

بررسی اثر آزمایشگاهی گل ختمی بر روی فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

دکتر شریف مراغی *، مهندس محمد حسین فیض حداد *، دکتر محمد لیراوی **

خلاصه:

گل ختمی کاربرد زیادی در درمان بیماریهای مختلف بخصوص بیماریهای پوستی دارد. این گیاه از تیره پنیرک بوده و دارای گونه‌های متفاوتی است. در بررسی انجام شده غلظتهای مختلف از عصاره آبی - الکلی گل ختمی بر روی فرمهای پروماستیگوت لیشمانیا ماژور اثر داده شد و مشخص شد که این گیاه با حداکثر غلظت ۱/۶۹۸ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر و IC50 معادل ۰/۹۱۶ میلی گرم درصد باعث مهار تحرک و در همان غلظت و با IC50 معادل ۰/۹۳۰ میلی گرم درصد باعث رشد کامل فرمهای پروماستیگوت می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: گل ختمی، پروماستیگوت.

مقدمه:

در حال حاضر حدود ۱۲ میلیون نفر در دنیا به این انگل آلوده و ۳۵۰ میلیون نفر نیز در معرض آلودگی به این انگل قرار دارند کودکان بیش از هر گروه سنی دیگر به این بیماری حساس هستند سوء تغذیه و ضعف سیستم ایمنی زمینه ساز ابتلاء به بیماری در افراد می‌باشد (۶). از مهمترین مراکز آلودگی به سالک در جهان می‌توان به کشورهای شرقی - منطقه خاورمیانه با آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری اشاره نمود در حالیکه شیوع این بیماری در منطق کوهستانی کمتر می‌باشد سابقه بیماری سالک در کشور ایران طولانی است. بطوریکه اولین بار محمد بن زکریای رازی در قرن پانزدهم هجری این بیماری را توصیف نموده است و هشت قرن بعد پزشکان روسی این بیماری را گزارش نمودند. از نظر انتشار بیماری در ایران نیز استانهای خراسان و اصفهان

گل ختمی گیاهی علفی از تیره پنیرک است که دارای گونه‌های متفاوتی می‌باشد. تمام قسمتهای مختلف این گیاه دارای اثرات درمانی است. یکی از کاربردهای این گیاه در درمان سالک می‌باشد (۱). این بیماری از قدیم در کشور ایران شناخته شده است. بطوریکه در کتب قدیم پزشکی ایران از جمله قانون ابن سینا از آن به عنوان زخمی یاد شده که خیرونیه نام دارد. این زخم مدتها دوام داشته و درمان آن مشکل و مقاوم به داروهای گوناگون می‌باشد.

سالک یا لیشمانیوز جلدی پس از بیماری مالاریا شایعترین بیماری منتقله توسط حشرات می‌باشد. که در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان بخصوص جهان سوم شایع است (۲).

* گروه انگل شناسی - دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اهواز.

** فارغ التحصیل، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اهواز.

روش کار:

لیشمانیای مورد نظر در این تحقیق از فرم پروماستیگوت لیشمانیاماژور با کد ژنتیکی MRHO/IR/75/ER از بخش ایمنولوژی انستیتوپاستور تهران تهیه شده که با حفظ ویروالانس در موش BALB/C تکثیر یافته است. این نوع لیشمانیادر محیط کشت نوری - نیکول - مک نیل (N.N.N) تکثیر داده شده و جهت تهیه پروماستیگوت از فاز مایع محیط کشتیابی استفاده گردیده که در آنها پروماستیگوت ها در مرحله ایستایی (Stationary phase) از رشد، قرار داشتند زیرا در این حالت پروماستیگوت دارای حداکثر فعالیت و قدرت بیماریزایی می باشند. جهت حذف عوامل اضافی و نیز افزایش تعداد انگل در واحد حجم، فاز مایع برداشت شده از محیط کشت ۳ مرتبه بوسیله سرم فیزیولوژی شستشو و سانتریفوژ گردید. انگلها بروش Dilution - counting و با استفاده از لام هموسایتومتر تثویر شمارش و تعداد $2/7 \times 10^6$ پروماستیگوت در هر میلی لیتر تعیین گردید.

