مطالعه اثر ضد آیمریایی اسانس گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) در خرگوش آزمایشگاهی در شرایط In vivo و In vitro

• **محمد یخچالی**، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ایران
• **علیرضا خسروی**، گروه آموزشی قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، تهران- ایران

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۳

چکیده

پس از شناسایی و جمع آوری گیاه درمنه، عصاره آبی *A. sieberi* به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) تهیه گردید و اووسیستهای غیر اسپرولە مورد نیاز از ۵۹ خرگوش آزمایشگاهی (نژاد سفید نیوزیلندی) جمع آوری شدند. مطالعه اثر رقت های مختلف اسانس الکلی *A. sieberi* بر اووسیســت های اســپرولە و غیراسپرولە آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدنی بیانگر بروز اثرات متفاوتی از این رقت ها بود . به طوری که بیشترین و کمترین میزان اثر ضد آیمریایی به ترتیب در رقت ۱ و رقت یک‌دهم مشــاهده گردید . یک رابطه خطی نیز بین میزان اثر کشــندگی اســانس برای اووسیست های غیر اسپرولە در مقایسه با گروه شــاهد وجود داشــت (٪۹۷= X/r ۰/۹۰۵ +۳۴۶۹۵۷= (E (y/x). خورانیدن اووسیســت های اسپرولە و غیراسپرولە مجاور شده با غلظت پایه اسانس گیاهی به خرگوش و کنترل زمان شروع دفع اووسیست از زمان خورانیدن اووسیست نشان داد که پس از گذشــت مدت زمان لازم برای طی شــدن چرخه تکاملی انگل ، اووسیست تمامی گونه های آیمریا توانستند از بدن خرگوش دفع شوند . این نتیجه بیانگر بی اثر بودن اسانس بر اووسیست و اسپوروزوئایت های انگل در داخل اووسیست بوده و اووسیست به خوبی در برابر رقت های مختلف اسانس مقاومت نموده است

کلمات کلیدی: اسانس، گیاه درمنه، اووسیست آیمریا، خرگوش آزمایشگاهی

Pajouhesh & Sazandegi No 64 pp: 48-51

In vitro and In vivo assessment of plant essence (*Artemisia sieberi*) coccidiocidal effect on rabbit coccidiosis

By: Yakhchali, M. Pathobiology Department. Parasitogy Division, Faculty of Veterinary Medicine, Nazlu Campus, Urmia University, Urmia, Iran; Khosravi, A.R. Mycology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University Tehran, Iran

Study on coccidiocidal effect of different dilutions alcoholic essence of artemisia on sporulated and non-sporulated oocysts showed different effects. So that, maximum and minimum coccidiocidal rate of essence were observed in original and 1/10. It was showed a linear relationship between coccidiocidal effect of essence and non-sporulated oocysts that were exposed by original dilution (E (y/x) = 0.346957+0.905x, r =97%). Inoculation of sporulated and non-sporulated oocysts and pre patent period indicated that oocysts shading began on ninth day of infection as usual. Moreover, In vivo experiment showed that essence could not affect sporozoite within oocyst.

Key words: Plant essence, *Artemisia sieberi*, Oocyst, Eimeria, Rabbit

مقدمه

گیاه درمنه با نام علمی *A. sieberi* از تیره کامپوزیتیا می‌باشد که در مناطق با میزان بارندگی سالیانه کمتر از ۲۰۰ میلی‌متر رشد می نماید این گونه در منابع قدیمی تحت عنوان *A. herbalba* نامیده می شد (۶،۱۰،۱۳).کوکسیدیوز کبدی و روده ای نیز از بیماریهای شایع معدی روده ای خرگوش است و بیشتر در خرگوش های جوان مشاهده می شود . تمامی عوامل کوکسیدیوز خرگوش از خانواده آیمری ایده می باشند (۱۱) و تاکنون ۱۲ گونه آیمریایی از خرگوش های مبتلا گزارش شده اند. البته , تعداد کمی از آنها از نظر بیماریزایی اهمیت دارند (۹) . با توجه به اهمیت پرورش و نگهداری خرگوش جهت مصارف آموزشی و تحقیقاتی (۴،۳) و نیز تحقیقات جدید در خصوص نقش اسانس‌های گیاهی به واسطه وجود ترکیبات شیمیایی (ماده موثره) که گیاه تولید می کند ، استفاده از اسانس گیاهی می تواند به عنوان یکی از تدابیر مناسب برای درمان غیر شیمیایی کوکسیدیوزیس در این دام و الگویی برای بکارگیری تجربی آن در سایر دام ها باشد .

