STUDY THE ROLE OF *NIGELLA SATIVA* AQUATIC EXTRACTED IN STAMULATION OF THE IMMUNITY RESPONSE

دراسة دورالمستخلص المائي لبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* في تحفيز الاستجابة المناعية .

ابتسام قحطان عبد الكريم
معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا/ جامعة بغداد

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة على 60 من ذكور الفئران البيضاء وباعمار تتراوح بين 8-12 اسبوع، قسمت الفئران الى اربعة مجاميع (معاملات) مدرجة ادناة، وكل معاملة لها ثلاثة مكررات،وكل مكرر لة خمسة ذكور، تراوح معدل وزنها 22 غم، تم تجريعها باستخدام المستخلص المائي للحبة السوداء لمدة 30 يوماً بصورة متعاقبة، بالتراكيز التالية (0، 200، 300، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم لكل مجموعة وأجريت عليها عدة فحوصات متضمنة قياس تأثير هذه الجرع على نسبة وزن غدة التوثية ووزن الطحال الى وزن الجسم Thymus and spleen index وقياس فعالية البلاعم الكبيرة في التجويف البطني للفئران بواسطة القابلية البلعمية لها لالتهام خلايا كريات الدم الحمراء erythrocytes للدواجن ومن ثم قياس فرط الحساسية المتأخرةdelayed hypersensitivity test . أظهرت نتائج هذه الفحوصات هناك زيادة معنوية $p\leq0.05$ في Thymus index وفحص الحساسية المتأخرة في الفئران عند اعطاء المستخلص المائي للحبة السوداء بتركيز (300، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم بينما لم يسجل spleen index اي زيادة معنوية عند اعطاء اي تركيز من التراكيز المذكورة اعلاه مقارنة بمجموعة السيطرة. اما القابلية البلعمية ونسبة فعالية الخلايا البلعمية فقد أظهرت زيادة معنوية $p\leq0.05$ عند اعطاء كل من التراكيز (200، 300، 500) ملغم/كغم وأفضل مستوى لها عند اعطاء 500 ملغم/كغم.
أظهرت نتائج الدراسة ان أفضل التراكيز المستخدمة من المستخلص كانت (300، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم.

ABSTRACT

Sixty white males mice involved in this study. The range of their age were 8-12 weeks, divided into four groups treatment, each one included three replicates, each replicate include 5 mice, weighted 22g. Aquatic extract prepared from *Nigella sativa* seeds. Different doses (0, 200, 300, and 500) mg/kg body weight orally applied for 30 consecutive days. Later the ratio of thymus /body, spleen/body, macrophage activities and delayed hypersensitivity (DTH) were determined by standard methods. The thymus index and the (DTH) significant increase $p\leq0.05$ at the concentration of (300, 500) mg/kg body weight from the aquatic extract of *N. sativa* seeds, but the spleen index not recorded any significant increase as compared with control. The ability of macrophages to phagocyte and the activity of macrophages revealed significant increase $p\leq0.05$ at all concentration (200, 300, and 500) mg/kg body weight but the best was at 500 mg/kg.
The results of this study showed that the best concentration were (300, 500) mg/kg body weight.

Key words: *Nigella sativa*, Immune effect, aquatic extract.

المقدمة Introduction :

ينتمي نبات النيجيلا ساتيفا *Nigella sativa* لفصيلة النباتات الشقيقية ومن الاسماء المتواترة لهذا النبات هو الحبة السوداء او حبة البركة. وقد استعملت في كثير من دول الاشرقين- الاوسط والاقصى- علاجاً طبيعيا منذ أكثر من الفي عام. كما ان الرسول الاعظم (ص) أوصى باستعمال الحبة السوداء كدواء لكل داء إلا الموت(1).

تم استخلاص مركب النيجللون من زيت الحبة السوداء عام 1959م باعتباره مضاد اكسدة طبيعي، وتحتوي بذور الحبة السوداء على 40% من وزنها زيتاً ثابتاً و 1.4% زيوتاً طيارة، وتحتوي على خمسة عشر حامضاً أمينياً، وبروتين وكالسيوم وحديد وصوديوم وبوتاسيوم (3، 2). وأهم المركبات الفعالة هي: الثيموكينون، والدايثيموكينون، والثيموهايدروكينون، والثيمول Thymoquinone (TQ), dithymoquinon (DTQ), Thymohyroquinone (THQ), Thymol (THY) (4).