گل ختمی (*Althea officinalis*) در اواخر خردادماه و اوایل تابستان یعنی فصل گل دادن گیاه در استان خوزستان در اهواز جمع آوری شده و سپس گلهای مذکور خشک، پودر و بوسیله عبور از الک مواد زائد آنها جدا گردید و بعد بروش خیساندن اقدام به عصاره گیری شد. بدین ترتیب که ۲۵ گرم پودر به همراه ۱۳۵ سی سی الک ۹۶ درجه و ۲۵ سی سی آب مقطر در یک ارلن مایر ریخته و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد تا عمل خیساندن بهتر انجام گیرد. سپس عصاره مذکور صاف و توسط دستگاه تقطیر در خلاء و در حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد تغلیظ و چگالی (دانسیته) عصاره غلیظ شده به کمک پیکنومتر

دو کانون اصلی این بیماری می باشند جنس لیشمانیا دارای دو فرم آماستیگوت (لیشمانیایی) و پروستیگوت (لپتوموناس) می باشد که فرم اول انگل اجباری سلولهای رتیکولواندو تلیال بدن مهره داران است این فرم لیشمانیا فاقد تاژک می باشد (۳).

در فرم پروماستیگوت انگل دارای تاژک نازک و دراز در قسمت قدامی خود است. این فرم دارای حرکت می باشد. پروماستیگوت فرم آلوده کننده انگل است که از طریق نیش پشه های خاکی ماده به میزبان مهره دار تلقیح می شود و سپس بسوی ماکروفاژهای جلدی جلب و بداخل آنها نفوذ و پس از تبدیل شدن به فرم لیشمانیایی شروع به رشد و تکثیر می نمایند (۴).

ناقل بیماری سالک پشه خاکی است که از جنس فلپتوموس می باشد. تاکنون داروهای متفاوتی در درمان لیشمانیوز پوستی استفاده شده است که از جمله آنها می توان به ترکیبات آنتی موان پنج ظرفیتی اشاره نمود. این ترکیبات بیشتر از یک قرن در درمان سالک سابقه مصرف دارند. مکانیسم اثر این ترکیبات از طریق اثر بر روی آنزیمهای انگل و بخصوص وقفه فعالیت آنزیم فسفوفروکتوکیناز و جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) می باشد.

پنتامیدین نیز از جمله داروهایی است که در درمان لیشمانیازیس کاربرد دارد. مکانیسم اثر آن از طریق اثر بروی DNA کینتو پلاست و شکستن آن می باشد. این دارو بصورت تزریقی در درمان سالک بکار می رود. گزارشاتی نیز از مؤثر بودن داروی آمفوتریسین B از طریق وریدی در درمان لیشمانیوز پوستی وجود دارد. این دارو در لیشمانیازیس پوستی - مخاطی توصیه شده است بخصوص زمانی که به ترکیبات آنتی موان پاسخ درمانی مطلوب داده نشود (۷).

جدول شماره ۱: درصد مهار رشد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در غلظت‌های مختلف گل ختمی

غلظت mg/100 ml	درصد رشد	درصد مهار
۰	۱۰۰	۰
۰/۶۷۹	۸۱	۱۹
۰/۷۹۹	۶۹	۳۱
۰/۸۴۹	۵۱	۴۹
۰/۹۷۰	۴۵	۵۵
۱/۳۵۸	۱۱	۸۹
۱/۶۹۸	۰	۱۰۰

جدول شماره ۲: نسبت مهار رشد فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در عصاره گل ختمی

جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
غلظت	۰	۰/۶۷۹	۰/۷۹۹	۰/۸۴۹	۰/۹۷۰	۱/۳۵۸	۱/۶۹۸
تعداد پروماستیگوت فعال	۲/۱×۱۰ ^۵	۱/۷×۱۰ ^۵	۱/۴۴×۱۰ ^۵	۱/۰۷×۱۰ ^۵	۹/۴×۱۰ ^۵	۳/۳×۱۰ ^۵	۰
درصد رشد	۱۰۰	۸۱	۶۹	۵۱	۴۵	۱۱	۰
درصد عدم رشد	۰	۱۹	۳۱	۴۹	۵۵	۸۹	۱۰۰

