تأثير مستخلص نبات الدفلة *Nerium oleander* في نمو وتطور الاكياس العدرية للمشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* في الفئران البيض Balb/c

فاضل حسن علوان الدليمي

جامعة بابل- مركز بحوث البيئة المحلية

الخلاصة

اجريت دراسة فعالية القلويدات للمدة من شهر ايلول ٢٠١٠ ولغاية نيسان ٢٠١١ وبتراكيز (140 ، 240 ، 270) مايكروغرام / مل والفينولات بتراكيز (160 ، 260 ، 280) مايكروغرام / مل لنبات الدفلة *Nerium oleander* على حيوية الرؤيسات الاولية للمشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* داخل الجسم الحي في الفئران البيض السويسرية *Mus musculus* سلالة Balb /c . جمعت الرؤيسات الاولية في الدراسة الحالية من اكباد الاغنام المصابة في مجزرة الحلة بمحافظة بابل وقيست حيوية هذه الرؤيسات باستعمال صبغة الايوسين المائية (0.1 %) اظهرت النتائج ان هنالك فروق معنوية حيث ان تركيز القلويدات 270 مكغم/مل/ فأر قد خفض قطر الاكياس (4.1) ملم مقارنة بالسيطرة الموجبة (6.0) ملم، اما الفينولات فكان التركيز 280 مكغم/ مل قد خفض قطر الاكياس (3.8) ملم مقارنة بالسيطرة الموجبة (6.0) ملم. وحقق تركيزي (270 ، 280) مكغم/ مل للقلويدات والفينولات على التوالي كفاءة علاجية نسبية مقدارها (55.17 % ، 48.27 %) على التوالي ايضا، وكذلك انخفض معدل وزن الكيس الواحد مقارنة بالسيطرة لكلا التركيزين الانفين الذكر . لوحظ انخفاض في معدلات اوزان ومعامل تضخم الاعضاء المصابة (الكبد والطحال والرئة) مقارنة بالسيطرة الموجبة .

Abstract

The present study was conducted during the period from September 2010 till April 2011 to evaluate the effect of active materials (alkaloids and phenols) of *Nerium oleander* activity on viability of the protoscolices In *vivo* of *Echinococcus granulosus* in white mice (*Mus musculus*) type Balb /c . The protoscolices were collected from sheep livers in Al-Hilla abattoir in Babylon province . The percentage of the viability of protoscolices was measured by using the eosin aqueous stain (0.1) .

The results of the study revealed that there are statistically significant for the alkaloides concentration 270 mg/ml/mice and phenols concentration 280 mg/ml/mice decreased the weight and diameters of cysts (4.1، 3.8) millimeter respectively in comparison with positive control group (6.0) milimeter . and the alkaloids and phenols concentrations (270 ، 280) mg/ml respectively gives relative drug efficiency equals (55.17 % , 48.27 % respectively) .

The results revealed decrease in percentages of weights and hypertrophy organ index of infected organ (livers , spleen and lungs) in comparison with positive control .

المقدمة

يعد مرض الأكياس العدرية واحدا من المشكلات الصحية الوبائية الخطيرة في معظم انحاء العالم (Eckert & Deplazes , 2004) . وله عدة اسماء ، فهو مرض المشوكات الحبيبية Echinococcosis ومرض المشوكات الكيسي echinococcosis Cystic ومرض الأكياس المائية Hydatidosis (Roberts & Janovy, 2000) . وهو من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان Zoonotic disease وتعد بلدان الشرق الأوسط وشمال أفريقيا والسودان وحوض بحر قزوين وبعض أقطار أميركا الجنوبية عالية التوطن لهذا المرض (Wen *et al.,* 1993) . ينتج المرض في الانسان والمضائف الوسطية الاخرى (الاغنام، الابقار، الجاموس، الجمال، الخيول وحيوانات اخرى) عن الطور اليرقي لطفيليات شريطية تابعه لجنس المشوكات *Echinococcus* والذي يضم انواع عديدة اهمها طبيا النوع الحبيبي *E. granulosus* والنوع الحويصلي *E. multilocularis* وهذا الطور يمكن ان يهاجم أي عضو في جسم المضيف الوسطي (Kismet *et al.* ,2008) .ويكثر المرض في المناطق الريفية التي يكثر فيها تربية حيوانات المزرعة واكلات اللحوم مما يساعد على اكتمال دورة حياة هذا الطفيلي الذي يحتاج الى المضيف الوسطي والمضيف النهائي (الكلاب ،

الـــــــــذئاب ، الـــــــــضباع الفهـــــــــود وحيوانـــــــــات ضـــــــــارية اخـــــــــرى) (Marquardt *et al* .,2000) . لا يزال هذا المرض في العراق من الامراض المتوطنة فضلا عما له من أثار على الناحية الصحية للانسان مما دفع العديد من الباحثين الى التقصي عن وسائل للعلاج وان كان التدخل الجراحي يعد من اهم طرق العلاج بالرغم من المشاكل الخطيرة التي يتعرض لها المريض اثناء الجراحة . والتي يصعب اجرائها احيانا ويتعذر في احيان اخرى (Mentes *et al.*,2000 ; Elissondo *et al.*, 2002) . لكون المريض غير مؤهل جراحيا بسبب العمر او التخدير او وقوع الكيس في اماكن يصعب على الجراح التعامل معها كما في اكياس الدماغ او القلب او العمود الفقري ومن هنا جاءت اهمية استخدام مواد او مستخلصات ذات طبيعة كيميائية مختلفة قد تساعد في معالجة المرضى (الحميداوي ، ٢٠٠٦).ومع تعدد المواد المستخدمة في معالجة المرض كيميائيا ضد الاكياس العدرية ، الا انها نجحت نجاحا جزئيا . مما ادى الباحثين في طرح الكثير من الافكار لغرض تنشيط عملية المعالجة الدوائية ، ولجا البعض الى محاولة تطوير العلاج الكيمياوي من خلال خلط مكونات النباتات الطبية مع بعض الادوية الفعالة ضد الاكياس (Polat *et al.*,2009) . وذلك بهدف تقويتها وزيادة امتصاصها من قبل الجسم وبالتالي رفع تركيزها في بلازما الدم ليكون لها تاثير قوي ضد الطفيلي (سيدا ، 2005) . حيث وجد (Ma *et al.* 2007) التاثير القوي الناتج من خلط قلويدات نبات *Sophora moorcoftaina* مع الالبندازول في تثبيط الاكياس الثانوية المحدثة تجريبيا في الفئران البيض كذلك في حيوية الرؤيسات الاولية Protoscolices المأخوذة من أكياس عدرية أحادية الفجوة خارج الجسم الحي *In vitro* .

