تأثير الشاي الاخضر على الحالة المناعية للأرانب المختبرية المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*

عهود مزاحم شاكر وشهد محمد محمود
كلية العلوم التطبيقية – جامعة سامراء– العراق

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تأثير المستخلص الكحولي للشاي الاخضر *Camellia sinensis* في ذكور الارانب البيضاء النيوزلندية المخمجة بطفيلي *Entamoeba histolytica* المسبب لداء الزحار الاميبي Amoebic dysentery وذلك بالاعتماد على عدة معايير شملت دراسة التغيرات الحاصلة في معامل البلعمة وعيوشية خلايا متعددة اشكال النوى PMNs والخلايا اللمفية والتشكل الزهري التائي الفعال والكلي ومعامل انقسام خلايا نخاع العظم وقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاض غير معنوي لعيوشية الخلايا اللمفية وعيوشية خلايا متعددة اشكال النوى بعد المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر بتركيز 500 مكغم \مل مقارنة مع السيطرة الموجبة والسالبة وارتفاع بقية التجارب المناعية معامل البلعمة والتشكل الزهري التائي الكلي والفعال ومعامل انقسام خلايا نخاع العظم وبينت الدراسة الحالية امكانية استخدام الشاي الاخضر كعلاج لتحفيز كل من المناعة الطبيعية والمكتسبة ضد الخمج بداء الزحار الاميبي في الارانب البيض.

الكلمات المفتاحية:
الشاي الأخضر، الحالة المناعية، الارانب، الاميبا.
للمراسلة:
عهود مزاحم شاكر
كلية العلوم التطبيقية – جامعة سامراء– **العراق**
الاستلام: 24/ 11 / 2016
القبول: 11 / 4 / 2017

Green Tea Effect on Immunity State of Lab Rabbits afflicated with *Entamoeba histolytica* Parasite

Ouhood Mozahim Shakir and Shahad M.Mahmood
College of Applied Science- University of Samarra- Iraq

ABSTRACT

This study includes the alcoholic extract effect of the green tea *Camellia sinensis* on newzealand white male rabbits infected with *Entamoeba histolytica* that causes Amoebic dysentery disease ,by depending on several criteria including the study of variation occurring to phagocyte coefficient and PMNs cells nourishment ,lymphatic cells,thorough active T-rosette conformation ,and bone marrow cells fission coefficient .The current study results showed insignificant decrease for nourishment of lymphatic cells and nourishment of multi-form nuclei after being treated by green tea extract 500mk\ml in comparison whith positive and negative control ,and increase in the rest of immunity experiments for phagocyte coefficient,thorough active T-rosette conformation,and bone marrow cells fission coefficient it is shown the current study showed ,that the potentiality of using green tea as adrug to stimulate both natural and acquired immunity aginst putrefication by amoebic dysentery disease in white rabbits.

Key words:
Green tea, immunity state, Lab. Rabbits, *Entamoeba histolytica*

Corresponding Author:
Ouhood M. Shakir
College of Applied Science- University of Samarra- **IRAQ**

Received: 24/11/2016
Accepted: 11/4/2017

المقدمة:

يعد طفيلي اميبا النسيج *Entamoeba histolytica* من الطفيليات المهمة الشائعة الانتشار في العالم ويسبب للإنسان داء الاميبا Amoebiasis ويقدر عدد المصابين به في جميع انحاء العالم بـ 480 مليون اصابة ويتسبب في وفاة (40 – 110الف) حالة سنويا (Tan واخرون، 2010) ويحتل داء الاميبا المرتبة الثالثة بعد الملاريا Malaria والبلهارزيا Bilhariasis في حالات الوفاه (Samie واخرون، 2012) يستوطن الطفيلي الامعاء الغليظة ولاسيما منطقة الاعور Cecum ونهايات الامعاء الدقيقة مسببا اعراض مرضية symptomatic amoebiasis ويمكن ان تنتقل الاصابة إلى شخص اخر عن طريق الماء والطعام الملوث ببراز الاشخاص المصابين الحاوي على الطور المتكيس المعدي للطفيلي Ralston و Petri (2011). تعتبر النباتات احد اهم

