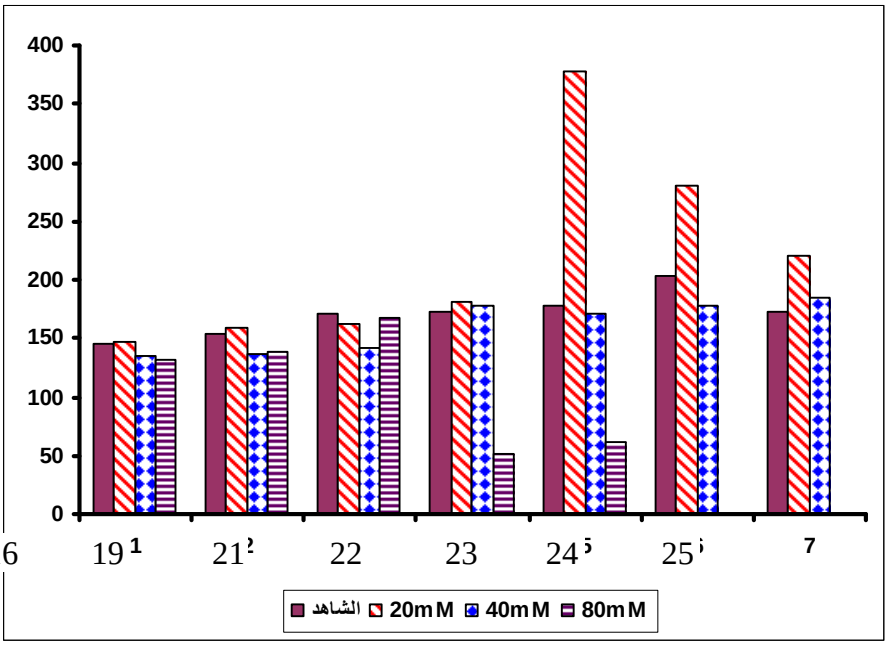
الشكل رقم (2) المنحنى العياري للديجوكسين

النتائج: أوراق نباتات الشاهد Control، وكذلك في أوراق النباتات المزروعة في الوسط الملحي، وكذلك يبيّن الجدول (3) الدلالات الإحصائية.

يبيّن الجدول (2) محتويات الديجوكسين معبراً عنها بـــ نانو غرام/ لكل غرام من الوزن الجاف الموجـــودة فـــي

الجدول (2) محتوى الأوراق من الديجوكسين معبراً عنها بالنانوغرام/لكل غرام وزن جاف

80mM	40mM	20mM	شاهد	الأسابيع
4.8=131.64	3.9±135.41	2.5±147.23	2.1±145.11	16
1.9±139.12	1.5±137.09	2.9±158.67	2.4±153.75	19
1.4±168.13	4.3±142.51	2.1±162.31	1.8±171.78	21
1.1±51.81	5.1±177.41	2.8±181.71	4.1±173.01	22
2.7±061.49	3.1±171.131	5.13±377.38	1.7±177.24	23
0	4.1±178.44	5.1±279.50	3.9±203.12	24
0	2.1±185.20	3.9±219.81	2.9±172.71	25



المخطط البياني لتركيز الديجوكسين في الأوراق

الجدول (3) الدلالات الإحصائية

الأسابيع	شاهد	20mM	40mM	80mM
16		**	**	***
19	*	*	**	**
21		*	***	*
22		*	***	-
23		**	NS	-
24		**	*	-
25		**	*	-

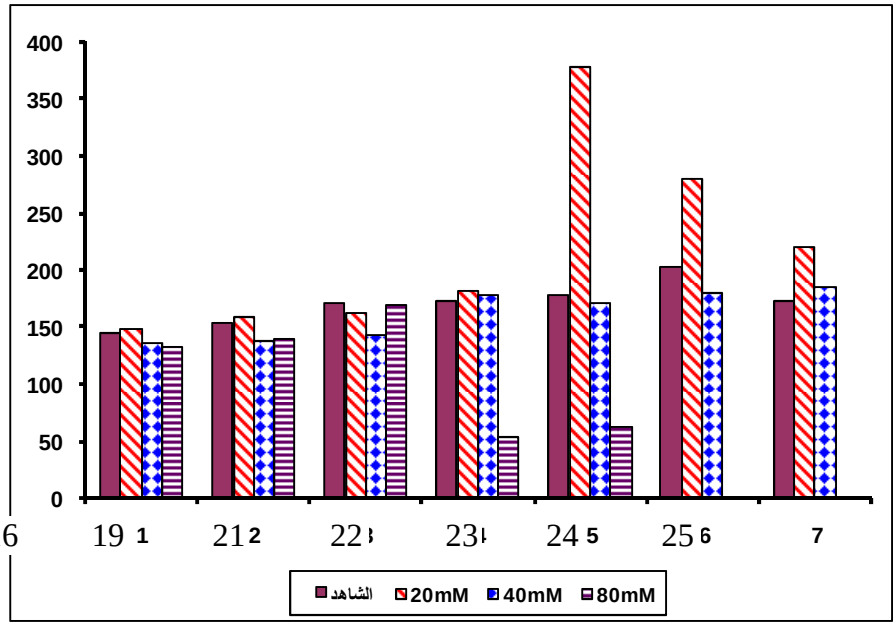
Signification: N.S *= $p \geq 0.05$, **=$p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$