هدفت الدراسة الحالية لمعرفة تأثير المواد الفعالة المعزولة من مستخلص نبات الدفلة *Nerium oleander* (القلويدات والفينولات) على حيوية الرؤسات الاولية داخل الجسم الحي وتأثيرها على الطبقتين الصفائحية والجرثومية كمحاولة علاجية لهذه المواد على المصابين بالاكياس العدرية .

المواد وطرائق العمل

استخدمت ذكور الفئران البيض السويسرية نوع *Mus musculus* سلالة Balb/c في الدراسة الحالية. للفترة المحصورة من شهر ايلول لعام ٢٠١٠ ولغاية شهر نيسان لعام ٢٠١١ ونقلت الى البيت الحيواني التابع الى كلية الطب/جامعة بابل لتربيتها وتكثيرها تحت الظروف البيئية الملائمة وبعد تكاثرها عزلت الذكور بعمر 3-4 اسابيع في اقفاص فرشت أرضيتها بنشارة الخشب وبواقع 5-8 فئران /قفص لتحضيرها للتجربة . تم الحصول على الاكياس العدرية من اكباد الاغنام المصابة طبيعيا والمذبوحة في مجزرة الحلة في محافظة بابل واستأصلت الاكياس العدرية منها بمساعدة الاطباء البيطريين، اذ وضعت في حاوية من الفلين ونقلت الى المختبر وغسلت هذه الاعضاء من الخارج بالماء لغرض ازالة الدم والمواد العالقة بها اثناء الذبح . اتبعت طريقة (1985) Smythلجمع الرؤيسات الاولية اذ تم تعقيم سطح الكيس العدري اولا باستخدام كحول اثيلي 70% ومحاقن طبية معقمة ذات حجم 10 مل ذات ابر قياس 21 درجة . سحب سائل الكيس العدري مع الرؤيسات السابحة فيه ووضع في بيكر سعة 250 مل ، ثم فتح الكيس باستخدام المقص والملقط لغرض استخراج الطبقة المولدة ووضعت في اناء معقم حاوي على المحلول الملحي الفسلجي ثم غسلت بوساطة قنينة غسل حاوي على محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) . جمع هذا المحلول المعلق الذي تم الحصول عليه وأضيف إلى السائل العدري ، بعدها جمعت الرؤيسات الاولية في انابيب اختبار معقمة لغرض ترسيبها بجهاز المنبذ Centrefuge ثلاث مرات وبسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة لكل ترسيب ، وتم اضافة المضادات الحيوية قبل البدء

بالغسلة الثانية (البنسيلين crystalline penicillin بواقع 2000 وحدة/لتر وستربتومايسين streptomycin بواقع 1غم/لتر) الى محلول الغسل PBS اثناء الغسلة الثانية . وبعد اتمام الغسل سكب الراشح واضيف الى الراسب قليل من دارئ الفوسفات الملحي المعقم لحساب عدد الرؤيسات الاولية .

تم حساب عدد الرؤيسات الاولية باستخدام طريقة نقل الحجم الثابت بواسطة ماصة دقيقة ذات حجم 50 مايكروليتر بعد رج المعلق المؤلف من الرؤيسات الاولية ودارئ الفوسفات المحلي المعقم . اذ تم وضع هذا المعلق على شريحة زجاجية نظيفة ومزج معها قطره من صبغة الايوسين المائية 0.1% وضعت تحت المجهر وتم ايجاد العد التقريبي المطلوب والبالغ 2000 رؤيس اولي هي ذات لون اخضر براق ، اما الرؤيسات المصطبغة باللون الأحمر فقد أهملت لكونها ميتة . وتم حساب عدد الرؤيسات الاولية في المليلتر الواحد كما يلي : متوسط عدد الرؤيسات في الحجم الثابت المستعمل (10 مايكروليتر) = 28.6 رؤيس كما في جدول (2 ، 3) اذن عدد الرؤيسات في المليلتر الواحد =28.6x 100 = 2860 رؤيس ،وتم ايجاد العدد التقريبي المطلوب والبالغ 2000 رؤيس اولي (0.7 مل) وهي ذات لون اخضر براق ، حقن ما يقارب 2000 رؤيس اولي حي بواسطة محقنة طبية ذات حجم 1مل وابرة قياس 21 درجة في التجويف الخلبي (I.P.) Intraperitoneal بعد تعقيم منطقة الحقن بالكحول الاثيلي 70 % عند حقن كل فار من فئران التجربة (Wangoo *et al* .,1989) .حيث عملت ثلاث مجاميع من الفئران (السيطرة ، ومجموعة القلويدات ، الفينولات) ولكل مجموعة 18 فأرا لكل تركيز(6 فئران) . وبعدها تركت لتعيش اربعة اشهر ، وتم تنظيم جدول علاجي عن طريق اعطاء هذه التراكيز (قلويدات وفينولات) عن طريق الفم وبجرعة واحدة ولمدة 21 يوما . ثم شرحت الفئران ولوحظ مدى تأثير العلاج من خلال قياس اعداد ووزن وقطر الاكياس العدرية . جمعت عينات النبات (الاوراق) *Nerium oleander* خلال شهر ايلول لعام 2010 من حدائق بعض المتنزهات في محافظة بابل ، تم تشخيص النبات في معشب كلية العلوم للنبات /جامعة بابل من قبل الاستاذ الدكتور عبد الكريم البيرماني . اخذت اوراق النبات بعد تنظيفها بشكل جيد وتركت لتجف في المختبر ، بعدها طحنت بمطحنة كهربائية وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال . اما تحضير مستخلصات المركبات القلويدية الخام والمركبات الفينولية الخام فقد اعتمدت طريقة السامرائي (1983) لاستخلاص المركبات القلويدية لنبات الدفلة. وكذلك اتبعت طريقة Ribereaun – Gayon (1972) لاستخلاص المركبات الفينولية لاوراق النبات. تم تحضير المحاليل الخزينة وتحديد الجرعة نصف القاتلة للقلوانيات والفينولات وذلك باضافة (1) غم من المادة الجافة للقلوانيات والفينولات واذيب في بضع قطرات من الكحول الاثيلي (96%) ومن ثم اكمل الحجم الى (100) مل بالماء المقطر، بذلك اصبح تركيز المحلول الأصلي (1%) او ما يعادل (10) ملغم/مل وتم التعرف على قيمة الجرعة النصف قاتلة L.D.50 للقلويدات والفينولات المستخلصة من اوراق نبات الدفلة وذلك بتجريع الفئران البيض Balb/c فمويا بهذه المواد الفعالة ومراقبتها خلال 24 ساعة وملاحظة علامات الخمول او عدم النشاط او الموت وذلك بدءً بالجرعات القليلة جدا وبصورة تصاعدية لحين التوصل الى معرفة الجرعة نصف القاتلة اعتمادا على قانون Litchfield & Wilcoxon (1949) وحسب جدول (1) وفقا للمعادلة التالية : –

