

التحري عن فعالية المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر (*Cordia myxa*(L.) في التعديل المناعي (Immunomodulatory)

حوراء عبد الامير علي الدهان
كلية العلوم - قسم التحليلات المرضية/جامعة الكوفة

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة الكشف عن بعض المركبات الكيميائية الطبية الفعالة والاستخلاص الكحولي لثمار نبات البمبر (*Cordia myxa*(L.) باعتباره واحد من اهم النباتات الطبية التي تستخدم في علاج العديد من الامراض. حضرت مجموعة من التراكيز لهذا المستخلص للتحري عن سميته للخلايا المناعية (المفاوية والبلعمية). وجد في هذه الدراسة ان النسبة المئوية لسمية المستخلص للخلايا المناعية قد انخفضت وبشكل معنوي بزيادة التركيز، وقد تم اختيار التركيزين (750 و1000) مكغم/مل في التجارب المناعية اللاحقة. ان فعالية المستخلص كمعدل مناعي قدرت خارج الجسم الحي باستخدام خلايا ذكور الفئران للمفاوية والبلعمية المنشطة. حيث بينت النتائج ان التراكيز (750 و1000) مكغم/مل من المستخلص ادت الى تثبيط قابلية التحول للمفاوي غير المعتمد على الانسمام الخلوي (0.2، 0.1) مقارنة بالسيطرة السالبة والموجبة التي كانت (0.3، 1.6) على الترتيب، كما ووضحت النتائج ان فحص اختزال صبغة NBT قد اظهرت تثبيطاً معنوياً (دون حدوث انسمام خلوي) في النسبة المئوية لخلايا PMNL المكونة لحبيبات الفورمزان والتي بلغت (29.4، 15.2) مقارنة بالسيطرة (43.1).

المقدمة:

ينتمي نبات البمبر (*Cordia myxa*(L.) الى العائلة البورانجينية (Boraginaceae) والتي تحوي على اكثر من 148 جنساً و2740 نوعاً تنتشر نباتات هذه العائلة في المناطق المعتدلة والحارة وشبه الاستوائية في جميع قارات العالم، وتتركز في منطقة البحر الابيض المتوسط (15). وفي العراق تنتشر زراعة نبات البمبر (*Cordia myxa*(L.) في منطقة البصرة وبشكل واسع (25). ويعد الجنس *Cordia* (الحوي على اكثر من 200 نوعاً) واحد من اكبر الاجناس لهذه العائلة والتي تستخدم بشكل واسع للاغراض الطبية والمشروبات العطرية والزيتية، حيث تكون ثمرة نبات البمبر ذات لب غروي صمغي تؤكل طازجة، كما وتستخدم الثمار الخضراء في صناعة المخللات وله استخدامات كثيرة وشائعة في الطب الشعبي حيث تستخدم كمادة للجراثيم (Antibacterial) ومضادة للديدان (Antiworm) (22) وفي معالجة الالتهابات المعوية (Anti-inflammation) (4). كما وتستخدم بشكل واسع في معالجة الامراض البولية والصدريه. وان المستخلص الكحولي لهذا النبات له فعالية في تقليل الالتهابات وخفض الالام والحرارة (5). ووضحت العديد من الدراسات (3 & 25) ان المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر تحوي على اربعة انواع من المركبات الفلافونيدية (Flavonoids) (robinin, rutim, datiscoside, heperidin) بالاضافة الى مواد زيتية نايتروجينية، قلويدات (من نوع بايرول (pyrole) وصمغ (gum)، ومواد دباغية (tannins). وجد ان المستخلص الطازج لثمار نبات البمبر (*Cordia myxa*(L.) يعطي حماية ضد مرض تليف الكبد (liver fibrosis) حيث وجد ان 1 ملغم من المستخلص الخام يعادل 15 مكغم من حامض الاسكوربيك (ascorbic acid) حيث له فعالية ضد الاكسدة للعديد من انزيمات الكبد (ALP, ALT, AST) (2). ونظرا للآثار الجانبية السلبية للعديد من الادوية المستخدمة في علاج الامراض المناعية (مثل امراض المناعة الذاتية والحساسية) والتي تستخدم لفترة طويلة وماتسببه من مضاعفات، من هنا جاءت اهمية البحث عن جزيئات ذات فعالية حيوية (bioactive) ذات تأثير سمي اقل (lower toxic effect) مما هو عليه في الادوية الكيميائية (12). وفي هذه الدراسة تم تقدير فعالية المستخلص الكحولي لثمار البمبر كمعدل مناعي (immunomodulator) من خلال معرفة تأثيره على عملية التحول للمفاوي (Lymphoproliferation) واختزال صبغة NBT (Nitroblue tetrazolium).

