تأثير مستخلصات نبات الشيح *Artemisia herb-alba* المائي والكحولي في كفاءة عملية البلعمة

Effect of aqueous and ethanol extracts of *Artemisia herb – alba* plant on the phagocytosis

أ.م. حسين علي عبد اللطيف / علوم الحياة / كلية الزراعة / جامعة كربلاء
م.م. أزهار موسى جعفر / علوم الحياة / كلية التربية / جامعة كربلاء
م.م. لقاء حسون صگبان / علوم الحياة / كلية التربية / جامعة كربلاء

الخلاصة :

أجريت الدراسة لغرض تقييم تأثير نبات الشيح ***Artemisia herb – alba*** في كفاءة ونشاط الخلايا البلعمية Phagocytes بنوعيها وحيدة النواة Monocyts والخلايا مشكلة النواة (مفصصة النواة Polymorph nuclear PMNLs (Leukocytes باختبار عملية البلعمة (Phagocytosis). قد اختبر تأثير المستخلص المائي والكحولي لأوراق هذا النبات . كانت نسبة المستخلص المائي للأوراق 22 % والمستخلص الايثانولي **17** % وأوضحت النتائج انه عند إضافة تراكيز مختلفة من المستخلصات فان النسبة المئوية لعدد الخلايا المبلعمة يزداد بازدياد التركيز مقارنة مع عينة السيطرة ابتداءاً من التركيز 62.5 مايكروغرام / مليلتر وصعودا الى التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر . وكان المستخلص المائي أكفأ المستخلصات الخام تأثيراً في زيادة عدد الخلايا المبلعمة .

ABSTRACT:

This study aims to evaluate effects of one of the medical plants in its natural form which is called *Artemisia herb – alba* and its activity of phagocytes which has two kinds (monocytes) and (polymorph nuclear) PMN by experiment test namely(phagocytosis). A test has been made of two types of extracts of this plant (water and ethanol extract) for the plant part (leaves) . and there are rate of extract record as 22 % for the water extract of the leaves,but ethanol extracts record 17%. The results showed that when addition different concentrations from extracts were not increase percentage of phagocyte number compared with control sample as beginning from concentrated 62.5 to 1000 µg / ml . The water extract was more efficient in increasing the phagocytosis .

المقدمة :

نبات الشيح ***Artemisia herb – alba*** هو نبات خشبي عشبي متفرع من القاعدة يعود إلى العائلة (Asteraceae) . يحوي هذا الجنس تقريبا 380 نوع منتشرة جغرافيا حيث تتواجد أنواعه في أوربا والمنطقة الاستوائية ، جنوب غرب أسيا ، الشرق الأوسط ، شمال إفريقيا بالإضافة إلى الشمال الشرقي لأمريكا (Watson *et al* ., 2002) . ويعد هذا النبات من النباتات الصحراوية المنتشرة في مصر ، الأردن ، سوريا ، إيران (Al-Khazraji , 1991) .كما أن هذا النوع شائع وجوده في العراق في منطقة مكاو شمال غرب مندلي وبحيرة الثرثار واربيل والبصرة ومنطقة الجزيرة في النجف والفلوجة والرطبة وسنجار والصحراء الغربية في غرب الرمادي وفي سلمان باك والصحراء المعتدلة والشمالية ، و يعد من النباتات التي تستخدم لرعي الحيوانات ويكون طرازه بري في العراق (Crespo *et al.*, -1990) . تعمل المستخلصات الخام للنبات كمضادات للبكتريا وتساعد في تقليل الالتهاب الرئوي المزمن وكمضادات للثآليل والطفيليات (Rai *et al* ., 2003) كما ان للنبات طيف واسع من الاستخدامات الطبية في الطب الشعبي في العراق كعلاج مرض السكر حيث تاخذ مستخلصاته عن طريق الفم (Twaij and Al-Badr , 1988) . يحتوي نبات الشيح على الزيوت المتطايرة والتانينات التي تسهل عمليات الهضم بزيادة الإفراز في المعدة والأمعاء (Remberg *et al.*,2004) . كما ان للزيوت الأساسية فعالية ضد البكتريا والفطريات كما أنها تساعد في علاج الأنفلونزا والحمى ولعلاج الصداع (Graven *et al* ., 1990) . يكمن دور النبات في تنشيط الجهاز المناعي في تنشيطه للخلايا البلعمية ومنها خلايا الدم البيض الحبيبية (Granular Leucocytes) والتي هي أكثر خلايا الدم البيض وفرة والخط الدفاعي الأول للجسم (ومنها الخلايا العدلة Neutrophils) إذ تتولد استجابة سريعة من قبل هذه الخلايا عندما تغزوه البكتريا حيث تحيط الخلايا العدلة البكتريا وتقوم بهضمها داخلياً Endocytosis بواسطة إنزيمات حالة موجودة في الحبيبات السايتوبلازمية ويطلق على هذه العملية بالبلعمة Phagocytosis (Powers , 1989) . لذا هدفت هذه الدراسة لبيان أهمية هذا النبات في الجهاز المناعي ودوره في تنشيط الخلايا المهمة مناعيا والتي تقوم بالتصدي للأمراض وبالتالي يمكن ان يوصف كدواء معزز للمناعة .

