.

دراسة تأثير الكاتشين المنقى من الشاي الاخضر في أهم المسببات البكتيرية لالتهابات المجاري البولية والتأثير التآزري عليها

عصام فاضل الجميلي، *ياسر عادل جبار، *نزار ادور ناصر

فرع التقنية الاحيائية، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد. بغداد–العراق.

* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية. بغداد–العراق.

الخلاصة

جمعت ٢٠٠ عينة إدرار من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية الحاد والمزمن، عُزلت ٨٥ عزلة بكتيرية منها، وشخصت بأستخدام الفحوصات الكيموحيوية واختبار العدة API، وكان معظمها يعود الى *E.coli* بنسبة(٢٣.٥%) و*K.pneumoniae* بنسبة(١٧.٦%). أختيرت العزلات البكتيرية *E.coli* و*K.pneumoniae* على أساس ترددها الأكثر في إصابات المجاري البولية ومقاومتها لتأثير المضادات الحيوية. درس التأثير المثبط للكاتشين Catechin المنقى من الشاي الأخضر في نمو العزلات عند التراكيز (٢٥, ٥٠, 75, 100) ملغم/مليلتر، وقد أظهر التركيز(١٠٠) ملغم/ مليلتر فعالية ضد كلا الجنسين من البكتريا. قدر التأثيرالخلطي المركب الكاتشين المنقى (Catechin) مع المضادين Amikacin و Gentamycin على العزلات البكتيرية المقاومة للمضادين وهما*E.coli* و*K.pneumoniae* وقد تمت مقارنة التركيز المثبط الادنى للعزلات قبل وبعد الخلط للمضادات، اذ كان تأثير خلط Amikacin مع الكاتشين (Catechin) تآزرياً مع مضاد Amikacin على العزلتين ، اما مضاد Gentamycin فقد اعطى تأثيراً تآزرياعلى بكتيريا *K.pneumoniae*.

STUDY THE EFFECT OF PURIFIED CATECHINS OF GREEN TEA ON THE MOST IMPORTANT CAUSES OF BACTERIAL INFECTIONS OF THE URINARY TRACT AND SYNERGISTIC EFFECT

ESSAM F.A.Al-jumaily, *Yasir A.J.Al-Abdli,*Nazar E.Nasser

Department of Biotechnology, Institute of Genetic Engineering and Biotechnologyfor post graduate Studies, University of Baghdad. Baghdad- Iraq

*Department of Biology, College of Science, Unversity of Al-Mustansirya. Baghdad - Iraq

Abstract

Two hundred urine samples were collected from patients infected with acute and chronic urinary tract infection, 85 bacterial isolate were isolated from these samples and were diagnosed using biochemical tests and kit API test, most of them identified *E.coli* (23.5%) *K.pneumoniae* rate (17.6%). Isolates were selected *E.coli* and *K.pneumoniae* according to their isolation rate from urinary tract infection cases and their antibiotic resistance. The inhibition effect of the purified catechin from the green tea was studied when the isolates were grown in the following concentrations (25, 50,75, 100) mg/ml. The concentration of 100 mg/ml showed a high action against the two species. The combination effect of the purified catechin was estimated with both Amikacin and Gentamycin on the resistant isolates to these antibiotics (*E.coli* and *K.pneumoniae*) and has been compared to the minimum

inhibitor concentration of the isolates before and after the confusion of antioxidants, as the effect of mixing Amikacin and Gentamycin with Catechin, it gave a synergic effect with Amikacin on two isolates, either Gentamycin gave synergic effect on *K.pneumoniae*.

