

بررسی تاثیر اسانس گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) بر زخم‌های حاصل از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

عباس درودگر^{۱*}، محسن اربابی^۱، محمدرضا رضوی^۲، مهدی مجبلی^۳، فخرالدین صدر^۴، زهره تشکر

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به شیوع لیشمانیوز جلدی در مناطق مختلف جهان و ایران و نظر به اینکه ترکیبات پنج‌ظرفیتی آنتی‌موان که برای درمان این بیماری به کار می‌رود دارای عوارض جانبی متعددی می‌باشد، استفاده از گیاهان دارویی مورد تاکید قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر گیاه دارویی درمنه بر روی زخم‌های حاصل از لیشمانیا ماژور در موش آزمایشگاهی نژاد BALB/c در دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تحقیق با طراحی تجربی صورت گرفت. غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد اموسیون هیدروالکلی گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) بر روی ۵ گروه ۱۰ تایی موش سفید کوچک که قبلاً توسط پروماستیگوت‌های زنده و فعال لیشمانیا ماژور (MHOM/64/IR/ER75) زخمی شده بودند مورد آزمایش قرار گرفت. سه گروه ۱۰ تایی از جمعیت موش‌ها به گروه‌های تجربی (دریافت-کننده غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد) و ۲۰ سر موش دیگر در ۲ گروه ۱۰ تایی به گروه‌های کنترل (بدون هرگونه مداخله و تجویز الکلی ۸۰ درصد) تقسیم شدند. کلیه موش‌ها به منظور مشاهده میکروسکوپی آماستیگوت مورد آزمایش قرار گرفتند و در صورت مثبت بودن تحت درمان واقع شدند. درمان به شکل موضعی سه بار در روز و حداکثر به مدت ۳۰ روز انجام شد. در پایان هر ۱۰ روز قطر زخم‌ها تعیین و از نظر وجود آماستیگوت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. تغییرات قطر زخم‌ها در هریک از گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری Paired t-test، ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: بهبودی کامل بعد از پایان دوره ۳۰ روزه درمان در هیچ‌کدام از موش‌های تحت درمان با غلظت‌های مورد بررسی درمنه مشاهده نشد و آزمایشات میکروسکوپی نمونه‌های گرفته شده از موش‌های مورد بررسی مثبت بود.

نتیجه‌گیری: اسانس درمنه در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد در درمان زخم لیشمانیا ماژور موثر نمی‌باشد و اموسیون گیاهی درمنه در کاهش قطر زخم‌ها و کاهش معنی‌دار اجسام لیشتن زخم موش‌ها پس از پایان دوره درمانی بی‌تاثیر بود.

واژگان کلیدی: لیشمانیا ماژور، اسانس، درمنه، موش BALB/c

۱- مربی گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲- استادیار بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران

۳- استاد گروه دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استادیار گروه داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* نویسنده مسئول: عباس درودگر

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی

پست الکترونیک: adoroudgar@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۱

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۴

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۶/۹/۲۸

مقدمه

مورد لیشمانیوز جلدی در نقاط مختلف جهان وجود داشته باشد و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند. در حال حاضر ۸۸ کشور جهان به لیشمانیوز جلدی آلوده هستند. [۱، ۲]. میزان بروز لیشمانیوز جلدی در ایران به طور متوسط ۰/۲۸ در هر

لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از بیماری‌های انگلی شایع انتقالی توسط پشه خاکی است که در بسیاری از کشورهای حاره و نیمه حاره‌ی جهان شیوع دارد. تخمین زده می‌شود که حدود ۱۲ میلیون