المصادر للعديد من العقاقير الطبية ونبات الشاي الاخضر واحد من اهم النباتات الطبية التي تستخدم في علاج العديد من الحالات المرضية مثل أمراض القلب والشرايين وبعض أنواع السرطان، وتعزيز صحة الفم، والحد من ارتفاع ضغط الدم، ويساعد في السيطرة على وزن الجسم، ويمتلك خصائص مضادة للجراثيم والفيروسات، ويقدم حماية ضد الأشعة فوق البنفسجية ، وزيادة كثافة المعادن في العظام Cabrera (2006),.بسبب احتوائها على المواد الفعالة مثل الفلافونول الذي يقوي المناعه والكافئين الذي يقوي القلب ويعزز الجهاز العصبي المركزي ومواد اخرى اساسيه تعمل كمضادات اكسده مثل الكاروتين والمغنسيوم والبوليفينولات والسليوم Kishi واخرون (2010) وبما ان استراتيجية العلاج التقليدي في علاج داء الزحار الاميبي المتمثلة باستخدام الادوية التي لها اضرار جانبية، وبتواصل تقدم البحوث والدراسات بشكل واسع فقد تم دراسة استخدام المعدلات المناعية Immunomodulation في تعديل الاستجابة المناعية ضد الطفيلي عن طريق تثبيط أو تحفيز خلايا معينه في الجهاز المناعي الخلوي بوصفها احدى الوسائل العلاجية أو لغرض انتاج الكلوبيولينات المناعية المعروفة، ومن اجل الكشف عن السبل الكفيلة والمفيدة في السيطرة على الطفيلي عن طريق تحفيز أو تعديل الاستجابة المناعية للمضيف لغرض الحماية من الاصابة بداء الزحار الاميبي كان الهدف من هذا البحث دراسة تأثير مستخلص الشاي الاخضر على الاستجابة المناعية في الارانب المختبرية النيوزلندية ضد الخمج المنفعل بداء الزحار الاميبي اذ وجد وبعد الاطلاع على ما نشر من البحوث العلمية السابقة انه لم يسبق استخدامه كمحاولة لتحديد تأثيره بوصفه محفزًا أو منشطًا لمناعة المضيف ضد هذا المرض.

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات النباتية:

جلبت كمية من الشاي الاخضر من الاسواق المحلية في سامراء بشكل مسحوق من الاوراق المجففة المحفوظة داخل كيس مغلف، وزن 1 كغم، وهذا النوع من الشاي الاخضر صيني المنشأ، وتمت تعبئته في سوريا – دمشق، الاسم العلمي الحالي للشاي الاخضر هو *Camellia sinensis* ، إذ صنف هذا النبات الأستاذ الدكتور علي حسين الموسوي ، قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد.

الاستخلاص الكحولي للشاي الاخضر Alcoholic extract

حُضر المستخلص على وفق ما ورد في (Swamy،2000) وذلك بنقع 50غم من مسحوق الشاي الاخضر في 500مل من الميثانول 99 % لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة ، وبعد أن رُشح المزيج بالشاش ، تم ترشيح الراشح بأوراق ترشيح نوع واتمان رقم 1 ، وركز المستخلص بوساطة جهاز المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator لحين الحصول على سائل كثيف، بعدها وضع في الحاضنة بدرجة 37 م° لمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص، ثم وضع في أنبوبة محكمة الغلق ومغلفة بورق الالمنيوم وذلك منعا وصول الضوء للعينه لأنها تتأكسد بوجود الضوء ، وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

عينات الطفيلي:

تم الحصول على عينات طفيلي *E. histolytica* من المراجعين والراقدين في مستشفى سامراء العام والذين يعانون من اسهال شديد الى متوسط وفي معظم الحالات يعانون من اسهال دموي، خلال شهر اب لعام 2016 وشخصت العينات بالطريقة المتبعة من قبل Singh واخرون(2009)، وتم عزل الطفيلي حسب طريقه Clarkو Diamond (2002) وقد تم حساب عدد الاكياس وتحديد جرعه الحقن، حيث تم تحديد جرعة الحقن عن طريق حساب عدد الاكياس في كمية (0.1) مل وحددت الجرعة بمقدار 4×10^3 كيس جرعة اصابة لكل ارنب يتم تجريعه فمويا(تم حساب عدد الاكياس بواسطه slide chamber وطريقه الحساب مشابهه لحساب كريات الدم البيض wbc)، واستخدمت ذكور الارانب بعد تحديد جرعة الحقن، ثم تم تجريع الارانب بأكياس الطفيلي عن طريق الفم وتم التحري عن اكياس الطفيلي في غائط الارانب المصابة يومياً ولمدة اسبوعين بعد الخمج للتأكد من حدوث الاصابة بالطفيلي وتم التأكد من حدوث الخمج عن طريق تحضير عدة مسحات من براز الارانب المصابة على شريحة

زجاجية وفحصـــها تحت المجهر ومشـــاهدة الطفيلي واطواره المختلفة وتم اســـتخدام طرق مختلفة لتشـــخيص الطفيلي المفحص باستخدام صبغة لوكل ايودين local iodin وطريقة التطويف بالمحلول السكري Singh واخرون (2009)

تحضير محاليل الاختبارات المناعيه

محلول دارئ الفوسفات الملحيPBS :

حضر حسب طريقه FDA (2001) بإذابة المواد الاتية في لتر من الماء المقطر

المادة	الوزن (غم)
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4	0.144
فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na2HPO4	0.795
كلوريد الصوديوم NaCl	9

وبعد ان ضبط الاس الهيدروجيني إلى 7.2 وضع في قنينة محكمة الغلق وعقم بالمؤصدة نفس طريقه تعقيم الوسط الزرعي وحفظ في الثلاجة بدرجة (4) م° لحين الاستعمال

محلول واطئ التوتر Hypotonic Solution

حضـــر المحلول بإذابة 5.75 غم من كلوريد البوتاســـيوم (KCl) في 500 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 1000 مل وعقم بالمؤصدة وحفظ في الثلاجة (4) م لحين الاستعمال(خلف ،2008)

محلول الكولجسين Colchicine Solution

حضر محلول الكولجسين قبل الاستعمال مباشرة وذلك بإذابة واحد غم (كل حبة 1 غم) من عقار الكولجسين في 1 مل من محلول دارئ الفوسـفات الملحي PBS وحضـر المحلول بعيداً عن الضـوء وحقن كل حيوان بكل الكمية المحضـرة في غشـاء الخلب (خلف ،2008)

محلول التثبيت Fixative solution

حضر محلول التثبيت انياً (قبل الاستخدام بنصف ساعة) بمزج مادتي الكحول المثيلي المطلق Absolute Methanol (CH3OH) وحامض الخليك الثلجي Glacial Acetic acid (CH3CooH) وبنسب حجمة 3 : 1 واستخدام المحلول بارداً بعد ان تم حفظه في الثلاجة (4 م°) (خلف ،2008)

محلول السفير Alsevr's Solution pH = 6.1

تم تحضـير المحلول حسـب طريقه lewis واخرون (2001) وذلك بإذابة المواد ادناه في 100 مل من الماء المقطر: كلوريد الصـوديوم NaCl 0.42 غم \\–سـترات الصـوديوم Sodium citrate 0.8 غم –دكسـتروز Dextrose 2.05 غم بعد تمام ذوبان جميع المواد ضبط الاس الهيدروجيني للمحلول إلى 6.1 باستعمال 10 % من محلول حامض الستريك Citric acid ثم عقم المحلول بالمؤصـدة وحفظ بعد تعقيمة في درجة حرارة (4) م° لحين الاسـتعمال . اسـتعمل المحلول للمحافظة على كريات الدم الحمر للخروف من التحلل Hemolysis فهو يستعمل بنسبة 1 : 1 لمدة اسبوع

المحلول الملحي الوظيفي Physiological Saline Solution

حضر بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم في لتر واحد من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة استعمل المحلول لإجراء التخافيف وغسل الخلايا وحفظ بالثلاجة (4) م° FDA (2001)

تحضير عالق خلايا الدم الحمر للخروف Sheep Red Blood Cells (SRBCs)

