

Effect of Hydroalcoholic Extract of Saffron on Cysts of *Giardia Lamblia* In Vitro

Pouryousef A.* MSc, Tatari M.¹ MSc, Soleimani R.² MSc

*Laboratory Sciences Department, Paramedicine Faculty, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Torbat Heydarieh, Iran

¹Basic Sciences Department, Nursing & Midwifery Faculty, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Torbat Heydarieh, Iran

²Laboratory Sciences Department, Paramedicine Faculty, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Torbat Heydarieh, Iran

Abstract

Aims: *Giardia lamblia* is one the most important of intestinal flagellate protozoan which in terms of medical parasitology and public health is important in Iran and many countries. Considering the resistance of parasite to chemical drugs, the present study was conducted to investigate the effect of saffron hydroalcoholic extract on *Giardia lamblia* cyst in vitro.

Materials & Methods: In this experimental study, cysts of *Giardia* were isolated from high-infected stool samples and concentrated by 0.85 molar sucrose. Then, the effect of hydroalcoholic extract of saffron in concentrations of 1, 10, 50 and 100 mg/ml was evaluated on cyst life at different times (one minute, 2 minutes, 30 minutes, one hour, 3 hours and 24 hours). The vital staining of cysts with Eosin 0.1% was used to determine the percentage of cysts life. Data were analyzed using SPSS 20 software and by two-way ANOVA, multiple scales and paired t-test.

Findings: Increasing the concentration of hydroalcoholic extract of saffron and also increasing the time of exposure to cysts, the mean of effect percentage of saffron extract increased gradually as compared to control group, so that the concentration of 50 and 100 mg/ml of extract after 3 and 24 hours had the highest toxicity on *Giardia* cyst in vitro ($p < 0.05$).

Conclusion: Hydroalcoholic extract of saffron is effective in eliminating *Giardia lamblia* cysts in vitro in concentrations of 50 and 100 mg/ml after 3 and 24 hours.

Keywords

Giardia lamblia [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016829>];

Crocus sativus [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68027622>];

Hydroalcoholic Extract [Not in MeSH];

In vitro [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68066298>]

*Corresponding Author

Tel: +98 (51) 52230973

Fax: +98 (51) 52242039

Address: Laboratory Sciences Department, Paramedicine Faculty, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Razi Street, Torbat Heydarieh, Iran

apouryousef67@gmail.com

Received: July 12, 2017

Accepted: November 15, 2017

ePublished: January 11, 2018

اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی زعفران بر کیست ژیرادیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی "در شیشه"

علی پوریوسف* MSc

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

مریم ناتاری MSc

گروه علوم پایه، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

رحیم سلیمانی MSc

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

چکیده

اهداف: ژیرادیا لامبلیا یکی از مهم‌ترین تک‌یاخته‌های تازک‌دار روده‌ای محسوب می‌شود که از نظر انگل‌شناسی پزشکی و بهداشت عمومی در ایران و بسیاری از کشورها دارای اهمیت است. با توجه به مقاومت انگل به داروهای شیمیایی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی زعفران (کراکوس ساتیوس) بر کیست ژیرادیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی "در شیشه" انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کیست ژیرادیا از نمونه‌های مدفوع با شدت آلودگی بالا، جمع‌آوری شده و با استفاده از روش ساکارز ۰/۸۵ مولار تغلیظ شدند. سپس تاثیر عصاره هیدروالکلی زعفران در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حیات کیست در زمان‌های مختلف (یک دقیقه، ۲ دقیقه، ۳۰ دقیقه، یک ساعت، ۳ ساعت و ۲۴ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین درصد حیات کیست‌ها از روش رنگ‌آمیزی حیاتی کیست‌ها با اتوزین ۰/۱٪ استفاده شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 20 و توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دوطرفه، مقیاس چندگانه و T زوجی مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی زعفران و همچنین با افزایش زمان مجاورت عصاره با کیست، میانگین درصد کشندگی عصاره زعفران در مقایسه با گروه کنترل به تدریج افزایش یافت. به طوری که غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره پس از ۳ و ۲۴ ساعت بیشترین تاثیر کشندگی را بر کیست ژیرادیا در شرایط آزمایشگاهی نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی زعفران از بین‌بردن کیست ژیرادیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی "در شیشه" در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت موثر است.

