

دراسة نسيجية لتأثير المستخلص المائي للثوم *Allium sativum* على طفيلي الزحار
الامبيي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض
A Histological study on the Effect of *Allium sativum* wattery extract
on the *Entamoeba histolytica* in Albino mice

بان جاسم محمد

سهيلة حياوي محمود

كلية العلوم / جامعة بغداد

Ban Jasim Mohamad

Suhaila H. Mahmoud

College of Science/ Baghdad University

المستخلص

اجريت هذه الاختبارات داخل الجسم الحي *in vivo* باستخدام (24) فأر من الفئران البيض بوزن (25-20) غم للكشف عن تأثير المستخلص المائي للثوم (*Allium sativum*) على الاطوار المغذية trophozoites والمتكيسة cysts لطفيلي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض ، تم تجريع الفئران المصابة بالطفيلي بالمستخلص المذكور بجرع (0.03, 0.01) مل بمعدل ثلاث جرعات يوميا مدة اسبوع ، وخلال تلك المدة فحص غائط الفئران كل 36 ساعة لمراقبة التغير في اعداد الطفيلي بعد التجريع بالمستخلص . وظهرت النتائج ان المستخلص المائي للثوم كان فعالا في خفض اعداد الاطوار المغذية والمتكيسة في الفئران المصابة بالطفيلي ، اذ سجلت اعلى نسبة قتل للاطوار المغذية والمتكيسة عند جرعة 0.03 مل من المستخلص فكانت (97.78 ، 89.59) % على التوالي .

Abstract

Twenty four Albino mice with (20-25)gm weight were used to determine the effect of Garlic(*Allium sativum*) on the cysts and trophozoites stages of *Entamoeba histolytica in vivo*. The previously infected mice with *E. histolytica* were demonstrated with two doses (0.01, 0.03) ml of garlic wattery extract three times daily for a period of 7 days. The results showed that the garlic wattery extract was very effective to eliminate the numbers of cysts and trophozoites of *E. histolytica* in mice, the highest percentage of killing was recorded with dose of 0.03 ml which were 97.78 % for trophozoites and 89.59 % for cysts.

المقدمة

طفيلي *Entamoeba histolytica* ابتدائي معوي يصيب الانسان ويسبب له مرض الزحار الامبيي Amoebic dysentery والذي يعد احد مشاكل الصحة العامة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية [3,2,1] اذ يحتل المرتبة الثالثة من بين اخطر ثلاث امراض طفيلية قاتلة بعد داء الملاريا والبلهارسيا [4] اذ يصيب ما يقارب 50 مليون شخص ويتسبب في 100,000 حالة وفاة سنويا على مستوى العالم [3، 5] يمر الطفيلي خلال دورة حياته بطورين اساسيين هما الطور المغذي Trophozoite والطور المتكيس Cyst ، والاخير يمثل الطور المعدي infective stage ، اذ تتم الاصابة بالطفيلي عن طريق تناول الطعام والشراب الملوث بذلك الطور [6] . يعد الطور المغذي هو الطور الضار، يعيش في تجويف الامعاء الغليظة للمضيف ويتغذى على الغشاء المخاطي للامعاء وكريات الدم الحمراء ويقوم بافراز انزيمات تحلل الغشاء المخاطي وتتعمق داخل جدار الامعاء فتتلف خلاياه مسببة قروحا مؤلمة وبذلك يحدث مرض الزحار الامبيي [5، 7] .

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 تعيق نمو الطفيلي وكذلك تساعد في القضاء على القرع المعوية وشفائها [11,10,9,8] فضلا عن كونها اقل ضررا واقل سمية من العقاقير الكيماوية . وقد اجريت في العراق العديد من الدراسات حول هذا الموضوع ومنها تلك التي بحثت في تأثير بعض المستخلصات النباتية على طفيلي الزحار الامبيي [12] ، ونظرا لقلّة الدراسات في العراق حول مدى تأثير الثوم على طفيلي الزحار الامبيي قمنا بأجراء

هذه الدراسة للكشف عن تأثير المستخلص المائي للثوم *Garlic Allium sativum* على الطفيلي داخل الجسم الحي *in vivo*.

