Evaluation of antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (*Pistacia atlantica*) in vitro and in vivo

Adel Ghaderi[1], Mohammad Bagher Khadem-Erfan[2], Mohammad Barati [1], Shahla Ghaderi[2]
1.Infectious Diseases Research Center, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran, , Tel:021-43822990, Email: mbaratim@gmail.com
2.Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medical Sciences, Kordestan University, Sanandaj, Iran.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

ABSTRACT

background and Aim: Leishmaniasis is a zoonotic disease which presents with a wide range of clinical features, including cutaneous and visceral forms in Iran. *Leishmania (L) major* is one of the agents responsible for cutaneous leishmaniasis transmitted by the bite of sand fly. In this study we assessed the antileishmania effect of *pistacia Atlantica* (alpha-pinene) in culture and also its therapeutic effects on Balb/c mice infected with *L. Major*.

Material and Method: Certain amount of promastigots was challenged with increasing concentrations of *pistacia atlantica* extract. MTT test was used to assess promastigote survival after 24, 48 and 72 hours. For in vivo assessment, in the stationary phase, 0.1 ml solution containing 2×10^6 promastigotes were injected subcutaneously into the base of the tails of the mice. Four weeks after injection, cutaneous lesions appeared and different doses of the extract were applied daily in the form of an ointment for 3 weeks. Diameters of the lesions were measured at the end of each week and therapeutic effect of the extract on the lesions was assessed.

Results: The results of MTT test revealed remarkable effect of the treatment on the growth of promastigots. IC50 values for glucantime and *alpha pinene* were found to be 10 µg/ml and 1.46 µg/ml respectively. 30 % ointment of the extract decreased the lesion diameter significantly while 15% ointment and treatment for control group were ineffective.

Conclusion: The results of the present study showed antileishmanial effect of *alpha-pinene* on Leishmania major promastigots, *in vitro*. Moreover, topical ointment of the extract can reduce size of the lesions caused by the parasite, *in vivo*.

***Keywords*:** *Pistacia atlantica*, *Leishmania major*, Area of lesion, *alpha-pinene*, MTT

Received: June 31, 2018 **Accepted:** July 6, 2018

How to cite the article:
Adel Ghaderi, Mohammad Bagher Khadem-Erfan, Mohammad Barati, Shahla Ghaderi.
Antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (*Pistacia atlantica*) in vitro and in vivo.SJKU.2018;23(4):32-44.URL:http://sjku.muk.ac.ir/article-1-3586-fa.html

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم /آذر و دی ۱۳۹۷/۴۴-۳۲

بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی گیاهی آلفاپاینن (*Pistacia atlantica*) در شرایط آزمایشگاهی و موش حساس آزمایشگاهی BALB/c

عادل قادری[۱]، محمدباقر خادم عرفان[۲]، محمد براتی[۱]، شهلا قادری[۲]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران، تلفن ثابت:۴۳۸۲۲۹۹۰-۰۲۱، Email:mbaratim@gmail.com

۲.گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز از جمله بیماری‌های مشترک انسان و حیوان است که با طیف وسیعی از علائم بالینی به‌ویژه ضایعات جلدی (سالک) و احشایی (کالا آزار) در ایران همراه است. *لیشمانیا ماژور* یکی از علل لیشمانیوز جلدی است که به‌وسیله نیش پشه‌ی خاکی منتقل می‌شود. در مطالعه حاضر تأثیر آلفاپاینن، عصاره‌ی گیاهی بنه (*Pistacia atlantica*) در میزان کشندگی *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت و همچنین اثر درمانی این عصاره بر روی لیشمانیازیس ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c بررسی گردید.

روش بررسی: غلظت‌های افزایش یابنده عصاره‌ی گیاه آلفاپاینن با میزان مشخص پروماستیگوت‌ها مواجه داده شدند. برای محاسبه میزان زنده ماندن، تعداد پروماستیگوت‌ها بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی شرایط درون تنی از چهار گروه موش استفاده گردید، جهت آلوده کردن موش‌ها به میزان ۱/. میلی‌لیتر محلول حاوی ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در فاز ایستا به قاعده دم موش‌ها و به صورت زیر جلدی تزریق شد. حدود ۴ هفته پس از تزریق، ضایعات جلدی مشهود گردید، سپس با استعمال دارو به صورت پماد در دوزهای مختلف به‌صورت روزانه و به مدت سه هفته در ناحیه زخم و اندازه‌گیری مساحت زخم‌ها در پایان هر هفته در گروه‌های مختلف، اثر درمانی دارو در بهبودی زخم بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT حاکی از اثرگذاری تیمار مورد نظر بر رشد پروماستیگوت‌ها بود. میزان IC50 مربوط به عصاره آلفا پاینن ۱/۴۶ µg/ml و گلوکانتیم ۱۰µg/ml محاسبه گردید. در شرایط درون تنی نیز پماد موضعی ۳۰ درصد این عصاره در کاهش اندازه زخم تأثیر داشت، به‌طوری‌که غلظت ۱۵ درصد و داروی کنترل تأثیری را در کاهش اندازه زخم نداشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد، استفاده از عصاره آلفا پاینن در شرایط برون تنی اثر ضد لیشمانیایی مناسبی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور نشان داد و در شرایط درون تنی نیز بر روی موش حساس آزمایشگاهی باعث محدود شدن زخم گردید.