کلیدواژه‌ها: ژیرادیا لامبلیا، زعفران (کراکوس ساتیوس)، عصاره هیدروالکلی، "در شیشه"

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۴

*نویسنده مسئول: apouryousef67@gmail.com

مقدمه

ژیرادیا لامبلیا، عامل ژیرادیازیس یا اسهال چرب (استثناوره) از مهم‌ترین تک‌یاخته‌های روده‌ای بیماری‌زا در انسان است که کیست آن به روش مدفوعی-دهانی انتقال می‌یابد. این تک‌یاخته به دلیل خصوصیات ساختمانی در مرحله فعال (تروفوزوئیت) در روده کوچک انسان تکثیر و تغذیه می‌نماید و کیست آن که آلوده‌کننده است از طریق مدفوع دفع می‌شود^[1, 2]. انسان تنها مخزن شناخته‌شده این انگل و مهم‌ترین راه انتقال کیست انگل از طریق مصرف غذا و آب آلوده است. این تک‌یاخته انتشار جهانی داشته و در مناطق گرمسیر شایع‌تر از مناطق سردسیر است. این تک‌یاخته از شایع‌ترین انگل‌های روده‌ای در اکثر مناطق ایران است که از تمام نقاط دنیا نیز گزارش شده است. میزان آلودگی آن در مناطق مختلف جهان از ۱٪ تا ۲۵٪ متفاوت است^[3-1]، به طوری که برآورد می‌شود سالانه ۲۸۰ میلیون عفونت در انسان در سراسر جهان ایجاد می‌شود^[4].

ژیرادیا لامبلیا یکی از عوامل بیماری اسهال، سوءجذب و از دست‌دادن وزن به‌خصوص در کودکان است^[2-4]. ایران به‌عنوان یک منطقه اندمیک برای این تک‌یاخته است و شیوع آن در مناطق مختلف متفاوت گزارش شده است^[5-7]. با توجه به انتظار مقاومت انگل به دارو که از مناطق مختلف دنیا و از ایران گزارش شده است، پیشگیری و درمان این بیماری به‌ویژه در کودکان بسیار ضروری است^[8-10]. با توجه به اینکه تعیین ایزوله، کشت و آزمون‌های تعیین حساسیت ژیرادیا به‌علت تنوع نتایج، کار مشکلی است و بیشتر اطلاعات در مورد تاثیر دارو بر تجربیات بالینی استوار بوده است، از این رو درمان شیمیایی این بیماری براساس تجویز یکی از چهار داروی مترونیدازول، فورازولیدون، تینیدازول و کیناکرین صورت می‌گیرد که این داروها اثرات و عوارض جانبی متعددی دارند^[9, 10]. در حال حاضر برای درمان ژیرادیا از ترکیبات مختلفی مثل مشتقات نیتروایمیدازول، بنزایمیدازول، آرکیدین و نیتروفوران مانند مترونیدازول و فورازولیدون استفاده می‌شود که داروهای فوق همگی دارای اثرات نامطلوب به‌ویژه در کودکان و زنان هستند^[4, 9].^[10] از طرفی، گزارش‌هایی از مقاومت این انگل نسبت به داروهای فوق به‌ویژه مترونیدازول وجود دارد و اثرات کارسینوژنیک و موتاژنیک این داروها در مدل‌های حیوانی به‌تایید رسیده است^[3, 4].^[10] به همین دلیل تلاش برای یافتن ترکیباتی که دارای اثرات جانبی کمتر یا بدون اثرات جانبی باشد، در تحقیقات مورد توجه بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی برای درمان ژیرادیازیس به‌واسطه اثرات جانبی کم آنها رو به افزایش است. مطالعات مختلفی در زمینه گیاهان دارویی در ایران و جهان انجام شده است و تاثیر گیاهانی نظیر زنیان، سیر، پیاز، آویشن، گندواش و موسیر را بر کیست ژیرادیا لامبلیا مورد ارزیابی قرار داده‌اند^[4, 8, 10].

