Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

ORIGINAL ARTICLE

In vitro Anti Leishmanial Effect of Agrostemma githago Extract on Leishmania Major Promastigotes by Cell Count and MTT Assay

Ali Niapour[1],
Shahab Bohlooli[2],
Marzieh Sharifi Pasandi[3],
Behnam Mohammadi-ghalehbin[4]

[1] Associate Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[2] Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[3] MSc in Biochemistry Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Medical Parasitology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received February 5, 2018 ; Accepted June 25, 2018)

Abstract

Background and purpose: Treatment of leishmaniasis is getting complicated due to multiple side effects and drug resistance to first-line drugs. *Agrostemma githago* is a plant with anti-cancer and cytocidal effects, so, this study was conducted to evaluate the anti leishmanial effect of its extract on *Leishmania major* promastigotes by MTT assay and cell count.

Materials and methods: A total of 2.5×10^6 *Leishmania major* promastigotes in their stationary phase were plated to each well of the 96 well culture plates. Cells were then incubated with increasing concentrations of *Agrostemma githago* extract (0.05 – 2.4 mg/ml) for 48 hours at 25°C. Glucantim was used as standard control. Then, the supernatants were discarded and 50 µl of MTT were added for 3 hours. After centrifuge, the supernatants were replaced by 100 µl of DMSO. The plate was read by ELISA reader at 570 nm. Trypan blue staining was also performed to evaluate the effect of *Agrostemma githago* extract on *Leishmania major* promastigotes.

Results: MTT assay showed that increasing concentrations of Agrostemma extract could significantly reduce cell viability of *Leishmania major* promastigots in a dose dependent manner ($p<0.05$). IC_{50} of the Agrostemma and Glucantime were 0.365 and 71.01 mg/ml, respectively.

Conclusion: Aqueous extract of *Agrostemma githago* was found to have stronger inhibitory effect than Glucantim on *Leishmania major* promastigots.

Keywords: leishmania major, *Agrostemma githago*, MTT assay

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (165): 13-23 (Persian).

*** Corresponding Author: Mohammadi-ghalehbin B -** School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran (E-mail: b.mohammadi@arums.ac.ir)

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۴۵ مهر سال ۱۳۹۷ (۲۳-۱۳)

بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره سیاه تخمه روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

علی نیاپور[۱]
شهاب بهلولی[۲]
مرضیه شریفی پاسندی[۳]
بهنام محمدی قلعه بین[۴]

چکیده

سابقه و هدف: درمان لیشمانیوز به دلیل عوارض جانبی متعدد و ایجاد مقاومت دارویی نسبت به داروهای خط اول درمان با پیچیدگی‌هایی همراه شده است. با توجه به اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی عصاره سیاه تخمه، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی با استفاده از روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) و شمارش سلولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در فاز ایستا به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه اضافه شد. عصاره سیاه تخمه در رقت های افزایشی (۲/۴ – ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. از داروی گلوکانتیم به عنوان کنترل استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج و ۵۰ میکرولیتر MTT اضافه گردید. بعد از سه ساعت انکوباسیون، محلول رویی جدا و حلال DMSO افزوده شد. جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. از روش رنگ آمیزی تریپان بلو برای ارزیابی اثر عصاره سیاه تخمه روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استفاده گردید.

یافته‌ها: عصاره سیاه تخمه به صورت وابسته به دوز باعث کاهش درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور شد که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). در روش MTT، IC50 عصاره بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور ۰/۳۶۵ و گلوکانتیم ۷۱/۰۱ میلی‌گرم در میلی لیتر به دست آمد.

استنتاج: عصاره آبی سیاه تخمه نسبت به گلوکانتیم تاثیر بسیار قوی‌تری روی اشکال پروماستیگوت لیشمانیا ماژور دارد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، سیاه تخمه، MTT

مقدمه

لیشمانیوز بیماری تک یاخته‌ای است که توسط گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و تظاهرات بالینی آن به فرم‌های جلدی، جلدی مخاطی، احشایی و جلدی منتشر دیده می‌شود. بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان داده است، ۱۲ میلیون نفر در جهان با این بیماری درگیر هستند و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا می‌باشند و سالیانه دو میلیون ابتلای جدید گزارش می‌شود. ایران جزو کشورهایی است که لیشمانیوز جلدی در آن شایع

مولف مسئول: بهنام محمدی قلعه بین– اردبیل: دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی E-mail:b.mohammadi@arums.ac.ir
۱. دانشیار، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۲. استاد، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۳. کارشناسی ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۱۱/۲۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۴/۴

