Iraqi Journal of Science

دراسة نسجية لتأثير المستخلص المائي للفلفل الحار *Capsicum spp.* في طفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض.

سهيلة حياوي محمود ، بان جاسم محمد
Suh_Mahmood@yahoo.com
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بغداد. بغداد–العراق

الخلاصة
اجريت هذه الدراسة داخل الجسم الحي in vivo للكشف عن تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار *Capsicum spp.* على الاطوار المغتذية trophozoites والمتكيسة cysts لطفيلي الزحار الاميبي *Entamoeba histolytica* في الفئران البيض ، اذ تم تجريع الفئران المصابة بالطفيلي بالمستخلص المذكور بجرعتي0.03,0.01 مل بمعدل ثلاث جرع يوميا (صباحا ظهرا ،مساءا) لمدة اسبوع ، وخلال تلك المدة فحص غائط الفئران كل (36) ساعة لمراقبة التغير في اعداد الطفيلي بعد التجريع بالمستخلص.واظهرت النتائج ان المستخلص المائي للفلفل الحار كان فعالا في خفض اعداد الاطوار المغتذية والمتكيسة في الفئران المصابة بالطفيلي ، اذ سجلت اعلى نسبة قتل للاطوار المغتذية والمتكيسة عند جرعة 0.03 مل من المستخلص فكانت (100 % و 90.1%)على التوالي ،اما نتائج الدراسة النسيجية فقد اظهرت فعالية المستخلص في تقويض الاصابة ومعالجتها في كل من الكبد والامعاء الدقيقة والغليضة خصوصا عند الجرعة الواطئة منه.

الكلمات المفتاحية:- أنتمبيا الزحار

A HISTOLOGICAL STUDY ON THE EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF *Capsicum spp.* ON *Entamoeba histolytica* IN ALBINO MICE.

Suhaila H.Mahmood, Ban Jasim Mohamed
Department of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq

Abstract
The present study was conducted to determine the effect of hot pepper *Capsicum spp.* on the cysts and trophozoites stages of *Entamoeba histolytica* in albino mice. The previosly infected mice with *E. histolytica* were administered with two doses (0.01 and 0.03 ml) of aqueous extract of hot pepper three times daily at(morning, afternoon and evening) for a period of 7 days. The results showed that the aqueous extract of hot pepper was very effective in decreasing the numbers of cysts and trophozoites of *E. histolytica* in mice. The highest percentage was recorded with the dose of 0.03 ml which was100 % for trophozoites and 90.1 % for cysts. The histological study of small and large intestine and liver revealed that the low concentration was more effective to eliminate the injuries in small and large intestine and liver.

Keywords:Entamoeba histolytica

المقدمة

يعد طفيلي *Entamoeba histolytica* من الابتدائيات المعوية التي تصيب الانسان وتسبب له مرض الزحار الاميبي Amoebic dysentery ويمثل احد مشاكل الصحة العامة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية [3,2,1]،اذ يحتل المرتبة الثالثة من بين اخطرثلاث طفيليات قاتلة بعد الملاريا والبلهارزيا [4] ويصيب مايقارب 50مليون شخص ويتسبب في 100,000حالة وفاة سنويا على مستوى العالم[5,3] يمر

الطفيلي خلال دورة حياته بطورين اساسيين هما الطور المغتذي Trophozoiteوالطور المتكيس Cyst ، والاخير يمثل الطور المعدي infective stage،اذ تتم الاصابة بالطفيلي عن طريق تناول الطعام والشراب الملوث بذلك الطور[6].يعد الطور المغتذي هو الطور الضار،و يعيش في تجويف الامعاء الغليظة للمضيف ويتغذى على الغشاء المخاطي للامعاء وكريات الدم الحمر ويقوم بافراز انزيمات تحلل الغشاء المخاطي وتتعمق داخل جدار الامعاء فتتلف خلاياه مسببة قروحا مؤلمة وبذلك يحدث مرض الزحار الاميبي[7,5]. ونظرا للاهمية الطبية لهذا الطفيلي فقد بذلت في العقود الاربعة الاخيرة جهود حثيثة للتعرف بشكل اكبر على الطفيلي والمرض وكيفية علاجه ،وتزايد الاهتمام باستخدام المستخلصات النباتية في علاج الاصابة بالطفيلي نظرا لما يحويه بعضها من مركبات تعيق من نمو الطفيلي وكذلك تساعد في القضاء على القرح المعوية وشفاءها[11,10,9,8] فضلا عن كونها اقل ضررا واقل سمية من العقاقير الكيماوية.وقد اجريت في العراق العديد من الدراسات حول هذا الموضوع ومنها تلك التي بحثت في تأثير بعض المستخلصات النباتية على طفيلي الزحار الاميبي [12] ، يعد الفلفل الحار من النباتات الطبيه التي تستعمل لعلاج طيف واسع من الامراض مما دفع بعض الباحثين لاعتباره النبات المعجزه ، اذ يستعمل لمعالجة السعال والتهابات اللثه واللسان والجروح وقرح الجهاز الهضمي بوصفه مضاد للالتهابات البكتيريه وللفايروسات كما ان له فعالية كبيره في تنشيط الجهاز المناعي والدوره الدمويه وخفض احتمالات السكته القلبيه وخفض نسبة الدهون والسكر في الدم فضلا عن فعاليته في ايقاف النزف الدموي وتسكين الالام [14] . ونظرا لقلة الدراسات حول مدى تأثير الفلفل الحار على طفيلي الزحار الاميبي تم اجراء هذه الدراسة للكشف عن تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار *Capsicum spp.* على الطفيلي داخل الجسم الحي*in vivo*. وان البحث الحالي يمثل استكمالا لبحث سابق تم اجراءه للتعرف على مدى تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار على طفيلي الزحار الاميبي في الزجاج *in vitro* .[13]

