دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده بهداشت

عنوان:

تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه *رامنوس کاتارتیکا* (*Rhamnus Cathartica*) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط In-vivo.

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد
در
انگل شناسی پزشکی

نگارنده:
فاطمه بیات

اساتید راهنما:
سرکارخانم دکتر افسانه متولی حقی
جناب آقای دکتر مهدی ناطق پور

سال دفاع: ۱۴۰۰
شماره پایان نامه:.....

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده بهداشت

عنوان:

تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه *رامنوس کاتارتیکا* (*Rhamnus Cathartica*) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط In-vivo.

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

در

انگل شناسی پزشکی

نگارنده:

فاطمه بیات

اساتید راهنما:

سرکارخانم دکتر افسانه متولی حقی

جناب آقای دکتر مهدی ناطق پور

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر عباس رحیمی فروشانی

جناب آقای دکتر امیر امانی

سال دفاع: ۱۴۰۰

شماره پایان نامه:.....

اظهارنامه دانشجو

موضوع پایان نامه: تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه *رامنوس کاتارتیکا* (***Rhamnus Cathartica***) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش **Balb/c** و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط **In-vivo**.

اینجانب **فاطمه بیات** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران گواهی می نمایم که تحقیقات ارائه شده در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده و صحت و اصالت مطالب نگارش شده مورد تائید می باشد و در موارد استفاده ازکار دیگر محققان به مرجع مورد استفاده اشاره شده است. بعلاوه گواهی می نمایم که مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون برای دریافت مدرک توسط اینجانب یا فرد دیگری ارائه نشده است وهیچ بخش آن از کارسایر دانشجویان و محققین کپی نشده است. در تدوین متن پایان نامه دستورالعمل مصوب دانشگاه را بطور کامل رعایت کرده ام.

امضای دانشجو:

تاریخ:

حق چاپ، نشر و مالکیت معنوی پایان نامه

۱. هرگونه کپی برداری به صورت کل پایان نامه یا بخشی ازآن تنها با موافقت استاد راهنما مجاز است.

۲. کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد و بدون اجازه کتبی دانشگاه به شخص ثالث قابل واگذاری نیست.

۳. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

این پایان نامه حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۴۶۱۱۱-۹۹-۱-۹۹ می باشد که در دانشکده بهداشت به تصویب رسیده است و دارای کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.۱۳۹۸.۲۹۵ میباشد.

هرکس در عجبی و عجب من این است

کو نگنجد به میان چون به میان می آید؟

این پایان نامه را در کمال افتخار و امتنان و با تشکر و سپاس بیکران تقدیم می نمایم به :

- **محضر ارزشمند پدر، مادر بی نهایت عزیزم، مادربزرگ، خاله مهربان و عزیزم که بسیار بسیار دوستشان دارم و درتمام دوران زندگی ام با محبت ها و تلاش های بی وقفه اشان، عارفانه بودن و خوب زیستن را به من آموخته اند.**
- **محضر برادران دوست داشتنی و بزرگوارم که در تمام دوران زندگی و تحصیلم با تلاش های محبت آمیزشان، موفقیت و شاد زیستن را به من آموخته اند.**
- **محضر اساتید فرزانه، فرهیخته و گرانبهایم که در راه کسب علم و معرفت و اخلاق مرا یاری نموده اند.**

و

همه تشکر و قدردانی ام ویژه کسانی است که در همه سختی ها کنارم بودند

و در تک تک لحظات زندگی همراه و هم قدمم بوده اند

ممنونم ازتون بابت تمام آنچه که بی منت به من بخشیدید و تنهایم نگذاشتید

خداوند بزرگوارم، ضمن تشکربی نهایت، توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همسو با پیشرفت علم و دانش و پژوهش جهت رشد و شکوفایی کشور عزیزم ایران را عنایت بفرما.

تشکر و قدردانی

- با تشکر فراوان از اساتید راهنمای ارجمندم **سرکارخانم دکتر افسانه متولی حقی** و **جناب آقای دکتر مهدی ناطق پور** که با بزرگواری ، مهربانی، صبر ، حوصله و دقت فراوان درتمام مراحل پایان نامه یاری ام نمودند.
- با تشکرو قدردانی فراوان از استاد ارجمند، **جناب آقای دکتر بهمن رحیمی اسبوئی** و هم کلاسی کارشناسی ارشد و دوست عزیز **جناب آقای عارف فاریابی** که با صبر و حوصله فراوان درتمام مراحل پایان نامه به عنوان همکار اصلی طرح، مرا یاری نمودند.
- با سپاس فراوان از اساتید مشاور محترم، جناب آقای دکتر عباس رحیمی فروشانی و جناب آقای دکتر امیرامانی .
- **با تشکر از تمام اساتید عزیزم:**

جناب آقای دکتر ایرج موبدی، سرکارخانم دکتر بهناز آخوندی، سرکارخانم دکتر سعیده شجاعی، جناب آقای دکتر غلارمضا مولوی، جناب آقای دکتر مهدی محبعلی، جناب آقای دکتر غلامرضا حسن پور، جناب آقای دکترمحمد باقر رکنی، جناب آقای دکتر محمدرضا پورمند، جناب آقای دکتر علی فرهناک، سرکارخانم دکترعشرت بیگم کیا، سرکارخانم دکتر هما حجاران، جناب آقای دکتر یاور راثی، جناب آقای دکتر ذبیح الله زارعی، جناب آقای دکتر محمدرضا عبایی، جناب آقای دکتر مصطفی رضائیان، سرکارخانم دکتر الهام کاظمی راد، سرکار خانم دکتر فرزانه ذهبیون، سرکارخانم دکتر فائزه نجفی، جناب آقای دکتراحمد رئیسی، جناب آقای محمد باقر مولائی راد، جناب آقای دکتر مهدی یاسری، جناب آقای دکتر کامران اکبرزاده، جناب آقای دکتر علیرضا زهرائی رمضانی، جناب آقای دکتر محمد مهدی امیری، جناب آقای دکتر سید علیرضا رضوی، جناب آقای دکتر فاضل شکری، سرکار خانم دکترفروغ گلساز شیرازی.

- با سپاس و تشکر ویژه ازکارشناسان محترم آزمایشگاه تخصصی مالاریا، **سرکارخانم لیلا فریور** و **سرکارخانم زهرا صیاد طلایی**، به خاطر همکاریهای خالصانه و بی دریغشان در تمام مراحل پایان نامه.
- با سپاس از پرسنل محترم واحد پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده بهداشت و دانشکده فارماکولوژی، آقای اسکندری، آقای قاسمی.
- با سپاس فراوان از همکاران محترم گروه انگل شناسی پزشکی: سرکارخانم ها صمیمی، غلامی، عناصری، سلیمی، آریان پور، طریقی، کاکوئی.
- با سپاس از همکاران محترم آموزش: جناب آقای صالحی، سرکارخانم دانش و سرکارخانم تاجیک.
- با تشکر از پرسنل محترم مرکز کامپیوتر و کتابخانه دانشکده بهداشت.
- با تشکر از همکاران محترم طرح، سر کارخانم دکتر آرونا چابرا، خانم دکتر خدیجه خضری.
- با تشکر و سپاس صمیمانه از دوستان و هم کلاسی های کارشناسی ارشد عزیز هاجر معصومی کیا و محمد صابری روزی.
- با تشکر از همکاران محترم آزمایشگاه تخصصی پرتو رایان رستاک و شرکت مهامکس.

چکیده فارسی

تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه *رامنوس کاتارتیکا (Rhamnus Cathartica)* بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط In-vivo.

مقدمه و هدف

مالاریا یک بیماری تک یاخته ای قدیمی مهم و فراگیر است ویکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها بخصوص کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است. این بیماری نقش مهمی در تاریخ پزشکی داشته و به طور قابل ملاحظه ای بیش از هر بیماری عفونی دیگر به انسان آسیب رسانده است، و بیش از نیمی از مردم جهان در خطر ابتلا به این بیماری هستند. موارد مرگ و میر ناشی از بیماری مالاریا در بین ایرانیان طی سالهای اخیر را می توان به سفرهای کشورهای خارجی به ویژه کشورهای آفریقایی نسبت داد.

در زمینه درمان، کلروکین دارویی موثر بر روی انگل مالاریا بوده است که سالیان متمادی از آن در نقاط مختلف جهان استفاده شده است و درموارد مقاومت دارویی نیز از فانسیدار استفاده میشود، در حال حاضر با بروز مقاومت در انگل *پلاسمودیوم فالسیپاروم* و حتی در برخی نقاط در *پلاسمودیوم ویواکس*، موجب توجه محققین به لزوم جایگزینی داروهای ضد مالاریا برای درمان این انگل ها شده است.

از آنجا که در سال های اخیر مقاومت دارویی بعضی از پلاسمودیوم ها به داروهای شیمیایی مشکل ساز شده است، اهمیت گیاهان دارویی در درمان مالاریا مورد توجه واقع شده است و استفاده از گیاهان دارویی در مناطق مالاریا خیز از اولویتهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) می باشد. از طرفی پژوهشگران معتقدند که ذرات نانو می تواند اثر بخشی مواد دارویی را افزایش داده و سبب تاثیر قویتر آنها بر عفونت گردد. در این مطالعه فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه *رامنوس کاتارتیکا (Rhamnus cathartica)* بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط in vivo مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روش کار

به منظور تعیین موثرترین غلظت نانوامولسیون امودین بر روی موش های Balb/c ، ۴۵ سر موش Balb/c که از نظر جنس (نر) ، سن (۱۰-۸ هفته ای) و وزن (۲±۲۰) همسان سازی شده بودند، به ۹ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. به همه ی موش ها (به جز گرو های ۸ و ۹) بر اساس روش درمانی PETERS ، تعداد 10^6 عدد انگل پلاسمودیوم برگئی (سوش هندی NICD) بصورت زیر جلدی تزریق شد. ۲ ساعت بعد، درمان دارویی صورت گرفته و تا روز ۴ به صورت پیاپی ادامه پیدا کرد. بدین صورت که به گروه های ۱ تا ۴ غلظت های مختلف نانو امولسیون امودین (Nano-Emodin) به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم برکیلوگرم تزریق شد، گروه ۵ غلظت ۴۰۰ میلی گرم از امودین جامد معمولی (غیر نانو) تزریق شد، به گروه ۶ به عنوان

گروه کنترل مثبت ، ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم داروی کلروکین و به گروه ۷ به عنوان گروه بدون درمان (کنترل منفی) پلاسیبو (سرم فیزیولوژی) تزریق شد و گروه ۸ به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک داروهای مورد بررسی، غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو امودین مایع تزریق شد (بدون تزریق انگل) و گروه ۹ به منظور کنترل مرگ و میر تصادفی موش ها در حیوانخانه بدون تزریق انگل و دارو قرار گرفت. برای تعیین پارازیتمی و محاسبه ی مهاررشد انگل پلاسمودیوم برگئی، روزD4 وD7 از انتهای دم موش ها خونگیری بعمل آمد و از هر نمونه گسترش نازک خون تهیه، فیکس و پس از رنگ آمیزی با گیمسا، تعداد انگل ها مورد شمارش قرار گرفتند و با گروه کنترل مقایسه شد. بررسی موش ها از نظر مرگ و میر نیز تا D14 ادامه داشت. بعد از روز ۱۴ موش ها کشته شده و گروه توکسیسیتی بعد از ۱۴ روز نیز تشریح شد (با استفاده از روشهای رایج در واحد پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی). اندازه کبد و طحال آنها اندازه گیری شد و با گروه های کنترل مثبت مقایسه شد. همچنین به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک دارو بر روی آنزیم های کبدی، در روز D14 که از همه موش ها خونگیری صورت گرفت، مقادیر پارامترهای کبدی سرم شامل AST، ALT و ALP با استفاده از کیت های اندازه گیری (Pars Azmoon، Iran) و با استفاده از یک دستگاه آنالایزر بیوشیمی اندازه گیری شدند. وزن موش ها نیز در قبل و بعد از درمان ثبت گردید. در پایان کار از اطلاعات بدست آمده در مرحله in vivo با استفاده از نرم افزار SPSS ، سری۱۶و به روش آزمون های Kolmogorov-Smirnovz، One way- Anova ، Kruskal-wallis وPost Hoc ، آنالیز آماری انجام شد و نتایج تجزیه و تحلیل گردید وبه صورت جدول و نمودارهای مقایسه ای ارائه گردید.

یافته ها

بررسی حاصل از تاثیر عصاره نانوامودین مایع در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و امودین جامد غیر نانو در غلظت ۴۰۰میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر روی میزان پارازیتمی انگل *پلاسمودیوم برگئی* در شرایط درون تنی نشان داد که با توجه به کاهش پارازیتمی در روز D4 ، و افزایش آن در D7، میتوان گفت عصاره امودین در تمام غلظت های مورد بررسی به طور قابل توجهی موثر بوده است و دراین بین غلظت ۴۰۰ mg/kg از نانو امودین مایع با ۵۲/۳۰ درصد ممانعت از رشد و غلظت ۴۰۰ mg/kg از امودین جامد غیر نانو با ۶۷/۶۹ درصد ممانعت از رشد، بهتر اثر کرده اند. درنتایج حاصل از آزمون های آماری در روز D4 ، اختلاف معنی داری بین گروه های موشهای آلوده که با عصاره امودین درمان شده اند با گروه شاهد (پلاسیبو) وجود دارد. که نشان دهنده موثر بودن دارو بر روی کاهش پارازیتمی نیز می باشد. (P-value <۰/۰۰۱). در روزD7 نتایج نشان داد که بین گروه های موش های آلوده به پلاسمودیوم برگئی و درمان شده با عصاره دارویی امودین در غلظت های مختلف در مقایسه با گروه شاهد یا کنترل منفی (موشهای آلوده که پلاسیبو دریافت کرده اند) در میزان پارازیتمی تفاوت معنی داری وجود ندارد.

(p-value >۰/۰۵). با بررسی اندازه ی کبد و طحال موش ها و اندازه گیری آنزیم های کبدی و مقایسه آنها با گروه درمانی کلروکین هیچ یک از غلظت های دارویی دارای اثر سمی روی کبد و طحال و آنزیم های کبدی نبودند، احتمالا چنانچه عصاره امودین در مدت زمان طولانی تر و در دوزهای بیشتر و یا به دفعات بیشتر مصرف گردد احتمال اثر مثبت شان بیشتر خواهد بود.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره امودین چه به صورت مایع و نانو شده و چه به صورت جامد دارای اثر درمانی بر روی موش های Balb/c مبتلا به *پلاسمودیوم برگئی* می باشد. این عصاره دارای هیچگونه اثر سمی روی ارگان های داخلی موش نبوده و روی آنزیم کبدی نیز اثر ندارد و به نظر میرسد که به دلیل نیمه عمر پایین چنانچه در مدت زمان بیشتر از ۴ روز و در دوزهای بیشتر و یا به دفعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد احتمالا بتواند اثرات پایدار یا Stable را آشکار سازد و انگل را به میزان بیشتری سرکوب کند. از آنجایی که در این مطالعه، عصاره تام دارو مورد استفاده قرار گرفته است، لذا تفکیک اثر فراکشن های مختلف به صورت جداگانه بر روی انگل ناممکن است، بنابراین برای یافتن ماده موثره و به منظور کسب نتایج دقیق تر انجام پروسه فراکشنیشن (تخلیص سازی) ضروری به نظر می رسد که جزء اهداف این مطالعه نبوده است.

واژگان کلیدی

پلاسمودیوم برگئی؛ نانو امودین؛ *رامنوس کاتارتیکا*؛ درمان؛ کلروکین؛ موش Balb/c.

فهرست مطالب

۱. **فصل اول – کلیات و بیان مسئله** ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. تعریف مالاریا ۳

۱-۳. تاریخچه مالاریا در جهان ۳

۱-۴. تاریخچه مالاریا در ایران ۶

۱-۵. تاکسونومی انگل های مالاریا (Toxonomy) ۸

۱-۶. اهمیت مطالعه بر روی پلاسمودیوم های جوندگان در تحقیقات مالاریا ۱۱

۱-۷. سیرتکاملی ومورفولوژی انگل های مالاریا ۱۱

۱-۷-۱ دوره جنسی انگل مالاریا (اسپروگونی) ۱۲

۱-۷-۲ . دوره غیرجنسی انگل های مالاریا (شیزوگونی) ۱۳

۱-۷-۲-۱. شیزوگونی نسجی ۱۳

۱-۷-۳ . مرحله ی به وجود آمدن سلول های جنسی (گامتوگونی) ۱۶

۱-۸ . بیماری زایی انگل های مالاریا ۱۷

۱-۸-۱. مرحله لرز ۱۸

۱-۸-۲. مرحله تب ۱۸

۱-۸-۳. مرحله عرق ۱۸

۱-۸-۱-۱. بیماری زایی پلاسمودیوم ویواکس ۱۹

۱-۸-۱-۲. بیماری زایی پلاسمودیوم اووال ۱۹

۱-۸-۱-۳. بیماری زایی پلاسمودیوم مالاریه ۲۰

۱-۸-۱-۴. بیماری زایی و عوارض ناشی از پلاسمودیوم فالسیپاروم ۲۰

۱-۹ اپیدمیولوژی مالاریا ۲۲

۱-۹-۱. اپیدمیولوژی مالاریا در ایران ۲۳

۱-۱۰. راه های انتقال مالاریا ۲۴

۱-۱۱. تشخیص بیماری مالاریا ۲۴

۱-۱۱-۱. روش پارازیتولوژیک ۲۵
۱-۱۱-۲. روش مولکولی ۲۵
۱-۱۱-۳. روش سرولوژیک ۲۶
۱-۱۱-۴. کشت ۲۶
۱-۱۲. مقاومت دارویی در مالاریا ۲۶
۱-۱۳. کنترل و پیشگیری مالاریا ۲۷
۱-۱۴. درمان و داروهای ضد مالاریا ۲۹
۱-۱۵. درمان مالاریا در ایران ۳۰
۱-۱۶. استفاده از نانوذرات در درمان بیماری ها ازجمله مالاریا ۳۱
۱-۱۷. امودین چیست؟ ۳۱
۱-۱۸. کاربرد امودین و خواص آن ۳۴
۱-۱۹. بیان مسئله و ضرورت اجرای آن ۳۵
۱-۲۰. اهداف ۴۰
۱-۲۰-۱.اهداف اصلی طرح ۴۰
۱-۲۰-۲.اهداف فرعی طرح ۴۰
۱-۲۰-۳.اهداف کاربردی طرح ۴۰
۱-۲۱. فرضیات و سوالات پژوهشی ۴۰
۱-۲۲. ملاحظات اخلاقی ۴۱
۱-۲۳. محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها ۴۱
۲. **فصل دوم – بررسی متون** ۴۲
۳. فصل سوم – مواد و روش کار ۴۹
۳-۱. نوع مطالعه ۵۰
۳-۲. روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن ۵۰
۳-۳. مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن ۵۰
۳-۴. گروه بندی موش های Balb/c ۵۰

۳-۵. انگل پلاسمودیوم برگئی مورد بررسی ۵۲
۳-۶. عصاره گیری و تهیه امودین ۵۲
۳-۷. اندازه گیری مقیاس ذرات نانو ۵۳
۳-۷-۱. روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای مطالعه اندازه نانوذرات ۵۳
۳-۸. کلروکین: (Chloroquine) ۵۵
۳-۹. طرز تهیه غلظت داروی کلروکین جهت تزریق به موش Balb/c ۵۵
۳-۱۰. روش آلوده کردن موش های مورد مطالعه به انگل پلاسمودیوم برگئی ۵۵
۳-۱۱. وسایل مورد نیاز جهت تهیه نمونه خون از موش ۵۵
۳-۱۲. مواد مورد نیاز برای رنگ آمیزی نمونه خون تهیه شده از موش ۵۵
۳-۱۳. روش تهیه خون از موش های مورد مطالعه و تهیه گسترش های خونی ۵۷
۳-۱۴. رنگ آمیزی گسترش های خونی تهیه شده ۵۷
۳-۱۵. شمارش انگل ها ۵۷
۳-۱۶. بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد ۵۷
۳-۱۷. بررسی هپاتومگالی و اسپلنومگالی ۵۹
۳-۱۸. وسایل مورد نیاز جهت جداسازی و اندازه گیری کبد و طحال موش ها ۵۹
۳-۱۹. محاسبه ED50 ..... ۶۰
۳-۲۰. مراحل تعیین ED50 امودین ۶۰
۳-۲۱. بررسی اثرات همولایزیس ۶۰
۳-۲۲. تست سمیت دارو (سایتوتوکسیسیتی) ۶۱
۳-۲۳. طرز تهیه PBS ۶۱
۳-۲۴. بررسی آنزیم های کبدی ۶۱
۳-۲۵. آنالیز آماری ۶۱
۴. فصل چهارم – یافته ها ۶۲
۴-۱. یافته های مربوط به میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل ۶۳
۴-۲. یافته های مربوط به نمودارهای مقایسه ای میزان پارازیتمی و در صد ممانعت از رشد در روز D4 ۶۵

۴-۳. نتایج حاصل ازتعیین ED50 عصاره امودین در روز D4 درمان ۶۷
۴-۴. یافته های مربوط به نمودارهای مقایسه ای میزان پارازیتمی و در صد ممانعت از رشد در روز D7 ۶۸
۴-۵. تست سمیت دارو (سایتوتوکسیستی) ۷۰
۴-۶. یافته های مربوط به بررسی اندازه کبد در موش های مورد مطالعه ۷۰
۴-۷. نتایج آزمون Post-Hoc برای اندازه طول کبد موش ها ۷۱
۴-۸. یافته های مربوط به بررسی اندازه طحال موش های مورد مطالعه ۷۲
۴-۹. یافته های مربوط به بررسی اندازه آنزیم های کبدی موش های مورد مطالعه..... ۷۲
۴-۱۰. نتایج آزمون Post-Hoc برای آنزیم های کبدی موش ها..... ۷۳
۴-۱۱. بررسی اثر همولایزیس داروی امودین بر روی RBC های خونی انسانی..... ۷۳
۵. فصل پنجم – بحث و نتیجه گیری ۷۵
۵-۱. بحث ۷۶
۵-۲. نتیجه گیری..... ۸۱
۵-۳. پیشنهادات ۸۲

فهرست جداول

جدول ۱-۱: تاکسونومی انگل های مالاریا.....۸

جدول ۱-۲: تاکسونومی عصاره امودین.....۳۵

جدول ۱-۳: گروه بندی موش ها جهت تعیین ED50 در غلظت های مختلف عصاره امودین ۵۱

جدول ۴-۱: نتایج آزمون Kolmogorov- Smirnovz جهت بررسی نرمال بودن متغییرها ۶۳

جدول ۴-۲: نتایج آزمون One -Way Anova حاصل از پارازیتمی در روزهای D4 ، D7.....۶۴

جدول ۴-۳: میانگین و انحراف معیار اندازه گیری شده در میزان پارازیتمی روزهای D4 و D7 .....۷۰

جدول ۴-۴: نتایج آزمون One -Way Anova در مقایسه اندازه کبد موش ها ۷۱

جدول ۴-۵: مقایسه اندازه کبد موش ها با استفاده از آزمون Post Hoc ۷۱

جدول ۴-۶: نتایج آزمون One -Way Anova برای مقدار آنزیم های کبدی موش ها ۷۳

جدول ۴-۷: نتایج آزمون Post Hoc در آنزیم های کبد موش ها.....۷۳

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱: میزان درصد پارازیتمی در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D4 ..... ۶۶

نمودار ۴-۲: میزان درصد ممانعت از رشد در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D4 ..... ۶۶

نمودار ۴-۳: تعیین ED50 عصاره امودین در پارازیتمی روز D4 ..... ۶۷

نمودار ۴-۴: تعیین ED50 عصاره امودین در پارازیتمی روز D4 ..... ۶۸

نمودار ۴-۵: میزان درصد پارازیتمی در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روزD7 ..... ۶۹

نمودار ۴-۶: میزان درصد ممانعت از رشد در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روزD7 ..... ۶۹

فهرست تصاویر

شکل ۱-۱: نقشه پراکندگی مالاریا درجهان در سال ۲۰۲۰ (۴).....۵

شکل ۱-۲: جنس ، زیر جنس و گونه های پلاسمودیوم (۱۸) ۱۰

شکل ۱-۳: چرخه زندگی انگل مالاریا در میزبان مهره دار و بی مهره (۱۹).....۱۶

شکل ۱-۴: چرخه زندگی پلاسمودیوم در انسان و حشره (۲۰) ۱۷

شکل ۱-۵: ساختار شیمیایی عصاره امودین و Rhamnus cathartica & Emodin (۳۷) ۳۴

شکل ۳-۱: عصاره نانوشده امودین در حالت مایع ۵۳

شکل ۳-۲: میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ۵۴

۱. فصل اول – کلیات و بیان مسئله

۱-۱. مقدمه

مالاریا یک بیماری تک یاخته ای قدیمی مهم و فراگیر است و یکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها بخصوص کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است. در واقع یک بیماری عفونی انگلی تب دار است که در اثر ورود تک یاخته ها به سلول های کبدی و بعد به داخل گلبول های قرمز ایجاد و با حملات تب ولرز متناوب (تب نوبه)، کم خونی، بزرگی طحال وکبد و گاه با عوارض کشنده همراه است. عامل بیماری مالاریا درانسان انگل پلاسمودیوم از گروه شاخه اپی کمپلکسا می باشد که توسط گزش پشه آنوفل ماده آلوده اغلب منتقل می گردد، این بیماری نقش مهمی در تاریخ پزشکی داشته و به طور قابل ملاحظه ای بیش از هر بیماری عفونی دیگر به انسان آسیب رسانده است. بخشی از چرخه زندگی این انگل در بدن میزبان مهره دار (پستانداران، پرندگان، خزندگان) و بخشی دیگر در بدن میزبان بی مهره، پشه هایی از جنس آنوفل[۱]، کولکس[۲] و آادس [۳] طی می شود و با علائمی مثل لرز، تب، تعریق می باشد، البته علائم اختصاصی نیست اما عمدتا وجود دارد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۰، حدود ۲۲۹ میلیون نفر در کل جهان به مالاریا مبتلا بوده اند که ۴۰۹۰۰۰ نفر جان خود را از دست دادند. که ۶۷ درصد آن را کودکان زیر ۵ سال تشکیل داده اند. همچنین ۹۴ درصد مرگ و میر ها از قاره افریقا گزارش می شود. پلاسمودیوم ویواکس انگل غالب عامل مالاریا در خارج از قاره آفریقا، در مناطق مالاریا خیز ازجمله ۷۲/۳٪ در آمریکا و ۵۱/۷٪درآسیای جنوب شرقی، ۲۳/۳٪ در شرق مدیترانه است. (۱,۲)

مالاریا هنوز از مهم ترین بیماریهای انگلی است و سالانه میلیون ها مورد مالاریا در جهان گزارش می شود. حدود ۱۵۶ گونه پلاسمودیوم شناخته شده و در انواع گونه های انسانی، حیوانی، پرندگان، جوندگان و... می باشد. چهار گونه از آنها در انسان ایجاد بیماری مالاریا می کنند که عبارت اند از:

پلاسمودیوم فالسیپاروم[۴]، *پلاسمودیوم ویواکس*[۵] ، *پلاسمودیوم اووال*[۶] ، *پلاسمودیوم مالاریه* (۳)[۷].

البته چند سالی است *پلاسمودیوم ناولزی*[۸]که عامل ایجاد مالاریا به طور مشترک بین انسان و میمون است در این ۴ گروه عامل انسانی قرار گرفته است (۴).

پلاسمودیوم فالسیپاروم خطرناک ترین و کشنده ترین مالاریا انسانی است که بیشتر درمناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله کشورمان ایران یافت می شود و امروزه ۸٪ یا کمتر به آن مبتلا هستند. *پلاسمودیوم ویواکس* در خارج از قاره آفریقا شایع ترین نوع مالاریا می باشد و گونه غالب ایجاد کننده مالاریا در ایران همواره پلاسمودیوم ویواکس بوده است و در حدود۹۲ ٪ می باشد که در حال حاضر نیز با آن مواجه هستیم. و در

---

[1] Anopheles
[2] Culex
[3] Aedes
[4] *Plasmodium falciparum*
[5] *Plasmodium vivax*
[6] *Plasmodium oval*
[7] *Plasmodium malariae*
[8] *Plasmodium knowlesi*

حال حاضر در سال ۱۴۰۰، حدود ۱۴ مورد ابتلا به پلاسمودیوم فالسیپاروم و ۱۸۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس و مجموعا ۲۰۰ مورد در ایران گزارش شده است.

پلاسمودیوم اووال در برخی مناطق آسیای شرقی ونواحی گرمسیری آفریقا انتشار گسترده ای دارد و در ایران نداریم. *پلاسمودیوم مالاریه* عمدتا در نواحی نیمه گرمسیری معتدل شایع است و بومی ایران نیز می باشد و حتی رازی وابن سینا به آن تب راجعه می گویند و آلودگی به آن در چند سال اخیر در کشور نادر گزارش شده اما احتمال بازگشت می باشد. *پلاسمودیوم ناولزی* که مشترک انسان و میمون است (زئونوز) و در مناطقی که انسان ها درحاشیه جنگل ها زندگی می کنند، جنگل هایی که دارای میمون است مثل کشور مالزی و برخی از کشورهای آفریقایی شایع است و اما انتقال این انگل تا کنون از ایران گزارش نشده است (۵).

نکته قابل توجه دراین تحقیق بررسی اثردرمانی امودین به شکل عصاره نانو شده میباشد.

این مطالعه برای اولین بار در مورد تاثیر ضد مالاریایی داروی امودین می باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی مالاریا در واحد تک یاخته شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است .

۱–۲. تعریف مالاریا

کلمه مالاریا ازدو قسمت Mal به معنی بد و Aria به معنی هوا تشکیل شده است . مالاریا به معنی هوای بد به این دلیل برای این بیماری انتخاب شده است که درابتدا گمان می کردند علت این بیماری هوای بد مناطق با تلاقی در نواحی شایع این بیماری بوده است. مالاریا از وخیم ترین بیماریهای تک یاخته ای است که میزان مرگ و میر ناشی ازآن تا کنون از تمام بیماریهای انگلی بیشتر بوده است. اسامی مترادف آن عبارتند از: در زبان فرانسه پالودیسم [۹]یا تب باتلاقی ، تب نوبه ، تب رومی، تب گرمسیری، تب ولرز، تب متناوب، تب شاگرس، تب مارش [۱۰]، تب طره، تب ساحلی، تب مرداب [۱۱] ، تب جنگل، آگو[۱۲] (۶).

۱–۳. تاریخچه مالاریا در جهان

در متون باستانی با بیش از سه هزارسال قدمت از تمدن های ایران ، هند، مصر و چین ، مالاریا به خوبی شرح داده شده است که دال بر سابقه بیماری است. مالاریا یک بیماری قدیمی است که از جنوب شرقی آسیا واحتمالا از گونه های خاص میمون های آن ناحیه به انسان رسیده است. از گونه های پلاسمودیوم میمون ها به انسان میتوان به *پلاسمودیوم ناولزی* (انتقال به صورت طبیعی و درموارد نادر) و *پلاسمودیوم سینومولژی* (آلودگی پرسنل آزمایشگاه از طریق پشه) و *پلاسمودیوم رودهائینی* که انگل مالاریا در میمون و شامپانزه است، کاملا شبیه به *پلاسمودیوم مالاریه* در انسان است، اشاره کرد (۷).

[9] Paludisme
[10] Marsh
[11] Swamp
[12] Ague

بقراط [۱۳]پزشک یونانی در قرن پنجم قبل ازمیلاد به ارتباط بین تب های متناوب با مرداب ها اشاره کرده و علائم مالاریا از قبیل بزرگی طحال و اشکال مختلف تب های سه یک خوش خیم، سه یک بدخیم و چهار یک را توصیف نموده است. سقراط [۱۴]فیلسوف یونانی در قرن چهار قبل از میلاد تب ها را به انواع مداوم، روزانه ، سه گانه، چهارگان تقسیم بندی کرد. علت مرگ اسکندر مقدونی [۱۵]در سن ۳۲ سالگی را بیماری مالاریا می دانند (۸).

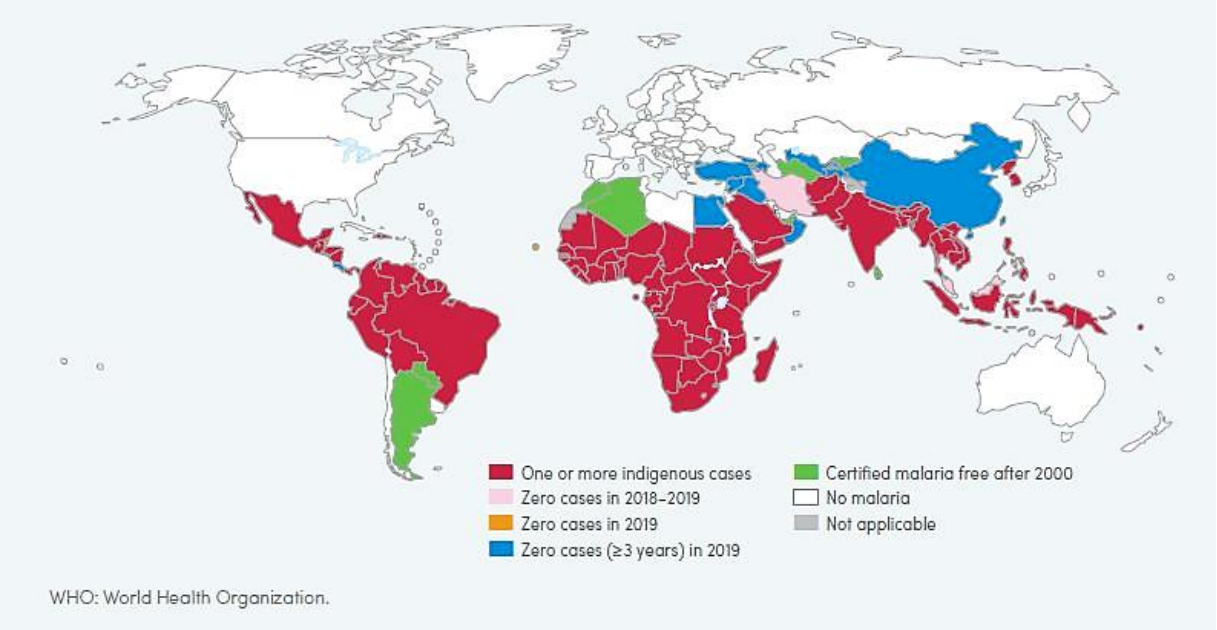
مالاریا در ادوار قدیم در مناطق گرمسیر کره زمین مانند آفریقا، آسیا شیوع داشته است. در اواسط قرن هفدهم با ورود پوست درخت گنه گنه [۱۶] ازآمریکای جنوبی به اروپا درمان مالاریا وارد مرحله جدیدی گردید. حدود یک هزار سال قبل شیخ ابوعلی سینا به تب ولرز، تب نوبه و تناوب آن اشاره کرده است و مدت زمان تب و لرز وتعریق را که در واقع یک حمله مالاریا [۱۷]ست ۴تا۱۲ساعت تعیین کرده است. لاوران [۱۸]دانشمند فرانسوی برای اولین بار در سال ۱۸۸۰ میلادی انگل مالاریا (پلاسمودیوم مالاریه) را درداخل گلبول های قرمز خون یک بیمار مالاریایی در الجزایر مشاهده کرد. گولژی[۱۹] در ایتالیا در سال۱۸۸۶ پلاسمودیوم های ویواکس و مالاریه ، سلی[۲۰]و مارکیا فاوا [۲۱]در سال های ۹۰-۱۸۸۹ پلاسمودیوم فالسیپاروم را شرح دادند. رومانفسکی [۲۲] در سال ۱۸۹۱ روش رنگ آمیزی پلی کروم[۲۳]را برای مشخص کردن ساختمان انگل مالاریا در گسترش خون معرفی کرد. رونالدوراس[۲۴] درسال ۱۸۹۷ با استفاده از یافته و نظریات جدید پاتریک مانسون [۲۵]، (۱۸۹۴) در مورد انتقال انگل ها توسط پشه ها توانست نقش پشه ها را ابتدا در انتقال مالاریا پرندگان و بعد در انتقال مالاریای انسانی به اثبات برساند. محققین ایتالیایی (باستیا نلی[۲۶]و همکاران) در سال ۱۸۹۸ مطالعات راس را تکمیل کردند و نقش آنوفل ها را به عنوان ناقل مالاریای انسانی مشخص نمودند و سیر تکاملی انگل را در این پشه ها شرح دادند. گراسی[۲۷] در سال ۱۹۰۱ وجود مرحله سومی را دربافت در سیر تکاملی انگل های مالاریا اعلام کرد. پلاسمودیوم اووال در سال ۱۹۲۲ توسط استفنز [۲۸]وتشخیص و توصیف گردید (۹).

---

[13] Hippocrater
[14] Socrates
[15] Alexandre
[16] Cinchona
[17] Paroxysm
[18] Lavran
[19] Golgy
[20] Celli
[21] Marchiafava
[22] Romanoufsky
[23] Polychrome
[24] Ronald Ross
[25] Patrich Manson
[26] Bastianelli
[27] Grassi
[28] Stephenes

در سال ۱۹۳۵ کلروکین در آلمان ساخته شد و در سال های ۳۹-۱۹۳۶ اثر حشره کشی DDT که در سال ۱۸۷۴ توسط زیلدر[۲۹] در آلمان ساخته شد کشف گردید. شورت[۳۰] و همکاران در سال ۱۹۴۸ و ۱۹۴۹به ترتیب اشکال غیر جنسی پلاسمودیوم ویواکس و فالسیپاروم را در خارج از گلبول های قرمز در داخل کبد انسان شرح دادند. گارنهام[۳۱] در سال ۱۹۵۳ همین مرحله از انگل را در پلاسمودیوم اووال توصیف کرد. در سال ۱۹۵۰ در چهاردهمین مجمع سازمان بهداشت جهانی برنامه ریشه کنی مالاریا را در دنیا مطرح و تصویب گردید.

