مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره الکلی دانه اسپند (*Peganum harmala*) بر پلاسمودیوم فالسیپاروم و مقایسه آن با کلروکین در شرایط *in vitro*

میترا شربت‌خوری[۱]، دکتر مهدی ناطق‌پور[۲]، دکتر غلامحسین ادریسیان[۳]، دکتر عفت سوری[٤]، دکتر مهدی محبعلی[٥]، کامران اکبرزاده[٦]، افسانه متولی‌حقی[۷]، محمدتقی سطوت[۸]، عباس رحیمی[۹]

تاریخ دریافت 84/02/07، تاریخ پذیرش 84 /09/23

چکیده

پیش‌زمینه و هدف : مالاریا یکی از مهمترین عفونتهای انگلی در جهان است. بیش از ٤٠% جمعیت جهان درمناطق انـدمیک مالاریـا زنـدگی مـی‌کننـد. بـا توجه به ظهور سوشهای پلاسمودیوم فالسیپاروم مقاوم به کلروکین در دهه های اخیر، کشورهای در حال توسـعه از جملـه ایـران بـا مـشکلاتی در درمـان موارد حاد بیماری مواجه می‌باشند. به همین دلیل یافتن داروهای جدید با حداقل عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد. از هزاران سـال پـیش، گیاهـان بـه صورت سنتی در نقاط مختلف جهان برای درمان مالاریا استفاده می‌شوند. با توجه به توصیه‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر تحقیقات پیرامـون گیاهـان بومی مناطق مالاریاخیز، ما نیز بر آن شدیم تا تاثیر عصاره الکلی دانه گیاه اسپند را بر انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم بررسی نماییم.

مواد و روشها: عصاره اسپند در ٤ غلظت ۱۲/۵ µg/ml، ۲۵ µg/ml، ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ µg/ml برروی انگلهای جدا شده از نمونـه خـون ۲۳ بیمـار مبـتلا بـه پلاسمودیوم فالسیپاروم با استفاده از روش *in Vitro* و بر مبنای دستورالعمل WHO با کمی تغییرات، مورد ارزشیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از نظر آماری هر ٤ غلظت عصاره اسپند به طور معنی‌داری نسبت به کنترل، توانـسته‌انـد از رشـد انگـل جلـوگیری کننـد ($p<۰/۰۵$). درمقایـسه بـا کلروکین ۲ غلظت اول یعنی ۱۲/۵ µg/ml و ۲۵ µg/ml کمتر از کلروکین تاثیر داشتند اما دو غلظت ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ µg/ml همانند کلـروکین بـرروی رشـد انگل تاثیر داشتند. همچنین درسه مورد مقاوم به کلروکین عصاره ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ µg/ml عصاره اسپند مؤثر واقع شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره الکلی دانـه اسـپند مـی‌توانـد تـا حـدود زیـادی ماننـد داروی کلـروکین مـانع رشـد انگـل پلاسمودیوم فالسیپاروم شود.

گل‌واژگان: اسپند، پلاسمودیوم فالسیپاروم، کلروکین

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره دوم، ص۱۰۸-۱۰۱، تابستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: تهران- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، میترا شربت‌خوری

[۱] دانشجوی Ph.D. انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۲] دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[٤] دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[٥] استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[٦] مربی آموزشی گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۷] کارشناس ارشد انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۸] کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۹] عضو هیئت علمی گروه اپیدمیولوژی و آمار و دانشجوی Ph.D.، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مالاریا یکی از مهمترین عفونتهای انگلی در جهان است بیش از ٤٠% جمعیت جهان در مناطق اندمیک مالاریا زندگی می‌کنند. آمار دقیق مشخص نیست ولی تخمین زده می‌شود که سالانه ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر در جهان به مالاریا مبتلا می‌شوند و ۱/۵ تا ۲/۷ میلیون نفر در سال در اثر مالاریا می‌میرند(۶).

مالاریا از زمانهای گذشته در نقاط مختلف ایران وجود داشته است و پزشکان ایرانی با علائم بالینی این بیماری آشنا بوده‌اند(۱). حدود یکهزار سال قبل، ابوعلی سینا به تب و لرز و تب تناوب و تب نوبه اشاره کرده است(۲).

