

Effect of Hydroalcoholic extract of Artemisia annua on cysts of Giardia lamblia in Invitro

Bahman Rahimi-Esboei¹,
Shirzad Gholami²,
Mohammad Azadbakht³,
Hajar ziaei¹

¹ MSc Student of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 20, 2011 ; Accepted June 30, 2012)

Abstract

Background and purpose: Giardia lamblia is an intestinal flagellate of important protozoan parasites of medical and public health in Iran and the world. Given the importance of treatment in patients with Giardiasis, particularly with the use of medicinal plants and parasite resistance to chemical drugs, in the present study the effect of hydroalcoholic extract of Artemisia annua on the cystic stage of the Giardia lamblia in vitro was done.

Materials and methods: In this experimental study hydroalcoholic extracts of A. annua prepared in 1, 10, 50 and 100 mg/ml concentrations, and cysts of Giardia isolated from stools of patient by sucrose solution 0.85M. Then, hydroalcoholic extract after diluting affected on Giardia cysts, the results were compared with the control groups

Results: Results of this study indicated that concentration of 50 and 100 mg/ml of hydroalcoholic extracted of A. annua after 3 and 24 hours has the most killing and cytotoxicity activity on G. lamblia cysts in vitro

Conclusion: According to our results, the concentration of 100mg/ml of A. annua after 24 hour has the highest cytotoxicity effect on G. lamblia cysts. Therefore, the in vivo study on A. annua in animal models is recommended.

Key words: Giardia lambelia, artemisia annua, hydroalcoholic extract, invitro

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) بر روی مرحله کیستی انگل ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی

بهمن رحیمی اسبویی^۱
شیرزاد غلامی^۲
محمد آزادبخت^۳
هاجر ضیائی^۱

چکیده

سابقه و هدف: ژیا ردیا لامبلیا از تک یاخته های مهم تازک دار روده ای است که از نظر انگل شناسی پزشکی و بهداشت عمومی در کشور ما و بسیاری از کشورها دارای اهمیت است. با توجه به اهمیت درمان ژیا ردیا یازیس در مبتلایان به ویژه با استفاده از گیاهان دارویی و وجود مقاومت انگل به داروهای شیمیایی، مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) بر روی مرحله کیستی انگل ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر استخراج و بر روی کیست ژیا ردیا که با استفاده از محلول ساکارز ۰/۸۵ مولار از نمونه های مثبت تهیه شده بود پس از رقیق کردن تأثیر داده شد. نتایج حاصل پس از ثبت با گروه کنترل مقایسه گردید.

یافته ها: نتایج حاصل از تأثیر غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) در زمان های مختلف نشان می دهد که غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) پس از ۳ و ۲۴ ساعت بیشترین تأثیر کشندگی را بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی داشته است.

استنتاج: بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت به عنوان یک ترکیب مؤثر جهت از بین بردن کیست های انگل ژیا ردیا مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین مطالعات دیگر بر روی حیوانات آزمایشگاهی (In vivo) جهت تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا توصیه می شود.

واژه های کلیدی: ژیا ردیا لامبلیا، عصاره هیدروالکلی، شرایط آزمایشگاهی، گیاه گندنا

مقدمه

آن به روش مدفوعی - دهانی (Fecal-oral) انتقال می یابد. این تک یاخته به دلیل خصوصیات ساختمانی در مرحله فعال (Trophozoite) در روده کوچک انسان

ژیا ردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) عامل بیماری ژیا ردیا یازیس یا اسهال چرب (استئاتوره) از مهم ترین تک یاخته های روده ای بیماری زا در انسان است که کیست

E-mail: sgholami200@gmail.com

مؤلف مسئول: شیرزاد غلامی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. گروه فارماکونوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱/۲۲ تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۱۰

