

## بررسی اثر اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط *In vitro* و *In vivo*

دلشاد حسامی<sup>۱</sup>، فاطمه غفاری فر<sup>۲\*</sup>، عبدالحسین دلیمی اصل<sup>۳</sup>، وحید نصیری<sup>۴</sup>، عزت‌الله قاسمی<sup>۵</sup> و اوغل نیاز جرجانی<sup>۶</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

۳- استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- دانشجوی دکتر، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۶- استادیار، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

### چکیده

لیشمانیوز جلدی از بیماری‌های اندمیک و شایع در بعضی از نقاط کشورمان می‌باشد. استفاده از ترکیب‌های آنتی‌موان پنج ظرفیتی به‌عنوان داروهای خط اول درمان لیشمانیازیس جلدی همراه با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعدد است. داروهایی با منشأ گیاهی می‌توانند جایگزین مناسبی باشند. به همین منظور در این پژوهش تأثیر اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) که از گیاهان بومی کشور است بر رشد لیشمانیای ماژور در شرایط *in vitro* و *in vivo* بررسی شد. ابتدا اسانس بنه با رقت‌های ۱/۵۰ تا ۱/۳۲۰۰ بر پروماستیگوت‌های لیشمانیای ماژور، ماکروفاژهای غیر آلوده و ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت انگل در شرایط *in vitro* با آزمون‌های MTT و فلوسایتومتتری بررسی شد. میزان دوز مؤثر IC<sub>50</sub> بر روی پروماستیگوت‌های سوش استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER)، مشخص گردید. اسانس بنه به‌صورت پمادی برای درمان استفاده شد. سپس موش‌های نژاد BALB/c به ۳ گروه ۵تایی تحت درمان با اسانس بنه به‌صورت پمادی و گروه درمان با گلوکانتیم به‌صورت تزریقی و گروه کنترل بدون درمان چهار هفته درمان، یک‌بار در روز در یک زمان مشخص انجام شد و برای بررسی میزان تأثیر دارو هر هفته قطر زخم، وزن موش‌ها و میزان مرگ و میر موش‌ها بررسی شد. به‌طوری که اسانس به‌صورت پمادی از افزایش قطر زخم‌ها جلوگیری کرد. نتایج فلوسایتومتتری نشان داد که بنه توانست در ۱۰٪ پروماستیگوت‌ها ایجاد آپوپتوز کند. نتایج بدست‌آمده نشان داد اسانس بنه در از بین بردن لیشمانیای ماژور در ماکروفاژ و محیط کشت فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد. همچنین میزان بقاء موش‌هایی که تحت درمان قرار گرفتند با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.)، شرایط آزمایشگاهی، موش BALB/C.

## مقدمه

لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*)، به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، عامل بیماری سالک روستایی (سالک نوع حاد و مرطوب) می باشد. مصونیت نسبت به این بیماری با بهبود ضایعات کامل می گردد و درمان آن نیز تا حدودی با داروهای شیمیایی، اقدامات فیزیکی و اعمال جراحی امکان پذیر است. مطالعات انجام شده مؤید آن است که لیشمانیا ماژور در اغلب نقاط جهان و ایران شایع بوده و شاید تنها راه گشای این مشکل، تهیه داروی مؤثری می باشد که دارای کمترین اثرهای جانبی و بهترین اثر تقویت کنندگی را روی سیستم دفاعی بدن داشته باشد (Alvar et al., 2012). لیشمانیا ماژور عامل بیماری سالک جلدی حاد و جزء بیماری های منتقل شده از حیوان به انسان است (Sacks, 1989؛ Handman et al., 1983؛ King & Turco, 1988؛ Kink & Chang, 1987).