در سال های ۶۵-۱۹۶۱ گزارش پیدایش سویه های پلاسمودیوم فالسیپاروم مقاوم به کلروکین در کلمبیا و برزیل درآمریکای لاتین و همچنین در تایلند در جنوب شرقی آسیا منتشر گردید. کشت مداوم پلاسمودیوم فالسیپاروم در سال ۱۹۷۶ توسط تریگر[۳۲] و جنسن[۳۳] در ایالت متحده آمریکا انجام گرفت. در سال ۱۹۸۰ کشف هیپنوزوئیت[۳۴] که در کبد میمون آلوده شده به پلاسمودیوم ویواکس در انسان توسط کروتوسکی[۳۵] و همکاران، مسئله عود مالاریا را در پلاسمودیوم ویواکس و اووال تا حد زیادی روشن کرد. در سال ۱۹۸۷، DNA نوترکیبی وپپتید ساخته شده اسپروزوئیت پلاسمودیوم فالسیپاروم به عنوان واکسن مالاریا در سال ۱۹۹۲کشف شده است که از مرحله غیر جنسی و اسپروزوئیت مورد آزمایش قرار گرفت (۱۰).



شکل ۱-۱: نقشه پراکندگی مالاریا درجهان در سال ۲۰۲۰ (۴)

[29] Zeilder
[30] Shortt
[31] Garnham
[32] Trager
[33] Jensen
[34] Hypnozoite
[35] Krostoski

۱–۴. تاریخچه مالاریا در ایران

بیماری مالاریا از قدیم درایران وجود داشته و پزشکان ایرانی با آن آشنا بوده اند. درکتاب اوستا به تب ولرز اشاره شده است. در ایران این بیماری به علت فراوانی فوق العاده، موارد ایجاد ضعف، کم خونی، کاهش قدرت کارایی افراد، بروز بیماری درایام کار کشاورزی و آمادگی بیشتر بیماران مالاریایی برای ابتلا به دیگر بیماری ها مورد توجه بوده است. در ایران مطالعه علمی درباره مالاریا از سال ۱۳۰۰ ه ش توسط لاتیشف[۳۶] در راس هیئتی در رشت و بندر انزلی شروع شد (۱۱) .

درسال ۱۳۰۳ بنا به تقاضای دولت ایران سازمان جهانی بهداشت، دکتر ژیملور[۳۷] را برای مطالعه بیماری مالاریا و بیماری های عفونی به ایران اعزام کرده این فرد گزارش جالبی راجع به انتشار بیماری های عفونی در ایارن تهیه کرد که در مجله جامعه ملل در سال ۱۹۲۴ چاپ و منتشرشد (۱۲) .

دکتر ژیملور درباره مالاریا نوشته است:

مالاریا از شایع ترین بیماری ها درکشور ایران است، هرسال ۵-۴میلیون نفر از مردم ایران به این بیماری مبتلا می شوند. (در سال ۱۳۰۳ جمعیت ایران ۱۳میلیون نفر بوده است) حداقل ۷۵٪ جمعیت کشور در مناطقی زندگی می کنند که به شدت مالاریاخیز است – در حدود۴۱ ٪ از کل مرگ ومیر سالانه کشور ناشی از مالاریا است (۱۲).

درایران مالاریا درگذشته حدود۴۱٪ از جمعیت کشور را مبتلا می کرده است. ولی براثرعملیات وسیع مبارزه با مالاریا که درنیم قرن اخیر انجام گرفته است تعداد موارد بیماری خیلی کاهش پیدا کرده و انتقال مالاریا در اثر مناطق مالاریا خیز قبلی قطع شده است. درحال حاضر انتقال مالاریای ویواکس و فالسی پاروم در استان های جنوب شرقی کشور مثل سیستان و بلوچستان، هرمزگان و قسمت گرمسیری کرمان انجام می گیرد. در سال های اخیر دربعضی ازکشورهای مالاریا خیزهم جوار، مقاومت تعدادی از گونه های آنوفل ناقل مالاریا به بعضی ازحشره کش ها و افزایش مقاومت قابل ملاحضه پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین اشاره کرد (۱۳) .

مالاریا در ایران به طور مکرر در مناطق معتدل وکوهستانی مثلا دراستان اردبیل در۳۰سال گذشته یا درآذربایجان شرقی و غربی دیده شده است. اما درحال حاضر بسیار نادر میباشد. درگذشته انتقال محلی نیز وجود داشت. درحدود ۵۰ سال قبل، از ۱۳ میلیون جمعیت ایران هر سال ۵- ۴میلیون نفر مبتلا میشدند (۱۳). براساس مطالعات صورت گرفته بیماری مالاریا در شمال وجنوب ایران به صورت فرابومی (هیپراندمیک) و درفلات مرکزی و شرق ایران (مزوآندمیک) یا زیربومی (هیپوآندمیک) بوده است (۱).

درسالهای ۱۳۰۴تا ۱۳۲۳ مطالعات مختلفی در مناطق گوناگون کشور توسط گروه محققین ایرانی (دکترعمیدزاده- دکترمشعوف و دکتر طیب زاده) وگروه انسیتوپاستور (دکتر کراندلو ژنرال کولونیه) و محققین

[36] Latycheve
[37] Gymore

روسی وانگلیسی صورت گرفت. این مطالعات توسط بخش انگل شناسی پزشکی تهران و سپس انسیتو مالاریالوژی ادامه یافت (۱) .

درسال۱۳۳۶، مطابق توصیه WHO برنامه ریشه کنی مالاریا جهت جلوگیری از انتقال مالاریا و پاکسازی منابع آلوده کننده ، به صورت سم پاشی مکان های استراحت آنوفل ها و ازبین بردن مکان های تخم ریزی آن ها و بیماریابی و درمان بیماران شروع شد که این برنامه تاسال ۱۳۴۰ ادامه داشت ولی به علت ظهور مقاومت پشه آنوفل استفنسی (ناقل مهم مناطق جنوب کشور) به DDT و Dilderin، این عملیات ریشه کنی در مناطق جنوبی کشورقطع گردید و در سال ۱۳۴۷ با استفاده از حشره کش مالاتیون برای اولین باروتوزیع ماهی گامبوزیا و اجرا عملیات لاروکشی و توزیع دارو، این عملیات از سر گرفته شد. این اقدامات باعث شدکه درسال ۱۳۵۲ بیش از$\frac{2}{3}$ جمعیت کل کشور ساکن در شمال رشته کوه های زاگرس کاملا از ابتلا به مالاریا ایمن شوند و در قسمت جنوبی کشور نیز این بیماری مهار گردد (۱۲).

همچنین درسال ۱۳۷۶، کانون های انتقال بیماری درسه منطقه مرزی بین آستارا دراستان گلستان، پارس آباد دراستان اردبیل و کلیبردراستان آذربایجان شرقی موجود بوده است. بدیهی است ادامه عملیات بیماریابی و تشخیص بموقع بیماران دراین مناطق به منظور جلوگیری و گسترش کانون های جدید از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۴) .

منطقه جنوب شرقی،که درحقیقت منطقه مشکل آفرین از نظر بروز انگل در سال است، شامل استان های سیستان وبلوچستان ، هرمزگان وقسمت گرمسیری استان کرمان است که بنا به دلایل مختلف ازجمله فراوانی ناقل ها ومقاومتشان به حشره کش ها، ظهور و توسعه مقاومت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین، نبودن راه های ارتباطی مناسب، آب وهوای گرمسیری، فصل انتقال طولانی، ناپایداری وضعیت اکولوژی و جغرافیای خاص منطقه و همچنین وجود مکان های موقت وتغییرات زیست محیطی وشرایط ویژه انسان، باعث شد که بیماری مالاریا همواره به عنوان یک مشکل بهداشتی درمنطقه باقی بماند (۱۵) .

درسال۱۳۸۷، دراین منطقه۱۱۲۹۰ مورد مالاریا کشف شد که از موارد مذکور۹۰٪ پلاسمودیوم ویواکس و۷/۸ ٪ پلاسمودیوم فالسیپاروم و ما بقی به صورت میکس بود (۱۴).

درسال۱۳۷۶،دراین منطقه ۲۹۹۰۶ مورد ابتلا به مالاریا و بروز انگلی سالانه آن۸۷۴۴ درهزار نفر جمعیت بوده است. همچنین تعداد ۲۲۲۲۴ مورد یعنی۷۴ ٪ موارد مذکور متعلق به استان سیستان و بلوچستان بوده است. قابل ذکر است که کنترل مالاریا دراین مناطق بدون مشارکت مردم امری دشواراست و از طرفی گزارشات دکترناطق پور و همکاران (۲۰۱۲)، تربیت میکروسکوپیست های ورزیده درامر تشخیص انگل های مالاریا نقش موثری درپروتکل جهانی WHO مبنی برتشخیص سریع و درمان فی الفور نموده است (۱۶, ۱۷) .

خوشبختانه در سال های اخیر تعداد موارد مالاریا در ایران روبه کاهش بوده است. مرگ و میر براثر مالاریا در ایران بندرت اتفاق می افتد. عامل مرگ ومیر در بیماران مبتلا به مالاریا په در مناطق مالاریاخیز و چه درمناطق غیرمالاریاخیز به علت تأخیر در بلاتشخیص و عدم درمان به موقع است (۱).

۱–۵. تاکسونومی انگل های مالاریا (Toxonomy)

انگل های مالاریا تک یاخته هایی هستند از شاخه *اپی کمپلکسا*[۳۸]و از خانواده ی *پلاسمودیده*[۳۹]و جنس *پلاسمودیوم*[۴۰] که به صورت زیر طبقه بندی می شوند: (۱, ۱۲)

جدول ۱-۱: تاکسونومی انگل های مالاریا

Kingdom	Sub kingdom	Phylum	Class	Sub class	Order	Sub order	Family	Genus
Protista	Protozoa	Apicomplexa	Sporozoa	Coccidian	Eucoccidiida	Haemosporina	Plasmodiidae	Plasmodium

امروزه بیشتر مطالعات روی پلاسمودیوم انسان و بعد جوندگان و بعد پرندگان است و گروه خونسردها جدا می باشند. پلاسمودیوم پستانداران دارای سه زیر جنس، شامل زیرجنسهای پلاسمودیوم، لاورانیا، وینکئییا می باشد. که گونه های پلاسمودیوم ویواکس و اووال و مالاریه در زیرجنس پلاسمودیوم و گونه ی پلاسمودیوم فالسیپاروم به دلیل شکل خاص گامتوسیت هایش که به صورت دراز وسوسیسی شکل است در زیرجنس *لاورانی*[۴۱] قراردارد و سایر گونه های آلوده کننده پستانداران جزو زیر گروه *وینکئییا*[۴۲] هستند.

زیرجنس پلاسمودیوم ولاورانیا برای انسان و سایر حیوانات از جمله میمون ها و زیر جنس وینکئیا، جوندگان را شامل میشود. زیر جنس *وینکئیا* نزدیک ترین مدل به پلاسمودیوم انسانی بعد ازپلاسمودیوم میمون ها می باشد (۵).

در پلاسمودیوم مربوط به میمون ها، میمون های جغدی مستعد ابتلا به نوع فالسی پاروم بوده وبرایشان کشنده است. پلاسمودیوم *اینوئی*[۴۳] در میمون ها با دوره ۷۲hشیزوگونی شبیه به پلاسمودیوم مالاریه درانسان است وپلاسمودیوم سینومولژی با دوره شیزوگونی ۴۸ h به ویواکس شباهت دارد (۵).

تا کنون ۱۵۶ گونه پلاسمودیوم شناخته شده است که برای پستانداران و پرندگان و خزندگان بیماری زا هستند. از این تعداد پنج گونه درانسان ایجاد بیماری می کنند. (ویواکس ، فالسیپاروم، اووال، مالاریه وناولزی). درموارد

[38] *Apicomplexa*
[39] *Plasmodiidae*
[40] *Plasmodium*
[41] *Laverania*
[42] *Vinckeia*
[43] *Inuie*

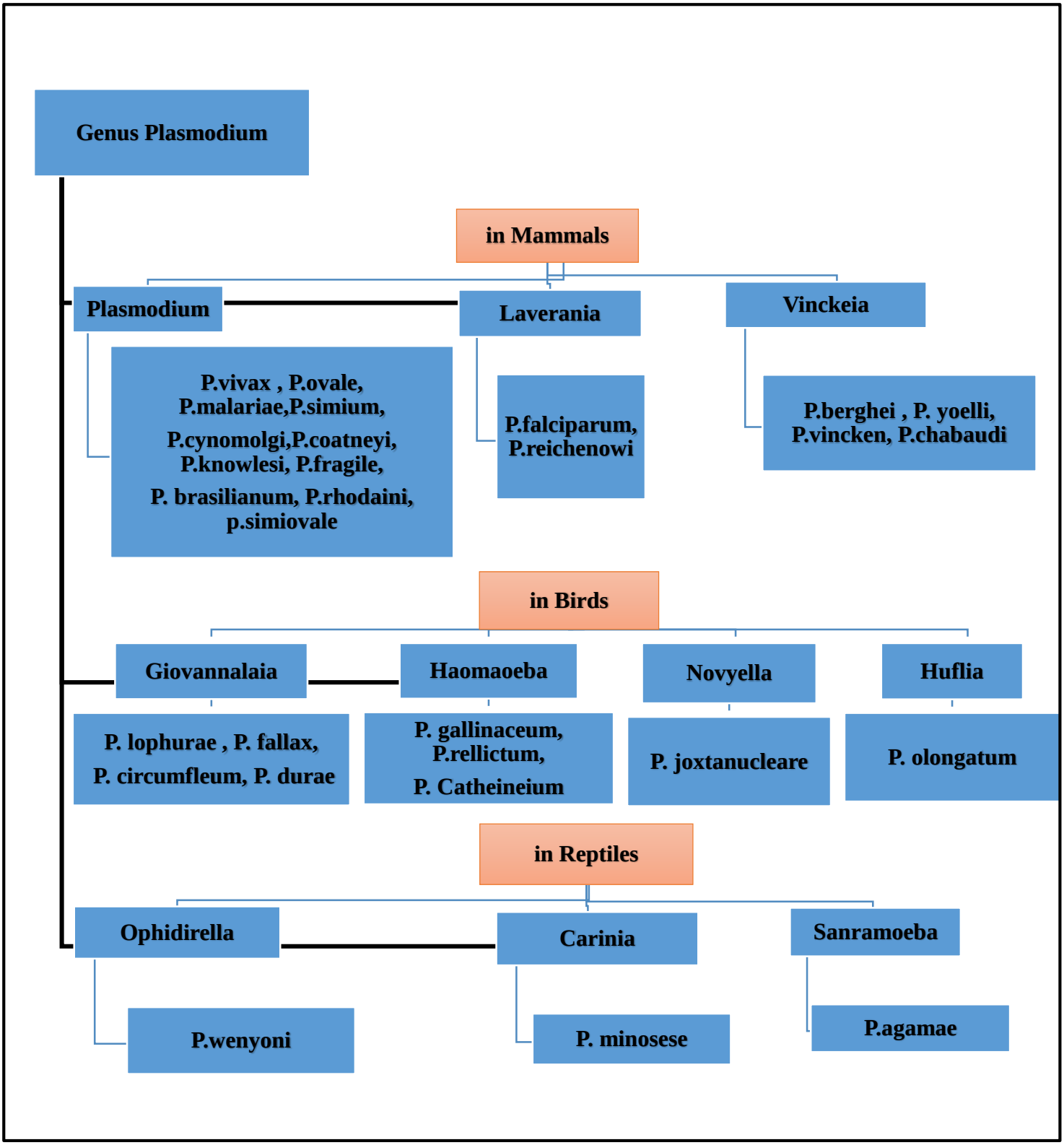
نادری انتقال طبیعی از برخی گونه های پلاسمودیوم میمون ها به انسان گزارش شده است، مانند سینومولژی[۴۴] و ناولزی و رود ها ئینی و... (۱).

براساس طبقه بندی گارنهام[۴۵] جنس پلاسمودیوم به ۱۰ زیرجنس تقسیم شده است. معیار این تقسیم بندی خصوصیات شکلی مانند، تروفوزوئیت ، گامتوسیت واووسیت وتعداد مروزوئیت درشیزونت رسیده ونیز مشخصات چرخه زندگی انگل مانند: نوع میزبان ، نوع سلول های مورد تهاجم میزبان ، طول مدت مراحل مختلف زندگی ، وجود یا عدم وجود عود یا بازگشت مجدد بیماری و ... بوده است. البته این موارد هیچ یک نمی توانند معیار ایده آلی درطبقه بندی باشند، اما در اغلب موارد جهت تشخیص و دسته بندی گونه ها به کافی بوده اند. همچنین روش های پیشرفته تر مثل: تعیین توالی همولوژی های ژن سازنده پروتئین غشائی اسپروزوئیت (Circumsporozoite= Csp-1) و مقایسه ژنهای زیر واحد rRNA نیز در مطالعات بررسی تکامل نژادی[۴۶] مورد استفاده قرارگرفته اند و به کمک این روش ها اطلاعات جدیدی بدست آمده است (۱۴) .

بیماری ایجاد شده توسط پلاسمودیوم فالسیپاروم پیشرونده و خطرناک می باشد. بیش تر مطالعات انتقال وآزمایشات بر روی حیوانات به ویژه جوندگان به وسیله پلاسمودیوم برگئی [۴۷] انجام می شود (۴) .

ازطرفی انگل های مالاریای موشی به دلیل چرخه زندگی سریعشان از انگل های سایرپستانداران تفکیک شده اند (۱۴) .

[44] *P.cynomolgi*
[45] Garnham
[46] Phylogenetic
[47] *P.Berghei*



شکل ۱-۲: جنس ، زیر جنس و گونه های پلاسمودیوم (۱۸)

۱–۶. اهمیت مطالعه بر روی پلاسمودیوم های جوندگان در تحقیقات مالاریا

فالسیپاروم جوندگان درسال ۱۹۷۸، باعث گردید قابلیت انگل های انسانی برای مطالعه برروی بیولوژی مالاریا به طور وسیعی افزایش یابد. این مطالعات شامل اساس مولکولی مقاومت دارویی، تنوع آنتی ژنی، مکانیسم تهاجم اریتروسیتی و تردد پروتئین ها بودند (۱۲).

با وجود مزیت های مطالعه ی انگل های مالاریا انسانی، پلاسمودیوم های جوندگان به عنوان مدل مفیدی برای تحقیقات درمورد بیولوژی انگل های مالاریا، واکنش های بین میزبان و انگل، تکامل واکسن ها ،آزمایش دارویی قابل استفاده می باشند، این انگل ها به دلایلی ازجمله :

- ✓ شباهت اساس بیولوژی انگل های مالاریا انسانی وجوندگان با یکدیگر
- ✓ ثابت بودن ژنتیک و سازماندهی ژنومی بین پارازیتهای انسانی و جوندگان
- ✓ یکسان بودن پروسه های بیوشیمیای دربین آنها
- ✓ مشابه بودن اساس مولکولی حساسیت و مقاومت دارویی درانگل های انسان و جوندگان

ساختمان و عملکرد آنتی ژنهای هدف معرفی شده برای تهیه واکسن بین انگل های جوندگان و انسان ثابت اند، مثل: CSP [48] ، TRAP [49] اسپروزوئیت ها، MSP1 [50] و AMA1 [51] مروزوئیت ها.

- ✓ راه اندازی وبرقراری سیکل زندگی به طور کامل از جمله آلوده کردن پشه ها هم ساده و هم ایمن می باشد.
- ✓ تکنیک های کشت In-Vitro برای تولید انبوه و راه اندازی مراحل مختلف چرخه زندگی انگل قابل دسترسی است.
- ✓ در دسترس بودن متدولوژی برای اصلاح ژنتیکی .
- ✓ میزبان های جوندگان با خصوصیات ژنتیکی فراوان، دستاوردهای با اهمیتی برای بررسی های ایمونولوژیکی می باشند.

همچنین مطالعه انگل های جوندگان این امکان را میدهد تا درضمن اثرات متقابل انگل ومیزبان، آزمایشات دارو درمانی نیز صورت گیرد و میزبان جونده که با خصوصیات گسترده ژنتیکی ،ابزار مفید و قابل دسترسی برای مطالعات ایمونولوژیکال است، میتوانند درتحقیقات در مورد مالاریا جایگزین مدل انسانی شوند (۵) .

۱–۷. سیرتکاملی ومورفولوژی انگل های مالاریا

تک یاخته های پلاسمودیوم در چرخه ی زندگی خود دارای دو میزبان (مهره دار و بی مهره) می باشند. پس در حقیقت در طول زندگی خود میزبان اصلی یا میزبان بی مهره ، گونه هایی از پشه آنوفل ماده هستند که

[48] Circum Sporozoite Protein
[49] Tromobospondin Relatd- Adhesive Protein
[50] Merozoite Surface Proteine 1
[51] Apical Membrain Antigen 1

تکثیرجنسی یا اسپروگونی[۵۲] ، در بدن آنها انجام می گیرد. میزبان واسط یا میزبان مهره دار، انسان یا سایر حیوانات می باشد که تکثیر غیرجنسی یا شیزوگونی[۵۳] ،در بدن انسان و سایر پستاندارن انجام می گیرد. سلول های جنسی یا گامتوسیت ها [۵۴]، در بدن انسان بوجود می آیند. گامت های [۵۵] نر و ماده در پشه آنوفل طی مرحله ای به نام گامتوگونی[۵۶] ، بوجود می آیند. انسان ۳ نقش در چرخه ی حیاتی انگل بازی می کند، ۱) میزبان مهره دار، ۲) میزبان واسط ، ۳) مخزن [۵۷] (۱).

۱-۷-۱ دوره جنسی انگل مالاریا (اسپروگونی)

آنوفل های ماده معمولا ۳ تا ۵ روز یک بار جهت رشد تخمک های خود نیازبه خونخواری دارند. اگر ناقل مالاریا ازبیمار مالاریایی که در خون او تعداد کافی سلول های جنسی یا گامتوسیت های نر و ماده انگل مالاریا وجود دارند، تغذیه کند ازراه خرطوم تعدادی ازانگل های خون بیمار ازجمله گامتوسیت ها را وارد معده خود می کند. گامتوسیت های پلاسمودیوم ویواکس، اووال و مالاریه کروی یا تخم مرغی شکل است و گامتوسیت های پلاسمودیوم فالسی پاروم لوبیایی شکل است. گامتوسیت های ماده (ماکروگامتوسیتها) بزرگتر ازگامتوسیت نر (میکروگامتوسیت) است. کروماتین هسته در ماکروگامتوسیت متراکم و در میکروگامتوسیت شبکه ای و پخش است. در معده پشه گامتوسیت نر پس از اکسفلاژلیشن[۵۸] تقسیم میگردد و ایجاد ۴تا ۸ سلول دراز تاژک مانند به نام گامت نر یا میکروگامت[۵۹] می کند، گامتوسیت ماده هم بعد از تغییراتی به شکل یک سلول ماده به نام ماکروگامت[۶۰] در می آید. یک گامت نر درگامت ماده نفوذ کرده (سینگامی[۶۱]) وپس از لقاح ایجاد سلولی بنام تخم یا زیگوت[۶۲] ، می کند که دوکی شکل و متحرک شده و ااکینت[۶۳] از بین سلول های جدار معده پشه عبور می کند ودر زیر غشائی که سلول های معده پشه را می پوشاند روی معده به اسم اواوسیست[۶۴] بوجود می آورد. انتشاررنگدانه یا پیگمان [۶۵]، در اواوسیست های هر یک از گونه های پلاسمودیوم شکل خاصی دارد. منشاء رنگ دانه ها از تجزیه هموگلوبین گلبول های قرمزحاوی انگل است و زمانی بوجود می آیند که گامتوسیست ها در داخل گلبول های قرمز از هموگلوبین تغذیه کرده و مواد زائد حاصل از این تغذیه به صورت دانه هائئ به رنگ زرد، قهوه ای یا سیاه درسیتوپلاسم گامتوسیت ها دیده می شوند. این دانه ها درمراحل بعدی یعنی درگامت ها، زیگوت، ااکینت و اواوسیست باقی می مانند. وقتی که هریک اواوسیست ها تقسیم شد و ایجاد تعداد زیادی

---

[52] Sporogony
[53] Schizogony
[54] Gametocytes
[55] Gametes
[56] Gametogony
[57] Reservoir
[58] Exflagellation
[59] Microgamet
[60] Macrogamet
[61] Singamy
[62] Zygote
[63] Ookinete
[64] Oocyct
[65] Pigmant

اسپروزوئیت کرد رنگ دانه ها از انگل جدا می شوند، بنابراین اسپروزوئیت ها فاقد رنگدانه هستند. اسپروزوئیت ها ابتدا در داخل کیسه ای که آنها را پوشانده است قرار دارند و مجموعه آن ها را اواوسیت رسیده می نامند. پس از پاره شدن جدارکیسه، اسپروزوئیت ها وارد حفره عمومی بدن پشه که محتوی مایع بی رنگ یا شیری رنگ بنام هموسل[۶۶] ، است وبه منزله خون پشه میباشد، می شوند. اواوسیست ها گاهی به تعداد زیاد روی معده دیده می شوند و هر اواوسیت پس از تکثیر حدود هزاراسپروزوئیت بوجود می آورد. اسپروزوئیت ها به طرف غدد بزاقی پشه که ازیک جفت غده بزاقی پشه که ازیک جفت غده سه لوبه تشکیل شده است می روند ودر داخل غده بزاقی و اکثرا در مجاری آن جایگزین می شوند. وقتی که پشه آلوده به اسپروزوئیت به منظور خون خوردن شخص سالمی را نیش می زند، قبل از مکیدن خون همراه بزاق خود تعدادی اسپروزوئیت وارد بدن می کند. دوره اسپروگونی برحسب نوع پلاسمودیوم و شرایط محیط (درجه حرارت و میزان رطوبت نسبی) متفاوت است. در درجه حرارت بین ۲۰ تا ۳۰درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی بالای ۶۰ ٪، انتقال مالاریا صورت می گیرد. درجه حرارت مطلوب ۲۸ درجه سانتیگراد و رطوبت هرچه بیشتر باشد طول عمر پشه آنوفل طولانی تر می شود و بهتر می تواند مالاریا را منتقل کند. در درجه حرارت پایین و هوای خشک دوره اسپروگونی کند ویا متوقف می شود. دوره اسپروگونی درشرایط مطلوب در تمامی پلاسمودیوم ها ۱۶-۸ روز طول می کشد که : پلاسمودیوم ویواکس : ۱۰-۸ روز/ پلاسمودیوم فالسیپاروم : ۱۰-۹ روز/ پلاسمودیوم اووال : ۱۴-۱۲ روز / پلاسمودیوم مالاریه : ۱۶-۱۴ روز (۱) .

۱-۷-۲. دوره غیرجنسی انگل های مالاریا (شیزوگونی)

شیزوگونی انگل های مالاریا شامل دو مرحله:

۱) شیزوگونی نسجی (درسلول های پارانشیم کبد)

۲) شیزوگونی خونی (درگلبول های قرمز خون)

۱-۷-۲-۱. شیزوگونی نسجی

بعد از ورود اسپروزوئیت ها ازطریق نیش پشه آنوفل ماده به جریان خون انسان، تعدادی ازآنها طی مدت نیم ساعت وارد سلول های پارانشیم کبد می شوند. تعداد زیادی ازآنها توسط سلول های بیگانه خوار فاگوسیته شده وازبین می روند. انگل درداخل سیتوپلاسم سلول پارانشیم کبد گرد شده داری یک هسته است، بتدریج انگل رشد کرده وهسته شروع به تقسیم شدن می کند. سیتوپلاسم هم تقسیم شده، درداخل سلول کبد تعداد زیادی انگل ریز بنام مروزوئیت نسجی بوجود می آید. به مجموعه مروزوئیت های داخل سلول کبد، شیزونت نسجی می گویند. تعداد مروزوئیت های شیزونت رسیده نسجی حدود۱۰تا۳۰ هزار عدد است. (پلاسمودیوم ویواکس ۱۰هزار، پلاسمودیوم فالسیپاروم ۳۰ هزارعدد است وپلاسمودیوم مالاریه و اووال حدود ۱۵ هزار). بعد از اینکه شیزونت نسجی کاملا رسید، جدار سلول کبد پاره شده و مروزوئیت های آزاد شده وارد جریان خون می شوند.

[66] Haemo cell

مرحله Exo-Erythrocytic حدود۶ تا ۱۶ روز طول می کشد (پلاسمودیوم فالسیپاروم ۵/۵ تا ۷روز، پلاسمودیوم ویواکس ۶تا ۸ روز، پلاسمودیوم اووال ۹روز و پلاسمودیوم مالاریه ۱۴تا۱۶روز). تعداد زیادی ازمروزوئیت های نسجی آزاد شده که درجریان خون قرارگرفته اند، وارد گلبول های قرمزشده وشیزوگونی خونی را آغاز می کنند.در پلاسمودیوم ویواکس و احتمالاپلاسمودیوم اووال تعدادی ازاسپروزوئیت ها به شکل سلول های کوچک و ظریف درسلول های پارانشیم کبد برای مدت نسبتا طولانی به طورخفته وغیرنرمال به نام هیپنوزوئیت[۶۷] باقی می مانند و هرچند وقت یک بار تعدادی ازآنها فعال شده، رشدوتکثیر می یابند وپس از گذراندن شیزوگونی نسجی ثانویه [۶۸]وارد خون شده و سبب عود [۶۹]می شوند. در مالاریای ویواکس واحتمالا اووال طول زمانی که ممکن است عودهای بیماری رخ دهد ۱/۵تا ۵ سال است. فاصله عودهای مکرردر سویه های ویواکس مناطق معتدل، طولانی (چندماه)، است. در پلاسمودیوم فالسیپاروم واحتمالا مالاریه عود بیماری وجود ندارد ولی ممکن است دراثردرمان ناقص و یا مقاومت ضعیف انگل به دارو ویا مصونیت نسبی، تکثیرانگل مهارشده و فقط تعداد خیلی کمی ازاشکال شیزوگونی خونی بتوانند درخون به تکثیر خود به تعدادخیلی محدود ادامه دهند،طوری که بیماربرای مدتی هیچ علامتی ندارد اما با ازبین رفتن عوامل مهارکننده تکثیر، مجدد ظاهرشود که این فرآیند را ظهور مجدد[۷۰] گویند و درنوع فالسیپاروم طی ۱ماه تا ۲سال ممکنه اتفاق افتد ولی درمالاریه تحت یک فشارمصونیت نسبی معمولادر حد خیلی محدود به مدت طولانی حتی تا آخرعمر ممکنه باشد و فرد نقش حامل بیماری را دارد،در ویواکس و اووال هم ممکن است علاوه برعود، ظهور مجدد بیماری نیز اتفاق بیافتد (۱).

۱-۷-۲-۲. شیزوگونی خونی

مروزوئیت هاتوسط گیرنده های اختصاصی که درسطح گلبول قرمز وجود دارد به جدارRBC متصل شده بعد درمحل اتصال حفره ای به نام Parasitophorous Vacuole ایجاد می شود که اطراف انگل را دربرگرفته و وارد RBC می شود.این عمل حدود۱۰تا ۳۰ ثانیه طول می کشد.مروزوئیت های خونی پس از ورود به RBC ابتدا به شکل یک حلقه انگشترمانند[۷۱] می باشند. هسته کروماتینی قرمز یا بنفش که نگین انگشتر وسیتوپلاسم آبی که حلقه انگشتر و داخل حلقه که بی رنگ است واکوئل[۷۲] می باشد. این فرم را تروفوزوئیت جوان[۷۳] یا رینگ می نامند. بعد تروفوزوئیت جوان رشد کرده و تبدیل به فرم تروفوزوئیت درحال رشد میشود. فرآیند رشد ادامه پیدا کرده وفرم تروفوزوئیت پیر [۷۴] ایجاد میشود، درمرحله ی بعد فاز رشد پایان یافته و انگل بیشتر فضای RBC

[67] Hypnozoite
[68] Secondary Exo-Erythrocitic Schizogony
[69] Relapse
[70] Recrudescence
[71] Ring Form
[72] Vacuole
[73] Young Trophozoite
[74] Old Trophozoite

را فراگرفته وشروع به تقسیم شدن می کند. درابتدا هسته انگل تقسیم شده وفرم شیزونت نارس[۷۵] تشکیل میشود. بعد سیتوپلاسم تقسیم شده و فرم شیزونت رسیده[۷۶] ایجاد شده که برحسب نوع پلاسمودیوم حاوی ۶ تا ۲۴ انگل بنام مروزوئیت خونی می باشد.درآخرRBC پاره شده و مروزوئت های آزاد شده در انسان وارد یکی از۳ مسیر می شوند:

۱) ورود به سایرRBC ها ۲) فاگوسیته شدن توسط سلول های بیگانه خوار ۳) برخی هم وارد مرحله ی گامتوگونی شده و تبدیل به سلول های جنسی گامتوسیت می شوند.البته این مرحله بعد از چند نسل شیزوگونی خونی صورت میگیرد (۱) .

بروزعلائم بیماری درمالاریا مربوط به دوره غیر جنسی بیماری است. درمواردی که تعداد نسبتا زیاد RBC حاوی شیزونت رسیده هم زمان باهم پاره می شوند و محتویات خود یعنی مروزوئیت ها، رنگ دانه و موادساخته شده توسط انگل را واردجریان خون می کنند، عکس العمل بدن نسبت به این مواد به شورت لرز شدید در بیمار تظاهرمی کند که معمولا دراوایل حمله مالاریا (Paroxysm) دیده می شود. سپس بروز تب و ورود انگل به داخل خون و بعد تعریق که مرحله آخرو همزمان با ورود انگل به داخل گلبول قرمز اتفاق می افتد (۱, ۱۲) .

Pre-patent Period: فاصله زمانی بین ورودانگل به بدن تا ورود انگل به خون بعد ازطی دوره کبدی، که معمولا کمی کمترازدوره کمون می باشد. این دوره به طورمتوسط برای ویواکس ۸ روز، فالسیپاروم ۵ روز، مالاریه ۱۴ روز می باشد وفرد بدون علائم کلینیکی است (۱۲) .

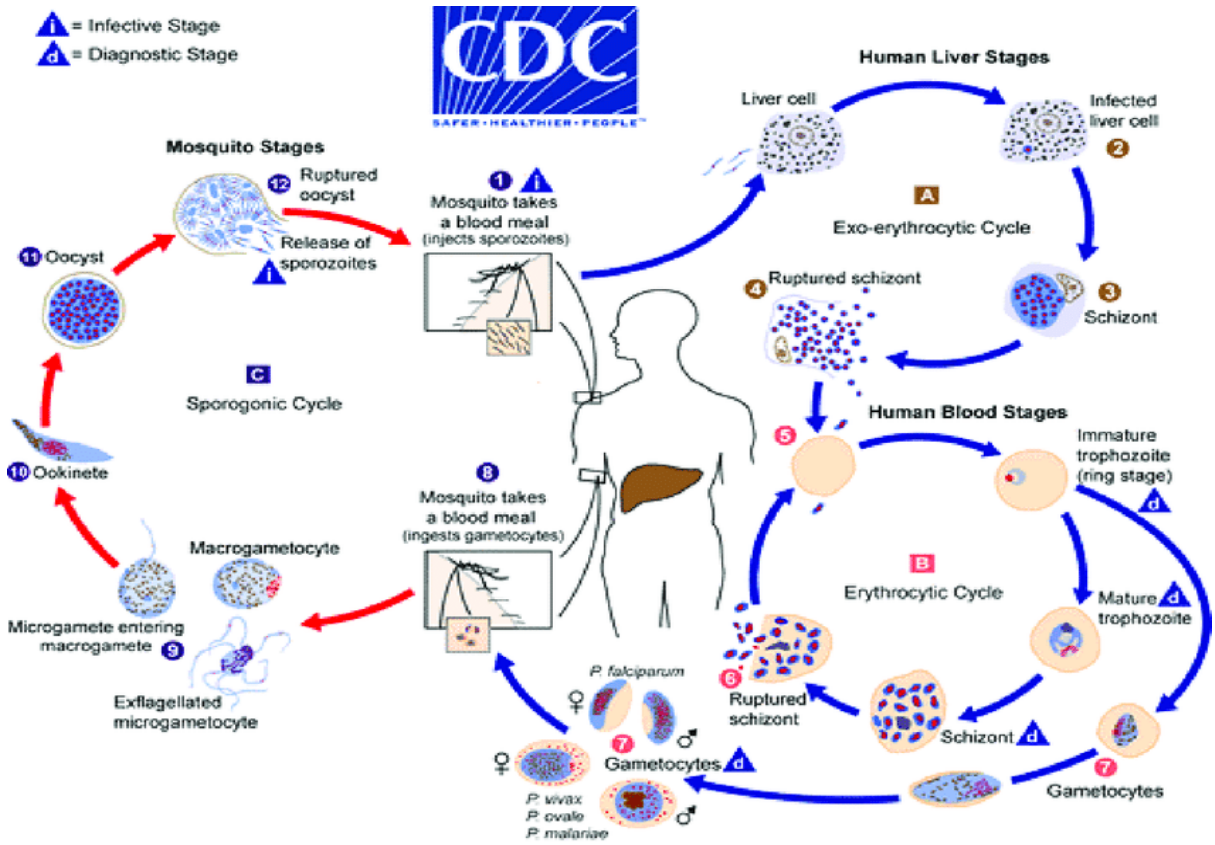
در صورت تزریق خون شخص مبتلا به بیماری مالاریا، به فرد سالم، این خون آلوده می تواند منجر به بروز بیماری مالاریا در فرد سالم شود، که مبنای آن تداوم تکثیر غیر جنسی انگل در بدن گیرنده خون است. این بیماری از طریق جفت به جنین قابل انتقال است (۱) .

در ابتلا به پلاسمودیوم فالسیپاروم چون درهرمرحله حدود۱۰ ٪ از گلبول های قرمز پاره می شوند در نتیجه علت احتمال مرگ زیاد بوده و رنگ ادرار به دلیل هموگلوبین دفع شده به رنگ قهوه ای یا سیاه دیده می شود (۱۲) .