تکثیر و تغذیه می‌نماید و کیست آن که آلوده‌کننده است از طریق مدفوع دفع می‌شود (۱، ۲). انسان تنها مخزن شناخته شده این انگل و مهم‌ترین راه انتقال کیست انگل از طریق مصرف غذا و آب آلوده می‌باشد. این تک یاخته انتشار جهانی داشته و در مناطق گرمسیر شایع‌تر از مناطق سردسیر است. این تک یاخته از شایع‌ترین انگل‌های روده‌ای در کشور ما ایران به‌خصوص نواحی شمال است که از تمام نقاط دنیا گزارش شده است میزان الودگی آن در مناطق مختلف جهان از ۱ تا ۲۵ درصد متفاوت است (۱، ۲، ۳). به طوری که برآورد می‌شود سالانه ۲۸۰ میلیون عفونت در انسان در سراسر جهان ایجاد می‌شود (۴). زیاردیا لامبلیا یکی از عوامل بیماری اسهال به‌خصوص در کودکان و سوءجذب و از دست دادن وزن شود (۴-۲). کشور ایران به عنوان یک منطقه اندمیک برای این تک یاخته است و شیوع آن در مناطق مختلف متفاوت گزارش شده است (۷-۵). شیوع زیاردیازیس در استان مازندران حدود ۱۵/۲ درصد (شهر ساری) گزارش شده است (۱، ۵، ۷). با توجه به انتظار مقاومت انگل به دارو که از مناطق مختلف دنیا و از کشور ما گزارش شده است پیشگیری و درمان این بیماری به‌ویژه در کودکان بسیار ضروری است (۱۰-۸).

با توجه به اینکه تعیین ایزوله، کشت و تست‌های تعیین حساسیت زیاردیا به علت تنوع نتایج، کار مشکلی است و بیشتر اطلاعات در مورد تأثیر دارو بر تجربیات بالینی استوار بوده است. چنان‌چه درمان شیمیایی این بیماری بر اساس تجویز یکی از چهار داروی مترونیدازول، فورازولیدون، تینیدازول و کیناکرین صورت می‌گیرد که این داروها اثرات و عوارض جانبی متعددی دارند (۹، ۱۰). در حال حاضر برای درمان زیاردیا از ترکیبات مختلفی مثل مشتقات نیتروایمیدازول، بنزایمیدازول، آرکیدین و نیتروفوران مانند مترونیدازول و فورازولیدون استفاده می‌شود که داروهای فوق همگی دارای اثرات نامطلوب به‌ویژه در کودکان و زنان هستند (۴، ۹، ۱۰). از طرفی گزارش‌هایی

از مقاومت این انگل نسبت به داروهای فوق بویژه مترونیدازول وجود دارد و اثرات کارسینوژنیک و موتاژنیک این داروها در مدل‌های حیوانی به تأیید رسیده است (۳، ۴، ۱۰). به همین دلیل تلاش برای یافتن ترکیباتی که دارای اثرات جانبی کم‌تر یا بدون اثرات جانبی باشد، در تحقیقات مورد توجه بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان زیاردیازیس به واسطه اثرات جانبی کم آن‌ها روبه افزایش است. مطالعات مختلفی در زمینه گیاهان دارویی در ایران و جهان انجام شده است و تأثیر گیاهانی نظیر زنیان، سیر، پیاز، آویشن و موسیر را بر روی کیست زیاردیا لامبلیا را مورد ارزیابی قرار دادند (۴، ۸، ۱۰).

گیاه گندواش (*Artemisia annua*) از خانواده استراسه (*Asteraceae*) از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی چین مصرف داشته و در چند دهه اخیر برای درمان مالاریا مورد استفاده قرار گرفته است (۸، ۱۱، ۲۲). این گیاه در مناطق شمالی ایران نیز گسترش فراوانی دارد. در سال ۱۹۷۲ ماده موثر و فعال این گیاه یعنی آرتمیزینین جدا شد و ساختار شیمیایی آن تشریح شد. آرتمیزینین توسط یک حلال با نقطه جوش پایین مانند دی‌اتیل اتر جدا شد. این ماده در ساختمان رشته‌ای غده مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و گل آذین وجود دارد و در سرتاسر گیاه پخش می‌شود (۱۴-۱۲). آرتمیزینین نامحلول می‌باشد و باید به صورت خوراکی مصرف شود. مطالعات *In vitro* نشان می‌دهد که آرتمیزینین موسیر، آویشن، زنیان می‌تواند انگل (۱۸-۱۵)، ویروس و باکتری را از بین ببرد (۸، ۱۸، ۲۰، ۲۱). همچنین مطالعات دوسوکور نشان می‌دهد که تزریق یا کاربرد خوراکی آرتمیزینین یا ترکیبات مشابه به سرعت و با اثر زیادی بیماران مبتلا به مالاریا را درمان می‌کند. آزمایش‌ها بر روی انسان نیز نشان می‌دهد که آرتمیزینین مرگ‌ومیر ناشی از مالاریا را تا ۵۰ درصد نسبت به داروهای ضد مالاریای کینولین استاندارد کاهش می‌دهد (۱۴، ۲۰). این گیاه خواص ضد سرطانی به

دلیل سمیت انتخابی بر روی سلولهای سرطانی نیز دارد (۸، ۱۵).

