مجلة المثنى للعلوم الصرفة
AL-Muthanna Journal of Pure Sciences (MJPS)
VOL.(3)...NO.(1) 2016

تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات البطنج *Mentha longifolia* في حيوية الشكل المسوط لطفيلي *Leishmania donovani* في الزجاج *in vitro*

بسعاد عقرب العبودي نهى جبار عبد الركابي حيدر صباح عبدالحسين
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ذي قار

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة لمعرفة تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي Leishmania donovani في الزجاج in vitro اذ استخدم المستخلص المائي والكحولي لنبات البطنج وبالتراكيز 100,50,25 ملغم / مليليتر. اظهرت النتائج ان النسبة المئوية لهلاك الطفيلي تزداد بزيادة التركيز ومدة التعرض للمستخلص حيث بلغت نسبة الهلاك 100% عند الزمن 180 دقيقة وبالتركيز 100و25 ملغم /مليليتر ولكل من المستخلص المائي والكحولي على التوالي بينما بلغت نسبة الهلاك 100% عند الزمن 120 دقيقة وبالتركيز 100 ملغم /مليليتر للمستخلص الكحولي. وكان للمستخلص الكحولي فعالية اكبر في القضاء على الطفيلي.

المقدمة Introduction

داء اللشمانيا مرض تسببه طفيليات ابتدائية تعيش داخل خلايا عوائلها Intracellular تنتمي الى جنس *Leishmania* (Sharma and Singh,2009) . هناك أكثر من 20 نوع وتحت النوع من جنس اللشمانيا التي تصيب الانسان عن طريق لسعة ذبابة الرمل Sand fly ويعد ذباب الرمل من جنس *Lutzomyia* هو الناقل الرئيس لطفيلي اللشمانيا في العالم الجديد بينما جنس *Phlebotomus* هو الناقل الرئيس في العالم القديم (Markle and Makhoul,2004) وداء اللشمانيا الاحشائية Visceral Leishmaniasis او مايسمى بـ Kala- azar هو من اشد اشكال داء اللشمانيا ضراوة فالمرض يستهدف الاحشاء الداخلية كالكبد والطحال ولاسيما الحالات الشديدة وعند إهمال العلاج (Clem,2010) وبين Marovt *et al*.(2010) ان داء اللشمانيا مرض متوطن في 88 دولة 21 دولة منها في العالم الجديد و 67 دولة في العلم القديم . ويعتبر العراق من البلدان التي يتوطن فيها المرض (Taj-Eldin and Al-.(Alousi,1954 وفي ضوء ما تقدم اقترحت الدراسة الحالية التي تهدف الى دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية في حيوية طفيلي اللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani* في الزجاج *In vitro* . وخاصة في الاونة الاخيرة اتجه العديد من الباحثين نحو النباتات الطبية والتي تتوفر بكثرة في المحيط البيئي حيث أستعملت منذ القدم في علاج مختلف الامراض التي تصيب الانسان والحيوان لأحتوائها على مواد فعاله قادرة على علاج الكثير من الامراض الطفيلية دون ان يكون لها تأثيرات جانبية كبيرة تذكر في الجسم الحي (Al- Sabawi,2001)