درمان سالک موضوعی بحث انگیز است، به طوری که گاهی درمان آن را ضروری می دانند و گاهی از درمان آن اصولاً چشم پوشی می کنند و آن را به حال خود می گذارند تا مسیر طبیعی خود را طی کند و بهبودی خود به خود حاصل شود. بنابراین درمان به عوامل متعددی مانند تعداد زخم های سالک، مدت زمان پیدایش زخم ها، محل زخم ها و شرایط سنی، جنسی، اجتماعی و غیره بستگی دارد. در مناطقی که بیماری به صورت اندمیک وجود دارد، چنانچه زخم در صورت (یا مناطق باز بدن) نباشد که به زیبایی شخص صدمه بزند، در صورتی که بتوان آن را از عفونت های ثانویه محفوظ نگه داشت، بهتر است از درمان خودداری نمود تا پس از بهبودی، بیمار نسبت به عفونت دوباره مصون شود. اما در مناطق غیر اندمیک بیماران را می توان درمان نمود (Meshnick, 2002).

بیماری لیشمانیوز جلدی، سالهاست که مورد مطالعه پژوهشگران قرار گرفته است. این بیماری از جمله بیماری های بومی کشور ما ایران است و در مناطقی از این سرزمین، به صورت هیپراندمیک وجود دارد. در این بیماری پس از گزش حشره و گذشتن دوره کمون، ضایعات قرمز

رنگ ظاهر می شود و پس از مدتی زخم شده در نهایت خود به خود بهبود می یابد و از خود جوشگاهی باقی می گذارد، اما همیشه سیر بیماری به صورتی که گفته شد طی نمی شود و گاهی زخم به صورت مزمن سالها باقی می ماند و مشکلات متعددی را برای بیمار ایجاد می نماید. این بیماری دارای یک طیف وسیع بالینی است که از یک زخم ساده خود به خود بهبود یابنده تا لیشمانیوز جلدی حاد، لیشمانیوز جلدی منتشره، لیشمانیوز احشایی و لیشمانیوز جلدی - مخاطی را شامل می شود.

داروی گیاهی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت اسانس بنه با نام علمی *Pistacia atlantica* می باشد (Bozorgi et al., 2013؛ Pourreza et al., 2008). این وارسته در ایران در استان های کهگیلویه و بویراحمد، کرمان (شاه کوه، کوه جبال بارز)، سیستان و بلوچستان (۱۳ کیلومتری جنوب غرب نصرت آباد، کوه تفتان) و همچنین نواحی مختلف استان هرمزگان می روید (Zakizadeh et al., 2011). ارتفاع این گیاه به ۷ تا ۹ متر می رسد. اگرچه آمار دقیقی از تعداد درختان بنه در بانه موجود نیست اما تعداد آنها بین ۱۰ تا ۲۰ هزار اصله تخمین زده شده است. روغن پسته وحشی به طور متوسط ۵۹٪ چربی دارد و غنی از اسیدهای چرب غیراشباع بوده که اسیدهای چرب غیراشباع آن شامل: اسید اولئیک (۶۹٪)، اسید لینولئیک (۱۷٪)، اسید پالمیتیک (۹/۶٪)، اسید استئاریک (۱/۳٪) و اسید پالمیتولئیک (۳/۱٪) می باشد (Handman et al., 1983).

مطالعات قبلی نشان داده اند که آلکالوئیدهای مشتق از گیاهان دارویی شامل ترین و فنول خاصیت ضدانگلی دارند. در مطالعه Kayser و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده شده که گیاه بنه شامل مونوتترین و تری ترین است. در مطالعات انجام شده توسط Yousefi و همکاران (۲۰۰۹) و Tabatabaai و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از عصاره دو گیاه فریفون (*Euphorbia mysinites*) و ابوخلسا (*Alkanna tinctoria*) که هر دو حاوی ترین می باشند بر روی انگل لیشمانیا خواص ضدلیشمانیایی خوبی از خود نشان داده اند. به همین

ظرف حاوی انگل اضافه شده و در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این محیط در شرایط عادی به دلیل اینکه حاوی "قتل رد" می‌باشد، قرمز رنگ است و با رشد و تکثیر انگل و تنزل pH به دلیل آزاد شدن متابولیت‌های انگل به رنگ زرد در می‌آید. در چنین حالتی برای جلوگیری از اُفت انگل باید آن را به محیط تازه پاساژ داد. برای مشاهده انگل‌ها، بهتر است از میکروسکوپ معکوس استفاده نمود تا خطر آلودگی کاهش یابد. در هر بار پاساژ به روش گفته شده فوق، از محیط نمونه‌برداری شد و رشد انگل‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از این انگل‌ها در مرحله ایستا، می‌توان برای تزریق به موش به مدت طولانی استفاده نمود.

