

ارزیابی تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه *Echinacea purpurea* بر توکسوپلازما در شرایط

برون تنی و در مدل توکسوپلاسموزیس حاد موشی

سناخوت آهنگ^۱، دکتر علی هانیلو^۲، دکتر سقراط فقیه‌زاده^۳

نویسنده‌ی مسوول: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان hani@zums.ac.ir

دریافت: ۹۴/۲/۶ پذیرش: ۹۴/۷/۴

چکیده

زمینه و هدف: درمان رایج توکسوپلاسموزیس، ترکیب خوراکی پیریمتامین و سولفادیازین است که با ایجاد عوارض جانبی و مسمومیت در بیماران، به ویژه افراد مبتلا به اختلالات شدید سیستم ایمنی همراه است. گیاه اکیناسه‌آ پورپورا (سرخارگل) از گیاهان دارویی است که دارای خواص ضد میکروبی و تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی بدن می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تاثیر ضد توکسوپلاسمایی و درمانی عصاره‌ی گیاه سرخارگل در شرایط برون تنی و مدل توکسوپلاسموزیس حاد موشی انجام شد.

روش بررسی: سوسپانسیون حاوی ۴۲۰۰۰ تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلازما (سویه RH)، در غلظت‌های سریال ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره‌ی خام الکلی اکیناسه‌آ پورپورا در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند. درصد بازدارندگی در هر غلظت و در نهایت غلظت بازدارنده ۵۰ درصد (IC_{50}) عصاره از طریق رگرسیون خطی محاسبه شد. در مرحله‌ی بعد، ۴۸ سر موش BALB/c در ۶ گروه به صورت داخل صفاقی با 10^4 تاکی‌زوئیت آلوده شدند. ۲۴ ساعت پس از آلودگی، ۰/۵ میلی لیتر عصاره با غلظت‌های فوق، به طریق داخل صفاقی و به گروه شاهد فقط ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، روزانه تا زمان مرگ موش‌ها تزریق شد. موش‌ها هر روز پایش می‌شدند. زمان بقای گروه‌ها با آزمون‌های One way ANOVA و Duncan، آنالیز و تفاوت در سطح ($P < 0/05$) معنی‌دار تلقی گردید. **یافته‌ها:** با استفاده از مدل رگرسیون خطی، مقدار IC_{50} عصاره بعد از ۵ ساعت، معادل ۷۸۴ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان (حداقل $7/5 \pm 0/9$ روز) نسبت به گروه شاهد ($5 \pm 0/0$ روز) به‌طور معنی‌داری بیشتر شد ($P < 0/05$). حداکثر میانگین بقا با $7/3 \pm 1/0$ روز در گروه پنجم آزمون (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و بدون اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌های آزمون دیده شد.

نتیجه‌گیری: در شرایط برون تنی، غلظت‌های مورد استفاده عصاره‌ی الکلی اکیناسه‌آ پورپورا، اثر بازدارندگی مطلوبی بر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما نداشت، ولی در شرایط درون تنی، به طور معنی‌داری موجب افزایش زمان بقای موش‌های آلوده شد.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسموزیس، تاکی‌زوئیت، اکیناسه‌آ پورپورا، برون تنی، موش

۱- کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی، دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۳- دکترای تخصصی آمار زیستی، گروه آمار زیستی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقدمه

توکسوپلاسموزیس (ناشی از *Toxoplasma gondii*)

از شایع‌ترین عفونت‌های انگلی انسان و دیگر حیوانات خون گرم به‌شمار می‌آید. عفونت توکسوپلاسمایی ممکن است حاد یا مزمن، با علامت و یا بدون علامت باشد. توکسوپلاسموز اکتسابی در افراد با سیستم ایمنی سالم، اکثراً بدون علامت است ولی در افراد دارای اختلال سیستم ایمنی و همچنین در توکسوپلاسموز مادرزادی، همراه با علائم و عوارض شدید و گاهی اوقات کشنده است. در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و بدخیمی‌ها، عفونت مزمن و نهفته ممکن است دوباره فعال شده و عوارض شدید و کشنده‌ای مانند آنسفالیت، میوکاردیت یا پنومونی را ایجاد نماید (۱).