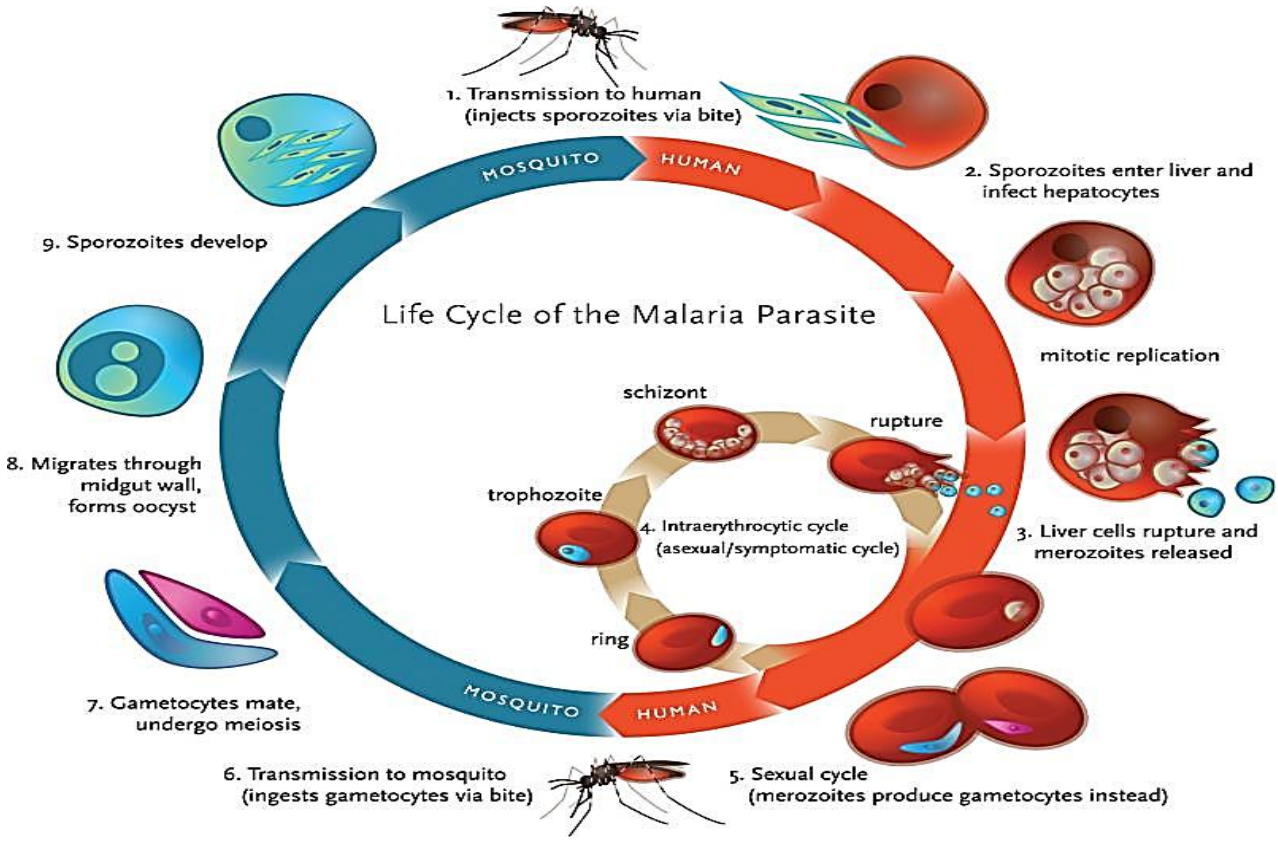
[75] Immature Schizont
[76] Mature Schizont

۱–۷–۳ . مرحله ی به وجود آمدن سلول های جنسی (گامتوگونی)

تعدادی از مروزوئیت ها که وارد گلبول های قرمز میشوند ایجاد گامتوسیت یا سلول های جنسی می کنند. گامتوسیت های نر و ماده بعد از اینکه کاملا رسیدند در جریان خون مدتی باقی می مانندواگر وارد معده پشه آنوفل شوند از بین می روند. در پلاسمودیوم ویواکس، مالاریه و اووال دوسه روز پس از آغاز شیزوگونی خونی گامتوسیت ها ممکن است در خون محیطی دیده شوند و یکی دو روز بعد از شیزوگونی خونی ناپدید گردند. در پلاسمودیوم فالسیپاروم معمولا حدود یک هفته بعد از شیزوگونی خونی گامتوسیت ها ئر خون محیطی ظاهر می شوند و در جریان شیزوگونی خونی همراه تروفوزوئیت های جوان (رینگ ها) در خون محیطی دیده می شوندو بعد از از بین رفتن شیزوگونی خونی ممکن است تا چهار هفته گامتوسیت ها به تنهایی و بدون اینکه در بیمار علائم بالینی ایجاد کنند در خون محیطی دیده شوند. در این مدت نسبتا طولانی وجود گامتوسیت ها در جریان خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسیپاروم، امکان آلوده شدن پشه های آنوفل که از خون این افراد تغذیه می کنند زیاد است. قدرت آلوده کنندگی گامتوسیت ها محدود است. چون اگرنارس باشند و یا مدتی از وقت رسیدن آنها گذشته باشد قادر نیستند سیر تکاملی خود را در پشه آنوفل ماده ادامه دهند (۱) .



شکل ۱-۳: چرخه زندگی انگل مالاریا در میزبان مهره دار و بی مهره (۱۹)



شکل ۱-۴: چرخه زندگی پلاسمودیوم در انسان و حشره (۲۰)

۱-۸. بیماری زایی انگل های مالاریا

بعد از اینکه اسپروزوئیت توسط نیش پشه آنوفل وارد بدن انسان شدند ومرحله نسجی اولیه را گذراندند و شیزوگونی خونی شروع شد بعد از یکی دو دوره شیزوگونی خونی علائم بالینی مالاریا به صورت تب ظاهر می شود. فاصله زمانی بین ورود اسپروزوئیت به بدن و ظهور تب که معمولا ۹ تا ۴۰ روز برحسب پلاسمودیوم طول می کشد، دوره ی نهفتگی[۷۷] نامیده می شود.

درجه حرارت ممکن است ۳۹-۳۸ درجه سانتیگراد باشد،این حالت ۲ تا ۳ روز طول می کشد، بعد از آن حرارت بدن پایین می آید و اختلالات فوق الذکر تخفیف پیدا می کند و وضع بیمار به حال عادی بر می گردد تا اولین حمله بیماری مالاریا ظاهر شود. در شروع بیماری گاهی تب دائمی و سردرد شدید و حالت تهوع و استفراغ وجود دارد. در این حالت مالاریا ممکن است با بیماریهای دیگرمانند حصبه و مننژیت و در مواردی با سرماخوردگی اشتباه شود. در بعضی موارد علائم مقدماتی به اندازه ای خفیف است که بیمار متوجه آن نمی شود ویا فقط احساس کسالت خفیفی می کند. بعداز مرحله مقدماتی، حمله های متناوب یک روز درمیان

[77] Incubation period

(مالاریای ویواکس و فالسیپاروم) یا دوروز در میان (مالاریای مالاریه) ظاهر می گردد. حمله مالاریا (Paroxysm) دارای سه مرحله متوالی لرز، تب و عرق است (۱) .

۱-۸-۱. مرحله لرز

مرحله لرز شروع حمله مالاریا است. لرز ابتدا از ستون فقرات شروع و بعدا در تمام بدن عمومیت پیدا می کند. تمام بدن بیمارمی لرزد و از شدت لرز دندان هایش بهم می خورد. در این مرحله سردرد شدید ودرد کمر وگاهی تهوع همراه با استفراغ های صفراوی وجود دارد. پوست بیمارسرد،خشک و رنگ پریده می شود و لب ها کبود و چشم ها گود رفته است. حرارت سطح بدن علت کاهش جریان خون محیطی ممکن است به ۳۲ درجه سانتیگراد تقلیل پیدا کند. حرارت داخل بدن بالا می رود وبه ۴۰ الی ۴۱ درجه سانتیگراد می رسد،نبض کوچک و سریع است. مرحله لرز معمولا یک ربع تا یک ساعت طول می کشد.

۱-۸-۲. مرحله تب

بیمار کم کم احساس گرما می کند و پوشش خود را کنار می اندازد و صورتش پرخون شده وبه اصطلاح گل می اندازد. معمولا تنفس سریع، سردرد و سرگیجه، استفراغ و هذیان وجود دارد. نبض پروسریع است. مرحله تب ۲ تا ۶ ساعت طول می کشد. در مالاریای فالسیپاروم دوره تب طولانی تر است. در جریان مالاریا لوکوپنی اما در زمان تب لکوسیتوز دیده می شود.

۱-۸-۳. مرحله عرق

به تدریج علائم تخفیف پیدا کرده، سردرد کم می شود و حالت تهوع و استفراغ از بین می رود. بیمار عرق فراوانی می کند و حرارت بدن سریعا پایین آمده و نبض کند می شود و بیمار احساس آرامش می کندو تمایل به خوابیدن دارد. مرحله عرق ۲ تا ۴ ساعت طول می کشد. معمولا طول یک دوره حمله مالاریا حدود ۵ تا ۱۱ ساعت است. حملات مالاریا در پلاسمودیوم های ویواکس، فالسیپاروم،اووال یک روز در میان و در پلاسمودیوم مالاریه دو روز در میان است. معمولا درطول یک روز یا دوروز فاصله بین حملات مالاریا بیمار ناراحتی های زیادی ندارد و می تواند به کار روزانه خود برسد، فقط کمی احساس ضعف می کند و درجه حرارت بدن بیمار ممکن است چند درجه کمتر از حالت طبیعی باشد. در مالاریای ویواکس و فالسیپاروم روز سوم (مالاریای سه به یک) و در مالاریای مالاریه روز چهارم (مالاریای چهار به یک) حمله مالاریا از نو شروع می شود. در صورت عدم درمان، حملات بیماری مالاریا مدتی ادامه پیدا می کند. بتدریج در بیمار نسبت به انگل یک مصونیت نسبی به وجود می آید. دراین صورت شدت حملات کم شده و خودبه خود بیمار به طور موقت و یا برای همیشه بهبود پیدا می کند. بیمار مالاریایی بعد از چند حمله ضعیف، کم بنیه وکم خون شده و طحال وکبد او بزرگ می شود و رنگ پوست بیمار زرد مایل به خاکستری شده و نیروی جسمانی و فکری او رو به تحلیل می رود و بدن او برای ابتلاء به بیماریهای دیگر آماده می گردد. بیماری اگر مدت نسبتا طولانی ادامه پیدا کند قدرت و حوصله کار کردن ازبیمارسلب شده و سربار خانواده و جامعه خواهد شد (۱) .

اثرات بیماری زایی عفونت مالاریایی مستقیما از تخریب یاخته های سرخ آلوده و غیرآلوده، آزاد شدن متابولیت های انگل،پاسخ ایمونولوژیک میزبان به مواد آنتی ژنیک و تشکیل رنگ دانه های مالاریایی هستند. به علاوه پدیده چسبندگی سلولی عامل اساسی کاهش موضعی انتشار مواد غذایی به بافت بوده که جزء عوارض بسیارشدید مالاریای فالسی پاروم است. چسبندگی سلولی نتیجه تظاهرمناطق اتصالی یا لیگاند ها [۷۸]در سطح یاخته های سرخ آلوده است که خاص سویه و مرحله تکاملی انگل بوده، به صورت دکمه هایی با تراکم الکترونی مشاهده می شوند. این دکمه ها را می توان با شروع تقسیم انگل در سطح یاخته های سرخ آلوده مشاهده کرد (۹).

۱-۸-۱-۱. بیماری زایی پلاسمودیوم ویواکس

مالاریای ویواکس یا عامل مالارایای سه یک خوش خیم [۷۹]، به طور معمول درافراد غیرمصون دارای دوره نهفتگی ۱۷-۱۲روز است ولی در بعضی از سویه های *پلاسمودیوم ویواکس* بویژه در مناطق معتدل دوره نهفتگی طولانی حدود ۱۲-۸ ماه است وحتی تا ۲۱ ماه گزارش شده است. مالاریای ویواکس در افرادی که از مناطق مالاریا خیز به مناطق غیر مالاریا خیز رفته اند دریک سوم موارد طی یک ماه بعداز ورود ودر ۵ تا۱۰٪ موارد عود مالاریا و علائم بیماری یک سال بعد از ورود ظاهر شده است (۱) .

حملات اولیه کلینیکی این انگل معمولا ۷تا ۱۰روز بعد از آغاز عفونت اتفاق می افتد. البته سویه های مختلف با کمون طولانی را باید در نظر گرفت، در بعضی بیماران علائمی از قبیل سردرد، ترس از نور، کوفتگی عضلات، بی اشتهائی، تهوع و بعضی مواقع استفراغ، قبل از این که ارگانیسم در خون محیطی قابل تشخیص باشد، ممکن است اتفاق بیافتد و برعکس در بعضی از بیماران چند روز قبل از ظاهر شدن علائم کلینیکی می توان انگل را درخون تشخیص داد. قابل ذکراست که احتمال بروز مالاریای مغذی در اثر عفونت ویواکس غیر ممکن نیست، اما درمجموع می توان گفت که حملات ناشی از *پلاسمودیوم ویواکس* به ندرت شدید هستند و حمله اولیه *پلاسمودیوم ویواکس* درمان نشده ممکن است ۳ هفته الی ۲ ماه یا حتی بیشتر ادامه داشته باشد. عفونت ناشی از *پلاسمودیوم ویواکس* از نظر تکرارتعداد دفعات حمله در ابتدای عفونت اغلب نامنظم بوده سپس بعد ازچند روز به صورت یک سیکل ظاهر می شود.

۱-۸-۱-۲. بیماری زایی پلاسمودیوم اووال

مالارایای اووال از نظر خصوصیات و علائم بالینی شبیه به *پلاسمودیوم ویواکس* است. انتشارآن بیشتر در منطقه گرمسیری آفریقا و درسواحل غربی این قاره شایع است. مواردی از آن از جنوب شرقی آسیا و جنوب آمریکا گزارش شده است. حمله تب ممکن است مثل ویواکس شدید باشد ولی بهبود ناگهانی خودبخود بیشتر دیده می شود. کم خونی و بزرگی طحال کمتر از مالاریای ویواکس است. در مواردی که عفونت مختلط این

[78] Ligands
[79] Benign Tertian Malaria

پلاسمودیوم با پلاسمودیوم قوی تر مثل *پلاسمودیوم فالسیپاروم* وجود دارد، تحت تاثیر آن به طور مخفی باقی می ماند و وقتی که اشکال خونی *پلاسمودیوم فالسیپاروم* ناپدید شد اشکال خونی *پلاسمودیوم اووال* ظاهر می شود. عوارض ناشی ازاین انگل چندان شدید نیست، گرایش آن به عود کم تر از *پلاسمودیوم ویواکس* است و معمولا به طور خود به خودی بهبود می یابد و اغلب بیشتر از ۶ تا ۱۰ حمله ایجاد نمی کند. دوره کمون *پلاسمودیوم اووال* مشابه *پلاسمودیوم ویواکس* است اما فراوانی وشدت علائم بسیار کم است و تب آن پایین تر از *پلاسمودیوم ویواکس* بوده و فاقد لرز مشخص است و حداکثر تا دو درصد گلبول های قرمز خون محیطی انسان را آلوده می کنند (۱, ۱۲) .

۱-۸-۱-۳. بیماری زایی پلاسمودیوم مالاریه

درمالاریای مالاریه یا عامل مالاریای چهار-یک [80]، معمولا دوره نهفتگی بیش از ۱۸ روز است و ممکن است طولانی ۳۰تا۴۰ روز باشد. چهره بالینی در شروع بیماری شبیه ویواکس است ولی علائم اولیه و لرز ممکن است شدیدتر باشد. حملات مالاریا منظم تز و اغلب بعد از ظهر نزدیک عصر انجام می گیرد. کم خونی خفیف تر از مالاریای ویواکس است. طحال ممکن است خیلی بزرگ شود ولی پارگی آن کمتر از ویواکس اتفاق می افتد. پارازیتمی به ندرت به یک درصد می رسد. هیپنوزوئیت ندارد ولی ظهور مجدد در سال اول بیشتر دیده می شود و بعدا با فواصل طولانی حتی تا ۵۰ سال بعد از عفونت اولیه ممکن است اتفاق بیفتد. اغلب افرادی که مبتلا به مالاریای مالاریه می شوند در صورتی که درمان انجام نگیرد ممکن است پارازیتمی خیلی ضعیف بدون علائم بالینی را تاآخر عمر داشته باشند. در این حاملین انگل [81]، پارازیتمی به حدی کم است که انگل در آزمایش معمولی میکروسکوپی در خون مشاهده نمی شود ولی اگر از خون این افراد در انتقال خون استفاده شود در گیرنده خون انگل تکثیر پیدا می کند و در آزمایش میکروسکوپی دیده می شود و علائم بالینی مالاریا ظاهر می گردد.

۱-۸-۱-۴. بیماری زایی و عوارض ناشی از پلاسمودیوم فالسیپاروم

دراغلب موارد عفونت ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم* بسیار شدیدتر از عفونت سه گونه دیگرمالاریای انسانی است. مشکلی که طی عفونت های ناشی ازاین گونه مالاریا دیده می شود احتمالا به ناتوانی بیمارقبل از دچارشدن به عفونت ربط دارد و یا مربوط به همزمان بودن با یک بیماری دیگر است. این انگل حمله به تمام رده های گلبولی چه پیر و چه جوان را دارد، درنتیجه امکان آلودگی گلبول های قرمز تا ۵۰٪ افزایش می یابد. شیزوگونی این انگل دراعضای داخلی بیش تر از خون محیطی اتفاق می افتد. ایسکمی ناشی از آن به وسیله مسدود شدن عروق داخلی این اندام ها توسط توده های گلبولی آلوده به این انگل است که باعث بروز علائم مختلفی بسته به عضو گرفتار می شود. کاهش درجه انعطاف پذیری مرفولوژیکی گلبول های قرمز آلوده به

[80] Quargtan Malaria
[81] Carriers

پلاسمودیوم فالسیپاروم هنگام عبور از عروق موئینه یا از صافی های طحالی ممکن است منجر به مسدودشدن عروق گردد. حمله *پلاسمودیوم فالسیپاروم* معمولا ۸ تا ۱۲روز پس از عفونت اتفاق می افتد. سردرد، خستگی، بی اشتهایی، استفراغ، کوفتگی ودرد از علائم آن می باشند. در مراحل اولیه بیماری دوره های بیماری منظم نیست،در نتیجه باعث اختلال در تشخیص می شود. بعد از منظم شدن دوره تب سیکل بیماری حدودا ۴۸ساعت خواهد بود. درصورتی که درمان صورت نگیرد،حمله اولیه طی ۲ الی ۳ هفته ظاهرا از بین می رود، اما ظهور مجدد عفونت پس از یک سال به ندرت ممکن است دیده شود، عود حقیقی با منشاء کبدی در عفونت های ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم* دیده نمی شود. گاهی شدت پارازیتمی مشاهده شده در خون محیطی به عوارض ناشی از این انگل ربطی ندارد، که این موضوع در مورد *پلاسمودیوم فالسیپاروم* بیش تر مشاهده می شود. در عفونت های ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم* ممکن است ما شاهد انعقاد منتشرداخل عروقی (DIC) که یک عارضه نادر در عفونت های مالاریایی هست باشیم، که بستگی به شدت پارازیتمی دارد. از دیگر عوارض شدید ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم*، ادم ریوی، کم خونی، عوارض مغزی و کلیوی می باشند. ایجاد لخته یکی دیگر از عوارض این انگل می باشد که به دلیل انتروتوکسین انگل و توده های گلبولی به هم چسبیده آلوده و در نتیجه اثر بر روی دیواره سیاهرگی به وجود می آید. از دیگر عوارض این انگل مالاریا مغزی است که درسایر مالاریا های انسانی هم دیده می شود. تشکیل توده اریتروسیتی روزت فرم در ایجاد پاتوژنز مالاریا مغزی موثر بوده بوده و در این بین وجود انتی بادی های ضد روزت فرم می توانند موجب جلوگیری از معضل گردند. تشکیل این توده بستگی به پلاسمای خون افراد و خاصیت گلبول های قرمزشان دارد. گلبول های قرمز دسته ای از افراد فاقد خاصیت ایجاد روزت بوده و همچنین در پلاسمایشان دارای عواملی هستند که موجب ممانعت از ایجاد روزت توسط گلبول های قرمز می شود. تب های شدید ۴۱ درجه سانتیگراد یا بالاتر، تب های صفراوی خفیف که موجب گرفتاری کبد می شوند همراه علائمی همچون درد شکمی، تهوع، استفراغ، گاهی اسهال خونی که منجر به کاهش آب بدن می شود نیز گاهی در بیماران دیده می شود، ادرار همراه با صفرا، زردی رنگ پوست، کبد بزرگ از دیگر علائم آن است. یکی دیگراز عوارض نادر اما وخیم عفونت ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم* مالاریا سرد [۸۲]می باشد که علامت آن کم شدن جریان خون، کاهش فشار خون، کاهش درجه حرارت بدن، نبض تند ولی ضعیف، سردی بدن، رنگ پریدگی، از علائم آن می باشد. گاهی در مالاریا سرد، درد شکمی شدید، اسهال، استفراغ، درد عضلانی نیز ممکن است دیده شود، اگر چه تب پیشاب سیاه [۸۳] اغلب با مالاریا فالسیپاروم ارتباط دارد. در بیمارانی که سابقه حملات مالاریا درآنها وجود دارد، به علت همولیز ناگهانی داخل عروقی، تغییر رنگ وحشتناک ادرار مشاهده می شود. همچنین در عفونت های ناشی از *پلاسمودیوم فالسیپاروم* کاهش پلاکت های خون نیز مشاهده می شود. طی مطالعاتی موارد مقاوم *پلاسمودیوم فالسیپاروم*

[82] Algid malaria
[83] Black water fever

باعث افزایش همولیزو در موارد حساس موجب کاهش پلاکت های مریض میشود. در صورتی که میزان پارازیتمی از ۱۰الی ۲۰ درصد، گلبول های قرمز بیمار تجاوز نکند حتی در صورت درمان فوری ممکن است موجب مرگ بیمار شود. در مالاریا مغزی حتی با ۵٪ پارازیتمی هم ممکن است شاهد مرگ بیمار باشیم، که با تعویض به موقع خون می توان بیمار را نجات داد. *پلاسمودیوم فالسیپاروم* از لحاظ بیماریزایی به دو تیپ تقسیم می شود: complicated وnoncomplicated ، اما چون هنوز سویه دقیق از این دو گروه شناسایی نشده بنابراین کلی همه رادر گروه complicated قرار می دهند. به طور کلی علائم بدخیمی آن شامل: مالاریای مغزی [۸۴]، تب پیشاب سیاه ، پارازیتمی بالا [۸۵]می باشد(۱۲, ۲۱, ۲۲) .

۱-۹ اپیدمیولوژی مالاریا

از آنجایی که انتقال مالاریا تا حد زیادی بستگی به شرایط آب و هوای منطقه و شرایط دیگر دارد، لذا این بیماری بسته به نواحی مختلف، انتشار متفاوتی دارد .

مالاریا از عرض شمالی ۶۴ (منطقه آرا کانجل روسیه) تا عرض جنوبی ۳۲ (آرژانتین) گزارش شده است. در ارتفاعات۲۸۰۰ متری از سطح دریا در نقاط مختلف جهان تا ۴۰۰ متر پایین تر از سطح دریا نیز دیده شده است. از بیش از ۱۸۰کشورجهانی، ۳۷کشور تقریبا عاری از مالاریا،۱۶ کشور دارای حداقل خطر ابتلا و بقیه کشورها از حالات شدید تا خفیف وجود دارد (۱).

چناچه انتقال مالاریا حداقل سه سال متوالی صورت گیرد، چنین منطقه ای را بومی یا آندمیک[۸۶] گویند. میزان اندمیسیته از روی بزرگی طحال افراد ساکن در منطقه به ویژه در گروه سنی (۹-۱) سال تعیین می شود. در بیماری ناشی از *پلاسمودیوم ویواکس*، بزرگترین طحال ها و در پلاسمودیوم مالاریه شاهد کوچک ترین طحال ها هستیم.

اگر ابتلا به مالاریا مکررا صورت گیرد، طحال فیبروزه و کوچک شده و به اندازه طبیعی بر می گردد و در مناطقی که انتقال عفونت بسیار بالا است این شاخص در بالغین ممکن است طبیعی باشد، بنابراین در این مناطق از شاخص Parasite rate در نشان دادن شیوع مالاریا استفاده می شود که بیانگر نسبتی از جمعیت است که با داشتن ظاهری سالم، اما در خونشان انگل وجود دارد.

مالاریا فالسیپاروم و اووال بیماری مناطق گرمسیری به شمار می آیند و مالاریه در مناطق نیمه گرمسیری و معتدل یافت می شود. شایع ترین نوع مالاریا در تمام نقاط اندمیک، مالاریای ویواکس است. ازاواسط تابستان تا اواسط پاییز مالاریای ویواکس دیده می شود. در مناطق گرم و خشک مالاریای ویواکس و فالسیپاروم وجود دارد، مالاریای فالسیپاروم در نواحی گرم و مرطوب مانند نواحی استوایی بیشتر دیده می شود. مالاریای مالاریه و اووال در مناطقی که *پلاسمودیوم فالسیپاروم* وجود دارد کم و بیش نیزدیده می شوند (۸) .

---

[84] Cerebral malaria
[85] Hyper parasitemia
[86] Endemic

اگر میزان آلودگی افراد ساکن در یک منطقه از میزان اندمیسیته معمولی آن منطقه بالاتر رود و میزان مرگ و میر افزایش یابد، بیماری به صورت اپیدمی [۸۷] در می آید که این اپیدمی ممکن است فصلی یا دوره ای و محلی یا منطقه ای باشد و یا از مرز طبیعی خود خارج شود و جهانی یا پاندمیک[۸۸] شود.

مالاریا پایدار[۸۹] در شرایطی به وجود می آید که در یک منطقه با وجود فصل گرما یا سرما بیماری مالاریا هرساله به صورت مرتب و ثابت وجود داشته باشد. در چنین منطقه ای به استثناء کودکان کمتر از ۵ سال، بقیه مردم به علت ابتلای مداوم تقریبا از مصونست نسبی برخوردارهستند. در منطقه پایدار انگل غالب فالسیپاروم است و به طور معمول اپیدمی نداریم. ما در کشورهای جنوب صحرای آفریقا و گینه نو شاهد مالاریای پایدار هستیم (۸) .

۱-۹-۱. اپیدمیولوژی مالاریا در ایران

درایران از سال ۱۳۳۵بر نامه ریشه کنی مالاریا شروع شد. در سال ۱۳۵۱ درکل کشور ۲۰هزار بیمار مالاریا وجود داشت که این بهترین وضعیت بود. درسال ۱۳۶۲ فقط در استان سیستان و بلوچستان ۲۰ هزار مورد بیمار مالاریا داشتیم و سال ۱۳۶۹ در کل کشور به ۸۰ هزار نفر رسید که ۷۴هزار مورد آن در سیتان و بلوچستان بوده است. این در حالی است که تعداد بیماران طی سال های ۷۰-۶۵ در این استان به میزان دو برابر افزایش یافت. در سال ۱۳۷۰ تعداد موارد مالاریا در کشور حدود ۱۰۰ هزار مورد رسید ، در سال ۱۳۷۷ تا ۴۰هزار مورد کاهش و سال۱۳۸۱ به ۲۰ هزار مورد کاهش رسید که حدود نیمی ازآنها غیر ایرانی بودند. در سال ۱۳۸۹ تعداد موارد مالاریای ثبت شده به ۶۰۰۰ مورد رسید. در همین سال اداره وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ایران برنامه حذف مالاریا در سال ۱۳۹۰ را نهادینه کرد. با توجه به اینکه در حدود ۶۰ سال قبل مالاریا اولین علت مرگ و میر در کشور بوده است و در اکثریت قریب به اتفاق مناطق کشور شیوع داشته است، همچنین زمانی که کشور حدود ۱۵ میلیون جمعیت داشته است، یک سوم آن یعنی ۵ میلیون نفر در سال مبتلا به مالاریا بودند. در نتیجه امروز با توجه به تلاش‌های دهه‌های گذشته در بخش عمده‌ای از کشور، دیگر نگرانی جدی برای این بیماری وجود ندارد. مالاریا از پنج میلیون بیمار سالیانه در شش دهه قبل به ۵۷ مورد بومی در سال ۱۳۹۶ رسید و خوشبختانه تا تیرماه سال ۱۳۹۷ نیز هیچ موردی از ابتلا به مالاریا وجود نداشته است (۱) .

در حال حاضر آلودگی به پلاسمودیوم اووالە در ایران وجود ندارد، نوع غالب پلاسمودیوم در استان سیستان و بلوچستان و در استان هرمزگان و در استان کرمان که مناطق مالاریا خیز از گذشته تا کنون هستند، پلاسمودیوم ویواکس، و در چابهار و ایرانشهر نوع غالب، پلاسمودیوم فالسیپاروم می باشد.در ایران منطقه هولواندمیک وجود ندارد و منطقه جنوب شرقی ایران حالت اندمیک دارد (۲۳).

---

[87] Epidemic
[88] Pandemic
[89] Stable Malaria

۱–۱۰. راه های انتقال مالاریا

مهم ترین راه انتقال به مالاریا از طریق نیش پشه آنوفل ماده آلوده به اسپروزوئیت و بعداز آن از طریق جفت مادر در هر مرحله ای از دوره جنینی می باشد. از دیگر راه های انتقال، از طریق انتقال خون یا فرآورده های خونی ، سرنگ مشترک در معتادین میباشد. انتقال مستقیم مالاریا توسط انسان را (Induced Malaria) گویند که معمولا براثر انتقال خون ایجاد میشود.

سه تیپ از افراد مستعد برای ابتلا به مالاریا شامل افرادی از قبیل کودکان زیر ۵ سال ، خانم های باردار، افراد معمولی به دلیل سفر از مناطق غیر اندمیک به مناطق اندمیک هستند (۵) .

پس عفونت مالاریا ممکن است به روش مکانیکی و توسط انسان به طور تجربی،اتفاقی ویا به منظور درمانی صورت گیرد. این انتقال در تمام حالت های تلقیح انگل از راه داخل پوستی، درون ماهیچه ای یا داخل وریدی صورت می گیرد (۱۲) .

- مالاریا تجربی (Experimental-malaria): این روش برای انجام مطالعه های ایمنی شناختی،ارزشیابی داروها، روش های درمانی و بررسی دیگر ویژگی های زیست شناختی انگل مالاریا به کار برده می شود.
- مالاریا اتفاقی: این نوع از مالاریا در حالت های متفاوتی دیده می شود. مالاریای اتفاقی در آزمایشگاه که توسط نیش پشه آنوفل آلوده به پلاسمودیوم انسانی و یا پلاسمودیوم میمون مشاهده می شود و همچنین در معتادان به هروئین یا مورفین و غیره دراثر آلودگی از راه سرنگ آلوده، ما شاهد بروز این نوع از مالاریا هستیم. مالاریای اتفاقی نیز در اثر انتقال خون گزارش شده است. به علت توسعه برنامه های انتقال خون و همچنین مراحل نهایی برنامه ریشه کنی مالاریا در بعضی از کشورها، مساله ایجاد مالاریا از راه انتقال خون اهمیت بیشتری پیدا کرده است.
- مالاریا درمانی[۹۰]: پیش از این به عنوان وسیله ایجاد شوک در امراض روانی یا درمان بعضی از عفونت ها به کا می رفت (۱۲) .

۱–۱۱. تشخیص بیماری مالاریا

تشخیص مالاریا از یک سو برای درمان بیمار و از سوی دیگر برای جلوگیری از انتقال بیماری به سایرین و نیز بررسی های اپیدمیولوژیک اهمیت دارد (۱) .

درحال حاضر کشورایران درمرحله Elimination مالاریا می باشد، و حداقل انتقال را دارد، اما از آنجایی که ایرانیان به کشورهای آفریقایی رفت و آمد دارند، و ایمنی هم نسبت به آن ندارند، طی ابتلا به آن عوارض شدیدتر است. پس نقش انگل شناسان ورزیده در این امر بسیار حیاتی میباشد، یک بیمار مالاریایی که به ما مراجعه میکند، دارای علائم تیپیک لزر، تب ، عرق میباشد، پس اولین موردی که در افراد مهاجر ازآفریقا و افغانستانی ها و پاکستانی ها باید شک کرد، به ویژه داشتن تب، ابتلا به مالاریا می باشد.

[90] Malaria therapy

روشهای معمول تشخیص مالاریا، روش هایی هستند که در آن ها از میکروسکوپ استفاده میشود یعنی روش پارازیتولوژیک (۱).

۱-۱۱-۱. روش پارازیتولوژیک

از بیمار مشکوک به مالاریا خون گرفته، اسمیرنازک و ضخیم تهیه کرده، با رنگهای رومانوفسکی بویژه گیمسا رنگ کرده و اسمیر ها را بررسی می کنیم. نمونه خون را می توان هر زمانی گرفت چون عفونتها معمولا آنقدر همزمان نیستند ولی اگر نمونه گیری به هنگام تب باشد بهتر است. گسترش نازک با متانول خالص فیکس می شود، زمان رنگ آمیزی ۳۰ دقیقه در PH خنثی می باشد. مزیت گسترش ضخیم این است که شانس دیدن انگل درآن ۲۰-۱۸ برابر گسترش نازک است و لذا در مواردیکه آلودگی پایین است بهتر می توان انگل را یافت. مزیت گسترش نازک این است که بر خلاف گسترش ضخیم درآن مرفولوژی RBC حفظ میشود و اشخاص مبتدی راحتتر می توانند انگل را پیدا کنند. در کل گسترش ضخیم روش قطعی تری است. در تهیه گسترش ضخیم ضخامت آن باید طوری باشد که خطوط روزنامه از پشت آن نمایان باشد. گسترش ضخیم بر خلاف نازک نیاز به فیکس کردن ندارد و در گسترش ضخیم RBC دیده نمی شود. زمان لازم جهت پیدایش انگل در نمونه خون را دوره ی اختفاء انگل[۹۱] گویند. گاهی اوقات علائم بیماری در افراد حساس زودتر از دوره ی ظهور انگل تظاهر می کند. یعنی علیرغم بروز علائم نمی توان انگل را یافت لذا در آزمایشگاه باید مراقب این مسئله بود و در صورت موارد مشکوک آزمایش تا ۳ بار تکرار شود. رابطه ی دوره کمون [۹۲]و دوره ی اختفاء انگل (p.p) را می توان چنین نشان داد:

در افراد نرمال P.P = I.P / در افراد حساس I.p < p.p / در افراد مقاوم I.P > P.P / .

۱-۱۱-۲. روش مولکولی

این تست ها می تواند برای تایید تشخیص در آزمایشگاه هایی که تجربه و مهارت کافی درآزمایش میکروسکوپی وجود ندارد مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برای تعیین گونه پلاسمودیوم، یا زمانی که گسترش خونی واضح نیست و همین طور در موارد کاهش سطح انگل در خون یا عفونت های مخلوط که ممکن است آزمایش میکروسکوپی دقت کمتری داشته باشد، سودمند خواهد بود. روش های مختلف شامل: PCR, Nested PCR, Real Time PCR, LAMP-PCR مثلا: Real Time PCR در مالاریا بدون علامت روش تشخیصی حساس است (۱, ۵).

[91] p.p= propatent period
[92] I.P = Incubation period

۱-۱۱-۳. روش سرولوژیک

از جمله بررسی کمی بافی کوت [۹۳]بیشتر در بررسی سرواپیدمیولوژیک و تعیین حاملین سالم بکار می رود و در تشخیص آزمایشگاهی روتین کاربرد ندارد و در انتقال خون و پارازیتمی پایین کاربرد دارد.

۱-۱۱-۴. کشت

از روش های دیگر تشخیصی بیماری مالاریا می توان به کشت انگل مالاریا به صورت زنده و تشخیص پس از مرگ از طریق تشخیص انگل های مالاریا و یا مشاهده رنگدانه در لوکوسیت ها در کالبد شکافی از طریق بیوپسی بافت ها از نمونه مغز، طحال و اسمیر نازک استخوان اشاره کرد.

درمحیط RPMI 1640 انگل به خوبی قابل نگهداری و کشت است. کاربرد آن بیشتر در واکسن سازی و بررسی مقاومت دارویی است (۴).

ضمنا گرچه علائم بالینی مالاریا در مناطقی که بیماری شیوع دارد برای پزشکانی که تجربه کافی درتشخیص بالینی مالاریا دارند، ممکن است به تشخیص کمک کند، اما با این وجود، معالجه و درمان بیماران مالاریای بدون آزمایش جز در موارد اضطراری و عدم دسترسی به آزمایشگاه توصیه نمی شود (۱).

۱-۱۲. مقاومت دارویی در مالاریا

مقاومت دارویی مالاریا بزرگترین چالش در مبارزه علیه مالاریا است که درطی دو دهه ی اخیرگسترش زیادی داشته. به علت این افزایش مقاومت مرگ و میر ناشی از مالاریا بخصوص در اطفال روبه افزایش گذاشته است و اپیدمی های متعددی از مالاریای فالسیپاروم رخ داده است.

مقاومت دارویی در مالاریا یعنی توانایی سویه ی انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت هایی از دارو که به طور معمول انگل های همان نوع پلاسمودیوم را از بین برده و یا از تکثیر آنها جلوگیری می کنند، مقاومت دارویی تحت تاثیر دو عامل قدرت سازگاری پلاسمودیوم و استفاده از داروهای ضد مالاریا در پیشگیری و درمان در مناطق بومی بوجود می آید.

