مقاله اصیل پژوهشی

اثر کشندگی عصاره آبی و الکلی انغوزه بر کیست ژیاردیا لامبلیا در شرایط In-vitro

محمدرضا رضائی‌منش[1]، شهناز شیربازو[2]

چکیده

زمینه و هدف: ژیاردیا لامبلیا، تک‌یاخته عامل بیماری ژیاردیازیس، یکی از شایعترین عوامل ایجاد اسهال در سراسر دنیا و بخصوص در ایران می‌باشد. انغوزه، صمغ گیاهی به نام انگدان است که بومی ایران بوده و دارای خواص درمانی فراوان بخصوص در درمان بیماری‌های انگلی می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر کشندگی عصاره آبی و الکلی انغوزه بر کیست ژیاردیا لامبلیا در شرایط *In-vitro* می‌باشد.

روش تحقیق: پانصد میکرولیتر از غلظت‌های ۱، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و الکلی انغوزه با ۵۰۰ میکرولیتر از کیست‌های تخلیص‌شده ژیاردیا لامبلیا مخلوط شده و در دماهای۴، ۲۴و ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درصد کشندگی عصاره‌ها ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت پس از مواجهه، به وسیله رنگ‌آمیزی با رنگ ائوزین۰/۱ درصد و شمارش میکروسکوپی کیست‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه، تی‌تست مستقل و ضریب همبستگی اسپیرمن، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیشترین درصد کشندگی عصاره الکلی انغوزه در دمای ۳۷ درجه، در غلظت ۲۰*mg/ml* و در ساعت چهارم به میزان ۱۰۰٪ بود؛ در حالی که بیشترین درصد کشندگی عصاره آبی انغوزه، در همین دما و غلظت ولی در ساعت پنجم، ۵۷/۲۳ درصد بود. بین درصد کشندگی عصاره‌های آبی و الکلی در همه غلظت‌ها، زمان‌ها و دماها، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد($P<۰/۰۰۵$). اثر کشندگی هر دو عصاره به طور معنی‌داری با افزایش غلظت، زمان و دما افزایش یافت ($P<۰/۰۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در شرایط *In-vitro* دارای اثر کشندگی بر کیست ژیاردیا لامبلیا می‌باشند. تأثیر کشندگی عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی است.

واژه‌های کلیدی: انغوزه، ژیاردیا لامبلیا، کیست، اثر کشندگی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۱؛ ۱۹ (۱): ۲۲-۳۳

دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰

[1] نویسنده مسؤول، مربی انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران
آدرس: تهران- میدان ونک- خیابان ملاصدرا- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)- مرکز تحقیقات بهداشت نظامی بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- گروه علوم آزمایشگاهی
تلفن: ۰۲۱۸۲۴۸۲۴۷۰۰ نمابر: ۰۲۱-۸۲۴۸۲۴۷۰ پست الکترونیک: *rezaimanesh@gmail.com*

[2] استادیار انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران

مقدمه

ژیاردیازیس، بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای تاژک‌دار به نام ژیاردیا لامبلیا[1] (ژِیاردیا اینتستینالیس یا ژیاردیا دئودنالیس) ایجاد می‌شود. ژیاردیا لامبلیا دارای انتشار جهانی بوده و با ۲۸۰ میلیون مورد در سال، شایع‌ترین انگل روده‌ای در کشورهای توسعه‌یافته می‌باشد. در این کشورها، این تک‌یاخته معمولاً با طغیان‌های اسهال همراه بوده؛ به طوری که در آمریکا، عامل بیشترین طغیان‌های اسهال با منشأ آب آلوده، ژیاردیا لامبلیا می‌باشد. میزان شیوع عفونت در اروپا بین ۲ الی ۱۷ درصد می‌باشد. در آسیا، افریقا و آمریکای لاتین در حدود ۲۰۰ میلیون نفر دارای ژیاردیازیس علامت‌دار می‌باشند و سالیانه در حدود ۵۰۰ هزار مورد جدید از این مناطق گزارش می‌شود. این تک‌یاخته در ایران جزء شایع‌ترین تک‌یاخته‌های انگلی بوده و از عوامل مهم اسهال بخصوص در کودکان می‌باشد. میزان شیوع این انگل در کشور ما به طور متوسط ۱۹ الی ۲۲ درصد گزارش شده است (۲،۱).

ژیاردیا لامبلیا دارای ۲ شکل تروفوزوئیت و کیست است. کیست، شکل آلوده‌کننده انگل بوده و برای انسان بسیار عفونی می‌باشند. کیست‌ها قادرند در محیط، تا ۳ ماه زنده بمانند. به علت مقاومت کیست‌ها نسبت به کلرینه‌کردن آب، انتشار از طریق آب آسان‌تر بوده و بیماری عمدتاً از طریق مصرف آب آلوده به انسان منتقل می‌شود. انتقال فرد به فرد از طریق تماس مستقیم مدفوعی- دهانی بخصوص در اجتماعات متراکم مانند مهد کودک‌ها و در بین اعضای خانواده انتقال از طریق غذای آلوده و در کشورهای توسعه یافته انتقال درمیان همجنس بازان، راه‌های دیگر انتقال بیماری می‌باشند؛ همچنین ژیاردیا لامبلیا به عنوان عامل اسهال طولانی‌مدت در مسافران نیز شناخته می‌شود (۳).