در حال حاضر، درمان انتخابی توکسوپلاسموزیس ترکیب سینرژستیک، پیریمتامین و یک سولفونامید است. این ترکیب دارویی در بیماران مبتلا به اختلالات سیستم ایمنی مانند بیماران ایدزی با عوارض زیادی همراه است. در بیشتر بیماران ایدزی تحت درمان با ترکیب پیریمتامین - سولفادiazین علائم مسمومیت شدیدی بروز می‌کند که منجر به قطع درمان می‌شود. مصرف مقادیر زیاد و طولانی‌مدت پیریمتامین ممکن است با عوارضی از قبیل ترومبوسیتوپنی، لکوپنی و آنمی مگالوبلاستیک همراه باشد و به علت اثرات تراوتورنیک، نباید در نیمه‌ی اول بارداری مصرف گردد. سولفادiazین نیز علاوه بر کریستالوری و هماچوری، موجب واکنش‌های ازدیاد حساسیت در بیماران می‌شود (۲).

پایداری و حتی توسعه‌ی طب گیاهی در کنار گسترش کم نظیر داروهای شیمیایی، حاکی از اهمیت دانش یاد شده می‌باشد. از مزایای گیاهان دارویی در اغلب موارد، پایین بودن عوارض جانبی و پذیرش مطلوب توسط بیماران است. مصرف بی‌رویه‌ی داروهای صنعتی علاوه بر داشتن عوارض جانبی، مسئله‌ی مقاومت علیه ارگانیسم‌ها را نیز موجب شده است، که این امر ضرورت شناسایی و تحقیق در مورد کاربرد

گیاهان دارویی را دوجندان می‌کند. نقش تعدادی از گیاهان به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در مقیاس آزمایشگاهی و نیز کارآزمایی‌های بالینی مشخص شده است. یکی از این گیاهان که اثر آن به‌عنوان تعدیل‌کننده و تقویت‌کننده‌ی قدرت دفاعی و ایمنی بدن به تایید رسیده، گیاه دارویی اکیناسه می‌باشد که در ایران به‌عنوان سرخارگل شناخته می‌شود و اولین بار در سال ۱۳۸۰ در منطقه زردبند شمال شرق تهران به صورت آزمایشی کشت و مورد بهره‌برداری قرار گرفت (۳). این گیاه با نام علمی *Echinaceae purpurea* گیاهی علفی و چندساله است که به خانواده *Asteraceae* تعلق دارد. اکیناسه یکی از گیاهان پر مصرف و بومی آمریکای شمالی است (۴). اندام‌های مختلف گیاه حاوی مواد فعال و ارزشمندی نظیر ترکیبات آلکیل‌آمیدی، اسید شیکوریک، پلی‌ساکاریدها، فلاونوئیدها و پلی‌استیلن است، ضمن اینکه در اسانس آن هومولن و کاریوفیلن نیز وجود دارد (۵ و ۶).

عصاره‌ی اکیناسه به طور سنتی قرن‌هاست که به عنوان داروی پیشگیری‌کننده و معالجه‌کننده‌ی انواع عفونت‌ها از جمله عفونت‌های سیستم تنفسی فوقانی، زخم‌ها و ضایعات التهابی، ابتدا توسط بومیان آمریکایی و سپس در کشورهای اروپایی مورد استفاده قرار گرفته است (۶). مطالعات اخیر نشان داده است که عصاره‌ی خام و بعضی فرآورده‌های این گیاه خواص ضد ویروسی (۷ و ۸) و ضد باکتریایی (۹ و ۱۰) دارد. به‌علاوه سبب تقویت سیستم دفاعی بدن در برابر عفونت‌های ویروسی و باکتریایی از طریق تحریک فعالیت ماکروفاژها و تعدیل یا سرکوب پاسخ‌های پیش التهابی سلول‌های اپی تلیال (۱۱ و ۱۲) می‌شوند.

تعدادی از پژوهش‌ها که اخیراً بر روی خواص ضد انگلی ترکیبات عصاره‌ی اکیناسه انجام گرفته، با نتایج امیدوار کننده‌ای همراه بوده است (۱۳ و ۱۴). در مطالعه‌ای، عصاره‌های تهیه شده اتانولی و آبی گیاه در شرایط برون‌تنی در جلوگیری از رشد و تکثیر لیشمانیا مازور، لیشمانیا دونووانی و

استفاده شد (محلول ۰/۵ درصد رنگ در بافر فسفات). در این روش، تاکی زوئیت‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند اما تاکی زوئیت‌های زنده بی‌رنگ می‌مانند. (۱۵).

