دراسة أولية حول تأثير نبات *Z. spina-christi* على أنواع مختارة من الليشمانيا

المستخلص

لقد أصبحت الحساسية والمقاومة المتباينين لطفيليات الليشمانيا ضد عوامل العلاج الكيميائي المختلفة، مشكلة خطيرة، ومن هنا نشأت الحاجة إلى اكتشاف نوعية أدوية جديدة. والأعشاب الطبية هي البديل المتوفر في الوقت الحالي. والمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات السدر *Ziziphus spina christi* المستخدمة في الطب الشعبي في المملكة العربية السعودية قد تم اختبارها للمرة الأولى كعامل مضاد لليشمانيا.

ولقد تم اختبار المستخلصات على الأطباق لسلالتين من الليشمانيا *Leishmania* : الليشمانيا الكبرى *L.major* (FV1) ، والليشمانيا الدونوفانية (LV9) *L.donovani*. وكانت الأكثر فعالية هي المستخلص الايثانولية التي أعطت تثبيط لنمو (FV1) عند تركيز 250 ميكروجرام/مل بنسبة 77.3 % مع قيمة معنوية عالية ($P < 0.001$) بالمقارنة مع تركيزات الخلاصات الأخرى. بينما كانت نسبة تثبيط المستخلص المائية لنمو LV9 عند تركيز 250 ميكروجرام/مل 57.33 %. عند قيمة معنوية عالية بالمقارنة بالخلاصات الأخرى ($P < 0.001$).

المقدمة

مرض الليشمانيا هو مجموعة من الأمراض التي تصيب البشر في المناطق الاستوائية والشبه استوائية في العالم (WHO, 1990). وتقدر منظمة الصحة العالمية انتشار مرض الليشمانيا باثني عشر مليون نسمة، وهناك 350 مليون عرضة للإصابة. ومعدل الإصابة السنوي بالليشمانيا الجلدية هو 1-1.5 مليون حالة والليشمانيا الأحشاء 0.5مليون حالة. ويسبب المرض حيوان أولي protozoan من سوطيات الدم haemoflagellates من جنس ليشمانيا. وينقل إلى الإنسان أساسا عن طريق عضة أنثى ذبابة الرمل *sand-fly* المصابة. ويتراوح المدى السريري لمرض الليشمانيا في مجال واسع بدئا من إصابات محدودة ذاتية الشفاء مسببة قرحة بسيطة، مرورا بالقرحة المدمرة في الجلد والأغشية المخاطية وحتى الإصابة المتفشية في كل الجهاز الشبكي البطاني الاندوثيليالي. والتي ربما تكون سببا رئيسيا في الإمراض والوفيات. (Ashford & Bates, 1998). وكل مرض له وبائياته الخاصة، ومدى من المظاهر السريرية. ويوجد طفيلي الليشمانيا في شكلين متميزين من حيث الوصف أو التركيب الكيميائي الحيوي: طور مسوط (بروماستيجوت) متحرك يعيش خارج الخلايا في القناة الهضمية للناقل (ذبابة الرمل) وطور لاسوطي (أماستيجوت) يعيش داخل الخلية ضمن الفجوات التحليلية للخلايا الأكولة macrophages في الثدييات. ويوجد خمسة أنواع من الليشمانيا وهي العوامل المسببة لمرض ليشمانيا leishmaniasis العالم القديم وهي: ليشمانيا كبرى *L. major* ، وليشمانيا تروبيكا *L. tropica* ، وليشمانيا أثيوبيكا *L. aethiopica* ، وهي أساسا العوامل المسببة لليشمانيا الجلدية. وليشمانيا دونوفاني *L. donovani*، وليشمانيا إنفانتوم *L. infantum* ، وهي العوامل المسببة لليشمانيا الحشوية. (Ashford & Bates, 1998)

