مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲٤، شماره‌ی ۱۰۳، خرداد و تیر ۱۳۹۵، صفحات ٤۲ تا ۵۱

ارزیابی تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه *Echinacea Purpurea* بر توکسوپلاسما در شرایط برون‌تنی و در مدل توکسوپلاسموزیس حاد موشی

سخاوت 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: ۹٤/۲/٦ پذیرش: ۹٤/٦/٤

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 عصاره ی گیاه سرخارگل در شرایط برون‌تنی و مدل توکسوپلاسموزیس حاد موشی انجام شد.*

روش بررسی: *سوسپانسیون حاوی ٤۲۰۰۰ تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلاسما (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، ٤۸ سر موش BALB/c در ٦ گروه به صورت داخل صفاقی با 10^4 تاکی زوئیت آلوده شدند. ۲٤ ساعت پس از آلودگی، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با غلظت‌های فوق، به طریق داخل صفاقی و به گروه شاهد فقط ۰/۵ میلی‌لیتر 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 ۷/۸٤ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان (حداقل ۰/۹±٦/۵ روز) نسبت به گروه شاهد (۰/۰±۵ روز) به‌طور معنی‌داری بیشتر شد ($P<0/05$). حداکثر میانگین بقا با ۱/۰±۷/۳ روز در گروه پنجم آزمون (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بدون اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌های آزمون دیده شد.*

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

واژگان کلیدی: توکسوپلاسموزیس، تاکی‌زوئیت، اکیناسهآ پورپورا، برون‌تنی، موش

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

۲- دکترای تخصصی انگل‌شناسی 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

Archive of SID

www.SID.ir

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، اکثرا بدون علامت است ولی در افراد دارای اختلال سیستم ایمنی و همچنین در توکسوپلاسموز مادرزادی، همراه با علایم 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 سینرژیستیک، 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 – سولفادیازین علایم 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 تراتوژنیک، نباید در نیمه‌ی اول بارداری مصرف گردد. سولفادیازین 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 صناعی 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 دوچندان 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 prupurea*، گیاهی علفی و چندساله است که به خانواده *Asteraceae* تعلق‌دارد. اکیناسه یکی از گیاهان پر مصرف و بومی آمریکای شمالی است (٤). 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 (۵و ٤).

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 (٦). مطالعات اخیر نشان داده است که عصاره‌ی خام و بعضی فرآورده‌های این گیاه خواص ضد ویروسی (۸و ۷) و ضد باکتریایی (۱۰و ۹و ٦) 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 (۱۲و ۱۱) می‌شوند.

تعدادی از پژوهش‌ها که اخیرا بر روی خواص ضد انگلی ترکیبات عصاره‌ی اکیناسه انجام گرفته، با نتایج امیدوار کننده‌ای همراه بوده است (۱٤و ۱۳). در مطالعه‌ای، عصاره‌های تهیه شده اتانولی و آبی گیاه در شرایط برون‌تنی در جلوگیری از رشد و تکثیر *لیشمانیا ماژور*، *لیشمانیا دونووانی* و

Archive of SID
www.SID.ir

تریپانوزوما بروسی موثر بوده که عصاره‌ی استاندارد اتانولی اکیناسه در محیط کشت سلولی انسان، فعالیت ضد التهابی نشان داده است (۱۳). بنابر این به نظر می‌رسد عصاره‌ی این گیاه بتواند به‌طور مستقیم یا از طریق بهبود و تعدیل سیستم ایمنی، در توکسوپلاسموز حاد موشی اثرات ضد توکسوپلاسمایی ودرمانی 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=٦/٤١ 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، ٤۰۰، 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 ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سویه‌ی مورد استفاده و نحوه‌ی تکثیر انگل: در این مطالعه از تاکی‌زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما گوندی که در موش‌های سوری تکثیر پیدا می‌کرد، استفاده شد. برای تکثیر انگل به هر موش ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۲×۱۰^{۵} تاکی‌زوئیت زنده به صورت داخل صفاقی تلقیح و پس از ٤ روز، مایع صفاقی موش‌های آلوده با سرنگ استریل پونکسیون شد. تعداد تاکی‌زوئیت‌ها 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 تاکی‌زوئیت‌های زنده از تست دفع تریپان بلو استفاده شد (محلول ۰/۵ درصد رنگ در بافر فسفات). در این روش، تاکی زوئیت‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند اما تاکی‌زوئیت‌های زنده بی‌رنگ می‌مانند. (۱۵).

بررسی تاثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌ی اکیناسه در شرایط In vitro: برای ارزیابی تاثیر بازدارندگی عصاره بر روی تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما، به شش میکروتیوب هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده انگل که دارای ٤۲۰۰۰ تاکی‌زوئیت 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، ٤ 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 تاکی‌زوئیت زنده در گروه کنترل و TT تعداد تاکی‌زوئیت زنده در غلظت‌های مختلف عصاره می‌باشد. این آزمایش در سه تکرار انجام و میانگین داده‌ها ملاک محاسبه قرار گرفت (١٦).