شهابی و همکاران (۲۰۰۸) اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زبان بر کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که هرچه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس گیاهان دارویی طولانی تر باشد، در غلظت‌های کمتر نیز رشد انگل در محیط کشت متوقف می‌شود و کیست‌ها در اثر مجاورت با غلظت‌های مختلف گیاه از بین می‌رود (۲۷). سجادی و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر ضد ژیا ردیایی آلبیمو و سرکه را مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین در مطالعه خود ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها را جداگانه با ۱۰۰۰ میکرولیتر کیست ژیا ردیا تاثیر دادند و درصد زنده ماندن انگل را بعد از ۱، ۲، ۳ و ۵ ساعت محاسبه کردند. نتیجه این تحقیق نشان داد که عصاره سرکه بعد از ۳ ساعت بیشترین اثر ضد ژیا ردیایی را نسبت به بقیه موارد داشته است (۲۹).

بنابراین برای از بین بردن کیست و تروفوزوئیت روش‌های مختلفی پیشنهاد می‌شود که یکی از راه‌های پیشنهادی توسط WHO، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین بردن کیست انگل می‌باشد (۱۴). با توجه به اثرات بسیار مفید این گیاه که از گیاهان بومی ایران بوده و به مقدار فراوان در دسترس می‌باشد، بنابراین در مطالعه حاضر تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) با توجه به خواص سمی ترکیبات آن بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- جمع‌آوری و جدا سازی کیست ژیا ردیا:

در مطالعه حاضر کیست‌های ژیا ردیا از مدفوع‌های تازه آلوده (۲۰ نمونه با شدت آلودگی بالا) از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی مازندران جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از

روش ساکارز ۰/۸۵ مولار تغلیظ گردید. برای جداسازی کیست ژیا ردیا ۱۰ تا ۱۵ گرم از نمونه‌های مدفوع را با ۱۰ برابر آب مخلوط کرده و با استفاده از گاز دولایه صاف شدند. پس از صاف کردن نمونه‌ها محلول حاصل را در دور 400g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل را مجدداً با ۱۰ برابر حجم آب مخلوط و با همان سرعت و زمان سانتریفوژ، و به رسوب حاصل ۵ میلی‌لیتر آب اضافه شد. محلول فوق را به ۳ میلی‌لیتر محلول ساکارز ۰/۰۸۵ مولار که از قبل آماده شده بود، به آرامی اضافه گردید. پس نمونه‌ها در دور 600g در مدت ۱۰ دقیقه از سانتریفوژ شد. از سه لایه تشکیل شده پس از سانتریفوژ، کیست‌ها را از بین لایه‌های اول و دوم با پیپت پاستور جمع‌آوری و پس از دوبار شستشو با آب مقطر برای انجام آزمایش آماده شدند. برای شمارش کیست‌ها از لام نئوبار استفاده شد. ضمناً نمونه‌ها را می‌توان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات مرحله بعد نگهداری کرد (۱۴).

۲- عصاره‌گیری گیاه گندنا:

گیاه گندنا از گیاهان بومی استان مازندران است در این بررسی این گیاه از مناطق روستایی شهرستان بابل در فصل بهار جمع‌آوری و توسط دکتر محمد آزادبخت و در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران ثبت شد. پس از تهیه هرباریوم و تأیید جنس و گونه گیاه، مقدار ۵ کیلو گرم از گیاه را بعد از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال و در شرایط اتاق اندام هوایی گیاه جدا و دور از نور خورشید خشک و به وسیله خردکن برقی تبدیل به پودر شد. در مرحله بعد ۳۰۰ گرم از پودر حاصل را در محلول آب و الکل به نسبت مساوی (۵۰ درصد آب و ۵۰ درصد الکل) حل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. از آنجا که الکل نسبت به حلال‌های دیگر مواد بیشتری را و هم ترکیبات قطبی و هم غیرقطبی را جدا می‌کند در این مطالعه از الکل اتانول مطلق استفاده شد. محلول حاصل

یافته‌ها

نتایج حاصل از مطالعه تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا (*Artemisia annua*) در غلظت‌های ۱ و ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) در زمان‌های متفاوت و در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد:

۱- با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا به‌ویژه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر میانگین اثر کشندگی (درصد) عصاره گیاه گندنا در زمان‌های متفاوت در مقایسه با گروه کنترل طبق جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ به تدریج افزایش می‌یابد. به‌نحوی بیشترین اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۳ ساعت با میانگین ۹۰ درصد و در ۲۴ ساعت با میانگین ۹۴ درصد و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در ۳ ساعت با میانگین ۹۶ درصد و در ۲۴ ساعت با میانگین ۹۹ درصد می‌باشد. بنابراین افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا باعث افزایش میزان کشندگی عصاره بر روی کیست‌های ژیا ردیا می‌شود.