تزداد محتويات الديجوكسين في أوراق النباتـــات ســـواء أكانت من الشاهد أم تلك المزروعة فـــي الوســـط 20mM وذلك في الأسبوعين الثالث والعشرين والرابع والعشرين على التوالي، ثم تنخفض بعد ذلك. تشير هذه الظاهرة إلى أن الاصطناع الانتقائي للديجوكسين يـــستمر طيلـــة مـــدة التجربة تقريباً، بمعنى أن الملوحة تسهل من عملية تحويل الغلوكوزيدات البوربورية إلى ديجوكسين فمـــن الناحيـــة العملية تثبط عملية تحطيم الديجوكسين خلال مدة النمـــو الطبيعي للنباتات[13].

يبيّن الجدول (4) محتويات الديجوكسين في جذور النباتات الشاهد المعالجة بالملح. إذْ يلاحظ على أن الديجوكـــسين يتراكم بشكل منفصل فـــي الأوراق، فـــي حـــين تكـــون مستويات الديجوكسين في جذور النباتات التـــي عولجـــت بالملح أخفض بكثير. كما أن الجـــدول (5) يـــشير إلـــى الدلالات الإحصائية.

الجدول (4) محتوى الجذور من الديجوكسين معبراً عنها بالنانوغرام/لكل غرام وزن جاف

الأسابيع	شاهد	20mM	40mM	80mM
16	0.4±11.69	0.69±9.91	19.27±1.1	0.68=29.864
19	1.2±12.49	0.79±10.95	0.39±35.34	7.9±0.91
21	1.9±13.21	2.19±11.13	2.1±31.21	1.119±5.17
22	1.9±14.47	2.19±12.09	1.81±21.49	-
23	1.8±15.11	2.21±17.19	1.4±15.91	-
24	2.92±16.19	3.94±29.115	3.94±18.12	-
25	4.9±18.13	3.7±30.89	1.91±8.95	-



المخطط البياني لتركيز الديجوكسين في الجذور

الجدول (5) الدلالات الإحصائية

80mM	40mM	20mM شاهدcontrol/	الأسابيع
*	**	**	16
***	***	**	19
***	***	***	21
***	*	***	22
***	*	***	23
-	***	***	24
-	*	N.S	25

Signification: N.S=p≥0.05 *= p ≥ 0.05 , **=p≤0.01, *** = p≤0.001

هناك كمية ضئيلة من الديجوكسين في جذور النباتات الشاهد التي ترتفع طيلة مدة التجربة، تتضمن كتلة جذور النباتات التي تنمو في الوسط 20mM محتويات من الديجوكسين على النسق السابق نفسه، إذْ تبلغ مستويات أعلى مما هي عليه في جذور نباتات الشاهد.

تبلغ محتويات الديجوكسين في جذور النباتات التي تنمو في الوسط 40mM حداً أقصى في الأسبوع التاسع عشر، ثم تتناقص بعد ذلك طيلة مدة التجربة. يمكن الاستنتاج أن هذا المقدار الأعظمي من الديجوكسين يتوافق مع قيمة للعلاقة الأيونية K^+/Na^+ تكون مفيدة ومناسبة لهذه الجذور، تتناقص قيم الديجوكسين في جذور النباتات التي تنمو في الوسط 80mM طيلة مدة التجربة.

المناقشة:

تؤدي إضافة الملح إلى الوسط الخارجي إلى حدوث خلل أيوني يؤثر بدوره في عمليات الاستقلاب المختلفة في النبات، ولهذا السبب سنشرح في البداية كلاً من المحتويات الأيونية والعلاقات الأيونية التي تؤثر في النبات، ومن ثَمَّ سنقوم بشرح التأثيرات المتعلقة بمستوى مختلف المواد الاستقلابية.

