دراسة تأثير مستخلصات بذور نبات اليقطين الأصفر (*cucurbita maxima*)pumpkin في علاج الإصابة التجريبية بداء الأكياس المائية لطفيلي المشوكة الحبيبية في الجرذان المختبرية

هادي مدلول حمزة - سعد عزيز عنة
جامعة القادسية –كلية التربية – قسم علوم الحياة

الخلاصة

أستهدفت الدراسة الحالية معرفة تأثير مستخلصات بذور نبات اليقطين الأصفر *Cucurbita maxima* pumpkin في تضعيف حيوية الروؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* خارج الجسم الحي*In vitro* وتحديد الجرعة العلاجية لهذهِ المستخلصات لاستخدامها في علاج مرض الأكياس العدرية الثانوية في الجرذان المختبرية المخمجة بالروؤيسات ومقارنتها بمجموعة السيطرة السالبة.

أظهرت نتائج معاملة الروؤيسات الأولية بالمستخلصات الثلاث (المائي البارد والمائي الحار والكحولي وبالتراكيز (60,50,40,30)ملغم/مل من المستخلصات الثلاثة لبذور اليقطين الأصفر وبالفترات المختلفة (24,12,6,1) ساعة بعد المعاملة خارج الجسم الحي *in vitro* بأن المستخلص المائي البارد بتركيز 60 ملغم/مل هو الأكفأ في هلاك الروؤيسات يلية المستخلص المائي الحار ومن ثم المستخلص الكحولي.

تم تحديد الجرعة المتوسطة القاتلة للجرذان(LD_{50}) للمستخلصات(المائي البارد والمائي الحار والكحولي) ومنها أستخرجت الجرع العلاجية للمستخلصات والتي كانت(51.6 ،54.2، 56.3)ملغم/كغم على التوالي.

حقنت الجرذان البيض بالروؤيسات الأولية والتي حصل عليها من أكباد الأغنام المصابة من مجزرة الديوانية بواقع 2000 روؤيس لكل جرذ وعولجت بالجرع العلاجية من كل مستخلص وقد أظهرت النتائج بعد ثلاثة أشهر من الخمج وبالأعتماد على الكفاءة العلاجية النسبية أن المستخلص المائي البارد هو الأكفأ في أختزال عدد الأكياس العدرية الثانوية .

المقدمة Introduction

يعد داء الأكياس العدرية Hydatidosis أحد المشاكل الصحية الوبائية في مختلف أرجاء العالم (1) ، وهو من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان zoonotic disease أذ ينتشر في بلدان الوطن العربي وكذلك في بقية دول العالم ويزداد تواجد هذا المرض في المناطق الريفية التي تمتاز بتربية حيوانات الماشية والاغنام والابقار وأنتشار الكلاب السائبة(2).

من الأسباب المؤدية الى أنتشار هذا المرض هو عدم القدرة على أكتشاف الأصابة في المراحل المبكرة أذ لاتظهر أعراض مرضية إلا بعد زيادة حجم الكيس الذي يؤدي بدوره الى الضغط على الأنسجة المحيطة به وكذلك عدم توفر الوسائل العلاجية ، ويماثل هذا المرض في شدة إنتشاره الأورام السرطانية في مرحلة الأنبثاث Metastasis (3) ونظراً لأهمية المرض وتأثيره في النواحي الصحية والأقتصادية والأجتماعية للأنسان فقد أتجه الباحثون لايجاد وسائل مختلفة بهدف العلاج والسيطرة ،منها الأزالة العلاجية التي تعد من الطرق المفضلة المستخدمة بالرغم من صعوبة أجراءها في بعض الحالات أوحتى تعذرها أحياناً(5,4) ، ثم العلاج الكيمياوي بأستخدام مشتقات البنزيميدازول (Benzimidazole (BZ والبندازول Albendazole والميبندازول Mebendazole والبرازيكوانتيل Praziquantel والأيبسبرانتيل Epsiprantel والأيزوبرينوسين Isoprinosine والسايكلوسبورين Cyclosporine والأيفيرميكتين Ivermection والفينبندازول Fenbendazole وغيرها ، الذي يستعمل بالتزامن مع التداخل الجراحي أو لوحده والذي أعطى نتائج شفائية محدودة لكثير من الحالات مصحوباً بأثار جانبية في الجسم كفقدان الشعر والحمى والم في البطن والدوار Dizziness (7,6) .

أثبت العلاج بالنباتات والاعشاب الطبية تأثيره الفعال عبر التاريخ ولايزال يمارس في كثير من البلدان وحتى المتطورة منها لأن النباتات بشكل عام والطبية بشكل خاص تعد مصدراً مهماً للعديد من المركبات العضوية وغير العضوية ذات الأهمية العلاجية(8) ومن النباتات الطبية المهمة نبات الرمان والداتورة والحنظل والحبة السوداء وغيرها كما ويعد نبات القرع الأصفر أحد هذهِ النباتات حيث تستعمل

بذورة كمضادات للديدان الشريطية كدودة البقر الشريطية *Taenia saginata* والديدان الخيطية كدودة الصفر الخراطيني *Ascaris lumbricoid* وبعض الديدان المثقبة كدودة البلهارزيا *Schistosoma sp.* كما يقلل من الأصابة بأمراض القلب وتصلب الشراين والأمراض الناتجة عنها فضلاً عن معالجته للقرح والأمراض الجلدية ومرض الجذام (9)

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1- جمع نماذج الأكياس العدرية وتحضير الروؤيسات الأولية

Collection of Hydatid cysts and Preparation of Protoscolices

تم الحصول على الأكياس العدرية من أصل أغنام مصابة طبيعياً من مجزرة الديوانية / محافظة الديوانية ، أذ وضعت في داخل أكياس نايلون نظيفة ومن ثم وضعت داخل حاوية نظيفة ونقلت بعد ذلك إلى المختبر ، وغسلت الأعضاء من الخارج بالماء لغرض ازالة الدم والمواد العالقة بها أثناء الذبح ، أتبعت طريقة (10) لجمع الروؤيسات الأولية