المواد وطرق العمل

1. تحضير المستخلص النباتي Preparation of plant extract

جمعت عينات ثمار نبات البمبر الناضجة من اشجار البمبر، وغسلت الثمار جيدا بالماء الجاري وجففت وأزيلت منها الاقماح، وتركت في الظل لتجف معرضة للهواء الجوي وبعدها طحنت الثمار الناضجة الجافة واحتفظ بالمسحوق لحين استعمالها في الاستخلاص والدراسة الكيميائية، وقد تم أيضا خزن قسم من الثمار الطازجة بدرجة حرارة (-18م°) لتقدير تركيز الصمغ فيها.

2. الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المركبات الفعالة الموجودة في النبات

1-1. الصمغ (Gum)

تم فصل المادة الصمغية من ثمار نبات البمبر المهروسة باتباع طريقة (16) وذلك بالتسحيح مع الكحول الايثيلي وحسبت النسبة المئوية بعد التجفيف بدرجة حرارة 100م°. ثم عمل الصمغ الناتج مع كاشف Naphtho Resorcino I للكشف عن وجود السكريات الاحادية (Galactose) وحامض الـ Glucuronic acid .

2-2. الكشف عن المواد الدباغية Tannins

غليت 10 غم من المسحوق النباتي مع 50 مل من D.W، ورشح المحلول وترك الراشح ليبرد، ثم قسم الى جزئين، أضيف للقسم الاول 1% خلات الرصاص للاستدلال على وجود راسب ابيض هلامي القوام يدعى بالتانينات، اما القسم الثاني فاضيف اليه محلول 1% كلوريد الحديدك حيث يدل اللون الاخضر المزرق على وجود التانينات ايضا (10).

3-2. الكشف عن القلويدات (Alkaloids)

وتم حسب طريق (23) وذلك بغلي 10 غم من المسحوق النباتي مع 50 مل من D.W. المضاف اليه حامض الهيدروكلوريك (4%)، رشح المحلول بعد تبريده، وبعدها تم اضافة 0.5 مل من الراشح في زجاجة ساعة مع الكواشف التالية:

- كاشف ماير : ظهور راسب ابيض
- كاشف واكنر: ظهور راسب بني
- كاشف البكريك: ظهور راسب اصفر
- كاشف دراكندروف: ظهور راسب برتقالي

4-2. الكشف عن المادة الزيتية النابتروجينية:

تمت بنفس طريقة الكشف عن القلويدات ولكن باستخدام كاشفي Mayer and Dragendorff eagent معا حيث تتكون مادة زيتية كثيفة القوام مائلة قليلا للصفرة (21).

2-5. قياس الاس الهيدروجيني pH

خلط 10 غم من المسحوق النباتي الى 50 مل من D.W. رشح المحلول وتم قياس pH باستخدام جهاز meter - pH (21).

3. تحضير مستخلص ثمار البمبر

وضع 10 غم من مسحوق الثمار المجففة في دورق زجاجي بعد سحقه ووضع في كشتبان ورقي (Thumble)، ثم وضع في جهاز الاستخلاص (Soxhelt extract) بدرجة حرارة 40م° ولمدة 24 ساعة واستخدم الكحول الايثيلي بتركيز (70%) . جفف المستخلص بجهاز المبخر الدوار (Rotary evaporeta) الحراري (14). فتكون راسب ذو قوام لزج واعتبر المستخلص الناتج كمادة اولية، استخدمت في تحضير المحلول الاساس (Stock solution) وذلك باذابة 1 غم من الثمالة الجافة في 10 مل من D.W. ثم حضرت منها التراكيز التالية : 100، 250، 500، 750، 1000 مكغم/مل.

