التأثير التثبيطي والمناعي لاوراق نبات الخروع Ricinuis communis وفعاليته كمضاد حيوي ومعززا لفعالية الجهاز المناعي

ميادة فرحان درويش
كلية العلوم
قسم علوم الحياة
جامعة الكوفة

زهرة محسن
كلية العلوم
قسم علوم الحياة
جامعة الكوفة

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية دراسة التاثير المحتمل لمستخلص الماء المغلي والبارد لاوراق نبات الخروع *Ricinuis communis* وتاثيره في نمو بعض انواع البكتريا المرضية منها *Staphelococcus aureus , Klebsiella spp.,Proteus mirabilis, Psedumonase aeruginosa* ، فضلا عن تقويم كفاءة المستخلصين المائيين لاوراق نبات الخروع في تحفيز الاستجابة المناعية في الفئران المختبرية.

تبين من النتائج عدم وجود أي تأثير للمستخلص النباتي في تثبيط البكتريا وبالتراكيز المحضرة (20,16,8,4,2,0%). كما أظهرت النتائج ان مستخلص النبات كان معززا" لفعالية الجهاز المناعي ، وظهر ذلك من خلال الارتفاع المعنوي في معظم الاختبارات المناعية المستعملة مقارنة بالسيطرة وان هذا التعزيز كان معتمد على الجرعة وان زيادتها عززت الفعالية المناعية اكثر وتجدر الاشارة الى ان المستخلص البارد كان اكثر فعالية من المستخلص الحار في هذا المجال وبذلك يمكن عد النبات كعاملا" محفزا" لفعالية الجهاز المناعي في الفئران المختبرية .

المقدمة :-

يعد الخروع *Ricinuis communis* العائد لعائلة Euphorbiaceae جنس Euphorbia ويعود هذا الجنس الى الفصيلة السوسبية التي تعد من الفصائل الكبيرة حيث تشمل على 300 جنس و5000 نوع (1) . يملك نبات الخروع العديد من التسميات حيث يدعى *Ricinuis communis* جاءت هذه التسمية من اللاتينية ricinus بمعنى "tick" حشرة القراد لان بذورة تشبه هذه الحشرة ، كما يسمى castro bean , castro oil bean (2) .

يحتوي الخروع على العديد من المركبات الكيميائية النباتيةphytochemical compound ومنها , Flavonoid Coumarins , anthraquinones, tannins ,sterols ,Terpenoids (Glycyrrhzin«GR», Saponine , Vitamine(E, C, B , Biotin) , Minerals (Ca ,Mg ,P) (3) .

يوصف الخروع ومستخلصاتة في علاج حالات مرضية عديدة ، فزيت الخروع يستعمل كمسهل غير عنيف لكنه سريع التأثير ، كما يستعمل في معالجة تقرحات الجلد والنزلات الصدرية والبواسير وطارد للديدان و كما يستخدم كمضاد للتشنج (4) ، وتستخدم اوراق الخروع كمضاد للالتهابات ومدر للطمث وخافض للحرارة .

يعد الجهاز المناعي من الاجهزة الجسمية المهمة والتي تعمل على حماية اجسام الفقريات من الكائنات المجهرية المرضية والامراض السرطانية ، فقد ثبت ان كثيرا" من تلك الكائنات الحية تمتلك القابلية على التغلب على هذا الجهاز او اضعافة من خلال الذيفانات التي تنتجها تلك الكائنات او تتستر بها الخلايا الورمية لذا وقع الاختيار على نبات الخروع لما اكدته العديد من الدراسات على استخدامة كمضاد بكتيري ومضاد للفايروسات ومضاد طفيلي ومضاد للتسرطن(5,6,7) .