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

است، همچنین دارای کانون‌های اندمیک شناخته شده برای لیشمانیوز احشایی در شمال غرب و جنوب کشور می‌باشد(۳-۱). داروهای خط اول مورد استفاده در درمان لیشمانیوز، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (گلوکانتیم و پنتوستام) می‌باشند که در دهه‌های گذشته مورد استفاده قرار گرفته و دارای عوارض جانبی متعدد مثل مسمومیت دارویی می‌باشند. از سوی دیگر مقاومت انگل نسبت به این دارو در نقاط مختلف جهان در حال افزایش می‌باشد(۴). داروهای خط دوم از جمله آمفوتریسین B و میلتفوسین دارای عوارض سوء دارویی بالا و محدودیت استفاده در تمام بیماران بوده و فرم لیپوزومال آمفوتریسین B هزینه بالایی را به بیماران تحمیل می‌نماید(۵،۶). در پاره‌ای از موارد سایر داروها، از قبیل پنتامیدین، آمفوتریسین B و پارامومیسین علی‌رغم سمیت بالایشان برای میزبان به عنوان گزینه‌های دوم و در موارد بروز مقاومت به کار می‌روند که اخیرا مقاومت در مورد پنتامیدین نیز گزارش شده است. همچنین مشکلات مربوط به‌درمان بیماران دچار سرکوب ایمنی (مانندHIV) یعنی بیمارانی که داروهای موجود اثر کم‌تری روی آن‌ها داشته و معمولا دوز های دارویی بیش‌تر و دوره ی درمان طولانی‌تری نیاز دارند نیز بر مشکلات قبل افزوده شده است(۷،۸). طبق نظر سازمان بهداشت جهانی اثر درمانی گلوکانتیم در کشورهای مختلف متفاوت بوده و نیز پروتوکل‌های درمانی مختلف براساس مناطق جغرافیایی خاص تعیین می‌شوند(۹). علاوه بر پاسخ‌های کلینیکی متفاوت بیماران لیشمانیازیس احشایی و جلدی نسبت به ترکیبات آنتی موان ۵ ظرفیتی، عوارض جانبی ازقبیل تجمع دارو در بافت‌هایی مثل کبد و طحال، درد عضلانی، پانکراتیت، آریتمی قلبی و هپاتیت منجر به‌کاهش مصرف دارو یا ترک درمان و حتی مقاومت اکتسابی به این ترکیبات شده است(۱۰،۱۱). آنتی‌موان‌های ۵ ظرفیتی هنوز در تعداد زیادی از کشورهای دنیا، مناطق اندمیک لیشمانیازیس از جمله ایران، به عنوان داروی خط اول درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما در برخی از کشورها از جمله هندوستان به واسطه عدم پاسخ لیشمانیا دونووانی در برابر گلوکانتیم و ان متیل گلوکامین، تقریبا کنار گذاشته شده اند(۱۲).

گیاه سیاه تخمه (*Agrostemma githago*)گیاهی مدیترانه‌ای از خانواده Caryophyllacea با گل‌های بنفش یا ارغوانی کم رنگ و با دانه‌های سمی می‌باشد که به وفور در طبیعت یافت می‌شود. این گیاه دارای اثرات سمی شناخته شده‌ای به روی انسان و حیوانات است(۱۳،۱۴). همچنین، در ایران در مراتع و گندم زارهای شمال غرب ایران (استان اردبیل) رشد می‌کند(۱۵). در طب سنتی قدیم از این گیاه در درمان بیماری‌های انگلی و درمان سرطان و زگیل استفاده می‌شده است(۱۶-۱۸).

عصاره دانه سیاه تخمه حاوی Saponin، Githagnin، Githagin، Agrostemmic acid می‌باشد(۱۹،۲۰). خاصیت سیتوتوکسیک این گیاه مربوط به Triterpenoid saponin، Githagenin، پروتئین غیرفعال کننده ریبوزوم Ribosome-inactivating protein و Agrostin می‌باشد(۲۱،۲۲). آگروستین یک پروتئین غیرفعال کننده ریبوزوم تیپ یک می‌باشد (RTP I) و ترکیب با ساپونین فعالیت سیتوتوکسیک آن را تقویت می‌کند(۲۳). این گیاه همچنین دارای فلاونوئیدهایی با خاصیت سیتوتوکسیک و خاصیت آنتی اکسیدانت می‌باشد(۱۵).

