تأثير المستخلصات المائية للفلفل الحار *Capsicum frutescens* وقشور ثمار الرمان الاسود *Punica granatum* على طفيلي الجيارديا اللامبلية *Giardia lamblia* خارج الجسم الحي

هناء كامل حمد

جامعة بغداد ، كلية العلوم للبنات ، قسم علوم الحياة.

الخلاصة

اجريت هذه الاختبارات خارج الجسم الحي للكشف عن تأثير المستخلصات المائية لكل من الفلفل الحار *Capsicum frutescens* وقشور ثمار الرمان الاسود *Punica granatum* على الاطوار الناشطة Trophozoites لطفيلي *Giardia lamblia* المنمى في الوسط الزرعي HSP-1 عند درجة ْC 37، تم اضافة المستخلصين كلا على انفراد بتراكز (0.01 و 0.05و 0.1 و0.5 و1) ملغم/ مل الى 5 مليلتر من المزروع الحاوي على 12×10^6 ناشطة/ مل وتركت لمدة 24 ساعة بدرجة ْC 37، وكانت النسب المئوية لقتل الاطوار الناشطة للطفيلي التي عوملت بالمستخلص المائي للفلفل الحار (24.84 و 41.35 و 62.66 و74.32 و 97.83%) على التوالي، وهي مقاربة ا لتلك النسب الناتجة عن معاملة الطفيلي بالمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان الاسود والتي كانت (18.66 و 34.22 و.12 54 و70.77 و92.44 %) على التوالي.

وبصورة عامة فأن النتائج اظهرت ان المستخلصات المائية للفلفل الحار فعالة في التخلص من الاطوار الناشطة لطفيلي *Giardia lamblia*.خصوصا عند التركيز 0.5 و1 ملغم/ مل.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية، *Giardia lamblia*.

المقدمة

يعد طفيلي *G. lamblia* أحد الاوالي المسوطة المسببة للاسهال حيث تصيب الاثنا عشري والجزء العلوي من الامعاء الدقيقة في الانسان وبعض الحيوانات، ومن الاعراض المرضية للمصاب هو الاسهال الدهني Steatorrhae وسوء امتصاص الدهون ومغص معوي مسببا مايعرف بداء الجيارديات Giardiasis [1]. ينتشر هذا الطفيلي في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق الصناعية المزدحمة والبيئات الفقيرة [2]. تبلغ نسبة انتشاره عالميا 1-30% كما ان له القدرة على احداث الاصابة في كل من الاشخاص الاصحاء وذوي الاعراض المرضية المختلفة على حد سواء، فهو يسبب حالات الاسهال لكل من حديثي الولادة والاطفال والبالغين حيث تصل الى الاصابة الحادة Acute والمزمنة Chronic [3].

يمر الطفيلي خلال دورة حياته بطورين اساسيين هما الطور الناشطة (Trophozoite) والطور المتكيس (Cyst) ويمثل الطور المعدي اذ تتم الاصابة بالطفيلي عن طريق تناول الطعام أو الماء الملوث بذلك الطور اذ يعد الماء من النواقل المهمة للمرض [4] يفتح الكيس في الجزء العلوي من الاثنا عشري بعملية التحرر من الكيس (Excystation) نتيجة لانتقاله من وسط قاعدي الى وسط متعادل وفيها تتحرر اثنان من الناشطات من كل كيس تلتصق بظهارة الامعاء وتستقر لفترة 1-8 ساعات [5]، بعدها تتكاثر الناشطات بالانشطار الثنائي الطولي وبعد بضعة ايام يلاحظ الملايين من الناشطات تغطي سطح زغابات الامعاء الدقيقة وتحت تأثير املاح الصفراء أو الحوامض الشحمية في الامعاء الدقيقة تخضع الناشطة للتكيس في الجزء البعيد من تجويف الامعاء الدقيقة وعبر المعي تخرج مع البراز [6]. ونظرا للاهمية الطبية لهذا الطفيلي تزايد الاهتمام باستخدام المستخلصات النباتية في علاج الاصابة بالطفيلي نظرا لما يحويه بعضها من مركبات تساعد في القضاء عليه فضلا عن كونها أقل ضررا واقل سمية من العقاقير الكيمياوية والهدف من هذه الدراسة هو ايجاد بدائل عن العقاقير الطبية وذلك باستخدام نوعين من المستخلصات النباتية وهما المستخلص المائي للفلفل الحار *C. frutescens* والمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان الاسود *granatum P.* والكشف عن تأثيرهما في القضاء على طفيلي *G. lamblia* خارج الجسم الحي (*in vitro*).

