دراسةفعاليةالمستخلصات الخام لنبات ذنب الخيل المحلي .*Equisetum arvense* L في عملية تخثر الدم

*سيلفا انترانيك زوكيان** *ميسون خضر البياتي*** *رعد محسن المولى****

تاريخ قبول النشر 2006/4/26

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة على الاجزاء الخضرية لنبات ذنب الخيل المحلي .Equisetum arvense L الذي ينمو طبيعيا في منطقة حاج عمران شمال العراق ، وتضمنت بعض الفحوصات المختبرية التي تتعلق بعملية تخثر الدم ، باستخدام تراكيز متدرجة من كلا المستخلصين المائي والكحولي خارج الجسم الحي In vitro وداخل الجسم الحي In vivo ، وتبينت فعالية التركيزين (25 و50) ملغم / مل للمستخلص المائي لذنب الخيل في تقليل زمن تخثر الدم خارج الجسم الحي غير ان التركيز الاعلى (100) ملغم / مل عمل على سيولة الدم وعدم تخثره خارج الجسم الحي . كما ظهرت فعالية المستخلص المائي والكحولي في تقليل زمن التخثر، فضلاً عن زيادة عدد الصفيحات الدموية مع زيادة التركيز داخل الجسم الحي، وان التركيز (100) ملغم / مل كان ذا تأثير مخالف عن البقية، إذ أدى الى زيادة زمن التخثر وسيولة الدم مع نقصان في عدد الصفيحات الدموية.

المقدمة

دأب العلماء والباحثون في مجال انتاج الادوية والعقاقير الطبية على ايجاد علاجات بديلة Alternative medicine من منتجات طبيعية عسى ان يكون لها تأثيرا اكثر تخصصا من العلاجات التقليدية ، وكانت مركبات الايض الثانوي للنباتات الطبية واحدة من البدائل القوية التي فرضت نفسها على الساحة العلاجية ، اذ تمتلك تلك المركبات - وبشكل عام- العديد من الخواص العلاجية مثل : مضادات للالتهابات ، مانعة للتخثر ، مانعة للنزف ، مضادات للبكتريا ، مضادات للسرطان، وغيرها (1) .ونبات ذنب الخيل هو احد هذه النباتات الطبية الذي يمتلك العديد من هذه الاستطبابات ، وهو ينمو في معظم دول العالم وبنمو طبيعيا في المنطقة الشمالية من العراق ، وتشير (2) الى وصف النبات ومناطق انتشاره في القطر فضلا عن اهم محتوياته من العناصر الغذائية المعدنية المهمة في تقوية وبناء الجسم ، وتأثيره اتجاه بعض الخمائر والفطريات . كما بينت دراسة (3) الى احتوائه على العديد من مركبات المجاميع الفعالة وكفاءة مستخلصه الكحولي في تثبيط نمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام. وتشير العديد من المصادر العالمية القديمة والحديثة الى اهمية هذا النبات في عملية تخثر الدم ووقف النزف. ونظرا لعدم توافر دراسات حول النوع المحلي لنبات ذنب الخيل في هذا المجال اجريت هذه الدراسة لتحقيق الاتي :

1- دراسة تأثير المستخلصات الخام في عملية تخثر الدم خارج الجسم الحي *In vitro* .

2- دراسة تأثير المستخلصات الخام في عملية تخثر الدم داخل الجسم الحي *In vivo*.

المواد و طرائق العمل

1. جمع العينات النباتية وتحضيرها:

جمعت نباتات ذنب الخيل *E. arvense* من منطقة حاج عمران التابعة لمقاطعة راوندوز خلال السفرات الحقلية بين شهري آيار وحزيران، وحفظت مجموعة من العينات في معشب الجامعة الواقع في كلية العلوم تحت الرقم 46312.

غسلت النباتات جيدا بالماءالجاري، للتخلص من الاتربة والحشرات والعوالق الاخرى، ونشفت في جو المختبر، ثم فصلت الجذور عن المجاميع الخضرية. جففت بعدها النباتات بفرن كهربائي عند 40 مْ لحين ثبوت الوزن.

طحنت الاجزاء النباتية (السيقان والاوراق) بوساطة مطحنة كهربائية، ثم حفظت في عبوات زجاجية محكمة الغلق لحين الاستخدام، ودونت على العبوات المعلومات الكاملة لاسم النبات وتاريخ وموقع جمعه.