آخرین آمار گزارش مالاریا در ایران مربوط به سال ۱۳۸۳ می‌باشد که توسط مرکز مدیریت بیماریها جمع‌آوری و اعلام گردیده است و طی آن از ۱۳۱۶۶ مورد مالاریا در سال ۱۳۸۳، ۱۲۰۰۷ مورد ویواکس، ۹۷۸ مورد فالسیپاروم، ۱۸۱ مورد میکس بوده است. در اغلب مناطق مالاریاخیز استفاده از داروی کلروکین با مقاوم شدن پلاسمودیوم فالسیپاروم به این دارو کم فایده شده است (۱۰-۷).

اولین گزارش مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین در ایران توسط ادریسیان و همکاران از ایرانشهر گزارش گردید که تعداد آن به تدریج افزایش یافت(۳). با توجه به گسترش مقاومت دارویی در پلاسمودیوم فالسیپاروم در جهان و ایران، داروهای آنتی‌مالاریای جدید با عملکردهای جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند. تحقیقات گیاهان دارویی، به خصوص پس از استفاده از داروی آنتی مالاریای چینی به نام آرتمی سینین[1] جدا شده از گیاه آرتمیزیاآنوا[2] مهمتر شده است (۱۱،۱۳،۲۵).

اخیراً بعضی مطالعات به ارزیابی تأثیر ممانعت‌کنندگی عصاره گیاهان گوناگون روی پلاسمودیوم فالسیپاروم (۱۷-۱۴) و پلاسمودیوم برگئی (۱۸) در محیط کشت پرداخته‌اند. خاصیت ضد مالاریایی برخی عصاره گیاهان در شرایط *in Vivo* روی موشهای آلوده به پلاسمودیوم برگئی (۲۱، ۱۹) و پلاسمودیوم وینکئی (۲۲) وپلاسمودیوم یوئلی (۲۳) مطالعه شده است.

با توجه به اهمیت موضوع، در مطالعه حاضر سعی شده است اثر عصاره الکلی دانه اسپند با نام علمی پگانوم هارمالا (*Peganum harmala* L.) بر پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in Vitro* بررسی شود. گفتنی است اثرات ضدکرمی(۴) این عصاره و نیز اثر ضدمالاریایی آن بر پلاسمودیوم برگئی در موش سوری در شرایط *in Vivo* (۵) توسط محققان دیگر در ایران بررسی شده است. این مطالعه در آزمایشگاه مقاومت دارویی مالاریا واقع در ایستگاه تحقیقات بهداشتی ایرانشهر استان سیستان و بلوچستان وابسته به دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش *in Vitro* و بر روی نمونه خون بیماران مبتلا به پلاسمودیوم فالسیپاروم در این شهر و بخشهای اطراف آن تا مرز پاکستان انجام گرفته است.

مواد و روشها

۱- روش تهیه غلظتهای مختلف عصاره اسپند

اسپند مورد استفاده در این پژوهش به طور تصادفی از نقاط مختلف شهر گرگان در استان گلستان جمع‌آوری و مخلوط شد و پس از حذف مواد زاید آن، تحت نظارت دکتر داروساز در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، عصاره‌گیری شد. بدین صورت که ۳۰۰ گرم از پودر دانه اسپند را به طور دقیق وزن کرده و با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۹٦ درجه کاملاً خیسانده شد. مخلوط حاضر را به مدت دو ساعت به طور کامل به‌هم زده و یک شب در هوای آزمایشگاه نگهداری شد. در این شرایط، حلال حاوی عصاره جدا می‌شود. پس از صاف کردن آن، دوباره حلال اضافه شد، این عمل به مدت ۵ روز تکرار گردید. همه حلالهای جدا شده، مخلوط و پس از صاف شدن با دستگاه تقطیر در خلاء تقطیر شدند. عصاره به دست آمده غلیظ و به رنگ قهوه‌ای تند بود. برای تهیه ٤ غلظت مقاومت اسپند، ابتدا حلال اتانول ۷۰% به کار رفت و در چندین بیمار استفاده شد که چون در چاهکهای کنترل هم تولید شیزونتهای مشاهده شده قابل قبول نبود و اتانول به تنهایی مانع رشد انگل شده بود، از حلال دی متیل سولفاکساید[3] (DMSO)استفاده شد. DMSO به صورت غلیظ و غلظتهای ۲/۵% و ۵% و ۱۰% و ۲۰% برای چندین مریض به کار رفت. بهترین غلظتی که هم مانع رشد انگل نمی‌شد و هم قادر به حل نمودن عصاره اسپند بود ۵% بود. به همین دلیل در

[1] Artemisinin
[2] Artemisia Annua
[3] DiMethyl SulfOxide

Archive of SID
www.SID.ir

کل‌کار و برای تمام غلظتهای عصاره اسپند از حلال DMSO ۵% استفاده گردید.