هدف از این مطالعه جدا سازی اسانس گیاه درمنه و مطالعه تجربی اثر ات ضد آیمریایی آن بر اووسیست آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدنی بود .

مواد و روش کار

الف - روش تهیه اسانس و کنترل کمی و کیفی - پس از شناسایی گیاه و جمع آوری آن نسبت به اسانس گیری گیاه و کنترل کیفی و کمی اسانس آن اقدام گردید .

۱- اسانس گیری از درمنه - اسانس درمنه از اندام هوایی گیاه درمنه با نام علمی *A. sieberi* بدست می آید . تهیه و تعیین مقدار اسانس فرار با استفاده از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس گیری کیسر و لانگ انجام گرفت(۲).

۲ - آزمایشات کیفی - بعد از تهیه اسانس و تخلیص و تصفیه آن اولین آزمایش که روی آن انجام گرفت تعیین ضریب شکست، چرخش نوری و وزن مخصوص بود (۲).

۳ - آزمایشات کمی - برای تعیین نوع و مقدار مواد متشکله اسانس از آنالیز با دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل شده با طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده گردید .

ب - روش تهیه اووسیست آیمریا و اسپروله کردن- از ۵۹ خرگوش آزمایشگاهی (نژاد سفید نیوزیلندی) نمونه مدفوع جمع آوری گردید . برای تعیین تعداد اووسیست در یک گرم مدفوع از روش شناورسازی استفاده شد (۱، ۵، ۸) .

نمونه مدفوع خرگوش‌ها در بیکرومات پتاسیم ۲٪ به منظور اسپروله شدن خیسانده می‌شدند . سپس در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۹۶ - ۷۲ - ساعت نگهداری می‌شدند تا اووسیستها اسپروله گردند (با کنترل روزانه) (۱۴،۱۲،۱۱) .

ج - روش تهیه رقت از اسانس آرتمیزیا سیبری و مجاور نمودن هر رقت با اووسیست غیراسپروله و اسپروله آیمریا در شرایط آزمایشگاهی- تعداد ۲۵۰۰ عدد اووسیست (به تفکیک برای اووسیست اسپروله و غیراسپروله) به کمک لوپ و سمپلر ۱۰۰ لاندا شمارش ، جمع آوری و در هر لوله آزمایش از ۱۸ عدد لوله آزمایش جداگانه ریخته می شدند . سپس به هر لوله آزمایش به ترتیب رقت ۱ ، یک‌پنجم، یک‌صدم، یک هزارم از اسانس افزوده شد (گروه تیمار) و یک لوله حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ و ۲۵۰۰ عدد اووسیست اسپروله(گروه شاهد) نیز برای هر تکرار تهیه می گردید . تمامی لوله ها (گروه شاهد و تیمار) در انکوباتور۲۸- ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ روز با کنترل روزانه (درجه حرارت ، هم زدن و هوادهی با استفاده از پمپ هوا) قرار داده شدند .

۴ - روش مطالعه نحوه اثر اسانس آرتمیزیا سیبری بر اووسیست های اسپروله و غیراسپروله مجاورت یافته با اسانس- بعد از خورانیدن داروی آمپرولیوم (۲ ٪/۰) آزمایش مدفوع برای اطمینان از عدم حضور اووسیست انجام شد . سپس برای بررسی نحوه اثر اسانس بر اووسیستهای غیر اسپروله و اسپروله آیمریا ، از اووسیستهای مجاور شده با غلظت ۱ در گروه تیمار و گروه شاهد به خرگوش‌ها خورانیده شدند . تعداد اووسیست در گرم مدفوع روزانه و میزان پره پتنت پریود (از زمان خورانیدن اووسیست تا زمان شروع دفع اووسیست) به مدت ۱۹ روز بررسی و ثبت گردید .

۵) آزمون آماری- از روش آماری رگرسیون خطی(Linear regretion) و تعیین ضریب همبستگی(r) برای آنالیز نتایج بدست آمده توسط نرم افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

۱ - نتایج حاصل از کنترل کیفی و کمی اسانس ها - عصاره آبی *A. sieberi* تهیه گردید و نتایج کنترل کمی و کیفی آن در جدول ۱ ثبت شده است .

۲ - نتایج مطالعه اثر رقت های مختلف اسانس گیاهی *A. sieberi* بر اووسیست های آیمریا - نتایج بدست آمده از مطالعه اثر اسانس آرتمیزیا سیبری با توجه به آزمایش آنها بر روی دو نوع اووسیست اسپروله و غیراسپروله در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدنی قابل بررسی می باشد .