کراکوس ساتیوس (*Crocus Sativus*)، گیاهی از خانواده زنبقیان است که به‌نام "زعفران" معروف است. مهم‌ترین اجزای سازنده کلاله زعفران شامل کروستین، کروسین، آلفا کاروتن، آنتوسیانین، لیکوپن و فلاونوئیدها هستند. ترکیباتی از زعفران که اثرات فارماکولوژیک دارند، مواد تلخی هستند که از ساfranال و پیگمان‌های مربوط به کاروتنوئید کروستین مشتق می‌شوند^[11, 12]. شهبابی و همکاران، اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنیان بر کیست‌های ژیرادیا لامبلیا را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس گیاهان دارویی طولانی‌تر باشد، در غلظت‌های کمتر نیز رشد انگل در محیط کشت متوقف می‌شود و کیست‌ها در اثر مجاورت با غلظت‌های مختلف گیاه از بین می‌روند^[13].

سجادی و همکاران، تاثیر ضدژیرادیایی آلبیمو و سرکه را مورد ارزیابی قرار دادند. این محققان در مطالعه خود ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها را جداگانه با ۱۰۰۰ میکرولیتر کیست ژیرادیا تاثیر دادند و درصد زنده‌ماندن انگل را بعد از صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ ساعت محاسبه کردند. نتیجه این تحقیق نشان داد که عصاره سرکه بعد از ۳ ساعت بیشترین اثر ضدژیرادیایی را نسبت به بقیه موارد داشته است^[14]. بنابراین برای از بین‌بردن کیست و تروفوزوئیت روش‌های مختلفی پیشنهاد می‌شود که یکی از راه‌های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO)، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین‌بردن کیست انگل است^[15].

با توجه به اثرات بسیار مفید زعفران که از گیاهان بومی ایران بوده و به‌مقدار فراوان در دسترس است و از آنجایی که این گیاه ارزشمند در منطقه خراسان رضوی به‌ویژه شهرستان تربت‌حیدریه به‌وفور

۱۹۷۰ میلی‌گرم پودر به دست آمد. در مرحله نهایی پودر حاصل در غلظت‌های مختلف آب و الکل (۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رقیق شد.

برای انجام مطالعه، نتایج حاصل از تاثیر گیاه، با گروه کنترل (سرم فیزیولوژی) مقایسه شد و غلظت‌ها با توجه به مطالعات قبلی تعیین شدند. به منظور بررسی تاثیر عصاره گیاهی بر کیست، غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زعفران تهیه شد. سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر از هر غلظت در لوله آزمایش جداگانه، آماده و به هر لوله آزمایش ۱۰ هزار کیست ژیرادیا لامبلیا اضافه شد و در نهایت تاثیر غلظت‌های مختلف از گیاه بر حیات کیست در زمان‌های مختلف (یک دقیقه، ۲ دقیقه، ۳۰ دقیقه، یک ساعت، ۳ ساعت و ۲۴ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین درصد حیات کیست‌ها از روش رنگ‌آمیزی حیاتی کیست‌ها با ائوزین ۱٪ استفاده شد.

داده‌های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دوطرفه، مقیاس چنگدانه و T زوجی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی زعفران و همچنین با افزایش زمان مجاورت عصاره با کیست‌های ژیرادیا لامبلیا، میانگین درصد کشندگی در مقایسه با گروه کنترل به تدریج افزایش یافت. این در حالی است که در گروه کنترل میانگین زنده‌بودن کیست ژیرادیا در زمان‌های متفاوت ۵٪ تا ۳۰٪ بود. در گروه کنترل نیز با افزایش زمان و غلظت، درصد کمی از کیست‌ها از بین رفتند که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

میانگین تاثیر عصاره هیدروالکلی زعفران بر کیست ژیرادیا به‌ویژه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۳ و ۲۴ ساعت یعنی با افزایش زمان روی کیست افزایش یافت و باعث از بین رفتن کیست‌ها شد. هر چند میانگین درصد تاثیر عصاره گیاه بر کیست‌ها در هر یک از زمان‌های مجاورت متفاوت بود، این اختلاف در هر یک از زمان‌ها در غلظت‌های مختلف تفاوت داشت ($P < 0.05$ ؛ جدول ۱).

