تأثير الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر *Camellia sinensis* على الخمج التجريبي بالاميبا الحالة للنسج *Entamoeba histolytica* في الفئران المختبرية.

الهام عائد اسعد التكريتي* ومروان عبد الهادي حسين الجنابي**

*قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة تكريت ** قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة تكريت

الملخـص

عزلت المادة الفعالة الكافيين من الاوراق الجافة للشاي الأخضر *Camellia sinensis* ، واظهرت نتائج جهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء بأستخدام متحول فورييه FTIR، مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية UV و جهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء HPLC ان المادة المعزولة هي الكافيين، وحددت نقاوتها بالمقارنة مع الكافيين القياسي، وبلغ مقدار الجرعة القاتلة LD_{50} للمادة الفعالة الكافيين 125 mg/kg بعد 48 ساعة من تجريعها للفئران المختبرية، واوضحت النتائج تاثير التراكيز المختلفة للمادة الفعالة الكافيين، على التغيرات النسيجية لقولون الفئران المختبرية المخمجة عن طريق التجريع الفموي بعالق الأميبا *Entamoeba histolytica*، وعلى عدد الاكياس المطروحة مع الغائط يوميا لمدة 7 ايام، إذ لوحظت التغيرات النسيجية في قولون الفئران المعاملة كانت اما زيادة في عدد الخلايا الكاسية، أو افراز كميات كبيرة من مادة الميوسين وارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية، واظهر التركيز العالي 10 mg/kg مادة الفعالة الكافيين أعلى تاثير معنوي في التقليل من عدد الأكياس المطروحة مع الغائط في التراكيز الثلاثة للمستخلصات، اذ بلغت نسبة الاكياس المطروحة بعد المعاملة بالتركيز العالي 10 mg/kg للمستخلص المائي 31.25 % و 50.00 % في التركيز المتوسط 5 mg/kg للمستخلص الكحولي و 81.25 % في التركيز الواطئ 2.5 mg/kg للمادة الفعالة (الكافيين).

الكلمات المفتاحية:
الشاي الاخضر، الكافيين، الاصابات الطفيلية، الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*

للمراسلة :
مروان عبدالهادي الجنابي
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت ، العراق .
البريد الالكتروني :
marrrwan@gmail.com

The Effect of Caffeine Extracted From Green Tea *Camellia Sinensis* on Experimental Infection of *Entamoeba histolytica* in Laboratory Mice.

Ilham A. A. Altikrity* and Marwan A. H. Aljanabi**

*Dep. Biology- Sciences College - Tikrit Uni. **Dep. of Biology- College of Education for Pure Sciences – Tikrit Uni.

ABSTRACT

The active compound (caffeine) was isolated from dry leaves of green tea *Camellia sinensis* , and the isolation confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy FTIR, UV/VIS scanning spectrophotometer UV and High Performance Liquid Chromatography HPLC. The caffeine purity was identified by comparing with standard caffeine, the lethal dose LD_{50} of the caffeine was 125mg/kg after 48 hours of dosage, The results showed the effect of different concentrations of the active compound (caffeine), on the histological changes of the infected mice colon, and on the number of cysts that released with the feces daily for 7 days, these results showed that the infected colon of the treated mice were either recovered to the normal histological condition, or an increase in the number of under laying cells, secretion of high quantities of mucin and few leaching of inflammatory cells. The first concentration of caffeine, showed significant effect in reducing the number of the released cysts among the three concentrations of caffeine, as the percentage of the released cysts after treatment (31.25%, 50.00% and 81.25%) respectively.

Key words:
Green tea, Caffeine, parasitic infections, *Entamoeba histolytica*.

Correspondence:
M.A. Aljanabi
Dep. of Biology- College of Education for Pure Sciences – Tikrit Uni.- **IRAQ.**

E-mail:
marrrwan@gmail.com

المقدمة :

طفيلي *Entamoeba histolytica* من الطفيليات الشائعة في العراق والعالم ويسبب داء المتحولات الاميبي والزحار الاميبي والتهاب الكبد الاميبي ، تقدر عدد الاصابات بهذا الطفيلي (50) مليون شخص في العالم و يسبب (110. 000) حالة وفاة سنويا، وتأتي الاصابة بهذا الطفيلي بالمرتبة الثانية بعد الملاريا Malaria من بين الاصابات الطفيلية والتي تسبب حالات الوفيات سنويا [2,1] .ينتشر الخمج بهذا الطفيل ويتوطن في الدول الفقيرة والنامية بسبب تدني التجهيزات الصحية وتلوث مياه الشرب والغذاء بمياه الصرف الصحي ومن ثم تلوثه بالفضلات الحاوية على اكياس الطفيل رباعية النواة المعدية [3]. يعد هذا الطفيلي من الطفيليات وحيدة الخلية حقيقية النواة ويعد الأنسان المضيف الطبيعي له [4] وقد يصيب الحيوانات الأخرى مثل القردة والكلاب وأحيانا الخنازير اذ تشكل هذه الحيوانات مصدراً ضئيلاً لنقل الخمج للأنسان قياساً بالأنتقال المباشر من أنسان الى آخر [5] كما يصيب ايضاً عدداً من اللبائن مثل القطط [6]. ظهر الأميبا في الغائط بعدة أشكال، الشكل المتحرك وهو الطور المتغذي أو الخضري Trophozoite والشكل ما قبل التكيس Precyst والشكل المتكيس Cyst وهو الطور المعدي Infective stage والمسؤول عن انتقال العدوى من شخص الى آخر، تتوطن الأطوار المتغذية في الأمعاء الغليظة للإنسان إذ لها القدرة على مهاجمة الطبقة المخاطية Mucosa والطبقة تحت المخاطية Submucosa ولها القابلية على إحداث التحلل الخلوي Cytolysis وتحلل الأنسجة Histolysis وذلك بإفراز مواد سامة تحلل وتحطم الطبقة المخاطية للأمعاء ثم تتغذى على الأنسجة المتحللة وكريات الدم الحمر والبكتريا الطبيعية Bacterial flora في الأمعاء، و يحدث نتيجة لذلك التنخر Necrosis في بطانة الأمعاء، وهذا مايمكن الاميبا من الأنتقال الى باقي أنحاء الجسم عن طريق مجرى الدم وبشكل أساسي الى الكبد [8,7]. 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 من نمو الطفيلي وكذلك تساعد في القضاء على القرح المعوية وشفاءها [12,11,10,9]، الشاي الأخضر هو واحد من المشروبات الأكثر استهلاكا على نطاق واسع في البلدان الآسيوية، وكان مألوفا في الصين واليابان من قرون [13]، واكتشفه بالصدفة امبراطور الصين Shen Nung في 2737 قبل الميلاد وسماه الامبراطور بالجنة المرسلة [14]. ولاتعرف خطورة صحية من تناوله من قبل الإنسان، [15]. ان استعراض الدراسات الأخيرة على الانسان تنص على أن الشاي الأخضر قد يقلل من أمراض القلب والشرايين وبعض أنواع السرطان، وتعزيز صحة الفم، والحد من ارتفاع ضغط الدم، ويساعد في السيطرة على وزن الجسم، ويمتلك خصائص مضادة للجراثيم والفيروسات، ويقدم حماية ضد الأشعة فوق البنفسجية ، وزيادة كثافة المعادن في العظام [16]. وله اثر في الحد من امتصاص الدهون lipids والكوليسترول cholesterols في القناة الهضمية gastrointestinal tract [17]، كما إن حامض الاسكوربيك ascorbic acid والفينولات المتعددة الكاتكينية وخاصة epigallocatechin gallate الموجودة في الشاي الاخضر هي المسؤولة عن القوة المضادة للاكسدة [18]، وأظهرت مادة Epigallocatechin انها تخفض تراكيز الكولسترول الخلوية cellular cholesterol خارج جسم الكائن الحي *In vitro*، و الكاتكين المستخلص من الشاي الاخضر يخفض مستويات الكولسترول البلازمية plasma cholesterol في جسم الكائن الحي *In vivo* [19]، وتثبط بوليفينولات الشاي الاخضر والاسود نمو الخلايا cell growth وتحفز موت الخلايا المبرمج induce apoptosis لخلايا سرطان عنق الرحم في الاناث [20]. الشاي الاخضر له تاثير مضاد لداء السكري [21]، وأظهرت ثلاث دراسات خارج جسم الكائن الحي أن epigallocatechin تثبط تكرار فيروس نقص المناعة البشرية HIV replication [22]، والكافيين هو قلويد بلوري مر الطعم يوجد بكميات متفاوتة في أوراق وحبوب وفاكهة أكثر من 60 نبتة، إذ يعمل مبيداً للآفات الطبيعية [23]، عَزَلَ الكافيين لاول مرة Friedlieb Ferdinand Runge [24] عام 1820 م، وبعد 80 عام حصل عليه عن طريق التركيب Emil Fischer [25] وهو يحتل أهمية في مجموعة متنوعة من المجالات، ومن المثير للاهتمام انه لم يتوصل الى التركيب البلوري للكافيين الا في عام 2007 [27,26]، ويوجد الكافيين على شكلين بلوريين، يكون الشكل غير المنتظم R-form في درجة الحرارة