المواد وطرائق العمل

لغرض اجراء الاختبارات اللازمة للتعرف على مدى تأثير المستخلص المائي للثوم على طفيلي الزحار الاميبي تم اولا تحضير العالق الاميبي لتخميج حيوانات التجربة بطريقة Stanley [13] بعد الحصول على عينات غائط لمرضى ثبتت اصابتهم بطفيلي الزحار الاميبي *E. histolytica* من مستشفى بغداد التعليمي/مدينة الطب ، كما تم تحضير المستخلص المائي للثوم وذلك بأضافة 500 مل ماء مقطر الى 100غم من الثوم المقشر ثم وضع في الخلاط عدة دقائق بعدها حرك المزيج الناتج باستمرار لمدة 48 ساعة في الهزاز shaker ثم رشح المزيج عبر طبقات من الشاش المعقم ونقل الى قنينة معقمة ، اغلق بأحكام وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال . اما حيوانات التجربة فقد تم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية /ساحة الاندلس وهي 24 من الفئران البيض Albino mice تتراوح اوزانها من (20-25) غم من الذكور والاناث وبعد التأكد من سلامتها من الاصابة بالطفيليات المعوية وذلك من خلال فحص البراز مجهريا ، تم تقسيمها الى اربع مجاميع كل مجموعة تحوي 6 أفراد من كلا الجنسين ، خمجت الثلاث مجاميع الاولى بطفيلي الزحار الاميبي بتجريع افرادها بـ 0.2 مل من العالق الاميبي المحضر سابقا على مدى اسبوعين بمعدل جرعتين اسبوعيا ، فحص غائط الفئران المخمجة بشكل دوري وبعد التأكد من اصابتها بالطفيلي من خلال مشاهدة الاطوار المغتذية والمتكيسة في الغائط وضعت في اقفاص نظيفة ومعزولة ، جرعت المجموعة الاولى من الفئران المخمجة بـ 0.01 مل والمجموعة الثانية بـ 0.03 مل من المستخلص المائي للثوم والمحضر سابقا لثلاث مرات يوميا وعلى مدى اسبوع ، المجموعة المخمجة الثالثة تركت بدون علاج كمجموعة سيطرة موجبة (+ve) (control) ، اما المجموعة الرابعة فجرعت بمحلول الملح الفسيولوجي فقط واعتبرت سيطرة غير مخمجة (-ve control) ، بعد انتهاء مدة العلاج تم فحص غائط حيوانات التجربة وحسبت اعداد الاطوار المغتذية والمتكيسة في كل عينة حسب المعادلات الاتية :

$$\text{Number of a live troph.} \times 100$$

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

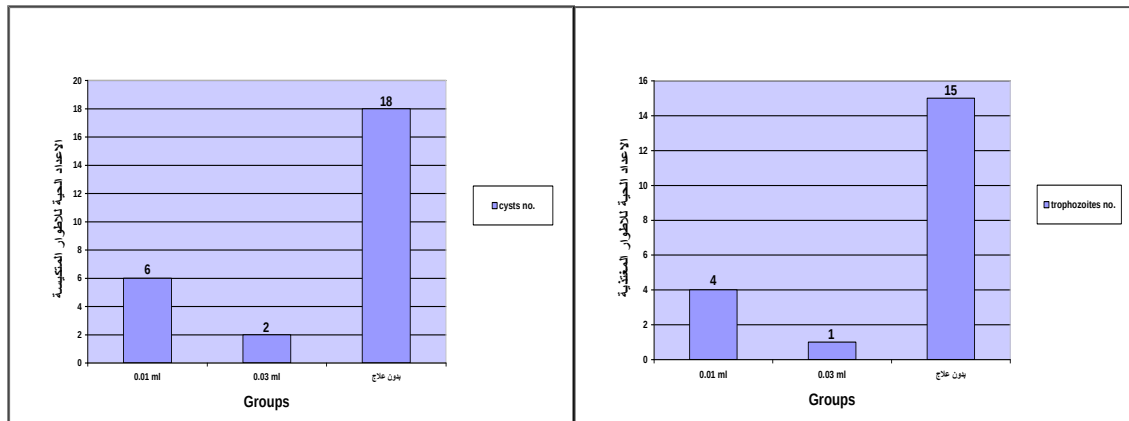
$$\text{Number of a live cysts} \times 100$$

$$\% \text{ of live cysts} = \frac{\text{Total number of cysts}}{\text{Number of a live cysts} \times 100}$$

