پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۱، شماره ۳، صفحات ۴۶-۵۴ (مهر- آذر ۱۳۷۶)

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف گیاه هیدراهلیکس و آمپول گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی به روش invitro در کاشان (سال ۱۳۷۳)

دکتر صفرعلی طالاری، حسین هوشیار و مهندس منصور سیاح
گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

خلاصه

در این بررسی تاثیر مقایسه غلظت‌های مختلف گیاه هیدراهلیکس (Hedera helix) و آمپول گلوکانتیم (Glucantime) بر دو گونه لیشمانیوز جلدی، نوع روستائی Leishmania major (MRHO/IR/64/Nadim I) و L.tropica (MHON/SU/74/K27) تایید شده سازمان جهانی بهداشت به روش تجربی انجام شد. روش مطالعه و مراحل انجام آن برای هر یک از عوامل انگلی فوق یکسان بود و شامل تعداد ۱۴ ردیف دەتایی لوله‌های محتوی محیط کشت N.N.N، تعداد معینی پروماستیگوت کشت داده شده بود که در ۶ ردیف دەتایی آن از غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرم در سانتیمتر مکعب سرم فیزیولوژی؛ ۶ ردیف دەتایی دیگر عفونت‌های مشابه از عصاره گیاه هیدراهلیکس و در دو ردیف دەتایی باقی مانده (گروه شاهد) فقط سرم فیزیولوژی اضافه شد. تمام لوله‌ها در حرارت ۲۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد و همه روزه به مدت ۱۰ روز با لام نئوبار و میکروسکوپ تعداد انگلهای زنده شمارش شده، به ثبت رسید.

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که اثر گلوکانتیم بر لیشمانیا ماژور بیشتر از لیشمانیاتروپیکا می‌باشد؛ در حالی که اثر هیدراهلیکس بر هر دو انگل تقریبا" یکسان است؛ و درصد انگلهای زنده و زمان زنده بودن آنها در لوله‌های محتوی غلظت‌های مختلف هیدراهلیکس کمتر از غلظت‌های مشابه آن با گلوکانتیم می‌باشد. نتایج حاصل با آزمون آماری t مورد تحلیل قرار گرفت و در نتیجه مشخص شد که اختلاف موجود از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P<0/003$).

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای مشترك بین انسان و حیوان است که از طریق گونه‌های مختلف فلبوتوموس منتقل می‌شوند. در حال حاضر، ایران در جهان یکی از کانونهای این بیماری می‌باشد که به طور عمده توسط دو گونه L.major و L.tropica ایجاد می‌شود (۱). این بیماری اگرچه از نظر مرگ و میر و معلولیت، در مقایسه با سایر بیماریها، مشکل زیادی به وجود نمی‌آورد اما به دلایل مختلفی نظیر طولانی بودن دوره زخم، احتمال عفونت‌های ثانویه، هزینه‌های درمانی سنگین برای جامعه، طول دوره درمان و عوارض ناشی از درمان با داروهای موجود، اشکالات زیادی به بار می‌آورد (۲).

در حال حاضر، درمان بیماری در بیشتر موارد با گلوکانتیم انجام می‌شود. اگرچه برخی از گونه‌های لیشمانیا نسبت به درمان با گلوکانتیم، بد جواب می‌دهند و نیاز به تزریقات مکرر دارد و مقدار آن نیز بایستی بیش از حد تعیین شده باشد که این مسئله، خود موجب اتلاف وقت، هزینه‌های اقتصادی و بروز مشکلات درمانی می‌شود (۳). گیاه هیدراهلیکس یا عشقه یک گیاه ساپروفیت و همیشه سبز از تیره گیاهان Araliacea می‌باشد که دور گیاهان و درختان می‌پیچد و با ریشه‌های نابجا و جانبی به تنه آنها متصل می‌شود. این گیاه گسترش زیادی دارد به گونه‌ای که از نواحی غرب اروپا تا سرحد روسیه وجود دارد؛ و در قفقاز، ارمنستان، ایران و لبنان نیز روییده می‌شود. در ایران در مناطق کردستان و شاهرود، بیش از مناطق دیگر کشور دیده می‌شود (۴). در این مطالعه، مقایسه تعیین اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس را نسبت به اثرات داروی گلوکانتیم به روش invitro بر گونه‌های L.major و L.tropica در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان مورد بررسی قرار دادیم تا با دست‌یابی به اثرات احتمالی عصاره این گیاه و با توجه به تهیه ساده و ارزان آن به اقتصاد کشور و مبتلایان کمک شود.

