Study The Effect of *Thymbra spicata* Extract In Infected Mice With *Entamoeba histolytica*

دراسة تأثير مستخلص نبات الزعتر *Thymbra spicata* في معالجة الفئران المصابة *Entamoeba histolytica*تجريبياً بطفيلي

* د. سبأ طاهر محمد
**م.م. سهام علي قاسم
***م.م.ميساء عبد اللطيف
**** م.م. صفاء صبري سالم

*فرع علم الحيوان/ علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
**فرع علم الحيوان/ علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
***فرع علم الحيوان/ قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
**** فرع علم الحيوان/ قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

الخلاصة :

هدفت الدراسة الحالية التحري عن امكانية استعمال مستخلص نبات الزعتر *Thymbra spicata* (المائي والزيتي) في معالجة الفئران المختبرية المصابة تجريبيا بطفيلي *Entamoeba histolytica* وبجرعة علاجية 0.1 مليلتر/ فأر وبمعدل ثلاث مرات في اليوم ومقارنتهما بالكفاءة العلاجية لعقار الميترونيدازول Metronedazol الذي اعطي بجرعة 0.005 ملغم/فأر /يوم. اظهرت الدراسة بان الكفاءة العلاجية المستخلص الزيتي لنبات الزعتر والتي بلغت 70.5% اعلى من المستخلص المائي والتي بلغت 59.7% ومتقاربة مع الكفاءة العلاجية لعقار الميترونيدازول والتي بلغت 77.8%.

Summary

This study aimed to know if can used the aqueous and oil extracts of *Thymbra spicata* as a treatment for laboratory mice that infected with *Entamoeba histolytica* parasite which inoculated 0.1 ml\mouse, triple time per day, and compared with curing efficiency of meteronidazole which inoculated 0.005 mg\mouse\day.

The study showed that the curing efficiency for oil *Thymbra spicata* which reach 70.5% higher than curing efficiency of aqueous extract which 59.7% and its closed value with curing efficiency of metronidazole drug which reach 77.8%.

المقدمـــة //

استعمل الاطباء العرب العديد من النباتات الطبية في علاج العديد من الامراض المستعصية، وقد استخدمت اما عن طريق الفم بهيئة مستخلصات نباتية او استخدمها البعض على هيئة مراهم (1) ومن بين تلك النباتات نبات الزعتر.*Thymbra* sp الذي ينتمي الى العائلة الشفوية Labiatae، وهو عبارة عن شجيرات صغيرة ذات سيقان رمادية واحيانا خضراء (2). ينمو الزعتر بريا في شمال العراق وفي تركيا وبلدان الشرق الاوسط وسوريا وبلاد الاناضول، وهو يستخدم بكثرة كنوع من انواع التوابل اذ يعرف محليا باسم Satar or Zatar الا ان اسمه العلمي .*Thymbra spicata* L ويمتاز بطعمه الحار ورائحته المميزة لوجودالمواد الفينولية (3) هنالك نوعين مهمين احدهما يعرف *Thymbra spicata* Var. spicata والاخر .*Thymbra spicata*Var Infricate (4).

تحتوي اوراق الزعتر على مالايقل عن 1-2% من وزنها زيوتا طيارة ومواد راتنجية ودباغية وصمغية ويحتوي زيته على Corvacol بنسبة 40.15% و Ama-terpinene بنسبة 26.56% وP-cymene 16.39% و Thymol 13.16%(5) .

وجد ان مادة Corvacol هو الزيت الاساسي الموجود في نبات الزعتر وهو مادة ذات فعالية مضادة للالتهاب في جسم الانسان (6)، كما اوضحت دراسات اخرى بانه غني بمادة الثايمول Thymol ذات فعالية اشد واقل سمية من الفينول، وهو يستعمل بشكل واسع في الطب الشعبي فهو يستعمل كمطهر ومقوي عام للجسم ومنبه وفي علاج السكر واوجاع المعدة وامراض البرد والزكام ولوجع الرأس والاسنان وفي معالجة قرحة الفم وكذلك يستخدم كطارد للديدان (7). يعمل نبات الزعتر كطارد للطفيليات الداخلية وخاصة الديدان المسطحة ،كما يعد زيته قاتل لجراثيم القولون وخصوصا الاميبا المسببة للزحار Dysentry وكذلك الطفيليات المعوية الاخرى مثل طفيلي *Giardia lamblia* (8).