2. تحضير المستخلصات النباتية

أ- تحضير المستخلص المائي:

وزن (50) غم من المسحوق النباتي، واضيف اليه (500) مل من الماء المقطر بدرجة الغليان وترك ليبرد مع التحريك المستمر، ثم رشح المحلول عبر طبقات من الشاش، ثم ورق الترشيح Whatman No. 2 ، واخذ الراشح وبخر بجهاز المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة (60) مْ لحين الحصول على سائل كثيف،

*مدرس مساعد /قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد
**استاذ مساعد /قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد

بعدها جفف السائل في حاضنة بدرجة (37) مْ خلال (2-3) ايام حتى تكون المسحوق المجفف، ثم جمع المسحوق وحفظ في قنينة زجاجية نظيفة ومعقمة ووضع في الثلاجة بدرجة (4) مْ لحين الاستخدام.

ب- تحضير المستخلص الكحولي:

اتبعت خطوات تحضير المستخلص المائي نفسها ما عدا استخدام (250) مل من الكحول الاثيلي 80% بدلاً من الماء المقطر.

فحوصات الدم Haematological Tests

1. فحوصات الدم خارج الجسم الحي Haematological Tests *In vitro*

1.1 حساب وقت البروثرومبين Prothrombin Time:

لحساب وقت تخثر البروثرومبين استخدمت طريقة(4) Quick method وتتلخص الطريقة بما ياتي:

تسحب كمية من الدم وتوضع في انابيب تحتوي على Sodium citrate ، تنبذ العينة بجهاز النبذ المركزي (1000) دورة في الدقيقة الواحدة ولمدة (10) دقائق لفصل البلازما عن باقي المكونات الخلوية. تنقل البلازما بوساطة ماصة الى انابيب اختبار معقمة وجافة. بعدها يؤخذ (0.1) مل من البلازما الى انبوبة اختبار معقمة وجافة مثبتة في حمام مائي بدرجة (37) مْ بوساطة مثبت الانابيب Tube rack ولمدة (10) دقائق. ثم يضاف (0.2) مل من الثرومبوبلاستين المُصَنع (Calcium-thromboplastin *in vitro* diagnostic)، وعند لحظة الاضافة نفسها تضبط ساعة التوقيت لحساب الوقت اللازم لظهور الخثرة. ويعد هذا الاختبار سيطرة Control.

تكرر العملية بالطريقة اعلاه نفسها ماعدا انه يستخدم المستخلص النباتي بدلا من الثرومبوبلاستين المصنع، اذ يضاف (0.2) مل من المستخلص النباتي بتراكيز متدرجة (25 ، 50 ، 100) ملغم / مل الى البلازما وعند لحظة الاضافة نفسها تضبط ساعة التوقيت لحساب الوقت اللازم لظهور الخثرة.

2.1 قياس زمن التخثر Clotting time :

وقت التخثر هو الوقت اللازم لتخثر الدم دون اضافة مواد اليه. ولبيان تاثير المستخلص النباتي دون اضافته مباشرة الى الدم خارج الجسم الحي ، فقد تم تحضير انابيب شعرية Capillary tubes لا تحتوي على (EDTA K) Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid ، طليت هذه الانابيب من الداخل بالتراكيز المتدرجة (100،50،25) ملغم / مل من المستخلص المائي وتركت في جو المختبر لتجف تماما.

تم عمل وخزة في الاصبع بعد تعقيمه بالكحول، وبوساطة الخاصية الشعرية سُحب الدم الى حوالي ثلاثة ارباع الانبوبة الشعرية المحضرة، وبدأ التوقيت حال خروج الدم من الوخزة. وضعت الانبوبة في راحة الي(37) مْ ، بعدها تم كسر جزء من الانبوبة كل (30) ثانية الى حين ملاحظة تكون الليفين Fibrin كخيط احمر.

2. فحوصات الدم داخل الجسم الحي Haematological Tests *In vivo*:

استخدمت في هذه التجربة (27) فأراً مختبريا من نوع Albino من الجنسين كليهما، وكانت اوزانها (25 ± 5) غم ،بعمر شهرين تقريبا. قسمت عشوائيا على ثلاث مجموعات. تضم المجموعتين الاولى والثانية (12) فأراً، اما المجموعة الثالثة فتتكون من (3) فئران بوصفها سيطرة. وضعت الفئران في اقفاص مختبرية نظيفة في البيت الحيواني لقسم علوم الحياة في كلية العلوم - جامعة بغداد عند درجة حرارة (30 ± 2) مْ، وجهزت الفئران بعليقة غذائية خاصة وماء بكميات تضمن الحاجة.