آماده‌سازی پماد: ۰/۱ گرم از اسانس بنه همراه با ۱ گرم وازلین روی زخم به صورت درمان موضعی استفاده شد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها  
این آزمون بر پایه ممانعت یا مهار رشد تعداد مشخصی انگل زنده و فعال لیشمانیا ماژور به فرم پروماستیگوت (تعداد اولیه  $2 \times 10^6$  پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف اسانس بنه در طی مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در سه پلیت جداگانه و به صورت تری‌پلیت در درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد پی‌ریزی شده است. در ضمن چون اسانس بنه بوی بسیار تندی دارد پروماستیگوت‌هایی که با اسانس بنه مجاور شد در میکروتیوپ کشت داده شد و اسانس بنه با DMSO و PBS رقیق شد. اسانس به صورت مساوی با DMSO مخلوط شد و اسانس بنه با رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰ و ۱/۳۲۰۰ تهیه شد و در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط  $20\% \text{FCS} + \text{RPMI} 1640$  حاوی انگل به تعداد  $2 \times 10^6$  به چاهک‌ها اضافه گردید (ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای رقیق‌سازی اسانس بنه را انجام داده‌ایم). لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده است و پلیت اول را به مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به مدت ۷۲ ساعت

دلیل بود که در این تحقیق نیز از اسانس گیاه *Pistacia atlantica* برای درمان لیشمانیازیس ناشی از لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی و موش BALB/c استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

### انگل لیشمانیا ماژور

سویه انگلی که برای این تحقیق انتخاب گردید (MHRO/IR/75/ER) سویه‌ای از لیشمانیا ماژور است که توسط آقای دکتر ندیم از رومومیس در منطقه اصفهان جدا شد و هم اکنون در ایران برای تهیه لیشمانین و واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد و توسط مؤسسه‌های مربوطه، به صورت زنده در برودت بسیار پایین و یا به صورت پاساژهای سریال، در محیط کشت و موش BALB/c نگهداری می‌شود.

### حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این تحقیق از موش‌های آزمایشگاهی خالص از نوع BALB/c استفاده گردید. موش‌ها همگی ماده بوده و در سنین ۶ تا ۸ هفتگی مورد استفاده قرار گرفتند. این موش‌ها از مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، واقع در مؤسسه تحقیقات رویان تأمین شده و در مرکز نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

### شرایط *in vitro*

نحوه کشت انگل لیشمانیا ماژور: انگل از دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج و در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید. به این ترتیب محیط یخ زده انگل، به صورت مایع درآمد. برای حصول اطمینان از زنده بودن انگل، در کنار شعله، با استفاده از سوآپ استریل و در زیر هود، یک قطره از محیط جدا و در زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ مشاهده گردید. سپس برای کشت از محیط  $\text{GIBCO}^{\circledR} \text{RPMI} 1640$  Media که با ۲۰٪ سرم جنین گوساله (Fetal Bovine Serum (FBS) GIBCO) غنی شده است استفاده شد که به

در انکوباتور ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده است. همچنین در هر پلیت ۳ چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط فاقد هیچگونه دارویی بود که این چاهک به‌عنوان کنترل آزمون است. همچنین در هر پلیت در ۳ چاهک آموتریسین و در ۳ چاهک دیگر گلوکانتیم با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان دارو اضافه شد تا اثر اسانس بنه با این دو دارو مقایسه و ارزیابی شود.

۷۲ ساعت در انکوباتور  $25^{\circ}\text{C}$ -۱۸ قرار داده شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک مقدار  $20\ \mu\text{l}$  از محلول MTT اضافه گردید. پلیت‌ها دوباره به مدت ۴ ساعت در انکوباتور  $18^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $1000\ \text{g}$  سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد، به‌طوری که سلول‌ها در ته پلیت ته‌نشین شدند. به هر چاهک مقدار  $100\ \mu\text{l}$  از DMSO اضافه گردید. جذب حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. نتایج آزمایش به‌صورت OD محاسبه گردید.