المواد وطرائق العمل:

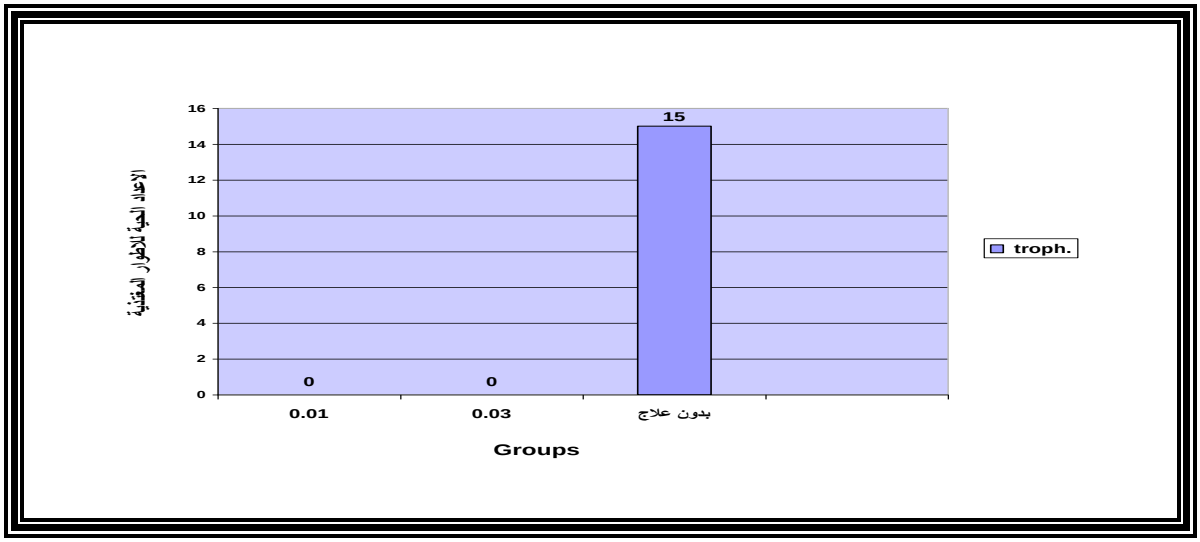
لغرض اجراء الاختبارات اللازمة للتعرف على مدى تأثير المستخلص المائي للفلفل الحار على طفيلي الزحار الاميبي تم اولا تحضير العالق الاميبي لتخميج حيوانات التجربة بطريقة Stanley وجماعته [15] بعد الحصول على عينات غائط لمرضى ثبت اصابتهم بطفيلي الزحار الاميبي*E. histolytica* من مستشفى بغداد التعليمي /مدينة الطب ، وحضر المستخلص المائي للفلفل الحار بأضافة (500)مل ماء مقطرالى (100)غم من الفلفل الحار ثم وضع في الخلاط عدة دقائق بعدها حرك المزيج الناتج باستمرار مدة 48ساعة في الهزاز shaker ثم رشح المزيج عبر طبقات من الشاش المعقم ونقل الى قنينة معقمة ، اغلق بأحكام وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.اما حيوانات التجربة فقد تم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية / وزارة الصحة وهي (24)من الفئران البيض تراوحت اوزانها من(20-25)غم من الذكور والاناث بعد التأكد من سلامتها من الاصابة بالطفيليات المعوية من خلال فحص البراز مجهريا، وقسمت الى اربع مجاميع كل مجموعة تحوي(6) حيوانات من كلا الجنسين،خمجت الثلاث مجاميع الاولى بطفيلي الزحار الاميبي بتجريع افرادها ب(0.2)مل من العالق الاميبي المحضر سابقا على مدى اسبوعين بمعدل جرعتين اسبوعيا،فحص غائط الفئران المخمجة بشكل دوري وبعد التأكد من اصابتها بالطفيلي من خلال مشاهدة الاطوار المغتذية والمتكيسة في الغائط وضعت في اقفاص نظيفة ومعزولة ،جرعت المجموعة الاولى من الفئران المخمجة ب (0.01) مل والمجموعة الثانية ب(0.03) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار والمحضر سابقا لثلاث مرات يوميا في (الصباح والمساى والظهر)على مدى اسبوع ، المجموعة المخمجة الثالثة تركت بدون علاج كمجموعة سيطرة موجبة (+ve control) ،اما المجموعة الرابعة فجرعت بمحلول الملح الفسيولوجي فقط واعتبرت سيطرة غير مخمجة (-ve control) بعد انتهاء مدة العلاج تم فحص غائط حيوانات التجربة وحسبت اعداد الاطوار المغتذية والمتكيسة في كل عينة حسب الصيغ الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للاطوار المغتذية الحية} = \frac{\text{عدد الاطوار المغتذية الحية}}{\text{العدد الكلي للاطوار المغتذية}} \times ١٠٠$$

