تأثير المستخلصات المائية الباردة والكحول الايثانولي لنبات الدفلة *Nerium oleander* على حيوية ونمو طفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania cutanous* خارج جسم الكائن الحي In vitro

م. هناء دخيل مزعل
المديرية العامة للتربية في محافظة ذي قار

الملخص:

تضمنت الدراسة الحالية تأثير المستخلصات المائية الباردة والمستخلصات الكحولية الايثانولية لنبات الدفلة على نمو وفعالية طفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania cutanous* promastigote المنماة في وسط توبي Tobie's mediumالمضاف اليه دم الانسان بنسبة15% . وبحساب اعداد *Leishmania cutanous* promastigote خلال 96 ساعة المضاف اليه التراكيز المثبطة. اظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي لنبات الدفلة كان اكثر تاثير من المستخلص المائي للنبات باستخدام التدرج بالتراكيز(0.5-2)ملي غرام /مل لنفس النبات , كمااظهرت التراكيز للمستخلصات النباتية تثبيط تدريجياً في اعداد امامي السوط للطفيلي مع ازدياد الوقت خلال فترة النمو . لقد ادت التراكيز العالية (2)ملي غرام /مل لنبات الدفلة الى تثبيط مايقارب ($36.250X10^6\pm10$) للمستخلص الكحولي و($52.333 X 10^6\pm10$)للمستخلص المائي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة ($80.000X10^6\pm10$)خلال 96 ساعة من النمو.

المقدمة:

تاريخ داء اللشمانيا History of leishmaniasis

يعتبر طفيلي اللشمانيا الجلدية major. L أحد أنواع اللشمانيا المسببة للقرحة الجلدية الرطبة حيث تظهر الإصابات في المناطق المكشوفة من الجسم كالأنف والخدود

والذراعين ويطلق على القرحة الجلديـــة أسماء محلية شائعة منها حبة بغداد (الأخت) وتتضمن حياة الطفيلي شكلين رئيسين هما الشكل عديم السوط الاماستكوت (Amastigote) الذي يتواجد داخل خلايا المضيف الفقري, والشكل المسوط (البروماستكوت) Promastigote الذي يتواجد في الأمعاء الوسطى لحشرة ذبابة الرمل( ). Lainosa,1979 . هناك نوعين من مسببات اللشمانيا الجلدية هما :-

1-**اللشمانيا المداريـــة**: tropica Leishmania التـــي تســـبب القرحـــة الجافـــة sore dry، ، (ضـــوا -1992) .

2-**اللشمانيا الكبرى** : major Leishmania التي تسبب القرحة الرطبة wet sore (نحاس وشعبان 1997 آلام كما تظهر ندبة واضحة مكان الإصابة Schneider and (Ockert,1987) يصاب الإنسان باللشمانيا الجلدية اما بسبب لدغ الذبابة الفاصدة للوريد او قد تنتقل العوامل الممرضة بسحق جسم الذبابة الناقلة على جلد مخرش أو يُعَدُ داء اللشمانيا من المشاكل الصحية العامة المنتشرة في جنوب-غرب اسيا والعالم العربي وقد تحدد الداء في وقت حكم الفراعنة في مصروالاشوريين في بلاد ما بين النهرين . لكنَ الداء وصف بصورة دقيقة من قبل العلماء العرب المسلمين مثل ابن سينا (980-1037 A.D) حيث شرح الداء في فصل كامل في كتابه القانون في الطب وذكر فيه امكانية البعوض في نقل الداء . اما العالم العربي الرازي (850-932 A.D) فقد شخص اللشمانيا الجلدية كداء مستوطن في افغانستان (Cox, 2002) . اما العالم روسيل وصف اللشمانيا الجلدية في حلب – سوريا عام 1756 (Klaus &Frankenburg, 1999)

في عام 1956 الباحث pringle سجل ثمان عشرة حالة في المنطقة الوسطى . وبعد حقبة الخمسينات اظهرت بشكل واضح ازدياد انتشار الداء في عموم البلاد قدرت بـــ 5000 اصابة سنويا (Sukker, 1983 & 1976) فقد اشارت التقارير الواردة من مركز السيطرة للامراض الانتقالية في حقبة السبعينات الى ازدياد عدد المصابين بالمرض سنة بعد اخرى , ومن ضمنها محافظة ذي-قار سجلت اعلى عدد في الاصابات (1348)اصابة وكانت اقلها في محافظة المثنى (110) خلال حقبة من 1971-1996 بينما سجل سعدون العلاق (1971 -1996)في مركز المجر فقط (109) اصابة في ميسان. ينتقل طفيلي اللشمانيا بواسطة انثى ذبابة الرمل , تنتشر هذه الحشرة على نحو واسع مثل

المناطق المدارية والمناطق الدافئة وتمتد شمالا. هناك حوالي 600 نوع ترجع لخمس اجناس تحت العائلة الفرعية Phlebotominae., ومن بينها 70 ناقلًا لداء اللشماني. اما الخازن الرئيسي فيها فهو الكلاب كذلك الحال في الصين (Guarga *et al.2000*) . بينما في ايران فان الخازن الرئيسي هو نوعين من القوارض.