آزمایش MTT بر روی ماکروفاژها (برای بررسی سمیت دارو بر سلول)

دقیقاً به روش کشت پروماستیگوت‌ها انجام شد، فقط بجای انگل از لاین سلولی 774J ماکروفاژ به همان تعداد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵٪ گاز  $\text{CO}_2$  استفاده شد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از ماکروفاژها (حاوی  $10^4 \times 5$ ) بر روی لامل‌های استریل که درون پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت قرار داده شده بود ریخته شد. لامل‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ گاز  $\text{CO}_2$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا ماکروفاژها به کف پلیت بچسبند. پس از این مدت به‌منظور حذف ماکروفاژهایی که نجسبیده‌اند در زیر هود و کنار شعله محلول رویی برداشته و با RPMI یک‌بار شستشو داده شد. سپس پروماستیگوت‌هایی که در مرحله ایستایی بودند به تعداد ۷ تا ۱۰ برابر ماکروفاژ به هر چاهک به میزان ۲۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ گاز  $\text{CO}_2$  به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند تا انگل وارد ماکروفاژ شود. پس از این مدت به‌منظور حذف انگل‌هایی که وارد ماکروفاژ نشده‌اند در زیر هود و کنار شعله محلول رویی برداشته شده و با RPMI یک‌بار شستشو داده شد. آنگاه اسانس بنه با رقت‌های  $1/50$ ،  $1/100$ ،  $1/200$ ،  $1/400$ ،  $1/800$ ،  $1/1600$

اندازه‌گیری میزان بقاء انگل با انجام آزمایش MTT (3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-) MTT آزمایش (diphenyle tetrazolium bromide) نسبت به سایر روش‌های بررسی پرولیفراسیون سلولی ساده‌تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجراست. به‌علاوه اینکه کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر قرائت می‌شود، از این رو تعداد زیادی نمونه را می‌توان همزمان آزمایش کرد.

آزمایش MTT قادر به عبور از غشای سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، حلقه تترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کنند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. هدف از این آزمایش تعیین دوز آنتی‌ژن و بدست آوردن حداکثر پرولیفراسیون در آزمایش‌های *in vitro* است.

آزمایش MTT بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در سه پلیت به‌صورت جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول RPMI 1640 و ۲۰٪ FCS حاوی  $2 \times 10^6$  پروماستیگوت به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه شد.

در یک چاهک از ۲۰۰ میکرولیتر RPMI 1640 + FCS 20٪ به‌عنوان کنترل استفاده شد. از اسانس بنه با رقت‌های مختلف از  $1/50$  تا  $1/3200$  تهیه و در هر چاهک به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پلیت‌ها به مدت

۲ هفته به زخم تبدیل شد. برای اطمینان از وجود انگل لیشمانیا در زخم، از روش نمونه برداری استفاده و با لام مستقیم در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. پس از ایجاد زخم درمان موش‌ها شروع شد.

برای درمان موش‌ها از اسانس بنه به صورت پماد موضعی استفاده گردید. روش کار بدین شرح بود.

موش‌ها به ۳ دسته ۵ تایی به تقسیم شدند:

۱- گروه شاهد آلوده بدون درمان

۲- گروه تحت درمان با پماد بنه

۳- گروه تحت درمان با تزریق گلوکانتیم

در طول درمان و چند هفته پس از درمان قطر زخم موش‌ها به صورت هفتگی با کولیس اندازه‌گیری شد. پس از چند هفته ۲ موش از هر گروه را کشته و برای بررسی بار انگلی از طحال موش‌ها رقت تهیه و به صورت هفتگی تعداد پروماستیگوت‌های رشد کرده شمارش شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین متغیرهای مورد مطالعه در گروه‌های مختلف از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way Analysis of Variance) استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون تعقیبی (Post Hoc Test) توکی (Tukey) استفاده گردید. از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک‌نمونه‌ای (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ استفاده گردید و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### نتایج