في ضـــوء ماتقدم ، أختيرت مجموعة من البكتريا المســـببة لالتهاب الجروح والحروق وكذلك بعض الامراض المختلفة في الجسـم لقياس مدى تأثير المسـتخلص المائي للخروع عليها ، كما هدف الدراســه الحالية لمعرفة تأثير مسـتخلص اوراق نبات الخروع في فعالية الجهاز المناعي للفئران ولغرض الوصـــول الى الهدف ، تم قياس مجموعة من المعايير المناعية لتقييمها في الفئران المختبرية المجرعة بالمستخلص المائي (البارد والحار) لاوراق الخروع وشملت المعايير التالية :

1- حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء

2- دراسة الفعالية البلعمية لخلايا غشاء الخلب (phagocytosis)

3- دراسة معامل الانقسام الخيطي (mitotic index)

4- دراسة تفاعلات فرط الحساسية العاجلة (Arthus reaction) والاجلة (Delayed type hypersensitivity) .

المواد وطرق العمل:-

- أنواع البكتريا
تم استخدام كل من *S.aureus , Klebsiella spp., P. mirabilis, Ps. aeruginosa* تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة الكوفة.

- تحضير المستخلص المائي المغلي والبارد لاوراق الخروع
اعتمدت طريقة (8) في تحضـــير مســـتخلص اوراق الخروع، حيث ترك مســـحوق اوراق الخروع في الماء المقطر المضاعف Double distiuled water حضرت مجموعة تراكيز وهي (20, 16, 8, 4, 2, 0)% كل من الماء البارد والماء الحار وتركت التراكيز لمدة ثلاثة ســـاعات في درجة حرارة المختبر وطردت مركزيا (1500) دورة / دقيقة لمدة عشرة دقائق اخذ الجزء الطافي ، نظم الـ pH مقاربا للتعادل باستخدام جهاز الـ pH meter .

- وزن المسحوق حسب التركيز مثلا تركيز 2% نأخذ 2 mg ويذوب في 100 ml ماء مقطر ينتج التركيز 2%

- تأثير مستخلص اوراق الخروع على نمو البكتريا المرضية بطريقة الانتشار بالاكار
نقل (1) مل من معلق البكتريا بعمر 18ســاعة الى ســطح الاكار المغذي، فرشــت جيدا بالناشــر المعقم وتركت نصــف ساعة ليجف سطحها الذي ثقب باستخدام Stainless stell borer بقطر 6 ملم وضع في كل حفرة (0.2) مل من كل تركيز من التراكيز الستة للمستخلص وبمعدل (مكررين / بكتريا / تركيز)، وضـعت الاطباق في الحاضـنة عند درجة حرارة (37) م° ، لمدة 48 ساعة لقياس قطر المنطقة الخالية من النمو (ملم) حول كل حفرة (9).

- تاثير المضادات الحيوية على نمو البكتريا المعوية
استعملت طريقة(10) لمعرفة استجابة البكتريا للمضادات الحيوية المستعملة في الدراسة وذلك بنقل 1مل من معلق كل من البكتريا *S. ureus , Klebsiella spp., P. mirabilis, Ps. aeruginosa* لكل منها بعمر 18ســاعة الى ســطح وســط Muller Hinton agar وفرشــت جيدا بالناشــر المعقم وتركت لمدة خمســة دقائق ليجف ووزعت على سطح الوسط الملقح أقراص المضادات الحيوية المختارة.

- تم حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض حسب طريقة (11) .
- درست عملية البلعمة بأستعمال الخلايا البلعمية المستخرجة من غشاء الخلب بحسب ماورد في طريقة (12) .
- تم اجراء فحص الحساسية الاجلة والعاجلة حسب طريقة (13) .

النتائج والمناقشة:-

تشـير النتائج عدم وجود تأثير لمسـتخلص اوراق الخروع مضـاد على أنواع البكتريا المسـتخدمة في هذه الدراسـة لكل من المستخلص المائي الحار والبارد وبالتراكيز المختلفة المستخدمة.