۲- روش تهیهٔ محلول کلروکین

مقدار ۱۶/۵ میلی گرم از پودر کلروکین فسفات (MW= ۵۱۵/۹) را به طور دقیق وزن کرده و در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به طور کامل حل می‌کنیم. ۱ میلی‌لیتر از این محلول را برداشته و در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری رقیق می‌کنیم تا محلولی با غلظت ۸/۲۵ µg/ml تهیه شود. در زمان انجام تست *in vitro* از این محلول ۱۰ میکرولیتر به حفره‌های مربوطه می‌افزاییم. با توجه به حجم کل محتویات هر حفره (۱۰۰ میکرولیتر) غلظت نهایی در هر حفره معادل ۸ پیکومول (۱/۶ µmol/L) خواهد بود.

۳- روش تهیه محیط کشت

به محتوی یک قوطی پودر 1640 RPMI[1] مقدار ۵۰mg هیپوگزانتین، ۲۰gr گلوکز، ۵/۹۴ gr بافرهپس، ۲/۲gr بی‌کربنات سدیم افزوده و حجم نهایی را با آب مقطر دوبار تقطیر، به یک لیتر رساندیم. محلول حاصل را با گذراندن از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون استریل نموده و تا موقع مصرف در یخچال ۴°C نگهداری نمودیم. همزمان با کشت نمونه‌های بیماران، سرم AB^+ انسانی استریل و دکمپلمانه به میزان ۱۰% به محیط کشت افزودیم.

۴- روش انجام تست *in Vitro*

از هر بیمار مقدار ۳۰۰ میکرولیتر خون و یک لام گسترش خون ضخیم و نازک تهیه شد. پس از بررسی لام خونی، بیمار با شرایط زیر جهت انجام تست *in Vitro* انتخاب می‌گردید:

۱- بیمار مبتلا به پلاسمودیوم فالسیپاروم باشد و دچار آلودگی توام نباشد.

۲- رینگها گوشتالو باشند.

۳- تعداد انگل در هر میکرولیتر خون بین ۱۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰ باشد.

در هر میکروپلیت تعداد دو حفره از ردیف A به کنترل (شامل ۹۰λ محیط کشت و ۱۰λ خون بیمار) اختصاص می‌یافت. دو حفره ردیف B برای حلال عصاره یعنی DMSO ۵% و دو حفره در ردیفهای C و D و E و F برای غلظتهای ۱۲/۵ µg/ml و ۲۵ µg/ml و ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ µg/ml عصاره الکلی اسپند و دو حفره ردیف G برای غلظت ۸ pmol/well (۱/۶µmol/l) کلروکین در نظر گرفته شد. با استفاده از سر سمپلر استریل مقدار ۱۰ میکرولیتر از داروها و حلال عصاره در حفره‌های مربوط ریخته می‌شد. سپس مقدار ۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده شامل محیط کشت و خون بیمار (نسبت ۱۰ به ۱) در تمامی حفره‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است کلیه این مراحل زیر هود و در شرایط استریل کامل انجام گرفت. پلیتها به مدت چند ثانیه به آرامی تکان داده شد تا محتویات هر حفره به خوبی مخلوط شوند. سپس پلیتها در انکوباتور ۳۷ و شرایط بی‌هوازی به روش کندل‌جار به مدت ۲۴ تا ۳۰ ساعت نگهداری شدند(۲۴). پس از انقضا مدت زمان کشت از هر حفره گسترش ضخیم تهیه شد. گسترش پس از ۲۴ ساعت به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد، تعداد شیزونتهای تولید شده در هر حفره در برابر ۲۰۰ انگل غیر جنسی (میزان پارازیتمی) شمارش شد و برای هر ردیف میانگین تعداد شیزونتها در حفره‌ها محاسبه شد، سپس با یکدیگر مقایسه شده و انحراف معیار[2] محاسبه گردید. با استفاده از آزمون مک نمور[3] رشد یا عدم رشد در غلظتهای مختلف عصاره اسپند در جدولهای جداگانه یک بار با کنترل و یک بار با کلروکین مقایسه شدند و پس از قرار دادن عددها در فرمول مربوطه، جهت درجه اطمینان ۹۵% در صورتی که X^2 بزرگتر از ۳/۸۴ بود اختلاف معنی‌دار ($p< ۰/۰۵$) درنظر گرفته می‌شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۲۳ نمونه خون بیمارانی که آلوده بودن آنها به انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم از طریق بررسی گسترش نازک و ضخیم خون، مورد تایید قرار گرفته بود، استفاده شد. جهت بررسی دقیقتر، میزان انگلهای غیرجنسی موجود در هر میلی‌متر مکعب خون نیز برای تمامی بیماران مشخص شد که محدوده آن بین ۲۶۴۰ تا ۶۰۰۰۰ انگل غیرجنسی (رینگ) در هر میلی‌متر مکعب خون با میانگین ۱۲۱۰۲ عدد بود. با استفاده از آزمون مک نمور اختلاف معنی‌داری بین تعداد انگل در هر میلی‌متر مکعب خون و اثرات عصاره‌های مختلف اسپند و کلروکین مشاهده نشد.($p<۰/۰۵$).

