بررسی آزمایشگاهی اثر کشندگی عصاره آبی و الکلی درمنه ترکی بر کیست ژیاردیا لامبلیا

محمدرضا رضائی منش[1]، شهناز شیربازو[2]، نائمه پور یعقوب[3]

نویسنده مسؤول: ۱- مربی،عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه،تربت حیدریه،ایران
آدرس: تربت حیدریه، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه،مرکز مطالعات پزشکی
تلفن:۰۵۳۱-۲۲۴۲۰۳۸
نمابر:۰۵۳۱-۲۲۴۲۰۳۸
پست الکترونیک:
rezaimanesh@gmail.com
۲- استادیار انگل شناسی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۳- دانشجوی مامایی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی بقیه الله (عج)

چکیده

زمینه و هدف: ژیاردیا لامبلیا، تک یاخته عامل بیماری ژیاردیازیس، یکی از شایعترین عوامل ایجاد اسهال در سرتاسر دنیا و بخصوص در ایران می باشد. درمنه ترکی از گیاهان دارویی بوده که در طب سنتی بعنوان ضد انگل از آن استفاده می شده است. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کشندگی عصاره آبی و الکلی درمنه ترکی بر کیست ژیاردیا لامبلیا در شرایط In-vitro می باشد.

روش بررسی: ۵۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۱، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره های آبی و الکلی بذر درمنه ترکی با ۵۰۰ میکرولیتر از کیست های تخلیص شده ژیاردیا لامبلیا مخلوط شده و در دماهای ۴، ۲۴و ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شد. درصد کشندگی عصاره ها ۱، ۲، ۳، ۴و ۵ ساعت پس از مواجهه بوسیله رنگ آمیزی با رنگ ائوزین۰/۱ درصد و شمارش میکروسکوپی کیست ها اندازه گیری شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه، تی تست مستقل و ضریب همبستگی اسپیرمن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیشترین درصد کشندگی عصاره الکلی درمنه ترکی در دمای ۳۷ درجه، در غلظت ۲۰mg/ml و در ساعت چهارم بمیزان ۱۰۰ درصد بود. در حالیکه بیشترین درصد کشندگی عصاره آبی درمنه ترکی در همین دما و غلظت و زمان ۶۶/۱ درصد بود. بین درصد کشندگی عصاره های آبی والکلی هر دو گیاه در همه غلظت ها، زمان ها و دماها تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۵$). اثر کشندگی عصاره های آب و الکلی بطور معنی داری با افزایش غلظت، زمان و دما افزایش یافت ($p<۰/۰۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: عصاره های الکلی و آبی بذر درمنه ترکی در شرایط In-vitro دارای اثر کشندگی بر کیست ژیاردیا لامبلیا می باشند. تاثیر کشندگی عصاره الکلی این گیاهان بیشتر از عصاره آبی آنها است.

کلیدواژه ها: درمنه ترکی؛ ژیاردیا لامبلیا؛ کیست؛ اثر کشندگی

فصلنامه علمی دانشکده علوم پزشکی تربت حیدریه، دوره اول، شماره۱، بهار۱۳۹۲

مقدمه

ژیاردیازیس عفونت روده ای است که بوسیله تک

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

یاخته ای تاژکدار بنام ژیاردیا لامبلیا[1] (ژیاردیا اینتستینالیس یا ژیاردیا دئودناله) ایجاد می شود. این بیماری جهانی بوده و در کشورهای دنیا از شیوع نسبتا بالایی برخوردار می باشد. ژیاردیا لامبلیا دارای انتشار جهانی بوده و با ۲۸۰ میلیون مورد در سال شایعترین انگل روده ای انسان در کشورهای توسعه یافته می باشد (۱). در کشورهای توسعه یافته این تک یاخته معمولا با طغیان های اسهال همراه می باشد، بطوریکه در آمریکا عامل بیشترین طغیانهای اسهال با منشاء آب آلوده، ژیاردیا لامبلیا است (۲).

در آسیا، افریقا و آمریکای لاتین در حدود ۲۰۰ میلیون نفر دارای ژیاردیازیس علامتدار می باشند و سالیانه در حدود ۵۰۰ هزار مورد جدید از این مناطق گزارش می گردد (۳). این تک یاخته در ایران جزء شایعترین تک یاخته های انگلی بوده و از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال بخصوص در کودکان دبستانی می باشد (۴). چرخه زندگی ژیاردیا لامبلیا دارای ۲ شکل تروفوزوئیت و کیست است. کیست ها شکل آلوده کننده انگل بوده و برای انسان بسیار عفونی می باشند بطوریکه در مطالعات تجربی، افراد داوطلب با مصرف حداقل ۱۰ کیست آلوده شده اند (۵). بعلت مقاومت کیست ها نسبت به کلرینه کردن آب، انتشار از طریق آب آسانتر بوده و بیماری عمدتا از طریق مصرف آب آلوده به انسان منتقل می گردد. این کیست ها می توانند در محیط تا ۳ ماه زنده بمانند (۶). انتقال فرد به فرد از طریق تماس مستقیم مدفوعی-دهانی بخصوص در اجتماعات متراکم مانند مهد کودک ها و در اعضای خانواده ها (۷)، انتقال از طریق غذای آلوده (۸)، و در کشورهای توسعه یافته در همجنس بازان (۹)، راه های دیگر انتقال بیماری می باشند. همچنین ژیاردیا لامبلیا بعنوان عامل اسهال طولانی مدت در مسافران نیز شناخته می شود (۱۰).