هزار نفر جمعیت است. سالیانه حدود ۲۰۰۰۰ مورد لیشمانیوز جلدی از نقاط مختلف ایران گزارش می‌شود که میزان واقعی آن را چندین برابر میزان گزارش شده تخمین می‌زنند. [۳] متأسفانه علی‌رغم شیوع قابل توجه لیشمانیوز جلدی در ایران، هنوز روش پیشگیری، کنترل و درمان مناسبی وجود ندارد [۴]. ایجاد زخم‌های بدشکل و طولانی‌مدت در مناطقی از بدن نظیر صورت و ایجاد آلودگی‌های ثانویه در این بیماری، درمان بیماری را ضروری می‌سازد. در زمان حاضر داروهای شیمیایی مختلفی جهت درمان لیشمانیوز جلدی به کار می‌رود که در بین آن‌ها می‌توان از ترکیبات آنتی‌موان (پنج‌ظرفیتی یا سه‌ظرفیتی)، داروهای ضد مالاریا (کلروکین، کیناکرین)، امین، مترونیدازول و آنتی‌بیوتیک‌ها (مونوماکسین، تراسایکلین و ریفامپین) نام برد. از ترکیبات پنج‌ظرفیتی آنتی‌موان و از متداول‌ترین داروهایی که جهت درمان لیشمانیوز جلدی در ایران و سایر نقاط دنیا از آن استفاده می‌شود، گلوکانتیم (متیل‌گلوکامین آنتی‌موان) است. داروی دیگر پنتوستام (سدیم استیوگلوکونات) می‌باشد. از ترکیبات سه‌ظرفیتی آنتی‌موان، فوآدین می‌باشد [۴]. این داروها به علت تکرار عمل تزریق و دوز بالا علاوه بر تحمیل خسارات اقتصادی بر خانواده‌ها منجر به بروز عوارض جانبی همچون اختلالات کبدی، قلبی و بیوشیمیایی می‌شوند. به علاوه این ترکیبات دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم تاثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره‌ی درمان، عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد می‌باشند. [۵، ۶] در حال حاضر تحقیقات وسیعی بر روی روش‌های درمانی لیشمانیوز در حال انجام است. در طب سنتی ایران از گیاهان دارویی برای درمان یا کاهش سطح ضایعه لیشمانیوز جلدی استفاده شده است [۷]. اثرات ضدانگلی گیاه دارویی درمنه در درمان عفونت کرم‌های روده‌ای و همچنین بیماری مالاریا و عفونت‌های قارچی به اثبات رسیده است [۸-۱۱]. تاثیر ضدلیشمانیایی این گیاه دارویی در مطالعه انجام شده در مراکش به اثبات رسیده است. در این بررسی اثر ضدلیشمانیایی گیاه درمنه در غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در پایه‌ی روغنی بر روی لیشمانیا ماژور (عامل سالک روستایی) و لیشمانیا تروپیکا (عامل سالک شهری) بسیار عالی گزارش شده است [۱۲]. *Artemisia sieberi* Besser (*Artemisia herba-alba* Asso) نمونه‌ای از گیاهان بیابانی است که در ایران، فلسطین، سوریه، عراق، ترکیه، افغانستان و آسیای مرکزی می‌روید. [۹، ۱۳] به این گیاه درمنه دشتی می‌گویند. این گیاه بوته‌ای بسیار معطر، عنصر اصلی و غالب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه‌خشک کشور محسوب می‌شود. ارتفاع این بوته بین ۳۰ تا ۵۰ سانتی‌متر

مواد و روش‌ها

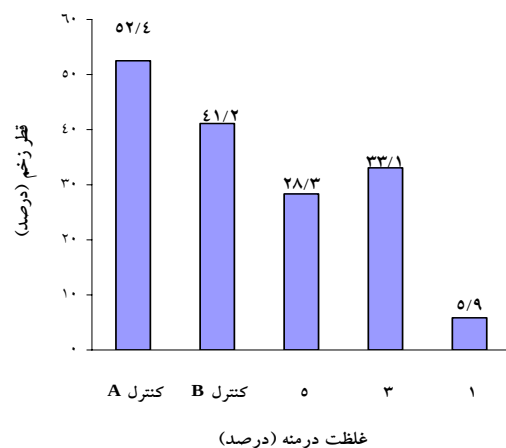
این مطالعه با طراحی تجربی در دانشگاه علوم پزشکی کاشان در سال ۱۳۸۵ صورت گرفت. درمنه مورد استفاده در این بررسی در سه غلظت ۱، ۳ و ۵ درصد در پایه‌ی الکل در شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه گردید. داروهای مورد نظر در ظروف شیشه‌ای کهربایی رنگ که بر روی هریک از ظروف بسته‌بندی، نام

قبل و بعد از درمان با امولسیون‌های ۳ و ۵ درصد مشاهده شد. (به ترتیب $p=0/004$ و $p=0/005$) میانگین قطر زخم‌ها ۳۰ روز بعد از درمان با اسانس‌های ۳ و ۵ درصد افزایش داشت.