وجد ان بذور حبة البركة تحتوي على مضادات مدمرة للفيروسات والميكروبات فضلا عن احتوائها على الرايتنويدات المضادة للسرطان (5). كما ان لها أهمية حياتية وطبية اذ انها تزيد من انتاج interleukin-1 وكذلك interleukin-3 بينما لا تؤثر على interleukin-2 (6).

كما واختبر زيت الحبة السوداء كمضاد للفيروسات وقيست المناعة المكتسبة اثناء الفترة المبكرة من الاصابة بالفيروس بتحديد خلايا القاتل الطبيعى والخلايا البلعمية الكبيرة وعملية البلعمة، بعد اعطاء الزيت وجد تثبيط واضح فى معدلات نمو الفايروس في الكبد والطحال بعد ثلاثة ايام، كما ازدادت معدلات الاجسام المضادة في المصل وانخفاض عدد ونشاط خلايا القاتل الطبيعى وحدث زيادة في اعداد الخلايا المساعدة التائية. في اليوم العاشر من الاصابة لم يتمكن من تحديد اى معدل لوجود الفايروس في الكبد والطحال بينما وجد بوضوح في مجموعة التحكم(7).

وتستخدم بذور هذا النبات لمعالجة مختلف الامراض مثل البرد، السعال، الحمى، وانواع مختلفة من الالام تشمل ألم الاسنان والاضطرابات المعدية والمعوية والغثيان والتقيؤ وعدوى الجهاز البولي وحصوات المثانة البولية او الكلية وطارد الديدان (10 ، 9، 8)، اضافة الى كونه محفزا للجهاز المناعي ولم يتضح دور الحبة السوداء في المناعة الطبيعية حتى عام 1986 بأبحاث أجراها الدكتور القاضي وزملاءه (11) في الولايات المتحدة الامريكية،حيث اجرى دراستين وكانت نتائج الدراسة الاولى زيادة في نسبة الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة Th الى الخلايا الكابحة Ts بنسبة 55% وزيادة متوسطة فى نشاط خلايا القاتل الطبيعى Keller cells بنسبة 30% واثبت البحث الثانى زيادة نسبة الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة الى الخلايا التائية الكابحة 70% وتحسن في نشاط الخلايا القاتل الطبيعى بنسبة74% بعد الاخذ بنظر الاعتبار الضغوطات والاجهادات بالعمل في البحث الاول. ثم توالت بعدها الابحاث في شتى الاقطار وفي مجالات عديدة حول بذور هذا النبات.

الهدف من إجراء هذا البحث تأثير المستخلص المائي للحبة السوداء في بعض مؤشرات الاستجابة المناعية في الفئران.

المواد وطرائق العمل Material and methods :

1- **الاستخلاص المائي لبذور الحبة السوداء:**تم شراء بذور الحبة السوداء من الاسواق المحلية في بغداد ثم حضر المستخلص المائي لها وحسب طريقة Shtayel and Ghdeib (12) والمتضمنة: وزن 50 غم من مسحوق الحبة السوداء ووضعها في دورق سعة 1 لتر وأضيف 350 مليلتر من الماء المقطر وتركها لمدة 24 ساعة على المازج المغناطيسي، رشح المزيج بواسطة الشاش ثم ركز باستخدام جهاز المبخر الدوار وعلى درجة 45ºم حتى يبلغ الحجم 5 مل ثم جفف وحفظ لحين الاستخدام.

2- **حيوانات التجربة:**أجريت هذه الدراسة على ذكور الفئران البيضاء وباعمار تتراوح بين 8-12 اسبوعا قسمت الفئران الى اربعة مجاميع (Treatments)، لكل معاملة ثلاثة مكررات ، ولكل مكرر خمسة فئران، تراوح معدل وزنها حوالي 22غم وعوملت بتجريع المستخلص المائي للحبة السوداء لمدة 30 يوما متعاقبة وبالتراكيز التالية (مجموعة سيطرة control0، المعاملةالاولىT1 200،والمعاملة الثانية T2 300 والمعاملة الثالثة T3 500) ملغم/كغم من وزن الجسم ثم أجريت عليها الفحوصات المناعية التالية:

أ- **قياس تأثير تجريع المستخلص المائي على مؤشر نسبة وزن غدة التوثية ووزن الطحال الى وزن الجسم Thymus and spleen indexes .**

تم قتل الفئران للمجاميع الاربعة بعد تجريعها بالتراكيز المذكورة اعلاة لمدة 30 يوماً وأخذ قياس وزن كل من الغدة التوثية والطحال نسبةً الى وزن الجسم spleen/thymus: body weight = spleen/thymus index.اعتماداً على طريقة Chen,H.L.et al. (13).

