Vol. 7, No. 13 and 14, P. (71-82)A, 2018

الاستخدام الوقائي للمستخلص المائي للزنجبيل (Zingiber officinale) ضد ذيفان حال الدم ألفا المستخلص من بكتريا الأشريشيا القولونية في الفأران

وفاء صادق محسن الوزني

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة كربلاء، العراق.

تاريخ الاستلام: 13 / 7 / 2017

تاريخ قبول النشر: 14 / 8 / 2017

Abstract

This study was designed to explain the prophylactic use of hot aqueous extract of ginger (Zingiber officinale) in mice injected with α-hemolysis toxin was extracted from Escherichia coli bacteria by cold centrifuge and then partially purified using (75%) saturation of ammonium sulfate followed by ion exchange chromatography with DEAE-cellulose. The optimal prophylactic dose of extract was (20) mg/mouse that gave (100%) survival rate in mice injected with lethal dose of toxin (100) mg/ (0.5) ml. There was reduction in the total number of WBC in mice injected with LD50 (29.4)mg / (0.5ml) reached to (4×103) cell /ml compared to control while increased level of pro-inflammatory cytokines such as TNF-α (220) pg/ml, IL-6 (146) pg /ml and IL-1β (201) pg/ml)in this group compared to control .While the mice group injected with prophylactic dose of plant extract before injected with LD50 of toxin showed increase total number of WBC (6×103) cell/ml and decrease in level of pro-inflammatory cytokine TNF-α (140) pg /ml, IL-6 (120) pg/ml and IL-1β (166) pg/ml in compared with group injected with LD50 of toxin only from this results concludes that the hot aqueous extract of ginger have anti-inflammatory activity inside body.

Key words

Zingiber officinale, E.coli, α-hemolysis toxin, Pro-inflammatory cytokins.

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية لبيان التاثير الوقائي للمستخلص المائي الساخن لنبات الزنجبيل (Zingiber of ficinale) في الفئران المحقونة بذيفان حال الدم الفا (Hemolysin-α) الذي تم استخلاصه من مزروع بكتريا Escherichia coli من خلال فصل الراشح الجرثومي بالطرد المركزي المبرد ومن ثم تنقيتة جزئيا باستعمال الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (75٪) وكروماتوغرافي التبادل الايوني باستخدام عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose.

قـــــدرت الجرعـة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي بـ (20) ملغم/ فأرة والتي اعــطت نسبة نجاة (100٪) في الفئران المحقونة بالجرعة المهلكة الكلية من الذيفان البالغة (100) ملغم/ (0.5) مليليتر .انخفض عدد خلايا الدم البيض الكلي في الفئران المحقونة بالجرعة القاتلة النصفية من الذيفان والبالغة (29.4)ملغم / (0.5) مليليتر ليصل الى (4.3×103) خلية/ مليليتر مقارنة بالسيطرة في حين ارتفع مستوى الحركيات الخلوية قبل الالتهاب TNF-α وIL-6 و IL-1β في تلك المجموعة ليصل الى (220-146-201) بيكوغرام/ مليليتر على التوالي مقارنة بالسيطرة . كما اظهرت مجموعة الفئران المحقونة بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص قبل حقنها بالجرعة القاتلة النصفية من الذيفان ارتفاع ملحوظ في عدد خلايا الدم البيض ليصل الى (6 ×103) خلية / مليليتر وانخفاض في مستوى الحركيات الخلوية ليصل الى(140-120-166) بيكوغرام / مليليتر لكل من TNF-α وIL-6 و IL-1β على التوالي عند مقارنتها بالمجموعة المحقونة بالجرعة القاتلة النصفية من الذيفان فقط من هذا نستنتج ان للمستخلص المائي الحار للزنجبيل تاثير مضاد للتفاعلات الالتهابية داخل الجسم الحي .

الكلمات المفتاحية

الزنجبيل، بكتريا القولون، ذيفان حال الدم الفا، الحركيات الخلوية قبل الالتهاب.

Vol. 7, No. 13 and 14, P. (71-82)A, 2018

1. المقدمة: Introduction

تعد بكتريا *Escherichia coli* من الفلورا الطبيعية في امعاء الانسان تستوطن الطبقة المخاطية للقولون وتبقى تعايشية مع مضيفها حيث تلعب دورا مهما في الحفاظ على ثبات اعداد الفلورا الطبيعية في الامعاء والمحافظة على توازنها [1].كما توجد سلالات مرضية من تلك البكتيريا تعد احد اهم اسباب اصابات الاسهال عند الرضع حيث تسبب التصاق او طمس الزغيبات وتكوين تراكيب كاسية عند التصاقها بخلايا الغشاء المخاطي لديهم [2] .كما تمتلك تلك السلالات العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من احداث الانحاج ومواجهة الجهاز المناعي للمضيف حيث يكون ذيفان حال الدم الفا (Hemolysin-α) احد اهم تلك العوامل الذي يكون تأثيره على الخلايا المعوية وجدار الامعاء ناتج من قدرته على تحطيم الغشاء المخاطي المعوي وتحفيز انتقال البكتريا الى مجرى الدم اما مباشرة او من خلال تطور العملية الالتهابية في ذلك الغشاء [3] .