التجارب المناعية

1.4 فحص سمية المستخلص للخلايا المناعية Cytotoxicity assay

- حضر عالق الخلايا للمفاوية المعزولة من طحال حيوانات الاختبار وحيوانات السيطرة (فئران ذكور من نوع BALB/c) وفق ما جاء في (7)، حيث رفع الطحال من طحال حيوانات الاختبار وحيوانات السيطرة، ووضع كلا على حدة في أطباق بلاستيكية معقمة حاوية على قطرات من الوسط RPMI-1640 المضاف له 10% مصل العجل الجنيني (Fetal calf serum) و50 مكغم/مل من مضاد Gentamycin.
- أزيلت القطع الدهنية والانسجة الرابطة من حوله وغسل العضو بمحلول هانكس الملحي المتوازن (HBSS) والمحضر حسب طريقة (17) باستعمال محقنة ذات ابرة بحجم 260 وملقط مستدير النهائيين. ضرب على الطحال عدة مرات لكي يسمح بخروج الخلايا.
- جمعت الخلايا في انابيب بلاستيكية ورسبت بالنبذ المركزي (1500 دورة/دقيقة) لمدة 5 دقائق.
- تم التخلص من كريات الدم الموجودة معالخلايا للمفاوية في الطحال بتحليلها باستخدام محلول كلوريد الامونيوم (0.83وزن/حجم)، علقت الخلايا لمدة 5 دقائق ورسبت بسرعة 1500 دورة/دقيقة. غسلت الخلايا 3 مرات بمحلول HBSS وعلقت بمحلول RPMI- 1640.
- قدرت سمية المستخلص باستخدام طريقة (19) باضافة 0.5 مل من عالق الخلايا للمفاوية الى 0.5 مل من كل تركيز من تراكيز المستخلص وتركت انبوبة بالتركيز صفر كعامل سيطرة. حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة ساعة واحدة. ثم حسبت 200 خلية لاستخراج النسبة المئوية لسمية الخلايا باستعمال صبغة التريبيان الزرقاء (0.2%) علما ان الخلايا المصبوغة تعد ميته من خلال القانون التالي :

النسبة المئوية لسمية الخلايا = عدد الخلايا الميتة

$$100x \frac{\text{العدد الكلي}}{\text{العدد الكلي}}$$

2.4 فحص التحول للمفاوي Lymphocyte transformation assay

- استخدمت طريقة (9) باضافة المستخلص لانابيب اختبار تحوي 0.4 مل من عالق الخلايا للمفاوية بتركيز 4 x 10⁶ خلية/مل والمحضر في الفقرة السابقة وبتركيز نهائية (500، 750، 1000) مكغم/مل في محلول داريء الفوسفات الملحي PBS. اضيف 0.4 مل من وسط RPMI-1640 مع 0.4 مل من عالق الخلايا للمفاوية في انابيب معقمة وعدت كسيطرة سالبة.
- اضيف 0.4 مل من المشطر اللانوعي PHA (10 مكغم/مل) الى 0.4 مل من عالق الخلايا للمفاوية في وعدت كسيطرة موجبة.
- حضنت الانابيب بحرارة 37°م بوجود 5% من غاز CO₂ لمدة 6 ايام بالنسبة لانابيب الاختبار والسيطرة السالبة و3 ايام لانابيب السيطرة الموجبة. وبعد انتهاء مدة الحضان. اضيف 40 مايكروليتر من صبغة MTT المحضرة حسب طريقة (18). ثم اعيد الحضان بالظروف نفسها لمدة 4 ساعات اخرى .
- اضيف 300 مايكروليتر من المادة المذابة HCl-Isopropanol (0.04N) لكل الانابيب. وتم قراءة طيف الامتصاص باستخدام جهاز المطياف الضوئي (578 نانوميتر) لحساب نسبة التحسس (Sensitization rate). حسب طريقة (20).

طيف الامتصاص لانابيب الحاوية على المستخلص او المشطر

$$\text{طيف الامتصاص لانابيب الخالية على المستخلص او المشطر} = \text{نسبة التحسس}$$

3.4

ملحق بحوث مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 15 العدد 4 سنة 2010 (ISSN 1997-2490)