أذ تم تعقيم سطح الكيس العدري أولاً باستخدام كحول أثيلي 70% ومحاقن طبية معقمة ذات حجم 10مل ذات أبر قياس 21 درجة . تمت عملية الجمع تحت ظروف معقمة حيث سحب سائل الكيس العدري مع الروؤيسات الأولية السابحة فيه ووضع في بيكر سعة 250 مل ،ثم فتح الكيس باستعمال المقص والملقط لغرض استخراج الطبقة المولدة ووضعت في أناء معقم حاوي على المحلول الملحي الفسلجي وقطعت إلى قطع صغيرة ثم غسلت بواسطة قنينة غسل Washing bottle تحتوي على محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) ثم أضيف هذا المعلق الذي تم الحصول عليه إلى السائل العدري ، ثم وضعت الروؤيسات الأولية في أنابيب أختبار معقمة لغرض ترسيبها بجهاز الطرد المركزي Centrifuge Hettich-Micro 120 ولمدة 15 دقيقة لكل ترسيب،وتم أضافة المضادات الحيوية قبل البدء بالغسلة الثانية البنسلين Crystalline penicillin بواقع 2000 وحدة /لتر وستربتومايسين Streptomycin بواقع (1غم/لتر) إلى محلول الغسل PBS في أثناء الغسلة الثانية ،وبعد الأنتهاء من عملية الغسل سكب الراشح وأضيف إلى الراسب قليل من دارئ الفوسفات الملحي المعقم لحساب عدد الروؤيسات الأولية أما معلق الروؤيسات فحفظ في محلول هانك الملحي مع سائل الكيس العدري ثم أجريت عمليات فحص الحيوية وأحتساب عدد الروؤيسات الأولية .

2- تقدير حيوية الروؤيسات الأولية Estimation of ProtoscolicesViability

قدرت حيوية الروؤيسات الأولية بأخذ حجم معين من معلق الروؤيسات الأولية ومزجه مع حجم مماثل(1:1) من صبغة الأيوسين المائية (0.1%) وباستعمال ماصة دقيقة Micropipatte ورج المحلول جيداً وأخذت منهُ قطره وفحصت مباشرة تحت المجهر الضوئي نوع Olympus Co.,LDT وتم حساب النسبة المئوية للرؤيسات الأولية التي أظهرت باللون الأخضر مقارنةً بالروؤيسات الأولية الميتة التي أخترقت الصبغة أغشيتها وأصطبغت باللون الأحمر ولخمس مكررات (11).

3-عد الروؤيسات الأولية الحية Count of Viable Protoscolices

حسب عدد الروؤيسات الأولية باستعمال طريقة نقل الحجم الثابت بواسطة ماصة دقيقة ذات حجم 10مايكروليتر بعد رج المعلق المؤلف من الروؤيسات الأولية ودارئ الفوسفات الملحي المعقم . وتم حساب العدد الكلي للرؤيسات باستعمال المجهر المركب نوع Olympus وقد اعتمد معدل العدد لخمسة مكررات في احتساب العدد الكلي للرؤيسات وتم احتساب عدد الروؤيسات الأولية في المليلتر الواحد كمايلي :-

متوسط عدد الروؤيسات في الحجم الثابت المستعمل (10ml) =20 رؤيس

أذ أن عدد الروؤيسات في واحد مليلتر=20 ×100 =2000 رؤيس (12)

4- تحضيرالمستخلص المائي البارد والحار والكحولي لبذور القرع الأصفر

تم الحصول على بذور هذا النبات من المكاتب الزراعية في مدينة الديوانيةبعدها تركت البذور في المختبر لمدة أسبوع بدرجة حرارة 25مْ لغرض تجفيفها طحنت البذور بعد تجفيفها بواسطة مطحنة كهربائية Electrcal Mill وحفظ المسحوق في قناني زجاجية محكمة الغلق بدرجة حرارة 4مْ لحين استعمالهِ.

مزج 50 غرام من مسحوق بذور القرع مع 500مل من ماء مقطر ووضع المزيج على جهاز المحرك المغناطيسيMagnetic Stirrer لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة المختبر ، ثم استعمل جهاز الطرد المركزي Centerfuge وبسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض فصل الراشح عن الراسب ، ركز الراشح باستعمال المبخر الدوار Rotary Evaporator ثم وضع الراشح في أطباق بتري وترك في درجة حرارة المختبر حتى يجف بعدها حفظ في الثلاجة وبنفس الطريقة حضر المستخلص المائي الحار لبذور القرع الاصفر ولكن باستخدام الماء الحار بدل الماء البارد(14,13) .امابالنسبة للمستخلص الكحولي فقد تم وضع 50 غرام من مسحوق بذور القرع الجافة في أوعية الأستخلاص Thimbles الموجودة في جهاز السوكسليت Soxhlet extractorوحسب طريقة Harborne (15) تم إضافة 500 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 80% وأستمر الأستخلاص لمدة 24 ساعة ثم أخذ المستخلص ووضع في فرن كهربائي بدرجة 40 مْ وبعد الحصول على مستخلص جاف وضع في الثلاجة لحين الأستعمال.

5- أختبار فعالية المستخلص المائي البارد والحار والكحولي لبذور القرع الأصفر بالتراكيز (60,50,40,30)ملغم/مل في حيوية الروؤيسات الأولية في الزجاج

جمعت الروؤيسات الأولية وتم عدها وأحتساب حيويتها بحيث كان عدد الروؤيسات في كل أنبوب 2000 رؤيس/ مل وحسبت النسبة المئوية للحيوية في بداية التجربة .

رج عالق الروؤيسات الأولية جيداً وذلك لأنتظام توزيع الروؤيسات في العالق، نقل 1 مليلتر من عالق الروؤيسات إلى كل أنبوب من الأنابيب الزجاجية ذات الغطاء المحكم التي كان عددها 20أنبوب عوملت الأنابيب الحاوية على عالق الروؤيسات بالتراكيز (60,50,40,30 ملغم/مل) لكل مستخلص من المستخلصات الثلاثة بالأوقات (24,12,6,1) ساعة بعد ذلك تم أحتساب معدل المتوسط الحسابي للحيوية بعد ساعة بدليل نفاذ صبغة الأيوسين بعدها خزنت الأنابيب في الظروف الهوائية بدرجة حرارة (20مْ) ثم بعد ذلك احتسب معدل المتوسط الحسابي لحيوية الروؤيسات للأوقات(24,12,6)ساعة بدليل نفاذ صبغه الايوسين حيث فحصت الروؤيسات تحت المجهر الضوئي ومن ثم تعداد الحيه والميته منها وسجلت النتائج بضوء أصطباغ الرؤيس الأولي بصبغة الأيوسين والتغيرات والتشوهات الشكلية (16).