اكتسب ذيفان حال الدم الفا اسمه من قدرته على تحليل خلايا الدم الحمر ومهاجمة العديد من خلايا الجسم كالخلايا المناعية الخلطية والخلوية [4]. يمتلك الذيفان قدرة عالية على توسعة التفاعل الالتهابي الذي يؤدي الى تلف انسجة المضيف بفعل الحركيات الخلوية قبل الالتهاب مثل TNF-α و-IL 1β التي تنتج بكميات كبيرة من الخلايا المناعية المختلفة (كالخلايا اللمفية واحادية النواة والخلايا العدلة) استجابتا» لتاثير ذلك الذيفان [5].

تعد النباتات الطبية ومنتجاتها مصدرا مهما للعديد من المركبات الكيمياوية الامنه وغير السامة وذات فعالية بايلوجية مضادة للجراثيم وللاكسدة وللسرطان كما تعمل المستخلصات النباتية على تعديل الاستجابة المناعية للجسم اما بالتحفيز غير المتخصص للجهاز المناعي من خلال تنشيط نظام المتمم والفعالية البلعمية للخلايا المناعية كالخلايا العـــدلة (Neutophils) والخلايا وحيدة النواة (Monocyte) او بالتحفيز المتخصص للجهاز المناعي والمتمثل بالتفاعلات الخلوية والخلطية التي تنظم انتاج الاجسام المضادة (Antibodies) في الجسم [6] .

يعد نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale*) واحد من تلك النباتات الطبية باعتباره مصدرا للمركبات الفينولية كما يتميز بامتلاكه فعاليات بايولوجية مختلفة اهمها عمله كمضاد للالتهاب والاكسدة وذو فعالية مضاده للجراثيم تمكنه من تقليل امراضية العديد من الاجناس الجرثومية وتثبيط انتاج عوامل ضراوتها [7,8].كما لوحظ ان استخدام مستخلص نبات الزنجبيل سيعمل على تقليل التشوهات الكروموسومية وتلف جزيئات DNA المرافق لبعض الاصابات, فضلا عن دوره المحسن للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية في المضيف المتمثل بايقاف عملية القتل الخلوي المبرمج والتنخر الخلوي للخلايا اثناء الاصابات الجرثومية مع عمله لتقليل حدة التفاعلات الالتهابيه [9] لذا جاءت هذه الدراسة للوقوف عند امكانية استخدام المستخلص المائي الحار لنبات الزنجبيل ضد التأثير المرضي لذيفان حال الدم الفا المنتج من البكتريا المعوية المسؤولة عن العديد من الاصابات الخطرة خصوصا عند الاطفال ودراسة تأثيره المعدل لمؤشرات المناعة الذاتية في جسم العائل.

2. المواد وطرائق العمل :

1.2. الحيوانات المختبرية:

استعملت ذكور الفئران المختبرية البيضاء من الضرب Balb /c بمعدل عمر (15-20) اسبوع ووزن (26±3) غم عند بداية التجربة والتي جهزت من كلية الصيدلة جامعة كربلاء ووزعت في اقفاص لدائنية بهيئة مجاميع بحسب حاجة التجربة مع الاستمرار بتجهيزها بالماء والعليقة المتكاملة وتوفر الظروف البيئية المناسبة المتمثلة بدرجات الحرارة

والرطوبة المناسبتين بالأضافة الى استحصال موافقة لجنة اخلاقيات الحيوان في جامعة الكوفة (Animal Ethics Committee) لأتمام التجارب المتعلقة بالحيوان.

2.2. المستخلص النباتي:

تم الحصول على درنات الزنجبيل الجاف من الاسواق المحلية في محافظة كربلاء أذ طحنت بالطاحونة الكهربائية للحصول على مسحوق ناعم استعمل لتحضير المستخلص المائي الحار وفق الطريقة المبينة في [6].كما تم تقدير المحتوى الكيمياوي للمستخلص بأتباع الطرائق الموصوفة من قبل [7] لتحديد وجـود الالكلويدات (Alkaloids) و السابونينات (Saponins) والتانينات (Tannins) والفلافونويدات (Flavonoides) والستيرويدات (Ste-roids) والتربينويدات (Trpenoides) .

3.2. العزلات البكتيرية:

تم الحصول على ستة عزلات سريرية لبكتريا *E.coli* من مختبر الصحة العام في محافظة كربلاء وبعد تشخيصها بأعتماد الفحوصات المظهرية والبايوكيميائية المبينه في [10,11] تم تأكيد التشخيص بأستخدام عدة التشخيص Api E20 بحسب تعليمات الشركة المجهزة BioMer-ieux ، عندها زرعت السلالات البكتيرية المشخصة على وسط غراء الدم لغرض التحري النوعي عن قابليتها على انتاج ذيفان حال الدم الفا من خلال ملاحظة شكل ونوع التحلل الدموي ووفق الطريقة المبينة في Santos وجماعته [12] ومن ثم اعتمد التقدير شبه الكمي للتحلل الدموي للراشح الجرثومي المجموع من العزلات البكتيرية المدروسة لتحديد العزلة البكتيرية الاكفأ لانتاج الذيفان حيث وضع (50) مايكرولتر من راشح كل عزلة جرثومية في حفر تم عملها بواسطة الثاقب الفليني على وسط غراء الدم ثم حضنت الاطباق عند (37) م° وبعد (24) ساعة قيس قطر مناطق التحلل حول الحفر وحددت العزلة التي اعطت اكبر قطر لمنطقة التحلل لاستخدامها لأستخلاص ذيفان حال الدم الفا [13] .

