تأثير المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان *Punica granatum* في الرؤيسات الاولية لطفيلي المشوكات الحبيبة *Echinococcus granulosus* في الزجاج وعلاج الاكياس العدرية في الفئران البيض Balb/c

جميل جري يوسف
كلية التربية للبنات
جامعة الكوفة

الخلاصة :

هدفت الدراسة الحالية، اختبار تأثير المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان في الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبة ***Echinococcus granulosus*** في الزجاج والأكياس العدرية في الفئران البيض.

اظهرت النتائج ان للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان تأثيراً معنوياً ($p<0.05$) في زيادة النسب المئوية لهلاك الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبة في الزجاج كلما زاد تركيز المستخلص مقارنة بالسيطرة، فعند المعاملة بالتركيز 5 ملغم/مل كان معدل النسبة المئوية لهلاك الرؤيسات 33.5% في حين كان معدل النسبة المئوية لهلاك الرؤيسات الاولية 100% عند المعاملة بالتركيز 20ملغم/مل. وكانت للجرعة العلاجية للمستخلص (0.924 غم/كغم) تأثيراً معنوياً في اختزال عدد الأكياس العدرية وانخفاض معدلات اوزان الجسم والطحال والكبد في الفئران المخمجة بالرؤيسات الاولية والمعالجة بالمستخلص مقارنة بالفئران المخمجة وغير المعالجة.

المقدمة:

يعد داء الأكياس العدرية Hydatidosis من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان في جميع مناطق العالم والذي يتسبب بوساطة الأطوار اليرقية للديدان الشريطية التابعة الى جنس *Echinococcus* والذي يشمل عدة أنواع أهمها النوع الحبيبي *E. granulosus* والنوع السنخي *E. multilocularis* ، (Thompson and Mcmanus, 2001).

ينتشر مرض الأكياس العدرية في جميع أنحاء العراق ويصاب به العشرات من سكان هذه المناطق سنوياً، ويعزى سبب انتشار هذا المرض الى البيئة الزراعية التي تتكاثر فيها المواشي والأغنام(المضائف الوسطية) والكلاب السائبة (المضائف النهائية) مما يساعد على اكتمال دورة حياة الطفيلي (Abu- Esbeih, 2001).

يعد التداخل الجراحي من أفضل الطرائق العلاجية لحد الآن على الرغم من صعوبة إجرائه في بعض الحالات او تعذره(Mentes *et al*.,2000) ومن هنا تبرز أهمية العلاج الكيمياوي كبديل عن العلاج الجراحي في حالات الإصابة المبكرة او المتعذرة جراحياً ، حيث أعطى نتائج شفائية للكثير من الحالات، ولكن لهذا العلاج تأثيرات جانبية في الجسم وخاصة انه يستعمل لمدة طويلة ولاحتمال عودة الإصابة في بعض الحالات ولمقاومة الطفيلي لبعض تلك المركبات العلاجية وتثبيطه لعملها، ولهذا اتجه العديد من الباحثين نحو النباتات الطبية والتي تتوافر بكثرة في المحيط البيئي، حيث استعملت منذ القدم في علاج العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان لاحتوائها على مواد فعالة تكون قادرة على علاج الكثير من الأمراض الطفيلية من دون أن يكون لها تأثيرات جانبية كبيرة في الجسم الحي (Al-Saddi *et al*.,1996) .

استعملت مستخلصات قلف جذور وسيقان الرمان كقاتل وطارد للديدان الشريطية المعوية لاحتوائها على مركبات قلويدية Alkaloids (Zhicen,1987;Wren,1988;Kapoor,1990) كما استعملت مستخلصات قشور ثمار الرمان وبكفاءة عالية في علاج بعض الأمراض المتسببة عن الديدان الطفيلية كمرض تعفن الكبدFascioliasis الذي تسببه دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica*(المياح، 2002) ومرض الاكياس العدرية Hydatidosis الذي يسببه طفيلي المشوكات الحيبية *E. granulosus*(المبارك،2006).