6- أحتساب قيم الجرعة نصف القاتلة Lethal Dose (LD_{50})

تم التعرف على قيمة LD_{50} للمستخلص المائي البارد والحار والكحولي لبذور القرع الأصفر من اجل حقنها في الجرذان البيض أثناء فترة الدراسة باستخدام قانون Litchfield & Wilcoxon (17) وحسب القانون التالي :-

$$L.D._{50} = \text{Highest dosage} - \Sigma\, ab/n$$

L.D.50 =الجرعة نصف القاتلة

Highest dosage = أعلى جرعة حققت قتل 100%

Σab = مجموع ضرب a × b حسب الجدول

a = مقدار الفرق بين الجرع

b= مجموع عدد الحيوانات الميتة لكل جرعة (الثاني + السابق/2)

n= عدد الحيوانات المستخدمة لكل جرعة

وكما موضح في المثال التالي المطبق في الدراسة الحالية لحساب قيمة LD_{50} للمستخلص المائي البارد لبذور القرع الأصفر

الجرعة ملغم/كغم	عددالحيوانات لكل مجموعة	عـــــددالحيوانات الميتة	a مقدارالفرق بين الجرع	b الثاني + السابق/2	ab
400	6	–	50	–	–
450	6	–	50	–	–

50	1	50	2	6	500
175	3.5	50	5	6	550
275	5.5	50	6	6	600
ΣAb=500					

L.D50= 600- 500/6
= 600-83.33
= 516.6

وبالقسمة على 10تكون الجرعة العلاجية 51.6 ملغم /كغم وبنفس الطريقة استخرجت الجرعة العلاجية لكل من المستخلص المائي الحار والمستخلص الكحولي حيث كانت(56.3,54.2) على التوالي .

7-دراسة تاثير الجرع العلاجية للمستخلصات (المائي البارد، المائي الحار،الكحولي)في اناث الجرذان البيض المخمجة بالروؤيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية

استخدمت الجرع العلاجية (51.6, 54.2, 56.3)ملغم/كغم للمستخلصات المائي البارد و الحار والكحولي على التوالي في علاج الجرذان المخمجة بالروؤيسات الأولية .

استعملت في هذهِ التجربة 44 من اناث الجرذان البيض حيث خمجت 40 من الجرذان وبواقع 2000 رؤيس اولي عن طريق الحقن بالبريتون وتركت الاربعة المتبقية كسيطرة سالبة عوملت بالمحلول الملحي الفسلجي (0.9 %)وتم تقسيم الجرذان المخمجة إلى المجاميع التالية :

1- مجموعة تتكون من12 حيوان مخمج جرعت بالجرعة العلاجية 51.6 ملغم /كغم من المستخلص المائي البارد وهذهِ المجموعة بدورها قسمت إلى ثلاث مجاميع بواقع 4 جرذان لكل مجموعة حيث عولجت المجموعة الأولى بعد 24 ساعة والمجموعة الثانية بعد اسبوع والمجموعة الثالثة بعد 15 يوم .

2- مجموعة تتكون من 12 حيوان مخمج جرعت بالجرعة العلاجية 54.2 ملغم/ كغم من المستخلص المائي الحار وايضاً قسمت إلى ثلاث مجاميع وبنفس الفترات الزمنية السابقة.

3- مجموعة تتكون من12 حيوان مخمج جرعت بالجرعة العلاجية 56.3 ملغم/كغم من المستخلص الكحولي وايضاً قسمت إلى ثلاث مجاميع وبنفس الفترات الزمنية السابقة.

وتركت الحيوانات الاربعة المخمجة المتبقية بدون علاج كمجموعة سيطرة موجبة .

شرحت جميع الجرذان بعد مرور ثلاثة اشهر من الخمج بعد وزنها بواسطة ميزان حساس ثم تخديرها بواسطة الكلورفورم ،ثم فحص الجوف الداخلي للجرذان لغرض عد الاكياس العدرية في جميع الاحشاء الداخلية للحيوانات ومن ثم تقدير الكفاءة العلاجية حسب المعادلة التي ذكرها (18),*etal*.Chappell :

الكفاءة العلاجية النسبية= $\frac{\text{معدل عدد الاكياس في مجموعة السيطرة الموجبة – معدل عدد الأكياس في المجموعة المعاملة}}{\text{معدل عدد الاكياس في مجموعة السيطرة الموجبة}} \times 100$

8- التحليل الاحصائي Statistics Analysis

تم استعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design(CRD) وبتجربة عاملية ذات عاملين وهما(التراكيز والفترات الزمنية)وبخمسة مكررات وتم اختبار النتائج حسب اختبار اقل فرق معنوي Least Significance Defferences(LSD) وعلى مستوى احتمال P<o.o5 (19).

النتائج Results

دراسة تراكيز مختلفة من المستخلصات(المائي البارد والمائي الحار والكحولي) لبذور القرع الأصفر *C.maxima* في نسب هلاك الرووئيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية خارج الجسم الحي*In vitro* .

أظهرت النتائج وكما مبين في الجداول (1و2و3) حصول زيادة في نسبة هلاك الرووئيسات الأولية بزيادة التركيز ومدة التعريض للمستخلصات الثلاثة حيث كانت أعلى نسبة لهلاك الرووئيسات الأولية بعد 24 ساعة مقارنةً بنسبة هلاك الرووئيسات الأولية المعاملة بنفس التراكيز وبفترات زمنية أقل بينما كانت أقل نسبة هلاك في المجموعة المعاملة بعد ساعة وتزايدت نسبة الهلاك طردياً مع الزمن حيث جاءت نسبة الهلاك بعد 6 ساعة بالمرتبة الثانية تلتها نسبة هلاك الرووئيسات بعد 12 ساعة من المعاملة ، وأظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية ذات دلالة أحصائية عند مستوى أحتمالية ($P<0.05$) بين المجاميع المختلفة مقارنةً بمجموعة السيطرة. .

الجدول (1): دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي البارد لبذور القرع الأصفر *C.maxima* في نسب هلاك الرووئيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية خارج الجسم الحي*In vitro* .

تركيز المستخلص ملغم/مل	النسبة المئوية لهلاك الرووئيسات الأولية % / المده الزمنية بعد المعاملة (ساعة)			
	1	6	12	24
30	9.2	29.3	51.3	78.2
40	19.7	48.3	67.5	86.8
50	31.8	64.5	79.2	94.7
60	49.7	76.7	87.1	100
السيطرة	0	5.2	7.1	12.2
أقل فرق معنوي عند مستوى $P<0.05$	10.46	38.7	45.17	75.34

الجدول (2): يبين تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الحار لبذور القرع الأصفر *C.maxima*في نسبة هلاك الرووئيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية خارج الجسم الحي*In vitro* .