تظاهرات بالینی ژیاردیازیس متنوع می باشد. علائم بالینی ژیاردیازیس معمولاً ۳-۱ هفته پس از خوردن کیست ها شروع شده و مهمترین علامت بیماری اسهال می باشد که در ۹۰ درصد بیماران علامتدار مشاهده می شود. اسهال ممکن است حاد و خودمحدود شونده و یا مزمن و ناتوان کننده باشد. درد شکم، نفخ، سوء هاضمه، درد اپی گاستر، تهوع، استفراغ، مدفوع چرب از سایر علائم بیماری می باشند. در عفونت های مزمن سوء جذب مواد مغذی از قبیل چربی، لاکتوز، آهن، ویتامین A و B12، کاهش وزن و کاهش میزان رشد بخصوص در کودکان گزارش شده است (۱۲،۱۱).

طیف وسیعی از داروها از قبیل ترکیبات ۵-نیتروایمیدازول، کیناکرین،فورازولیدون،پارومومایسین، ترکیبات بنزیمیدازول و نیتازوکسانید برای درمان بیماری بکار می روند که در بین این داروها مترونیدازول داروی انتخابی درمان ژیاردیازیس می باشد. این داروها دارای اثرات جانبی ناخوشایندی از ایجاد قبیل ناراحتی گوارشی، تهوع، سردرد، لکوپنی و طعم نامطبوع در دهان می باشند. همچنین این داروها می توانند منجر به اثرات نوروتوکسیک، بیقراری، تشنج و سرگیجه شده و در روند درمان اختلال ایجاد نمایند. بعلاوه اثر جهش زایی، سرطان زایی و تاثیر سوء برخی از آنها بر جنین در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۱۵،۱۳). از سوی دیگر ژیاردیا لامبلیا در برابر این داروها مقاوم بوده و موارد مقاومت دارویی بیماران رو به افزایش است (۱۷،۱۶). بعلت اثرات جانبی زیاد و خطرناک داروهای ضد ژیاردیا و همچنین افزایش مقاومت انگل نسبت به درمان های دارویی رایج، جستجو برای پیدا کردن داروهای جدید، موثر و بی خطر برای درمان این بیماری ضروری است.

تنوع بسیار زیاد و وفور ترکیبات دارای خواص درمانی در گیاهان باعث شده از آنها بتوان بعنوان یک منبع مهم بمنظور جستجوی ترکیبات جدید دارویی و سنتز داروهای موثر استفاده نمود (۱۸).

از گیاه درمنه ترکی (Chenopodium botrys L.) در طب سنتی ایران به عنوان ضدانگل نام برده شده است. درمنه ترکی، گیاهی علفی از خانواده کاسنی است که

1- Giardia lambelia

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

پراکندگی وسیعی در ایران داشته و در طب قدیم به عنوان داروی ضد انگل مورد استفاده قرار می گرفته است (۱۹).

هدف از انجام این تحقیق بررسی آزمایشگاهی تأثیر درمنه ترکی در کشتن و از بین بردن کیست های ژیاردیا لامبلیا می باشد.

روش بررسی

جمع آوری نمونه و تخلیص کیست های ژیاردیا لامبلیا: نمونه های مدفوع آلوده به کیست ژیاردیا با مراجعه روزانه به آزمایشگاه مرکزی بیمارستان امام رضا (ع) و آزمایشگاه تشخیص طبی شفا واقع در شهرستان بیرجند جمع آوری شد. وجود کیست های فراوان ژیاردیا با تهیه گسترش مستقیم و آزمایش میکروسکوپی نمونه ها توسط میکروسکوپیست مجرب تایید گردید. بمنظور بدست آوردن حداکثر کیست زنده عمل جداسازی وتخلیص کیست ها در همان روز جمع آوری نمونه ها انجام گرفت. نمونه مدفوع با آب مقطر کاملا مخلوط شده و از گاز چهار لایه عبور داده شد تا ذرات درشت جداسازی شوند. محلول صاف شده در لوله آزمایش ریخته شد و بمدت ۵ دقیقه در g×۸۰۰ سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت تخلیه شده ورسوب مجددا با آب مقطر شستشو داده شد و بمدت ۵ دقیقه در g×۸۰۰ سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و بطور مساوی در چهار لوله بمیزان ۵ میلی لیتر تقسیم گردید. محتویات هریک از لوله ها با پیپت پاستور در لوله های سانتریفوژ ۱۵ میلی لیتری ته مخروطی، به آرامی بر روی ۳ میلی لیتر سوکروز ۰/۸۵ مولار سرد اضافه گردید، بطوریکه دو فاز کاملا مشخص تشکیل شد. لوله ها بمدت ۱۰ دقیقه در g× ۶۰۰ سانتریفوژ شدند که در نهایت ۴ لایه مشخص در آنها ایجاد گردید. لایه بین آب و سوکروز (حاوی تعداد زیادی کیست ژیاردیا) با دقت و حوصله با کمک پیپت پاستور جمع آوری گردید. در اغلب روش های تخلیص، در این مرحله بواسطه ورود باکتری ها، آلودگی باکتریال اجتناب ناپذیر می باشد. برای رفع این مشکل در تحقیق حاضر از روش Alvarado و همکاران استفاده گردید (۲۰). بدین صورت که لایه جمع آوری شده به نسبت ۲۰ برابر حجم خود با آب مقطر مخلوط شده و سپس با استفاده از سیستم وکیوم- فیلتریشن، توسط فیلتر ممبران استات سلولز پور سایز ۵ میکرون (Sartorius , Germany) صاف گردید. باکتری ها بدلیل اندازه کوچک از منافذ صافی رد شده و کیست های باقیمانده در سطح فیلتر با ۵ میلی لیتر آب مقطر شستشو داده شده و درون یک پتری دیش استریل جمع آوری شدند. مایع حاوی کیست به لوله های استریل منتقل شد. تعداد کیست ها به روش هموسایتومتری بوسیله لام نئوبار شمارش شده و تعداد آنها در واحد میلی لیتر محاسبه گردید.

تعداد کیست در ۱ میلی لیتر= میانگین تعداد کیست های شمارش شده در ۴ مربع مخصوص شمارش گلبول سفید × فاکتور رقت × 10^4.