سحب الدم من الوريد العنقي للخروف ووضع في انابيب معتمة تحوي الهيبارين (500) وحدة عالمية / مل مع محلول السفير بنسبة (1:1) تم حفظ المزيج بحرارة (4) م° فترة الحفظ اسبوع(الخفاجي ،2006)

الحيوانات المختبرية:

استعملت في هذه الدراسة ذكور الارانب النيوزلندية البيضاء والتي تم الحصول عليها من المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية وتراوحت اوزان الحيوانات المستعملة من (1000 – 1800) غم بينما تراوحت اعمارها من (10 – 18 شهر) وغذيت الحيوانات بالعليقة الجاهزة واعطيت الماء والغذاء على نحو مستمر طوال مدة الدراسة .

تصميم التجربة :

تم استخدام (30) من ذكور الارانب بعد التأكد من سلامتها من الامراض الظاهرية، و تم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع رئيسية وكل مجموعة تضم (10) ارنبا،

مجموعة الطفيلي(مجموعة السيطرة الموجبة) : تم تجريع (10) ارنب بطفيلي *E. histolytica* بجرعة فموية مقدارها 4×10^3 من اكياس Cyst الطفيلي، وقد تم فحص براز الحيوانات يومياً للتأكد من حدوث الخمج وبعد اسبوعين من الاصابة تم سحب الدم واجراء الفحوصات المناعية.

المجموعة المعالجة بالشاي الاخضر : تم تجريع (10) ارنب بطفيلي *E. histolytica* بجرعة فموية مقدارها 4×10^3 من اكياس Cyst الطفيلي، وقد تم فحص براز الحيوانات يومياً للتأكد من حدوث الخمج وبعد اسبوعين من الاصابة تم معالجتها بالشاي الاخضر بتراكيز 500 مكغم\مل لمده اسبوع وبعدها تم سحب الدم واجراء الفحوصات المناعية

مجموعة السيطرة السالبة: تم تجريع (10) بمحلول الملحي الفسيولوجي لمده اسبوعين وبعدها تم سحب الدم لا جراء الفحوصات المناعية

المعايير المستخدمة في الدراسة:

1- تأثير مستخلص الشاي الاخضر على عيوشية الخلايا اللمفية وعيوشية متعددة اشكال النوى: حيث تم عزل خلايا (PMNs) تبعاً لطريقه Cech وLahrer (1984) وعزلت الخلايا اللمفاوية وفقاً لما جاء في Boyum (1968) وحساب عيوشيتها اعتمادا على طريقة Nonoyama واخرون (1979)

2- تأثيره على عمليه البلعمة في الزجاج وفق طريقة(1984,Cech and Lahrer) .

3- تأثيره على التشكل الزهري التائي الفعال والكلي اعتمادا على طريقه (1984,Cech and Lahrer)

4- تأثيره على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في الارانب وفق طريقة (Allen واخرون، 1977)

5- التحليل الاحصائي

النتائج والمناقشة:

تأثير مستخلص الشاي الاخضر على عيوشية خلايا متعددة اشكال النوى (PMNs) والخلايا اللمفية:

اوضح الجدول (1) ان النسبة المئوية لعيوشية الخلايا PMNs لمجموعة الحيوانات المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر انخفضت قليلا ولكن غير معنوي بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة حيث كانت بعد المعالجة (89.7%) مقارنه بالسيطرة السالبة التي بلغت (94.5%) أما بالنسبة لعيوشية الخلايا اللمفية لمجموعة المستخلص الشاي الاخضر (جدول2) فقد انخفضت معنويا بمستوى ($P < 0.05$) بعد العلاج مقارنة مع السيطرة السالبة والموجبة حيث بلغت (84%) مقارنه بالسيطرة السالبة التي كانت (92.6%) وتدل هذه النتائج على ان المستخلص هو امن للاستخدام لكونها لم تقتل الخلايا PMNs والخلايا اللمفية او تقلل من نشاطها ويعتبر الشاي الأخضر من مضادات الالتهاب حيث يمنع موت الخلايا المبرمج للخلايا العدلة وينشطها بسبب احتوائه على ماده ابيكالوكاتشين كاليتEpigallocatehin – 3- gallate – (-) (EGCG) التي تعود الى الفلافونيدات (kim- park *et al*.,2015)(Dona *et al*.,2003) وتحفز هذه المادة انترولكين 6 وانترفيرون كاما (wen *etal*.,2014)