العالية، وشكل β-form في درجة حرارة الغرفة [28]. وله تاثير منشط على المزاج والأداء المعرفي [29]، وله تأثير كل من الاوعية الدموية الدماغية، وضغط الدم، وعمل الجهاز التنفسي، وعمل المعدة، والقولون، وحجم البول، و أداء التمارين الرياضية [30]، ان 200–300 ملغم من الكافيين نفسها تعمل على تعزيز مشاعر السعادة، وتحسين التركيز، وزيادة الشهوة والطاقة [31]، ويستخدم الكافيين للعلاج والوقاية من انقطاع النفس عند الخدج، لأنه يقلل من تكرار انقطاع النفس والحاجة إلى التهوية الميكانيكية خلال الأيام السبعة الأولى من العلاج [33,32]، والكافيين لديه العديد من المزايا أكثر من الثيوفيلين، ويعد أحسن من ميثيل بسبب مؤشراته العلاجية الواسعة [34].

ونظرا لعدم وجود دراسات في العراق حول مدى تأثير الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر *Camellia sinensis* على طفيلي الزحار الاميبي اجريت هذه الدراسة للكشف عن تاثير الكافيين على الطفيلي داخل الجسم الحي *In vivo* .

المواد وطرائق العمل :

1- جمع عينات الغائط :

جمعت (1712) عينة غائط خلال المدة التي امتدت من 2011/10/1 ولغاية 2012/10/19 من الاطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي في مدينة بغداد الذين يعانون من إسهال شديد الى متوسط وفي معظم الحالات يعانون من إسهال دموي. وضعت العينات في حاويات معقمة ذات فتحة واسعة مزودة بسداد محكم للحفاظ على رطوبة العينة ومنع جفافها ،وأعطيت أرقام متسلسلة مع كتابة الاسم والعمر والجنس والمكان.

2- فحص العينات :

فحصت العينات خلال نصف ساعة من وصولها المختبر مع الحرص عند الفحص الأخذ من المناطق الحاوية على الدم أو المخاط بحثاً عن وجود الطور المتغذي المسؤول عن حدوث حالة الإصابة بالطفيلي فالطور المتغذي غالباً ما يلاحظ في العينات الطرية ونادراً ما يلاحظ في الغائط الصلب كامل التكوين أو شبه الصلب الذي يحوي عادة على الطور المتكيس مع ملاحظة احتواء العينة على الدم أو المخاط إذ غالباً ما يشير وجودها إلى حدوث إصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج [35] باحدى الطرق التالية:

2-1 الطريقة المباشرة :

فحصت العينات بطريقة المسحة المباشرة بأستخدام طريقة [36].

2-2 طريقة التطويف بكبريتات الخارصين :

يمزج 1-2 غم من الغائط في كمية كافية من الماء المقطر بواسطة قضيب زجاجي لتحرير الاكياس من الغائط. ثم يرشح المزيج من خلال اربع طبقات من الشاش وبعدها ينقل الراشح الى انابيب الاختبار وتوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 1000 (دورة /دقيقة).يطرح الطافي من انابيب الاختبار ويضاف محلول كبريتات الخارصين الى الراسب ثم تعاد انابيب الاختبار لجهاز الطرد المركزي لنفس السرعة والمدة. يسحب الطافي بواسطة ماصة باستور وينقل الطافي الى انابيب اختبار حاوية على ماء معقم ثم تعاد لجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 500 (دورة /دقيقة). ينقل الراسب الى انابيب حاوية على 2 ml من محلول دارئ الفوسفات الملحي ويحفظ بدرجة حرارة 4° لحين الاستعماله في تجريع الفئران المختبرية [37].

2-3 طريقة التطويف بمحلول السكروز :

تتبع نفس الخطوات في الفقرة السابقة مع استعمال محلول السكروز بدلا من محلول كبريتات الخارصين [38].

3- جمع العينات النباتية :

جلبت كمية من الشاي الاخضر من الاسواق المحلية في الدورة – بغداد وأثبت أن *Camellia sinensis* هو الاسم العلمي الحالي للشاي الاخضر، إذ صنف هذا النبات الأستاذ الدكتور علي حسين الموسوي ، قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد ثم جهزت الاوراق لاستخلاص المادة الفعالة (الكافيين) منها.

4- استخلاص المادة الفعالة الكافيين من الشاي الاخضر :

أُخذ 10 g من اوراق الشاي الاخضر ووضعت في دورق مخروطي مع 100 ml من الماء المقطر، و 10 g من كاربونات الكالسيوم، وسخن المزيج حتى الغليان لمدة 25 دقيقة، ورشح بعد ذلك بواسطة قمع بخنر، ونقل الراشح الى قمع الفصل، حجم 250 ml ، وأُضيف 80 ml من الكلوروفورم ورج المزيج بلطف لمدة 5 دقائق، ثم ترك ليستقر، وتنفصل طبقة الكلوروفورم عن الطبقة المائية، جمعت طبقة الكلوروفورم في دورق زجاجي حجم 100 ml، ونقلت الى الحمام المائي لحين تبخر الكلوروفورم. وغسلت البلورات الناتجة عن تبخر الكلوروفورم بالايثانول الساخن 95 % لقابلية ذوبان الكافيين فيه ورشح من خلال قمع بخنر وبرد وجمع الراشح في جفنة، وترك حتى الجفاف [39].

5- تشخيص الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر :

5-1- تشخيص الكافيين بجهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء بأستخدام متحول فورييه Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy :

تخلط كمية من المادة المراد فحصها 2 mg – 1 مع بروميد البوتاسيوم KBr اللاعضوي 200 mg – 100، ويجب ان تكون هذه المادة جافة تماما، وطحنت المادتان معا ثم توضعان بشكل متجانس على قرص دائري لعمل قرص FTIR، ويسلط عليهما ضغط بحدود (10 – 15 طن) لكي يتصلب هذا القرص، وضع بعد ذلك في الحامل الخاص في جهاز الـ FTIR نوع Shimadzu موديل IRPrestige 21، وسجل طيف المادة المراد فحصها من خلال برنامج IRsolution الموجود في الحاسبة المربوط بها الجهاز،ولايحتوي القرص على أكثر من 2 % من المادة المراد فحصها [41,40].