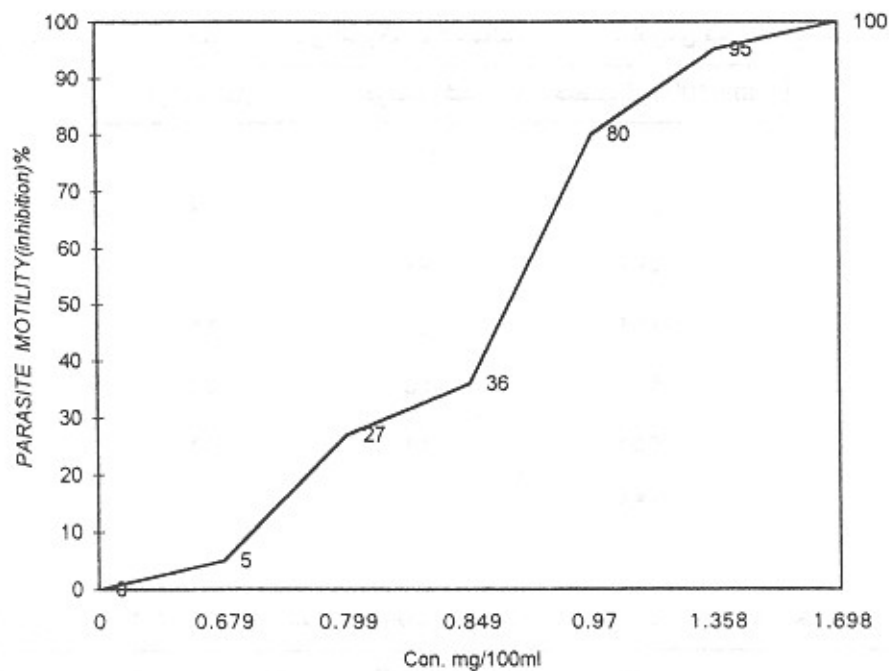
مدت یک هفته در دمای 24 ± 2 درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت شمارش انگل‌ها انجام گردید. سپس برای مدت یک هفته با بررسی میکروسکوپ فاز آبی محیط‌ها از نظر رشد پروماستیگوت و تکثیر آنها مورد بررسی و شمارش قرار گرفتند و با لوله‌های کنترل که فقط حاوی انگل بودند مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج:

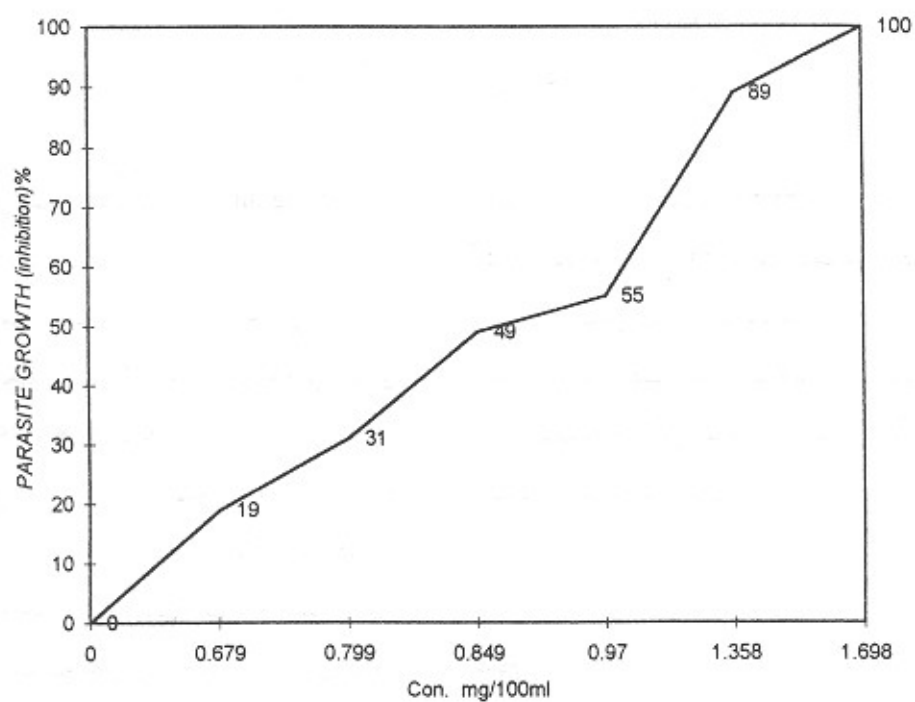
در این بررسی ابتدا میزان رشد انگل در حالت بدون دارو (کنترل) اندازه‌گیری شد و سپس اثر عصاره گل ختمی در غلظت‌های فوق‌الذکر نسبت به گروه شاهد کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصل در جدول