بهلولی و همکاران تاثیر عصاره سیاه تخمه را بر روند رشد و بقای سلول‌های سرطانی معده مورد بررسی قرار دادند. عصاره سیاه تخمه توانست از رشد سلول‌های سرطانی AGS معده ممانعت کرده و سبب توقف سلول‌های سرطانی در مرحله G1 بشود. هم چنین فعالیت آنزیم Caspase 3 به دنبال تیمار با عصاره سیاه تخمه افزایش یافت(۲۰). همین گروه در مطالعه دیگری نشان دادند که تاثیر عصاره در فرم نانولیپوزومال عصاره نسبت به حالت عادی تقویت می‌شود(۲۴). لذا با توجه به اثرات سیتوتوکسیک و ضد سرطانی عصاره سیاه تخمه، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره سیاه تخمه در مقایسه با داروی گلوکانتیم انجام گرفت، تا در صورت وجود خاصیت ضد لیشمانیایی قوی در

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

عصاره، با در نظر گرفتن میزان اثرات سمی آن روی سلول‌های نرمال انسان وتاثیر آن در مدل حیوانی و بررسی تمام جوانب لازم، تصمیم لازم در خصوص احتمال طراحی داروی موضعی (و احیاناً سیستمی) اتخاذ گردد.

مواد و روش ها

پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و در محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion Broth) در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری و پاساژ داده شد(۲۵). انگل‌ها در فاز ایستا برای انجام آزمایشات استفاده شدند.

استخراج عصاره آبی از گیاه سیاه تخمه

دانه‌های گیاه سیاه تخمه با آب مقطر شست و شو و روی پارچه‌ای استریل خشک شدند. دانه‌های خشک شده توسط دستگاه آسیاب پودر شدند و مقدار ۱۰۰ گرم از پودر دانه با ۵۰۰ سیسی آب (نسبت یک به پنج) در بشر ریخته شد. به منظور حل شدن بهتر، محلول ابتدا توسط دستگاه هموژنایزر به مدت پانزده دقیقه در دور ۲۶۰۰ و سپس در دستگاه اولتراسونیک هموژنایزر (UP200H, Hielscher, Germany) درآخرین دور به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید و در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتر توزیع شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد، تا ذرات نامحلول در انتهای مخروطی لوله‌های فالکون رسوب کرده و محلول رویی جدا شود. محلول هموژن بدست آمده به مدت یک شبانه روز در دمای منفی ۸۰ نگهداری شد. سپس محلول فریز شده در دستگاه فریزدرایر قرار داده شد و بعد از ۴۸ ساعت عصاره لیوفیلیزه آماده گردید و برای استفاده بعدی در منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد(۱۵).

بررسی اثر کشندگی رقت‌های گوناگون عصاره آبی سیاه تخمه بر انگل لیشمانیا ماژور

اثر کشندگی عصاره گیاهی سیاه تخمه بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در شرایط in vitro بررسی شد. بدین منظور، در ابتدا غلظت اولیه عصاره در دو غلظت به مقادیر ۲۴ میلی‌گرم و ۱۶ میلی‌گرم پودر سیاه تخمه در یک میلی لیتر درمحیط BHI تهیه شد. سپس با روش رقیق‌سازی سریالی (Serial dilution) رقت‌های ۱۶،۱۲،۸،۶،۴،۳،۲،۱و۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. از غلظت ۲۴ میلی‌گرم جهت تهیه رقت‌های ۱۲، ۶ و ۳ و از غلظت ۱۶ میلی‌گرم برای تهیه رقت‌های ۸ ، ۴، ۲ ، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. در نهایت ده غلظت از عصاره (۲۴-۰/۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش اثر کشندگی رقت های گوناگون عصاره آبی سیاه تخمه به روش MTT

ماده MTT پودری زرد رنگ است که جذب سلول‌های زنده شده وتوسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی تبدیل به ماده‌ی نامحلول فورمازان می‌شود. با اضافه شدن حلال مناسب نظیر DMSO کریستال‌های نامحلول فورمازان به صورت محلول تبدیل شده و از سلول خارج می‌شوند. میزان رنگ تولید شده متناسب با میزان زنده بون سلول‌ها و فعالیت متابولیکی سلول‌هاست‌که توسط روش کالریمتریک قابل اندازه‌گیری است. برای اجرای آزمایش، پروماستیگوت‌های در فاز ایستا به تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط BHI در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهک کشت داده شدند. حجم ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های متفاوت عصاره به هر چاهک اضافه و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به چاهک شاهد فقط محیط کشت و به چاهک کنترل منفی محیط کشت حاوی انگل اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از انکوباسیون، میکروپلیت توسط سانتریفوژ یخچال دار در دمای چهار درجه سانتیگراد با دور ۲۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی پروماستیگوت‌ها به آرامی و به کمک سرنگ برداشته شد و ۵۰ میکرولیتر محلول

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

MTT با غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات به هر چاهک اضافه شد. سپس به مدت چهار ساعت در انکوباتور و در تاریکی نگهداری شد. پس از اتمام انکوباسیون، حجم ۱۰۰ میکرولیتر از حلال متوقف‌کننده DMSO اضافه شد و پس از پنج دقیقه میزان جذب نوری که بیانگر فعالیت متابولیکی پروماستیگوت‌ها است، توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (ELISAReader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. به عنوان کنترل از داروی گلوکانتیم در غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. (در خصوص کنترل منفی نیز باید توضیحات نوشته شود. یعنی انگل های لیشمانیا به تنهایی و بدون مداخله دارویی) آزمایشات به صورت تریپلیکات و سه بار تکرار گردید(۲۶).