$L.D._{50}$ = Highest dosage –

$L.D._{50}$ = الجرعة نصف القاتلة

Highest dosage = أعلى جرعة حققت قتل 100%

$\sum ab$= مجموع ضرب a × b حسب الجدول (1)

a = مقدار الفرق بين الجرع

b = مجموع عدد الحيوانات الميتة لكل جرعة (السابقة + اللاحق/2)

n = عدد الحيوانات المستخدمة لكل جرعة

بعد معرفة الجرعة القاتلة للقلويدات والفينولات (جدول 1) تم اختيار ثلاث تراكيز هي (الاقل من الجرعة الدوائية والجرعة الدوائية والأعلى من الجرعة الدوائية) بالنسبة للقلويدات هي (140 ، 240 ، 270) وللفينولات هي (160، 260 ، 280) .اما الكفاءة العلاجية النسبية تم استخراجها وفقا للمعادلة التالية .

$$\text{الكفاءة العلاجية النسبية} = \frac{\text{معدل عدد الأكياس العدرية في مجموعة السيطرة الموجبة} - \text{معدل عدد الأكياس العدرية في الفئران المعاملة}}{\text{معدل عدد الأكياس العدرية في مجموعة السيطرة الموجبة}} \times 100$$

كذلك استخرج معامل تضخم العضو index Organ وفق معادلة Kroeze & Tanner (1987) (السيعاوي ، 2001) وكالاتي :

$$\text{معامل تضخم العضو} = \frac{\text{وزن العضو}}{\text{وزن الجسم (الفار)}} \times 1000$$

النتائج

يبين جدول (1) تحديد الجرعة نصف القاتلة L.D.50 والجرعة الدوائية لنبات الدفلة في ذكور الفئران البيض حيث قسمت الحيوانات الى سبع مجاميع في كل مجموعة (6 فئران) وتم تجريع كل مجموعة بالجرع (0.25 ، 0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ، 2.5 ، 3.0 ، على التوالي) وتم حساب عدد الحيوانات الميتة وحساب مقدار الفرق بين الجرع (a) ومجموع عدد الحيوانات الميتة لكل جرعة ، بحيث السابق / اللاحق / 2 وتمثل b . ثم ضرب العمود a x b لكل جرعة من مجاميع الفئران المجرعة وجمعت واستخرجت الجرعة نصف القاتلة المشار الى معادلتها في طرائق العمل .ويظهر جدول (2 ، 3) مقدار عدد الرؤيسات الاولية وكذلك حيوية الرؤيسات في 50 مايكروليتر ولخمس مكررات على التوالي . حيث كان معدل المتوسط الحسابي لحيوية الرؤيسات عند المعاملة صفر (28.6 ± 4.44) بينما بلغ هذا المعدل في الساعة 24 (26 ± 2.93) ، كذلك يبين ان العدد الكلي للرؤيسات تراوح مابين (144 – 151) رؤيس وان معدل عدد الرؤيسات الحية تراوح مابين (135 – 144). وكانت النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات الاولية 94.83 % (جدول 3) . يبين الجدول (4) تاثير القلويدات والفينولات في قطر الاكياس العدرية الثانوية في اكباد الفئران المصابة والمعاجة بتراكيز مختلفة من هذه المواد المفعلة ولمدة 21 يوما . حيث تراوحت معدلات اقطارهذه الاكياس بالنسبة لمجاميع الفئران المعالجة بالقلويدات (4.1– 4.5) ملم والفينولات (3.8 – 4.4) ملم و تعطي هذه النتائج فروق معنوية عند

مقارنتها مع مجموعة السيطرة الموجبة غير المعالجة ، لكن معدلات هذه الاقطار لكلا المجموعتين كانت اقل نسبيا من السيطرة الموجبة غير المعالجة (6.0) ملم. اما اعداد هذه الاكياس في الكبد فيها فروقا معنوية ايضا عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة الموجبة غير المعالجة (8.0) بعد ما انخفظت نسبيا .