وبسبب اهتمام الناس بالتداوي بالنباتات الطبية كبديل عن الأدوية الكيمياوية لما تسببه الأخيرة من تأثيرات جانبية،لذا اقترحت هذه الدراسة والتي تهدف الى اختبار تأثير المستخلص المائي الحار لقلف جذور الرمان في الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية في الزجاج ومحاولة علاج داء الأكياس العدرية في الفئران البيض Balb/c المخمجة بالرؤيسات الأولية باستعمال الجرعة العلاجية من المستخلص بعد تحديد الجرعة القاتلة لنصف الفئران المختبرة.

المواد وطرائق العمل:

1- تحضير المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان

جمعت جذور نبات الرمان من مزرعة للرمان في منطقة العباسية في محافظة النجف، ثم وضعت في أكياس نايلون معتمة، وغسلت عدة مرات بالماء المقطر، ثم فصل القلف عن الجذور وترك في المختبر عدة أيام لحين جفافه بشكل تام، قطع الى قطع صغيرة وطحن بالمطحنة الكهربائية وحفظ المسحوق في قناني زجاجية محكمة الغلق بدرجة حرارة (4م) لحين استعماله. ولغرض تحضير المستخلص مزج(50) غرام من مسحوق القلف مع (500) مللتر من الماء المقطر في دورق زجاجي سعة (500)مللتر وتم غلي الخليط بواسطة جهاز تسخين لمدة 40 دقيقة وترك الخليط لفترة لكي يبرد، بعدها أستعمل جهاز الطرد المركزي وبسرعة(3000)دورة /دقيقة لمدة (15)دقيقة لغرض فصل الراشح عن الراسب ، بعدها ركز الراشح باستعمال المبخر الدوار بدرجة حرارة 40م، ثم وضع الراشح في أطباق زجاجية وجفف في فرن كهربائي بدرجة حرارة (40- 45م) وحفظ في درجة حرارة 8م لحين الاستعمال وتم الكشف عن وجود القلويدات في المستخلص وذلك بمزج 5مل من المستخلص مع 2مل من كاشف القلويدات Dragendroffs reagent حيث ظهر راسب برتقالي محمر دلالة على وجود القلويدات في المستخلص (Harborne,1984).

2-الحيوانات المختبرية:

استعملت الفئران البيض *Mus musculus* التي تم الحصول عليها من معهد ابحاث العقم والأجنة، حيث وضعت في أقفاص بلاستيكية أذ ربيت وكثرت في ظروف البيت الحيواني القياسية الثابتة من التغذية والتهوية والإنارة ودرجة الحرارة التي تراوحت بين 25-30م.

3- جمع نماذج الأكياس العدرية وتحضير الرؤيسات الأولية وحسابها وتحديد حيويتها

جمعت نماذج الأكياس العدرية من أكباد الأغنام ذات الاعمار الكبيرة والمخمجة طبيعياً من مجزرة محافظة النجف،ثم نقلت العينات في حاويات خاصة الى مختبر الحيوان في كلية التربية- جامعة الكوفة، واجريت معاملات التهيئة والعد خلال مدة لا تتجاوز الساعتين ،واعتمدت طريقة Al-Omoran *et al*. (1995) في عملية تحضير الرؤيسات الأولية، اذ عقم السطح الخارجي للكيس العدري بالكحول الاثيلي 70% وتم سحب 75% من السائل العدري بوساطة محاقن طبية نبيذة بحجم 20 ملليتر بعد ذلك فصلت الطبقة الجرثومية عن الطبقة الصفائحية للكيس ووضعت في