مایع حاوی کیست تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تهیه و شناسایی گیاهان: بذر گیاه درمنه ترکی از روستاهای اطراف شهرستان بیرجند جمع آوری گردید و برای شناسایی به هرباریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ارسال گردید. درمنه ترکی توسط اساتید گروه زراعت با نام علمی .Chenopodium botrys L و مورد تایید قرار گرفت.

روش تهیه عصاره آبی درمنه: بمنظور استخراج عصاره آبی درمنه ترکی ۵۰۰ گرم از بذر این گیاه در سایه کاملا خشک شده و به کمک آسیاب برقی کاملا مخلوط و بصورت پودر درآمد. سپس ۵ لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و بمدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد تا کاملا مخلوط گردد. مخلوط حاصله از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. عصاره گیری در شرایط خلاء با استفاده از دستگاه فریز- درایر انجام شد. عصاره کاملا خشک توزین شده و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

روش تهیه عصاره الکلی درمنه: بمنظور تهیه عصاره الکلی درمنه ۶۵۰ گرم پودر خشک بذر گیاه را با ۱۰۰۰ میلی لیتر متانول الکل اتیلیک خالص

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

(Merck, Germany) مخلوط شده و بمدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد تا کاملا مخلوط شود. مخلوط حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد سپس برای تبخیر الکل مایع حاصله درون چند بشر تقسیم شده و در انکوباتور ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا الکل تبخیر شود. سپس مخلوط غلیظ حاصل درون چند پلیت تقسیم شد و در دمای اتاق قرار داده شد تا در معرض هوا در طی چند روز کاملا خشک شود. عصاره جامد حاصل توزین شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

روش اندازه گیری اثر کشندگی عصاره ها بر کیست های ژیاردیا لامبلیا: برای اندازه گیری اثر کشندگی عصاره ها از روش رنگ آمیزی حیاتی کیست ها با رنگ ائوزین ۰/۱٪ استفاده شد (۲۱). در این روش حجم مساوی از مخلوط عصاره وکیست ژیاردیا با رنگ ائوزین مخلوط شده و پس از ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی، در بررسی میکروسکوپی کیست های مرده قرمز رنگ شده، در حالیکه کیست های زنده رنگ را جذب نکرده و کاملا بیرنگ بنظر می رسند.

روش آزمایش تاثیر عصاره ها بر کیست ژیاردیا لامبلیا: رقت های ۱، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های آبی و الکلی درمنه به کمک آب مقطر تهیه گردید. سپس ۳ سری میکروتیوب آماده شده و در هر یک ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کیست (حاوی ۲۵۰۰۰ عدد کیست ژیاردیا لامبلیا) با ۵۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ها مخلوط گردید. سری اول میکروتیوب ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد (درون یخچال)، سری دوم در ۲۴ درجه سانتیگراد (دمای آزمایشگاه) و سری سوم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (درون انکوباتور) قرار داده شد. بعنوان شاهد در هر دما از میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کیست و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد.

سپس در زمان های ۱، ۲، ۳، ۴ و۵ ساعت، پس از چند بار آسپیره کردن با میکروپیپت، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب ها برداشته شده و با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ ائوزین ۰/۱٪ در میکروتیوب های ۰/۵ میلی لیتری مخلوط گردید. پس از رنگ آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله روی یک لام تمیز قرار داده شد و پس از گذاشتن لامل با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر بصورت تصادفی ۲۰۰ عدد کیست شمارش شده وتعداد کیست های مرده (رنگ گرفته) و کیست های زنده (رنگ نگرفته) تعیین گردید. برای دقت بیشتر نمونه گیری از هر میکروتیوب ۳ بار تکرار شده و میانگین شمارش ها محاسبه گردید. با استفاده از فرمول زیر درصد کشندگی عصاره ها محاسبه گردید:

میانگین تعداد کیست های زنده در گروه آزمون - میانگین تعداد کیست های زنده در گروه شاهد تقسیم بر میانگین تعداد کیست های زنده در گروه شاهد ضرب در ۱۰۰ برابر درصد کشندگی عصاره ها

روش تجزیه و تحلیل داده ها: بمنظور مقایسه میانگین در گروه های مختلف از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و تی تست مستقل و جهت بررسی رابطه متغیرها از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده گردید. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 14 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و برای رسم نمودارها از نرم افزار GraphPad Prism 5 استفاده شد. در تمامی موارد $p\leq ۰/۰۵$ بعنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

در هر دما درصد کشندگی بین عصاره های آبی و الکلی در غلظت ها و زمان های مختلف دارای تفاوت معنی داری بود ($p<۰/۰۰۵$). محلول شاهد (آب مقطر) تأثیر بسیار اندکی بر کیست ها داشت که در تمامی گروه ها بین ۱-۰ درصد متغیر بود. بیشترین درصد کشندگی عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ۴ درجه در غلظت ۲۰mg/ml و در ساعت پنجم به ترتیب شامل ۱۲/۶ درصد و ۲۲/۴ درصد بود (جدول۱).