ان الفحص المختبري لجميع عينات البراز التي فحصت خلال هذا البحث تمت بطريقة المسحة الرطبة المباشرة Direct wet film [14] ، وجدير بالذكر انه عند حساب عدد الاطوار المغتذية تم اضافة قطرة من صبغة الايوسين الحمراء لمسحة الغائط لتمييز الحي عن الميت منها ، في حين اضيفت قطرة من صبغة اليود اللوكالي لتمييز الاطوار المتكيسة الحية من الميتة ، حضرت الصبغات حسب طريقة Luna [15] . اما المقاطع النسيجية فقد تم اعدادها وتحضيرها في وحدة النسيج المرضي / المختبرات التعليمية /مدينة الطب وبإشراف الاستاذ الدكتور سالم رشيد حمودي .

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الفحص المجهرى لبراز الفئران المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي والمعالجة بالمستخلص المائي للثوم بجرعتي (0.01، 0.03) مل انخفاض مستويات الخمج بنسبة (92.99%) للاطوار المغتذية و66.67% للاطوار المتكيسة) و(97.78% للمغتذية و89.59% للمتكيسة) على التوالي ، اذ انخفضت اعداد الاطوار المتكيسة من (18) الى (6) والاطوار المغتذية من (15) الى (4) عند جرعة 0.01 مل بينما كانت معدلات الانخفاض عند الجرعة 0.03 مل للاطوار المتكيسة من (16) الى (2) وللاطوار المغتذية من (15) الى (1) . شكل (2،1)



شكل (2): تأثير الجرعة المختلفة للمستخلص المائي للثوم *Allium Satvum* على اعداد الاطوار المتكيسة لطفلي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض

شكل (1): تأثير الجرعة المختلفة للمستخلص المائي للثوم *Allium Satvum* على اعداد الاطوار المتغذية لطفلي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض

ان الفعالية العالية لمستخلص الثوم ضد طفيلي الزحار الاميبي تعزى لعدة اسباب منها احتواء الثوم على مركب Allicin وهو عبارة عن (diallyl disulfide oxide) ، اذ ان هذا المركب يمتلك قدرة تثبيطية لانزيم cycteine proteinase [16,9,8] وبما ان هذا الانزيم الذي يفرزه طفيلي الزحار الاميبي يعد اهم عوامل الفوعة virulence factors في هذا الطفيلي وهو الذي يقوم بتحليل الخلايا المستهدفة للعائل ، لذلك فان تثبيط هذا الانزيم يمكن من السيطرة على الاصابة بهذا الطفيلي [15، 16] . العامل الاخر المؤثر في فعالية الثوم هو احتواءه على مركب Thaiosulfide المضاد للابتدائيات والذي يتحد مع الانزيمات الحاوية على مجموعة (-SH) في الطفيلي ما يؤدي الى تثبيط هذه الانزيمات وبالتالي يحد من نشاط ونمو الطفيلي [21,20,19,18] ، ومن العوامل الاخرى التي لا بد من التطرق اليها هي حامضية المستخلص المائي للثوم pH=5.7 والتي لا تلائم نمو الطفيلي الذي يفضل العيش في محيط متعادل ذو (pH=7.2) . ان نتائج هذا البحث تعزز ماتم التوصل اليه في بحث سابق أجري خارج الجسم الحي *in vitro* عن فعالية المستخلص المائي للثوم في القضاء على طفيلي الزحار الاميبي في الوسط الزرعي [22] .