ب- قياس فعالية البلاعم الكبيرة في التجويف البطني للفئران بواسطة القابلية البلعمية لها لالتهام خلايا كريات الدم الحمراء erythrocytes للدواجن .

تم هذا الفحص حسب طريقة Zhang,W.et al. (14). قبل ساعة من قتل الفئران نقوم بحقن 1 مل من 20% (V/V) محلول خلايا الدم الحمراء للدجاج (CRBC) وبعد قتلها نقوم بحقن 2 مل من المحول الملحي الفسيولوجي لجمع السائل من بطن هذه الفئران. الخلايا المستحصل عليها نعمل على حضنها لمدة 30 دقيقة في درجة 37°م ، عدد خلايا CRBC الملتهمة من قبل 100 من البلاعم الكبيرة macrophages تحسب في المجهر الضوئي وتستخرج مؤشر البلعمة phagocytic index (PI)، والنسبة المئوية للخلايا البلعمية الملتهمة لخلايا CRBC التي تشير الى فعالية الخلايا البلعمية phagocytic efficiency (PEI) index.

ج- فحص فرط الحساسية المتاخرة delayed type hypersensitivity test

في اليوم 25 من التجريع تحقن 50 مايكروليتر من محلول دنتروفلوروبنزين dintrofluorobenzene المحضر بطريقة Vadas et al.(15) في منطقة البطن او المنطقة الاربية لكل الفئران ، وبعد خمسة ايام يعطى dintrofluorobenzene µ10L في منطقة الاذن اليمنى. بعدها تقتل هذه الفئران بعد 2 ساعة من الحقن الاخير ويقطع بقطر 8 ملم قطعة دائرية من نسيج الاذن لكل من الاذن اليمنى واليسرى ثم توزن وتحسب الفرق بين الأذنين اعتماداً على طريقة كل من. Corsini et al.(16) و Pamela (17) et al.

التحليل الاحصائي Statistical Analysis :

استعمل التصميم العشوائي الكامل تام التعشية (CRD) لدراسة تاثير معاملات التجربة في الفحوصات المختلفة و قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار دنكن Duncan متعدد الحدود و تم استعمال البرنامج الاحصائي SAS في التحليل الاحصائي وفق الانموذج التالي:-

$$Yij = M + Ti + eij$$

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تجريع المستخلص المائي للحبة السوداء الى الفئران لمدة 30 يوما متعاقبة يؤدي الى زيادة في وزن غدة التوثية نسبةً الى وزن الجسم Thymus index مقارنة مع وزنها في مجموعة السيطرة وكان أفضل تأثير له عند إعطاء جرعة (300، 500) ملغم/كغم وبمستوى فارق معنوي $p\leq0.05$ حسب جدول رقم (1) مقارنة عما هو عليه في جرعة (200) ملغم/كغم ومجموعة السيطرة بينما لم يسجل spleen index اي زيادة معنوية في حجم الطحال نسبةً الى وزن الجسم بجميع التراكيز المعطاة المتمثلة (200، 300، 500) ملغم/كغم. وقد يعزى سبب زيادة Thymus index الى تأثير المستخلص في تسريع الاستجابة المناعية المتأخرة cell mediated immunity وتحفيز الخلايا التائية (T cell) للتكوين (18).

تعتبر غدة التويثة والطحال من الاعضاء المناعية الصغيرة اذ تؤثر عليها بعض العوامل التي قد تعمل على تثبيطها وانكماشها وعوامل اخرى تعمل على زيادة نشاطها.