يبين الجدول (5) معدل وزن الاكياس العدرية الثانوية والكفاءة العلاجية النسبية في الفئران المعالجة بتراكيز مختلفة من القلويدات والفينولات لمدة 21 يوما، اذ وجد ان وزن الاكياس يتناقص بشكل ضئيل نسبيا مع زيادة تركيز المادة المفعلة لكنه اعطى فروق معنوية باستعمال التحليل الاحصائي عند المقارنه مع السيطرة الموجبة . اذ بلغ ادنى معدل لمجموع اوزان الاكياس الثانوية في الفار الواحد لتركيز 270 مكغم/ مل بالنسبة للقلويدات هو 0.0257 غم. اما الفينولات فكان ادنى معدل لمجموع الاوزان هو 0.0258 غم بالنسبة لتركيز 280 مكغم/ مل وهذه الاوزان هي ادنى من مجموعة السيطرة الموجبة البالغة 0.049 غم. اما الكفاءة العلاجية فازدادت بزيادة التركيز وكانت الفروق المعنوية اذ بلغ اعلى مستوى لها لكل من القلويدات 270 مكغم/ مل والفينولات 280 مكغم /مل (55.17 % و 48.27 %، على التوالي) . يبين الجدول (6) معدل اوزان الكبد والطحال والرئة ومعامل تضخمها في مجاميع الفئران المصابة بالاكياس العدرية الثانوية والمعالجة بتراكيز من القلويدات والفينولات ولمدة 21 يوما. ظهر ان معدل هذه الاوزان لم تنخفض انخفاضا كبيرا عند مقارنتها بالسيطرة السالبة غير المصابة لكنها نسبيا اقل من السيطرة الموجبة المصابة فقط وغير المعالجة ، اذ كان التركيز 270 مكغم/مل للقلويدات الافضل ضمن هذه المجموعة حيث كانت اوزان الكبد والطحال والرئة (2.04 ± 1.311 ، 0.26 ± 0.059 ، 0.18 ±0.05)غم على التوالي، اما معامل تضخمها فكان (64.55 ، 8.22، 5.69 على التوالي) ايضا . اما الفينولات فكان تركيز 280 ملغم/ مل هو الاكثر تاثيرا في اوزان الكبد والطحال والرئة (2.2 ± 0.149، 0.25± 0.067، 0.24 ± 0.065)غم على التوالي ومعامل تضخمها كان (64.32 ، 7.30، 7.01، على التوالي) ايضا ، وتبين من التحليل الاحصائي انه هنالك انخفاضا كبيرا نسبيا عند المقارنه مع السيطرة الموجبة غير المعالجة.

جول (1) : تحديد الجرعة نصف القاتلة L.D.50 والجرعة الدوائية لقلويدات نبات الدفلة *Nerium oleander* في ذكورالفئران البيض .

الجرعة ملغم/كغم	عدد الحيوانات	عدد الحيوانات الميتة	مقدار الفرق بين الجرع a	مجموع عدد الحيوانات الميتة لكل جرعة (السابقة / اللاحقة /2) b	axb
0.25	6	0	–	–	–
0.5	6	0	0.25	0	0
1.0	6	1	5.0	1	0.5
1.5	6	2	0.5	2	1.0
2.0	6	4	0.5	2	1.0
2.5	6	5	0.5	1.25	0.625
3.0	6	6	0.5	1.2	0.6
					∑ab=3.725

$L.D._{50} = 3.0 - 3.725/6$

$= 3.0 - 0.620833 \quad = 2.379167 \text{ mg/kg} \approx 2.4 \text{ mg /kg}$ الجرعة نصف القاتلة

وبالقسمة على (10) تكون الجرعة الدوائية (0.24)ملغم/كغم = 240 مايكروغرام/كغم من وزن الفار وبنفس الطريقة استخرجت الجرعة نصف القاتلة للفينولات (2.6) ملغم/كغم وبالقسمة على (10) تكون الجرعة الدوائية تقريبا (0.26ملغم/كغم) = 260 مايكروغرام/كغم من وزن الفار .

جدول (2): متوسط عدد الرؤيسات الأولية في 10 مايكروليتر لخمس مكررات محسوبة بطريقة الحجم الثابت ولفترات زمنية مختلفة.

مدة المعاملة (ساعة)	عدد الرؤيسات الأولية المحسوبة في 10 مايكروليتر لخمسة مكررات					متوسط عدد الرؤيسات ± S.D.
	١	٢	٣	٤	٥	
0	35	31	26	22	29	28.6 ±4.44
12 ساعة	27	23	33	26	31	28 ±3.52
24 ساعة	24	22	29	28	27	26 ±2.93

جدول (3): معدل المتوسط الحسابي لحيوية الرؤيسات الأولية في 50 مايكروليتر لخمس مكررات

المكررات	1	2	3	4	5	المجموع	المتوسط الحسابي ± S.D.
معدل العدد الكلي للرؤيسات	147	148	144	145	151	537	147 ± 3.6
معدل عدد الرؤيسات الحية	140	144	140	135	138	697	139.4 ±3.3
معدل عدد الرؤيسات الميتة	5	7	7	9	10	38	7.6 ±2.9
النسبة المئوية	97.33	99.66	97.0	96.33	99.66	94.83	

جدول (4) : تأثير القلويدات والفينولات لنبات الدفلة *Nerium oleander* في قطر الاكياس العدرية الثانوية في كبدالفئران المصابة تجريبيا والمعالجة بتراكيز مختلفة لمدة 21 يوم .