کلمات کلیدی: *Pistacia atlantica*، *لیشمانیا ماژور*، مساحت زخم، *آلفاپاینن*، MTT

وصول مقاله:۹۶/۳/۱۰ اصلاحیه نهایی:۹۷/۷/۹ پذیرش:۹۷/۷/۱۴

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

مقدمه

لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای است که توسط گونه‌های انگل لیشمانیا و گزش پشه خاکی ماده ایجاد می‌گردد. سالیانه حدود ۱۲ میلیون نفر در ۹۸ کشور در سراسر جهان به این بیماری مبتلا می‌گردند و حدود ۳۵۰ میلیون نفر هم در معرض خطر با گونه‌های مختلف تک یاخته لیشمانیا هستند. گونه‌های لیشمانیا در انسان می‌توانند ایجاد بیماری‌های لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز جلدی-مخاطی و لیشمانیوز احشایی نمایند(۱).

لیشمانیازیس پوستی یکی از مهم‌ترین علل ضایعات پوستی اولسراتیو مزمن است. از نظر بالینی بیماری به اشکال مختلف دیده می‌شود. لیشمانیازیس پوستی حاد، لیشمانیازیس پوستی مزمن، لیشمانیازیس پوستی عودکننده و لیشمانیازیس پوستی منتشر(۲). لیشمانیوز جلدی-مرطوب (لیشمانیوز نوع روستایی) یکی از اشکال مهم و شایع بیماری لیشمانیوز است که توسط گونه *لیشمانیا ماژور* ایجاد می‌گردد، این بیماری جزء بیماری‌های زئونوز (مشترک بین انسان و حیوان) بوده و سالیانه افراد زیادی را در ایران و جهان درگیر می‌کند (۳).

داروهای شیمیایی مختلفی ازجمله میلتفوسین، پنتامیدین، آمفوتریسین B، عوامل ضد قارچی (از قبیل، کتوکونازول، فلوکونازول، ایتراکونازول)، پاروموماسین، آلوپورینول و مپاکرین در درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. خط اولیه درمان این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی‌موآن است(۴).

اغلب فرآورده‌های دارویی و ترکیبات ضد لیشمانیایی دارای سمیت و عوارض جانبی بوده به‌طوری‌که مواردی از مقاومت دارویی در درمان با گلوکانتیم در برخی بیماران دیده‌شده است. همچنین درمان با این داروها طولانی‌مدت بوده به طوری که ممکن است تا چندین ماه فرد مبتلا نیاز به استفاده از دارو داشته باشد. از طرفی معمولاً درمان مؤثر لیشمانیوز جلدی با گلوکانتیم نیاز به تزریق دارو در محل ضایعه دارد و ازآنجاکه ضایعات عمدتاً در دست یا صورت فرد مبتلا دیده می‌شود، تزریق دارو با درد همراه است. گلوکانتیم علاوه بر اثری که بر روی انگل دارد می‌تواند باعث تخریب سلول‌های طبیعی بدن فرد مبتلا شود که این امر یکی از مهم‌ترین اثرات جانبی استفاده از گلوکانتیم است. زخم مشکل جدی برای بیمار ایجاد نمی‌کند و در اکثر موارد بهبودی خودبه‌خودی حاصل می‌شود، ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بدشکل بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه، ارائه روش درمانی آسان، قابل‌تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد(۶-۴).

با توجه به اثرات سمی و عوارض جانبی این داروها و ترکیبات شیمیایی، بنابراین استفاده از گیاهان و فرآورده‌های گیاهی بومی مناطق اندمیک بیماری که منبع غنی ترکیبات ضد لیشمانیایی را فراهم می‌کنند به عنوان استراتژی جدید درمانی در محدود کردن و درمان این بیماری، جزء اهداف مهم سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سایر نهادهای بهداشتی و درمانی در دنیا و ایران است. استفاده از گیاهان دارویی به علت ماهیت طبیعی خود دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی می‌باشند(۷و ۵).

بنه (*Pistacia atlantica*) یک نوع درخت از خانواده آنکاردیاسه (*Ancardiaceae*) است که عمدتاً در مناطق غربی (کوه‌های زاگرس) مشاهده می‌شود. میوه‌های بنه توسط افراد محلی پس از آسیاب کردن و مخلوط کردن با مواد طعم‌دهنده دیگر به عنوان مواد غذایی استفاده می‌شود و همچنین از صمغ یا شیره غلیظ (Oleoresin) بنه برای ساخت آدامس در ایران استفاده می‌شود(۸). آلفا پاینن مهم‌ترین ماده تشکیل‌دهنده‌ی عصاره‌ی گیاه بنه است که در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره این گیاه مورد بررسی قرارگرفته است(۹و۸)

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

با توجه به اینکه گیاه بنه از جمله گیاهان بومی منطقه کردستان است و سابقه زیادی در طب سنتی این منطقه دارد و اثرات ضد میکروبی آن در متون علمی مختلف مورد تائید قرارگرفته است، لذا به همین منظور در این مطالعه اثر ضد لیشمانیایی آلفاپاینن، عصاره‌ی گیاهی بنه (*Pistacia atlantica*) در شرایط برون تنی و همچنین در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c موردبررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه و استخراج عصاره‌های گیاهی