در چاهکهای کنترل ۱ (محیط کشت + خون) میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۱۳۴ عدد (SD=۳۰/۳) و در چاهکهای کنترل ۲

[1] Gibco

[2] SD

[3] McNemor

Archive of SID

www.SID.ir

(محیط کشت + خون بیمار + DMSO ۵%) میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۱۳٦ عدد (SD=۳۱/۲) بود. اختلاف معنی‌داری بین میزان شیزونتهای رشد کرده در کنترل ۱و۲ وجود ندارد ($p<۰/۰۵$). بنابراین DMSO به عنوان حلال عصاره اسپند تاثیر منفی بر رشد انگل نداشته است. در چاهکهای مربوط به غلظت ۱۲/۵ µg/ml عصاره اسپند میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۱۲ عدد (SD=۵/۷) بود. در چاهکهای مربوط به غلظت ۲۵ µg/ml عصاره اسپند میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۳/۵ عدد (SD=٤/۱) بود. در چاهکهای مربوط به غلظت ۵۰ µg/ml عصاره اسپند میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۲ عدد (SD=۳/۸) بود. در چاهکهای مربوط به غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره اسپند میانگین میزان رینگ به شیزونت ۰/۳ عدد (SD=۱/٤) بود. در چاهکهای مربوط به غلظت ۸ pmol کلروکین میانگین میزان تبدیل رینگ به شیزونت ۰/۵ عدد (SD=۱/٤) بود. درصد ممانعت از رشد[1] انگل به روش زیر محاسبه گردید (۲۵):

$$\text{درصد ممانعت از رشد} = \frac{\text{پارازیتمی در کنترل} - \text{پارازیتمی در دارو}}{\text{پارازیتمی در کنترل}} \times ۱۰۰$$

در جدول ۱ درصد ممانعت از رشد عصاره‌های مختلف مشخص شده است.

جدول شماره۱: درصد پارازیتمی و کاهش رشد انگل در کنترل و عصاره‌های مختلف اسپند و کلروکین

حفره های کشت	متوسط پارازیتمی (±SD)	Inhibition% (درصد ممانعت از رشد انگل)
کنترل ۱	۱۳٤ (±۳۰/۳)	۰
کنترل ۲	۱۳۶ (±۳۱/۲)	۰
غلظت ۱۲/۵ µg/ml عصاره اسپند	۱۲ (±۵/۷)	۹۰
غلظت ۲۵ µg/ml عصاره اسپند	۳/۵ (±٤/۱)	۹٦/۱
غلظت ۵۰ µg/ml عصاره اسپند	۲ (±۳/۸)	۹۸/٤
غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره اسپند	۰/۳ (±۱/٤)	۹۹/۲
کلروکین	۰/۵ (±۱/٤)	۹۹/٦