يمكن التشخيص للمرض على المظهر الخارجي المتمثل بالآفات البارزةحيث تغطيها قشرة وان لم تعالج يمكن أن تتقرح وخاصة عندما تصادف باصابة عدوى ثانوية من كائنات حية مثل بكتيريا *المكورات العنقودية الذهبية*، لدى شخص قد عاد من منطقة يستوطن بها المرض. يمكن التشخيص في تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المعروفة باسم PCR اختصارًا.(2007) Reithinger R & Dujardin J-C تتراوح مدة حضانة الداء عادة من 3-8 اشهر لكنها قد تمتد الى 2-3 سنوات , James and Chin) (2001 .تتميز الاعراض السريرية (Clinical Symptoms) لداء اللشمانيا ومن خلال الدراسة لهذا المرض في إطار علم الأنسجة أنه توجد مجموعة متنوعة من الخلايا الالتهابية المزمنة؛ والتي تتمثل أورام حبيبية ظهارية أو في خلايا بلعمية, Singh *et al*) (1998 يمكن القول ان سبب انخفاض درجة حساسية أساليب التشخيص التي كانت مستخدمة من قبل يعود اسببه الى انه لا يعتبر تركيز الطفيليات ثابتًا في كل الدراسات المتعلقة بهذا الشأن. . ويشيع امتداد تأثير هذا المرض ليشمل الأعصاب في أفريقيا، لكن هذا الأمر نادر الحدوث في شبة القارة الهندية لذا يسبب أنماطًا مختلفة من المرض في كل من السودانو الهند. ففي النمط الذي يظهر به المرض في الهند، تتسع العقيدات بمرور الوقت وتشكل بقعًا دهنيةً كبيرةً، الا انها نادرًا ما تتقرح، لكن بالنسبة للعقيدات التي تتكون في النمط الذي يظهر في أفريقيا، فإنها غالبًا ما تتقرح كلما تقدمت مراحل المرض بمرور الوقت.(Salotra[1], 2006) (Hyper pigmentation) على الجلد (Stites *et al*.,1994).

تعتبر النباتات ولقرون عديدة ضمن عدد كبير من العناصر الطبية , كما ان هناك عددًا ضخمًا من مكونات المركبات المهدئة تم عزلها من النباتات الطبيعية . ايضا استخدمت النباتات ومستخلصاتها في الطب التقليدي وهناك ما يقارب 80% من سكان العالم يعتمدون على استخدام النبات في الطب التقليدي في حياتهم لما له من دور في الاهتمام بالصحة واعتمادا على منظمة الصحة العالمية (WHO) فان النباتات الطبية

ستكون افضل مصدر للحصول على علاجات متنوعة والتي ساهمت في مجال الصحة الانسانية.(El-Astal *et al*. , 2005) تحتوي النباتات على العديد من المركبات الايضية الثانوية والتي لها فعالية مضادة للميكروبات مثل التانينtannins واشباه القلويدات Alkaloids التربينات Terpenoids والفلافونويداتFlavonoids (Bouzada *et al*., 2009)

نبات الدفلة *Nerium oleander* plant

يعود نبات الدفلة *Nerium oleander* الى الى العائلة الدفلية Apocynaceae وله عدة تسميات التي يطلق عليها بالدفلة وآجو في اللغة التركية وزلاة في اللغة الكردي اما الانكليزي فيطلق عليه ب الدفلي oleander الذي يقصد به(النبات السام ذوالازهار العطرة)واكليل الورد rosebay نسبة الى نوراتها التي تكون ذات ازهار محتشدة.وجد نبات الدفلة *N. Oleander* في منطقة تل القدم الفارسية ومنطقة السليمانية وراوندوز والعمادية وانتشر في الاقاليم الجافة في العراق اضافة الى المناطق التي يكون فيها الري محدود (Chakravarty,1976) .

يمتاز نبات الدفلة كونه من الاشجار معمرة دائمة الخضرة وهي اشجار صغيرة ذات سيقان متصاعدة والاوراق تكون بترتيب سواري)وجنس الدفلة هو نبات سام جدآ الا انه يدخل في علاج القلب لاحتوائه على مركب الاولندرين Oleandarine الذي أعتبر كبديل مثالي عن الديجيتالين Digitaline (Show and Pearn ,1979)

ان سم الاوليندرين يستعمل لعلاج امراض القلب وذكر المقادير المناسبة لتصنيع هذا العلاج ووثقت في سنة 1930ان هناك تأثيرات سامة لآوراق الدفلة ناتجة عن حرق اوراقها التي لايخلو العسل المصنوع من ازهار الدفلة من تأثيراتها السمية. كما ان الاستعمال الطبي لمغلي اوراق الدفلة يؤدي الى تقليل الانتفاخات ويستعمل مغلي الاوراق كغرغره لتقوية الاسنان وكقطرات للانف وتستعمل الدفلة في علاج الصدفية وتقوية اللثة والاسنان وفي تسميم الفئران (Al-Mayah,2001) من الدراسات المهمة لنبات الدفلة هي ماوجده عبد الله و آرتين (2007)في تأثير المستخلصات المائية لنباتي الدفلى *Nerium oleander* والسبحبح *Melia azedarach* على نمو المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* خارج الجسم الحي (Osterloh and Herold ,1982).