جدول ۱- مقایسه اندازه قطر زخم لیثمانیوز جلدی در موش‌های گروه تجربی و کنترل قبل و ۳۰ روز بعد از درمان با استفاده از

غلظت‌های مختلف درمنه			
گروه‌ها	قطر زخم		نتیجه آزمون
	قبل از درمان	بعد از درمان	
غلظت ۱٪	$9/27 \pm 1/76$	$10/29 \pm 2/9$	$P=0/0578$
غلظت ۳٪	$10/67 \pm 1/21$	$14/23 \pm 3/05$	$P=0/004$
غلظت ۵٪	$8/79 \pm 1/67$	$11/28 \pm 1/72$	$P=0/005$
کنترل الکلی ۸۰٪	$7/03 \pm 2/11$	$10/05 \pm 2/03$	$P=0/018$
کنترل بدون مداخله	$7/09 \pm 2/76$	$11/05 \pm 3/8$	$P=0/002$

در پایان دوره‌ی ۳۰ روزه درمان اندازه قطر زخم‌ها در گروه‌های مورد، دریافت‌کننده غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد به ترتیب ۵/۹، ۳۳/۱، ۲۸/۳ درصد افزایش داشت. افزایش قطر زخم‌ها در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده الکلی ۸۰ درصد (کنترل B) و بدون مداخله (کنترل A) به ترتیب ۴۱/۲ و ۵۲/۴ درصد بود. (نمودار شماره ۱)



نمودار ۱- قطر زخم در ۵۰ موش BALB/c مبتلا به لیثمانیوز جلدی تحت درمان با غلظت‌های مختلف اسانس هیدروالکلی درمنه

میزان تاثیر غلظت‌های مختلف درمنه بر روی تعداد اجسام لیثمن موجود در زخم‌های جلدی موش‌های آزمایشگاهی ۳۰ روز بعد از درمان در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

دارو، غلظت تهیه شده و تاریخ ساخت قید گردیده بود تحویل شد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. به منظور لیثمانیابی کردن حیوانات از پروماستیگوت‌های حاصل از آماستیگوت‌های جدا شده از زخم‌های فعال موش‌های آلوده در محیط کشت N.N.N استفاده شد. سوبیه‌ی مورد استفاده در این بررسی MHOM/64/IR/ER75 بود که از بخش تک‌یاخته‌شناسی دانشکده‌ی بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده بود. از محیط مایع RPMI1640 با انگل-های در فاز ایستا (Stationary)، با استفاده از سرنگ انسولین، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول به قاعده‌ی دم هر یک از موش‌های BALB/c انتخاب شده برای هر گروه به صورت زیرجلدی تزریق گردید. پس از گذشت حدود ۳۰ روز زخم در قاعده‌ی دم موش‌ها ایجاد می‌گردد. نمونه‌گیری از زخم‌ها و بررسی میکروسکوپی اسلایدهای تهیه شده، موید آلوده بودن زخم به انگل می‌باشد. در این بررسی موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه‌های مورد: شامل سه گروه ده‌تایی موش‌های شماره‌گذاری شده و با غلظت ۱، ۳ و ۵ درصد امولسیون درمنه تحت درمان قرار گرفتند. گروه‌های شاهد: شامل دو گروه ۱۰ تایی موش‌های شماره‌گذاری شده که یک گروه ده‌تایی با الکلی اتیلیک ۸۰ درجه و گروه دیگر بدون هرگونه مداخله بودند. محل‌های خاصی از بدن موش‌ها در گروه‌های مورد و شاهد با استفاده از اسید پیکریک به رنگ زرد رنگ‌آمیزی و شماره‌گذاری شد. درمان با اندازه‌گیری قطر زخم موش‌ها و ثبت آن در فرم‌های مخصوص آغاز شد. جهت ارزیابی درمان پس از پایان هر دوره ۱۰ روزه درمان قطر زخم‌ها با کولیس اندازه‌گیری گردید و از آن‌ها جهت رویت جسم لیثمن و تایید لیثمانیوز جلدی گسترش تهیه شد و با گروه‌های شاهد و موارد قبل از درمان مقایسه و نتیجه‌گیری گردید. درمان به صورت موضعی، سه بار در روز و حداکثر به مدت ۳۰ روز صورت گرفت. تغییرات قطر زخم-ها در هریک از گروه‌های تحت بررسی با استفاده از آزمون‌های آماری Paired t-test، ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

