یک

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

**پایان نامه ی دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی**

# تعیین مقدار آرتمیزینین در بافت های مختلف طیور گوشتی پس از تجویز خوراکی به صورت تک دوز و مزمن

**استادان راهنما:**
**دکتر سعید حبیبیان دهکردی**
**دکتر حسینعلی عرب**

**استادان مشاور:**
**دکتر امیر علی شهبازفر**
**دکتر جهانگیر کبوتری کتج**

**پژوهشگر:**
**مطهره اسماعیلی**

**دی ماه ۱۳۹۰**

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم پایه

پایان نامه **خانم مطهره اسماعیلی** جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی با عنوان **تعیین مقدار آرتمیزینین در بافتهای مختلف طیور گوشتی پس از تجویز خوراکی به صورت تک دوز و مزمن** در تاریخ **۱۳۹۰/۱۰/۲۸** با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه/ نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

**۱. استادان راهنمای پایان نامه**

**دکتر سعید حبیبیان دهکردی با مرتبه علمی استادیار** **امضاء**

**دکتر حسینعلی عرب با مرتبه علمی دانشیار** **امضاء**

**۲. استادان مشاور پایان نامه**

**دکتر امیر علی شهبازفر با مرتبه علمی استادیار** **امضاء**

**دکتر جهانگیر کبوتری کتج با مرتبه علمی استادیار** **امضاء**

**۳. استادان داور پایان نامه**

**دکتر حمدالله مشتاقی با مرتبه علمی دانشیار** **امضاء**

**دکتر شهاب بهادران با مرتبه علمی استادیار** **امضاء**

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

**دکتر سعید حبیبیان دهکردی**
**معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی**
**دانشکده دامپزشکی**

**دکتر حسین نورانی**
**رئیس دانشکده دامپزشکی**

**کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.**

پروردگارا؛ ای هستی بخش وجود، مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست، ذره ذره وجودم برای تو و نزدیک شدن به تو می تپد؛ الهی مرا مدد کن تا دانش اندکم نه نردبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه ای برای اسارت و نه دست مایه ای برای تجارت، بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

حال که توفیق جمع آوری و تهیه این مجموعه را یافته ام بر خود واجب می دانم از تمامی عزیزانی که در طی انجام این پژوهش از راهنمایی و یاری شان بهره مند گشته ام تشکر و قدردانی کنم و برای ایشان از درگاه پروردگار مهربان آرزوی سعادت و پیروزی نمایم؛

از اساتید راهنمای ارجمند آقایان دکتر حسینعلی عرب و دکتر سعید جبیبیان که با ارائه نظرات و رهنمودهایشان مرا در پیشبرد این پایان نامه راهنمایی نموده اند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید محترم مشاور و داور که زحمت بازخوانی و داوری این مجموعه را به عهده داشتند، سپاسگزارم.

زحمات کارشناس محترم آزمایشگاه آقای مهندس شمس را ارج مینهم که مرا در مسیر این رساله یاری نمود.

از کلیه اساتید گرانقدر که در دوران تحصیل از محضرشان کسب فیض نمودم، تشکر و قدردانی می نمایم.

و در نهایت از تمامی دوستان و هم کلاسیهای عزیزم که در طول این مدت افتخار آشنایی و مصاحبت با آنها را داشتم، به پاس محبتهایشان سپاسگزارم.

تقدیم به

پدر عزیزم ؛ بزرگ استاد زندگی ام که درس تلاش و زندگی را عالمانه به من آموخت تا استادگی را تجربه نمایم

و مادرم مهربانم ؛ دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به

همسر مهربانم ؛ اسطوره زندگیم ؛ پناه خستگیم و امید بودنم او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود. آن مهربان همیشگی

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، مهرم قطره ای از دریای مهر اوست

و زندگیم در کنار او معنی گرفت.

تقدیم به پدر و مادر همسرم که دعای خیر و مهربانی هایشان تلخی خستگی هایم را به حلاوت پر طراوت آرامش آمیخت

تقدیم به خواهران و برادران عزیزم که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

