مجلة بغداد للعلوم **مجلد 7(1) 2009**

تأثير المستخلصات المائية للثوم *Allium sativum* والفلفل الحار *Capsicum spp.* على طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* خارج الجسم الحي in vitro

***بان جاسم محمد* ***

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة
اجريت هذه الاختبارات خارج الجسم الحي In vitro للكشف عن تأثير المستخلصات المائية لكل من الثوم *Allium sativum* والفلفل الحار *Capsicum* spp. على الاطوار المغتذية trophozoites لطفيلي *Entamoeba histolytica* المنمى في الوسط الزرعي liver infusion agar عند درجة C 37، تم اضافة المستخلصين كلا على حدة بجرعات (0.01، 0.05، 0.1، 0.5، 1مل) الى عدد محدد من الاطوار المغتذية للطفيلي وتركت لمدة 24 ساعة ، وكانت النسب المئوية لقتل الاطوار المغتذية للطفيلي التي عوملت بالمستخلص المائي للثوم (14.82% ، 31.05%، 46.16 %، 64.29 %، 92.7%) على التوالي ، وهي مقاربة جدا لتلك النسب الناتجة عن معاملة الطفيلي بالمستخلص المائي للفلفل الحار والتي كانت (17.86%، 32% ، 44 %، 66.67% ، 100%) على التوالي .
وبصورة عامة فأن النتائج اظهرت ان المستخلصات المائية للثوم والفلفل الحار فعالة في التخلص من الاطوار المغتذية لطفيلي *E. histolytica* خصوصا عند الجرع 0.5 مل و1 مل

الكلمات المفتاحيه: ***Allium sativum، Capsicum، الزحار الاميبي***

المقدمة :

طفيلي *Entamoeba histolytica* ابتدائي معوي intestinal protozoan يصيب الانسان ويسبب له مرض الزحار الاميبي Amoebic dysentery والذي يعد احد مشاكل الصحة العامة خاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية [3,2,1]
اذ يصيب مايقارب 50مليون شخص ويتسبب في100000 حالة وفاة سنويا على مستوى العالم [4,2].
يمر الطفيلي خلال دورة حياته بطورين اساسيين هما الطور المغتذي Trophozoite والطور المتكيس Cyst ، والاخير يمثل الطور المعدي infective stage اذ تتم الاصابة بالطفيلي عن طريق تناول الطعام والشراب الملوث بذلك الطور[5] ، يعيش الطور المغتذي في تجويف الامعاء الغليظة للمضيف ، ويتغذى على الغشاء المخاطي للامعاء الغليظة وكريات الدم الحمر ويقوم بافراز انزيمات تحلل الغشاء المخاطي وتتعمق داخل جدار الامعاء فتتلف خلاياه مسببة قروحا مؤلمة وبذلك يحدث مرض الزحار الاميبي [6,5]

ونظرا للاهمية الطبية لهذا الطفيلي فقد بذلت في العقود الاربعة الاخيرة جهود حثيثة للتعرف بشكل اكبر على الطفيلي والمرض وكيفية علاجه ، وتزايد الاهتمام باستخدام المستخلصات النباتية في علاج الاصابة بالطفيلي نظرا لما يحويه بعضها من مركبات تساعد في القضاء على القرح المعوية وشفاءها[7] فضلاعن كونها اقل ضررا واقل سمية من العقاقيرالكيمياوية, وهذه الدراسة التي نحن بصددها اجريت للكشف عن تأثير اثنين من تلك المستخلصات النباتية في طفيلي *E. histolytica* خارج الجسم الحي in vitro ،وهما : المستخلص المائي للثوم watery extract of garlic *Allium sativum* والمستخلص المائي للفلفل الحار watery extract of hot pepper *Capsicum spp.*

المواد وطرائق العمل :

اولا: المواد:

1- محلول الملح الفسيولوجي : Normal saline

تم تحضير هذا المحلول بأذابة 0.9 غم من كلوريد الصوديوم (Nacl) في حجم صغير من الماء

* كلية العلوم/قسم علوم الحياة/جامعة بغداد

المقطر ثم اكمال الحجم الى1000 مل ، وثبت الرقم الهيدروجينيpH عند 7.2 باستخدام جهاز pH meter ، وعقم المحلول بالموصدة autoclave عند 121C وضغط 15 باوند/انج مدة ربع ساعة ، ثم حفظ المحلول في درجة 4C لحين الاستخدام[8]

