



جامعة الموصل
كلية التربية للنبات
قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية كيموحيوية لنبات العرن المثقوب *Hypericum perforatum L.* وتأثير مستخلصه على الإصابة بطفيل *Cryptosporidium sp.*

دانيه عبدالإله شهاب أحمد

رسالة ماجستير

في علوم الحياة

بإشراف

أستاذ مساعد

د. فراس محمد بشير الخشاب

أستاذ مساعد

د. جهان يحيى الحاتم

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية تقييم جزيئي وكيموحيوي لنبات العرن المثقوب *Hypericum perforatum* L. النامي في محافظة نينوى، لتأكيد الهوية الوراثية للنبات والكشف عن مكوناته الفعالة، والتحقق من تأثير مستخلصاته النباتية على الإصابة التجريبية بطفيلي *Cryptosporidium* sp.

تضمن الجانب الجزيئي دراسة المؤشر الوراثي للنموذج النباتي المدروس باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، إذ تم تضخيم مقاطع من الجين 5.8S rRNA gene الموجود في DNA النبات، ثم تحليلها بواسطة الترحيل الكهربائي، ثم تمت دراسة التتابع الجيني لدنا النبات المعزول من ناحية زمار التابعة لمحافظة نينوى، وقد أظهرت نتائج تسلسل القواعد النتروجينية تطابقاً عالياً مع سلالات عالمية ضمن قاعدة البيانات المثبتة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية Gen Bank Graphics، ودخل النوع *Hypericum perforatum* تحت رقم انضمام ON:685357.1 ، إذ بلغت نسبة التطابق 100% مع العزلة العالمية البرتغالية المودعة في بنك الجينات، وتم تسجيل 3 سلالات للنبات باسم الباحثين في بنك الجينات العالمي.

تضمن الجانب الكيميائي تقدير وتشخيص عدد من المركبات الفعالة في المستخلص الخام باستعمال تقنية كروماتوغرافية السائل عالي الاداء HPLC، وقد تبين وجود ما يقارب سبعة عشر مركباً، اثني عشر مركباً هي مركبات فينولية وفلافونويدية بتركيز مختلفة P-coumaric acid /Iso qurcetine /Vanillic acid Caffeic /acid/Ferulic acid /Chlorogenic acid Catechine /Rutin /Kaempferol /Luteolin /Qurcetine //Hydrobenzoic acid ، وأربع مركبات أحماض دهنية بتركيز مختلفة /Palmatic acid /Isovaleric acid /Stearic acid /Mysitric acid، فضلاً عن المركب النشط الفعال (الهايبرفورين).

تم تحضير ثلاثة أنواع من المستخلصات النباتية: المستخلص الإيثانولي والمستخلص المائي، فضلاً عن المستخلص النانوي باستعمال جسيمات أكسيد الحديد النانوية Fe_3O_2 NPs بطريقة Green Synthesis ، وقد تم توصيف المستخلص النانوي باستعمال تقنية حيود الأشعة السينية XRD X-ray Diffraction وتقنية المجهر الالكتروني الماسح (FE-SEM)

Emission Scanning Electron Microscope، إذ أظهرت النتائج أن الجسيمات النانوية لها بنية نانوية متجانسة واضحة في حجمها وشكلها تدعم الفعالية البيولوجية.