وفي هذه الدراسة تم أختيار نبات البطنج *Mentha longifolia* لدراسة تأثيره في حيوية الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani* ينتمي نبات البطنج الى العائلة الشفوية Labiatae الاسم العلمي له *Mentha longifolia* اما الاسم المحلي البطنج (رويحه، 1983). اما بالنسبة للجزء الطبي المستعمل في النبتة فهو الاوراق وقمم الازهار المجففة (الزبيدي وأخرون،1996).ان البطنج من الاعشاب المعروفة وهو نبات اوراقه بيضية متطاولة او رمحية تكون مرتبة على ساق النبته بشكل أزواج متصالبة ملساء او مجعدة الى زغبية مسننه بأنتظام . الاوراق العليا جالسة اما السفلى فهي ذو سويق صغير (PDR for herbal medicin,1998) للبطنج استعمالات علاجية كثيرة منها انه طارد للغازات ومضاد للمغص ومعرق ومضاد للقيء كذلك فهو يعالج عسر الهضم المصحوب بالغازات والزكام وعسر الطمث اما استعمالاته الخارجية فهو معقم ومضاد للحكة (الزبيدي واخرون،1996) وهو مضاد للديدان المسطحة (Sharathcharel ,*et al*.,1995) ومضاد للميكروبات والفطريات (Mucciarelli *et* al.,2001) كما انه يحمي من اصابات نخاع العظم والمعدة الناتجه من التعرض للاشعاع وخاصة اشعة كاما (Tagetia and Baliga,2002) .

المواد وطرائق العمل

1- مصدر طفيلي اللشمانيا الاحشائية

تم الحصول على طفيلي اللشمانيا الاحشائية من كلية العلوم جامعة البصرة وتم تكثيرها على وسط NNN medium وتم حضنها بدرجه حرارة 26 مْ وهي الدرجه الحراريه المثلى لنمو الطفيلي لغرض أجراء البحث .

2- تحضير المستنبت ثنائي الطور Bi-Phasic medium يعرف هذا المستنبت بـ NNN medium واستخدم لاول مرة من قبل Novy and Macneal (1904), ثم حور من قبل Kagan and Norman(1970) يتكون هذا المستنبت من طورين الطور الصلب Solid phase والطور السائل liquid phase.

أ-الطور الصلب Solid phase المكونات في لتر واحد

نقيع الدماغ والقلب	37غم	Brain heart infusion
دكستروز	10 غم	Dextrose
أكار	20غم	Agar
ماء مقطر	1000سم3	Distilled water
دم الارنب خالي من الفايبرين	200سم3	Defibrinated rebbits blood
بنسلين بلوري 2000 وحدة دولية (I-U)		Crystallin pencillin
كبريتات الستربتوماسين 200ملغم		Streptomycine sulphate

تحضير المستنبت

تذاب المواد المذكورة اعلاه عدا مضادات الحياة والدم بالماء المقطر وينظم الاس الهيدروجيني الى 7.4 ويعقم بجهاز الموصدة ثم يبرد في حمام مائي بدرجة 50-55مْ ثم يضاف اليه الدم الخالي من الفايبرين والمضادات الحيوية مع الرج بعدها يصب 5سم^3 منه في كل قنينة من القناني المعقمة المجهزة سعة 25 سم^3 مع مراعاة وضع القناني بشكل مائل للحصول على مساحة سطحية اكبر للمستنبت لنمو الطفيليات تترك بعدها لتجمد في الثلاجة لمدة نصف ساعة ثم تنقل الى حاضنة بدرجة 37مْ لمدة 48 ساعة للتاكد من خلوها من التلوث بعدها يتم حفظها في الثلاجة بدرجة 4مْ لحين الاستخدام.

أ-الطور السائل Lock'solution وصف من Dawson et al. (1969) والمكونات في لتر واحد هي

كلوريد الصوديوم	9 غم	Nacl
كلوريد البوتاسيوم	0.42غم	Kcl
كلوريد الكالسيوم المائي	0.32 غم	Cacl2.2 H2o
بيكاربونات الصوديوم	0.2 غم	D-glucose

تذاب المواد اعلاه بالماء المقطر وينظم الاس الهيدروجيني للمحلول 7.4 ويعقم في الموصدة ويبرد ويضاف 1-1.5 سم3 من الطور السائل الى العينة الحاوية على الطور الصلب وبذلك يتكون المستنبت ثنائي الطور.