مواد و روش‌ها

این بررسی یک تحقیق تجربی است که در کاشان روی پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی نوع شهری و روستایی در شرایط یکسان، طبق مطالعات ماجستر انجام شد (۶). ابتدا برگ گیاه هیدراهلیکس یا عشقه را از اداره منابع طبیعی و امور دام استان اصفهان تهیه و با آب کاملا" شسته شد؛ سپس در مورد L.major و L.tropica مطالعه کردند که اثر درمانی گلوکانتیم نسبت به دو داروی دیگر بیشتر بوده است (۷). در سال ۱۹۹۱ ماجستر و همکارانش در فرانسه عصاره گیاه هیدراهلیکس را با گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های L.infantum - بدون در نظر گرفتن غلظت‌های مختلف آنها- مورد مطالعه قرار دادند و اعلام کردند که عصاره این گیاه بر پروماستیگوت‌های یاد شده موثرتر از گلوکانتیم بوده است (۶).

در سال ۱۳۷۱ فتی، در مشهد اثر شیرابه، عصاره و ماده موثر برگ فرفیون را بر پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی نوع شهری مطالعه کرد. نتایج نشان داد که غلظت ۳ میلیگرم در لیتر آن پس از ۷۲ ساعت منجر به از بین رفتن کلیه پروماستیگوت‌های مورد مطالعه شده است (۵).

با توجه به مطالب بالا اثر گلوکانتیم نسبت به داروهای دیگر مورد بررسی، بیشتر ولی نسبت به هیدراهلیکس کمتر بوده است. نتایج مقایسه غلظت‌های گلوکانتیم و عصاره گیاه فوق در این بررسی نشان داد که نتایج به دست آمده مشابه تحقیقات ماجستر روی عامل لیشمانیوز احشائی بوده است. در تحقیقات فتی، غلظت ۳ میلیگرم در میلیلیتر عصاره برگ گیاه فرفیون پس از ۷۲ ساعت باعث شد که پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی به طور کامل از بین بروند؛ در حالی که

در این بررسی در تمام غلظت‌های بکار رفته عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس، پس از ۴۸ ساعت کلیه پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی از بین رفتند. لذا می‌توان اظهار داشت که اثر عصاره گیاه هیدراهلیکس بر عامل لیشمانیوز جلدی بیش از عصاره فرفیون است. بنابراین مصرف گیاه هیدراهلیکس به جای داروی گلوکانتیم پس از مطالعه تاثیر آن روی زخم ایجاد شده در حیوانات آزمایشگاهی و در صورت موثر بودن و نداشتن عوارض جانبی- با توجه به در دسترس بودن و صرفه اقتصادی آن - انتظار می‌رود که شاید این نوشتار مبنایی باشد که به درمان موضعی زخمهای لیشمانیائی پی برده شود.

نتایج

تاثیر غلظت‌های عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس روی پروماستیگوت‌های L tropica نشان می‌دهد که پس از ۲۴ ساعت غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرمی آن باعث می‌شود که پروماستیگوت‌های موجود در محیط کشت به طور کامل نابود شود. غلظت ۲۵ میلیگرم پس از ۴۸ ساعت و غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلیگرم آن پس از ۷۲ ساعت موجب از بین رفتن کلیه پروماستیگوت‌ها شد؛ درحالی که، در گروههای شاهد در تعداد پروماستیگوت‌ها کاهشی وجود نداشت (جدول ۱، نمودارهای ۱ و ۲).

نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف گلوکانتیم بر عامل لیشمانیوز جلدی نوع شهری نشان می‌دهد که پس از ۲۴ ساعت پروماستیگوتهای L tropica کاهش نیافته، پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرم آن به ترتیب ۵۴/۲ و ۳۲/۷ درصد پروماستیگوتها زنده بودند و پس از پنج روز کلیه انگلها از بین رفتند. در غلظت‌های ۲۵ میلیگرم پس از ۴۸ ساعت ۷۶/۹ درصد زنده ماندند و پس از شش روز همه نابود شدند. در غلظت‌های ۱۰ میلیگرم در روز چهارم ۵۳/۲ درصد و در غلظت‌های ۱ و ۵ میلیگرمی آن در روز پنجم به ترتیب ۳۶/۷ و ۵۳/۳ درصد زنده بوده، پس از هفت روز کلیه لوله‌ها-در مقایسه با گروه شاهد- فاقد انگل زنده بودند (جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲).