حديثا انتجت عقارات مختلفة تحتوي على زيت الزعتر في تركيبها الاساسي واثبتت فعاليتها ضد الطفيليات واستخدمت في علاج الاسهال(9).

لذا فقد اجريت هذه الدراسة لمعرفة مدى امكانية استعمال مستخلصي نبات الزعتر (المائي والزيتي) في علاج الاسهال المتسبب عن طفيلي *Entamoeba histolytica* في الفئران.

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات :

جمعت 200 عينة من البراز من اطفال وبالغين يعانون من اسهال شديد من بعض المختبرات الاهلية في بغداد للفترة امتدت من شهر نيسان الى شهر تشرين الثاني للعام 2008ء، وضعت العينات في قناني نظيفة ومعقمة ثم حضرت مسحات من البراز باستعمال صبغة اللوكول ايودين Logole Iodine، ثم فحصت العينات تحت المجهر للتحري عن وجود الطور المتكيس لطفيلي *Entamoeba histolytica* .

واستخدمت العينات التي تحتوي على عدد كبير من الطفيلي وبمعدل (4-5) كيس في الحقل المجهري الواحد لتنقية الطور المتكيس .

تنقية الطور المتكيس :

اتبعت طريقة(Paulson (1982 (10) في تنقية الطور المتكيس ثم حضر عالق من اكياس الطفيلي بتركيز (1×10^3)كيس /مليلتر واستعملت مباشرة في تجريع الفئران.

تحضير مستخلصات نبات الزعتر :

تم الحصول على المستخلص الزيتي من احد المعاشب في بغداد،اما المستخلص المائي فلقد حضر حسب طريقة (1993) Anesini and Perez (11) وذلك باستعمال نبات الزعتر المحلي *Thymbra spicata* من نفس المعشب.

حيوانات التجربة:

استخدم24 فأر من ذكورالفئران السويسرية البيضاء ويتراوح عمرها مابين 10- 12 اسبوع وبوزن 20-25غم تم الحصول عليها من البيت الحيواني /طب النهرين ووضعت في اقفاص بلاستيكية وزودت بعليقة خاصة وبمياه شرب معقمة مع توفير درجة حرارة وتهوية مناسبتين. فحص براز الفئران قبل بدء التجربة للتأكد من خلوها من الاصابات المعوية الطفيلية.

تصميم التجربة :

1- ثبطت مناعة24 فأرا وذلك باستعمال عقار الدكساميثازون Dexamethazone المنتج من قبل شركة Medochmie) (LTD.Limassol_Cyprusاذ حقن بمقدار0.1 مل بالعضلة بجرعة 0.10 ملغم /فأر /يوم وطيلة مدة اجراء التجربة (12).

2- بعد 4-5 ايام جرعت الحيوانات بـ 0.1 مل من العالق وذلك باستعمال الانبوب المعدي Stomach tube من العينة المحضرة سابقا وليومين متتالية.

3- فحص براز الفئران المجرعة ابتداءا من اليوم الثاني بعد التجريع الى حين ظهور الطفيلي في البراز ،اذ حددت المدة قبل البائنة وعزلت الحيوانات المتشابهة في مددها البائنة وقسمت الى4 مجاميع وبمعدل 6 فأرات لكل مجموعة وكالاتي :

المجموعة الاولى :

جرعت بـ0.1 مل من المستخلص المائي لنبات الزعتر وبمعدل 3 مرات في اليوم.

المجموعة الثانية :

جرعت بـ 0.1 مل من المستخلص الزيتي لنبات الزعتر وبمعدل 3 مرات في اليوم.

المجموعة الثالثة:

جرعت بـ 0.1 مل من المحلول الحاوي على 0.005ملغم من عقار الميترونيدازول Flagyl وبمعدل 3 مرات.

المجموعة الرابعة:

جرعت بـ 0.1 مل من المحلول الملحي الفسلجي (Phosphate Buffer Solution) PBS وعدت كمجموعة سيطرة .