الف- نتایج مطالعه اثر رقت‌های مختلف اسانس بر اووسیست های غیر اسپروله و اسپروله - مطالعه اثر رقت‌های مختلف اسانس الکلی *A. sieberi* بر اووسیست‌های اسپروله و غیراسپروله آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی در شرایط آزمایشگاهی بیانگر بروز اثرات متفاوتی از این رقت‌ها بود. به

جدول شماره ۱ - نتایج کنترل کمی و کیفی در تهیه اسانس از گیاه درمنه

نوع آزمایش	نتیجه
رنگ	کهربای شفاف
وزن مخصوص	۰/ ۹۸۹۱ ± ۰/۰۱
ضریب شکست	۱/۴۶ ± ۰/۰ ۲
چرخش نوری	(-۶) تا -۱
بررسی وجود توجون	مثبت
درصد وزنی آلفا توجون در اسانس	حداقل ۳۰
درصد وزنی بتا توجون در اسانس	حداقل ۱۰

جدول شماره ۲ – نتایج مطالعه اثر رقت‌های مختلف اسانس گیاهی *A. sieberi* بر اووسیست‌های اسپروله آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی

روز صفر	روز دوم					
غلظت / اووسیست	۱	یک پنجم	یک‌دهم	یک‌صدم	یک‌هزارم	شاهد
۲۵۰۰	۱۰۸۰	۱۷۲۰	۱۱۱۰	۲۴۲۰	۲۳۶۰	۲۵۰۰
۲۵۰۰	۱۴۶۵	۲۳۴۰	۱۹۰۰	۱۵۵۰	۱۵۱۲	۲۱۹۰
۲۵۰۰	۱۴۱۰	۱۳۲۰	۱۷۰۰	۱۳۶۰	۱۶۰۰	۲۱۴۰

جدول شماره ۳ – نتایج مطالعه اثر رقت های مختلف اسانس *A. sieberi* بر اووسیست های غیراسپروله آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی

روز صفر	روز دوم					
غلظت / اووسیست	۱	یک‌پنجم	یک‌دهم	یک‌صدم	یک‌هزارم	شاهد
۲۵۰۰	۱۲۵۰	۱۶۰۰	۱۶۲۵	۱۵۰۰	۱۶۸۰	۲۴۰۰
۲۵۰۰	۷۵۰	۱۳۱۲	۱۵۷۴	۱۳۵۰	۲۰۱۰	۲۰۵۰
۲۵۰۰	۱۰۱۵	۱۲۰۰	۱۱۷۰	۱۳۹۴	۱۳۳۰	۲۳۳۰

طوری که بیشترین و کمترین میزان اثر ضد آیمریایی به ترتیب در رقت ۱ و رقت یک‌دهم مشاهده گردید (جداول ۲و۳). یک رابطه خطی نیز بین میزان اثر ضد آیمریایی اسانس برای اووسیستهای غیر اسپروله در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت (۹۷٪= X,r ۰/۹۰۵ +۳۴۶۹۵۷ =(E (y/x).

ب- نتایج مطالعه نحوه اثر رقت های مختلف اسانس بر اووسیست های غیراسپروله و اسپروله آیمریا ی انگل خرگوش آزمایشگاهی - پس از گذشت مدت زمان لازم برای طی شدن چرخه تکاملی انگل ، اووسیست ها توانستند از بدن خرگوش دفع شوند . این نتیجه بیانگر بی اثر بودن اسانس بر اسپوروزوئایت های انگل در داخل اووسیست بوده و اووسیست به خوبی در برابر رقت های مختلف اسانس ها مقاومت نموده است (جدول ۴) .

بحث

این مطالعه برای نخستین بار در درمان گیاهی خرگوش های آزمایشگاهی مبتلا به عوامل آیمریایی در ایران طراحی و اجرا گردیده است . به این دلیل می توان گفت که نتایج بدست آمده می تواند پایه ای مناسب برای شروع مطالعات تکمیلی باشد .