4.2. استخلاص ذيفان حال الدم الفا:

تم تنمية العزلة البكتيرية المنتقاة في وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت بدرجة حرارة (37) م بحاضنة هزازة لمدة (18) ساعة فقط ثم جمع الراشح بالطرد المركزي المبرد (10000 دورة بالدقيقة لمدة 30 دقيقة) وعقم باستخدام ورق ترشيح ذو ثقوب (0.22) ملي مايكرون [12] عندها قدر تركيز البروتين في الراشح باستخدام طريقة Lowry وجماعته [14] والفعالية التحليلية له بحسب الطريقة المبينة من قبل May وجماعته [15] التي تتضمن تحضير سلسلة تخافيف متدرجة من الراشح البكتيري ثم خلط (400) مايكروليتر من كل تخفيف مع (100) مايكروليتر من عالق خلايا الدم الحمر وحضنت لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة (37) م° ثم قرات الامتصاصية للخليط بعد ازالة الخلايا الغير متحللة بعملية الطرد المركزي على طول موجي (543) نانومتر. مثلت الفعالية التحليلية مقلوب اعلى تخفيف اعطى تحلل كامل لخلايا الدم الحمر مقارنة بالسيطرة الموجبة المتكونة من خلط (100) مايكرو ليتر من عـالق خلايا الدم الحمر مع (400) مايكرو ليتر من ماء حنفية والسيطرة السالبة المتكونة من خلط (100) مايكرو ليتر من عالق خلايا الدم الحمر مع (400) مايكرو ليتر من 0.9 ٪ محلول ملحي عندها حسبت نسبة التحلل لكل تخفيف وفق المعادلة التالية:

$$\text{نسبة التحلل} = \frac{A}{A1} \times ١٠٠$$

A = قيمة الامتصاص الصغرى

A1= قيمة الامتصاص العظمى

5.2. التنقية الجزئية لمستخلص حال الدم ألفا:

اضيفت بلورات كبريتات الامونيوم تدريجيا الى (100) ملليلتر من الراشح الجرثومي وبنسب اشباع متدرجة (25-50-75-100٪) مع التحريك المستمر في حمام ثلجي لا تتجاوز حرارته (5) م° وبعد عملية الطرد المركزي المبرد علق الراسب المتكون باقل كمية ممكنة من محلول (0.02) مولار دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك ثم جرت ديلزته حيال عدة تبديلات بأستخدام نفس المحلول وبدرجة حرارة (4) م لمدة (48) ساعة عندها ركز المحلول بأستخدام السكروز وقدر تركيز الذيفان والفعالية التحليلية له لتحديد نسبة الاشباع المثلى بعد ذلك نقل المستخلص المتكون الى عمود المبادل الايوني DEAE-Celllose (15× 1.5) سم المحضر وفق ما جاء في [16] ثم غسل العمود بمحلول الموازنة نفسه (M Tris-HCl 0.02 /pH=8) وتم الاسترداد باستخدام محلول الغسل نفسه وبتدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0- 1.5 مولار) وبسرعة جريان (0.5)ملليلتر/ دقيقة و بحجم جزء مقداره (3) ملليلتر . تمت متابعة تركيز ذيفان حال الدم الفا بالاجزاء النافذة بقراءة الامتصاص عند الطول الموجي (280) نانوميتر ثم جمعت القمم المتكونة والاجزاء القريبة منها كلا على انفراد وتم ديلزتها حيال عدة تبديلات من الماء المقطر لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة (4) م° ثم ركزت هذه الاجزاء وقدر تركيز الذيفان فيها والفعالية التحليلية لها.

6.2. تحديد الجرعة القاتلة الكلية(LD100) والنصفية LD50)) لذيفان حال الدم الفا المنقى جزئيا:

حددت الجرعة المهلكة الكلية والنصفية للذيفان باعتماد الطريقة المتبعة من قبل Chined وجماعته [17] فقد حضرت تراكيز ذيفان حال الدم الفا التي أعطت نسبة تحلل (25-50-70-90-100 ٪) والبالغة (1.56 - 3.12 - 12.5 – 50 – 100) ملغرام/ (0.5) ملليلتر على التوالي ثم حقن (0.5) ملليلتر\ لكل فأرة من كل تركيز وبواقع (5) فئران للتركيز الواحد داخل البريتون وبعد مرور (5) ايام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل مجموعة والتي منها حددت الجرعة القاتلة الكلية والنصفية للذيفان وبحسب المعادلة التالية:

$$LD_{50} = LD_{100} - \sum \left(\frac{a \times b}{n} \right)$$

LD_{50} = متوسط الجرعة القاتلة

LD_{100} = اقل جرعة مطلوبة للقتل الكلي

a = فرق الجرع b معدل الوفيات n= عدد الفئران في المجموعة الواحدة

7.2. تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي الحار للزنجبيل ضد الجرعة المهلكة الكلية من ذيفان حال الدم ألفا:

حضرت اربعة تراكيزمن مستخلص الزنجبيل المائي الحار (10- 15 -20-40) ملغم \ (0.5) ملليلتر ثم حقن (0.5) ملليلتر لكل فأرة من كل تركيز وبواقع (5) فئران للتركيز الواحد داخل تجويف الخلب كل (48) ساعة لمدة (20) يوم وبعد نصف ساعة من اخر جرعة تم حقن كل فأرة داخل غشاء الخلب (0.5) ملليلتر من الجرعة المهلكة الكلية من الذيفان ثم تم متابعة عدد الفئران الميتة والحية بعد مرور (5) ايام فقط (18). مع الاخذ بنظر الاعتبار وجود مجموعة سيطرة حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي بدلا من المستخلص خلال فترة المعاملة.