ولقد كان علاج الليشمانيا دائما محفوفا بالمصاعب. (Bernan, 1997). وكانت الحساسية المتباينة لطفيليات الليشمانيا ضد العلاجات الكيميائية المختلفة تعود أساسا لاختلافات في السلالة أو النوع، وأيضا تبعا لاستجابة المريض. وفي بعض الحالات مثل الليشمانيا الجلدية الواسعة الانتشار، تكون الاستجابة للعلاج الكيميائي ضئيلة جدا. ولقد كان الخط الدوائي الأول في علاج الليشمانيا منذ العشرينات من القرن العشرين مستندا على مركبات الأنتيمون الخماسية، وغالبا ما يستخدم صوديوم ستيبوجلوكونات sodium stibogluconate، وميجلومين أنتيمونات meglumine antimoniate (Goodwin, 1995). والأميدينات الثنائية العطرية وأهمها بنتاميدين pentamidine كانت تستخدم كخط ثاني في العلاج في عام 1952 (Thakur et al, 1991). ولقد أظهر أمفوتيريسين بي Amphotericine B (فانجيزون(Fungizone)) وبصفة شائعة في صورته الليبوسومية، فعالية قوية ضد طفيليات الليشمانيا، وكان يستخدم بكثافة لما زادت نسبة حدوث ليشمانيا الأحشاء في المرضى ذوي المناعة الضعيفة بالإضافة إلى زيادة نسبة المقاومة ضد مركبات الأنتيمون. (Thakur et. al, 1991). وبالرغم من العوامل العلاجية المختلفة التي تمت

دراستها واختبارها، إلا أن علاج الليشمانيا يظل إلى حد ما تجريبيا. ومعظم الأدوية المتوفرة حاليا هي سامة، وغالية الثمن، ولها آثار جانبية غير محبذة. ولقد أصبح نظام العلاج الطويل باضطراد، غير مؤثر. مما يدعو إلى الحاجة إلى خط علاجي جديد (Thakur et. al, 1991).

وفي الوقت الحالي توجه العديد من الناس إلى استخدام الطب الشعبي كطريقة للتغلب على الآثار الجانبية، والتكلفة الباهظة للأدوية المصنعة. وبنفس الطريقة بدأ العلماء أبحاثا جديدة في الطب الشعبي كمحاولة للتغلب على مقاومة الميكروبات والحصول على علاج طبيعي لتنشيط المناعة.

والنباتات التي تنتمي إلى جنس الزيزيفس *Ziziphus* تستخدم في العديد من الأغراض الطبية في الطب الشعبي في العالم كله. ويستخدم النبات أيضا من أجل خواصه المسكنة (Adzu et. al, 2002). وهو جنس معترف به بأنه ذو خواص دوائية محتملة. وفي الهند والصين، تستخدم أنواع نباتات جنس الزيزيفس بالذات في علاج أمراض مختلفة.

كما تستخدم في المملكة العربية السعودية لعلاج القرح، والجروح، وأمراض العين، والتهاب الشعب الهوائية، ويستخدمها البدو في علاج الجروح والأمراض الجلدية، وكمضاد للالتهابات. والخواص الدوائية الواسعة التنوع لنباتات جنس الزيزيفس هي أمر معروف، مع استخدامات ضد الأمراض الجلدية، والإسهال والحمى، والأرق. والفعالية الحيوية لخلاصات أوراق، وسيقان، وجذور نباتات جنس الزيزيفس للأنواع *Z. jujube, Z. spina christi, Z. mauritiana, Z. nummularia* ، كمضاد حيوي، ومضاد للفطريات، قد تم إظهارها جيدا (Kayser and Arndt, 2000). ومن المجموعات الكيميائية التي تم التعرف عليها في نبات *Z. spina Christi* مركبات الفينول، (أحماض الفينول، والفلافونويدات). ولقد وجد أن أعلى محتوى للفلافونويدات موجود في الأوراق (Mahran et. al, 1996). ويوجد بها أيضا الجليكوسيدات، والقلويدات، والصابونين. (Mojab, 2003).