المادة المستخلصة	التراكيز مايكروغرام /مل/ فأر	معدل قطر الاكياس (ملم)	معدل عدد الاكياس في الكبد	الانحراف المعياري S.D. ±
القلويدات	140	4.5	5	1.49±
	240	4.3	4	1.42 ±
	270	4.1	3	1.43 ±
	L.S.D	0.5	1.1	
الفينولات	160	4.4	2	1.48 ±
	260	3.9	3	1.41 ±
	280	3.8	3	1.29 ±
	L.S.D	0.6	1.2	
السيطرة	+	6.0	8.0	1.55 ±
	–	0.0	0.0	0.0

فروق معنوية تحت مستوى دلالة 0.05

جدول (5) : معدل وزن الاكياس العدرية والكفاءة العلاجية النسبية في الفئران المصابة والمعالجة بتراكيز مختلفة في القلويدات والفينولات لنبات الدفلة *Nerium oleander* لمدة21 يوما .

المادة المستخلصة	التركيز مكغم/مل/فأر	معدل وزن الكيس الثانوي الواحد(غم)	معدل عدد الاكياس العدرية الثانوية في الاعضاء المصابة			الكفاءة العلاجية النسبية (%)
			الكبد	اعضاء اخرى	العدد الكلي	
القلويدات	140	0.0262	5	14	19	34.48
	240	0.0243	4	13	17	41.37
	270	0257.0	3	10	13	55.17
	L.S.D	0.20			2.5	17.8
الفينولات	160	0.0280	2	17	19	34.48
	260	0.0267	3	15	18	37.93
	280	0.0258	3	12	15	48.27
	L.S.D	0.19			2.9	
السيطرة	+	0.049	6	23	29	0.0
	–	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

فروق معنوية تحت مستوى دلالة 0.05 .

جدول (6) : معدل وزن الكبد والطحال والرئة ومعامل تضخمهما في مجاميع الفئران المصابة بالاكياس العدرية الثانوية والمعالجة بتراكيز مختلفة في القلويدات والفينولات لمدة 21 يوما .

المادة المستخلصة	التراكيز مايكروغرام/مل /فأر	معدل وزن الفئران بعد المعالجة ± الانحراف المعياري	معدل وزن الكبد(غم) ± الانحراف المعياري	معامل التضخم	معدل وزن الطحال ± الانحراف المعياري	معامل التضخم	معدل وزن الرئة (غم)± الانحراف المعياري	معامل التضخم
قلويدات	140	1.136±32.8	0.484± 2.375	72.40	0.030±0.28	8.53	0.008±0.27	8.23
	240	1.542±33.7	1.203±2.13	63.20	0.04±0.28	8.30	0.089±0.183	5.43
	270	1.206±31.6	1.311±2.64	64.55	0.059±0.26	8.22	0.05±0.18	5.69
	L.S.D	1.1	0.11	6.1	0.10	2.4	0.01	0.53
فينولات	160	1.657±33.8	0.11±2.38	70.41	0.06±0.29	8.57	0.026±0.29	8.58
	260	1.039±31.5	0.247±2.3	73.01	0.052±0.26	8.25	0.015±0.26	8.25
	280	1.021±34.2	0.149±2.2	64.32	0.067±0.25	7.30	0.065±0.24	7.01
	L.S.D	1.21	0.5	8.10	0.11	1.9	0.15	1.16
السيطرة	السالبة(−)	1.5012±34.2	0.39±1.388	40.58	0.02±0.16	4.67	0.25±0.162	4.73
	الموجبة(+)	1.231±36.4	0.257±2.61	71.70	0.029±0.34	9.34	0.031±0.32	8.79

فروق معنوية تحت مستوى دلالة 0.05 .

المناقشة

داء الأكياس العدرية من الأمراض الشائعة في العالم وله تأثيرات اقتصادية واجتماعية ويمكن ان يعزى انتشار هذا المرض الى سببين : الأول هو عدم القدرة على اكتشاف الاصابة في المراحل المبكرة لكونه لا يظهر اعراضا مرضية الا بعد زيادة حجم الكيس مما يؤدي الى الضغط على الانسجة المجاورة له ، اما السبب الثاني هو فقدان الوسائل العلاجية ، ويشبه هذا المرض في حدة انتشاره الاورام السرطانية في مرحلة الانبثاث Metastasis (Naguleswaran *et al.* , 2006) . شملت الدراسة الحالية اختبار فعالية القلويدات والفينولات لاوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* ، حيث وجد في الآونة الأخيرة إن استعمال النباتات بشكل مستخلص وخلطها مع المركبات البنزيميدازول جعلها أكثر فعالية مما لو كانت هذه المواد كيميائية لوحدها (Chai *et al.*, 2002).اما الفعالية المؤثرة لمستخلص اوراق نبات الدفلة تعود إلى المحتوى الكيميائي من المواد الفعالة مثل مركبات القلويدات Alkaloides والفينولات Phenols والفلافونات Flavonoids والتانينات Tannins واللاكتينات Lectins (الربيعي ،1999) . وقد فسرت عملية التثبيط التي تحدثها مركبات القلويدات كونها تتداخل في سلسلة تفاعلات ايض البروتينات الضرورية لاستمرار حيوية الكائن المجهري ، والى قدرتها على تحطيم الجدار الخلوي وما يحويه من بروتينات ودهون ومن ثمَّ هلاك الطفيلي (Cowan , 1999) . كما قد فسرت فعالية القلويدات على أساس تثبيط الايض الكربوهيدراتي من خلال التأثير على المايتوكوندريا ومن ثم عرقلة آلية التنفس (Delorenzi *et al.,* 2001) . يلاحظ من الجدول (1) ان الجرعة الدوائية لقلويدات وفينولات نبات الدفلة هي (240، 260) مايكروغرام/كغم من وزن جسم الفأر وهذه الجرع هي مقاربة نوعما

لدراسة Mustafa & Al-Khazriji (2008) (250 ، 270) مايكروغرام / كغم للقلويدات والفينولات على التوالي وهذه النسب الواطئة من المستخلص ترجع الى كون ان نبات الدفلة هو من النباتات السامة والتي تحوي على مركبات قلويدية عديدة سامة جدا اذا ما اخذت بصورة خاطئة من قبل الانسان والحيوان (الربيعي، 1999) .

