تأثير المستخلص المائي لنباتي الكجرات وعرق السوس على نمو ونشاط الأميبا الحالّة للنسج(*Entamoeba histolytica*) في الزجاج

The effect of aqueous plant extracts (*Hibiscus sabdariffa* and *Glycyrrhiza glabra*), on the growth of *Entamoeba histolytica in vitro*

زهراء عبد الرحيم أحمد عبد الله ، آمنة نصيف جاسم ، علي حسين أدحية*
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد
*وحدة الأبحاث البايولوجية للمناطق الحارة / كلية العلوم /جامعة بغداد

Zahra'a Abdul-Raheem Ahmed , Amna N. Jasim , Ali H. Ad'hiah
Biology Department / College of Science for Women/ Baghdad University
Tropical- Biological Research Unit. / College of Science/ Baghdad University

المستخلص :
تم تنمية وأدامة نموالاميبا الحالة للنسج في الزجاج باستخدام الوسطين الزرعيين Locke-egg medium (LEM) و Liver infusion agar medium (LIAM) . وبعد ذلك درس تأثير المستخلص المائي لنباتي الكجرات وعرق السوس على نمو ونشاط الأميبا في الوسطين الزرعيين . أظهرت النتائج بأن لكلا المستخلصين تأثيراً واضحاً في اختزال حجم الطفيلي في الوسط الزرعي LEM .اما من ناحية معدل التضاعف فقد أظهر المستخلص المائي للكجرات تأثيراً معنوياً في تثبيط معدل التضاعف لتصل عند التركيز الثالث (19.71 ملغم/مل) الى 57.6 و83.6% للوسطين الزرعيين LEM و LIAM ،على التوالي بينما لم يلحظ اختلافاً معنوياً في معدل التضاعف عند أستخدام المستخلص المائي لعرق السوس لكلا الوسطين الزرعيين .

Abstract
***Entamoeba histolytica* parasite was isolated from a stool sample, cultivated and maintained *in vitro* using Locke-egg medium (LEM) and Liver infusion agar medium (LIAM). The effect of two aqueous plant extracts (*Hibiscus sabdariffa* and *Glycyrrhiza glabra*) on the growth and activity of the parasite in the two culture media was investigated. The aqueous extracts of *H. sabdariffa* and *G. glabra* were effective in reducing the parasite size in the LEM medium. With respect to the reproduction rate, the third concentration (19.71 mg/ml) of *H. sabdariffa* was significantly effective in inhibiting such rate to 57.6 and 83.6% in LEM and LIAM media, respectively, while for *G. glabra*, no significant difference in the reproduction rate was observed in both culture media.**

المقدمة :
النباتات وخاصة النباتات الطبية ازدادت اهمية استخدامها في علاج العديد من الامراض وخاصة في السنوات الأخيرة . لذا بحثت في الدراسة الحالية مدى فعالية المواد الغذائية المتوافرة في النباتات لتجهيز الوسط الزرعي بالغذاء المناسب

من جهة وفعالية النبات كعلاج من جهة أخرى ، لذا تم أستخدام المستخلص المائي للكجرات وعرق السوس لهذا الغرض. أذ يحتل الكجرات (*Hibiscus sabdariffa* L.) موقعاً مهماً في المشروبات الطبية من خلال التأثيرات الحياتية والطبية والمتمثلة في حماية القلب والكبد وخفض كولسترول الدم وكذلك يستخدم كعلاج للخراجات ومضاد للالتهاب كما ويستعمل أيضاً لمعالجة فقر الدم لانهُ غني بالمعادن [1 ، 2 ، 3] . أما بالنسبة لنبات عرق السوس (*Glycyrrhiza glabra* L.) فيستخدم في العديد من الحالات المرضية مثل أمراض المعدة وكل أنواع القرح الهضمية والمغص المعوي ولمعالجة التهابات الكلى والمثانة والتهاب الكبد والصفراء كما ويكثر استخدامه كدواء ضد النزلات الشعبية والسعال وبحة الصوت[4 ، 5] .