رُقمت المجموعة الاولى من الفئران، ثم جُرعت بتراكيز متدرجة من المستخلص المائي للنبات (25 ، 50 ، 75 ، 100) ملغم / مل، بحجم (0.04) مل، مرة واحدة خلال اليوم وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز، لمدة ثلاثة ايام.

المجموعة الثانية رقمت وجرعت بتراكيز متدرجة من المستخلص الكحولي للنبات بالطريقة نفسها اعلاه.

اما المجوعة الثالثة (السيطرة) فقد جرعت بمحلول الملح الفسيولوجي Normal Saline.

2. 1 قياس زمن التخثر Clottig Time :

حسب طريقة (5) ،اذ قطع الربع الاخير من ذنب فئران المجموعات الثلاث(بعد تعقيمه بالكحول و استعمال مقص نظيف ومعقم) للحصول على قطرات دم.ثم سحب الدم بوساطة الخاصية الشعرية بالانابيب الشعرية الى حوالي ثلاث ارباع الانبوبة، ضُبط الوقت حال خروج الدم، بعدها تم كسر جزء من الانبوبة كل (30) ثانية وملاحظة تكون الليفين Fibrin كخيط احمر.

2.2 جمع عينات الدم Blood collection:

جمعت عينات الدم بعد ذبح الحيوانات المختبرية في انابيب تحتوي على مانع تخثر ($EDTA\ K^+$) لغرض حساب عدد الصفيحات الدموية.

3.2 عد الصفيحات الدموية Platelet count:

عين عدد الصفيحات الدموية حسب طريقة Visual method for whole blood (6). وقد تم العد في المليمتر المكعب الواحد من الدم باستعمال مقياس الخلايا الدموية Karl Kolb hemacytometer ذي الشريحة الزجاجية من نوع Improved neubaer ، كما استعمل محلول اوكزالات الامونيوم Ammonium oxalate في تخفيف الدم، وتم العد باستخدام العدسة الشيئية (× 40) للمجهر المركب ، وطبقت المعادلة الاتية :

$$Y = \text{عدد الصفيحات الدموية المحسوبة في 25 مربع} \times \frac{\text{معامل التخفيف (200)}}{\text{الحجم (0.1)}}$$

النتائج والمناقشة

1 - فحوصات الدم خارج الجسم الحي

أ- حساب وقت البروثرومبين :

حسب وقت البروثرومبين للسيطرة بعد اضافة مادة الثرومبوبلاستين المصنع للبلازما مباشرة ،وسجل الوقت (12) ثانية وهو الوقت الطبيعي للتخثر. اما عند استخدام التراكيز المتدرجة من المستخلص النباتي المائي والكحولي فكانت النتيجة سالبة حيث لم يحصل تخثر للبلازما.

ب- قياس زمن التخثر:

سجل زمن تخثر الدم الطبيعي للسيطرة (الباحثة) (4) دقائق- اذ يتراوح زمن تخثر الدم الطبيعي للانسان (3-7) دقائق (5).

وقد سجل زمن تخثر الدم عند استخدام الانابيب الشعرية المطلية من الداخل بالتراكيز (25 ، 50 ، 100) ملغم / مل من المستخلص المائي (ثلاث دقائق ، دقيقتان ، ساعتان) على التوالي وكما موضح في الجدول رقم (1).

جدول رقم (1) معدل قراءات قياس زمن التخثر خارج الجسم الحي بأستخدام المستخلص المائي لذنب الخيل.

تركيز المستخلص (ملغم / مل)	زمن تخثر الدم (دقيقة)
السيطرة	4
25	3
50	2
100	120

وهذا يؤيد قدرة المستخلص المائي لـ *E. arvense* على تقليل زمن تخثر الدم عند الاستعمال الخارجي، و يفسر استخدامه الشائع لحالات وقف النزف الخارجي من الجسم مثل الرعاف ونزف الفم واللثة، فضلاً عن معالجة البواسير بتكميدها او بحماماته المقعدية الساخنة (7)، وقد تعزى فعالية ذنب الخيل في وقف النزف الى الفعل القابض للانسجة local astringent فضلاً عن المحتوى العالي للسليكا التي قد تصل نسبتها الى(8-10) % (8) ، (9).