بررسی میزان زنده بودن سلول ها

ماده تریپان بلو به‌طور گسترده‌ای برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده استفاده می‌شود. تریپان بلو نمی‌تواند بین سلول‌های کاملا سالم و سلول‌های زنده اما فاقد عملکردهای سلولی تمایز قائل شود. بنابراین، تنها وارد سلول‌هایی می‌شود که تمامیت غشای خود را از دست داده باشند و سلول‌های زنده به دلیل سالم بودن غشای سلولی، از ورود رنگ به داخل سلول جلوگیری می‌کنند. در این روش، بقای سلول توسط شمارش سلول‌هایی که رنگ را جذب نکرده‌اند، در زیر میکروسکوپ انجام می‌شود. خلاصه روش آزمون به این صورت است که پروماستیگوت‌ها با تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط BHI تحت مواجهه با رقت‌های گوناگون عصاره سیاه تخمه قرار گرفته و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از اتمام ۴۸ ساعت از انکوباسیون، حجم ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی از هر گروه با حجم برابر محلول تریپان بلو چهار درصد مخلوط شده به روی لام گذاشته شد و زیر میکروسکوپ شمارش شد.

بررسی سمیت سلولی عصاره آبی سیاه تخمه بر رده سلولی ماکروفاژی J774

جهت بررسی سمیت سلولی از رده سلولی ماکروفاژی J774 استفاده شد. این رده ی سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال منجمد شده خریداری شد و پس از ذوب، در فلاسک حاوی محیط کشت DMEM با مقدار گلوکز بالا حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (FBS)، آنتی‌بیوتیک یک درصد (Pen/strep) و گلوتومکس در انکوباتور (شرکت Memmert آلمان) در دمای۳۷ درجه سانتیگراد و فشار دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری و کشت شدند. به طور خلاصه، تعداد ۵×۱۰^{۲} سلول درون هر چاهک ظروف کشت ۹۶ خانه پلیت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره سیاه تخمه (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. ۴۸ ساعت بعد از مواجهه، بقای سلول‌ها به روش MTT بررسی شد(۲۸،۲۷).

آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بیان و ارزش احتمالی کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت بررسی نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی بهره گرفته شد.

یافته ها

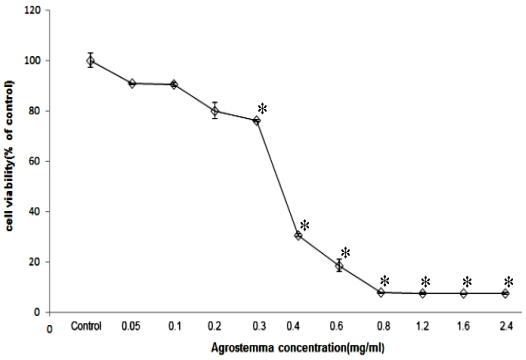
اثر عصاره دانه Agrostemma githago در ۱۰ غلظت مختلف بر میزان بقای پروماستیگوت های انگل لیشمانیا

اثر ضد لیشمانیایی عصاره دانه‌ی گیاه *Agrostemma githago* بر روی زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش سنجش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره در غلظت‌های مختلف به طور معکوس با درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

ماژور ارتباط دارد که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p <$ ۰/۰۵). تغییرات جذب نوری به صورت میانگین درصد کشندگی ± انحراف معیار در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. غلظت‌های بالاتر دارو اثر قوی‌تری بر کاهش درصد حیات سلولی داشت که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده گردید. پس از ورود نتایج تست به نرم‌افزار Sigma plot نسخه ۱۲، میزان IC_{50} عصاره بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور ۰/۳۶۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