المواد وطرائق العمل :

تحضير الأوساط الزرعية

حضرت نوعين من الأوساط الزرعية من نوع Xenic culture media ، وهذه الأوساط ذات بيئة ثنائية الطور (Diphasic media) .

أ- الوسط الزرعي (LEM) Locke- egg medium

حضر الوسط الزرعي والذي يتكون من طورين بحسب طريقة (Boeck and Drobohlav,1925) .

1. **الطور الصلب** : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو محتوى بيض الدجاج و يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مل.
2. **الطور السائل** : محتوى هذا الطور هو محلول لوكس (Locke's solution) و يمثل الطور السائل العلوي إذ أضيف بمقدار 6 مل الى الطور الصلب المائل في انبوبة الزرع [6] .

ب- الوسط الزرعي (LIAM) Liver infusion agar medium

حضر الوسط بحسب طريقة (Cleveland and Collier,1930) ويتكون ايضاً من طورين **:**

1. **الطور الصلب** : أن المكون الأساسي لهذا الطور هو نقيع كبد البقر(Beef liver infusion) و يمثل السطح الصلب المائل بمقدار 5 مل .
2. **الطور السائل:** يتألف هذا الطور من دارئ المحلول الفسيولوجي والمصل المعقم لدم الخروف بعد تثبيط المتمم ، إذ مزجا بنسبة 1:5 . تم أضافةهذا المزيج (4 مل) والذي يمثل الطور السائل الى الطور الصلب [7].

المضادات الحيوية Antibiotics

أضيف كل من Streptomycin Sulphate بمقدار2 ملغم/مل وProcaine Benzylpenicillin بمقدار1000 وحدة دولية/مل و Nystatin بمقدار 2 ملغم/مل الى الطور السائل للوسط الزرعي للسيطرة على نمو البكتريا ولمنع نمو الفطريات لكي تساعد على تجهيز السلالة الأميبية في الزرع[6 ، 7] .

جمع وعزل الطفيلي من عينة البراز

تم جمع وعزل الاميبا الحالة للنسج من عينات براز لأشخاص مخمجين وتم التأكد من الخمج بطفيلي الأميبا الحالّة للنسج من خلال الفحص المجهري للبراز ، وبعد عزل الطفيلي من البراز أضيف الى أنابيب الوسط الزرعي ثم حضنت أنابيب الأوساط الزرعية بوضع عمودي في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة [6 ، 7] .

تحضير المستخلصات النباتية

- **الكجرات (*Hibiscus sabdariffa*):** حضر المستخلص المائي بنقع 50غم من مسحوق الكجرات الجاف في250 مل من الماء المقطر المعقم ووضع في الحمام المائي بدرجة الغليان ولمدة 30 دقيقة ثم رشح المحلول بشاش معقم وبعدها رشح بورق الترشيح ، ولضمان الحصول على محلول رائق جداً وضع المحلول في النابذة (3000 دورة/دقيقة) ولمدة 15دقيقة . جمع الرائق في أنابيب معقمة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4م [2ْ ، 8] . تم تجفيف 10مل من المستخلص المائي للنبات وقدرت الكمية التي يحتويها هذا المستخلص حيث كانت 138ملغم/مل . أضيف 0.1 و 0.5 و 1مل من محلول المستخلص الى كل أنبوبة وسط زرعي وكان ذلك مساوياً الى 2.26 و 10.61 و 19.71 ملغم/مل من الطور السائل للوسط الزرعي وعلى التوالي .
- **عرق السوس(*Glycyrrhiza glabra*)** : حضر هذا المستخلص بنفس طريقة تحضير مستخلص الكجرات ، وقدرت الكمية التي يحتويها هذا المستخلص وكانت 18ملغم/مل . أضيف 0.1 و 0.5 و 1مل من محلول المستخلص

الى كل أنبوبة وسط زرعي وكان ذلك مساوياً الى 0.29 و 1.38 و 2.57 ملغم/مل من الطور السائل للوسط الزرعي وعلى التوالي .