چکیده
آرتمیزینین ماده موثره گیاه درمنه بوده و امروزه به عنوان موثرترین داروی ضد مالاریا به ویژه در سویه های مالاریای مقاوم به درمان کاربرد دارد. در مطالعات اخیر اثرات ضد کوکسیدیوزی گیاه درمنه و فارماکودینامی و اثرات توکسیکوپاتولوژیک آرتمیزینین در طیور گوشتی مورد توجه قرار گرفته است، با این حال هنوز توزیع بافتی آرتمیزینین در این گونه مورد بررسی جدی قرار نگرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی توزیع بافتی آرتمیزینین به دنبال تجویز دوزهای مختلف به صورت تک دوز و مزمن جهت تعیین رابطه بین دوزهای متفاوت بالاتر از دوز درمانی و تجمع بافتی در طیور می باشد. برای انجام مطالعه، تعداد ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه نژاد هیبرید راس به طور تصادفی به دو دسته شامل ۱۳ گروه آزمایشی ۵ تایی تقسیم شدند. دسته ی اول (مزمن) شامل ۵ گروه بود که گروه اول به عنوان شاهد آرتمیزینینی دریافت نکردند و ۴ گروه بعد به ترتیب دوزهای ppm ۱۷،۳۴،۶۸،۱۳۶ آرتمیزینین را از ۸ روزگی به صورت روزانه مخلوط با جیره تا ۴۴ روزگی (به مدت ۳۶ روز) دریافت کردند. دسته ی دوم (تک دوز) شامل ۹ گروه بود که ۲ گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و ۷ گروه تحت آزمایش، آرتمیزینین را با دوزهای ۱۰۰۰۰،۱۰،۵۰،۲۵۰،۱۲۵۰،۲۵۰۰،۵۰۰۰mg/kg به صورت محلول در الکل یا سوسپانسیون در آب به صورت تک دوز از طریق داخل چینه دان در ۳۰ روزگی دریافت کردند. در طول دوره پرورش علائم بالینی احتمالی ناشی از مسمومیت مشاهده نشد و در این مدت هیچ یک از پرندگان تلف نشدند. جوجه ها پس از دریافت آخرین دوز به صورت مزمن و یا تک دوز کشتار و نمونه های بافتی از کلیه، کبد، مغز، طحال و ریه اخذ و در فریزر نگهداری شدند. نمونه های بافتی در اثر امواج مافوق صوت و تماس با حلال مناسب (متانول و اسید هیدروکلریدریک) متلاشی و آرتمیزینین موجود در نمونه ها با استفاده از روش مایع – مایع استخراج و میزان آن با استفاده از سامانه HPLC اندازه گیری شد. به دنبال تجویز تک دوز و مزمن، بیشترین میزان دارو در کبد تجمع یافت که به طور کلی میزان توزیع بافتی با افزایش دوز تجویز شده روند افزایشی داشت. مقدار آرتمیزینین تجمع یافته در طحال به دنبال تجویز تک دوز، کمترین میزان نسبت به سایر بافت ها بود. ولی به دنبال تجویز مزمن مقدار آرتمیزینین تجمع یافته در طحال، نسبت به روش تک دوز افزایش یافت و میزان تجمع یافته نسبت به مغز، ریه و کلیه بیشتر گردید. در مغز با افزایش دوز میزان تجمع دارو در دوزهای پائین به صورت افزایشی بود. اما در دوزهای بالا در هیچکدام از روش های تجویزی افزایشی ملاحظه نشد. در ریه به دنبال تجویز تک دوز، میزان تجمع بافتی در دوزهای کم با بالا رفتن دوز افزایش یافت، ولی در دوزهای بالاتر تفاوت معنی داری در میزان تجمع یافته مشاهده نشد. به دنبال تجویز مزمن، الگوی توزیع بافتی در ریه به طور کلی روند افزایشی داشت. به دنبال تجویز تک دوز در دوزهای بالا، دارو در کلیه تجمع یافت. متعاقب تجویز تک دوز بیشترین مقدار تجمع در کبد و کمترین مقدار در طحال بود، تفاوت معنی داری نیز در مقادیر تجمع یافته بین سایر بافت ها ملاحظه نگردید. به دنبال تجویز دارو به صورت مزمن، در گروهی که ppm ۱۷ آرتمیزینین دریافت کرده بود بیشترین مقدار تجمع بافتی در طحال ملاحظه شد. در گروه های دیگر بیشترین مقدار تجمع دارو در کبد و به دنبال آن در طحال، ریه، مغز و کلیه مشاهده شد.

**کلید واژه:** آرتمیزینین، جوجه های گوشتی، توزیع بافتی، تک دوز، مزمن، روش داخل چینه دان، روش خوراکی

**فهرست مطالب**

عنوان شماره صفحه


**فصل اول- مقدمه** ..... ۶

**فصل دوم- کلیات** ..... ۸

۲-۱ درمنه ..... ۸

۲-۱-۱ گیاه شناسی و انتشار جغرافیایی گیاه درمنه ..... ۸

۲-۱-۲ تاریخچه کاربرد به عنوان گیاه داروئی ..... ۹

۲-۱-۳ ترکیبات شیمیایی گیاه ..... ۱۰

۲-۲ معرفی آرتمیزینین و مشتقات آن ..... ۱۱

۲-۲-۱ مشخصات فیزیکی و شیمیایی آرتمیزینین ..... ۱۱

۲-۲-۲ مشتقات آرتمیزینین ..... ۱۲

۲-۳ فارماکودینامیک آرتمیزینین ..... ۱۴

۲-۳-۱ مکانیزم های عمل اختصاصی ..... ۱۴

۲-۳-۱-۱تداخل عمل با پمپ کلسیم ATPase رتیکولوم اندوپلاسمی/ سارکوپلاسمی(SERCA)..... ۱۴

۲-۳-۱-۲ تداخل عمل با زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری ..... ۱۵