جدول (1) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs) للحيوانات المختبرية المعامله بالشاي الاخضر

المجموعة	(عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
positive control	6.67 ± 91.22	a
Negative control	*2.18 ± 94.58*	a
بعد العلاج	*3.19 ± 89.70*	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول(2) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفية للحيوانات المختبرية المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر

المجموعة	عيوشية الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
positive control	1.75 ± 94.28	a
Negative control	*2.76 ± 92.62*	a
بعد العلاج	*5.88 ± 84.04*	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير مستخلص الشاي الاخضر على عملية البلعمة في الزجاج:

اظهرت نتائج الدراسة حدوث ارتفاعاً معنوياً بمستوى معنوية ($P < 0.05$) في معدلات معامل البلعمة لمجموعه الحيوانات (الارانب) المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة والموجبة. حيث بلغت (63.7%) مقارنة بالسيطرة السالبة (57.7%) وتدل نتائج هذه الدراسة إلى ان المستخلص حفز فاعلية البلاعم على التهام الطفيلي ولهذه العملية اهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعد عملية قتل الطفيليات عن طريق الخلايا البلعمية خطوة اساسية بوصفها خط دفاعي اولي غير متخصص ضد المسببات المرضية (Moonah واخرون، 2013) وجاءت هذه النتائج متوافقة مع هادي واخرون (2013) حيث ارتفع معامل البلعمة عند استخدام نبات الحبه السوداء ضد طفيلي *E.histolytica*

جدول(3) النسبة المئوية للفعالية البلعمية للحيوانات المختبرية المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر

المجموعة	معامل البلعمة (PI)% المعدل ± الانحراف المعياري M ± S . D	قيمة P
positive control	*11.50 ± 33.10*	b
Negative control	*5.83 ± 57.70*	a
بعد العلاج	*9.16 ± 63.72*	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير مستخلص الشاي الاخضر على التشكل الزهري التائي:

يعد فحص التشكل الزهري من التقنيات البسيطة التي تستخدم لدراسة الاستجابة المناعية الخلوية من خلال التحري عن عدد الخلايا التائية النشطة اذ يكون العلاقة خطية بين عدد الزهرات المتكونة للخلايا التائية النشطة وبين العدد الكلي للخلايا التائية (Weir, 1973) ويحدث التشكل الزهري من خلال ارتباط المستقبل CD_2 للخلايا اللمفية (بروتين سكري سطحي) يبلغ وزنه الجزيئي (50 – 58) KD الذي يظهر في بداية تطور الخلايا التوتية وكذلك يوجد في جميع الخلايا التائية الناضجة مع المركب الترابطي (Ligand) Lymphocyte Function - associated antigen – 3 (Lfa-3) الموجود على سطوح كريات الدم الحمر للخروف (Roitt واخرون،2001) وان الخلية اللمفية التي ترتبط بثلاث كريات دم حمر للخروف فأكثر تعد خلية ذات تشكل زهري و يوضح الجدول (4) وجود فروق معنوية بين الحيوانات المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر مقارنة بالسيطرة السالبة والموجبة حيث ارتفعت نسبة التشكل الزهري الفعال لمجموعة الشاي الاخضر بنسبة (82%) مقارنه بالسيطرة السالبة (72.4%) اما التشكل الزهري الكلي فارتفع لمجموعة العلاج بنسبة (83.2%) مقارنة بالسيطرة السالبة (76.2%) ويعتبر الشاي الاخضر من مضادات الأكسدة المهمة لاحتوائه العديد من المركبات الفعالة ومن اهمها الفلافونيدات المتضمنة ابيكالوكاتشين كاليت (EGCG) (-) – Epigallocatehin – 3- gallate حيث تعمل هذه المادة على تحفيز الخلايا اللمفاوية البائية B cell (Hassanain *etal.*,2010) وكذلك ماده ابيكاتشين كاليت (ECG) (-) – Epicatechin – 3- gallate ابيكالوكاتشين – (-) (EGC) Epigallocatechin و ابيكاتشين Epicatechin (EC)حيث تحفز الخلايا التائية (Li *et al*,2000) (Forester & Lambert,2011) وقد وجد (Kuo *et al*,2014) ان الشاي الاخضر يحفز انتاج الخلايا اللمفية في الفئران ويزيد من CD4,CD25