تركيز المستخلص ملغم/مل	النسبة المئوية لهلاك الرووئيسات الأولية % / المده الزمنية بعد المعاملة (ساعة)			
	1	6	12	24
30	6.6	21.8	37.2	45.6
40	13.2	35.5	50	75.5
50	25.5	46.4	69.5	88.1
60	43.6	71.5	83.1	96.5
السيطرة	0	5.2	7.1	12.2
أقل فرق معنوي عند مستوى $P<0.05$	8.47	11.74	28.08	29.49

الجدول (3):يبين تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور القرع الأصفر*C.maxima* في نسبة هلاك الرووَيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية خارج الجسم الحي*In vitro* .

تركيز المستخلص ملغم/مل	النسبة المئوية لهلاك الرووَيسات الأولية%/ المده الزمنية بعد المعاملة (ساعة)			
	1	6	12	24
30	4.4	18.7	33.4	39.7
40	11.2	31.2	46.7	70.5
50	20.2	40.5	56.8	84.6
60	38.4	66.3	80.1	92.2
السيطرة	0	5.2	7.1	12.2
أقل فرق معنوي عند مستوى P<o.o5	18.09	36.36	28.47	47.50

تأثير المستخلصات (المائي البارد والحار والكحولي) لبذور القرع الأصفر *C.maxima* بجرعة 51.6 ,56.3,54.2 ملغم/كغم على التوالي في أختزال عدد الأكياس العدرية للجرذان المخمجة بالرووَيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية .

تشير نتائج الدراسة الحالية وكما مبين في الجداول(4و5و6) أن معدل عدد الأكياس العدرية في الجرذان المخمجة والمعالجة بالمستخلص المائي البارد والمائي الحار والكحولي وبالفترات الزمنية الثلاثة كانت اقل من معدل عدد الأكياس العدرية في الجرذان المخمجة غير المعالجة (السيطرة الموجبة) وبفارق معنوي أحصائي عند مستوى معنوية P<0.05 وقد أظهرت الدراسة أن أفضل وقت للمعالجة أدى إلى خفض عدد الأكياس العدرية للحيوانات المخمجة هو بعد 24 ساعة وأسبوع من الخمج.

الجدول(4):تأثير المستخلص المائي البارد لبذور القرع الأصفر *C.maxima* بجرعة (51.6) ملغم/كغم في معدل عدد الأكياس العدرية والكفاءة العلاجية النسبية للجرذان المخمجة بالرووَيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية .

نوع المجموعة الحيوانية	معدل عدد الأكياس العدرية	النسبة المئوية للكفاءة العلاجية
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد 24 ساعة	–	100
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوع	–	100
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوعين	1.2	84

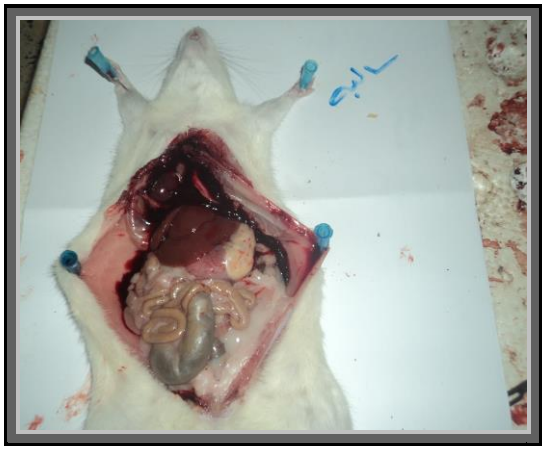
سيطرة موجبة (بدون معالجة)	7.5	–
اقل فرق معنوي عند مستوى أحتمالية 5 P<0.0	1.162	–

الجدول(5):تأثير المستخلص المائي الحار لبذور القرع الأصفر *C.maxima* بجرعة (54.2) ملغم/كغم في معدل عدد الأكياس العدرية والكفاءة العلاجية النسبية للجرذان المخمجة بالروؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية .

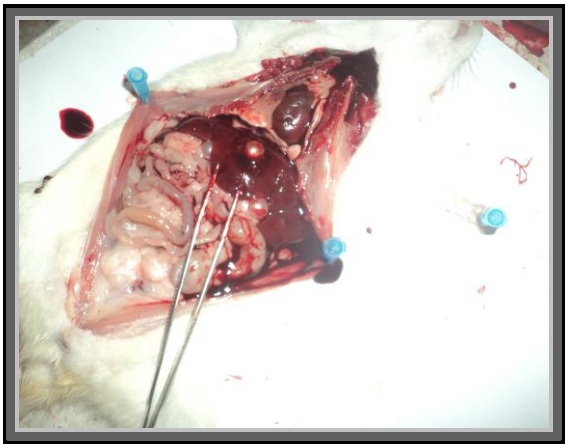
نوع المجموعة الحيوانية	معدل عدد الأكياس العدرية	النسبة المئوية للكفاءة العلاجية
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد 24 ساعة	–	100
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوع	1.5	80
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوعين	2.7	64
سيطرة موجبة (بدون معالجة)	7.5	–
اقل فرق معنوي عند مستوى أحتمالية 5 P<0.0	1.977	–

الجدول(6):تأثير المستخلص الكحولي لبذور القرع الأصفر*C.maxima* بجرعة (56.3) ملغم/كغم في معدل عدد الأكياس العدرية والكفاءة العلاجية النسبية للجرذان المخمجة بالروؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية .

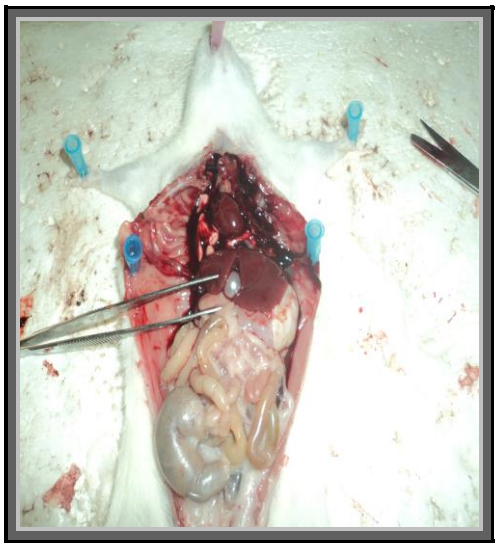
نوع المجموعة الحيوانيه	معدل عدد الأكياس العدرية	النسبة المئوية للكفاءة العلاجية
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد 24 ساعة	2.2	70.6
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوع	4.7	37.3
حيوانات مخمجة ومعالجة بعد أسبوعين	5.2	30.06
سيطرة موجبة(بدون معالجة)	7.5	–
اقل فرق معنوي عند مستوى أحتمالية 5 P<0.0	2.737	–



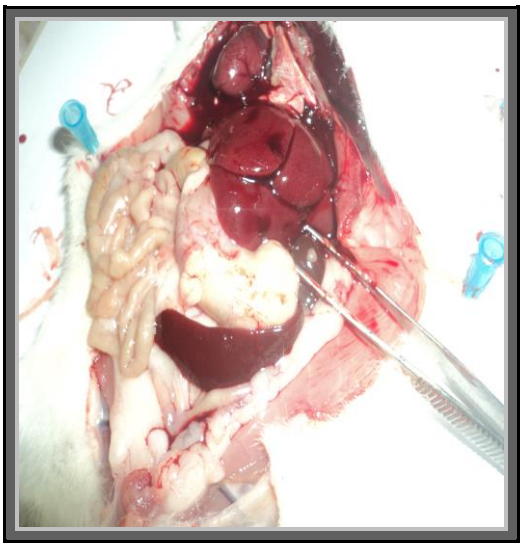
الصورة(1): جرذ طبيعي محقون بالمحلول الملحي الفسلجي 0.9% (سيطرة سالبة)



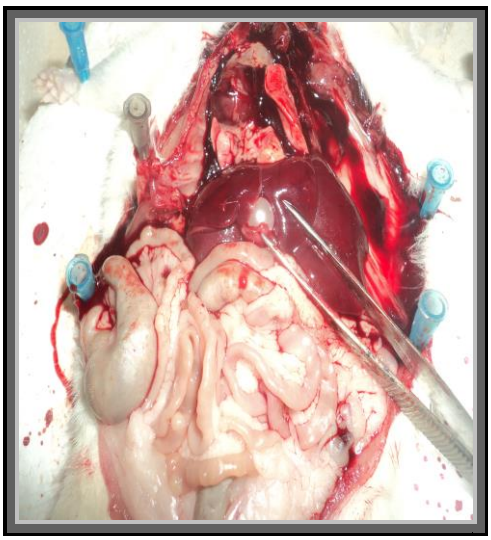
الصورة(2): جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية غير معالج (سيطرة موجبة) يلاحظ فيه زيادة نمو الأكياس العدرية.



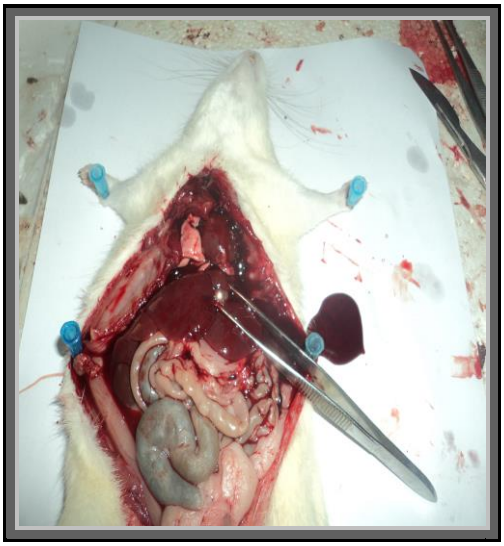
الصورة(3).جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة 51.6ملغم/كغم من المستخلص المائي البارد بعد اسبوعين يلاحظ فيه نمو الأكياس العدرية



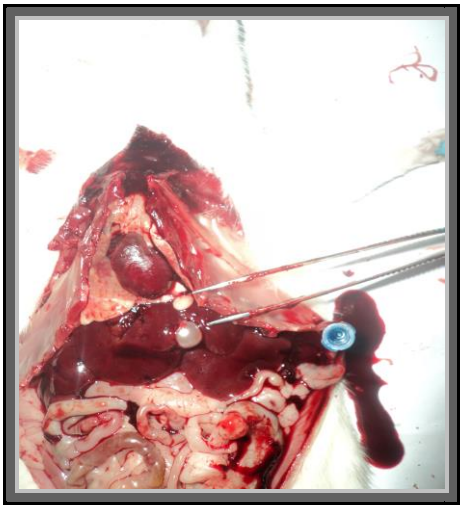
الصورة(4): جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة54.2 ملغم/كغم من المستخلص المائي الحار بعد اسبوع يلاحظ فيه نمو الأكياس العدرية.



الصورة(5):جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة 54.2ملغم/كغم من المستخلص المائي الحار بعد اسبوعين بلاحظ فيه نموالأكياس العدرية .



الصورة(6): جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة56.3 ملغم/كغم من المستخلص الكحولي بعد 24 ساعة يلاحظ فيه نمو الأكياس العدرية.



الصورة(7):جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة 56.3ملغم /كغم من المستخلص الكحولي بعد اسبوع يلاحظ فيه نمو الأكياس العدرية

الصورة(8): جرذ مخمج بالروؤيسات الأولية ومعالج بجرعة 56.3ملغم/ كغم من المستخلص الكحولي بعد اسبوعين يلاحظ فيه نموالأكياس العدرية

المناقشة

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى زيادة نسبة هلاك الروؤيسات الأولية بصورة طردية بزيادة التركيز ومدة التعرض للمستخلص المائي البارد ، أذ أستخدمت في هذهِ الدراسة أربعة تراكيز تصاعدية هي 60,50,40,30 ملغم/مل إضافة إلى روؤيسات أولية معاملة بالمحلول الملحي الفسلجي0.9% تمثل مجموعة السيطرة . وتم حساب نسبة هلاك الروؤيسات الأولية بعد أربعة أوقات وهي (24,12,6,1ساعة) لكل تركيز من التراكيز المذكوره أعلاه ، حيث بلغت نسبة هلاك الروؤيسات الأولية المعاملة بالتراكيز 60,50,40,30 ملغم/مل بعد 24 ساعة من المعاملة 78.2% ،86.8% ،94.7% ،100% على التوالي وهي تمثل أعلى نسبة لهلاك

الروؤيسات الأولية المعاملة بنفس التراكيز وبفترات زمنية أقل في حين بلغت أقل نسبة لهلاك الروؤيسات بعد ساعة من المعاملة 9.2% ،19.7% ،31.8% ،49.7% على التوالي وهي نسب قليلة جداًعند مقارنتها مع نسب هلاك الروؤيسات بعد (24,12,6 ساعة) من المعاملة .