بررسی تاثیر درمانی عصاره‌ی اکیناسه در توکسوپلاسموز حاد موشی: ٤٨ سر موش آزمایشگاهی BALB/c خریداری شده از موسسه رازی کرج با سن ٤ هفته و وزن ٢٤ تا ٢٦ گرم در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. همه‌ی موش‌ها به صورت داخل صفاقی با $۱۰^{٤}$ عدد تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه RH آلوده شدند. موش‌ها در ٦ گروه مساوی ۸ تایی به صورت تصادفی، شامل ۵ گروه آزمون و یک گروه شاهد قرار گرفتند. ٢٤ ساعت پس از آلودگی، به ۵ گروه از موش‌ها به حجم ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی اکیناسه با غلظت‌های۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر

Archive of SID

www.SID.ir

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 SPSS آنالیز و در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج تاثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره اکیناسه در شرایط In vitro نتایج تاثیر عصاره اکیناسه با غلظت‌های مورد آزمایش بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۵ ساعت باعث از بین بردن ۵۱/٦ درصد تاکی زوئیت‌ها 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 ۷۸٤ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار ۱).

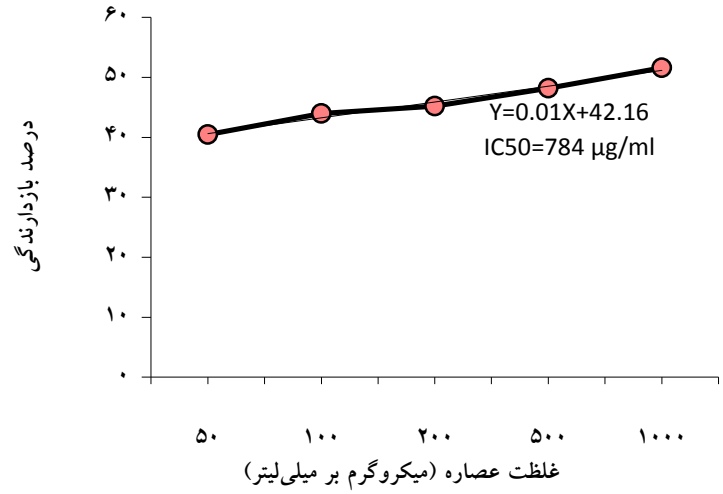
جدول ۱: اثر بازدارندگی عصاره اکیناسه برتاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در شرایط In vitro

غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد بازدارندگی در زمان‌های مختلف (ساعت)				
	۰/۵	۱	۲	۳	٤	۵
۵۰	٤/۲	۷/۱	۸/۹	۱۹/۰	۲۲/۰	٤۰/۵
۱۰۰	٤/۸	٦/۵	۸/۳	۲۰/۲	۲۲/۰	٤٤/۰
۲۰۰	٤/۸	۷/۱	۱٦/۱	۲۳/۲	۲۵/٦	٤۵/۲
۵۰۰	٤/۸	۸/۹	۲۰/۸	۳۰/۹	۳۳/۳	٤۸/۲
۱۰۰۰	۵/۰	۹/۵	۲۳/۸	۳۲/۱	۳۵/۷	۵۱/٦

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 (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.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: منحنی خطی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره اکیناسه برتاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در مدت ۵ ساعت

آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA نشان داد، میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های که تحت درمان با عصاره‌ی اکیناسه بودند نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر است (P<۰/۰۵). به‌طوری که میانگین بقای موش‌هایی که عصاره دریافت کرده بودند حداقل ٦/۵ روز، در حالی که میزان بقا در گروه شاهد ۵ روز بود. متعاقبا آزمون مقایسه چندگانه دانکن نشان داد، فقط گروه شاهد با کمترین زمان بقا (۰/۰±۵ روز) با گروه‌های آزمون به‌طور معنی‌دار اختلاف دارد (P<۰/۰۵)، اما در بین گروه‌های آزمون که با غلظت‌های متفاوتی از عصاره تحت درمان قرار گرفته بودند، اختلاف معنی‌دار دیده نشد (P=۰/۱۲). میانگین بقا در گروه‌های چهارم و پنجم آزمون به ترتیب ٦/٦±۰/۷ و ۷/۳±۱ روز به‌دست آمد (جدول ۲).

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

غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)	تعداد موش	**میانگین ± انحراف معیار (روز)**	**حداقل (روز)**	**حداکثر (روز)**
*شاهد	۸	۵/۰±۰/۰	۵	۵
۵۰	۸	٦/۵±۰/۹	۵	۸
۱۰۰	۸	٦/۵±۰/۹	۵	۸
۲۰۰	۸	٦/۵±۰/۹	۵	۸
۵۰۰	۸	٦/٦±۰/۷	٦	۸
۱۰۰۰	۸	۷/۳±۱/۰	٦	۹

در گروه شاهد به جای عصاره‌ی اکیناسه، سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌هایی که تحت درمان با عصاره‌ی بودند نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵)، اما در بین گروه‌های آزمون، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P=۰/۱۲)

Archive of SID
www.SID.ir

تاثیر 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، همه ی 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 توکسوپلاسما باشد، نشان داده شد که عصاره‌ی الکلی خام پیکر رویشی گیاه اکیناسه فقط در شرایط درون‌تنی بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما موثر است. به طوری که میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان با عصاره (حداقل ۰/۹±۶/۵ روز) نسبت به گروه شاهد (۰/۰±۵ روز) به طور معنی‌داری بیشتر دیده شد (P<۰/۰۵).