اما الجدول رقم (2) فيشير الى القابلية البلعمية phagocytic index وكذلك نسبة الفعالية البلعمية phagocytic efficiency index عند اعطاء المستخلص المائي للحبة السوداء وجد ان هناك فارق معنوي بمستوى احتمالية $p\leq0.05$ عند اعطاء التراكيز (200، 300، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم لكل من القابلية البلعمية ونسبة فعالية البلعمية مقارنة بمجموعة السيطرة وبلغت أفضل مستوى لها عند اعطاء تركيز 500 ملغم/كغم من وزن الجسم وهذا يتناسب مع ما أشار اليه (6،19) اذ لاحظ ان اعطاء الحبة السوداء يعمل على زيادة او انخفاض في مستوى الاستجابة المناعية اعتماداً على التراكيز المعطى من الحبة السوداء، ووجد كذلك بان اعطاء زيت الحبة السوداء يزيد من افراز الانترلوكين نوع بيتا -1 مما يعني ان لها تأثير في تنشيط خلايا البلعمية الكبيرة وعملية البلعمة كما ان له خاصية مضادة للفيروسات المضخمة للخلايا والتي قيست من خلال ازدياد وظيفة وعدد الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة T-cell T_4 (CD_4) وزيادة انتاج الانترفيرون نوع جاما في مصل الدم.

اما الجدول رقم (3) يبين ان هناك تأثير لمستخلص الحبة السوداء على فرط الحساسية المتاخرة بمستوى احتمالية مقدارها $p\leq0.05$ في كل من التراكيز (300، 500) ملغم/كغم التي بلغت (15.9 , 17.5) ملغم على التوالي مقارنة مع تركيز (200) ملغم/كغم ومجموعة السيطرة التي بلغت (9.6 , 9.4) ملغم على التوالي. وهذا يتناسب مع جاء في أبحاث (11) من ان اعطاء زيت الحبة السوداء او حبوبها بشكل كامل بكمية 1 غم لمرتين في اليوم في الانسان تعمل على تحفيز عمل (T4) T-helper cell وتثبيط نسبة عمل T-suppresser cell (T_8) وزيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells وفي نفس الوقت تثبيط مستوى عمل الكلوبيولينات المناعية نوع gA, IgG and IgM. وكذلك أشار (20) ان التأثير السمي والمناعي لمستخلص بذور الحبة السوداء كان قوياً وساماً على بعض الخلايا السرطانية وتأثير قوي ومنشط كذلك للمناعة الخلوية. ومن هذه الدراسة نستنتج ان أفضل التراكيزالتي يمكن اعطاءها وتكون مؤثرة على ارتفاع الاستجابة المناعية من المستخلص المائي للحبة السوداء هي (300، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم اذ أعطت في هذين التركيزين أفضل استجابة للفحوصات التي أجريت بهذة الدراسة.

جدول (1): تأثير المستخلص المائي للحبة السوداء على وزن غدة التوثية/وزن الجسم وكذلك وزن الطحال/وزن الجسم.

المعاملات ملغم/كغم	وزن غدة التويثةmg/وزن الجسمg Men±_SE	وزن الطحالmg/وزن الجسمg Men± SE
السيطرة 0	A 0.06 ± 0.27	A 0.04 ± 0.35
200	A 0.07 ± 0.31	A 0.14 ± 0.37
300	B 0.09 ± 0.40	A 0.12 ± 0.39
500	B 0.04 ± 0.42	A 0.08 ± 0.36

الفرق بين المعدلات التي تحمل حروفا مختلفة مهمة احصائيا بنسبة $p \leq 0.05$.

جدول (2): تأثير المستخلص المائي للحبة السوداء على القابلية البلعمية phagocytosis index وعلى نسبة الفعالية البلعمية للبلاعم الكبيرة phagocytic efficiency index.

المعاملات ملغم/كغم	Phagocytic index (PI) Men±SE	Phagocytic efficiency index (PEI) Men±SE
السيطرة 0	A 0.23 ± 0.51	A 6.3 ± 27.4
200	B 8.72 ± 0.71	B 7. 4 ± 36.6
300	B 9.63 ± 0.82	B 9.2 ± 37.2
500	B 0.41 ± 0.89	B 4.6 ± 40.3

الفرق بين المعدلات التي تحمل حروفا مختلفة مهمة احصائيا بنسبة $p \leq 0.05$.

جدول (3): تأثير المستخلص المائي للحبة السوداء في فرط الحساسية المتاخرة للفئران.

