تأثير مستخلص بذور نبات الحرمل *Peganum harmala* على نمو امامية السوط لطفيليات *Leishmania tropica major* خارج الجسم الحي

م. حسناء حامد جمعة
كلية العلوم -جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : 2009/10/1 ؛ تاريخ قبول النشر : 2010/4/22

ملخص البحث :

تم خلال هذه الدراسة التحري عن فعالية مستخلص بذور نبات الحرمل *Peganum harmala* على نمو طفيليات اللشمانيا الجلدية *Leishmania major* خارج الجسم الحي كما تتبعنا تأثيره على الإصابة من خلال فرط التحسس الأجل داخل الجسم الحي .

حيث استعمل تركيزان من مستخلص بذور نبات الحرمل0,25–0,5 ملي غرام/سم^3 وتمت متابعة أعداد الطفيليات على مدى 96,72,48,24 ساعة خارج الجسم الحي والتي أظهرت انخفاضا كبيرا في اعداد الطفيليات مع كلا التركيزين مقارنة بالسيطرة وبينت النتائج بالاعتماد على اختبار فرط التحسس النمط الأجل لمتابعة تأثير المستخلص داخل الجسم الحي استجابة عالية رفعت متوسط أقطار انتفاخ راحة القدم اليسرى للفئران المعاملة بعد التخميج بـ 0,25ملي غرام/سم^3 من المستخلص حيث كانت النتائج 1,41 , 1,621, 2,126 ملم اما عند التركيز 0,5 ملي غرام/سم^3 كانت النتائج 1,70 ,2,48 , 2,622 ملم وللفترات2 ,4 ,6 على التوالي , في حين لم تسجل الحيوانات المخمجة غير المعاملة أي استجابة مناعية بفرط التحسس الأجل ولنفس الفترة , وبهذا فقد أثبتت النتائج إن المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل ذو فعالية تثبيطية في تقليل أعداد طفيليات اللشمانيا في أوساطها الزراعية وللحد من الإصابة داخل الجسم الحي .

The effect of seed extract of *Peganum harmala* on growth of *Leishmania torpica major promastigotes* parasite in vitro.

Lecturer Hassna Hamid Jumah
College of Science - University of Mosul

Abstract:

The present study investigates the effect of seeds extract from

Peganum harmala on the growth of *Leishmania major* parasite in *vitro*, and follows its effect in *vivo* through delayed hypersensitivity. The researcher used two concentrations of the seeds extraction 0.25, 0.5 mg/ml, and the amount of the parasite number has been calculated along 24, 48, 72, 96 hours in *vitro*, which shows a great decrease in parasite number with both concentrations of seeds extract in contrast with control. Also the results showed dependence on the delayed hypersensitivity, increase of left food pad swellings reach to 1.41 , 1.62 , 2.126 for mice treated after infected with 0.25 mg/ml ,and reach to 1.70 , 2.48 , 2.622 when treated with 0.5 mg/ml along 2,4,6 week while the infected not treated mice had no responses by delayed hypersensitivity for the same periods . So the results proofed the effectiveness of seeds extract from *Peganum harmala* on the reduction parasite number in *vitro* and in *vivo*.

المقدمة

يعد داء اللشمانيا الجلدية من الأمراض المتوطنة في 88 دولة مختلفة في خمس قارات من العالم وهناك 1.5مليون إصابة جديدة سنويا(Sharama and Singh ,2008) . يعد العراق واحدا من هذه البلدان التي يتوطن فيها هذا المرض . تعود نسبة الانتشار العالية لهذا المرض إلى كثرة أنواع الحشرة الناقلة sand fly ووجود المضائف الخازنة مثل الكلاب (soulsby,1982). بالرغم من تاثير داء اللشمانيات على صحة المجتمع ,الا ان الجهود التي تبذل الان لمكافحتها غير كافية ففي الوقت الحاضر لا يوجد لقاح فعال كوقاية , لذا فان الاتجاه العام للمعالجة هي الادوية (Al-Jebouri,2002) ,الا ان بعض هذه الادوية ذات كلفة عالية وهناك بعض الدراسات التي تشير مؤخرا انه بين 10−15% من الإصابة بداء اللشمانيا الجلدية لا يستجيب للعلاج بمركبات Antimonials وخاصة Megaiumin (Esmaeili , 2008). ومن هنا اتجهت الكثير من الدراسات إلى استخدام مستخلصات بذور او أوراق او سيقان نباتات طبية مختلفة لعلاج أنواع عديدة من الكائنات المسببة للأمراض كالابتدائيات الطفيلية او الفطرية .ولما كان نبات الحرمل من النباتات الطبية المهمة إذ استخدمت بذوره منذ القدم في الطب الشعبي لأغراض علاجية عديدة كتنظيم الدورة الشهرية وكمدرر قوي واستعمل أيضا كطارد للديدان ومقشع وملين للجلد وعلاج لضعف الذاكرة والتهاب القصبات (Al-khazraji, 1989).