با استفاده از آزمون مک نمور، بین میزان رشد انگل در غلظتهای ۱۲/۵ µg/ml، ۲۵ µg/ml، ۵۰ µg/ml، ۱۰۰µg/ml عصاره اسپند با کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$) و همه آنها از رشد انگل ممانعت به عمل آورده و توانسته‌اند حداقل ۵۰ درصد ممانعت از رشد انگل (IC_{50}) به عمل آورند. بین میزان رشد انگل در غلظت ۱۲/۵ µg/ml و ۲۵ µg/ml عصاره اسپند با کلروکین اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) یعنی کلروکین به طور واضح بهتر از این دو غلظت مانع رشد انگل شده بود. بین میزان رشد انگل در غلظت ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ µg/ml عصاره اسپند با کلروکین اختلاف معنی‌دار نبود و این دو غلظت اثری مشابه کلروکین بررشد انگل داشتند.

در سه نمونه خون از کل نمونه‌ها رشد انگل در حفرات کلروکین مشاهده شد. که این سه نمونه را به عنوان نمونه‌های مقاوم به کلروکین در شرایط *in vitro* در نظرگرفتیم. در دو مورد از این سه نمونه رشد انگل در غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره اسپند و در یک مورد از دو مورد اخیر رشد انگل در غلظت ۵۰ µg/ml عصاره اسپند نیز مشاهده نشد. جدول شماره ۳ مقایسه میانگین رشد انگل در غلظتهای مختلف اسپند و کلروکین در دوگروه نمونه‌های حساس به کلروکین (۲۰ نمونه) و مقاوم به کلروکین (۳) است.

بحث

در دهه گذشته داروهای گیاهی که سالیان دراز به صورت سنتی مورد مصرف بوده‌اند، پس از گذراندن مراحل تحقیقاتی و کلینیکی به اشکال صنعتی به بازار عرضه شده‌اند. دانه اسپند از زمانهای قدیم به عنوان انگل‌کش و گندزدا مورد استفاده قرار می گرفته است. در سال ۱۹۸۰ از عصاره آلکالوئید اسپند برای درمان بعضی درماتوزها استفاده شد که نتایج اثرات ضد باکتریایی، ضدقارچی و احتمالا ضدتک‌یاخته‌ای آن گزارش گردید(۲۶).

در سال ۱۹۹۴ محققان چینی با به کار بردن ۱۰ گیاه سنتی مختلف روی پروتواسکولکسهای کیست هیداتید به صورت *in vitro* اعلام کردند که *پگانوه هارمالا* دارای قویترین اثر اسکولکس‌کشی بوده است(۲۷).

[1] inhibition

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره۲: مقایسه تاثیر غلظتهای مختلف عصاره اسپند و کلروکین بر نمونه‌های حساس و مقاوم به کلروکین

غلظتهای مختلف اسپند و کلروکین / نمونه‌های خون	(±SD) میانگین رشد انگل در :				
	عصاره اسپند ۱۲/۵ µg/ml	عصاره اسپند ۲۵ µg/ml	عصاره اسپند ۵۰ µg/ml	عصاره اسپند ۱۰۰ µg/ml	کلروکین
حساس به کلروکین	۱۱/۵ (±۵/۹)	۲/۷۸ (±۳/۹)	۱/٤۷ (±۳/۵)	۰	۰
مقاوم به کلروکین	۱۵/۵ (±۱)	۸/٤ (±۰/۵)	۵/۵ (±٤/۷)	۲/۳ (±٤)	٤/۱ (±۱)

در سال ۱۹۹۷ تاثیر آلکالوئیدهای تام اسپند در درمان آلودگی تجربی هموسپوریدین درگاو گزارش شد(۲۸) . در سال ۱۹۹۹ اثر قابل توجه متوقف‌کننده رشد *پلاسمودیوم فالسیپاروم* (بالای ۹۶%) به وسیله عصاره آبی اسپند توسط ستیا مورتی[1] و همکارانش اثبات گردید(۲۹). در سال ۲۰۰۰ اثر سم زدایی آلکالوئیدهای پگانوم هارمالا روی سلولهای سرطانی توسط لمچوری[2] و همکارانش گزارش گردید(۳۰). در مورد مصارف انسانی هنوز در بین مردم بومی بسیاری از مناطق کشورهای مختلف نوعی از فراورده‌های دانه اسپند با این باور که برای بهبود بیماریهای جسمی مزمن مانند هپاتیت، لوکمیا، فلج، رماتیسم و بیماریهای روحی و دماغی مانند افسردگی و صرع موثر واقع می‌شود به‌کار می‌رود(۳۱).