5-2- تشخيص الكافيين بجهازمطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية Ultraviolet scanning spectrophotometer (UV) :

استعمل جهاز Philips PU 8720 UV/VIS scanning spectrophotometer في فحص قمية الـ UV لكل من الكافيين القياسي والكافيين المستخلص من الشاي الاخضر واستخدم الكلوروفورم مذيباً للعينات وحُضرت العينات وفحصت من قبل تقني في وزارة العلوم والتكنلوجيا/ دائرة البيئة والمياه.

5-3- تشخيص الكافيين بجهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) :

فحصت العينات بجهاز HPLC نوع (Syknm) المكون من خمس وحدات، وهي الموضحة في الجدول 1، والمربوط بحاسبة نوع (LG Flatron w1942se) مع طابعة نوع (Canon)، وتقوم الحاسبة بتسجيل الكروماتوكرام على الشاشة وقياس عدة عوامل، منها زمن الاحتجاز ومساحة الحزمة في آن واحد، ويمكن خزن عدد هائل من النتائج في الحاسبة واستدعاء اي كروماتوكرام في اي وقت، والجهاز مزود بعمود Column نوع C_{18}، أبعاده 25 cm × 0.46، ويتكون الطور المتحرك Mobile phase من الأسيتونتريل وماء بنسبة (25:75) ذي معدل جريان Flow Rate (1 ml/min) بدرجة حرارة 25°وحُضرت العينات وفحصت من قبل تقني في وزارة العلوم والتكنلوجيا/ دائرة البيئة والمياه.

جدول 1. يوضح وحدات جهاز الـ HPLC

اسم الوحدة	الموديل	النوع
Solvent Delivery System	S 1122	Syknm
Sample injector	S 5200	Syknm
Column Thermo Controller	S 4011	Syknm
UV/VIS Detector	S 3210	Syknm
UV/VIS Multichannel Detector	S 3240	Syknm

6- حيوانات التجربة :

إستخدم 56 فأراً من نوع *Mus musculus* سلالة Balb/C (ذكور)، وبعمر 6-8 أسابيع ووزن (20±5) غراماً، وفرت الظروف البيئية المناسبة لهذه الحيوانات خلال مدة الدراسة وقسمت الى:

6-1- مجموعة الفئران المعاملة بالمادة الفعالة الكافيين :

قسمت الفئران الى 4 مجاميع في كل مجموعة 5 فئران جرعت ثلاث مجاميع منها عن طريق الفم بالعالق الاميبي 0.1 مليلتر والحاوي على 1000 كيس باستخدام محقنة محورة ، وذلك بإدخال المحقنة إلى الفم، ودفع السائل الحاوي على الأكياس. وبالطريقة نفسها تم تجريع المجموعة الرابعة حيوانات السيطرة السالبة بالمحلول الملحي الطبيعي.بعد ظهور الخمج بالطفيلي عوملت المجاميع بالتراكيز (75,50.25) غم/كغم من الكافيين المستخلص .

6-2- مجموعة اختبار الجرعة القاتلة للكافيين LD_{50} :

قسمت الفئران الى 6 مجاميع في كل مجموعة 6 فئران جرعت المجموعة الأولى (مجموعة السيطرة السالبة) بالمحلول الملحي الطبيعي عن طريق الفم واعطيت بالطريقة نفسها جرع متدرجة من المادة الفعالة الكافيين (25، 50، 75، 100، 125) غم/كغم لحيوانات المجاميع الاخرى (G1, G2, G3, G4, G5) على التوالي وسجلت الوفيات الحاصلة بعد مراقبتها لمدة 48 ساعة [42].

7- الدراسة النسجية Histological study :

حضرت المقاطع النسجية حسب ما جاء في [45,44,43].

النتائج والمناقشة :

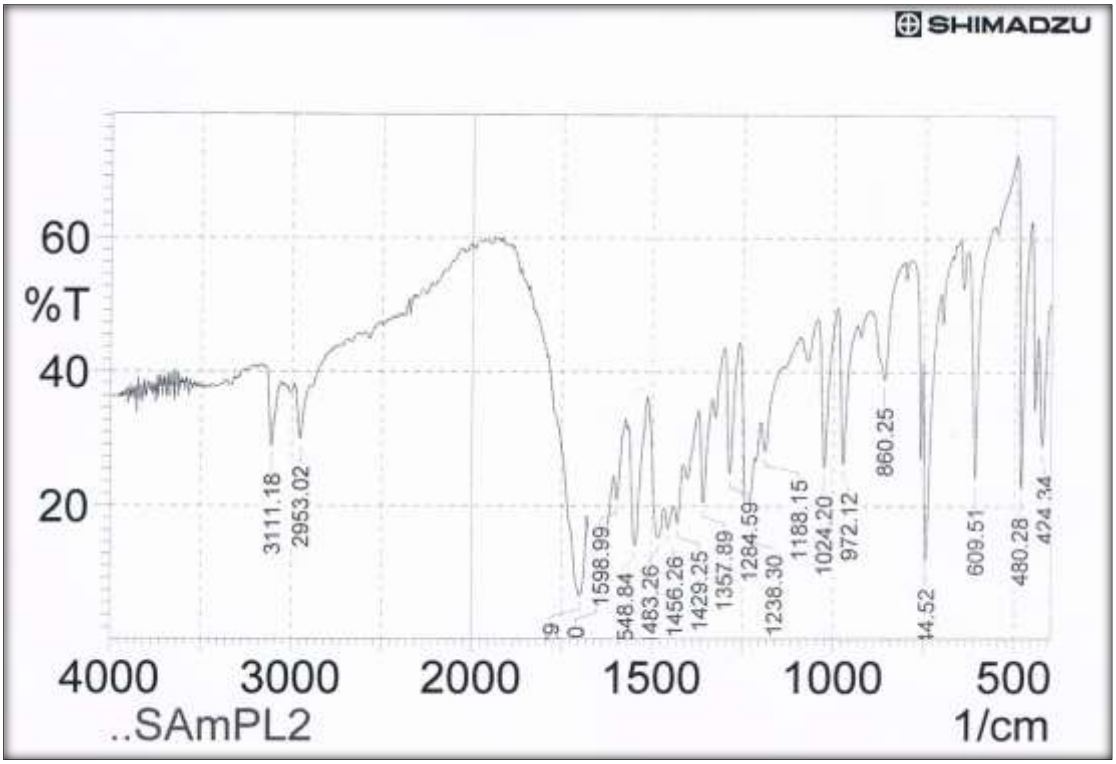
تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بوساطة تقنية FTIR :

شخص الكافيين القياسي المستخلص من الشاي الاخضر بجهاز الـ FTIR وأظهرت النتائج ارقام القمم التشخيصية التي تعود الى الاواصر بين ذرات الكافيين وهوما موضح في الجدول 2.