جدول (4) النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي الفعال والكلي للحيوانات المختبرية المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر

المجموعة	الشكل الزهري الفعال %	قيمة P	الشكل الزهري الكلي %	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M		المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	
positive control	9.19 ± 49.2	c	9.52 ± 56.2	c
Negative control	*5.83 ± 72.48*	b	*5.62 ± 76.22*	b
بعد العلاج	*5.56 ± 82.02*	a	*5.26 ± 83.20*	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p > 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير مستخلص الشاي الاخضر على معامل الانقسام الخيطي لنخاع العظم:

يبين الجدول (5) وجود زيادة معنوية بمستوى($p > 0.05$) في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في مجاميع الحيوانات المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر مقارنة مع السيطرة الموجبة والسالبة حيث ارتفعت مجموعه العلاج الى (56.1%) مقارنه بالسيطرة السالبة (52.8%) هذا يدل ان المستخلص الكحولي للشاي الاخضر كان له تأثير محفز على انقسام خلايا نخاع العظم حيث ان هذا المستخلص اثر على الخلايا السدوية (Stromal cells) الموجودة في نقي العظم من خلال تحفيزها، لاطلاقه عدد من الوسائط الخلوية الضرورية، لانقسام، وتمايز الخلايا الجذعية (Stem cells) الى الأنواع المختلفة من خلايا الدم (Knupp واخرون، 1988)

جدول (5) النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم للحيوانات المختبرية المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر

المجموعة	معامل الانقسام الخيطي%(Mitotic index MI)	قيمةP
	الانحراف المعياري±المعدل S . D ± M	
positive control	2.88 ± 28.50	b
Negative control	*6.74 ± 52.86*	a
بعد العلاج	*3.85 ± 56.10*	a

المصادر :

الخفاجي، سيناء مهدي شاكر (2006). دراسة عن كبسوله بكتريا *Acinetobacter baumanni* وتأثيرها على الاستجابة المناعية. أطروحة دكتوراه، كليه العلوم، الجامعة المستنصرية .

خلف، عمر رحيم (2008). دراسة بعض المؤشرات الوراثية الخلوية لتأثير مادة الكلوروفورم على الفار الابيض. رساله ماجستير، كليه العلوم، جامعه تكريت، **العراق.**

هادي، ناديه احمد وعلي مانع حسين وفاطمه عزيز مهدي(2013).تأثير المستخلص المائي لبذور الحبة السوداء في بعض المعايير الفسلجية والمناعيه والتغيرات النسيجية لذكور الفئران المختبرية المصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica*

Allen , J . W . ; Shuller , C . F . ; Mendes , R . W . ; and Lah , S . A .(1977). Asimplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchange using 5 - bromodeoxy - uridine tablets . Cytogent . cell . Genet . 18 : 231 – 237

Boyum , A . (1968) . Isolation on mononuclear cells and granulocytes from human blood . Scand . J . Clin . Lab . Invest . 21 : 77 – 89.

Cabrera, C.; Artacho, R. and Giménez. (2006). Beneficial effects of green tea: a review. *J. Am. Coll. Nut.* 25(2):79-99.

Cech , P . and . Lahrer , R . I . (1984) . Heterogenicity of Human Neutrophil Phagolysosomes : Functional Consequences for Candidacidal Activity , Blood , 64 : 147-151

Clark , C . G and Diamond , L . S . (2002) . Methods of Cultivation of huminal parasitic protists of Clinical importance . Clin . Microbiol . Rev . , 15 (2) : 329 – 341.

Dona, M.;Dell'Aica, I.; Calabrese, F.; Benelli ,R.; Morini ,M.;Albini ,A.; Garbisa S.(2003). Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. J Immunol.;170:4335–4341.

FDA/Food&Drug Adminstration. (2001). Bacteriological analytical manual online . http://www.food and drug administration.com.