در این پژوهش اثرات ۴ غلظت ۱۲/۵ µg/ml و ۲۵ و۵۰ و ۱۰۰ عصاره الکلی دانه اسپند بر روی ایزوله‌های انسانی پلاسمودیوم فالسیپارم در محیط کشت بررسی شده است.

با توجه به اینکه استفاده از حلال اتانول در نمونه چندین بیمار مشخص کرد که اتانول خود باعث کشتن انگلها در حفره‌های کنترل شده است در ادامه این مطالعه DMSO به عنوان حلال عصاره الکلی اسپند در نظر گرفته شد و ۰/۰۵ مناسبترین غلظتی بود که هم باعث حل شدن عصاره الکلی اسپند می‌شد و هم اثر سوئی بر انگلها نداشت.

نتایج این تحقیق نشان‌می‌دهد که هر ٤ غلظت به کار رفته عصاره دانه اسپند، قادر به جلوگیری از حداقل رشد ۵۰ درصدی (IC_{50}) پلاسمودیوم فالسیپارم در محیط کشت شده است (جدول ۱). اولین ارزشیابی اثر ضدمالاریایی عصاره اسپند در ایران را متولی در سال ۱۳۸۲ گزارش کرد(۵). وی مشاهده نمود که عصاره الکلی دانه اسپند برروی پلاسمودیوم برگه‌ای (گونه‌ای که در جونـدگان ایجاد بیماری می‌کند) موثر واقع شده است. داده‌های این بررسی نشان می‌دهد که عصاره اسپند در ٤ غلظت به کار برده شده اثر ضدمالاریایی دارد و هرچه میزان غلظت افزایش یابد، درصد ممانعت از رشد انگل بیشتر می‌شود و این موضوع با نتایج ستیا مورتی در سال ۱۹۹۹ (۲۹) که روی اثر عصاره دانه اسپند بر پلاسمودیوم فالسیپارم، در محیط کشت با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کارکرد، به طور کامل همخوانی دارد. با توجه به میزان سمیت آلکالوئیدهای موجود در عصاره دانه اسپند که مهدوی و مسعود(٤) در بررسی عصاره اسپند بر روی انگل کیست هیداتیک و همچنین متولی در بررسی اثر عصاره اسپند برروی پلاسمودیوم برگه‌ای در موش نشان داده‌اند، غلظتهای زیاد آن به دلیل ایجاد مسمومیت منع استفاده دارد، بنابراین در این بررسی چنان که در قسمت نتایج بیان شد، هر ٤ رقت تهیه شده از عصاره اسپند، غلظتی کمتر از غلظتهای مسمومیت‌زای گزارش شده توسط مهدوی و متولی‌حقی دارند.

کلروکین دارویی مؤثر برروی انگل مالاریا بوده است که سالیان متمادی از آن در نقاط مختلف جهان استفاده شده است. در حال حاضر با بروز مقاومت در انگل پلاسمودیوم فالسیپارم در مقابل این دارو، اهمیت بررسی عصاره‌های گیاهی بیشتر احساس می‌شود. براساس جدول شماره ۲ در سه مورد از بیماران، انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در حفرهٔ حاوی ۸ پیکومول کلروکین رشد داشت و انگل نسبت به داروی کلروکین در بررسی in vitro مقاومت داشت. در بررسی غلظتهای مختلف اسپند در این سه مورد مشاهده گردید که عصاره‌های 50 µg/ml و 100 µg/ml دانه اسپند اثر معنی‌داری برروی موارد مقاوم داشت ($p>$۰/۰۵). البته برای بیان دقیقتر اثرات عصاره اسپند برروی موارد مقاوم انگل فالسیپارم به کلروکین نیاز به مطالعه موارد بیشتر وجود دارد اما به نظر می‌رسد که عصاره اسپند بر روی موارد مقاوم به کلروکین مؤثر است. در بررسی غلظتهای مختلف عصاره اسپند برروی انگل پلاسمودیوم فالسیپارم در مقایسه با داروی کلروکین، در