8.2. تأثير الجرعة الوقائية للمستخلص المائي الحار للزنجبيل في أمراضية ذيفان حال الدم الفا في الفئران:

بعد تحديد متوسط الجرعة القاتلة LD_{50} من ذيفان حال الدم ألفا والجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي للزنجبيل قسمت الفئران الى عدة مجاميع تتألف كل مجموعة من (5) فئران:

1) حقنت المجموعة الاولى داخل غشاء الخلب بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص كل (48) ساعة لمدة (20) يوم وبعد نصف ساعة من اخر جرعة حقنت تلك الفئران داخل البريتون بمتوسط الجرعة القاتلة من ذيفان حال الدم ألفا .

2) حقنت المجموعة الثانية داخل غشاء الخلب بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص فقط .

3) حقنت المجموعة الثالثة داخل غشاء الخلب بمتوسط الجرعة القاتلة من ذيفان حال الدم ألفا فقط .

4) حقنت المجموعة الرابعة بالمحلول الملحي الفسلجي فقط كمجموعة سيطرة.

وبعد مرور ثلاث ايام لوحظة التغيرات المرضية العينية الظاهرة في مجاميع الفئران مقارنة بمجاميع السيطرة ثم تم تخدير الفئران وسحب منها الدم بطريقة طعنة القلب حيث استخدم جزء من الدم لحساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض في حين استعمل الجزء الاخر لغرض فصل المصل لاستخدامه في تحديد تركيز كل من TNF.α , IL-1β , IL-6 باستخدام العدة المجهزة من شركة Elabsciens ltd وحسب تعليمات تلك الشركة باستخدام جهاز الاليزا .

3. النتائج والمناقشة:

1.3. التحري عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج ذيفان حال الدم ألفا:

اظهرت نتائج التحري النوعي عن قابلية العزلات الجرثومية لانتاج ذيفان حال الدم الفا قابلية ثلاث عزلات بكتيرية فقط على انتاج مناطق تحلل واضحة على وسط غراء الدم وبعد اجراء التقدير شبه الكمي لتركيز الذيفان في راشح كل عزلة من تلك العزلات الثلاثة تم انتقاء العزلة البكتيرية التي اعطى راشحها اكبر منطقة تحلل لغرض استخلاص الذيفان منها حيث بينت الدراسات وجود علاقة طردية بين تركيز الذيفان وقطر منطقة التحلل وذلك بسبب القدرة العالية للذيفان على تحليل انواع مختلفة من خلايا المضيف كخلايا الدم الحمر والبيض من خلال مايحدثه من ثقوب في غشائها البلازمي تلك الثقوب التي تؤدي الى انتفاخها وتحطمها وتحرر المغذيات منها مثل الحديد وجزيئات ATP التي تعد أساسية لنمو الخلايا البكتيرية التي تعمل على انتاج الذيفان في البيئات قليلة المغذيات من اجل بقاءها وانتشارها داخل جسم العائل [19] كما لوحظ ان وجود التراكيز العالية من ذيفان حال الدم ألفا سيؤدي الى الزيادة في نسبة الكالسيوم داخل خلوية واحداث تغيرات شكلية كبيرة تنتهي بتحلل الخلايا وتحطمها. لذا اعتمدت طريقة تحلل خلايا الدم الحمر في العديد من الدراسات لتحديد قابلية البكتريا على انتاج ذيفان حال الدم ألفا [20].

2.3. استخلاص وتنقية ذيفان حال الدم ألفا.

بينت نتائج استخلاص الذيفان من الراشح البكتيري الذي فصل عن الخلايا الجرثومية بالطرد المركزي المبرد وجود زيادة ملحوظة بفعاليته التحليلية بعد ترشيحه وديلزته وتركيزه فقد وصلت الفعالية التحليلية للراشح (40) وحدة تحلل/ مليليتر والتي تمثل مقلوب اعلى تخفيف اعطى تحلل واضح لخلايا الدم .

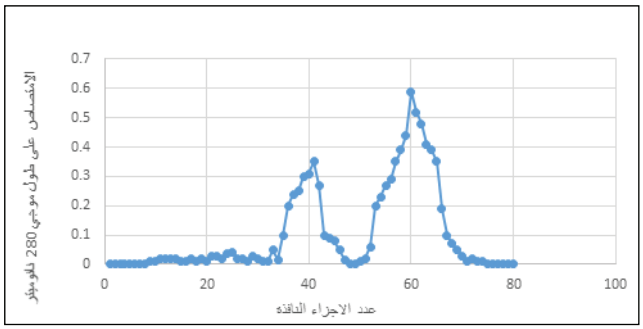
اكدت تلك النتائج القابلية العالية للعزلة البكتيرية على افراز حال الدم ألفا الى الوسط الذي تعيش فيه باعتباره احد اهم عوامل الضراوة التي تفرزها البكتريا الى البيئة المحيطة بها بأعتماد آلية خاصة تتضمن ارتباط ثلاث مكونات رئيسة (HIyB ,HIyD ,ToIC) لتكوين قناة عبر الجدار البكتيري تربط الغشاء الداخلي والخارجي للبكتريا والتي من خلالها يعبر الذيفان (HIyA) الى البيئة الخارجية المحيطة بالبكتريا [21] .كما اظهرت نتائج ترسيب مستخلص الذيفان الخام باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (75٪) زيادة واضحة في الفعالية التحليلية للذيفان المترسب بعد ديلزته