علائم بالینی ژیاردیازیس معمولاً ۱-۳ هفته پس از خوردن کیست‌ها شروع شده و مهمترین علامت بیماری، اسهال می‌باشد که در ۹۰ درصد بیماران علامت‌دار مشاهده می‌شود. اسهال ممکن است حاد و خودمحدودشونده و یا مزمن و ناتوان‌کننده باشد. شایع‌ترین علائم بالینی ژیاردیازیس در ایران شامل درد شکمی (۴۲٪) و نفخ (۲۳٪) می‌باشند. سایر علائم بیماری شامل سوء هاضمه، درد اپی‌گاستر، تهوع، استفراغ و مدفوع چرب با بوی بد می‌باشند. در عفونت‌های مزمن سوء جذب چربی، لاکتوز، آهن، ویتامین A و B_{12}، کاهش وزن و کاهش میزان رشد بخصوص در کودکان گزارش شده است (۵،۴).

داروهای رایج برای درمان این بیماری عبارتند از ترکیبات نیتروایمیدازول شامل: مترونیدازول، تینیدازول، ارنیدازول، شینیدازول و نیمورازول، ترکیبات بنزیمیدازول از قبیل مبندازول و آلبندازول و سایر داروها مانند کیناکرین، فورازولیدون و پارومومایسین که در بین این داروها مترونیدازول داروی انتخابی درمان ژیاردیازیس می‌باشد. این داروها دارای اثرات جانبی ناخوشایندی از قبیل ایجاد طعم نامطبوع در دهان، ناراحتی گوارشی، تهوع، سردرد و لکوپنی می‌باشند؛ همچنین برخی از این داروها می‌توانند منجر به اثرات نوروتوکسیک، بی‌قراری، تشنج و سرگیجه شده و در روند درمان، اختلال ایجاد نمایند. به علاوه اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و اثر سوء برخی از آنها بر جنین، در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. مقاومت ژیاردیا لامبلیا در برابر داروهای مترونیدازول، کیناکرین و پارومومایسین در بررسی‌های آزمایشگاهی و بالینی در مناطق مختلف دنیا مشخص شده است و موارد مقاومت دارویی، در بیماران رو به افزایش است (۶-۸).

به علت اثرات جانبی داروهای ضدّ ژیاردیا و همچنین افزایش مقاومت انگل نسبت به درمان‌های دارویی رایج، تلاش به منظور پیداکردن داروهای جدید، مؤثر و بی‌خطر برای درمان این بیماری ضروری است. تنوع بسیار زیاد، وفور ترکیبات دارای خواص درمانی، اثرات جانبی اندک و عدم ایجاد مقاومت دارویی باعث شده که بتوان از آنها به عنوان

[1] *Giardia lambelia*

یک منبع مهم به منظور جستجوی ترکیبات جدید دارویی و سنتز داروهای مؤثر استفاده نمود. انگدان[1] از گیاهان دارویی مهم تیره چتریان[2] می‌باشد. صمغی که از این گیاه به دست آمده و انغوزه[3] نامیده می‌شود در طب سنتی، در درمان بسیاری از بیماری‌ها بخصوص بیماری‌های انگلی مورد استفاده بوده است (۹).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر عصاره آبی و الکلی انغوزه در کشتن و از بین بردن کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در شرایط *In-vitro* می‌باشد.

روش تحقیق

جمع‌آوری نمونه و تخلیص کیست‌های ژیاردیا لامبلیا:

نمونه‌های مدفوع آلوده به کیست ژیاردیا، با مراجعه روزانه به آزمایشگاه مرکزی بیمارستان امام رضا(ع) و آزمایشگاه تشخیص طبّی شفا، واقع در شهرستان بیرجند جمع‌آوری شد. وجود کیست‌های فراوان ژیاردیا با تهیه گسترش مستقیم و آزمایش میکروسکوپی نمونه‌ها، توسط میکروسکوپیست مجرب تأیید گردید. به منظور به دست آوردن حداکثر کیست زنده، عمل جداسازی و تخلیص کیست‌ها، در همان روز جمع‌آوری نمونه‌ها انجام گرفت. نمونه مدفوع، با آب مقطر کاملاً مخلوط شده و از گاز چهار لایه عبور داده شد تا ذرات درشت جداسازی شوند. محلول صاف‌شده در لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰g سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت تخلیه‌شده و رسوب، مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰g سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و به طور مساوی در چهار لوله به میزان ۵ میلی‌لیتر تقسیم گردید. محتویات هر یک از لوله‌ها با پیپت پاستور در لوله‌های سانتریفوژ ۱۵ میلی‌لیتری ته مخروطی، به آرامی بر روی ۳ میلی‌لیتر سوکروز ۰/۸۵ مولار سرد، اضافه گردید؛ به طوری که دو فاز کاملاً مشخص تشکیل شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰g 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 جمع‌آوری گردید. در اغلب روش‌های تخلیص، در این مرحله به واسطه ورود باکتری‌ها، آلودگی باکتریال اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. برای رفع این مشکل، در تحقیق حاضر از روش *Alvarado* استفاده گردید (۱۰)؛ بدین صورت که لایه جمع‌آوری شده، به نسبت ۲۰ برابر حجم خود با آب مقطر مخلوط شده و سپس با سیستم وکیوم- فیلتریشن، فیلتر ممبران استات سلولز پور سایز ۵ میکرون (شرکت سارتوریوس، آلمان) صاف گردید. باکتری‌ها به دلیل اندازه کوچک، از منافذ صافی رد شده و کیست‌های باقیمانده در سطح فیلتر با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شده و درون یک پتری‌دیش استریل جمع‌آوری شدند. مایع حاوی کیست، به لوله‌های استریل منتقل شد. تعداد کیست‌ها به روش هموسایتومتری به وسیله لام نئوبار شمارش‌شده و تعداد آنها در واحد میلی‌لیتر محاسبه گردید (تعداد کیست در ۱ میلی‌لیتر= میانگین تعداد کیست‌های 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:

انغوزه خشک، از شرکت شیراز آلوئه‌ورا واقع در شهر شیراز خریداری گردید و برای شناسایی به هرباریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ارسال گردید و به عنوان صمغ *Ferula assa-foetida* مورد تأیید قرار گرفت.

روش تهیه عصاره آبی انغوزه:

۱۵۰ گرم انغوزه، به وسیله آسیاب برقی آسیاب شده و به پودر تبدیل شد. پودر حاصله با ۳ لیتر آب مقطر مخلوط گردید

[1] *Ferula assa-foetida*
[2] *Apiaceae*
[3] *Asafoetida*

و به مدت ۲۰ دقیقه روی هات‌پلیت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. محلول سفید شیری رنگ حاصله، به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک، صاف گردید. برای عصاره‌گیری از دستگاه فریز- درایر (اشنایدرز ساینتیفیک، هلند) استفاده شد. عصاره آبی حاصله پس از توزین تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

روش تهیه عصاره الکلی انغوزه:

۱۵۰ گرم پودر خشک انغوزه با ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد (مرک، آلمان) مخلوط شده و به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک روی شیکر قرار داده شد. مخلوط حاصله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک، صاف شده و در چندین پلیت تقسیم گردید. برای تبخیر الکل، پلیت‌ها به مدت چند ساعت در انکوباتور ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس عصاره موجود در پلیت‌ها در دمای اتاق و در معرض هوا در طی چند روز کاملاً خشک شد. عصاره حاصل، توزین شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش اندازه‌گیری اثر کشندگی عصاره‌ها بر کیست‌های ژیاردیا لامبلیا:

برای اندازه‌گیری اثر کشندگی عصاره‌ها از روش رنگ‌آمیزی حیاتی کیست‌ها با رنگ ائوزین ۰/۱٪ استفاده شد (۱۱). در این روش، حجم مساوی از مخلوط عصاره و کیست ژیاردیا با رنگ ائوزین مخلوط شده و پس از ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی، در بررسی میکروسکوپی، کیست‌های مرده، قرمز رنگ شده، در حالی که کیست‌های زنده رنگ را جذب نکرده و کاملاً بی‌رنگ به نظر می‌رسند.

روش آزمایش تأثیر عصاره‌ها بر کیست ژیاردیا لامبلیا:

رقت‌های ۱، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و الکلی انغوزه، 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 غلظت‌های مختلف عصاره‌ها مخلوط گردید. سری اول میکروتیوب‌ها، 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. به عنوان شاهد، در هر دما از میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کیست و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد؛ سپس در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت، پس از چند بار آسپیره‌کردن با میکروپیپت، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب‌ها برداشته شده و با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ ائوزین ۰/۱٪ در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری مخلوط گردید. پس از رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله روی یک لام تمیز قرار داده شد و پس از گذاشتن لامل با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، به صورت تصادفی ۲۰۰ عدد کیست، شمارش‌شده و تعداد کیست‌های مرده (رنگ گرفته) و کیست‌های زنده (رنگ نگرفته) تعیین گردید. برای دقت بیشتر نمونه‌گیری، از هر میکروتیوب ۳ بار تکرار شده و میانگین شمارش‌ها محاسبه گردید. با استفاده از فرمول زیر درصد کشندگی عصاره‌ها محاسبه گردید:

$$\text{درصد کشندگی عصاره} = \frac{\text{میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه آزمون} - \text{میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه شاهد}}{\text{میانگین تعداد کیست های زنده در گروه شاهد}} \times ۱۰۰$$

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

به منظور مقایسه میانگین در گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه *(ANOVA)* و تی‌تست مستقل و جهت بررسی رابطه متغیرها از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار *SPSS* (ویرایش ۱۴) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار *GraphPad Prism 5* استفاده شد. در تمامی موارد $P\leq$۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

درصد کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در دمای ۴، ۲۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول۱- درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی انغوزه در دمای ٤ درجه سانتیگراد

عصاره	غلظت (mg/ml)	زمان					
		۱	۲	۳	٤	٥	P-value
الکلی	۱/۲۵	۰/۵	۲/۳	۲/۷	۳/۷	۷	۰/۰۰۲
	۲/۵	۲	۵	۷/۷	۸/۴	۷/۹	۰/۰۸۳
	۵	۳/۵	۷/۳	۱۱/۸	۱۴/۱	۱۶/۴	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۴/۳	۸/۳	۱۳	۱۶/۲	۱۸/۴	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۸	۱۳/۶	۱۶/۵	۲۰/۳	۲۲/۳	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–
آبی	۱/۲۵	۰/۱۶	۱	۱/۲	۱/۳	۱/۸	<۰/۰۰۰۱
	۲/۵	۱/۵	۱/۸	۱/۶	۳/۳	۴/۸	<۰/۰۰۰۱
	۵	۲/۵	۵	۶/۲	۷/۸	۹/۵	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۳/۷	۸/۲	۱۱	۱۱/۵	۱۲/۷	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۵/۳	۹	۱۱/۲	۱۱	۱۴/۸	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–