3- تحضير محلول دارئ الفوسفات PBS

ذي الاس الهيدروجيني 7.2 حيث حضر المحلول بإذابة المواد الاتية في لتر من الماء المقطر

كلوريد الصوديوم	8 غم	Nacl
فوسفات البوتاسيوم الحامضية	0.2غم	KH2po4
فوسفات الصوديوم الحامضية	1.15 غم	Na2HPo4
كلوريد البوتاسيوم	0.2 غم	Kcl

استخدم هذا المحلول في غسل الطفيليات

4- تحضير المستخلص المائي البارد لنبات البطنج

تم الحصول على نبات البطنج من الاسواق المحلية في محافظة ذي قار وتم تحضير المستخلص المائي بأتباع طريقة Harbone (1984) حيث اخذ 20غم من مسحوق المادة النباتية الجافة ووضع في دورق زجاجي سعة 1000 مليليتر ويحتوي على 100 مليليتر من الماء المقطر البارد بدرجة حرارة الغرفة ثم خلطت المادة النباتية بخلاط مغناطيسي Magnetic sterrer لمدة 15 دقيقة بعدها تم ترشيحه بقطعة من قماش الشاش لفصل العوالق الكبيرة ثم نقل الراشح الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق وذلك لترسيب العوالق النباتية الاصغر والحصول على مستخلص نباتي رائق ثم وضع الراشح في اطباق بتري ليجف بدرجة حرارة المختبر وبعد الحصول على مسحوق جاف وزن وحفظ بدرجة حرارة 20- مْ لحين الاستعمال.

5 تحضير المستخلص الكحولي لنبات البطنج

حضرت المستخلص الكحولي لنبات البطنج باستعمال الكحول الاثيلي 35% بوصفه مذيبا جيدا وتم ذلك باخذ 50 غرام من المسحوق النباتي واضيف اليه 250 مليليتر من الكحول وضع في حمام مائي بدرجة 50م لمدة ساعة ثم وضع في المحرك الكهربائي لمدة ساعة واكملت بقية الخطوات كما في تحضير المستخلص المائي.

التجربة

تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي Leishmania donovani في الزجاج تم استخدام سبع مجاميع من انابيب الاختبار كل مجموعة تتكون من ثلاث مكررات وكل انبوبة تحوي على 1مل من محلول اللوك المعقم الحاوي على 20 مليون طفيلي/مليليتر (تم حساب عدد الطفيليات باستخدام جهاز Haemocytometer) وقد تم اضافه ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلص المائي وثلاث تراكيز من المستخلص الكحولي لنبات البطنج الى ست مجاميع من الانابيب وبقيت المجموعة السابعة كمجموعة سيطره موجبه وكالاتي:

1-المجموعة الاول اضيف اليها المستخلص المائي بتركيز 25ملغم / مليليتر

2- المجموعة الثانية اضيف اليها المستخلص المائي بتركيز 50ملغم / مليليتر
3- المجموعة الثالثة اضيف اليها المستخلص المائي بتركيز 100ملغم / مليليتر
4- المجموعة الرابعة اضيف اليها المستخلص الكحولي بتركيز 25ملغم / مليليتر
5- المجموعة الخامسة اضيف اليها المستخلص الكحولي بتركيز 50ملغم / مليليتر
6- المجموعة السادسة اضيف اليها المستخلص الكحولي بتركيز 100ملغم / مليليتر
7- المجموعة السابعة مجموعة السيطرة (خالية من المستخلص).

حضنت جميع المجاميع بدرجة حرارة 26 مْ

و تم حساب حيوية الطفيليات بعد (180,120,60,0) دقيقة من اضافة المستخلص وتم قياس حيوية الشكل المسوط للطفيلي بأستخدام صبغة (ارثروسين- ب) حيث تم خلط حجوم متساوية 100مايكروليتر لكل من عالق الطفيليات ومحلول الصبغة المخففة بدارئ الفوسفات وتم تبريد المزيج الى درجة 4 مْ ثم حفظ بالثلج بدرجة -4 مْ ولمدة 5 دقائق ثم تم فحص قطرة من المزيج وتم حساب 100خلية في الاقل لاجل تقدير النسبة المئوية لحيوية الخلايا حيث ان الطفيلي المصطبغ يشير الى الخلايا الميتة والطفيلي غير المصطبغ يشير الى الخلايا الحية.