تحتوي جذور نباتات الشاهد على مستوى منخفض جداً من أيونات الصوديوم Na^+، كما تحتوي الأوراق بدورها على مستوى أخفض بكثير من أيونات الصوديوم Na^+، وهذا الأمر طبيعي نظراً إلى افتقار المحلول المغذي لأيونات الصوديوم Na^+، ويمكن تفسير وجود هذه الكمية الضئيلة من أيونات الصوديوم Na^+ بسبب وجود بعض الشوائب في الوسط الزرعي.

تزداد محتويات أيونات الصوديوم Na^+ بشكل ثابت في جذور النباتات الخاضعة للملوحة المنخفضة (20mM NaCl). وتبلغ محتويات أيونات الصوديوم Na^+ حداً أقصى في جذور النباتات الخاضعة لكل من الملوحة المتوسطة والمرتفعة (40 & 80 mM NaCl)، وذلك خلال الأسبوعين السادس عشر والحادي والعشرين على التوالي.

تكون محتويات أيونات البوتاسيوم K^+ مرتفعة في كل من أوراق نباتات الشاهد وجذوره Control خلال سير التجربة.

في حين تكون مستويات هذه الأيونات $\left(K^+\right)$ منخفضة في جذور النباتات الخاضعة للملوحة مما يؤدي إلى حدوث عوز في أيونات البوتاسيوم K^+.

يمكن لأيون الصوديوم Na أن تحل محل أيون البوتاسيوم K^+ في بعض وظائفها.

يتبّين من خلال هذا البحث أن الأوراق الخاضعة للملوحة تحتوي على مستويات من أيونات البوتاسيوم K^+ أعلى بكثير مما هي عليه في أوراق نبات الشاهد Control، وهذا يعني أن الجذور تقوم باحتباس أيونات الصوديوم Na^+ غير أنها تقوم في الوقت نفسه بنقل كمية أكبر من أيونات البوتاسيوم K^+ إلى الأجزاء الهوائية (الأوراق).[14]

اتفقت النتائج التي حصلنا عليها مع نتائج Grenway H. [15] الذي لاحظ وجود زيادة في المحتوى الأيوني لكل من

أيون الصوديوم Na^+ والبوتاسيوم K^+، وذلك في أوراق النباتات الحساسة تجاه الملح.

أثبتت نتائجنا من خلال الشروط التجريبية المـستخدمة [14] أن الحد الملائم لنمو كل من جـذور نباتـات الـديجيتال الأرجواني وأوراقه يتوافق مع قيمة للمجمـوع الأيـوني $Na^+ + K^+$ تعادل ضـعف قيمـة المجمـوع الأيـوني الموجودة في نباتات الشاهد Control.

أثبت كـل مـن Wittington, J.; smith, F.; [16] أَّن أيـون الكالسيوم Ca^{++} تؤدي دوراً واقياً في سلامة الأغـشية، كما أنها تحافظ على خاصية النفوذ نـصف الاصـطفائي half permeability التي تـؤدي إلـى اسـتبعاد أيونـات الصوديوم Na^+.

تبقى مستويات أيونات الكالسيوم Ca^{++} مرتفعة في جذور وأوراق نباتات الشاهد Control وذلك خلال مـدة سـير التجربة.

تزداد مستويات أيونات الكالسيوم فـي جـذور النباتـات الخاضعة للملوحة خلال مدة التجربة، إلا أنها تبقى أخفض مما هي عليه في جذور نباتات الـشاهد Control، حيـث تتناقص مستويات أيونات الكالسيوم Ca^{++} وذلـك مـع ازدياد درجة الملوحة المطبقة.

العلاقة الأيونية Na^+ / Ca^{++}

تبقى قيمة العلاقة الأيونية Na^+ / Ca^{++} منخفضة جداً في جذور نباتات الشاهد Control في حين تكون قيمـة هـذه العلاقة أعلى بكثير، وذلك في جذور النباتات الخاضـعة للملوحة.

يمكن أن نربط بشكل عام التلف الحاصل فـي الأنـسجة النباتية بالقيمة المرتفعة للعلاقة الأيونية Na^+ / Ca^{++}، إذْ يلاحظ وجود تثبيط لعمليات الاستقلاب، وذلك عندما ترتفع هذه العلاقة إلى ما فوق 0.35، ولذلك تعاني جذور النباتات الخاضعة للملوحة المنخفضة (20mM NaCl) وهـذا مـا يحدث أيضاً في جذور نباتات المجموعتين الأخيرتين (40 & 80 mM NaCl).