جدول ۱) میانگین آماری درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی زعفران در زمان‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل

زمان مجاورت	یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره	۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره	۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره	۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره
یک دقیقه	۰/۰۵±۰/۰۰۱	۱/۲۵±۰/۰۰۵	۱/۱۱±۰/۰۰۲	۴/۵۲±۰/۱۰
۲ دقیقه	۰/۰۵±۰/۰۰۳	۴/۱۴±۰/۱۵	۴/۰۲±۰/۱۱	۷/۳۶±۰/۱۹
۳۰ دقیقه	۱/۱۲±۰/۰۰۹	۶/۰۹±۰/۱۲	۷/۱۳±۰/۱۳۸	۱۵/۰۷±۰/۲۱
یک ساعت	۲/۲۵±۰/۰۰۵	۹/۱۰±۰/۳۱	۱۰/۴±۰/۲۲	۱۸/۰۹±۰/۶۶
۳ ساعت	۲/۳۶±۰/۴۱	۱۲/۰۳±۰/۲۷	۱۴/۰۵±۰/۱۹	۲۳/۱۴±۰/۱۰۵
۲۴ ساعت	۳/۴۱±۰/۷۲	۲۶/۰۴±۰/۵۶	۲۹/۳۳±۰/۱۰	۳۷/۰۱±۰/۲۱

بحث

با توجه به اینکه بررسی تاثیر خواص گیاهان بومی هر منطقه بر مرحله کیستی و تروفوزوئیت تک‌یاخته‌ها توسط سازمان جهانی

کشت و برداشت شده و مورد استفاده خانگی و صنعتی قرار می‌گیرد، لذا به لحاظ اهمیت موضوع و اینکه تاکنون در ایران چنین تحقیقی انجام نشده است، بر آن شدیم تا تحقیقی در زمینه اثر کشندگی این گیاه بر کیست ژیرادیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی انجام دهیم. بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی زعفران بر کیست ژیرادیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی "در شیشه" بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، برای جمع‌آوری و جداسازی کیست ژیرادیا، مدفوع‌های تازه با قوام‌های متفاوت (سفت، نرم و آبکی) و آلوده (۱۲ نمونه با شدت آلودگی بالا) از افراد مراجعه‌کننده (بدون علامت و دارای علامت) به آزمایشگاه‌های بیمارستان نهم دی و آزمایشگاه مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها با استفاده از روش ساکارز ۰/۸۵ مولار تغلیظ شدند. برای جداسازی کیست ژیرادیا ۱۰ تا ۱۵ گرم از نمونه‌های مدفوع با ۱۰ برابر آب، مخلوط و با استفاده از گاز دولایه صاف شد. پس از صاف کردن نمونه‌ها، محلول حاصل در ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل مجدداً با ۱۰ برابر حجم آب مخلوط و با همان سرعت و زمان سانتریفوژ شده و به رسوب حاصل ۵ میلی‌لیتر آب اضافه شد. به محلول فوق ۳ میلی‌لیتر محلول ساکارز ۰/۸۵ مولار که از قبل آماده شده بود، به آرامی اضافه شد. سپس نمونه‌ها در ۶۰۰ دور در دقیقه در مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. از سه لایه تشکیل شده پس از سانتریفوژ، کیست‌ها از بین لایه‌های اول و دوم با دقت به وسیله پپیت‌پاستور جمع‌آوری و پس از دوبار شست‌وشو با آب مقطر برای انجام آزمایش آماده شدند.

برای تعیین حیات کیست‌ها از رنگ‌آمیزی حیاتی کیست‌ها با ائوزین ۱٪ استفاده شد. تعداد کیست‌های زنده و مرده (رنگ‌گرفته)، با شمارش تصادفی ۱۰۰ عدد کیست ژیرادیا مشخص می‌شود. به منظور دقت بیشتر، هر آزمایش پنج‌بار تکرار شد. درصد زوال کیست‌ها از فرمول زیر محاسبه شد [16]:

$$K\% = [(MCC - MCT) / MCC] \times 100$$

در فرمول فوق، $K\%$ = درصد نابودی کیست‌ها، MCC = میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه شاهد و MCT = میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه آزمون است.

برای شمارش کیست‌ها از لام نئوبار استفاده شد. ضمناً نمونه‌ها را می‌توان در دمای ۴°C برای انجام آزمایشات مرحله بعد نگهداری کرد [17].