امولسیون‌های ۱، ۳ و ۵ درصد درمنه قادر به کاهش اندازه‌ی قطر زخم‌ها و کاستن اجسام لیثمن در آن‌ها پس از دوره‌ی درمانی ۳۰ روزه نگردید. همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود آزمون آماری بین میانگین قطر زخم‌ها قبل و بعد از درمان با اسانس هیدروالکلی ۱ درصد درمنه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در حالی که اختلاف معنی‌دار بین میانگین قطر زخم‌ها

aucheri بر روی انگل *L.major* در محیط کشت موثر گزارش شده است به گونه‌ای که اثر مهارکنندگی غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رشد و تکثیر انگل طی ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داده شد. در غلظت‌های ۶۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز همان نتیجه مشاهده شده است [۱۵]. نتایج حاصل از پژوهش فوق با نتایج حاصل از مطالعه Hatimi و همکاران (۲۰۰۰) هم‌خوانی ندارد. در پژوهش حاضر از اسانس هیدروالکلی درمنه و در نمونه حیوانی (محیط *in vivo*) استفاده شد در حالی که در مطالعه‌ی Hatimi و همکاران از درمنه در پایه‌ی روغنی و آبی و در محیط کشت (*In vitro*) استفاده شده بود که توجه‌کننده‌ی تفاوت مشاهده شده در مطالعات فوق می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی شریف و همکاران (۲۰۰۶) نیز به علت استفاده از درمنه و محیط متفاوت با مطالعه‌ی فوق هم‌خوانی ندارد.

نتیجه‌گیری

اسانس درمنه در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد در درمان زخم لیشمانیا ماژور موثر نمی‌باشد و اموسین گیاهی درمنه در کاهش قطر زخم‌ها و کاهش معنی‌دار اجسام لیشمن زخم موش‌ها پس از پایان دوره‌ی درمانی بی‌تاثیر بود. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی از غلظت‌های کمتر و فرم دارویی دیگر درمنه استفاده شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر نتیجه اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۸۱۲۳ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد. از این رو نگارندگان بدین وسیله از حمایت‌های مالی آن دانشگاه صمیمانه تشکر به عمل می‌آورند. نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از آقایان دکتر حسین هوشیار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان به خاطر همکاری انگل‌شناسی و دکتر منصور سیاح به خاطر مساعدت در آنالیز آماری و آقایان مهندس حسین حجازی مدیر عامل محترم شرکت داروسازی باریج اسانس و دکتر عبدالحمید رضایی کارشناس علمی این شرکت به خاطر تهیه و در اختیار قرار دادن امولسیون‌های درمنه ابراز می‌نمایند.

References:

- [۱] ارجمند محسن، فتح‌الهی علیرضا. در ترجمه انگل شناسی پزشکی مارکل. دیوید جان، ویلیام آ. پتری ج ر (مؤلف) ویرایش نهم. تهران: انتشارات ارجمند، ۱۳۸۵. صفحات ۱۵۲-۱۴۶.
- [2] WHO Expertise Committee. Tenth program of world health organization. 1st ed. Swiss: WHO press: 1990: 27-41.
- [۳] مجبعلی مهدی، بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان. چاپ اول. تهران: نشر نادى. ۱۳۷۵.

جدول ۲- توزیع فراوانی اجسام لیشمن در زخم لیشمانیوز جلدی موش‌ها پس از درمان در گروه‌های مورد و کنترل

وجود انگل			
گروه ها	نتیجه تست		
	۱+	۲+	۳+
	(۱-۱۰)	(۱۰-۱۰۰)	(۱۰۰-۱۰۰۰)
غلظت ۱٪	۸	۲	۰
غلظت ۳٪	۷	۳	۰
غلظت ۵٪	۸	۲	۰
کنترل الک ۸۰٪	۷	۲	۱
کنترل بدون مداخله	۵	۳	۲
جمع	۳۵	۱۲	۳

همان‌طور که در جدول شماره‌ی ۲ مشاهده می‌شود، بهبودی کامل بعد از پایان دوره‌ی ۳۰ روزه‌ی درمان در هیچ‌کدام از موش‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف درمنه مشاهده نشد و آزمایشات میکروسکوپی نمونه‌های گرفته شده از تمامی موش‌ها مثبت بود.

