مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره سیزدهم/ پائیز ۱۳۸۷/۲۰-۱۵

بررسی میزان لیشمانیاکشی گونه‌های آرتمیزیای بومی استان خراسان رضوی در شرایط برون تنی

دکتر احمد امامی[۱]، دکتر محمود محمودی[۲]، شهرزاد زمانی تقی‌زاده رابع[۳]، علی آهی[۴]

۱- استادیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تلفن: ۷۱۱۲۶۱۱ -۰۵۱۱

(مؤلف مسؤول) mahmoudi@mums.ac.ir

۳- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

٤- کارشناس گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

Archive of SID

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیا ماژور مسئول ایجاد لیشمانیوز جلدی است که تعداد زیادی از مردم دنیا به آن مبتلا بوده یا در خطر ابتلا قرار دارند. داروهای مورد استفاده برای درمان لیشمانیوز عوارض جانبی نامطلوبی داشته یا مؤثر نیستند. با توجه به شیوع روز افزون لیشمانیوز جلدی، تولید داروی لیشمانیا کش جدید و مؤثر بسیار ضروری است. گونه‌های مختلف گیاه آرتمیزیا (.Artemisia spp) فعالیت لیشمانیا کشی دارند ولی گزارشی در باره گونه‌های بومی استان خراسان وجود ندارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر لیشمانیا کشی عصاره‌های مختلف ۱۱ گونه بومی گیاه آرتمیزیا می‌باشد.

روش بررسی: یازده گونه گیاه آرتمیزیای بومی استان خراسان جمع‌آوری شده و عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آنها تهیه شد. پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI در in vitro کشت داده شدند. تأثیر عصاره‌های مذکور بر بقای پروماستیگوتها توسط تست MTT ارزیابی و بصورت ۵۰٪ غلظت مهاری (IC_{50}) محاسبه گردید.

یافته‌ها: غلظتهای مختلف تمامی عصاره‌ها تکثیر پروماستیگوتها را بطور وابسته به دوز مهار کردند. عصاره‌های اتانولی قویترین و عصاره‌های هگزانی ضعیف‌ترین تأثیر لیشمانیاکشی (بجز A.fragrans) را داشتند. عصاره‌های اتانولی A.kulbadica (IC_{50}:0.025)، A.ciniformis (IC_{50}:0.025) و A.santolina (IC_{50}:0.080) قویترین تأثیر لیشمانیاکشی را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان دادند. تأثیر عصاره‌های اتیل استاتی تمام گونه‌ها بجز A.turanica و A fragrans قویتر از عصاره دی کلرومتانی آنها بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله، آرتمیزیاهای بومی کشور می‌توانند گیاهان مناسبی برای بررسی خاصیت لیشمانیا کشی در in vivo باشند. بدین منظور، جداسازی و تعیین ساختار ترکیبات مؤثر آنها در آینده امری ضروری بنظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: آرتمیزیا (.Artemisia spp)، فعالیت لیشمانیا کشی، لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت

وصول مقاله: ۸۶/۱۲/۷ اصلاحیه نهایی: ۸۷/۵/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۱۹

مقدمه

گیاه آرتمیزیا یکی از بزرگترین و وسیع الطیف‌ترین جنس‌های Astraceae (Order) در دنیا محسوب می‌شود. این جنس بیش از ۴۰۰ گونه دارد که عمده آنها در مناطق معتدل، ازجمله اروپا، آسیا و امریکای شمالی وجود دارند (۵-۱). در ایران ۳۰ گونه گیاه آرتمیزیا وجود دارد که دو گونه آن منحصراً در ایران دیده می‌شود (۷-۵). ترکیبات شیمیایی مختلفی در