بررسی تاثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌ی اکیناسه در شرایط In vitro: برای ارزیابی تاثیر بازدارندگی عصاره بر روی تاکی زوئیت توکسوپلاسم، به شش میکروتیوب هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده انگل که دارای ۴۲۰۰۰ تاکی زوئیت زنده بود، ریخته شد. سپس به هر میکروتیوب، ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف استوک عصاره گیاه اضافه گردید که در عمل غلظت‌های نهایی ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد. همچنین به میکروتیوب کنترل، ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید. میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت، اثر بازدارندگی عصاره در مقایسه با گروه کنترل (بدون عصاره گیاه اکیناسه) به تفکیک در غلظت و زمان‌های مختلف از طریق فرمول $PI = \frac{TC-TT}{TC} \times 100$ محاسبه گردید، که در این فرمول، PI اثر بازدارندگی عصاره، TC تعداد تاکی زوئیت زنده در گروه کنترل و TT تعداد تاکی زوئیت زنده در غلظت‌های مختلف عصاره می‌باشد. این آزمایش در سه تکرار انجام و میانگین داده‌ها ملاک محاسبه قرار گرفت (۱۶).

بررسی تاثیر درمانی عصاره‌ی اکیناسه در توکسوپلاسموز حاد موشی: ۴۸ سر موش آزمایشگاهی BALB/c خریداری شده از موسسه رازی کرج با سن ۴ هفته و وزن ۲۴ تا ۲۶ گرم در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. همه‌ی موش‌ها به صورت داخل صفاقی با ۱۰^۴ عدد تاکی زوئیت توکسوپلاسمای گوندی سویه RH آلوده شدند. موش‌ها در ۶ گروه مساوی ۸ تایی به صورت تصادفی، شامل ۵ گروه آزمون و یک گروه شاهد قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از آلودگی، به ۵ گروه از موش‌ها به حجم ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی اکیناسه با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر

تریپانوزوما بروسی موثر بوده که عصاره‌ی استاندارد اتانولی اکیناسه در محیط کشت سلولی انسان، فعالیت ضد التهابی نشان داده است (۱۳). بنابراین به نظر می‌رسد عصاره‌ی این گیاه بتواند به‌طور مستقیم یا از طریق بهبود و تعدیل سیستم ایمنی، در توکسوپلاسموز حاد موشی اثرات ضد توکسوپلاسمایی و درمانی داشته باشد.

روش بررسی

تهیه و آماده سازی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اکیناسه:

عصاره‌ی الکلی خام پیکر رویشی گیاه *Echinacea purpurea* که دارای ظاهر قهوه‌ای تیره با pH=۷/۴۱ می‌باشد، از شرکت گیاهان دارویی زردبند ایران (Batch No: EP04-92) خریداری شد. ابتدا عصاره توسط دستگاه فریز درایر (مدل ALPHA 1-2، ساخت آلمان) خشک و تبدیل به پودر لیوفیلیزه شد. سپس غلظت‌های سریال استوک ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پودر عصاره در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. عصاره توسط فیلترهای سرنگی یکبار مصرف میلی‌پور با منافذ ۰/۲۲ میکرون، استریل شد و تا زمان استفاده در ویال‌های استریل در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سویه‌ی مورد استفاده و نحوه‌ی تکثیر انگل: در این مطالعه از تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسمای گوندی که در موش‌های سوری تکثیر پیدا می‌کرد، استفاده شد. برای تکثیر انگل به هر موش ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۲×۱۰^۵ تاکی زوئیت زنده به صورت داخل صفاقی تلقیح و پس از ۴ روز، مایع صفاقی موش‌های آلوده با سرنگ استریل پونکسیون شد. تعداد تاکی زوئیت‌ها توسط لام نئوبار شمارش و محاسبه گردید. پس از تعدیل تعداد انگل در واحد حجم، برحسب نیاز جهت پاساژ مجدد یا آزمایش برون‌تنی و یا تزریق به موش‌های گروه آزمون، مورد استفاده قرار گرفت. برای تشخیص تاکی زوئیت‌های زنده از تست دفع تریپان بلو

SPSS آنالیز و در سطح $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج تاثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره اکیناسه در شرایط *In vitro* نتایج تاثیر عصاره اکیناسه با غلظت‌های مورد آزمایش بر روی تاک‌ی‌زوئیت‌های توکسوپلاسم‌نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۵ ساعت باعث از بین بردن ۵۱/۶ درصد تاک‌ی‌زوئیت‌ها در شرایط برون‌تنی می‌شود (جدول ۱). در هیچ‌یک از غلظت‌های پایین‌تر، بازدارندگی ۵۰ درصد در مدت ۵ ساعت مشاهده نشد. با استفاده از مدل رگرسیون خطی مقدار IC_{50} بعد از ۵ ساعت معادل ۷۸۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار ۱).