۲-۳-۲ مکانیزم های عمل غیر اختصاصی ..... ۱۵

۲-۳-۲-۱ تولید رادیکالهای آزاد ..... ۱۶

۲-۴ فارماکوکینتیک آرتمیزینین ..... ۱۷

۲-۵ اثرات فارماکولوژیک آرتمیزینین ..... ۲۰

۲-۵-۱ اثرات ضد مالاریایی آرتمیزینین ..... ۲۰

۲-۵-۲ اثرات آرتمیزینین بر روی سیستم ایمنی ..... ۲۱

۲-۵-۳ اثرات ضد ویروسی ..... ۲۱

۲-۵-۴ اثرات بر روی رگ سازی ..... ۲۲

۲-۵-۵ اثرات ضد سرطانی ..... ۲۲

۲-۵-۶ اثرات ضد کوکسیدیوزی آرتمیزینین ..... ۲۳

۲-۵-۷ سایر اثرات درمانی ..... ۲۸

۲-۶ عوارض جانبی و توکسیکولوژی آرتمیزینین و مشتقات آن ..... ۲۸

۲-۶-۱ عوارض ناشی از مصرف تک دوز ..... ۲۹

۲-۶-۲ عوارض ناشی از مصرف دارو به شکل مزمن ..... ۳۰

۲-۶-۳ عوارض عصبی ..... ۳۱

**فصل سوم – مواد و روش کار** ..... ۳۴

۳-۱ مواد و لوازم مورد نیاز ..... ۳۴

۳-۱-۱ دستگاهها و مواد شیمیایی ..... ۳۴

۳-۱-۱-۱ مشخصات دارو ..... ۳۵

۳-۱-۲ حیوانات ..... ۳۵
۳-۱-۳ وسایل مورد نیازجهت پرورش و نمونه برداری ..... ۳۵
۳-۱-۳-۱ غذا وشرایط نگه داری ..... ۳۶
۳-۱-۳-۲ واکسیناسیون ..... ۳۷
۳-۲ نحوه مصرف دارو ..... ۳۷
۳-۲-۱ تجویز آرتمیزینین به صورت تک دوز ..... ۳۷
۳-۲-۲ تجویز آرتمیزینین به صورت مزمن ..... ۳۸
۳-۳ بررسی علائم بالینی ..... ۳۹
۳-۴ نمونه برداری ..... ۳۹
۳-۵ آماده سازی نمونه های بافتی (استخراج دارو از سلول ها) ..... ۳۹
۳-۵-۱ روش های متلاشی ساختن سلول ها ..... ۳۹
۳-۵-۱-۱ امواج مافوق صوت: روش فیزیکی جهت استخراج دارو از نمونه های بیولوژیک ..... ۳۹
۳-۶ جداسازی و استخراج دارو از نمونه های بیولوژیک ..... ۴۰
۳-۶-۱ انواع روش های استخراج ..... ۴۰
۳-۶-۱ -۱ استخراج مایع – مایع ..... ۴۰
۳-۶-۱-۲ سایر روش های استخراج ..... ۴۰
۳-۷ استخراج آرتمیزینین از نمونه های بافتی ..... ۴۱
۳-۸ تعیین مقدار آرتمیزینین ..... ۴۱
۳-۸-۱ انواع روش های شناسایی و تعیین مقدار آرتمیزینین ..... ۴۱
۳-۸-۲ تعیین مقدار آرتمیزنین با استفاده از دستگاه HPLC ..... ۴۲
۳-۸-۲-۱ دستگاه مورد استفاده برای کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ..... ۴۲
۳-۸-۲-۲ اختصاصات روش آنالیز ..... ۴۲
۳-۹ مطالعات مربوط به اعتبار سنجی روش آنالیز ..... ۴۲
۳-۹-۱ انتخابی بودن روش آنالیز ..... ۴۳
۳-۹-۲ صحت و دقت روش آنالیز ..... ۴۳
۳-۹-۳ کالیبراسیون ..... ۴۴
۳-۹-۳-۱ رسم منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین با استفاده از دستگاه HPLC ..... ۴۴
۳-۹-۳-۲ کمترین حد قابل تشخیص (LLOQ ) ..... ۴۴
۳-۹-۴ پایداری ..... ۴۵
۳-۱۰ بررسی آماری داده ها ..... ۴۵

**فصل چهارم نتایج ..... ۴۶**
۴-۱ بررسی پارامترهای اعتبار سنجی روش آنالیز جهت تعیین مقدار آرتمیزینین ..... ۴۶
۴-۱-۱ انتخابی بودن روش ..... ۴۶
۴-۱-۲ دقت و صحت روش ..... ۴۶
۴-۱-۳ پایداری روش ..... ۴۶
۴-۱-۴ رسم منحنی کالیبراسیون و بررسی محدوده خطی آرتمیزینین در نمونه های بافتی ..... ۴۸

۴-۲ نتایج حاصل از آنالیز نمونه های بافتی ..... ۴۹
۴-۲-۱ مقایسه بین میزان تجمع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف در هر بافت ..... ۴۹
۴-۲-۲ مقایسه بین میزان تجمع بافتی آرتمیزینین در بافت های مختلف در هر دوز ..... ۵۷

**فصل پنجم – بحث** ..... ۶۱
۵-۱ بحث پیرامون نتایج حاصل از آنالیز نمونه های بافتی ..... ۶۱
۵-۲ نتیجه گیری ..... ۶۴

**منابع** ..... ۶۶

**فهرست شکل ها**

عنوان شماره صفحه


شکل ۲-۱: بوته گیاه آرتمیزیا آنوا ..... ۹
شکل ۲-۲: نمونه برگ گیاه آرتمیزیا آنوا ..... ۹
شکل۲-۳: بوته گیاه آرتمیزیا سیبری ..... ۹
شکل ۲-۴: نمونه برگ گیاه آرتمیزیا سیبری ..... ۹
شکل ۲-۵: ساختار شیمیایی آرتمیزینین ..... ۱۲
شکل ۲-۶: ساختار شیمیایی برخی از مشتقات آرتمیزینین ..... ۱۳
شکل ۲-۷: چرخه زندگی آیمریا تنلا ..... ۲۴
شکل ۴-۱: نمونه کروماتوگرام حاصل از تعیین مقدار آرتمیزینین در نمونه بافتی جوجه های گوشتی ..... ۴۷
شکل ۴-۲: منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین ..... ۴۸
شکل ۴-۳: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت تک دوز در بافت کبد ..... ۵۲
شکل ۴-۴: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت مزمن در بافت کبد ..... ۵۲
شکل ۴-۵: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت تک دوز در بافت طحال ..... ۵۳
شکل ۴-۶: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت مزمن در بافت طحال ..... ۵۳
شکل ۴-۷: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت تک دوز در بافت مغز ..... ۵۴
شکل ۴-۸: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت مزمن در بافت مغز ..... ۵۴
شکل ۴-۹: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت تک دوز در بافت ریه ..... ۵۵
شکل ۴-۱۰: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت مزمن در بافت ریه ..... ۵۵
شکل ۴-۱۱: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت تک دوز در بافت کلیه ..... ۵۶
شکل ۴-۱۲: نمودار توزیع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف به صورت مزمن در بافت کلیه ..... ۵۶
شکل ۴-۱۳: میانگین توزیع بافتی آرتمیزینین در بافت های مختلف به دنبال تجویز تک دوز با دوزهای مختلف ..... ۵۹
شکل۴-۱۴: میانگین توزیع بافتی از آرتمیزینین در بافت های مختلف به دنبال تجویز مزمن با دوزهای مختلف ..... ۵۹