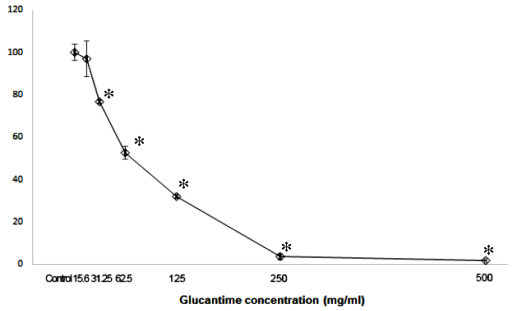


نمودار شماره ۱: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی گیاه *Agrostemma githago* بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

* : P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

اثر گلوکانتیم در ۶ غلظت مختلف بر میزان بقای پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

اثر ضد لیشمانیایی داروی گلوکانتیم به عنوان داروی استاندارد بر روی حیات سلولی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش سنجش MTT بررسی شد. تغییرات جذب نوری به صورت میانگین درصد کشندگی ± انحراف معیار در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که رقت‌های مختلف داروی گلوکانتیم (در محدوده ی ۵۰۰-۱۵/۶۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) باعث کاهش درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور (IC50=71.01) گردید ($p <$ ۰/۰۵).

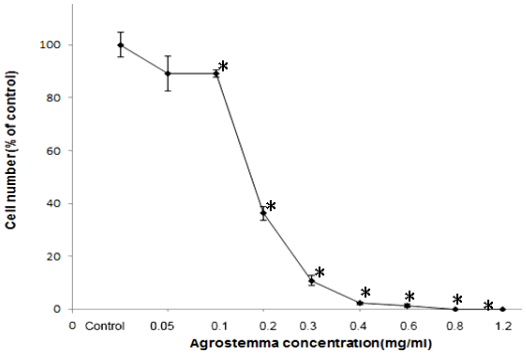


نمودار شماره ۲: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف داروی گلوکانتیم بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

* : P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

اثر عصاره دانه گیاه Agrostemma githago بر میزان زنده مانی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور

برای بررسی میزان زنده مانی انگل در غلظت‌های متفاوت عصاره، تعداد کل سلول‌های زنده در هر گروه به کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلو شمارش شد. تعداد سلول‌های محاسبه شده به صورت mean± در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره دانه گیاه *Agrostemma githago* سبب کاهش میزان زنده مانی سلول‌ها به صورت وابسته به دوز در پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون شد و با افزایش غلظت عصاره این میزان به‌طور معنی‌اری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p <$ ۰/۰۰۱).



نمودار شماره ۳: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی گیاه *Agrostemma githago* بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش رنگ آمیزی تریپان بلو پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

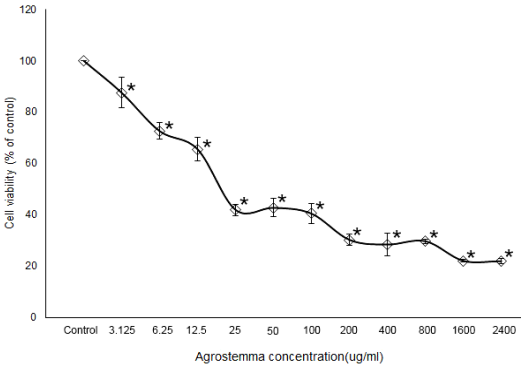
* : P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه Agrostemma githago بر سلول‌های رده ماکروفاژی J774

نتایج MTT نشان دهنده سمیت وابسته به دوز برای عصاره سیاه تخمه بود. به طوری که با افزایش غلظت عصاره، درصد زنده مانی سلول‌های J774 به صورت قابل توجهی کاهش یافت نمودار شماره ۴. جهت محاسبه میزان IC_{50}، نتایج MTT به نرم‌افزار Sigma plot نسخه ۱۲ وارد شد. پس از انتخاب نمودار مناسب، IC50 عصاره سیاه تخمه روی سلول‌های ماکروفاژی به میزان ۱۲/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.



نمودار شماره ٤: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی گیاه *Agrostemma githago* بر سلول‌های رده ماکروفاژی J774 به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

* : P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره سیاه تخمه در غلظت‌های مختلف به‌طور معکوس با درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور ارتباط دارد و میزان IC_{50} عصاره بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور ۰/۳۶۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. در حالی که این میزان برای گلوکانتیم ۷۱/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای سلول‌های ماکروفاژ ۱۲/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. با وجود مطالعات متعدد در سطح جهان برای کشف دارویی جایگزین داروهای حاضر که بر گونه‌های لیشمانیا موثر باشد و در عین حال عوارض جانبی کم و قابل استفاده در انسان باشد، هنوز این مهم میسر نشده و مطالعات در این زمینه کماکان ادامه دارد. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی به منظور تاثیر عصاره‌های گیاهی روی انگل‌های لیشمانیا در ایران و جهان صورت گرفته است و نتایج مختلفی از این مطالعات به دست آمده است.

