فعالية حليب البقر وحليب جوز الهند وحليب فول الصويا على نمو الاطوار المغتذية لطفيلي الاميبا الحالة للنسج في الزجاج (*in vitro*)

زهراء عبد الرحيم أحمد

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد.بغداد – العراق

الخلاصة

تم عزل و تنمية وأدامة الاميبا الحالة للنسج في الزجاج باستخدام الوسط الزرعي Locke – egg medium (LEM) ، ثم درس تأثيرأضافة حليب الابقار وحليب جوز الهند وفول الصويا في نمو ونشاط الأميبا الحاله للنسج بتراكيز مختلفة (١،٥،١٠)% لكلا النوعين الى الوسط الزرعي (LEM) الخاص بنمو الاميبا الحاله للنسج وفحصها بعد ٢٤ و٤٨ ساعة من الحضانة وملاحظة مدى قدرة هذه الانواع الثلاثة من الحليب في تثبيط نمو الاميبا الحاله للنسج ، فضلاً عن ملاحظة التغايرات الشكلية التي يعاني منها الطفيلي خلال مدة المعاملة . أوضحت النتائج فعالية حليب البقر وفول الصويا قد ثبطا نمو الاطوار المغتذية للاميبا الحاله للنسج أذ بلغت فعالية المعاملة ٨٠.٧% و ٥١.٣% على التوالي عند التركيز ١% وبعد مرور ٤٨ ساعة حضانة بينما كانت الفعالية التثبيطية لحليب جوز الهند قليله ، أذ بلغت ٢٠% عند التركيز ١% وبعد مرور ٤٨ ساعة حضانة . ولوحظ عند التركيز ٥% و ١٠% وبعد ٤٨ ساعة حضانة ارتفاع الفعالية التثبيطية لكل من حليب البقر وفول الصويا وجوز الهند اذ بلغت فعالية المعاملة ٩٧.٤% و٩٩% و٨٤.٦% على التوالي عند التركيز ٥% ، بينما بلغت عند التركيز ١٠% ٩٩.٧% و٩٩.٥% و٩٦.٢% على التوالي . و لوحظ حدوث عملية التكيس للاميبا الحاله للنسج مع حصول تغايرات شكلية للطفيلي أدت الى تحللهُ نتيجة توقف عملية البلعمه والهضم الداخل خلوي .

THE ACTIVITY OF BOVINE MILK, COCONUT MILK AND SOYA BEAN MILK ON GROWTH OF *ENTAMOEBA HITOLYTICA* TROPHOZOITE *IN VITRO*

Zahra'a Abdul-Raheem Ahmed

Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad. Baghdad-Iraq

Abstract

Trophozoites of *Entamoeba histolytica* were isolated from a stool sample, and then cultivated and maintained axenically by using Locke-egg medium (LEM). The effect of supplementation of two different milk sources on the growth and activity of the parasite was investigated. The first source which is an animal (bovine milk) and the second is plant source (coconut & soybean milk). Different concentrations of milk (1, 5, and 10 %) have been added to the Locke-egg medium that is specified to the growth of *E. histolytica*. The ability of these three types of milk in inhibiting the *E. histolytica* growth was examined after 24 and 48h of incubation in addition to morphological changes that parasites underwent were observed. The results showed that bovine & soybean milk were active in the inhibition of the

growth of *E.histolytica* trophozoite, and the inhibition rate reaches to 80.7% and 51.3% respectively at the concentration of 1%, after 48h of incubation. But the inhibition rate for coconut milk is less than other types of milk and the inhibition rate reaches to 20% at the concentration of 1%, after 48h of incubation. While the inhibition rate was increased at the concentration 5% and 10%, after 48h of incubation when the milk of bovine and soybean and coconut were supplemented to LEM medium to reach %٩٧.٤,%٩٩ , 84.6 % respectively at 5% concentration , while at 10% concentration was reach to %٩٩.٧,%٩٩.٥, %٩٦.٢ respectively.

Encystment of *E.histolytica* has been noticed and morphological changes in the parasite have been observed that led to lyses of parasite which were resulting from the stopped phagocytosis and endosmosis.

المقدمة :-

يعد طفيلي الاميبا الحالة للنسج (*Entamoeba histolytica*) الاحادي الخلية المسبب لمرض الزحارالاميبي (Amoebic dysentery) من أهم المشاكل الصحية انتشاراً في العالم والمسؤول عن وفاة مائة الف شخص سنوياً خاصةً في البيئة الفقيرة ذات الظروف الصحية الرديئه ، أذ تحدث الاصابة عند ابتلاع الاكياس رباعية النواة عن طريق الطعام اوالشراب الملوثين لتستقر في القولون وتتغذى على الدقائق الغذائية والبكتريا وتهاجم جدار المعي لتكّون القرح وتسبب الزحار (dysentery) وقد تنتقل بواسطة الدم الى مواقع خارج الامعاء مثل الكبد والرئة والدماغ [1].

تعد المنتجات والمشتقات النباتية والحيوانية فضلاً عن المعادن من المصادر الرئيسية للعقاقير ومنذُ زمن طويل ، اذ تعمل هذه المنتجات كمركبات مضادة للجراثيم وتمثل احدى الوسائل الدفاعية لحماية النبات من الهجوم الجرثومي [2] . ويعد الحليب مصدر حيواني غني بالبروتينات والفيتامينات فضلاً عن المعادن كما أن لهُ القدرة على قتل الجراثيم بسبب أحتوائه على بعض المركبات مثل Lactoferrin, lysozyme , Lactoperoxidase فضلاً عن IgA الموجود في حليب الانسان[3].كما أظهرت احدى الدراسات فعالية بروتين الحليب المتمثل بـ Lactoferrin في تثبيط نمو بعض الاحياء المجهرية في الزجاج ونجاحهُ في القضاءعلى السلالات المرضية لـ *E. coli* وكذلك *Staphylococcus albus* , *Staphylococcus aureus* ,*Bacillus subtilis* فضلاً عن *Candida albicans* [4] . كما اشارت عدة بحوث الى فعالية حليب الانسان في قتل طفيلي الاميبا الحالة للنسج وبفعل IgA وبالرغم من ذلك مازالت هنالك مركبات اخرى مجهولة في الحليب تعمل على قتل الاميبا الحاله للنسج[3].