[1] Sathiyamoorthy
[2] Lamchouri

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت ۱۲/۵µg/ml و ۲۵ µg/ml کمتر از کلروکین مؤثر بودند ولی با افزایش غلظت و افزایش ماده مؤثر، در عصاره اسپند میزان این تاثیر بیشتر شده است. به طوری که در غلظت ۵۰ µg/ml درصد کشندگی آن تقریبا شبیه به کلروکین بوده است و در غلظت ۱۰۰ میکروگرمی حتی درصد کشندگی بیشتری نسبت به کلروکین داشته است و این ارتباط افزایش غلظت با درصد کشندگی با مطالعه پروزسکی(۳۲) روی سایر عصاره‌های گیاهی همخوانی دارد و این موضوع نقطه قوتی از تاثیر عصاره اسپند در مقایسه با کلروکین برروی انگل پلاسمودیوم فالسیپارم در محیط کشت است. با توجه به اینکه IC_{50} عصاره اسپند در این بررسی کمتر از ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است و هر ٤ غلظت تهیه شده آن بیش از ۵۰ درصد اثر بازدارندگی بر روی انگل داشته‌اند؛ به نظر می‌رسد که با تجزیه عصاره اسپند و بررسی اثر آلکالوئیدها و اجزای آن به طور جداگانه بر روی مواد حساس و مقاوم پلاسمودیوم فالسیپارم در محیط کشت بتوان به نتایج درخشان‌تری دست یافت و امید به یافتن داروی کم ضرر برروی موارد مقاوم پلاسمودیوم فالسیپارم بیشتر شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاران محترم ایستگاه آموزش و تحقیقات بهداشتی ایرانشهر و آقای سیداله سیدزاده در آزمایشگاه مرکزی ایرانشهر و نیز آقای دکتر علی احسان حیدری در گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی نمایند.

References:

۰۱.فقیه م: مالاریا شناسی و ریشه کنی مالاریا. انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۱۲۵۷، ۱۳۴۸، صص ۲-۳.

۰۲.شیخ‌الرئیس ابوعلی سینا، قانون در طب. ترجمه عبدالرحمان شرفکندی ، انتشارات سروش، تهران، ۱۳۷۰، ص ۱۰۵.

۰۳.ادریسیان غ: سیر مقاومت دارویی مالاریا در ایران طی سالهای ۱۳۸۰-۱۳۶۲. مجلهٔ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی. دانشگاه علوم پزشکی تهران، سال دوم، شمارهٔ سوم، پاییز ۱۳۸۲ صص۹۳-۸۳.

۰۴.مهدوی م، مسعود ج: بررسی اثرات اسکولکس کشی عصاره‌های آبی–الکلی و آلکالوئیدهای تام دانه اسپند (Peganum harmala) بر روی پروتو اسکولکسهای کیست هیداتید. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۱۳۸۱، سال ۶۰، شماره ۳، صص ۲۲۶-۲۱۵.

۰۵.متولی حقی ا، ناطق‌پور م، ادریسیان غ، سوری ع، سطوت م: بررسی اثر عصاره الکلی دانه اسپند بر پلاسمودیوم برگئی در موش سوری ومقایسه آن با کلروکین. مجله دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۲، سال دوم، شماره۱، بهار ۸۲ صص ۵۳-٤۷.

06. World Health Organization. The use of antimalarial drugs, Report of a WHO Informal consultation. 2001; 33:8-16.

07. Ramanitrahasimbola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga S, Vial H. Malagasha-nine potentiates chloroquine antimalarial activity in drug resistant Plasmodium malaria by modifying both its efflux and influx. Mol Biochem Parasitol 2006; 146 (1): 58-67.

08. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Exalt TA, Agana-Nsiire P, Stollberg K, Mathieu A et al. Chloroquine-treatment failure in northern Ghana. Roles of pfcrt T76 and pfmdr1 Y86. Ann Trop Med Parasitol 2005; 99(8): 723-32.

09. Peek R, VAN Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L. Drug resistance and genetic diversity of Plasmodium falciparum parasites from suriname.Am J Trop Med Hyg 2005 Nov; 73(5): 833-8.