**فهرست جدول ها**

عنوان شماره صفحه

جدول ۲-۱: خصوصیات فارماکوکینتیک آرتمیزینین و مشتقات آن ..... ۲۰
جدول ۳-۱: دستگاه ها و وسایل مورد نیاز ..... ۳۴
جدول ۳-۲: مواد شیمیایی مورد استفاده ..... ۳۵
جدول ۳-۳: فرمول پیشدان که از ۱ تا ۲۴ روزگی مورد استفاده قرار می گرفت ..... ۳۶
جدول ۳-۴: فرمول میاندان که از ۲۵ تا ۴۴ روزگی مورد استفاده قرار گرفت ..... ۳۶
جدول ۳-۵: ماده دریافت شده توسط پرندگان در دسته تجویز تک دوز ..... ۳۷
جدول ۳-۶: میزان دارو دریافت شده توسط پرندگان در دسته مزمن ..... ۳۸
جدول ۴-۱: منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین در بافت های مختلف ..... ۴۸
جدول ۴-۲: توزیع بافتی آرتمیزینین در گروه های تجویز تک دوز..... ۴۹
جدول ۴-۳: توزیع بافتی آرتمیزینین در گروه های تجویز مزمن .....۴۹
جدول۴-۴: نتایج آزمون های آماری آنالیز واریانس در گروه های تجویز تک دوز جهت بررسی اختلاف تجمع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف ..... ۵۰
جدول ۴-۵: نتایج آزمون های آماری آنالیز واریانس در گروه های تجویز مزمن جهت بررسی اختلاف تجمع بافتی آرتمیزینین در دوزهای مختلف ..... ۵۱
جدول ۴-۶: نتایج آزمون های آماری آنالیز واریانس در گروه های تجویز تک دوز جهت بررسی اختلاف تجمع بافتی آرتمیزینین در بافت های مختلف ..... ۵۷
جدول ۴-۷: نتایج آزمون های آماری آنالیز واریانس در گروه های تجویز مزمن جهت بررسی اختلاف تجمع بافتی آرتمیزینین در بافت های مختلف ..... ۵۸

# فصل اول

## مقدمه

کوکسیدیوز یکی از شایعترین بیماری های صنعت پرورش طیور در اکثر نقاط دنیا و مهمترین بیماری انگلی در طیور به شمار می رود که سالیانه حدود ۲ میلیارد دلار خسارت را به صنعت پرورش طیور در جهان تحمیل می کند [۱۴۴]. علت بروز بیماری تکثیر نوعی انگل تک یاخته از جنس آیمریا است که باعث آسیب بافتی و به دنبال آن اختلال در فرآیند تغذیه و هضم غذایی، کم آبی، از دست دادن خون و افزایش حساسیت به سایر بیماری های عفونی از قبیل آنتریت نکروزان، بیماری سر سیاه، مارک و گامبرو می گردد [۱۰۴].

هر چند بیماری مربوط به طیور جوان است و به دنبال مواجهه با بیماری ایمنی به سرعت ایجاد می شود ولی بین گونه های مختلف انگل ایمنی متقاطع وجود ندارد [۱۰۴]. از سویی، ورود مستمر داروهای شیمیایی به طبیعت به دنبال استفاده گسترده آنها در خوراک دام و طیور و عوارض جانبی ناشی از مصرف این فرآورده های دامی از جمله نکات نگران کننده و محدود کننده برای بکارگیری داروهای شیمیایی در مبارزه با عوامل میکروبی و انگلی می باشد. بر این اساس در دهه های اخیر استفاده از روش های جایگزین از جمله کاربرد داروهای گیاهی مورد توجه محققین قرار گرفته است.

یکی از این انتخاب های جایگزین ماده آرتمیزینین (artemisinin) است که در گیاهان درمنه یافت می شود. این ماده یک سزکوئی ترپن لاکتون (sesquiterpene lactone) است که دارای یک پل اندوپراکسیدی است و بیشتر اثرات درمانی آن به همین پل اندوپراکسیدی مربوط است. گیاهان این سرده جزء پوشش بومی فلات ایران بوده و از دامنه های البرز تا دشت های جنوبی ایران می رویند. آرتمیزیاها در طب سنتی چین به عنوان داروی درمان کننده مالاریا، تب بر، آرامبخش، تقویت کننده معده، ضد اسهال، ضد کرمک و ضد آسکاریس کاربرد داشته اند. در طب سنتی ایران نیز این گیاهان به عنوان داروهای ضد انگل دستگاه گوارش به کار می رفته اند [۲]. گرچه عمده مصرف آرتمیزینین بر ضد مالاریاهای مقاوم به درمان است، لیکن برای اولین بار در