نتایج مطالعه نشان داد که اثر ضد آیمریایی اسانس با افزایش رقت کاهش می یابد و اووسیست اسپروله قادر به مقاومت در برابر اسانس با حفظ عفونت زایی اووسیست می باشد . فاصله زمانی خورانیدن اووسیست تا شروع دفع آن در مورد اووسیست های اسپروله مجاور شده با اسانس نیز در مقایسه با گروه شاهد و الگوی Soulsby تا حدودی اختلاف نشان داد، به طوری که زمان اسپرولاسیون از ۵ روز به ۱۰ روز افزایش یافت . درحالیکه , اووسیست های غیر اسپروله نسبتا به یک اندازه در مواجهه با غلظت ۱ اسانس پس از خورانیدن به خرگوش های آزمایشگاهی در گروه تیمار و شاهد از خود مقاومت نشان دادند و پره پتنت پریود از ۵ روز به ۱۲ روز افزایش یافت (۱۲) . این مقادیر بیانگر تاثیر نسبی اسانس بر طول چرخه تکاملی آیمریا و بروز تاخیر در زمان پره پتنت پریود دارد که از نظر انتشار آلودگی و برنامه های کنترلی می تواند مورد توجه قرار گیرد. در این زمینه مطالعات مشابهی در طیور انجام شده است. از جمله Allen و همکاران در سال ۱۹۹۷ یک بررسی در خصوص اثرات کوکسیدیوسیدی اندام های مختلف گیاه *Artemisia anova* در کوکسیدیوزیس جوجه مرغ انجام دادند. بر این اساس اثرات ضدکوکسیدیایی برگ و اجزا شیمیایی گیاه از نظرایجاد پروفیلاکسی تغذیه ای مورد آزمایش قرار گرفت . نتایج این تجربیات نشان داد که برگ خشک گیاه (۵٪) در طول سه هفته به طور معنی داری مانع از بروز جراحات *E. tennella* در جوجه‌ها می‌گردد. ولی اثر ممانعتی در برابر گونه‌های *E. acervulina* و *E. maxima* نشان نداد. در صورتی که به هنگام استفاده از آن به مدت پنج هفته (۱٪) در جوجه‌های واکسینه شده با واکسن زنده، مقاومت خوبی را جوجه‌ها در برابر ایجاد جراحات توسط *E. tennella* و *E. acervulina* نشان دادند. البته ماده موثره گیاه *E. anova* به نام آرتیمیزینین می‌باشد که ترکیب پنج درصد آن ۱۷ میلی گرم به کیلوگرم آرتیمیزینین دارد. در این بررسی، از مصرف آن به مدت سه هفته افزایش وزن و کاهش جراحات *E. tennella* به میزان معنی‌داری دیده شد ولی در مقابل *E. acervulina* بی اثر بود. ترکیب کافور و ۱و۸ سینئول به میزان ۱۱۹ میلی گرم به کیلوگرم موجب افزایش وزن و کاهش جراحات حاصل از *E. tennella* گردید . در حالیکه کافور به تنهایی توانست موجب کاهش جراحات حاصل از *E. acervulina* گردد. علاوه بر این، مصرف خوراکی آرتیمیزینین به مدت چهار هفته و با مقادیر ۲ , ۸/۵ و ۱۷ میلی گرم موجب کاهش معنی داری در دفع اووسیست *E. acervulina* و *E. tennella* گردید (۷).

این مقادیر در مقایسه با اووسیست‌های اسپروله می تواند بیانگر اثرگذاری نسبی اسانس در طول چرخه تکامل جنسی آیمریا (گامتوگونی) باشد. همچنین یک

جدول شماره ۴ – نتایج مطالعه اثر رقت های مختلف اسانس *A. sieberi* بر اووسیست‌های غیراسپروله و اسپروله آیمریای انگل خرگوش آزمایشگاهی (بر اساس زمان شروع دفع اووسیست)

اووسیست	غیراسپروله		اسپروله	
زمان (روز)	تیمار	شاهد	تیمار	شاهد
۹ - ۱	–	–	–	–
۱۰	–	+	–	+
۱۱	–	+	–	+
۱۲	–	+	–	+
۱۳	+	+	+	+
۱۴	+	+	+	+
۱۵	+	+	+	+
۱۶	+	+	+	+
۱۷	+	+	+	+
۱۸	+	+	+	+
۱۹	+	+	+	+

رابطه خطی بین میزان اثر ضد آیمریایی برای اووسیست های غیر اسپروله اسانس در مقایسه با گروه شاهد در رقت پایه وجود دارد (E (y/x) = ۳۴۶۹۵۷+ ۰/۹۰۵ X,r =٪۹۷). در صورتی که، این رابطه در مورد میزان اثر ضد آیمریایی برای اووسیست های اسپروله در مقایسه با گروه شاهد اثبات نگردید
(E (y/x) = ۳۴۶۹۵۷+ ۰/۹۰۵ X,r =۹۷٪).

با توجه به یافته های فوق و روش های متداول درمان شیمیایی کوکسیدیوزیس و بیماری های انگلی تک یاخته ای و کرمی در سطح جمعیت دامی کشور ، می توان موارد زیر را برای مطالعات آتی در قالب طرح‌های درمانی و کنترل دارویی پیشنهاد کرد:

الف) بررسی میزان نقش عوامل فردی نظیر سن ، جنس ، نژاد، دفاع میزبان ، خصوصیات هورمونی ، فصل و خصوصیات ترشحی لوله گوارش .