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ این گیاه بر پروماستیگوت‌های L major (جدول ۲ و نمودارهای ۳ و ۴) نشان می‌دهد که پس از ۲۴ ساعت غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرم آن موجب شد که پروماستیگوت موجود در لوله‌های محیط کشت کاملا" نابود شوند. غلظت ۱۰ میلیگرم پس از ۴۸ ساعت، ۵ و ۱ میلیگرم پس از ۷۲ ساعت موجب از بین رفتن کلیه پروماستیگوت‌های L major (در مقایسه با گروه شاهد) شد. غلظت‌های مختلف گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های L major در جدول ۲ و نمودارهای ۳ و ۴ نشان می‌دهد که پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلیگرم در سانتیمترمکعب آن، به ترتیب ۵۰ و ۶۷/۷ درصد؛ پس از ۴۸ ساعت، ۳۲/۲ و ۳۴/۳ درصد پروماستیگوت‌ها؛ پس از ۷۲ ساعت، صفر و ۲۰/۴ درصد زنده ماندند. روز چهارم کلیه پروماستیگوت‌ها از بین رفتند. نتایج این طرح با آزمون آماری t مزدوج تحلیل و مشخص شد که اختلاف موجود در نتایج یاد شده از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P<0/003$).

تفسیر نتایج

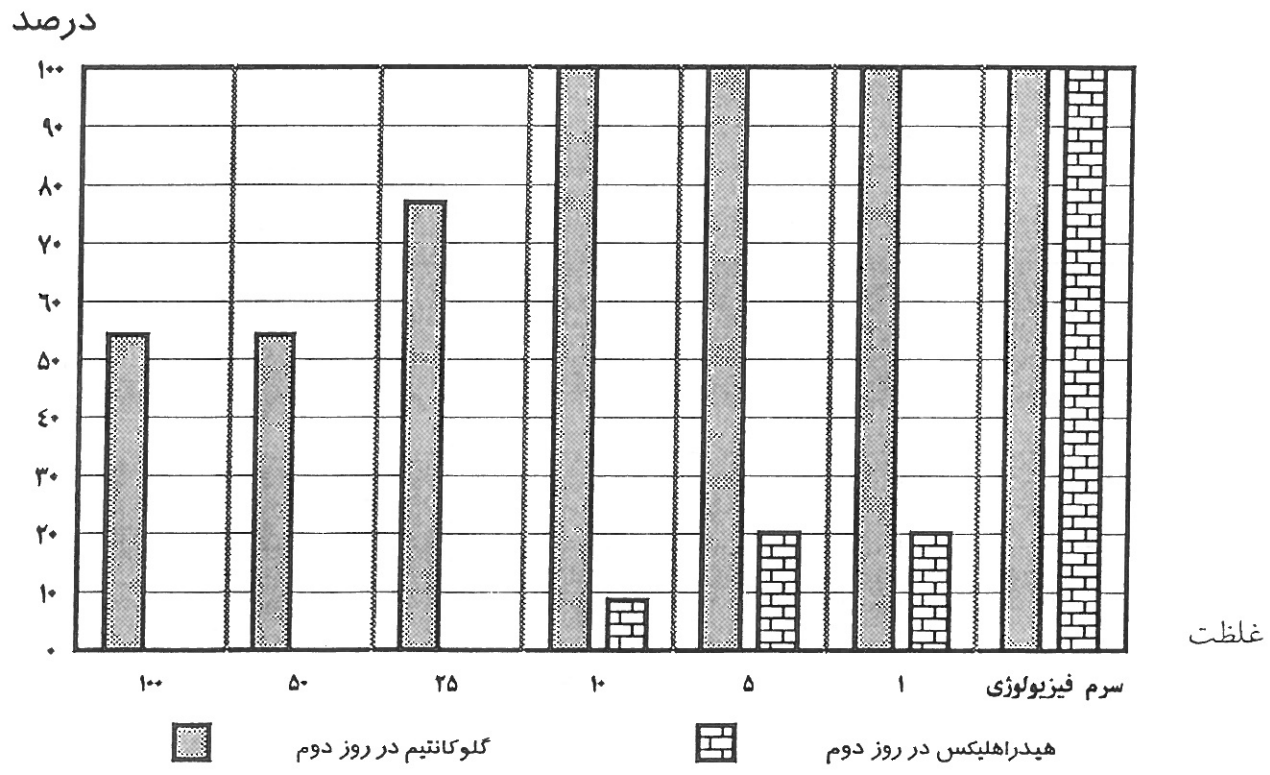
در این بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر کاهش رشد پروماستیگوت‌های L major و L tropica و مقایسه آنها با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تاثیر غلظت‌های مختلف گلوکانتیم بر L major بیشتر از تاثیر آن بر L tropica می‌باشد؛ در حالی که، اثر غلظت‌های عصاره این گیاه