با پایان بارش‌های بهاره و رسیدن دما به حداکثر میزان خود در منطقه رشته کوه‌های زاگرس (بین اواسط خرداد تا اوایل تیرماه) کار بهره‌برداری شیره سقز از درختان بنه آغاز می‌شود چون در این زمان درخت در حال رشد است و شیره سقز از آن تراوش می‌کند (تصویر ۱). شیره را به شرکت سقز سازی انتقال داده سپس همراه با آب در دیگ‌های جوش به نقطه‌ی جوش رسانیده و بعد از به جوش آمدن، بخارات حاصله توسط دستگاه تقطیر در مخزنی مدرج ذخیره می‌شوند. در این مخزن دو فاز جدا از هم تشکیل می‌گردد که شامل آب و آلفا پاینن است. آب به علت سنگین بودن در زیر قرار می‌گیرد سپس توسط شیر تخلیه خارج می‌گردد، در نهایت آنچه در مخزن باقی می ماند عصاره‌ی گیاه بنه یا همان آلفا پاینن خواهد بود. به این عصاره به این علت آلفا پاینن گفته می‌شود چون بعد از GC-MS گرفته شده از عصاره، بیش از ۹۷٪ آن را آلفاپاینن تشکیل می‌دهد. آلفاپاینن عصاره‌ای روغنی و هیدروفوبیک است.

تهیه و کشت انگل

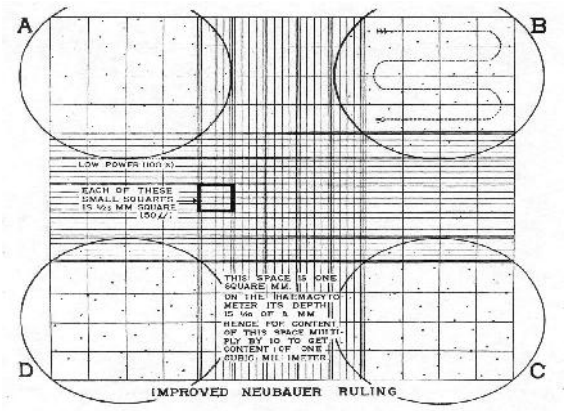
این مطالعه به روش تجربی (Experimental) بر روی انگل *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد با کد شناسایی (MRHO.IR.75.ER) در شرایط برون تنی و همچنین درون تنی (موش آزمایشگاهی) انجام شد.

سویه استاندارد از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و بعد از کشت و پاساژهای متوالی به دانشکده علوم پزشکی دانشگاه کردستان منتقل شد. به‌منظور کشت انگل لیشمانیا، محیط *RPMI1640* به‌صورت آماده خریداری شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ۱۰۰unit/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین و به عنوان ماده مکمل سرم جنین گوساله (FBS) ۱۰٪ به محیط اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و هر روز با میکروسکوپ اینورت (invert) بررسی شد. درصورتی‌که رنگ محیط زرد شده و پروماستیگوت‌ها وارد فاز ایستا شدند، محیط کشت جدید به آن‌ها اضافه گردید. این کار تا زمانی انجام شد که تعداد انگل به میزان مورد نیاز برسد. برای شمارش تعداد انگل از لام نئوبار استفاده شد که مقطع آن در تصویر شماره ۲ نشان داده‌شده است

تصویر ۱: نحوه بهره برداری شیره از درخت بنه

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018



تصویر ۲: مقطع لام نئوبار جهت شمارش پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

پروماستیگوت‌ها در فاز لگاریتمی به میزان ۱۰۰ لاندا (حاوی $۰/۵ \times ۱۰^{۶}$ پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای) کشت داده شدند، سپس به همان میزان غلظت-های افزایش یابنده از آلفا پاینن به صورت تری‌پلیت برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد با پروماستیگوت‌ها مواجهه داده شدند. در هر پلیت به عنوان کنترل منفی به ازای هر تکرار یک چاهک دارای پروماستیگوت و PBS[1] قرار داده شد، سپس انگل‌ها شمارش و برای محاسبه میزان زنده‌مانی توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش MTT

این آزمون که نوعی آزمون رنگ سنجی محسوب می‌شود و بر پایه‌ی شکسته شدن نمک تترازولیوم MTT(۳-(۴و۵-دی متیل تترازولیل -۲)-۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) زرد به کریستال‌های فورمازون بنفش توسط سلول‌هایی است که ازنظر متابولیکی فعّال هستند. این احیاء سلولی با دخالت کوفاکتور نوکلئوتید پیریدین NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می-گیرد. کریستال‌های فورمازونی که تشکیل می‌شوند قابل‌حل شدن می‌باشند و جذب نوری محلول رنگی حاصل، می‌تواند با استفاده از روش الایزا به طور کمّی مورد بررسی قرار گیرد. کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی به صورت تریپلیکیت انجام شد و نتایج با دستگاه الایزا ریدر شرکت Biotek مدل Synergy HTX قرائت شد (۱۰و ۶)

به میزان ۲۰ لاندا MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و چاهک‌ها در محیط تاریک به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت به میزان ۱۰۰ لاندا DMSO به‌منظور حل کردن مواد درون چاهک ریخته شده و پیپتینگ انجام شد. در پایان، جذب نوری حاصل در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد. سپس میزان IC50 (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰٪ ارگانیسم می‌شود) نیز محاسبه شد.