بیماری مالاریا مشکل بهداشتی۴۰ ٪ جمعیت دنیا، حدود ۲/۴ میلیارد نفر محسوب میشود. افزایش مقاومت انگل مالاریا نسبت به داروهای ضد مالاریایی، از بزرگترین مسائل کنترل بیماری مالاریا می باشد. مقاومت دارویی به منزله افزایش خطر عوارض جانبی، افزایش هزینه ها و افزایش مشکلات درمان و کنترل این بیماری است. داروی کلروکین به دلیل جذب بالا و همچنین بدون اثرجانبی و قیمت ارزان، با ارزش ترین داروی آنتی مالاریایی در طول نیم قرن گذشته است و همواره به عنوان داروی انتخابی مورد توجه قرار گرفته است و همواره به عنوان داروی انتخابی مورد توجه قرار گرفته است. حدودا ۲۵ سال قبل اولین گزارش مقاومت دارویی *پلاسمودیوم فالسیپاروم* نسبت به کلروکین در ایران توسط ادریسیان منتشر گردید. این انگل های مقاوم به

[93] QBC = Quantitative Buffy Coat

داروتوسط پشه های آنوفل، در سراسر مناطق مالاریا خیز پخش گردید، در نتیجه به تدریج شاهد افزایش شدت و شیوع مقاومت به مالاریا شدیم (۲۴, ۲۵).

مقاومت به تمامی داروهای ضد مالاریا از دیرباز و نسبت به آرتمیسینین و مشتقات آن اخیرا در شرایط Invivo گزارش شده است. مقاومت دارویی ، ضرورت استفاده از داروهای گران تر و با عوارض جانبی خطرناک را ایجاب می کند. مقاومت *پلاسمودیوم فالسیپاروم* نسبت به کلروکین که با ارزش ترین و پر مصرف ترین داروی ضد مالاریا در درمان مالاریا حاد است به تدریج درسال های ۱۹۶۱-۱۹۶۰در کلمبیا و برزیل ازآمریکای لاتین و همزمان با آن تایلند از قاره آسیا و بعد ها تعدادی از کشورهای مالاریا خیز جنوب شرقی آسیا مانند: مالزی ، کامبوج، فیلیپین، اندونزی، ویتنام ، لائوس و برمه و در سال ۱۹۷۸ از کشورهای آفریقا مانند کنیا و تانزانیا گزراش گردید. در حال حاضر مقاومت *پلاسمودیوم فالسیپاروم* به صورت کانون های کوچک و بزرگ در بیشتر نقاط مالاریا خیز دنیا انتشار دارد. کانون جنوب شرقی آسیا از نظر میزان انتشار و شدت مقاومت نسبت به کانون های آمریکای لاتین و آفریقا اهمیت بیشتری دارد و توسعه این کانون به طرف غرب به مناطق مالاریا خیز جنوب شرقی ایران نیز رسیده است (۲۶, ۲۷).

درزمینه تعیین میزان حساسیت *پلاسمودیوم فالسیپاروم* به کلروکین از سال ۱۳۶۲تا ۱۳۸۱ مطالعاتی توسط واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی انجام گرفت. نتایج این مطالعات نشان داد که در مناطق مالاریا خیز ایران در بیمارانی که به آزمایشگاه های بررسی مقاومت دارویی مالاریا در بندرعباس و ایرانشهر مراجعه کرده اند، درصد موارد مقاوم و سطح مقاومت بالا بوده است (۲۸).

طبق تعریف مقاومت دارویی درمالاریا، برای تعیین مقاومت دارویی دریک بیمار مبتلا به مالاریا که دارو دریافت کرده است صرفا وجود انگل در خون پس از درمان دلیل مقاومت نمی باشد، بلکه لازم است بطور هم زمان غلظت های کافی از دارو در خون و متابولیت های آن را به کمک آزمایشات دقیقی چون HPLC اندازه گیری و ردیابی کرد. بنابراین اگر چه مقاومت دارویی می تواند منجر به شکست درمانی گردد، ولی تمام شکست ها را نمی توان به مقاومت دارویی نسبت داد (۱۷).

۱-۱۳.کنترل و پیشگیری مالاریا

اززمان های گذشته، حتی قبل از کشف انگل پیشگیری و کنترل مالاریا صورت می گرفته است. رومی ها و یونانی ها در زمان های بسیار قدیم به منظور دوری از تب، خانه هایشان را در مناطق مرتفع وخشک می ساختند، همچنین با خشک کردن باتلاق ها در واقع به این امر مهم دست یافته و واقف به ارزش بهداشتی این کار بودند (۲۹).

با توجه به سیرتکاملی انگل های مالاریا و نقش پشه آنوفل به عنوان ناقل، بطورکلی می توان چند راه را برای این منظور در نظر گرفت.

۱) کاهش جمعیت پشه های ناقل و یا ریشه کن کردن آنها از منطقه مورد نظر از طریق استفاده از حشره کش های ابقایی به صورت عملیات سمپاشی اماکن داخلی و پناهگاههای خارجی.

۲) جلوگیری ازآلوده شدن پشه ها ازطریق گزش انسان های آلوده ویا ممانعت ازسیر تکامل انگل در پشه

۳) جلوگیری ازانتقال مالاریا به افراد سالم ازطریق ممانعت از گزش پشه های آنوفل آلوده یا به کارگیری پشه بندهای آغشته به حشره کش های نسبتا بی ضرر مانند permethrine ویا مالیدن دورکننده پشه ها (RepellentS).

۴) جلوگیری از تکمیل سیر تکاملی انگل در بدن انسان ازطریق درمان بیماران به طور کامل و دراسرع وقت.

هریک ازموارد ذکر شده مراحل گوناگون داشته و بحث مشروحی رادر جای خود اقتضاء می کند. لیکن دراینجا به چند نکته مهم درباره هریک اشاره میشود:

- ✓ احتراز از قرارگرفتن در معرض نیش پشه

اگرمردم راه مبارزه با پشه ها را بدانند علیه آنها اقدام خواهند کرد، ذخیره کردن آب آشامیدنی در ظرفهای پوشیده و درب دار، پرورش ماهی هایی که از لارو و پشه ها تغذیه می کنند (ماهی گامبوزیا)، کاربرد منطقی حشره کش های مناسب در جای خود، محافظت منزل از ورود پشه ها توسط توری درجلو درب ها و پنجره ها و کاستن درختان نیازمند آب زیاد جهت کشیدن آب از خاکهای مرطوب و خشکاندن آنها.

- ✓ اداره کردن بیمار مالاریایی و پایش بیماری

همانند بسیاری از بیماریها، درمورد مالاریا نیز اگر تشخیص سریع و درمان بموقع انجام گیرد به میزان زیادی از مرگ و میر کاسته خواهد شد. لذا لازم است علائم بالینی بیماری به افراد خانواده ها آموزش داده شود تا با مشاهده اولین علائم بیماری و احتمال آن به نزدیک ترین پایگاه تشخیص و درمان مالاریا مراجعه نمایند واین خود مستلزم وجود پرسنل با تجربه جهت تشخیص و درمان مالاریا می باشد. باید در نظر داشت که بیماری می تواند ظرف مدت ۲۴ ساعت از علائم اولیه تا مرگ بیمار پیش رود واین مساله ضرورت وجود مراکز تشخیص ودرمان مالاریا را به صورت شبکه ای درسراسر کشور نشان می دهد چرا که بسیاری ازکودکان در راه رسیدن به مراکز درمانی جان خود را از دست می دهند .

- ✓ ردیابی علت بیماری ومنطقه ای که متعاقبا مورد حمله مالاریا قرارخواهد گرفت. بسیاری ازگزشهای مالاریایی را میتوان بایک پیش بینی وآینده نگری صحیح بی اثر ساخت. برای مثال با پایش مقاومت دارویی پلاسمودیوم های منطقه به داروهایی که تجویز می شود میتوان قبل ازآن که عده ای به دلیل ابتلا به مالاریا و مصرف داروهای بی اثر تلف شوند، با تغییر دارو ازآن جلوگیری نمود. همواره بایستی تغییرات محیطی و مهاجرت مهاجرین به منطقه مورد توجه قرار گیرد تا با پیشگیری و یا درمان موارد مالاریا از بروز اپیدمی مالاریا در منطقه جلوگیری شود.

- ✓ یکی از روش های مهم وحیاتی درمسیر پیشگیری وکنترل مالاریا، استفاده از داروهای پیشگیری کننده مالاریا است، تا بحال واکسیناسیون موثر و گسترده علیه مالاریا امکانپذیر نشده است. استفاده از داروهای پروفیلاکتیک تا حدی موثر بوده است، اما به علت استقبال مناطق مالاریاخیز و پدیدآمدن سویه های مقاوم به داروهای ضدمالاریایی نسبتا ارزان و بی ضرر مانند کلروکین درسطح وسیع، استفاده از چنین داروهایی به عنوان داروی پیشگیری کننده در مناطق مالاریاخیز توصیه نمی شود.

هنگام تجویز داروی پیشگیری کننده، باید چندین نکته قابل توجه در نظر گرفته شود از جمله: مدت مسافرت، گونه انگل و شدت انتقال درآن منطقه. برای مثال در منطقه آسیای جنوب شرقی، توصیه دارویی به منظور پیشگیری از مالاریا مشکل است زیرا سطح بالایی از مقاومت نسبت به داروهای ضدمالاریا دراین مناطق شایع است. درآفریقا مقاومت به کلروکین در تمامی نواحی گزارش شده است، لذا کلروکین داروی مناسبی برای پیشگیری نخواهد بود. برای مناطقی که مقاومت به کلروکین گزارش نشده یک دوز ۳۰۰mg،کلروکین در هر هفته، یک هفته قبل ازشروع مسافرت به منطقه مالاریا خیز تا سراسر طول سفر و تا یک هفته پس از برگشتن از منطقه باید تجویز گردد. برای مناطقی که مقاومت با کلروکین درآن گزارش شده باید از داروی گرانتری مانند مفلوکین به میزان هفته ای ۲۵۰ mg، استفاده کرد. دانستن میزان و سطح مقاومت دارویی درمنطقه مقصد نیز مهم است. از سایر داروهای ضدمالارایایی نیز می توان با لحاظ مشخصات دارو و انگل استفاده کرد (۱۷ ,۲۹) .

۱-۱۴.درمان و داروهای ضد مالاریا

برای درمان مالاریا ابتدا باید نوع انگل تشخیص داده شود. در مناطق هیپرآندمیک و هولوآندمیک در صورتی که وسایل تشخیصی دردسترس نباشد می توان به علائم بالینی و شیوع مالاریا منطقه بیماران را درمان نمود. تشخیص و درمان سریع مالاریا از ارکان اساسی استراتژی سازمان بهداشت جهانی برای کنترل مالاریا به شمار می رود. درمان ضدمالاریایی صحیح و موثر نه تنها مدت بیماری را کاهش می دهد بلکه از عوارض و خطر مرگ ومیر مالاریا به میزان زیادی می کاهد (۳۰).

انگل پلاسمودیوم دارای سه مرحله آلودگی می باشد: مرحله خونی غیرجنسی، مرحله کبدی و هیپنوزوئیت، گامتوسیت ها. داروهایی که برای درمان مالاریا به کارمی روند برروی یک یا چند مرحله از این مراحل مختلف سیرتکاملی اثر می گذارند، داروهای ضدمالاریایی ضمن موثربودن برروی انگل، باید ارزان و دردسترس بوده و عوارض جانبی نداشته باشند (۱۲).

۱) داروهایی که برروی شیزوگونی نسجی اولیه (کبدی) [۹۴] اثر می کند، از داروهای این دسته میتوان به پریماکین، پروگوانیل و سیکلوگوانیل اشاره کرد.

[94] Primary Tissue schizontocides

۲) داروهایی که برروی شیزوگونی نسجی ثانویه (کبدی) [۹۵] اثر می کند ، برروی هیپنوزوئیت ها درکبد موثراست واز عود بیماری جلوگیری می کند مثل پریماکین و پاماکین.

۳) داروهایی که برروی شیزوگونی خونی [۹۶] اثر می کنند: از داروهای این گروه می توان به کلروکین و مفلوکین اشاره کرد.

۴) داروهائی که برای ازبین بردن گامتوسیت ها [۹۷]به ویژه در عفونت با پلاسمودیوم فالسیپاروم به کار می روند.

۵) اسپرونتوسید[۹۸]: دارویی که بر گامتوسیت ها اثر کرده، وقتی وارد بدن پشه شوند ازطی دوره اسپورگونی جلوگیری میکنند، مثل پریماکین و پریمتامین (۱۲).

۱-۱۵. درمان مالاریا در ایران

با توجه به شرایط ایپدمیولوژیک کشور و برطبق آخرین پروتوکل، درمان علائم بالینی مالاریای ویواکس با کلروکین خوراکی که معمولابه صورت قرص های حاوی ۱۵۰Mg کلروکین است، به مدت ۳ روز درافراد بالغ به شرح زیراست:

روز اول ۴ قرص(۶۰۰ Mg)، کودکان ۱۰Mg/ Kg

روز دوم ۴ قرص(۶۰۰ Mg)، کودکان ۱۰Mg/ Kg

روز سوم ۲ قرص(۶۰۰ Mg)، کودکان ۵Mg/ Kg

که خانم های باردار هم میتوانند استفاده کنند و تاثیر منفی ندارد. بنابراین با این ۳روز درمان علائم بالینی از بین می رود که به آن درمان بالینی می گویند. به دلیل اینکه کلروکوئین روی مرحله عود اثر ندارد بعد ازتکمیل درمان مالاریای ویواکس به منظور درمان اساسی و برای ازبین بردن هیپنوزوئیت های موجود درسلول های پارانشیم کبدی و جلوگیری ازعود بیماری، ازداروی پریماکین که به طور هفتگی و به مدت هشت هفته و به مقدارMg ۴۵ (۳ قرص) درافراد بالغ وبه مقدارMg ۰/۷۸ به ازای هرکیلوگرم از وزن بیمار درکودکان، هفته ای یک بار تجویز می گردد. که به این روش، درمان ضدعود می گویند. تا سال های اخیر به منظوردرمان مالاریای فالسیپاروم از کلروکین استفاده می شد، اما به علت بروز مقاومت دارویی به کلروکین از دو داروی فنسیدار و آرتسونات استفاده می شود. فنسیدار از دو داروی سولفادوکسین و پریمتامین تشکیل شده است. همچنین از یک داروی گیاهی تحت عنوان آرتمیزنین استفاده میشود، که یک به عنوان یک عصاره یا دمنوش گیاهی ضدتب در چین به کارمیرود و درایران تحت عنوان درمنه کوهی وجود دارد و یک داروی ضد مالاریای قوی است و درحال حاضر به شکل قرص یا شیاف وشربت استفاده میشود(۳۱, ۳۲).

مراحل درمان درمان مالاریای فالسیپاروم به شرح زیراست:

---

[95] Secondary Tissueschizontocides
[96] Blood schizontocides
[97] Gametocytocide
[98] Sporontocide

روز اول ۲ قرص آرتسونیت (۲۰۰mg)، کودکان۴+۳ mg/kg قرص فنسیدار و کودکان۲۵ mg/kg

روز دوم ۲ قرص آرتسونیت (۲۰۰mg)، کودکان۴ mg/kg

روز سوم ۲ قرص آرتسونیت (۲۰۰mg)، کودکان۴+۴۵ mg/kg (۳قرص) پریماکین درافراد بالغ وکودکان۰/۷۵ mg/kg(به منظورنابودی گامتوسیت ها)

ازداروی کوارتم به منظوردرمان مالاریای توام استفاده می شود. قابل ذکر است موانع تجویز و عوارض ناخواسته کلیه داروها دارای اهمیت فراوانی است که باید توجه قرارگیرد (۲, ۳۲).

۱-۱۶.استفاده از نانوذرات در درمان بیماری ها ازجمله مالاریا

نانوذرات به عنوان شکل جدیدی از مواد با خواص بیولوژیکی برجسته وسمیت پایین می باشد که به نظر می رسد پتانسیل بالایی در عبور از سد فیزیولوژیکی بدن جهت دسترسی به بافت هدف خاصی از بدن میباشد.

در نانوذرات میزان سمیت آنها نیز بسیار کمتر از میانگین دوز سمی و آسیب حاد کبد است درنتیجه نانوذرات برای هدف قرار دادن سلول های مختلف جهت تحویل دارو یا عوامل ژنتیکی و فاکتورهای تشخیصی بسیار مناسب اند.

نانوذرات از زمانهای بسیار دور مورد استفاده قرار گرفتند. نانو ذرات ، (یا نانو پودر یا نانوکلاستر یا نانوکریستال) ذرات ریز پراکنده یا ذرات جامد با اندازه ۱۰- ۱۰۰ نانومتر هستند که به اشکال مختلف تهیه میشوند . در حال حاضر تحقیقات روی نانو ذرات به علت طیف وسیعی از کاربرد های بالقوه در زمینه های پزشکی، اپتیکال و الکترونیک در محدوده ی تحقیقات بالای علمی است (۲۶ ,۳۳).

نانوذرات از ده ها یا صدها اتم یا مولکول و با اندازه ها و مورفولوژی های مختلف (آمورف، کریستالی، کروی شکل، سوزنی شکل و ...) ساخته شده است. اغلب نانوذرات که به طور تجاری مورد استفاده قرار می گیرند، به شکل پودر خشک و یا به صورت بخش مایع می باشند. البته نانوذرات ترکیب شده (آمیخته شده) در یک محلول آلی یا آبی که به شکل سوسپانسیون یا خمیری شکل است نیز مورد توجه می باشد. این ذرات در شکل ها و مورفولوژی های گوناگونی یافت می شوند، ساختارهایی از کروی گرفته تا فلسی، ورقه ای، شاخه ای، لوله ای و میله ای. امروزه علم نانو در زمینه‌های مختلف پزشکی و درمانی از جمله درمان سرطان بسیار رشد و توسعه یافته است (۲۶).

۱-۱۷. امودین چیست؟

Emodin (۶ متیل ۱،۳،۸تری هیدروکسی آنتراکوئینون) یک عصاره یا ترکیب شیمیایی مشتق شده از گیاهان مختلفی از جمله ریواس، چغندرقند (آش انگور) و یک گیاه ژاپنی تحت عنوان *Japonica reynoutria* است و توسط بسیاری از گونه های قارچ ها ازجمله: اعضای خانواده ی Aspergillus، Pyrenochaeta، Pestalotiopsis ، تولید شده است و از نام های مشترک آن، (*Himalayan rhubarb*) *Rheum australe*، *Frangula emodin*،

Rheum emodin، 3-methyl-1, 6, 8- trihydroxyanthraquinone و Persian Berry Lake rhubarb میباشد (۳۴).

➢ لیست انواع گونه های گیاهی تولیدکننده عصاره امودین:

- ***Acalypha australis***
- ***Cassia occidentalis***
- ***Cassia siamea***
- ***Frangula alnus***
- ***Glossostemon bruguieri***
- ***Kalimeris indica***
- ***Polygonum hypoleucum***
- ***Reynoutria japonica* (syn. *Fallopiajaponica*) (syn. *Polygonum cuspidatum*)**
- ***Rhamnus alnifolia* the alderleaf buckthorn**
- ***Rhamnus cathartica* the common buckthorn**
- ***Rheum palmatum***
- ***Rumex nepalensis***
- ***Senna obtusifolia* (syn. *Cassia obtusifolia*)**
- ***Thielavia subthermophila***
- ***Ventilago madraspatana***

امودین یک آنتراکوئینون فعال زیستی با اثرات بیولوژیکی متنوع میباشد. ودارای خواص آنتی اکسیدانی و ژنوتوکسیک میباشد. از نظر ساختار شیمیایی، متشکل ازترایهادروکسیدآنتراکوئینون[۹۹] ، و از نوع ۹،۱۰ آنتراکوئینون بوده یعنی در موقعیت ۱و۳و۸ دارای گروه هیدروکسید و درموقعیت۶ دارای گروه متیل است. این ترکیب در ریشه وپوست انواع زیادی ازگیاهان (به ویژه ریواس[۱۰۰] و چغندر[۱۰۱]) قارچ ها [۱۰۲]وگلسنگ ها [۱۰۳]وجود دارد و یک ماده موثردرگیاهان مختلف چینی است.همچنین دارای خواص مهارکننده ی تیروزین کینازی، یک ماده ی ضد پلاستیک، یک ملین ویک متابولیت گیاهی است. فرمول شیمیایی آن $C_{15}H_{10}O_5$ است (۳۴).

آنتراکوئینون یک هیدروکربن معطر چندحلقه ای است که از ترکیباتی به نام آنتراسن[۱۰۴] و آنهیدرید فتالیک [۱۰۵]حاصل میشود، آنتراکوئینون ها درساخت رنگ ها، درصنایع نساجی و پالپ و همچنین به عنوان ماده دافع پرندگان و درخمیر سفیدکننده برای کاشت مایع مورد استفاده قرار میگیرد. نام های دیگرآن آنتراسدنئون[۱۰۶] یا دیوکزانترانسن[۱۰۷] میباشد وفرمول شیمیایی آن $C_{14}H_8O_2$ میباشد. ایزومرها مشتقات گوناگون کوئینون ها را

[99] Trihydroxyanthraquinone
[100] rhubarb
[101] buckthorn
[102] moulds
[103] lichens
[104] anthracene
[105] phthalic anhydride
[106] anthracenedione
[107] dioxoanthracene

شامل میشوند اما اصطلاح آنتراکوئینون، با این حال به ایزومر ۹،۱۰ آنتراکوئینون [۱۰۸] اطلاق میشود که درآن گروه های کتو بر روی حلقه مرکزی قراردارند و امودین که از مشتقات آنتراکوئینون ها می باشد.

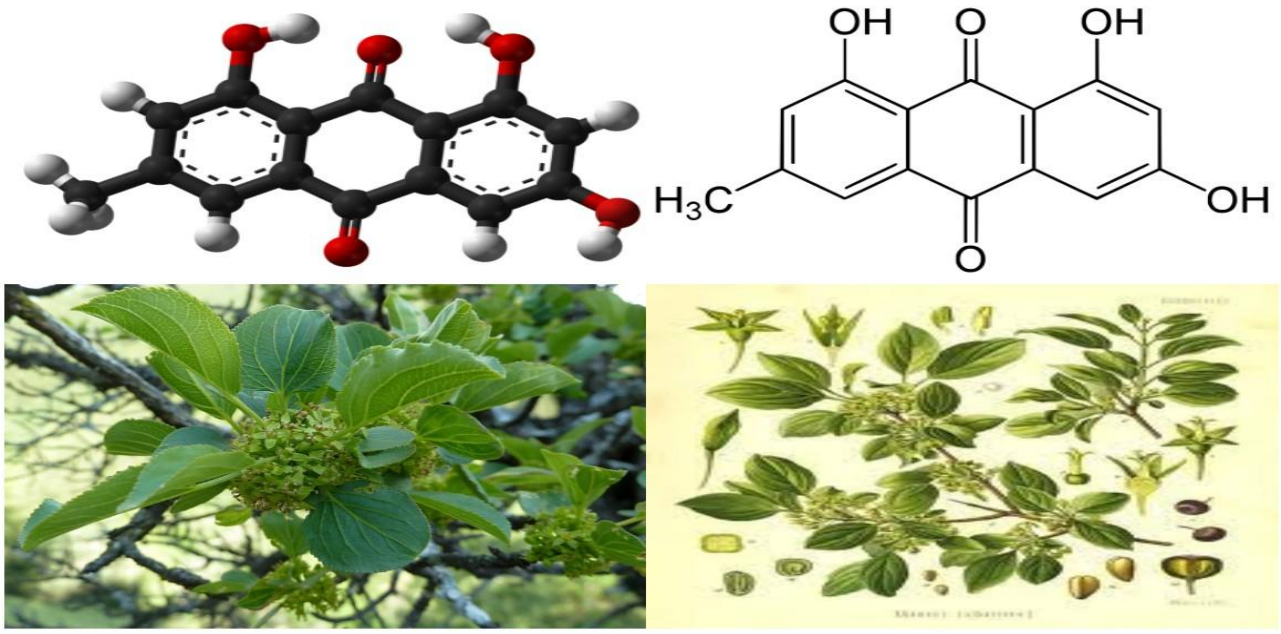
همچنین ۹،۱۰ آنتراکوئینون شامل داروهای مهم (که مجموعا آنتراسنوئید[۱۰۹] نامیده میشود) است و شامل ملین های چون: دانترون[۱۱۰] ، امودین، آلوئه امودین و برخی از گلیکوزیدهای آنتی مالاریایی مانند روفیگالول[۱۱۱] است، مشتقات آنتراکوئینون از جمله: رائین[۱۱۲] ، امودین، آلوئه امودین، پاریتین[۱۱۳] و کریسوفانول[۱۱۴] سمی هستند (۳۵).

دراین کار تحقیقاتی، عصاره امودین استفاده شده از گیاه خانواده Rhamnaceae جنس Rhamnus و گونه *R. cathartica* گرفته شده است (۳۴).

R.cathartica متعلق به خانواده Rhamnaceae است. Rhamnus از خانواده چغندرقند (آش انگور) بوده و یک جنس از حدود ۱۱۰ گونه ی درختچه یا درختان کوچک است که عمدتا تحت عنوان Buckthorns هستند. دامنه گونه های آن از ۱ تا ۱۰ متر قد (به ندرت تا ۱۵ متر) و عمدتا بومی مناطق شرق آسیا و آمریکای شمالی است، اما در سراسرنیم کره شمالی معتدل و نیمه گرمسیری یافت شده است و ازطرفی به صورت محلی بیشتر در نیمکره جنوبی نیمه گرمسیری در بخش هایی از آفریقا و آمریکای جنوبی نیز وجود دارد. برگها ساده هستند، ۳ تا ۱۵سانتی متر طول، و به طور متناوب مرتب ، در جفت های مخالف ، یا تقریبا زوج هستند، یکی از مشخصه های بارز بسیاری از گروه های چغندر ها شکل منحنی های رگه ای به سمت بالا به سمت نوک برگ آنهاست . این گیاهان دارای میوه های کوچک در رنگ های سیاه وقرمز دارند که شبیه به توت است. رامونوس خود متشکل از گونه های مختلف است که به صورت های برگریز و سرسبز هستند. در این تحقیق عصاره امودین از جنس وگونه ی *Rhamnus cathartica* که بومی در اروپا، آسیای غربی، شمال امریکا و ایران است (۳۴).

جنس Rhamnus تشکیل شده از آنتروکوئینون ها (امودین، آلوئه امودین، رائین، فرانگوئیل، گلوکوفرانگوئیل، کریسوفانول، فیسکون[۱۱۵]) و فلانول ها (کاتاریسین، کائمپرفرول و کوئرستین) و رامنوزیدآنترون، مشتقات نفتالین، فلوانول گلیکوزیدها (کائمپروفرول،رامنازین، رامنتین، رامنوسیترین)، استروئیدها (استیگماسترول، P-sitosterol) است (۳۶).

[108] 9,10-dioxoanthracene
[109] anthracenediones
[110] dantron
[111] rufigallol
[112] rhein
[113] parietin
[114] chrysophanol
[115] physcion



شکل ۱-۵: ساختار شیمیایی عصاره امودین و Rhamnus cathartica & Emodin (۳۷)

۱-۱۸.کاربرد امودین و خواص آن

امودین به عنوان یکی از ترکیبات داخلی گیاه رامنوس کاتارتیکا، نشان داده شده است که قادر به مهار آنزیم های مونواکسیداز و تیروزین کیناز است همچنین دارای فعالیت های آنتی باکتریال و ضد سرطانی میباشد. از جمله فعالیت های ضد باکتریال آن که به اثبات رسیده است، بر ضد استاف اورئوس بوده است که اثرات بهتری حتی به نسبت نئومایسین داشته است و در نتیجه در حال حاضر به عنوان یک داروی مرجع ضد تک یاخته ژیاردیا بوده وبسیار به عنوان یک داروی جدید امیدوارکننده بوده است (۳۶).

این عصاره دارای اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی قوی است که میتواند در درمان سرطان، پوکی استخوان، و بیماری های قلبی عروقی، CNS، کبد، واکنش های متابولیکی و تنفسی سودمند باشد. فعالیت ضد میکروبی و ملین و ضد باکتریال ، ضد انگلی ، ضدویروسی ، ضد قارچی و خواص درمانی در دیابت و علیه سرطان های دستگاه گوارش، سینه، رحم و مثانه و بدخیمی های خونی نیز ازآن گزارش شده است (۱۱, ۳۸).

جدول ۱-۲: تاکسونومی عصاره امودین

Rhamnus cathartica
Scientific classification:
Kingdom: Plantae
Order: Rosales
Family: Rhamnaceae
Genus: *Rhamnus*
Species :*cathartica*

۱–۱۹. بیان مسئله و ضرورت اجرای آن

مالاریا یک بیماری تک یاخته ای قدیمی مهم و فراگیر است ویکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها بخصوص کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است. عامل بیماری مالاریا درانسان انگل پلاسمودیوم از گروه شاخه اپی کمپلکسا می باشد که توسط گزش پشه آنوفل ماده آلوده منتقل می گردد، این بیماری نقش مهمی در تاریخ پزشکی داشته و به طور قابل ملاحظه ای بیش از هر بیماری عفونی دیگر به انسان آسیب رسانده است (۱, ۲).

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۰، حدود ۲۲۹میلیون نفر در کل جهان به مالاریا مبتلا بوده اندکه در این آمار قاره افریقا در حدود ۹۴درصد و بعد از آن شرق مدیترانه ۲۶ درصد و جنوب شرق آسیا با ۳ درصد بیشترین میزان ابتلا را دارا می باشند، ۲۹ کشور ۹۵ درصد کل مالاریا را شامل میشوند و بیشترین کشورهایی که دارای مالاریا هستند شامل: نیجریه، ۲۷درصد، جمهوری دموکراتیک کونگو۱۲درصد، اوگاندا هم ۵ درصد، مزامبیک ۴ درصدو نیجر ۳ درصد می باشند (۲).

در ایران در سال ۲۰۱۷، تعداد ۵۷ نفر مبتلا به مالاریا گزارش شده بود که هرچند رشد منفی ۲۴ درصدی داشته است ولی نشان میدهد که بیماری همچنان در کشور جریان دارد. طبق گزارش ها هر دو دقیقه یک کودک از این بیماری (که قابل درمان و پیشگیری است) می میرد. همچنین سطح دسترسی و استفاده از ابزارهای ماندگار و مداخلات در برابر مالاریا کافی نیست. برای مقابله با مالاریا، ما نیاز به یک رویکرد جامع داریم که شامل کنترل برداری وکتورها و تشخیص و درمان زودرس، به ویژه درسطح روستاها باشد . نسبت قابل توجهی از افرادی که در معرض خطر ابتلا به عفونت هستند و محافظت نمی شوند از جمله زنان باردار و کودکان درکشور آفریقا هستند (۲).

ایده آل ترین درمان مالاریا باید به گونه ایی باشد که بدون ایجاد مسمومیت مانع از عود مجدد شود، گامتوسیت را از بین ببرد تا مانع از ایجاد عفونت در پشه شود و همچنین منجر به ایجاد مقاومت در میزبان نگردد. اما هیچ داروئی نمی تواند به تنهایی کاملاً پاسخگوی تمامی اهداف فوق الذکر باشد ، از طرفی ریشه کنی مرحله شیزوگونی داخل گویچه ای [۱۱۶]که عامل اصلی بروز علائم و بیماری است مورد اهمیت بوده و جلوگیری از عود با منشاء خونی یا همان پدیده ظهور مجدد [۱۱۷]وحتی عود با منشاء نسجی [۱۱۸]از اهداف اصلی درمان مالاریا میتواند باشد (۱).

درحال حاضر داروی اصلی در درمان مالاریا کلروکین و درموارد مقاومت دارویی فانسیدار میباشد. اما به صورت عمومی داروهایی که در درمان مالاریا بکار می روند عبارتند از: کلروکین، کینین ، آمودیاکین ،پریماکین ، مفلوکین ، سولفادوکسین (فانسیدار)، داکسی سایکیلین (۱).

از طرفی مقاومت دارویی مالاریا درطی دو دهه ی اخیر گسترش زیادی داشته و بزرگترین چالش در مبارزه علیه مالاریا است. مقاومت دارویی در مالاریا یعنی توانایی سویه ی انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت هایی از دارو که به طور معمول انگل های همان نوع پلاسمودیوم را از بین برده و یا از تکثیر آنها جلوگیری می کنند، مقاومت دارویی تحت تاثیر دو عامل قدرت سازگاری پلاسمودیوم و استفاده از داروهای ضد مالاریا در پیشگیری و درمان در مناطق بومی بوجود می آید . به علت این افزایش مقاومت ، مرگ و میر ناشی از مالاریا بخصوص در اطفال رو به افزایش است واپیدمی های متعددی از مالاریا به ویژه فالسیپاروم رخ داده است (۱) .

متخصصان یک موسسه مطالعات دارویی در بانکوک هشدار دادهاند که مالاریا تحت عنوان "سوپر مالاریا" در مقابل تمام داروهای ضد مالاریا مقاوم است و هیچ دارویی توانایی کشتن آن را ندارد. اولین بار این نوع مالاریا در کامبوج دیده شد اما به سرعت به نقاط دیگر آسیای جنوب شرقی مانند تایلند، لائوس و ویتنام گسترش یافت. آرجن داندراپ، رئیس تیم تحقیقاتی موسسه مطالعات دارویی آکسفورد تروپیکال گفته شدیدا نگران است که این بیماری به نقاط دیگر جهان از جمله آفریقا گسترش پیدا کند. پلاسمودیوم فالسیپاروم شدیدترین شکل مالاریا را ایجاد می کند و بیشتر ین میزان پارازیتمی را به همراه دارد. در حال حاضر مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم نسبت به کلروکین که با ارزشترین و پر مصرف ترین داروی ضد مالاریا در درمان مالاریای حاد است به صورت کانون های کوچک و بزرگ در بیشتر نقاط مالاریا خیز دنیا انتشار دارد و توسعه ی این کانون ها بطرف مناطق مالاریا خیز جنوب شرقی ایران نیز رسیده است. درحال حاضر با توجه به توسعه ی روز افزون مقاومت به داروهای ضد مالاریایی به مناطق جدید و افزایش شدت مقاومت در مناطق قدیمی تر ، اهمیت زیاد مسئله وضرورت توجه هرچه سریع تر و بیشتر مسئولین وسازمان ها و موسسات بهداشتی – درمانی ملی و بین المللی را درنیاز به امادگی برای داروهای جدید دراین امر مهم نشان می دهد. از آنجائیکه اکثر داروهای شیمیایی

[116] Erythrocytic Stage
[117] Recrudescrnce
[118] Relapse

دارای اثرات جانبی زیادی می باشند و مقاومت داروئی زیادی از این داروها در نقاط مختلف گزارش شده است و همچنین برخی از این داروها در مادران باردار دارای منع مصرف می باشد، لذا استفاده از داروئی که عوارض جانبی نداشته باشد و همچنین تاثیر ضد انگلی بالایی داشته باشد ، ضروری بنظر می رسد. از هزاران سال پیش، گیاهان به صورت سنتی در نقاط مختلف جهان برای درمان مالاریا استفاده می شوند (۱, ۳۹) .

یکی از راه های پیشنهادی توسط WHO، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین بردن انگل می باشد و توصیه بر یافتن پتانسیل های احتمالی گیاهان هرمنطقه است که دارای خاصیت آنتی مالاریایی باشد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان بواسطه اثرات جانبی کم یا هیچ آن‌ها ، دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی، ارزان و دردسترس تر بودن و کمتر بودن عوارض و عدم ایجاد سمیت سلولی در اثر مصرف زیاد،رو به افزایش می‌باشد، ازطرفی با توجه به ظهور سوشهای پلاسمودیوم فالسیپاروم مقاوم به کلروکین در دهه های اخیر، کشورهای در حال توسعه از جمله ایران با مشکلاتی در درمان موارد حاد بیماری مواجه می باشند. به همین دلیل یافتن داروهای جدید با حداقل عوارض جانبی ضروری به نظر می رسد. استفاده از طب گیاهی علیه تب های مالاریا سابقه ی طولانی دارد، دو گونه از این مواد که از درختان سینکونا و آرتمیزینا آنوآ مشتق شده اند، در مقابل منسوخ شدن ناشی از گذشت زمان ، پایداری کرده و مورد استفاده قرارگرفته اند. ازطرفی نسبت به آرتمیزین و مشتقات آن در شرایط درون تنی مقاومت دارویی گزارش نشده است (۴۰).

همچنین Emodin (۶ متیل ۱،۳،۸تری هیدروکسی آنتراکوئینون) یک عصاره یا ترکیب شیمیایی مشتق شده از گیاهان مختلفی از جمله ریواس، چغندرقند (آش انگور)، ویک گیاه ژاپنی تحت عنوان *Japonica Reynoutria* است و توسط بسیاری از گونه های قارچ ها ازجمله: اعضای خانواده ی Aspergillus، Pyrenochaeta، Pestalotiopsis ، تولید شده است و از نام های مشترک آن، Rheum australe (Himalayan rhubarb)، frangula emodin، rheum emodin، 3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone و Persian Berry Lake rhubarb میباشد (۴۱).

این عصاره دارای اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی قوی است که میتواند در درمان سرطان، پوکی استخوان، و بیماری های قلبی عروقی، CNS، کبد، واکنش های متابولیکی و تنفسی سودمند باشد. فعالیت ضد میکروبی و ملین و ضد باکتریال ، ضد انگلی ، ضدویروسی ، ضد قارچی و خواص درمانی در دیابت و علیه سرطان های دستگاه گوارش، سینه، رحم و مثانه و بدخیمی های خونی ازآن گزارش شده است. این عصاره از گیاه Rhamnus تهیه میشود. رامنوس از خانواده چغندرقند (آش انگور)، [۱۱۹]بوده و یک جنس از حدود ۱۱۰ گونه ی درختچه یا درختان کوچک است که عمدتا تحت عنوان Buckthorns هستند. و خود متشکل از گونه های مختلف است که در این تحقیق عصاره امودین از جنس وگونه ی *Rhamnus cathartica* که بومی در اروپا، آسیای غربی، شمال امریکا و ایران است گرفته شده است (۳۶).