برای عصاره‌گیری زعفران، این گیاه از مناطق روستایی شهرستان تربت‌حیدریه در فصل پاییز جمع‌آوری و توسط دکتر/احمد/احمدیان در پژوهشکده زعفران تربت‌حیدریه ثبت شد. پس از تایید، مقدار ۵۰۰ گرم از گیاه بعد از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال یافت و در شرایط اتاق و دور از نور خورشید، خشک و به وسیله خردکن برقی تبدیل به پودر شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ گرم از پودر حاصل در محلول آب و الکل به نسبت مساوی (۵۰٪ آب و ۵۰٪ الکل) حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. از آنجا که الکل نسبت به حلال‌های دیگر، مواد بیشتری (هم ترکیبات قطبی و هم غیرقطبی) را جدا می‌کند، در این مطالعه از الکل اتانول مطلق استفاده شد. پس از صاف کردن محلول حاصل، حلال (آب و الکل) توسط دستگاه روتاری اوپوراتور تبخیر شد و سپس ماده باقی‌مانده خشک شد تا تبدیل به پودر شود که در این روش مقدار

بهداشت و بعضی از محققان پیشنهاد شده است [8-10, 15, 18]، لذا در مطالعه حاضر که برای اولین بار در سطح ایران انجام شد، تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی زعفران که گیاه بومی استان خراسان رضوی است با توجه به خصوصیات و ترکیبات آن، در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در طب سنتی از زعفران به‌عنوان تسکین‌دهنده، ضدباکتریایی، گندزدایی، کنترل و تضعیف‌کننده عفونت استفاده می‌شود [11, 12].

براساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی زعفران بر کیست *ژیاردیا* در شرایط آزمایشگاهی، با افزایش غلظت گیاه در زمان معین، میانگین درصد کشتندگی در کیست‌ها افزایش یافت. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی زعفران در هر یک از غلظت‌ها درصد کشتندگی و تاثیر گیاهی در ازبین‌بردن کیست‌های *ژیاردیا* (یا درصد کشتندگی) افزایش داشت. در گروه کنترل نیز با افزایش زمان و غلظت، درصد کمی از کیست‌ها از بین رفتند که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در مطالعه شهبابی و همکاران، اثر کشتندگی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زینان بر کیست‌های *ژیاردیا لامبلیا* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد که پس از گذشت ۶۰ دقیقه از تماس بین عصاره یا اسانس با کیست *ژیاردیا لامبلیا*، حداقل غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی و اسانس زینان به ترتیب ۱۰۰ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، پس از ۱۲۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پس از ۱۸۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد [13]. در مطالعه حاضر اثر عصاره هیدروالکلی زعفران در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱، ۲، ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۱۴۴۰ دقیقه روی کیست *ژیاردیا لامبلیا* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین اثر کشتندگی در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت بود، به این صورت که بعد از اضافه‌کردن عصاره هیدروالکلی در ۱۸۰ دقیقه باعث ازبین‌رفتن ۲۳٪ کیست‌ها و در ۱۴۴۰ دقیقه (۲۴ ساعت) باعث ازبین‌رفتن ۳۷٪ کیست‌ها شد. در تحقیق شهبابی و همکاران نکته قابل توجه این است که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس گیاهان دارویی طولانی‌تر باشد، در غلظت‌های کمتر نیز رشد انگل در محیط کشت متوقف می‌شود و کیست‌ها در اثر مجاورت با غلظت‌های گیاهان از بین می‌روند. در مطالعه حاضر براساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره زعفران بر کیست *ژیاردیا* بیشترین اثر کشتندگی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت بود که از لحاظ آماری معنی‌دار بود. بنابراین برای تکمیل مطالعه حاضر و طبق برنامه‌ریزی‌های انجام‌شده، تاثیر این عصاره در دمای ۳۷°C و زمان‌های بالاتر (۴۸ و ۷۲ ساعت) در مطالعات آینده بررسی خواهد شد تا بتوان با اطمینان بیشتری راجع به اینکه این گیاه قدرت کشتندگی مطلق کیست *ژیاردیا* را دارد یا خیر، سخن گفت. همچنین در مراحل بعد می‌توان از عصاره هیدروالکلی "در محیط زنده" برای درمان کیست‌های *ژیاردیا* در حیوانات آزمایشگاهی یا در انسان با غلظت مناسب استفاده کرد.