##### نتایج *in vitro*

بررسی نتایج تأثیر اسانس بنه بر روی آماستیگوت‌های

##### *L. major* در شرایط *In vitro*

نتایج آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک نمونه‌ای نشان‌دهنده آن است که فرض نرمال بودن برای ماکروفاژهای

و ۱/۳۲۰۰ میکرولیتر تهیه و به هر لامل اضافه شد. این کار برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد. لامل‌ها برای ۲۴ ساعت انکوبه و بعد توسط پنس از چاهک‌ها خارج شدند. سپس سطح آنها توسط متانول فیکس و با گیمسا به نسبت (۱ به ۵) رنگ‌آمیزی شد. لامل‌ها در پایان به منظور شمارش تعداد ماکروفاژ آلوده به انگل و تعداد آماستیگوت‌های موجود در هر ماکروفاژ در تعداد ۱۰۰ ماکروفاژ بررسی شد و شاهد منفی (ماکروفاژ و انگل بدون دارو) و شاهد مثبت (ماکروفاژ و انگل درمان شده با گلوکانتیم) تعیین گردید.

##### بررسی مرگ سلولی به وسیله فلوسایتومتری

سلول‌های مواجه شده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی و اسانس بنه و همچنین سلول‌های کنترل توسط محلول PBS خنک در ۱۴۰۰g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ و شسته شد. برای اطمینان بیشتر از خارج شدن محیط RPMI۱۶۴۰ این عمل یک بار دیگر انجام شد. مطابق پروتکل به سلول‌های ته‌نشین شده ۵μl محلول Annexin-V و ۵μl از محلول PI اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. شدت رنگ Propidium و Annexin-V جذب شده به سلول‌ها توسط دستگاه BDFACSCantoII Flow cytometer بررسی شد. نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo تجزیه و تحلیل شد.

##### شرایط *in vivo*

روش آلوده‌سازی و درمان موش‌های BALB/c با انگل لیشمانیا ماژور

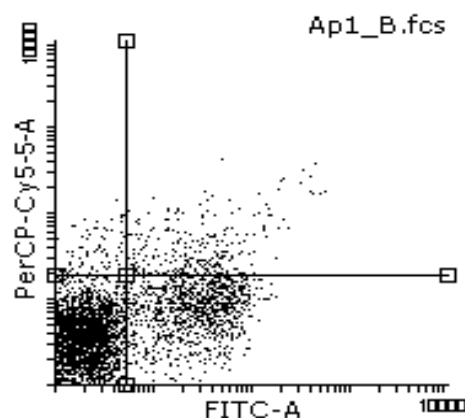
سویه انگلی که برای این تحقیق انتخاب گردید (MRHO/IR/75/ER) سویه‌ای از لیشمانیا ماژور است که توسط آقای دکتر ندیم از رومومیس در منطقه اصفهان جدا شد. ۰/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی انگل که حاوی ۲×۱۰<sup>۶</sup> پروماستیگوت را که در مرحله ایستا بود به صورت زیرجلدی، به کمک سرنگ انسولین، در ناحیه قاعده دم موش‌ها تزریق شد. پس از گذشت ۳۵ روز از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل پدید آمد که پس از حدود

## نتایج بررسی فلوسایتومتری

نتایج بررسی فلوسایتومتری بنه در غلظت ۱/۳۲۰۰ بر روی پروماستیگوت‌های لیسمانیا مازور نشان داد که ۱۰/۱۰٪ انگل‌ها دچار آپتوز اولیه ۲/۵۸٪ دچار آپتوز ثانویه و ۱/۰۹٪ دچار نکروز شده‌اند (شکل ۱).

آلوده (P=69%) و آماستیگوت (P=59%) در غلظت‌های مختلف برقرار است. نتایج استفاده از اسانس بنه در میانگین تعداد ماکروفاژهای آلوده بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ). قابل ذکر است که در اثر اسانس بنه در کلیه غلظت‌ها تمام آماستیگوت‌ها از بین رفته بودند.