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام برنامج SPSS باستخدام Anova test.

النتائج

من خلال النتائج التي تم التوصل اليها نلاحظ الجدول (1) ان تأثير المستخلص المائي لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية Leishmania donovani يزداد بزيادة التركيز وزيادة مدة التعرض للمستخلص حيث يلاحظ ان النسبة المئوية لهلاك الشكل المسوط المعرض لتركيز 100 ملغم/مليليتر من المستخلص بلغت 100%عند الزمن 180 دقيقة مقارنة مع السيطرة التي بلغت 4.6% بينما بلغت النسبة المئوية للهلاك 90% و 71.33% للطفيليات المعرضة لتركيز 50 و25 ملغم/مليليتر من المستخلص المائي للنبات وبالزمن 180 دقيقة. وكانت الفروق معنوية عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$ بين التراكيز والأوقات المختلفة.

جدول (1) تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص المائي البارد لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي Leishmania donovani **خارج الجسم الحي**

مدة التعرض (دقيقة) / التركيز ملغم /مليليتر	النسبة المئوية للهلاك *			
	في الدقيقة الاولى	60 دقيقة	120 دقيقة	180 دقيقة
25	30 ±2.89	45 ±2.89	53.33 ±1.67	71.33 ±1.56
50	42.33 ±1.45	60 ±1.15	71.67 ±1.67	90 +2.89
100	76.33 ±1.86	88.33 ±1.67	96 ±1.53	100 ±0
Control	2.67 ±0.33	3.33 ±0.33	3.67 ±0.33	4.67 ±0.33

* تمثل قيمة ثلاث مكررات ± SD الانحراف المعياري.

اما بالنسبة للمستخلص الكحولي لنبات البطنج فيبين الجدول (2) ان تأثير المستخلص الكحولي لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية Leishmania donovani يزداد بزيادة التركيز وزيادة مدة التعرض للمستخلص حيث يلاحظ ان النسبة المئوية لهلاك الشكل المسوط المعرض لتركيز25 ملغم/مليليتر من المستخلص بلغت 100%عند الزمن 180دقيقة مقارنة مع السيطرة التي بلغت 4.6% بينما بلغت النسبة المئوية للهلاك 100% للطفيليات المعرضة لتركيز 100ملغم/مليليتر من المستخلص الكحولي للنبات وبالزمن 120 دقيقة . وكانت الفروق معنوية عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$ بين التراكيز والأوقات المختلفة.

جدول (2) تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لنبات البطنج في حيوية الشكل المسوط لطفيلي خارج الجسم الحي Leishmania donovani

مدة التعرض (دقيقة) / التركيز ملغم /مليليتر	النسبة المئوية للهلاك *			
	في الدقيقة الاولى	60 دقيقة	120 دقيقة	180 دقيقة
25	61.67 ± 7.26	85 ±	94.67 ± 2.6	100 ± 0
50	80 ± 2.89	94.33 ± 2.33	98.33 ± 0.33	100 ± 0
100	91 ± 0.55	96.33 ± 1.33	100 ± 0	100 ±
Control	2.67 ± 0.33	3.33 ± 0.33	3.67 ± 0.33	4.67 ± 0.33

* تمثل قيمة ثلاث مكررات ± SD الانحراف المعياري

المناقشة

شملت الدراسة الحالية استخدام المستخلص المائي والكحولي لنبات البطنج *Mentha longifolia* حيث كان لكل من المستخلص المائي والكحولي ذا فعالية في القضاء على الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية خارج الجسم الحي حيث كانت النسبة المئوية لهلاك الطفيلي تزداد بزيادة التركيز ومدة التعرض للمستخلص .