المواد وطرائق العمل

1- تحضير الوسط الزرعي (HSP-1)

حضر حسب طريقة Meyer [7] بأذابة المواد التالية:

المادة	الكمية
Phytone pepton	1 غم
L-cysteine hydrochlorid	0.15 غم
Glucose	0.05 غم
Hanks balanced salt solution	85 مل

عدل الأس الهيدروجيني للوسط pH = 6.7 وعقم في الموصدة لمدة 10 دقائق تحت ضغط 15 باوند /انج ودرجة حرارة 121 م.

1. أضيف مضادي البنسلين 500 وحدة/ مليلتر والستربتومايسين 50 وحدة/ مليلتر الى الوسط قبل الزرع مباشرة
2. اضيف مصل الانسان الى الوسط قبل الزرع مباشرة بعد التعقيم بالترشيح.
3. وضع في كل انبوبة 5 مليلترمن الوسط الزرعي المعقمة وحفضت بدرجة حرارة 4 م لغرض استخدامه لزرع طفيلي *G. lamblia*

2- تحضير المستخلصات المائية النباتية

حضرت المستخلصات المائية حسب طريقة Bedevian [8]، ذلك بأخذ 100 غم من مسحوق الفلفل الحار *C. frutescens* وقشور ثمار نبات الرمان الأسود *P. granatum* ووضع كلاً منهما على انفراد في دورق زجاجي سعة 500 مل يحوي 200 مل من الماء المقطر المغلي مع الخلط لمدة 15 دقيقة ترك الدورق ومحتوياته لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ورشح المحلول خلال قطعة قماش نظيفة ووضع الراشح في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة/ دقيقة لمدة عشر دقائق). أخذ الراشح ووضع في قناني زجاجية ووضعت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70 م لتجفيف المستخلص وبقاء المادة الصلبة، بعدها أخذ وزن من المادة الصلبة لتحضير التراكيز المطلوبة لإختبار تأثيرها كما مبين في [9] .

3- فحص العينات

أ- الفحص العياني

فحصت عينات الغائط عيانياً قبل فحصها مجهرياً وشمل الفحص قوامه Consistency ولونه Color فقد يحتوي على الدم Blood أو المخاط Mucus فيجب فحص هذه الأجزاء بصورة منفصلة وبعناية [10].

ب – الفحص بطريقة المسحة المباشرة.

تم في هذه الطريقة وضع قطرة من المحلول الفسيولوجي الإعتيادي Normal saline (0.9% كلوريد الصوديوم) على أحد جانبي شريحة زجاجية نظيفة وجافة وقطرة أخرى من محلول اليود Lugol's iodine على الجانب الآخر ثم أخذت كمية صغيرة من الغائط بواسطة عود خشبي ومزجت بشكل جيد مع قطرة من المحلول الفسيولوجي ومحلول اليود، وقد أخذت العينات من أماكن مختلفة من النموذج لزيادة إحتمال ظهور الطفيلي، ثم وضع غطاء الشريحة دون التسبب في حصول فقاعات هوائية بعد إزالة أية جسيمات كبيرة من العينة [11].

4- تنقية الطور المتكيس:

اعتمدت طريقة تنقية الطور المتكيس حسب طريقة Sheffield and Bjorvatan [12] مع بعض التحوير وكما يأتي:

1. خففت عينة البراز بنسبة 1 غم–10 مليلتر من الماء المقطر.
2. رشحت العينة بوساطة قطعة قماش نايلون، بعدها تم تصفية الراشح بوساطة مصفاة معدنية قطر الثقوب فيها بين 120–90 مليماكرون.
3. اخذ حوالي 4–5 مليلتر من العينة المرشحة ونبذت مركزيا 1800 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق.
4. خفف الراسب 1–10 مليلتر من الماء المقطر ونبذت مركزيا 1800 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق.
5. اضيف 4 مليلتر من الماء المقطر الى الراسب.
6. اعيدت هذه الطريقة ثلاث مرات.
7. علق الراسب بالماء المقطر 4 مليلتر ويحفظ بدرجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.
8. تم عد خلايا الطور المتكيس بوساطة شريحة عد كريات الدم (Haemocytometer) للحصول على 10^5 خلية / مليلتر.