سال۱۹۹۷ اثرات ضد کوکسیدیائی آرتمیزینین موجود در گیاه درمنه توسط یک گروه از محققین در آمریکا اعلام گردیده است [۹]. مطالعات بعدی منجر به جداسازی و تعیین مقدار آرتمیزینین در بعضی از انواع درمنه از جمله درمنه بومی ایران، درمنه سیبری، گردید. چند مطالعه انجام شده درمورد اثرات فارماکولوژیک، فارماکوکینتیک و توکسیکولوژیک آرتمیزینین در برخی از حیوانات آزمایشگاهی، حاکی از آن است که این ماده می تواند بالقوه به عنوان یک داروی نسبتاً بی خطر در پیشگیری و درمان کوکسیدیوز طیور مطرح باشد. بیماری کوکسیدیوز را می توان یکی از مهمترین بیماری ها از نظر ایجاد ضایعات اقتصادی در صنعت طیور دانست. کنترل بیماری هم اکنون بیشتر بر پایه مصرف داروهای شیمیایی مختلف استوار است که غالباً به عنوان عوامل پیشگیری کننده به همراه غذای طیور مورد استفاده قرار می گیرند. این داروها هر چند باعث عدم بروز و شیوع کوکسیدیوز می شوند، لیکن به علت ایجاد فشار انتخابی و بروز مقاومت تدریجی در برابر آنها، استفاده از دارو های جدید و تحمل هزینه های قابل توجه را به دنبال دارند. از طرفی حضور این ترکیبات یا متابولیت های آنها در لاشه حیوانات یکی از دغدغه های مهم در جهت تأمین امنیت غذایی است. بدین خاطر یافتن ترکیبات جدید ضد کوکسیدیوزی با منشاء گیاهی می تواند از اهمیت بالائی برخوردار باشد. در این راستا ماده آرتمیزینین موجود در گیاه درمنه که هم اکنون به عنوان یک داروی ضد مالاریا مورد استفاده قرار می گیرد، می تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب مطرح باشد.

در مطالعات اولیه ای که توسط Arab و همکاران انجام گردیده نشان داده شده که عصاره درمنه بومی ایران یعنی درمنه سیبری *(Artemisia sieberi)*، ضمن اینکه حاوی مقدار مناسبی آرتمیزینین می باشد، بالقوه دارای اثرات ضد کوکسیدیائی نیز هست [۱۳]. در مطالعات بعدی، ضمن تولید گرانول آرتمیزینین از عصاره درمنه سیبری، اثرات ضد کوکسیدیوزی این گرانول در مقایسه با آرتمیزینین خالص نشان داده شد و در زمینه فارماکودینامی گرانول تولید شده نیز مطالعاتی انجام شده است [۶]. همچنین در مطالعه اخیر در زمینه توکسیکوپاتولوژی آرتمیزینین، گزارش شد که تجویز دوزهای بالای آرتمیزینین قادر به ایجاد عوارض برجسته بالینی یا پاتولوژیک در طیور گوشتی نبوده و این دوزهای بالا قابل تحمل برای جوجه های تحت آزمایش بوده است [۱۲]. یافته های هیستوپاتولوژیک حاصل از بررسی اثرات سمی دارو در طیور گوشتی، سمیت عصبی و زخم های میکروسکوپی متوسط تا شدید در کلیه، کبد و مغز را به دنبال تجویز آرتمیزینین به صورت تک دوز و مزمن در دوزهای مختلف نشان می دهد [۱۳،۱۰۹]. هدف از مطالعه حاضر بررسی توزیع بافتی آرتمیزینین در بافت های کبد، کلیه، مغز، ریه و طحال به دنبال تجویز دوزهای مختلف به صورت تک دوز و مزمن جهت تعیین رابطه بین اثرات سمی و تجمع بافتی در دوزهای مختلف می باشد.

# فصل دوم

## کلیات

### ۲-۱ درمنه

#### ۲-۱-۱ گیاه شناسی و انتشار جغرافیایی گیاه درمنه

آرتمیزینین یکی از ترکیبات شیمیایی گیاه درمنه می باشد. درمنه از رده ی گیاهان گلدار (گل ستاره ای)، نهاندانه، دولپه ای، پیوسته گلبرگ، از دسته ی تتراسیکلیک، راسته ی گل مینا، تیره ی راده، جنس آرتمیزیا می باشد. این گیاهان یا به صورت علفی و یک ساله یا دو ساله هستند، یا به صورت درختچه ای و پایا هستند. دارای اسانس معطر، برگ های متناوب و منشعب و گل آذین خوشه مانند هستند. گل های لوله ای به رنگ قهوه ای متمایل به زرد یا قرمز با جنسیت متفاوت دارند [۲]. گل های این گیاهان معمولا تلخ است [۳۹]. دارای میوه ی دوکی شکل و اغلب صاف می باشند. مهمترین گیاه این خانواده که در ایران می روید *آرتمیزیا سیبری* است. این گیاه از تیره ی کاسنی ها یا همان گل آفتابگردان است، بوی خاصی دارد و از علوفه ی مورد علاقه دام هنگام چرا به ویژه در مناطق کویری به شمار می آید. درمنه سیبری گیاهی بوته دار، سبز متمایل به خاکستری، بسیار پر شاخه، خوابیده بر خاک، به ارتفاع cm ۲۵-۲۰، دارای ریشه عمودی، چوبی و ضخیم که در انتها منشعب می گردد. ساقه ی آن محکم و سفت به تعداد کم یا بسیار متعدد، مورب و کاهی رنگ است. برگهای گیاه منشعب، خاکستری و پوشیده از کرک های نرم و گاهی اوقات بدون کرک می باشد. گل آن زرد رنگ است و در ماه های فروردین و اردیبهشت به گل می نشیند [۲].