	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	86.23
Right Bottom	10.10
Left Top	1.09
Right Top	2.58



شکل ۱- نتایج فلوسایتومتری با اسانس بنه با رقت ۱/۳۲۰۰ نشان‌دهنده ۲۳/۸۶٪ انگل زنده، ۱۰/۱۰٪ آپتوز اولیه، ۱/۰۹٪ نکروز و ۲/۵۸٪ آپتوز ثانویه

جدول ۱- تأثیر اسانس بنه بر روی پروماستیگوت‌ها در آزمون MTT

درصد بازدارندگی	انحراف معیار $\pm$ میانگین	غلظت اسانس بنه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۸۴	$0.11 \pm 0$	۱/۵۰
۸۳	$0.12 \pm 0.01$	۱/۱۰۰
۸۱	$0.13 \pm 0$	۱/۲۰۰
۷۸	$0.15 \pm 0.01$	۱/۴۰۰
۷۷	$0.16 \pm 0$	۱/۸۰۰
۷۶	$0.17 \pm 0$	۱/۱۶۰۰
۷۵	$0.18 \pm 0$	۱/۳۲۰۰
۰	$0.71 \pm 0$	کنترل
۶۹	$0.22 \pm 0$	گلوکانتیم
۷۶	$0.17 \pm 0$	آمفو تریسین

اختلاف تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

نتایج *in vivo*

## نتایج حاصل از گروه‌های مورد مطالعه

در گروه شاهد بیشتر موش‌های شاهد بیمار تا پایان روز ۶۰ (در پایان روز ۶۰ برای سنجش میزان بار انگلی کشته شدند و طحال جدا گردید) مردند. بدین ترتیب که درمان به مدت ۲۸ روز متوالی در زمان معین و هر روز انجام شد و بعد برای سنجش بار انگلی از هر گروه دو موش انتخاب شد و موش‌های انتخاب شده برای سنجش بار انگلی کشته شدند. اما موش‌های باقی‌مانده از گروه شاهد بیمار پس از یک هفته مردند. گروه پمادی بنه در مقایسه با گروه شاهد بیمار و گروه‌های تحت درمان از نظر میانگین قطر زخم و میانگین وزن اختلاف معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ). در گروه شاهد، میانگین قطر زخم پیوسته در حال افزایش و میانگین وزن هم در طی ۶۰ پایش کاهش چشمگیری داشت (جدول ۳).

نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بنه روی پروماستیگوت‌های لیسمانیای ماژور به‌نحوی بود که تمام پروماستیگوت‌ها تحت تأثیر اسانس بنه در کلیه غلظت‌ها از بین رفتند.

## نتایج آزمون MTT

درصد کشندگی غلظت‌های مختلف اسانس بنه با غلظت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰ و ۱/۳۲۰۰ بر روی پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای (غیر آلوده) ۷۲ ساعت پس از کشت در جدول‌های ۱ و ۲ شرح داده شده است ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲- تأثیر اسانس بنه بر روی ماکروفاژ با استفاده از آزمون MTT

درصد بازدارندگی	انحراف معیار $\pm$ میانگین میزان جذب	غلظت اسانس بنه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۸۸	$0.08 \pm 0$	۱/۵۰
۸۷	$0.09 \pm 0$	۱/۱۰۰
۸۶	$0.10 \pm 0$	۱/۲۰۰
۸۶	$0.10 \pm 0$	۱/۴۰۰
۸۵	$0.11 \pm 0$	۱/۸۰۰
۸۴	$0.11 \pm 0$	۱/۱۶۰۰
۸۴	$0.12 \pm 0$	۱/۳۲۰۰
۰	$0.75 \pm 0.15$	کنترل
۴۸	$0.39 \pm 0$	گلوکانتیم
۵۳	$0.35 \pm 0$	آمفوتریسین

اختلاف تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار تغییرات قطر زخم ناشی از آلودگی به لیشمانیای ماژور