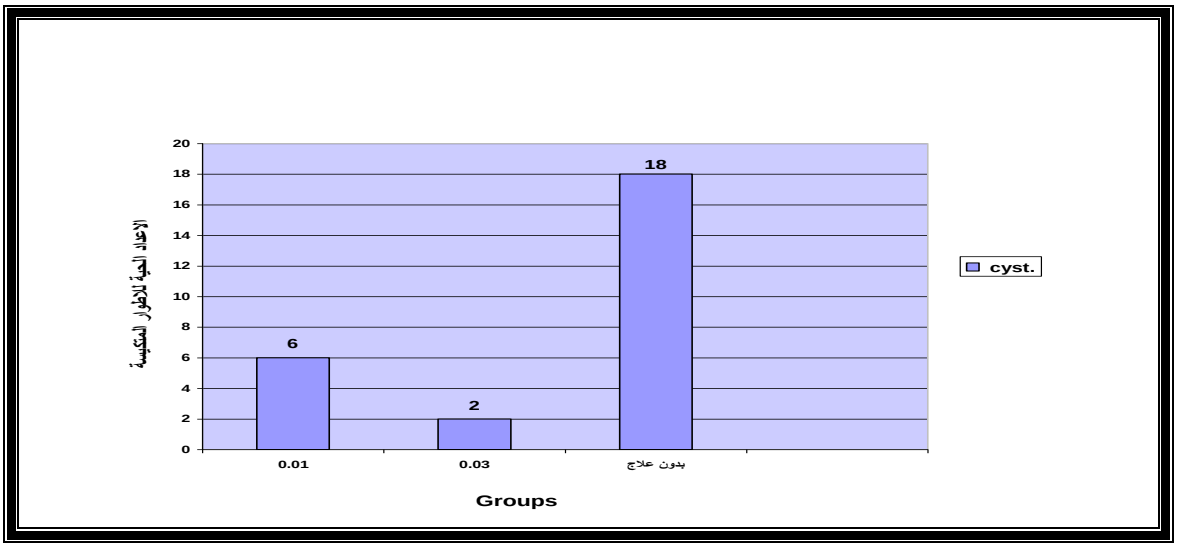
$$\text{النسبة المئوية للاطوار المتكيسة الحية} = \frac{\text{عدد الاطوار المتكيسة الحية}}{\text{العدد الكلي للاطوار المتكيسة}} \times ١٠٠$$

النتائج والمناقشة:

اجري الفحص المختبري لجميع عينات البراز التي فحصت خلال هذا البحث بطريقة المسحة الرطبة المباشرة Direct wet film [16] ، وعند حساب عدد الاطوار المغتذية تم اضافة قطرة من صبغة الايوسين لمسحة الغائط لتمييز الحي عن الميت منها ، في حين اضيفت قطرة من صبغة اليود اللوكالي لتمييز الاطوار المتكيسة الحية من الميتة ، وحضرت الصبغات استنادا الى Luna [17]. وحضرت ا لمقاطع ا لنسيجيه للامعاء والكبد في وحدة النسيج ا لمرضي / المختبرات التعليميه / مدينة ا لطب اظهرت نتائج الفحص المجهري لغائط الفئران المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي والمعاملة بالمستخلص المائي للفلفل الحار بجرعتي (0.01, 0.03) مل انخفاض مستويات الخمج بنسبة (100% للاطوار المغتذية و70% للاطوار المتكيسة) و(100% للمغتذية و90.1% للمتكيسة)على التوالي ، اذ انخفضت اعداد الاطوار المغتذية من 18 الى 0 ،والمتكيسة من 20 الى 6 عند جرعة 0.01 مل من المستخلص ، في حين عند جرعة 0.03 مل كانت معدلات الانخفاض للمغتذية من 17 الى 0 وللمتكيسة من 22 الى 2 ،(الشكلين 1، 2)



الشكل 1 : تأثير الجرع المختلفة للمستخلص المائي للفلفل الحار *Capsicum spp.* على اعدادالاطوار المغتذية لطفيلي *E. histolytica* في الفئران البيض



الشكل 2 : تأثير الجرع المختلفة للمستخلص المائي للفلفل الحار *Capsicum spp.* على اعداد الاطوار المتكيسة لطفيلي *E. histolytica* في الفئران البيض