طريقة العمل

1- جمع العينات The data collection

جمعت عينات دم من الاشخاص المشكوك اصابتهم بطفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania cutanous* complex من المراجعين والراقدين في مستشفى الحسيني العام و بالتنسيق مع شعبة المختبر وبمساعدة بعض الاطباء الاختصاص بالاطفال وامراض الدم.

2- الفحوصات السريرية Clinical tests

تم إجراء الفحص ألسريري للأطفال قيد الدراسة من قبل الملاك الطبي للتعرف على الأعراض السريرية

3-طرق التشخيص Diagnosis methods

1-3 اختبار الطفيلي Testing of the parasite

تم اخذ العينات من الاشخاص المشكوك اصابتهم بطفيلي اللشمانيا الجلدية ثم في مختبرات مستشفى الحسيني العام في محافظة ذي قار ثم تم إجراء الفحص لجميع الحالات المدروسة و ذلك بإجراء لطاخة دموية من حافة الإصابة و تلوينها بغيمزا و فحصها بالمجهر باستخدام العدسة الغاطسة (بالتكبير ×100)، وذلك لتحري العناصر الطفيلية عديمة السوط .تم عزل العينات الطفيلية واستنباتها من جميع الحالات المدروسة إيجابية وسلبية الفحص المجهري المباشر. حيث أخذت رشافة من حافة الإصابة بماصة زجاجية معقمة وزرعت على الوسط ثنائي الطور N.N.N المؤلف من آغار مملح، دم أرنب منزوع الفيبرين وصادات حيوية. وفحصت في اليوم الثاني للبحث عن العناصر الطفيلية أمامية السوط. كما تم نقل طفيليات كل زراعة إلى الوسط السائل 1640-RPMIالمدعم ب (10 %)من مصل البقر الذي عطلت متممته لتكثير الطفيلي والحصول على خلاصة طفيلية منحلة تستخدم من أجل التفاعلات المناعية أو لتنميط الطفيليات بطريقة الرحلان الكهربائي متماثل الأنزيمات electrophoresis Isoenzymeوبعد أن تكون القطرة قد انتشرت تماما على الشريحة الثانية تدفع الشريحة بقوة وبسرعة وبزاوية مائلة 45 درجة . (Sood ,1985) . قبل البدء بتصبيغ المسحة تثبت باستعمال الكحول المثيلي لمدة دقيقة واحدة لتجنب حصول أي تغيير على المسحة

ولمنع حدوث عملية التحلل التي تحصل خلال عملية التصبيغ كما يعمل الكحول على تقوية وتثبيت محتويات الخلية .وباستعمال طريقة (Sood , 1985)في التصبيغ وكانت العملية كالتالي:-

وضع ما يقارب (8 قطرات) من الصبغة على الشريحة الزجاجية بحيث غطيت بالكامل لمدة (2 دقيقة) طوفت المسحة بالماء المقطر وتستغرق هذه العملية من 3-2 دقائق .

3-1-2طريقة الفحص Examination of bone marrow film

يتم فحص المسحة المحضرة والمصبوغة بصبغة ليشمان حيث يتم فحص كل جزء من الشريحة الزجاجية وبصورة تدريجية على العدسة (10x)ومن ثم على العدسة (40x) وعلى العدسة الزيتية (100x) فعند وجود طفيلي الليشمانيا الجلدية complex *L .cutanous* بطوره غير المسوط اما السايتوبلازم يظهر باللون الأزرق الشاحب و النواة فتكون كبيرة وتظهر باللون الأحمر وفي وسط السايتوبلازم يظهر الجسيم الحركي Kinetoplast على شكل عصوي ذو لون احمر داكن ويمكن ملاحظة وجود الخيط المحوري يمتد بالقرب من الجسيم الحركي إلى غشاء الخلية
(Beaver *et al*. ,1985)

4- الفحوصات المصلية Seriological tests

4-1اختبار الشريط المناعي Dipstick test (rk39 test)

يستعمل اختبار الشريط المناعي لتحديد الإصابة با لليشمانيا الجلدية ولغرض استعمال هذه الطريقة يفصل المصل من دم الأشخاص بواسطة جهاز الطرد المركزي REM/India وبسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة 15 دقيقة ويستعمل في اليوم نفسه .