قياس فعالية المعاملة

تم قياس فعالية المعاملة بأستخدام المعادلة الآتية وحسب ماجاء في [9]:

$$\text{فعالية المعاملة (\%)} = \left[\frac{\text{المعاملة (طور متغذي /مل)}}{\text{السيطرة (طور متغذي /مل)}} \times 100 \right] - 100$$

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج باستخدام اختبار أقل فرق معنوي Least significant Difference (LSD) وكذلك اختبار دنكن المتعدد المدى Duncan Multiple Range Test بأستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز(SPSS) .

النتائج :

المستخلص المائي للكجرات : تم فحص الأس الهيدروجيني (pH) للمستخلص المائي للكجرات بواسطة ورق مؤشر الأس الهيدروجيني إذ كانت قيمته pH=3 ، ثم أضيفت ثلاث أحجام (0.1،0.5،1مل) من المستخلص الى 6 مل للوسط الزرعي ، حيث وكانت هذه مساوية الى التراكيز 2.26،10.61،19.71 ملغم/مل ، على التوالي . ثم أضيف العالق الأميبي (0.08×10^6 طور متغذي مل) وحضنت لمدة 48 ساعة ولوحظ بأنه كلما زاد التركيز أثر سلباً على معدل التضاعف للأميبا ، أذ أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين التركيز الثاني للكجرات مقارنة بالسيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.001 وبين التركيز الثالث مع السيطرة عند مستوى احتمالية ≤0.01 في الوسط الزرعي LEM . أما في الوسط LIAM فقد لوحظ فرق معنوي عند مستوى احتمالية ≤0.05 بين التركيز الثالث والسيطرة . أما فعالية المعاملة فكانت تثبيطيه أذ بلغت نسبة التثبيط 63.5 و57.6% عند التركيز الثاني والثالث على التوالي في الوسط الزرعي LEM ، أما في الوسط الزرعي LIAM فبلغت نسبة التثبيط 45.5 و59.5 و 83.6% للتراكيز الثلاثة على التوالي ، وذلك دلالة على تثبيط النمو بشكل عالي جدول (1) . كما شوهد في الوسط (LEM) حدوث صغر في حجم الأميبا بشكل كبير عن الحالة الطبيعية أذ بلغ قطرها 8-10 مايكرون ، وعند نقل المستنبت الى وسط زرعي خالٍ من المستخلص لم يزال التأثير إذ لوحظ استمرار صغر حجم الأميبا حتى بعد زوال المؤثر وحتى بعد عدة نقلات زرعية مع استمرارية الانقسام والتضاعف شكل(1) ، وعلى العكس من ذلك في الوسط LIAM فقد امتازت الأميبا بكبر حجمها المعتاد ، ولم تلاحظ أي حالة تكيس في هذه المعاملة .