أما بخصوص اختبار حيوية هذه الرؤيسات فقد اعتمدت ظاهرة نفاذ صبغة الايوسين المائية وذلك لصعوبة التمييز بين الرؤيسات الحية والميتة الا من خلال نفاذ هذه الصبغة جدول (2 ،3) ، فالرؤيسات التي تصتبغ باللون الاخضر الطبيعي هي حية اما التي تأخذ اللون الاحمر فهي ميتة (Risan, 1994 ; العبودي ،2001) ومن خلال ملاحظة نتائج الدراسة جدول (4) إن للقلويدات تأثيرا واضحا ومعنويا في تقليل النسبة الحيوية للرؤيسات إذ تناسبت طرديا مع زيادة التركيز وهذا يتفق مع ما توصل اليه كل من Al-Nakeeb (2004) ودراسة Ma *et al.* (2007) ودراسة Mustafa & Al-Khazriji (2008) . وذلك للفعل التازري لهذه القلويدات إضافة إلى أنها تعمل على زيادة امتصاصه وتؤدي إلى ظهور قطيرات دهنية بشكل تجمعات مع الكلايكوجين والأنزيمات الحالة أيضا وتؤدي إلى فقدان العضيات الحيوية وتحطيم انوية الخلايا المولدة في الرؤيسات الأولية ومن ثم إلى موتها(Gidado *et al.*,2007) .أما الفينولات فكان لها تأثير معنوي في خفض حيوية الرؤيسات الأولية وتناسب هذا التأثير طرديا مع التركيز ومدة حفظ الرؤيسات إذ أدى إلى حصول انخفاض معنوي في معدل المتوسط الحسابي لحيوية الرؤيسات الأولية وهذا يتفق مع ما توصل اليه (2008) El- Torki *et al.* ودراسة الحميري (2010)، وقد يعود السبب إلى إن الفينولات يكون تأثيرها على أنزيم الاستايل كولين استريز Acetyle-choline estrase المسيطر على مرونة ونفاذية الغشاء الخلوي ، إذ أن الفينولات أفقدت الغشاء هذه الخاصية التنافذية مما أدى إلى دخول المواد المختلفة والسامة بدون تنظيم ومن ثمَّ موت الطفيلي(Naguleswaran *et al.*, 2006) .لوحظ انخفاض قليل بوزن وقطر وأعداد الأكياس العدرية والأعضاء المصابة جدول (4) وهذا الانخفاض غير معنوي عند المقارنة مع السيطرة بالنسبة للفئران المعالجة بالقلويدات والفينولات، لكن هذه الفروق كانت معنوية عند مقارنتها بالسيطرة الموجبة غير المعالجة .وهذا ربما يمكن تفسيره اعتمادا على المحتوى الكيميائي لمستخلص القلويدات والفينولات التي أشير لها سابقا وخاصة القلويدات إذ أشارت دراسات حديثة إلى سلوكها كعوامل محفزة للمناعة الخلوية والخلطية في الفئران المصابة بأمراض يشترك تنظيمها لعامل النخر الورمي Necrosis factor Tumor وهو احد أنواع السايتوكينات Cytokines التي تتوسط الالتهابات الحاصلة في الجسم عن طريق تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية وعلى إنتاج (IL2) الذي يرفع من كفاءة الجهاز المناعي ويزيد قابلية الخلايا البلعمية على مهاجمة الأجسام الغريبة ، (Maizeles & Yazdanbakhsh, 2003 ; Xingming *et al.*,2009). وكذلك الفينولات Phenols التي ثبت تأثيرها المضاد لنمو الأحياء المجهرية حتى عند استعمال تراكيز واطئة منها (Naguleswaran *et al.*, 2006) . وهذا الرأي يتفق مع ما أشار إليه كل من Al-Tmimy (2001) و Reddy (2009) والحميري (2010) في إن سبب مقاومة الفئران للإصابة بأنواع عديدة من البكتريا المرضية هو استعمال المستخلص الكحولي لنبات الدفلة الذي ينشط المناعة الخلوية من خلال تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية ومن ثمَّ تنشيط السايتوكينات مثل (IL-1) المحفز للخلايا اللمفاوية التائية على إنتاج (IL-2) مما يؤدي إلى القضاء على البكتريا . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه Ma *et al.* (2007) الذي اشار الى ان القلويدات تؤدي إلى تحطيم انوية الطبقة المولدة للكيس العدري .

يوضح جدول (5) وجود أكياس عدرية ثانوية في مجاميع الفئران المصابة والمعالجة بالقلويدات والفينولات ولمدة 21 يوماً ، إذ توزعت الإصابات في الكبد بالدرجة الأولى والرئتين والطحال ، كما أظهرت