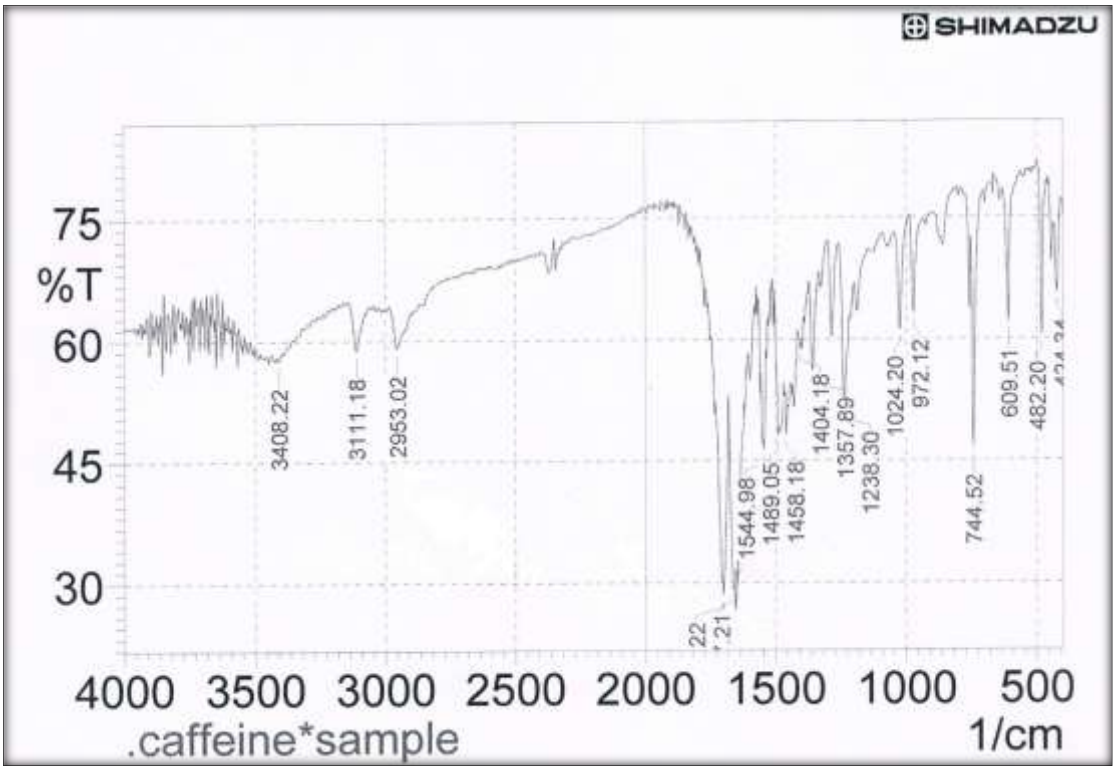
جدول 2. يوضح ارقام القمم للاواصر وحركة الذرات وقوتها.

رقم القمة	الاصرة	حركة الذرات	قوة الحركة
860 و 972	=C-H	Bend	Strong
1024 و 1188 و1238	C-N	Stretch	Medium
1357	C-H	Bend	Medium
1284	C-N	Stretch	Strong
1701	C=O	Stretch	Strong
2953	C-H	Stretch	Medium
860 و 972	=C-H	Bend	Strong
1024 و 1188 و1238	C-N	Stretch	Medium

ويبين الشكلان 1 و2 وجود تطابق بين طيفي الكافيين القياسي المستخلص من الشاي الاخضر، ويدل هذا على نقاوة المستخلص.

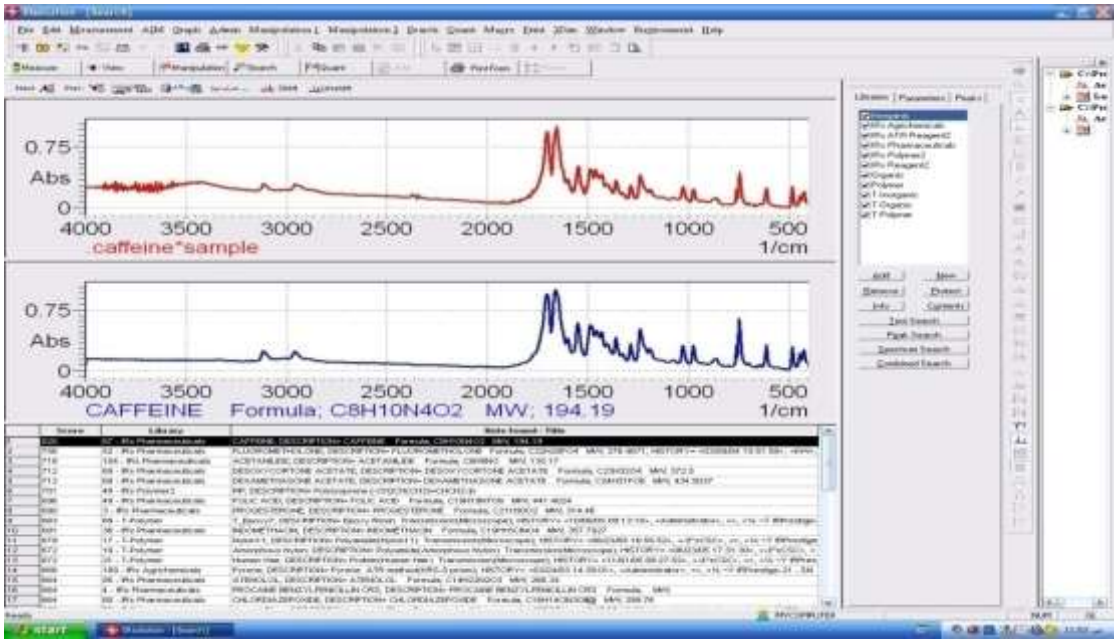


شكل 1. مقطع طيف الكافيين القياسي



شكل 2. طيف الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر

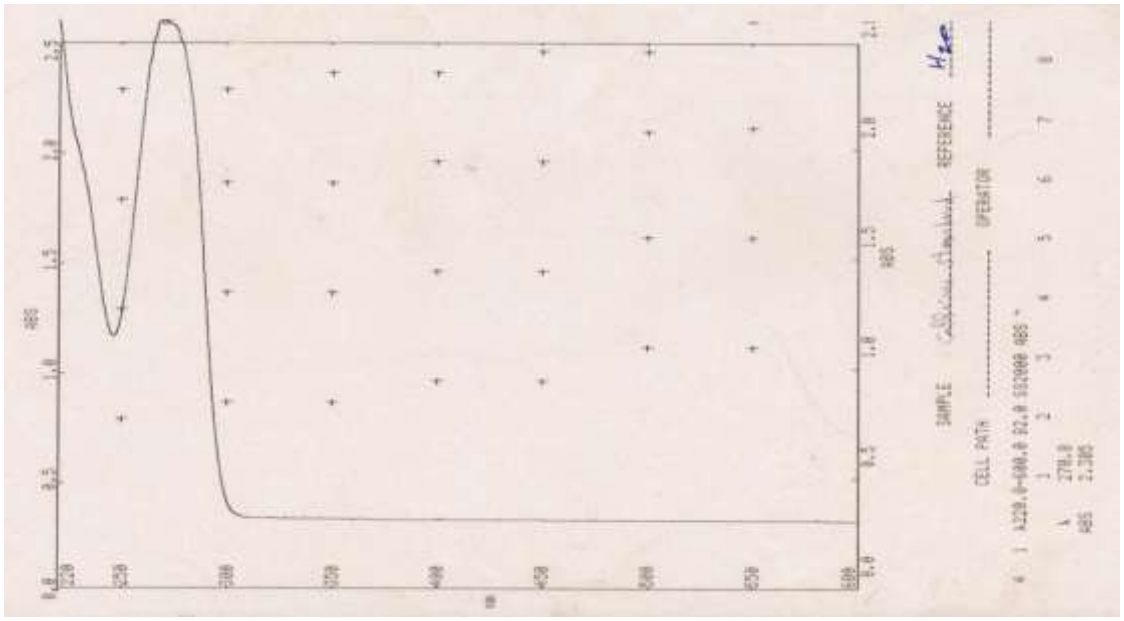
ويوضح الشكل 3 وجود تطابق بين طيف المستخلص والطيف الموجود في قاعدة بيانات الجهاز المخزونة في الشركة Shimadzu المجهزة للجهاز.