www.SID.ir

بعضی از این گونه‌ها وجود دارد که از آن جمله می‌توان مونوترپنها، سسکوئیترپنها، سسکوئیترپن لاکتونها، فلاوونوئیدها، کومارینها، استرولها و پلی استاتها را نام برد (۳,۸). گونه‌های مختلف آرتمیزیا اثرات بیولوژیکی بسیار متنوعی دارند که می‌توان اثرات ضد مالاریایی (۸)، سایتوتوکسیک (۹)، ضد باکتریایی، ضد قارچی (۸) و آنتی‌اکسیدانی را نام برد (۱۰). لیشمانیوز جلدی توسط گونه‌های مختلف از جمله لیشمانیا ماژور[1] ایجاد می‌شود. این بیماری توسط پشه خاکی (Phlebotomus spp.) منتقل می‌شود. بر طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ۱۲ میلیون نفر در دنیا آلوده به انگل لیشمانیا هستند و ۳۵۰ میلیون نفر در مناطق پرخطر ابتلا به آن زندگی می‌کنند (۱۱,۱۲). بروز سالیانه موارد جدید حدود ۲ میلیون نفر می‌باشد که از میان آنها ۱/۵ میلیون نفر به لیشمانوز جلدی (CL) مبتلا می‌باشند. لیشمانیوز جلدی که توسط زیرگونه‌های مختلف لیشمانیا ایجاد می‌شود، یک زخم پوستی است که در اغلب موارد بطور خودبخود بهبود می‌یابد ولی دوران بهبود طولانی دارد. ترکیبات آنتی مونیال پنج ظرفیتی، اولین داروهایی هستند که برای درمان لیشمانیوز استفاده می‌شوند ولی عوارض جانبی نامطلوبی داشته، در بعضی موارد سمی بوده و یا اصلاً مؤثر نیستند (۱۳,۱۴). به علاوه، استفاده از آنها در درمان بیمارانی که بطور همزمان به ایدز و لیشمانیوز مبتلا هستند چندان مؤثر نیست (۱۵). استفاده از داروهای دیگر از جمله آمفوتریسینB نیز تنها به بیمارستانها محدود می‌شود. بعلاوه، مقاومت انگل به این داروها مشاهده شده است (۱۶). با توجه به شیوع رو به افزایش لیشمانیوز جلدی در شهر مشهد، تولید یک داروی لیشمانیا کش جدید و مؤثر بسیار ضروری بنظر می‌رسد (۱۷). یک استراتژی برای کشف داروهای جدید، تحقیق بر روی اثرات لیشمانیا کشی محصولات طبیعی گیاهی است. بسیاری از مردمی که در مناطق اندمیک لیشمانیوز زندگی می‌کنند تا حد زیادی به طب سنتی وابسته هستند. ما در جریان جستجو برای یافتن داروهای ضد انگلی جدید و مؤثر از منابع طبیعی، دریافتیم که گونه‌های آرتمیزیا که از استان خراسان جمع‌آوری شده‌اند در in vitro فعالیت ضد میکربی دارند. در گزارشات قبلی فعالیت لیشمانیا کشی Artemisia herba alba و عصاره اتانولی برگهای A. indica نشان داده شده بود ولی گزارشی در باره فعالیت لیشمانیا کشی گونه‌های دیگر آرتمیزیا، بویژه آرتمیزیاهای بومی استان خراسان وجود نداشت (۱۸,۱۹). این تحقیق به منظور کسب شواهد علمی جهت استفاده از گونه‌های آرتمیزیا و نیز تعیین غلظت مهاری IC_{50}[2] این ترکیبات و تأثیر لیشمانیاکشی عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی ۱۱ گونه از آرتمیزیاهای بومی استان خراسان بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در in vitro صورت گرفت (۲۰,۲۱).

روش بررسی

نمونه‌های گیاهی

یازده گونه آرتمیزیا زیر از استان خراسان جمع‌آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت:

A. Absinthium, A. annua, A. biennis, A. ciniformis, A. fragrans, A. khorassanica, A. kopedaghensis, A. kulbadica, A. santolina, A. siberi, A. turanica

عصاره‌گیری

نمونه‌های گیاهی در سایه خشک شده و سپس پودر شدند. عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی

1. Leishmani major

2. %50 Inhibition Concentration

Archive of SID

www.SID.ir

کلرومتانی و هگزانی ۱۰۰ گرم از هر یک از نمونه‌های پودر شده با استفاده از حلال‌های اتانول، اتیل استات، دی کلرومتان و هگزان در دمای اتاق توسط روش ماسراسیون تهیه شد. عصاره‌های تهیه شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط خلاء خشک شدند.

کشت پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور

پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور (سویه MRHO/IR/75/ER) از خانم دکتر سازگارنیا (پژوهشکده بوعلی، بخش فیزیک پزشکی) دریافت شد. پروماستیگوتها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی 10% FBS غیر فعال شده، ۲ میلی مولار ال- گلوتامین و پنی سیلین- استرپتومایسین در انکوباتور ۲۷°C و فشار ۵٪ CO2 کشت داده شدند.