طبق زجاجي معقم وقطعت الى قطع صغيرة وغسلت بالمحلول الملحي الفسلجي 0.85% الحاوي على 100 وحدة دولية /ملليتر من بروكائيين بنسيلين و100مايكروغرام/ملليتر من ستريتومايسين ورشحت بوساطة مصفاة معقمة تسمح ثقوبها بمرور الراشح الحاوي على الرؤيسات الاولية فقط جمع الراشح في قناني زجاجية معقمة، تركت القناني عدت دقائق لكي ترسب الرؤيسات ثم غسلت 3-4مرات بالمحلول الملحي الفسلجي الحاوي على المضادات الحياتية وكانت ترج في كل مرة رجة خفيفة وتترك لعدة دقائق لحين ترسيب الرؤيسات ثم أزيل الراشح بعدها علقت الرؤيسات بالمحلول الملحي الفسلجي الخالي من المضادات الحياتية. حسب عدد الرؤيسات الأولية باستعمال طريقة نقل الحجم الثابت بوساطة الماصة الدقيقة ذات السعة (10)مايكروليتر ،اذ حسب العدد الكلي للرؤيسات الأولية في هذا الحجم بوساطة عداد يدوي وباستعمال المجهر المركب وتحت القوة 20X واعتمد معدل العدد لسبعة مكررات في حساب العدد الكلي للرؤيسات،وفحصت حيوية الرؤيسات باستعمال صبغة الأيوسين المائية 0.01%،حيث مزجت كميات متساوية من عالق الرؤيسات مع الصبغة وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير20X، اذ تتكون الرؤيسات الحية باللون المائل للأخضر في حين تتلون الرؤيسات الميتة باللون الاحمر وذلك لنفاذ صبغة الايوسين المائية عبر جدرانها (Landa- Garacia *et al*. 1997).

4- أختبار فعالية تراكيز مختلفة من المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان في الرؤيسات الأولية في الزجاج

أستعمل الماء المقطر كمذيب في تحضير أربعة تراكيز مختلفة (5، 10، 15، 20 ملغم/مل) من المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان وحفظت في درجة حرارة 4م لحين استعمالها في تجارب الاختبار الحيوي ولغرض توزيع الرؤيسات على انابيب الاختبار رُجّ عالق الرؤيسات جيداً لانتظام توزيع الرؤيسات في العالق ،ثم نقل حجم ثابت من العالق يحوي حوالي 1000 رؤيس وذلك بوساطة ماصة دقيقة ووضع في انابيب اختبار معقمة بواقع ثلاثة انابيب لكل تركيز ،بعدها عومل كل أنبوب من الأنابيب الحاوية على عالق الرؤيسات بـ(1مل) من التراكيز المختلفة من المستخلص، وتركت ثلاثة أنابيب اخرى كسيطرة أذ عوملت كل منها بـ(1مل) من الماء المقطر ،سجلت الهلاكات بعد مرور 24 ساعة من المعاملة بدليل نفاذ صبغة الأيوسين حيث تتلون الرؤيسات الميتة باللون القهوائي –أحمر اما الرؤيسات الحية فتتلون باللون المائل للأخضر (المبارك ، 2006)

.

5- تعيين الجرعة القاتلة المتوسطة للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان

استعمل في هذه التجربة 60 فأرة بيضاء تتراوح أوزانها بين 25- 27غرام وبعمر 4- 6 أسابيع وقسمت الى ستة مجموعات كل مجموعة تضم 10 فأرات ،حيث أعطيت جرع متدرجة (5، 10، 15، 20، 25، غم/كغم) من المستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان ،حيث استعمل الماء المقطر كمذيب لتحضير الجرع وأعطيت هذه الجرع عن طرق الفم بوساطة انبوبة التغذية الانفية المعدية (Naso-Gastric tube) أذ جرعت كل فأرة بـ 1ملليتر من كل تركيز، في حين تركت احدى المجموعات كسيطرة حيث جرعت كل فأره بـ 1ملليترمن الماء المقطر ، سجلت الهلاكات بعد مرور 48 ساعة من المعاملة (المبارك ،2006).