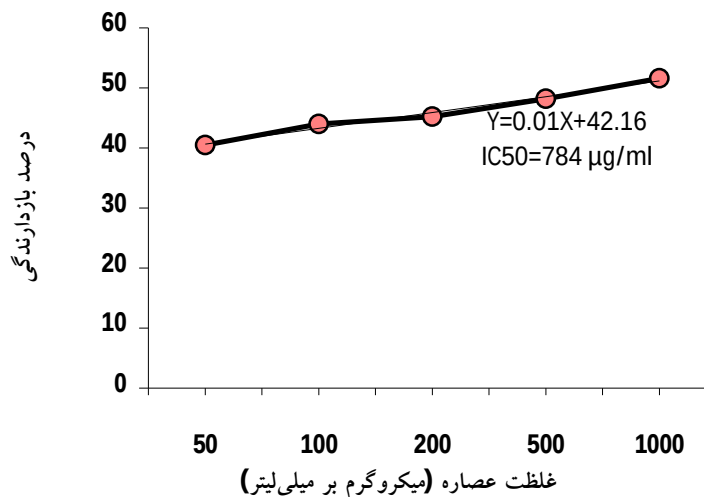
میلی‌لیتر روزانه تا زمانی که موش‌ها زنده بودند، به‌طریق داخل صفاقی تزریق شد. همزمان به موش‌های گروه شاهد فقط ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. موش‌ها روزانه تا زمان مرگ از نظر زنده بودن کنترل و تعداد روزهای بقا برای هر یک از موش‌ها یادداشت شد. در نهایت تمامی موش‌های بیمار و شاهد بعد از مرگ، اتوپسی شده و از مایع صفاقی، کبد، طحال و مغز گسترش تهیه شد. پس از فیکساسیون و رنگ‌آمیزی گیمسا، نمونه‌ها از نظر وجود تاک‌ی‌زوئیت‌ها بررسی گردیدند. غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد (IC_{50}) عصاره از طریق رگرسیون خطی با استفاده از نرم‌افزار EXCEL محاسبه و تعیین شد. تفاوت گروه‌ها از نظر میزان بقا با آزمون One way ANOVA و آزمون مقایسه چندگانه Duncan توسط نرم‌افزار آماری

جدول ۱: اثر بازدارندگی عصاره اکیناسه بر تاک‌ی‌زوئیت‌های توکسوپلاسم‌نشان در شرایط *In vitro*

غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد بازدارندگی در زمان‌های مختلف (ساعت)					
	۰/۵	۱	۲	۳	۴	۵
۵۰	۴/۲	۷/۱	۸/۹	۱۹/۰	۲۲/۰	۴۰/۵
۱۰۰	۴/۸	۶/۵	۸/۳	۲۰/۲	۲۲/۰	۴۴/۰
۲۰۰	۴/۸	۷/۱	۱۶/۱	۲۳/۲	۲۵/۶	۴۵/۲
۵۰۰	۴/۸	۸/۹	۲۰/۸	۳۰/۹	۳۳/۳	۴۸/۲
۱۰۰۰	۵/۰	۹/۵	۲۳/۸	۳۲/۱	۳۵/۷	۵۱/۶

(۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنجم (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، مرگ موش‌ها از روز ششم به بعد اتفاق افتاد (جدول ۲). به‌طور کلی از همه‌ی موش‌هایی که عصاره دریافت کرده بودند، تنها سه موش در روز پنجم تلف شدند و بقیه، روزهای بیشتری و حداکثر تا روز نهم زنده ماندند.

نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اکیناسه بر میزان بقای موش‌های آلوده: میانگین بقای موش‌ها در گروه‌های آزمون و شاهد، متفاوت بود. در گروه شاهد (سرم فیزیولوژی) همه موش‌ها در روز پنجم تلف شدند، اما در گروه‌های تحت درمان با عصاره، مرگ موش‌ها از روز پنجم به بعد آغاز شد. در گروه‌های آزمون چهارم



نمودار ۱: منحنی خطی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره اکیناسه بر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسم در مدت ۵ ساعت

فقط گروه شاهد با کمترین زمان بقا ($5 \pm 0/0$ روز) با گروه‌های آزمون به‌طور معنی‌دار اختلاف دارد ($P < 0/05$)، اما در بین گروه‌های آزمون که با غلظت‌های متفاوتی از عصاره تحت درمان قرار گرفته بودند، اختلاف معنی‌دار دیده نشد ($P = 0/12$). میانگین بقا در گروه‌های چهارم و پنجم آزمون به ترتیب $6/7 \pm 1/6$ و $7/3 \pm 1/7$ روز به‌دست آمد (جدول ۲).

آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA نشان داد، میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های که تحت درمان با عصاره اکیناسه بودند نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). به‌طوری که میانگین بقای موش‌هایی که عصاره دریافت کرده بودند حداقل $6/5$ روز، در حالی که میزان بقا در گروه شاهد ۵ روز بود. متعاقباً آزمون مقایسه چندگانه دانکن نشان داد،

جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره اکیناسه بر میزان بقای موش‌های آلوده

غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)	تعداد موش	میانگین $\pm$ انحراف معیار (روز)	حداقل (روز)	حداکثر (روز)
شاهد*	۸	$5/0 \pm 0/0$	۵	۵
۵۰	۸	$6/5 \pm 0/9$	۵	۸
۱۰۰	۸	$6/5 \pm 0/9$	۵	۸
۲۰۰	۸	$6/5 \pm 0/9$	۵	۸
۵۰۰	۸	$6/7 \pm 1/6$	۶	۸
۱۰۰۰	۸	$7/3 \pm 1/7$	۶	۹

در گروه شاهد به جای عصاره اکیناسه، سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌هایی که تحت درمان با عصاره بودند نسبت به گروه شاهد بیشتر بود ($P < 0/05$)، اما در بین گروه‌های آزمون، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P = 0/12$)

تأثیر عصاره بر جلوگیری از تکثیر و انتشار تاک‌ی‌زوئیت‌ها در مایع صفاقی، طحال، کبد و مغز موش‌ها؛ در بررسی میکروسکوپی گسترش نمونه‌های مایع صفاقی، طحال، کبد و مغز موش‌ها پس از مرگ، به غیر از بافت مغز، همه‌ی اندام‌های مورد بررسی در گروه شاهد و گروه‌های آزمون آلوده به تاک‌ی‌زوئیت بودند و عصاره‌ی اکیناسه در غلظت‌های تجویز شده، در هیچ گروهی از تکثیر و انتشار تاک‌ی‌زوئیت‌ها جلوگیری نکرد.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر که شاید اولین مطالعه این عصاره بر روی توکسوپلازما باشد، نشان داده شد که عصاره‌ی الکلی خام پیکر رویشی گیاه اکیناسه فقط در شرایط درون‌تنی بر روی تاک‌ی‌زوئیت‌های توکسوپلازما موثر است. به طوری که میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان با عصاره (حداقل $6/5 \pm 0/9$ روز) نسبت به گروه شاهد ($0/0 \pm 0/0$ روز) به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0/05$).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره‌ی خام و بعضی ترکیبات تهیه شده از گیاه اکیناسه‌آ پورپورا دارای فعالیت انتخابی ضدویروسی و میکروبی از جمله بعضی تک‌یاخته‌ها است. به علاوه، این ترکیبات در تعدیل سیستم ایمنی از قبیل تحریک فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها و کاهش و تعدیل پاسخ‌های پیش التهابی سلول‌های اپی‌تلیال (سیتوکین‌ها و اینترلوکین‌ها) در عفونت‌های ویروسی و باکتریایی، موثر هستند (۶). نکته‌ی مهم این که همه‌ی فعالیت‌های زیستی مذکور، در غلظت‌های غیرسمی عصاره و ترکیبات گیاه اتفاق می‌افتد (۱۸ و ۱۷) و دامنه‌ی وسیع اثرات مشاهده شده صرفاً به یک ترکیب خاص در گیاه مربوط نمی‌شود، بلکه ناشی از مجموعه مواد و ترکیبات مختلفی است که در این گیاه وجود دارند. بنابراین فواید بالقوه عصاره و ترکیبات اکیناسه به مراتب فراتر از کاربردهای سنتی آن خواهد بود. البته، مقالات