۲- طبق جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲ با افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا در زمان‌های متفاوت میزان میانگین تاثیر و کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه به تدریج افزایش می‌یابد. به‌نحوی که بیشترین تاثیر عصاره گیاهی بر روی کیست ژیا ردیا در ۳ ساعت و ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۱ میلی گرم بر میلی لیتر ۹۱ درصد در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر ۹۳ درصد در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر ۹۶ درصد و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ۹۹ درصد بوده است. این درحالی است که در گروه کنترل میانگین زنده بودن کیست ژیا ردیا در زمان‌های متفاوت ۶ تا ۸ درصد می‌باشد.

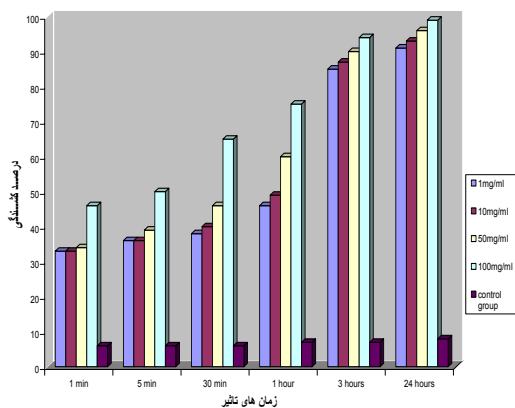
۳- طبق نتایج حاصل از این مطالعه میانگین تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست ژیا ردیا

پس از صاف شدن، حلال (آب و الکل) توسط دستگاه روتاری اوپوراتور تبخیر می‌گردد و سپس ماده باقی مانده را خشک کرده و تبدیل به پودر می‌شود که در این روش مقدار ۱۴۵۰ میلی گرم پودر به دست آمد. راندمان عصاره گیری: در این مطالعه از ۸/۵ کیلو گرم گیاه خام ۱۴۵۰ میلی گرم پودر عصاره حاصل شد که راندمان عصاره گیری تقریباً ۰/۱۷ درصد بوده است. در مرحله نهایی پودر حاصل را در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) آب و الکل رقیق شد. در این مطالعه نتایج حاصل از تاثیر گیاهان با گروه کنترل (سرم فیزیولوژی) مقایسه شد و غلظت‌ها با توجه به مطالعات قبلی تعیین گردید. در مطالعات اولیه معمولاً از این غلظت‌ها استفاده می‌شود. نتایج حاصل از استفاده غلظت‌های فوق برای تعیین غلظت‌های بالاتر در مطالعات تکمیلی کاربرد دارد.

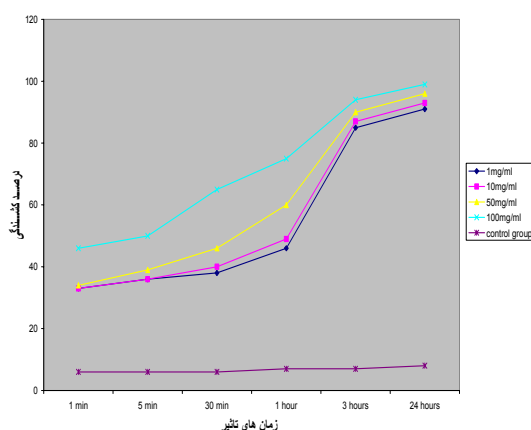
۳- تاثیر عصاره گیاهی بر روی کیست:

در این مطالعه غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از گیاه گندنا تهیه شد سپس مقدار ۲ میلی لیتر از هر غلظت در لوله آزمایش جداگانه آماده و به هر لوله آزمایش ۱۰۰۰۰ کیست ژیا ردیا لامبلیا اضافه شد. و در نهایت تاثیر غلظت‌های مختلف از گیاه بر حیات کیست در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین درصد حیات کیست‌ها از روش رنگ آمیزی حیاتی کیست‌ها با اتوزین ۰/۱ درصد استفاده شد. و هر آزمایش برای تایید سه بار در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکرار شد. اطلاعات حاصل از مطالعه ثبت و در مقایسه با گروه کنترل که حاوی کیست و سرم فیزیولوژی بود و با استفاده از آنالیز واریانس و مقایسه چندگانه با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه قبل و بعد تاثیر عصاره گیاهی از آزمون Paired T Test استفاده شد.