طرائق العمل :

تم جمع نبات **الشيح *Artemisia*** في محافظة كربلاء ، أخذت الأوراق فقط ونظفت وغسلت ثم جففت في الظل بعيدا عن أشعة الشمس بدرجة حرارة الغرفة مع التقليب المستمر لمنع تعفنها وبعدها طحنت النماذج النباتية الجافة طحنا خشنا بواسطة مطحنة كهربائية ، ثم حفظت الأجزاء المطحونة في قناني بلاستيكية نظيفة ذات غطاء محكم بعيدا عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال .

لغرض الحصول على المستخلص الخام Crude Extracts تم إتباع طريقة Abu-Ghdeib and Shtayeh (1999) مع إجراء بعض التحويرات وعلى النحو التالي :-

- وضع 50 غرام من مسحوق أوراق الشيح في دورق حجمي سعة لتر .
- أضيف إليه 500 مليلتر من الماء المقطر وأغلقت الفتحة بواسطة parafilm .
- وضع الدورق على محرك مغناطيسي Magnetic stirrer وترك ليمتزج جيدا بواسطة مازج مغناطيسي ْ (لمدة 72ساعة للمستخلص المائي و24 ساعة للمستخلص الكحولي) وبدرجة حرارة الغرفة 37 مْ .
- رشح المحلول باستعمال الشاش الطبي أولا ثم بورق الترشيح Wattman رقم 1 .
- وزع الراشح في أنابيب النبذ المركزي ونبذ بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة 10 دقائق .
- أهمل الراسب وأخذ الرائق إلى جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator لغرض تركيزه ومن ثم وزن المستخلص الخام الناتج .
- حضر على وفق طريقة Abdul- Majeed (2000) ; Mahony (1989) كل من المستخلص المائي والايثانولي عن طريق إذابة 0.2 غرام من المستخلص الخام في 10 مليلتر من المذيب (phosphate buffer saline) الذي عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة في ظروف معقمة .

تم الحصول على المستخلصات (المائي والايثانولي) للنبات ،عقمت المستخلصات باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.4 ثم بقطر 0.22 مايكرون وحضرت من كل مستخلص خمسة تراكيز بشكل ثنائي وهي62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 مايكروغرام /مليلتر وتحت ظروف معقمة . استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير . تم تحضير المستخلص الكحولي الخام (الايثانولي) بنفس الطريقة المذكورة آنفاً باستخدام الكحول الاثيلي بتركيز 80% (Anessiny and Perez , 1993) .