[119] Buckthorn

نکته قابل توجه دراین تحقیق بررسی اثردرمانی امودین به شکل عصاره نانو شده میاشد. نانوذرات از زمانهای بسیار دور مورد استفاده قرار می گرفته است. نانو ذرات ، (یا نانو پودر یا نانوکلاستر یا نانوکریستال) ذرات ریز پراکنده یا ذرات جامد با اندازه ۱۰- ۱۰۰ نانومتر هستند که به اشکال مختلف تهیه میشوند . در حال حاضر تحقیقات روی نانو ذرات به علت طیف وسیعی از کاربرد های بالقوه در زمینه های پزشکی، اپتیکال و الکترونیک در محدوده ی تحقیقات بالای علمی است (۳۳, ۳۶) .

نانوذرات از ده ها یا صدها اتم یا مولکول و با اندازه ها و مورفولوژی های مختلف (آمورف، کریستالی، کروی شکل، سوزنی شکل و ...) ساخته شده است. اغلب نانوذرات که به طور تجاری مورد استفاده قرار می گیرند، به شکل پودر خشک و یا به صورت بخش مایع می باشند. البته نانوذرات ترکیب شده (آمیخته شده) در یک محلول آلی یا آبی که به شکل سوسپانسیون یا خمیری شکل است نیز مورد توجه می باشد. این ذرات در شکل ها و مورفولوژی های گوناگونی یافت می شوند، ساختارهایی از کروی گرفته تا فلسی، ورقه ای، شاخه ای، لوله ای و میله ای. امروزه علم نانو در زمینه‌های مختلف پزشکی و درمانی از جمله درمان سرطان بسیار رشد و توسعه یافته است (۴۲).

علم نانو و فناوری نانو بسیار گسترش یافته است و زمینه‌های مختلف آن از جمله نانوذرات به صورت گسترده برای انواع برنامه‌های کاربردی، به ویژه برای تحویل دارو و موارد تشخیصی و تصویربرداری مورد توجه و استفاده قرار گرفته است. در سالهای اخیر توجه فراوانی به تهیه نانوذرات پلیمری به عنوان حامل داروها شده است چرا که نانو ذرات به دلیل کنترل و آهسته نمودن رهش دارو، اندازه ذره ای کوچکتر از سلول، زیست سازگاری و نیز افزایش کارآیی درمانی دارو می تواند به عنوان یک سیستم دارورسانی بسیار موثر در نظر گرفته شود. با توجه به قطعی نبودن اثر درمانی داروهای ضد انگلی و عوارض جانبی آن ها، طی سال های اخیر به استفاده از نانو ذرات دردرمان بیماری ها از جمله بیماری های انگلی توجه ویژه ای شده است . از جمله کاربرد های دیگر درمانی نانوذرات مثل : تولید گیاهی نانو ذرات نقره توسط گیاه دارویی بومادران ، بررسی اثرهم ا فزایی نانوذرات نقره با اسانس برگ گیاه اکالیپتوس علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا، بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی میوه سماق به روش سبز، تهیه نانوترکیب جدید از کدو حلوایی برای ترمیم سوختگی پوست در موش سوری نر از نژاد آلبینو و ... میباشد (۴۳-۴۵).

مصارف پزشکی نانو ذرات دارای سابقه طولانی دردرمان بیماری های مختلف است . در حال حاضر از نانو ذرات مختلف در درمان سرطان ها و آرتریت روماتوئید استفاده می شود؛ هم چنین در سال های اخیر استفاده از مشتقات طلا و نقره در برابر بیماری های انگلی مانند مالاریا، لیشمانیوز، تریپا نوزومیازیس و شیستوزومیازیس که میلیونها نفر از مردم سراسر جهان با آن درگیر هستند و روش های درمانی در آن ها از محدودیت های بسیاری برخودار است مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. هر چند که تحقیقات محدودی در این خصوص انجام شده است. پیشرفت های اخیر در استفاده از نانو ذرات مختلف مانند طلا ، نقره و اکسید فلزات به عنوان

داروهای ضد انگل با تأکید بر عمده بیماری های گرمسیری نشان می دهد که نا نو ذرات نقره ، طلا، کیتوزان و اکسید فلزات، بر روی انگل ها ی مختلف از جمله ژ یاردیا ،لیشمانیا، مالار یا، توکسوپلاسما و لارو حشرات اثر کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارند و از طرفی ارزیابی ها ی مختلفی از تأثیر درمانی نانو ذرات مانند طلا و نقره بر رو ی عوامل تک یاخته ها، به ویژه لیشما نیا و مالاریا، شده است . از نانو ذرات برای از بین بردن انگل ها می توان به صورت منفرد یا ترکیبی استفاده کرد ، در نتیجه استفاده از نانو ذرات در نابودی انگل ها (دارای اثر کشندگی و مهاری) ساخت داروهای مؤثرتر و کم ضررتر و هم چنین واکسن های مفید جهت پیشگیری و مبارزه با انگل ها توصیه می شود (۱۱) .

با وجود مزیت های مطالعه ی انگل های مالاریا انسانی، پلاسمودیوم های جوندگان به عنوان مدل مفیدی برای تحقیقات درمورد بیولوژی انگل های مالاریا، واکنش های بین میزبان و انگل، تکامل واکسن ها ،آزمایش دارویی قابل استفاده می باشند، این انگل ها به دلایلی ازجمله اینکه: شباهت اساس بیولوژی انگل های مالاریا انسانی وجوندگان با یکدیگر- ثابت بودن ژنتیک و سازماندهی ژنومی بین پارازیتهای انسانی و جوندگان- یکسان بودن پروسه های بیوشیمیای دربین آنها - مشابه بودن اساس مولکولی حساسیت ومقاومت دارویی درانگل های انسان و جوندگان – ساختمان و عمل آنتی ژنهای هدف معرفی شده برای تهیه واکسن درهردو ثابت اند-راه اندازی وبرقراری سیکل زندگی به طور کامل از جمله آلوده کردن پشه ها هم ساده و هم ایمن می باشد - تکنیک های کشت In-vitro برای تولید انبوه و راه اندازی مراحل مختلف چرخه زندگی انگل قابل دسترسی است - در دسترس بودن متدولوژی برای اصلاح ژنتیکی و همچنین مطالعه انگل های جوندگان این امکان را میدهد تا درضمن اثرات متقابل انگل ومیزبان، آزمایشات دارو درمانی نیز صورت گیرد و میزبان جونده که با خصوصیات گسترده ژنتیکی ،ابزار مفید و قابل دسترسی برای مطالعات ایمونولوژیکال است، میتوانند درتحقیقات در مورد مالاریا جایگزین مدل انسانی شوند (۴۶) .

پلاسمودیوم برگئی یکی از انواع انگل های مالاریاست ویکی از ۴ گونه پلاسمودیوم های گزارش شده در موش های آفریقایی است. به دلیل توانایی ایجاد بیماری در موش و سهولت نسبی مهندسی ژنتیک ، یک مدل محبوب برای مطالعه مالاریای انسان است که معمولا جوندگان و به ندرت سایر پستانداران را مبتلا میسازد. تا کنون آلودگی انسان با این انگل گزارش نشده است، پلاسمودیوم برگئی یک مدل بسیارعالی برای پژوهش و شناخت بیشتر درمورد بیولوژی انگل های مالاریاست، به دلیل : دردسترس بودن تکنولوژی برای کشت in vitro و تولید و خالص سازی مراحل مختلف چرخه ی انگل، در حد مطلوب بودن دانش ما درمورد سازماندهی وثبوت ساختمان ژنی ، امکان پذیر بودن متدولوژی برای تغییر ژنتیکی انگل ودردسترس بودن کلون های کاملا مشخص شده و رده های جهش یافته از نظر ژنتیکی. عفونت با پلاسمودیوم برگئی برای جوندگان آزمایشگاهی به سرعت کشنده است و این امر مانع از مطالعه روی تغییرات ژنتیکی اختصاصی یا تولید شده میگردد. عامل بیماری مالاریا در جوندگان است (۴۷).

۱–۲۰. اهداف

۱-۲۰-۱. اهداف اصلی طرح

تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه رامنوس کاتارتیکا [۱۲۰]بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط in vivo.

۱-۲۰-۲. اهداف فرعی طرح

۱. تعیین میزان اثر عصاره نانو امودین بر روی انگل پلاسمودیوم برگئی در شرایط درون تنی در زمانهای مختلف
۲. تعیین میزان اثر عصاره نانو امودین بر روی انگل پلاسمودیوم برگئی در شرایط درون تنی در غلظت های مختلف
۳. تعیین میزان اثر همولایزیس امودین بر روی سلول های گلبول قرمز انسانی
۴. تعیین اثرسیتوتوکسیسیتی دارو برکبد موش های آلوده
۵. تعیین اثر دارو برآنزیم های کبدی موش های آلوده
۶. تعیین اندازه ذره ای، پتانسیل زتا، و توزیع نانوذرات تهیه شده
۷. تعیین میزان بارگیری نانوذرات

۱-۲۰-۳. اهداف کاربردی طرح

نتایج حاصل از این طرح میتواند اهداف دراز مدت تعیین داروهای جدید برای درمان مالاریا را مورد استفاده قرار دهد.

۱–۲۱. فرضیات و سوالات پژوهشی

۱. میزان اثر عصاره نانو امودین بر روی انگل پلاسمودیوم برگئی در شرایط درون تنی در زمانهای مختلف چگونه است؟
۲. میزان اثر عصاره نانو امودین بر روی انگل پلاسمودیوم برگئی در شرایط درون تنی در غلظت های مختلف چگونه است؟
۳. آیا امودین بر روی سلول های گلبول قرمز انسانی اثر همولایزیس دارد ؟
۴. آیا امودین اثرسیتوتوکسیسیتی برکبد موش های آلوده دارد ؟
۵. میزان اثر دارو برآنزیم های کبدی موش های آلوده چگونه است؟
۶. اندازه ذره ای، پتانسیل زتا، و توزیع نانوذرات تهیه شده چقدر است؟
۷. میزان بارگیری نانوذرات چقدر است؟

[120] *Rhamnus Cathartica*

۱-۲۲.ملاحظات اخلاقی

این مطالعه صرفاً در آزمایشگاه و بر روی موش های Balb/c انجام گرفت و تمامی موازین اخلاقی درنگهداری، ایجاد بیماری یا آلوده سازی، خونگیری، درمان و کشتن موشها بر اساس پروتوکل اخلاق در پژوهش پزشکی جمهوری اسلامی ایران رعایت گردید و تمام اطلاعات منتشر شده به صورت گروهی بوده، و هیچ داده‌ای را که بتوان به فرد خاصی منتسب کرد، منتشر نگردید.

۱-۲۳. محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها

باتوجه به کار با حیوان آزمایشگاهی ممکن است که به علت تفاوت یا نرسیدن مواد مورد نیاز، از نظر زمان طول بکشـــد. اولین و مهمترین محدودیت احتمالی مطالعه، بحث عملیاتی مطالعه بود یعنی احتمال عدم همکاری برخی مراکز برای پیشبرد این پژوهش وجود داشت . مشکل دیگراحتمال عدم جمع آوری تعداد نمونه مد نظر در زمان تعیین شـده بود. به دلیل وسـعت مطالعه و عدم پشـتیبانی مالی به موقع نیز می‌تواند در روند مطالعه اخلال وارد کند. و همچنین نیاز به تکرار برخی از قسمتهای مطالعه نیز می باشد.

۲. فصل دوم - بررسی متون

۱. در مطالعه متولی حقی و همکاران در سال ۱۳۸۲ بر روی ع صاره الکلی دانه ا سپند بر پلا سمودیوم برگئی در موش سوری و مقایسه آن با کلروکین، غلظت ۱۰۰ mg/kg با کمتر ین اثر سمیت ، بیشتر ین تا ثیر را در کاهش پاراز تیمی در مو شهای تحت برر سی دا شته ا ست . ضمناً در این مطالعه سمیت غلظتهای عصاره مذکور در غلظت های بالا نمایان گردید (۳۱).

۲. ناطق پور و همکاران عصاره الکلی گیاه گلدر را بر روی انگل پلاسمودیوم برگئی تاثیر دادند. بررسی حا صل از این محققین ن شان داده ا ست که غلظت ۴۵۰ میلی گرم بر وزن بدن از ع صاره گیاهی به نحو معنی داری باعث کاهش میزان پارازیتمی در موش های آلوده شده ا ست. در این مطالعه ازکلروکوئین بعنوان کنترل مثبت استفاده شده است که تاثیر بهتری نسبت به عصاره گیاهی داشته است اما اختلاف آماری معنی داری در این خصوص وجود نداشته است (۱۷) .

۳. Batista و همکاران در سال ۲۰۱۸ از ع صاره emodin برروی ویروس زیکا ا ستفاده کردند. اثرات ضد ویروسی بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اثرعفونت زایی ویروس زیکا با ۴۰ میکرولیتر از امودین درحدود ۸۳/۳٪ کاهش داشته است. داده های پراکندگی نور پویا نشان داد که این ترکیب به طور قابل توجهی شعاع هیدروودینامیک ذرات ویروس در محلول را کاهش می دهند، درنتیجه این ترکیب طبیعی امودین دارای قدرت ویروس کشی قوی یرای ویروس زیکا هستند (۴۸) .

۴. Dumit و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که آنتروکوئینون امودین دارای خواص ضد سرطانی ا ست و آنها طی این مطالعه ن شان دادند که سلول ها با کارایی متابولی سم تنف سی کمتر ح ساس به امودین است، در حالی که سلول های تحت متابولیسم گلیکولیتیک به این ترکیب آسیب پذیرتر است. یافته های آنها ن شان داد که ایمودین با نقش م شابه از زنجیره انتقال الکترونی میتوکندری باعث ا سترس اکسیداتیو و مختل کردن سلول های سرطانی می شود. امودین دارای اثر م ضربرروی سلولهای سرطانی درمحیط ک شت ا ست،در حالی که سلول های سالم ظاهرا بی تاثیرازاین ترکیب قرارمیگیرند. آنها پاسخ اولیه سلول های نرمال فیبروبلاست پوست انسانی (NHF)، سلول های نرمال کراتینوسیت انسانی جدا شده ازسلولهای سرطانی سینه ، ریه ،روده بزرگ و رحم بودند به امودین را ارزیابی کردند (۴۹).

۵. Yin وJiab وسایرهمکاران درسال ۲۰۱۶ روی اثرعصاره امودین گرفته شده از گیاه Polygonum cuspidatum برعلیه باکتری Haemophilus parasuis که عامل بیماری GlÃssera ا ست که منجر به آ سیب جدی اقتصادی به صنعت گوشت خوک می شود کارکردند. اگر چه آنتی بیوتیک ها به طور گسترده ای برای کنترل عفونت استفاده می شوند،اما شیوع این بیماری به طور ناگهانی اتفاق می افتد. Emodin از Polygonum cuspidatum، اثرات مهار کننده قوی روی H. parasuis را نشان داد. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت باکتری (MBC) از ایمودین به ترتیب ۳۲ و ۶۴ میلی گرم در میلی لیتر بود. منحنی های جنبشی ضد باکتری ن شان داد که فعالیت ضد باکتری امودین به صورت وابسته به غلظت ا ست. تست

نفوذپذیری سلولهای غشائی و فلوسیتومتری نشان داد که ایمودین می تواند یکپارچگی غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری غشا را از بین ببرد و تست های طیف فلور سانس نشان داده است که امودین بر پروتئین غشاء تأثیر دارد. تحت بررسی با میکرو سکوپ الکترونی گذاره، ضایعات جدی ازH. parasuis که در معرض امودین (۶۴ میلی گرم در میلی لیتر) قرار گرفته ،یافت شد، از جمله: شکل سلول نامنظم، پلاسمولیز، دیواره سلولی شکسته و واکوئله شدن غشاء سیتوپلاسمی. این نتایج نشان می دهد که ایمودین می تواند به عنوان یک کاندید پیشگیری کننده بیماری GlÃsserâ استفاده می شود (۵۰) .

۶. Yadav و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نمونه های آلوئه ورا از مناطق مختلف آب و هوایی هند جمع آوری کردند و با روش کمی HPTLC (کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا)، آنتراکینون های مهم مثل آلوئین و آلوئه امودین از نظرتخمین پتانسیل ضد پلاسمودیومی و اثرات این ترکیبات به صورت عصاره خام آبدار استفاده کردند. این دو عصاره طبق دستورWHO با حداقل غلظت مهاری (MIC) برعلیه سویه *P. falciparum* (MRC-2) که حساس شده به کلروکین بود انتخاب شدند. روش، مبتنی بر ارزیابی مهار بلوغ شیزونت در یک صفحه میکروتیتر ۹۶ اینچ است. EC (غلظت موثر است) از نمونه های مختلف برای پیش بینی پتانسیل ضد پلاسمودیوی گیاه از مناطق آب و هوایی خود در نظر گرفته شد.حداکثر مقدار آلوئین و آلوئه امودین به ترتیب ۰,۴۵ و ۰,۲۷ میلی گرم بر گرم به ترتیب از۱۲ نمونه از آلوئه ورا که جداشده بود، است. مهار کننده رشد پارازیت با مقادیر EC50 بین ۰,۲۸۹ تا ۱۰۵۶ میکروگرم در میلی لیتر است.مقدار EC50 antiplasmodial از کنترل مثبت کلروکین ۰,۰۳۴ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده شد و مقدار EC50 توسط آلوئین و آلوئه امودین به ترتیب ۶۷ و ۲۸۰ میلی گرم / میلی لیتر نشان داده شد. فعالیت ضد پلاسمودیوی با افزایش غلظت آلوئین و آلوئه امودین افزایش می یابد، مقدار آلوئین و آلوئیدوادین با افزایش دما کاهش یافت و از این رو با درجه حرارت ارتباط منفی داشت. عصاره های آلوئورا که از مناطق آلودگی سردتر جمع آوری شده، فعالیت ضد پلاسمودیوی خوب نشان داد. هردوآنتروکوئینون پتانسیل ضد پلاسمودیومی کمتری درمقایسه با عصاره خام ازانواع نمونه آلوئه ورا نشان دادند. عوامل مختلف آب وهوایی مقدارترکیبات آزمایش شده وپتانسیل ضد پلاسمودیومی گیاه درانواع مختلف آلوئورا تاثیرمیگذارد(51)).

۷. ناطق پور و همکاران درسال ۲۰۱۶(۱۳۹۴) اثر عصاره الکلی وفراکسیون های زعفران در درمان مالاریا ناشی از پلاسمودیوم برگئی برروی موش های سوری در مقایسه با کلروکین را بررس کردند، کلروکین به عنوان یک داروی استاندارد توانست میزان درصد پارازیتمی در موش ها در روزهای ۴و۷ به صفر برساند و بقا را در موشها افزایش دهد. عصاره اتیل استانی mg/kg۷۰۰ وعصاره آبکی ۳۵۰ و۷۰۰ mg/kg درروز هفتم به طورمعنی داری میزان پارازیتمی انگل پلاسمودیوم برگئئ درموشهای تحت مطالعه درمقایسه با گروه های کنترل را کاهش داده است ($p<0/05$). کاهش سمیت عصاره های زعفران امکان مصرف آن دردوزهای بالاترنسبت به سایر گیاهان را فراهم میکند.اگرچه خاصیت ضدانگلی عصاره زعفران در مقایسه با داروی

کلروکین بر روی انگل یاد شـــده کمتر بوده اما می توان ازآن به عنوان داروی مکمل اســـتفاده کرد. تا نتایج بهتری درکاهش میزان پارازیتمی وافزایش طول موش ها داشته باشد(۵۲) .

۸. Chen و همکاران در ســـال ۲۰۱۵ از ریشـــه خشـــک شـــده یا ریزوم گیاه Rheum palmatum L., Rheum tanguticum عصـــاره Emodin را گرفته و با روش MTT assay, flow cytometry و electron microscopy اثر مهاری غلظت های مختلف عصـــاره emodin روی رده SMMC-7721 از ســـلول های هپاتوسـیت انسـانی بررسـی کردند. بعد از ۱۲،۲۴و۴۸ سـاعت با غلظت های ۲۰،۴۰و۸۰ umol/L از emodin روی سـلولهای SMMC-7721، تکثیر سـلول های SMMC-7721 هپاتومای انسـانی مهارشـد. اثرات مهاری ن شان دهنده واب ستگی به زمان وغلظت بود. ۴۸ ساعت پس از عمل غلظت های مختلف emodin در سلول های SMMC-7721 سـلول در مرحله G2 / M به طور قابل توجهی افزایش یافته اسـت، در حالی که نسـبت سـلولهای فاز S به تدریج کاهش یافت. پس ایمودین می تواند سـلول Hepatoma انسـانی SMMC-7721 را مهار کند (۵۳).

۹. Suleman وهمکارانش در ســـال ۲۰۱۸ یک مطالعه روی اثردرمانی گیاهان برعلیه مالاریا دراتیوپی انجام دادند. در ابتدا، ۱۷ منطقه از منطقه جیمما، یک بررســـی جمعیتی از گیاهان انجام شـــد، منطقه جیمما مالاریاخیز و غنی از گیاهان طبیعی اسـت، مجموعا ۱۱۵ شـفادهنده گیاهی طی جمع آوری اطلاعات ازطریق پر س شنامه وج ستجودرپایگاه های اطلاعاتی بد ست آمد، از نظر جمعیت شنا سی، مجموع ۲۸ گونه از گیاهان مورد ا ستفاده در درمان سنتی مالاریا و علائم مرتبط در منطقه جیمما جمع آوری، شنا سایی و م ستند شد ودر سرچ پایگاه های اطلاعاتی، ۱۲۴ گونه از گونه های گیاهی دارویی گزارش شده ا ست که به طور سنتی در درمان استفاده می شود، Asteraceae و Fabaceae بیشترین خانواده و Allium sativum L. Carica papaya L. and Croton macrostachyus Del و L. Vernonia amygdalina Del., Lepidium sativum یشترین گونه های گیاهی گزارش شده برای ا ستفاده از آنتی مالاریا بودند. گزارش های فعالیت ضد پلا سمودیوی in-vitro و in vivo از ع صاره برخی از گونه های گیاهی حمایت میکرد و چند متابولیت ثانویه جدا شده از گونه های گیاهی خاصـی که به طور سـنتی برای درمان مالاریا و علائم مرتبط اسـتفاده می شـوند گزارش شـد. در اتیوپی. .Allium sativum L، .Carica papaya L، Vernoniaو amygdalina del.، و Lepidium sativum L . بیشترین میزان گزارش شده به عنوان گیاهان ضد مالاریا گزارش شد (۵۴).

۱۰. Chotivanich و Pukrittayakamee و سایر همکاران در سال ۲۰۱۴ تست های آزمایشگاهی مقاومت دارویی آرتمیزنین در پلا سمودیوم فالسی پارم را برر سی کردند، ت ست های حسا سیتی ۴۸ ساعته حسا سیت کمتری را در شنا سایی پلا سمودیوم فال سیپاروم مقاوم به آرتمی سینین دا شت، این اختلاف با از د ست دادن حسا سیت روی محله رینگ تو ضیح داده شده ا ست و به همین ترتیب ت ست مهار بلوغ ۲۴ تایی تروفوزوئیت (TMI) با تمرکز بر روی مرحله رینگ و مقای سهٔ آن با آزمون ا ستاندارد WHO برای مهار ۴۸ ساعته شیزونت

صـورت گرفت، درنهایت ترخیص آرام آرام در مالاریای فالسـیپاروم در غرب کامبوج باعث کاهش حسـاسـیت سطح حلقه می شود (۵۵).

۱۱. Huang وهمکارانش درسـال ۲۰۱۵ اثرات مهاری امودین وبیاسـلین درژن hefA مقاوم به داروها درباکتری هلیکوباکترپیلوری بررسی کردند، با استفاده ازروش رقت دوگانه برای مشاهده سویه های MDR H. pylori و تعیین حداقل غلظت مهاری (MICs) امودین، baicalin، schizandrin، berberine، کلاریترومایسین، مترونیدازول، تترا سایکلین، آموکسی سیلین و لووفلوکسا سین علیه H. pylori پس از لکه های MDR غربال شده با ایمودین، باکالین، اسکیزندرین یا berberine در یک غلظت MIC ۲/۱ برای ۴۸ ساعت، تغییر می کند. در MICs آموکسی سیلین، تترا سایکلین، لووفلوکسا سین،مترونیدازول و کلاریترومایسین تعیین شد. سویه های MDR با MIC های آموکسـی سـیلین کاهش یافته بودند ،برای تشـخیص بیان mRNA hefA با زمان واقعی PCR کمی انتخاب شد. در مجموع چهار سویه MDR H. pylori وجود داشت نمایش داده شده درمان با امودین، باکالین، اسـکیزاندرین و berberine به طور قابل توجهی کاهش MICs آموکسـی سـیلین و تتراسـایکلین در برابر برخی از سـویه ها، کاهش ۱ تا ۲ بار، اما به طور قابل توجهی تغییر MICs از کلاریترومایسین، لووفلوکسا سین و مترونیدازول در برابر سوء MDR. در اکثر موارد سویه های با MIC های کم amoxicillin، mRNA hefA بیان کاهش یافته اسـت آنالیز یک طرفه (SPSS12.0)برای تجزیه و تحلیل تطبیقی، $P < 0.05$ مورد استفاده قرار گرفت. امودین، باکالین، اسکیزندرین وباربرین ، MICs آموکسی سیلین را به طور قابل توجهی کاهش دادند، و تتراسـایکلین در برابر برخی از گونه های H. pylori، احتمالا توسـط مکانیزم های مرتبط با کاهش بیان mRNA hefA است(۵۶) .

۱۲. کامیار امرایی وهمکارانش در سال ۱۳۹۱، به مقایسه ی حساسیت جمعیتهای جغرافیایی ناقل مهم مالاریا، آنوفل استفنسی به پلاسمودیوم برگئی پرداختند، آنوفل استفنسی یکی از ناقلین اصلی مالاریا در جهان از جمله جنوب ایران است. بر اساس مورفولوژی تخم، سه جمعیت جغرافیایی از آنوفل استفنسی مشخص شده اسـت. هدف از مطالعه حاضـر تعیین توانایی انتقال پلاسـمودیوم در جمعیتهای جغرافیایی مختلف آنوفل استفنسی با استفاده از انگل پلاسمودیوم برگئی سویه ANKA بود. به منظور بررسی مراحل اووسیست و اسپروزوئیت، پشه ها در زمان -های مختلف پس از آلوده سازی تشریح شدند. به نظر میرسد که جدایی جغرافیایی و اکولوژیک پشـه های ناقل، نه تنها باعث برخی تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی میشود، بلکه در حساسیت ناقلین به پلاسمودیوم نیز تأثیرگذار است. بنابراین هر یک از عوامل حیاتی محیط زیست در تعامل پلاسمودیوم / آنوفل تأثیرگذار است. این یافته ها ممکن است که فقط توانایی انتقال برخی از آنوفلها را در منطقه خاص توضـیح دهد. همچنین این نتایج ممکن اسـت شـواهد پایه در خصـوص مکانیزم سازگاری پلاسمودیوم با پشه ناقل خود را ارائه دهد(۵۷) .

۱۳. Chabra و همکارانش در سال ۲۰۱۹ اثر کیتوسان، نانو کیتوسان و امودین را در شرایط آزمایشگاهی بر روی انگل ژیاردیا لامبلیا مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل نشان داده است که داروهای مورد بررسی در مقایسه با گروه کنترل اثرات قابل قبولی بر روی کیست و تروفوزوئیت انگل ژیاردیا لامبلیا داشته اند. همچنین نتایج نشان داده است که داروی امودین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانسته است ۱۰۰ درصد انگل ژیاردیا لامبلیا را بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه از بین ببرد (۳۶).

۱۴. حیدریان، ناطق پور، متولی حقی، فریور، رحیمی اسبوئی و همکاران، در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثربخشی عصاره اتانولی گیاه Curcuma longa ، به طور پراکنده و در ترکیب با کلروکین در مقابل سویه های حساس Plasmodium berghei به کلروکین پرداختند. این تحقیق نشان داد که نتایج ED50 برای کلروکین وc. Longa به ترتیب mg/kg۱۲۵۰,۱/۴mg/kg ، بود، ترکیب عصاره اتانولی C.longa با کلروکین به نسبت ۸۰/۲۰ بیشترین فعالیت را با درصد ۷۱/۷۵٪ جهت مهار رشد پلاسمودیوم برگئی داشت که نشان داد دارای واکنش سینرژیک در روش درمانی ترکیبی دارد (۳۳).

۱۵. ادریسیان و شعبانی و همکاران بررسی کردند با توجه به گسترش مقاومت درپلاسمودیوم فالسیپاروم نسبت به کلروکین ازسال ۲۰۰۷ درمان مالاریای فالسیپاروم ازکلروکین به ترکیب آرتسونیت – فنسیدار تغییریافت.

۱۶. Girma و همکاران درسال ۲۰۱۵ اعلام داشتند که عصاره های کلروفرمی برگ خام Osyris (نوعی چای سبزوحشی) باغلظت ۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم ، بر روی موش های مورد آزمایش اثرمهار رشد انگل پلاسمودیوم برگئی را ۴۳/۳ درصد افزایش داده و درنتیجه متوسط سن موش ها به مدت ۱۱روز در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است (۵۸).

۱۷. Govindan و همکاران درسال ۲۰۱۶به ارزیابی فعالیت ضدمالاریایی ترکیب روغن سیر وآرتریر در داخل بدن پرداختند وبه دنبال درمان بااین ترکیب،۱۰۰ درصد مصونیت و بقای موش ها حاصل گردید و برای اولین بار نشان دادند که روغن سیر می تواند به عنوان ترکیب ضدمالارایی ایده الی به همراه آرتریر در درمان ترکیبی به کار رود (۵۹).

۱۸. کربلایی پازکی و همکاران، در سال ۱۳۹۱، به بررسی اثر الکلی گیاه درمنه ترکی (Artemsis annua) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش سوری به روش in vivo ومقایسه آن با اثر کلروکین پرداختند که بررسی نشان داد که غلظت های ۱۱۰۰و ۱۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره گیاهی میزان پارازیتمی را درموش های آلوده بیشتر از سایر غلظت ها کاهش داد که غلظت ۱۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم نیز سمیت کمتری داشت ($p<0.05$). تاثیر کلروکین بر انگل های تحت مطالعه قاطع وبیشتر از غلطت های متفاوت عصاره الکلی درمنه ترکی بود (۶۰).

۱۹. خدادای و همکاران، در سال ۱۳۹۲ به برر سی اثرالکلی درمنه کوهی (Artemisia Aucheri) و داروی کلروکین به صورت جداگانه و ترکیبی، یر روی سویه های حـ ساس به کلروکین پلا سمودیوم برگئی در موش ســـوری پرداختند و این مطالعه نشـــان داد که درمنه کوهی با غلظت mg/kg۱۰۰۰ می تواند در کاهش انگل موثر باشد و در ترکیب با کلروکین این خاصیت خود را از دست میدهد (۶۱).

۲۰. مدرســـی و همکاران، در ســـال ۱۳۹۳ به بررســـی تاثیر عصـــاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر آنزیم های کبدی ALP ، ALT، AST و بافت کبد در موش کوچک آزمایشگاهی (BALB/c) پرداختند و میزان تغییرات آنزیمهای فوق با آزمون Anova وبا نرم افزارspss در سطح $p<0.05$ آنالیز گردید. و در عین حال بافت کبد جهت بررسی تغییرات بافتی این اندام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از کاهش معنی دار ALP وALT در دوز ۲۰۰ میلی گرم / کیلو گرم بود و تعداد هپاتوســیتها و هیســتولوژی بافت کبد تغییرات معنی داری را نشان نمیدهد .به طور کلی میتوان گفت عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه با کاهش فعالیت آنزیمهای ALP و ALT و عدم تغییر در بافت کبد توانسته نقش حفاظتی خود را به اثبات برساند .از این رو در صورت استفاده صحیح میتواند نقش مهمی در پیشگیری و درمان بیماریها در طب سنتی و طب رایج داشته باشد (۶۲).

۲۱. علمی و همکاران، در ســـال ۱۳۹۷ به بررســـی اثر ضـــد مالاریایی عصـــاره هیدرو الکلی گیاه زنجبیل (Officinale Zingiber)، در موش های آلوده به پلاســـمودیم برگئی پرداختند، که این عصـــاره در دوز ۲۵۰ میلی گرم اثر مهاری ۶۲ در صدی بر ر شد انگل در موش سوری دا شت. ($p<0.05$) دا شت که از نظر آماری اختلاف آن با گروه کنترل معنی دار بود، بیشـــترین میزان بقاء در موشـــها مربوط به غلظت۲۵۰ میلیگرم با میانگین ۲±۲۴ روز بود که اختلاف آن نسبت به سایر گروههای درمانی معنی دار بود. ($p<0.05$). مقایسه کبد و کلیه موش ها با گروه کنترل منفی نشان داد، عصاره فوق فاقد اثر سمی برای این ارگان ها می باشد (۶۳).

۳. فصل سوم – مواد و روش کار

۳–۱. نوع مطالعه

این مطالعه مداخله ای-علوم پایه (Experimental-Interventional) بوده ودر آزمایشگاه ملی مالاریا، واحد تک یاخته شناسی گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران درسال ۹۸-۱۳۹۷به مدت ۱سال انجام شده است.

۳–۲. روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن

با توجه به مطالعات انجام شده و شرایط حیوانخانه و نگهداری حیوانات در این مطالعه برای هر گروه درمانی، ۵ عدد موش در ۹ گروه در نظر گرفته می شود و تعداد کل موش ها ۴۵ عدد موش می باشد.

۳–۳. مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن

برای انجام این مطالعه، درمان با استفاده از روش پیترز و دوره چهار روزه انجام گرفت و درصد کشندگی انگل پلاسمودیوم برگئی توسط عصاره نانو امودین در غلظت های ۱۰۰،۲۰۰،۴۰۰،۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر کیلوگرم آن جهت بررسی سایتوکسیتی دارو، با استفاده از روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت و اثرات همولایزیس عصاره روی گلبول های قرمز خون انسان نیز بررسی شد. پس از تاثیر دادن غلظت های مختلف امودین بر روی پلاسمودیوم برگئی با بررسی اسمیر های خونی موش ها و شمارش انگل ها، و تعیین میزان ED50 عصاره ، میزان فعالیت امودین تعیین شد. همچنین طول کبد و طحال موش ها اندازه گیری شد و با گروه کنترل مقایسه و میزان اثرات سایتوتوکسیک عصاره ی مورد بررسی نیز تعیین شد، از طرفی آنالیز آنزیم های کبدی نیز صورت گرفت.

۳–۴. گروه بندی موش های Balb/c

حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده در این مطالعه ۴۵ سر موش نژاد Balb/c جنس نر هستند که از نظر جنس، سن (۱۰-۸ هفته ای) و وزن (۲±۲۰) همسان سازی شدند و جهت بررسی در مرحله invivo به ۹ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. این موش ها از واحد پرورش ونگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده فارماکولوژی و انستیتو پاستور رازی تهیه گردیدند. به همه ی موش ها (به جز گرو ه های ۸ و ۹) تعداد $۱۰^{۶}$ عدد IRBC آلوده به انگل پلاسمودیم برگئی در حجم ۰/۲ سی سی به صورت داخل صفاقی تزریق شد (D0). ۲ ساعت بعد درمان بصورت تزریق زیر جلدی شروع و تا D3 ادامه داشت. (۴روز ادامه پیدا کرد). بدین صورت که به گروه های ۱ تا ۴ غلظت های مختلف نانو امولسیون امودین (Nano-Emodin) مایع به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم برکیلوگرم به صورت زیر جلدی (S.C) تزریق شد، گروه ۵ غلظت ۴۰۰ میلی گرم از امودین معمولی و جامد (غیر نانو) تزریق شد، به گروه ۶ به عنوان گروه مثبت ، ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلروکوئین و به گروه ۷ به عنوان گروه بدون درمان، پلاسیبو (سرم فیزیولوژی) تزریق شد وگروه ۸ به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک داروهای مورد بررسی، غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از امودین مایع نانو شده تزریق شد (بدون تزریق

انگل) وگروه ۹ که به منظور کنترل مرگ و میر تصادفی موش ها در حیوانخانه بدون تزریق انگل و دارو قرار گرفت ، گروه شاهد بدون درمان در نظر گرفته شد.

روزD4 و D7 از دم موش ها خونگیری شد و پارازیتمی تعیین گردید و با گروه کنترل مقایسه شد و درآخر ED50 نیز برای سنجش میزان اثر عصاره در روزهای D4,D7 محاسبه گردید و نمودار آنها به صورت های درصد پارازیتمی و درصد ممانعت از رشد رسم شد.

بعد از روز D14 موش ها با استفاده از روش های رایج در واحد پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی کشته شدند، گروه سایتوتوکسیسیتی بعد از ۱۴ روز نیز دایسکت شد و طول کبد و طحال و آنزیم های کبدی آنها اندازه گیری شدند و با گروه های کنترل مقایسه گردیدند. همچنین وزن موش ها نیز در قبل و بعد ازدرمان ثبت گردید. موش ها در قفس های آهنی مخصوص نگهداری شدند. محل نگهداری آنها پوشیده از تراشه های چوب و پوشال بود. موش ها با پلت های استاندارد و نوشیدن آب سالم تغذیه شدند. (جدول ۳-۱).