تأثير المستخلص على اختزال صبغة NBT (Nitroblue tetrazolium) على خلايا البلعمية الصفافية من الفئران المحضر حسب طريقة (24) في انابيب بلاستيكية معقمة واذيف 0.5 مل من المستخلص الى كل انبوب بتركيز نهائية (500، 750، 1000) مكغم /مل وتركت انبوبتان دون معاملة كسيطرة واذيف الى كل انبوب اعلاه 1 مل من محلول صبغة NBT ثم رجبت الانابيب بلطف لمزج محتوياتها. حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 25 دقيقة، وبعد الانتهاء من الحضان اخذت قطرة من كل الانابيب ونشرت على شريحة زجاجية، وتركت لتجف، ثبتت بالميثانول. وصبغت بصبغة كمزرا لمدة 15 دقيقة وحسبت 200 خلية تحت المجهر الضوئي (100X) لاستخراج النسبة المئوية للخلايا البلعمية التي تمكنت من انتاج ايون اوكسيد O₂- وبالتالي اختزال صبغة NBT.

النتائج والمناقشة :

تحتوي معظم النباتات على مركبات كيميائية لها فعالية طبية ومن هذه المركبات هي الكلايكوسيدات والتانينات ومواد دباغية والصابونيات والفلافونويد . وقد اظهرت نتائج التحليلات الكيميائية التمهيدية ان ثمار نبات البمبر تحوي على الصمغ (Gum) والقلويدات (Alkaloids) ومواد دباغية (Tannine) وان قيمة الاس الهيدروجيني PH = 6.4 وعلى هذا الاساس تعتبر ثمار نبات البمبر من الثمار الحلوة المذاق وهذا ما اكده كل من (16 & 25) باحتواء ثمار نبات البمبر على الصمغ والقلويدات (نوع بايرون) ومواد دباغية ومواد زيتية نايتروجينية (Nitrogenous oily component) وفلافونويد (Flavonoid) والتي لها دور كبير في التحفيز المناعي .بالاضافة الى احتواء الثمرة على ماء ورماد وفيتامين C وبروتين. وهذا ما دفع الى استخدام الثمار الناضجة والبذور في علاج الكثير من الامراض وصناعة الادوية بفعل ما تحويه من المركبات الطبية الفعالة الخالية من التأثير الجانبي السلبي. ينفرد نبات البمبر عن باقي النباتات الاخرى من حيث مصدر انتاجه للصمغ. وتعتبر الثمرة الجزء الوحيد في النبات الذي يحتوي على مواد صمغية تحيط النواة بشكل كثيف لزج القوام شفاف يتجمع حول البذرة بغزارة وسماك يتراوح بين (0.4 - 0.5) سم. وصمغ نبات البمبر محلول متوسط الحموضة في الماء، كما اثبتت النتائج الحالية ان الصمغ ذو تركيب كيميائي خاص بالاصماغ النباتية، وذلك لوجود حامض (Glucuronic acid) وبعض السكريات الاحادية (Galactose) التي اعطت لونا مانلا للوردي عند معاملتها بكاشف Naphtho Resorcinol. وقد اشار (2) الى ان ثمار البمبر المجففة في الظل يتغير لونها بشكل من اللون الوردي المخضر الى البني المسود نتيجة للاكسدة والبلمرة الهوائية لمركبات هذا النبات. ووضح (11) ان ثمار البمبر تحوي على العديد من المركبات الفينولية والتي شخّصت وعرفت بامتلاكها فعالية ضد الاكسدة (Antioxidants).

- اختبار سمية المستخلص للخلايا (Cytotoxicity)

يوضح الجدول (1) نتائج سمية المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر للخلايا اللفاوية والخلايا البلعمية الصفافية المعاملة بتركيز مختلفة من هذا المستخلص (100، 250، 500، 750، 1000) مكغم /مل مقارنة مع مجموعة السيطرة المعاملة بمحلول داريء الفوسفات الملحي. وقد اوضحت النتائج ان النسبة النوية لسمية المستخلص ازدادت بزيادة تركيز المستخلص وبشكل غير معنوي عند التركيزين (100 و 250) مكغم /مل حيث بلغت (7.4 و 8.2) للخلايا اللفاوية و(6.8 و 7.1) للخلايا البلعمية الصفافية على التوالي مقارنة بالسيطرة ثم عادت لتتخفف في بقية التراكيز حيث سجلت اقل سمية لها وبشكل معنوي (p < 0.05) عند التركيز 1000 مكغم /مل حيث بلغت (4.1 و 4.3) للخلايا اللفاوية والخلايا البلعمية الصفافية على التوالي. وعلى هذا الاساس تم اختيار التركيزين (750 و 1000) مكغم /مل في التجارب المناعية اللاحقة باعتبارها اقل سمية من بقية التراكيز. وقد اوضحت النتائج ان لهذا المستخلص سمية منخفضة مما دفع الى استخدامه في الصناعات الدوائية مما له من فعالية بايولوجية في علاج الروماتزم ومسكن للالام .