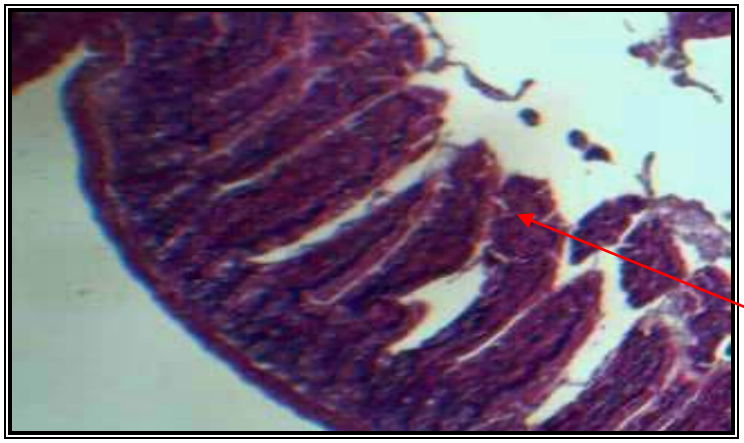
ويتضح من النتائج المذكورة سابقا وجود تأثير مثبط للمستخلص المائي للفلفل الحار على الاطوار المغتذية والمتكيسة لطفيلي *Entamoeba histolytica* ، وهذا التأثير يعود لعدة اسباب منها حامضية المستخلص المائي التي تصل الى (pH= 5) والتي تؤثر سلبا على نمو الطفيلي الذي يفضلpH متعادل لكي ينمو [19] وقد يعود التاثير المثبط للمستخلص لاحتوائه على ا لمركب الفعال Capsaicin الذي يوجد في بذور وثمار الفلفل الحار وهو ذو تأثير مضاد لكثير من الكائنات الحية ومنها الابتدائيات Antiprotozoal وذلك بسبب محتواه منterpenoides التي تقضي على طيف واسع من الميكروبات عن طريق ميكانيكية تحطيم الغشاء الخلوي لها [20, 22,21, 23, 24, 25] . فضلا عن قدرة هذا المستخلص على تنشيط الجهاز المناعي لاحتوائه على العديد من الفيتامينات لاسيما فيتامين C [14]

نتائج الدراسة النسيجية :

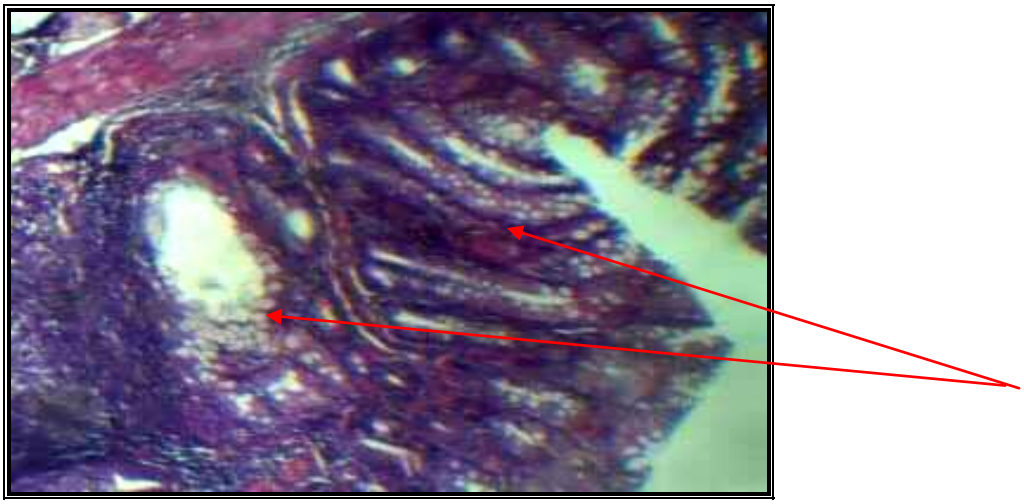
اولا : التغيرات النسيجية للحيوانات المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي :

اظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من الكبد حدوث تنكس مع تنخر في الخلايا الكبدية نتيجة الاصابة بالطفيلي ، وارتشاح خلايا التهابية بؤرية منتشرة بين خلايا الكبد ،اما مقاطع الامعاء الدقيقة فقد اظهرت حدوث قصر في الزغابات المعوية في مناطق مختلفة من الامعاء مع وجود تنسّج في الخلايا المبطنة للزغابات،هذا واظهرت المقاطع النسيجية المأخوذة من القولون والمستقيم حدوث تنسج للخلايا النسيجية في تجويف الامعاء مع حدوث تنخر في سطح الطبقة المخاطية وارتشاح خلايا التهابية (الاشكال 8,7,6,5,4,3).

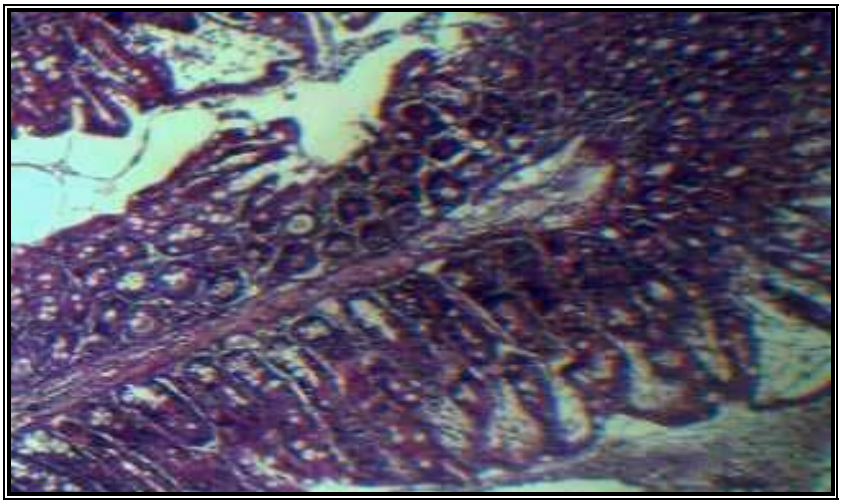
الشكل رقم 3: مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لفأر مخمج قبل العلاج يوضح قصر الزغابات المعوية(x100)