Forester,S.C & LAMBERT,J.D.(2011). Antioxidant effects of green tea Mol Nutr Food Res.; 55(6): 844–854.

Hassanain,E.; Silverberg, J.I.; Norowitz, K.B.; Chice, S.; Bluth, M.H.; Brody, N.; Joks, R.; Durkin H.G.; Smith-Norowitz, T.A.(2010) .Green tea (Camelia sinensis) suppresses B cell production of IgE without inducing apoptosis. Ann Clin Lab Sci40(2):135-43.

Kishi, Y. and Matsuoka, M. (2010). Cryst. Growth Des., 10, 2916–2920 .

Kim-Park ,W.K.; Allam ,E.S.; Palasuk, J.; Kowolik, M.; Park, K.K.; Windsor, L.J.(2015). Green tea catechin inhibits the activity and neutrophil release of Matrix Metalloproteinase-9. J. Tradit Complement Med. 2015 Apr 29;6(4):343-346.

Knupp,C.;Pekala,I.H.and Cornelius,P.(1988). Extrensive bone marrow necrosis in patients with cancer and tumor necrosis factor activity in plasma.Am. J.Hematol .,29:20-25

Kuo,C.L.;Chen,T.S.; Liou ,S.Y.; Hsieh ,C.C.(2014). Immunomodulatory effects of EGCG fraction of green tea extract in innate and adaptive immunity via T regulatory cells in murine model mmunopharmacol Immunotoxicol.;36(5):364-70.

Lewis, S.M.; Bain, B.J. and Bates, I. (2001). Dacie and Lewis . Practical ematology. 9th ed. Churchill Livingstone. London.

Li, H.C.; Yashiki, S.; Sonoda, J.; Lou ,H.; Ghosh, S.K.; Byrnes, J.J.; Lema, C.; Fujiyoshi, T.; Karasuyama, M.; Sonoda ,S.(2000). Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. Jpn J Cancer Res.;91:34–40

Moonah ,S.N.; Jiang, N.M.; Petri ,W.A.(2013). Host immune response to intestinal amebiasis. PLoS Pathog. 9:e1003489. 10.1371/journal.ppat.1003489 .

Nonoyama , S . ; Kojo , H . ; Mine , Y . Nishida , M . ; Goto , S . and Kuwahara , S . (1979) . Inhibitory effect of *pseudomonas aeruginosa* on the pheagocytic and killing of Rabbit polymorphonuclear leukocytes : Mechanism of action of a Polymorphonuclear leukocytes inhibitor , Infect . Immun . 24 : 399 – 403**.**

Ralston, K. S. and W.A. Petri.(2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. Trends in parasitology.27(6):253-262.

Roitt, I.; Brostoff. J.; and Male, D.(2001). Immunology. 6th ed . Harcourt publisher limited. Mosby. London

Samie , A; ElBakri , A. and AbuOdeh , R. (2012). Amoebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis. Current Topics in Tropical Medicine, Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed.), In. Tech. China.: 201- 226.

Singh, A .; Ericttouft, B.H. and William, A.C. (2009). Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa .J. Infect. Dis.,61(3): 280-286.

Swamy, S.M. (2000). Cytogenetic and Immunopotential effect of ethanolic extract of *Nigella sativa* seed .J. Ethanopharma 70(1):1-7**.**

Tan, Z.N.;Wong, W.K.;Nik Zairi, Z.; Abdullah, B.; Rahmah, N.; Zeehaida, M.; Rumaizi, S.; Lalitha, P.; Tan, G.C.; Olivos-Garcia, A.and Lim , B.H.(2010). Identification of *Entamoeba histolytica* trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. Tropical Biomedicine .27(1): 79–88.

Weir , D.M. (1973). Handbook of Experimental Immunology Vol. 2: Cellular l. pp : 2712-2718. Black well Scientific Publication. Oxford.

Wen ,W.C.; Kuo, P.J.; Chiang, C.Y.; Chin ,Y.T.; Fu, M.M.; Fu, E.(2014). Epigallocatechin-3-gallate attenuates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-enhanced matrix etalloproteinase-1 production through inhibition of interleukin-6 in gingival fibroblasts J Periodontol.;85(6):868-75.