جدول۲- درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی انغوزه در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد

عصاره	غلظت (mg/ml)	زمان					
		۱	۲	۳	٤	٥	P-value
الکلی	۱/۲۵	۶/۲	۸/۷	۹/۵	۱۲/۷	۲۳	<۰/۰۰۰۱
	۲/۵	۱۰/۵	۱۳	۱۳/۹	۱۹/۵	۲۹/۸	<۰/۰۰۰۱
	۵	۱۳/۵	۱۷/۸	۲۱/۸	۲۹	۳۹/۲	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۱۸/۷	۲۰	۲۴/۷	۳۱/۶	۴۸/۱	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۲۵	۳۲/۵	۳۸/۲	۴۶/۷	۵۶/۸	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–
آبی	۱/۲۵	۸/۵	۸/۷	۱۳/۵	۱۶/۲	۲۲/۸	<۰/۰۰۰۱
	۲/۵	۱۰/۵	۱۲/۲	۱۸/۳	۲۳/۶	۲۹/۵	<۰/۰۰۰۱
	۵	۱۵/۸	۱۷/۸	۲۰/۳	۲۸/۵	۳۸/۵	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۲۱	۲۴/۵	۲۹/۲	۳۶/۲	۴۲/۷	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۳۲/۵	۳۹/۷	۴۵/۵	۵۲/۶	۵۵/۶	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–

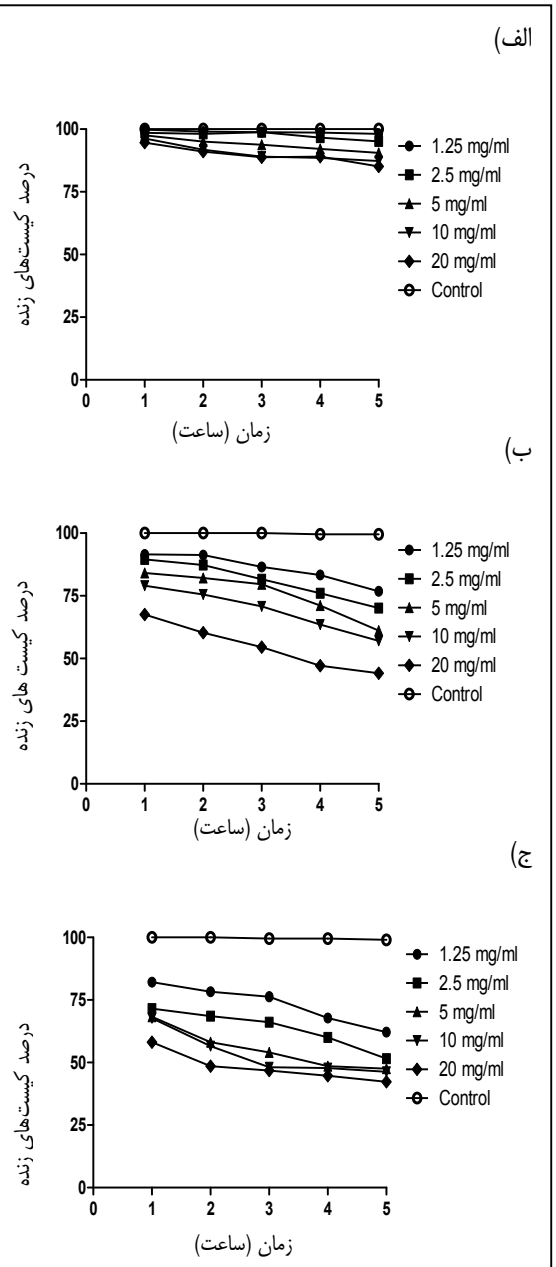
جدول۳- درصد کشندگی کیست های ژیادیا لامبلیا توسط عصاره های الکلی و آبی انغوزه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

عصاره	غلظت (mg/ml)	زمان					
		۱	۲	۳	٤	٥	P-value
الکلی	۱/۲۵	۱۲/۵	۳۸/۹	۴۳/۱	۴۴/۹	۶۵/۷	<۰/۰۰۰۱
	۲/۵	۱۸/۸	۴۴/۹	۵۴/۳	۶۲	۸۳/۶	<۰/۰۰۰۱
	۵	۳۶/۷	۵۰/۴	۶۰	۷۸/۹	۸۸/۹	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۴۶/۸	۶۲	۷۵/۴	۸۶/۸	۹۷/۱	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۵۲/۲	۶۷/۳	۸۷/۱	۱۰۰	۱۰۰	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–
آبی	۱/۲۵	۱۷/۸	۲۱/۷	۲۳/۳	۳۱/۸	۳۷/۲۰	<۰/۰۰۰۱
	۲/۵	۲۸/۵	۳۱/۵	۳۳/۵	۳۹/۷	۴۸	<۰/۰۰۰۱
	۵	۳۱/۷	۴۱/۸	۴۵/۸	۵۱/۲	۵۲	<۰/۰۰۰۱
	۱۰	۳۲/۳	۴۳/۵	۵۱/۶	۵۱/۹	۵۳/۲	<۰/۰۰۰۱
	۲۰	۴۱/۸	۵۱/۵	۵۲/۹	۵۵/۱	۵۷/۲	<۰/۰۰۰۱
	P-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	–