السيطرة الموجبة غير المعالجة (المصابة فقط) وجود أكياس عدرية ثانوية في أعضاءها وبشكل كتل متجمعة وكانت إصابة الكبد أكثر شيوعا ، فقط لوحظ إن بعض الأكياس كانت مغروسة جزئيا في نسجه في حين كان البعض الأخر ملتصقا وبهيئة مفصصة كروية الشكل متباينة الحجم وربما يعزى السبب الى نفس التأثيرات التي ذكرت سابقا للقلويدات والفينولات ولوحظ في الدراسة الحالية حدوث زيادة في أوزان الكبد والطحال والرئة ومعامل تضخمهما في مجموعة السيطرة الموجبة والتراكيز المفعلة القليلة جدول (6) ، وقد يعزى ذلك إلى كثرة الأورام الحبيبية والبؤر النخرية التي تغير من طبيعة هذه الأنسجة ، فضلا عن كثرة أعداد الطفيليات في هذه الأعضاء ، مما يؤدي الى فشل المضيف في مقاومة الطفيلي والسيطرة عليه ، وقد تعزى أسباب تضخم الطحال إلى تكاثر الخلايا اللمفية نتيجة انقسامها وتأثير التفعيل وإفرازها للمونوكينات وهذه نتيجة طبيعية كون الطحال اكبر عضو لمفي في إنتاج أجسام مضادة متخصصة لمستضدات الطفيلي(Virella ; Mosqueda *et al.*,2007 &Tomlinson, 2007). كما تعزى الزيادة الحاصلة في وزن الكبد والرئة إلى شدة التفاعل الالتهابي فضلا عن الزيادة في تكوين الورم الحبيبي وهجرة الخلاياالوحيدة والحمضات إلى موقع الإصابة في الكبد والرئة (Lightowlers *et al.*,2003) .وتتفق هذه النتائج مع الباحثين Ali–Khan (1978a,b) و Gottstein & Hemphill (1997) و إبراهيم (2000) والحميري (2010) الذين أشاروا إلى التضخم الواضح في الكبد وذلك لتزاحم الأنسجة فيه نتيجة الإصابة بالأكياس العدرية .يمكن ان نستنتج من هذه الدراسة ان لقلويدات وفينولات نبات الدفلة تأثير فعال ضد الأكياس العدرية داخل الجسم الحي بالنسبة للفئران المصابة بالأكياس التي عولجت مقارنة مع تلك المصابة ولم تعالج وهذا ربما يرجع الى المواد الفعالة الدوائية الموجودة في هذا النبات .

المصادر

إبراهيم، زمان عبد الصاحب عبد (2000). دراسة مناعية وبايولوجية لداء الأكياس العدرية. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية: 178 صفحة.

الحميداوي ، جميل جري يوسف (٢٠٠٦) . استعمال بعض العقاقير المثبطة مناعيا في علاج داء الاكياس العدرية في الفئران البيض ، اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل :١٠٩ صفحة .

الحميري، احمد خضير عبيس (2010) . تقييم فعالية مستخلص بذور الداتورة Datura stramonium على نمو وتطور الاكياس العدرية للمشوكة الحبيبية Echinococcus granulosus في الفئران البيض Balb /c (دراسة دوائية ، نسيجية ومناعية) ، اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الكوفة : 167 صفحة .

الربيعي، هادي مزعل خضير (1999) . دراسة تأثير مستخلصات نبات الداتورة Datura innoxia mill في أداء الذبابة المنزلية Musca domestica . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل : 126 صفحة .

السامرائي ، خلود وهيب (١٩٨٣). توزيع القلويدات وأهميتها التصنيفية في بعض الأنواع البرية من العائلة الباذنجانية Solanaceae في العراق . أطروحة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد : ١٥٧ صفحة.

السبعاوي ، بثينة حاتم هاشم سليمان (٢٠٠١).تأثير نبات عنب الذئب Solanum nigrum L . كمعدل مناعي في نمو وتطور الأكياس العدرية الثانوية للمشوكة الحبيبية Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) من أصل إنسان وأغنام. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل: ٢٢٧ صفحة.

العبودي ، اسوان كاظم جبر (2001) . تضعيف الرؤيسات الاولية للمشوكة الحبيبية E granulosus باستخدام بعض المستخلصات النياتية ، رسالة ماجستير ، كلية اللوم ، جامعة بغداد : 96 صفحة .

سيدا ، لويس عبد الأحد (2005) . محاولات في معالجة داء الأكياس العدرية الثانوية في الفئران المختبرية (سلالة Balb/c). أطروحة دكتوراه ، كلية التربية (أبن الهيثم) ، جامعة بغداد : 132 صفحة.

Ali-Khan, Z. (1978a). Cellular changes in the lymphoreticular tissue of C57L/J mice infected with Echinococcus multilocularis cysts. Immunology, 34: 831-839.

Ali-Khan, Z. (1978b). Echinococcus multilocularis : Cell mediated immune response in early and chronic alveolar murine hydatidosis Exp. Parasitol. , 46: 157-165.

Al-Nakeeb, S. A. R. (2004). Seroepidemiological and therapeutic study on hydatid cyst infection in Kirkuk and Tikrit provinces. M. Sc. Thesis , coll. Med. , Univ. Tikrit: 125 pp.

Al-Tmimy, A. A. (2001). Efficiency of N. sativa extracts against experimental infection with E. coli in white mice. M. Sc. Thesis, Coll. Edu. , Univ. Baghdad.

Chai, J. ; Jiao, W. ; Sun, D. ; Liang, B. ; Shi, J. ; Fu, C. ; Li, X. ; Mao, Y. ; Wang, X.; Wang, **Y. ;** Gao, F. and Xiao, S. (2002). Clinical efficacy of albendazole emulsion in treatment of 212 cases of liver cystic hydatidosis. Chin. Med. J. , 12: 1809-1813. (Medline Abst.)

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12(4): 564- 582.

Delorenzi, J.C.; Attias, M. ;Gattas, C.R.; Andrade, M.; Rezende, C.; Pinto, A.C.; Henriques, A.T.; Bou-Habib, D.C. and Saraiva, E. M. (2001). Anti-Leishmanial activity of an indole alkaloid from peschiera australis. Antimicrob. Agents. Chemother. , 45(5):1349-1354 .

Eckert, J. and Deplazes, P. (2004). Biological , epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern, Clin. Microbiol. Rev. , 17(1): 107-135.

Elissondo, M.C.; Dopchiz, M. C. & Denegri, G. (2002). Human hydatidosis in Mar del Plata, Buenos Aires province, Argentina (1992-1995): A preliminary study. Parasitol. Latinoamer. , 57: 124-128.