اتبعت طريقة (Makcie and Mc–Cartney , 1995) في اجراء اختبار كفاءة البلعمة Pagocytosis بعد ان تم تحضير عالق البكتريا حسب طريقة ماكفرلند (McFarland Tube) لبكتريا *E. coli* وحفظت بدرجة حرارة (4مْ) لحين الاستعمال .وكما يلي :-

1- سحب 1 مل من الدم من الأشخاص الأصحاء ، ووضع الدم في EDTA منعا لتخثر الدم لحين الاستعمال .

2- نقل الدم الى plain tube وأضيف له الزرع البكتيري بنسبة 1 : 10 ، وأضيف المستخلص حسب التراكيز المذكورة أعلاه وبواقع مكررين لكل انبوبة وبوجود انابيب السيطرة .

3- حضن الدم مع البكتريا والمستخلص في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة ساعة ونصف .

4- أخرجت الأنابيب من الحاضنة بعد إنهاء مدة الحضن ورجت جيدا بعدها تم عمل مسحة smear من خليط الدم والبكتريا والمستخلص .

5- تترك الشرائح على الزجاجة لتجف بدرجة حرارة الغرفة .

6- تثبت المسحة بواسطة الكحول المثيلي المطلق Absolute methanol وتترك لتجف في الهواء .

7- تصبغ الشرائح بصبغة كمزا Giemsa stain وذلك باخذ 1 مل من محلول stock solution للصبغة وأضيف لها 4 مل من دارئ السورنسن الدافئ .

تم الفحص بواسطة العدسة100X حيث تفحص خلايا Monocyte وخلايا P.M.N. وتحدد عدد الخلايا المبلعمة وغير المبلعمة ، ثم تحسب النسبة المئوية للخلايا من خلال قسمة عدد الخلايا البلعمية على عدد الخلايا المحسوبة (المبلعمة وغير المبلعمة) .

تم تحويل النسب المئوية للخلايا المبلعمة باستخدام التحويل الزاوي الى جيب الزاوية العكسية وطبقت تجربة عاملية بتصميم القطاعات العشوائية 2×6 وبواقع أربعة مكررات لتحليل النتائج (المشهداني و المشهداني 1989) .

النتائج والمناقشة

بلغت نسبة المستخلص المائي لأوراق النبات(22%) وكان قوامه لزجاً وذا لون بني . أما المستخلص الايثانولي للأوراق فكانت نسبته (17 %) وكان قوامه لزجاً وذا لون أخضر داكن .

اختير نبات الشيح كونه واحداً من النباتات الطبية المتوفرة ، ويمتلك خواصاً طبية وعلاجية متعددة ، فضلا عن احتوائه على عدد من المكونات كالسانتونين والزيوت الاساسية التي لها تأثيراً للجهاز المناعي ولتنشيط الخلايا البلعمية (Rai *et al* ., 2003) .تم أخذ نوعين من المذيبات لإجــراء الاســتخلاص وهما (الماء والايثانول) وذلك لبيان الفرق في تأثيرهما حيث أوضح (Edenharder *et al.,* 2002) بأن فعالية المستخلصات النباتية تختلف باختلاف المذيب .

ومن خلال استخلاص النبات باستخدام الكحول الاثيلي كانت المستخلصات ذات لون اخضر داكن يعود إلى صبغة الكلوروفيل الموجودة في النبات (Harborne , 1973) .

تشير النتائج في الجدول (1) (ومن خلال حساب النسبة المئوية للخلايا بقسمة عدد الخلايا البلعمية على عدد الخلايا المحسوبة (100خلية مبلعمة وغير مبلعمة)) وبالمقارنة مع النسبة المئوية لعينة السيطرة) في بيان تأثير نوع المستخلص (مائي او كحولي) والتركيز في نشاط الخلايا البلعمية monocytes الى ان التراكيز اختلفت في تأثيرها على كفاءة ونشاط الخلايا البلعمية حيث زادت نسبة الخلايا المبلعمة بازدياد التراكيز بتأثير معنوي ($p<0.01$) ابتداءاً من التركيز 62.5 مايكروغرام / مللتر وصعوداً الى التركيز 1000 مايكروغرام / مللتر . كما ان المستخلص المائي أكفأ في عملية البلعمة بتأثير معنوي . وكان هناك تداخل عالي المعنوية بين المستخلص وتركيزه وخصوصاً بين المستخلص المائي وتركيز 1000 مايكروغرام / مللتر .