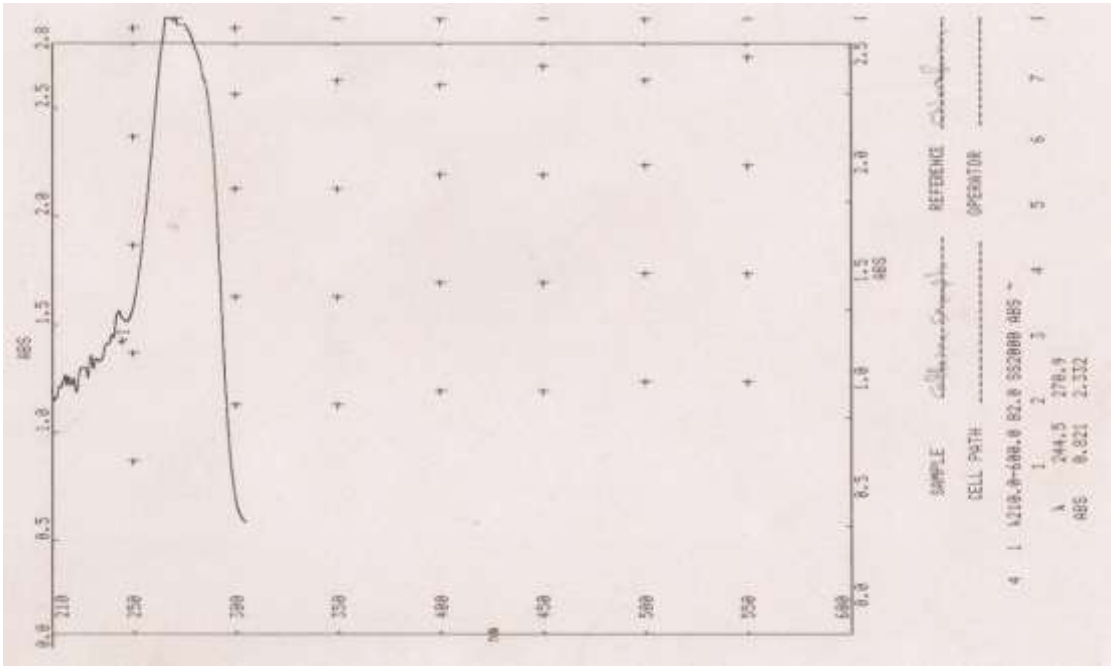
شكل 3. يوضح التطابق بين طيف الكافيين المستخلص والطيف المخزن بالجهاز.

تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بوساطة تقنية UV :

سجلت قيمة الـ UV للكافيين القياسي، وقورنت مع قيمة الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر، وكانت النسبة متقاربة لكل من الكافيين القياسي، اذ بلغت 270.8، والكافيين المستخلص، إذ بلغت 270.9، وهو ما يوضحه الشكلان 4 و5.



الشكل 4. يوضح طيف الـ UV للكافيين القياسي حيث x يمثل الطول الموجي و y يمثل الامتصاصية.



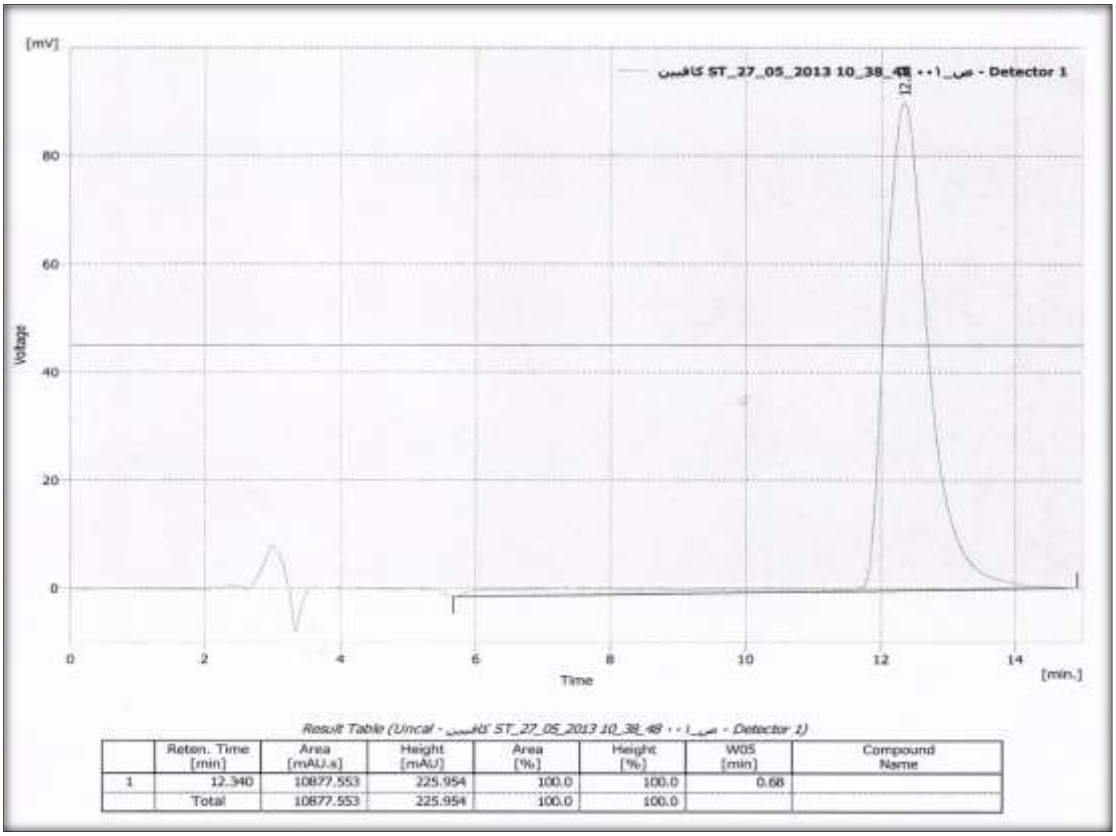
الشكل 5. يوضح طيف الـ UV للكافيين المستخلص من الشاي الاخضر حيث x يمثل الطول الموجي و y يمثل الامتصاصية.

تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC :

وضعت عينة للمادة الفعالة (الكافيين) القياسية، وهي إحدى أهم المواد في القلويدات بجهاز الـ HPLC لمدة 15 دقيقة، إذ ظهرت قمة واحدة فقط عند الدقيقة 12.340، وهذا يدل على عدم وجود مركبات أخرى معه، الشكل 6، وكان وقت ظهور الكافيين المستخلص مقارباً لوقت الكافيين القياسي، إذ ظهرت النتيجة عند الدقيقة 12.107 وهو ما موضح في الشكل 7، ويظهر جدول 3 نقاوة الحزمة للمستخلص ومساحتها مقارنة بالكافيين القياسي.