جدول (1): قطر مناطق التثبيط بالـ(ملم) للمضادات الحيوية الحساسة لها البكتريا

(R) تعني البكتريا مقاومة للمضاد الحيوي

No.	Antibiotics	Symbol	*P. aeruginosa*	*S. ureus*	*Klebsiella spp.,*	*P. mirabilis*
1	Amoxicillin	Amo	16	R	R	R
2	Cephalexin	CL	R	R	R	R
3	Cefotaxime	CTX	R	R	R	36
4	Ceftazidime	CFM	R	R	R	
5	Ceftriaxone	CFT	25	R	R	36
6	Gentamycin	CN	30	6	24	27
7	Amikacin	AK	15	16	R	R
8	Tetracyclin	TE	R	R	R	R
9	Clarthromycin	Clr	29	R	R	R
10	Ciprofloxacin	CIP	34	28	16	R
11	Metronidazole	M	R	R	R	R
12	Trimethoprime	W	32	R	R	R

- اختيار التركيز الامثل

عند تجريب التراكيز المحضرة من المستخلصين المائيين البارد والحار لاوراق نبات الخروع على الفئران المختبرية وقياس العدد الكلي لكريات الدم البيض ومعامل البلعمة وجد ان تركيز 20% كان الافضـــل في رفع المعايير المناعية لذا اختير لاكمال التجارب المناعية .

بينت النتائج الموضـــحة في الجدول (2) وجود زيادة معنوية في قيمة العدد الكلي لخلايا الدم البيض بزيادة الجرعات للمســـتخلصـــين المائيين البارد والحار لنبات الخروع ، أذ بلغت اعلى قيمة لها في الجرعة الثالثة للمســـتخلص البارد وكانت (13425 ± 550) والمسـتخلص الحار كانت (12750 ± 500) وشـكلت هذه الزيادة فرقا معنويا على مسـتوى دلالة (0.05) عند مقارنتها بالسيطرة .

جدول (2) :تأثير المستخلص المائي (البارد والحار) لنبات الخروع في العدد الكلي لكريات الدم البيضاء في الفئران المختبرية

المجاميع	عدد الفئران المحقونة	عدد كريات الدم البيضاء الكلي(معدل ± الانحراف المعياري)	
السيطرة	3	500.8 ± 7950	
م .م بارد جرعة اولى	3	971.2 ± 9550	
م.م بارد جرعة ثانية	3	430.9 ± 10100	
م.م بارد جرعة ثالثة	3	* 500 ± 12750	
م.م حار جرعة اولى	3	931.2 ± 9550	
م.م حار جرعة ثانية	3	476.8 ± 12500	
م.م حار جرعة ثالثة	3	* 550 ± 13425	

م م مستخلص مائي ، * عالي المعنوية

تشير النتائج الموضحة في الجدول (3) الى ان معاملة الفئران بالمستخلصين المائيين ادى الى حصول زيادة معنوية في قدرة الخلايا البلعمية على بلعمة الخميرة المقتولة بالحرارة عند زيادة عدد الجرع للمستخلصين المائيين البارد والحار لنبات الخروع وبلغت اعلى قيمة لها في الجرعة الثالثة للمستخلصين المائيين البارد والحار لنبات الخروع وكانت للمستخلص المائي البارد (33 ± 2.45) وللمستخلص المائي الحار (30.45 ± 2.41) عند المقارنة مع السيطرة (17.5 ± 2.21) ، كما اظهرت النتائج المبينة في الجدول (3) زيادة في معامل الانقسام أذ اكتسبت الزيادة فارقا" معنوبا"على مستوى دلالة(P< 0.05) وبلغت اعلى قيمة لها في الجرعة الثالثة للمستخلصين المائيين البارد والحار لنبات الخروع وكانت نسبتها للمستخلص المائي البارد (31.50 ± 0.57) وللمستخلص المائي الحار(29.75 ± 0.50) عند المقارنة مع السيطرة (16.25 ± 0.9) .