عزلت الفئران بشكل منفرد ثم جمع البراز وفحص ابتداءا من اليوم التالي من التجريع وذلك بتطبيق المعادلة والمتبعة من قبل Rayan,*etal.*,(13)

$$N= S / (Vol \times Wt)$$

حيث أن:

N : عدد أكياس البيض في غرام من البراز.

S : عدد أكياس البيض المحسوبة في الشريحة.

Vol: حجم العينة المحسوبة بـ(0.01) مل.

Wt: وزن عينة البراز المأخوذة (اغم)

كما تم قياس الكفاءة العلاجية لمستخلص الزعتر ومقارنتها مع عقار الميترونيدازول وذلك بتطبيق المعادلة التي استخدمها Xiao *etal.*, (14)

$$\text{كفاءة العلاج المستعمل \%} = \frac{\text{معدل عدد اكياس بيض الطفيلي في 1 غم من البراز للمجموعة العلاجية} - \text{معدل عدد اكياس بيض الطفيلي في 1 غم من البراز لمجموعة السيطرة}}{\text{(معدل عدد اكياس بيض الطفيلي في 1 غم من البراز لمجموعة السيطرة)}}$$

التحليل الاحصائي :

حللت النتائج باستعمال الفرق المعنوي الاصغرLeast Significant Difference عند مستوى($p<0.05$) ولقد ثبتت النتائج على شكل المعدل الحسابي ±الانحراف المعياري Standard Deviation.

References.

1. Lana, S. (2001). The Rapeutic uses of Herbs and Medicinal Plants in Traditional Arab medicine. J. The Arab Board of med. Specialization. 3(2): 60-65.
2. البياتي ، ميسون خضر عباس. (2001) دراسة تصنيفية مقارنة لانواع الاجناس Micromevia Benth و Thymus Ziziphora L. L. العائدة للعائلة الشفوية Labiatae في العراق . أطروحة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة – بنات \ تصنيف نباتات طبية - جامعة بغداد.
3. Ravid, H. and Putieersky, E. (1985). Compostion of Essential Oil of *Thymbra spicata* and *Saturja thymbra* Chemotype. Plant Medica. 65: 337-338.
4. Davis, P. H. (1982). *Thymbra* L. In. Davis, P. H. (ed), Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University Press, 7: 382-383.
5. Baser, K. H. C. (2002). Aromatic Biodiversity Among The Flowering Plant Taxa of Turkey. Journal of Herbs, Spies and Medicinal Plants. , 10: 49-61.
6. Toncer, O. and Kizil, S. (2005). Determination of Yield Components in Wild Thyme (*Thymbra spicata* L. var spicata) as Influenced Development Stages Hort. Sci. (Paragne), 32(3): 100-103.
7. Goven, A. C. ; Topcu, G. ;Blisel, G. and Bilsel, M. (2004) . Analysis of Essential Oil of Satureja Thymbra By Hydrodisllation, The rm Techniques and Its Antimicrobial Activity. Nat. Prod. Res. 18(2): 189-95.
8. Githiori, J. B. Athana Siadous, S. and Thamsborg, S. M. (2006). Use of Plants In Novel. Approaches For Control of Gastrointestinal Helminthes. InLiveStock with Emphasis on Small Ruminant. Vet. Parasite. 139(4): 308-320.
9. Jacobs, J.; Jimenez, M. and Malthouse, S. (2000). Homeopathic treatment of acute childhood diarrhea : Results from clinical trail in Nepal. J. Atern. Complement. Med., 6(2): 131-139.
10. Paulson, M. (1982) . An accurate Method For The Numerical Determination of *Entamoeba histolytica* invitro and Its Possible Use with other Intestinal Protozoa Suggested Clinical Application. Amer. J. Troph. Med. 12: 387-394.
11. Anesini, C. and Perez, C. (1993). Screening of Plants Used In Argentin Falk medicine For Antimicrobial Activity. J. Ethnopharma. , 39(20): 119-128.
12. Regh, J. E. (1996). Effect of Interferony in Experimental *Cryptosporidium parvum* Infection. J. Infect. Dis. 174. 229-232.
13. Rayan, M. ; Carol, C. Tim, A. and Olsan, D. (1999). Duration of Naturally Acquired Giardiasis and Cryptosporidiosis in Dairy Calves and Their Association with Diarrhea J. Amer. Vet. Med. Assoc. , 214(3): 391-396.
14. Xiao, L. Saeed, K. and Rings, D. (1996). Efficacy of Albendazole and Fenbendazole Against *Giardia* Infection in Cattle. Vet. Parasitol. , 61: 165-170.