تكون قيمة العلاقة الأيونية Na^+ / Ca^{++} منخفضة فـي أوراق نباتات الشاهد Control، في حين تكون قيمة هـذه العلاقة مرتفعة بشكل واضح في أوراق النباتات الخاضعة للملوحة إذْ تبلغ القيمة 0.35 بعد نحو عـدة أسـابيع مـن بلوغها في الجذور. وهذا يعني وكما أشير إليه سـابقاً أنَّ الجذور تصاب أولاً بالتلف ثم تصاب الأوراق.

يتبّين من خلال نتائج الدلالات الإحـصائية المـستخدمة بنظام (SPSS) أن مستويات الديجوكـسين فـي النباتـات الخاضعة للملوحة المنخفضة (20mM) تكون هي الأكثـر ارتفاعاً في العينات جميعها من تلك الموجودة في نباتـات الشاهد، كما أن المقدار الأعظمي من الديجوكسين تبيّن لنا أنّه موجود في أوراق النباتات التي تنمـو فـي الوسـط الملحي 20mM ، وذلك في الأسبوعين الثالث والعـشرين والرابع والعشرين على التوالي من المعالجة، ثم تنخفض بعد ذلك، تشير هذه الظاهرة إلى أن الاصطناع الانتقـائي للديجوكسين يستمر طيلة مدة التجربة تقريباً، بمعنـى أن الملوحة تسهل من عملية تحويل الغلوكوزيدات البوربورية إلى ديجوكسين، فمن الناحية العملية يجري تثبيط العمليـة لعملية تحطيم الديجوكسين خلال مدة النمو الطبيعي[14].

تزداد كمية الديجوكسين في أوراق النباتات التي تنمو في الوسط الملحي 40mM حتى الأسبوع الثاني والعشرين، ثم تنخفض بعد ذلك على الرغم مـن وجـود الديجوكـسين بمستويات مرتفعة جداً مشابهة لتلك الموجودة في نباتـات الشاهد. وترتفع قيم الديجوكسين في أوراق النباتات التـي تنمو في الوسط الملحي 80mM خلال مدة التجربة حتـى الأسبوع الحادي والعشرين، ثم تتناقص بعد ذلك وتنخفض بسبب التموت Necrosis الذي يطرأ على النباتات [17].

يبيّن الجدول (4) محتويات الديجوكسين في جذور النباتات الشاهد المعالجة بالملح. إذْ يلاحظ على أن الديجوكسين يتراكم بشكل منفصل في الأوراق، في حين تكون مستويات الديجوكسين في جذور النباتات التي عولجت بالملح أخفض بكثير. وتوجد كمية ضئيلة من الديجوكسين في جذور النباتات الشاهد Control التي ترتفع طيلة مدة التجربة، كتلة جذور النباتات التي تنمو في الوسط 40mM محتويات من الديجوكسين تكون على النسق السابق نفسه، إذْ تبلغ مستويات أعلى مما هي عليه في جذور نباتات الشاهد.

تبلغ محتويات الديجوكسين في جذور النباتات التي تنمو في الوسط 40mM حداً أقصى في الأسبوع التاسع عشر، ثم تتناقص بعد ذلك طيلة مدة التجربة. يمكن الاستنتاج أن هذا المقدار الأعظمي من الديجوكسين يتوافق مع قيمة للعلاقة الأيونية K^+/Na^+ تكون أقل من الواحد مفيدة ومناسبة لهذه الجذور تتناقص قيم الديجوكسين في جذور النباتات التي تنمو في الوسط 80mM طيلة مدة التجربة.[18] يتبيّن من خلال الدلالات الإحصائية أن مستويات الديجوكسين في النباتات الخاضعة للملوحة المنخفضة (20mM) تكون في الواقع هي الأكثر ارتفاعاً في العينات جميعها من تلك الموجودة في نباتات الشاهد، كما أن المقدار الأعظمي من الديجوكسين يتبّين أنه موجود في أوراق النباتات التي تنمو في الوسط الملحي (20mM) وذلك في الأسبوع الرابع والعشرين من المعالجة، أي عند بدء حدوث الخلل الأيوني الذي يسجل عند قيمة للعلاقة الأيونية K^+/Na^+ أقل من الواحد، وكذلك عند قيمة للعلاقة الأيونية Na^+/Ca^{2+} تكون أعلى من 0.35.[19]

وكذلك نستنتج أن الخلل الأيوني الخفيف في أوراق نباتات الديجيتال الأرجواني يؤدي إلى زيادة في تشكيل الديجوكسين. ويلاحظ ذلك عند اشتداد الخلل الأيوني في حدوث انخفاض في تراكم الديجوكسين. [14]

الاستنتاج:

يؤدي الخلل الأيوني Ionic disequilibrium الخفيف إلى تنشيط في تراكم الديجوكسين في الجذور، وبشكل أكبر في أوراق نباتات الديجيتال الأرجواني *Digitalis purpurea*.