در موش‌های کنترل بدون درمان و تحت درمان

گروه	گروه تزریقی	گروه کنترلی	تحت درمان با اسانس
هفته	گلوکانتیم	(بدون درمان)	بنه به صورت پمادی
اول	۴/۲۸±۰/۵۵	۳/۶۷±۰/۸۸	۴/۱۳±۰/۲۵
دوم	۴/۲۹±۰/۵۵	۵/۴۹±۰/۹۱	۴/۱۳±۰/۲۵
سوم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۷/۵۱±۰/۶۷	۴/۱۴*±۰/۲۵
چهارم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۸/۷۱±۰/۴۱	۴/۱۴*±۰/۲۵
پنجم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۹/۹۳±۰/۸۳	۴/۱۴*±۰/۲۵
ششم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۱۲/۲۲±۰/۵۶	۴/۱۴*±۰/۲۵

\*، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

## بحث

مهمترین درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیوز بکار می‌رود، ترکیب‌های ۵ ظرفیتی آنتی‌موان هستند که شامل سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) و مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) می‌باشد. این ترکیب‌ها بیش از یک قرن است که برای درمان لیشمانیوز بکار رفته‌اند و هنوز هم داروی اول در درمان این بیماری محسوب می‌شوند. ولی چون مواردی از این بیماری به این داروها مقاوم بوده و به درمان پاسخ نمی‌دهند و از سویی به علت وجود عوارض متعدد دارو، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریعتر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را هم داشته باشد و پس از بهبودی جوشگاهی بر جای نگذارد، ادامه دارد. درمان‌های مختلفی مانند سرما درمانی، گرما درمانی، استفاده از داروهایی مثل داپسون، ریفامپیسین، کتوکونازول، پارومومایسین موضعی، آمیتین، مپاکرین، آمفوتریسین B و آلوپورینول و غیره برای این بیماری پیشنهاد شده است، اما هیچکدام از این موارد روش درمان قطعی نمی‌باشند. مطالعات قبلی بر روی گیاهان دارویی دارای فرآورده‌های آلکالوئیدی شامل ترین نشان داده که دارای

خاصیت ضد لیشمانیایی می‌باشند. گیاهانی مانند فریبون (*Euphorbia mysinites*) و ابوخلسا (*Alkanna tinctoria*) که دارای آلکالوئید تری‌ترین می‌باشند هر دو دارای خواص ضد لیشمانیایی بوده (*Tabatabaï et al.*, 2005؛ *Yousefi et al.*, 2009) و این مطالعه نیز که شامل اسانس بنه و حاوی مونوترپن و تری‌ترین است نشان داد که دارای خواص ضد لیشمانیایی بوده و می‌تواند در درمان لیشمانیا مؤثر باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش قطر زخم برای موش‌های درمان شده با بنه مشابه کاهش قطر زخم برای موش‌های درمان شده با گلوکانتیم می‌باشد و قطر زخم از هفته سوم با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد که این امر بیانگر قدرت بالای اسانس بنه برای درمان زخم موش‌های BALB/c ناشی از لیشمانیا ماژور است.

نتایج بررسی آپویتوز و نکروز با روش فلوسایتومتری نشان داد که آپویتوز ایجاد شده در پروماستیگوت‌ها بیش از ۱۰٪ می‌باشد که این درصد برای نکروز ۱٪ بود، بنابراین استفاده از اسانس بنه علاوه بر از بین بردن انگل لیشمانیا کمترین التهاب را ایجاد می‌کند.