كما لوحظ تأثير المستخلص المثيلي والمستخلص بالايثر فاعلية مضادة لبكتيريا *Staphylococcus albus, Escherichia coli* وللمبيضات البيض *Candida albicans* (Adaay *et al*, 1989).

ومن هنا جاءت هذه الدراسة لمعرفة تأثير مستخلص بذور نبات الحرمل وبتراكيز مختلفة على نمو *Leishmania tropica* خارج الجسم الحي .كما تمت متابعة الإصابة داخل الجسم الحي من خلال فرط التحسس النمط الاجل المتمثل بانتفاخ راحة القدم , لمحاولة ايجاد علاج امن ورخيص لداء اللشمانيا الجلدية .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على العزلة المعتمدة في البحث MHOM/IQ/93/MRCB من إحدى العزلات المستخلصة من المرضى في مركز البحوث الطبية كلية الطب /جامعة النهرين , وحدة خزن الليشمانيات والمشخصة باستخدام تقنية المتغايرات الإنزيمية Enzyme variants.حضر الشكل المسوط للعزلة المعتمدة باستخدام طريقة التخفيف المحدد المتبعة من قبل Handman واخرون (1983) بواسطة تحضير المستنبت ثنائي الطور المعروف بـ NNN medium حيث يصب في قناني زجاجية صغيرة ومعقمة بواقع 0,5سم^3 في كل قنينة و يحسب عدد خلايا الشكل المسوط باستخدام شريحة عد كريات الدم Haemocytometer للحصول على العدد الكلي للطفيليات في 1سم^3,ثم يخفف عالق الطفيليات عدة مرات بمحلول اللوك Lock solution الطور السائل لتنمية الطفيليات.

تم تهيئة 45 قنينة زجاجية سعة 25 سم^3 الحاوية على 5 سم^3 من الوسط الزرعي NNN مع مراعاة وضع القناني بصورة مائلة للحصول على مساحة سطحية كبيرة لنمو الطفيليات وعند اجراء الزرع يضاف 0,5 سم^3 من الطور السائل الى القنينة الواحدة الحاوية على الطور الصلب وبعد ذلك تلقح كل قنينة بـ 2,5*10^{6}محصود من اليوم الرابع لنمو الطفيلي في مزارعه الأصلية. قسمت القناني إلى تسع مجاميع لكل مجموعة خمس مكررات وتركت ثلاث مجاميع كسيطرة لمتابعة أعداد الطفيليات بعد 24 ,48, 72, 96 ساعة ,على التوالي, ولقحت ثلاث مجاميع بـ 0,25ملي غرام /سم^3 من المستخلص وثلاث مجاميع أخرى لقحت بـ 0,5 ملي غرام /سم^3 من المستخلص وتمت متابعة أعداد الليشمانيا لنفس الفترة الزمنية للسيطرة .