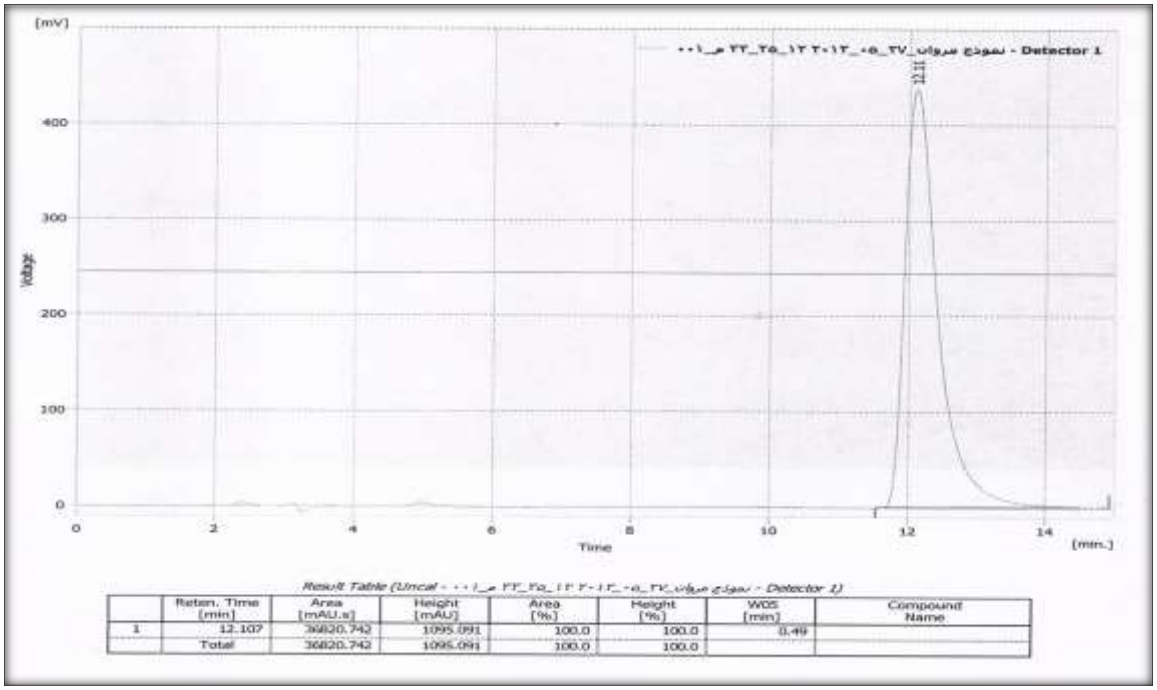
جدول 3. مقارنة بين الكافيين القياسي والمستخلص

المادة	زمن الاحتجاز (Min)	مساحة الحزمة (mAU.s)	النقاوة %
الكافيين القياسي	12.340	10877	99
الكافيين المستخلص	12.107	36820	65.7



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	12.340	10877.553	225.954	100.0	100.0	0.68	
	Total	10877.553	225.954	100.0	100.0		

شكل 6. يوضح وقت الاحتجاز للكافيين القياسي



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	12.107	36820.742	1095.091	100.0	100.0	0.49	
	Total	36820.742	1095.091	100.0	100.0		

شكل 7. يوضح وقت الاحتجاز للكافيين المستخلص من الشاي الاخضر.

الجرعة القاتلة LD_{50} للكافيين :

يوضح الجدول 4 مقدار الجرعة القاتلة للكافيين بعد 48 ساعة من تجريع الفئران عدداً من التراكيز المختلفة، إذ بلغ مقدار الجرعة القاتلة 125 غم/ كغم، وقد تعزى سمية الكافيين الى تأثيره على ضربات القلب وسرعتها، وعلى التنفس، اضافة الى الاضطرابات الهضمية والتهيج والأرق [49,48,47,46].

جدول4. يوضح مقدار الجرعة القاتلة واعداد الهلاكات للكافيين ونسبها.

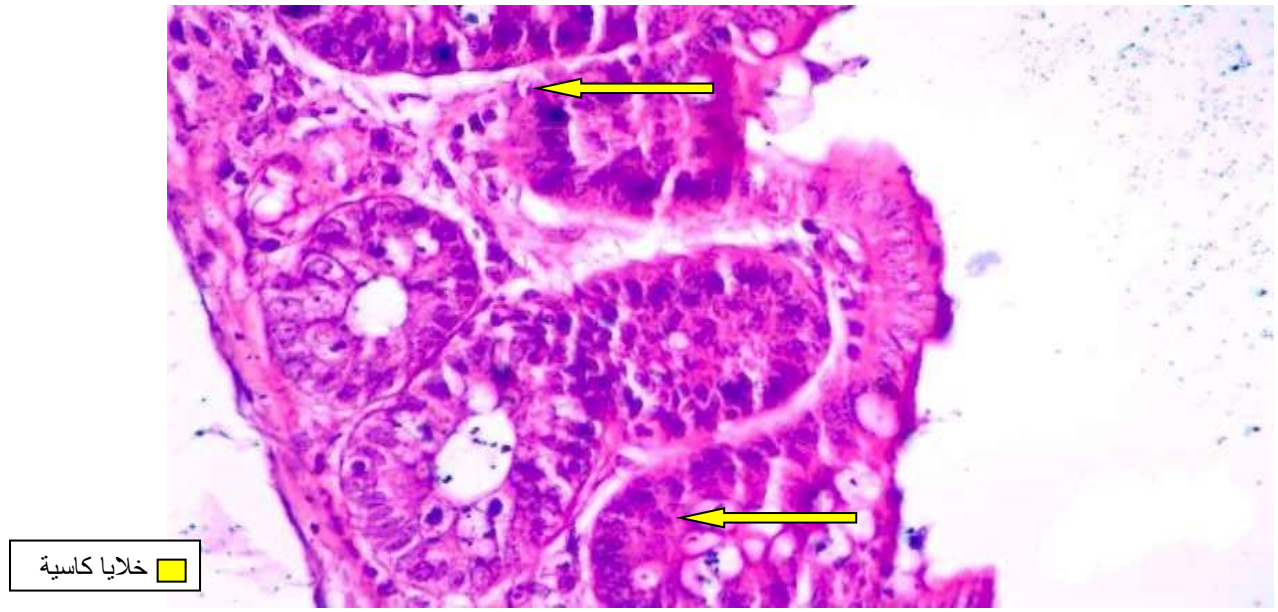
اسم المجموعة	الجرعة غم/كغم	عدد الهلاكات في اليوم الاول	عدد الهلاكات في اليوم الثاني	العدد الكلي للهلاكات	النسبة المئوية
المجموعة السالبة	–	–	–	–	% 0
التركيز الاول	25	–	–	–	% 0
التركيز الثاني	50	–	–	–	% 0
التركيز الثالث	75	–	1	1	% 16.6
التركيز الرابع	100	1	–	1	% 16.6
التركيز الخامس	125	2	1	3	% 50

الدراسة النسيجية لعلاج مرض الزحار الاميبي بالمادة الفعالة الكافيين :

يظهر الجدول 5 وجود فروق معنوية ($p< 0.01$) بين التراكيز الثلاثة للكافيين، ويبين كذلك وجود تفاوت نسب الخمج بين التراكيز الثلاثة المستخدمة في علاج الفئران المخمجة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج،إذ أظهرت نسبة الخمج في الفئران المعاملة بالتركيز الواطئ من الكافيين 2.5 mg/kg انخفاضا بلغ 81.25 %. وأظهرالشكل 8 مقطعاً في القولون يشير إلى رجوع الشكل الطبيعي للنسيج المبطن للقولون.