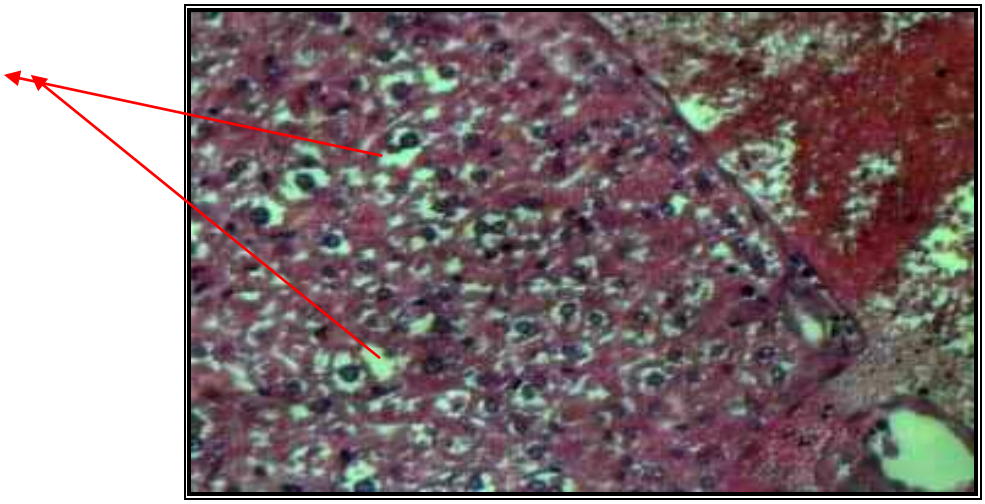
الشكل رقم 4: مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لفأر طبيعي(x100)



الشكل رقم 5: مقطع في نسيج الامعاء الغليظة لفأرمخمج قبل العلاج يظهر حدوث تنسج وتنخرفي سطح الطبقة المخاطية للامعاء(x100)

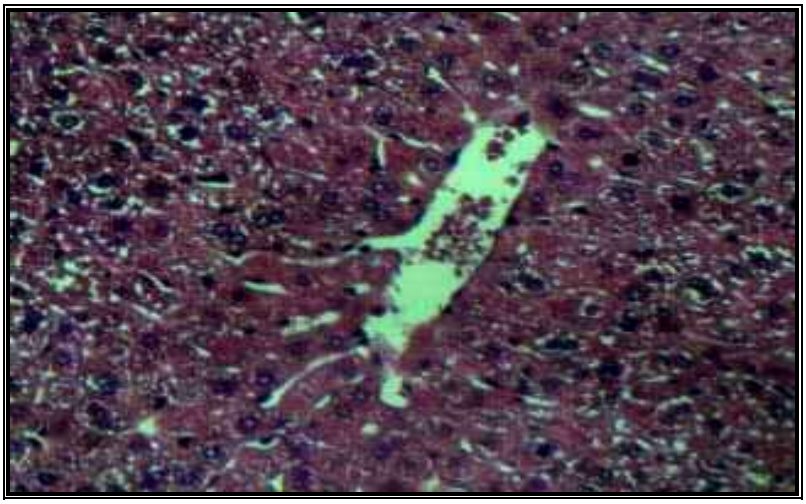


الشكل رقم 6 : مقطع في نسيج امعاء غليظة لفأر طبيعي(x100)



الشكل رقم 7: مقطع في نسيج كبد لفأر مخمج قبل العلاج يوضح وجود تنكس

مع تنخر في الخلايا الكبدية(x200)

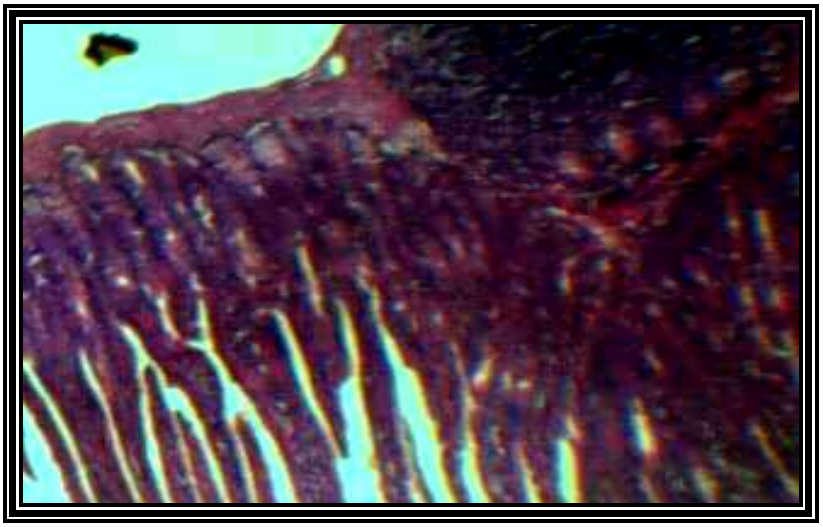


الشكل رقم 8: مقطع في نسيج كبد لفأر طبيعي(200x)