جدول ۱: درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ٤ درجه سانتیگراد

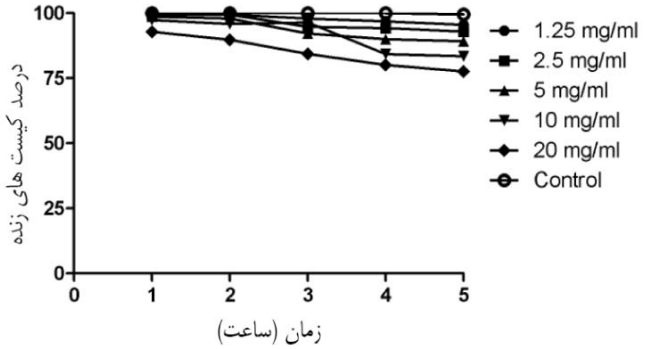
[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

عصاره	غلظت (mg/ml) +	زمان (ساعت)				
		۱	۲	۳	٤	٥
الکلی	۱/۲۵	۰/۵	۰/۵	۰/۷	۱/۳	۳/۲
	۲/۵	۱	۲	۲	۳/۷	۴/۸
	۵	۱/۵	۲	۳/۲	۴/۲	۵/۳
	۱۰	۳	۵/۲	۶/۵	۶/۶	۱۰
	۲۰	۸/۵	۸/۱	۱۰	۱۰	۱۲/۶
آبی	۱/۲۵	۰/۵	۰/۵	۲/۱	۳/۱	۴/۴
	۲/۵	۰/۶	۱/۵	۵/۲	۵/۷	۷/۱
	۵	۱/۳	۲	۷/۸	۹/۹	۱۰/۸
	۱۰	۲/۶	۴/۱	۱۳/۵	۱۵/۷	۱۶/۶
	۲۰	۷/۱	۱۰/۲	۱۵/۶	۱۹/۹	۲۲/۴

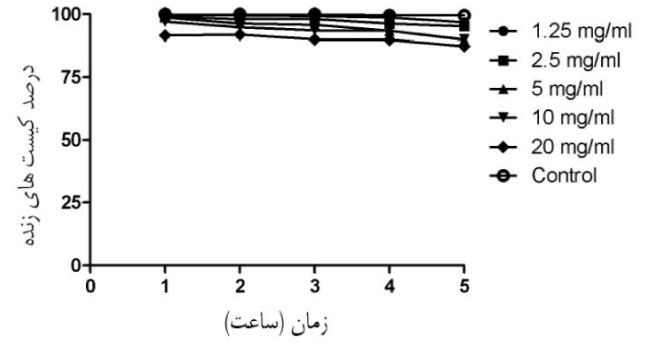
* $p\leq ۰/۰۵$ بین عصاره های آبی و الکلی در غلظت ها و زمان های مختلف، تفاوت معنی دار وجود دارد.

+ بین غلظت های مختلف در عصاره های آبی و الکلی در زمان های مختلف تفاوت معنی دار وجود دارد.

درصد کشندگی در همه غلظت و در همه زمان ها بین عصاره الکلی و آبی دارای تفاوت معنی داری بود($p<۰/۰۰۵$). الکلی و آبی درمنه در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری داشت ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۱- الف و نمودار ۲- الف). میانگین تعداد کیست های زن



نمودار ۱-الف: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاری آبی درمنه در ساعات مختلف در درمای ٤ درجه سانتیگراد



نمودار ۲-الف: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاری الکلی درمنه در ساعات مختلف در درمای ٤ درجه سانتیگراد

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

بیشترین درصد کشندگی عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ۲۴ درجه، در غلظت ۲۰mg/ml و در ساعت پنجم بترتیب ۵۷/۲ و ۴۴/۱ درصد بود (جدول۲).

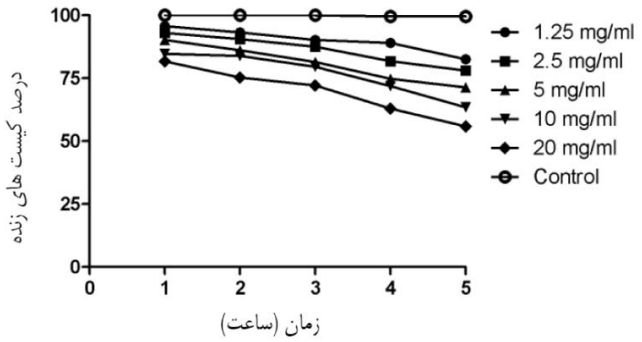
جدول ۲: درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد

* عصاره	+ غلظت (mg/ml)	زمان (ساعت)				
		۱	۲	۳	٤	٥
الکلی	۱/۲۵	۶/۸	۸/۶	۹/۱	۱۳/۳	۲۳/۴
	۲/۵	۱۰/۴	۱۳	۱۴/۲	۲۰	۳۰/۲
	۵	۱۳/۵	۱۷/۸	۲۲/۱	۲۹/۴	۳۹/۵
	۱۰	۱۸/۷	۲۲/۲	۲۵	۳۲	۴۸/۸
	۲۰	۲۵	۳۲/۵	۳۸/۶	۴۷	۵۷/۲
آبی	۱/۲۵	۴/۳	۶/۸	۹/۸	۱۰/۹	۱۷/۴
	۲/۵	۷	۹/۵	۱۲/۵	۱۸/۲	۲۱/۹
	۵	۹/۸	۱۳/۸	۱۸/۵	۲۵/۲	۲۸/۶
	۱۰	۱۵/۳	۱۳/۱	۲۰/۴	۲۸/۱	۳۶/۶
	۲۰	۱۸/۳	۲۴/۷	۲۷/۸	۳۷	۴۴/۱

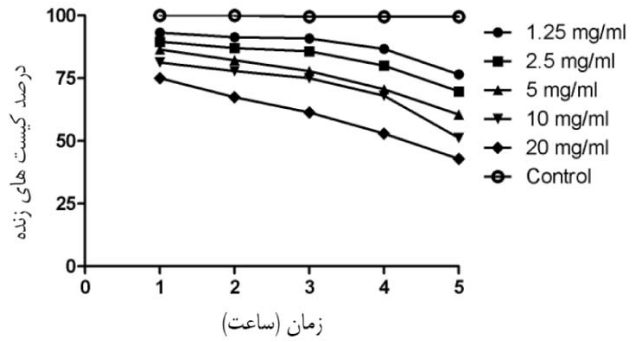
* $P \leq 0.05$ بین عصاره های آبی و الکلی در غلظت ها و زمان های مختلف، تفاوت معنی دار وجود دارد.

+ بین غلظت های مختلف در عصاره های آبی و الکلی در زمان های مختلف تفاوت معنی دار وجود دارد.