2- فحوصات الدم داخل الجسم الحي

يبين الجدول (2) نتائج إعطاء المستخلص المائي لنبات ذنب الخيل المحلي للمجموعة الاولى من الفئران البيض والمستخلص الكحولي للنبات للمجموعة الثانية من الفئران تحت الدراسة لمدة ثلاثة أيام متتالية، ويلاحظ حدوث تغييرات مهمة في زمن تخثر الدم وعدد الصفيحات الدموية قياساً بالمجموعة الثالثة (فئران السيطرة)، حيث سجل زمن التخثر لحيوانات السيطرة (1:15) دقيقة، وكان عدد الصفيحات الدموية الطبيعي لها (468)، في حين سجلت قراءات إعطاء المستخلص المائي والكحولي انخفاضاً مهماً في زمن تخثر الدم، وزيادة عدد الصفيحات الدموية مع زيادة التركيز ، الا ان التركيز (100) ملغم / مل ابدى تأثيراً مخالفاً للبقية (شكل 1) إذ سجل زيادة في زمن التخثر وسيولة الدم مع نقصان عدد الصفيحات الدموية.

ويلاحظ من الجدول رقم (2) ان عدد الصفيحات الدموية يتلائم مع الوقت اللازم لعملية التخثر، اذ تشترك الصفيحات الدموية في تكوين الخثرة الدموية عن طريق تجمعها والتصاقها بخيوط شبكة الفايبرين (10)

وتؤيد هذه النتائج خصائص نبات ذنب الخيل المحلي في عملية تخثر الدم وايقاف النزف بانواعه أجمع وتتفق مع المصادر القديمة والحديثة جميعها في هذا المجال (11) ، (8) ، (12) ، وقد تعزى فعالية ذنب الخيل في تجلط الدم الى محتوى العشبة العالي من السليكا. اذ انها ذات كتلة جزيئية واطئة ؛ مما يسهل ذوبانها في السوائل النسيجية والدم، اذ تساعد في عملية الانكماش وتجلط الدم (13) . ويرى فريق اخر من العلماء الى ان حامض الغاليك Gallic acid وحامض البكتيك Pectic acid هما المسئولان عن عملية التخثرحسب الموقع الالكتروني (14). ويشير (7) الى احتواء ذ نب

الخيل على مواد مجلطة للدم (توقف النزيف) - لم يذكرها تفصيلاً، كما اكد (15)

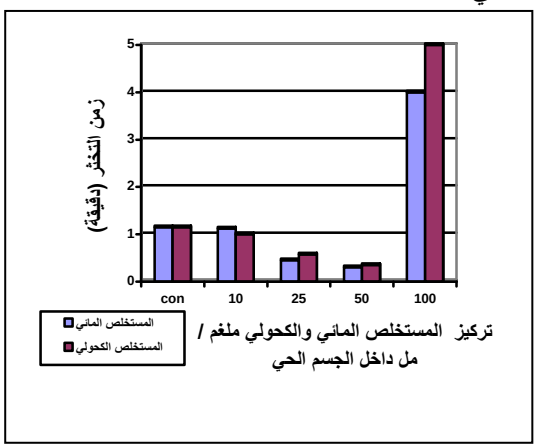
ان تراكيز معينة من مستخلص ذنب الخيل تثبط تكوين الثرومبين و(PTA) في الطور الانزيمي من عملية التخثر مما يمنع تجمع الصفحات الدموية ؛ وعلل ذلك بسبب وجود المركبات البولي فينولية. وتتفق هذه النتائج ايضاً مع ما ذكره (16) ، اذ ان التراكيز المعتادة من ذنب الخيل توقف النزف لكن التراكيز العالية قد تكون ذات تأثير قوي لاحداث نزف الدم ؛ وربما يعود سبب زيادة وقت التخثر عند التركيز (100) ملغم / مل الى احتواء المستخلص على كميات عالية من الصابونين التي تعمل على سيولة الدم . وتعد هذه النتائج مهمة على الصعيد العلاجي والوقائي لا سيما فيما يتعلق بامراض القلب والاوعية الدموية.

إن هذا الموضوع بحاجة الى مزيد من التجارب والاختبارات في المجال الكيميائي والعقاقيري والسريري حتى يمكن الاستفادة منه علاجياً .