جدول (3) تأثير المستخلص المائي (البارد والحار) لنبات الخروع على معدل معامل البلعمة ومعامل الانقسام الاختزالي في الفئران المختبرية

المجاميع	عدد الفئران المحقونة	معامل البلعمة(معدل ± الانحراف المعياري)	معامل الانقسام (معدل ± الانحراف المعياري)
السيطرة	3	2.21 ± 17.5	0.9 ± 16.25
م . م بارد جرعة اولى	3	4.00 ± 24.5	2.5 ± 23.50
م.م بارد جرعة ثانية	3	4.96 ± 26.8	0.95 ± 25.25
م.م بارد جرعة ثالثة	3	2.44 ± 30.45	0.5 ± 29.75
م.م حار جرعة اولى	3	4.04 ± 25.75	0.95 ± 25.50
م.م حار جرعة ثانية	3	3.75 ± 29.25	2.8 ± 27.25

م.م حار جرعة ثالثة	3	2.45 ± 33	0.57 ± 31.50

تشير النتائج الموضحة في الجدول (4) الى ان قيمة تفاعل ارتش اكتسبت زيادة معنوية ($P< 0.05$) بزيادة الجرعات وبلغت اعلى قيمة لها في الجرعة الثالثة وكانت على التوالي للمستخلص المائي البارد (0.99 ±0.02) وللمستخلص المائي الحار (0.86 ±0.01) عند المقارنة مع السيطرة (0.49 ±0.01)،

كما اوضحت نتائج نفس الجدول ان معاملة الفئران بالمستخلص المائي البارد والحار ادى الى حدوث زيادة معنوية في اختبار فرط الحساسية الأجل وبلغت اعلى قيمة لها في الجرعة الثالثة وكانت للمستخلص المائي البارد (1.07 ± 0.026) وللمستخلص الحار(1.02 ± 0.043) عند المقارنة مع السيطرة (0.68±0.017).

جدول(4) تأثير المستخلص المائي (البارد والحار) لنبات الخروع على معدلات تفاعل آرثس و فرط الحساسية الآجل في الفئران المختبرية

المجاميع	عدد الفئران المحقونة	معامل آرثس(معدل ± الانحراف المعياري)	فرط الحساسية الآجل(معدل ± الانحراف المعياري)
السيطرة	3	0.01 ± 0.49	0.017 ± 0.68
م . م بارد جرعة اولى	3	0.05 ± 0.65	0.044 ± 0.74
م.م بارد جرعة ثانية	3	0.03 ± 0.76	0.021 ± 0.84
م.م بارد جرعة ثالثة	3	0.01 ± 0.86	0.043 ± 1.02
م.م حار جرعة اولى	3	0.05 ± 0.69	0.039 ± 0.77
م.م حار جرعة ثانية	3	0.04 ± 0.79	0.033 ± 0.98
م.م حار جرعة ثالثة	3	0.02 ± 0.99	0.028 ± 1.07

يعد الجهاز المناعي الخط الدفاعي الاساس داخل اجسام الفقريات لحمايتها من الكائنات المجهرية او الذيفانات التي تنتجها هذه الكائنات وان أي خلل او اضطراب في وظائف هذا الجهاز يؤدي الى اصابة الكائن الحي بكثير من الامراض التي قد تسبب بعضها في هلاكه الا انه يمكن تعزيز فعالية هذا الجهاز بأستعمال بعض المواد او المركبات (Immunostimulants) التي من شأنها ان تؤثر في مواقع معينه منه كأن تزيد في انقسام الخلايا اللمفاوية او تنشط الفعالية البلعمية (14) . لذا تأتي هذه الدراسة كمحاولة اولية لتسليط الضوء على الدور الذي يؤديه المستخلص المائي لنبات الخروع في تعزيز فعالية الجهاز المناعي للفئران البيضاء .