درصد کشندگی در این گروه بین عصاره الکلی و آبی در همه غلظت ها و تمامی زمان ها دارای تفاوت معنی داری بود ($p<۰/۰۰۵$). میانگین تعداد کیست های زنده در عصاره های الکلی و آبی درمنه در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری داشت ($p<۰/۰۰۰۱$). (نمودار۱- ب و [illegible])



نمودار ۱-ب: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاره الکلی درمنه و در ساعات مختلف در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد



نمودار ۲-ب: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاره الکلی درمنه و در ساعات مختلف در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

بیشترین درصد کشندگی عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ۳۷ درجه، در غلظت ۲۰mg/ml و در ساعت پنجم بترتیب ۱۰۰ و ۶۶/۱ درصد بود (جدول۳).

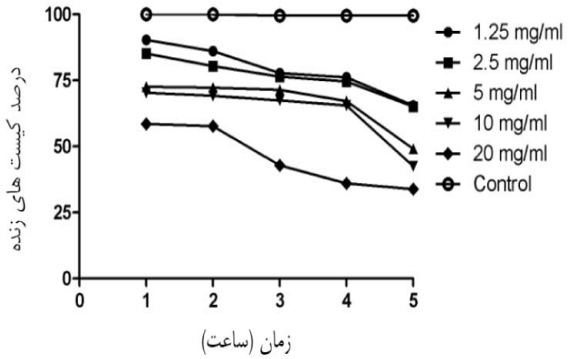
جدول ۳: درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی درمنه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

* عصاره	+ غلظت (mg/ml)	زمان (ساعت)				
		۱	۲	۳	٤	٥
الکلی	۱/۲۵	۹/۴	۱۶/۱	۲۷/۲	۳۶/۸	۳۶/۱
	۲/۵	۱۶/۲	۲۶/۵	۳۱/۶	۴۲	۵۲
	۵	۲۲	۳۲/۷	۳۵/۹	۴۶/۵	۷۰/۸
	۱۰	۳۲/۸	۴۰/۴	۴۷/۹	۶۲/۶	۸۳/۷
	۲۰	۴۴	۴۸/۳	۶۰/۲	۸۳/۲	۱۰۰
آبی	۱/۲۵	۹/۶	۱۳/۸	۲۲/۲	۲۳/۸	۳۶/۴
	۲/۵	۱۴/۸	۱۹/۵	۲۳/۸	۲۵/۴	۴۴/۹
	۵	۲۷/۴	۲۷/۷	۲۸/۶	۳۲/۸	۵۰/۸
	۱۰	۲۹/۶	۳۰/۸	۳۲/۵	۳۴/۴	۵۷/۶
	۲۰	۴۱/۵	۴۲/۳	۵۷/۱	۶۳/۹	۶۶/۱

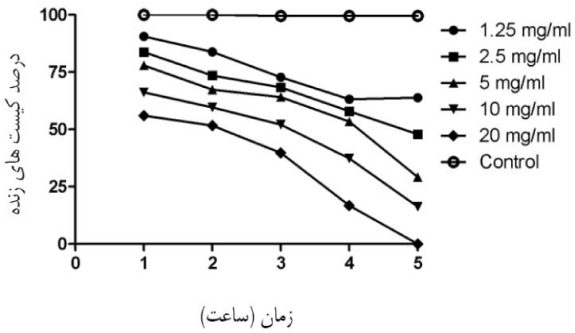
* $P \leq 0.05$ بین عصاره های آبی و الکلی در غلظت ها و زمان های مختلف، تفاوت معنی دار وجود دارد.

+ بین غلظت های مختلف در عصاره های آبی و الکلی در زمان های مختلف تفاوت معنی دار وجود دارد.

درصد کشندگی در این گروه بین عصاره الکلی و آبی در همه غلظت ها و تمامی زمان ها دارای تفاوت معنی داری بود (p<۰/۰۰۵). میانگین تعداد کیست های زنده در این دما و در عصاره های الکلی و آبی درمنه در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۰۰۱). (نمودار۱- ج و نمودار ۲- ج).



نمودار ۱-ج: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاره الکلی درمنه و در ساعات مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد



نمودار ۲-ج: تغییرات درصد کیست های زنده ژیاردیا در اثر غلظت های متفاوت عصاره الکلی درمنه و در ساعات مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ضریب همبستگی اسپیرمن مشخص گردید که در هر دو عصاره آبی و الکلی این گیاه ، در تمامی زمان ها با افزایش غلظت، درصد کشندگی کیست ها افزایش می یابد (p<۰/۰۰۰۱). همچنین در عصاره آبی و الکلی این گیاه در نمامی غلظت ها و دماها با افزایش زمان درصد کشندگی کیست ها افزایش می یابد (p<۰/۰۰۰۱). در مورد دما نیز مشخص گردید که در هر دو عصاره آبی و الکلی این گیاه و در نمامی غلظت ها و زمان ها با افزایش دما، درصد کشندگی کیست ها افزایش می یابد (p<۰/۰۰۰۱).

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

بحث

در این تحقیق مشخص گردید که عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی درمنه ترکی دارای تاثیر بیشتری بر کیست ژیاردیا لامبلیا بوده و بیشترین تاثیر کشندگی را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دارد. نتایج حاصل از این تحقیق بوضوح نشان می دهد که هر دو عصاره الکلی و آبی درمنه ترکی در محیط آزمایشگاه بر کیست های ژیاردیا لامبلیا موٍثر می باشند. تابحال تحقیقی در مورد تاثیر درمنه ترکی بر اشکال مختلف انگل ژیاردیا صورت نگرفته است. در مطالعه سرکاری و همکاران تاثیر غلظت های ۰/۵، ۱و ۲ میلی گرم در میلی لیتر عصاره آبی درمنه بر تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بررسی شده، که در نتیجه درصد کشندگی غلظت ۲ میلی گرم در ساعت اول و دوم ۹۰ درصد و پس از ۲۴ ساعت ۹۵ درصد ذکر شده است ($p<۰/۰۱$) (۲۲). در مطالعه حاضر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، درصد کشندگی غلظت ۲/۵ میلی گرمی عصاره الکلی درمنه ترکی در ساعات اول، دوم و پنجم (بیشترین زمان) بترتیب ۱۶/۲، ۲۶/۵ و۵۲ درصد و درصد کشندگی عصاره آبی درمنه ترکی در ساعات اول، دوم و پنجم به ترتیب ۱۴/۸، ۱۹/۵ و ۴۴/۹ درصد بود.