ولمتابعة تأثير مستخلص بذور نبات الحرمل على الاصابة داخل الجسم الحي فقد تم تتبع الزيادة الحاصلة في وسادة القدم اليسرى (Barral *et al.*,1983) حيث خمج 45 فارا ذكرا من نوع Balb/c وبأعمار 6-8 أسابيع بـ 1*10^7 من الشكل السوطي لليشمانيا الجلدية داخل الغشاء البريتوني , ثم قسمت إلى تسعة مجاميع ضمت كل مجموعة 5 فئران .تركت 3 مجاميع

سيطرة مخمجة غير معالجة وعولجت 3 مجاميع عن طريق الحقن داخل البريتون بتركيز 0,25 ملي غرام/سم^3 من مستخلص الحرمل حيث قسمت الجرعة على يومين الاول بعد التخميج والقسم الثاني اليوم السابع بعد التخميج , و3 مجاميع عولجت بتركيز 0,5 ملي غرام /سم^3 من مستخلص الحرمل حيث قسمت الجرعة على يومين الاول بعد التخميج والقسم الثاني في اليوم السابع بعد التخميج .ثم تتبعنا الإصابة بفترات 6,4,2 أسبوع بالاعتماد على قياس فرط التحسس الأجل Delayed Hypersensensitivity (DTH). حيث حقنت القدم اليسرى للفئران بـ 0,1 سم^3 من مستضد الليشمانيا بتركيز 2 مايكروغرام في حين حقنت القدم اليمنى بـ 0,1 سم^3 من محلول PBS دارئ الفوسفات , وبعد مرور 24 ساعة قيس انتفاخ القدم اليمنى واليسرى بواسطة القدمة Vernae وحساب الفرق بين القراءتين.

تم الحصول على بذور نبات الحرمل من السوق المحلي وحضر المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بالاعتماد على طريقة Riose وجماعته (1987) وقد استخدم التركيزين 0,25-0,5 ملي غرام/سم^3 .

النتائج والمناقشة

يبين الجدول 1 تأثير التركيزين 0,25- 0,5ملي غرام/سم^3 المختلفين من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل على عدد امامية السوط في اوساطها الزرعية ,حيث يبين الجدول انخفاض أعداد الليشمانيا الجلدية المعاملة بالمستخلص مقارنة باعدادها في الاوساط غير المعاملة .

حيث سجلت معدل أعدادها في الأوساط المعاملة بـ 0,25ملي غرام /سم^3 من المستخلص 1,12 ,1,875 ,5,25 ,9,33 على فترات 24 , 48 , 72, 96 ساعة, على التوالي, . كما سجلت انخفاضا اكبر في معدل أعدادها في الأوساط المعاملة بـ 0,5ملي غرام/سم^{3}من المستخلص 0,92 ,1,225 ,3,625 ,4,625 وعلى فترات 24 , 48 , 72, 96 ساعة.

وهذا يتطابق مع نتائج Duran واخرون (2008)عند استعمالهم المستخلص الاثيلي للصمغ *Adana proplis* حيث حققت التراكيز 750,500,250 ملي غرام /مل انخفاضا معنويا عند مستوى $\rho \geq 0,05$ في عدد خلايا الليشمانيا الجلدية مقارنة مع عدد الخلايا غير المعاملة .أيضا تطابقت النتائج مع Gicheru واخرون (2004) عند استعمالهم لتراكيز مختلفة من التريبانTraypan في تقصي تأثيره على مزرعة مشتركة لطفيليات *Leishmania donovani* *Leishmania major* , حيث سجلت أعداد الطفيليات تناقصا بعد 48 ساعة من الحضن بدرجة 25 م .أما بالنسبة لتقدير تأثير المستخلص على حث استجابة فرط التحسس الاجل

Delayed hypersensitivity تم بتتبع التغيرات الحاصلة في معدلات انتفاخ راحة القدم اليسرى حيث يوضح الجدول 2 إن الفئران المخمجة والمعاملة بمستخلص بذور نبات الحرمل بالتراكيز 0,25 –0,5 ملي غرام/سم^3 اظهرت زيادة في معدلات انتفاخ راحة القدم في حين ان الفئران المخمجة كسيطرة اظهرت نتائج سلبية في قياس فرط التحسس الاجل حيث سجلت معدل انتفاخ راحة القدم لهذه الفئران وللفترات 2،4،6 اسابيع عقب الخمج متوسطات اقطار 1,42،1,32،1,186ملم ,على التوالي, غير ان معدل انتفاخ راحة القدم للفئران المخمجة والمعاملة بعد الخمج بتركيز 0,25 ملي غرام /سم^3 من المستخلص ولنفس الفترة كانت 1,418 ,1,62 ,2,126 ملم ,على التوالي, في حين سجل التركيز 0,5 ملي غرام /سم^3 ايضا ارتفاعا في نسبة الاستجابة حيث كانت معدلات انتفاخ راحة القدم للفئران 1,706, 2,481 , 2,62 ملم ,على التوالي, فقد اظهر التحليل الاحصائي باستخدام تحليل التباين ان الاستجابة لفرط التحسس الاجل في الفئران المعاملة بعد التخميج قد ارتفعت عند مستوى $\rho \geq 0,05$ مقارنة مع السيطرة شكل رقم 1.