والغرض من هذه الدراسة هو بحث تأثير المستخلصات الكلية لنبات *Ziziphus spina Christi* المعروف بالسدر(ويسمي العرب ثماره: بالنبق) على بعض سلالات طفيلي الليشمانيا على الأطباق.

المواد والطريقة:

1. سلالات الليشمانيا المستخدمة والوسط المغذي:

تم الحصول على السلالات المختلفة من طفيلي الليشسمانيا من معمل جامعة ليفربول بالاتصال المباشر مع Dr. Chance Liverpool School of Tropical Medicine والسلالتين هما:

MHOM/IL/80/Friedlin FV1(*L. major*)

MHOM/67/HU3: LV9 (*L.donovani*).

وتمت زراعة الطفيلي في عبوات بلاستيكية مقمة سعة 25 مل في وسط بيئي M199 الغني بالمواد المغذية : BEM, HEBES, L.glutamic مع مصل خامل لجنين عجل 10% FCS inactive؛ واستخدام penicillin/ stryptomycin. حفاظ على سلالات الطفيلي تم تمرير الطفيلي أسبوعيا في عبوات من نفس الحجم في وسط بيئي جديد، و تحسب الكمية المطلوبة لإعطاء كثافة مثالية تبلغ $5x10^6$ خلية برومستيجوت/مل وذلك باستخدام جهاز إحصاء الخلايا Haemocytometer

2. منشأ النبات وطريقة استخلاصه:

جمعت أوراق نبات السدر *Ziziphus spina Christi* من منطقة الطائف بالمملكة العربية السعودية في يوليو. ثم جففت في فرن عند 40 ^{0}م لمدة 24 ساعة، ثم طحنت بهاون يدوي على شكل بودرة.

2- 1. تحضير المستخلصات:

الطريقة التقنية المتبعة بالمرجع (Ali-Shtayeh, et. al., 1998) طبقت على كلا المستخلصين المائي والكحولي وكانت كالتالي:

2- 1-1. المستخلص المائي:

10 جم من بودرة النبات الجافة استخلصت 3 مرات بالنقع في الماء على البارد مع التحريك بين الفينة والأخرى ثم رشحت بالقطن في نظام متصل بمفرغة هوائية، تلا ذلك الترشيح بالسيلايت545 (20µl-45) تحت نفس النظام المتصل بالمفرغة الهوائية ثم ركز المستخلص حتى الجفاف بتبخير المذيب من الراشح في جهاز التبخير بالدوران تحت ضغط منخفض وعند 80 °م ثم حفظ بزجاجة في مكان معقم ومظلم بالفريزر.

2- 1-2. المستخلص الكحولي:

10 جم من بودرة النبات الجافة نقعت في الكحول الإيثيلي 80 % على البارد مع التحريك بين الفينة والأخرى ثم رشحت بالقطن فى نظام متصل بمفرغة هوائية، تلا ذلك الترشيح بالسيلايت545 (20µl-45) تحت نفس النظام المتصل بالمفرغة الهوائية ثم ركز المستخلص حتى الجفاف بتبخير المذيب من الرشح في جهاز التبخير بالدوران تحت ضغط منخفض وعند درجة 80 ºم، ثم حفظ بزجاجة في مكان معقم ومظلم بالفريزر.

2- 2. تحضير تراكيز المستخلصات:

المستخلصات السابقة لكلا النباتين تم إذابتها في الماء وحضر منها محلول مصدر (Stock) بتركيز 5 ملجم/ مل.

3- 1. فاعلية المستخلصات:

تم تقييم المستخلصات النباتية لنبات السدر في أطباق ذات 24 وحدة بأحجام عيارية (24-well microtitre plates) تحوي البيئة المغذية M199 والطفيلي في طوره المسوط (promastigotes) في الحالة اللوغاريتمية (10^6cells/ml) والتركيزات المختلفة لكلا المستخلصين: المائي والكحولي كل على حدة وهي (250 µg/ml, 125 µg/ ml, 50 µg/ml). وعمل عينة ضابطة (Control) تحوي فقط الطفيلي في البيئة المغذية.