نمودار شماره ۱: درصد تاثیر غلظت های مختلف گیاه گندنا (*Artemisia annua*) در زمان های مختلف



نمودار شماره ۲: بر صد تاثیر غلظت های مختلف گیاه گندنا (*Artemisia annua*) بر زمان های مختلف



بحث

ژيارديا لامبليا عامل ژيارديازييس، تک ياخته روده ابي است که انتشار جهاني دارد. اين تک ياخته در کشور ما در مناطق مختلف به ويژه شمال ايران از شيوع بالايي نسبت به ساير تک ياخته هاي روده ابي برخوردار است. کنترل عفونت ناشي از ژيارديا لامبليا به ويژه در مبتلايان به گاستروانترت با روش هاي درماني مناسب به خصوص استفاده از ترکيبات داروهای گیاهی به دليل اثرات جانبي کم و عدم مقاومت انگل نسبت به اين داروها در مقايسه با داروهای شيميايي مانند مترونيدازول ار اولويت خاصی در تحقيقات برخوردار است. مطالعه تأثير خواص گیاهان بومي هر منطقه بر روی مرحله کيستي و تروفوزويت توسط سازمان جهاني بهداشت و بعضی از محققين پيشنهاد شده است (۸، ۹، ۱۰، ۲۶). در

به ويژه در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ ميلي گرم بر ميلي ليتر بعد از ۳ ساعت و ۲۴ ساعت يعني با افزايش زمان بر روی کيست افزايش می يابد و باعث از بين رفتن کيست ها می شود. بنابر اين افزايش ميانگين درصد تأثير عصاره هيدروالکلي گیاه گندنا با افزايش زمان مجاورت با کيست های ژيارديا ارتباط دارد که از لحاظ آماری (آزمون T) اين اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$). از طرفي ميزان تأثير عصاره هيدروالکلي گیاه گندنا در از بين رفتن تدريجي کيست های ژيارديا لامبليا در هريك از غلظت ها مورد مطالعه در زمان های متفاوت به تدريج افزايش می يابد. از طرفي ميزان تأثير عصاره هيدروالکلي گیاه گندنا در از بين رفتن تدريجي کيست های ژيارديا در هر يك از زمان های مورد مطالعه با افزايش غلظت عصاره گندنا به تدريج افزايش می يابد به نحوی که با مطالعه اين اختلاف در غلظت های ۱ و ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ ميلي گرم بر ميلي ليتر در زمان های ۱ دقيقه، ۳۰ دقيقه، يك ساعت، ۳ ساعت و ۲۴ ساعت مشخص می شود که در هريك از زمان های مجاورت به تدريج ميزان تأثير عصاره هيدروالکلي گیاه گندنا در از بين رفتن تدريجي کيست ها افزايش می يابد. هر چند که اختلاف ميانگين در صد تأثير عصاره گیاه بر روی کيست ها در هريك از زمان های مجاورت متفاوت می باشد اين اختلاف در هر يك از زمان ها در غلظت های متفاوت طبق جدول شماره ۳ متغير می باشد. اين اختلاف ميانگين بر حسب زمان در يك غلظت از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p > 0.05$) و در يك زمان در غلظت های متفاوت اين اختلاف متغير و در زمان ۱ ساعت معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

جدول شماره ۱: ميانگين درصد تأثير غلظت های مختلف گیاه گندنا (*Artemisia annua*) در زمان های مختلف

	1mg/ml	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml
After 1 min	33%	33%	34%	46%
5 min	36%	36%	39%	50%
30 min	38%	40%	46%	65%
1 hour	46%	49%	60%	75%
3 hours	85%	87%	90%	94%
24 hours	91%	93%	96%	99%

هموسیتومر مشخص گردید با توجه به نتایج به دست آمده میانگین کشندگی اسانس گیاهان مورد مطالعه در مدت ۶۰ دقیقه بیشتر از ۳۰ دقیقه بوده است. با توجه به نتایج این مطالعه اثر کشندگی اسانس آویشن باریک در دو زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه و در غلظت های مختلف (رقت های ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۱۰۰) از سایر گیاهان بیشتر بوده است (۲۸).