2- محلول الملح المتعادل : buffered saline solution

حضر بأذابة 1غم من potassium dihydrogene phosphate (KH2PO4) و0.6 غم من dihydrogene phosphate disodium (Na2HPO4) و 0.84 غم من كلوريد الصوديوم في حجم قليل من الماء المقطر واكمل الحجم الى 1000 مل وثبت الـ pH عند7.2 ، عقم المحلول باستخدام الموصدة عند 121c وضغط 15باوند/انج مدة ربع ساعة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام [9]

3 محلول - النشا : Starch Solution

حضر بأضافة0.5 غم من النشا الى9.5 مل من الماء المقطر ومزجه جيدا باستخدام الهزازshaker لحين الحصول على عالق suspension ، ثم اخذ 1مل منه ووضع في انبوب يحوي 9 مل ماء مقطر وحفظ في الثلاجة ، وعند تحضير الوسط الزرعي يضاف له 0.1 مل من هذا العالق كغذاء للطفيلي[10]

***4 - صبغة* الايوسين الكحولية : Alcoholic eosin stain**

حضرت بأذابة 1 غم من الصبغة في99 مل من الكحول الاثيلي تركيزه 75% ، ثم حفظت في قنينة معتمة بدرجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام [11]

5- مصل الدم : Blood serum

تم سحب عينة دم من شخص سليم ووضعت في انبوب معقم خالي من مانع التخثر ، تركت العينة بدرجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة ثم عرضت لعملية طرد مركزي بقوة3000rpm مدة 10 دقائق ثم جمع المصل ووضع في انابيب أبندروف معقمة ،حفظت في درجة 20C لحين الاستخدام [12]

6 - الوسط الزرعي : *liver infusion agar*

ويتكون من طورين :

أ-طور صلب Solid phase

وهو على شكل مسحوق في عبوات تجارية جاهزة للاستخدام ، يتكون من :

Beef liver infusion	500 gm / l
Proteose peptone	10 gm / l
Sodium chloride	5 gm / l
Agar	20 gm /l

حضر هذا الطور بأذابة55 غم منه في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمال الحجم الى 1000 مل ، ثم سخن المزيج جيدا حتى الغليان للأذابة مكونات الوسط بالكامل ، ثم التعقيم باستخدام الموصدة عند نفس الظروف المذكورة سابقا مدة ربع ساعة.

ب- طور سائل : Liquid phase

يتكون من5 مل من محلول الملح البفري buffered saline soliution و 1 مل من مصل الدم فيكون الحجم النهائي 6 مل ، تضاف الى الطور الصلب في ظروف معقمة [9].

7 - المستخلصات النباتية : Plant extracts

***أ- المستخلص المائي للثوم Allium sativum* watery extract :**

تم وزن 100 غم من فصوص الثوم بعد ازالة القشور ووضعها في500 مل من الماء المقطر ، وضعت في الخلاط ثم حرك المزيج الناتج باستمرار لمدة 48 ساعة في الهزازshaker , رشح المزيج عبر طبقات من الشاش المعقمsterile gauze ثم حفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

***ب-المستخلص المائي للفلفل الحار Capsicum spp.* watery extract :**

اتبعت نفس الخطوات المستخدمة اعلاه لتحضير المستخلص المائي للثوم في تحضير هذا المستخلص.

ثانيا- طرائق العمل:

1-عزل طفيلي *E. histolytica*

تم عزل الطفيلي من غائط الاشخاص المصابين بالزحار الاميبي والذي يكون ذا قوام مخاطي mucoid دموي Bloody ,اذ اخذت كمية من الغائط ومزجت جيدا مع 3 مل من الـ normal saline لحين الحصول على عالق ، ثم رشح المزيج عبر طبقات من الشاش المعقم للتخلص من الجزيئات الكبيرة قبل ان يتم تلقيح الوسط به [13,10]