تتم طريقة العمل حسب التعليمات الموجودة في النشرة الداخلية المرفقة للاختبار ويستخدم هذا الاختبار للكشف عن الأجسام المضادة Antibodies الخاصة بالليشمانيا الجلدية في المصل ويسمح بقاء العينات وأشرطة الاختبار Dipstick بدرجة حرارة الغرفة حتى انتهاء الاختبار.

وتشمل طريقة العمل الخطوات الآتية:-

- إخراج الشريط من المحفظة المعدنية الرقيقة الخاصة به ومن الطرف البعيد عن وسادة الفحص.

- استعمل في هذا الاختبار الأطباق المسطحة القعر Flat bottom وذلك بوضع (3 - 2) قطرة أي ما يعادل(150µl) من محلول Chase buffer الخاص بالفحص في كل حفرة.
- أضيف(20µl) من المصل بواسطة الماصة pipette إلى شريط الاختبار في منطقة ألحشوه strip .
- وضع شريط الاختبار من جهة ألحشوه strip في الحفر الحاوية على محلول Chase buffer ولمدة 10 دقائق .

فحص النتائج كما يأتي:-

← **النتيجة الموجبة/** تكون النتيجة موجبة عندما يظهر الخطان باللون الأحمر حيث يمثل الخط العلوي خط السيطرة أما الخط السفلي فيمثل خط الاختبار.

← **النتيجة السالبة** / تكون النتيجة سالبة عندما يظهر الخط العلوي أي عندما يظهر خط السيطرة فقط ولا يظهر خط الاختبار.

5- تحضير الوسط الزرعي لطفيلي ليشمانيا دونوفاني

استخد م وسط توبي Tobie's medium لتنمية أمامية السوط لطفيليات الليشـــمانيا الاحشائية وإدامتها (Tobie *et al* , 1950) بدرجة حرارة (26) مئوية ، ويتكـــون هـــذا الوسط من طورين

Meat extract (oxid)	**3 GM**	**خلاصة اللحم**
Bacteriological pepton (oxid)	**5 GM**	**ببيتون**
Agar	**15 GM**	**اكار**
Sodium chloride	**8 GM**	**كلوريد الصوديوم**
Distilled water	**1000 ML**	**ماء مقطر**
Crystalline peniciline	**200.000 IU وحدة دولية**	**بنسلين بلوري**
Streptomycin sulphate	**200m GM**	**سلفات الستربتومايسين**
Blood	**150 ML**	**دم**

1-5 الطور الصلب Solid Phase

ومكوناته في اللتر الواحد هي :-

2-5 الطور السائل Liquid Phase

استخدم محلول اللوك Lock's Solution لهذا الغرض (Dawson *et al* ., 1969) ومكوناته في اللترالواحد والذي حضر ايضا في المختبركما يأتي :

Sodium chloride nacl	8 GM	كلوريد الصوديوم
Potasium chloride kcl	0.2 GM	كلوريد البوتاسيوم
Cacl2.2H2O	0.2GM	كلوريد الكالسيوم المائي
KH2PO4	0.3GM	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
D- glucose	2.5 GM	D- كلوكوز
Distilled water	1000ML	ماء مقطر
Crystalline peniciline	200.000IU وحدة دولية	بنسلين بلوري
Streptomycin sulphate	200 mgm	سلفات الستربتومايسين

تذاب المواد أعلاه (باستثناء المضادات الحيوية) في الماء المقطر ويعدل بعد ذلك الرقم الهيدروجيني ph الى (7.2) ثم يعقم بالموصدة Autoclave بدرجة (121) مئوية لمدة (20) دقيقة يترك المحلول بعدها ليبرد الى درجة حرارة (50) مئوية ثم يضاف له الدم والمضادات الحيوية ويصب (3) مليلتر منه في قناني زجاجية معقمة سعة (25) مليلتر ويترك ليتصلب بوضع مائل وتحضن بدرجة (37) مئوية مدة (24) ساعة للتأكد من تعقيمها وتحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

6- تنمية طفيلي الليشمانيا في الوسط الزرعي

Growth of *leishman* parasite in the culture medium

تم تنمية امامية السوط في وسط توبي المحضر اعلاه حسب الفقرة **(3-1-5)** بعد ان ينقل لقاح Inoculum بحجم (0.1) مليلتر من الوسط السائل الحاوي على نمو جيد من امامية السوط الحية والخالية من التلوث وفي الطور اللوغارتمي الى قناني الزرع المعقمة وبكثافة طفيلية تبلغ ($10X10^6$) خلية / مليلتر وتحضن بدرجة (26) مئوية ويتابع النمو

يوميا وعلى مدى خمسة ايام. تحسب خلايا البروماستيكوت بواسطة شريحة عد الخلايا الدموية hemocytometer (Neubaur) وبتخفيف عينة من المستنبت بنسبة 1 : 100 وتحسب الطفيليات في 64 مربع صغير وتطبيق المعادلة الاتية:العدد الكلي للطفيليات=عدد الطفيليات في 64 مربع صغير (2.5×10^3) معامل التخفيف.