يعتبرالتركيز 60ملغم/مل من المستخلص المائي البارد التركيز الوحيد الذي أعطى نسبة قتل 100% بعد 24 ساعة وقد يعود السبب في ذلك إلى قدرة المستخلص المائي البارد على أستخلاص المواد الفعالة وقد أتفقت هذهِ النتيجة مع نتيجة (20) الذي أستخدم المستخلص المائي لأوراق نبات العرعر بتركيز 60 ملغم/مل والذي سبب قتلاً كاملاً للروؤيسات الأولية بنسبة 100% في زمن 60 دقيقة مع تفوق واضح لنبات العرعر بالنسبة للوقت،كماتطابقت هذهِ النتيجة مع ماتوصل اليه (21) والذي استعمل المستخلص المائي البارد لثمار الشفلح بتركيز 300ملغم/مل والذي سبب قتلاً كاملاً للروؤيسات الأولية في زمن 45 دقيقة ،وأتفقت هذهِ النتيجة أيضاً مع نتيجة (22) الذي أستعمل المستخلصات المائية لنبات النبق والزيتون بتركيز 1ملغم /مل واللذان سببا قتلاً كاملاً للروؤيسات الأولية في الوقتيين 72 و96 ساعة على التوالي ، وتشابهت هذه النتيجة أيضاً مع نتيجة (23) الذي أستخدم المستخلص المائي لنبات الحرمل بتركيز 1000%ملغم/مل والذي حقق نسبة هلاك 100% في زمن 24 ساعة وقد لوحظ تفوق واضح للمستخلص المائي البارد لبذورالقرع الأصفرعلى بقية المستخلصات من ناحية التركيز أو من ناحية الزمن.

أما بالنسبة للتراكيز 50,40,30 ملغم/مل فقد حققت نسبة هلاك متفاوته بعد 24 ساعة ،وبشكل عام تعتبر نسب هلاك الروؤيسات الأولية المتحققه بفعل المستخلص المائي البارد أعلى من نسب هلاك الروؤيسات المتحققة بفعل المستخلص المائي الحار والمستخلص الكحولي بمختلف التراكيز والأوقات الزمنية وقد يعزى سبب ذلك إلى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لبذور القرع الأصفر لأحتواء بذوره على مواد فعالة مثل الصابونيات والفلافونويدات الكلايكوسيدية والاحماض الامينية والتي من المحتمل أثرت على فسلجة الروؤيسات الأولية من خلال توقف عمليات الأيض أو بتأثيرها على الأنزيمات أو أيقاف دورات أيض الخلية التي تحدث داخل الروؤيسات الأولية ،أو من خلال تحليل غشاء خلايا طبقة الجليد Tegument فيها مؤدياً إلى موت الخلايا وعدم منعها لدخول صبغة الأيوسين فيها أو ربما أثرت على عمل الخلايا اللهبية فيها وهذا بدوره يؤثر على التنظيم الأزموزي فيهاOsmoreyulation مما أدى إلى تراكم الفضلات النتروجينية فيها وبالتالي موتها.

أستخدم أيضاً في هذهِ الدراسة المستخلص المائي الحار لبذور القرع الأصفر بدل المستخلص المائي البارد وبنفس التراكيز السابقة 60,50,40,30ملغم/مل وكذلك نفس الفترات الزمنية الأربعة (24,12,6,1ساعة) لكل تركيز من التراكيز المذكورة أعلاه ،وأشارت النتائج إلى زيادة نسبة هلاك الروؤيسات الأولية بصورة طردية بزيادة التركيز ومدة التعرض،حيث بلغت نسبة هلاك الروؤيسات الأولية بعد 24ساعة من المعاملة 45.6% ،75.5% 88.1% ،96.5% على التوالي وهي تمثل أعلى نسبه لهلاك الروؤيسات الأولية المعاملة بنفس التراكيز وبفترات زمنية أقل أما أقل نسبة لهلاك الروؤيسات الأولية فقد سجلت بعد ساعة واحدة من المعاملة أذ بلغت 6.6% ،13.2% ،25.5% ،43.6% على التوالي ،وقد أعطى التركيز 60ملغم/مل بعد 24 ساعة أعلى نسبة لهلاك الروؤيسات حيث بلغت 96.5% وهذهِ النتيجة مقاربة لماتوصل اليه ا (20) في دراسته للمستخلص المائي لأوراق نبات العرعر بتركيز 60ملغم/مل بعد 60 دقيقة حيث بلغت نسبة الهلاك 100% وكذلك المستخلص المائي لأوراق نبات الرمان والذي سبب قتلاً كاملاً للروؤيسات في الوقتين 45 و60 دقيقة ،وعند مقارنة نسب الهلاك المتحققة بفعّل المستخلص المائي الحار نجدها أقل من نسبة الهلاك المتحققة بفعل المستخلص المائي البارد وأعلى من نسب الهلاك المتحققة بفعّل المستخلص الكحولي لبذور القرع الأصفروهذا يتفق أيضاً مع ما توصلت اليه (24) في دراستها للمستخلصات المائية والكحولية لقشور ثمار الرمان. وقد يعزى أنخفاض نسب هلاك الروؤيسات الأولية بفعل المستخلص المائي الحار لبذور القرع الأصفر إلى كون الماء الحار أقل كفاءة من الماء البارد في أستخلاص المواد الفعالة .