بحث

۳۰ روز پس از درمان، در تمام گروه‌های تحت بررسی تغییر معنی‌داری در قطر زخم مشاهده گردید ($p < 0/05$) به جزء موش‌های تحت درمان با غلظت ۱ درصد اسانس درمنه، با افزایش غلظت اسانس، قطر زخم‌ها نیز افزایش داشت ($p < 0/001$). در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد افزایش قطر زخم‌ها به ترتیب ۵/۹، ۳۳/۱ و ۲۸/۳ درصد بود. افزایش قطر زخم‌ها در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده‌ی الک ۸۰ درصد و بدون مداخله به ترتیب ۴۱/۲ و ۵۲/۴ درصد بود. عفونت ثانویه‌ی زخم‌ها در همه‌ی موش‌های مورد بررسی شایع بود و این موضوع می‌تواند در افزایش قطر زخم‌ها موثر باشد. در مراکش Hatimi و همکاران (۲۰۰۰)، اثر لیشمانیاکنشی درمنه *Artemisia herba-alba* Asso را در محیط *In vitro* با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در پایه‌ی روغنی و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی آبی را بر روی انگل‌های *L.tropica* و *L.major* گزارش کرده‌اند [۱۲]. بر اساس مطالعه‌ی شریف و همکاران (۲۰۰۶) در ایران، عصاره‌ی درمنه *Artemisia*

- [۴] صائبی ابراهیم، بیماری‌های انگلی در ایران (تک یا ختگان). ویرایش چهارم. تهران: انتشارات آبیژ. ۱۳۸۴.
- [۵] صائبی ابراهیم، بیماری‌های انگلی در ایران. چاپ چهارم. تهران: انتشارات روزبهان. ۱۳۶۷.
- [6] Francis EG Cox. Julius P. Kreier. Derek Wakelin. Parasitology. Oxford University Press: Ninth Edition, Volume 5. 1999.
- [۷] امین‌زاده، غلامرضا، گیاهان دارویی سنتی ایران. جلد اول. تهران: مؤسسه پژوهش‌های گیاهان دارویی ایران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده داروسازی. ۱۳۷۰.
- [8] Giao PT. Binh TQ. Kager PA. Long HP. Van Thang N. Van Nam N. et al. Artemisinin for treatment of uncomplicated falciparum malaria: is there a place for monotherapy?. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 690-695.
- [9] Farzaneh M. Ahmadzadeh M. Hadian J. Tehrani AS. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil-borne phytopathogens. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2006; 71: 1327-1333.
- [۱۰] میرحیدر حسین، معارف گیاهی (کاربرد گیاهان و پیشگیری و درمان بیماری‌ها، چاپ سوم، تهران: دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۸۰.
- [11] Maryam Negahbana. Saeid Moharramipoura. Fatemeh Sefidkon. Fumigant toxicity of essential oil from Artemisia sieberi Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*. 2006 Elsevier Ltd.
- [12] Hatimi S. Boudouma M. Bichichi M. Chaib N. Guessous Idrissi N. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'Artemisia herba-alba Asso. *Therapeutique*: 2000.
- [۱۳] آیت‌اللهی عبدالمجید، کمیلی زاده حسین، روستاییان عبدالحسین. روغن‌های اسانسی گونه‌هایی از آرتمیزیای بومی ایران. *فصلنامه پژوهشی پژوهنده* ۱۳۷۸: دوره ۴، شماره ۱۵: صفحات ۳۱۵ تا ۳۱۹.
- [۱۴] استاد ناصر، بوربور فرحناز. بررسی سمیت حاد اسانس درمنه از طریق مصرف خوراکی و موضعی، اولین همایش بین‌المللی طب سنتی و مفردات پزشکی، خلاصه مقالات، ۱۳۷۹.
- [15] Mehdi SHARIF, Hajar ZIAEI- Mohammad AZADBAKHT- Ahmad DARYANI, Akbar EBADATTALAB, Masoumeh ROSTAMI. Effect of Methanolic Extracts of Artemisia aucheri and Camellia sinensis on Leishmania major (In Vitro). *Turk J Med Sci* 2006; 36: 365-369.