جدول ۱) درصد پروماستیگوت‌های زنده L tropica در غلظت‌های مختلف گلوکانتیم و هیدراهلیکس طی روزهای مختلف

دارو	روز / غلظت	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
G*	۱۰۰	۱۰۰	۵۴/۲	۳۲/۷	۳۲/۷	۱۸/۹	۰	۰	۰
	۵۰	۱۰۰	۵۴/۲	۳۲/۷	۳۲/۷	۱۸/۹	۹/۸	۰	۰
	۲۵	۱۰۰	۷۶/۹	۵۰/۸	۳۴/۱	۲۲/۲	۹/۸	۰	۰
	۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۳/۲	۳۳/۳	۱۹/۵	۷/۸	۰
	۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۶/۷	۱۹/۵	۱۱/۲	۰
	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۳/۳	۳۶/۳	۱۸/۳	۰
	نرمال سالین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
H**	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲۵	۹/۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۱۰	۱۹/۸	۸/۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۵	۲۶/۸	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۱	۳۴/۳	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	نرمال سالین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* داروی گلوکانتیم		** عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس

نمودار ۱) مقایسه تاثیر غلظتهای مختلف هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های زنده L.tropica در روز اول



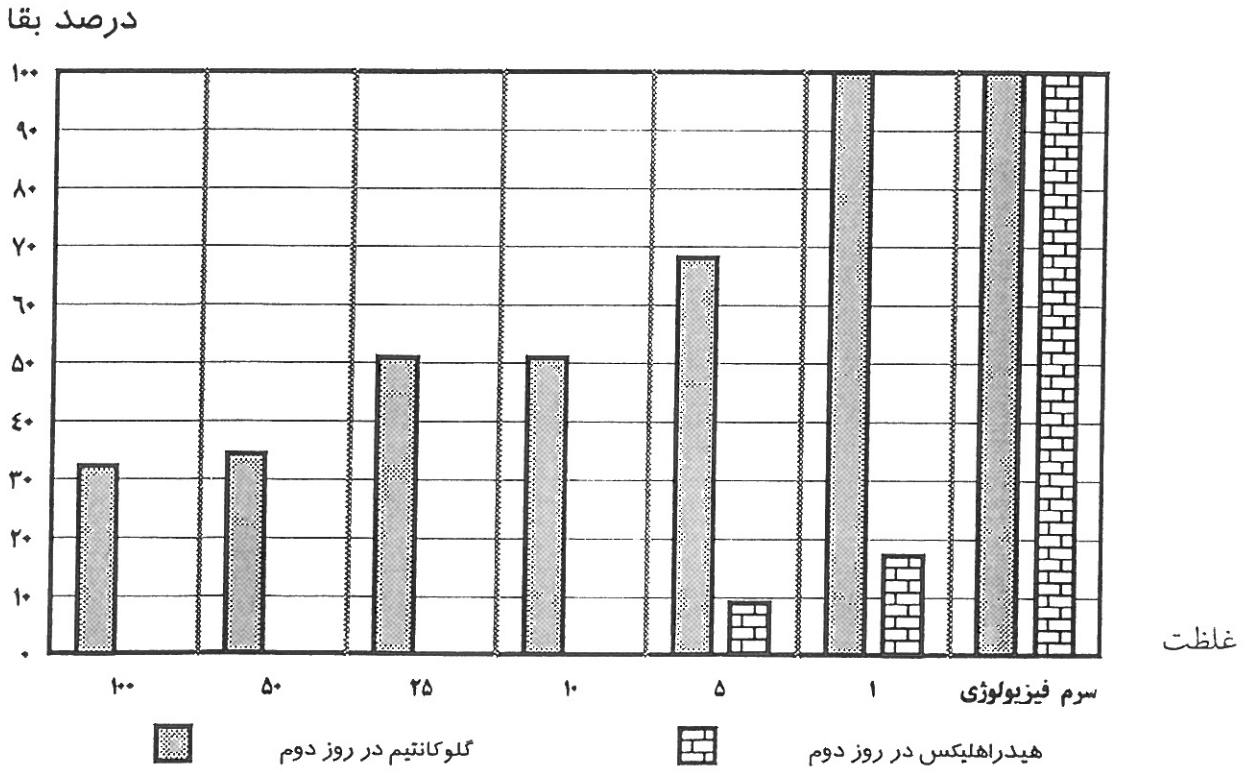
نمودار ۲) مقایسه تاثیر غلظتهای مختلف هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های زنده L.tropica در روز دوم