و اطلاعات انتشار یافته در خصوص اثرات ضد انگلی این گیاه اندک است. از جمله می‌توان به مطالعات کانالز و همکاران (۱۳) و سودی و همکاران (۱۴) اشاره داشت که در آن اثرات ضد لیشمانیایی و ضد التهابی عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه در شرایط برون‌تنی و در مطالعه‌ی آلن (۱۹) اثرات ضد کوکسیدیایی در جوجه‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفته و نتایج رضایت بخش بوده است. در مطالعه‌ی حاضر، نشان داده شد که عصاره‌ی الکلی خام پیکر رویشی گیاه اکیناسه فقط در شرایط درون‌تنی بر روی تاک‌ی‌زوئیت‌های توکسوپلازما موثر است. بر اساس مدل رگرسیون خطی، هرچند که عصاره گیاه در غلظت ۷۸۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۵ ساعت باعث از بین بردن ۵۰ درصد تاک‌ی‌زوئیت‌ها در شرایط برون‌تنی گردید، اما همچنان که در نمودار ۱ مشخص است، بین میزان کشندگی و غلظت عصاره یک رابطه خطی با شیب ملایم ($0/01$) وجود دارد و IC_{50} نزدیک به حداکثر غلظت مورد استفاده عصاره، بعد از ۵ ساعت به دست آمد. به عبارت دیگر افزایش غلظت و گذشت زمان، هیچ‌کدام در افزایش میزان کشندگی تاک‌ی‌زوئیت‌ها نسبت به گروه کنترل تأثیر معنی‌داری نداشت. صرف نظر از محدود بودن تعداد تکرار آزمایش و ناهمگنی نتایج درون گروهی که ممکن است بر نتایج کلی موثر باشد، این واقعیت را بایستی در نظر داشت که بخش زیادی از خواص ضد میکروبی این عصاره و ترکیبات گیاه، مربوط به اثرات ضد التهابی و افزایش قدرت دفاعی بدن میزبان در برابر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۱۱-۱۳). برعکس شرایط برون‌تنی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد در مدل توکسوپلاسموز حاد موشی، میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان با عصاره اکیناسه نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). به طوری که میانگین بقای موش‌هایی که عصاره دریافت کرده بودند حداقل ۶/۵ روز، در حالی که میزان بقا در گروه شاهد فقط ۵ روز بود (جدول ۲).

همچنان‌که در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها اشاره شد، اثرات بازدارندگی عصاره این گیاه بر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما در بدن موش‌های آلوده ممکن است به طور مستقیم یا به واسطه‌ی تقویت سیستم ایمنی باشد. در پژوهشی که بر روی جوجه‌های آلوده به کوکسیدیا (*Eimeria spp.*) انجام گرفته است، غنی‌سازی رژیم غذایی آن‌ها با عصاره‌ی ریشه‌ی اکیناسه به طور معنی‌داری در کاهش زخم‌های روده و بهبود سلامت جوجه‌های آلوده نسبت به گروه کنترل موثر بود (۱۹). با توجه به این که در این پژوهش نیز همانند مطالعه ما، پارامترهای ایمنی نظیر فاکتورهای پیش التهابی یا میزان فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها اندازه‌گیری نشده است، مشخص نیست که نتایج مشاهده شده آیا به واسطه اثرات مستقیم ضد کوکسیدیایی عصاره است یا به واسطه تعدیل و تقویت سیستم ایمنی جوجه‌های آلوده می‌باشد.

در مطالعه‌ی کانالز و همکاران (۱۳)، اثرات ضد لیشمانیایی و تریپانوزومیایی سه عصاره‌ی اتانولی و آبی متفاوت از اندام‌های هوایی اکیناسه/پورپورا مورد ارزیابی قرار گرفت و هر سه عصاره‌ی تهیه شده بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در جلوگیری از رشد این تک‌یاخته‌ها موثر بودند، اما در کل عصاره‌ی اتانولی اثرات بیشتری نشان داد. در همین مطالعه عصاره‌ی اتانولی از القای ترشح فاکتورهای پیش التهابی IL-6 و IL-8 توسط لیشمانیا دونوانی در دو کشت مختلف سلولی انسان (لاین‌های سلولی اپیتلیال و برونشیل) جلوگیری کرد. برعکس مطالعه‌ی ما، در مطالعه سودی و همکاران، غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی ریشه اکیناسه/پورپورا در ممانعت از رشد و تکثیر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور در محیط کشت موثر بوده است، به طوری که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره، قادر به کشتن ۱۰۰ درصد انگل در مدت ۴۸ ساعت بود (۱۴). البته تفاوت مشاهده شده در نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی سودی و همکاران، ممکن است به دلایل تفاوت نوع انگل مورد بررسی، زمان

تأثیر و غلظت‌های مورد استفاده عصاره رخ داده باشد که در مطالعه‌ی آنها، زمان تأثیر و غلظت مورد استفاده عصاره به مراتب بیشتر بود. علاوه بر این، عصاره مورد استفاده‌ی آن‌ها از ریشه‌ی گیاه تهیه شده است و به استناد مقالات مروری در زمینه ترکیبات فیتوشیمیایی و فعال اکیناسه، تفاوت‌هایی در مواد فعال و موثر اندام‌های رویشی از جمله ساقه، گلبرگ و ریشه گیاه دیده شده است (۵ و ۴). از طرف دیگر در مطالعات حیوانی، روش و مسیر تجویز عصاره ممکن است کارآیی و اثرات ضدانگلی آن را تحت تأثیر قرار دهد. برای نمونه در مطالعه‌ی ساداتی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی شیراز (۲۰)، تجویز خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی اکیناسه/پورپورا در کنترل و التیام زخم ناشی از انگل لیشمانیا مازور در موش‌ها موثر نبوده است.