5- التنمية المختبرية

بعد ان حضر الوسط الزرعي لطفيلي *G. lamblia* وسط (HPS-1) تم زرع عينة البراز كالاتي:

1. اخذ 1 مليلتر من العالق الحاوي على 10^5 خلية من الطور المتكيس الى الوسط الزرعي واضيف الى الوسط 3 مليلتر من مصل الانسان.
2. حضنت الانابيب الملقحة بدرجة 37ْم بصورة مائلة ولمدة ثلاثة ايام.
3. اجري فحص دوري ابتداءا من اليوم الثالث من الزرع، حيث تم أخذ قطرة من المزروع على شريحة زجاجية ووضع غطاء الشريحة وفحص بالمجهر الضوئي على قوة تكبير 400X ، اذ لوحظ وجود الطور الناشط وباعداد قليلة مع وجود الطور المتكيس.
4. اجريت عملية زرع ثانوي بعد عشرة ايام، تم عد الناشطات في الوسط في الايام الاولى 10^6 لغرض ادامة بقاء الطور الناشط يوميا على الاقل اذ اخذ من الوسط النامي 3 مل واهماله واضافة مليلتر من الوسط الجديد.

6- معاملة المستنبت بتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية النباتية

أ- تحديد تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار في بقاء الناشطات لطفيلي *G. lamblia*

1- تم فحص المزروع وحساب عدد خلايا الناشطات (12×10^6 ناشطة/ مل).

2- وضع المزروع في ست مجاميع من القناني الزجاجية المعقمة كل مجموعة مكونة من5 قناني يحوي 5 مليلتر من المزروع.

3- تم اضافة تراكيز مختلفة من مستخلص الفلفل الحار وهي (0.01، 0.05، 0.1، 0.5 1 ملغم/ مل) على التوالي، عدا المجموعة السادسة السيطرة الخالية من المستخلص.

4- وضعت القناني في الحاضنة مدة 24 ساعة بدرجة 37ْ .

تم حساب اعداد الطفيلي بأستخدام Haemocytometer وتحديد النسبة المئوية لحيوية الاطوار الناشطة للطفيلي حسب المعادلة التالية:

$$\%\text{ of live trophozoite}=\frac{\text{Number of live trophozoite}\times100}{\text{Total number of trophozoite}}$$

$$\%\text{ of dead trophozoite}=\frac{\text{Number of dead trophozoite}\times100}{\text{Total number of trophozoite}}$$

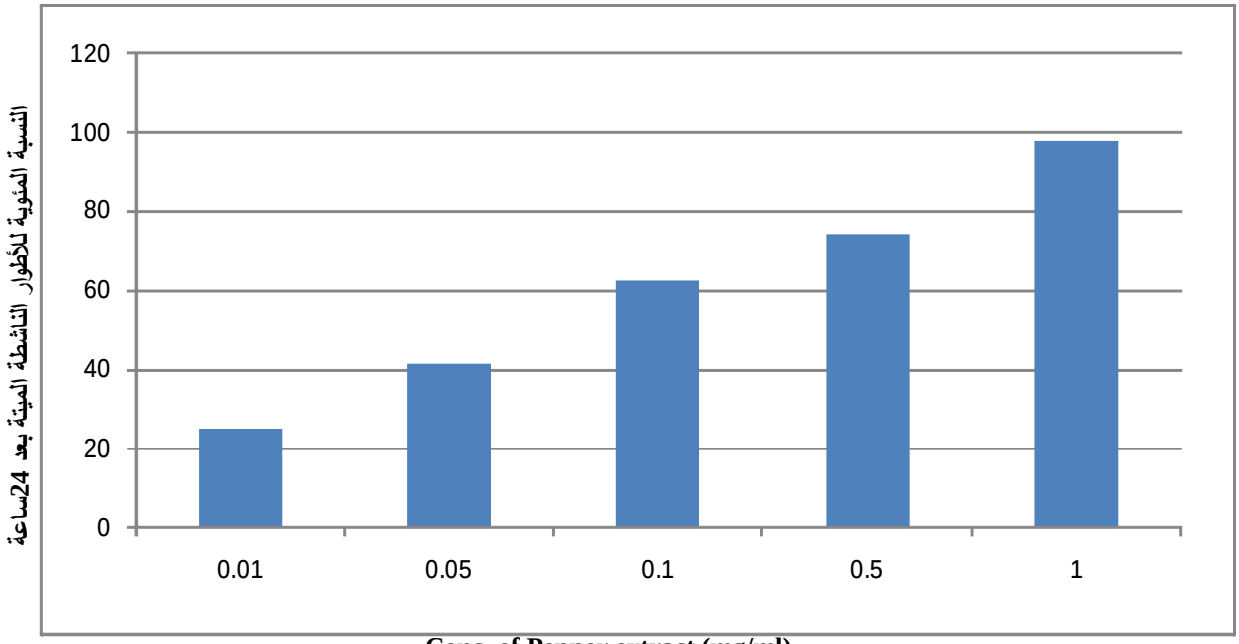
ب- تحديد تأثير المستخلص المائي لقشورثمار الرمان الاسود في بقاء الناشطات لطفيلي G. lamblia.