جدول رقم (2) : معدل قراءات فحوصات الدم (زمن التخثر وعدد الصفيحات الدموية) بعد تجريع الحيوانات المستخلصات الخام لنبات ذنب الخيل لمدة ثلاثة ايام

نوع المستخلص	التركيز (ملغم/مل)	زمن التخثر (دقيقة)	عدد الصفيحات الدموية
السيطرة	0	1:15	468
المستخلص المائي	10	1:12	457
	25	0:45	702
	50	0:30	998
	100	4:00	424
المستخلص الكحولي	10	1:00	456
	25	0:57	482
	50	0:35	501
	100	5:00	485

شكل (1) علاقة التراكيز المتدرجة للمستخلص المائي والكحولي لنبات ذنب الخيل وزمن التخثر داخل الجسم الحي



المصادر:

1- الحلي ، زيد منعم (2003) تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد في تثبيط نمو الخطوط السرطانية *Cyperus rotundus* L. . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد.

2- زوكيان، سيلفا انترانيك يعقوب (2005) دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصين المائي والكحولي لنبات ذنب الخيل المحلي *Equisetum arvense*L. . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد.

3- المولى ، رعد محسن ؛ البياتي ، ميسون خضر وسيلفا انترانيك يعقوب (2006) المركبات الفعالة في نبات ذنب الخيل المحلي *Equisetum arvense* L. وتأثيراتها التثبيطية في نمو بعض انواع البكتريا المرضية ، مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية .

4- Talib, V.H.(1996). Ahand book of medical laboratory technology W.H.O, EBSpublishers and distrbuters.

5- منظمة الصحة العالمية (1983) دليل الطرائق الاساسية في المختبرات الطبية. جنيف.

6- Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (1984). Practical heamatology, 6th ed. Edinburgh, Churchill.

7- رويحة، امين (1983) التداوي بالاعشاب ،الطبعة السابعة، دار القلم ، بيروت- لبنان.

8- Bradley,P.;ed.(1992). British Herbal Compendium (BHC) Vol.1 British Herbal Association.

9- Grieve, M. (1979). Amodern herbal. New York. Dover publications, Inc.

10- عبدالفتاح، رشدي (1988) اساسيات عامة في علم الفسيولوجيا. كلية العلوم- جامعة الكويت، الطبعة الثانية.

11- Gibelli, C. (1931). The homeostatic action of *Equisetum*. Arch. Intern. Pharmacodynamie. 41: 419- 67.

12- Derrida, M.(2005) What is horsetail (*Equisetum arvense* L.) and its super functions ?. http: // www. Mdidea . com

13- Peggs, A. and Bowen, H. (1984). Inability to detecte organo-silicon compounds in *Equisetum* and *Thuja*. Phytochemistry. 23(8): 1788- 1789. [Available online 2001]

14- Botanical. *E.arvense* L. A detail of plant. (2005).http: // Botanical . com / mgmh / html

15- Mekhfi, H. ; El-Haouari, M. ; Legssyar, A. ; Bnouhan, M.;Aziz, M. ; Atmani, F. ; Remmal, A.;and Ziyat, A.(2004). Platlet anti- aggregant property of some Moroccan medicinal

pharmacology and therapeutics. Portland. Oregin:Electic medical publications.

plants. Journal of Ethnopharmacology. 94(2-3): 317- 322. [EBSCO 2005]

16- Bloyer,W.(2001). *Gaultheria* and *Equisetum*. The eclectic materia medica,

Study of efficiency of crude extract of local Horsetail *Equiaetum arvense* L. in blood coagulation

S.A.Zokian* ***M.KH. Al- Bayati**** ***R. M. AL.Mawla****

*Biology dep. /collage of science/University of Baghdad.

Abstract:

This study has been performed on the vegetative parts of the local Horsetail *Equisetum arvense* L.,which grow naturally in Haj Umran , north of Iraq , included some heamatological tests coccerning blood coagulation by using different concentration of both water and ethanolic extracts *in vitro* and *in vivo* . The results revealed that water extract of (25 and 50) mg/ml decreased clotting time *in vitro*, but higher concentration (100) mg/ml had reverse effect (stoped coagulation) , Also the low concentration of crude extracts (water and ethanolic) were very efficient to decrease clotting time, and increase platelet count *in vivo*. But higher concentration (100) mg/ml increased the clotting time with decrease in platelet count .