وتعد المنتجات النباتية مصدراً للعقاقير الجديدة مع فعالية عالية وسمية واطئة وثمن رخيص ، لذلك أن معظم سكان البلاد النامية يعتمدون على هذه الاعشاب والمنتجات النباتية الطبية في علاج أمراضهم ، وفي هذه الدراسة تم أستخدام نباتي جوز الهند وفول الصويا كعقاقير لمنتجات نباتية مضاده للأميبا الحالة للنسج .

تتألف ثمرة نبات جوز الهند *Cocos nucifera* والمعروفة بـ coconut من قشرة shell مغلفة باالالياف husk وتحوي الثمرة على مادة غذائية بيضاء تعرف باللحم meat ويملاء مركز الجوزة سائل والذي يمثل حليب جوز الهند milk وتكون نسبة هذا السائل من الثمرة الى ٢٥% [5]، وقامت عدة بحوث بدراسة المستخلص الكحولي للقشرة والياف الثمرة في علاج مختلف الامراض كأصابات الامعاء بالطفيليات وكذلك كمضاد للبكتريا والفايروسات والطفيليات مثل *Staphylococcus aureus , Herpes simplex virus , Leishmania amazonesis* [6].

أما بالنسبة لحليب فول الصويا Soya milk المستخرج من حبوب نبات فول الصويا *Glycine max* والمعروف بـ Soya bean فلم تتطرق الدراسات بشكل كبير الى فعاليتهُ او دورهُ كمضاد للاحياء المجهرية ، و يساعد حليب الصويا في تخفيض ضغط الدم ويخفف معدل الكولسيترول وايضاً يخفف من هشاشة العظام لدى النساء كما يعمل الى تفادي خطر الاصابة بسرطان القولون . ويمتاز حليب الصويا بأحتوائه على جميع الاحماض الامينية الاساسية ماعدا methioine كما يحتوي على كميات قليلة من الدهون المشبعة والكوليسترول [7].

لذا كان الهدف من هذه الدراسة هو التحري عن أفضلية مصدرين مختلفين من الحليب (حيواني و نباتي) كمضاد لنمو الاطوار المغتذية للاميبا الحاله للنسج في الزجاج *in vitro*.

المواد وطرائق العمل

عزل وتنمية طفيلي الاميبا الحاله للنسج

تم عزل وتشخيص طفيلي الاميبا الحاله للنسج من عينة براز للمصابين بمرض الزحار الاميبي في مختبرات مستشفى

اليرموك التعليمي ، أخذت هذه العينة ونميت على وسط زرعي من نوع Xenic culture media أذ أستخدم الوسط الزرعي Locke-egg medium(LEM) في تنمية الاميبا الحاله للنسج بدرجة ٣٧° وادامة النمو كل ٤٨ ساعة. وتم تحضير الوسط الزرعي والذي يتكون من طورين بحسب طريقة (Boeck and Drobohlav,1925)

١. **الطور الصلب:** المكون الأساسي لهذا الطور هو محتوى بيض الدجاج بمقدار 5 مل والذي يمثل السطح الصلب المائل.
٢. **الطور السائل:** محتوى هذا الطور هو محلول لوكس (Locke's solution) و يمثل الطور السائل العلوي إذ أضيف بمقدار 6 مل الى الطور الصلب المائل في انبوبة الزرع[8].

وبعد ان نميت الاميبا لعدة أشهر تم اجراء هذه الدراسة أذ تم معاملة الاميبا الحالة للنسج بالتراكيز الآتية (١٠,٥,١)% أذ تم تحضير هذه التراكيز من التركيز الاصلي بأستخدام معادلة التخفيف وأستخدام محلول لوكس كمادة مخففه لتراكيز الثلاثة لكل من حليب البقر وجوز الهند وفول الصويا، وتم عدّ الاطوار المغتذية للاميبا الحاله للنسج بوساطة شريحة عدّ الخلايا Haemocytometer وباستخدام المعادلة التالية وحسب ماجاء في [9] :

العد الكلي للاميبا (أميبا/مل) =
مجموع أعداد الأميبا في المربعات × عامل التخفيف ×$١٠^{٤}$

وبذلك حددت كمية العالق الحاوية على الاطوار المغتذية والبالغة ($١٠^{٦}$× ٠.٠٢ طور مغتذي/ مل من الطور السائل للوسط الزرعي) وأضيف هذا العالق الى المزارع الثانوية المعاملة والغير معاملة (السيطرة) وحضنت بدرجة ٣٧° وتمت متابعة النمو والتغيرات الشكلية للطفيلي بعد ٢٤ و٤٨ ساعة حضانة ، ومن ثم قيست فعالية المعاملة بوساطة المعادلة الاتية وكما ورد في[10]:

فعاليةالمعاملة(%)= (المعاملة (طورمتغذي /مل) / (السيطرة (طورمتغذي /مل)) ×١٠٠-١٠٠

جمع عينات الحليب

١- المصدر الحيواني (حليب الابقار)

جمعت عينات حليب البقر الطازج من بقرسليم في مزرعة الجادرية ومن ثم عقم ورشح بمرشحات غشائية [3]، ثم حضرت ثلاث تراكيز مختلفة (١٠,٥,١)% وأضيفت الى الاوساط الزرعية وتمت متابعة نمو ونشاط الاميبا بعد ٢٤ و٤٨ ساعة من الحضانة .