در این مطالعه حاضر اثر عصاره هیدروالکلی گیاهگ گندنا در غلظت های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان های ۱، ۵، ۳۰ دقیقه، ۱، ۳ و ۲۴ ساعت بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. تحقیقات نشان داده است که گیاه گندنا (*Artemisia annua*) دارای ترکیباتی شامل مونوترپنهای آلفا- پینن (۱۳/۲۸-۷/۸۷ درصد)، ۸ او سینئول (۱۷/۲۶-۵/۷۷ درصد)، آرتمیزیون (۱۴/۲۶-۲۹/۰۵) کامفر (۶/۹۷-۱/۴۴ درصد)، کافور (۳/۶۴-۸/۰۴ درصد)، سز کویتین های بتا- کار یوفیلین (۳/۴۳-۹/۳۷ درصد)، جرماکرون دی (۳/۰۷-۶/۲۶ درصد) و بتا- سلینین (۱۰/۳۶-۰/۴۶ درصد) میباشد. در طب سنتی از گندنا به عنوان ضد تب، ضد مالاریا، ضد بواسیر، ضد انگل، ضد باکتری و ضد سرطان استفاده می شود (۱۷-۱۴).

در تحقیق شهابی و همکاران و بحری نجفی و همکاران نکته قابل توجه این است که هرچه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس گیاهان دارویی طولانی تر باشد، در غلظت های کمتر نیز رشد انگل در محیط کشت متوقف می شود و کیست ها در اثر مجاورت با غلظت های گیاهان از بین می رود. در مطالعه حاضر بر اساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت های متفاوت عصاره گیاه گندنا بر روی کیست ژیا ردیا در زمان ها ۳ و ۲۴ ساعت میانگین درصد کشندگی با درصد بالای (۹۴ تا ۹۹ درصد) بر روی کیست ها افزایش می یابد. بنابراین می توان از عصاره هیدروالکلی در مطالعات آینده در محیط زنده (*In vivo*) جهت درمان

مطالعه حاضر تأثیر غلظت های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا که گیاه بومی استان مازندران است با توجه به خصوصیات و ترکیبات آن در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت بر اساس نتایج حاصل از تأثیر غلظت های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت گیاه در زمان معین میانگین درصد کشندگی بر روی کیست ها افزایش می یابد. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در هر یک از غلظت ها درصد کشندگی و تأثیر گیاهی در از بین بردن کیست های ژیا ردیا (یا درصد کشندگی) به نحو معنی داری بویژه در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش می یابد.

در مطالعه شهابی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در بررسی اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنبان بر کیست های ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی پس از ۶۰ دقیقه تماس عصاره یا اسانس با کیست ژیا ردیا لامبلیا حداقل غلظت عصاره هیدروالکلی و اسانس زنبان ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۱۲۰ دقیقه ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۱۸۰ دقیقه ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد در این مطالعه اثر کشندگی هیدرو الکلی و اسانس زنبان در محیط آزمایشگاه بر روی کیست های ژیا ردیا گزارش شد (۲۷). در این مطالعه نتایج ۱۸۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره الکللی باعث از بین رفتن ۱۰۰ درصد کیست های ژیا ردیا شده است که با نتایج تحقیقات حاضر در ۲۴ ساعت با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر مطابقت دارد. در مطالعه بحری نجفی و همکاران در مطالعه اثرات تعدادی از گیاهان دارویی بر روی کیست های ژیا ردیا در مقایسه با مترونیدازول در *In vivo* میزان کشندگی اسانس گیاهان در مقایسه با داروهای شیمیایی با شمارش کیست های رنگ شده (به وسیله ائوزین) و تعداد کل کیست ها که از طریق لام

کیست‌های ژیا‌ردیا در حیوانات آزمایشگاهی و یا در انسان با غلظت مناسب استفاده کرد.