7-تحضير العينات النباتية

تمت عملية جمع العينات من مناطق متعددة وخلال شهري ايلول وتشرين الاول من عام 2011 حيث تم جمع اوراق النباتات من حديقة كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة ذي قار في مدينة الناصرية .

1- تحضير المستخلص المائي البارد Aqueous Extract preparation

استخدمت طريقة (Grand *et al*., 1988) في تحضير المستخلص المائي وهي:-

بعد جمع الاجزاء المستخدمة للدراسة خلال شهري ايلول وتشرين الاول من عام 2011غسلت لازالة الاتربة والمواد العالقة ثم تركت في الظل وقلبت بين الحين والاخر لمنع تعفنها بعدها طحنت باسخدام المطحنة الكهربائية Blender ثم مزج (20) غم من مسحوق النبات مع (200) مل من الماء المقطر المعقم وترك المحلول مع التحريك المستمر بواسطة الجهاز الهزاز Magnatic stirrer ، رشح المزيج من خلال عدة طبقات من الشاش ثم رشح مرة ثانية

بوساطة قمع بخنر للترشيح مع التفريغ بأستخدام مضخة التفريغ pumpvaccum وذلك للتخلص من الأجزاء غير المسحوقة والألياف النباتية وبذلك تم الحصول على المستخلص الخام Crude extract وترك المستخلص في اطباق بتري فيحرارة الغرفة (25)م للحصول على مستخلص جاف.

2- تحضير مستخلص كحول الايثانول Ethanolic Extract preparation

حضر المستخلص الكحولي بنفس طريقة طريقة تحضير المستخلص المائي البارد باستثناء استبدال الماء بالكحول الاثيلي 70%.جفف Stock Extract ويحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

8- تحديد التراكيز المؤثرة لكلا المستخلصين

preparation of effect concentration

تم تحديد تأثير المستخلصات النباتية المائية والكحولية في حيوية الطفيلي In vitro ضمن مدة زمنية معينة وتركيز معين صممت التجربة باربع تراكيز وهي 1.5, 0.5,1 (2,)ملغرام /مل

9- أختبار فعاليات المستخلصات على حيوية الطفيلي

تضمن كل تركيز ثلاثة مكررات بالاضافة الى مجموعة السيطرة . وضع في كل انبوبة 1مل من المستخلص النباتي في العبوات الحاوية على البيئة المغذية للطفيلي وهو في حالته اللوغارتيمية(10^6 cells/ml) المذاب في وحسب التراكيز والاوقات بخصوص المستخلص المائي الحاوي على80.000x) (10^6) . وكذلك الحال بالنسبة للمستخلص الكحولي فقد وضع في كل انبوبة 1مل من المستخلص النباتي وحسب التراكيز والاوقات.

وتم حساب متوسط عدد الطفيليات لاربع ايام الاولى بعد عملية احصاء الخلايا الحية للطفيلي بجهاز Haemocytometer والمجهر الضوءي ثم قورنت نتائج عدد الطفيليات في التركيزات المتواجدة مع الطفيلي والبيئة المغذية مع العينة الضابطة التي تخلو من المستخلصات .

10-التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات إحصائيا بإستعمال أحد الأنظمة الجاهزة في الحاسوب SPSS (Statistical Package For Social Science) version 11 ، مع نظام جداول البيانات (Excel 2000) ، تم تقديم المعطيات بإستعمال النسب الإحصائية البسيطة مثل النسبة المئوية والمتوسط Mean والخطأ المعياري، تعد الإختبارات معنوية عند مستوى إحتمالية $p < 0.05$ و $p < 0.01$.(الراوي وخلف الله,1980)

النتائج

جدول(1) تاثير التد اخل ما بين التركيز والوقت لمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو طفيلي اللشمانيا

التركيز ملغرام/مل	الوقت (ساعة)			
	(عدد الطفيليات X 10^6) ± 10			
	24	48	72	96
0	80.000	86.000	91.000	99.000
0.5	76.333	68.833	65.333	62.833
1	72.833	62.333	56.667	49.833
1.5	61.833	55.500	49.333	39.833
2	56.000	52.167	39.000	30.000

R.L.S.D 0.05=1.98 R.L.S.D 0.01=2.5

ومن خلال ملاحظة الجدول (1)نجد ان اعلى اعداد مسجلة لتثبيط طفيلي اللشمانيا كان للمستخلصين المائي والكحولي عند مقارنتهما مع مجموعة السيطرة (80.000 X 10^6± 10) اذ تزداد الاعداد في مجموعة السيطرة بزيادة فترات الحضن لتصل الى (X 99.000 10^6±10) بينما يزداد تاثير تثبيط التراكيزعلى الطفيلي بزيادة فترات الحضن وان اعلى تاثير سجل للمستخلصين كان عند اتركيز (2) ملغرام /مل اذ قلت الاعداد الى (30.000 X 10^6± 10)عند مقارنتهما مع مجموعة السيطرة .