حيال عدة تبديلات بأستخدام الماء المقطر وتركيزه اذ وصلت الفعالية التحليلية له الى (160) وحدة تحلل/ ملليتر. ان الزيادة الحاصلة في الفعالية التحليلية للمستخلص تعد دليلا على كفاءة عملية الترسيب بأملاح كبريتات الامونيوم في الحصول على محاليل بروتينية اكثر تركيزا وتحقيق درجة من النقاوة عبر التخلص من البروتينات الملوثة [16]. حيث تتميز املاح الامونيوم بذائبيتها العالية وقدرتها على المحافظة على البروتينات ومنع مسخها بالأضافة الى قدرتها على معادلة الشحنات السطحية للبروتينات وأزالة طبقة الماء المحيطة بها مؤدية بذلك الى تقليل ذائبية البروتين وترسيبه بتأثير الملح [22].

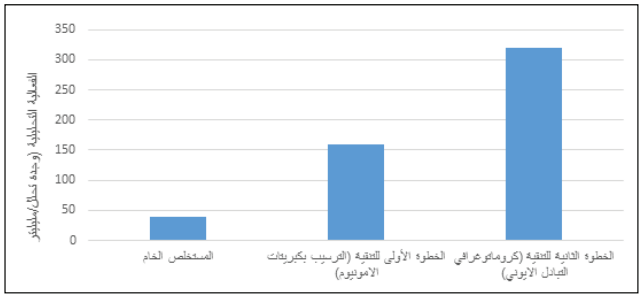
مرر البروتين المترسب في عمود المبادل الايوني DE-AE-Cellulose وبعد الغسل ومتابعة الامتصاص على الطول الموجي (280) نانوميتر للأجزاء النافذة لوحظ ظهور قمتين عند الاجزاء (34-47) و(51-70) على التوالي (شكل 1).وعند قياس الفعالية التحليلية للقمم الظاهرة بعد ديلزتها وتركيزها لوحظ وجود فعالية تحليلية وصلت الى (320) وحدة تحلل/ ملليتر في القمة الثانية فقط .كما اتضح ان تركيز كلوريد الصوديوم اللازم لاسترداد الذيفان من عامود المبادل الايوني بلغ (1.25) مولار.

استخدمت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني كمرحلة ثانية للتنقية للبروتين من قبل العديد من الباحثين حيث ان استعمال مدى ايوني متوسط او محلول دارئ حاوي تراكيز ملحية متوسطة سيعمل على تقليل التداخل الحاصل ما بين البروتين ومادة المبادل مسهلا بذلك استرداد النموذج نتيجة العمل على فك الترابطات الحاصلة بين البروتين والمبادل [16].

لوحظ من النتائج الحالية وجود زيادة مناسبة في الفعالية التحليلية لمستخلص الذيفان المنقى جزئيا بعد كل خطوة من خطوات التنقية مقارنة بالمستخلص الخام كما موضح في الشكل (2) فقد اشارت الدراسات السابقة الى محاولة اختصار خطوات التنقية الى اقل عدد ممكن واعتماد التنقية بطريقة الالفة التي تنقي البروتينات بخطوة واحدة فقط وبالتالي سيتم المحافظة على فعالية البروتينات وتقليل فرص تلفها.



شكل (1): كروماتوغرافيا التبادل الايوني بأستخدام عمود التبادل الايوني DEAE-Cellulose بأبعاد (15×1.5) سم لتنقية الذيفان حال الدم ألفا تم الاسترداد بمحلول (0.02) مولار دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك ذو (pH=8)وبتدرج ملحي خطي بمدى (0 -1.5) مولار كلوريد الصوديوم بسرعة جريان (0.5) ملليتر / دقيقة وبواقع (3) ملليتر / جزء.



الشكل (2): الفعالية التحليلية لمستخلص ذيفان حال الدم حسب خطوات التنقية.

3.3. الجرعة القاتلة الكلية (LD100) والنصفية (LD50) لذيفان حال الدم ألفا:

تم تحديد الجرعة القاتلة الكلية والنصفية للذيفان من خلال حقن الفئران بالتراكيز التي اعطت نسب تحلل متدرجة (25-50-70-90-100٪) وبواقع 5 فئران للتركيز الواحد داخل غشاء الخلب حيث وجد ان الجرعة القاتلة الكلية هي (100)ملغم \(0.5 مليليتر) وبنسبة هلاك (100٪) بعد مرور (5) ايام في حين وجد ان الجرعة

القاتلة لنصف عدد الفئران قد وصلت الى(29.4) ملغم \ (0.5) مليليتر بعد مرور (5) ايام كما مبين في جدول (1).

توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة والتي اكدت على وجود زيادة طردية في النسبة المؤية لعدد الفئران الميتة عند حقنها بتراكيز تصاعدية من ذيفان حال الدم ألفا كما لوحظ ان سلالات بكتيريا *E.coli* المنتجة لذيفان حال الدم ألفا تكون اكثر ضراوة وقدرة على قتل الحيوانات المختبرية من السلالات غير المنتجة للذيفان [15].

كما ان الاختلافات في قيم كل من الجرعة المهلكة الكلية والنصفية للذيفان بين الدراسات المختلفة قد يرجع الى طبيعة السلالات الجرثومية التي استخلص منها الذيفان والى ظروف عملية الاستخلاص والتنقية التي قد تؤثر على فعالية الذيفان المستخلص بالاضافة الى التأثير المباشر لقوة الجهاز المناعي للحيوانات المختبرية المستخدمة في التجربة على الرغم من ان النظام البايولوجي للذيفان هو نفسه في كل الحالات.