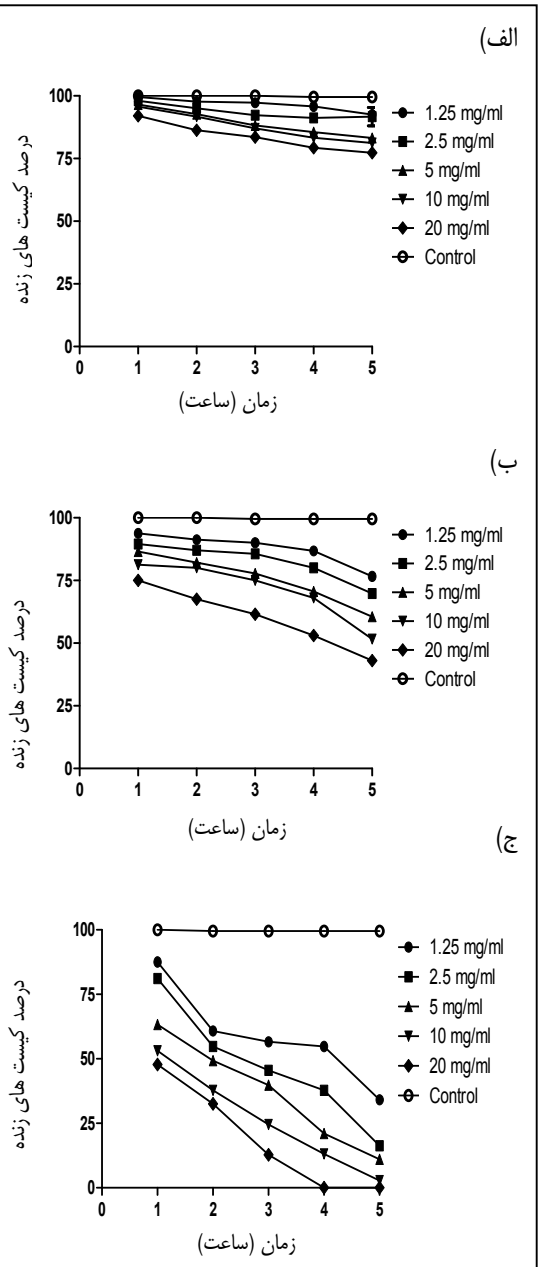
در هر دما درصد کشندگی بین عصاره‌های آبی و الکلی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌داری بود *(P<۰/۰۰۵)*. محلول شاهد (آب مقطر) تأثیر بسیار اندکی بر کیست‌ها داشت که در تمامی گروه‌ها بین ۰-۱ درصد متغیر بود. بیشترین درصد کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در دمای ۴ درجه، به ترتیب شامل ۲۲/۳ درصد و ۱۴/۸ درصد بود (جدول۱). درصد کشندگی در غلظت‌های کمتر از *۲۰mg/ml*، از ساعت سوم به بعد و در غلظت *۲۰mg/ml* در همه زمان‌ها، بین عصاره الکلی و آبی دارای تفاوت معنی‌داری بود*(P<۰/۰۵)*. میانگین تعداد کیست‌های زنده در این دما و در عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه، در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت *(P<۰/۰۰۰۱)* (شکل۱- الف و شکل ۲- الف). بیشترین درصد کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در دمای ۲۴ درجه، در غلظت *۲۰mg/ml* و در ساعت پنجم به ترتیب ۵۶/۸ و ۵۵/۶ بود. درصد کشندگی در این گروه بین عصاره الکلی و آبی، در غلظت *۵mg/ml* بدون تفاوت معنی‌دار ولی در غلظت *۱/۲۵mg/ml* در ساعات ۳ و۴ *(P<۰/۰۵)*، در غلظت *۲/۵mg/ml* در ساعات ۲ تا چهار *(P<۰/۰۰۵)* و در غلظت‌های *۱۰mg/ml* و *۲۰mg/ml* در تمامی زمان‌ها دارای تفاوت معنی‌داری بود *(P<۰/۰۰۵)*. (شکل ۱- ب و شکل ۲- ب). بیشترین درصد کشندگی عصاره الکلی انغوزه در دمای ۳۷ درجه در غلظت *۲۰mg/ml*، در ساعت‌های چهارم و پنجم مشاهده شد که در هر دو زمان ۱۰۰ درصد بود؛ در صورتی که بیشترین درصد کشندگی عصاره آبی انغوزه در این دما در غلظت *۲۰mg/ml* و ساعت پنجم، ۵۷/۲ درصد بود (جدول۳). این اختلاف در تمامی غلظت‌ها و زمان‌ها بین دو عصاره الکلی و آبی تفاوت معنی‌داری داشت *(P<۰/۰۰۰۱)*. در این دما نیز در تمامی غلظت‌ها و زمان‌ها، بر اساس آزمون آنالیز واریانس، میانگین تعداد کیست‌های زنده بین عصاره‌های آبی و الکلی انغوزه و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت *(P<۰/۰۰۰۱)* (شکل ۱- ج و شکل۲- ج).