ورغم تشابه التراكيز في المستخلص المائي والكحولي الا ان المستخلص الكحولي اكثر تأثيرا في حيوية الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا الاحشائية خارج الجسم الحي وهذا راجع الى كون المستخلص الكحولي يمتاز بوجود الراتنجات فضلا عن وجود القلويدات اذ ان الراتنجات لاتذوب في الماء ولكنها تذوب في الكحول اما القلويدات تذوب بشكل جزئي في الماء لكنها تذوب جيدا في الكحول (حجاوي وجماعته ، 1999).

وتعود فعالية الرااتنجات الى كونها مركبات مؤكسدة سامة للاحياء المجهرية ولها القابلية على الارتباط مع المكونات الدهنية لغشاء الخلية مؤدية الى اعاقة عمله وبالتالي تثبيط نشاط الخلية وموتها (Cowan,1999) .

وفي دراسة اخرى قامت بها العبيدي (2007) بتجريب المستخلص المائي والكحولي لعدد من النباتات الطبية ومن ضمنها البطنج على طفيلي الزحار الاميبي خارج الجسم الحي حيث اظهرت هذه المستخلصات لنبات البطنج في القضاء على الطفيلي.

وهناك عدد من الدراسات حول تأثير بعض المستخلصات النباتية في حيوية الشكل المسوط لطفيلي اللشمانيا . حيث توصل Alain *et al.*(1992) ان المستخلص الكلوروفورمي لنبات *Pera benensis* يحتوي *على* Quinones والذي كان له تأثير فعال ضد الشكل أمامي السوط Promastigote لطفيلي اللشمانيا وضد الشكل فوقي السوط Epimastigote لطفيلي *Trypanosoma cruzi* وبتركيز 10 mg/ ml.

كما توصل Passero *et al.*(2007) الى ان المستخلص الميثانولي لأوراق نبات *Jacaranoda puberula* فعالية ضد طفيلي *Leishmania amazonensis* في الزجاج، حيث لاحظ ان التركيز المثبط للشكل المسوط لطفيلي *L. amazonensis* هو 88 mg/ml بينما لاحظ ان التراكيز الاعلى كان لها تأثير سام على الخلايا .

بينما توصل Byrum *et al.* (2010) الى ان المستخلص الميثانولي لنبات *Allium sativum* كان له تأثير فعال ضد الشكل المسوط لطفيلي *L. major* و *L.donovani* حيث لاحظوا ان التركيز المثبط للشكل المسوط للطفيلي هو 100 mg/ ml.

المصادر العربية

1-العبيدي، هبة محمد علي حمود. 2007. تأثير بعض المستخلصات النباتية المضادة للاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* المنماة في اوساط زرعية. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة بغداد.

2- الزبيدي، زهير نجيب، هدى عبد الكريم بابان وفارس كاظم فليح. 1996. دليل العلاج بالإعشاب الطبية العراقية. الطبعة الاولى. شركة أب للطباعة الفنية المحدودة، ص 8-111.