٢- المصدر النباتي

أ- حليب جوز الهند

أخذت عينة من ثمرة جوز الهند خالية من الخدوش وبعد تعقيم القشرة بالكحول ٧٠% تم سحب السائل من داخل الثمره بوساطة محقنة طبية معقمة وبظروف معقمة وذلك بعد ثقب الثمرة بوساطة سكين معقمة ، ثم عقم الحليب بترشيحهُ بمرشحات غشائية [5,11] وحضرت ايضاً ثلاث تراكيز مختلفة (١٠,٥,١)% واضيفت الى الاوساط الزرعية الخاصة بنمو الاميبا الحاله للنسج ومتابعة النمو بعد ٢٤ و٤٨ ساعة حضانه.

ب- حليب فول الصويا

تم تحضير حليب الصويا وبشكل تقليدي وحسب ما ذكرهُ [7] بتنقيع حبوب فول الصويا الجافة طيلة الليل في الماء ومن ثم يعصر ويرشح لازالة الراسب ويعقم بوساطة المرشحات الغشائية وكذلك تم تحضير ثلاث تراكيز مختلفة (١٠,٥,١)% واضافتها الى الاوساط الزرعية الخاصة بنمو الاميبا الحاله للنسج ومتابعة النمو بعد ٢٤ و٤٨ ساعة حضانة .

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى Duncan Multiple Range Test لتشخيص جميع الفروقات الممكنة بين جميع معدلات المعاملات وعند مستوى معنوية $p>0.05$ بأستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS).

النتائج

عند عزل طفيلي الاميبا الحاله للنسج من عينة البراز وتنميتهُ في الزجاج بأستخدام الوسط الزرعي locke-egg medium لوحظ فقط نمو الاطوار المغتذية وعدم وجود الاكياس او أي عملية تكيس ، وهذا عادةً مايحدث عند تنمية الاميبا الحاله للنسج في الزجاج أذ تفقد قابليتها على التكيس . وبعد تنمية الاميبا الحاله للنسج في الزجاج لعدة اشهر تمت معاملة الاوساط الزرعية المهيأة للعمل بحليب البقر وحليب جوز الهند وفول الصويا. أظهرت النتائج الفعاليه التثبيطيه للحليب بشكل عام على نمو الاطوار المغتذية للاميبا الحالة للنسج في الاوساط الزرعية أذ لوحظ بعد ٢٤ ساعة حضانة وجود فروق

معنوية عند مستوى احتمالية P>٠.٠٥ بين السيطرة وجميع المعاملات وكذلك بين التراكيز ماعدا معاملة حليب جوز الهند اذ لم يظهر فرق معنوي بين السيطرة والوسط المعامل بحليب جوز الهند وللتراكيز الثلاثة ، بينما لوحظ في الساعة ٤٨ حضانه وجود فروق معنوية بين السيطرة وجميع المعاملات ومن ضمنها حليب جوز الهند وبذلك ارتفع معدل التثبيط بحليب جوز الهند بعد الساعة ٤٨ حضانة ، وعند المقارنة بين الوقتيّن ٢٤ و٤٨ ساعة فقد لوحظ وجود فروق معنوية لكل من السيطرة والمعاملات ، ما عدا التركيز الثالث ١٠% لكل من حليب الصويا وحليب جوز الهند اذ لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين الوقتيّن وكما هو موضح في (الجدول ١).

أما فعالية المعامله فقد كانت متباينة بحسب نوع المعاملة والتركيز والتوقيت ، أذ أوضحت النتائج بأن حليب البقر وفول الصويا كانا ذا فعالية عالية في تثبيط النمو الاميبي مقارنةً بحليب جوز الهند وللتراكيز الثلاثة ولكلا الوقتيّن ،أذ كانت فعالية المعاملة لحليب البقر وفول الصويا عند التركيز ١٠% وبعد ٢٤ ساعة ٩٣.٢% و ٩٧.٦% على التوالي اما في الساعة ٤٨ فقد كانت ٩٩.٧% و ٩٩.٥% على التوالي ، بينما بلغت فعالية المعاملة لحليب جوز الهند ٧٩% وذلك عند التركيز ١٠% وبعد ٢٤ ساعة حضانة أما بعد ٤٨ ساعة حضانة فقد بلغت ٩٦.٢% وكما هو موضح في (الجدول ٢).

بالنسبة للتغيرات الشكلية للأميبا الحاله للنسج فقد أظهر الفحص المجهري بشكل عام ولكل المعاملات انخفاض في نشاط وحركة الاطوار المتغذية كما لوحظ استدارة حدود غشاء الخلية اذ اصبح دائرياً بمعنى حدث تدوير للغشاء البلازمي (شكل ١) كما لوحظ تحلل بعض الاطوار المتغذية للطفيلي وخاصة عند التعرض الى التراكيز العالية وبتقدم فترة الحضانة (شكل ٢ و ٣) . كما اظهرت الدراسة وجود حالات تكيس للاميبا الحاله للنسج اذ لوحظ اكياس فتية ذات فجوة كلايكوجينية كبيرة (شكل ٤) كما لوحظ وجود اكياس ثنائية النواة للاميبا الحاله للنسج في حين لم تلاحظ اي اكياس ناضجة (شكل ٥) كما اظهرت الدراسة بشكل عام ولجميع المعاملات وجود اعداد كبيرة من الفجوات الغذائية بمختلف الاعداد والاحجام (شكل ٦) في حين لوحظ عند المعاملة بحليب البقر حدوث توقف لمراحل عملية البلعمة وتجمع الجسيمات البلعمية مما يعني توقف عملية الهضم الذي أدى الى تغير في الشكل الخارجي للاميبا (شكل ٧) كما أن جميع هذه التغيرات لوحظت بشكل اساسي عند التركيز ١% و ٥% أذ أن الفعالية التثبيطية ازدادت بزيادة التركيز مما أدى الى هلاكات عالية وخاصةً عند التركيز ١٠%.

جدول ١ : تأثير الانواع المختلفة من الحليب على نمو طفيلي الأميبا الحالة للنّسج والنامية في الوسط الزرعي Locke-Egg Medium(LEM) بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة من الحضانه .