اندازه‌گیری شد که میزان آن $1/67642 \text{ g/ml}$ محاسبه شده است.

پس از تعیین میزان دانسته عصاره گل ختمی، با یک میلی لیتر از محلول استوک توسط سرم فیزیولوژی غلظت‌های ۰/۶۷۹، ۰/۷۹۹، ۰/۸۴۹، ۰/۹۷۰، ۱/۳۵۸، ۱/۶۹۸ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد و پس از انجام مراحل فوق به هر یک از حفرات لوله‌های کشت $100 \mu\text{l}$ از مایع حاوی پروماستیگوت افزوده شد. سپس به تمامی لوله‌ها به جزء لوله‌های کنترل دو برابر غلظت‌های عصاره گل ختمی اضافه گردید بطوریکه ۵ لوله پس از کنترل به ترتیب حاوی ۰/۶۷۹، ۰/۷۹۹، ۰/۸۴۹، ۰/۹۷۰، ۱/۳۵۸، ۱/۶۹۸ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر عصاره گل ختمی بودند. سپس تمامی لوله‌ها به



نمودار ۱: وابستگی مهار تحرک فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور توسط عصاره گل ختمی.



نمودار ۲: وابستگی مهار رشد فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور توسط عصاره گل ختمی.

شماره ۱ درج گردیده است. همچنین با استفاده از آزمون فرضیه تفاوت بین نسبتهای دو جمعیت وابستگی مهار رشد انگل، با غلظتهای عصاره گل ختمی مشخص گردید (نمودار شماره ۱) سپس با توجه به میزان رشد در گروه شاهد میانگین بدست آمده از بررسی لوله‌های تست نسبت به آن سنجیده شد به منظور مقایسه بین میانگین‌های بدست آمده از بررسی لوله‌های تست با میانگین گروه شاهد، از روش نسبتها استفاده شد که نتایج بدست آمده نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها است. جدول شماره ۲ نسبت به مهار رشد فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در غلظتهای مختلف عصاره گل ختمی را نشان می‌دهد. IC_{50} با استفاده از تابع و بکارگیری کامپیوتر محاسبه شد که مقدار این پارامتر $0.93 \pm$ بدست آمد (نمودار شماره ۲).

بحث و نتیجه‌گیری:

سالم یک بیماری مزمن با اتیولوژی مشخص، دوره کمون و سیر بالینی متغیر و واکنشهای بافتی متفاوت و عوارض گوناگون می‌باشد. این بیماری بین انسان و حیوان مشترک بوده و پس از بهبودی مصونیت ایجاد می‌کند. با وجود آنکه مطالعات زیادی جهت درمان این بیماری صورت گرفته، معهذاً روز بروز شاهد شیوع بیشتر این بیماری و عدم موفقیت در درمان آن هستیم.

سالم یک بیماری شایع در کشور ما بخصوص در خوزستان می‌باشد، قدمت این بیماری احتمالاً از زمان پیدایش سه عامل اصلی و مؤثر در آن یعنی انسان، پشه خاکی، سگ و جوندگان بوده است.