جامعه موردمطالعه

با توجه به مطالعات مشابه، در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و گروه آزمون به‌طور جداگانه، تعداد ۱۰ موش در هر گروه تعیین گردید. موش‌ها را با تعداد مشخصی از انگل لیشمانیا ماژور سویه ایرانی، آلوده کرده سپس با دوزاژ مشخص از عصاره‌ی آلفا پاینن (گروه آزمون)، داروی استاندارد (گروه کنترل مثبت) و هیچ‌کدام (گروه کنترل منفی) تحت درمان قرار گرفتند، سپس بهبودی زخم ایجادشده در اثر انگل، بررسی شد.

در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش BALB/c، ۴ تا ۶ هفته-ای، ماده با وزن متوسط ۲۵ گرم از مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، واقع در مؤسسه تحقیقات انستیتو-پاستور خریداری شده و جهت رفع استرس پس از گذشت یک هفته در خانه حیوانات مرکز بیماری‌های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران تلقیح انگل انجام شد. جهت آلوده کردن موش‌ها به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در فاز ایستا

[1] Phosphate-buffered saline

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

(Stationary) به‌وسیله سرنگ انسولین به قاعده دم موش‌ها و به صورت زیر جلدی تلقیح شد. پس از گذشت حدود ۴ هفته از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل تزریق پدید آمد که پس از حدود ۲ هفته به زخم مبدل شد. سپس به خانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه کردستان منتقل شدند.

تهیه پماد عصاره آلفا پاینن

پمادهای ۱۵ و ۳۰ درصد مربوط به این عصاره بر پایه وازلین-اوسرین تهیه گردید. جهت آماده‌سازی پماد ۱۵ درصد، به میزان ۱۵ میلی لیتر عصاره حاصله با ۸۵ میلی لیتر از ترکیب وازلین و اوسرین (به ترتیب به نسبت ۵۰ و ۳۵ میلی‌لیتر) مخلوط گردید. پماد ۳۰ درصد نیز با ترکیب ۳۰ میلی‌لیتر عصاره و ۷۰ میلی‌لیتر از ترکیب وازلین و اوسرین (به ترتیب به نسبت ۵۰ و ۲۰ میلی‌لیتر) مخلوط گردید.

اندازه‌گیری زخم

جهت بررسی زخم هر هفته با استفاده از دوربین دیجیتال از زخم عکس گرفته شد و مساحت زخم با استفاده از نرم افزار اتوکد از روی تصاویر حاصل از زخم برآورد گردید (۱۱). تصویر شماره ۳ زخم ایجادشده در موش آلوده به لیشمانیا ماژور و نحوه اندازه‌گیری زخم نشان داده‌شده است.

تصویر ۳: زخم ایجاد شده در موش آلوده به *لیشمانیا ماژور* و نحوه اندازه‌گیری زخم

شروع درمان، طول دوره درمان و اندازه‌گیری مساحت زخم

زخم‌ها پس از گذشت حدود شش هفته مشهود و درمان از این زمان شروع شد. اندازه زخم‌ها از ابتدای مشهود شدن ثبت گردیدند. مدت زمان درمان سه هفته به طول می‌انجامد. گروه‌ها روزانه با مقداری از پماد که سطح زخم را پوشش دهد تحت درمان قرار گرفتند (۱۱).

در مورد گروه کنترل مثبت نیز با تزریق روزانه‌ی گلوکانتیم (بر اساس دوز استاندارد دارو) در اطراف زخم، به صورت زیر جلدی (SC) درمان صورت گرفت.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت مقایسه میانگین اندازه زخم در مدت سه هفته در گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه[2] استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به‌صورت دوبه‌دو بین گروه‌های مختلف از آزمون T-test استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد و سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج *برون تنی (In vitro)*

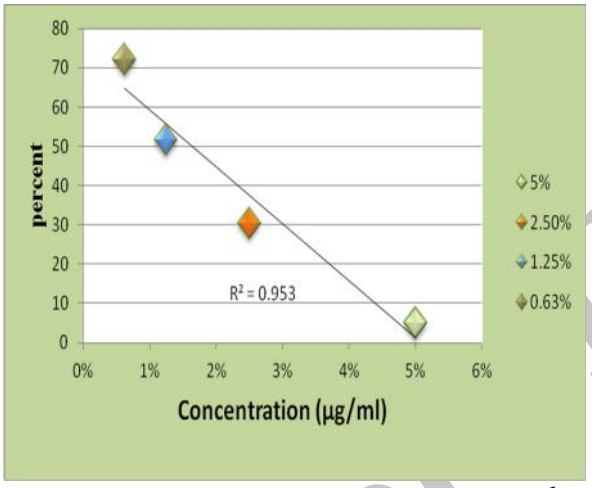
پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، درصد انگل‌های زنده با استفاده از روش MTT نشان داد که در حضور غلظت‌های ۵- ۲/۵- ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ درصد عصاره‌ی آلفا پاینن تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد که این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است($P<0/05$). مقایسه اثر ضد لیشمانیایی غلظت های مختلف آلفا پاینن نشان داد که با افزایش غلظت، موجب مهار رشد پروماستیگوتهای *لیشمانیا ماژور* گردیده است (نمودار ۱).