سنجش فعالیت لیشمانیا کشی

به منظور تعیین ۵۰٪ غلظت مهاری[1] (IC_{50}) عصاره‌های بررسی شده از روش MTT[2] استفاده شد (۱۰,۱۱). اساس این روش شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ می‌باشد که توسط دی متیل سولفوکساید به صورت محلول در می‌آیند. هر چه تعداد انگلها بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بطور خلاصه، پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور زمانی که در انتهای مرحله رشد لگاریتمی بودند از فلاسک جدا شده و در پلیت ۹۶ خانه‌ای (۴×۱۰^{۵} عدد در ۵۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک) ریخته شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی هر یک از ۱۱ گونه آرتمیزیای مورد بررسی (n=3) اضافه شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۷ °C و فشار CO2 ۵٪ قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۵۰٪ ایزوپروپانول- ۱۰٪ سدیم دی دسیل سولفات متوقف شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. دانسیته نوری (OD) رنگ حاصله در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت شد. تمام آزمایشات حداقل۲ یا ۳ بار تکرار شدند. جذب نوری عصاره های آرتمیزیا به تنهایی نیز به عنوان کنترل بررسی شد ولی هیچ جذب قابل توجهی در طول موج ۵۷۰ نانومتر مشاهده نشد. IC_{50} (غلظتی است که سبب کشته شدن نیمی از پروماستیگوتهای لیشمانیا شود) عصاره‌های مورد بررسی از روی نمودار غلظت تعیین شد.

یافته‌ها

غلظت‌های مختلف تمامی عصاره‌ها تکثیر پروماستیگوتها را بطور وابسته به دوز مهار کردند (جدول۱ و نمودار۱). عصاره‌های اتانولی قویترین و عصاره‌های هگزانی ضعیف‌ترین تأثیر لیشمانیاکشی (بجز A.fragrans) را داشتند. عصاره‌های اتانولی A.ciniformis (IC_{50}:0.025)، A.kulbadica (IC_{50}:0.025) و A.santolina (IC_{50}:0.080) قویترین تأثیر لیشمانیاکشی را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان دادند. تأثیر عصاره‌های اتیل استاتی تمام گونه‌ها بجز

1. غلظتی که سبب کشته شدن نیمی از پروماستیگوتهای لیشمانیا می شود
2. (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

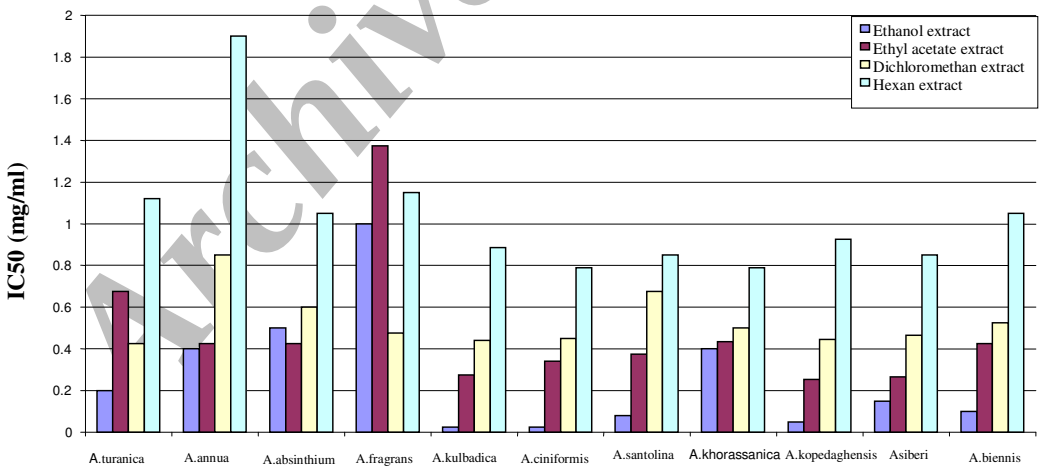
Archive of SID

www.SID.ir

A.turanica و A. fragrans قویتر از عصاره دی‌کلرومتانی آنها بود.