أظهرت نتائج الفحوصات الدمية الى وجود زيادة معنوية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض تتناسب طرديا" مع زيادة عدد الجرعات الا ان المستخلص البارد كان اكثر تأثيرا" من المستخلص الحار وقد ترافق ذلك ايجابيا" مع معامل الانقسام لخلايا نقي العظم ويمكن ان تعزا هذه الزيادة الى فعالية بعض المركبات التي تدخل في تركيب هذا النبات والتي اثبتت فعاليتها الدوائية ومنها coumarin , flavonoids , saponins وبعض العناصر والفيتامينات التي اثبت ان لها دور في تنشيط الجهاز المناعي (15) .

اظهرت النتائج زيادة في قدرة الخلايا البلعمية على التهام خلايا الخميرة المقتولة بالحرارة ووجد ان مركب GR يعمل على تنشيط خلايا macrophage لعملية البلعمة من خلال تحفيزها لانتاج كميات كبيرة من اوكسيد النتريك الذي يعد ساما للكائنات الحية المجهرية (16) كما ان للعناصر المعدنية كالفسفور والمغنيسيوم والكالسيوم دور في تعزيز فعالية الجهاز المناعي من خلال زيادة اعداد خلايا الدم البيض وتعزيز وظيفة الخلايا اللمفاوية وخلايا البلعمة(17).

وترافقت الزيادة في اعداد خلايا الدم البيض و معامل البلعمة مع زيادة معامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية الذي يعطي صورة واضحة عن الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية للمستخلصين المائيين البارد والحار لنبات الخروع للخلايا المكونة للجهاز المناعي وتمايزها الى مراحل مختلفة من الاستجابة المناعية ، ويمكن ان يعزا هذه الزيادة في معامل الانقسام الى وجود مركبات في المستخلص المائي لاوراق النبات تمتلك فعل المشطرات

اظهرت النتائج حصول زيادة في تفاعل ارثس في مجاميع الفئران المحقونة بعالق كريات الدم الحمراء للخروف في راحة القدم الخلفي ومن المعروف ان تفاعلات الحساسية من النوع الثالث تحدث عند تكوين المعقدات المناعية الصغيرة والتي لاتستطيع

الخلايا البلعمية التهامها وتخليص الجسم منها ، فالحقن الجلدي المتكرر بكريات الدم الحمر للخروف يؤدي الى انتاج اضداد من النوع IGg التي تتفاعل مع المستضد مكونة معقد مناعي وذلك يؤدي الى التهاب موضعي Arthus reaction نتيجة تنشيط نظام المتمم ، كما اظهرت النتائج زيادة معامل فرط الحساسية الاجل وان الزيادة الحاصلة في هذا التفاعل تكون مرتبطة بالتنشيط الحاصل لوظائف الجهاز المناعي ، يتفق هذا مع ما توصل اليه (18) من ان مركبات الـــ Flavonoids (وهي مركبات مضادة للاكسدة وكاسحة للجذور الحرة) و Lignans المشتقة من مستخلص G.glabra تعمل كمضادات لمعالجة حالات الربو من خلال تثبيطها تفاعلات الحساسية . بالاضافة الى ذلك فأن هذه المركبات (Flavonoids , Tannins , Lignans) تعمل على تثبيط عامل (Platelate- Activating Factor) وهذا يفيد في حالة الالتهاب والحساسية (19) ، لوحظ ان المستخلص المائي البارد اكثر فعالية من المستخلص الحار وقد يعود السبب الى تأثر بعض المركبات بالحرارة التي تثبط فعاليتها .

المصادر :-

1-.Chiej,R.(1984) :Encyclopedia of Medicinal plants .London :MacDonald ,Duke ,J. and Atensu , E.S.(1985) : Medicinal plants of China .MI:Reference Publications ,Inc.; P20-24.

2- Coe, F.G. and Anderson, G.J. (1996). Screening of Medicinal Plants used by the Garifuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. *J. Ethnopharmacol*. 53: 29-50.

3-Trease, G.E., and Evans, W.C. (1989). Carbohydrates, volatile oils, and resins, acids, alcohols and esters, alkaloids. In: Textbook of Pharmacognosy, 13th Ed. Bailliere and Tindal, London, p. 612-638.