م حساب متوسط عدد الطفيليات للثلاثة أيام الأولى بعد عملية إحصاء الخلايا الحية للطفيلي بجهاز Haemocytometer والمجهر الضوئي light microscope. ثم قورنت نتائج عدد الطفيليات في التركيزات المتواجدة مع الطفيلي والبيئة المغذية، مع العينة الضابطة والتي تخلو من المستخلصات.

3- 2. بحث نشاط المستخلصات في تثبيط نمو الطفيلي:

تم استخدام صبغة تريبان الزرقاء Trypan blue للتمييز بين البروماستيجوت الميتة من الحية، ومن هنا نحسب انخفاض العدد. ولقد تم رصد نسبة الحركة ومظهر الليشمانيا.

4. التحاليل الإحصائية:

تم تحليل البيانات باستخدام برامج EPI-INFO 2000 (CDC, Atlanta, GA, USA)

النتائج

أظهرت مستخلصات نبات السدر *Z. spina Christi* تثبيطا متنوعا لنمو الطورالمسوط (بروماستيجوت) في سلالات الليشمانيا (الكبرى *L. major* (FV1)، والدونوفانية *L. donovani* (LV9)) وذلك بعد حضانتها لمدة 72 ساعة في الأطباق جدول (1) شكل(2،1). ولقد ثبطت المستخلص الايثانولية للنبات عند تركيز 250 ميكروجرام، نسبة 77.3 % من سلالة FV1، بينما ثبطت 40 % فقط من سلالة LV9، ومن ناحية أخرى فان المستخلص المائي للنبات Z. s قد ثبط 57.33 % من LV9، و20 % فقط من بروماستيجوت FV1. شكل(3)

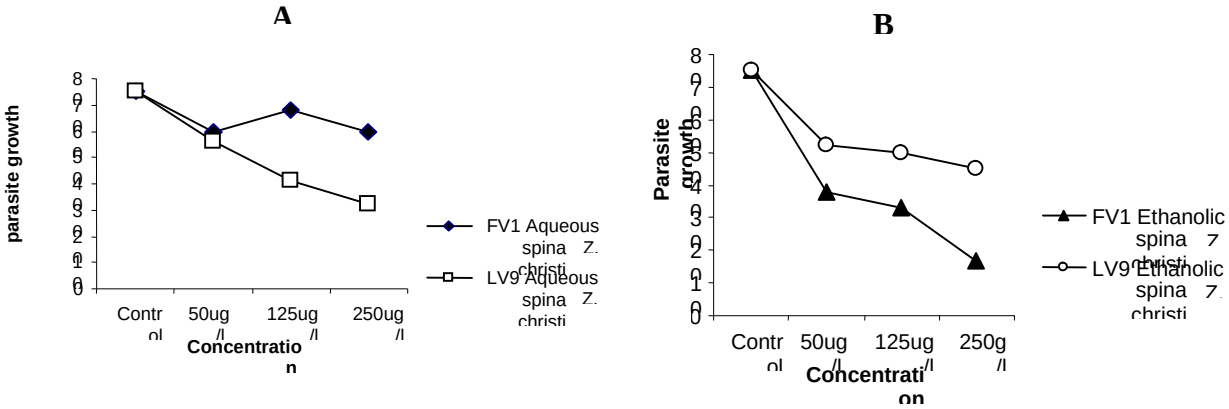
تثبيط أكثر من 50 % من FV1 كان بواسطة المستخلص الإيثانولية للنبات ، عند تركيز 125 ميكروجرام/لتر، مع تأثير معنوي عند تركيز 250 ميكروجرام/لتر بالمقارنة بتركيز 125 ميكروجرام/لتر.