جدول (2)تاثير التداخل ما بين المعاملات والتركيزلمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو طفيلي اللشمانيا .

المعاملات	التركيز ملغرام/مل				
	(عدد الطفيليات x 10^6) ± 10				
	0	0.5	1	1.5	2
المستخلص المائي	80.000	70.500	63.083	56.917	52.333
المستخلص الكحولي	80.000	66.167	57.750	46.333	36.250
المعدل	80.000	68.333	60.417	51.625	44.292

R.L.S.D 0.05=1.39 R.L.S.D 0.01=1.8

من خلال ملاحظة الجدول (2) يتبين ان هناك انخفاضًا لاعداد اللشمانيا عند المستخلص الكحولي اكثر من المستخلص المائي حيث كانت الاعداد عند التركيز (0.5) ملغرام/مل للمستخلص المائي ($10\pm70.500x10^6$) اما المستخلص الكحولي فكانت (X 10^6 66.167 $\pm$ 10) لكن عند التركيز(2)انخفضت الاعداد الى (52.333 X 10^6 $\pm$ 10) عند المستخلص المائي اما المستخلص الكحولي فكانت (36.250 X 10^6 $\pm$ 10) ملغرام/مل.

جدول(3) تاثير التداخل ما بين المعاملات والوقت لمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو طفيلي اللشمانيا

المعاملات	الوقت(ساعة)				المعدل
	(عدد الطفيليات X 10^6) $\pm$ **10**				
	24	48	72	96	
المستخلص المائي	**70.867**	**66.400**	**62.533**	**58.467**	64.567
المستخلص الكحولي	**67.933**	**61.133**	**53.600**	**46.533**	57.300
المعدل	69.400	63.767	58.067	52.500	

R.L.S.D 0.05= 1.25 R.L.S.D 0.01= 1.62

من خلال جدول (3) يمكننا ملاحظة تأثير الوقت والمعاملات على الطفيلي، اذ نلاحظ ان المستخلص الكحولي كان اكثر تأثيراً من المستخلص المائي اذ بلغ اعداد الطفيلي بتأثير المستخلص الكحولي عند الساعة (24) (67.933 X 10^6 $\pm$ 10) اما المستخلص المائي فقد بلغت الاعداد (70.867 X 10^6 $\pm$ 10) ويزداد تاثير المعاملات بصورة طردية مع زيادة الوقت وايضا تاثير المستخلص الكحولي كان اكثر من المستخلص المائي حيث قلت الاعداد عند المستخلص الكحولي(46.533 X 10^6 $\pm$ 10) عند الساعة (96) اما المستخلص المائي فقد اثر على اعداد الطفيلي الى (58.467 X 10^6 $\pm$ 10) وفي نفس الوقت.

المناقشة

1- تأثير التداخل بين التركيز والوقت لمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو **طفيلي اللشمانيا**

لقد تطابقت النتائج الحالية مع ما توصلت اليه (Al-Jubouri, 2008)وجماعتها في تأثير اوراق الدفلة على طفيلي اللشمانيا الجلدية حيث أدت التراكيز2.5 في اليوم الرابع من النمو الى تثبيط اعداد كبيرة من اللشمانيا وجاءت هذه النتائج مخالفة الى ما توصلت اليه الخان وجماعته(2006) في تاثير نبات الدفلة والسبحبح على المظهر الخارجي لطفيلي اللشمانياالجلدية حيث اثبت عند التركيز (4 mg/lm) يؤدي الى تثبيط اعداد اللشمانيا في اليوم الرابع والسبب يعود الى احتواء نبات الدفلة على مركب الـــoleandarine الذي بسبب سميته العالية تؤدي نسبة قليلة منه الى تثبيط واضح للطفيلي (Zasada *et al*. 2002) , بينما التركيز الذي استخدمه الخان وجماعته (2006)كان عاليًا وهذا ما اثبتته الدراسة الحالية حيث كان اعلى تركيز مستخدم هو 2.5 ملغرام /مل ثبط اعداد هائلة خلال اليوم الرابع من النمو بينما التركيز الذي استخدمه الخان(2006) هو 4 ملغرام/مل.

2- تأثير التداخل بين التركيز و المعاملات لمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو طفيلي اللشمانيا.:

يبدو من خلال الدراسة الحالية ان هناك تأثيرات واضحة ومعنوية للمستخلصات المائية والكحولية لاوراق الدفلة والتي تتناسب طرديا مع زيادة التركيز اذ أدت معاملة الطفيلي بالمستخلص المائي والكحولي خارج جسم الكائن الحي الى انخفاض في المعدل المتوسط الحسابي لحيوية طفيليات اللشمانيا وان تاثير المستخلص الكحولي كان اكفأ من تأثير المستخلص المائي وهذا ما جاء مشابه لما توصل اليه (Singh and Singh, 2009)افي استخدام قلف نبات الدارسين في تثبيط انواع البكتريا المرضية حيث كان مستخلص الكحولي الايثانولي اكثر تثبيط من المستخلص المائي البارد والساخن ضد بكتريا *Escherechia - coli* ولكن عند التركيز 25%حيث كان ذا كفاءة علاجية جيدة ويعود الى تدخل المستخلص الكحولي الذي يعمل على زيادة ذوبان مركبات أكثر لنبات الدفلة من المستخلص المائي التي تعمل بدورها على تداخل مع سلسلة تفاعلات

البروتينات الضروريه لاستقرار حيوية الطفيلي وبالتالي موته (Abd-Elhady *et al.*,1994).