واختبرت الفعالية العلاجية للمستخلصات الإيثانولية والمائية والنانوية على فئران مصابة تجريبياً بطفيلي *Cryptosporidium sp.*، باستعمال ثلاثة تراكيز مختلفة (10، 20، 30) ملغم/مل لكل من المستخلصات النباتية، وأظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في عدد الأكياس البيضوية Oocysts المطروحة في البراز لدى مجموعات المعالجة، وكان تركيز 30 ملغم/مل هو الأكثر فعالية في أنواع المستخلصات كافة بعد مرور 5 أيام من المعالجة، وكشفت الفحوصات النسيجية للأمعاء الدقيقة عن تحسن ملحوظ في البنية النسيجية لدى الفئران المعالجة، مما يؤكد الأثر العلاجي للمستخلصات ولاسيما المستخلص النانوي. كما هدفت الدراسة الى تشخيص الإصابة بالطفيلي لدى الأطفال ما دون سن الخامسة لمستشفى السلام والمستشفى العام في مدينة الموصل/ محافظة نينوى، من خلال جمع وفحص 150 عينة براز من المصابين بحالات إسهال مستمر خلال المدة من بداية شهر آب 2024 إلى شهر شباط 2025، واستعملت طريقة (صبغة الزيل نلسون المعدلة) وطريقة التطويف بالمحلول السكري المشبع لعزل أكياس بيض الطفيلي وتنقيتها. إذ أظهرت النتائج التشخيصية التي تمت مشاهدتها تحت المجهر الضوئي أن صبغة الزيل نلسون تُعد طريقة فعالة وموثوقة للكشف عن الطفيلي.

وتُشير النتائج إلى أن مستخلصات نبات *Hypericum perforatum* تُعد واعدة بوصفها مضادات حيوية طبيعية ضد إصابة الطفيلي المعوي *Cryptosporidium sp.*

Abstract

The present study involved a molecular and biochemical evaluation of the wild St. John's Wort plant (*Hypericum perforatum* L.) growing in Nineveh Province, Iraq, to confirm its genetic identity, identify its active constituents, and investigate the therapeutic effect of its extracts on experimental infection with *Cryptosporidium* sp.

The molecular aspect involved genetic marker analysis of the studied plant using Specific PCR technique. DNA fragments were amplified and analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pair ITS1 and ITS4. The nucleotide sequencing results showed a high degree of similarity with international isolates listed in the GenBank database (NCBI), with the accession number ON:685357.1, showing 100% identity with the reference global isolate.

The chemical analysis involved the identification and quantification was conducted using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Approximately seventeen compounds were detected, including twelve phenolic and flavonoid compounds at varying concentrations such as p-coumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, vanillic acid, isoquercetin, hydroxybenzoic acid, quercetin, luteolin, kaempferol, rutin, and catechin. Additionally, four fatty acids—namely isovaleric acid, palmitic acid, myristic acid, and stearic acid—were identified, along with the bioactive compound hyperforin.

Three types of plant extracts were prepared: ethanolic, aqueous, and a nano-formulation using green-synthesized iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄ NPs). The nano-extract was characterized using X-ray diffraction (XRD) and Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), confirming a uniform nanostructure with defined size and shape supporting its biological activity.

To evaluate the therapeutic efficacy, these extracts were tested on laboratory mice experimentally infected with *Cryptosporidium* sp. The study also aimed to diagnose *Cryptosporidium* infection in children under five years of age from Al-Salam Hospital and the General Hospital in Mosul, Nineveh Province. A total of 130 stool samples were collected from patients suffering from persistent diarrhea between August 2024 and February 2025. Modified Ziehl-Neelsen staining and the sugar flotation technique were used for oocyst isolation and purification. Microscopic examination confirmed that the Ziehl-Neelsen stain provided a reliable diagnostic method for infection detection.

Three different concentrations (10, 20, and 30 mg/mL) of each plant extract were tested. Results showed a significant reduction in oocyst shedding in feces across the treated groups, with the 30 mg/mL concentration showing the highest efficacy after 5 days of treatment for all extract types. Histopathological examination of the small intestine revealed notable improvements in tissue architecture among treated mice, particularly those given the nano-extract.

These findings suggest that *Hypericum perforatum* extracts represent a promising natural antimicrobial alternative against intestinal *Cryptosporidium* sp. infection, supported by molecular and chemical analyses.

University of Mosul

College of Education for Girls



Molecular Biochemical study of *Hypericum perforatum L.* and the effect of its extract on Infection with *Cryptosporidium sp.*

A Thesis submitted

By

Daniah Abdullellah Shihab Ahmad

M. Sc. Thesis

Biology

Supervised By

**Assist Prof. Dr.
Dr. Jehan Yehya Al-Hatem**

**Assist Prof. Dr.
Dr. Firas Mohamed Bashir Al-Khashab**