اما بالنسبة لجدول (2) فقد بين تأثير المستخلصات باستخدام التراكيز الخمسة نفسها (62.5 ، 125 ، 250 ، 500 ، 1000 مايكروغرام / مللتر) في الخلايا البلعمية مفصصة النواة Polymorph nuclear Leukocytes فقد أشارت أيضا إلى أن التراكيز اختلفت في تأثيرها على كفاءة ونشاط الخلايا البلعمية حيث زادت نسبة الخلايا المبلعمة بازدياد التراكيز بتأثير معنوي ($p<0.01$) ابتدءا من التركيز 62.5 مايكروغرام / مللتر وصعوداً إلى التركيز 1000 مايكروغرام / مللتر . كما أن المستخلص المائي أكفأ في عملية البلعمة أيضا بتأثير معنوي . وكان هناك تداخل عالي المعنوية بين المستخلص وتركيزه وخصوصاً بين المستخلص المائي وتركيز 1000 مايكروغرام / مللتر .

جدول رقم (1): تأثير تراكيز مستخلص نبات الشيح في كفاءة ونشاط الخلايا البلعمية وحيدة النواة monocytes

النسبة المئوية للخلايا المبلعمة / التركيز	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المتوسط	
1000 مايكروغرام / مللتر	%70	%67	A %68.5	LSD= 0.36
500 مايكروغرام / مللتر	%66	%59	B % 62.5	
250 مايكروغرام / مللتر	%55	%48	C %51.5	
125 مايكروغرام /مللتر	%45	%44	D %44.5	
62.5 مايكروغرام / مللتر	%35	%39	E % 37	
CONTROL	%36	%40	F %38	
	0.69	LSD =		
المتوسط	% 51.17 A	% 49.5 B		
	LSD = 0.11			

- **تشير الحروف المختلفة الكبيرة الى وجود فروقات معنوية بين التراكيز .**

جدول رقم (2): تأثير تراكيز مستخلص نبات الشيح في كفاءة ونشاط الخلايا البلعمية مفصصة النواة PMN

النسبة المئوية للخلايا المبلعمة / التركيز	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المتوسط	
1000 مايكروغرام / مللتر	%69	%66	A %67.5	LSD= 0.96
500 مايكروغرام / مللتر	%54	%45	B % 49.5	
250 مايكروغرام / مللتر	%51.5	%34	C %42.75	
125 مايكروغرام /مللتر	%41.5	%30	D %35.75	
62.5 مايكروغرام / مللتر	%22	%25	F % 23.5	
CONTROL	%36 1.35	%30 LSD=	E %33	
المتوسط	% 46 A LSD = 0.55	% 39 B		

*** تشير الحروف المختلفة الكبيرة الى وجود فروقات معنوية بين التراكيز .**

قد يعزى دور الخلايا في البلعمة وقتلها خارج الجسم الحي إلى دور مادة السانتونين الفعالة التي تحويها تلك المستخلصات أو إلى الكلايكوسيدات الفينولية والتانينات الموجودة في المستخلصات والتي قد تعمل كعوامل جذب الخلايا نحو البكتريا ثم الالتصاق بها ، كما ان للزيوت الأساسية التي يحويها نبات الشيح دور مهم في التأثير على المستقبلات الموجودة على أسطح الخلايا البلعمية اذا تعمل كمواد استساغة opsiazation لتقبل الخلايا البكتريا الموجودة في الوسط الزرعي . (Twaij and Al-Badr, 1988)

ويمكن عد دور المركبات الفعالة في إعطاء الطاقة للخلايا لمساعدتها في التهام البكتريا وإفراز اللايسوسومات عليها .