ملحق بحوث مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 15 العدد 4 سنة 2010
(ISSN 1997-2490)

جدول(1): تأثير مستخلص ثمار نبات البمبر على سمية الخلايا البلعمية والخلايا اللمفاوية

النسبة المئوية لسمية المستخلص (%) (المعدل \pm الانحراف المعياري)		تركيز المستخلص مكغم/مل
الخلايا البلعمية الصفاقية	الخلايا اللمفاوية	
3.7 \pm 6.0	3.8 \pm 6.2	السيطرة
1.5 \pm 6.8	1.4 \pm 7.4	100
2.1 \pm 7.1	* 1.7 \pm 8.2	250
2.2 \pm 7.0	2.3 \pm 6.7	500
1.0 \pm 6.2	0.8 \pm 5.6	750
* 1.6 \pm 4.3	* 1.8 \pm 4.1	1000

* (وجود فروق معنوية عند $p < 0.05$)

تأثير المستخلص على قابلية التحول اللمفاوي

يبين الجدول(2) نتائج دراسة تأثير المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر على تحول الخلايا اللمفاوية، حيث بينت ان التركيزين (750، 1000) مكغم/مل قد ثبتت تحول الخلايا اللمفاوية، وازداد هذا التنشيط وبشكل معنوي ($p < 0.05$) بزيادة التركيز، حيث بلغت قيم طيف الامتصاص (0.2، 0.1) على الترتيب عند نسبة تحسس (0.7، 0.3) على الترتيب مقارنة مع السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة التي بلغت قيمة طيف الامتصاص لها (0.3، 1.6) على الترتيب. يعرف التحول اللمفاوي بانه تغير الخلية اللمفاوية الصغيرة الساكنة الى ارومة لمفية (Lymphoblast). يحفز هذا التحول بمستضدات تدعى المشطرات (Mitogens)، كما وتوجد العديد من المشطرات التي تستخدم لتحفيز الانقسام والتكاثر اللانوعي للخلايا اللمفاوية وتحولها الى ارومات لمفية منها المشطر (Concavalin/ConA) و (Phyto haemoagglutinine/PHA) الذي استخدم في هذه التجربة كسيطرة موجبة وهو عبارة عن لاكتين (Lactin)، وهو يحفز الخلايا التائية بشكل خاص عن طريق ارتباطه ببروتينات على سطح الخلايا اللمفاوية تدعى Mitogen receptors (13). وقد جاءت هذه النتائج مطابقة للنتائج التي حصل عليها (12) والتي تشير الى تنشيط عملية التحول اللمفاوي غير المعتمد على الانسمام الخلوي (Cytotoxicity). كما و اشار (13) ان IL-2 (من اهم الساييتوكينات التي تفرز من جراء تنشيط الخلايا اللمفاوية) ايضا تم تثبيطه من قبل المستخلص، وهذا يؤكد قدرة هذا المستخلص في التعديل المناعي غير المعتمد على الانسمام أيضا.

جدول(2) تأثير مستخلص ثمار البمبر على قابلية التحول اللمفاوي (Proleferation)

نسبة التحسس	قيم طيف الامتصاص (المعدل \pm الانحراف المعياري)	تركيز المستخلص مكغم/مل
1	0.03 \pm 0.3	صفر (سيطرة سالبة)
5.3	0.12 \pm 1.6	PHA
0.7	0.21 \pm 0.2	750
0.3	0.5 \pm 0.1	1000

تأثير المستخلص على اختزال صبغة NBT

يستخدم فحص اختزال صبغة الـ NBT من قبل الخلايا البلعمية الصفاقية (وحيدة النواة وخلايا الـ PMNL) في معرفة قدرة هذه الخلايا على بلعمة الجراثيم ، اذ يعتمد هذا الفحص على قدرة الخلايا البلعمية في انتاج أيون السوبر اوكسيد -O₂ الذي يعتمد على ختزال صبغة NBT الصفراء الذائبة الى حبيبات الفورمزان (Formazan) الزرقاء الداكنة المترسبة في سايتوبلازم الخلية البلعمية كما في المعادلة التالية :

$$\text{NBT} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Formazan} + \text{O}_2$$

يوضح الجدول (3) نتائج معاملة الخلايا البلعمية الصفاقية بالتركيزين (750، 1000) مكغم/مل من مستخلص البمبر في فحص اختزال صبغة NBT والتي اظهر فيها تثبيط معنوي في النسبة المئوية لخلايا PMNL المكونة لحبيبات الفورمزان والتي بلغت (29.4، 15.2) مقارنة بالسيطرة (43.1) .