El-Torki, M. A. ; Mehdi, A. W. ; Mohammed, A. I. and Al-Jiboori, N. A. (2008). Liver and kidney function in adult male rats following multiple subcutaneous injections of non- lethal doses of Datura metel leaves aqueous extracts. J. Faculty, Sci. , 2 : 26-98.

Gidado, A. ; Zainab, A. A. ; Hadiza, M. V. ; Serah, D. P. ; Anas, H. Y. and Milala, M. A. (2007). Toxicity studies of ethanol extracts of the leaves of Datura stramonium in rats. Afri. J. Biotechnol. , 6(8): 1012 – 1015.

Gottstein, B. and Hemphill, A. (1997). Immunopathology of echinococcosis. Chem. Immunol. , 66 : 177-208.

Kismet, K. ; Kilicoglu, S.S. ; Kilicoglu, B. ; Erel, S.; Gencay, O. ; Sorkun, K. ; Erdemli, E. ; Alkhan, O. ; Akkus, M. A. and Sayek, I. (2008). The Effect of scolicidal Agent propolis on liver and biliary tree. J. Gastroenterol. Surg. , 12: 1406-1411.

Kroeze, W. K. ; Tanner, C. E. (1987). Echinococcus multilocularis susceptibility and responses to infection in bred mice. Int. J. Parasitol. , 17 (4): 873-883. cited by (Al-Sabawi,2001) in Arabic.

Lightowlers, M.W.; Colebrook, A.L. ; Gauci, C.G. ; Gauci, S. M. ; Kyngdon, C.T; Monkhouse, J. L. ; Rodriquez, C. V. ; Read, A. J. ; Rolfe, R. A. and Sato, C. (2003). Vaccination against cestode parasites : anti-helminth vaccines that work and why . Vetern. Parasitol. , 115:83-123.

Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. pharmacol. EXP. and Therap., 96: 94-113.

Ma, X. M. ; Bao, G. SH. , Wan, J. M.; Liao, D. J. ; Yin, SH. F.; Meng, X.Q.; Zhou, G.K.; Lu, X. M. and Li, H. Y. (2007). Therapeutic effect of Sophora moorcrofliana alkaloids in combination with albendazole in mice experimentially infected with protoscolices of Echinococcus granulosus . Braz. J. Med. Biol. Res. , 40(10):1463-1708.

Maizeles, R.M. and Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by Helminth parasites: Cellular and molecular mechanisms. Nature , Rev. Immunolo., 3: 733-744.

Marquardt W.C.; Demaree, R.S. and Grieve, R.B. (2000). Parasitology and vector biology. Harcourt, Acad. Press. 335-339.

Mentes, A.; Yalaz, S.; Killi, R. and Altintas, N. (2000). Radical treatment for hepatic echinococcosis. HPB. 2(1): 49-54.

Mosqueda, M. B. ; Esparza, R. H. ; Padilla, C. R.; Garcia, J.P.T.; Reys, M.M.; Almaraz, V.B.; Echavarria, F.; Saucedo, A. L. and Delapena, C.M. (2007). Gender as factor of susceptibility to infection in experimental hydatidosis. kev. Latinoam, Microbiol., 49 (1-2):31-37.

Mustafa, M. A. and Al-khazraji, A. (2008). Effect of some plant extracts on the Culex pipiens molestus forskal larvae , Iraq. J. Vet. Sci. , 22(1) : 9-12.

Naguleswaran, A. ; Spicher, M.; Vonlaufen, N. ; Ortega - Mora, L.M. ; Torgerson, P.; Gottstein, B. and Hemphill, A. (2006). In vitro metacestodicidal activities of genistein and other isoflavones against Echinococcus multilocularis and E.granulosus. Antimicrob. Agents, Chemother. 50(11): 3770-3778.

Polat, E.; Aslan, M. ; Cakan, H. ; Saribas, S. ; Ipek, T. and Kocazeybek, B. (2009). The effect of albendazole and povidone iodine for hydatid cysts protoscoleces , In-vitro and – vivo. Afri. J. Microbiol. 3(11):743-746.

Reddy, U. B. (2009). Antimicorbial activity of Datura stramonium and Tylophora indica (Burm. f.) Merr. Pharmacology on line 1:1293-1300.

Ribereaun – Gayon, P. (1972). Plant phenolics. Oliver and boyd. U. S. A. 254 pp.

Risan, F.A. (1994) . A stady of possibility of attenuation of protoscolices of E. granulosus using different types of laser rays .M .Sc. Thesis, Coll . Sci., Univ. Baghdad .

Roberts, L. S. & Janovy, J. Jr. (2000). Schmidt & Roberts' foundations of parasitology, 6th edn. McGraw-Hill Book Co. , New York: 670 pp.

Smyth, J.D. (1985). In vitro culture of Echinococcus spp. Proc. 13th Int. Cong. Hydatid. Madrid : 84-95.

Virella, G. and Tomlinson, S. (2007). Infection and immunity. In: Virella , G. (Eds.). Medical immunity , 6th edn. , Informa, Healthcare, NewYork : 183-200.

Wangoo, A. ;Ganguly, N. and Mahjan, R.C. (1989) Phagocytic function of monocytes in murine Model of Echinococcus granulosus of human origin. Indian. J. Med. Res. , 89: 40-42.

Wen, H. ; New, R.R.C. and Craig, P.S. (1993). Diagnosis and treatment of human hydatidosis. Br. J. Clin. Pharmacol. , 35: 565-574.

Xingming, M. ; Hangjuan, Y. ; Ying, D. ; Yanping, L. ; Weihua, T. ; Fangyu, A. and Jun, G. (2009). Antitumor effects of ethanotic extracts from sophora moorcroftiana seeds in mice. Irn. Red, (rescent, Med. J. , 11(1): 18-22.