در زمینه درمان این بیماری تحقیقات وسیعی بر روی داروهای متعدد بصورت تزریقی و موضعی و

خوراکی انجام گرفته است اما عوارض جانبی زیاد برخی از این داروها مانع از کاربرد وسیع آنها گردیده است. در مورد داروهای تزریقی تحمل درد ناشی از تزریق مکرر در عضله و یا در موضع همچنان مقاوم و سرکش مانده است. تکرار تزریق آمفوتریسین B باعث اسکروز و رید و مسدود شدن رگ، نارسایی حاد کلیوی، پلی نروپاتی و نیز دپرسیون مغز استخوان و کم خونی می‌شود. امروزه در اکثر مراکز بهداشتی درمانی کشور مان از آمپولهای گلوکانیتم بصورت تزریق موضعی و عضلانی جهت درمان سالک استفاده می‌شود. تزریق این دارو علاوه بر دردهای ناشی از تزریق باعث عوارض جانبی از قبیل تهوع، استفراغ، آسیب کبدی و کلیوی، میوکاردیت و پلی نوریت در برخی بیماران می‌شود. لذا پژوهش و تحقیق در رابطه با درمان مؤثر و مطمئن و نیز عاری از عوارض جانبی خطرناک و نیز پیشگیری از این بیماری حائز اهمیت فراوان می‌باشد.

در این تحقیق ما نیز بر اساس گفته‌های عوام و مستندات موجود در کتب سنتی بر آن شدیم که از گل ختمی که فاقد اثرات جانبی ناخواسته است، بصورت عصاره آبی و الکلی استفاده کنیم (۵). نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داده است که IC_{50} جهت مهار تحرک و رشد به ترتیب $0.916 \pm$ و $0.93 \pm$ در 100 میلی لیتر می‌باشد. هم چنین مشخص گردید که بالاترین غلظتهای عصاره گل ختمی در مهار تحرک و رشد صددرد فرمهای پروماستیگوت $1/698$ میلی گرم در 100 میلی لیتر می‌باشد. از آنجائیکه فرمهای پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در میزان بدون مهره تشکیل و تکثیر می‌یابند و این فرمها عناصر آلوده کننده برای میزان مهره دار و از جمله انسان می‌باشند و با توجه به تأثیری که این عصاره بر فرمهای مزبور داشته

- است، لذا به نظر می‌رسد کاربرد موضعی این گیاه بر روی زخم‌های سالک بتواند بر روی فرم‌های آماس‌تیکوت (لیشمانیایی) تأثیر گذاشته و احتمالاً باعث بهبود لیشمانیوز جلدی شود.
- کتابنامه:**
- ۱- زرگری، ع «گیاهان دارویی»، جلد اول، انتشارات امیرکبیر ۱۳۴۵، صفحات ۳-۳۵۲.
 - ۲- اصلیان، ع «لیشمانیوز جلدی (سالک) و روش‌های درمانی و پیشگیری آن، چاپ اول، تابستان ۱۳۷۱ انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان».
 - ۳- اورمزدی، ه «انگل‌شناسی» جلد اول، تک یاخته شناسی، چاپ چهارم، موسسه انتشارات جهاد
 - دانشگاهی، زمستان ۱۳۷۲، صفحات ۲۷۴-۲۰۱.
 - ۴- اصلیان، ع «درمان سالک بوسیله تزریق امتین داخل ضایعه»، مجله دارو و درمان ۱۳۶۹، شماره ۸۴ صفحه ۱۷.
 - ۵- رجحان، م. ص «درمان بوسیله گیاهان دارویی»، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران سال ۱۳۷۱، صفحات ۵۴-۵۵.
 - 6 - Who Report on the Consaltative meeting on leichmania /HIV Co Infection ,6-7 september 1994.
 - 7 - Torre - Cisneros ,j,Para JL ,et al < Liposomal amphotericin , B, Clin , Infect.Dis.1994 Jun , 18(16): 1024 - 5 .