12-Markle,W.H.and Makhoul,K.(2004).Cutaneous leishmaniasis :recognition and treatment .Amfam.Physician. 69:60-455.
13-Marovt,M.;Kokol,R.;Stanimirovic,A.and Milskovic,J.(2010).Cutaneous leishmaniasis:A case report.Acta Dermatoven APA.19(2): 41-43.
14-Mucciarelli,M.;C.Wanda,M.Bertera cinzia and B.Simon.(2001).Effect of (+)- pulegone and other oil components of *Mentha pipertia* on cucumber respiration.Phytochem.Elsevier.Science Ltd,57:91-98.
15-Novy,F.G.and Macneal,W.J.(1904).On the cultivation of *Trypanosoma bruce*i.J.Infect.Dis.,1:1-30.
16-Passero,L.F.D.,Castro.A.A.,Tomokaue,T.Y., Kato,M.J.Paulineti,T.F,Carbett,C.E.and Laurenti, M.D. (2007). Anti-Leishmania actitsemi-Purified fraction of Jacaranda puberula leaves. Para. Res.101:677-680.
17-PDR forherbal medicines.1998,Medicines Economics company.INC.Montvale,695-97
18-Sharathchandra,J.N.N.;K.Platel and K.Srinivasan.(1995).Digestive enzymes of rat pancreas and small intestine in response to orally administered Mint (Mentha spicata) leaf and Garlic (Allium sativum) oil.Ind.J.Pharmacol.,27:156-160.
19-Sharma,U.and Singh,S.(2009).Immunobiology of leishmaniasis .Indian.J.EXP- Biol. 412-423.
20-Tagetia,G.C.and M.S.Baliga.(2002).Influence of the leaf extract of *Mentha orvensis* Linn.(Mint) on the survival of mice exposed to different dose of Gamma radiation. Strahlentherapie and onkilogie,Ab.,178(2):91-98
21-Taj-Eldin.S.D.and Al-Alousi,K.(1954).Kala-azar in Iraq-Report of Eour. Eases .J.Fac.Med.18:15-19.

3-حجاوي،غسان والمسيمي. حياة وقاسم، رولا. (1999)علم العقاقير والنباتات الطبية دار الثقافة للنشر–عمان-الاردن صفحة 151،187،253.
4-رويحه،امين.1983. التداوي بالإعشاب طريقة علمية تشمل الطب الحديث والقديم.الطبعة السابعة، دار القلم، بيروت- لبنان.ص -361 21

5-Alain,F.;Alcira,A.;Victoria,M.;Francois. R.;Revnald,H.and Andre,c.(1992).Biologicaland chemical studies of *Per benensis*,a Bolivian plant used in folk medicine as atreatment of cutaneous leishmaniasis.Journal of Eth no.37,159-164.
6-Al-Sabawi,B.H.H.(2001).Immunomodulation effect of the black nightshade *Solanum nigrum* on growth and development *Echinococcus granulosus* secondary hydatid cyst of human and sheep origin.Ph.D.thesis,Coll.Of Science. Univ.Mosul.
7-Byrum,W.;Christopher,O.;Moses,M.;Peter,K.; Elizabeth,M.,Johnston,I.and Judith,M. (2010).Experimental chemotherapy with Allium sativum (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with.Leishmania major and Leishmania donovani–J.vector.Borne.Dis.47. Pp.160-167
8-Clem,Angela.(2010).A current perspective on leishmaniasis.J.Glob.Infect.Dis.2:124-126.
Cowan,M.M.(1999).Plant products as anti microbial agensts Clin.Microbiol.Rev.,12(4):564-582.
9-Dawson,R.M.;Elliott,D.C.;Elliott,W.H.and Jones,K.M.(1969).Data for biochemical research ,2nd .ed. Clarendon Press. Oxford.Pp 508.
10-Harbone,J.B.(1984).Phytochemical methods. Chapman and Hall New York.2nd ed.288 Pp.
11-Kagan,I.G.and Norman,L.(1970).Manual of Clinical microbiology.Am.Soc.Microblio. Wash.,P 479.

Effect of aqueous and alcoholic extract of the plant *Mentha longifolia* in viability of *Leishmania donovani in vitro*

Basad A.Al-Aboody Nuha J.Al-Rekabi Haider sabah

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of aqueous and alcoholic extract of the plant Mentha longifolia in viability of promastigote of Leishmania donovani in vitro the aqueous and alcoholic extract has been used with concentration 25,50,100 mg/ml . The results showed the percentage of the destruction of the parasite increases with concentration and duration of exposure to extract . Where the percentage of perdition 100%at the time of 180 minutes and concentration 100 and 25 mg/ml to each of the aqueous extract and alcohol respectively ,while the percentage of perdition 100% at the time of 120 minute and concentration 100 mg/ml of the alcoholic extract. The alcoholic extract take place effectiveness largest in the elimination of parasite.