Key words: Purified catechins, Green tea, Bacterial infections

المقدمة

تعد امراض الجهاز البولي من بين أهم المسببات المؤدية إلى العجز والوفاة في كثير من دول العالم [1]. ان معظم اصابات المجاري البولية تتسبب بها جرثومة *E.coli* وبنسبة (٨٠-٨٥%) وفق إحصائيات معظم البحوث والدراسات [2,3] . كما تسبب بكتيريا *K.pneumoniae* إصابات التهابات المجاري البولية [4]. ولعلل تكرار الاصابة بالتهاب المجاري البولية له الدور في ارتفاع نسبة الاصابة ، وقد يعزى ذلك الى عشوائية العلاج أو وجود أكثر من مسبب مرضي في الوقت نفسه (multi microbial infection)، وهذا سوف يُسرّع من المقاومة المتعددة ضد المضادات الحياتية [5]. تعرف أوراق الشاي الاخضر بانها ذات فعالية ضد مايكروبية (antibacterial activity) ضد الاحياء المجهرية الممرضة، وتشير التقاريرالى وجود تأثير تآزري بين مستخلصات الشاي الاخضر والمضادات الحيوية [6]. ويحتوي الشاي الاخضر على مواد البولي فينول مثل (catechin وepicatechin وepigallocatechin وepicatechin gallate وepigallocatechin gallate). إذ تمتلك فعالية قاتلة ضد مختلف البكتيريا المرضية الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام، بالاضافة لذلك وجد ان تركيزاً قليلاً من Epigallocatechin gallate (EGCg) يساعد على تقليل المقاومة لعزلات *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ضد مضادات البيتالاكتام [7]. وقد يختلف نوع التأثير عند خلط مركب (EGCg) مع مضادات حيوية أخرى مثل Minocycline and Ofloxacin إذ يكون التأثير من نوع اضافة (Addition) أو غير مؤثر (Indifference) بالمقارنة مع التاثير التازري الناتج من خلط مضادات البيتالاكتام مع مركب (EGCg) [8]. يهدف البحث الى دراسة تاثير مركب الكاتشين المنقى من الشاي الاخضر على نمو أهم المسببات البكتيرية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية والتاثير التازري بينه وبين المضادات الحيوية المستخدمة.

المواد وطرائق العمل

- **الاجناس البكتيرية المدروسة**

تم استخدام جنسين من البكتيريا المعوية وهما (*E.coli* و*K.pneumoniae*)، المعزولة من مصابين بالتهابات المجاري البولية من مستشفى الامام علي ودائرة مدينة الطب /المختبرات التعلمية ومستشفى الكندي التعليمي.

- **قياس التركيز المثبط الأدنى لمضادات الحياة**

أستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة (Two fold dilution method) على الوسط الزرعي Muller-Hinton agar لحساب MIC_s لمضادات الحياة المثبتة أعتماداً على ما ذكر في Stocks و Ridgway [9] وكما يأتي:

١.حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت قيمتها بين 0.5-1024 مايكروغرام/مل للمضادات (Gentamycin و Amikacim). وذلك بإضافة تراكيز مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة الى وسط مولر هنتون المعقم والمبرد الى 45 ْم. رجت الاوساط جيداً بعد إضافة المضاد وصبت في اطباق معقمة وحفظت في درجة حرارة 4 ْم لحين استعمالها خلال 24 – 48 ساعة.

٢.حضرت التخافيف العشرية 10^{-2} لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي. سحب 5 مايكرولتر من التخافيف أعلاه ولكلا العزلتين البكتريا بوساطة ماصة دقيقة ولقح به الوسط الحاوي على المضاد الحياة بتراكيز مختلفة، ثم حضنت في درجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة.

- **استخلاص وتنقية الكاتشين من اوراق الشاي الاخضر**

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Jin وجماعته [١٠] والتي تضمنت مرحلتين الاولى باستخدام الماء المقطر بدرجة حرارة ٥٠ م ولمدة اربع ساعات

والترشيح باوراق ترشيح واتمان رقم ١، وفي المرحلة الثانية الاستخلاص بالمذيبات العضوية، الكلورفورم وخلات الاثيل وبعدها تم الحصول على مركبات الكاتشين بالطبقة المائية وتم تجفيفها باستخدام المجفد Lyophilizer.

- **طريقة خلط الكاتشين مع المضادات الحيوية**

يعتمد هذا الاختبار اساسا على الجمع بين مختلف المضادات الحيوية مع المادة الفعالة الكاتشين المنقاة من الشاي الاخضر وفق الطريقة المذكور اعلاه، ويتم التحري عن تاثيرالخلط المادتين في مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية، وقد أُجري الاختبار باتباع الطريقة الاتية:

- **طريقة رقعة الشطرنج Checker Board Assay**

استخدم في هذا الاختبار وسط زرعي Muller-Hinton agar وحضرت تخافيف من المادة الفعالة الكاتشين مماثلة للتخافيف التي حضرت للمضادات الحيوية وتم تحديد نسبة الخلط بين المادة الفعالة والمضاد الحيوي والتي تمثلت بنسب (١:١ و ٢:١ و ٣:١ و ٤:١). بعدها تم حساب قيم المعامل الجزئي لتثبيط التركيز (Fractional inhibitory concentration) لاختبار جيكربورد من خلال المعادلة:

$$FIC = \frac{\text{MIC للمضاد في الخليط}}{\text{MIC للمضاد لوحدة}}$$

ومعامل FIC يمثل المجموع الجبري لقيم FIC لكلا المادتين أو اكثر والنتائج تعدّ تأزرا، اضافة، غير مؤثرة، متضادة اذا كانت قيم معامل FIC تساوي **٠.٥>**، **١>-٠.٥**، **٢>-١**، **٢<** على التوالي [11].

النتائج والمناقشة

- **العزل والتشخيص**

شخصت البكتيريا مبدئيا على وسط اكار الدم واكار الماكونكي وبالأعتماد على بعض الصفات التفريقية الخاصة بكل نوع من انواع البكتيريا، فقد تم تشخيص الأنواع المختلفة من البكتيريا التي تؤدي دورا مهما في احداث التهابات المجاري البولية. بكتيريا *E.coli* بالأعتماد على صفاتها الزرعية، إذ امتازت المستعمرات بكونها وردية (بسبب تخميرها سكر اللاكتوز) وصغيرة وجافة ذات نهايات منتظمة على وسط اكار الماكونكي [12,13]. اما بكتيريا *Klebsiella spp.* فقد شخصت على وسط اكار الماكونكي بكون مستعمراتها دائرية كبيرة الحجم، ذات حافات منتظمة وردية اللون وذات قوام مخاطي لامتلاكها الكبسولة، وتكون غير منتظمة [12,13].

- **قياس تاثير الكاتشين في نمو العزلات البكتيرية**

تم قياس فعالية الكاتشين ضد بكتيريا *E.coli* و *K.pneumoniae* حيث اظهر مركب الكاتشين تأثيراً ليس بالفعال لكلا الجنسين من البكتريا فقد بلغ قطر التثبيط ١٠ و ٩ ملم عند التركيز ١٠٠ ملغم/مل على التوالي كما مبين في الجدول (١)، وقد أشار Piskula and Terao [15]; Willson, [14] الى ان الكاتشين ليس له تأثير على بكتيريا النبيت الطبيعي Intestinal normal micro flora التي لها الدور الاهم في القضاء على البكتريا الانتهازية. كما اورد كل من Yee وجماعته [١٦] و Takabayashi وجماعته [١٧] أن الكاتشينات الموجودة في الشاي الاخضر لها تاثير على بكتريا *Salmonella* و *Bacillus* و *Clostridium* و *H.pylori*.

الجدول١: فعالية الكاتشين (Catechin) المنقى من اوراق الشاي الأخضر في نمو العزلات البكترية

العزلات	التراكيز (ملغم / مل)			
	١٠٠	٧٥	٥٠	٢٥
	معدلات تثبيط النمو البكتيري مقاسه بـ (ملم)			
E. coli	١٠	٠	٠	٠
K.pneumoniae	٩	٠	٠	٠

- **تاثير خلط مضادات الحياة مع مركب الكاتشين (Catechin) في نمو العزلات البكتيرية**

تمت دراسة الخلط بين المادة الفعالة الكاتشين Catechin والمضادين الحيويين الاميكاسين والجنتاماسين بتحديد التركيز المثبط الادنى للمضادين الحيويين، فقد بلغ التركيز المثبط الادنى لـل Amikacin و Gentamycin (١٢٨) و(٢٥٦) مايكروغرام/مل على التوالي لبكتيريا *E.coli*، اما بكتيريا *K. pneumoniae* و فقد بلغ التركيز المثبط الادنى لـل Amikacin و Gentamycin (٦٤) و(٥١٢) مايكروغرام/مل على التوالي. كما تم تحديد التركيز المثبط