در سال‌های اخیر مطالعات مختلف در زمینه بررسی خواص ضدانگلی گیاه گندنا بر روی انگل‌های مختلف انسانی و حیوانی توسط مراکز تحقیقاتی صورت گرفته است، به‌عنوان مثال آلبرت و همکاران در سال ۲۰۱۰ عصاره اتانولی گیاه *Artemisia annua* را روی انگل *Heterobranchnus longifilis* تأثیر دادند. عصاره این گیاه می‌تواند با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۶۰ دقیقه ۵۰ درصد انگل را از بین ببرد و عصاره با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۶۰ دقیقه می‌تواند ۸۵ درصد انگل را از بین ببرد و همچنین عصاره با غلظت ۸۵ میلی‌گرم بر لیتر در ۹۰ دقیقه توانست تمام (۱۰۰ درصد) انگل‌ها را از بین ببرد. و ضمناً از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین غلظت و زمان با مرگ انگل وجود دارد (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۲، Kim و همکاران اثرات ضد انگلی آرتیمیزینین را بر روی نئوسپورا کانینوم در شرایط *In vitro* بررسی نمودند. در این مطالعه سلول‌های Vero یا ماکروفاژهای صفاقی موش را که آلوده به تاکی زوئیت نئوسپورا کانینوم بود کشت داده و غلظت‌های ۱/۰۱، ۱۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آرتیمیزینین را بر روی این کشت سلولی اثر دادند. غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۱۴ روز تعداد نئوسپورا کانینوم را کاهش و سبب حذف کامل میکروسکوپی آن گردید. این مطالعه بیان می‌کند که آرتیمیزینین تکثیر درون سلولی تاکی زوئیت‌های نئوسپورا کانینوم را مهار می‌کند (۲۴). مطالعه حاضر که تأثیر ۹۹ درصدی عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا را بر روی کیست ژیا‌ردیا نشان می‌دهد نیز مانند مطالعات قبلی می‌باشد. نکته قابل توجه در این مطالعه و مطالعات مشابه این است که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره طولانی‌تر باشد، می‌توان با غلظت کمتری از عصاره رشد انگل را در محیط کشت مهار کرد. همچنین نتایج تحقیقات فرسنگی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر نیز

نشان‌دهنده این است که زمان، تأثیر بسیار مهمی در کشتن کیست‌های ژیا‌ردیا توسط عصاره‌های مختلف گیاهی دارد (۲۵).

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان از عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در درمان کیست‌های ژیا‌ردیا استفاده کرد. چون ژیا‌ردیا به‌صورت کیست وارد بدن می‌شود و به‌صورت کیست نیز از بدن دفع می‌گردد، مسلماً اثر کشندگی عصاره گیاه برای جلوگیری از آلودگی و همین‌طور زمانی که این ماده به مقدار مناسب در معده و روده حضور داشته باشد، با کشتن کیست‌ها از پدیده Excystation و تبدیل آن به فرم تروفوزوئیتی و در نتیجه استقرار بیماری جلوگیری می‌کند (۱۰). با توجه به اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست ژیا‌ردیا لامبلیا در این تحقیق می‌توان گیاه گندنا را گیاهی مؤثر در از بین بردن کیست‌های ژیا‌ردیا در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرد. و با توجه به این‌که این اثرات در محیط *In vivo* (بر روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان) مشخص نمی‌باشد انجام مطالعات کارآزمایی‌های بالینی در این ارتباط ضروری به‌نظر می‌رسد.

از طرفی انتقال ژیا‌ردیا لامبلیا به‌وسیله کیست انگل است که برای از بین بردن کیست‌ها روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است. که یکی از این روش‌های پیشنهاد شده که یکی از راه‌های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) استفاده از مواد خوراکی طبیعی و گیاهان دارویی می‌باشد (۲۶). در ایران نیز بعضی از گیاهان دارویی به‌عنوان داروهای ضد ژیا‌ردیا مانند موسیر (*Allium paradoxum*) آویشن باریکک، در غلظت ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، انبه در غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معرفی شده‌اند (۸). هر چند تأثیر گیاهان دارویی مانند سیر و موسیر و آویشن یا داروهای گیاهی دیگر بر روی کیست یاردا در مطالعات قبلی گزارش شده است ولی در مراحل بعدی مطالعات تکمیلی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان انجام نشده

است جهت استفاده درمانی و تحقیقات بعدی بر روی تروفوزوئیت ژیاوردیا لامبلیا یا سایر تک یاخته‌های روده‌ای در حیوانات آزمایشگاهی توصیه نمود.