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ضریب همبستگی اسپیرمن مشخص گردید که در هر دو عصاره آبی و الکلی، در تمامی زمان‌ها با افزایش غلظت، درصد کشندگی کیست‌ها افزایش می‌یابد *(P<۰/۰۰۰۱)*؛ همچنین در هر دو عصاره آبی و الکلی و در تمامی غلظت‌ها و دماها با افزایش زمان، درصد کشندگی کیست‌ها افزایش می‌یابد *(P<۰/۰۰۰۱)*. در مورد دما نیز مشخص گردید که در هر دو عصاره آبی و الکلی و در تمامی غلظت‌ها و زمان‌ها با افزایش دما، درصد کشندگی

کیست‌ها افزایش می‌یابد($P<۰/۰۰۰۱$).



شکل۱- الف) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره آبی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. ب) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره آبی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد. ج) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره آبی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد.



شکل۲- الف) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره الکلی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ب) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره الکلی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد ج) تغییرات درصد کیست‌های زنده ژیاردیا در اثر غلظت‌های متفاوت عصاره الکلی انغوزه و در ساعات مختلف در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد

بحث

در این تحقیق مشخص گردید که عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی انغوزه دارای تأثیر بیشتری بر کیست ژیاردیا لامبلیا بوده و بیشترین تأثیر کشندگی را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارد. انگدان، گیاهی بومی ایران و افغانستان بوده و از این مناطق به سایر کشورهای دنیا صادر می‌شود. استفاده از انغوزه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های انگلی، نفخ، درد معده، آسم، کم اشتهایی، صرع و آنفولانزا رایج بوده است (۹). تحقیقات جدید، خواص درمانی دیگر از قبیل خاصیت ضدّ قارچ، جلوگیری از سرطان، آنتی‌اکسیدان، ضدّ حلزون، ضدّ اسپاسم و ضدّ دیابتی این ترکیب گیاهی را نشان داده‌اند (۱۲).

در سایر تحقیقات اثر حلزون‌کشی انغوزه بر *Lymnaea acuminata*، حلزون میزبان واسط کرم انگلی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا (۱۳)، اثر کشندگی آن بر کرم شیستوزوما مانسونی در مدل موشی (۱۴)، اثر ضدّ میکروبی در باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا (۱۵و۱۶)، اثر ضدّ لیشمانیا (۱۷) و خاصیت جلوگیری از رشد و تکثیر انگل تریکوموناس واژینالیس توسط عصار انغوزه (۱۸و۱۹) مورد بررسی قرار گرفته و اثربخشی آن مشخص شده است.

نتایج حاصل از این تحقیق به وضوح نشان می‌دهد که هر دو عصاره الکلی و آبی انغوزه در محیط آزمایشگاه بر کیست‌های ژیاردیا لامبلیا مؤثر می‌باشند. تا به حال تحقیقی در مورد تأثیر انغوزه بر اشکال مختلف انگل ژیاردیا صورت نگرفته است. در مطالعه سرکاری و همکاران تأثیر غلظت‌های ۰/۵، ۱و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی انغوزه بر تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شده که در نتیجه، درصد کشندگی غلظت ۲ میلی‌گرم در ساعت اول و دوم، ۹۰ درصد و پس از ۲۴ ساعت ۹۵ درصد ذکر شده است ($P<0/01$) (۱۸). در مطالعه حاضر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، درصد کشندگی غلظت ۲/۵ میلی‌گرمی عصاره الکلی انغوزه در ساعات اول، دوم و پنجم (بیشترین زمان) به ترتیب ۱۸/۸، ۴۴/۹ و ۸۳/۶ درصد و درصد کشندگی عصاره آبی انغوزه در ساعات اول، دوم و پنجم به ترتیب ۲۸/۵، ۳۱/۵ و ۴۸ درصد بود. درصد بیشتر کشندگی در مطالعه سرکاری، احتمالاً به دلیل حساس‌تر بودن فرم تروفوزوئیت تریکوموناس نسبت به فرم کیست ژیاردیا در برابر ترکیبات مؤثره گیاه می‌باشد. فرم تروفوزوئیت تک‌یاخته‌ها معمولاً خارج از بدن انسان به سرعت از بین می‌رود؛ در حالی که دیواره کیست، پوشش مقاومی را برای انگل ایجاد می‌کند تا بتواند در شرایط نامساعد محیط بیرون از بدن انسان، مدت‌ها زنده بماند. در مطالعه صفارهرندی و همکاران، درصد کشندگی عصاره کلروفورمی سیر در غلظت‌های ۴ و ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ساعت پنجم به ترتیب ۴۲ و ۶۸ درصد بوده (۲۰) در حالی که در مطالعه حاضر در همین شرایط، درصد کشندگی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی انغوزه به ترتیب ۸۸/۹ و ۹۷/۱ و در عصاره آبی انغوزه به ترتیب ۵۲ و ۵۳/۲ می‌باشد. در مطالعه شهابی و همکاران، درصد کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان بر کیست ژیاردیا لامبلیا در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه پس از ۳ ساعت، برابر ۷۵ و در بررسی حاضر درهمین شرایط اثر کشندگی غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی و آبی انغوزه به ترتیب برابر ۸۷/۱ و ۵۲/۹ می‌باشد. نتایج تحقیق مذکور نشان داده است که عصاره آبی زنیان، اثر چندانی روی کیست‌های ژیاردیا ندارد، به طوری که اثر کشندگی غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن نیز پس از ۳ ساعت، تنها ۱۰ بوده است (۲۱). در تحقیق مشابه دیگری نیزمشخص شده که عصاره آبی گیاه آویشن، اثر کشندگی کمی بر کیست ژیاردیا دارد (میانگین درصد کشندگی ۷ درصد) و دلیل احتمالی این اثر کم، حل‌نشدن مواد مؤثره گیاه در آب و تبخیر آن در اثر حرارت‌دادن ذکر شده است (۲۲). سجادی و همکاران در مطالعه‌ای، اثر کشندگی آبلیمو، آبغوره و سرکه را بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد بررسی کرده‌اند که بر اساس نتایج حاصله، بیشترین اثر