نتائج الدراسة النسيجية

اولا : التغيرات النسيجية للحيوانات المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي :

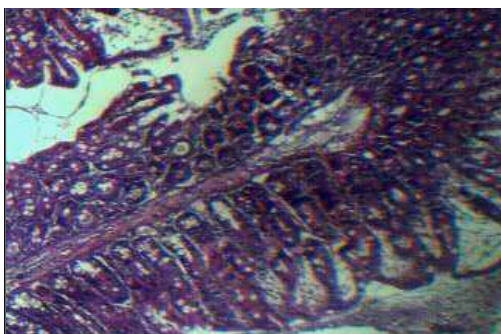
درست التأثيرات المرضية التي أحدثها الطفيلي في مناطق الامعاء الدقيقة والغليظة والكبد للفئران المخمجة ، اذ اظهر الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من الكبد حدوث تنكس مع تنخر في الخلايا الكبدية نتيجة الاصابة ، وارتشاح خلايا التهابية بؤرية منتشرة بين خلايا الكبد ، اما مقاطع الامعاء الدقيقة فقد اظهرت حدوث قصر في الزغابات المعوية في مناطق مختلفة من الامعاء مع وجود تنسج في الخلايا المبطنة للزغابات ، هذا واطهرت المقاطع النسيجية المأخوذة من القولون والمستقيم حدوث تنسج للخلايا النسيجية في تجويف الامعاء مع حدوث تنخر في سطح الطبقة المخاطية وارتشاح خلايا التهابية شكل (3، 4، 5، 6، 7، 8) .



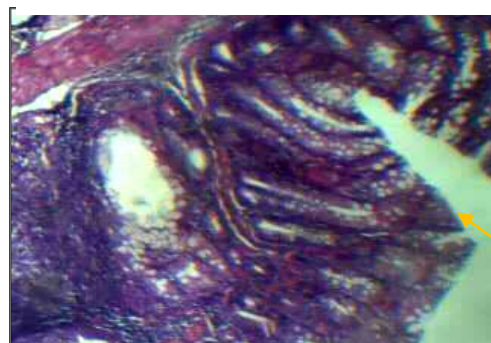
شكل (4): مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لفأر طبيعي (x100)



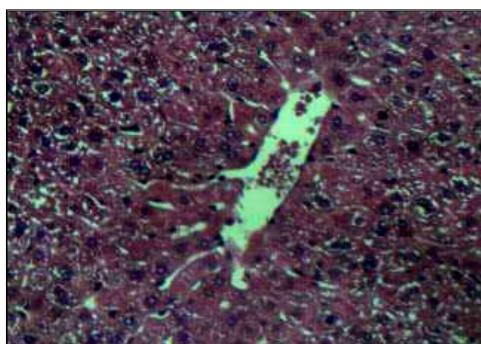
شكل (3): مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لفأر مخمخ قبل العلاج يوضح قصر الزغابات المعوية (x100)



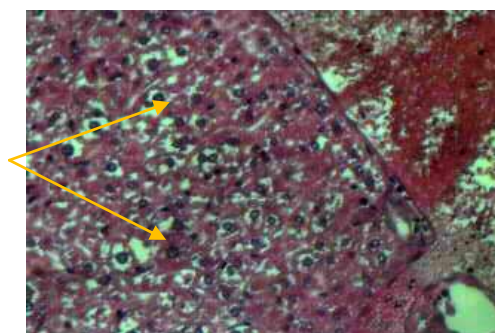
شكل (6): مقطع في نسيج امعاء غليظة لفأر طبيعي (x100)



شكل (5): مقطع في نسيج الامعاء الغليظة لفأر مخمخ قبل العلاج يظهر حدوث تنسج وتنخر في سطح الطبقة المخاطية للامعاء (x100)



شكل (8): مقطع في نسيج كبد لفأر طبيعي (x200)



شكل (7): مقطع في نسيج كبد لفأر مخمخ قبل العلاج يوضح وجود تنكس مع تنخر في الخلايا الكبدية

ثانيا : التغيرات النسيجية للحيوانات المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي والمعاملة بالمستخلص المائي للثوم
1. الامعاء الدقيقة

اظهر الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من منطقة الامعاء الدقيقة للفئران المخمجة والمعاملة بجرعة 0.01 مل من المستخلص المائي للثوم رجوع الشكل الطبيعي للزغابات المعوية ولوحظ الشيء نفسه عند المعاملة بالجرعة الاخرى (0.03) مل من المستخلص شكل (9، 10) .