وهذا يتطابق مع نتائج Al-Saidi (2000) عند استعمال قياس فرط التحسس الاجل كاحد معايير استخدام الحرمل في علاج الاصابة بداء *Leishmania donovani* والذي سجل استجابة مناعية عالية متمثلة في انتفاخ راحة القدم للفئران البيض .

يتبين من النتائج ان للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل تاثيرا تثبيطيا على عدد امامية السوط خارج الجسم الحي كما ظهر تاثيره داخل الجسم الحي من خلال حث Delayed hypersensitiviy وربما يعود هذا التاثير الى احتواء بذور نبات الحرمل على عدد من اشباه القلويدات الفعالة التي توجد في كل اجزاء النبات كالبذور والجذور والاوراق والازهار والسيقان والخشب واللحاء اذ تحتوي البذور الجافة الناضجة على 5% من اشباه القلويدات (Ayoub *et al*.,1989) وتشمل تلك المركبات الهارمين والهارمالين والهارمالول وهي مركبات قاعدية عضوية وهي من أفضل المواد في كفاءتها العلاجية (Rashan *et al*., 1988). كما اشار Adaay واخرون (1989) ان للمستخلص بالايثر فعالية مضادة لبكتريا *Escherichie coli* وللمبيضات البيض *Candida albicans* , وقد ذكر Li واخرون (1995)ان مركبات الهارمين والهارمالين والهارمالول وهارمين كاما ذات تاثير وقائي تجاه اشعة كاما اذ لاحظوا زيادة نسبة البقاء بمعدل 30 يوما للفئران المعرضة كليا لجرع اشعاعية باستخدام العنصر المشبع كوبلت Co^{60} والمعاملة بجرع تراوحت ما بين 50– 80 ملي غرام/كغم من هذه المركبات الاربعة قبل 30–40 دقيقة من التعريض للاشعة .وقد اثبتت الباحثة Al-Saidi (2000) ان للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل تاثيرا في الحد من الاصابة باللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani* في الفئران البيض, ومن ناحية السمية لبذور نبات الحرمل اشارت

الابحاث الى ان سمية المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل قليلة جدا في الجرذان والفئران اليبض(Al-khazraji, 1989; Adaay *et al.*, 1989).

يستنتج من هذه النتائج بانه يمكن استخدام المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل كمادة مضادة او فعالة لامامية السوط .

الشكل (1)

صورة لراحة القدم اليسرى لفار ابيض بعد اسبوعين من التخميج ومعالجته بـ 0,5 ملي غرام /سم^3 يظهر فيها انتفاخ راحة القدم .

الجدول (1)

التغيرات الحاصلة في اعداد اللشمانيا الجلدية *Leishmaina tropica* في اوساطها الزرعية بتاثير تركيزين مختلفين لمستخلص بذور نبات الحرمل ولفترات نمو مختلفة عدد اللشمانيا المسوطة المستخدمة في الزرع $2.5*10^6$

المعاملة ملي غرام /سم3	24 ساعة		48 ساعة		72 ساعة		96 ساعة	
	سَ ± ع	% نمو	سَ ± ع	% نمو	سَ ± ع	% نمو	سَ ± ع	% نمو
السيطرة الموجبة	0,005±1,375	100	0,28±4,5	100	0,43±9,06	100	0,75±15,66	100
0,25	0,15±1,12	81,45	0,12±1,87	41.6	0,18±5,25	57,94	0,48±9,33	59,8
0,5	0,002±0,92	66,9	0,1±1,225	27.22	0,29±3,625	39,95	0,28±4,625	29,6

استعملت خمس مكررات لكل مجموعة وقيمت معنوية النتائج باستخدام تحليل التباين P>0.05

الجدول (2)

التغيرات الحاصلة في معدلات انتفاخ راحة القدم الخلفي مقاسة بالملمتر المكعب في الفئران المخمجة بالشكل السوطي للشمانيا الجلدية ($1*10^7$) ولفترات مختلفة والمعاملة بمستخلص بذور نبات الحرمل في اليوم الاول والسابع بعد الخمج ومقارنتها بالسيطرة .