ب) تعیین نقش عوامل تغذیه ای شامل رژیم غذایی ، جیره غذایی و خصوصیات متابولیکی محیط لوله گوارش .

ج) بررسی فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک اسانس گیاهی.

د) تعیین مرز سلامتی و فاصله بین دوز درمانی (ED_{50}) و سمی (LD_{50}) اسانس .

ه) ارزیابی باقیمانده اسانس در بافت حیوانی و مدت زمان دفع آن از بدن .

و) سنجش بیولوژیک تداخل عمل اسانس با چرخه زندگی انگل (ها) .

تداوم این قبیل مطالعات به دلایل ذیل در سطح جمعیت دامی کشور و برای دستیابی به فن آوری های جدیدتر در درمان پاره‌ای از بیماری های انگلی دامی کشور به کمک گیاهان دارویی مفید و میسر است:

۱ - عدم نیاز به فن آوری های خاص .

۲ – عدم نیاز به وارد نمودن مواد اولیه .

۳ – دسترسی آسان و در حد وفور به گونه های گیاهی درمانی در اقلیم های مختلف ایران .

۴ - عدم وجود مخاطرات زیست محیطی به دلیل قابل تجزیه بودن در محیط زیست .

۵ – کاربرد آسان در تجویز برای انواع دام‌ها.

۶ - بسته بندی آسان و عدم ارزبری نظیر آنچه در مورد داروهای شیمیایی مطرح است.

این مطالعه با اعتبارات تحقیقاتی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به مرحله اجرا درآمده است.

منابع مورد استفاده

۱ - اسلامی ، ع. ,۱۳۷۶. کرم شناسی دامپزشکی (نماتودا و آکانتوسفالا) ، جلد سوم ، چاپ و انتشارات دانشگاه تهران ، صفحات ۸۰۰- ۷۹۹

۲ - باباخانلو، پ. ؛ میرزا، م.؛ سفیدکن ، ف.؛ احمدی، ل.؛ برازنده،م.م. ؛ عسکری ، ف. ,۱۳۷۷. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر(۱). انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع. چاپ اول ، صفحه ۱۴-۴.

۳ - تاج بخش ، ح. ؛ ستاری ، م. ,۱۳۵۱. پرورش حیوانات آزمایشگاهی و بیماریهای آنها ، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران ، چاپ اول ، صفحات ۳۲۶-۳۲۰

۴ - نجف زاده ، ح. ,۱۳۷۸. حیوانات کوچک آزمایشگاهی ، چاپ اول ، چاپ گنجینه ، صفحه ۷-۱ ، ۸۹

۵ - نیاک ، ع. ,۱۳۴۸. گونه های کوکسیدیوز خرگوش های اهلی ایران و میزان درصد آلودگی ، نامه دامپزشکی ، جلد ۲۵ ، شماره ۳ ، صفحات ۳۶-۳۲

6- Ahti, H.; L., Suominen; J., Ulvinen; T.; Uotila, P. ,1998. Retkeilykasvio (Field Flora of Finland); Ed. 4., pp. 656. Finnish Museum of Natural History, Botanical Museum. Helsinki.

7-Allen, P.C.; Danforth, H.D.; Augustine, P.C.; Shirley, M.; Tomley, F. ,1998. Dietary modulation of avian coccidiosis. International-Journal for Parasitology. 1998, 28: 7, 1131-1140.

8- Fudge, A. 7. M. ,2000. Laboratory medicine: Avian & Exotic pets. Saunders company, pp. 251 - 360

9- Jenkins, J. R. ,2000. Coccidia in the Intestine and liver. House Rabbit Society, San Diego Chapter Write, Spring Verlag, CA 91979

10- Mela, A. J., Cajander, A. K. 1906. Suomen Kasvio; Viides painos Northern Prairie Wildlife Research Center http//www.npsc.nbsc.nbs.gov/index.htm

11- Niak, A. ,1967. Eimeria in Laboratory Rabbits in Tehran. Veterinary Record, 81, 21, 549

12- Soulsby, E. J. L. ,1986. Arthropods, Protozoa and Helminthes of domesticated animals. 7th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 657 – 661

13- Tamu, B.W.G. 1998. A synonymized Checklist of the Vascular Flora of the United States. A data base interface; BONAP U.S. Checklist, provided by Texas A. & M. Bioinformatics woking group; Based onBiota of North America Program.

14-Vanzutphen, L. F. M.; Bauman, S. V.; Beynen, A. C. ,1993. Principals of laboratory animal science(book). Published by Elsevier.