كماأستخدم في هذهِ الدراسة أربعة تراكيز تصاعدية من المستخلص الكحولي وهي 60,50,40,30 ملغم/مل ودرس تأثيرها بعد أربع أوقات وهي (24,12,6,1 ساعة) لكل تركيز،أذ بلغت أعلى نسبة لهلاك الروؤيسات الأولية عند التركيز 60ملغم/مل بعد 24 ساعة من المعاملة حيث بلغت 39.7%،70.5% ،84.6% ،92.2% على التوالي وهذهِ النسب تعد عالية عند مقارنتها مع نسب هلاك الروؤيسلات المعاملة بنفس التركيز ولكن بفترات زمنية أقل في حين سجلت أقل نسبة لهلاك الروؤيسات بعد ساعة من المعاملة أذ بلغت4.4% ،11.2% ،20.2% ،38.4% على التوالي وهي أقل بكثير من نسبة هلاك الروؤيسات الأولية المعاملة بعد (24,12,6 ساعة)، وتقاربت

نسب الهلاك المتحققة بفعل المستخلص الكحولي لبذور القرع الأصفر مع دراسة (20) الذي أستخدم المستخلص الكحولي لأوراق نبات العرعر وتأثيرهُ على حيوية الروؤيسات الأولية ، كذلك أتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (21) الذي أستخدم المستخلص الكحولي لكل من ثمار الشفلح والسبحبح وأوراق الآس عند دراست تأثيرها على حيوية الروؤيسات الأولية . وعند مقارنة نسب الهلاك المتحققة بفعل المستخلص الكحولي لجميع التراكيز والأوقات نجدها قد أنخفضت بشكل ملحوظ عن نسب الهلاك المتحققة بفعل المستخلص المائي البارد

والحاروقد يعود السبب في ذلك إلى كون الكحول مذيب غير جيد للمواد الفعالة على خلاف الماء البارد الذي حقق أعلى نسبة لهلاك الروؤيسات بسبب كونهِ قد أذاب المواد الفعالة دون التأثير على فعاليتها وهذا يتفق مع ما ذكرتهُ (24) بينما أختلفت مع ما ذكرهُ (25) والذي أشار إلى أن المستخلص الكحولي لبذور الحبة السوداء حقق نسب عالية لهلاك الروؤيسات الأولية مقارنةً بالمستخلص المائي.

أظهرت نتائج خمج الجرذان البيض بالروؤيسات الأولية تكون العديد من الأكياس العدرية الثانوية ونموها في أنسجة وتجويف الجسم أذ كان الكبد العضو الأكثر تعرضاً لنمو الأكياس حيث شوهدت الأكياس مغروسة جزئياً في نسيج الكبد في حين كان البعض الآخرملتصقاً بهيئة أشكال كروية متباينة الحجم وهذا نفس مالاحظهُ (25) و (26) ، وقد تباين تأثير المستخلصات المستخدمة في أختزال عدد الأكياس العدرية الثانوية حيث كان المستخلص المائي البارد أفضل مستخلص أختزل الأكياس تماماً في المجموعة المعالجة بعد 24 ساعة والمجموعة المعالجة بعد أسبوع حيث كانت النسبة المئوية للكفاءة العلاجية 100% تلاه المستخلص المائي الحار الذي أختزل الأكياس العدرية تماماً في المجموعة المعالجة بعد 24 ساعة فقط وكانت النسبة المئوية للكفاءة العلاجية 100% وقد يعود السبب في ذلك إلى قابلية المستخلص النباتي على قتل الروؤيسات الأولية قبل تطورها إلى أكياس عدرية وهذا يتفق مع ماتوصل اليه (27) حيث أشارا إلى أن أفضل كفاءة لعقار البندازول كانت عند استخدامه بعد 24 ساعة من الحقن بالروؤيسات الأولية ولم يعطي أي نتيجة عند استخدامه بعد 15 يوماً من الحقن ويعود السبب في ذلك إلى أن الطفيلي يكون اقل حساسية للمعالجة خلال تطوره بسبب نمو وتكون الطبقة المصفحة والتي تمنع مرور المواد الكيميائية والعقارات من خلالها وبذلك ينمو ويتطور الكيس المائي،أما المستخلص الكحولي فكان تأثيرهُ قليل في أختزال الأكياس العدرية مقارنةً بالمستخلص المائي البارد والمائي الحار حيث بلغت النسبة المئوية للكفاءة العلاجية 70.6% وهذهِ النتائج تتفق مع ماتوصل اليه كل من (28) في أستخدامها لنبات عنب الذئب كمعدل مناعي في نمو وتطور الأكياس العدرية الثانوية للمشوكات الحبيبية و (24) في دراستها لتأثير قشور ثمار الرمان في علاج داء المشوكات الحبيبي و (26) في دراستهِ لمستخلص بذور الداتوره على نمو وتطور الأكياس العدرية للمشوكات الحبيبية .

بشكل عام فأن نمو الأكياس العدرية الثانوية بشكل كثيف في حيوانات السيطرة الموجبة يمكن أن يعود إلى جرعة الروؤيسات الأولية التي تم حقنها ، أما أنخفاض معدل عدد الأكياس الثانوية في المجاميع المعالجة فيعزى إلى فعالية المستخلص النباتي وتأثيرهُ في حيوية الروؤيسات الأولية فتكوين الأكياس الثانوية يتأثر بحيوية الروؤس الأولية وأستعداد الجهاز المناعي لجسم الحيوان (29) ، أما كثافة الأكياس الثانوية في الكبد فيمكن تعليلهُ إلى كون الكبد هو المرشح الأول للدم كما أن الأوعية الدموية الضيقة للكبد تعمل هي الآخرى على حجز الروؤيسات الأولية وبالتالي تعطيها فرصة للأستقرار ومن ثم النمو إلى أكياس عدرية ثانوية(30) .

المصادر

1-Naguleswaran , A.; Spicher , M.Vonlaufen , N.; OrtegaMora ,L. M .; Torgerson ,P .;Gottstein , B. & 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 .

2-Abu-Esbeih ,T.S. (2001).Anaphlaxis during hydatid liver disease surgery.T. Arab. Bor. Med. Special.,3(2):51-52.

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

4-Liance ,M.Tanin,V.;Bresson-Hadni,S.;Vuitton, D.; Houin ,R.and Piarroux,R.(2000). Immunodiagnosis of *Echinococcus* infection:confirmatory westernblot.J.Clin . Microbiol.,38(10):3718-3721.

5-Brunetti, E. & Filice . (2007). Echinococcosis hydatid cyst . Med . J ., Pp :1- 23 .

6-Taghavi,SA.(2000).Non surgical treatment of cystic echinococcsis. Shiraza E-Med. J.Iran, 1-33.

7–اللامي،عبد الحكيم عبد الرحمن كريم(2004).تاثير بعض المستخلصات النباتية في حيوية الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية *E.granulosus* المسبب لمرض الأكياس المائية.رسالة ماجستير،كلية العلوم،جامعة المستنصرية.