Chouhan و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور هند مطالعه‌ای با عنوان اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی دانه‌ی *Piper nigrum* بر *لیشمانیا دنوانی* انجام دادند که در آن عصاره‌های هگزانی و اتانولی استخراج شده از دانه *P.nigrum* بر رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا دنوانی* به ترتیب با IC50 ، ۳۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر قابل ملاحظه داشتند(۲۹). Sifaoui و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور برزیل مطالعه‌ای با عنوان اثر عصاره برگ گیاه زیتون روی پتانسیل غشای میتوکندریایی انگل لیشمانیا انجام داده‌اند که در آن دو عصاره triterpenic acids (maslinic و oleanolic) از برگ زیتون جدا شده و علیه پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* و *لیشمانیا آمازونسیس* مورد استفاده قرار گرفت. طبق بررسی‌ها IC50، ماسلینیک اسید ۱/۶۵۴ ± ۹/ ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *لیشمانیا اینفانتوم* و ۱/۲۵± ۱۲/۴۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *لیشمانیا آمازونسیس* گزارش شد که نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه ی عصاره برگ زیتون بود(۳۰).

Singh و همکاران مطالعه‌ای با عنوان اثر عصاره ۳۰ نوع گیاه مهم دارویی بر لیشمانیوز احشایی در منطقه بیهار در هند انجام دادند که در آن، خواص ضد انگلی این گیاهان را در مقایسه با داروهای (گلوکنات سدیم آنتیموان و آمفوتریسین B) روی پروماستیگوت لیشمانیا مورد بررسی قرار دادند. در مجموع، هشت عصاره گیاه به صورت واضحی بر رشد پروماستیگوت‌ها اثر مهاری داشتند(۳۱).

عزت‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ طی مطالعه‌ای اثر گیاه *Pistacia khinjuk* را روی *لیشمانیا تروپیکا* در شرایط in vitro بررسی کردند که، IC50 برای

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

پروماستیگوت برابر با ۳/۲±۵۸/۶ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد(۳۲).

امامی و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر عصاره یازده گیاه از گونه‌های آرتمیسیا را روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* با روش MTT بررسی کردند و نتایج نشان داد که تاثیر سه‌گونه *A.ciniformis*، *A.santotina* و *A.kulbadica* بیش‌ترین اثر را روی انگل داشتند(۳۳). محمودوند و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای اثر عصاره *Nigella sativa* و *Berberis vulgaris* را روی *لیشمانیا تروپیکا* بررسی کردند که میزان IC50، ۴/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *B.vulgaris* و میزان IC50، ۷/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *N.sativa* گزارش شد که تاثیر عصاره‌ی این گیاهان را نشان می‌داد(۳۴).

فتاحی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر عصاره *Nigella sativa* را روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* بررسی کرده و نشان دادند که غلظت‌های ۰/۴ ، ۰/۸ ، ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره باعث کاهش رشد پروماستیگوت‌ها می‌شود(۳۵).

در مطالعه دیگری اثر عصاره Peganum harmala بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* بررسی شد و IC50 به میزان ۱/۸۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر به‌ست آمده است(۳۶).

در مطالعه گسترده ای که گارسیا و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره ۴۷ گیاه بومی کشور کوبا روی لیشمانیا آمازونسیس انجام دادند، ۲۰ عصاره IC۵۰ کم‌تر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند که از بین آن‌ها عصاره *Hura crepitans L.*، *Bambusa vulgaris* و *Simarouba glauca DC.* اثر قویتری داشتند و به ترتیب غلظت موثره آن‌ها برابر با ۲۷/۷ ، ۴۱/۵ و ۴۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود(۳۷). نتایج مطالعات فوق نشان می‌دهد که غلظت موثر عصاره‌های بررسی شده در مطالعات مختلف روی انگل لیشمانیا متفاوت از هم می‌باشد. فاکتورهای متنوع و پیچیده ای در انتخاب داروی مناسب برای استفاده در موجودات زنده دخیل هستند. اولین قدم در روند امتحان یک ترکیب کاندید دارو، آزمایش آن به روش برون‌تنی می‌باشد. تا کنون مطالعه‌ای روی تاثیر عصاره‌ی سیاه تخمه بر انگل لیشمانیا صورت نگرفته است تا نتایج آن با مطالعه‌ی حاضر مقایسه گردد. در این مطالعه عصاره دانه سیاه تخمه در شرایط آزمایشگاهی روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور اثر داده شد و مشخص شد که در مقایسه با گلوکانتیم به عنوان کنترل از اثر کشندگی بالایی برخوردار است. از طرفی مشخص گردید که سلول‌های ماکروفاژ نسبت به پروماستیگوت های لیشمانیا به غلظت‌های پایین‌تر عصاره حساس هستند. با توجه به غلظت موثر عصاره در مقایسه با گلوکانتیم، کاهش دوز مصرفی عصاره به طور سیستمیک یا استفاده از فرم لیپوزومال آن شاید بتواند در کنار اثر کافی روی انگل از اثر سمی آن روی سلول‌های میزبان بکاهد که نیازمند بررسی‌های دقیق با آزمایشات درون تنی (in vivo) می‌باشد. همچنین با توجه به تاثیر کمتر سمیت ترکیبات داروئی در استفاده ی موضعی، آزمایشات بیش‌تر برای تاثیر موضعی عصاره به شکل پماد روی زخم‌های لیشمانیایی در حیوان آزمایشگاهی پیشنهاد می‌شود.