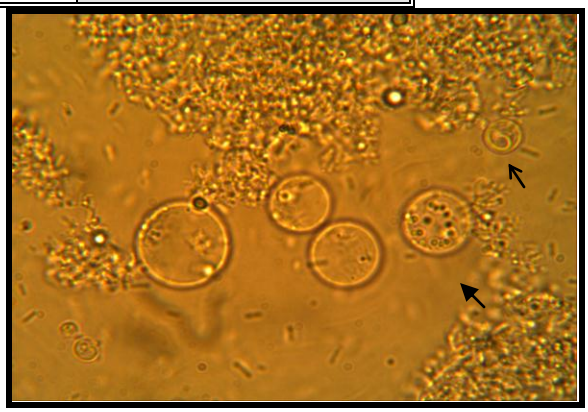
المجاميع	التراكيز	معدل أعداد الطفيلي النامية ± الخطأ القياسي × ١٠^٦/مليلتر	
		24 h	48 h
السيطرة	٠.٠٠٠	0.201 ±1.145**a** **A**	0.559 ± 3.477**a** **B**
حليب البقر	% 1	0.032 ±0.120**b** **A**	0.057 ± 0.670**b** **B**
	% 5	0.035 ± 0.097**b** **A**	0.042 ± 0.090**b** **A**
	% 10	0.012 ±0.077**b** **A**	0.006 ± 0.010**b** **B**
حليب فول الصويا	% 1	0.042 ± 0.233**b** **A**	0.285 ± 1.690**ab** **B**
	% 5	0.025± 0.130**b** **A**	0.009 ± 0.033**b** **B**
	% 10	0.007 ± 0.027**b** **A**	0.007 ± 0.017**b** **A**
حليب جوز الهند	% 1	0.085 ±0.423**a** **A**	1.068 ± 2.770**ab** **B**
	% 5	0.034 ±0.207**a** **A**	0.075 ± 0.533**b** **B**
	% 10	0.042± 0.240**a** **A**	0.015 ± 0.130**b** **A**

*الحروف الصغيرة المتشابهة في العمود الواحد يعني عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p>0.05$ وفق اختبار دنكن متعدد الحدود

*الحروف الكبيرة المتشابهة في الصف الواحد (بين التوقيتات) يعني عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p>0.05$ وفق اختبار دنكن متعدد الحدود

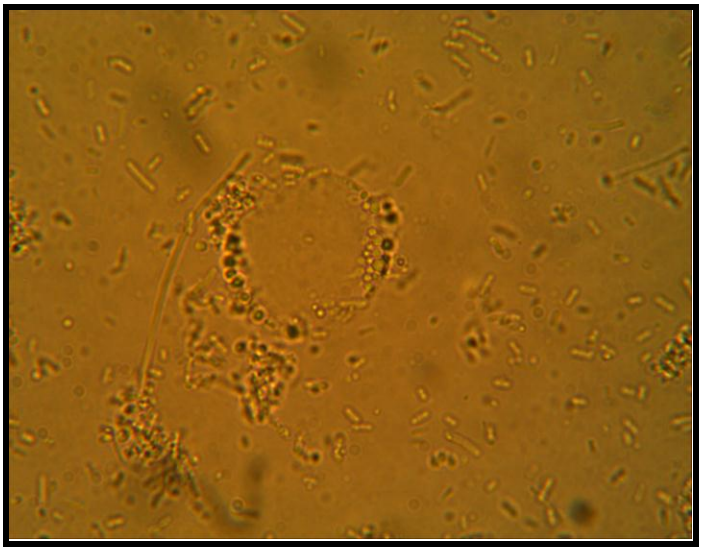
جدول ٢ : النسبة المئوية للفعالية المعاملة لانواع مختلفة من الحليب في الوسط الزرعي (Locke-Egg Medium(LEM بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة من الحضانه .

المجاميع	التراكيز	فعالية المعاملة (%)	
		24 h	48 h
حليب البقر	%1	% ٨٩.٥-	%٨٠.٧-
	%5	%٩١.٥ -	% ٩٧.٤ -
	%10	%٩٣.٢-	%٩٩.٧ -
حليب فول الصويا	%1	%٧٩.٦ -	%٥١.٣ -
	%5	%٨٨.٦-	%٩٩ -
	%10	%٩٧.٦-	%٩٩.٥ -
حليب جوز الهند	%1	%٦٣ -	%٢٠ -
	%5	%٨١.٩ -	%٨٤.٦ -
	%10	%٧٩ -	%٩٦.٢ -

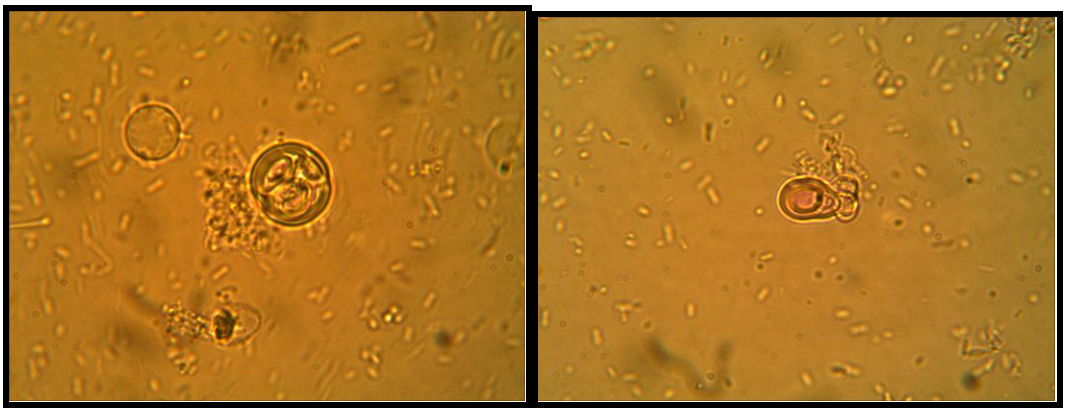


شكل ١: الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM والمعامله بحليب جوز الهند بتركيز ١% يوضح استدارة الغشاء البلازمي فضلاً عن وجود مرحلة بداية التكيس(↑) ووجود الفجوات الغذائية)X1000