3- تأثير التداخل مابين المعاملات والوقت لمستخلصات نبات الدفلة على حيوية ونمو **طفيلي اللشمانيا .**

لو حظ في نتائج الدراسة الحالية ان تأثير المستخلصات الكحولية والمائية لاوراق الدفلة يزيد في تثبيط اعداد كبيرة لطفيلي اللشمانيا بزيادة ساعات الوقت المحدد وهذا ما جاء به (Genena *et al.*, 2008) في استعمال المستخلص الكحولي لاكليل الجبل على *Staphylococcus aureus*.ويعود السبب الى احتواء اوراق نبات الدفلة على المركب.olendarine السام الذي له تأثير مباشر على الكثير من الاحياء المجهرية والذي يزداد تاثيره بزيادة وقت الحضن لانه كلما زاد الوقت يؤدي الى زيادة ذوبان مركبات المستخلص النباتي لذا فانه قد يدخل بصورة او باخرى مع الفعاليات الحيوية لطفيلي اللشمانيا فيشل حركته وبالتالي يوقف انقسامه وموته (Ascher, 1993).

المصادر

- **الخان، حسين إسماعيل، هيثم لقمان الحيالي، ثائر محمد المشهداني، (2006).** تأثير المستخلصات المائية النباتي الدفلة والسبحبح على الازموزية والمظهر الخارجي لامامية سوط اللشمانيا الجلدية خارج الجسم الحي. مجلة الرافدين، العدد (11)، ص79 .
- **الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز، (1980).** تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
- **ضوا ، سامية، (1992)**-دراسة احصائية عن أشكال اللشمانيا الجلدية وتوزعها في محافظة اللاذقية، رسالة ماجستير ، آلية الطب،جامعة تشرين،
- **نحاس، سمر وشعبان، مها(1997)**، دراسة مناعية للشمانيا الجلدية /حبة حلب / في دمشق وريفها، المؤتمر العربي الثامن لعلوم الحياة والمؤتمر الأردني الرابع للعلوم الحياتية ، عمان، الأردن،
- **Abd-Elhady,F. ;Hegazi ,A.;Ata ,N.; & Enbawy , M.,(1994)** . Studies fordetermining antimicrobial activity of Solen ostomma

argel. Extraction with metharol ,water in different propotions . Qater univ. Sci., 14(spec,issue):138-142.

- **-Ascher K.R.,(1993)** . Non conventional insecticidal effect of pesticide available from the Neem tree, *Azadirachta indica* Arch. Insect. Biochem. Physiol., 22: 433-449.
- **Al-Jubouri**,**S.A**.**; Hussain, I. A. ,(2008).** Effect of Aqueous Extracts of *Nerium oleander* and *Melia azedarach* on Growt *Leishmania tropica* promastigotes In Vitro. Department of Biology , College of Science , University of Mosul , Mosul , Iraq.P 98.
- **Al- Mayah , A. A.,(2001) .** Medicinal plant and herbaceous treaetment University of Basrah – University of Taiez First edition – Abady press . Pp.288.
- **Beaver ,P.C. ; Jung ,R.C.; &Faust ,E.C.,(1985**). Animal agents and vectors of human disease .5th Ed. Lea and febiger , Philadelphia , p. 117.
- . **Reithinger R & Dujardin J-C (2007)**. "Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications". *J Clin Microbiol*. **45** (1):21–25. doi:10.1128/JCM.02029 06. PMC 1828971. PMID 17093038.
- **-Bouzada, M.L.M.; Fabri R.L.; Nogueira M.; Konno T.U.P.; Duarte G.G.;& Scio E. , (2009)**. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants inbrazil. Pharm. Biol.J., 47: 44-52.
- **Chakravarty , H. L.,(1976a).** Plant Wealth of Iraq . S. N. Guharay, at sreesaraswaty Press. LTD. P. 376-378.
- **-Cox, F. E. G., (2002).** History of Human Parasitology, Clinical
- Microbiology Reviews.12: Pp595–612.
- **-Cox, F. E. G., (2002).** History of Human Parasitology, Clinical Microbiology Reviews.12: Pp595–612.
- **Dawson,R.**; **Elliot,D.; Elliot,W. And Jones,K. (1969).**,."Data for biochemical research" , 2nd ed., Clarendon Press, Oxford20-