با توجه به اثرهای سایتوتوکسیک بیشتر داروهای



- tropica*. Molecular and Biochemical Parasitology, 7(2): 111-126.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and Croft, S.L., 2003. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitology Research, 90(2): 55-62.
  - King, D.L. and Turco, S.J. 1988. A ricin agglutinin-resistant clone of *Leishmania donovani* deficient in lipophosphoglycan. Molecular and Biochemical Parasitology, 28(3): 285-293.
  - Kink, J.A. and Chang, K.P., 1987. Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana amazonensis*: expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(5): 1253-1257.
  - Meshnick, S.R., 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. International Journal for Parasitology, 32(13): 1655-1660.
  - Pourreza, M., Shawb, J.D. and Zangeneh, H., 2008. Sustainability of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in Zagros forests, Iran. Forest Ecology and Management, 255: 3667-3671.
  - Sacks, D.L., 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania promastigotes*. Experimental Parasitology, 69(1): 100-103.
  - Tabatabaie, F., Ghaffarifar, F. and Dalimi A., 2005. Effects of new herbal formulation of *Euphorbia mysinites*, *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* combination against experimental leishmaniasis in BALB/c mice. Medical Daneshvar Journal, 57: 37-46.
  - Yousefi, R., Ghaffarifar, F. and Dalimi, A., 2009. The effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* extraction on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iranian Journal of Parasitology, 4(1): 40-47.
  - Zakizadeh, M., Nabavi, S. and Ebrahimzadeh, M., 2011. In vitro antioxidant activity of flower, seed and leaves of *Alcea hyrcana* Grossh. European review for Medical and Pharmacological Sciences, 15(4): 406-412.

بکار رفته علیه لیشمانیازیس که اکثراً تزریقی هستند، جایگزین کردن این داروها با داروهایی که منشأ گیاهی داشته و بومی کشورمان باشند از اهداف این تحقیق بود. درمان با استفاده از اسانس بنه در لیشمانیوز جلدی به صورت پماد می‌باشد، بنابراین از روش‌های تهاجمی تزریقی استفاده نمی‌شود و کارایی آن نیز مشابه داروی گلوکانتیم است. بنابراین با انجام تحقیقات بیشتر اسانس بنه می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروی گلوکانتیم باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از اعضای محترم گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر را دارند (بودجه این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است).

### منابع مورد استفاده

- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. and den Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One, 7(5): e35671.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R. and Rahimi, R., 2013. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk* and *P. lentiscus*): A Review of their traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World: 33p.
- Handman, E., Hocking, R.E., Mitchell, G.F. and Spithill, T.W., 1983. Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania*

## A study on the effects of *Pistacia atlantica* Desf. essential oil on *Leishmania major* in vitro and in vivo

D. Hesami<sup>1</sup>, P. Ghaffarifar<sup>2\*</sup>, A. Dalimi Asl<sup>1</sup>, V. Nasiri<sup>3</sup>, E. Ghasemi<sup>4</sup> and O.N. Jorjani<sup>5</sup>

1- Parasitology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2\*- Corresponding author, Parasitology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
E-mail: ghafarifar@modares.ac.ir

3- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4- Ph.D. student, Parasitology Department, Faculty of Medical Sciences, Dezfoul University of Medical Sciences, Dezfoul, Iran

5- Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Received: May 2018

Revised: October 2018

Accepted: October 2018

### Abstract

Cutaneous leishmaniasis is one of the endemic and common diseases in many parts of our country. The use of pentavalent antimony compounds as first-line drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis have several limitations and side effects. Hence the herbal drug can be good alternatives. In the present study, the effect of essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. on the growth of *Leishmania major* was investigated in *in vivo* and *in vitro* conditions. Initially, the essential oil of *Pistacia atlantica* with dilution of 1:50 to 1:3200 was evaluated on the promastigotes of *Leishmania major*, non-infected macrophages, and infected macrophages with amastigotes, in *in vitro* with MTT and flow cytometry tests. Also, the IC<sub>50</sub> of the essential oil on the promastigotes of the *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) was calculated. The ointment of *Pistacia atlantica* essential oil was used for treatment in *in vivo* condition. BALB /c mice were divided into three groups and in each group five mice including treated group with ointment of essential, treated group with glucantime and non-treated control group. The treatment was performed daily and once a day for four weeks. To assess the effect of the drugs, the wound diameter and weight and the mortality rate of the mice were measured every week. The ointment of *Pistacia atlantica* essential oil could inhibit the wounds diameter caused by *Leishmania major*. The flow cytometry results showed that *Pistacia atlantica* essential oil could create 10% apoptosis in the treated promastigotes. Overall, *Pistacia atlantica* essential oil was effective in eliminating the amastigotes of *Leishmania major* in the macrophages and culture media, and also the survival rate differences of treated mice and control group were significant.

**Keywords:** *Leishmania major*, *Pistacia atlantica* Desf. essential oil, in vitro, BALB/c mouse.