عصاره آبی سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) نسبت به گلوکانتیم تاثیر بسیار قوی‌تری روی اشکال پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی دارد. مطالعات تکمیلی در جهت تاثیر این عصاره روی اشکال آماستیگوت و تاثیر آن در شرایط in vivo به شکل موضعی و سیستمیک در حیوان آزمایشگاهی لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه پزشکی به شماره ۰۵۶۵ و کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1394.89 از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می باشد. از معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه و معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی به جهت تامین مالی پروژه قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

References

1. Badirzadeh A, Mohebali M, Ghasemian M, Amini H, Zarei Z, Akhoundi B, et al. Cutaneous and post kala-azar dermal leishmaniasis caused by Leishmania infantum in endemic areas of visceral leishmaniasis, northern Iran 2002-2011: a Case Series. Pathog Glob Health 2013; 107(4): 194-197.
2. Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam GR, Sarkari B, Mohebali M, Zare Z, Jaberipour M, et al. A Leishmania infantum FML-ELISA for the detection of symptomatic and asymptomatic canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Iran. Iran J Immunol 2011; 8(4): 244-250 (Persian).
3. Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam G, Sarkari B, Mohebali M, Zarei Z, Bohlooli S. Cytokine Profile of Leishmania Infantum Fucose-Mannose Ligand in Vaccinated Dogs in the Northwest of Iran. Iran J Immunol 2017; 14(4): 293-305 (Persian).
4. Taran M, Mohebali M, Esmaeli J. In Vivo efficacy of gum obtained Pistacia atlantica in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. Iranian J Publ Health 2010; 39(1): 36-41 (Persian).
5. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemother 2004; 10(6): 307-315.
6. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad med J 2007; 83(976): 649-657.
7. Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. Trends Parasitol 2003; 19(5): 232-239.
8. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadeeylphosphocholine (rniltefosinc), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against Leishmania donovani in immunodeficient scid mice. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(6): 1872-1875.
9. Jaffary F, Nilforoushzadeh MA, Siadat AH, Haftbaradaran E, Ansari N, Ahmadi E. A comparison between the effects of glucantime, topical trichloroacetic acid 50% plus glucantime, and fractional carbon dioxide laser plus glucantime on cutaneous leishmaniasis lesions. Dermatol Res Pract 2016; 2016: 6462804.
10. Soto J, Valda-Rodriquez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monasterios-Torrico H, et al. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2004; 71(5): 577-581.
11. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 111-126.
12. Natera S, Machuca C, Padron-Nieves M, Romero A, Diaz E, Ponte-Sucre A. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(6): 637-642.
13. Koz O, Bedir E, Masullo M, AlankusCaliskan O, Piacente S. Triterpene glycosides from Agrostemma gracilis. Phytochemistry 2010; 71(5-6): 663-668.
14. Malcherek K, Breuer J, Schuphan I, Schmidt B. Metabolism of 4-nitrophenol in aseptically cultivated plants of the species wheat (Triticum aestivum L.), soybean (Glycine max L.), wild oat (Avena fatua L.) and corn cockle (Agrostemma githago L.). J Plant Physiol 1998; 153(1-2): 192-199.
15. Bohlooli Sh, Fathi P. Nanoliposomal formulation of Agrostemma githago aqueous extract shows enhanced cytotoxic effect on gastric cancer cell line. Nanomed J 2015; 2(1): 21-28.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