گیاهان سرده ی درمنه دارای انتشار جهانی هستند و در گسترده ی وسیعی از آسیا، اروپا و آمریکا دیده می شوند. خاستگاه اصلی آنها در آسیا از شبه جزیره کامچاتکا تا سیبری، هند، چین و در اروپا از مدیترانه تا اسکاندیناوی می باشد. بعضی از گونه های آنها در سه چهارم از پوشش های گیاهی فلات ایران از دامنه البرز تا دشت های جنوبی ایران می رویند. در ایران تمامی گونه های درمنه با تفاوت در کمیت انتشار در نواحی مختلف یافت می شود و با نام های مختلفی چون گندواش یا درمنه خزری، برنجاسف کوهی، درمنه، خاراگوش چینی و ... شناخته می شوند. گونه درمنه سیبری در ایران در نواحی مهاباد، خمسه اراک، اردستان،

کاشان، ندوشن و چوپانان یزد، اردکان فارس، ماهان، گنبد، طبس، سبزوار، سمنان، دامغان، تهران، ورامین، مردآباد و مبارکه وجود دارد. این گیاه به صورت خودرو در مکان های مختلف از قبیل کنار جاده ها، مزارع و پرچین ها، زمین های بایر، تپه ها و گودال های خشک، و در کنار جویبارها و رودها رشد می کند. با توجه به نوع خاک هر منطقه و میزان بارش و شدت تابش آفتاب، تفاوت هایی در شکل، مواد شیمیایی و خواص دارویی گیاه در مناطق مختلف قابل انتظار است [۲]. شکل های ۲-۱ تا ۲-۴ به ترتیب آرتمیزیا آنوا و آرتمیزیا سیبری (متداول ترین آرتمیزیا در ایران) را نشان می دهند.

**شکل ۲-۱: بوته گیاه آرتمیزیا آنوا [۱۲۲]**

**شکل۲-۲: نمونه برگ گیاه آرتمیزیا آنوا [۱۲۲]**

**شکل۲-۳: بوته گیاه آرتمیزیا سیبری [۱۳۱]**

**شکل ۲-۴: نمونه برگ گیاه آرتمیزیا سیبری [۱۳۱]**

### ۲-۱-۲ تاریخچه استفاده از درمنه به عنوان گیاه داروئی

یکی از گیاهان خانواده درمنه، *Artemisia annua* یا Qinghao در زبان چینی است که در طب سنتی چین قدمتی بیش از ۲۰۰۰ سال دارد. لغت چینی دارای دو قسمت است: Qing به معنی رنگ سبز که برگرفته از برگ های سبز رنگ گیاه می باشد و hao که به معنای ساقه بلند می باشد[۴۰]. این گیاه به ویژه در درمان تب کاربرد داشته است [۹۹]. ولی کاربرد آن برای مدت ها منسوخ شده بود، تا اینکه با یافتن یک

کتاب به زبان چینی که در سال ۳۴۰ بعد از میلاد، تحت عنوان مرجع داروهای تجویز شده برای درمان فوری نوشته شده بود، در سال ۱۹۷۰ دوباره مورد توجه قرار گرفت. در این کتاب دستور تهیه چایی از برگهای خشک شده این گیاه برای درمان مالاریا آورده شده است. پس از آن آرمگاهی متعلق به سلسله ی پادشاهی ماوانگ دویی هان (Mawangudi) مربوط به ۲۰۰-۱۵۰ سال پیش از میلاد یافت شد که در آن متنی با عنوان ۵۲ نسخه دفن شده بود. یکی از راه های درمانی که در این نسخه ها به آن اشاره شده است، مصرف درمنه در درمان بواسیر است [۶۷]. گیاه درمنه تحت عنوان Caohao و تلخ مزه با طبیعت سرد توصیف شده است، و در درمان ساسهای پوستی، زخمهای دلمه بسته خارش دار، زخم های بدخیم، از بین بردن شپش ها، تسکین درد مفاصل و شفاف کردن چشمها پیشنهاد شده است. بر این اساس گیاه درمنه عمدتاً به صورت موضعی به عنوان یک داروی ضد انگل و برای ناراحتی های پوستی استعمال خارجی می شده است و یا به صورت خوراکی برای درمان بیماری های روماتیسمی گرم استفاده می شده است [۴۰].

اغلب گونه های گیاه درمنه مثل *آرتمیزیا ولگاریس (A. Vulgaris)* و *آرتمیزیا آبستنتیوم (A. obstentium)* به عنوان دفع کننده ی کرم مشهور هستند. وگاهی sweet worm woods یا sweet worm خوانده می شوند. علاوه بر آن گیاه درمنه به عنوان آرامبخش، محرک معده، ضد اسهال، قابض، اشتها آور، باز کننده مجاری عروق، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم و ضد حشره نیز در طب سنتی کاربرد داشته است [۴۰]. در طب سنتی ایران نیز این گیاهان به عنوان داروی ضد انگل های دستگاه گوارش کاربرد داشته اند که در کتاب مخزن الادویه می توان موارد مصرف آن را مشاهده نمود. در طب سنتی از قسمتهای هوایی گیاه به خصوص گل ها و برگهای آن استفاده می شود. برگها را معمولاً قبل از فصل گلدهی و سر شاخه گلدار آنها را در فاصله ماه های فروردین تا اردیبهشت که فصل سبزی و طراوت گیاه است چیده و خشک می کنند[۲،۴۰].