در نهایت همچنان که در مقدمه اشاره شد، درمان ترکیبی و رایج توکسوپلاسموزیس در بیماران مبتلا به اختلالات سیستم ایمنی، توکسوپلاسموز چشمی و در مادران باردار گاهی اوقات با عوارض شدیدی همراه است (۲). گیاهان دارویی در اغلب موارد، به دلیل پایین بودن عوارض جانبی و پذیرش مطلوب توسط بیماران، در صورت اثر درمانی مطلوب، می‌توانند به عنوان درمان جایگزین و یا کمکی مورد استفاده قرار گیرند. در حال حاضر گرچه اثرات و فواید درمانی عصاره و ترکیبات مختلف اکیناسه/پورپورا بر روی تعدادی از باکتری‌ها و انواع ویروس‌ها به ویژه آن‌هایی که در عفونت سیستم تنفسی فوقانی درگیرند، به خوبی شناخته شده و در مقاله‌ای به تفصیل مرور شده است (۶)، اما در خصوص اثرات ضدانگلی آن، پژوهش‌ها اندک است (۱۹ و ۱۴ و ۱۳). در مجموع پژوهش حاضر به عنوان یک مطالعه مقدماتی، تأثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌ی الکلی این گیاه را در مدل حیوانی توکسوپلاسموز حاد تأیید می‌کند و حداقل می‌توان از منظر درمان کمکی توکسوپلاسموزیس حاد، مطالعات بعدی را طراحی و اجرا کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در شرایط برون‌تنی، عصاره الکلی اکیناسه/پورپورا در غلظت‌های مورد استفاده، اثر کشندگی مطلوبی بر روی تاک‌ی‌زوئیت‌های توکسوپلازما ندارد، ولی در مدل توکسوپلاسموز حاد موشی، موجب افزایش معنی‌دار زمان بقای موش‌های آلوده نسبت به گروه کنترل می‌شود. با توجه به اطلاعات موجود در خصوص مکانیسم اثرات ضد میکروبی این عصاره گیاهی که ممکن است به طریق مستقیم و یا با واسطه‌ی تقویت سیستم ایمنی میزبان اعمال شود، به نظر می‌رسد افزایش زمان بقای موش‌ها در مطالعه‌ی ما، حاصل تقویت نسبی سیستم ایمنی موش‌های گروه درمان باشد. البته این موضوع نیاز به بررسی و مطالعات

بیشتری دارد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، تاثیر عصاره‌ی خام یا ترکیبات بیواکتیو شناخته شده آن در تحریک و تقویت سیستم ایمنی میزبان از قبیل تحریک فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سیتوکاین‌های پیش التهابی، مورد مطالعه قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان‌نامه تحقیقاتی کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی پزشکی با کد مصوب A-12-95-2 دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه به خاطر پشتیبانی مالی پایان‌نامه اعلام می‌دارند.

References

- 1- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363: 1965-76.
- 2- Saei E. Textbook of Clinical Parasitology: protozoal diseases in Iran. Tehran; Aeeizh (5th ed); 2011. [in Persian].
- 3- Omidbaigi R. Study of cultivation and adaptability of purple coneflower (*Echinacea purpurea*) in the North of Tehran. *J Isfahan Univ Tech*. 2002; 6: 231-41.
- 4- Kumar KM, Ramaiah S. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. *Int J Pharm Bio Sci*. 2011; 2: 304-14.
- 5- Taghi Zadeh M, Jarvandi S, Yasa N. Review of *Echinacea*. *J Med Plants*. 2002; 3: 13-25.
- 6- Hudson JB. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (purple coneflower) in

- infectious diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012.
- 7- Hudson J, Vimalanathan S, Kang L, Amiguet VT, Livesey J, Arnason JT. Characterization of antiviral activities in *Echinacea* root preparations. *Pharm Biol*. 2005; 43: 790-96.
- 8- Vimalanathan S, Kang L, Amiguet VT, Livesey J, Arnason JT, Hudson J. *Echinacea purpurea* aerial parts contain multiple antiviral compounds. *Pharm Biol*. 2005; 43: 740-45.
- 9- Teymouri Zadeh Z, Rahimi SH, Karimi Torshizi MA, Omidbaigi R. The effects of *Thymus vulgaris* L., *Echinacea purpurea* (L.) Moench., *Allium sativum* L. extracts and virginiamycin antibiotic on intestinal microflora population and immune system in broilers. *Iran J Med Arom Plants*. 2009; 25: 39-48.