درصد بیشتر کشندگی در مطالعه سرکاری احتمالاً بدلیل حساس تر بودن فرم تروفوزوئیت تریکوموناس نسبت به فرم کیست ژیاردیا در برابر ترکیبات موثره گیاه می باشد. فرم تروفوزوئیت تک یاخته ها معمولا خارج از بدن انسان بسرعت از بین می رود، در حالیکه دیواره کیست، پوشش مقاومی را برای انگل ایجاد می کند تا بتواند در شرایط نامساعد محیط بیرون از بدن انسان مدت ها زنده بماند. در مطالعه صفارهرندی و همکاران، درصد کشندگی عصاره کلروفورمی سیر در غلظت های ۴ و ۸ میلی گرم در میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در ساعت پنجم بترتیب ۴۲ و ۶۸ درصد بوده (۲۳) در حالیکه در مطالعه حاضر در همین شرایط درصد کشندگی در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره آبی درمنه ترکی به ترتیب ۵۰/۸ و ۵۷/۶ و در عصاره الکلی بترتیب ۷۰/۸ و ۸۳/۷ می باشد.

در مطالعه شهابی و همکاران درصد کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان بر کیست ژیاردیا لامبلیا در غلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه پس از ۳ ساعت برابر ۷۵ و در بررسی حاضر درهمین شرایط اثر کشندگی غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره الکلی و آبی درمنه بترتیب برابر ۸۷/۱ و ۵۲/۹ می باشد. نتایج تحقیق مذکور نشان داده است که عصاره آبی زنیان اثر چندانی روی کیست های ژیاردیا ندارد، بطوری که اثر کشندگی غلظت ۷۰۰ میلی گرم در میلی لیتر آن نیز پس از ۳ ساعت تنها ۱۰ بوده است (۲۴).

در تحقیق مشابه دیگری نیزمشخص شده که عصاره آبی گیاه آویشن اثر کشندگی کمی برکیست ژیاردیا دارد (میانگین درصد کشندگی ۷ درصد) و دلیل احتمالی این اثر کم، حل نشدن مواد موثره گیاه در آب و تبخیر آن در اثر حرارت دادن ذکر شده است (۲۵). سجادی و همکاران در مطالعه ای اثر کشندگی آبلیمو، آبغوره و سرکه را بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتیگراد بررسی کرده اند که بر اساس نتایج حاصله، بیشترین اثر کشندگی در دمای ۲۴ درجه در ساعت سوم بمیزان های ۴۰/۶، ۲۸/۳و ۱۶/۲ درصد بترتیب متعلق به سرکه، آبلیمو و آبغوره بوده است(۲۶).

در تحقیق حاضر مشخص گردید اثر کشندگی عصاره الکلی (اتانولی) درمنه نسبت به عصاره آبی بمراتب بیشتر می باشد. کشندگی بیشتر عصاره اتانولی نشانگر اینست که ترکیبات ضد ژیاردیای درمنه ترکی محلولیت بیشتری در اتانول دارند.

همچنین مشخص گردید، اثر کشندگی این عصاره ها رابطه مستقیمی با افزایش غلظت، دما و گذشت زمان داشته و بیشترین رابطه را با دما دارد ($p<۰/۰۰۰۱$). بیشترین ترین تاثیر هر دو عصاره و بخصوص عصاره الکلی درمنه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده گردید که از نظر بالینی چون

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

دارو بایستی در بدن انسان که از همین دما برخوردار است اثر نمایید، حائز اهمیت می باشد. مطالعاتی که درآنها تاثیر متغیرهای غلظت، دما و زمان بر درصد کشندگی عصاره های گیاهی بررسی شده است، ارتباط مستقیمی میان این عوامل و اثر کشندگی مشخص شده است (۲۴-۲۲). وابستگی اثر کشندگی به زمان ممکن است بدلیل مجاورت بیشتر انگل با عصاره و نفوذ بیشتر ترکیبات کشنده و افزایش میزان آنها درون تک یاخته یا بعلت نفوذ تدریجی ترکیبات فعال و تبدیل آنها بشکل توکسیک بواسطه فعالیت آنزیم ها در داخل سیتوپلاسم انگل باشد (۲۷).

در مورد اثرات دارویی درمنه کوهی تحقیقات اندکی صورت گرفته است. در طب سنتی صربستان از این گیاه بعنوان مدر، آنتی اسپاسمودیک، کارمیناتیو، ضد اسهال و گاهی اوقات بعنوان ادویه نام برده شده است(۲۸). در طب سنتی پاکستان برای درمان سرماخوردگی و همچنین بعنوان ضد کرم مورد استفاده بوده است(۲۹). در این کشور گیاهان جوان بعنوان سبزی برای درمان یبوست استفاده می شود. گل ها و برگ ها خشک شده و پس از آسیاب شدن با آرد گندم مخلوط شده و برای درمان اختلالات گوارش استفاده می شوند(۳۰). در فرانسه و اروپای جنوبی استفاده از این گیاه در درمان سرماخوردگی و آسم مرسوم بوده است (۳۱).