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 اپی تلیال (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 (۱۸و ۱۷) و دامنه‌ی وسیع اثرات مشاهده شده صرفا به یک ترکیب خاص درگیاه 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 توکسوپلاسما 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 (۰/۰۱) 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 تاثیر 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 (۱۳-۱۱). برعکس شرایط برون‌تنی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد در مدل توکسوپلاسموز حاد موشی، میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های تحت درمان با عصاره‌ی اکیناسه نسبت به‌گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر است (P<۰/۰۵). 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).

Archive of SID
www.SID.ir

همچنان‌که در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها اشاره شد، اثرات بازدارندگی عصاره این گیاه بر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما 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 اندازه گیری 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 مطالعه ی کانالز و همکاران (۱۳)، اثرات ضد لیشمانیایی و تریپانوزومیایی سه عصاره‌ی اتانولی و آبی متفاوت از اندام‌های هوایی اکیناسهٔ پورپورا مورد ارزیابی قرار گرفت و هر سه عصاره ی تهیه شده بعد از ۲٤، ٤۸ 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 دونووانی در دو کشت مختلف سلولی انسان (لاین‌های سلولی اپیتلیال و برونشیال) جلوگیری کرد. برعکس مطالعه‌ی ما، در مطالعه سودی و همکاران، غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی ریشه *اکیناسهٔ پورپورا* در ممانعت از رشد و تکثیر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت موثر بوده است، به طوری که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره، قادر به کشتن ۱۰۰ درصد انگل در مدت ٤۸ ساعت بود (۱٤). البته تفاوت مشاهده شده در نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی سودی و همکاران، ممکن است به دلایل تفاوت نوع انگل مورد بررسی، زمان تاثیر و غلظت‌های مورد استفاده عصاره رخ داده باشد که در مطالعه‌ی آنها، زمان تاثیر 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 (۵و ٤). از طرف دیگر در مطالعات حیوانی، روش و مسیر تجویز عصاره ممکن است کارآیی و اثرات ضدانگلی آن را تحت تاثیر قرار دهد. برای نمونه در مطالعه ی ساداتی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی شیراز (۲۰)، تجویز خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی *اکیناسهٔ پورپورا* در کنترل و التیام زخم ناشی از انگل *لیشمانیا ماژور* 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، به‌دلیل پایین بودن عوارض جانبی و پذیرش مطلوب توسط بیماران، در صورت اثر درمانی مطلوب، می‌توانند به‌عنوان درمان جایگزین و یا کمکی مورد استفاده قرار گیرند. در حال حاضر گرچه اثرات و فواید درمانی عصاره و ترکیبات مختلف *اکیناسهٔ پورپورا* بر روی تعدادی از باکتری‌ها و انواع ویروس‌ها به ویژه آن هایی که در عفونت سیستم تنفسی فوقانی درگیرند، به خوبی شناخته شده و در مقاله‌ای به تفصیل مرور شده است (٦)، اما در خصوص اثرات ضدانگلی آن، پژوهش‌ها اندک است (۱۹و ۱٤و ۱۳). در مجموع پژوهش حاضر به عنوان یک مطالعه مقدماتی، تاثیر ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌ی الکلی این گیاه را در مدل حیوانی توکسوپلاسموز حاد تایید می‌کند و حداقل می‌توان از منظر درمان کمکی توکسوپلاسموزیس حاد، مطالعات بعدی را طراحی و اجرا کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در شرایط برون‌تنی، عصاره الکلی *اکیناسهآ پورپورا* در غلظت‌های مورد استفاده، اثر کشندگی مطلوبی بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما ندارد، ولی در مدل توکسوپلاسموز حاد موشی، موجب افزایش معنی‌دار زمان بقای موش‌های آلوده نسبت به گروه کنترل می‌باشد. با توجه به اطلاعات موجود در خصوص مکانیسم اثرات ضدمیکروبی 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 دندرتیک و سیتوکاین‌های پیش التهابی، مورد مطالعه قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

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

References

1- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363: 1965-76.

2- Saebi 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 (*Echinaceae 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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*: Parasiticidal 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Ahang S[1], Haniloo A[1], Faghih Zadeh S[2]

[1]Dept. of Medical Parasitoloy and Mycology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical, Zanjan, Iran.

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

Corresponding Author: Haniloo A, Dep. of Medical Parasitoloy 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 adminstration 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* extrac of *E. purpurea* and incubated at 37°C for 5 hours. Then, IC_{50} was calculated using linear regression. Subsequently, 48 BALB/c mice were asssigned to 5 treatment groups and a control group and were intraperitoneally infected with 10^4 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, IC_{50} 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

Archive of SID

www.SID.ir