2- تلقيح الوسط الزرعي بطفيلي *E. histolytica* وادامته :-

تم اخذ 0.5 مل من العالق المحضر اعلاه واضافتها الى الوسط الزرعي liver infusion agar ، وضع الوسط في الحاضنة incubator بدرجة c 37 مدة 48 ساعة ، ثم اخذت قطرة من الراسب الواقع بين الطورين السائل والصلب باستخدام pasture pipette ووضعت على شريحة زجاجية ثم فحصت تحت المجهر لمشاهدة الطور المغتذي trophozoie للطفيلي ، ان عدم وجود اي نمو للطفيلي يعني ان النتيجة سالبة وعليه يتم اعادة عملية الزرع مرة اخرى [10] . استخدم الـ Haemocytometer chamber لحساب عدد الاطوار المغتذية للطفيلي وفق المعادلة الاتية :

-

$$\text{Total number of amoeba} = x * y * 10^4$$

حيث ان:
X= اعداد الطفيلي في المربعات
Y = معامل التخفيف
10^4= معامل تصحيح الخطأ بالحجم
وكان عدد الاطوار المغتذية التي اضيفت للوسط عند عمل subculture هو
$28 * 10^3$ trophozoite / ml

3- دراسة تأثير المستخلصات المائية للثوم والفلفل الحار على الاطوار المغتذية لطفيلي *Entmoeba histolytica* خارج الجسم الحي :-

أ – المستخلص المائي للثوم :-

تم دراسة تأثير المستخلص المائي للثوم على الاطوار المغتذيةtrophozoites للطفيلي وذلك بأخذ ست مجاميع من القناني ذات الغطاء 6 groups screw – cap botteles والحاوية على الوسط liver infusion agar ، كل مجموعة مكونة من 5 قناني ، تم اضافة جرعات متزايدة من مستخلص الثوم الى خمس مجاميع من القناني وهي (0.01 ، 0.05 ، 0.1، 0.5، 1 مل) على التوالي ، اما المجموعة السادسة مجموعة السيطرة controlبقيت خالية من المستخلص ، تم تحريك القناني لمزج المستخلص مع الوسط الزرعي بشكل جيد ، ثم اضيف0.1 مل من عالق الطفيلي، وضعت القناني في الحاضنة مدة 24 ساعة بدرجة 37 c ، بعد فترة الحضانة اخذ 1 مل من السائل الموجودة في كل قنينة ووضعت في انبوب واضيفت له قطرة من صبغة الايوسين الحمراء لحساب اعداد الطفيلي باستخدام ال Haemocytometer وتحديد الجرع القاتلة والمثبطة للاطوار المغتذية للطفيلي حسب المعادلات التالية:

$$\% \text{ of live trophozoites} = \frac{\text{Number of a live trophozoites} * 100}{\text{Total number of troph .}}$$

$$\% \text{ of dead trophozoites} = \frac{\text{Number of a dead trophozoites} * 100}{\text{Total number of troph}}$$

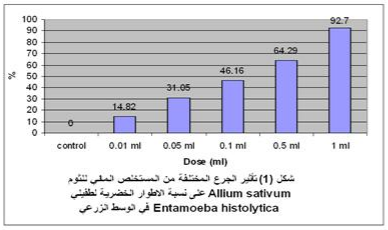
ب- المستخلص المائي للفلفل الحار :

تم دراسة تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار على الاطوار المغتذية للطفيلي واتبعت نفس الخطوات التي اتبعت مع المستخلص المائي للثوم في الفقرة السابقة.

النتائج والمناقشة :

1- المستخلص المائي للثوم :

تم التحري عن تأثير الجرع المختلفة للمستخلص المائي للثوم على الاطوار المغتذية لطفيلي *E. histolytica* بعد فترة حضانة مدتها24 ساعة ، واظهرت النتائج ان ادنى نسبة من الاطوار المغتذية الميتة Dead trophozoit وهي14.82 % كانت عند جرعة 0.01 مل من المستخلص ، في حين ارتفعت تلك النسبة عند الجرع 0.05 و 0.1 مل من المستخلص فكانت 31.05 % و 46.16 % على التوالي لتصل اعلى قيمة لها عند الجرع 0.5 و1 مل من المستخلص اذ بلغت 64.29 % و 92.7 % على التوالي (شكل 1)



شكل (1) تأثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي للثوم Allium sativum على نسبة الاطوار الخضرية لطفيلي Entamoeba histolytica في الوسط الزرعي