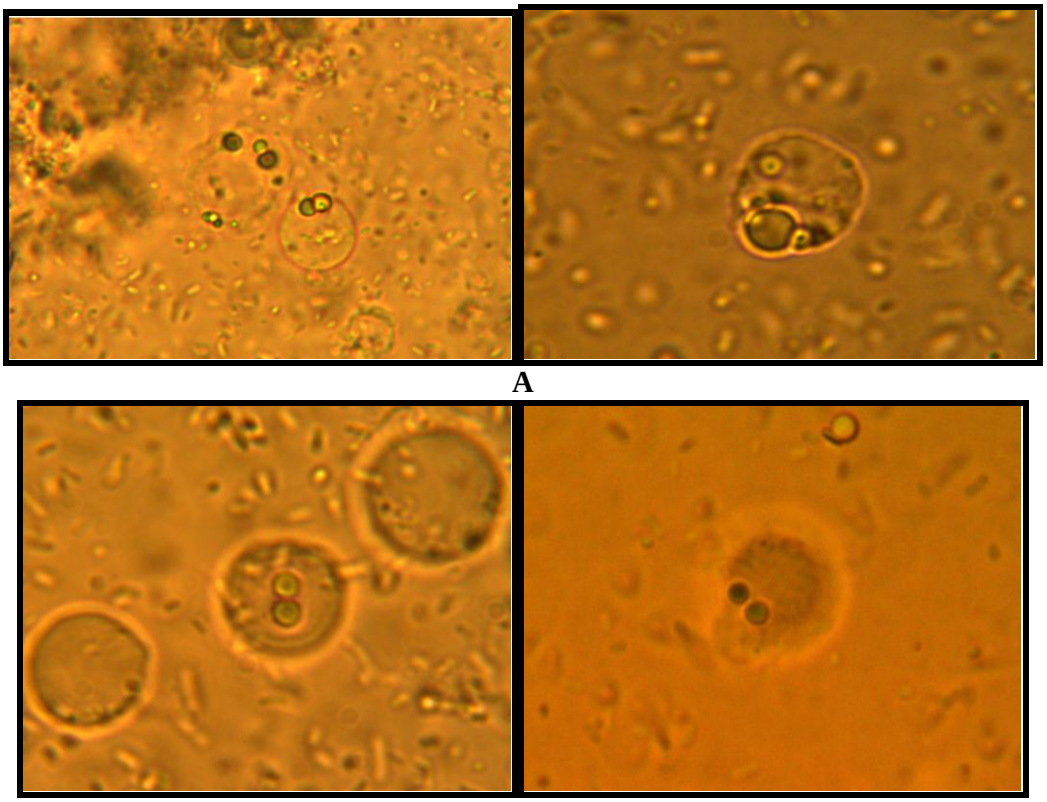
شكل ٢:- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM والمعاملة بحليب فول الصويا بتركيز ٥% يوضح فيه تحلل الاميبا الحاله للنسج (X١٠٠٠).



شكل ٣:- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM و المعاملة بحليب البقر بتركيز ٥% يوضح تحلل الغشاء البلازمي (X١٠٠٠).



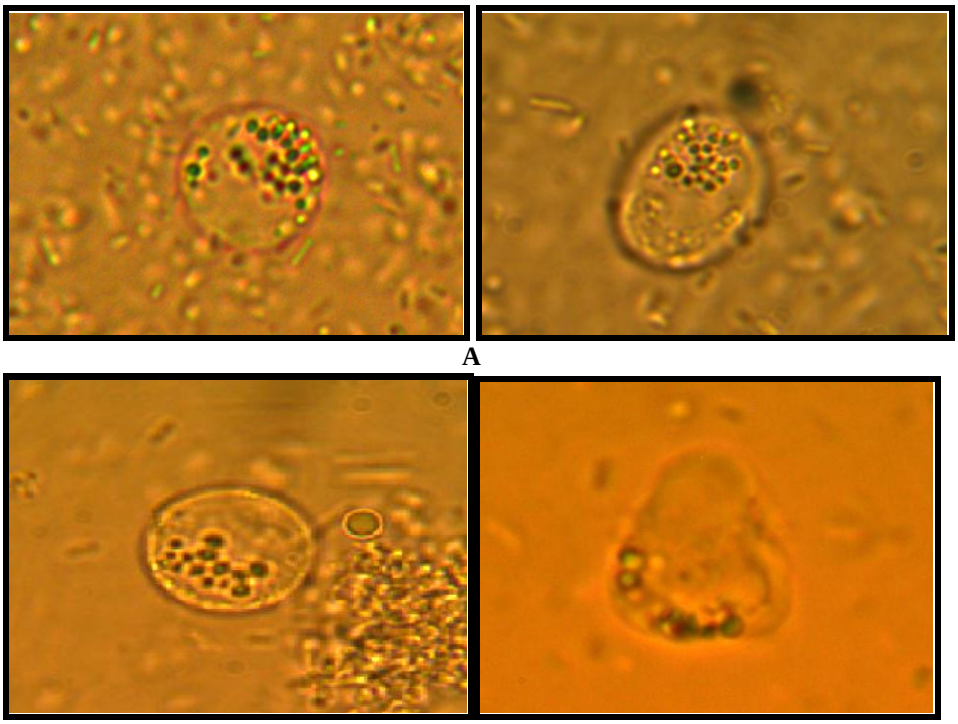
شكل ٤:- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM والمعامله بحليب جوز الهند بتركيز ٥ % يوضح فيه بداية عملية التكيس (X١٠٠٠) .