در مطالعه‌ای دیگر کیم و همکاران اثرات ضدانگلی آرتیمیزیین را بر *نئوسپورا کانینوم* در شرایط "در شیشه" بررسی نمودند. در این مطالعه سلول‌های ورو (Vero) یا ماکروفاژهای صفاقی موش را که آلوده به تاکیزوئیت *نئوسپورا کانینوم* بود کشت داده و غلظت‌های ۱۰، ۱ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آرتیمیزیین را روی این کشت سلولی اثر دادند. غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۱۴ روز تعداد *نئوسپورا کانینوم* را کاهش داد و سبب حذف کامل میکروسکوپی

آن شد. این مطالعه بیان می‌کند که آرتیمیزیین تکثیر درون‌سلولی تاکیزوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* را مهار می‌کند [19]. اما مطالعه حاضر نسبت به مطالعات مشابه درصد کشتندگی پایین‌تری را نشان می‌دهد که دلیل آن می‌تواند مربوط به میزان دمای به‌کارگرفته‌شده در این مطالعه باشد و همان طور که در بالا ذکر شد، پیش‌بینی می‌شود دمای بالاتر (۳۷°C) می‌تواند کشتندگی به‌مراتب بالاتری داشته باشد که در ادامه روند پژوهش مورد بررسی قرار خواهد گرفت. اما نکته قابل توجه در این مطالعه و مطالعات مشابه این است که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره طولانی‌تر باشد، می‌توان با غلظت کمتری از عصاره رشد انگل را در محیط کشت مهار کرد.

همچنین نتایج تحقیقات فرسنگی در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر نیز نشان‌دهنده این است که زمان، تاثیر بسیار مهمی در کشتن کیست‌های *ژیاردیا* توسط عصاره‌های مختلف گیاهی دارد [18]. در مطالعه‌ای که اسوبی و همکاران انجام دادند، عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در ۳ و ۲۴ ساعت بیشترین تاثیر کشتندگی را بر کیست *ژیاردیا* داشت که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [20]. در مطالعه رضایی‌منش و همکاران نیز اثر کشتندگی عصاره‌های آبی و الکی گیاه درمنه ترکی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت، زمان و دما افزایش یافت که این نتایج با مطالعه حاضر همراستا است [21].

به‌طور کلی یافته‌های این تحقیق نشان داد که می‌توان از عصاره هیدروالکلی زعفران با انجام مطالعات تکمیلی‌تر در آینده در درمان کیست‌های *ژیاردیا* استفاده کرد. چون *ژیاردیا* به‌صورت کیست وارد بدن می‌شود و به‌صورت کیست نیز از بدن دفع می‌شود، مسلماً اثر کشتندگی عصاره گیاه برای جلوگیری از آلودگی و همین‌طور زمانی که این ماده به‌مقدار مناسب در معده و روده حضور داشته باشد با کشتن کیست‌ها، از پدیده اگزکیستیشن و تبدیل آن به فرم تروفوزوئیتی و در نتیجه استقرار بیماری جلوگیری می‌کند. با توجه به اثر کشتندگی عصاره هیدروالکلی زعفران بر کیست *ژیاردیا لامبلیا* در این تحقیق می‌توان زعفران را گیاهی موثر در ازبین‌بردن کیست‌های *ژیاردیا* در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرد و با توجه به اینکه این اثرات در شرایط "در محیط زنده" (روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان) مشخص نیست، انجام مطالعات کارآزمایی بالینی در این ارتباط ضروری به‌نظر می‌رسد. از طرفی، انتقال *ژیاردیا لامبلیا* به‌وسیله کیست انگل است که برای ازبین‌بردن کیست‌ها روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است. یکی از راه‌های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت، استفاده از مواد خوراکی طبیعی و گیاهان دارویی است [18]. در ایران نیز بعضی از گیاهان دارویی به‌عنوان داروهای ضد *ژیاردیا* مانند موسیر و آویشن باریک در غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و انبه در غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معرفی شده‌اند [8]. هر چند تاثیر گیاهان دارویی مانند سیر و موسیر و آویشن یا داروهای گیاهی دیگر بر کیست *ژیاردیا* در مطالعات قبلی گزارش شده است، ولی در مراحل بعدی مطالعات تکمیلی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان صورت نگرفته است. لذا با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان زعفران را که در ازبین‌بردن کیست *ژیاردیا* در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت موثر است، برای تحقیقات بعدی روی تروفوزوئیت *ژیاردیا لامبلیا* یا سایر تک‌یاخته‌های روده‌ای در حیوانات آزمایشگاهی توصیه نمود.