8- Mills ,S Y.& Bone,K.(2000). Principles and practice of phytotherapy Churchill Livingstone .London

9- Saha , P.;Bala,A.Kar,B.; Naskar,S.; Mazumder,U. K.; Haldar ,P.K.&Gupta , M .(2011). Antidiabetic activity of *cucurbita maxima* erial parts.Res.J.Med.Pant ., 5:577

10- Smyth , J . D . (1985). *In vitro* culture of *Echinococcus* ss*p* . Proc .13thInt . Cong . Hydatid.Madrid .Pp:84-95.

11-Smth, J.D.& Barrett, N.J.(1980). Procedure for testing the viability of human hydatid cyst following surgical removal,especially after chemotherapy.Trans. Roy. Soci .Trop. Med.Hyg.,74(5):649-652.

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

13–العاني،أوس هلال جاسم (1998).دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية *Nigella sativa*وتأثير مستخلصاتها على بعض الأحياء المجهرية . رسالة ماجستير، كلية العلوم،جامعة المستنصرية.

14-Twaij,H.A.A.;Kery,A.&AL-Khazvagi,N.K.(1983).Some pharmacological toxicological and phytochemical investigations on phyllocephala . J .Ethnopharmacol.,47.

15-Harborne,J.B.(1984).Phytochemical methods: Aguide to modern techniques of plant analysis .2nd ed.Chapmant and Hall.London.P.288.

16 –الربيعي،سلوى حسن محسن(1999) . تأثير بعض المستخلصات النباتية في تضعيف روؤيسات الأكياس العدرية الأولية خارج الجسم وداخله في الفار الأبيض. رسالة ماجستير،كلية العلوم،جامعة بغداد:95 صفحة

17-Litchfield,J.T. & Wilcoxon, F.(1949) . Asimplified method of evaluating dose effect experiments .J.Pharmacol.Exp.and Therap., 96:94-113.

18-Chappell,L.H.;Thompson ,A.W.; Barker ,G.C.& Stuart ,W.(1987).Dosage ,Timing,and route of Administration of cyclosporine and Nonimmuno suppressive derivative of dihydrocyclosporin A and cyclosporine C against *Schitosoma mansoni* : in vivo and in vitro antimicrobial against and chemotherapy.31:1567-1571.

19–الراوي، خاشع محمود وعبد العزيزمحمد خلف الله (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

20–الشهواني،ثائر عبد المحسن صالح(2010). تأثيربعض المستخلصات النباتية في حيوية الروؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus* من أصل أغنام في الزجاج ونموها داخل الجسم الحي.رسالة ماجستير،كلية التربية،جامعة الموصل:160.صفحة.

21–العمري ،أرقم محمد أزهر(2005).تأثير مستخلصات نباتات الشفلح والسبحبح والآس في حيوية ونمو الروؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus* من أصل أنسان وأغنام خارج الجسم الحي ونموها داخلهِ. رسالة ماجستير،كلية التربية،جامعة

22-Al-Sudani , N .M .(2007) .Effect of extracts of *Zizphus spina- christi l*.and *Olea Euro -paea l*.on the larval stage of *E . granulosus*. Inter . J . Parasitic disease ,2(1):1-8 .

23–الجبوري،قتيبة علي صالح (2009) .تأثير المستخلصات المائية والكحولية لأوراق نبات الأسكلة والآس وبذور الحرمل في حيوية الروؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية *E.granulosus* .رسالة ماجستير،كلية التربية ،جامعة تكريت.

24–المبارك، زينب علي حسين(2008). تاثير مستخلصات قشور ثمار الرمان *Punica granatum* في علاج داء المشوكات الحبيبي لطفيلي *Echinococcus* granulosus في الفئران البيضBalb/c .رسالة ماجستير،كلية التربية للبنات،جامعةالكوفة:105 صفحة.

25–الخزاعي،جاسم حميد رحمه(2005) .تقيم فعالية مستخلص الحبة السوداء وبعض الأدوية والتيار الكهربائي على حيوية الروؤيسات الأولية لطفيلي المشوكات الحبيبية *E.granulosus* .أطروحة دكتوراه،كلية التربية،جامعة القادسية:99 صفحة.

26–الحميري،أحمد خضيرعبيس(2010) .تقيم فعالية مستخلص بذور الداتورة *Datura stramonium* على نمو وتطور الأكياس العدرية للمشوكة الحبيبية *E.granulosus* في الفئران البيض Balb/c (دراسة دوائية،نسيجية،ومناعية).أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم،جامعة الكوفة:167صفحة

27 – Morris , D.l & Taylor, D . H.(1988). Optimal timing of post - operative albendazole Prophylaxis in E.granulosus. Ann.Trop.Parasitol.,82(1):65-66.

28–السبعاوي،بثينه حاتم هاشم(2001). تأثير عنب الذئب *Solanum nigrum* في نمو وتطورالأكياس العدرية الثانوية للمشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* .أطروحة دكتوراه،كلية العلوم،جامعة الموصل:227 صفحة.

29-Thompson , R. C. (1977). Hydatidosis in Britaine . helminth ., 46(10) : 837 – 861.

30-Goldman ,L.& Bennett,J.(2000).Texbook of Medicine.21st ed .Acad.PressNewYork.

Study the effect of seed extracts of pumpkin (*cucurbita maxima*) in treatment of experimentally infected with hydatidosis disease for *E.granulosus* in laboratory rats

Hadi.M.Al-Mayali Saad.A.Anah
Coll.of Education/Univ of Al-Qadisiya

Abstract

The present study amied to determine the effect extracts seed of pumpkin *(cucurbita maxima*) for depression of the protoscolices of *Echinococcus granulosus* in vitro,and determination of the therapeutic doses of these extracts for treatment of the secondary hydatid cysts in experimentally infected rats with negative cntrol group .

In vitro Protoscolices were treated with concentrations (30,40,50,60)mg/ml of three extracts(cold water,hot water and alcoholic extract) at different time periods (1,6,12,24) hr after treatment,the result showed that cold water extract 60mg/ml was the most efficient to kill the protoscolices then hot water and lastiy alcoholic extract.

Median lethal dose (LD_{50}) estimated for (cold water,hot water and alcoholic extracts),then estimated therapeutic doses were calculated and these represented by (51.6,54.2,56.3)g/kg respectively.

Rats are inoculated with (2000) protoscolices per rat ,and treated with the therapeutic doses of extracts. After three month of inoculations and on the basis of therapeutic efficieny of extracts,resuts showed that the cold water extract is more efficient for reduction of secondary hydatid cysts .