جدول (1): الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران من ذيفان حال الدم الفا

المجاميع	عدد الفئران بكل مجموعة (n)	الجرعة (ملغم/ ٥, ٠ مليليتر)	اختلاف الجرع (a)	العدد الميت للفئران	معدل الوفيات (b)	النسبة المؤية للهلاك	$\frac{b \times a}{n}$
1	5	100		5		100%	
2	5	50	50	4	4.5	80%	45
3	5	12.5	37.5	3	3.5	40%	22.5
4	5	3.12	9.4	3	3	20%	2.8
5	5	1.56	1.6	1	2	20%	0.3
السيطرة	5	0	0	0	0		0
							المجموع (T) =70.6
الجرعة القاتلة النصفية = اقل جرعة مطلوبة للقتل الكلي -T = 100- 70.6 = 29.4 ملغرام/0.5 مليليتر							

4.3. الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي:

تم تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي الحار للزنجبيل والبالغة (20) ملغم \ فأرة والتي اعطت نسبة نجاة (100٪) في الفئران المحقونة بالجرعة القاتلة الكلية من الذيفان كما موضح في الجدول (2).

يعد عامل الحرارة من العوامل المهمة التي تساعد بأذابة المواد الفعالة في المستخلص النباتي الشيء الذي

لوحظ من خلال النتائج المبينة في الجدول (3) الذي يؤكد احتواء المستخلص المائي الحار للزنجبيل على كل من الالكلويدات (Alkaloid) السابونات (Saponins), الفلافونويدات (Flavonoids) , التانينات (Tannins) , الكلايكوسيدات (Glycosides) , تربينويدات (Ter-penoids) والفينولات (Phenolic) في حين لم يلاحظ وجود الستيرويدات (Steroids) .

تعد جميع تلك المواد فعالة في تدعيم الجهاز المناعي للعائل بأعتبارها مواد مضادة للأكسدة ومضادة للألتهاب حيث تعمل على تقليل الفعل المرضي للذيفانات من جهة وزيادة عدد الخلايا المناعية ومنع موتها مثل الخلايا البلعمية واللمفية التي تلعب دورا مهما في الاستجابة المناعية في جسم المضيف من جهة اخرى فضلا عن دوره المحسن للمؤشرات المناعية الذاتية (الخلوية والخلطية) الغير متخصصة [23].

جدول (2): الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي

تركيز المستخلص النباتي (ملغم/ 0.5مليليتر)	الجرعة المهلكة الكلية (مايكرو غرام/ مليليتر)	عدد الفئران	العدد الحي	العدد الميت	العدد التراكمي الحي	العدد التراكمي الميت	العدد الكلي	النسبة المؤية للهلاك ٪	النسبة المؤية للنجاة ٪
10	100	5	1	4	1	7	8	87.5	12.5%
15	100	5	2	3	3	3	6	50	50%
20	100	5	5	0	8	0	8	0	100%
25	100	5	5	0	13	0	13	0	100%

جدول (3): التحليل الكيمياوي لمستخلص نبات الزنجبيل.

المركبات الكيمياوية	وجود اوعدم وجود المادة
Alkaloids	+
Saponins	+
Flavanoids	+
Tanins	+
Glycoside	+
Terpenoids	+
Phenolic	+
Steroids	-

5.3. التأثير الوقائي للمستخلص المائي الحار للزنجبيل ضد التأثيرات المرضية لذيفان حال الدم الفا:

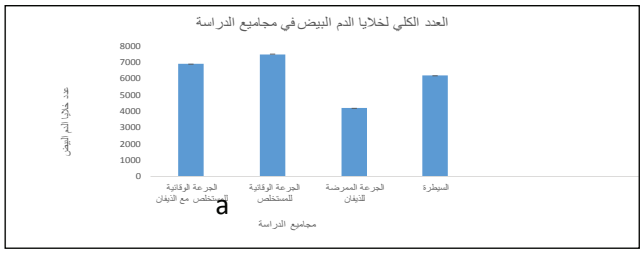
اكدت نتائج الدراسة الحالية الدور الوقائي للمستخلص المائي الحار للزنجبيل ضد ذيفان حال الدم ألفا من خلال دراسة المعايير التالية:

1.5.3. العد الكلي لخلايا الدم البيض في مجاميع الدراسة:

اظهرت النتائج انخفاض في عدد خلايا الدم البيض (4.3×10^3 خلية / مليليتر في الفئران المحقونة بالجرعة القاتلة النصفية من ذيفان حال الدم ألفا مقارنة بالسيطرة (6.7×10^3 خلية / مليليتر في حين كان هنالك ارتفاع في عدد خلايا الدم البيض(7×10^3) خلية/ مليليتر في مجموعة الفئران التي حقنت بالجرعة الوقائية من المستخلص فقط. كما لوحظ ارتفاع في عدد خلايا الدم البيض ليصل الى (6×10^3) خلية / مليليتر في مجموعة الفئران التي حقنت بالجرعة الوقائية من المستخلص قبل حقنها بالجرعة القاتلة النصفية من الذيفان مقارنة بالمجموعة التي حقنت بتلك الجرعة من الذيفان فقط شكل (3) .