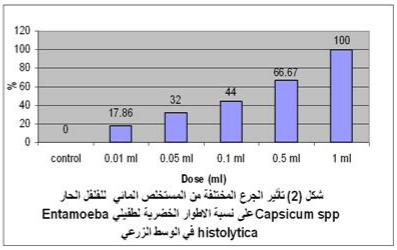
ان التأثيرالمثبط لمستخلص الثوم على الاطوار المغتذية لطفيلي *E. histolytica* ربما يعزى الى محتواه من الـ Allicin ، وهو المركب الفعال في الثوم والمسؤول عن رائحته المميزة ، وهو عبارة عن diallyl disulfide oxide ,إذ يثبط هذا المركب التأثير الامراضي المتعلق بالاصابة ونمو الطفيلي وذلك عن طريق تثبيطه لأنزيم cysteine protease في الطفيلي [17,16,15,14], كما ان محتوى الثوم من الـ thiosulfide له تأثيرمضاد للابتدائيات Antiprotozoal، اذ تتفاعل تلك المادة مع الانزيمات الحاوية على مجموعة (- SH) في تلك الكائنات مما يؤدي الى تثبيطها[19,18]

وربما تعود قابلية المستخلص المائي للثوم على قتل الاطوار المغتذية للطفيلي الى حامضية المستخلص التي تصل الى (pH=5.7) وهذه الحامضية غير ملائمة لنمو الطفيلي الذي يفضل العيش والنمو في pH متعادل (pH = 7.2) .

2- المستخلص المائي للفلفل الحار:

اظهرت نتائج الدراسة ان جرعة 1مل من المستخلص المائي للفلفل الحار كانت فعالة في القضاء على الاطوار المغتذية للطفيلي بنسبة 100% بعد فترة حضانة مدتها 24 ساعة ، في حين كانت للجرعات الاخرى

(1, 0.5,0.1, 0.05, 0.01مل) تأثير مثبط للاطوار المغتذية للطفيلي بنسبة (17.86 % 32% ، 44% 66.67 %) على التوالي (شكل2)



شكل (2) تأثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لتفلفل الحار Capsicum spp على نسبة الاطوار الخضرية لطفيلي Entamoeba histolytica في الوسط الزرعي

من النتائج اعلاه نلاحظ ان هناك تأثير مثبط للمستخلص المائي للفلفل الحار على الاطوار المغتذية لطفيلي *E. histolytica* ، وهذا التأثير يعود لعدة اسباب منها حامضية المستخلص المائي التي تصل الى (pH= 5) والتي تحولpH الوسط الزرعي من متعادل الى حامضي مايؤثر سلبا على نمو الطفيلي الذي يفضلpH متعادل لكي ينمو , وقد يعود التاثير المثبط للمستخلص المائي للفلفل الحار الى المركب الفعال فيه Capsaicin وهو ذو تأثير مضاد لكثير من الكائنات الحية ومنها الابتدائيات Antiprotozoal وذلك بسبب محتواه منterpenoides التي تقضي على طيف واسع من الميكروبات عن طريق ميكانيكية تحطيم الغشاء الخلوي لها cell membrane [20,7] destruption , كما تقوم التربينات terpenes بالتداخل مع مراحل نمو الطور المغتذي و تثبط ايض الكربوهيدرات مايؤدي الى قتل الطفيلي [14]فضلا عن كونها تمنع حدوث القرحةulcer في القناة الهضمية وتقلل من شدة ماموجود منها[22,21,20]

المصادر :