جدول ۱: فعالیت لیشمانیاکشی (IC_{50} برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های یازده گونه آرتمیزیا بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. نتایج حاصل از ۲-۳ بار تکرار آزمایش

گونه آرتمیزیا	عصاره اتانولی	عصاره اتیل استاتی	عصاره دی کلرومتانی	عصاره هگزانی
	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
A. turanica	۰/۲	۰/۶۷۵	۰/۴۲۵	۱/۱۲۰
A. annua	۰/۴	۰/۴۲۵	۰/۸۵۰	۱/۹۰۰
A. absinthium	۰/۵	۰/۴۲۵	۰/۶۰۰	۱/۰۵۰
A. fragrans	۱	۱/۳۷۵	۰/۴۷۵	۱/۱۵۰
A. kulbadica	۰/۰۲۵	۰/۲۷۵	۰/۴۴۰	۰/۸۸۵
A. ciniformis	۰/۰۲۵	۰/۳۴۰	۰/۴۵۰	۰/۷۹۰
A. santolina	۰/۰۸۰	۰/۳۷۵	۰/۶۷۵	۰/۸۵۰
A. khorassanica	۰/۴	۰/۴۳۵	۰/۵۰۰	۰/۷۹۰
A. kopedaghensis	۰/۰۵	۰/۲۵۵	۰/۴۴۵	۰/۹۲۵
A. siberi	۰/۱۵	۰/۲۶۵	۰/۴۶۵	۰/۸۵۰
A. biennis	۰/۱	۰/۴۲۵	۰/۵۲۵	۱/۰۵۰



Artemisia spp.

نمودار ۱: فعالیت لیشمانیاکشی (IC_{50} برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). عصاره های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی ۱۱ گونه آرتمیزیا بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

مردم عموماً از مواد گیاهی برای درمان لیشمانیوز جلدی استفاده کرده و آنها را مؤثر می‌دانند بدون اینکه از نحوه عملکرد آنها آگاهی علمی داشته باشند. از آنجایی که لیشمانیوز جلدی یک معضل بهداشتی مهم محسوب می‌شود و درمانهای شیمیایی مورد استفاده عمدتاً غیر مؤثر و دردناک هستند، بسیاری از مردم از گیاهان دارویی که در عطاری‌ها فروخته می‌شوند برای بهبود زخم‌های خود استفاده می‌کنند. در گزارشات قبلی فعالیت لیشمانیا کشی عصاره آبی و روغنی Artemisia herba alba (IC_{50} : ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب) علیه لیشمانیا ماژور گزارش شده بود. همچنین فعالیت لیشمانیاکشی عصاره آبی A.indica (IC_{50} : ۰/۴۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نشان داده شده بود (۹). همچنین مشخص شده بود که گونه‌های آرتمیزیای بومی ایران خاصیت ضد میکربی دارند (۱۲). در این تحقیق ۵۰٪ غلظت مهاری (IC_{50}) عصاره‌های مورد بررسی با استفاده از تست MTT از روی نمودار غلظت تعیین شد و بدین وسیله تأثیر مهاری عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی ۱۱ گونه آرتمیزیای بومی (Astraceae) بر رشد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در in vitro بررسی شد. چهار نوع عصاره گونه‌های بررسی شده فعالیت لیشمانیا کشی داشتند (جدول ۱). قویترین عصاره‌های هرگونه شامل A. turanica عصاره اتانلی، A. annua عصاره اتانلی، A. absinthium عصاره اتیل استاتی، A. fragrans عصاره دی کلرومتانی، A. kulbadica عصاره اتانلی، A. ciniformis عصاره اتانلی، A. santolina عصاره اتانلی، A. khorassanica عصاره اتانلی، A. kopedaghensis عصاره اتانلی، A. siberi عصاره اتانلی، A. biennis عصاره اتانلی بود.

اگرچه تمام گونه‌های بررسی شده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون فعالیت لیشمانیا کشی داشتند ولی عصاره‌های اتانولی اغلب آنها قویترین و عصاره‌های هگزانی ضعیفترین تأثیر لیشمانیاکشی (بجز A.fragrans) را نشان دادند. عصاره‌های اتانولی A.kulbadica (IC_{50} : ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، A.ciniformis (IC_{50} : ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و A.santolina (IC_{50} : ۰/۰۸۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قویترین تأثیر لیشمانیاکشی را در مقایسه با سایر گونه‌ها داشتند. تأثیر لیشمانیاکشی این عصاره‌ها قویتر از تأثیر عصاره آبی A.indica بود که قبلا گزارش شده بود. ولی فعالیت لیشمانیا کشی عصاره آبی و روغنی Artemisia herba alba همچنان قوی‌تر از عصاره‌های آرتمیزیاهای مورد بررسی بود.