تؤدي الملوحة الخفيفة المضافة إلى التربة بتركيز (20mM) إلى زيادة تركيز الديجوكسين في أوراق نبات الديجيتال الأرجواني، إذْ جرى التأكد باستخدام المقايسة المناعية المرتبطة بإنزيم ELISA وهي فائقة الدقة إذْ يصل التركيز إلى مقدار نانو غرام لكل غرام من الوزن الجاف للنبات.

References

1- Nevena S.; Miroslava K. – Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (phaseolus vulgaris L.) Journal central European, 2008, 9: (3): 385-392.

2- Richard N. Bennett and Roger M. Wallsgrove.- Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. New Phytologist, 1994, Vol. 127, No. 4, pp. 617-633.

3- Roberts DM.; Buckley N - Antidotes for acute cardenolide (cardiac glycoside) poisoning.2006, Plain Language Summary.

4- Sairam R.K.; Aruna T.- Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, Current Science, 2004, 86: (3), 10.

5- Tuteja N.- Mechanisms of high salinity tolerance in plants , Methods Enzymol, 2007, 428: 419-38.

6- Jian – Kang Zhu - Plant Salt Stress, Encyclopedia of life sciences, 2007, John Wiley & Sons, Ltd.

7- Kaymakanoval M.; Stoeval N.- Pysiological reaction of bean plants (phaseolus vulg. L.) to salt stress. Gen. Appl. 2008, Plant Physiology, 34 (3-4), 177-188.

8- Hayward H. E.; Winifred M. Blair – Some responses of Valencia orange seedlings to varying concentrations of chloride and hydrogen ions. American journal of botany. 1941, 29: 148-155.

9- Vindel, C.; P. Espectroscopia de emission por plasma ICP. Quimica e Industria 3, 1985, 2-5.

10- Orosz F.; Nuridsony M.; Ovadi J.– Isolation and quantitative determination of some cardiactive glycosides from digitalis lanata by HPLC, Medical biochemistry. 1986, 156, 171-175.

11- Wojciech K.; Malinowska E.; Alinowska, Piotr S., Jerzy K., Mariam O. ; Fraciszek H.- Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species, Food chemistry, 2009, 113: 351-355.
12- Xu R.; Lin G.; Wang W.; Liu M.; Zhan S.; Wang L.; Zhang K.; Zhang R.; Li J- Application of an ELISA-elution Assay to Dissociate Digoxin-antibody Complexes in Immunoaffinity Chromatography, Article first published, 2009, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02333.x.
13- Lacarelle B.; Rahmani R, de Sousa G.; Durand A.; Placidi M.; Cano JP.; Source - Metabolism of digoxin, digoxigenin digitoxosides and digoxigenin in human hepatocytes and liver microsomes, Article first published online, 2009, Volume 5, Issue 7, pages 567–582.
14- د. عصام الشماع (2008) : تأثير الملوحة في اختلال توازن الأيونات وفي اصطناع الغلوكوزيدات المقوية للقلب في نبات الديجيتال الأرجواني، مجلة جامعة دمشق للعلوم الصحية، المجلد 24، العدد2.
15- Grenway H.; Muuns, R- Interaction between growth Cl^- and Na^+ uptake and water relation of plants in saline environments. I highly cvacuolated cells. Plant cell environ. 1983, 6, 575-589.
16- Wittington, J.; Smith, F.; A. Calcium – salinity interaction affect ion transport in Chara coralline. 1992. Plant cell and environ. 15, 727-733.
17- Danilova N.P- ELISA screening of monoclonal antibodies to haptens: influence of the chemical structure of hapten-protein conjugates. Journal of Immunological Methods. 173: (1), 12 July 1994: 111-117.
18- Sruti D.; Roger T.; Yong-Bum K.; Kinya N.; Sheng Y. H- A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. The National Academy of Sciences . 2004. vol. 101, No. (26), 9927-9932.
19- Sonar A. N.; PAWAR N. S- Acoustic and Volumetric Properties of Digoxin and Thiabendazole in 1, 4 Dioxane at 303 K. E-Journal of Chemistry.e-journals., 2010, 7(3), 789-794.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2011/5/15.
تاريخ قبوله للنشر 2011/9/18.