1. Lejeune,M.;Rybicka JM. and chadee, K.2009.Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward E. histolytica . Fut. Microb .PP.: 105-118
2. Moncada ,D.; Keller , K. and Chadee ,K.,2005 . E. histolytica – secreted product degrades colonic mucin oligosaccharides. Infect.Imm., 73:3790-3793.
3. DiMiceli ,L.,2004. Distigushing between pathogenic and non pathogenic species of Entamoeba. Lab . Med. 35:613-616 .
4. . Achers, JP. and Mirelman ,D.,2006.Progress in research on E. histolytica pathgenesis.J.Microb .,vol.9, no.4 , pp:367-373
5. Linford , A.S.;Heriberto , M.;Kafelyn R.G. ; Hanbang , Z.;Singh, V. ; Willian , A. and Petri , JR.,2009. Short hairpin RNA. Mediated knoch down of Protein expression in E. histolytica , J. Microb . PP: 1035-1037
6. Ryan, KJ . and Ray CG.,2004. Amebiasis .Sherris Med – Microb .,4th ed .,McGraw Hill ,N.Y.,pp.: 733-738.
7. Yu sung ; Yu Yuchang and NiLun Ting , 2005. Capsaicin biosyn thesis in water stressed hot pepper fruits . Bot.Bull. Acad. Sin .,(46):35-42.
8. Myers , R.L.1995. Immunology (alaboratory manual) , 2ed ed. , WM.C. Brown Pub. Inc. USA ,Dubuque , PP.: 126-127.
9. Taylor , A.E.R. and Baker , J.R. 1968 .The cultivation of parasites invitro. Black well science Pub . Oxford , PP.: 120-144.
10. Clark ,C.G.and Diamond , L.S. 2002. Methods for cultiration of huminal Parasitic protests of clinical importance .Clin-microb. Rev.,15:329-341.
11. Luna , L.G.1968. Manual of histological staining methods , 3rd ed . McGraw – Hill book company , N.Y. , p:258
12. Brousseau ,P.; Payette , Y.; Tryphonas , H.; Blakley , B.;Boermans , H.;Flipo , D. and Fournier,M.1999.Manual of immunological methods. CRC press LIC, USA,F. , PP.: 135
13. Ramos , F.; Moran, P. ;GonZalea, E. ;Garcia, G. ;Ramiro ,M. ; Gomez, A. ;Garcia ,M.C. ; Melendro, E.I. ;Valadez ,A. and Ximenez ,C.2005. E. histolytica

18. Alvarez , A.H.;Cadena,M.G.; Silva , M.E. ; Savedra, E. and Avila E.E.,2007. E. histolytica : ADP ribosylation of secretedgly ceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase.Exp. Parasit.,117(4): 349-356.

19. Swiderski ,F.;Dabrowski, M.;Rusaczone K,A.; and Waszkiewicz , B.,2007.Bio active substances of garlic and their role in dietoprophylaxis and dieto therapy . Rocz.Panstw.Zaki . Hig .,58(1) :41-60.

20. Malgorzata , M. and Irena , P. ,2005. Antioxdant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit. J.Agr . – food chen .,53(5) : 1750-1756.

21. Marjorie , M.C. , 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin.Microb.12(4): 564-582.

22. John ,G. 2005.Research on the health benefits of herbs and supplements.M. Acad. Microb. ,10:257-265.

and Entaroeba dispar :Prevalence infection in aural Mexican communityEXP.Parasitol.,110:327-330 .

14. Coppi , A.; Cabinian ,M.;Mirelman ,D.; and Sinnis ,P.,2006 Antimicrobial activity of Allicin abiologically active compound from garlic cloves Microb . Agent Chem.,50(5) : 1731-1737

15. Davis,SR. ,2005. An overview of the antifungul properties of Allicin And its break down products. Mycoses , 48:95-100

16. Rudiger,H.and Hafez, M.,2007. Effect of coated plant extracts on Histomonas meleagridis and growth of bacteria invitro . Avian Dis., 51(4) : 880-883.

17. Singh, UP.; Prithiviraj ,B.;Sarma, BK.;Singh,M.; and Ray , AB.,2001.Role of garlic A. sativum in human and plant diseases .Ind. J.exp. Bio., 39(4) : 310-322.

The effect of *Allium sativum* and *Capsicum spp.* Watery extracts on the *Entamoeba histolytica* in vitro.

B. j. Muhamad

* Department of Biology, College of Science - University of Baghdad.

Abstract:

In vitro tests have been carried out to find out the efficacy of watery extracts of garlic *Allium sativum* and hot pepper *Capsicum* spp. against the trophozoites of *Entamoeba histolytica* cultivated in liver infusion agar media at 37 c .

The doses of (0.01, 0.05 ,0.1, 0.5, 1 ml)of garlic and hot pepper watery extracts were added to certain number of *E. histolotica* trophozoits for exposure time of 24 hrs., the mortality percentage of trophozoites treated with garlic extract were (14.82 %, 31.05% ,46.16% , 64.29% , 92.7%) respectively , these percentages were very close to that obtained from the treatment with the hot peper extract which were (17.86%, 32% , 44% ,66.67% ,100%) respectively .

Generally these results showed that the garlic and hot pepper watery extracts both were effective to eliminate *E. histolitica* trophozaites ,particularly the doses of (0.5 and 1 ml).

The differences in studied plant characters were significant in the case of the first concentration compared with the second one.