جدول (3) تأثير مستخلص ثمار البمبر على اختزال صبغة NBT

تركيز المستخلص مكغم/مل	% للخلايا المكونة للفورمزان (المعدل ± الانحراف المعياري)
صفر (السيطرة)	43.1 ± 2.1 *
750	29.4 ± 2.3 *
1000	15.2 ± 1.3 *

كما و اشارت العديد من الدراسات (6 & 1) ان العديد من المستضدات البكتيرية مثل عديد السكريد الشحمي وبروتينات الغلاف الخارجي (OMPs) له تأثير محفز ومنشط لاختزال صبغة NBT من pa ايض الاوكسجين عن طريق تنشيط مسار (Hexose monophosphat shunt/HMS) الذي يحدث فيه زيادة استهلاك O₂ لانتاج -O₂ والذي يلعب دورا مهما في قتل الاحياء المجهرية بفعل تجمع الاشكال المختزلة للاوكسجين -O₂ و H₂O₂ ، حيث ان الخلايا البلعمية المفعلة تنتج كمية اكبر من السوبر اوكسيد فضلا عن انتاج الانزيمات الحالة داخل الخلية (8)، في حين اظهرت نتائج الدراسة الحالية قابلية مستخلص نبات ثمار البمبر على تثبيط عملية البلعمة من خلال تثبيط اختزال صبغة NBT غير المعتمد على سمية هذا المستخلص للخلايا البلعمية .

ان جميع النتائج اعلاه تدعم الاساس في استخدام هذا النبات من قبل الطب الشعبي في علاج الامراض من خلال قدرته في التعديل الناعي دون حدوث انسمام للخلايا المناعية (المفاوية والبلعمية).

المصادر :

- 1-Abdul-Rahman ,I.A.(2002).Extraction , purification and characterization of outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: An immunological study .Ph.D. thesis ,Al-Mustansria university.
- 2-Afzal,M.;Obuekwe,A.R.; Khan ,A.R. and Barakat,H.(2007).Antioxidant activity of *Cordia myxa* (L). and its hepatoprotective potential. *Electronic J.Envir.Agricul.& Food Chemistry*.6:2109-2118.
- 3-Afzal,M.;Obuekwe,C.; Shuaib,N.and Barakat,H.(2004).Photosynthetic pigment profile of *Cordia myxa* (L) and its potential in folklore medicinal application.*J.of food agriculture and environment*.20:114-120.
- 4-Agra , M.F. ; Franca , P.F. and Barbosa-Filho ,J.M.(2007).Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Parazil. *Rev.Bras. Farmaccogn*. 17:114-140.
- 5-Al-Awadi,F.M.; Srikumar,T.S.Anum ,J.T.and Khan,J.(2001).Anti-inflamation effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats.*Nutration* .17:391-396.
- 6-Al-Neiami,E.N.A.(2000).Immunological study of some antigens for *Pseudomonas aeruginosa*.Ms.C. thesis ,Al-Mustansria university.
- 7-Brown,C.A.; Brown,I.W.and Siljivic,V.S.(1978).Entancement of the antibody response in vitro by BCG IN.Developments in Biological standardization.38:145.Edited Griffith, A.H. and Regamy,R.H.Paris,London,New york,Sydney.
- 8-Cravens, S.M.S.(1996).Virulence factors involved in shipping fever.Pfizer Animal Health.17:1-4.
- 9-Gerlier, D. and Thomassi,N.(1986).Use of MTT colorimetric assy measure cell activation .*J.Immunol.Meth.*,94:57-63.
- 10-Harbone,J.B.(1984).Phytochemical methods.Aguide to modern techniques of plants analysis.2nd .ed London ,New york ,Champan and Hall.
- 11-Jayaprakasam, B.;Vareed , S.K.; Olson ,L.K. and Nair,M.G.(2005).Insulin Secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits .*J.of Agriculture and Food chemistry* .53:28-31.
- 12-Jose,F.O.C.; Juceni,P.L.D.; Jorge, M.D.; Ana,M.G.; Luciano ,P.Q.; Ricardo,R.S.and Milene ,B.P.S.(2008).Immunomodulatory activity of *Cordia myxa* and *Cordia rufescens* A.DC.(Boraginaceae).Pant species native from Brazilian semi-arid .*Rev.bras.Farmacogn.*,18:1-8.
- 13-Klein,J. (1990).Immunology. Blackwell Scientific publications.Oxford.London.Paris.Berlin.Vienna.
- 14-Ladd,T.L.;Jacobson,M.and Burff,C.R.(1978).*J.Econ.Entorol*.71:810-813.
- 15-Langstrom, E.and Chase M.W.(2002).Tribes of Boraginoideae (Boraginaceae).and placement of antiphytum,*Echiochilon* , *Ogastemm* ,and *Sericostoma*:A Phylogenetic analysi based on atpB plastid DNA sequence data.*Plant syst.Evol.*, 234:137-153.
- 16-Mejeed,G.H.; Musa,T.N. and Al-Saraji,E.H.(1992).Gum substance of Banbar fruit *Cordia myxa* L.Basrah *J.Agric.Sci.*,5:177-188.
- 17-Metcalf,J.;Gallin,J.;Nausecf, W.and Root ,A.(1986).Transduction, mechanisms receptor expression.In laboratory manual of neutrophil function,Ravenpress , Newyork PP:78-79.