کشندگی در دمای ۲۴ درجه در ساعت سوم، به میزان‌های ۴۰/۶، ۲۸/۳و ۱۶/۲ درصد به ترتیب متعلق به سرکه، آبلیمو و آبغوره بوده است (۲۳).

در تحقیق حاضر مشخص گردید اثر کشندگی عصاره الکلی (اتانولی) انغوزه نسبت به عصاره آبی به مراتب بیشتر می‌باشد. کشندگی بیشتر عصاره اتانولی نشانگر اینست که ترکیبات ضدّ ژیاردیای انغوزه، محلولیت بیشتری در اتانول دارند. تأثیر بیشتر عصاره اتانولی انغوزه نسبت به سایر عصاره‌ها در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است (۱۳). در مطالعه *Kumar* و همکارانش مشخص شده که در عصاره اتانولی انغوزه، ترکیباتی از قبیل اسید فرولیک[1] و آمبلیوفرون[2] دارای تأثیر کشندگی بر حلزون میزبان واسط فاسیولا می‌باشند (۱۳). اثر ترکیبات دیگر انغوزه از قبیل اسید گالبانیک[3] و آمبلیپرین[4] بر ضدّ لیشمانیا و برخی باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا مشخص شده است (۱۲)؛ همچنین مشخص گردید، اثر کشندگی این عصاره‌ها رابطه مستقیمی با افزایش غلظت، دما و گذشت زمان داشته و بیشترین رابطه را با دما دارد($P<۰/۰۰۱$). بیشترین تأثیر هر دو عصاره و بخصوص عصاره الکلی انغوزه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید که از نظر بالینی، چون دارو بایستی در بدن انسان که از همین دما برخوردار است اثر نمایید، حائز اهمیت می‌باشد. مطالعاتی که در آنها تأثیر متغیرهای غلظت، دما و زمان بر درصد کشندگی عصاره‌های گیاهی بررسی شده است، ارتباط مستقیمی میان این عوامل و اثر کشندگی مشخص شده است (۱۳،۱۴،۱۹–۲۳). وابستگی اثر کشندگی به زمان ممکن است به دلیل مجاورت بیشتر انگل با عصاره و نفوذ بیشتر ترکیبات کشنده و افزایش میزان آنها درون تک‌یاخته یا به علت نفوذ تدریجی ترکیبات فعال و تبدیل آنها به شکل توکسیک به واسطه فعالیت آنزیم‌ها در داخل سیتوپلاسم انگل باشد(۱۳).

مصرف انغوزه در مقادیر درمانی معمول، بدون اثرات جانبی بوده ولی در صورت مصرف دوزهای بالاتر باعث تورم لب‌ها، مشکلات گوارشی از قبیل نفخ و اسهال و همچنین سردرد می‌شود. مصرف این دارو در زمان بارداری توصیه نمی‌شود (۹).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در شرایط آزمایشگاهی بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا دارای اثر کشندگی می‌باشند. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود، بررسی‌های فارماکولوژیک جهت شناسایی ترکیبات مؤثره این ترکیب گیاهی و مطالعات تجربی بر روی مدل حیوانی و افراد داوطلب به منظور ارزیابی‌های بالینی صورت گیرد. از آنجا که عامل انتقال بیماری ژیاردیازیس کیست‌ها می‌باشند، می‌توان از انغوزه به منظور جلوگیری از انتقال بیماری استفاده نمود؛ همچنین به دلیل اینکه شروع عفونت در انسان با پدیده تبدیل کیست به تروفوزوئیت *(Excystation)* در ابتدای روده باریک صورت می‌گیرد (۳)، انغوزه به صورت بالقوه می‌تواند از استقرار عفونت و ایجاد علائم ناشی از بیماری جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری

عصاره‌های الکلی و آبی انغوزه در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر کشندگی بر کیست ژیاردیا لامبلیا می‌باشند. اثر کشندگی عصاره الکلی نسب به عصاره آبی بیشتر می‌باشد. با افزایش غلظت، دما و زمان مواجهه کیست‌ها با عصاره‌ها، درصد کشندگی افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر اساس نتایج حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهیه شده است. از آقای دکتر زربان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و همچنین آقای لکزایی، آقای هوشیار، آقای افتخاری، خانم عسکری و

[1] *Ferulic acid*
[2] *Umbelliferone*
[3] *Galbanic acid*
[4] *Umbellipernin*

تمام همکارانی که در مراحل مختلف ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع:

1-Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health. 2010; 213(5): 321-33.

2- Saebi E. Porotozal diseases in Iran,Text book of clinical parasitology. 6th ed. Tehran: Hayan press; 1998. pp: 81-95. [Persian]

3- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 447-75.