جدول ۳-۱: گروه بندی موش ها جهت تعیین ED50 در غلظت های مختلف عصاره امودین

گروه ها	تعداد موش ها	تزریق انگل پلاسمودیوم برگئی	غلظت های دارویی
اول	۵	*	۱۰۰mg/kg امودین مایع نانو شده
دوم	۵	*	۲۰۰mg/kg امودین مایع نانو شده
سوم	۵	*	۴۰۰mg/kg امودین مایع نانو شده
چهارم	۵	*	۸۰۰mg/kg امودین مایع نانو شده
پنجم	۵	*	۴۰۰mg/kg امودین جامد غیر نانو
ششم	۵	*	۲۰mg/kg کلروکین (کنترل مثبت)
هفتم	۵	*	۰/۲Cc پلاسیبو (کنترل منفی)
هشتم	۵	ندارد	۸۰۰mg/kg امودین مایع نانو شده (سایتوتوکسیستی دارو)
نهم	۵	ندارد	NULL (بررسی حیوانخانه)

۳–۵. انگل پلاسمودیوم برگئی مورد بررسی

دراین مطالعه از پلاســـمودیوم برگئی (Plasmodium berghei) ســـویه هندی (NICD) تکثیر یافته در آزمایشگاه ملی مالاریا دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران (TUMS)، استفاده گردید. به منظور استفاده، انگل را با رعایت اصول ایمنی از تانک نیتروژن مایع خارج کرده، و در دمای محیط قرار می گیرد تا با دمای اتاق هم دما شـود. در مرحله بعد نمونه بصـورت داخل صـفاقی به چند موش جهت ایجاد آلودگی اولیه تزریق می شـــود. ۳ تا ۵ روز بعد از تزریق و پس از بروز علائم بالینی در موش، از موش های آلوده خونگیری شده و برای ایجاد آلودگی در گروه های مورد بررسی، تزریق می شود.

۳–۶. عصاره گیری و تهیه امودین

برای تخلیص امودین مقدار ۵۰۰ گرم از میوه های خشک شده گیاه آش انگور (*Rhamnus cathartica*) جدا کرده و با استفاده از آب شیر شستشو داده شد. هسته میوه ی گیاه در شرایط آزمایشگاه و به دور از نور خوشید قرار داده شد تا کاملا خشک گردد و بعد از آن بوسیله خرد کن برقی کاملا به پودر تبدیل شد.

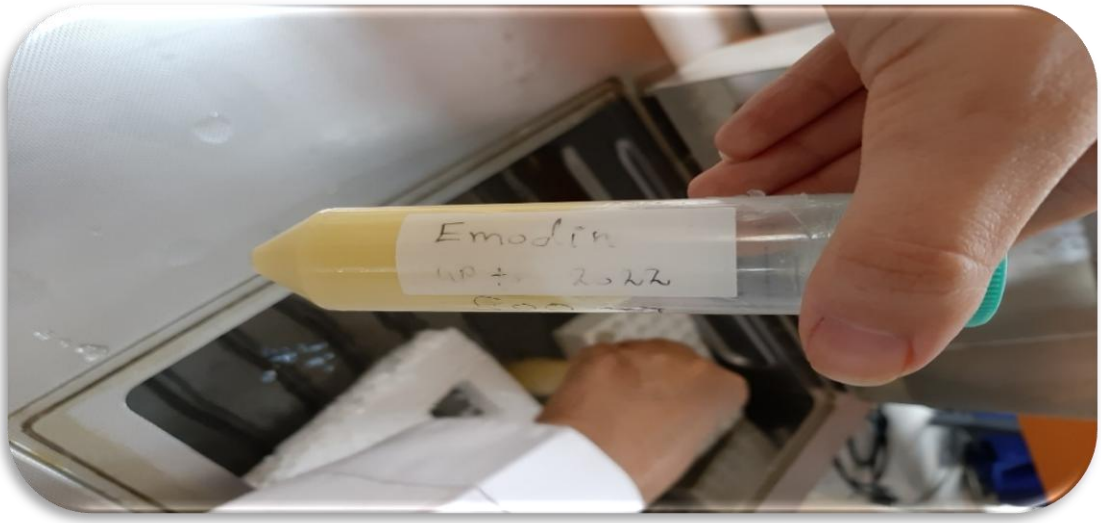
پودر حاصل به همراه ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول خالص (Merck, Germany) در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری قرار گرفتند. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در همزن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از آن به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی به ظرف شیشه ایی منتقل شد و بوسیله ورقه آلومینیومی پوشانده شد.

محلول رسوبی بوسیله هاون کوبیده شد و به آن ۱۰۰ میلی لیتر اتانول خالص اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در همزن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از آن به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی به ظرف شیشه ایی منتقل شد و بوسیله ورقه آلومینیومی پوشانده شد. این عمل برای بار سوم نیز تکرار شد و مجموع محلول های رویی را به یک ظرف منتقل کردیم و به همراه پوشش آلومینیومی در یخچال ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند تا موم از چربی جدا گردد. لازم به ذکر است که همه مراحل کار در آزمایشگاه کاملا کم نور انجام شد.

برای ارزیابی کمی امودین از محلول استاندارد امودین (6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone) با غلظت ۱ میلی مولار (SigmaAldrich, USA) استفاده شده است.

قبل از کروماتوگرافی، ابتدا محلول بوسیله فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (Shimadzu-A9, Australia) با ستون D5، به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر و قطر لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون می باشد، تزریق گردید. با مشاهده پیک های مربوطه و با توجه به زمان بازداری ۴۵ دقیقه ای مقادیر سطح زیر پیک کروماتوگرام مربوط به امودین مشخص گردیدند.

به منظور تعیین پیک مربوط به هر نمونه در کروماتوگرام حاصل، ۱ میلی لیتر از آن با ۱ میلی لیتر از محلول استاندارد اضافه می شود و مجددا به دستگاه تزریق می شود. برای تعیین مقدار امودین در نمونه، بصورت تنها و به همراه استاندارد توسط نرم افزار دستگاه استخراج و سپس محاسبات لازم جهت تعیین مقدار خالص سطح زیر پیک انجام گرفت و در نهایت مقدار دقیق امودین مشخص شد (۶۴).



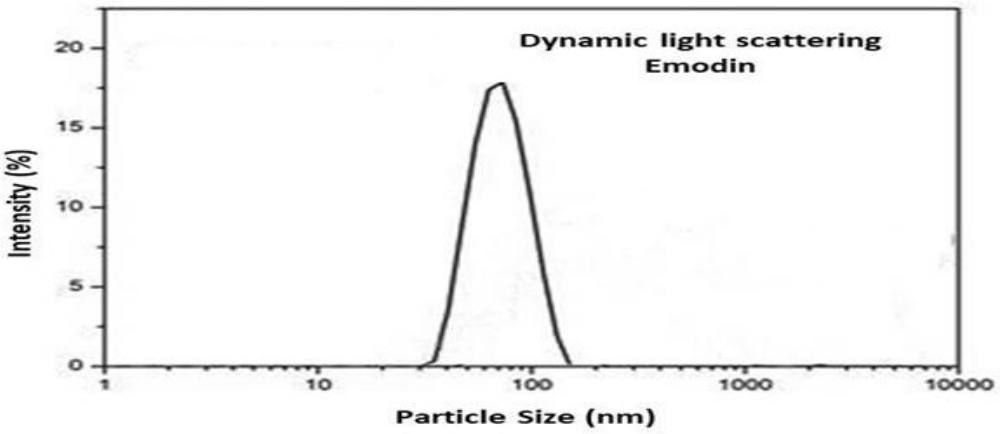
شکل ۳-۱: عصاره نانوشده امودین در حالت مایع

۳-۷. اندازه گیری مقیاس ذرات نانو

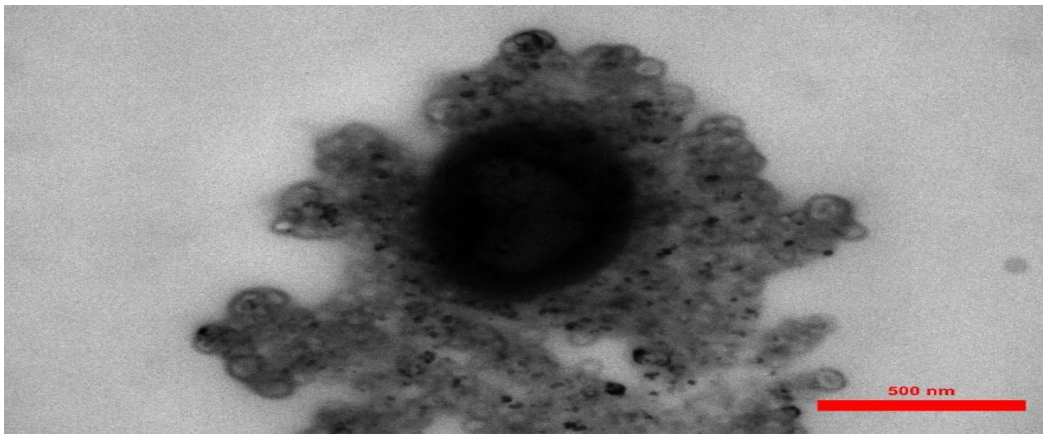
اندازه گیری نانوذرات و میزان بار سطحی آن بوسیله تکنیک های پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، زتا متر (Zeta Potential Analyzer) و میکروسکوپ الکترونی انجام شده است که برای این امر، نمونه ها برای شرکت پرتو رایان رستاک ارسال شد. (اندازه نانو ذرات، در مطالعات بیولوژیک بین اندازه ۱۰۰تا۴۰۰ نانومتر استاندارد می باشد). و از انچه در اشکال بدست آمده از میکروسکوپ TEM، در تصویر۲-۳ بدست آمده (با اشل ۵۰۰ نانومتر)، نشان گر اندازه ذرات بین ۱۲۰-۱۵۰ نانومتر می باشد که کاملا استاندارد است.

۳-۷-۱. روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای مطالعه اندازه نانوذرات

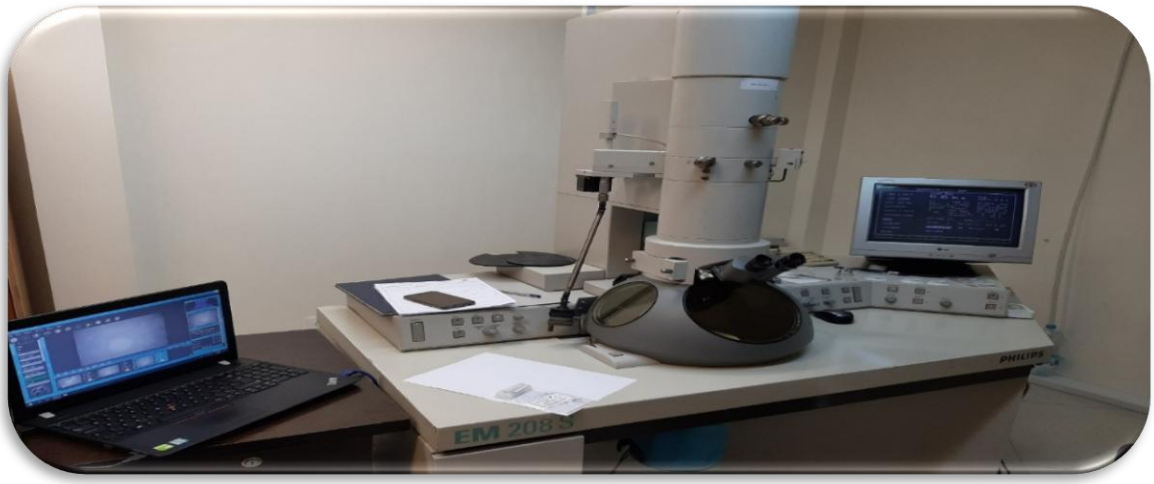
پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون استفاده می شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. در فناوری های اخیر، ذراتی با قطر کمتر از نانومتر نیز با این روش قابل اندازه گیری هستند. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می کند که می تواند به قطر ذره ارتباط داده شود.



نمودار ۳-۳: بررسی محدوده اندازه نانو ذرات با استفاده از تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (DLS)



شکل ۳-۳: عکس با میکروسکوپ الکترونی گذاره از عصاره نانو امودین



شکل ۳-۲: میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

۳–۸. کلروکین: (Chloroquine)

داروی کلروکین به صورت نمک دی فسفاته با فرمول (C18 H26 C1N3.2H3PO4) (MW:515.87 mg) از شرکت سیگما خریداری شد و طبق پروتوکل طرح، غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ازآن تهیه گردید.

۳–۹. طرز تهیه غلظت داروی کلروکین جهت تزریق به موش Balb/c

درمطالعه حاضر داروی کلروکین استفاده شده جهت درمان موش ها با غلظت ۲۰mg/kg می باشد. نحوه آلوده کردن موش ها به این صورت بود که ابتدا تعداد $۱۰^۶$ اریتروسیت پارازیته شده که به صورت یک سوسپانسیون آماده در سرم فیزیولوژی با حجم نهائی ۰/۲ml تهیه شده بود، به چند حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق شد. (تصویر ۴-۳) (۶۵)

۳–۱۰. روش آلوده کردن موش های مورد مطالعه به انگل پلاسمودیوم برگئی

بدین منظور ابتدا و پس از بالا آمدن انگل درخون از موش های آلوده به *P.berghei* به طریق کاردیاک پانکچر[۱۲۱] خونگیری شد. (تصویر ۴-۳). خون مورد نظر پس از مخلوط شدن با سیترات سدیم٪ ۳/۸ وتعیین درصد پارازیتمی به مقدار نیاز با سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید، به طوری که در هر ۰/۲ml از سوسپانسیون تهیه شده $۱۰^۶$ اریتروسیت پارازیته موجود بود، که جهت شروع مراحل بعدی کار، این سوسپانسیون حاوی اریتروسیت های پارازیته به طریق داخل صفاقی به موش های مورد نظر تلقیح شد. (تصویر ۵-۳). (۶۶).

۳–۱۱. وسایل مورد نیاز جهت تهیه نمونه خون از موش

۱. الکل اتیلیک طبی ۷۰ درجه
۲. فریزر ۲۰- درجه
۳. چراغ الکلی
۴. قیچی جراحی
۵. میکروتیوپ کوچک درب دار و استریل
۶. سرنگ استریل ۲ میلی لیتر
۷. کلروفرم
۸. پنبه هیدروفیل

۳–۱۲. مواد مورد نیاز برای رنگ آمیزی نمونه خون تهیه شده از موش

۱. لام آزمایشگاهی مرغوب
۲. ظروف مخصوص رنگ آمیزی

[121] pancture

۳. مزور یا استوانه مدرج ۱۰ یا ۲۵ میلی لیتری
۴. تخته شیاردار برای قرار دادن لام ها
۵. متانول (الکل متیلیک) جهت فیکساسیون (تثبیت) لام نازک
۶. رنگ گیمسا مرغوب و آب بافردار (PH:7.2) به منظور رقیق کردن رنگ گیمسا
۷. میکروسکوپ نوری معمولی مجهز به ابژکتیو ۱۰۰X
۸. روغن ایمرسیون
۹. لوله فالکون

شکل ۳-۳: تزریق داخل صفاقی به موش

شکل ۳-۳: خونگیری به روش کاردیاک پانچر از موش

۳-۱۳. روش تهیه خون از موش های مورد مطالعه و تهیه گسترش های خونی

در این مطالعه خونگیری از موش های آلوده به پلاسمودیوم برگئی به دو روش، یکی از ناحیه دم (تصویر شماره ۳-۶) و یا به وسیله سرنگ ۲ میلی لیتری و پس از بیهوش کردن موش به طریق کاردیاک پانکچر انجام شد (تصویر شماره ۳-۵)، سپس یک قطره از این خون روی لام قرار داده شد و گسترش نازک تهیه گردید و پس از خشک کردن خون، مشخصات مربوط به هر موش روی لام توسط مداد ثبت شد و سپس لام ها با گیمسا رنگ آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X100 مورد بررسی قرار گرفت (۶۷).

۳-۱۴. رنگ آمیزی گسترش های خونی تهیه شده

پس از خشک شدن گسترش های تهیه شد، لام های تهیه شده با الکل متیلیک فیکس شد (Fixation). برای رنگ آمیزی گسترش به روش گیمسا، معمولا رنگ گیمسای غلیظ به نسبت ۳تا ۵ درصد بوسیله آب با PH:7-7/2 رقیق گردیده وسپس روی هرلام 5ml محلول رقیق گیمسا ریخته شد، به طوری که کاملا روی لام را بپوشاند. مدت زمان رنگ آمیزی توسط رنگ گیمسا ۳۴-۴۵ دقیقه بود. بعد از سپری شدن این زمان محلول گیمسا را با جریان ملایم آب از روی لام شسته و وروی تخته شیاردار به صورت مورب قرار داده تا خشک شود، سپس با استفاده از روغن ایمرسیون و ابژکتیو روغنی ۱۰۰X و چشمی ۸-۱۰X (بزرگنمایی ۱۰۰۰-۸۰۰) جستجوی میکروسکوپی انگل در خون انجام گرفته شد. (تصویر ۳-۷). (۶۸)

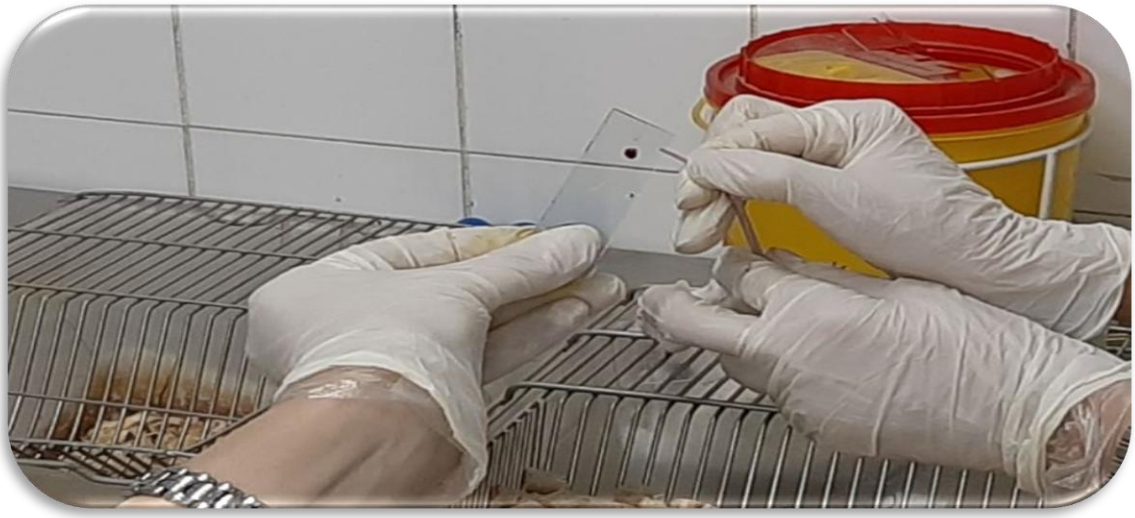
۳-۱۵. شمارش انگل ها

برای تعیین میزان پارازیتمی ، تعداد اریتروسیت های آلوده به انگل در مقابل ۱۰,۰۰۰ گلبول قرمز شمارش وبه درصد تبدیل شدند. برای شمارش انگل ها، تمامی انگل های خارج گلبول قرمز شمارش و گلبول های قرمز آلوده به چندین انگل هرکدام با عنوان یک انگل وشیزونت ها نیز یک انگل محسوب شدند. (تصویر ۳-۸). (۶۹)

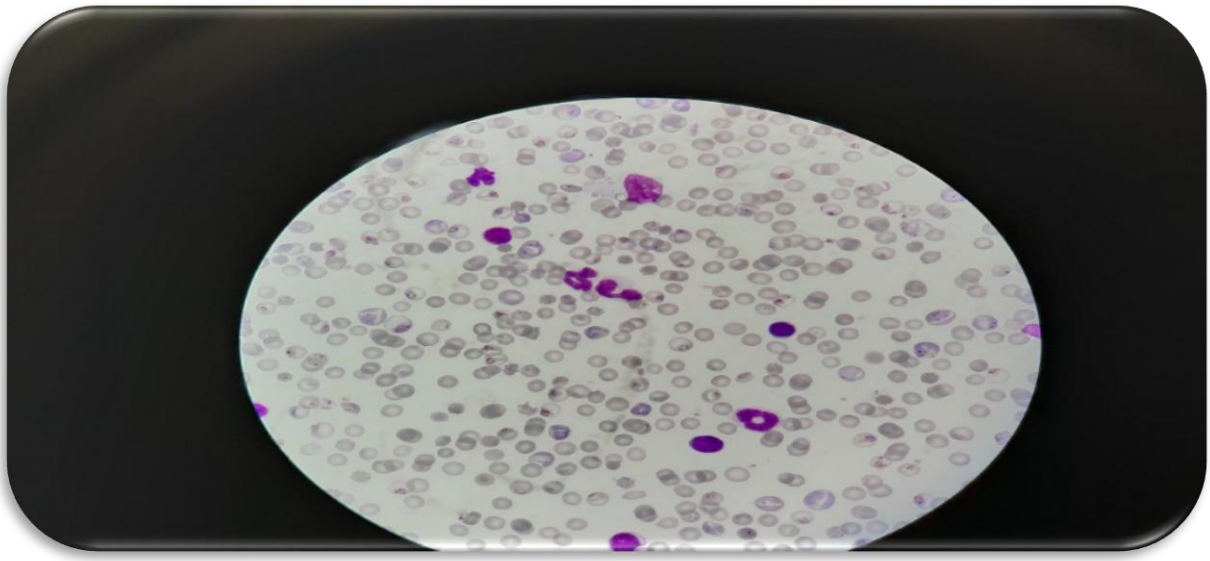
۳-۱۶. بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد

درمان با استفاده از روش پیشنهادی (Peters) انجام می گیرد. درمان بصورت تزریق زیر جلدی از دو ساعت پس از تزریق تا روز D3 یعنی به مدت چهار روز ادامه داشت. (تصویر ۳-۹). در روز D4 اولین خونگیری از موش ها انجام شد. تعیین پارازیتمی و محاسبه ی مهاررشد انگل صورت گرفت، و همچنین خونگیری در روزD7 و D14 نیز انجام شد و مجددا از نظر پارازیتمی و مهاررشد بررسی شدند و نمودار آنها رسم شد. روزانه از انتهای دم موش خونگیری بعمل آمد و از هر نمونه گسترش نازک خون تهیه، فیکس و پس از رنگ آمیزی با گیمسا، تعداد انگل ها مورد شمارش قرار گرفت. بررسی موش ها از لحاظ میزان پارازیتمی تا روز هفتم و از نظر مرگ و میر تا D14 ادامه داشت (۷۰).

شکل ۳۶-۳: خونگیری از دم موش



شکل ۳۷-۳: تهیه گسترش خونی از دم موش



شکل ۳۸-۳: تشخیص میکروسکوپی پلاسمودیوم برگئی

شکل ۳۹-۳: تزریق زیرجلدی دارو به موش

۳-۱۷. بررسی هپاتومگالی و اسپلنومگالی

به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک داروهای مورد بررسی، بعد از روز ۱۴ موش ها را با استفاده از روشهای رایج در واحد پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی کشته و کبد وطحال آنها اندازه گیری و با گروه های کنترل مقایسه شدند. همچنین وزن موش ها نیز در قبل و بعد ازدرمان ثبت گردید. (شکل ۱۰-۳).

شکل ۳۱۰-۳: جداسازی کبد و طحال موش ها و اندازه گیری سایز طول آنها

۳-۱۸. وسایل مورد نیاز جهت جداسازی و اندازه گیری کبد و طحال موش ها

۱. کولیس و خط کش
۲. پنس
۳. قیچی جراحی
۴. پنبه هیدروفیل

۵. دستکش لاتکس و نایلونی
۶. کلروفرم
۷. ظرف استوانه ای شکل مخصوص

۳-۱۹. محاسبه ED50

ED50 (Effective dose ۵۰ ٪)، یعنی غلظتی از دارو (عصاره امودین) که بتواند ۵۰٪ از انگل ها را از بین ببرد یا آن غلظتی که مانع از رشد انگل ها شود یا آن دوزی از دارو که به موش تزریق شده بتواند ۵۰٪ از انگل ها را در شرایط invivo ، در مقایسه با گروه شاهد از بین ببرد.
درصد ممانعت از رشد انگل به روش زیر محاسبه گردید (۵).

$$\textbf{درصد ممانعت از رشد} : \frac{\text{میزان پارازیتمی در دارو} - \text{میزان پارازیتمی در کنترل}}{\text{میزان پارازیتمی در کنترل}} \times 100$$

در این فرمول عدد بدست آمده نمایانگر درصد انگل های از بین رفته در برابر هرکدام از غلظت های دارویی می باشد. هر غلظت دارویی که بتواند حداقل ۵۰ درصد انگل ها را از بین ببرد به عنوان ED50 در نظر گرفته می شود. در برخی مواقع ممکن است تهیه غلظت ها بالاتر از یک دارو مقدور نباشد و یا یک دارو در غلظت های بالاتر اثر سمیت[۱۲۲] داشته باشد در این موارد عدد حاصل از محاسبه هر کدام از غلظت های دارویی که به عدد ۵۰ نزدیک تر باشد به عنوان ED50 آن دارو در نظر گرفته شده و در ترکیب درمانی، ازآن غلظت دارویی استفاده می شود (۱۲).

۳-۲۰. مراحل تعیین ED50 امودین

برای بدست آوردن ED50 امودین نیز غلظت های (۸۰۰،۴۰۰،۲۰۰،۱۰۰) میلی گرم بر گیلوگرم در حالت های نانو مایع و ۴۰۰ mg/kg جامد غیرنانو روی موش های آلوده به انگل پلاسمودیوم برگئ مورد آزمایش قرار گرفت، پس از نمونه گیری و بررسی لام ها و رسم نمودار در کاغذ Semi log، ED50 داروی امودین نیز بدست آمد (۷۱).

۳-۲۱. بررسی اثرات همولایزیس

برای بررسی اثر همولایزیس، میزان ۵ میلی لیتر از خون وریدی انسان را در محیط آزمایشگاهی سه بار با استفاده از سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. بدین صورت که ۷ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به خون اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، در دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و این پروسه سه بار تکرار شد. ۲۰۰ میکرولیتر از گلبول های قرمز شمارش شده که به نسبت ۱به ۱۰ رقیق شده بود به چاهک

[122] Toxicity

های پلیت ۹۶ خانه اضــافه گردید. دارو های مورد بررســی در غلظت های مختلف به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک ا ضافه شدند. به چاهک های گروه کنترل مثبت و منفی به ترتیب آب مقطر و محلول PBS ا ضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت و بعد از گذ شت زمان مورد نظر، تعداد گلبول قرمز شمارش شد . تعداد گلبول های قرمز قبل از تاثیر دارو و پس از تاثیر غلظت های مختلف دارو، با استفاده از لام نئوبار نیز شمارش گردید (۷۲, ۷۳).

۳-۲۲. تست سمیت دارو (سایتوتوکسیسیتی)

طبق روش درمانی Peters، به منظور تعیین ســـمیت دارو، پس از تعیین بهترین غلظت دارو برای اطمینان از عدم سمیت دوز مورد ا ستفاده، غلظت ۸۰۰mg/kg از نانو امودین مایع به عنوان بالاترین دوز در نظر گرفته شد و به گروه سایتوتوکسیسیتی تزریق شد و نتایج با گروه کنترل مثبت که با داروی کلروکین درمان شده اند و نیز گروه مرگ و میر مقایسه گردید (۷۴).

۳-۲۳. طرز تهیه PBS

۸/۵gr از Nacl gr+ ۱/۰۷ از Na_2Hpo_4 + ۰/۳۹gr از NaH_2po_4 و ۲ H_2O

مواد ذکر شده به میزان گفته شده با ترازو وزن شد و در یک لیتر آب مقطر حل شد، سپس PH محلول با PH متر بررسی شد. (PH مناسب : ۷/۱).

۳-۲۴. بررسی آنزیم های کبدی

همچنین به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک دارو بر روی سلول های کبدی و طحال ، در روز D14 از همه موش ها خونگیری صورت گرفت و در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سانتریفوژ در دور ۲۵۰۰ به مدت ۳ دقیقه سرم از سلول جدا شد. سرم ها در یخچال ۲۰- قرار گرفتند. در زمان آنالیز آنزیم ها، سرم ها از یخچال خارج گردید و مقادیر پارامترهای کبدی سرم شامل AST، ALT و ALP با استفاده از کیت های اندازه گیری (Iran ،Pars Azmoon) و با استفاده از یک دستگاه آنالایزر بیوشیمی اندازه گیری شدند.

۳-۲۵. آنالیز آماری

درپایان کاراز اطلاعات بدست آمده در مرحله in vivo با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۶و به روش آزمون های One way Anova, Post Hoc,Kruskal- wallis Kolmogorov-Smirnovz,آنالیز آماری انجام شد و نتایج تجزیه و تحلیل گردید. و ازطرفی با استفاده ازفرمول های تخصصی میزان پارازیتمی و درصد ممانعت از رشد و ED50 محاسبه گردید و نمودارآنها نیز رسم شد.

۴. فصل چهارم – یافته ها

این مطالعه با هدف تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه رامنوس کاتارتیکا (Rhamnus Cathartica) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط in vivo صورت گرفت.

۴-۱. یافته های مربوط به میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل

روزانه موش ها بررسی شدند. بررسی موش ها از لحاظ میزان پارازیتمی تا ۱۴ روز ادامه پیدا کرد و از نظر مرگ و میر تا D14 ادامه داشت. این تست برای اولین بار توسط Peters به کار برده شد و ما اختصارا از آن به عنوان تست Peters نام بردیم (۷۵).

نتایج حاصل از درصد پارازیتمی ودرصدممانعت از رشد وED50 در (نمودارهای ۴-۱، ۴-۲ ،۴-۳،) نشان داده شده است.

نتایج حاصل از شمارش میکروسکوپی لام های تهیه شده در برنامه آماری SPSS ثبت گردید و آنالیز های آماری به همراه آزمون ها تخصصی اجرا گردید. بدین صورت که جهت بررسی نرمال بودن متغیر های اندازه گیری شده از آزمون آماری Kolmogorov-Smirnovz استفاده گردید، در واقع آزمون کولموگروف -اسمیرنوف معمولا برای بررسی نرمال بودن داده‌های وابسته صورت می‌گیرد، و شرط نرمال بودن داده، مقدار p-value >۰/۰۵ می باشد. نتایج حاصل از این آزمون برای پارازیتمی در هر ۲روز D4 وD7 ، اندازه طول کبد و طحال موش ها و اندازه آنزیم های کبدی موش ها به تفکیک در (جدول ۴-۱) آورده شده است.

با توجه به اینکه تمام P-value ها به جز طول طحال، بالای ۰/۰۵ شده است، طبق اصول این آزمون پس همگی توزیع نرمال دارند.

جدول ۴-۱: نتایج آزمون Kolmogorov- Smirnovz جهت بررسی نرمال بودن متغییرها

نام متغیر	K-S Z	P-value
Parasitemia D4	٪۰/۸۵	٪۰/۴۵۷
Parasitemia D7	٪۰/۶۳	٪۰/۸۱۷
Parasitemia D10	٪۰/۳۷	٪۰/۹۹۹
Length Liver(Mm)	٪۰/۶۴	٪۰/۸۰۱
Length Spleen(Mm)	٪۱/۵۶	٪۰/۰۱۵
ALT Enzymes	٪۰/۷۰	٪۰/۷۱۱
AST Enzymes	٪۰/۹۲	٪۰/۳۶۵
ALP Enzymes	٪۱/۰۴	٪۰/۲۲۸

در مرحله بعد از آزمون های پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه یا (One-Way Anova) جهت مقایسه Mean یا میانگین متغیرهای اندازه گیری شده با توزیع نرمال درگروه های مختلف استفاده شد. که نتایج آن در جداول (۴-۲، ۴-۶ و ۴-۹) نشان داده شده است. برای اندازه طول طحال (پارامتری که غیر نرمال شد) از تست نان پارامتریک Kruskal- Wallis استفاده شد. و نتیجه آن در (جدول ۴-۸) نشان داده شده است.

- نتایج حاصل از تاثیر عصاره نانوامودین مایع در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۸۰۰ و امودین جامد غیر نانو در غلظت ۴۰۰میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر روی میزان پارازیتمی انگل *پلاسمودیوم برگئی* در شرایط درون تنی در روز D4 نشان می دهد، میانگین پارازیتمی در گروه اول (غلظت ۱۰۰Mg/kg مایع) ۶/۶ درصد، درگروه دوم (غلظت ۲۰۰Mg/kg مایع) ۶/۸ درصد، در گروه سوم (غلظت ۴۰۰Mg/kg مایع) ۶/۲ درصد، درگروه چهارم (غلظت ۸۰۰Mg/kg مایع) ۸/۴ درصد، گروه پنجم (غلظت ۴۰۰Mg/kg جامد) ۴/۲ درصد، گروه ششم (کلروکین)، ۰درصد و گروه هفتم (پلاسیبو) ۱۳ درصد بدست آمد که اختلاف میانگین گروه های نام برده شده در بالا با گروه کنترل از نظرآماری معنی دار است. (طبق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه P-value <۰/۰۰۱ یعنی معنی دار است). در روزD7 نتایج نشان داد که در این روز اختلاف معنی داری بین میانگین ها وجود ندارد چرا که مقادیر به هم نزدیک هستند و از طرفی P-value ها نیز در روز ۷ بالای ۰/۰۵ است در این صورت از نظر آماری اختلاف آنها معنا دار نیست، (طبق این آزمون P-value باید زیر ۰/۰۵ باشد.).