جدول ۲) درصد پروماستیگوت‌های زنده L major در غلظت‌های مختلف گلوکانتیم و هیدراهلیکس در روزهای مختلف

دارو	غلظت / روز	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
G*	۱۰۰	۵۰	۳۲/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۵۰	۶۷/۷	۳۴/۳	۲۰/۴	۰	۰	۰	۰	۰
	۲۵	۱۰۰	۵۰/۸	۲۶/۸	۰	۰	۰	۰	۰
	۱۰	۱۰۰	۵۰/۸	۲۶/۸	۰	۰	۰	۰	۰
	۵	۱۰۰	۶۸/۱	۳۳/۵	۰	۰	۰	۰	۰
	۱	۱۰۰	۱۰۰	۳۳/۵	۰	۰	۰	۰	۰
	نرمال سالین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
H**	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۱۰	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۵	۱۹/۳	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۱	۳۳	۱۷/۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	نرمال سالین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* داروی گلوکانتیم ** عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس

نمودار ۳) مقایسه تاثیر غلظتهای مختلف هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های زنده L.major در روز اول



نمودار ۴) مقایسه تاثیر غلظتهای مختلف هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های زنده L.major در روز دوم

روی دو نوع پروماستیگوت بالا از نظر طول زمان و از بین بردن انگل، نتیجه تقریبا" مشابهی را نشان می‌دهد.

غلظت‌های مختلف گلوکانتیم و هیدراهلیکس بر درصد پروماستیگوت‌های زنده L major و L tropica نشان می‌دهد که در محیطهای محتوی هیدراهلیکس درصد پروماستیگوت‌های زنده کمتر از محیطهای محتوی گلوکانتیم در غلظت‌های مشابه طی زمان یکسان بوده است. همچنین مشاهده شد که در غلظت‌های مختلف هیدراهلیکس در روز سوم هیچ گونه پروماستیگوت زنده L major یا L tropica وجود نداشت؛ در حالی که، در غلظت‌های مختلف گلوکانتیم درصدی از پروماستیگوت‌های L major تا روز چهارم و L tropica تا روز هشتم- در مقایسه با گروه شاهد- زنده بودند. نتیجه آنکه هیدراهلیکس بر L major موثرتر است. به بیان دیگر اثر گلوکانتیم بر L major بیشتر و نسبت به L tropica در زمان کمتری بوده است. در حالی که اثر این گیاه بر L major و L tropica تقریبا" یکسان و نسبت به اثر گلوکانتیم در غلظت‌های مشابه کمتر و در زمان کوتاه‌تری بوده است.

در سال ۱۳۷۱ فتی در مشهد اثر شیرابه و عصاره و ماده موثر برگ گیاه فرفیون را بر پروماستیگوت‌های عامل لیشمانیوز جلدی نوع شهری مطالعه کرد. نتایج نشان داد که غلظت ۳ میلیگرم در لیتر آن پس از ۷۲ ساعت کلیه پروماستیگوت‌های مورد مطالعه را از بین می‌برد (۵). با توجه به ترکیبات شیمیایی برگ گیاه عشقه که شامل آلفاهدرین، بتا هدرین، تافن، اسیدهدریک، مواد چرب و گلیسرین می‌باشد به نظر می‌رسد ماده موثر بر عامل لیشمانیوز L major و L tropica ترکیبات آلفا و بتا هدرین باشند.