تم تحديد تأثير المستخلص المائي لقشور ثمار الرمان الاسود على الاطوار الناشطة للطفيلي واتبعت نفس الخطوات التي اتبعت مع المستخلص المائي للفلفل الحار.

النتائج والمناقشة

1- المستخلص المائي للفلفل الحار

تم التحري عن تأثير التراكيز المختلفة على الاطوار الناشطة لطفيلي *G. lamblia* بعد فترة حضانة 24 ساعة وأظهرت النتائج ان أدنى نسبة من الاطوار الناشطة الميتة وهي 24.84% كانت عند تركيز 0.01 ملغم/ مل من المستخلص في حين أرتفعت تلك النسبة عند التركيزين 0.05 و0.1 ملغم/ مل من المستخلص فكانت 41.35 و 62.66 % على التوالي لتصل أعلى قيمة لها عند التركيزين 0.5 و 1ملغم/مل من المستخلص اذ بلغت 74.32 % و 97.83% على التوالي (شكل 1).

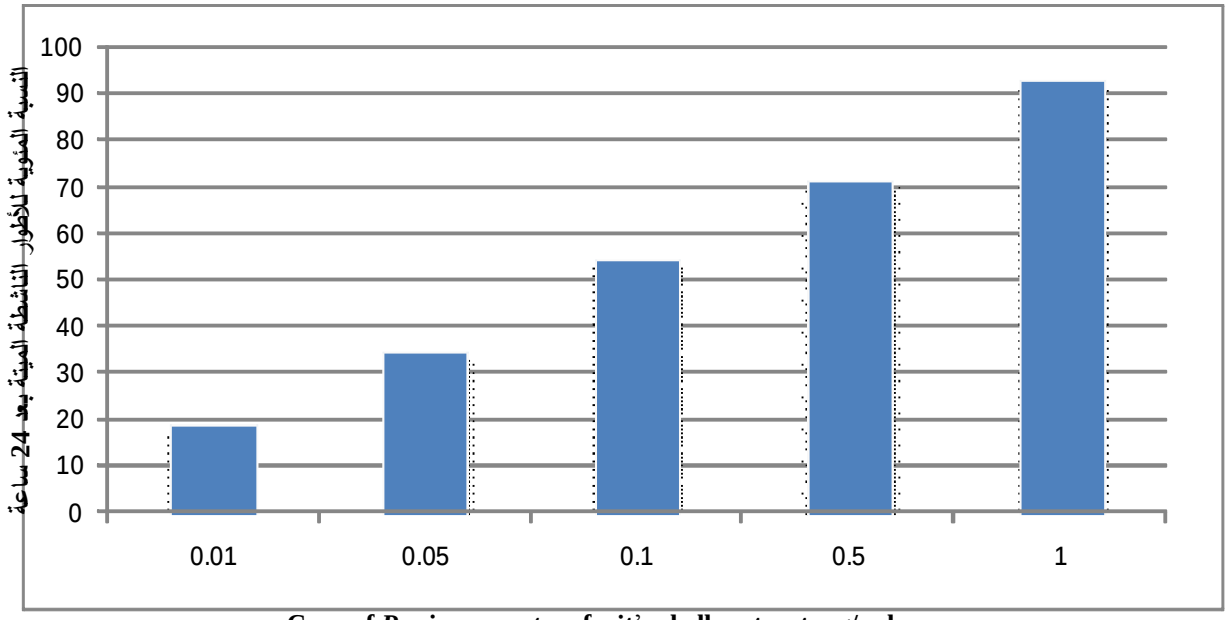


شكل (1) تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص المائي للفلفل الحار. على نسبة الاطوار الناشطة لطفيلي *G. lamblia*.

ومن النتائج اعلاه نلاحظ ان هناك تأثير مثبط للمستخلص المائي للفلفل الحار على طفيلي *G. lamblia* هذا التأثير يعود لعدة أسباب منها حامضية المستخلص المائي التي تصل الى (pH = 5.7) والتي تحول الوسط الزرعي المتعادل الى حامضي مايؤثر سلبا على نمو الطفيلي [5]، وقد يعود التأثير المثبط للمستخلص المائي للفلفل الحار الىالمركب الفعال فيه Capasaicin وهو ذو تأثير مضاد لكثيرمن الكائنات الحية ومنها الابتدائيات، Antiprotozoal وذلك بسبب محتواه من Terpenoides التي تقضي على طيف واسع من الميكروبات عن طريق ميكانيكية تحطيم الغشاء الخلوي لها [13،14].

2- المستخلص المائي لقشور ثمار الرمان الاسود

أظهرت النتائج ان تركيز1 ملغم/ مل من المستخلص المائي لقشور الرمان الاسود كانت فعالة في القضاء على الاطوارالناشطة للطفيلي بنسبة 92.44% بعد فترة حضانة مدتها 24 ساعة في حين كانت للتراكيز (0.05،0.01، 0.1، 0.5 ملغم/ مل) تأثير مثبط للاطوار الناشطة للطفيلي بنسبة (18.66، 34.22، 54.12،70.77%) على التوالي (شكل 2).