خاصیت آنتی اکسیدانی Chenopodium botrys در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی شصت گیاه از ایران مشخص شده است (۳۲). در تحقیقات صورت گرفته تاثیر ضد میکروبی و ضد قارچی این گیاه بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سابتیلیس، اشریشیا کلی، پسودوموناس ائروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا انتریتیدیس، شیگلا فلکسنری و قارچ های آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکنس بررسی کرده و به این نتیجه رسیده اند که اثر ضد میکروبی این گیاه مشابه آنتی بیوتیک هایی از قبیل آمیکاسین، سفوتاکسیم و خاصیت ضد قارچی آن قابل مقایسه با داروهای آمفوتریسین و نیستاتین می باشد (۳۳,۳۱,۲۸).

همچنین اثر ضد باکتری قابل توجه این گیاه در مقابل سالمونلا آرئوس و باسیلوس سرئوس مشخص شده است (۳۴). اثر ضد قارچی این گیاه در برابر درماتوفیت هایی مانند تریکوفیتون منتاگروفیتس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم و میکروسپوروم کنیس نشان داده شده است. محققان ایرانی نیز فعالیت ضد میکروبی درمنه کوهی را بر ضد ویبریو کلرا، استافیلوکوک اورئوس، شیگلا فلکسنری، سالمونلا تیفی و اشریشیا کلی گزارش کرده اند (۳۶,۳۵). نتایج تحقیقات مذکور نشان می دهد که این گیاه حاوی مواد باکتری کش است. ماده موثره این گیاه بر علیه باکتریها Sesquiterpene می باشد (۲۸). در بررسی صورت گرفته توسط Singh و همکاران اشاره شده که از عصاره بذر درمنه کوهی بمنظور درمان عفونت های کرمی استفاده می شده است (۳۷).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که عصاره های الکلی و آبی درمنه کوهی در شرایط آزمایشگاهی بروی کیست ژیاردیا لامبلیا دارای اثر کشندگی می باشند. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود بررسی های فارماکولوژیک جهت شناسایی ترکیبات موثره این ترکیب گیاهی و مطالعات تجربی بر روی مدل حیوانی و افراد داوطلب بمنظور ارزیابی های بالینی صورت گیرد. از آنجاکه عامل انتقال بیماری ژیاردیازیس کیست ها می باشند می توان از درمنه کوهی بمنظور جلوگیری از انتقال بیماری استفاده نمود. همچنین بدلیل اینکه شروع عفونت در انسان با پدیده تبدیل کیست به تروفوزوئیت (Excystation) در ابتدای روده باریک صورت می گیرد درمنه کوهی بصورت بالقوه می توانند از استقرار عفونت و ایجاد علائم ناشی از بیماری جلوگیری کند.

نتیجه گیری

عصاره های الکلی و آبی درمنه کوهی در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر کشندگی بر کیست ژیاردیا لامبلیا می باشند. اثر کشندگی عصاره الکلی نسب به عصاره آبی این گیاه بیشتر می باشد. با افزایش غلظت، دما و زمان مواجهه کیست ها با عصاره ها درصد کشندگی افزایش می یابد.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

تشکر و قدردانی

از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق با پژوهشگران همکاری داشته اند از جمله نمونه های مورد پژوهش کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References:

1. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite Giardia. Crit Rev Microbiol. 2002; 28(2):123–147.

2. Tessier JL, Davies GAL. Giardiasis. Infect Dis Update. 1999; 6: 8-11.

3. World Health Organization. The World Health Report 1996. fighting disease fostering development. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1996.

4. Saebi E. Porotozal diseases in iran, Text book of clinical parasitology. 6th ed., Tehran, Hayan press. 1998. pp: 81-95.

5. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II. Giardia lamblia cysts given in capsules. Am J Hyg. 1954; 59(2):209–220.

6. Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. Vet Parasitol. 2004; 126(1–2):15–35.

7. Black R E, Dykes A C, Sinclair S P, Wells J G. Giardiasis in day-care centers: evidence of person-to-person transmission. Pediatrics. 1977; 60:486–491.

8. Bean N H, Goulding J S, Lao C, Angulo F J. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1988–1992. CDC Surveillance Summaries, October 25, 1996. Morb Mortal Wkly Rep. 1996; 45(NSS-5):1–66

9. Meyers J D, Kuharic H A, Holmes K K. Giardia lamblia infection in homosexual men. Br J Vener Dis. 1977; 53: 54–55.

10. DuPont H L, Capsuto E G. Persistent diarrhea in travelers. Clin Infect Dis. 1996; 22:124–128.

11. Hill D R. Giardiasis: Issues in management and treatment. Infect Dis Clin North Am. 1993; 7:503–525.

12. Al-Mekhlafi H, Azlin M, Nor-Aini U, Shaik A, Sa'iah A, Fatmah MS,et al. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. T Roy Soc Trop Med H. 2005; 99: 686-691.

13. Petri W. Therapy of intestinal protozoa. Trends Parasitol. 2003;19(11): 523–526.

14. Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 57: 614-619.

15. Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, et al. Efficay of antigiardial drugs .Expert Opin Drug Saf. 2003;2:529–541.

16. Johnson PJ. Metronidazole and drug resistance. Parasitol Today. 1993;9(5):183–186.

17. Upcroft JA, Upcroft P, Boreham PFL. Drug resistance in Giardia intestinalis. Int J Parasitol. 1990;20(4):489–496.

18. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components: a resource for antiparasitic agents? Trends arasitol. 2005; 21: 462-468.

19. Sistanie A. Iranian folk medicine. 1th ed. Rozaneh press,Tehran. 1991. [Persian]

20. Alvarado ME, Wasserman M. Quick and efficient purification of Giardia intestinalis cysts from fecal samples. Parasitol Res. 2006; 99: 300–302.