4- Duke ,J.A. and Ayensu,E.S. (1985) : Medicinal plants of China . MI : Refrence Publication s ,Inc; p 20-4 .

5- Qun, L; Lester, A.M., and Linus, L.S. (2000). The 2-pyridone antibacterial agents: bacterial topoisomerase inhibitors. *Medecin Reserch Rev*ew. 20(4): 231-293.

6-Sule, M. I. and Sani, U. M.(2008) :Isolation of ricinine from methanpl extracts of three different seed varieties of ricinus communis linin (Euphorbiaceae) Nigerian J. Pharmcology 7, No. 1: 0189-823.

7- Torres, M., Gil, S., and Parra, M. (2005). New Synthetic methods of 2-pyridone rings. *Current Organic Chemistry*. 9(17): 1757-1779.

8- Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R. and Shimamura, T. (1989). The bacteriocidal activity of tea and coffee. 8: 123-125.

9- Kunin, C. (1997). Urinary tract infections: Detection, Prevention and management. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

10- Bauer , A.W. ;Kirby ,W.M. ;Shirris ,E.G. ; Jurk ,M. (1966) : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method . American Journal of clinical pathology . 45 .pp 493-496 .

11-Haen , P.J. (1995) : Principles of Hematology. Edited by L.H. Young. W.B. Publishers,London .

12- Metcalf, J.A.; Gallin, M.D. ; Nauseef, M .P. and Root, R.K.(Editors)(1986):Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press, .(1999) : Inhibition of lyso PAF Acetyl transferase activity by component of licorice root . Biology Pharmacology. Bull.22:1144-1146 .

13- Triolo ,A.J. ;Osteholm ,L. and Kratky ,M.T.(1989) :Enhancement of the Arthus and suppression of delayed type hypersensitivity by bluronic of 68.Adetergently used to prepare per carbon emulion ,International J. Immunology.11:41-48.

14- Hyde ,R.M. (Editor) (2000): Immunology 4th edition , Lippincott Williams and Wilkins , Philadeliphia ,U.S.A. .p:71-88 .

15-Beresford,T.(1999) : Glycyrrizaand treatment of respiratory disorders . Internet : Theaus.net@ hotmail .com .

16-Atlas ,R.M.(1995) : Prnciples of Microbiology .Mosby Yearbook , Inc. U.S.A.PP:88

17- Internet (2000):Nutration and digestion .www.chiro page .com .

18-Taniguchi , C. ;Homma ,M. ; Takano ,O. ; Hirano ,T.; Oka ,K.and Hayashi ,T.(2000) : Pharmacological effects of urinary products obtained after treatment with saiboku-to , aherbal medicine for bronchial asthma , on type IV allergic reaction . Planta Med.,66:607-600.

19-Nagumo,S.;Fukuju,A.;Takayama,M.;Nagai,M.;Yanoshita,R.and SamijiY.and Samejima ,Y (1999): Inhibition of lyso PAF Acetyl transferase activity by components of licorice root . Biologecal Pharmacology.Bull.22:1144-1146 .

The inhibitory and immunology effect of Ricinius communis leaf and its antibiotic activity and immune system stimulation

M.F.Darwesh Z.Muhsin

College of Science / AL-Kufa University

Abstract :-

The present study aimed to determine the possible antimicrobial effects of aqueous extract (hot and cold) *Ricinius communis* leaf on some pathogenic bacteria such as *S. aureus , Klebsiella spp., P. mirabilis, Ps. aeruginosa* , As well as to evaluate the ability of aqueous extract in stimulate immune response in mice .The result showed no effect of *Ricinius* extract on inhibition the bacterial growth in diffrent concentration 2-20% .

Also , the result showed that the plant extract enhancement the activity of immune system, this observed from significant increase in values of most immunological parameter compared with control and this enhancement depended on the dose, when increase the dose cause increase in immune response , it has been found also , that the cold aqueous extract was more effect than hot extract .

Aqueous extract of *Ricinius communis* leaf had astimulatory effect for immune response in mice