A

C **B**

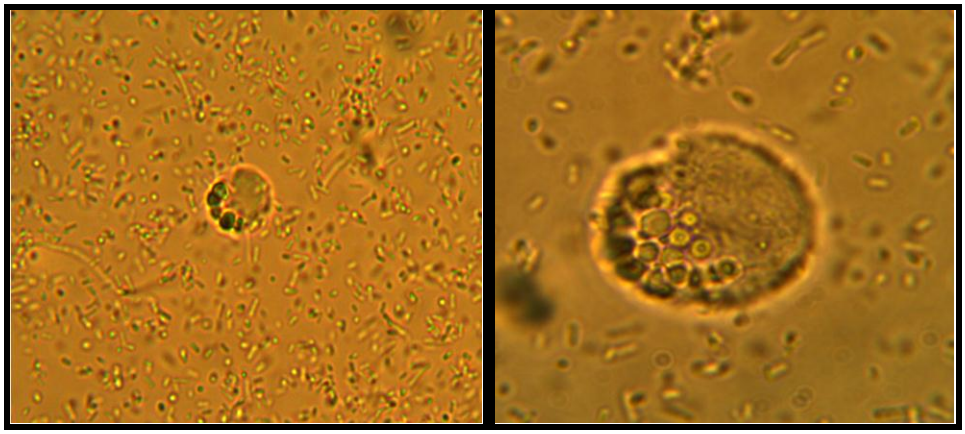
شكل٥ :- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM يوضح فيه وجود حالة التكيس اذ يلاحظ وجود اكياس ثنائية النواة والمعاملة بكل من : A- حليب البقر بتركيز ٥% ، B- حليب فول الصويا بتركيز ٥% ، C- حليب جوز الهند بتركيز ٥% (X١٠٠٠).



A

C B

شكل ٦:- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM والمعاملة بكل من : A - حليب البقر بتركيز ١% ، B- حليب فول الصويا بتركيز ١% ، C- حليب جوز الهند بتركيز ١% ، يوضح فيه وجود الفجوات الغذائية و تبايين أعدادها وأحجامها (X١٠٠٠) .



A B

شكل ٧:- الاميبا الحاله للنسج النامية في الوسط الزرعي LEM المعامل بحليب البقر بتركيز ٥% يوضح فيه توقف عملية الهضم الداخل خلوي A- X ٤٠٠ ، B- X ١٠٠٠ .

المناقشة

يعد الحليب غنياً بالمعادن وأهمها الكالسيوم ويتواجد الكالسيوم بكميات كبيرة تصل في حليب البقر الى ١١٨ملغم/١٠٠غم من الحليب ،بينما تصل النسبة في حليب الصويا الى ١٣ملغم/١٠٠غم [12]. فضلاً عن المعادن توجد مركبات تعد عوامل غير نوعية مضادة للجراثيم أهمها بروتين Lactoferrin[13]، وأشار [14] بأن lactoferrin الموجود في حليب اللبائن يؤدي دوراً في تقليل قدرة الاصابة باالجراثيم بسبب تثبيطهِ لانزيم cysteine protease الموجود في البكتريا والفايروسات فضلاً عن بعض الطفيليات . بينما ذكر [15] فعالية الـ lactoferrin الموجود في حليب البقر كمثبط لنموالبكتريا السالبة لصبغة كرام، وفسر [16] بأن سبب هذا التأثير التثبيطي هو التضرر المباشر للغشاء البلازمي للجراثيم . يعرّف الـ lactoferrin بأنهُ عبارة عن سلسلة مفردة من glycoprotein ذو وزن جزيئي80 KDa وينتج من الغدة اللبنية وكريات الدم العدلة ، ويعمل كخالبات chelates للحديد الخارج خلوي في سطح الامعاء [17,18] . وذكر [4] بأن حليب البقر يحوي على هذا البروتين بمقدار 5 ملغم/مل

ويمكن ان يبقى في الامعاء بدون ان يتحطم بالاحماض المعدية أو بفعل التحلل البروتيني في الامعاء . كما انه يوجد بشكل اساسي في الحليب و بتراكيز عالية ومتغايرة بحسب الانواع ، كما ان لهُ عدد من المزايا كمضاد للبكتريا والفايروسات والفطريات فضلاً عن الطفيليات وبطرق تأثير مختلفة ، ودورهُ كمضاد في امراض الطفيليات غير معروف وقد يعود السبب الى اشتراك عدة طرق مما يؤدي الى تقليل درجة الاصابة وأقترح بأن للببتيدات تأثير على استقامة غشاء الطفيلي [18] . لذا قام [16] بأختبار فعالية lactoferricin الذي يعد جزء من الـ lactoferrin الموجود في حليب البقر كمضاد للطفيلي *Toxoplasma gondii* في الزجاج وفي الحي ، ولوحظ تغير في شكل الطفيلي أذ اصبح بيضوي واصطباغهُ بملون تريبان الزرقاء دلاله على هلاك الطفيلي، بينما قام [19] باستخدام lactoferrin كمضاد للطفيلي *Toxoplasma gondii* و *Eimeria stiedae* ولاحظ تأثيرهُ في اختزال درجة الاصابة . قام [3] بمعاملة الاميبا الحاله للنسج في الوسط الزرعي axenic بحليب الانسان والبقر والخنزير وبتراكيز (٥-١٠-١٥-٢٠) % واظهرت النتائج بأن حليب الانسان والبقر قاتل للاميبا amoebicidal ومن التركيز الاول وبنسب قتل مختلفة بحسب اختلاف التراكيز ، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية أذ لوحظ التأثير التثبيطي العالي لحليب البقر على نمو الطفيلي وللتراكيز الثلاثة (١-٥-١٠)%،وفسر [3] ذلك الى بروتينات الحليب مثل lactoferrin lysozyme , التي لها القابلية على قتل الاميبا ، كما ذكر بأن الكاسئين الذي يشترك في نقل الايونات ولاسيما الكالسيوم يتحلل بفعل انزيم pepsin و trypsin بعد الهضم وينتج ببتيدات ذات نشاط مضاد للبكتريا فضلا عن انهُ يثبط انزيم cysteine protease وربما لايمتلك الكاسئين فعل قاتل للاميبا بسبب مواقع الهدف الغير موجودة في الاميبا وعدم تاثر نقل الكالسيوم بوساطة الكاسئين ،كما ذكرت نفس الدراسه بأن lactoferrin شوهد على سطح الاميبا في غضون خمس دقائق من التفاعل مع الاطوار المغتذية ومن ثم موت الاميبا اذ يتداخل مع دهون الغشاء البلازمي ليسبب ضرر في الطبقة الدهنية مما يؤدي الى التغير في نفاذية الغشاء والتحلل . وفي دراسات اخرى تم استخدام حليب الانسان كمضاد للطفيليات من اهمها الاميبا والجياردیا اذ لاحظ [20] قتل الاطوار المغتذية للاميبا الحاله للنسج بواسطة حليب الانسان وحتى بعد عزل s-IgA وبمقدار ٩٩% وكذلك الحال بالنسبة لطفيلي الجياردیا ، وفي دراسة اخرى [13] تم استخدام حليب الانسان والبقر والماعز كمضاد لطفيلي الجياردیا ولوحظ تثبيط قليل لحليب البقر والماعز مقارنة بحليب الانسان ، وظهر التثبيط في حليب البقر والماعز بتركيز ٢٠% وفي دراسات اخرى ٥٠% مقارنة بـ ٠.٣-١% لحليب الانسان كما ان نمو الطفيلي لوحظ في تراكيز ١% و ٤ % للبقر والماعز مقارنة بـ ٠.١% للانسان . وفي دراسة اخرى [21] أستخدم ايضاً حليب الانسان كمضاد للاميبا في الزجاج باستخدام ثلاث تراكيز (10,5,2) % وكان تأثيرها مميت للاطوار المغتذية بعد ٣٠ دقيقة من الحضانة