اولین گزارش از کاربرد درمنه برای درمان علائم مالاریا به کتابچه نسخه ها برای موارد ضروری نوشته ی جی هونگ بر می گردد که در سالهای ۳۴۰-۲۸۱ بعد از میلاد مسیح می زیسته است[۱۳۹].

در سال ۱۹۶۷ دانشمندان چینی در حین بررسی یکسری از درمان های سنتی بر روی اثرات دارویی، متوجه اثر قوی ضد مالاریایی عصاره درمنه شدند. در سال ۱۹۷۲ ماده مؤثر گیاه جداسازی و خالص گردید و در ابتدا Qinghaosu (عصاره Qinghao) و بعدها آرتمیزینین نامگذاری گردید و بر روی هزاران بیمار مبتلا به مالاریا با موفقیت آزمایش شد. در سال های ۱۹۸۰ مشتقات آرتمیزینین در چین به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفتند. با شیوع گونه های *پلاسمودیوم فالسی پاروم (Plasmodium falciparum)* مقاوم به درمان به ویژه در جنوب شرق آسیا توجه کشورهای غربی به این ماده آغاز شد [۸۸]. در سال های ۱۹۹۰ این ماده مورد توجه سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز قرار گرفت. ویتنام اولین کشوری بود که از آرتمیزینین برای درمان مالاریا استفاده کرد و توانست مشکل مالاریا را به خوبی کنترل کند. در سال های ۱۹۹۰ به بعد علاوه بر چین و ویتنام، آرتمیزینین در تایلند و برمه نیز به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفت [۸۸،۹۰،۱۳۷].

### ۲-۱-۳ ترکیبات شیمیایی گیاه

درمنه ها حاوی ترکیبات شیمیایی مختلفی هستند که ممکن است اثرات فارماکولوژیک آنها شناخته یا ناشناخته و یا فاقد اثر فارماکولوژیک باشند. از جمله مواد شیمیایی گیاه می توان به: آلکالوئیدها، تانن، تری ترپنوئیدها، استرول های غیر اشباع، فلانوئیدها، سانتونین، کومارین، سزکوئی ترپن لاکتون ها، ساپونین،

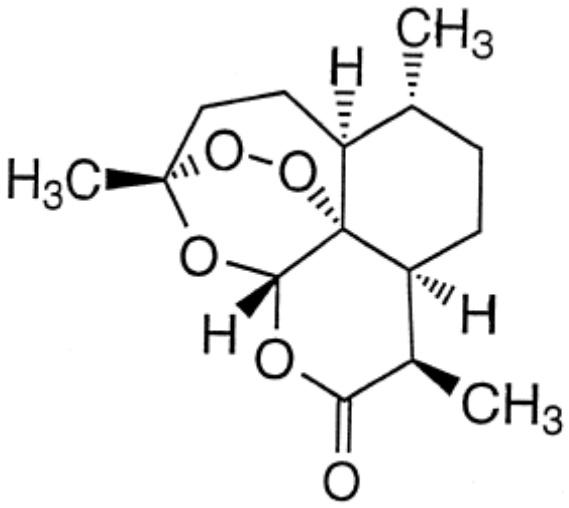
توجون، کولین، بتائین، گلیکوزیدها و قندهای احیاکننده مثل ساکاروز، اینولین اشاره کرد [۲،۴۰،۱۲۳،۱۴۸]. سزکوئی ترپن لاکتون ها ترکیباتی بالقوه آلرژی زا هستند که آرتمیزینین هم جزئی از آنهاست. گیاهان درمنه همگی معطر و حاوی اسانس های روغنی متشکل از مخلوط ترپن ها هستند که بیشترین غلظت آنها در گل های گیاه می باشد. میزان این اسانس ها در گونه های مختلف درمنه از ٪ ۰/۱۵ تا ٪ ۱ متغییر است. عامل معطر اصلی در درمنه، مونوترپن آرتمیزیا کتون (Monoterpene Artemisia ketone) است که با سایر مونوترپن ها همراه می باشد. این ترکیبات معطر ممکن است با ایجاد برخی اثرات ضد باکتریایی در استعمال جلدی مرتبط باشند و ممکن است در بروز اثر تنظیم کنندگی عصاره درمنه بر فعالیت کیسه صفرا نقش داشته باشند. از جمله ساختارهای روغنی با ساختار مونوترپنی می توان به این ترکیبات اشاره کرد: مونوترپن آرتمیزیا کتون، لینالول، ۱و۸ سینئول (اکالیپتول)، میرسن، پینن، کامفور، بورنئول که با کاریوفیلین که یک سزکوئی ترپن است همراه می شود [۵۱،۹۰،۱۳۷،۱۴۷]. از جمله فلانوئیدهای موجود در گیاه درمنه می توان به هیدروفلاونول، ۳و۴و۵ تری هیدروکسی-۷- متوکسی فلاونول، ۳و۴و۵تری هیدروکسی-۴و۶و۷تری متوکسی فلاوون و آرتمیتین اشاره کرد. عصاره استونی گیاه درمنه ترکیبات کریستاله مانند: آرتمیزیک اسید، آرتنون، هیدروآرتنون، آرتینوئینA و آرتینوئینB را دارا می باشد. عصاره اتانولی نیز حاوی: آرتمیزیک اسید متیل استر، آرتمیزینول و ترکیبات سزکویی ترپن می باشد. سزکویی ترپن ها از اجزای اصلی ترکیبات موجود در گیاه است که بر اساس ساختمان حلقه ای به سه گروه تقسیم می شوند: تک حلقه ای مانند آبسیسیک اسید، دو حلقه ای مانند کاتتن، سه حلقه ای های لاکتونی مانند سانتونین و آرتمیزینین، که سانتونین دارای خاصیت ضد کرم می باشد [۲،۴۰،۱۲۳،۱۳۹،۱۴۳].