للمادة المنقاة (Catechin) فقد بلغت قيمة الـMIC (١٠٢٤) مكغم/ مـل لكـلا الجنسـين مـن البكتريـا *E. coli* و *K. pneumoniae*. وطبقت طريقة Mandal وجماعتـه [18] بحساب معامل التركيز المثبط (FIC) للعـزلتين التـي تـم انتقائهما وفقاً لمقاومتهما للمضادات الحيوية المسـتخدمة فـي الاختبار. في هذه البحث تم خُلـط مضـادات Amikacin Gentamycinوالمادة الفعالة الكاتشـين (Catechin). وقـد تمت تجربة خلط المادة الفعالة مع المضادات الحيويـة بعـدة نسب من خلال تحضير تراكيز متسلسلة من المـادة الفعالـة ومماثلة لتراكيز المضادات الحيوية فقد حضرت التراكيز من (٠.٥ الى 1024 مايكروغرام / مل)، وقد تم تحديـد نسـبة الخلط الافضل قد وجد ان نسبة خلط الكاتشين/المضاد بنسـبة ١:٤ هي الافضل، من خلال ملاحظة نوع التأثير الناتج مـن نسبة الخلط على العزلات البكتيرية، وتبين الجداول الآتية (٢) و(٣) حدوث انخفاض كبير في مديات MIC للمضادات بعـد عملية خلطها مع مادة الكاتشين مما هـي عليـه فـي حالـة استعمال كل مضاد لوحده. اذ كان لخلط مضاد الاميكاسين مع المـادة الفعالـة تـأثيراً تآزريـاً علـى العـزلتين *E.coli* و*K.pneumoniae* وكما موضح في الجدول (٢). اما مضاد Gentamycin فقـد أظهـر الخلط مـع مـادة الكاتشـين (Catechin) تأثيراً تآزريا على بكتيريـا *K.pneumoniae*، اما على بكتيريا *E.coli* فقد اظهر تأثير الاضافة وكما مبين في الجدول (٣).

جدول٢: تأثير خلط مضاد الاميكاسين مع مركب الكاتشين في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة

العزلات	قيم MIC			FIC Index	نوع التأثير
	الكاتشين لوحده µg/ml	لاميكاسين لوحده µg/ml	الخليط µg/ml		
E. coli	١٠٢٤	١٢٨	٨	٠.٠٠٦٩	تأزري
K.pneumoniae	١٠٢٤	٦٤	١٦	٠.٢٦٥	تأزري

***FIC: Fractional lnhibitory Concentation.**

جدول٣: تأثير خلط مضاد الجنتامايسين مع مركب الكاتشين في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة

العزلات	قيم MIC			FIC Index	نوع التأثير
	الكاتشين لوحده µg/ml	جنتامايسين لوحده µg/ml	الخليط µg/ml		
E. coli	١٠٢٤	256	١٢٨	٠.٦٢٥	لاضافة
K.pneumoniae	١٠٢٤	١٢٨	512	٠.٣٧٥	زري

***FIC: Fractional lnhibitory Concentation.**

اظهـرت نتـائج الخلـط بـين مضـادات المجموعـة الامينوكلاكوسيدية مع الكاتشين وكما مبين في الجـدولين (٢) و(٣) تأثيراً تآزرياً واضحاً وعلى العزلات البكتيرية، حيـث بينت الدراسات الحديثة ان خلط مضاد حيوي من المجموعـة الامينوكلايكوسدية مع آخر من مجموعة البيتالاكتام يكـون ذا فعالية عالية ضد البكتيريا وخاصة تلك التي تظهـر مقاومـة عالية للمضادات الحيوية [19]. لكون مجموعـة مضـادات البيتالاكتام تؤثر في الجدار الخلوي للخلية البكتيرية في حـين أن مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدية يكون تأثيرها علـى مواقع تصنيع البروتينات في الخلية [20]، إذ ان الكاتشـينات لها آلية عمل مضادات البيتالاكتام نفسها لأن كلاهمـا يمتلـك موقع الهدف نفسه وذلك عن طريق الارتبـاط بالبروتينـات المرتبطة بالبنسلين (Pencillin binding proteins) والتي يرمز لها (PBPs) بالتالي تثبيط عملية بناء الجدار الخلـوي للبكتريـا [8].أشار Gradisarوجماعته [٢١] الـى آلية عمل الكاتشينات التي تعمل على تثبـيط أنـزيم DNA gyrase خلال الارتباط بموقع ATP للوحدة بيتا للانزيم ،اي انها تمتلك آلية عمل مضادات الكوينولينات نفسها.