است. لذا با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات می‌توان گیاه گندنا را که در از بین بردن کیست ژیاوردیا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت مؤثر

References

1. Thompson RC, Monis PT. Variation in Giardia Implication for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004; 58: 69-137.
2. Edrisian G, Rezaeean M, Ghorbani M, Keshavarz M, Mohebal M. Medical protozoology. First publication. Tehran: University of sciences; 2008. p. 175-176.
3. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite Giardia. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28(2): 123-147.
4. Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology* 2006; 22(5): 203-208.
5. Gholami Sh, Kyanyan H, Mobedi I, et al. Intestinal Protozoan Infections in cattle breeders in rural regions of Mazandaran province in 2003. *J Mazand Univ Med Sci* 2005; 45(14): 51-60 (Persian).
6. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Soltani- Arabshahi SK, Meamar AR, Hadighi R. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(2):75-82.
7. Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Gholami S, Khalilian AR. Relationship between Giardiasis an amount of Zinc, Iron elements in babies below 12 years old. *J Gorg Univ Med Sci* 2005; 14; 87-91 (Persian).
8. 1- Azadbakht M, Azadbakht MS. Five prevalent antiprotozoal herbal drugs. *J Mazand Univ Med Sci* 2008; 18(67): 118-132 (Persian).
9. Abdi YA, Gustafsson LL, Ericsson O, Hellgren U. Handbook of drugs for tropical parasitic infections. United Kingdom, London: Taylor & Francis Ltd; 1995. p. 12-16.
10. Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. *App Microbiol Biotech* 2001; 57(5-6): 614-619.
11. Bilia AR, Melillo de Malgalhães P, Bergonzi MC, Vincieria FF. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of Artemisia annuaL. Obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine* 2006; 13: 487-493.
12. Azadbakht MH, Ziaei H, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of essential oils of Artemisia, Zataria and Myrtus commonis on Trichomonas vaginalis. *J Med Plant* 2003; 2(8): 35-40.
13. Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalb A, Rostami M. Effect of methanolic extract of Artemisia auchori and Camellia sinensis on Leishmania major (in vitro). *Turk Sci* 2006; 36 (6): 365-369.
14. Blanke, C.H., Naisabha, G.B., Balema, M.B., Mbaruku, G.M., Heide, L., Muller, M.S. Herba Artemisia eannuae tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in

- the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. *Trop Doct* 2008; 38: 113–116.
15. Efferth T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside. *Planta Medica* 2007; 73: 299-309.
 16. Mishina YV, Krishna S, Haynes RK, Meade JC. Artemisinins Inhibit Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei rhodesiensis in Vitro Growth. *Antimicrob. Agents Chemother* 2007; 51:1852-1854.
 17. Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1213–1218.
 18. Shuhua X, Catto BA. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on Schistosoma mansoni. *Antimicrobial Agents and Chemotherap* 1989 33: 1557–1562.
 19. Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M. The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 804-811.
 20. Allen PC, Lydon J, Danforth HD. Effects of components of Artemisia annua on coccidia infections in chickens. *Poult Sci* 1997; 76: 1156-1163.
 21. Kane AV. In vitro encystation of in vitro cysts large scale production of in vitro cysts and clone difference in encystation efficiency. *Journal of Parasitol* 1991; 77(6): 974-981.
 22. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 2004; 74:2157–2184.
 23. Ekanem AP, Brisibe EA, Effects of ethanol extract of Artemisia annua L. against monogenean parasites of Heterobronchus longifilis. *Parasitol Res* 2010; 106(5): 1135-1139.
 24. Kim JT., Park JY, Seo HS, et al. In vitro antiprotozoal effect of artemisinin on Neosporacanium. *Vet Parasitol* 2002; 103(1-2): 53-63.
 25. Farsangi. M.H and et al. Killing effect of Zataria multiflora on cysts of Giardia lamblia in vitro. *J Clin Microbiol* 2001; 4: 88-95.
 26. World Health Organization (WHO) WHO/PAHO informal consultation on Intestinal protozoal infections. WHO/CDS. IPI. 1992; 92: 2.
 27. Shabi S, Ayazi Roozbehani F, Kamali Nazad M, Abadi AR. Anti-Giardia Activity of Carum copticum on Giardia lamblia Cysts in Vitro. *Pajouhesh Dar Pezeshki* 2008; 23(7): 303-307 (Persian).
 28. Bahri Najafi R, Motazedian M, Azadbakht M, Sodagar R: Effect of essential oils from some medicinal plants on giardia lamblia cyst in comparison with metronidazol. *Esfahan Univ Res J* 2003; 17(2): 199-206.
 29. Sadjadi S.M, 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(3): 24-27.