## ۲-۲ آرتمیزینین و مشتقات آن

### ۲-۲-۱ مشخصات فیزیکی و شیمیایی آرتمیزینین

این ماده برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط محققان چینی از برگ و گل گیاه جدا شد که در ابتدا آنرا Qinghaosu یا عصاره Qinghao و بعدها آرتمیزینین نام نهادند. این ماده یکی از ترکیبات اصلی گیاهان خانواده درمنه و در واقع ماده فعال عصاره درمنه است[۹۰]. البته همه گیاهان سرده درمنه در تمامی شرایط رشد، آرتمیزینین تولید نمی کنند و ممکن است گیاهان یک منطقه اصلا دارای این ماده نباشند. به طور مثال غلظت آرتمیزینین در مورد A.annua رشد یافته در دمای $۲۰^{o}C$ و در حضور آب کافی، نسبت به همین گیاه که در دمای $۳۰^{o}C$ با آب کافی رشد یافته ٪۱۹ بیشتر بوده است. در شرایط کمبود آب آرتمیزیای رشد یافته در دمای $۲۰^{o}C$ به میزان ٪۱۰ آرتمیزینین بالاتری نسبت به گیاه رشد یافته در دمای $۳۰^{o}C$ داشته است. آرتمیزینین یک سزکویی ترپن لاکتون پایدار است که توسط حلال های با نقطه جوش پایین مثل دی اتیل اتر از گیاه جدا می شود [۱۰۰]. این ماده دارای یک گروه اندو پراکسید تری اکسان است که وجود این پل پر اکسید درونی برای فعالیت ضد مالاریایی دارو ضروری است چرا که فرم احیا شده آن داکسی آرتمیزینین فاقد اثرات ضد مالاریایی است [۷۴،۱۳۶،۱۳۷]. آرتمیزینین با خلوص بالا، پودر کریستالی سوزنی سفید تا زرد رنگ، بدون بوی خاص با طعمی بسیار تلخ، که در آب و روغن به سختی حل می شود ولی به راحتی در اتانول، هگزان و دی متیل سولفوکساید حل می شود. فرمول بسته این ترکیب $C_{۱۵}H_{۵}O_{۲۲}$، با نقطه ذوب $۱۵۲-۱۵۷^{o}C$، وزن مخصوص $۱/۲۴\pm۰/۱ gr/cm^{3}$ و جرم ملکولی ۲۸۲/۳۳۲gr/mol می باشد [۲،۱۳۴].

ساختار شیمیایی آرتمیزینین در شکل ۲-۵ نشان داده شده است. اخیراً به روش مهندسی ژنتیک یک مخمر طراحی گردیده که می تواند ماده اولیه ساخت آرتمیزینین به نام OZ.۲۷۷ یا آرتمیزیک اسید را تولید نماید، سپس این ماده با روش های شیمیایی به آرتمیزینین تبدیل می شود [۸۴،۱۰۲].




**شکل ۲-۵: ساختار شیمیایی آرتمیزینین [۱۷]**

## ۲-۲-۲ مشتقات آرتمیزینین

مطالعه بر روی اثرات ضد مالاریایی آرتمیزینین حتی در غلظت های نانو مولار و از طرف دیگر حلالیت کم آن در آب و چربی منجر به تولید مشتقات نیمه سنتتیک و سنتتیک آرتمیزینین گردید.

دانشمندان چینی نسل اول مشتقات نیمه سنتزی را تولید کردند [۱۸]. به دنبال احیای آرتمیزینین توسط سدیم بوروهیدراید به دی هیدرو آرتمیزینین حلقه لاکتون به اتر یا استر تبدیل می شود. مشتقات اتری شامل آرتیمیتر (Artemether)، آرتیتر (Arteether)، آرتلینیک اسید (Artelinic acid) و مشتق استری آرتزونات سدیم (Sodium artesunate) می باشد. آرتیمیتر و آرتیتر محلول در چربی و آرتلینیک اسید محلول در آب است [۱۸،۲۳]. آرتزونات سدیم و آرتیلینیک اسید دارای اثر قوی در از بین بردن شیزونت های خونی مالاریا هستند و در موارد شدید مالاریا به ویژه فرم مغزی آن داروی انتخابی به شمار می آیند. آرتلینیک اسید محلول در آب است در نتیجه سمیت کمتری نسبت به آرتزونات دارد و به دلیل نیمه عمر طولانی تر و غلظت پلاسمایی بالاتر در تجویز خوراکی، قدرت ضد مالاریایی بیشتری نسبت به آرتزونات سدیم و سایر داروهای نسل اول ایجاد می کند [۹۶].

برای حل مشکلات داروهای نسل اول اتری از جمله پایداری متابولیکی اندک، نیمه عمر کوتاه، فراهمی زیستی پایین و مقاومت کم در برابر اسید معده مشتقات نسل دوم آرتمیزینین ساخته شدند، که به لحاظ ساختاری به دو گروه تقسیم می شوند: یک گروه در موقعیت کربن شماره ۱۰ دارای یک گروه فعال استال هستند این گروه را آنالوگهای 10-Acetal نسل دوم می گویند. در گروه دوم اکسیژن خارج حلقه در موقعیت کربن شماره ۱۰ با کربن جایگزین شده که به این ترکیبات آنالوگ های 10-Carba نسل دوم می گویند. در گروه اول مشتقات 10-Phenoxy قرار دارند که از پایداری متابولیکی بالاتری برخوردارند. آنالوگ های Aza هم در گروه