يعمل ذيفان حال الدم الفا في العديد من الحالات المرضية على تحفيز اظهار معقد غشائي من بروتينات سكرية يعرف CD18 /11a على سطح خلايا الدم البيض احادية النواة حيث يتوسط ذلك المعقد عملية التصاق متخصصة بين خلايا الدم البيض والخلايا الطلائية في الاوعية الدموية

مؤديا بذلك الى زيادة هجرة وارتشاح خلايا الدم البيض الى مناطق الاصابة الجرثومية وقلة عددها في الدم المحيطي لذا فان تثبيط اظهار تلك المعقدات بواسطة المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية كالمستخلص المائي الحار للزنجبيل سيقلل من هجرة خلايا الدم البيض الى موقع الاصابة ويزيد اعدادها في الدم المحيطي [24, 25] .



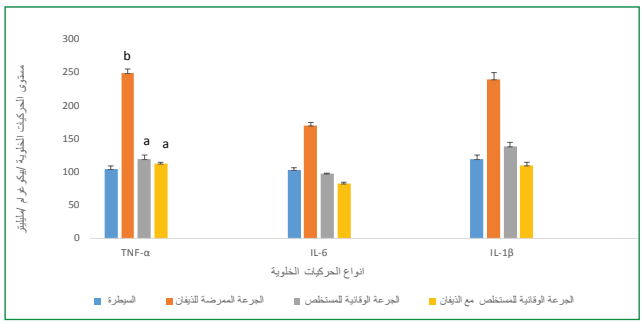
شكل (3): العدد الكلي لخلايا الدم البيض في مجاميع الدراسة.

2.5.3. مستوى الحركيات الخلوية قبل الالتهاب (IL-6, IL-1β,TNF-α) في مصل مجاميع الدراسة:

لوحظ من خلال النتائج المبينة في الشكل (4) وجود ارتفاع ملحوظ في مستوى الحركيات الخلوية قبل الالتهاب في مجموعة الفئران المحقونة بالذيفان حال الدم ألفا والتي بلغت (220 ,146, 201) بيكوغرام\مليليتر لكل من TNF-α, IL-6 IL-1β على التوالي مقارنة بالسيطرة البالغة (130, 116, 170) بيكوغرام\ مليليتر على التوالي التي كان معدل مستوياتها في المجموعة المحقونة بالجرعة الوقائية للمستخلص النباتي فقط مقاربا للسيطرة والبالغة(139،98،120) بيكوغرام \مليليتر على التوالي في حين اظهرت المجموعة المحقونة بالجرعة الوقائية للمستخلص قبل حقنها بالجرعة القاتلة النصفية من الذيفان انخفاض في معدل مستوى تلك الحركيات عند مقارنتها مع المستويات المسجلة في المجموعة المحقونة بالذيفان لوحده والتي وصلت الى (140, 120 , 166) بيكوغرام\مليليتر لكل من TNF-α,IL-6,IL-1β على التوالي.

ان الارتفاع الملحوظ في معدل مستوى الحركيات الخلوية قبل الالتهاب يعد من الخطوات الاولى لاستجابة الجهاز المناعي للمضيف ضد المرضات ومنتجاتها والتي تلعب دورا مهما لابادتها وتخليص الجسم منها مع ذلك يعمل الانتاج المفرط من تلك الحركيات على تطوير تفاعل التهابي حاد جدا يؤدي الى تلف النسيج وتحطمه [20].

يمتلك المستخلص المائي الحار لنبات الزنجبيل القدرة على تثبيط التفاعلات الالتهابية من خلال العمل على تقليل انتاج الحركيات الخلوية قبل الالتهاب من الخلايا المناعية المختلفة عن طريق تثبيط التحفيز المفرط لتلك الخلايا بواسطة العوامل المرضية مؤديا بذلك تقليل حدة التفاعل الالتهابي [26, 27]. كما يعمل مستخلص الزنجبيل على تثبيط تضاعف بعض الخلايا اللمفية كالخلايا التائية المساعدة وعلى ايقاف تنظيم اظهار جزيئات معقد التوافق النسيجي الاول والثاني على سطح الخلايا المظهرة للانتجين بالشكل الذي يؤدي الى تثبيط وضيفتها وايقاف قدرتها على انتاج الحركيات الخلوية في موقع الاصابة التي تكون مسؤولة عن تفاقم التفاعل الالتهابي [28].



-الحروف المتماثلة دلالة على اختلاف غير معنوي (P< 0.05)

-الحروف المختلفة دلالة على اختلاف معنوي (P< 0.05)

شكل (4): مستوى الحركيات الخلوية قبل الالتهاب (IL-6, IL-1β,TNF-α) في مصل مجاميع الدراسة.

المصادر

[1] Yan, F.and polk B. Commensally bacteria in the gut: learning our friends curr . opin .Gastro . 20: 565-571, (2004).

[2] Wiles, T.J.; Kulesus R.R and Mulvey M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp. Molic.Patho.85 (1):11-19, (2008).

[3] Bettelheim, K.A. and Gold water, P.N. Escherichia coli and sudden infant death syndrome. Frontiers. Immune .6(3):1-7, (2015).

[4] Berube,B.J.; 1 and Wardenburg,J.B. Staphylococcus aureus α-Toxin: Nearly a Century of Intrigue. Toxins .5: 1140-1166, (2013).

[5] Lehmacher, N.; Meier, H.; Aleksic, S. and Bochemuhl,J.Detection of Hemolysin Variants of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli by PCR and Culture on Vancomycin-Cefixime-Cefsulodin Blood Agar.App.Inviro.Micro.64(7): 2449-2453, (1998).