تأثیر عصاره‌های اتیل استاتی تمام گونه‌ها بجز A.turanicaو A.fragrans قویتر از عصاره دی کلرومتانی آنها بود. بنابراین، با توجه به غربالگری شیمیایی ترکیبات موجود در این گیاهان، می‌توان خاصیت لیشمانیاکشی آنها را به یکی از گروه ترکیبات ذکر شده نسبت داد. با توجه به نتایج بدست آمده باید عصاره اتانولی گونه‌های بررسی شده را فراکشنه کرده، تأثیر هر یک را بطور جداگانه بررسی کرده و درنهایت ترکیب/ترکیبات اصلی را از فراکشن/فراکشن‌های مؤثر جدا کرد.

بر طبق نتایج حاصل از این تحقیق، هر چهار نوع عصاره ۱۱ گونه آرتمیزیای بررسی شده بطور وابسته به دوز، سبب کشتن پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور شدند ولی عصاره‌های اتانولی بیشترین فعالیت لیشمانیا کشی را نشان دادند. بسیاری از عصاره‌های آرتمیزیاهای کشور دارای فعالیت ضد لیشمانیایی قوی هستند که بسیار قویتر از بعضی گونه‌های آرتمیزیای گزارش شده دنیا

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشند. بنابراین امید است بتوان تا با بررسی تأثیر آرتمیزیاهایی که تأثیر لیشمانیاکشی قویتری دارند در بدن موجود زنده، بتوان داروی مناسبی جهت درمان و یا بهبود ضایعات حاصل از لیشمانیا در بیماران یافت.

References

1. Heywood VH, Humphries CJ, Anthemideae systematic review. In: VH Heywood, JB Harborn and BL Turner Ceds. The Biology and chemistry of the compositae, Academic Press: London. 1997. p. 868.
2. Tutin TG, Persson K,and Gutermann W. (1976), Flora Europae Vol. 4 (Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S.M., and weeb D. A., eds.). Cambridge University Press, UK, PP. 178-186.
3. Mucciaralli M and Maffel M. Introduction of the genus. In: CW Wright (eds.), Artemisia. Taylor and Francis: London. 1976. p. 1-50.
4. Polyakov p, Artemisia. In: BK Shishkin (eds.), Flora of the USSR (English translation) Bisnen Singh Scientific Books. Koeringstein: Germany. 1997. p. 488-489.
5. Podlech D, KH Rechinger. Flora Iranica Akademische Druck-u. Verlagsansalt: Graz. 1976. p. 158-223.
6. Ghahreman A, Attar F. Biodiversity of plant species in Iran. Tehran University Publication: Tehran. 1999. p. 41-42.
7. Emami SA, et Aghazari F, Les Phanerogames endemiques de la flore d Iran L Institute de Researches des forets et des paturag, Tehran, 2001.
8. Tan RV, Zh eng WF, Tang HQ. Biologically active substances from genus. Artemisia Planta Medica 1998; 64: 295-302.
9. Zheng GQ. 1994 Cytotoxic terpenoides and flavonoides from Artemisia annua. Plant Medica 1994; 60: 54-57.
10. Cakir A, Kilic H, Kodali S, Mavi A, Yildirim A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species. J Agric Food Chem 2005; 53: 1408-1416.
11. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191-1199.
12. Ashford RW, Desjeux P, De Roadt P. Estimation of population at risk of infection & number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today 1992; 8: 104-105.
13. Modabber F. Leishmaniasis, in tropical disease research progress 1991-1992. (UNDP/World Bank/WHO special programme for research and training in tropical disease), World Health Organization, Geneva, 1993 p. 77-87.
14. UNDP/WB/WHO, The leishmaniasis. In: Tropical disease: Progress in International Research, 1987-1988, WHO special programme for research and training in tropical disease, ninth programme report, World Health Organization, Geneva.
15. Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson ADM, Pinching AJ. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical feature and response to therapy. Q J Med 1999; 77: 1101-1111.
16. Savorinin BS, Elias R, Lanza AMD, Balansard G, Gasquet M, Delmas F, Planta Medica 1991; 57: 260-262.
17. McGregor A, WHO warns of epidemic leishmania. Lancet 1998; 351: 575.
18. Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N, Idrissi NG. In vitro evaluation of antileishmania activity of Artemisia herba alba Asso. Bull Soc Pathol Exot 2001; 94: 29-31.
19. Ganguly S, Bandyopadhyay S, Bera A, Chatterjee M. Antipromastigote activity of an ethanol extract of leaves of Artemisia Indica. Indian Journal of Pharmacology 2006; 38: 64-65.
20. Sereno D, Lemerse JL, Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997; 41: 972-976.
21. Sereno D, Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of Leishmania amazonensis in vitro. Parasitol Res 1997; 83: 401-403.

Archive of SID

www.SID.ir