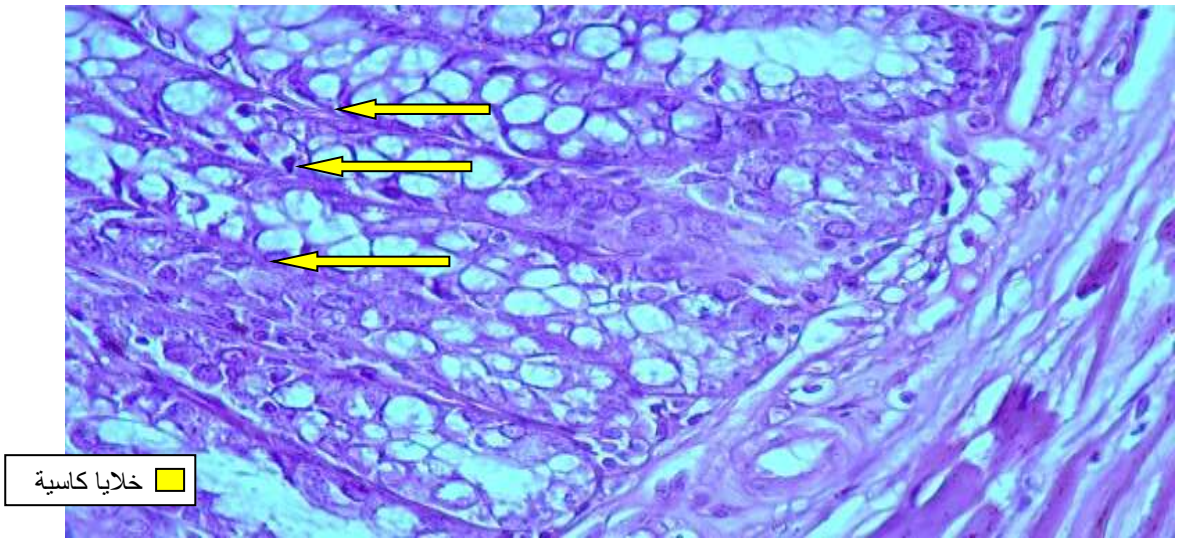
الجدول 5. تاثير التراكيز المختلفة للمادة الفعالة (الكافيين) المستخلصة من الشاي الاخضر في عدد اكياس *Entamoeba histolytica* المطروحة.

التركيز	عدد الأكياس المطروحة قبل المعالجة	عدد الأكياس المطروحة بعد سبعة ايام من المعالجة	النسبة المئوية %
التركيز العالي 10 mg/kg	b	5	31.25
التركيز المتوسط 5 mg/kg	15	8	50.00
التركيز الواطئ 2.5 mg/kg	15	13	81.25
قبل العلاج	15	--	100
قيمة مربع كاي	--	--	** 7.69
** (P<0.01).			



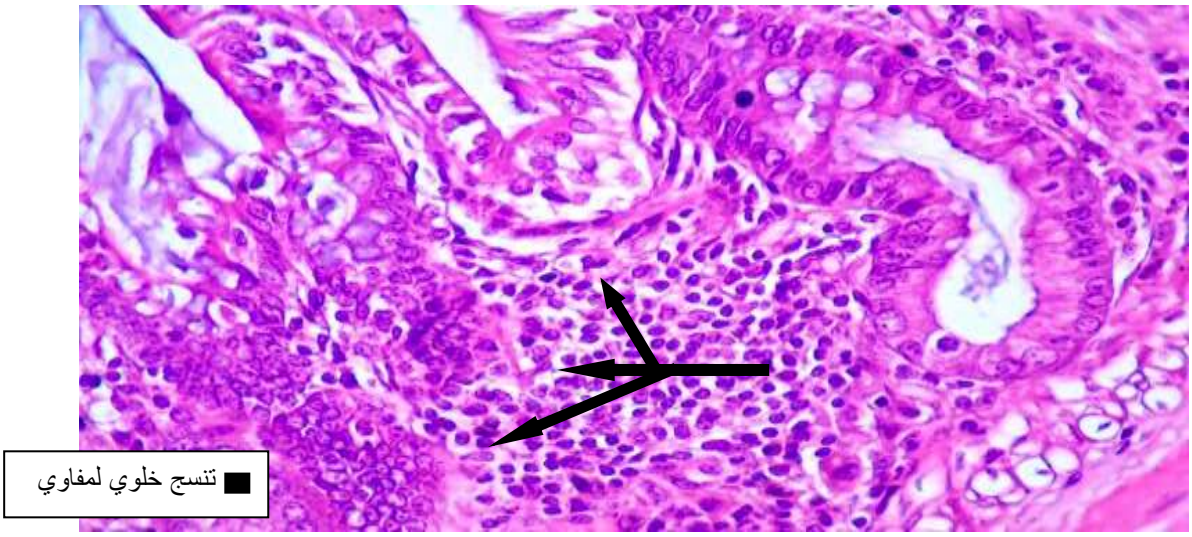
شكل 8. مقطع عرضي للنسيج المبطن للقولون في فأر معامل بالتركيز الواطئ 2.5 mg/kg من المادة الفعالة (الكافيين) المستخلصة من الشاي الاخضر يوضح رجوع الشكل الطبيعي للنسيج X200 (H&E).

ولوحظ في المجموعة الثانية المخمجة التي جرعت بالتركيز المتوسط 5 mg/kg من الكافيين انخفاض في نسبة الخمج بلغت 50 %، بينما أظهر الشكل 9 الفحص النسيجي لمقطع في القولون وجود زيادة ملحوظة وواضحة في الخلايا الكأسية.



شكل 9. مقطع عرضي في قولون فأر معامل بالتركيز المتوسط 5 mg/kg من المادة الفعالة (الكافيين) المستخلصة من الشاي الاخضر يوضح زيادة ملحوظة وواضحة في الخلايا الكأسية للنسيج X400 (H&E).

وانخفضت نسبة الخمج في المجموعة الثالثة من الفئران المخمجة المعاملة بالتركيزالعالي 10 mg/kg، فقد بلغت 31.25 %، وبين الشكل 10 لمقطع في نسيج القولون وجود تنسج خلوي لمفاوي.



شكل 10. مقطع عرضي في قولون فأر معامل بالتركيز العالي 10 mg/kg من المادة الفعالة (الكافيين) المستخلصة من الشاي الاخضر يوضح وجود تنسج خلوي لمفاوي X400 (H&E).

تبين النتائج السابقة أن كلا من التركيز العالي للكافيين كان له تأثير كبير في القضاء على الطفيلي وعلاج التأثيرات المرضية الناجمة عنه قياساً بالتركيزين المتوسط والواطئ، إذ انخفض عدد الأكياس المرضية الخارجة مع البراز وهذه النتائج تتوضح لنا أكثر عند دراسة المقاطع النسجية للقولون الناجمة عن المعاملة بالكافيين لمختلف التراكيز، إذ لوحظ بدء الرجوع الى الحالة الطبيعية للنسيج فكان النسيج، مشابهاً أو مقارباً للتركيب الطبيعي للنسيج، وربما لوحظ إفراز كميات كبيرة من مادة الميوسين نتيجة لزيادة الخلايا الكاسية اضافة الى وجود ارتشاح خلوي بسيط في الغشاء المبطن للنسيج، مع ملاحظة عدم وجود أي تقرح أو اختراق في جدران القولون بسبب الزحار الاميبي، وقد يعزى ذلك الى التاثير العلاجي الفعال للكافيين الذي قد يعمل على القضاء على الطفيلي داخل القولون، وبالتالي تثبيط الطفيلي ومنعه من الانقسام والتكاثر داخل تجويف القولون، ومن ثم عدم استمرار الطفيلي باحداث الامراضية والتغيرات النسجية الشديدة في انسجة القولون، ويعد الكافيين من القلويدات [23]، التي لها القدرة على تحطيم الجدار الخلوي Parasitophorous vacuole، وما يحويه من بروتينات ودهون، قد تسبب هلاك الطفيلي [50]، وتعمل القلويدات في خفض محتوى الحامض النووي الرايبوزي RNA والحامض النووي DNA، وربما تسببت في اختزال الفعالية النوعية للانزيمين دايهايدروفوليت ردكتيز وثايمدين فوسفورليز، فضلا عن تاثيرها التثبيطي الواضح لأيض الطاقة في الطفيلي [51].

المصادر

1- Sannella, A.; Gradoni, L.; Persichini, T.Ongini, E.; Venturini, G.and Colasanti. M. **2003**. Intracellular release of Nitric Oxide by NCX 972, a No-releasing Metronidazole, enhances In vitro killing of *E. histolytica .Anti microb. Agents Chemo*. 47(7):2303-2306.