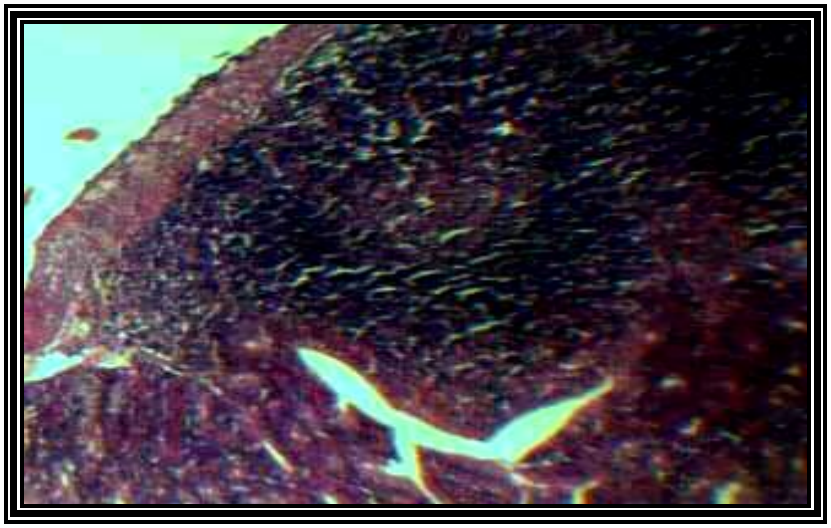
ثانيا : التغيرات النسيجية للحيوانات المخمجة بطفيلي الزحار الاميبي والمعاملة بالمستخلص المائي للفلفل الحار:

1- الامعاء الدقيقة :

اظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من منطقة الامعاء الدقيقة للفئران المخمجة والمعاملة بجرعة (0.01)مل من المستخلص المائي للفلفل الحار وجود تحفيز مناعي للعقد اللمفاوية المعوية مع وجود مركز جرثومي germinal centre ، والزغابات المعوية طبيعية الشكل،اما عند جرعة 0.03مل من المستخلص ذاته لوحظ الشكل الطبيعي للزغابات المعوية،مع حدوث تحفيز بسيط للعقد اللمفاوية اقل مما كان عليه في الجرعة السابقة ،ومن هنا يتضح ان الجرعة الواطئة من المستخلص هي الافضل للتحفيز مناعي للعقد اللمفاوية. (الشكلين 10,9)



الشكل رقم9: مقطع في نسيج امعاء دقيقة مصابة ومعاملة بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار (100x)

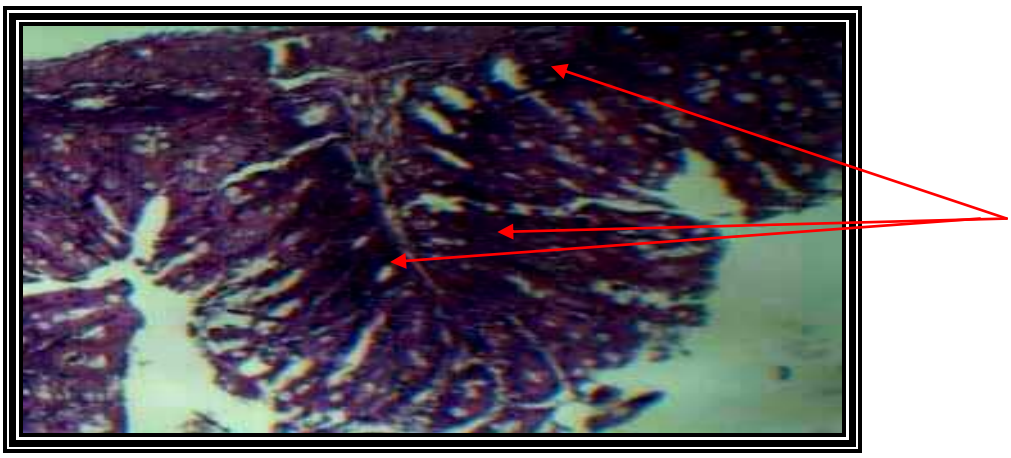


الشكل رقم 10: مقطع في نسيج امعاء دقيقة مصابة ومعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار (x100)

2- الامعاء الغليظة :

اظهر الفحص المجهري للمقاطع المأخوذة من الا معاء الغليظة للفئران المخمجة والمعاملة بجرعة (0.01)مل من المستخلص المائي للفلفل الحار أن نسيج القولون قريب للشكل الطبيعي مع وجود تنسج بسيط جدا في الطبقة المخاطية ، وارتشاح خلايا احادية النواة بين طيات الاغشية المخاطية ،اما عند المعاملة بجرعة(0.03) مل من المستخلص لوحظ الشكل الطبيعي للنسيج مع وجود تنسّج بسيط في بعض المناطق مكونا مايشبه الpolyps(الشكلين 12,11).