6- تأثير الجرعة العلاجية للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان في علاج داء الأكياس العدرية في الفئران البيض.

استعملت في هذه التجربة 30 فأرة بيضاء تتراوح اوزانها بين 27 – 28 غرام وبعمر 4- 6 اسابيع، قسمت الى ثلاثة مجموعات كل مجموعة تحوي على 10 فأرات، حيث خمجت 20 فأرة بالرؤيسات الأولية بواقع 2000 رؤيس لكل فأرة وعن طريق الخلب بينما تركت العشرة الباقية بدون

خمج كسيطرة سالبة، اذ حقنت بالماء المقطر فقط ،عولجت احدى المجموعات المخمجة بالرؤيسات بـ 1ملليتر من الجرعة العلاجية (0.924 غم/كغم)وعن طريق الفم بوساطة أنبوبة التغذية الانفية المعدية وذلك بعد الخمج بالرؤيسات مباشرة ولمدة عشرة ايام وتركت المجموعة المخمجة الأخرى بدون علاج حيث جرعت بالماء المقطر فقط واعتبرت سيطرة موجبة، تم وزن جميع الفئران بعد مرور ثلاثة أشهر ومن ثم شرحت وتم ملاحظة عدد الأكياس العدرية في كافة أعضاء جسم الفئران وكذلك تم وزن الطحال والكبد وقورنت النتائج مع مجموعات السيطرة (المبارك، 2006) واستخرجت الكفاءة العلاجية النسبية وحسب المعادلة التي ذكرت من قبل (1987).Chappell *et al* وكالآتي:

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

7- التحليل الاحصائي.

استعمل اختبار تحليل التباين Analysis of variance في تحليل النتائج التي تم الحصول عليها واستخرج اقل فرق معنوي LSD لمعرفة فيما اذا كانت الفروقات معنوية ام لا وبالاعتماد على(1988)Daniel، ولغرض الحصول على قيمة الجرعة اللازمة لهلاك 50% من الفئران المختبرة تم تطبيق طريقة المربعات الصغرى Least square method لانحراف القييم (Finney, 1977).

النتائج والمناقشة:

أظهرت النتائج المبينة في جدول (1) ان للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان تأثيراً معنوياً ($P<0.05$) في زيادة النسب المئوية لهلاك الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية في الزجاج كلما زاد تركيز المستخلص مقارنة بالسيطرة ،اذ كان معدل النسبة المئوية لهلاك الرؤيسات 33.5% عند المعاملة بالتركيز 5ملغم/مل، في حين كان معدل النسبة المئوية لهلاك الرؤيسات 100% في حالة المعاملة بالتركيز 20 ملغم/مل وعند اختبار السمية الحادة Acute toxicity للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان في الفئران وعن طريق الفم .بينت النتائج في جدول (2) ان النسب المئوية لهلاك الفئران تزداد كلما زادت جرعة المستخلص مقارنة بالسيطرة، اذ كانت النسبة المئوية للهلاك 10% عند المعاملة بالجرعة 5غم/كغم بينما كانت النسبة المئوية للهلاك 100% عند المعاملة بالجرعة 25 غم/كغم، وعند تحويل مقدار الجرعة الى اللوغاريتم المقابل لها ومقدار النسبة المئوية للهلاك الى الوحدة الاحتمالية المقابلة لها وبالاعتماد على طريقة المربعات الصغرى لانحراف القيم تم حساب الجرعة اللازمة لهلاك 50% من الفئران قيد التجربة (LD50) والتي كانت 9.24غم/كغم وبهذا تكون الجرعة العلاجية 0.924 غم/كغم، التي استعملت في علاج الفئران المخمجة بالرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية حيث بينت النتائج في جدول (3) ان للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان تأثيراً معنوياً ($P<0.05$) في خفض معدلات أوزان الجسم والطحال والكبد وعدد الأكياس العدرية في مجموعة الفئران المخمجة والمعالجة بالجرعة العلاجية من المستخلص اذ كانت الكفاءة العلاجية للمستخلص 93.8% مقارنة بمجموعة الفئران المخمجة وغير المعالجة(السيطرة الموجبة) ومن الملاحظ ان معدلات أوزان الجسم والطحال والكبد في مجموعة الفئران غير المخمجة وغير المعالجة (السيطرة السالبة) مقاربة الى مجموعة الفئران المخمجة والمعالجة بالمستخلص.