معاملة مايكرو غرام /سم3	2 اسبوع	4 اسبوع	6 اسبوع
	سَ ± ع	سَ ± ع	سَ ± ع
السيطرة الموجبة	0,122±1,42	0,226±1,32	0,127±1,186
0,25	0,021±1,418	0,065±1,620	0,262±2,126
0,5	0,163±1,706	0,106±2,481	0,270±2,622

استعملت خمس مكررات لكل مجموعة وقيمت معنوية النتائج باستخدام تحليل التباين P>0.05

References:

1. Sharama, U. Singh S. (2008) .Vector dorne Dis 54, December 2008.
2. Soulsby,E.J.L.(1982).Helminths,Arthropods and Prtozoa of Domesticated Animals. (7th ed).Bailleire Tindal, London: 3892-3895.
3. Al-Jebouri , N .N.A.(2002).Study of the effect of some purine analogs on growth and metabolism of *Leishmania major* promastigotes ,M.Sc.thesis, College of Education , Tikrit University, Iraq .
4. Esmaeili (2008) Evaluation of miltefosine against *leishmania majior in vitro and in vivo* studies. Acta Medica Iranica; 46(3):191-194.
5. Al-Khziraji, A.T.; Adaay, M.H.; Rashan,L.J. and Ayoub,M.T.(1989) A toxicity of aqueous extract of *Peganum harmala* .J.Edu.Sci.(7):45-51.
6. Adday,M.H;Rashan,L.J;andSulayman,K.D.(1989).Antimicrobial activity of different extracts from the seeds of *Peganum harmala*. Fitoterapia Vol.Lx (4):363-5.
7. Handman,E;Hocking,R.E;Mitchell,G.F.andSpithill,T.(1983)Isolation and characterization of infective and non-infective colones of *Leishmania tropica* . Mol. Biochem. Parasit. 7:111-6.
8. Barral,A.;Peterson, E.A.;Sacks ,B.L.and Neva,F.A.(1983) Late Metastatic leishmaniasis in the mouse a model for mutopupaneous disease . Am .J.Trop.Med .Hyg. , 32(2):277-285.
9. Riose,j.L.;Retio,M.C.and Villar, A.(1987) antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Medditrranean area .J. Ethnopharmacol .21:pp130-152.
10. Duran, G.; Duran, N.; Oztas, H.; Culha, G.; Ozcan, B.; and Ozer,B.(2008). In *vitro* antileishmanial activity of adana propolis samples of *Leishmania tropica*: a preliminary study. Parasitolgy Research; 102:1217-25.
11. Gicheru, M.; Bourdichon, A.; and Machariah, J. (2004). Efficacy of trypan:a diminazine based drug as antileishmanial agent. 1st cost-B22

congerss on" Drug Development for Parasitic Disease" Institute of Tropical Medicine: 1-2.

12. Al-Saidi,A.(2000).Study the effect of transfer factor and *Peganum harmala* seeds extract as immunological modulator on the pathogenicity of visceral leishmania . M.Sc. Thesis, Department of Biology ,Science Collage University of Mustansiriyah
13. Ayoub, M. T.; Rashan,L . J.; Khazraji, A. T. and Adaay , M. H.(1989) An oxamide from *Peganum harmala* seeds phytochemist . Vol. 28(7):2000-2001.
14. Rashan,L.J;Bashir,F.Y.;Hussain,A.;Adaay,M.H.;Taqa,M.T.;Rashan,F. J and Ayoub,M.T.(1988).study of the chronic oral toxicity of *Peganum harmala* seeds .Iraqi .J. of Veterinary Sci.1(201):14-22.
15. Li, G. W; Liang, P.G and Pan, G.Y. (1995). Radio Protective effect of gamma-harmine and its carboline ananlogues. Yao. Hsueh. Pao.30:715-722.