شكل (2) تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص المائي لقشور ثمار الرمان الاسود على نسبة الاطوار الناشطة لطفيلي *G. lamblia*.

يلاحظ من النتائج ان التأثير المثبط لمستخلص قشور الرمان الاسود على الاطوار الناشطة لطفيلي الجيارديا اللامبلية ربما يعزى الى محتواه الفعال من حامض التانيك الذي يستخدم لمعالجة الاسهال وهذايتوافق مع الكبيسي [15] كما اثبت Murthy [16] ان لمركبات Tannin المستخلصة من القشور والتي تبلغ نسبتها 25% فعالية عالية مضادة للاكسدة Antioxidant كذلك تعود الفعالية لقشور الرمان الاسود الى احتوائه على عدد من المركبات ذات الفعالية ضد المكروبية مثل مركبات Alkaloid Flavonoid, Polyphenol. [17] كما ذكر الكاتب [18] ان وجود الراتنجات والكلوكوسيدات في قشور الرمان لها دور فعال في منع المسببات المرضية المعوية كما أكد Ahmad [19] ان مركبات glycosides ذات فعالية ضد ميكروبية عالية من خلال ارتباطها بالبروتينات وتكوين معقد مع جدار الخلية مسببة تحطيمها. أن لقشور الرمان استخدام واسع كعلاج للاسهال وقابض للانسجة وطاردة للديدان وعلاج الام المعدة ومعظم اصابات القناة الهضمية [20].

References

[1] Gerald, D.and Robert, R. (2000). *Foundation of Parasitology*, 6ed: 297 pp.

[2] Agha Rodina, A..I. and Teodorescu, I. (2002). Prevalence of intestina parasites in three localities in Gaza governorates-Palestine. *Arch. Pub.Health*, 60: 363-370.

[3] Drora, F.; Natalya, B.;Ron,D.and Lechaim, N. (1999). *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: Risk factors and consequences.*Clin. Infect. Dis* 30:419-424.