1- One- Way Analysis of Variance (One- Way ANOVA)

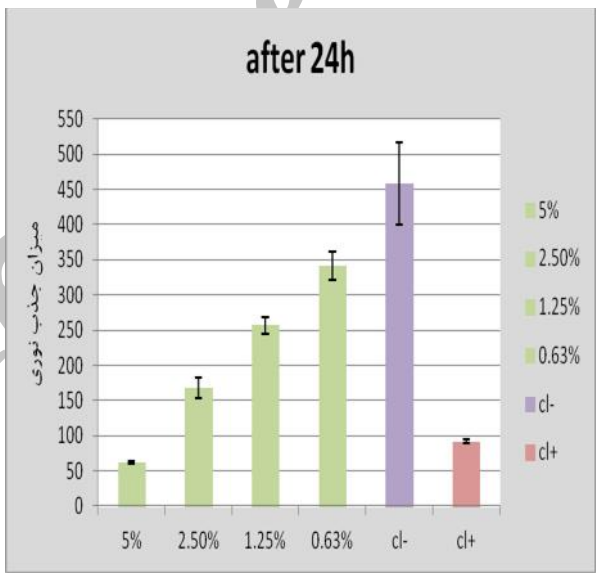
Archive of SID

www.SID.ir

در نمودار شماره ۲، مقایسه میانگین جذب نوری آلفا پاینن و گروه کنترل مثبت (گلوکانتیم) و منفی بعد از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره میزان جذب نوری کاهش می‌یابد. همچنین نمودار شماره ۳ و ۴، میانگین جذب نوری در گروه‌های دارو و کنترل را به ترتیب بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد.



نمودار۱. درصد زنده مانی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* با غلظت های مختلف عصاره آلفا پاینن در شرایط برون تنی بعد از ۴۸ ساعت

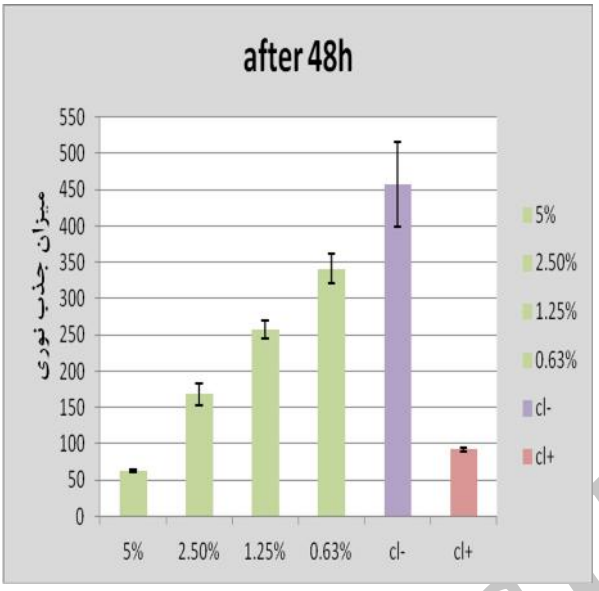


نمودار(۲). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف آلفا پاینن، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و گروه کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۲۴ ساعت

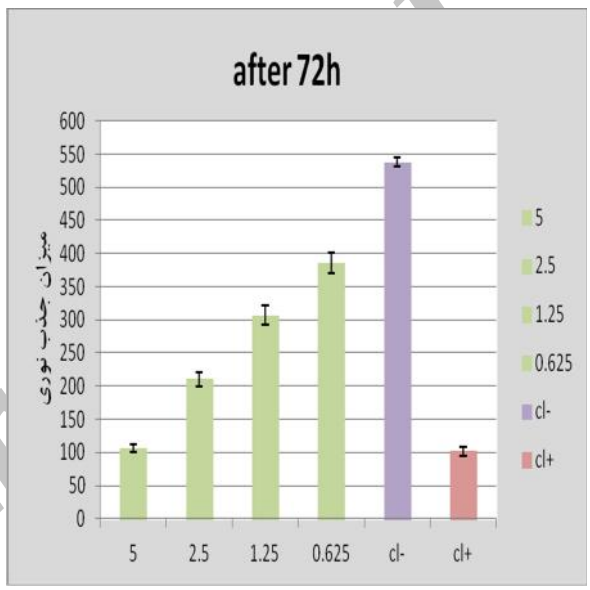
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018



نمودار (۳). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف آلفا پاینن، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۴۸ ساعت



نمودار (۴). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف آلفا پاینن، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۷۲ ساعت

با توجه به نمودارهای بالا این نتیجه به دست می‌آید که با گذشت زمان تغییر معنی‌داری در میزان مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا در حضور عصاره آلفا پاینن به وجود نمی‌آید.