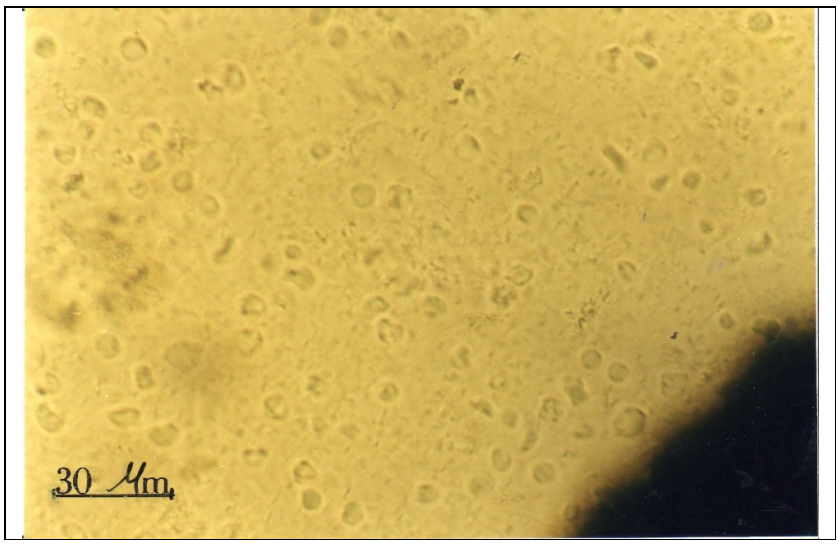
المستخلص المائي لعرق السوس : بعد فحص الأس الهيدروجيني للمستخلص المائي لعرق السوس بواسطة ورق مؤشر الأس الهيدروجيني (pH) . إذ كانت قيمته pH=8 . أضيف ثلاث أحجام (0.1،0.5،1 مل) من المستخلص الى 6 مل للوسط الزرعي حيث كانت هذه مساوية الى التراكيز(0.29 ، 1.38،2.57) ملغم/مل ، على التوالي . وبعد 48 ساعة حضانة مع العالق الأميبي البالغ 0.08×10^6 لوحظ بأنه كلما زاد التركيز في الوسط الزرعي LEM ارتفع معدل التضاعف للأميبا وعلى العكس بالنسبة للوسط LIAM أذ لوحظ انخفاض في معدل التضاعف للأميبا كلما زاد التركيز وعلى الرغم من ذلك لم تلاحظ أي فروق معنوية بين التراكيز الثلاثة والسيطرة و لكلا الوسطين الزرعيين. كما لوحظ زيادة معدل التضاعف في التركيز الثالث لعرق السوس في الوسط LEM إذ بلغت فعالية المعاملة +4.1% في حين لوحظ انخفاض فعالية المعاملة لباقي التراكيز وبدرجات متفاوتة وفي كلا الوسطين الزرعيين جدول (1) .
كما لوحظ في الوسط LEM المعامل بمستخلص عرق السوس صغر في حجم الأميبا عن الحجم الأصلي أذ بلغ قطرها 8-10 مايكرون واستمرار صغرالحجم حتى بعد زوال المؤثر شكل (2) ، وعلى العكس من ذلك في الوسط LIAM فقد امتازت الأميبا بكبر حجمها المعتاد .

جدول (1) تأثير المستخلصات النباتية على نمو طفيلي الأميبا الحالة للنسّج والنامية في الوسطين الزرعيين Locke-Egg Medium(LEM) و Liver Infusion Agar Medium(LIAM) .