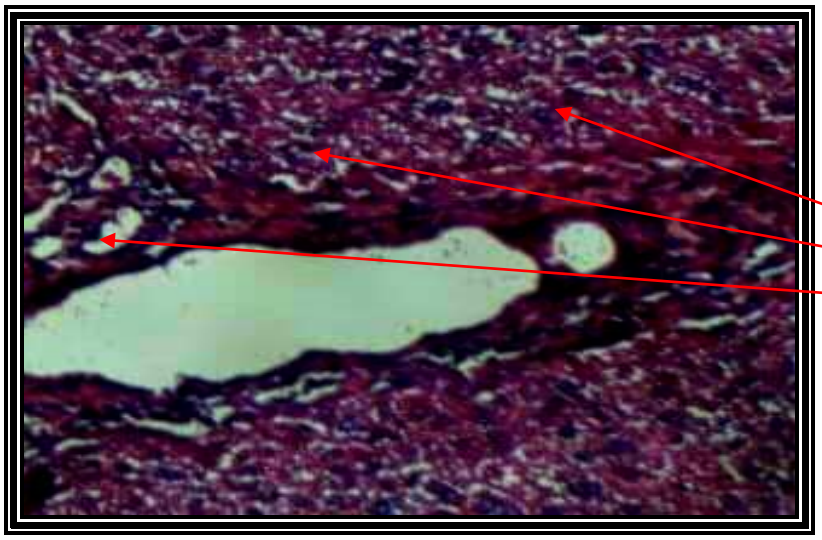
الشكل رقم 11 :مقطع في نسيج امعاء غليظة مصابة ومعاملة بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار(x200)



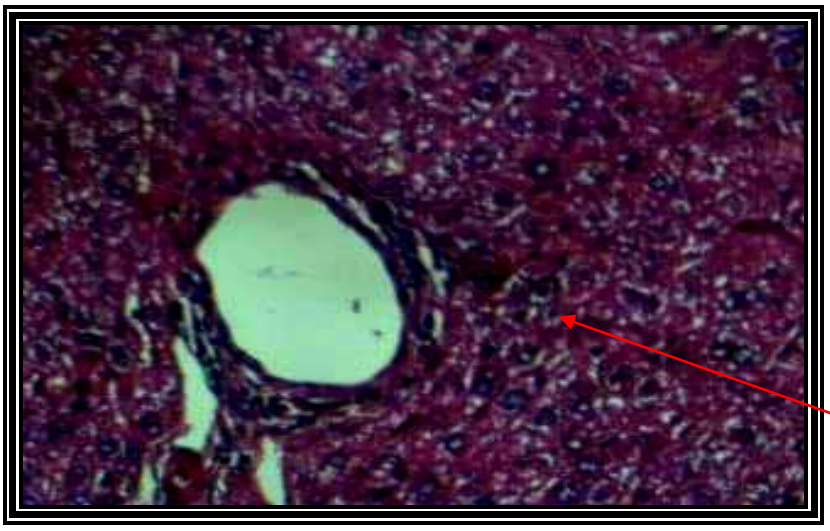
الشكل رقم 12 : مقطع في نسيج امعاء غليظة مصابة ومعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار(x100)

3- الكبد :

اظهرت المقاطع النسيجية المأخوذة من كبد الفئران المخمجة بالطفيلي والمعاملة بجرعة(0.01)مل من المستخلص المائي للفلفل الحار وجود احتقان دموي بسيط وتنكس بسيط في خلايا الكبد مع ارتشاح خلايا التهابية بسيط بين الخلايا الكبدية (اقرب للشكل الطبيعي لنسيج الكبد)اما عند المعاملة بجرعة (0.03) مل من المستخلص فقد اظهر الفحص المجهري عودة الشكل الطبيعي للكبد تقريبا مع حدوث تجمع لل glycoproteins داخل الخلايا الكبدية (الشكلين 14,13) .



الشكل رقم 13 : مقطع في نسيج كبد مصاب ومعامل بجرعة (0.01) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار (x200)



الشكل رقم 14 : مقطع في نسيج كبد مصاب ومعامل بجرعة (0.03) مل من المستخلص المائي للفلفل الحار(x200)

يتضح من فحص المقاطع النسيجيه ان مستخلص الفلفل الحار كان له تاثيرا ايجابيا في علاج اثار الاصابه بطفيلي الزحار الاميبي على كل من الامعاء الدقيقه والغليظه وعلى الكبد حيث عادت الى الوضع الطبيعي بعد انتهاء مدة العلاج . وهذه النتائج تؤكد ما ورد في العديد من المصادر حول قدره الفلفل الحار في علاج القروح والخراجات والانسجه التالفه لاسيما في القناة الهمضيه من خلال تحفيز انتاج الغشاء المخاطي المبطن للقناة الهضميه وكذلك عمله مضادا للاصابات الجرثوميه والالتهابات فضلا عن قدرته العاليه في تنشيط الدوره الدمويه [24,26,21,20],ومن الجدير بالاهتمام ان التراكيز العاليه او الجرعات الكبيره من الفلفل الحار لها تأثيرات عكسيه على علاج القروح وتؤدي الى سوء حالتها لذا من الضروري متابعة البحث في هذا الموضوع لتحديد اقل تركيز للجرعه الفعاله .