10. Hastings IM, D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster. The rise and spread of drug-resistant Malaria. Parasitology Today 2000; 16 (8): 340-347.

11. Madureira M, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Proenca da Cunha A, Rosario V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S.Tome and Principe islands J Ethnopharmacol 2002; 81: 23-29.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Mueller MS, Karhagomba IB, Hirt HM, Wemakor E. The potential of Artemisia annua L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. J Ethnopharmacol 2000; 73: 487-493.
13. Balint GA. Artemisinin and derivatives an important new class of antimalarial agents. Pharmacology & Therapeutics 2001; 90: 261-265.
14. Boyom FF, Ngouana V, Zollo PH, Menut C, Bessiere JM, Gut J et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. Phytochemistry 2003 Dec; 64(7): 1269-1275.
15. Debenedetti S, Muschietti L, Baren C, Clavin M, Broussalis A, Martino V et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. J Ethnopharmacol 2002; 80: 163-166.
16. Praveen Bhat G, Surolia N. *In vitro* antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. Amer Soc Trop Med Hyg 2001; 65 (4): 304-308.
17. Simonsen H T, Nordskjold J B, Smitt U W, Nyman U, Palpu P, Joshi P et al. In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. J Ethnopharmacol 2001; 74(2): 195-204.
18. Mesia G K, Tona G L, Penge O, Lusakibanza M, Nanga T M, Cimanga RK et al. Antimalarial activities and toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo: Croton mubango, Nauclea pobeguinii and Pyrenacantha staudtii. Ann Trop Med Parasitol 2005; 99(4): 345-57.
19. Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR. In vivo antimalarial activities of extracts from Amaranthus spinosus L. and Boerhaavia erecta L. in mice. J Ethnopharmacol 2006; 103(2): 236-40.
20. Waako PJ, Gumede B, Smith P, Folb PI. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of Cardiospermum halicacabum L. and Momordica foetida Schumch. Et Thonn. J Ethnopharmacol 2005; 99(1): 137-43.
21. Tchoumbougnang F, Zollo PH, Dagne E, Mekonnen Y. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from Cymbopogon citratus and Ocimum gratissimum on mice infected with Plasmodium berghei. Planta Med 2005; 71(1):20-23.
22. Beha E, Jung A, Wiesner J, Rimpler H, Lanzer M, Heinrich M. Antimalarial activity of extracts of Abutilon grandiflorum G. Don - a traditional Tanzanian medicinal plant. Phytother Res 2004; 8(3): 236-240.
23. Nwabuisi C. Prophylactic effect of multi-herbal extract 'Agbo-Iba' on malaria induced in mice. East Afr Med J 2002; 79(7): 343-346.
24. Trager W, J B. Human malaria parasite in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
25. Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munoz V, Ruiz G, Sauvain M. A search for natural bioactive compounds in Boliva through a multidisciplinary approach. J Ethnopharmacol 2000; 73(1): 271-275.
26. El-Saad El-Rifaie M. Peganum harmala: Its use in certain dermatoses. Int J Dermatol 1980; 19(4): 221-222.
27. Kang JF et al. *In vitro* cidal effect of 10 Chinese traditional herbs against E. granulosus protoscolices, (In chineese). Endemic Disease Bulletin 1997; 60(1): 22-24.
28. Fan B, Liang J, Men J, Gao F, Li G, Zhao S et al. Effect of total alkaloid of Peganum harmala L. in the treatment of experimental haemosporidian infections in cattle. Trop Anim Health Prod. 1997; 9(4 Suppl): 77S-83S.
29. Sathiyamoorthy P, Lugasi-Evgi H, Schlesinger P, Kedar I, Gopas J, Pollak Y et al. Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products. Pharmaceutical Biology 1999; 37(3): 188-195.
30. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Hassar M, Zemzami M, Atif N et al. *In vitro* cell-toxicity of Peganum harmala alkaloids on cancerous cell-lines. Fitoterapia 2000; 71(1): 50-54.
31. Peter S. Psychedelics Encyclopedia.

Archive of SID
www.SID.ir

Chapter 7, 3rd Ed, 1992, copyright© the, D, F, Book company: 2000; 234-237.
32. Prozesky EA, Meyer JJ M, Louw AI. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanicaly selected South African plants. J Ethnopharmacol 2001; 76: 239-245.

Archive of SID

www.SID.ir