المعاملات ملغم/كغم	فرق الوزن بين الأذن اليمنى واليسرى\mg Men±SE
السيطرة 0	A 4.2 ± 9.6
200	A 3.6 ± 9.4
300	B 4.3 ± 15.9
500	B 3.4 ± 17.5

الفرق بين المعدلات التي تحمل حروفا مختلفة مهمة احصائيا بنسبة $p \leq 0.05$.

المصادر

1-صحيح البخارى فى الطب:باب الحبة السوداء. ومسلم (2215) في السلام.

2-الدبعى عبد الرحمن سعيد والخليدي، عبد الولي احمد (1997). النباتات الطبية البيطرية في اليمن، انتشارها، مكوناتها الفعالة، استخداماتها. مركز عبادي للطباعة والنشر، صنعاء، الجمهورية اليمنية.

3-Mabberley, D.J. (1997). The plant book: A portable dictionary of the vascular plants, 2nd Edition, Cambridge University press, Cambridge, U.K.

4-Sayed, M.D. (1980).Traditional medicine in health care-Journal of Ethnoparmacology. 2: 19-22.

5-الدجوي، علي (1996). موسوعة انتاج النباتات الطبية والبيطرية. مكتبة مدبولي-القاهرة.

6-Haq, A.; Abdullatif, M.; Lobo, P.I.; Khabar, K.S.; Sheth, K.V. and Al-Sedairy, S.T. (1995). *Nigella sativa* effect on human lymphocyes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. Immunopharmacology, 30: 147-155.

7-Mohamed, L.and Mohammad, S.H. (2000).Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection.International Journal of Immunopharmacology Vol 22, Issue 9, 1 September page 729-740.

8-Marournin, K.H.; Blakey, D.H.; Cimino, M.C.; Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox. Program. Mutat. Res., 239: 29-80.

9-Michael Tierra, L.A.C. (2003). *Nigella sativa*, commonly known as therapy. Proc. annu. Meet. Am. Assoc. cancer Res. 38: A 1377.

10-Sylvie, L. (2002). The healing powder of black cumin-Lotus light publications, Box 325, Twinlakes, WI 53181.

11-El-Kadi, A. and Kandil, O. (1986). Effect of *Nigella sativa* (the blak seed) on immunity. Proceeding of the 4th International Conference on Islamic Medicine, Kuwait. Bull Islamic 4: 344-388.

12-Shtayeh, M.S.A. and Abu-Ghadeib, S.I. (1999). Antifungal activity of plant extract against dermatophytes. J. Mycoses., 42: 665-672.

13-Chen, H.L.; Li, D.F.; Chang, B.Y.; Gong, L.M.; Dai, J.G andYi, G.F. (2003). Effect of chinase herbal polysaccharides on the immunity and growth performance of young broilers.Poult. Scie, 82,364-370.

14-Zhang, W.; Wang, Y.and Hou, Y (2004). Effect of chinase medicinal fungus water extract on tumor metastasise and some parameters of immune function. Int Immunopharmacol, 4, 461-468.

15-Vadas, M.; Miller, J.; Gamble, J.andWhitelaw, A(1975).Aradioisotopic method to measure delayed type hypersensitivity in the mouse. Studies in sensitized and normal mice. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49,670-692.

16-Corsini, A.C.; Bellucci, S.B and Costa,M.G(1979). Asimple method of evaluating delayed type hypersensitivity in mice. Jour.of Immunology methods Vol, 30.Issue 2, pag 195-200.

17-Pamela, A.J.;Fraker,C,M.:Zwickl and Luecker,R.W (2010). Delayed type hypersensitivity in zinc deficient adult mice Impairmant and restoration of responsivity to Dinitrofluorobenzene. Jour. Nutrition,Org. July 2.

18-Marsh, J.A. (1993). The hormonal activity of the avian thymic microenviroment-poultry Sci. 37: 1289-1293.

19-Haq, A.; Lobo, P.I.; Al-Tufail, M.; Rama, N.R. and Al-Sedairy, S.T. (1999). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int. J. Immunopharmacol 21 (4): 283-285.

20-Swamy, S.M. and Tan, B.K. (2000). Cytotoxic and immunopotentiating effect of ethanolic extract of *Nigella sativa* L seeds. J. ethnopharmacol 70(1): 1-7.