ويعزى تأثر الطفيلي الى احتمالية التحلل المائي hydrolyzed للغشاء البلازمي وتحطم الطفيلي بسبب التداخل مع الحليب مما يؤدي الى التحلل الذاتي ، كذلك دورالاحماض الدهنية المتفلجة من الحليب تلقائياً والتي تكون سامة . فضلاً عن بروتينات اخرى كـ lactoferrin , lactoperoxidase التي تكون مضادة للبكتريا . وذكر [20] بأن الاطفال الذين يتغذون على حليب الام يصابون بنسبة أقل بالاميبا مقارنة بالاطفال الذين لايتغذون على الحليب .

أما بالنسبة لدور حليب جوز الهند والصويا فقد كانت الدراسات قليلة عن تأثيرهما سواء على الطفيلي او على الاحياء المجهرية الاخرى . يعد حليب فول الصويا غذائياً مشابهاً لحليب البقر أذ يتألف من نفس الكمية من البروتين كما أنهُ يحتوي ايضاً على الكالسيوم ويختلف عن حليب البقر بأنهُ يحوي على كمية قليلة من الاحماض الدهنية المشبعة كما يحتوي على سكر السكروز ولايحوي على الكلاكتوز فضلاً عن أنهُ يحوي على كميات كبيره من isoflavones الغير موجود في حليب البقركما يحوي على phytosterols, protease inhibitors, inositol hexaphosphate, saponins [22]. أما حليب جوز الهند فقد تم دراسة دور المستخلص الكحولي لقشرة جوز الهند فقط كمضاد للطفيليات ومن ضمنها الاميبا الحالة للنسج ، اذ درس [23] دور المستخلص لثمرة جوز الهند على الديدان الخيطية المعوية في الاغنام ولم تظهر اي تاثير مضاد للديدان الخيطية . ودرس [24] المستخلص الكحولي لعشرين نبات مختلف ومن ضمنها قشرة جوز الهند الذي اظهر أفضل تأثير كمضاد لنشاط الاطوار المغتذية لطفيلي *Trichomonas vaginalis* اذ كان Median lethal concentration (LC50) عند التركيز 5.8 ملغم/مليلتير وعزى ذلك الى انهُ غني بمركبات الـ polyphenolic وذكر ايضاً بأنهُ يعتبر مضاد جيد للبكتريا والفايروسات . ومن ثم قام [25] بأستخلاص الـ polypenolic

من قشرة ثمرة جوز الهند فوجدها مثبط جيد لنمو طفيلي *Leishmaina amazonensis* ولكلا الطورين amastigote و promastigote ، ودرس [26] الاستخلاص بالكحول الميثانولي لـ ٢٦ نبات ومن ضمنها قشرة ثمرة جوز الهند كمضاد للاطوار المغتذية لطفيلي الاميبا الحالة للنسج و *G. Lamblia* في الزجاج وبلغت LC50 عند تركيز 59.6 ملغم/مليلتير. تستخدم ثمرة جوز الهند كعلاج شعبي للاسهال والتهاب المفاصل arthritis كما انهُ غني بالبروتين والسكريات وكذلك المعادن مثل الفوسفات والكبريت والفلوريد والكلوريد ، وأثبتت البحوث [٦, ٢٤, ٢٥, ٢٦] دور ثمرة جوز الهند كمضاد للفايروسات والبكتريا والطفيليات مثل *Herpes simplex virus* , *Staphylococcus aureus* , *Leishmania amazonensis* في حين لم يظهر فعالية كمضاد للفطريات مثل , *Candida albicans* *Cryptococcus neoformans* , *Fonsecaea pedrosoi*

وفقاً الى ما ذكر عن فعالية الحليب في الدراسات السابقة فأن الدراسة الحالية كانت متفقة معها في فعالية الحليب سواء كان حيواني أم النباتي كمثبط لنمو الاطوار المغتذية للاميبا الحاله للنسج في الزجاج وازدياد معدل التثبيط بزيادة التركيز وذلك لما يحويه من مركبات فعاله ومعادن قادره على أحداث خلل في فسلجة الطفيلي مما يؤدي الى هلاكهُ . أما بالنسبة الى التغيرات الشكلية للطفيلي فتعد تثبيط عملية البلعمة من أهم التغيرات وذلك لاعتبار عملية البلعمة أحدى عوامل الضراوة المهمة للطفيلي وتم تشخيص الحالة بالاعتماد على [27] أذا قام بدراسة البروتينات والدهون فضلاً عن الانزيمات التي تنظم عملية البلعمة ، وأوضح بأن هناك عدة بروتينات تنظم مراحل عملية البلعمة بشكل متسلسل وأن أي تضرر لهذه البروتينات يؤدي الى خلل في عملية البلعمة ومن ضمنها توقف عملية الهضم الداخل خلوي .