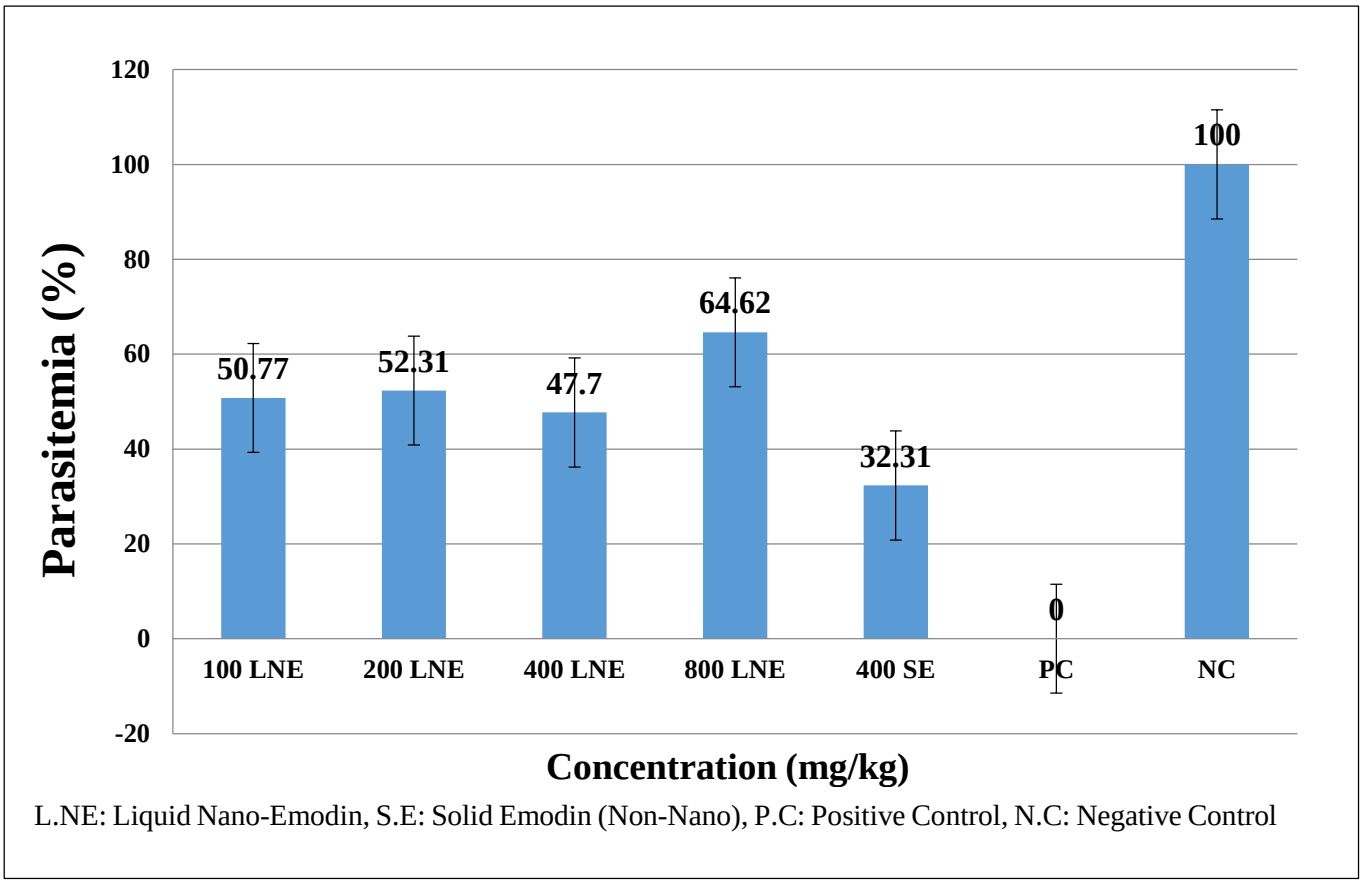
جدول ۴-۲: نتایج آزمون One -Way Anova حاصل از پارازیتمی در روزهای D4 ، D7

SD ± میانگین (%)								
شماره و نام گروه ها	گروه اول غلظت ۱۰۰ (mg/kg) از نانو امودین مایع	گروه دوم غلظت ۲۰۰ (mg/kg) از نانو امودین مایع	گروه سوم غلظت ۴۰۰ (mg/kg) از نانو امودین مایع	گروه چهارم غلظت ۸۰۰ (mg/kg) از نانو امودین مایع	گروه پنجم غلظت ۴۰۰ (mg/kg) از امودین جامد غیرنانو	گروه ششم کلروکین	گروه هفتم پلاسیبو	P-value
پارازیتمی D4	۶/۶ ± ۲/۵	۶/۸ ± ۳/۸	۶/۲ ±۴/۶	۸/۴ ± ۱/۸	۴/۲ ±۱/۷	۰	۱۳ ±۲/۴	<۰/۰۰۱
پارازیتمی D7	۲۹ ±۴/۸	۲۶/۵ ±۵/۰۶	۲۵/۶ ±۴/۱	۲۶/۴ ±۷/۸	۲۷/۲ ±۸/۹	۰	۳۴ ±۷/۵	۰/۶۳۸

۴-۲. یافته های مربوط به نمودارهای مقایسه ای میزان پارازیتمی و درصد ممانعت از رشد در روز D4

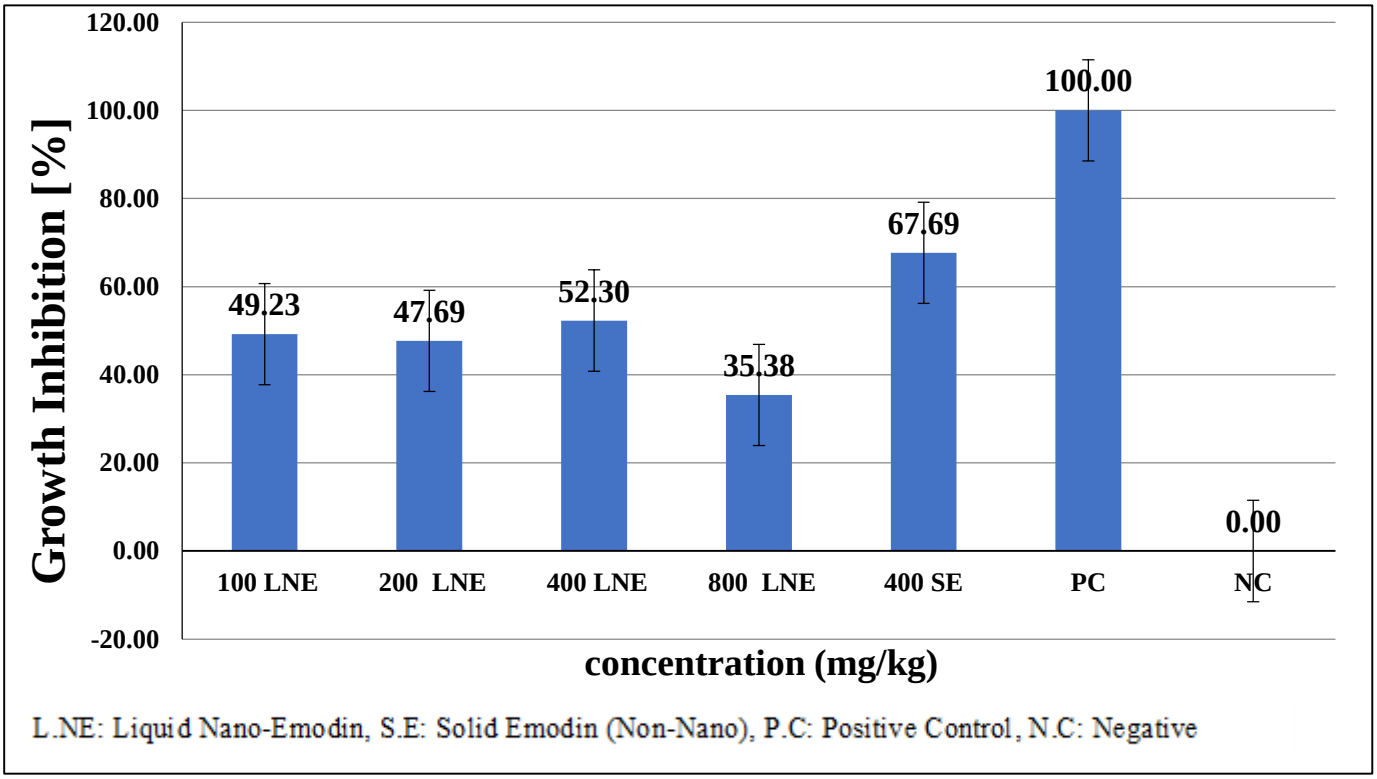
مطابق نمودارهای (شماره ۴-۱ و ۴-۲) در روز D4 :

- گروه اول شامل موش هایی است که با غلظت ۱۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۵۰/۷۷٪ و درصد ممانعت از رشد ۴۹/۲۳ ٪ می باشد.
- گروه دوم شامل موش هایی است که با غلظت ۲۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۵۲/۳۱٪ و درصد ممانعت از رشد ۴۷/۶۹٪ می باشد.
- گروه سوم شامل موش هایی است که با غلظت ۴۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۴۷/۷٪ و درصد ممانعت از رشد ۵۲/۳۰٪ می باشد.
- گروه چهارم شامل موش هایی است که با غلظت ۸۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۶۴/۶۲٪ و درصد ممانعت از رشد ۳۵/۳۸ ٪ می باشد.
- گروه پنجم شامل موش هایی است که با غلظت ۴۰۰mg/kg از داروی امودین جامد و غیر نانو درمان شده اندکه میزان پارازیتمی ۳۲/۳۱ ٪ و درصد ممانعت از رشد ۶۷/۶۹ ٪می باشد.
- گروه ششم کنترل مثبت شامل موش هایی است که با غلظت ۲۰ mg/kg با داروی کلروکین درمان شده اند و متوسط میزان پارازیتمی ۰٪ و درصد ممانعت از رشد ۱۰۰٪ می باشد.
- گروه هفتم شامل موش هایی است که بدون درمان اند (پلاسیبو) و میزان پارازیتمی ۱۰۰٪ و درصد ممانعت از رشد ۰٪ درصد می باشد.



L.NE: Liquid Nano-Emodin, S.E: Solid Emodin (Non-Nano), P.C: Positive Control, N.C: Negative Control

نمودار ۴-۱: میزان درصد پارازیتمی در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D4

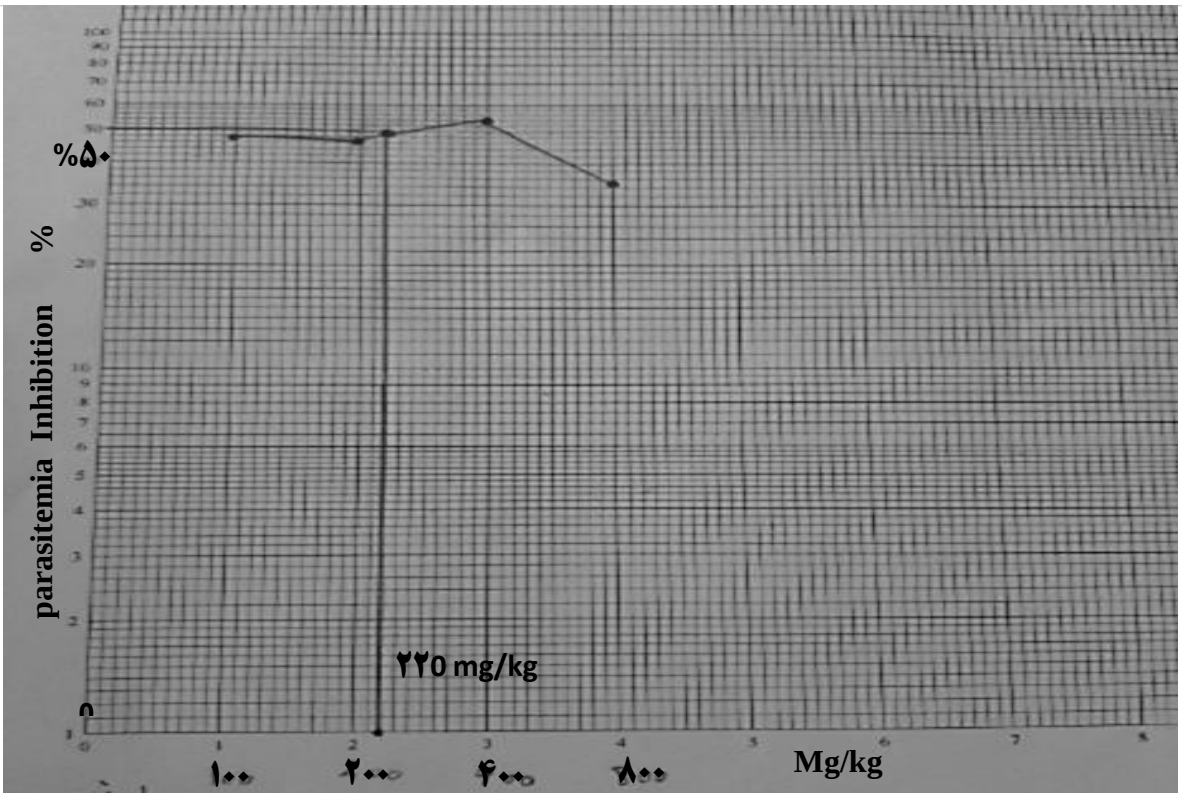


L.NE: Liquid Nano-Emodin, S.E: Solid Emodin (Non-Nano), P.C: Positive Control, N.C: Negative

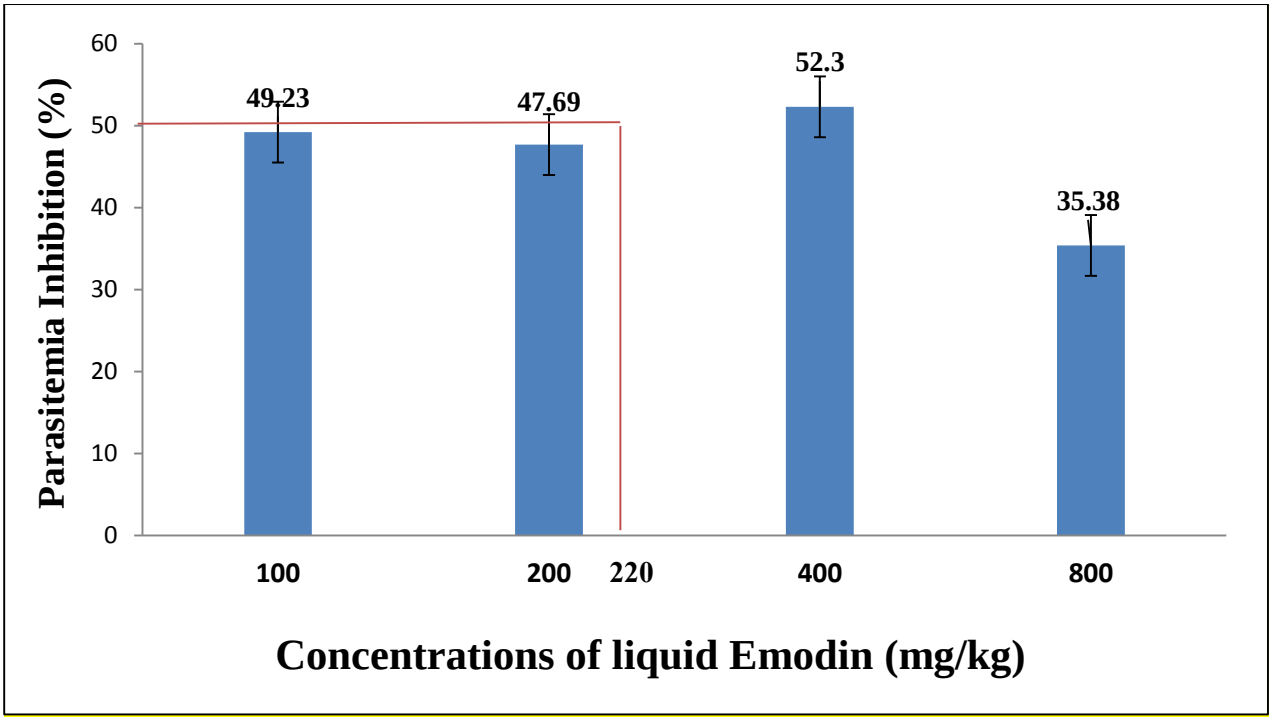
نمودار ۴-۲: میزان درصد ممانعت از رشد در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D4

۴-۳. نتایج حاصل ازتعیین ED50 عصاره امودین در روز D4 درمان

درمطالعه حاضر ED50 برای عصاره الکلی گیاه امودین تعیین گردید. طبق نمودار ۴-۳، این میزان برای عصاره امودین ۲۲۰mg/kg می باشد و این میزان از عصاره امودین میتواند ۵۰ درصد انگل ها را در میزبان کاهش دهد. اما با توجه به اینکه غلظت mg/kg ۸۰۰ تاثیر کمتری ازغلظت mg/kg ۴۰۰ داشته است، ممکن است سوال برانگیز باشد که چرا غلظت بالاتر تاثیر کمتری را داشته است. تجربیات و مطالعات مختلف نشان داده است که بعضی از فراکشن های گیاهی در غلظت پایین تر تاثیر بهتری میتواند اعمال کند.



نمودار ۴-۳: تعیین ED50 عصاره امودین در پارازیتمی روز D4 (Semi-log)



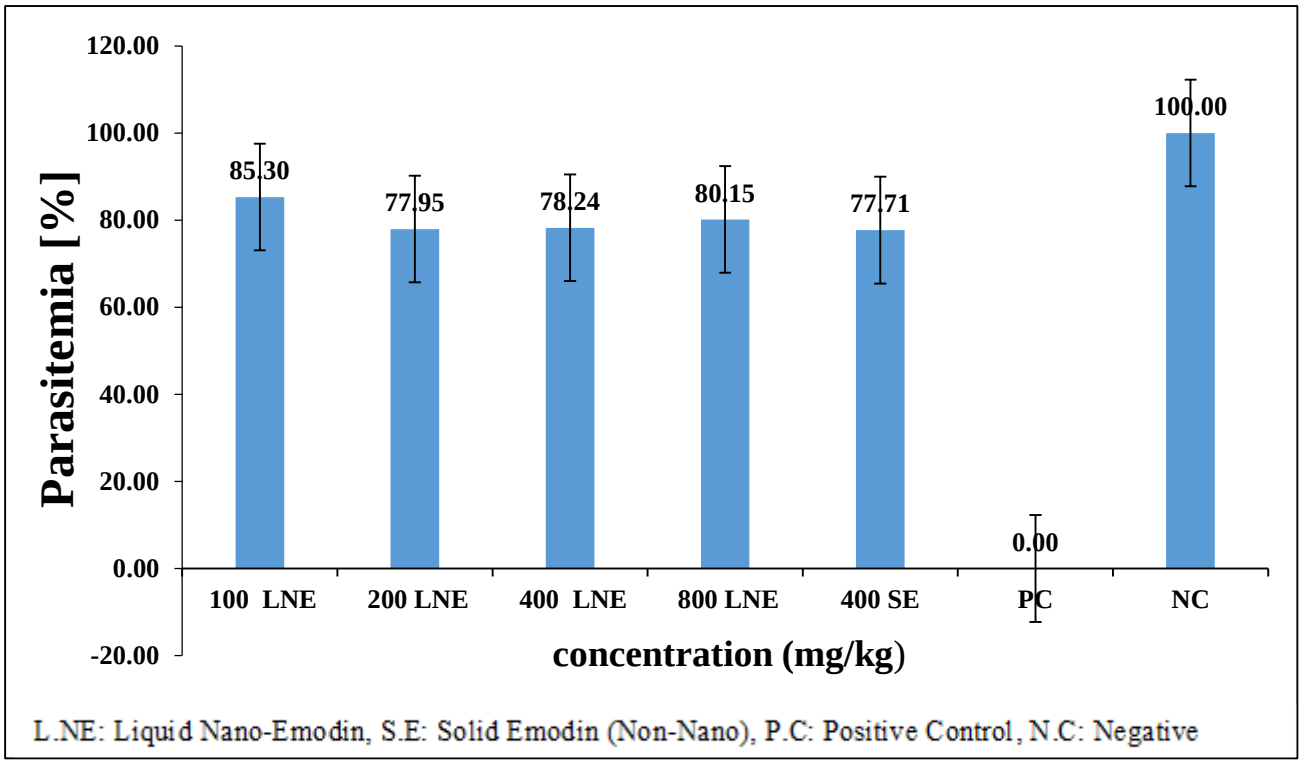
نمودار ۴-۴: تعیین ED50 عصاره امودین در پارازیتمی روز D4

۴-۴. یافته های مربوط به نمودارهای مقایسه ای میزان پارازیتمی و در صد ممانعت از رشد در روز D7

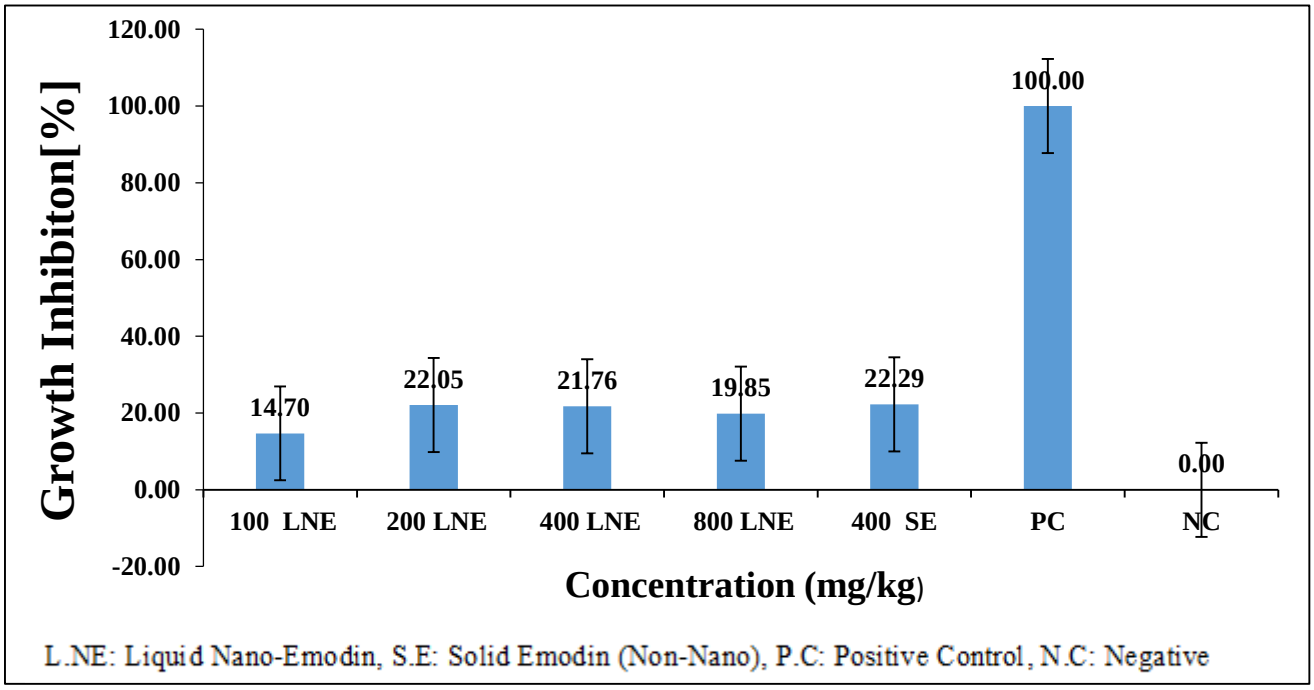
مطابق نمودارهای (شماره ۴-۴ و ۴-۵)، در روز D7 :

- ✓ گروه اول شامل موش هایی است که با غلظت ۱۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۸۵/۳٪ و درصد ممانعت از رشد ۱۴/۷۰٪ می باشد.
- ✓ گروه دوم شامل موش هایی است که با غلظت ۲۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۷۷/۹۵٪ و درصد ممانعت از رشد ۲۲/۰۵ ٪می باشد.
- ✓ گروه سوم شامل موش هایی است که با غلظت ۴۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۷۸/۲۴ ٪ و درصد ممانعت از رشد ۲۱/۷۶ ٪ می باشد.
- ✓ گروه چهارم شامل موش هایی است که با غلظت ۸۰۰mg/kg از داروی نانوامودین مایع درمان شده اندکه میزان پارازیتمی ۸۰/۱۵٪ و درصد ممانعت از رشد ۱۹/۸۵٪ می باشد.
- ✓ گروه پنجم شامل موش هایی است که با غلظت ۴۰۰mg/kg از داروی امودین جامد و غیر نانو درمان شده اند که میزان پارازیتمی ۷۷/۷۱٪ و درصد ممانعت از رشد ۲۲/۲۹٪ می باشد.
- ✓ گروه ششم کنترل مثبت شامل موش هایی است که با غلظت ۲۰ mg/kg با داروی کلروکین درمان شده اند و متوسط میزان پارازیتمی ۰٪ و درصد ممانعت از رشد ۱۰۰٪ می باشد.

✓ گروه هفتم شامل موش هایی است که بدون درمان اند (پلاسیبو) و متوسط میزان پارازیتمی ۱۰۰٪ و درصد ممانعت از رشد ۰٪ درصد می باشد.



نمودار ۴-۵: میزان درصد پارازیتمی در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D7



نمودار ۴-۶: میزان درصد ممانعت از رشد در موش های تحت درمان با غلظت های مختلف عصاره امودین در روز D7

علاوه بر آزمون های فوق، برای میزان پارازیتمی روزهای D4 و D7 و وزن موش های مورد مطالعه قبل و بعد از درمان، میانگین و انحراف معیار برای ۵ گروه درمانی به صورت کلی و جدا ارزیابی و هر یک به طور مجزا با گروه شاهد بدون در مان (پلاسیبو) مقایسه گردید، که برای وزن موش ها در قبل درمان به ترتیب میانگین ۱۸/۹۶ درصد و انحراف معیار۴/۶۲ درصد و بعد درمان ۲۰درصد و ۴/۴۰درصد بدست آمد که گروه های آلوده شده کاهش وزن و گروه شاهد افزایش وزن را داشته اند. همچنین نتایج پارازیتمی در دو روز فوق در جدول (شماره۴-۳) ، نشان داده شده است.

جدول ۴-۳: میانگین و انحراف معیار اندازه گیری شده در میزان پارازیتمی روزهای D4 و D7

	درصد پارازیتمی در D4 (۵ گروه درمانی)	گروه درمانی شاهد (پلاسیبو) در D4	درصد پارازیتمی در D7 (۵گروه درمانی)	گروه درمانی شاهد (پلاسیبو) در D7
میانگین	٪ ۶/۴	٪ ۱۳	٪ ۲۶/۹	٪۳۴
SD	٪ ۲/۸	٪ ۲/۴	٪۶/۱	٪ ۷/۵

۴-۵. تست سمیت دارو (سایتوتوکسیستی)

درگروه سایتوتوکسیسیتی که بمدت ۱۴ روز تحت درمان با دو برابر بالاترین دوز دارو قرار گرفتند بطور مرتب موش ها از لحاظ اسهال، کاهش وزن، شفافیت و تیرگی چشم، نکروز درمحل تزریق و مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند که هیچ مورد مشکوکی و یا منفی مشاهده نشد. همچنین چنانکه قبلا اشاره شد طی بررسی های تکمیلی، موشها در پایان کار (پس از ۴ روز) تشریح شدند که اندازه گیری سایز کبد ، طحال و آنزیم های کبدی موش ها نشان داد که تغییر قابل ملاحظه ای نسبت به گروه های شاهد (نرمال) نداشتند و سمیت دارو از هر لحاظ منقضی گردید.

۴-۶. یافته های مربوط به بررسی اندازه کبد در موش های مورد مطالعه

با توجه به اینکه اندازه نرمال اندازه کبد در موش های نژاد Balb/c در جنس نر بالغ بین (mm) ۱/۸ ± ۲۵ می باشد، مطابق (جدول ۴-۶) میانگین های بدست آمده نیز کاملا قابل تفسیر است و نتایج حاصل از مقایسه میانگین های طول کبد های اندازه گیری شده نشان میدهد که اختلاف بین میانگین ها بی معنی است (p-value = ۰/۲۳۶) پس آزمون One -Way Anova نشان داد که عصاره امودین در غلظت های مختلف، از نظر سایتوتوکسیستی روی کبد موش ها اثر ندارد، همچنین با مقایسه تغییرات اندازه ی کبد به ویژه در گروه های سایتوتوکسیسیتی با گروه پلاسیبو و گروه کلروکین و گروه شاهد بدون هیچ گونه درمان (Null)، نیز میتوان به

این نتیجه رسید که عصاره بدون اثر سمی روی کبد موش است. (در این تست سطح معنی داری بیشتر از ۰/۰۵ یا P-value > ۰/۰۵ بی معنی تلقی می شود.)

جدول ۴-۴: نتایج آزمون One -Way Anova در مقایسه اندازه کبد موش ها

مقایسه اندازه کبد موش ها	SD ± میانگین (٪)	P-value
نام گروه ها	Liver Size (mm)	
سایتوتوکسیسیتی	۲۴/۶ ± ۳/۲	۰/۲۳۶
کنترل منفی (پلاسیبو)	۲۴/ ۲ ± ۳/۸	
کلروکین	۲۲/۲ ± ۱/۹	
شاهد بدون درمان (Null)	۲۱/ ۸ ± ۱/۳	

۴-۷. نتایج آزمون Post-Hoc برای اندازه کبد موش ها

مطابق جدول ۴-۷، آزمون Post-Hoc که برای مقایسه اندازه کبد موش ها بر روی گروه های کلروکین (گروه ۶)، درمان شده با پلاسیبو (گروه ۷)، سایتوتوکسیسیتی (گروه ۸) و شاهد بدون درمان (گروه ۹) انجام شد، نشان داد که اختلاف معنی داری نیز بین این گروه ها وجود ندارد و با این نتیجه که عصاره امودین، سایز کبد موش ها را تغییر نداده است، مطابقت دارد. این آزمون تایید میکند که عصاره مزبور اثر سمی برکبد موش نداشته و چنانچه به عنوان یک دارو بتواند مورد استفاده قرار گیرد ایمن می باشد. با توجه به اینکه P-value > ۰/۰۵ است، پس معنی دار نمیباشد.

جدول ۴-۵: مقایسه اندازه کبد موش ها با استفاده از آزمون Post Hoc

گروه های مقایسه شده	P-value			
	گروه ۶ (کلروکین)	گروه ۷ (پلاسیبو)	گروه ۸(سایتوتوکسیسیتی)	گروه ۹ (شاهد بدون درمان)
گروه ۶		۰/۹۷	۱	۱
گروه ۷	۰/۹۷		۱	۰/۶۵
گروه ۸	۱	۱		۰/۸۰
گروه ۹	۱	۰/۶۵	۰/۸۰	

۴–۸. یافته های مربوط به بررسی اندازه طحال موش های مورد مطالعه

جهت مقایسه میانگین طحال موش ها به دلیل اینکه توزیع اش در آزمون K-S نرمال نبود از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد و با توجه به اینکه اندازه نرمال طحال در موش های نژاد Balb/c در جنس نر بالغ (۱۸ گرمی) حدود (mm) ۱/۶ ± ۷ می باشد، نتایج آن در (جدول ۴-۸) مطرح شده است، که نشان میدهد میانگین در گروه سایتوتوکسیتی ۱۳/۲ درصد، گروه کنترل منفی (پلاسیبو) ۱۰/۵ درصد، گروه کلروکین ۱۰/۵ درصد وگروه شاهد بدون درمان (Null) ۹ درصد شده است. طبق نتایج آزمونK.W ، اختلاف میانگین ها از نظر آماری بی معنی است چرا که مقدار۰/۰۵< P-value است و از طرفی با مقایسه میانگین گروه سایتوکسیسیتی با گروه کلروکین، گروه شاهد بدون درمان (Null) و گروه درمان شده (با پلاسیبو) ، از آنجایی که میانگین سایز طحال ها به هم نزدیک بوده و تفاوت زیادی ندارند پس بیان گر این امر میباشد که عصاره امودین از نظر سایتوتوکسیسیتی روی طحال موش ها اثر سمی ندارد. (در این تست P-value بیشتر از ۰/۰۵ بی معنی تلقی می شود.)

جدول ۴ ۸: نتایج آزمون Kruskal-Wallis در مقایسه اندازه طحال موش ها

نام گروه ها	متوسط رتبه (%)Mean Rank	نتیجه آزمون K-w		
		ملاک آزمون (Chi-square)	درجه آزادی (df)	P-value
سایتوتوکسیسیتی	**۱۳/۲**	**۲/۲۹۳**	**۳**	**۰/۵۱۴**
پلاسیبو	**۱۰/۵**			
کلروکین	**۱۰/۵**			
شاهد بدون درمان (Null)	**۹**			

۴–۹. یافته های مربوط به بررسی اندازه آنزیم های کبدی موش های مورد مطالعه

بررسی آنزیم های کبدی در موش های تحت مطالعه نشان داد که درمان با امودین اثری بر روی آنزیم های کبدی نداشته است. همچنان که در جدول (شماره ۴-۹)، مقدار P-value بالای ۰/۰۵ است، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار در میزان آنزیم های کبدی است، همچنین با مقایسه گروه سایتوکسیسیتی با گروه شاهد بدون درمان وگروه درمان شده با پلاسیبو وگروه کلروکین، اختلاف معنا داری بین آنها وجود ندارد و نشان میدهد که عصاره امودین از نظر سایتوتوکسیسیتی نیز روی آنزیم های کبدی موش ها اثر سمی ندارد و منجر به تغییر رنج نرمال آنها نشده است.

جدول ۴-۶: نتایج آزمون One -Way Anova برای مقدار آنزیم های کبدی موش ها

مقایسه میزان آنزیم	SD ± میانگین (٪)				P-value
	شاهد بدون درمان	سایتوتوکسیسیتی	کلروکین	پلاسیبو	
AST	۱/۴۱ ±۷/۸۳	۱/۳۳ ±۸ /۵۴	۱/۴۸±۳۲/۲۰	۱/۳۹ ±۳/۴۶	۰/۲۴۸
ALT	۷۱/۶ ± ۶/۹۵	۶۰/۱۶ ±۱۳/۵۵	۷۳/۸۰±۱۶/۱۴	۶۸/۱۴ ±۵/۶۶	۰/۲۸۸
ALP	۸/۲۴ ±۱۸/۵۷	۸/۲۴± ۸/۳۴	۸/۴۶ ±۳۹/۵۴	۸/۱۵ ±۵/۹۲	۰/۱۹۲

۴–۱۰. نتایج آزمون Post-Hoc برای آنزیم های کبدی موش ها

مطابق جدول ۱۰-۴، نتایج حاصل از آزمون **Post-Hoc** ، جهت مقایسه دو به دو میانگین آنزیم های کبدی، نشان میدهد که در مجموع اختلاف معناداری بین گروه سایتوتوکسیسیتی(گروه ۸) با گروه شاهد(پلاسیبو یا گروه ۷) وجود ندارد، از طرفی با اندازه سایز طول کبد و طحال که تغییر نکردند نیز هماهنگی و مطابقت دارد. طبق جدول ۴-۱۰، گروه ۶ (کلروکین)، گروه ۷ (پلاسیبو)، گروه ۸(سایتوتوکسیسیتی) وگروه ۹ (شاهد بدون درمان) میباشد.

جدول ۴-۷: نتایج آزمون Post Hoc در آنزیم های کبد موش ها

گروه های مقایسه شده	P-value در گروه ها ی آنزیم های کبدی											
	ALT				AST				ALP			
	۶	۷	۸	۹	۶	۷	۸	۹	۶	۷	۸	۹
۶		۱	۱	۰/۷		۱	۱	۱		۱	۰/۸	۱
۷	۱		۱	۱	۱		۱	۱	۱		۰/۲	۱
۸	۱	۱		۰/۴	۱	۱		۰/۳	۰/۸	۰/۲		۰/۸
۹	۰/۷	۱	۰/۴		۱	۱	۰/۳		۱	۱	۰/۸	

۴–۱۱. بررسی اثر همولایزیس داروی امودین بر روی RBC های خونی انسانی

میزان همولایز RBC انسانی با غلظت ۱۰۰mg/kg، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ از امودین مایع نانو وmg/kg ۴۰۰ از امودین جامد غیر نانو تعیین شد.

درگروه کنترل مثبت، میزان همولایز RBC انسانی با اب مقطر(کنترل مثبت)٪۱۰۰ می باشد.

درگروه کنترل منفی، میزان همولایز RBC انسانی با PBS (کنترل منفی) ٪۰ شد.

نتیجه اثرغلظت های مختلف عصاره امودین روی خون انسان، لیز آن بود و این تست دوبار تکرار شد و هر بار نتیجه لیز مشاهده گردید.

۵. فصل پنجم – بحث و نتیجه گیری

۵-۱. بحث

مقاومت دارویی در سالیان اخیر مشکلات عدیده ای در درمان مالاریا پدید آورده و بزرگترین چالش در مبارزه علیه مالاریا بوده است. مقاومت دارویی در مالاریا یعنی توانایی سویه ی انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت هایی از دارو است که به طور معمول انگل های همان نوع پلاسمودیوم را از بین برده و یا از تکثیر آنها جلوگیری می کنند، مقاومت دارویی تحت تاثیر دو عامل قدرت سازگاری پلاسمودیوم و استفاده از داروهای ضد مالاریا در پیشگیری و درمان در مناطق بومی بوجود می آید. افزایش مقاومت انگل نسبت به دارو سبب افزایش مرگ و میر ناشی از مالاریا بخصوص در اطفال بوده است واپیدمی های متعددی به ویژه از مالاریای فالسیپاروم رخ داده است. پلاسمودیوم فالسیپاروم شدیدترین شکل مالاریا را ایجاد می کند و بیشترین میزان پارازیتمی را به همراه دارد. مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم نسبت به کلروکین که سالها با ارزشترین و پر مصرف ترین داروی ضد مالاریا محسوب میشد اکنون در بیشتر نقاط مالاریا خیز دنیا انتشار دارد طبق مطالعاتی که درایران صورت گرفت، این مقاومت از سالها قبل به کشور ایران هم رسیده بود. ازطرفی گزارشات حاکی از مقاومت انگل نسبت به آرتمیزینین و مشتقات آن در شرایط درون تنی که تا مدت زیادی گزارش نشده بود، در حال حاضر از کامبوج و تایلند نیز رو به افزایش است.

از آنجایی که اکثر داروهای شیمیایی دارای اثرات جانبی زیادی می باشند و مقاومت داروئی زیادی از این داروها در نقاط مختلف گزارش شده است و همچنین برخی از این داروها در مادران باردار دارای منع مصرف می باشد، لذا استفاده از داروئی که عوارض جانبی نداشته باشد و همچنین تاثیر ضد انگلی بالایی داشته باشد، ضروری بنظر می رسد. از هزاران سال پیش، گیاهان به صورت سنتی در نقاط مختلف جهان برای درمان مالاریا استفاده می شده اند. یکی از راه های پیشنهادی توسط سازمان بهداشت جهانی، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین بردن انگل می باشد و توصیه بر یافتن پتانسیل های احتمالی گیاهان هرمنطقه است که دارای خاصیت آنتی مالاریایی باشد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان بواسطه اثرات جانبی کم یا هیچ آن‌ها ، دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی ،ارزان و دردسترس تر بودن و کمتر بودن عوارض و عدم ایجاد سمیت سلولی در اثر مصرف زیاد، رو به افزایش می‌باشد، ازطرفی با توجه به ظهور سوشهای پلاسمودیوم فالسیپاروم مقاوم به کلروکین و مشتقات آرتمی سینین در دهه های اخیر، کشورهای در حال توسعه از جمله ایران با مشکلاتی در درمان موارد حاد بیماری مواجه بوده اند. به همین دلیل یافتن داروهای جدید با حداقل عوارض جانبی ضروری به نظر می رسد. استفاده از طب گیاهی علیه تب های مالاریا سابقه ی طولانی دارد، دو گونه از این مواد که از درختان سینکونا و آرتمیزییا آنوآ مشتق شده اند، در مقابل منسوخ شدن ناشی از گذشت زمان، پایداری کرده و مورد استفاده قرارگرفته اند.

نانوذرات به عنوان شکل جدیدی از مواد با خواص بیولوژیکی برجسته وسمیت پایین می باشد که به نظر می رسد پتانسیل بالایی در عبور از سد فیزیولوژیکی بدن جهت دسترسی به بافت خاصی از بدن میباشد. میزان

سمیت آنها نیز بسیار کمتر از میانگین دوز سمی و آسیب حاد کبد است درنتیجه نانوذرات برای هدف قرار دادن سلول های مختلف جهت تحویل دارو یا عوامل ژنتیکی و فاکتورهای تشخیصی بسیار مناسب اند. به همین دلیل در این مطالعه بر ان شدیم تا ضمن استفاده از یک گیاه دارویی موثر بر میکرو ارگانیسم ها از فن اوری نانو نیز بهره برده و اثر تداخلی هر دو را با هم برانگل مالاریا بررسی نماییم.

هدف از این مطالعه، تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه رامنوس کاتارتیکا (Rhamnus Cathartica) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط in vivo بوده است.

با توجه به اینکه در سالهای اخیر رو شهای درمانی با گیاهان تاثیرات چ شمگیری برعفونت های میکروبی و انگلی داشته است، مطالعاتی در نقاط مختلف جهان و ایران نیز درباره ی تاثیر عصاره امودین بر روی انگل ها مثل *ژیاردیا لامبلیا* و همچنین برخی باکتری ها و ویروس ها کشف و آشکار شده است اما اثر ضدمالاریایی آن تاکنون بررسی نشده است.

در بخش یافته ها، با توجه به بررسی نمودار ها و جداول رسم شده بر اساس آزمون های آماری، نشان داده شد که تمام غلظت های عصاره امودین موفق به کاهش میزان درصد پارازیتمی در مقایسه با گروه کنترل که پلاسیبو تزریق شده بود شدند، که از بین آنها، غلظت ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم از نانوامودین مایع وغلظت ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم امودین جامد غیرنانو از بقیه بهتر اثر کرده اند و یا بیشترین درصد ممانعت از رشد انگل را داشته اند.

کاهش پارازیتمی در روز D4 نشانگر این امر میباشد که دارو توانایی سرکوب و یا ممانعت از رشد انگل را دارد و نتایج آزمون one-way Anova در این روز نشان دادکه اختلاف معنی دار بین گروه های موشهای آلوده که با عصاره امودین درمان شده اند با گروه شاهد (پلاسیبو) وجود دارد که نشان دهنده ی موثر بودن دارو بر روی کاهش پارازیتمی می باشد. در این بین گروه درمان شده با عصاره امودین مایع نانو و جامد غیر نانو با غلظت ۴۰۰mg/kg بالاترین اثر بر کاهش پارازیتمی را داشته است.