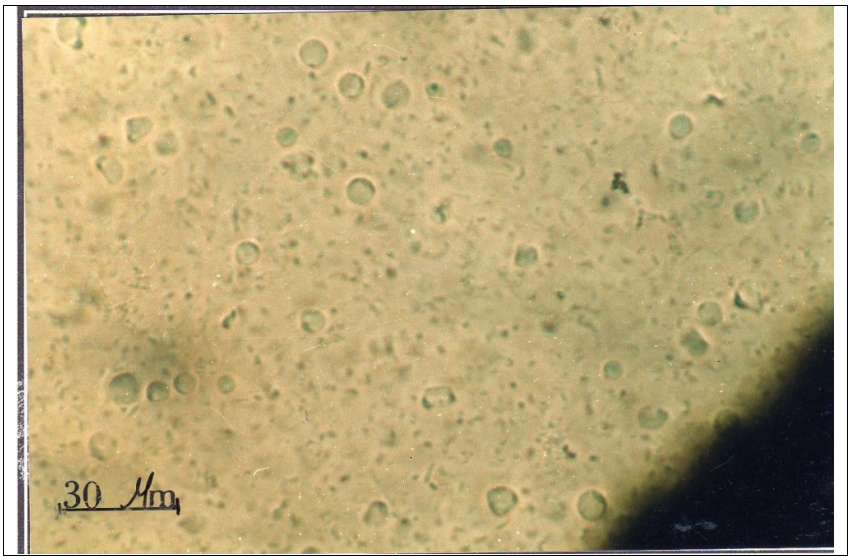
المجاميع		تركيز المستخلص ملغم/مل/وسط زرعي	** معدل أعداد الطفيلي النامية ± الخطأ القياسي × 10^6/مل		فعالية المعاملة (%) في وسطي		* الاحتمالية ≤
			LEM	LIAM	LEM	LIAM	
السيطرة		0.00	أ 0.084±0.905	أ 0.085±0.386			0.00
المستخلصين النباتيين	الكجرات	2.26	أ 0.083±1.04	أ 0.02±0.210	14.9+	45.5-	0.001
		10.61	ب 0.011±0.33	أ 0.047±0.156	63.5-	59.5-	0.05
		19.71	ب 0.018±0.383	ب 0.008±0.063	57.6-	83.6-	0.001
	عرق السوس	0.29	أ ب 0.089±0.620	أ ب 0.005±0.290	31.4-	24.8-	0.05
		1.38	ب 0.134±0.736	أ ب 0.027±0.256	18.6-	33.6-	0.05
		2.57	أ 0.152±0.943	أ ب 0.023±0.183	4.1+	52.5-	0.01

* الاحتمالية : المقارنة بين الوسطين الزرعيين LEM وLIAM .

** الاحرف المختلفة : فرق معنوي (الاحتمالية ≤ 0.05) مابين معدلات العمود الواحد.



شكل (1): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM المعامل بمستخلص نبات الكجرات توضح صغر حجم الأميبا عن الحالة الطبيعية



شكل (2): الأميبا الحالّة للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM المعامل بمستخلص نبات عرق السوس، توضح صغر حجم الأميبا عن الحالة الطبيعية

المناقشة :

تم تجهيز الوسطين الزرعيين بالمواد الغذائية الضرورية للنمو والتي تشمل البروتينات والدهون والكاربوهيدرات إلا أن وسط LIAM يتميز بوجود مصل الخروف في الطور السائل بينما وسط LEM فلا يحوي على المصل ولهذا دور كبير في اختلاف الوسطين الزرعيين فقد أظهر التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية بين الوسطين الزرعيين في معدل التضاعف ، كما لوحظ وجود اختلاف في حجم الاميبا بين الوسطين الزرعيين إذ امتاز وسط LIAM بكبر حجم الأميبا مقارنة بوسط LEM والتي كانت احجامها طبيعية على الرغم من أن السلالة المجهزة لكلا الوسطين الزرعيين كانت واحدة . وبالإضافة الى المواد الغذائية السابقة الذكر فأن الأطوار المتغذية تحتاج الى مصادر خارجية للغذاء مثل الدهون والبروتينات والمعادن كالحديد والكالسيوم وهناك الكثير من البحوث تؤكد بأن مستخلصي الكجرات وعرق السوس يحويان كميات من بعض المواد الغذائية المطلوبة ، إذ يمتاز عرق السوس بأحتواءه على نسبة عالية من البروتين عند استخلاصه [10] ، ويمتاز مستخلص الكجرات بأحتواءه على المعادن الضرورية للنمو كالحديد [8] . إلا أن النتائج أظهرت تراجع النمو الأميبي في الوسطين الزرعيين المعاملين بمستخلص الكجرات ووصل الى حد تثبيط النمو وقد يكون التفسير هو حامضية مستخلص الكجرات إذ يتراوح الأس الهيدروجيني بين 3.2-6.7 للمستخلص المائي للكجرات بحسب ما أكد [8] . في الدراسة الحالية عند فحص الأس الهيدروجيني لمستخلص الكجرات كانت قيمتهُ 3 ، وبما أن الأميبا الحالّة للنسج تنمو في وسط متعادل أو قليل القاعدية فأن تغير الوسط الهيدروجيني يؤثر على النمو بشكل كبير وهذا ما لوحظ خاصة عند زيادة التركيز وبالتالي تغلب الحامضية على الوسط مما قد يؤدي الى تثبيط النمو الأميبي ، أضافه الى ذلك فقد أكد [4] أن شراب الكجرات يوصف بكونه مطهر أو معقم للأمعاء إذ يستعمل ضد النمو البكتيري الضار وخاصة الذي يتواجد في الأمعاء وذلك لارتفاع حموضة الشراب مما يسبب موتها وتلفها داخل المعدة والأمعاء مع تجديد البكتريا الطبيعية المهمة داخلياً.