در سال ۱۹۹۴ لاکونا و همکارانش در واشنگتن اثر سه داروی گوکانتیم و پنتامیدین و الوپورینول را در سایه خشک کردند. برای تهیه عصاره آن مقدار ۵۰ گرم از پودر برگ گیاه را در یک ارلن به حجم ۵۰۰ سانتیمتر مکعب ریخته، ۳۰۰ سانتیمتر مکعب متانول ۸۰ درصد به عنوان حلال به آن اضافه کردند. برای جلوگیری از تبخیر حلال سرارلن را با چوب پنبه بسته و برای ۴-۵ ساعت روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شد. برای آنکه عمل استخراج کامل شود به مدت ۴۸ ساعت دور از نور در حرارت اتاق نگهداری شد. سپس با استفاده از کاغذ واتمن، قیف بوخنر و پمپ خلاء عصاره گیاه جدا شد. عصاره آن را در پتری‌دیش ریخته، جهت تبخیر در حرارت اتاق قرار داده شد تا عصاره گیاه به صورت پودر در آید. آمپول گلوکانتیم ساخت فرانسه با مارك Specia با غلظت ۰/۳ گرم در سانتیمتر مکعب از داروخانه تهیه شد. گونه‌های لیشمانیای L major با کد (MRHO/IR/64/Nadiml) و L tropica با کد (MHOM/SU/74/K27) تایید شده سازمان جهانی بهداشت از طریق انستیتو تحقیقاتی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه شد.

انجام آزمایش جهت مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ هیدراهلیکس و گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های L major و L tropica در شرایط یکسان (محیط کشت، تعداد انگل، رقت‌های مختلف عصاره برگ گیاه و گلوکانتیم، درجه حرارت، لام شمارش انگل و میکروسکوپ) انجام شد. ابتدا تعداد معینی از پروماستیگوت‌های L major آماده شده را در ۱۴ ردیف ده‌تایی لوله‌های محتوی محیط کشت لیشمن (N.N.N) به روش استریل کشت داده سپس در ۶ ردیف ده‌تایی آن به ترتیب در هر لوله یک سانتیمتر مکعب سرم فیزیولوژی محتوی غلظت‌های مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرم در سانتیمتر مکعب عصاره برگ گیاه هیدراهلیکس اضافه شد. در ۶ ردیف ده‌تایی دیگر در هر لوله یک سانتیمتر مکعب سرم فیزیولوژی محتوی غلظت‌های مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰

میلیگرم در سانتیمتر مکعب گلوکانتیم اضافه کردیم. در دو ردیف دهتایی باقی مانده در هر لوله یک سانتیمتر مکعب سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) اضافه شد. تمام اعمال بالا در مورد L tropica نیز انجام شد و کلیه لولههای محیط کشت مورد و شاهد را در حرارت ۲۶ درجه سانتیگراد قرار داده، همه روزه (به مدت ۱۰ روز) نمونهها کنترل و تعداد انگلهای زنده با لام نئوبار به کمک میکروسکوپ شمارش شد و نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری t مورد تحلیل قرار گرفت.

مراجع

۱) طلاری صفرعلی. تعیین سوشهای لیشمانیا به روش آنالیز ایزوآنزیمها در مبتلایان به لیشمانیوز جلدی در اصفهان. پایاننامه PhD انگلشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۷۳.

۲) لطفی اسماعیل. بررسی شیوع لیشمانیوز جلدی و ویژگیهای آن در شهر کاشان. پایاننامه دکترای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ۱۳۷۲.

۳) جاویدانژاد صادق و حاجیبابائی محمد. اطلاعات دارویی بالینی (داروهای ژنریک ایران)، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰.

۴) زرگری علی. گیاهان دارویی. جلد اول، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، آذر ماه ۱۳۶۰.

۵) فتی عبدالحمید. بررسی اثر شیرابه و عصاره و ماده موثر گیاه فرفیون بر پروماستیگوتها در محیط کشت N.N.N. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۴۵، سال ششم، ۳۰-۳۶، ۱۳۷۲.

6) Majester B. and et al. Saponins of the lvy plant, Hedera helix, and their leishmaniasis. Activity Planta Med 1991; 57:260-262.

7) Laguna F, et al. Assessment of allopurinol pluse meglumine antimonate in the treatment of visceral leishmaniasis patients infected with HIV. J Infect English 1994; 28:255-259.