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

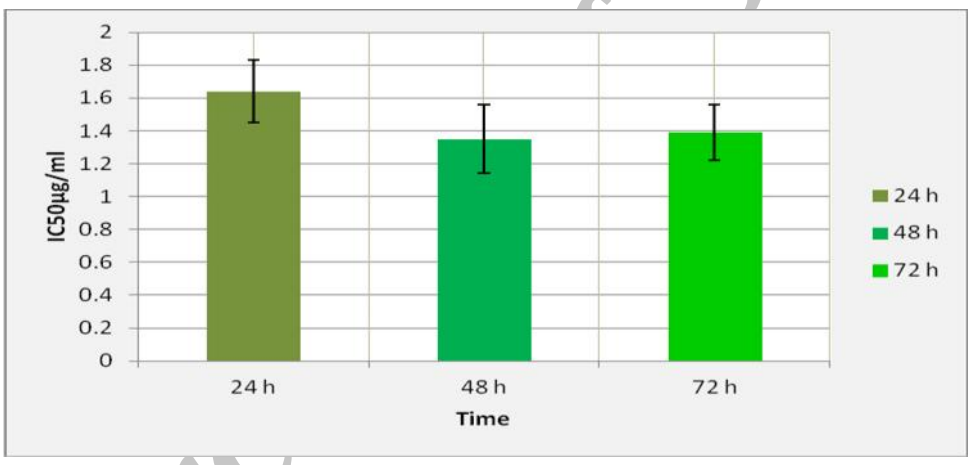
میزان IC50 عصاره آلفا پاینن و گلوکانتیم (کنترل مثبت) در زمان‌های مختلف، موردبررسی قرار گرفت و با توجه اینکه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، در نهایت IC50 میانگین محاسبه شد (جدول ۱).

جدول(۱) مقایسه میزان IC50 در زمان‌های ۲۴،۴۸و ۷۲ ساعت برای آلفاپاینن و گلوکانتیم

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
آلفاپاینن	۱/۶۴	۱/۳۵	۱/۳۹
گلوکانتیم	۱۲	۹	۹

میانگین IC50 برای آلفاپاینن =۱/۴۶ µg/ml

میانگین IC50 برای گلوکانتیم =۱۰ µg/ml



نمودار(۵). مقایسه میزان IC50 عصاره آلفا پاینن در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور*

درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های تیمارشده با غلظت-های مختلف آلفاپاینن و گلوکانتیم با استفاده از تست MTT نشان می‌دهد که هر دو گروه تیمار نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معنی‌داری دارند. در گروه‌های تیمار آلفا پاینن نیز با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رشد پروماستیگوت ها افزایش یافت.

نتایج *درون تنی (In vivo)*

میانگین مساحت زخم در گروه‌های تیمار و کنترل در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. در تمامی گروه‌های گلوکانتیم، تیمار و کنترل منفی میانگین مساحت زخم هفته-های اول، دوم و سوم پس از شروع درمان اندازه‌گیری شد. حداقل اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

جدول (۲). مقادیر میانگین و انحراف معیار مساحت زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در گروه‌های تیمار و کنترل بر حسب میلی‌متر مربع

زمان (هفته)	گلوکانتیم	آلفا پاینن ۱۵ درصد	آلفا پاینن ۳۰ درصد	کنترل منفی
۰	۲/۲۱±۱/۲۶	۲/۸۳±۲/۴۴	۱/۳۴±۱/۳۷	۲/۱۳±./۴۷
۱	۲/۶۰±۱/۵۷	۳/۱۴±۲/۳۳	۰/۷۳±./۴۱	۲/۸۰±./۵۲
۲	۳/۴۴±۲/۱۵	۲/۸۲±۱/۷۱	۰/۵۷±./۳۹	۳/۵۰±./۷۵
۳	۳/۵۲±./۶۸	۲/۵۵±۱/۳۱	۰/۲۷±./۲۳	۴/۲۷±۱/۰۷

جدول (۳)، نشان می‌دهد که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های آلفا پاینن ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی مشاهده نشد (حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار با هم می‌باشند)، اما گروه آلفا پاینن ۳۰ درصد با گروه های آلفا پاینن ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌دار در پایان هفته سوم است.

جدول (۳): اختلاف آماری بین گروه‌های مختلف در پایان هفته سوم در اندازه مساحت زخم برحسب میلی‌متر مربع ناشی از لیشمانیا ماژور.

گلوکانتیم	آلفا پاینن ۳۰ درصد	آلفا پاینن ۱۵ درصد	کنترل منفی
۲/۹۴±۱/۴۱	۰/۷۳±۰/۶۰	۲/۸۳±۱/۴۱	۳/۱۷±۰/۷۰
A	B	A	A

بحث

لیشمانیوز جلدی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم و اندمیک در برخی از کشورهای مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ازجمله ایران به حساب می‌آید. این بیماری در مهر و موم‌های اخیر در برخی استان‌های ایران روند افزایشی به خود گرفته است(۱۳و۱۲). درمان معمول لیشمانیوزها استفاده از ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی است که این داروها گران، کمیاب و دارای عوارض جانبی شدید می‌باشند، علاوه بر این درمان با آن‌ها زمان بر بوده و همچنین در مهر و موم‌های اخیر موارد متعددی از مقاومت دارویی این ترکیبات گزارش گردیده است که موجب شده کارایی درمانی آن‌ها زیر سؤال رود(۲)، بنابراین استفاده از ترکیبات و فرآورده‌های گیاهی که در دسترس و کم هزینه بوده و همچنین دارای اثرات جانبی کمتری می‌باشند به عنوان استراتژی درمانی نوین، به‌ویژه در مناطق بومی ضرورت دارد(۱۴).