2- Tachibana, H.; Matsumoto, N.; Tsukamoto, H.and Yoshihara, E. **2004**. Improved affinity of a human anti- *E. histolytica* Gal\GalNAc Lectin Fab fragment by a single amino acid modification of the light chain. Clin. *Diagno. Lab. Immunol.*, 11(6):1085-1088.

3- DiMiceli, L. **2004**. Distinguishing between pathogenic and non-pathogenic species of *Entamoeba*. *Lab. Med.*, 35:613-616.

4- Eichinger, D. **1997**. Encystation of *Entamoeba* parasites. *BioEssays.*, 19 (7) : 633-639 .

5- Beaver, P.C.; Jung, R.C. and Cupp, E.W. **1984**. Clinical parasitology. 9th ed. Lea and Febiger, Philadeliphia. 102-134.

6- Shimada, A.; Muraki, Y.; Awakura, T.; Umemura, T.; Sanekata, T.; Kuroki, T. and Ishihara, M. **1992**. Necrotic colitis associated with *Entamoeba histolytica* infection in a cat. *J. Comp. Pathol*. 106:195-199.

7- Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo,A. **2000**.Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol*., 13(2): 318-331.
8- Tanyuksel, M. and Petri, W.A. **2003**. Laboratory Diagnosis of Amoebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16:713-729.
9- Yu sung; Yu Yuchang and NiLun Ting. **2005**. Capsaicin biosyn thesis in water stressed hot pepper fruits. Bot.Bull. Acad. Sin.,(46):35-42.
10- 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.
11- 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.
12- Swiderski ,F.; Dabrowski, M.; Rusaczone 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.
13- Zaveri, N.T. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life. Sci. 78:2073–2080.
14- Wheeler, D.S. and W.J. Wheeler. 2004. The medicinal chemistry of tea. Drug Develop. Res. 61:45-65.
15- Kumamoto, M.; Sonda, T. and Nagayama, K. (2001). Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65:126 – 132.
16- Cabrera, C.; Artacho, R. and Giménez. (2006). Beneficial effects of green tea: a review. *J. Am. Coll. Nut.* 25(2):79-99.
17- Koo MW, Cho CH. 2004. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur. J. Pharm.* 500:1-3;177-85.
18- Nagaya, N.; Yamamoto, H.; Uematsu, M.; Itoh, T.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T.; *et al.* (2004). Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart* 90:12;1485-6.
19- Bursill, C.; Abbey, M. and Roach, P. (2007). A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atheroscler* 193:1;86-93.
20- Singh, M.; Tyagi, S.; Bhui, K.; Prasad, S. and Shukla, Y. (2009). Regulation of cell growth through cell cycle arrest and apoptosis in HPV 16 positive human cervical cancer cells by tea polyphenols. *Invest New Drug* Mar 7 E Pub ahead of print accessed 1 April 2009.
21- Tsuneki, H.; Ishizuka, M.; Terasaw, M.; Wu, J.; Sasaoka, T. and Kimura, I. (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharm.* 4:18 Accessed April 1 2009.
22- Braun L, Cohen M. (2007). Herbs & Natural Supplements: an evidence-based guide, 2nd end. Marrickville: Elsevier.
23- Richard, K.C. **2007**. Coffee: The demon drink, New Sci., 21: 4-6.
24- Bussemas, H. H.; Harsch, G. and Ettre, L. S, (1994). Chromatographia. 38, 243–254.
25- Kunz, H. (2002). Angew. Chem., Int. Ed., 41: 4439–4451.
26- Enright, G. D.; Terskikh, V. V.; Brouwer, D. H. and Ripmeester, J. A. (2007). Cryst. Growth Des, 7: 1406–1410.
27- Lehmann, C. W. and Stowasser, F. (2007). Chem. Eur. J. 13, 2908–2911.
28- Kishi, Y. and Matsuoka, M. (2010). Cryst. Growth Des., 10, 2916–2920.
29- Lieberman HR (2001) The effects of ginseng, ephedrine and caffeine on cognitive performance, mood and energy. Nutr Rev 59:91–102.
30- James, J.E. (1997). Understanding caffeine. Sage, Thousand Oaks.
31- Garrett, B. E. and Griffiths, R. R. (1997). The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 57,* 533–541.
32- Orozco-Gregorio, H.; Mota-Rojas, D.; Bonilla-Jaime, H.; Trujillo-Ortega, ME.; Becerril-Herrera, M.; Hernández-González, R. and Villanueva-García, D. (2010). Effects of

administration of caffeine on metabolic variables in neonatal pigs with peripartum asphyxia. Am. J. Vet. Res., 71: 1214 - 1219.

33- Schmidt, B. (2005). Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: Evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international caffeine for apnea of prematurity (CAP) trial. Biol. Neonate, 88: 208-213.

34- Ergenekon, E.; Dalgiç, N.; Aksoy, E.; Koç, E. and Atalay, Y. (2001). Caffeine intoxication in a premature neonate. Pediatr. Anaesth., 11: 737-739.

35- Clark, C.G. and Diamond, L.S. **2002**. Methods for cultivation of huminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.*,15(2):329-341.

36- Singh, A.; Ericttouft, B.H. and William, A.C. **2009**. Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa .*J. Infect. Dis*.,61(3): 280-286.13- Kotpal, R.L **1994**. Protozoa : A textbook for college and university students' 11th ed. National Press, Meerut, India. 54-65.

37- Coles, E.H. **1986**. Veterinary Clinical Pathology. 4th ed., Press of W.B. Saunders Co: 472-545.

38- Minvielle, M.C.; Molina, N.B.; Polverino, D. and Basualdo, J.A. **2008**. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem. Inst. Oswaldo. *Cruz. Rio de Janeiro*, 103(1): 98–103.

39- AL-Hitti, I.K. and Ibrahim, S.S. **2009**. Extraction, Identification and determination of caffeine and trace metals in three types of tea leaves, J. of Al-Anbar University for pure science: 3(1): 45-49.

40- William, K. **1996**. Organic Spectroscopy, 3rd ed, Macmilliam, Hong Kong, 20-99.

41- Mohammed, MJ.; Al-Bayati, FA. **2009**. *Int. J. Green Pharm*., Jan-March,: 52-57.

42- Effendy, A. W. M.; Saad, M. Z., Mohamad, M. and Omar, H. **2001,** *Vaccination of Sheep against pneumonic Pasteurellosis using anew Spray vaccine.* J. vet. Malaysia. 10(1): 45-49.

43.80−1: الحاج، حميد احمد. **1982**. المبادئ الأساسية للتحضير المجهري الضوئي. دار جون وايلي وأبنائهُ، نيويورك

44- Luna, L.G. **1968**. Manual of histological staining methods, 3rd ed. McGraw – Hill Book Company, New York: 258.

45- Bancroft, J.D. and Stevens, A. **1982**. Theory and practice of histological techniques, 2nd ed. Churchill Livingstone, London. pp109-120.

46- Murphy, S. J., and Benjamin, C. P. **1981**. The effects of coffee on mouse development. Micro. Bios. Letters, 17, 91–99.

47- IARC/ Lyon: International Agency for Research on Cancer. **1991**. Caffeine. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 51: 291–390.

48- Dlugosz, L., and Bracken, M. B. **1992**. Reproductive effects of caffeine: a review and theoretical analysis. Epidemiologic

49- Carrillo, J. A., and Benitez, J. **1996**. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. British J. of Clinical Pharmacology, 41, 605–608.

50- Anthony, H.R. **1976**. Chemical Microbiology: an Introduction to Microbial Physiology. 3rd ed. Butterworth and Co. (publishers). London.

51- Marua H. AL-Hammoshi. **2011**. Effects of Crude Alkaloids Isolated from *Peganum harmala* Seeds on the Growth and Metabolism of *Leishmania tropica* Promastigotes, Jou. Raf. Sci: 22(1): pp 17- 32