[6] Bolfa, P.; Catio, C.; Gal, A.; Taulescu, M. ; Fit, N.; Nadas, G.; Niculae, M.;Tamas, M.andSpinu, M . Screening of life alcoholic plants extract effect on the immune status of Romanian EIAV infected horses. Rom. Biotech. Litt. 16(6): 6730-6739, (2010).

[7] Kishk, Y. F. M. and Sheshetawy, H.E. Optimization of Ginger (Zingeber officinal) phenolic extraction conditions and its antioxidant and radical scavenging activities using response surface methodology .Wold. J. Dair. Food. Scien. 5(2):188-196, (2010).

[8] Riaz,H.; Begum,A.; Raza, S.; khan, Z.; yousaf, H. and Tariq, A. Antimicrobial property and phytochemical study of ginger found in local area of Punjab, Pakistan. Int.Curr.Pharm. J. 4(7):405-409, (2015).

[9] Sakr, S.A.; Nabi,S.H.; Okdah,Y.A.; Garawani,I.M. and El Shabka, A.M. Cytoprtective effects of aqueous ginger (Zingiber officinale) extract against carbimazole-induced toxicity in albino rats. Ejpmr.3(7): 489-497, (2016).

[10] Baron, E. J. and Finegold, S. M. Diagnostic Microbiology. 8th ed. The C. V. Mosby Company, Baltimore. (1990).

[11] Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Mjarmion , B.P. and Simmons, A. Mackie and McCartney practical medical microbiology. (14th ed.) Churchill. Livingston. USA, (1996).

[12] Santos, J.A.; Gonzales,C.J.;Otero,A. and Lopez, M.G.Hemolytic activity and siderophore production in different aeromonas species isolated from fish .Appl. Enviro. Micro. 65(12): 5612-5614, (1999).

[13] Ruiz, M. L.; Silva, P. G. and Laciar, A. L. Comparison of microplate, agar drop and well diffusion plate methods for evaluating hemolytic activity of Listeria monocytogenes. Afr.J.Microbiol.Res.3 (6):319-324, (2009).

[14] Lowry, O.H.; Reschrough, N.J.; Earry, A.L. and Randull,R.J.Protein measurement with folin reagent.J.Biol.Chem.193:265-257, (1951).

[15] May, A.; Gleason, T.;Sawyer, R. and pruett, T. Contribution of Escherichia coli α-hemolysin to bacterial virulence and in-

Megaterium.Int.J.Pharma.Res and Allie. Scie.5(1):65-71, (2012).

[23] Shaky, S.R. Medicinal uses of ginger (Zingiber officinale Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. Inter.J. Chem.Stud.3 (2):83-87, (2015).

[24] Harun,N.H.; Septama,A.W.and Jantan,I. Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagoctosis activities of leukocytes. Asian. Pac.J. Trop. Biomed.5(1):48-53, (2015).

[25] Stanley, P.; Koronakis, V. and Hughes, C. Acylation of Escherichia coli hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. Micro. Mol. Biol. Rev. 62(2): 309-333, (1998).

[26] Hai,N.V.The use of medical plants as immunostimulants in aquaculture: Aquaculture .446:88-96, (2015).

[27] Raji, Y.; Udohu,S; Oluwadar, O.;Akinsomisoye, O. and Awobajool,O. Anti-inflammatory and analgesic properties of the rhizome extract of Zingiber officinale.Afr. J. Biomed. Res. 5 :121-124, (2002).

[28] Tripathi, M.K.; Mishra, A.S.; Mondal, D.; Misra, A.K.;Prasad,R. and Jakhmola, R.C. Caecal fermentation characteristic blood composition and growth of rabbits on substitution of soya-bean mead by unconventional high-glycosinolate mustered (Brassica Juncea) mead as protein supplement. Animal.2 (2): 207-215, (2008).

traperitoneal alteration in peritonitis. Infect. Immune. 68(1): 176-183, (2000).

[16] Kadhem, AK.; Hamza, Sj. And Altaae, MF. Separation and purification of hemolysin from local isolation of Serratia marcescens. Intern. J. Phar. Scien. 3(6): 386-390, (2013).

[17] Chinedu, E.; Arome,D. and Ameh, F.S.A new method for determining acute Toxicity in Animal Models.Toxicol.Int. 20(3): 224–226, (2013).

[18] Mehrdad, M.; Messripour, M. and Ghobadipour, M. The effect of ginger extraction blood urea nitrogen an creatinine in mice. Pakistan. J.Biol. Scien. 10(17): 2968-2971, (2007).

[19] Skals, M.; Jorgensen, N.R.;Leipziger,J. and praetorins, H. A.α-hemolysin from Escherichia coli causes endogenous amplification through p2X receptor activation to induce hemolysis. PANS. 106 (10): 4030-4035 .(2009).

[20] Lae stadius,A.;Dahlfors.R. and Aperia,A. Dual effects of Escherichia coli α-hemolysinon rat renal proximal tubule cells. Kidney Inter. 62: 2035-2042, (2002).

[21] Su,L.; Chen,S.; Woodard,R.; Chen,J. and Wu,J.Extracellular over expression of recombinant Thermobifida fuscacutinase by alpha-hemolysin secretion system in E. coli BL21(DE3).Micro.C.Fact.11(8):2-7, (2012).

[22] Mishraa,S.andSuseelaa,M.R.Production, Partial Purification and Characterization of Extracellular, Alkalophilic, Carboxy Methyl Cellulase from Baccillus