21. Bingham KA, Jarrol LF, Meyer AE. Giardia Sp.: Physical factors of excystation In vitro and excystation vs eosin exculution as determination of viability. Experimental Parasitology. 1979; 47: 241 – 291.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

22. Sarkari B, Tadayon H, Askarian S, Farnia E, Askarian M. In Vitro anti-Trichomonas activity of Freula assafoetida and garlic extracts. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2009; 11 (3):13-17.

23. Safar Harandi MM, Dalimi Asl A, Ghaffarifar F. In vitro and in vivo effects of garlic (Allium sativum) extract on Giardia lamblia and Giardian muris. Hakim Research Journal 2006; 9(3): 58- 64. (Persian)

24. Shahabi S, Ayazi Roozbehani F, Kamalinejad M, Abadi A, Anti-Giardia Activity of Carum copticum on Giardia lamblia Cysts in Vitro. Pejouhesh, 2008; 32 (4):303-307.

25. Farsangi Mh, Sahebani N, Movahed A. in-vitro giardicidal activity of Thymus vulgaris on Giardia cyst. Iranian South Medical Journal - ismj.2001; 2:88-95. [Persian]

26. Sadjjadi SM, Rostami J, Azadbakht M. Giardiacidal Activity of Lemon Juice, Vinifer and Vinegar on Giardia intestinalis Cysts. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37 (suppl 3):24-27.

27. Kumar P, Singh DK. Molluscicidal activity of Ferula asafoetida, Syzygium aromaticum and Carum carvi and their active components against the snail Lymnaea acuminata. Chemosphere. 2006; 63:1568–1574.

28. Maksimovic ZA, Dordevic S, Mraovic M. Antimicrobial activity of Chenopodium botrys essential oil. Fitoterapia. 2005; 76(1):112-114.

29. Ali H, Qaiser M. The ethnobotany of chitral valley, Pakistan with particular reference to medicinal plants. Pak J Bot. 2009; 41(4):2009-2041.

30. Khan B , Abdukadir A, Qureshi R, Mustafa G. Medicinal uses of plants by the inhabitants of khunjerab national park, Gilgit, Pakistan. Pak J Bot. 2011; 43(5): 2301-2310.

31. Yada N, Vasudeva N, Singh S, Sharma SK. Medicinal properties of genus Chenopodium Linn. Natural Product Radiance. 2007; 6(2):131-134

32. Souri E, Amin G, Dehmobed-Sharifabadi A, Nazifi A, Farsam H. Antioxidative Activity of Sixty Plants from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2004; 3: 55-59

33. Tzakou O, Pizzimenti A, Pizzimenti FC, Sdrafkakis V, Galati EM. Composition and antimicrobial activity of Chenopodium botrys L. Essential oil from Greece. J Essent Oil Res. 2006; 19(3): 292-294.

34. Lyubenova ML, Ganeva YA, Chipilska LT, Hadjieva PD, Chanev CD. Biological active components of Chenopodium botrys L. phytomass. J Balkan Ecol. 2006; 9(3): 289-295.

35. Salehi Surmaghi MH, Amin GH. Screening of Iranian plants for Antimicrobial Activity III.j Sch of Pharm Tehran Unive. 1993; 3(1):55-62.

36. Chalabian F,Monfared A,Larijani K,Saldouzi S. Comparison of the essential oils of Chenopodium botrys l., Ferulago subvelutina Rech.f, Rosa gallica l. and antimicrobial activity of the oils against some microbes. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2006; 22(2):146-154.

37. Singh V. Herbal remedies for worm infestation in Kashmir Himalaya. Fitoterapia.1994; 65(4):354-356

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]

In-Vitro Giardicidal Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chenopodium Botrys L. on Giardia Lamblia Cysts

Rezaeemanesh M[1], Shirbazoo Sh[2], Pouryaghoub N[3]

Corresponding Author: 1-MSc in Parasitology, Faculty Member at Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences,Torbat Heydariyeh ,Iran.
Address: Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh ,Iran,EDC
Tel:0531-2242038
Fax:0531-2242038
E-mail:
rezaimanesh@gmail.com

2- PhD in Parasitology, Assistant Professor at Faculty of Medicine, Baghiatallah University of Medical Sciences

3- BSc student in Midwifery, Students' Research Committee, University of Medical Sciences

Abstract:

Background: Giardia lamblia, giardiasis causative protozoa, is one of the most common etiologic agents of diarrhea throughout the world especially in Iran. Chenopodium botrys L. Is one of the medicinal plants that used as anti-parasite agent in the traditional medicine. The aim of this study is in-vitro evaluation of the giardicidal effects of Chenopodium botrys aqueous and alcoholic extracts on Giardia lamblia cysts.

Materials and Methods: 500 µl of each 1.25, 2.5,5,10 and 20 mg/ml concentrations of Chenopodium botrys L. aqueous and alcoholic extracts added to 500 µl of purified Giardia cysts. The mixtures prepared in 3 series and were kept at different temperatures of 4, 24 and 37 degree Centigrade. The giardicidal effect of extracts measured 1,2,3,4 and 5 hours after exposure by 0.1% eosin dye staining and microscopic enumeration method. Data were analyzed by one way variance, Spearman correlation coefficient and Independent T-tests.

Results: The highest giardicidal effect of alcoholic and aqueous extracts of Chenopodium botrys L. at 37°C, in 20 mg/ml and 5 hour after experiment were 100% and 66.1% respectively. There was a significant difference between giardicidal effect of ethanol and water extracts of this plant in all concentrations, times and temperatures. ($P<0.005$). Giardicidal effect of both extracts of Chenopodium botrys L. significantly increased by rising the concentration, time and temperature ($P<0.0001$).

Conclusion: Both alcoholic and aqueous extracts of Chenopodium botrys L. have in-vitro giardicidal effect on Giardia lamblia cysts. The ethanol extracts of this plant have more giardicidal effect.

Key Words: Chenopodium botrys L., Giardia lamblia, Cyst, Giardicidal effect.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-03-19]