16. Foster S, Duke JA, Peterson RT. A Field Guide to Medicinal Plants: Eastern and Central North America. New York: Houghton-Mifflin Trade and Reference; (1990).
17. Waller PJ, Bernes G, Thamsborg SM, Sukura A, Richter SH, Ingebrigtsen K, et al. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. Acta Vet Scand 2001; 42(1): 31-44.
18. Corn Cockle Uses, Benefits & Dosage-Drugs.com Herbal Database. Avalable from: https://www.drugs.com/npp/corn-cockle.html
19. Kollmann J, Bassin S. Effects of management on seed predation in wildflower strips in northern Switzerland. Agric Ecosyst Environ 2001; 83(3): 285-296.
20. Siepmann C, Bader G, Hiller K, Wray V, Domke T, Nimtz M. New saponins from the seeds of Agrostemma githago var. githago. Planta Med 1998; 64(2): 159164.
21. Heisler I, Sutherland M, Bachran C, Hebestreit P, Schnitger A, Melzig MF, et al. Combined application of saponin anchimeric toxins drastically enhances thtargeted cytotoxicity on tumor cells. J Control Release 2005; 106(1-2): 123-137.
22. Hebestreit P, Weng A, Bachran C, FuchH, Melzig MF. Enhancement ocytotoxicity of lectins by Saponinumalbum. Toxicon 2006; 47(3): 330-335.
23. Hebestreit P, Melzig MF. Cytotoxic activity of the seeds from Agrostemma githago var. githago. Planta Med 2003; 69(10): 921-925.
24. Bohlooli S, Fathi P. Nanoliposomal formulation of Agrostemma githago aqueous extract shows enhanced cytotoxic effect on gastric cancer cell line. Nanomed J 2015; 2(1): 21-28.
25. Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EMB. Leishmania amazonensis: early proteinase activities during promastigote–amastigote diVerentiation in vitro. Exp Parasitol 2005; 109(1): 38-48.
26. Moein M, Hatam G, Taghavi-Moghadam R, Zarshenas MM. Antileishmanial Activities of Greek Juniper (Juniperus excelsa M.Bieb.) Against Leishmania major Promastigotes. J Evid Based Complementary Altern Med 2017; 22(1): 31-36.
27. Niapour N, Niapour A, Sheikhkanloui Milan H, Amani M, Salehi H, et al. All trans retinoic acid modulates peripheral nerve fibroblasts viability and apoptosis. Tissue Cell 2015; 47(1): 61-65.
28. Sharifi Pasandi M, Hosseini Shirazi F, Gholami MR, Salehi H, Najafzadeh N, Mazani M, et al. Epi/perineural and Schwann Cells as Well as Perineural Sheath Integrity are Affected Following 2,4-D Exposure. Neurotox Res 2017; 32(4): 624-638.
29. Chouhan G, Islamuddin M, Ahmad F, Sahal D, Afrin, F. Antileishmanial Potential of *Piper nigrum* Seed Extracts against *Leishmania donovani*. Open J Med Microbiol 2014; 4(4): 228-235.
30. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, Ticona JC, Reyes-Batlle M, Mejri M, et al. In vitro effects of triterpenic acids from olive leaf extracts on the mitochondrial membrane potential of promastigote stage of Leishmania spp. Phytomedicine 2014; 21(12): 1689-1694.
31. Singh SK, Bimal S, Narayan S, Jee C, Bimal D, Das P, et al. Leishmania donovani: Assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniasis endemic area of Bihar, India. Exp Parasitol 2011; 127(2): 552-558.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:01 +0330 on Monday November 19th 2018

32. Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M, Ezzatkhah F. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Pistacia khinjuk against Leishmania tropica and Leishmania major. Evid Based Complement Alternat Med 2015; 2015: 149707.
33. Emami SA, Zamanai Taghizadeh Rabe S, Ahi A, Mahmoudi M. Inhibitory activity of eleven Artemisia species from Iran against Leishmania major parasites. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(2): 807-811.
34. Mahmoudvand H, Sharififar F, Sezavar Rahmat M, Tavakoli R, Saedi Dezaki E, Jahanbakhsh S, et al. Evaluation of antileishmanial activity and cytotoxicity of the extracts of Berberis vulgaris and Nigella sativa against Leishmania tropica. J Vector Borne Dis 2014; 51(4): 294-299.
35. Fattahi Bafghi A, Mirzaei F. Antileishmanial activity of Nigella sativa extract against Leishmania major: an in vitro study. J Chem Pharm Res 2015; 7(7): 1239-1244.
36. Mirzaie M, Nosratabadi SJ, Derakhshanfar A, Sharifi I. Antileishmanial activity of Peganum harmala extract on the in vitro growth of Leishmania major promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. Vet Arhiv 2007; 77 (4): 365-375.
37. García M, Monzote L, Scull R, Herrera P. Activity of Cuban Plants Extracts against Leishmania amazonensis. ISRN Pharmacol 2012; 2012: 104540.

Archive of SID

www.SID.ir