در مطالعه حاضر، نتایج اثر ضد لیشمانیایی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آلفا پاینن و داروی کنترل (گلوکانتیم) در شرایط برون تنی و درون تنی بررسی شد. برای تعیین اثرات عصاره بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* و مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

آن با دارو از روش رنگ سنجی MTT، استفاده شد که نتایج نشان داد، با افزایش غلظت، موجب افزایش مهار رشد پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* می گردد و کاهش جذب نوری بیانگر این اثر مهاری است. در ایران در مطالعات متعددی از این روش رنگ سنجی جهت بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره های گیاهی، به دلیل فوایدی ازجمله سادگی، سهولت، تکرار پذیری، ارزانی، ایمن و قابل‌اطمینان بودن، مورد استفاده قرار گرفته است(۱۵و۶).

همچنین در مقایسه میانگین جذب نوری بین داروی کنترل و عصاره موردبررسی، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد؛ اما باگذشت زمان، از نظر آماری اختلاف معنی داری در میزان مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا در حضور عصاره آلفا پاینن وجود نداشت.

میزان IC50 مربوط به عصاره آلفا پاینن ۱/۴۶ µg/ml و گلوکانتیم ۱۰µg/ml محاسبه گردید که نشان می دهد عصاره آلفا پاینن در مقایسه با داروی کنترل گلوکانتیم دارای تأثیر مناسبی در مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی است.

در سال‌های اخیر خواص بیولوژیکی متعددی برای آلفا پاینن (پیستاسیا آتلانتیکا) گزارش گردیده است. در مطالعات مختلفی خاصیت ضد میکروبی(۱۶) و همچنین اثر ضد قارچی(۱۷) آن مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه دیگری تأثیر ضد انگلی عصاره‌ی میوه و برگ آن بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک بررسی گردیده است(۱۸).

اخیراً فعالیت ضد لیشمانیایی آلفاپاینن در شرایط برون تنی بر روی لیشمانیا آمازونسیس (L. amazonensis) بررسی‌شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که آلفاپاینن ترکیب فعال بیولوژیکی بر علیه هر دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا آمازونسیس در شرایط آزمایشگاهی است(۱۹).

در زمینه ارزیابی خواص دارویی و سمیت فرآورده‌ها و ترکیبات جدید دو دیدگاه وجود دارد عده‌های اعتقاد به کاهش استفاده از حیوانات در شرایط آزمایشگاهی را دارند که این امر، باعث گسترش روش‌های برون تنی گردیده است(۱۲). در یک روش، از پروماستیگوت ها جهت بررسی تأثیر مواد ضد لیشمانیایی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می گردد.

در این زمینه براتی و همکاران اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد را در مقایسه با داروی کنترل مورد بررسی قرار دادند به طوری که عصاره ها و داروی کنترل تأثیر مناسبی بر مهار رشد پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* نشان دادند(۶). همچنین در مطالعه‌ای دیگری عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه، رشد پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی را مهار کردند(۱۴).

اما به توجه به اینکه فرم آماستیگوت انگل در بدن میزبان حضور داشته و مسئول ایجاد علائم بالینی لیشمانیوز است بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی بافرم آماستیگوت دارای اهمیت بسزایی باشد. بدین منظور محیط‌های کشت اگزنیک آماستیگوت (Axenic amastigote) تولیدشده‌اند تا در مطالعات غربالگری ترکیبات جدید ضد لیشمانیایی بر روی این فرم انگل مورداستفاده قرار گیرند (۲۰و۱۵و۱۲). همچنین محیط‌های اگزنیک جهت شناخت مکانیزم های تمایز، بقا و بیماری‌زایی انگل به منظور توسعه و شناسایی اهداف مولکولی و شیمی‌درمانی دارای اهمیت می‌باشند(۲۱).

دیدگاه دوم بر این عقیده است که مدل‌های حاوی فرم داخل سلولی انگل یکی از بهترین روش‌ها برای ارتباط دادن فعالیت برون تنی یک دارو با اثربخشی آن در شرایط درون تنی است(۱۲)، بنابراین استفاده از حیوان آزمایشگاهی را جهت انجام مطالعات ضد لیشمانیایی توصیه می کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

در مطالعه حاضر مدل درون تنی نیز با استفاده از موش حساس آزمایشگاهی BALB/c جهت بررسی اثرات درمانی عصاره آلفا پاینن مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از آلوده کردن موش‌ها و ایجاد زخم لیشمانیایی از پماد های حاوی ۱۵ درصد و ۳۰ درصد آلفا پاینن در گروه‌های مداخله استفاده شد و در گروه کنترل نیز از تزریق داروی گلوکانتیم جهت درمان استفاده گردید. نتایج نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه های آلفا پاینن ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی مشاهده نشد و عملاً تأثیر درمانی آن‌چنانی نداشتند اما گروه آلفا پاینن ۳۰ درصد با گروه های آلفا پاینن ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی اختلاف معنی دار در پایان هفته سوم نشان داد؛ بنابراین پماد حاوی عصاره ۳۰ درصد در مقایسه با پماد ۱۵ درصد این عصاره و نیز داروی گلوکانتیم زخم ناشی از لیشمانیا را محدود کرده و سبب بهبودی سریع‌تر زخم گردید.