أما بالنسبة لمستخلص عرق السوس فأن الأس الهيدروجيني يتراوح مابين 6.6 الى 9.9 وبمتوسط 8.6 حسب ما أكده [11] ، أما في الدراسة الحالية فكانت قيمة الأس الهيدروجيني لنبات عرق السوس 8 مما قد يلائم النمو الأميبي إذ لوحظ نمو جيد في الوسط LEM وتراجع بسيط في الوسط LIAM كذلك ذكر [11] بأن شراب عرق السوس يسمح بنمو البكتريا الهوائية والخمائر ، ومن الأسباب الأخرى والتي تلعب دوراً في تأثير مستخلص عرق السوس هو وجود السكريات في المستخلص ويتم استخدام السكر من قبل البكتريا النامية في الوسط الزرعي مما يؤدي الى سرعة

الأيض إضافة الى فقدان التوازن الأميبي ـ البكتيري الضروري للكيان الزرعي [6] وينطبق هذا التفسير أيضاً على مستخلص الكجرات مما يؤدي الى التباين في الوسطين الزرعيين بزيادة التركيز .

المصادر :

1. Frank, T.; Jan Ben, M.; Netzal, M.; Strab, G.; Kler, A.; Kriesl, E. and Bitsch, I. (2005). Pharmacokinetics of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. extract. *J. Clin. Pharmacol.*, 45:203-210.
2. Amin, A. and Hamza, A.A. (2005). Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, Rosmarinus and Salvia on azathioprine- induced toxicity in rats. *Life Sci*., 77:266-278.
3. Akindahunis, A.A. and Olaleye, M. T. (2003). Toxicological investigation of aqueous-mathanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. . *J. Ethnopharmacol*., 89:161-164.

4. أبو زيد ،الشحات نصر (1986). النباتات والأعشاب الطبية. الطبعة الأولى. دار البحار. بيروت: 235-448.

5. Fukai, T.; Satoh, K. ; Nomura, T. and Sakagami, H. (2003). Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia*, 74:624-629.
6. Clark, C.G. and Diamond, L.S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*., 15:329-341.
7. Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. (1968). The cultivation of parasites *in vitro* . Black Well Science Publ., Oxford .pp.120-144.
8. Falade, O.S.; Otemuyiwa, I. O.; Oladipo, A.; Oyedapo, O.O.; Akinpleu, B.A. and Adewusi, S.R.A. (2005). The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia . *J. Ethnopharmacol*., 102:15-22.
9. Lwin, K.M. and Oo, M.(2004). *In vitro* anteamoebicidial activity of "Dysenzi" on *Entamoeba histolytica* in cultures. *FAME Pharmaceuticals Co., Ltd*. Internet:http://Famepharma.com.
10. DiMambro, V.M. and Fonseca, M.J.V. (2005). Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extract. *J. pharm. Biomed. Anal.*, 37:287-295.
11. Nassereddin, R.A. and Yamani, M.I. (2005). Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. *J. Food prot*., 68: 773-777. [Abstract].