نتایج شمارش انگل در روز D7 نشان داد که میزان پارازیتمی در این روز مجددا رو به افزایش بوده است، همچنین نتایج آزمون one-way Anova نیز در روز D7 نشان دادکه در هیچ یک از گروهها نمی توان اثر قابل ملاحظه ای بر انگل یافت، در حقیقت با قطع دارو، اثر آن هم به تدریج کاهش یافت بطوریکه در D7 اثرآن مشهود نبود. این افزایش انگل و بی اثر شدن آن در D7 می تواند حاکی از این امر باشد که اثر دارو پس از تجویز آخرین دوز و اعمال اثر آن، به تدریج کاهش یافته است و با کاهش غلظت دارو در بدن موش، مجددا انگل ها ظهور پیدا کرده و رشد یافته اند. شاید این مسئله بیانگر نیمه عمر پایین عصاره دارویی باشد، چنانچه این دارو که ازقبل مصرف دارویی و بدون عارضه داشته است در روزهای طولانی تر وبیش تری مورد استفاده قرار گیرد، احتمال دارد اثرات آن چشمگیرتر باشد. همچنین اگر دارو با کلروکین ترکیب شود شاید بتوان به اثرات شاخص

تری از این عصاره دست یافت. هر چه نیمه عمر یک ماده موثره بیشتر باشد اثر آن در موشهای آلوده پایدار تر خواهد بود، از طرفی از آنجایی که تستهای توکسیسیتی نشان داد که دارو هیچ اثر سمی بر ارگانهای میزبان نداشته اند. پس شاید بتوان با افزایش دوز دارو و یا افزایش روز هایی که میزبان می تواند تحت اثر دارو باشد یافته های بهتر و موثر تری گرفت.

ED50 (Effective dose ۵۰٪) ، یعنی غلظتی از دارو (عصاره امودین) که بتواند ۵۰٪ از انگل ها را در مقایسه با گروه شاهد بدون درمان از بین ببرد یا آن غلظتی از داروکه مانع از رشد۵۰ درصد از انگل ها شود. درمطالعه حاضر ED50 برای عصاره الکلی گیاه امودین تعیین گردید، طبق نمودار ۴-۳ مشخص گردید که غلظت mg/kg۲۲۰ از عصاره امودین می تواند ۵۰ درصد از انگل ها را در میزبان کاهش دهد که ED50 نامیده می شود.

طی بررسی های تکمیلی، موش ها در پایان کار(پس از ۱۴ روز) تشریح شدند. اندازه گیری ارگان های کبد و طحال موش و آنزیم های کبدی در گروه سایتوتوکسیستی که با غلظت mg/kg800 از نانوامودین مایع (۲ برابر بالاترین دوز دارو) مورد آزمایش قرار گرفته بودند، نشان داد که عصاره طی روند درمانی هیچ گونه اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی موش ها نداشته است. درواقع اندازه سایز کبد و طحال و آنزیم های کبدی در گروه سیتوتوکسیسیتی تغییر قابل ملاحظه ای نسبت به گروه شاهد (جامعه نرمال) نداشت و سمیت دارو از هر لحاظ منقضی گردید.

در بررسی اندازه کبد موش ها طی مقایسه گروه سایتوتوکسیسیتی با گروه درمانی کلروکین و گروه مرگ و میر و گروه بدون درمان (پلاسیبو) نشان داد که مصرف عصاره امودین تاثیری روی سایز کبد نداشته است.

در بررسی اندازه طحال موش ها هم، طی مقایسه گروه سایتوتوکسیسیتی با گروه درمانی کلروکین، گروه مرگ ومیر و گروه بدون درمان (پلاسیبو)، عصاره امودین تاثیری روی سایز طحال نیز نداشته است.

مقایسه گروه سایتوتوکسیسیتی با گروه کلروکین و گروه بدون درمان (پلاسیبو) در بررسی آنزیم های کبدی (ALP،ALT،AST) موش های مورد مطالعه، نشان داد که مصرف عصاره امودین تاثیری روی آنزیم های کبدی نداشته اند.

مقایسه ۲ گروه دارویی تجویز شده ۴۰۰ میلیگرم برکیلوگرم نانو مایع و غیر نانو جامد نیز نشان دادکه این دو گروه در کاهش پارازیتمی اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشته اند.(p-value > ۰/۰۵) در نتیجه به نظر میرسد که ایجاد ساختار نانو در دارو نتوانسته به نحوه موثری تاثیر مستقیمی روی دارو داشته باشد.

بررسی همولایزیس عصاره امودین که روی خون انسان انجام شد، نشان داد که RBC های انسان تخت اثر این ماده لیز شده و استفاده از آن باید با احتیاط و یا در غلظت های مورد اطمینان باشد.

از طرفی چون دراین مطالعه عصاره تام دارو مورد استفاده قرار گرفته است نیاز است که فراکشن های مختلف برای بررسی اثرات ضدانگلی و لیز RBC به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرند.

در مطالعه ی کربلایی و همکاران که پیرامون تاثیر عصاره الکلی گیاه درمنه ترکی بر روی پلاسمودیوم برگئی بود، بهترین غلظت درمانی ۱۱۰۰mg/kg گزارش شد که در روز چهارم درمان ۶۷/۷٪ و در روز هفتم ۱۴٪ ممانعت از رشد انگل را نشان داد. داروی استفاده شده طبق گزارش محقق تا روز D7 نیز کاهش ۱۴٪ نشان داد، به نظر میرسد که این دارو نسبت به امودین دارای اثر طولانی تری در بدن میزبان بوده است. از طرفی غلظت های بالاتر دارو دارای اثرات سمی برای موش بوده در حالی در مطالعه حاضر اثرات سمی در هیچ کدام از غلظت های دارویی مشاهده نشد.

Chabra و همکارانش در سال ۲۰۱۹ اثر امودین وکیتوسان، نانو کیتوسان را در شرایط آزمایشگاهی بر روی انگل *ژیاردیا لامبلیا* مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل نشان داده است که داروهای مورد بررسی در مقایسه با گروه کنترل اثرات قابل قبولی بر روی کیست و تروفوزوئیت انگل *ژیاردیا لامبلیا* داشته اند. همچنین نتایج نشان داده است که داروی امودین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانسته است ۱۰۰ درصد انگل *ژیاردیا لامبلیا* را بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه از بین ببرد. مطالعه فوق در محیط in-vitro انجام شده اما در مطالعه حا ضر داروی امودین در محیط in-vivo و در موش آزمایش شده ا ست و همین غلظت ها اعمال گردید که تمامی غلظت ها به ویزه غلظت mg/kg ۴۰۰ از نانوامودین مایع و جامد بهترین اثر را در روز D4 روی انگل پلا سمودیوم برگئی دا شتند. اثرک شندگی امودین روی ژیاردیا خواص ضد انگلی ان را ا شکار میسازد. در عین حال ممکن ا ست که دارو بر حسب نوع انگل مکانیزم اثر خا صی اعمال کند که این مسئله نیازمند پژوهش های بیشتری در این زمینه میباشد.

متولی حقی و همکاران (۲۰۰۳) اثر عصاره الکلی اسپند را برروی پلاسمودیوم برگئی در موش سوری مطالعه کردند وغلظت ۱۰۰mg/kg از آن را به عنوان موثر ترین غلظت بر روی انگل معرفی نمودند طبق گزارش مذکور گرچه عصاره الکلی اسپند در غلظت های بالاتر ازmg/kg ۱۰۰ دارای اثر کشندگی زیادی بر روی انگل بود، اثرات سمی فراوان نیز بر روی میزبان داشت بنابر این غلظت ۱۰۰mg/kg به عنوان بهترین غلظت در نظر گرفته شد. در این مطالعه عصاره اسپند در روزچهارم و هفتم به ترتیب ۷٪ و۴۸٪ ممانعت از رشد داشته اند. مقایسه این دارو با امودین نشان می دهد که عصاره ا سپند هر چند نیمه عمر بیشتر واثر طولانی تری در بدن میزبان دارد، اما عصاره امودین سریعتر میزان پارازیتمی را کاهش میدهد به طوریکه در روز D4 میزان ۶۹/ ۶۷ ٪ ممانعت از رشد مشهود بود. همچنین چون دارو سمی نیست میتوان دوز دارو را افزایش داد مثلا زمان طولانی تر ویا تعداد دفعات بیشتر از دارو استفاده نمود یا به صورت ترکیبی با کلروکین پس از تخلیص و شناسایی فراکشن های موثره استفاده کرد.

درمطالعه خدادادی و همکاران که بر روی تاثیر عصاره الکلی گیاه درمنه کوهی بر روی پلاسمودیوم برگئی انجام شد، غلظت ۱۰۰۰mg/kg بهترین غلظت در کاهش پارازیتمی در موش بوده است در صورتی که در غلظت های بالاتر میزان ممانعت از رشد بیشتر است ولی اثرات سمی در این غلظت ها مشهود بوده است پس

بهترین غلظت برای درمان غلظت ۱۰۰۰mg/kg می باشد. اما در مطالعه حاضر نه تنها تمام غلظت ها در روند درمان موثر بودند بلکه غلظت های ۴۰۰ mg/kg از نانوامودین مایع و جامد غیر نانو بهترین اثر را داشتند و از طرفی عصاره امودین بر خلاف عصاره درمنه کوهی هیچ گونه اثر سمی بر میزبان نداشته است.

Batista و همکاران درسال ۲۰۱۸ از عصاره Emodin برروی ویروس زیکا استفاده کردند. اثرات ضد ویروسی بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اثرعفونت زایی ویروس زیکا با ۴۰ میکرولیتر از امودین درحدود ۸۳/۳٪ کاهش داشته است. درنتیجه امودین دارای قدرت ویروس کشی قوی یرای ویروس زیکا هست. در مطالعه حاضر نیز عصاره امودین در غلظت های ۴۰۰ میکرو گرم برکیلوگرم در دو حالت نانو مایع و جامد غیر نانو روی انگل پلاسمودیوم برگئی موثرتر بوده است. به نظر میرسد که مکانیزم نحوه تاثیر دارو روی ویروس ها با انگل ها به دلیل تفاوت در ساختمان میکروارگانیسم ها میتواند متفاوت باشد زیرا مطالعه Batista بر روی ویروس واز نوع in-vitro و مطالعه حاضر بر روی انگل و از نوع in-vivo بوده است و در هر دو اثر درمانی نیز مشهود بوده است.

ناطق پور و همکاران درسال(۲۰۱۶) اثر عصاره الکلی وفراکسیون های زعفران در درمان مالاریا ناشی از *پلاسمودیوم برگئی* برروی موش های سوری در مقایسه با کلروکین را بررسی کردند، کلروکین به عنوان یک داروی استاندارد توانست میزان درصد پارازیتمی در موش ها در روزهای D4 وD7 به صفر برساند. غلظت ۷۰۰ mg/kg از عصاره اتیل استاتی و غلظت های ۳۵۰ mg/kg و۷۰۰ از عصاره آبی گیاه ، درروز هفتم به طورمعنی داری میزان پارازیتمی انگل پلاسمودیوم برگئی درموشهای تحت مطالعه درمقایسه با گروه های کنترل را کاهش داده است ($p<0/05$). کاهش سمیت عصاره های زعفران امکان مصرف آن در دوزهای بالاتر نسبت به سایر گیاهان را فراهم میکند. بنا به گزارش نویسندگان اگرچه خاصیت ضدانگلی عصاره زعفران در مقایسه با داروی کلروکین بر روی انگل یاد شده کمتر بوده اما می توان ازآن به عنوان داروی مکمل استفاده کرد تا نتایج بهتری درکاهش میزان پارازیتمی وافزایش طول عمر موش ها داشته باشد. در مطالعه حاضر، غلظت های مختلف امودین جامد و مایع نانوشده در روزD4 منجر به کاهش پارازیتمی شدند. و با آزمون های آماری در مقایسه با گروه کنترل (شاهد) نیز دارای اختلاف معنی داری از نظر درصد کاهش پارازیتمی بودند.($p<0/05$). هر چند داروی حاضر در مقایسه با کلروکین اثر پایدارتری نداشته است و میتواند مشابه عصاره زعفران به صورت مکمل مصرف شود، همچنین از نظر سمیت، غلظت های به کار برده شده از عصاره امودین دارای اثر سمی نبودند.

حیدریان و همکاران، در سال ۲۰۱۸ به برر سی اثربخ شی ع صاره اتانولی گیاه *Curcuma longa* ، به طور پراکنده و در ترکیب با کلروکین در مقابل سویه های حساس *Plasmodium berghei* به کلروکین پرداختند. این تحقیق نشـــان داد که نتایج ED50 برای کلروکین وزC. Longa به ترتیب ۱۲۵۰,۱/۴mg/kgبود، ترکیب عصاره اتانولی C.longa با کلروکین به نسبت ۸۰/۲۰ بیشترین فعالیت را با درصد ۷۱/٪۷۵ جهت مهار رشد

پلا سمودیوم برگئی دا شت که ن شان داد دارای واکنش سینرژیک در روش درمانی ترکیبی ا ست. در مطالعه حیدریان غلظت mg/kg ۱۲۵۰به عنوان ED50 برای عصاره کورکوما لونگا در نظر گرفته شد، در حالیکه در مطالعه حا ضر ع صاره امودین در غلظت های پایین تر (mg/kg ۲۲۰) تواند ست همان اثر را برانگل اعمال کند وسبب کاهش ۵۰% پارازیتمی در میزان گردد.

Verónica I. Dumit و همکارانش در سال ۲۰۱۷ ن شان دادند که آنتروکوئینون امودین دارای خواص ضد سرطانی ا ست و ن شان دادند که سلول ها با کارایی متابولیسم تنفسی کمتر حساس به امودین هستند، در حالی که سلول های تحت متابولیسم گلیکولیتیک به این ترکیب آ سیب پذیرتر ا ست. یافته های آنها ن شان داد که امودین با نقش م شابه از زنجیره انتقال اکترونی میتوکندری باعث ا سترس اکسیداتیو و مختل کردن سلول های سرطانی میشود. امودین دارای اثر مضربرروی سلولهای سرطانی درمحیط کشت است، در حالی که سلول های سالم ظاهرا بی تاثیرازاین ترکیب قرارمیگیرند. آنها پا سخ اولیه سلول های نرمال فیبروبلا ست پو ست ان سانی (NHF)، سلول های نرمال کراتینو سیت ان سانی (NHK(MCF7، A549, CaCo-2 و HeLa cells، جدا شده ازسلولهای سرطانی سینه ، ریه ،روده بزرگ و رحم بودند به امودین را ارزیابی کردند و درمطالعه حاضر هم با اعمال دوبرابر از بیشترین غلظت امودین بر کبد و طحال و آنزیم های کبد موش نشان داد که هیچ اثر سمی بر آنها ندارد و بیانگر ایمن و قابل استفاده بودن عصاره بر روی ارگان های داخلی می باشد.

۵-۲. نتیجه گیری

نتایج آزمون های آماری نشان داد که بین گروه های موش های آلوده به پلاسمودیوم برگئی و درمان شده با عصاره دارویی امودین در غلظت های مختلف در مقایسه با گروه شاهد (موشهای آلوده که پلاسیبو دریافت کرده اند) در میزان پارازیتمی برای روز D4 تفاوت معنی دار وجود دارد. در روز D7 مقایسه گروههای دارو گرفته با گروه شاهد بدون دارو نشان داد که تفاوت معنی دار در میزان پارازیتمی وجود ندارد. عصاره امودین در تمام غلظت های مورد بررسی به طور قابل توجهی موثر بوده است و دراین بین نیز غلظت های mg/kg ۴۰۰ از امودین مایع نانو وmg/kg ۴۰۰ از امودین جامد غیر نانو بهتر اثر کرده است و ضمنا بین خود این دو عصاره تفاوت معنی داری در کاهش انگل مشاهده نشده است . تاثیر دارو احتمالا به دلیل نیمه عمر کوتاهش بسرعت از بین میرود اما از انجاییکه عصاره امودین کاملا ایمن بوده، بدلیل عدم سمی بودن و عدم عوارض جانبی، می تواند در مدت زمان طولانی تر و در دوزهای بیشتر و یا به دفعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد. به طور کلی مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره امودین چه به صورت مایع و نانو شده و چه به صورت جامد دارای اثر درمانی بر روی موش های Balb/c مبتلا به پلاسمودیوم برگئی می باشد. این عصاره در مقایسه با کلروکین نیز به تنهایی باعث از بین رفتن کامل انگل نمیشود اما دارای اثر سمی روی ارگان های داخلی میزبان نیست و روی آنزیم کبدی نیز اثر ندارد.

۵-۳. پیشنهادات

۱- بررسی اثر درمانی عصاره امودین با افزایش غلظت آن و بصورت کامبینیشن با کلروکین.

۲- جداسازی فراکشن های مختلف عصاره و بررسی جداگانه انها به منظور حذف عوامل مزاحم (مانند اثر همولایتکی) و خالص سازی عوامل موثره.

فهرست منابع (References)

۱. Abdolahi. A SV, Hanifepour. H, & other colleagues., . Malaria book, 1395. First Edition.

۲. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges,2020.

.۳ Organization WH. Access to antimalarial medicines: improving the affordability and financing of artemisinin-based combination therapies. World Health Organization; 2003.

.٤ Wilson RJ WD, Preiser P. . Malaria and other Apicomplexans : the plant connection. Infect Agents Dis. 1994.

۵. ادریسیان. غ ح. تک یاخته شناسی پزشکی. ۲۰۲۰.

.٦ Ghalib H, Al-Ghamdi S, Akood M, Haridi A, Ageel A, Abdalla R. Therapeutic efficacy of chloroquine against uncomplicated, Plasmodium falciparum malaria in south-western Saudi Arabia. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2001;95(8):773-9.

۷. رییسی احمد, فرجی لیلا, رنجبر لیلا, صائبی اسماعیل, نبوی محمود, کشاورز حسین, et al. نگرشی به وضعیت مالاریای کشور در آستانه آغاز برنامه حذف مالاریا. (۲۰۰۶).

.۸ Powell RD. Essential Malariology. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1986;35(3):672.

۹. ادوارد ک. مارکل , تی.جان , وج ساچی آ.کروتسکی. انگل‌شناسی پزشکی مارکل. ۲۰۲۰.

.۱۰ Zakeri S, Gil JP, Bereckzy S, Djadid ND, Bjorkman A. High prevalence of double Plasmodium falciparum dhfr mutations at codons 108 and 59 in the Sistan-Baluchistan province, Iran. The Journal of infectious diseases. 2003;187(11):1828-9.

۱۱. متولی حقی افسانه، دلاوری محمد، ناطق پور مهدی، شکاری محمد،et al . وضعیت مالاریای بدون علائم بالینی در شهرستان مالاریا خیز جاسک از استان هرمزگان. فصلنامه دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی. ۲۰۱۵;۱۳(۲):۹۵-۱۰۳.

.۱۲ Momenfam F, Nateghpour M, Haghi AM, Farivar L, Mohebali M, Hajjaran H, et al. Interaction between Chitosan and Chloroquine against Plasmodium berghei and P. falciparum Using In-Vivo and In-Vitro Tests. Iranian Journal of Parasitology. 2021;16(2).

۱۳. رحمانی خالد، مرادی قباد، خادم عرفان محمد باقر، فرجی لیلا، et al. نظام مراقبت مالاریا در جمهوری اسلامی ایران: تاریخچه، ساختارها و دست‌آوردها. مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران. ۲۰۲۰;۱۵(۴):۳۱۳-۲۲.

.۱٤ EDRISIAN GH. Malaria in Iran: Past and present situation. 2006.

۱۵. پودات عباس, لدنی حسین, رییسی احمد. فاکتورهای احتمالی موثر بر وضعیت و بروز مالاریا در شهرستان بندرعباس طی سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷۷.

۱۶. http://www.Wikimedia.com Malaria [Internet]. 2014.

۱۷. Nateghpour M, Farivar L, Souri E, Hajjaran H, Mohebali M, Haghi AM. The effect of Otostegia persica in combination with chloroquine on chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of plasmodium berghei using in-vivo fixed ratios method. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2012;11(2):583.

۱۸. Gilles HM. Protozoal diseases: Arnold; 1999.

۱۹. https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html [Internet].

۲۰. Klein E. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. International journal of antimicrobial agents. 2013;41(4):311-7.

۲۱. Bolboli. B. Educational booklets, 96-97.

۲۲. Markel EK VM, John D I. . Medical Parasitology1992.

۲۳. صائبی اسماعیل. بیماریهای انگلی در ایران ۱۳۸۹.

۲۴. Farooq U MRC. Drug resistance in malaria.J. Vect. Born Dis. 2004;41.۵۳-٤٥:

۲۵. حامدی،یعقوب. مقاومت دارویی مالاریا در ایران. مجله پزشکی هرمزگان سال دهم. ۱۳۸۵;۹۳-۹۹.

۲۶. DTJ W. Nanoparticle. International Journal of Nanomedicine, 2011.

۲۷. ۱۷۱-۱٦٦WWE. Drug resistance malaria. 1994.

۲۸. Endirssian Gh NM, Afshar A, Sayedzadeh A, Mohsseni Gh, Satvat MT, Emadi AM. Monitoring the response of plasmodium falciparum and Vivax to antimalarial drugs in the malariuos areas in sout-east Iran. 1999;Arch.I.M.2(2):61-6.

۲۹. Bradley, 1996: Titus Bradley; "History and Distribution"; Department of Microbiology and Immunology, University of Leicester, 1996.

۳۰. WHO/CDS/RBM.338-46. The use of antimalaria drugs, Report of a WHO Informal Consulation, November. 2001.

۳۱. متولی حقی افسانه، ناطق پور مهدی، ادریسیان غلامحسین، et al. بررسی اثر الکلی دانه اسپند بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش سوری و مقایسه آن با اثر کلروکین [پایان نامه]. دانشکده بهداشت: دانشگاه علوم پزشکی تهران; ۸۲-۱۳۸۱.

۳۲. صائبی اسماعیل و همکاران. راهنمای درمان مالاریا در جمهوری اسلامی ایران ویرایش سوم وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی،مرکز مدیریت بیماری ها، اداره کنترل مالاریا، نشر صدرا، تهران. ۱۳۸۸

۳۳. Heydarian P, Nateghpour M, Mazhari N, Motevalli Haghi A, Farivar L, Souri E, et al. Evaluation of Effectiveness of Ethanolic Extract of Curcuma longa, discretely and in

Combination with Chloroquine against Chloroquine-Sensitive Strain of Plasmodium berghei. Herbal Medicines Journal. 2019;3(4):133-8.

.٣٤ zhaki I. Emodin–a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. New Phytologist. 2002;155(2):205-17.

.٣٥ Vogel A. "Anthraquinone", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry,. Weinheim: Wiley-VCH,. 2005.

.٣٦ Chabra A, Rahimi-Esboei B, Habibi E, Monadi T, Azadbakht M, Elmi T, et al. Effects of some natural products from fungal and herbal sources on Giardia lamblia in vivo. Parasitology. 2019;146(9):1188-98.

.٣٧ نقش نوشین, ابوطالبی فاطمه, سیچانی ک سمیرا. طراحی یک نانو ترکیب گیاهی جدید از کدوحلوایی برای ترمیم سوختگی پوست در موش‌های سوری نر از نژاد آلبینو: یک شیوه جدید نانو برای ترمیم پوست. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. ۲۰۱۳;۳(۱):۲۷-۳۳.

.٣٨ www.wikipedia.org. Ramnus katartica.

.٣٩ Phanouvong S, Raymond C, Krech L, Dijiba Y, Mam B, Lukulay P, et al. The quality of antimalarial medicines in western Cambodia: a case study along the Thai-Cambodian border. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013;44(3):349-62.

.٤٠ Willcox ML, Bodeker G. Traditional herbal medicines for malaria. Bmj. 2004;329(7475):1156-9.

.٤١ Pourhajibagher M, Rahimi-Esboei B, Ahmadi H, Bahador A. The anti-biofilm capability of nano-emodin-mediated sonodynamic therapy on multi-species biofilms produced by burn wound bacterial strains. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2021;34:102288.

.۴۲ ناصریان فرزانه، حشمتی فاطمه ، مهدی‌زاده عمرانی مریم، et al. مروری بر نانوذرات و کاربرد آن‌ها در انتقال دارو در بیماری سرطان: مقاله مروری. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۲۰۱۸;۷۶(۴):۲۲۱-۳۰.

.۴۳ علمی طاهر, غلامی, شیرزاد, فخار, عزیزی, et al. مروری بر استفاده از نانو ذرات در درمان عفونت های انگلی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران.۲۳(۱۰۲):۱۲۶-۳۳.

.۴۴ مبینی, مسعود, حیدری اصغر. بررسی اثر هم افزایی نانوذرات نقره با اسانس برگ گیاه اکالیپتوس علیه سودوموناس آئروژینوزا. نوید نو. ۲۰۱۶;۱۹(۶۲):۵۴-۶۱.

.۴۵ قربانی پریسا، حمیدی علمداری, داریوش نامور, et al. بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانتی نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی میوه سماق به روش سبز. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۲۰۱۶;۲۳(۷):۱۸۱-۹.

.٤٦ MOTEVALI HA, Nateghpour M, EDRISIAN GH, Souri E, Satvat M. EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ETHANOLIC EXTRACT OF PEGANUM HARMALA L. AGAINST PLASMODIUM BERGHEI IN COMPARISON WITH CHLOROQUINE IN SOURIAN MICE USING INVIVO TESTS. 2003.

.٤٧ Mountfield A. Working with animals: the reporters series: George G. Harrap and Company, London; 1980.

.٤٨ Batista MN, Braga ACS, Campos GRF, Souza MM, Matos RPAd, Lopes TZ, et al. Natural products isolated from oriental medicinal herbs inactivate Zika virus. Viruses. 2019;11(1):49.

.٤٩ Dumit VI, Zerbes RM, Kaeser-Pebernard S, Rackiewicz M, Wall MT, Gretzmeier C, et al. Respiratory status determines the effect of emodin on cell viability. Oncotarget. 2017;8(23):37478.

.٥٠ Li L, Song X, Yin Z, Jia R, Li Z, Zhou X, et al. The antibacterial activity and action mechanism of emodin from Polygonum cuspidatum against Haemophilus parasuis in vitro. Microbiological research. 201.45-186:139;6

.٥١ Kumar S, Yadav M, Yadav A, Rohilla P, Yadav JP. Antiplasmodial potential and quantification of aloin and aloe-emodin in Aloe vera collected from different climatic regions of India. BMC complementary and alternative medicine. 2017;17(1.10-1:)

.٥٢ Nateghpour. M GSM, Abedi. S, Peste Chian. N, . Comparison of the effect of alcoholic extract of saffron with chloroquine on plasmodium berghei in mice under condition in vivo. 2016.

.٥٣ Zhang X, Chen Y, Zhang T, Zhang Y. Inhibitory effect of emodin on human hepatoma cell line SMMC-7721 and its mechanism. African health sciences. 2015;15(1):97-100.

.٥٤ Suleman S BTT, Kebebe D, Belew S, Mekonnen Y, Gashe F, et al. . Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia. Journal of Ethnopharmacology. 2018; ;213:262-79.

.٥٥ Chotivanich K, Tripura R, Das D, Yi P, Day NP, Pukrittayakamee S, et al. Laboratory detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(6):31.٦١-٥٧

.٥٦ Huang Y-Q, Huang G-R, Wu M-H, Tang H-Y, Huang Z-S, Zhou X-H, et al. Inhibitory effects of emodin, baicalin, schizandrin and berberine on hefA gene: treatment of Helicobacter pylori-induced multidrug resistance. World Journal of Gastroenterology :WJG. 2015;21(14):4225.

.٥٧ Amraei. k BHR, Mohammadzadeh Haji Pirlo. H, Khashaveh. SH, Abaei. M.R, Edalat. H,. Comparison of the sensitivity of the populations of the important carriers of malaria, Anopheles stephensi to Plasmodium Bergie,. Journal of Health Sciences Jundishapur, Year 4, No 1, Spring 2012. 2012.

.٥٨ Girma S, Giday M, Erko B, Mamo H. Effect of crude leaf extract of Osyris quadripartita on Plasmodium berghei in Swiss albino mice. BMC complementary and alternative medicine. 2015;15(1):184.

.٥٩ Govindan VP, Panduranga AN, Murthy PK. Assessment of in vivo antimalarial activity of arteether and garlic oil combination therapy. Biochemistry and biophysics reports. 2016;5:359-64.

.٦٠ Karbalaei Pazoki Z, Nateghpour M, Maghsood A, Souri E, Haghi AM ,Farivar L, et al. Comparison between the effects of ethanolic extract of Artemisia annua and chloroquine on Plasmodium berghei in white mice. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2014;19(2):9-20.

.٦١ Khodadadi M, Nateghpour M ,Souri E, Farivar L, Haghi AM, Rahimi-Froushani A, et al. Evaluation of effectiveness of ethanolic extract of Artemisia aucheri, individually and in combination with chloroquine, on chloroquine-sensitive strain of Plasmodium berghei in sourian mice. Iranian journal of public health. 2013;42(8):883.

.٦٢ مدرسی مهرداد، گلخنی صفیه، مجلسی مهران. تاثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه برآنزیم ها و بافت کبد در موش کوچک آزمایشگاهی فصلنامه علمی-پژوهشی زیست شناسی جانوری، سال هفتم، شماره دوم، زمستان ۹۳، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان. ۱۳۹۳.

.٦٣ Elmi T, Hajialiani F, Asadi M, Orujzadeh F, Kalantari Hesari A, Rahimi Esboei B, et al. A study on the effect of Zingiber Officinale hydroalcoholic extract on plasmodium berghei in infected mice: an experimental study. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2019;18(4):353-64.

.٦٤ Rashidzadeh H, Tabatabaei Rezaei SJ, Adyani SM, Abazari M, Haghighi SR, Abdollahi H, et al. Recent advances in targeting malaria with nanotechnology-based drug carriers. Pharmaceutical Development and Technology. 2021 (just-accepted):1-40.

.٦٥ Edwin GT, Korsik M, Todd MH. The past, present and future of anti-malarial medicines. Malaria journal. 2019;18(1):1-21.

.٦٦ Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal management and welfare: John Wiley & Sons; 2008.

.٦٧ Jensen JB, Trager W. Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. The Journal of parasitology. 1977:883-6.

.٦٨ Haferlach T, Winkemann M, Loffler H, Schoch R, Gassmann W, Fonatsch C, et al. The abnormal eosinophils are part of the leukemic cell population in acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils (AML M4Eo) and carry the pericentric inversion 16: a combination of May-Grunwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization. 1996.

.٦٩ Legesse M, Erko B, Balcha F. Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in Schistosoma mansoni and Plasmodium berghei co-infected mice. Acta tropica. 2004;91(2):161-6.

.٧٠ Ajaiyeoba E, Abalogu U, Krebs H, Oduola A. In vivo antimalarial activities of Quassia amara and Quassia undulata plant extracts in mice. Journal of Ethnopharmacology. 1999;67(3):321-5.

.٧١ Izhaki I. Emodin–a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. New Phytologist. 2002;155(2):217-05.

.٧٢ Fievet CJ, Gigandet MP, Ansel HC. Hemolysis of erythrocytes by primary pharmacologic agents. American journal of hospital pharmacy. 1971;28(12):961-6.

.٧٣ Evans BC, Nelson CE, Shann SY, Beavers KR, Kim AJ, Li H, et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2013(73):e50166.

.٧٤ Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munoz V, Ruiz G, Sauvain M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. Journal of Ethnopharmacology. 2001;77(1):91-8.

.٧٥ Panda S, Rout JR, Pati P, Ranjit M, Sahoo SL. Antimalarial activity of Artemisia nilagirica against Plasmodium falciparum. Journal of parasitic diseases. 2018;42(1):22-7.

تاییدیه استاد راهنما مبنی بر آمادگی دانشجو برای دفاع از پایان نامه

مدیر محترم گروه

به اطلاع میرساند پایان نامه خانم فاطمه بیات دانشجوی مقطع : کارشناسی ارشد رشته : انگل شناسی پزشکی که با عنوان: تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه رامنوس کاتارتیکا (*Rhamnus Cathartica*) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط In-vivo و به راهنمائی اینجانب تایید گردیده است، قابل ارائه در جلسه دفاع میباشد.

تاریخ وساعت پیشنهادی برای دفاع از جلسه پایان نامه:

امضاء اساتید راهنما:

صورت‌جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

جلسه دفاعیه پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خانم: **فاطمه بیات** دانشجوی رشته: انگل شناسی پزشکی
تحت عنوان: تعیین فعالیت آنتی مالاریایی نانو امودین جدا شده از گیاه رامنوس کاتارتیکا (Rhamnus Cathartica) بر روی پلاسمودیوم برگئی در موش Balb/c و بررسی میزان پارازیتمی و مهار رشد انگل درشرایط In-vivo.

که به راهنمایی استاد محترم سرکار خانم دکتر افسانه متولی حقی تهیه شده است، در تاریخ تشکیل گردید.

این پایان‌نامه با توجه به ضوابط تعیین شده توسط شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده بهداشت ، ارزیابی و با نمره (به عدد ، به حروف)

و با درجه ☐ عالی ☐ بسیار خوب ☐ خوب ☐ قابل قبول

مورد تأیید هیأت محترم داوران قرار گرفت.

هیأت داوران	نام نام خانوادگی	امضا
۱–استاد راهنما	۱– دکتر افسانه متولی حقی	
	۲– دکتر مهدی ناطق پور	
۲–استاد مشاور	۱– دکتر عباس رحیمی فروشانی	
	۲– دکتر امیرامانی	
مدیر گروه :	– دکتر مهدی محبعلی	
۳–داوران	۱– دکتر بهناز آخوندی	
	۲– دکتر سعیده شجاعی	

معاون آموزشی دانشکده
نام و امضاء

معاون پژوهشی دانشکده
نام و امضاء

Declaration

Hereby I declare that the present thesis is exclusively my own work, based on my research in the department of Medical parasitology and mycology at School of Public Health, Tehran University of Mediacal Sciences, and Tehran, Iran.

I also declare that no part of this thesis has been submitted in this form to any other University or Institution of higher education for an academic degree. Information deliverd from the published or unpublished work of others has been acknowledged in the text and a list of references is given.

All the rights including printing, duplication, translation, adoption, etc..., of results of this thesis is reserved for the Tehran University of Mediacal Sciences. Criticism by mentioning the source is allowed.

Student' name: Fatemeh Bayat

Date and Signature:

Assessment of NanoEmodine antimalarial activity extracted from *Rhamnus Cathartica* on *Plasmodium berghei* in Balb/c and evaluate the parasitemia and inhibition of parasite growth using in vivo test.

Abstract

Background:

Drug resistance to chemical drugs in *Plasmodium falciparum* and even in *Plasmodium vivax* has become problematic issue in recent years. The use of medicinal herbs in malaria endemic areas is a suggestion and priority of World Health Organization. Nanoparticles can increase the effectiveness of drugs and have a stronger effect on the infection. The aim of this study was to assess the antimalarial activity of Nano Emodin isolated from *Rhamnus cathartica* on *P. berghei* in Balb/c mice to survey the rate of parasitemia and inhibition of parasite growth using in- vivo test.

Methods:

Methods Emodin was purified from *Rhamnus cathartica* plant. Nano-particles and their surface charge were measured by dynamic light scattering (DLS), Zeta Potential Analyzer and electron microscopy techniques, for each sample. Mice were infected with *P. berghei.* After two hours infected mice were treated using emodin nanoparticles. Drug administration continued for four days. On D4 and D7 thin blood smear were made of subjects. Parasitemia was evaluated in each group in comparison with control group. Toxicity test was done using twice the highest concentration of emodin extract on a separate group of mice, ED50 was calculated. The data obtained in this study were statistically analyzed using SPSS software, 16 series and Kolmogorov-Smirnovz, One way Anova, Kruskal-wallis and Post Hoc tests.

Results Emodin extract was significantly effective in all concentrations *(P. value*<0.05). Liquid Nano-Emodin and Solid (non-Nano) Emodin showed the most effective on parasitemia. ED50 for Emodin extract was determined 220 mg / kg and this amount of Emodin extract can reduce 50% of parasites in the host. Toxicity test showed no toxic effect on the subjects.

Conclusion It can be concluded that the Emodin extract is safe, lack of side effects. It can be used for more and longer period of time and in higher doses. Emodin extract, either in form of liquid and nanoparticle or in a solid form, has a therapeutic effect on *Plasmodium berghei* in infected Balb/c mice.

Keywords Malaria, *Plasmodium berghei*, Nano Emodin, *Rhamnus cathartica*, in-vivo test.

Conclusions:

It can be concluded that the Emodin extract is safe, lack of side effects. It can be used for more and longer period of time and in higher doses. Emodin extract, either in form of liquid and nanoparticle or in a solid form, has a therapeutic effect on *Plasmodium berghei* in infected Balb/c mice.

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei*, Nano Emodin, *Rhamnus cathartica*, in-vivo test.

Tehran University of Medical Sciences
School of Public Health

Title:
“Assessment of NanoEmodine antimalarial activity extracted from Rhamnus Cathartica on Plasmodium berghei in Balb/c and evaluate the parasitemia and inhibition of parasite growth using in vivo test.”

A thesis submitted as partial fulfillment of the requirements for Master of Science (MSc) Degree.

In

Medical Parasitology

By

Fatemeh Bayat

Supervisors
Dr.Afsaneh Motevali- Haghi
Dr. Mehdi Nateghpour

Consultants
Dr.Abbas Rahimi Foroushani
Dr. Amir Amani

Year: 2021
Register number: ……..

Tehran University of Medical Sciences

School of Public Health

Title:
“Assessment of NanoEmodine antimalarial activity extracted from Rhamnus Cathartica on Plasmodium berghei in Balb/c and evaluate the parasitemia and inhibition of parasite growth using in vivo test.”

A thesis submitted as partial fulfillment of the requirements for Master of Science (MSc) Degree.

In

Medical Parasitology

By

Fatemeh Bayat

Supervisors
Dr.Afsaneh Motevali- Haghi
Dr. Mehdi Nateghpour

Year: 2021
Register number: ……..