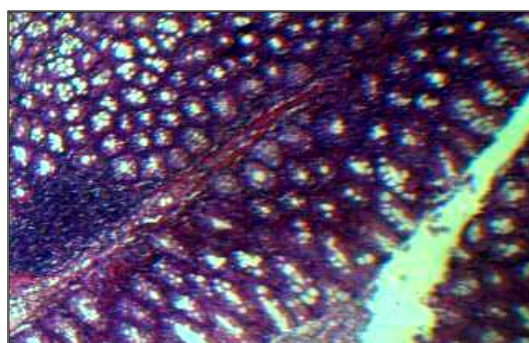
شكل (10): مقطع في نسيج امعاء دقيقة مصابة ومعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للثوم (x100)



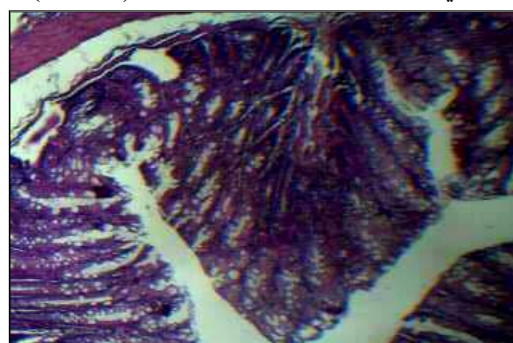
شكل (9): مقطع في نسيج امعاء دقيقة مصابة ومعاملة بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للثوم (x100)

2. الامعاء الغليظة

اظهر الفحص المجهرى للمقاطع المأخوذة من الا معاء الغليظة للفئران المخمجة والمعاملة بجرعة 0.01 مل من المستخلص المائي للثوم وجود تنسج في الطبقة المخاطية mucosa للامعاء مع تكوّن lymphatic follicles في اماكن مختلفة من الامعاء الغليظة، اما عند المعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص فقد لوحظ وجود تنسج بسيط في الطبقة المخاطية للقولون شكل (11، 12) .



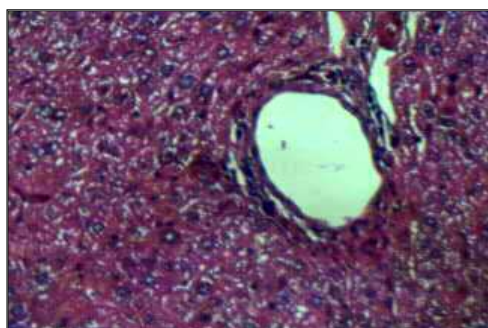
شكل (12): مقطع في نسيج امعاء غليظة مصابة ومعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للثوم (x100)



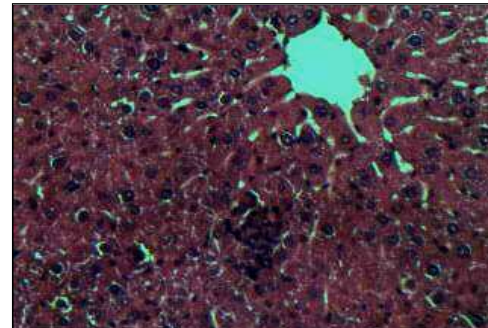
شكل (11): مقطع في نسيج امعاء غليظة مصابة ومعاملة بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للثوم (x200)

3. الكبد

اظهرت المقاطع النسيجية المأخوذة من كبد الفئران المخمجة بالطيفلي والمعاملة بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للثوم وجود تنكس بسيط وارتشاح لخلايا التهابية بين خلايا الكبد ، اما عند المعاملة بجرعة 0.03 مل من المستخلص فقد اظهر الفحص المجهرى عودة الشكل الطبيعي للكبد تقريبا مع وجود ارتشاح لخلايا التهابية بؤرية قليلة العدد بين خلايا الكبد شكل (13، 14) .



شكل (14): مقطع في نسيج كبد مصاب ومعامل بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للثوم (x200)



شكل (13): مقطع في نسيج كبد مصاب ومعامل بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للثوم (x200)