References:

1. Lejeune,M.,Rybicka JM. And Chadee, K.**2009**.Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica* . fut. Microb .PP.: 105-118

2. D:Miceli ,L.,**2004**. Distinguishing between pathogenic and non pathogenic species of Entamoeba. Lab . Med. **35:**613-616.
3. Moncada ,D., Keller , K. and Chadee ,K.,**2005** . *Entamoeba histolytica* – secreted product degrades colonic mucin oligosaccharides. Infect.Imm., **73:**3790-3793.
4. Nongyao ,A. , Kitja ,B. , and Pathana, p.B. **,2004**.Effects of *Pipper longum* Fruits on cecal amoebiasis in mice.J. Ethnopharmacol, 91,:357-360
5. Achers , JP.and Mirelman ,D**.,2006**.Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathgenesis.J.Microb**.9,** (4),:367-373
6. Linford , A.S.,Heriberto , M.,Kafelyn R.G. , Hanbang , Z.,Singh, V. , Willian , A. and Petri , JR**.,2009**. Short hairpin RNA. Mediated knoch down of protein expression in *Entamoeba histolytica* , J. Microb . PP: 1035-1037
7. Ryan, KJ . and Ray CG**.,2004**. Amebiasis .Sherris Med – Microb .,4th ed .,McGraw Hill,pp:733- 738
8. Yu sung ; Yu Yuchang and NiLun Ting , **2005**. Capsaicin biosyn thesis in water stressed hot pepper fruits . Bot.Bull. Acad. Sin .,(**46**):35-42.
9. Coppi , A., Cabinian ,M.,Mirelman ,D.; And Sinnis ,P.,**2006** Antimicrobial activity of Allicin abiologically active compound from garlic cloves Microb . Agent.chem.,**50**(5) : 1731-1737
10. Singh, UP., Prithiviraj ,B.;Sharma, BK.,Singh,M.,and Ray , AB**.,2001**.Role of garlic *Allium sativum* in human and plant diseases .Ind. J.exp. Bio., **39**(4) : 310-322.
11. Swiderski ,F.,Dabrowski,M.,Rusaczone K,A.,and Waszkiewicz ,B.,**2007.**Bio active substances of garlic and their role in dietoprophylaxis and dieto therapy . Rocz.Panstw.Zaki . Hig .,**58**(1) :41-60.
12. Stanley , S.L.Jr ; T.Zhang and K.B.Seyded ,**1999.** Animal models of Entamoeba histolytica infection . Handbook of animal models infection **. 102:**859-65
13. Tanyuksel ,m.; H.Yilmaz ; M.Ulukanligil ; E.Apraz., M.Cicek ; O .Koru ; Z.Tas and W.A.Petri , **2005**. comparison of two methods (microscopy and emzyme linked immune sorbent assay) for the diagnosis of amoebiasis. Exp.Parasitology , **110**:322-26.
14. Luna, L.G.**1968**. Manual of histological staining methods , 3 rd ed . McGraw – Hill Book Company, N.Y.,p :258
15. Bancroft, J.D. and A. Stevens . , **1982** . Theory and practice of histological techniques, 2 ed. Churchill Livingstone, London.PP 109-120.
16. Neall,R.A.**1967**. he IInVtro cultivation of Entamoeba.. in; . Taylor, A. E..(Ed), Problems of InVitro Culture. Blackwell Scientific Publications. London, Oxford. Pp.9-26.
17. Zakaria, Z.A. , Patahuddin, H. , Mohamad, D. A. , Israf, D. and Sulaiman, M.R. , **2010.** In vivo antinociceptiveand antinflammatory activities of the aqueous extract of Piper sarmentosum . J. Ethnopharmacol, **128(**1) : 42-48 .
18. Rodrigues, S.D., Baroni, S., Svidzinski, AE., Bersani-Amado, CA. and Corez, DA. **2008.** Anti-inflammatory activity of the extraction and amides from the leaves of Piper ovatum .J . Ethn. , **116**(3) : 569-573.
19. Silva, DR. ,Endo, EH. ,Filho, BP.,Nakamura, CV. ,Svidzinski, TI. ;de Souza, A. Young, MC. ,Ueda, T. and Cortez, DA. ,**2009.** Chemical composition and antimicrobial properties of Piper ovatum Vahl. J .Food Sci., **14**(3) ;1171-82.
20. Kobus, E.., 2008. Abstract of the world congress on medicinal and aromaticplants. Afr. J. med. 299-493
21. Sawangiaroen, N. , Sawangiaron, K. and Poonpanang, P., **2004**. Effect of Piper longum . Fruit and Piper sarmentosum on caecal amoebiasis in mice. J. Ethnopharmacol. **91(**2) : 357-360.
22. Marjorie, M.C., **1999.** Plant products as anti microbial agent. Clin. Microb. **12**(4) 546-582.
23. Ihesie Godwin. The healing values of cayenne pepper. Cited in Medicinal Plants
24. الطائي ، لمى قاسم علي ،٢٠٠٧ . دراسة تأثير عقار الميتروبندازول والمستخلصات الزيتية لنبات الدارسين والزنجبيل على امراضية طفيلي الزحار الاميبي في انسجة الفئران . رسالة ماجستير / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية ، ص ٨١
25. بان جاسم محمد ، **2010** . تاثير المستخلصات المائيه للثوم والفلفل الحار على طفيلي الزحار الاميبي خارج الجسم الحي . مجلة بغداد للعلوم ، **7** (1) : 146-142.

of the South West , **2008**. medplant.. nmsu. Edu/ capsicum. Shtm.