وتجدر الإشارة إلى أن هنالك تبايناً بين تأثير المستخلصات الخام في ما بينها حيث يتضح ان المستخلص المائي كان أكفأ من الكحولي في التأثير على كفاءة الخلايا ، والسبب في ذلك يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص خام وقدرتها على تحفيز الخلايا البلعمية لاداء وظيفتها (Shoieb *et al.* , 2003) .

المصادر:

• د.محمود حسن المشهداني و كمال علوان خلف المشهداني : (1989) تصميم وتحليل التجارب ، جامعة بغداد .

*Abdul-Majeed,M.R. (2000). Induction and characterization of Su.99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response . Ph D thesis ,Nahrain University Iraq .

*Abu Ghdeib,S.I. and Shtayeh, M.S.A.(1999).Anti Fungal activity of plant extracts against dermophytes . Mycoses,42:665- 672.

*Al-Khazraji,S.M.(1991) : Biopharmacological study of *Artemisia herba Alba* , M.Sc.Thesis , College of Pharmacy . University of Baghdad .

*Anessiny,C and Perez,C.(1993).Screeieng of plants used in Argentine Folk medicine for anti microbial activity .J.Ethnopharmacology . 39 :119-128.

*Crespo , M.E., Jimen ez, J., Gomis, E. and Navarroc.(1990) : Anti Bacterial Activity of the assential oil of Thymus serpylloides subspeciec gadorensis .Microbios ., 61: 181-184 .

*Edenharder,R.;Sager,J.W.;Glatt,H.;Muckel,E. and Platt , K.L (2002). Protection by beverages ,fruits , vegetables, herbs, and Flavonoids against genotoxicitiy of 2-acetylaminoflurorine and amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PHIP) in metabolically competent V79 cell.Mutat.Res.23 :57-72 .

*Graven , E. ; Webber, L.; Venter, M. and Gardiner, J.B.(1990) : The development of *Artemisia afra* Jacq.as a new essential oil crop . Journal of Essential Oil Research , 2:215-220.
*Harborn,J.B.(1973).Pytochemical methods .Science paper backs , Chapman and Hall ,London,pp:110.
*Mackie and Mc-Cartney : (1995). Practical medical microbiology 4th edited by collee et al., New York. USA. PP: 650-651.
*Mahony,D.E. ; Gilliatt,E. ; Dawson,S. ; Stockdal,E. And Lee,S.H.S.(1989).Vero cell assay for rapid detection of Clostridium Perfringins enterotoxin. Appl. Environ.Microbiol.,55:2141-43.
*Powers , L.W. (1989) : The granulocytes in diagnostic hematology , clinical and technical principles – Mosby Co.St. Louis Philadelphia: pp.91-107.
*Rai ,M.K. ;Achary, D. and Wadegankar , R. (2003) : Plant derived- antimycotics : Potential of Asteraceous plant , In : plant –derived antimycotices : Current Trends and Future Prospects Haworth Press , New York , London , Oxford ,PP:165-185.
*Remberg, P.; Bjork , L.; Hedner, T. and Sterner , O. (2004) : Characteristics , clinical effect profile and tolerability of a nasalspray preparation of *Artemisia abrotanum* L. for allergic rhinitis . Phytomedicine , 11:36-42 .
*Shoieb,A.M. ; Elgayyar,M. ; Dudrick,P. ; Bell,E. and Titnof , P.K. (2003).Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by Thimoquinol . Int.Oncology,22:107-113 .
*Twaij, H.A. and Al-Badr, A.A. (1988):Hypoglycemic activity of Artemisia herba alba.J. Ethnopharmacol.,24:123-126 .
*Watson , L.E., Bates, P.L.;Evans,T.M.Unwin,M.M. and Estes, J. R. (2002): Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (asteraceae) , including Artemisis and its allied and segregate genera . BMC Evolutionary Biology , 2:17-29 .