- **-El-Astal,Z.Y.; ashoura.E.R.A.;& kerrita. A. M., (2005)**. Antimicractivity of some medicinal plant extracts in Palestine. Pak. J. Med. Sci., 21: 187-193.
- **-Grand A.;Verpoort R.;Wondorgem PA.;& Poussel JL.,(1988)** Anti-infections phytotherapies of the tree-savanah Sengal (West-Africa) .II. Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., 22 : 25-31.
- **Genena AK.; Hense H.;Junior AS.;&Souza SM .,(2008)**. Rosemary (*Rosemarinusofficinalis*) – a study of the composition, atioxidant and antimicrobial activities of extrac obtained with supercritical carbon dioxide. Cienctecnol Aliment 28:463-469
- **Guarga,J.L.;Moreno,J.;Lucientes,J.;&Gracia,M.J**.; **,(2000)**. Peribanes, M.A.and Alvar,J.Canine Leishmaniasis Transmission :higher infectivity amongst naturally infected dogs to sandflies is associatedwith lower proportions of T helper cells. Res .Vet. Sci.,69(3):249-253
- **-James , A.; &Chin ,K., (2001).** Control of communicable disease manual . 17th ed. Report of the American Public Health Association,p. 278 – 289
- **Klaus S.; & Frankenburg S., (1999).** Cutaneous Leishmaniasis in the Middle East, Clin.Dermatol.J. **17**:137–141
- **Lainosa , R., and Shaw , J. ,(1979)** "Evolution Classification and geographical distribution, in the Leishmaniases in Medicine", 26, (1979). 7. Chance , M L., Ann. Trop. Med. Parasite, 68
- **Osterloh . J.; and Herold, S.,(1982).** Oleander inter Ference in the digoxing radioimmunoassay in afetal ingestion JAMA. Inunited Kindum. 247 (H) :1596-159
- **Salotra P, Singh R (2006).** "Challenges in the diagnosis of post kala- azar dermal leishmaniasis". *Indian J. Med. Res*. **123** (3): 295– 310. PMID 16778312
- **Schneider and Ockert.,(1987).** Molluscicidal activity of *Saraca asoca* and *Thuja orientalis* against the fresh water snail Lymnaea acuminata. Vet. Parasitol. 164: 206-210
- **Singh, A.; & Singh. V.K., (2009).** Molluscicidal activity of *Saraca asoca* and *Thuja orientalis* against the fresh water snail Lymnaea acuminata. Vet. Parasitol. 164: 206-210

- **Singh N, Ramesh V, Arora VK, Bhatia A, Kubba A, Ramam M (1998)**. "Nodular post-kala-azar dermal leishmaniasis: a distinct histopathological entity". *J. Cutan. Pathol*. 25(2): 95–
- **Show ,D.;& Pearn , Med,J.,(1979)**. Oleander poisoning . In Laborde *Nerium oleander* , Royal Batanic Gardens , Kew ,United Kindum. Aust, 2: 267-269
- **Sood, R. (1985)**. Medical Laboratory Technology .1th Ed. Jaypee Brothers , India ,pp . 113-122.
- **Stites, D.P.; Terr, A.I.; & Parslo, T.G.,(1994).**Basic and clinical immunology,8th ed.; Middle East edition,London. Pp.: 617-677
- **Sukker , F ., (1976) .** Some epidemiological and clinical aspects of Kala azar in Iraq . Bull. End .Dis. Iraq , 17: 53 – 62.
- **- Sukker, F. , (1983).** Epidemiology of Leishmaniasis In Iraq. Bull . End.Dis. Baghdad ., 22(4) :33-51.
- **Tobie,N.W.; Brand ,T.V. & Mehlman ,B.,(1950) ,** Cultural and physiological observations on *Trypanosom arhodesiense* and *Tryparanosoma gambiense* .J.parasito., 36 :48-54
- **Zasada,I.A.;Ferris,H.;&Zhrany,Z.,(2002)** Plant sources of Chinese herbalremedies :laboratory efficacy suppression of *Meloidogyne javanica* in soil and m phytotoxicity
- Assays.J.Nematology 34(2):124-129

SUMMARY

The present study involved the effect of aqueous extract and ethanolic extract of *Nerium oleander* on growth and active of*Leishmania cutanous* promastigotes grown on Tobie's medium ,applay of human blood by(1.5%).And by account the number of of *Leishmania cutanous* promastigotes through 96 h of the growth by apply aconcentration of inhibition . the result revealed that the ethanolic extract of *Nerium oleander* more effect than eqeuous extract by arrengment of aconcentration (0.5- 2) mg/ml of the same plant .As shown the concentration inhibition in number of *Leishmania cutanous* promastigotes with increasing the time . the high extract(2)mg/m lead to inhibit ($36.250x10^6 \pm 10$) for ethanolic extract and ($57.300x10^6 \pm 10$)for aqueous extract tothe plant by composition with control group ($80.000x10^6 \pm 10$) during 96 houre of growth