جدول (1):تأثير المستخلص المائي والإيثانولي لأوراق نبات السدر على سلالات من طفيلي الليشمانيا بعد 72ساعة من الحضن بالأطباق (عدد الطفيليات × 10^6)

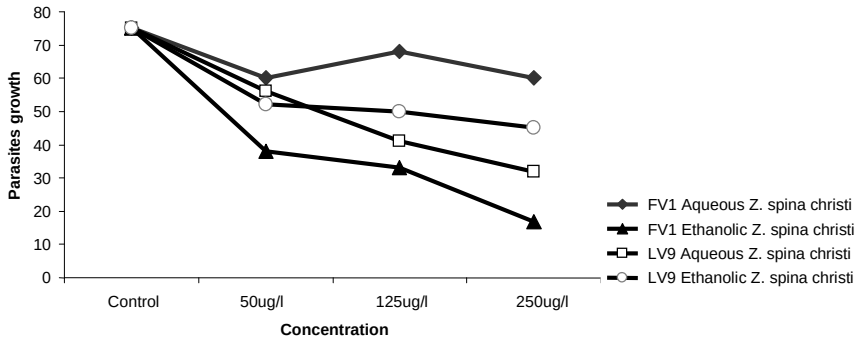
سلالات الليشمانيا		المستخلصات النباتية	(عدد الطفيليات × 10^6)			
			Control	50µg/ml	125µg/ml	250µg/ml
L. major	FV1	المستخلص المائي	75	60	68	60
	FV1	المستخلص الإيثانولي	75	38	33	17**
L. donovani	LV9	المستخلص المائي	75	56	41*	32**
	LV9	المستخلص الإيثانولي	75	52	50	45

*فرق معنوي $p < 0.01$ **أعلى فرق معنوي $p < 0.001$

شكل:(1)(B,A): تأثير المستخلصات بتراكيزها المختلفة على نمو الأطوار المسوطة لسلالات الليشمانيا بعد 72ساعة من الحضن بالأطباق

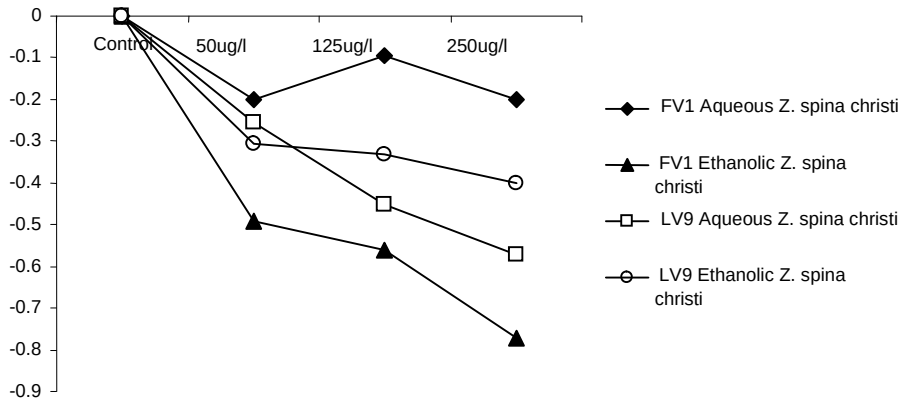


شكل (2) : تأثير المستخلصات بتراكيزها المختلفة على عدد الأطوار المسوطة لسلالات الليشمانيا



شكل (3) : التأثير الخافض للمستخلصات المختلفة على سلالات الليشمانيا spp

حركة البروماستيجوت الحية نقصت مع كل من المستخلصين، بعد إضافتهما لمدة 48-72 ساعة، عند تركيز 250 ميكروجرام/لتر.



كما لوحظ تثبيط أكثر من 50 % من LV9 مع المستخلص المائي للنبات ، عند تركيز 250 ميكروجرام/لتر، مع قيمة معنوية كبيرة $P < 0.001$ أكثر من استخدام تركيز 125 ميكروجرام/لتر، الذي أظهر فرقا معنويا قدره $P < 0.01$ بالمقارنة باستخدام تركيز 50 ميكروجرام/لتر.