4- Taherkhani H, Shariati S, Abdolahi N, Roshandel GH. Clinical manifestations of giardiasis in Iran. JCDR. 2009; 3: 1416-18.

5- Escobedo AA, Almirall P, Robertson LJ, Franco RM, Hanevik K, Mørch K, et al. Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. Infect Disord Drug Targets. 2010; 10(5): 329-48.

6- Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. Efficacy of antigiardial drugs. Expert Opin Drug Saf. 2003; 2(6): 529-41.

7- Rossignol JF. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. Exp Parasitol. 2010; 124(1): 45-53.

8- Tejman-Yarden N, Eckmann L. New approaches to the treatment of giardiasis. Curr Opin Infect Dis. 2011; 24(5): 451-6.

9- Emami A, Fasihi S, Mehregan I. Medicinal Plants. 1st ed. Tehran: Andisheh Avar Press; 2010. [Persian]

10- Alvarado ME, Wasserman M. Quick and efficient purification of Giardia intestinalis cysts from fecal samples. Parasitol Res. 2006; 99(3): 300-2.

11- Bingham AK, Jarrol EL, Meyer EA, Radulescu S. Giardia Sp.: Physical factors of excystation In vitro and excystation vs eosin exculution as determination of viability. Exp Parasitol. 1979; 47(2): 284-91.

12- Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (Ferula assa-foetida oleo-gum-resin)-a review. J Ethnopharmacol. 2011; 134(1):1-10.

13- 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(9): 1568-74.

14- Ramadan NI, Abdel-Aaty HE, Abdel-Hameed DM, El Deeb HK, Samir NA, Mansy SS, et al. Effect of Ferula assafoetida on experimental murine Schistosoma mansoni infection. J Egypt Soc Parasitol. 2004; 34(3 Suppl): 1077-94.

15- Rahman M, Odhan SG, Odhano EA. Antimicrobial activities of Ferula assafoetida oil against gram positive and gram negative bacteria. American-Eurasian J Agric & Environ Sci. 2008; 4(2): 203-6.

16- Lee CL, Chiang LC, Cheng LH, Liaw CC, Abd El-Razek MH, Chang FR, et al. Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from Ferula assa-foetida. J Nat Prod. 2009; 72(9): 1568-72.

17- Iranshahi M, Arfa P, Ramezani M, Jaafari MR, Sadeghian H, Bassarello C, et al. Sesquiterpene coumarins from Ferula szowitsiana and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. Phytochemistry. 2007; 68(4): 554-61.

18- 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): 13-7. [Persian]

19- Ramadan NI, Al Khadrawy FM. The in vitro effect of Assafoetida on Trichomonas vaginalis. J Egypt Soc Parasitol. 2003; 33(2): 615-30.

20- 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. 2006; 9(3): 58-64. [Persian]

21- 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): 303-7. [Persian]

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

23- 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): 24-7.

Abstract *Original Article*

In-vitro giardicidal effect of aqueous and alcoholic extracts of Asafoetida on Giardia lamblia cyst

M.R. Rezaiemanesh[1], Sh. Shirbazou[2]

Background and Aim: *Giardia lamblia, Giardiasis causative protozoa, is one of the most common etiologic agents of diarrhea throughout the world especially in Iran. Asafoetida, an oleo-gum-resin (called Anjodan in Farsi) obtained from an Iranian endemic herb, Ferula Assa-foetida has been used in treating of different diseases, particularly parasitic ones. The aim of this study was in-vitro evaluating of the effect of Asafoetida aqueous and alcoholic extracts on Giardia lamblia cysts.*

Materials and Methods: *Five hundreds µl of each of each of 1.25, 2.5, 5 and 20 mg/ml concentrtions of asafoetida aqueous and ethanol extracts was added to 500 µl of purified Giardia cysts, respectively. The mixtures were kept at 4, 24 and 37°C. The Giardicidal activity of the extracts was measured 1, 2, 3, 4 and 5 hour (s) after exposure through 0.1% eosin dye staining and microscopic enumeration method. The gathered data were analyzed by means of one- way variance, Pearson's correlation coefficient and Independent T-test.*

Results: *The highest Giardicidal effect of Asafoetida ethanol extract was 100% at 37°C, belonging to 20 mg/ml and in the 4th hour after experiment, while the maximum Giardicidal effect of Asafoetida aqueous extract was 57.23% at the same temperature and with the same concentration, in the 5th hour. There was a significant difference between Giardicidal effect of ethanol and water extracts with all concentrations and at different whiles and temperatures (P<0.005). Giardicidal effect of both extracts significantly increased due to rising the concentration, time and temperature (P<0.0001).*

Conclusion: *Ethanol and aqueous extracts of asafetida have in-vitro Giardicidal effect on Giardia lamblia cysts. Ethanol extract has more Giardicidal effect.*

Key Words: *Asafetida, Giardia lamblia, Cyst, Giardicidal effect.*

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2012; 19 (1): 22-33

Received: Saturday, December 10, 2011 Accepted: Tuesday, January 10, 2012

[1]. Corresponding Author, Msc in parasitology, Health Research Center, Baqhyatallah University of Medical Scienses. Tehran, Iran rezaimanesh@gmail.com
[2] Assistant professor in parasitology, Health Research Center, Baqhyatallah University of Medical Scienses. Tehran