از محدودیت‌های این مطالعه عدم امکان برای آزمایش عصاره زعفران روی حیوانات آزمایشگاهی بود. در انتها پیشنهاد می‌شود تاثیر عصاره هیدروالکلی زعفران در

Soltani-Arabshahi SK, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*: Application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iran J Publ Health*. 2008;37(2):75-82. [Persian]

7- Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Gholami Sh, Khalilian AR. Relationship between Giardiasis an amount of Zinc, Iron elements in babies below 12 years old. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2004;6(14):87-91. [Persian]

8- Azadbakht M, Azadbakht M. Five prevalent antiprotozoal herbal drugs. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2008;18(67):118-32. [Persian]

9- Hellgren U, Ericsson O, AdenAbdi Y, Gustafsson LL. Handbook of drugs for tropical parasitic infections. 2nd edition. Florida: CRC Press;1995.

10- Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57(5-6):614-9.

11- Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res Int*. 2010;43(8):1981-9.

12- Mousavi SZ, BathaieSZ. Historical uses of saffron: Identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna J Phytomedicine*. 2011;1(2):57-66.

13- Shahabi S, Ayazi Roozbehani F, Kamalinejad M, Abadi A. Anti-giardia activity of *Carum copticum* on *Giardia lamblia* cysts in vitro. *Res Med*. 2008;32(4):303-7.

14- Sadjjadi SM, Rostami J, Azadbakht M. Giardicidal activity of lemon juice, vinifer and vinegar on *Giardia intestinalis* cysts. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006;37(Suppl 3):24-7.

15- Organization WH. Informal consultation on intestinal protozoal infections. México, DF: Pan American Health Organization; 1992.

16- Hill DR, Pohl R, Pearson RD. *Giardia lamblia*: A culture method for determining parasite viability. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35(6): 1129-33.

17- Efferth T. Willmar schwabe award 2006: Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. *Planta Med*. 2007;73(4):299-309.

18- Farsangi M. Killing effect of *Zataria multiflora* on cysts of *Giardia lamblia* in vitro. *J Clin Microbiol*. 2001;4(1):88-95.

19- Kim JT, Park JY, Seo HS, Oh HG, Noh JW, Kim JH, et al. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*. 2002;103(1-2):53-63.

20- Rahimi-Esboei B, Gholami Sh, Azadbakht M, Ziaei H. Effect of Hydroalcoholic extract of *Artemisia annua* on cysts of *Giardia lamblia* in Invitro. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2012;22(90):71-80. [Persian]

21- Rezaieanesh MR, Shirbazou Sh. In-vitro giardicidal effect of aqueous and alcoholic extracts of *Asafoetida* on *Giardia lamblia* cyst. *J Birjand Univ Med Sci*. 2012;19(1):22-33. [Persian]

دماهای بالاتر (۳۷°C) و غلظت‌های بیشتر از مطالعه حاضر بررسی شود تا بتوان به نتیجه مطلوب‌تر و اثر کشندگی بیشتری از این عصاره دست یافت.

نتیجه‌گیری

عصاره هیدروالکلی زعفران در ازبین‌بردن کیست ژیاوردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی "در شیشه" در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت موثر است.

تشکر و قدردانی: پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تربیت‌حیدریه به‌خاطر همکاری مالی و نیز کارکنان آزمایشگاه مرکز بهداشت و پژوهشکده زعفران شهرستان تربیت‌حیدریه سپاسگزاری نمایند.

تاییدیه اخلاقی: پروتکل این پژوهش براساس تصویب در کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تربیت‌حیدریه با شناسه اخلاق IR.THUMS.REC.1394.10 به‌انجام رسید.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
 سهم نویسندگان: علی پوریوسف (نویسنده اول)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ مریم تاتاری (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ رحیم سلیمانی (نویسنده سوم)، نگارنده مقاله/پژوهشگر کمکی (۳۰٪).
 منابع مالی: این پژوهش از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تربیت‌حیدریه برخوردار بوده است.

منابع

1- Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*. 2004; 58:69-137.

2- Edrisian G, et al. Medical protozoology. Vol. 1. Tehran: University of sciences; 2008.

3- Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(2):123-47.

4- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203-8.

5- Gholami Sh, Ziai H, Sharif M, Mohammadpour Tahamtan RA, Kyanyan H, Mobdi I. Intestinal Protozoan Infections in cattle breeders in rural regions of Mazandaran province in 2003. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2005;15(45):51-60. [Persian]

6- Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E,