15. Marina, S. ;Jelena, V. ;Petar, M. and Dejan, B. (2009). Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities. Journal and Publication Information. Vol. 14(issuel): 238-249.
16. Fujita, M. ;Shiota, S. ; Kuroda, T. Hatana, T. ; Yoshida, T. and Suchiya, T. (2005). Remarkable Synergies Between Baicalein and Tetracycline and Baicalein and Betalactums Against Methicillin –Resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 49: 391-396.
17. Mikus, J. ; Harkenthal, M. ; Steverding D. and Reichling, J. (2000) . Invitro Effect of Essential Oils and Isolated mono- and Sesquiter penes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei.* Planta. Med. 66: 366-368.
18. Santaro, G. F. ; DasGracas Cardoso, M. ; Salgado, A. P. and Soares, M. J. (2007). Effect of Oregano (*Oreganum vulgare* L.)and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils on *(Trypanosoma cruzi*) (Protozoa . Kinetoplastida Growth and Ultrastructure. Parasitol. Res. 100: 783-790.
19. Calzada, F. ;MulinaL. And Aguilar, A. (2006). Invitro Susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to Plants Used in Mexican Traditional Medicine For The Treatment of Gastrointestnal Disorders. J. Ethnopharmacol. 108: 367-370.
20. Behnia, M. ;Haghighi, A. ;Komeylizadeh, H. Tabaei, S. J. and Abadi, A. (2008). Inhibitory Effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on Invitro Growth of *Entamoeba histolytica* . Korean J. Parasitol. 46(3): 153-156.
21. Lee, S. J. ; Umano, K. ; Shibamoto, T. and Lee, K. G. (2005). Identification of Volatile Components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and Thyme leaves (*Thymus vulgaris*L.) and Their Antioxidant Properties. Food. Chemistry. 91: 131-137.
22. Goodher, K. L. ; Mahattanatwaee, K. ; Plotto, A. ;Sotomayor, J. A. and Jordan, M. J. (2006). Aromatic Profiles of Thymus Hyemalis and Spanish *Thymus Vulgaris* Essential Oils. By Gc-ms/Gc-o. Indust. Crops. Prod. 24: 264-268.
23. Soffar, S. A. ;Metural, D. M. ;Abdel-Aziz, S. S. (2001). Evalution of The Effect of Plant Alkaloid (berberine derived from *Berberis aristata*) on *Trichomonas vagjinalis* invitro. J. Egypt. Soc. Parasitol. 31: 989-904.

جدول –1– : معدل اعداد طفيلي *Entamoeba histolytica* المطروحة من المجاميع المعالجة خلال مدة العلاج

المجاميع	نوع العلاج	الجرعة المستخدمة	أيام بعد العلاج								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
م 1 *	المستخلص الزيتي	0.1 مليلتر	450.0± 104.9	1400± 261	666.7± 163.3	116.7± 98.3	0	0				
م 2*	المستخلص المائي	0.1 مليلتر	600.0± 154.9	1400± 261	916.7± 147.2	550.0± 187.1	133.3± 121.1	0	0			
م 3*	الميترونيدازول (الفلاجيل)	0.005ملغم	366.7± 103.3	933.3± 121.1	633.3± 163.3	116.7± 98.3	0	0				
م 4*	PBS السيطرة	0.1 مليلتر	583.3± 147.2	1166.7± 163.3	1450.0± 104.9	1800.0± 141.4	1416.7± 172.2	1116.7± 116.9	916.7± 116.9	400.0± 141.4	116.7± 75.3	0

* وجود فرق معنوي بمستوى ($p<0.005$) بين المجاميع

جدول –2– الكفاءة العلاجية لجرع مستخلص نبات الزعتر مقارنة بعقار الميترونيدازول

نوع العلاج	الكفاءة العلاجية
المستخلص الزيتي للزعتر	% 70.5
المستخلص المائي للزعتر	% 59.7
الميترونيدازول(الفلاجيل)	% 77.84