إن الفاعلية الكبيرة للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان في هلاك الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية في الزجاج وكذلك الكفاءة العلاجية العالية له في اختزال عدد الأكياس العدرية ولما يسببه هذا الاختزال في خفض معدلات أوزان الجسم والطحال والكبد للفئران المخمجة والمعالجة بالمستخلص ربما تعود الى احتواء المستخلص على مركبات قلويدية فعالة ،فقد تمكن Willaman & Schubert(1961) من عزل بعض المركبات القلويدية من قلف جذور الرمان ومن هذه المركبات Isopelletierines, Pelletierines التي تجعله ذات فاعلية كبيرة ضد الديدان الطفيلية وخصوصا الشريطية منها كما أشارت بعض الدراسات ان المركبات القلويدية في قلف جذور الرمان تؤثر على النفاذية الاختيارية للغشاء البلازمي للطفيلي من خلال تأثيرها على الدهون والبروتينات المكونة له او انها ترتبط مع المواقع الفعالة لبعض الانزيمات المهمة في انتاج الطاقة الضرورية لديمومة حياة الطفيلي (Zhicen,1987;Wren,1988;Kapoor, 1990). نستنتج من هذه الدراسة ان للمستخلص المائي المغلي لقلف جذور الرمان فعالية كبيرة ضد الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية في الزجاج والأكياس العدرية في الفئران البيض المخمجة بالرؤيسات الاولية لطفيلي المشوكات الحبيبية.

جدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الحار لقلف جذور الرمان في الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية في الزجاج

التركيز ملغم/مل	معدل عدد الرؤيسات الحية	معدل % للحيوية	معدل عدد الرؤيسات الهالكة	معدل % للهلاك
السيطرة	17.6	91.7	1.6	8.3
5	14.3	66.5	7.2	33.5
10	6.2	31	13.8	69
15	2.3	12.2	16.6	87.8
20	0	0	20.4	100
أقل فرق معنوي عند مستوى 0.05	3.2		2.9	

جدول (2) عدد الفئران الهالكة ونسبها في اختبار الجرعة القاتلة المتوسطة للمستخلص المائي الحار لقلف جذور الرمان

الجرعة غم/كغم	عدد الفئران	عدد الفئران الهالكة	% للهلاك	الوحدات الاحتمالية للهلاك
السيطرة	10	–	–	–
5	10	1	10	3.71
10	10	5	50	5.00
15	10	7	70	5.52

20	10	9	90	6.28
25	10	10	100	–

جدول(3) تأثير الجرعة العلاجية 0.924غم/كغم من المستخلص المائي الحار لقلف جذور الرمان في معدلات أوزان الجسم والطحال والكبد وعدد الأكياس العدرية للفئران البيض المخمجة بالرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية .

المجموعة الحيوانية	معدل وزن الجسم (غم)	معدل وزن الطحال (غم)	معدل وزن الكبد (غم)	معدل عدد الأكياس العدرية	% للكفاءة العلاجية
فئران مخمجة ومعالجة	28.21	0.190	1.42	0.66	93.8
فئران مخمجة وغير معالجة (سيطرة موجبة)	33.27	0.385	2.01	10.80	
فئران غير مخمجة وغير معالجة(سيطرة سالبة)	27.33	0.117	1.21	–	
اقل فرق معنوي عند مستوى 0.05	1.80	0.11	0.32		

المصادر :

المبارك ،زينب علي حسين (2006). تأثير مستخلصات قشور ثمار الرمان*Punica granatum* في علاج داء المشوكات الحبيبي لطفيلي *Echinococcus granulosus* في الفئران البيض Balb/c. رسالة ماجستير ،كلية التربية للبنات،جامعة الكوفة، 110 صفحة.