18-Mossan,T.(1983).Rapid colorimetric assay for cellular and survival application to proliferation and cytotoxicity assay.J.Immunol.Method.6:513.

19-Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y.; Nishida, M.; Goto, S.; and Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing of rabbit polymorphonuclear leukocyte inhibition .Infect. Immun., 24:399-403.

20-Rosenberg,S.A. and Leavy ,R.(1972).Rapid assay cell mediated- immunity to soluble antigens based on the stimulation of protein synthesis .J.Immunol.108:100-107.

21-Shihata,I.M.(1951).Pharmacology study of analogies arvensis.M.D.Vet.thesis,Cairo university.

22-Silva ,S.A.;Souto,A.L.and Agra,M.F.(2004).A new arylnaphtalene type ligand from *Cordia rufescens* A.DC.(Boraginaceae).Arkivoc,6:54-58.

23-Stahl,E.(1969).Thin layer chromatography laboratory.Verlge.Berlin.Heidelberg.New york.

24-Weber,B.; Nickol,M.M. and Saelinger, C.B.(1982).Interaction of *Pseudomonas* exproduct with phagocytic cells.Can.J.Microbiol.28:679-685.

25 -عسكر،منال عبد اللهز(1994)زدراسة كيميائية لثمار وبنور نبات البمبر *Cordia myxa* المزروع في البصرة رسالة ماجستير .كلية الزراعة-جامعة البصرة.

Detection of Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Cordia myxa*(L.) fruit

Hawra`a A.A.Ad-Dahhan

Laboratory investigation Dept.-College of Science
/Kufa University

Abstract:

This study was doing to detect the medically active compounds and ethanolic extract of *Cordia myxa*(L.) fruits,since this plant considers one of the medically important plants, which is widely used for treatment of numerous diseases .The toxicity of this extract to immunological cells (lymphoid & phagocyte)was evaluated and different concentrations of extract were prepared .the percentage of cytotoxicity was inhibited significantly ($P<0.05$) with increase the concentration of extract .The concentrations (750 ,1000) $\mu\text{g/ml}$ were used in following immunological experiments .The immunomodulatory activity was determined in vitro assays with using activated mouse (males type BALB/c) macrophages and lymphocytes by using lymphoproliferation and reduction of NBT stain .These results indicate that concentration of (750 ,1000) $\mu\text{g/ml}$ inhibited The proliferation not due cell toxicity (0.2, 0.1) respectively ,in comparison with negative and positive control(0.3 , 1.6) respectively .The results of NBTwere indicated the significant inhibition (without cytotoxicity) in the percentage of PMNLs forming Formazan granules which were (29.4 , 15.2) in comparison with control(43.1).deferent