- 10- Sharma M, Vohra S, Arnason JT, Hudson JB. *Echinacea* extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria. *Pharm Biol.* 2008; 46: 111-16.
- 11- Sharma SM, Anderson M, Schoop SR, Hudson JB. Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized *Echinacea* extract (Echinaforce): dual actions against respiratory bacteria. *Phytomedicine.* 2010; 17: 563-68.
- 12- Hashemi SM, Soudi S, Ghaemi A, Soleimanjahi H, Hassan ZM. Study of the effect of *Echinacea purpurea* extract on cellular delayed type hypersensitivity and splenocyte proliferation in BALB/c Mice. *Yakhteh.* 2008; 9: 254-61.
- 13- Canlas J, Hudson JB, Sharma M, Nandan D. *Echinacea* and trypanosomatid parasite interactions: growth inhibitory and anti-inflammatory effects of *Echinacea*. *Pharm Biol.* 2010; 48: 1047-52.
- 14- Soudi S, Hashemi SM, Zavaran Hosseini A, Ghaemi A, Asghari Jafarabadi M. Antileishmanial effect of *Echinacea purpurea* root extract cultivated in Iran. *Iran J Pharmaceut Res.* 2007; 6: 147-49.
- 15- Tanaka T, Omata Y, Saito A, et al. *Toxoplasma gondii*: Parasitocidal effects of bovine lactoferricin against parasites. *Exp Parasitol.* 1995; 8: 614-7.
- 16- Jafari F, Nourian A, Fazaeli A, Yazdinezhad A, Haniloo A. In vitro activity of *Alkanna frigida* extracts in comparison with glucantime against *Leishmania major*. *Iran J Microbiol.* 2013; 5: 177-82.
- 17- Vimalanathan S, Kang L, Amiguet VT, Livesey J, Arnason JT, Hudson J. *Echinacea purpurea* aerial parts contain multiple antiviral compounds. *Pharm Biol.* 2005; 43: 740-45.
- 18- Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson JB. Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (SOIV). *Virol J.* 2009; 6: 197-202.
- 19- Allen PC. Dietary supplementation with *Echinacea* and development of immunity to challenge infection with coccidian. *Parasitol Res.* 2003; 91: 74-8.
- 20- Sadati MS, Sarkari B, Asgari Q, Hatami S, Tavakl E. Effect of *Echinacea purpurea* on control of *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis in mice. *Armagan-e-danesh.* 2010; 16: 31-40.

The Efficacy of *Echinacea purpurea* Alcoholic Extract on *Toxoplasma* in vitro and Acute Toxoplasmosis in a Mouse Model

Ahang S¹, Haniloo A¹, Faghih Zadeh S²

¹Dept. of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical, Zanjan, Iran.

²Dept. of Biostatistics, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Haniloo A, Dep. of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: hani@zums.ac.ir

Received: 26 Apr 2015 **Accepted:** 26 Aug 2015

Background and Objective: Current and common treatment of toxoplasmosis consist of oral administration of pyrimethamine and sulfadiazine. However, this drug combination has substantial toxicity and side effects on patients, especially in immunocompromised individuals. *Echinacea purpurea* is a medicinal plant with antimicrobial properties which boosts the immune system. This study was carried out to evaluate the anti-toxoplasma effect of *E. purpurea* extract in vitro and acute toxoplasmosis in a mouse model.

Materials and Methods: Parasite suspension containing 42000 live toxoplasma tachyzoites (RH strain) was added to serial concentrations of 50, 100, 200, 500 and 1000 µg/ml alcoholic extract of *E. purpurea* and incubated at 37°C for 5 hours. Then, IC₅₀ was calculated using linear regression. Subsequently, 48 BALB/c mice were assigned to 5 treatment groups and a control group and were intraperitoneally infected with 10⁴ tachyzoites. 24 hours post infection, the *E. purpurea* extract was injected intraperitoneally by the aforementioned concentrations on a daily basis until the death of the mice. The control group received sterile saline. Survival time of the groups was analyzed by One way ANOVA and Duncan tests and between-group differences at the level of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: Using linear regression, IC₅₀ values of *E. purpurea* extract was 784 µg/ml, after 5 hours. The mean survival time of the mice in the treated groups was significantly higher than the control group, respectively 6.5±0.9 and 5±0.0 days ($P < 0.05$). The maximum survival time (7.3±1.0) without any significant difference with other test groups, was obtained in the fifth group (1000 µg/ml).

Conclusion: The tested concentrations of alcoholic extract of *E. purpurea* did not pose any inhibitory effect on tachyzoites in vitro, but significantly increased the survival time of the infected mice in vivo.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Tachyzoites, *Echinacea Purpurea*, Mice, In vitro