المياح، زهرة عباس حسن (2002). تأثير المستخلص المائي لقشور الرمان في دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* .رسالة ماجستير، كلية التربية ،جامعة البصرة ، 101 صفحة.

Abu-Esbeih, T.S. (2001). Anaphylaxis during hydatid liver disease surgery. J. The Arab. Bor. Med. Speical., 3(2): 51-52.

Al-Omoran, A.H.; Emman,G. and Altaif, K.I. (1995).The immunomodulatory effect of hydatid cyst on mice humoral and cell- mediated immunity. J. Saddam University Science ,3(1) 189-198.

Al-Saddi, A.A.;Yones, F.N. and Al-Hadeth;, A.W. (1996). Primitive study on the efficiency of *Allium sativum* extract in experimental infection mice with _ *Hymenolopsis nana*- Technical Research. Techn., 31;58-63.

Chappell, L. H..; Thomson, A.W.; Barker, G. C. and Stuart, W.(1987). Dosage , timing, and route of administration of cyclosporine A and nonimmunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporine A and cyclosporine C against *Schistosoma mansoni: Invivo* and Invitro. Antimicrobial Agents and chemotherapy ,31:

1567-1571.

Daniel, W.W.(1988). Biostatistics. A foundation for analysis in health sciences ,4th ed., John Wiely& Sons ,Inc.

Finney, D.J**.** (1977). Probit analysis, 3rd ed, London-cambridge, University press, 333 pp.

Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis .2nd ed., Chapman and Hall. London ,288 pp.

Kapoor, L.D. (1990). CRC Handbook of Ayurvedic medicinal plants. CRC press, Boca Raton, Florida .

Landa-Garacia, J. I.; Alonso ,E.; Gonzalez- Uriarte, J. and Roderigues- Romano,D.(1997). Evaluation of scolicidal agents in experimental hydatid disease model. Eur. Sur. Res. ,29: 202-208.

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

Thompson, R.C. and Mcmanus, D.P.(2001). Aetiology: parasites and life – cycle, Pl- 19 in Eckert, J.; Gemmell, M.A. ; Mesline,F. X. and pawlowski, Z. S. (ed), WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: public health problem of global concerna. World organization for Animal Health, Paris ,France.

Willaman, J.J. and Schubert,B. G. (1961). Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. ARS, USDA Tech. Bull. 1234, Supt. Documents, Govt. Print. Off., Washington, DC, USA.

Wren, R. C. (1988). Potter's New Cyclopedia of Botanical Drugs and Preparations. The C. W. Daniel Company. Essex.

Zhicen, L. (1987). Colour Atlas of Chinese Traditional Drugs. Vol.1. Science Press, Beijing, People's Republic of china, pp. 75- 76.

Effect of boiling water extract of pomegranate *Paunica granatum* root hulls on protoscolices of *Echinococcus granulosus in vitro* and treatment of hydatid cysts in Balb/c mice

Jameel Jirry Yousif
College of Education
University of Kufa

Abstract:

The study aimed to bioassay the effect of boiling water extract of pomegranate root hulls on protoscolices *in vitro* and hydatid cysts in Balb/c mice.

Results showed a significant effect of extracts to increase the mortality percentage of protoscolices when the concentration of extract are increased,

Mice treated with therapeutic dose (0.924g/kg) of boiling water extract of pomegranate root hulls showed less number of hydatid cysts and the rates of spleen and liver weights were highly reduced than that of non-treated mice.