References

1. Stanley, S. L. **2003**. Amoebiasis. *Lancet*, **361**:1025-1034.
2. Esquenazi,D.;Wigg,M.D.;Miranda, M.M.F.S.;Rodrigues, H. M.;Tostes, J. B.F.; Rozental, S.; da Silva, A. J.R.and Alviano,C. S. **2002**. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, **153** : 647–652.
3. León-Sicairos, N.; López-Soto, F.; Reyes-López, M.; Godínez-Vargas, D.; Ordaz- Pichardo, C. and de la Garza, M. **2006**. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme. *Clin Med Res.*, **4**: 106–113.
4. Brock,J.H. **1980**. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood*, **55**: 417-421.
5. NarayanU, K.K.; Deo, J.V.and Abani, M.C. **2000**. Natural tritium levels in tender and ripe coconut fruit_*Cocos nucifera* L.: a preliminary examination. *The Science of the Total Environment*, **256**: 233-237.
6. Esquenazi, D.; Wigg, M. D.; Miranda, M. M.F.S.; Rodrigues, H. M.; Tostes, J. B.F.; Rozental, S.; da Silva, A. J.R. and Alviano , C. S. **2002**. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, **153**: 647–652.
7. Sarkar,S. **2006**. Potential of soyoghurt as a dietetic food. *Nutrition and food Science*, **36**:43-49.
8. Clark, C.G. and Diamond, L.S. **2002**. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**:329-341.
9. Brousseau, P.; Payette, Y.; Tryphonas, H. Blakley, B.; Boermans, H.; Flipo, D. and Fournier, M. **1999**. *Manual of immunological methods*. CRC Press LIC, United State of America, Florida.pp7-135.
10. Lwin, K.M. and Oo, M. **2004**. In vitro anteamoebicidial activity of "Dysenzi" on *Entamoeba histolytica* in cultures. *FAME Pharmaceuticals Co., Ltd*. Internet:http://Famepharma.com.
11. Schaffner, C. P.; Mosbach, K.; Bibit, V. C. and Watson, C. H. **1967** .Coconut and Salmonella infection.*Applied Microbiology*,**15**: 471-475.
12. Theobald ,H. E. **2005**. Dietary calcium and health. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, **30**: 237–277.
13. Gillin, F. D.; Reiner, D. S. and Wang, C. **1983**[a] . Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by normal human milk. *Journal of Cellular Biochemistry*, **23**:47-56.
14. Ohashi,A.;Murata,E.;Yamamoto,K.;Maj ima,E.Sano,E.;Le,Q. and Katunuma,K.

2003. New functions of lactoferrin and beta-casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors. *Biochem. Biophys Res. Commum.*, **20**:98-103.

15. Hoek, K. S.; Milne, J. M.; Grieve, P. A.; Dionysius, D. A. and Smith, R. **1997**. Antibacterial activity of bovine Lactoferrin-derived Peptides. *Antimicrobiol agents and chemotherapy*, **41**:54-59.
16. Tanaka.T.;Omata,Y.;Sato,A.;Shimazaki, K.;Yamauch,K.;Takase,K.;Garashi,I. and Suzuki,N. **1995**. *Toxoplasma gondii* : parasiticidal effect of bovine lactoferricin against parasites. *Expermental parasitology*, **81**:614-617.
17. León-Sicairos, N.; Reyes-López, M.; Canizalez-Román, A.; Bermúdez-Cruz, R.M.; Serrano-Luna, J.; Arroyo, R. and de la Garza, M. **2005** . Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica* . *Microbiology*, **151**: 3859-3871.
18. Brock,J.H. **2002** . The physiology of lactoferrin . *Biochem .cell Biol*., **80**:1-6.
19. Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K.,Yamauchi, K., Uzuka, Y., Tanabe, S., Sarashina, T., and Mikami,T. **2001**. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedae* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**: 187–90.
20. Gillin, F. D.; Reiner, D. S. and Wang, C. **1983** . Human milk kills parasitic Intestinal Protozoa. *Science*, **221**: 1290-1292.
21. Akisu, C.; Aksoy, U.; Cetin, H.; Ustun, S. and Akisu, M. Effect of human milk and colostrum on *Entamoeba histolytica* . *World J Gastroenterol.*, **10:**741-742.
22. Mazur,W.M.;Duke,J.A.;Wa¨ha¨la¨K.;Ra sku,S.;and Adlercreutz,H.**1998**. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **9**:193–200 .
23. Oliveira, L.M.B.; Bevilaqua, C.M.L. ; Costa, C.T.C. ; Macedo, I.T.F. ; Barros, R.S.;Rodrigues, A.C.M.; Camurc¸a-Vasconcelos, A.L.F.; Morais, S.M. ; Lima, Y.C.;Vieira, L.S. and Navarro, A.M.C. **2009** . Anthelmintic activity of Cocos *nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, **159** : 55–59.
24. Calzada, F.; Yepez-Mulia, L. and Tapia-Contreras, A. **2007** . Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 248–251.
25. Mendonça-Filho, R. R. ; Rodrigues, I. A.; Alviano, D. S.; Santos, A. L.S.;Soares, R. M.A.; Alviano, C. S.; Lopes,A.H.C.S and Rosa,M.S.S.**2004**. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, **155**: 136–143.
26. Calzada, F.; Yepez-Mulia, L. and Aguilar , A. **2006** . In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**: 367–370.
27. Powell, R.R.; Welter, B.H.; Hwu, R.; Bowersox, B.; Attaway, C. and Temesvari, L.A. **2006**. *Entamoeba histolytica*: FYVE-Wnger domains, phosphatidylinositol3-phosphate biosensors, associate with phagosomes but not Xuid Wlled endosomes. *Experimental Parasitology*, **112**: 221–231.