المصادر

1. Lejeune, M.; Rybicka JM. And chadee, K. 2009. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Int. Microb.* PP: 105-118
2. D: Miceli, L.,2004. Distigushing between pathogenic and non pathogenic species of *Entamoeba*. *Lab. Med.* 35:613-616.
3. Moncada, D.; Keller, K. and chadee, K. 2005 . *Entamoeba histolytica* – secreted product degrades colonic mucin oligo saccharides. *Infect.Imm.* 73:3790-3793.
4. Nongyao, A. ; Kitja, B. ; and Pathana, p.B. 2004 .Effects of Piper longum Fruits on cecal amoebiasis in mice. *J. Ethnopharmacology*, vol(91) pp:357-360.
5. Achters, JP.and Mirelman, D. 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *J. Microb.* vol.9, no.4. pp: 367-373.
6. Linford , A.S.; Heriberto, M.; Kafelyn R.G. ; Hanbang , Z.; Singh, V. ; Willian , A. and Petri , JR. 2009. Short hairpin RNA. Mediated knock down of Protein expression in *Entamoeba histolytica*. *Jour. Microb.* PP: 1035-1037.
7. Ryan, KJ. and Ray CG. 2004. Amebiasis. *Sherris Med – Microb.* 4th ed. McGraw Hill. pp: 733- 738.
8. Yu sung; Yu Yuchang and NiLun Ting. 2005. Capsaicin biosynthesis in water stressed hot pepper fruits. *Bot.Bull. Acad. Sin.*,(46):35-42.
9. 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.
10. Singh, UP.; Prithiviraj, B.;Sarma, BK.;Singh, M.; and Ray , AB. 2001.Role of garlic *Allium sativum* in human and plant diseases. *Ind. J.exp. Bio.* 39(4) : 310-322.
11. Swiderski ,F.; Dabrowski, M.; Rusaczona 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.
12. الطائي ، لمى قاسم علي ، 2007 . دراسة تأثير عقار الميترونيدازول والمستخلصات الزيتية لنبات الدارسين والزنجبيل على امراضية طفيلي الزحار الاميبي في انسجة الفئران . رسالة ماجستير / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية ، ص 81
13. Stanley, S. L.Jr ; T. Zhang and K. B. Seyded.1999. Animal models of *Entamoeba histolytica* infection. *Handbook of animal models infection.* 102:859-65.
14. Tanyuksel, M.; H.Yilmaz ; M.Ulukanligil ; E. Apraz., M. Cicek; O. Koru; Z. Tas and W. A. Petri. 2005. comparison of two methods (microscopy and enzyme linked immune sorbent assay) for the diagnosis of amoebiasis. *Exp.Parasitology.* 110:322-26.
15. Luna, L.G.1968. Manual of histological staining methods, 3 rd ed . McGraw – Hill book company. N.Y.,p :258.
16. Que, x.; kim , S. H. ;Sajid, M.; Eetmann , W.; Dinarello , C.A. ; J.H and Reed , S.L. 2003.Asurface amebic cysteine proteinase in activates interleukin → 18 . *Am.soc. Microb.*, 71 : 1274 -80.
17. Alvarez, A. H.; Cadena,M. G.; Silva , M.E. ; Savedra, E. and Avila E.E. 2007. *Entamoeba histolytica* : ADP ribosylation of secretedgly ceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. *EXP. Parasit.*,117(4): 349-356.

18. Behnial, M. ;Haghighiz, A. ;Komeili Zadeh, H. ;Seyyed, SJ.;and Abadi, A. 2008. *In vitro* antiamoebic activity of Iranian *Allium sativum* in comparison with metronidazole against *Entamoeba histolytica*.Iranian parasitol. J., vol (3)4, pp:32-38.
19. Adhvaryu MR. ; Reddy N. ; and Parabia MH. 2007. Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid -Rifampicin - and Pyrazinamide - induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. World J Gastroenterol., 13 (23) : 3199-3205.
20. Ayaz, E. ; Turel, I. ; Gul, A.; and Yilmaz , O., 2008. Evaluation of the Anthelmint activity of Garlic in mice naturally infected with *Aspiculuris tetraptera*. R.Anti . drug Dis., vol.3, no.2 PP:149 – 152.
21. Krishna, K.; Jigar, B.; and Jagrati, P. 2009. *Allium sativum*: Biological and medicinal properties:a review. Int.J.of alter. Med. vol.6 no. 2, p:15
22. بان جاسم محمد ، 2010 . تأثير المستخلصات المائية للثوم والفلفل الحار على طفيلي الزحار الاميبي خارج الجسم الحي . مجلة بغداد للعلوم ، المجلد (7) ، العدد (1) ، ص : 146 - 142 .