المصادر

1. Raksha,R.; Srinivasa, H.,and Macaden ,R.S.**2003**.Occarrenceandcharacterisatio nofuropathogenic *Escherichia coli* in Urinary trach infection . Indian. *J. Med. Microbiol* **.2:**102 – 107.
2. Todar, K**. 2002**. Pathogenic *E. coli. J. of Becteriology*,**33**: 340-350 .
3. Nester, E.W.; Anderson, D.G.; Roberts, C.E., Jr.; Pearsall, N.N. and Nester, M.T. **2001**. *Microbiology A Human Perspective* (3rd ed.). McGraw- Hill Higher Education ,New York.
4. Ebringer,A.;Rashid,T.;Wilson,C.;Ptaszy nska,T.&MarkFielder,M.**2006**.Ankylosi ng Spondylitis, HLA-B27 and *Klebsiella* –An Overview: Proposal for early diagnosis and treatment .*Current Rheumatology Reviews*.2:55-68.
5. Iwalokun, B.;Olukosi, Y.;Adejoro, A.;Olaye, J.; and Fashade, O.**2004**. Comparative biochemical and molecular evaluation of Swarming of *proteus* and

effects of anti-swarm agent, Aft.*J. Biotecnol* .(3): 99-104.

6. Isogai, E.; Isogai,H.; Hirose,K.; Hayashi, S.; and Oguma,K**.2001**. *In vivo* synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Curr. Microbiol.*, 42: 248-251.
7. Hu, Z.Q.; Zhao, W.H.; Asano, N.; Yoda, Y.;Hara,Y.;Shimamura,T.**2002**.Epigallo catechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.AntimicrobialAgentsChemothera py. 46: 558-560.
8. Zhao, W.-H.; Hu,Z.Q.; Okubo,S.; Hara,Y.; and Shimamura.T.**2001**. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*.45:1737–1742.
9. Stocks, E.J. and Ridgway, G.**1987**. *Handaling Clinical Speciments for Microbiology Studies*. (5th ed.). Churchill Livingston. Edinburgh. Pp:173-201.
10. Jin,Y.;Jin,C.H. and Row,K.H.**2006**. Separation of catechin compounds from different teas.*Biotechnology Journal* 1 (2): p 209-213.
11. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Jawa, W.M. and Sachreckeber, P.C.**1992**. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. J.B. lippincott company. Philadelphia.
12. Atlas, R. A.; Parks, L. C. & Brown, A. E.**1995**. Laboratory Manual Experimental Microbiology.1st ed. Mosby-Year book. 312.
13. Holt,J.G..;Krieg,N.R..;Sneath,P.H.A.; Staley,J.T. and Williams, S. T.**1994**. *Bergey's Manual of Determinable Bacteriology 9th ed* . William and Wilkins, Baltimore.
14. Willson, K.C.**1999**. Coffee, Cocoa and Tea. New York: CABI Publishing.
15. Piskula, M.K.; and Terao J. **1998**. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*. 128: 1172-1178.
16. Yee,Y.K.; Koo,M.W.L. and Szeto,M.L **2002**. Chinese tea consumption and lower risk of Helicobacter infection. J.Gastroenterol Hepatol. 17:552-555.
17. Takabayashi,F.;Harada,N.;Yamada,M.; Murohisa,B.andOguni,I.**2004**. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils.*J.Gastoenterol*. 39: 61-63.
18. Mandal, S. Mandal, M.D and Pal N.K **2004**. Evaluation of combination effect of ciprofloxacin and cefazolin against *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates by in vitro methods. *Calicut Med J*. 2(2): 12-20.
19. Ribera,E.;Gomez;Jimenez,J.;Cortes,E.; Valle,O.D.;Planes,A.;GonzalezAlujas,T. ; Almirante,B. and Ocana,I. **1996**. Effectiveness of cloxacillin with gentanicin in shot-term therapy for right sides *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Annals of internal Medicine*. **125**(12): 969-974.
20. Mcgrath, B. J.; Bailey, E.M.; Lamp, K. C. and Rybak, M. 1992. Pharmacocodynamics of once –daily amikacin in various combination with cefepine, aztreonam and ceftazindine against PS.aeruginosa in vitro infection model. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **36**(12) : 2741-2746.
21. Gradisar,H.; Pristovsek,P.;Plaper, A. and Jerala,R.**2007**. Green tea catechins inhibit Bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J.Med.Chemistry*. **50**(20),pp264-271.