در راستای یافته‌های این پژوهش، در یک مطالعه اثر ضد لیشمانیایی صمغ به دست آمده از *پیستاسیا آتلانتیکا* بررسی شد که در آن مطالعه ثابت گردید صمغ مربوطه، لیشمانیوز جلدی در موش‌های آلوده به *لیشمانیا ماژور* را کنترل کرده و قادر به کاهش اندازه زخم در آن‌ها است (۲۲).

در مطالعه دیگری اثر ضد لیشمانیایی عصاره الکلی پیستاسیا کینجاک (*P. khinjuk*) بر روی *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره تأثیر چشمگیری بر روی فرم‌های پروماستیگوت و آماستیگوت *لیشمانیا تروپیکا* داشته و در شرایط درون تنی نیز در موش‌های (BALB/c) آلوده که با غلظت ۳۰٪ عصاره تیمار شده بودند، اثر مهاری مناسبی داشته در حالی که در غلظت ۲۰٪ دارای تأثیر متوسطی در مهار رشد انگل لیشمانیا ماژور است(۱۱) که این نتایج با یافته های مطالعه حاضر همخوانی دارد.

امروزه توسعه و گسترش داروهای مؤثر، ایمن و قابل‌استعمال موضعی برای درمان لیشمانیوز یک امر ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه داروی گلوکانتیم که به‌صورت تزریقی استفاده می‌شود دارای عوارض دارویی بوده درحالی‌که عصاره آلفا پاینن عوارض جانبی کمتری داشته و علاوه بر این به‌صورت پماد جلدی مورد استفاده قرار می‌گیرد و اثرات درمانی بهتری نیز نشان داد، بنابراین می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان لیشمانیوز جلدی باشد.

نتیجه‌گیری

بر پایه‌ی نتایج این مطالعه می‌توانیم نتیجه بگیریم که استفاده از عصاره آلفا پایان درخت بنه (pistica atlantica) در شرایط *برون تنی (In vitro)* سبب مهار رشد پروماستیگوتهای *لیشمانیا ماژور* می‌شود، به نحوی که با افزایش غلظت، میزان مهار آلفا پاینن افزایش یافت. همچنین در شرایط *درون تنی (In vivo)* *پماد ۳۰ درصد آلفا پاینن* نیز زخم را محدود کرده و سبب بهبودی سریع‌تر می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی آجا و همکاری دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام گردید. بدین‌وسیله نویسندگان از دکتر عباس احمدی و دکتر پیمان توکلی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

Reference

1.Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 305-18.

2. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000Research 2017; 6: 750.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

3. Pakzad R, Dabbagh-Moghaddam A, Mohebali M, Safiri S, Barati M. Spatio-temporal analysis of cutaneous leishmaniasis using geographic information system among Iranian Army Units and its comparison with the general population of Iran during 2005-2014. J Parasit Dis 2017; 41: 1114-22.
4. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. Am J Clin Dermatol 2015;16: 99-109.
5.Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005; 12: 514-35.
6. Barati M, Sharifi I, Sharififar F. In vitro evaluation of anti-leishmanial activities of Zataria Multiflora Boiss, Peganum Harmala and Myrtus Communis by colorimetric assay. Journal of Kerman University of Medical Sciences 2010; 17: 32-41.
7. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry 2005; 66: 2056-71.
8. Hatamnia AA, Abbaspour N, Darvishzadeh R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits. Food Chem 2014; 15; 145: 306-11.
9. Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. Afr J Pharm Pharmacol 2008; 2: 22-8.
10. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev 2005;11:127-52.
11. 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.
12. De Muylder G, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A screen against Leishmania intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e1253.
13. Pouresmaeelian S, Sharifi I, Aflatoonian M, Fotouhi Ardakan R, Mirzaee M, Barati M. A new focus of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Dehbakry region of Bam district, southeastern Iran 2008. JKMU 2010; 7: 15-24.
14. Barati M, Sharifi I, Sharififar F, Hakimi Parizi M, Shokri A. Anti-leishmanial activity of gossypium hirsutum L., Ferula assa-foetida L. and Artemisia aucheri Boiss. Extracts by colorimetric assay. Anti Infect Agents 2014; 12: 159-64.
15. Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 972–6.
16. Ali Roozegar M, Azizi Jalilian F, Reza Havasian M, Panahi J, Pakzad I. Antimicrobial effect of Pistacia atlantica leaf extract. Bioinformation 2016; 12: 19-21.
17. Shialy Z, Zarrin M, Nejad BS, Naanaie SY. In vitro antifungal properties of Pistacia atlantica and olive extracts on different fungal species. Curr Med Mycol 2015; 1: 40-5.
18. Zibaei M, Rostamipour R, Nayebzadeh H. Effect of Pistacia atlantica Fruit and Leaf Extracts on Hydatid Cyst Protoscolices. Recent Pat Anti Infect Drug 2016; 11: 53-8.
19. Rodrigues KA, Amorim LV, Dias CN, Moraes DF, Carneiro SM, Carvalho FA. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol 2015; 160: 32-40.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, Nosratabadi J, et al. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Leishmania tropica to meglumine antimoniate. Parasitol Res 2012; 110: 1113-7.
21. Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of Leishmania. Trends Parasitol 2001;17: 150-3.
22. Taran M, Mohebali M, Esmaeli J. In vivo efficacy of gum obtained Pistacia atlantica in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. Iran J Public Health 2010; 39: 36-41.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:41 +0330 on Sunday December 16th 2018

Archive of SID

www.SID.ir