[4] Mintz, E.D.; Hudson, M.; Cartter, M.L.and Hdler,J.L.(1993). F00d borne giardiasis in arborate office setting, *J. Infect. Dis.*, 167: 250-253

[5] Katelaris, P.; Naeem, A. and Farthingm, M.(1995).Attachment of *Giardia lamblia* trophozoite to acultured humen intestinal cell line *Gut*:37(4): 512-518

[6] Oberhuber,G. and Stolte, M. (1995). Histological detection of trophozoites of *Giardia lamblia* in the terminal Ileum. *J.Gastro enterol*., 30: 905-908.

[7] Meyer,E. A. (1976). *Giardia lamblia:* Isolation and axenic cultivation.*Exp. parasitol*., 39:101-103.

[8] Bedevian, A. K. (1994). *Illustrated polyglottic dictionary of plant names in Latin, Arabic, Armenian, English, French, German, Italian and Turkish languages including economic, medicinal, poisonous*

and ornamental plants and common weeds. Medbouly Library, Cario: 644 pp.

[9] الموسوي، أحمد محمد (2000). *تأثير مستخلصات نبات الشيح Artemisia herba-alba في الدودة الشريطية القزمة Hymenolepis nana في الفأر الأبيض*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل: 98 صفحة.

[10] حديدي، سيد (1996). *الكيمياء المرضية الجهازية*، الجزء الثاني. شعاع للنشر والعلوم، حلب: 276 صفحة.

[11] Cheesbrough, O. and McArthur, O. (1976). *A laboratory manual for rural tropical hospitals: Basis for training courses.* Churchill Livingstone, Edinburgh: 209 pp.

[12] Sheffield, H.G. and Bjorvatan, B. (1977). Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26 (1): 23-30

[13] Yu Sung; Yu Yuchang and Nilun Ting, (2005).Capsaicin biosyn theses in water stressed hot pepper fruits. Bot. Bull. Acad. Sin., (46): 35-42.

[14] Malgorzatz, 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.

[15] الكبيسي، علي حسين (2007) *تأثير المستخلصات المائية لبعض النباتات في تثبيط المسببات البكتيرية والطفيلية للإسهال في محافظة كربلاء*. اطروحة دكتوراه – كلية التربية ابن الهيثم – جامعة بغداد: 152 صفحة.

[16] Murthy, K. N. CH.; Jayaprakasha, G. K. and Singh, R. P. (2002) "Studies on antioxidant of pomegranate (*Punica granatum)*Peel extract using in vivo models" *J. Agriculture Food Chemistry.* 50 (17): 4791-4795.

[17] Lu, E. P.; Gokmen,V.and Artik, N.(2002). Oraganic acides and phenolic compound in pomegranate (*Punica granatum)*grown in Turkey. *J. Food composition and analysis.* 15 (5):567-575.

[18] الكاتب، يوسف منصور (2000). *تصنيف النباتات البذرية*، الطبعة الثانية. مطبعة جامعة الموصل: 584 صفحة.

[19] Ahmad, I. and Beg, A. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistance human pathogens *J.Ethnopharmacol.*47:113-123.

[20] Das, A. K.; Mandal, S.C.; Benerjee, S.K.; Sinha,S.; Das, J. and Pal, M. (1999). Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *J. Ethnopharmacol.* 68 (1-3): 205-208

Abstract

In vitro tests were carried out to investigate the efficacy of equals extracts of watery chilli pepper and pomegranate fruit's shells on the trophozoites of *G.lamblia* grown in HSP-1 medium at 37 ^{o}C. Different Concentrations of (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) of pepper and *granatum* watery extracts were added to 12×10^{6} trophozoite/ ml of *G. lamblia* and incubated for 24 hrs at 37 ^{o}C. Results showed that mortality percentage of trophozoites treated with pepper extract were (24.84, 41.35, 62.66, 74.32 and 97.83%) respectively. These percentages were close to those obtained from the treatment with pomegranate fruit's shells extract which were (19.53, 30.85, 42.26, 62.59 and 92.24%) respectively. These results showed that both watery extracts of pepper and pomegranate fruit's shells at concentration (0.5 and 1 mg/ml) had better effect in killing *G. lamblia* trophozoites.