المناقشة

هذه الدراسة هي تقييم أولي لتأثير المستخلصين المائي والإيثانولي لنبات السدر *Z. spina Christi* على الطور المسوط لسلالات من الليشمانيا. ولقد أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن خلاصات أوراق نبات السدر لها تأثير مضاد لليشمانيا. ولقد لوحظ وجود زيادة تصاعدية في التأثير المضاد لليشمانيا. ولقد ظهر أفضل تأثير مضاد لليشمانيا عند تركيز 250 ميكروجرام/لتر للمستخلص الكحولي الإيثانولي، ضد سلالة الليشمانيا الكبرى (FV1)، حيث انخفض عدد الطفيليات بنسبة 77.3%.

ولقد أظهرت المستخلص المائية 57.3% تأثيرا مضادا لليشمانيا الدونوفانية (LV9)، عند تركيز 250 ميكروجرام/لتر. وتتفق هذه النتائج مع ما سجله (Awad et. al., 2001)، الذي أظهر أن المستخلص المائي لأوراق نبات السدر Z. s لها تأثير ملحوظ مضاد للبكتريا ضد السلالات الجرام الموجبة بدون تأثير سام للخلية.

والمستخلص الكحولي لنبات Z. s له تأثير مضاد لنمو الليشمانيا الكبرى، ولكن هذه النتيجة هي عكس ما سجله (Ali – Shatayeh et. al, 1998) الذين سجلوا أن التأثيرات المضادة للميكروبات الأضعف لمجموعة نباتات كانت من مستخلص Z. s سواء المائية أو الكحولية.

في دراستنا هذه لم نستخدم مستخلصات تجزيئية منفصلة، ولهذا السبب فانه لا يمكننا التقرير بدقة عن المجموعة الكيميائية التي كان لها التأثير المضاد لليشمانيا. ولقد سجل (Mittra et. al, 2000) ن الفلافونويدات الموجودة في عديد من العلاجات المشتقة من الأعشاب هي عوامل قوية مضادة لليشمانيا. وأن لها احتمالات واعدة كبيرة للاستخدام كعلاج كيميائي ضد الليشمانيا، وواحد من مكونات Z. sهو الفلافونويدات. (Mahran et. al, 1996). ومن هنا فانه ربما تكون هذه المكونات هي التي تقوم بدور في وقف نمو أنواع الليشمانيا في دراستنا.

ولقد سجل (Nils et. al, 2004) أن الصابونين من أوراق نبات ميسا بالانسي Maesa balansae ، له تأثير مضاد لليشمانيا، وهو واحد من المجموعات الكيميائية الموجودة في Z. s، وربما تلعب دورا في التخلص من الليشمانيا.

إن مهاجمة الكائنات الدقيقة للبشرة ربما يؤدي إلى فوق الأكسدة، وذلك يؤدي إلى مشاكل بالبشرة.

ومستخلص أوراق السدر Z. s. تحتوي على مجموعة الفينول. وهي تعتبر عامل فعال في التخلص من مجموعات بيروكسايل، وربما يساعد ذلك في إعادة التئام الجلد المصاب، وربما تحتاج هذه النقطة إلى مزيد من البحث، وذلك لتقرير دور مستخلص Z. s كمضاد للأكسدة، وخاصة في حالة الليشمانيا الجلدية.

ولقد سجل (Islam et. al., 2001) أن Z. s ليس لها تأثير ضار كدواء، وأن قيمة نصف الجرعة المميتة هي < 6400 مجم/كجم، ولم يتم تخطي هذه الجرعة في دراستنا.

التوصيات:

نوصي بأن يقوم العلماء بزيادة مجال البحث حول دور نبات السدر Z. Spina-christi سواء في الأطباق أو في الجسم كمضادة للطفيليات.