



Evaluation the effects of *Fumaria parviflora* aqueous extracts on *Leishmania major* in vitro and in vivo

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors

Simin A¹
Ghaffarifar* F²
Hamid Delavari H³
Bineshian F.⁴

1-M.Sc in parasitology, faculty of medical sciences, Tarbiat Modares university, Tehran, Iran
a.simin1398@gmail.com)

2-Professor, Department of in Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
(ghafarif@modares.ac.ir)

3-Assistant Professor, Nanomaterials Group, Department of Materials Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(hamid.delavari@modares.ac.ir)

4- Assistant Professor, Parasitology and Mycology Dept., Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences. (fzbineshian@yahoo.com).

*Correspondence

Parasitology and Entomology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran, P.O. Box 14115-331. Tel: +982182884553, Fax: +982182884555
E-mail: ghafarif@modares.ac.ir

Article History

Received: May 8, 2020
Accepted: April 7, 2021
ePublished: March 6, 2021

ABSTRACT

Objective : In the present study the effect of aqueous extract of *Fumaria* which is a native Iranian herb on the promastigote and amastigote under In vitro and In vivo condition.

Materials and Methods: The aqueous extract of the plant was prepared, then it was evaluated the effect of different concentration of aqueous extract under *In vitro* condition on promastigotes, uninfected macrophages and macrophages infected with amastigotes by counting, MTT and Flow Cytometry were evaluated. IC50 was calculated for promastigotes. Also, the effects of aqueous extracts of *Fumaria* ointment on lesions caused by *Leishmani major* in *BALB / c* mice were examined.

Results: The calculated IC50 of *Fumaria* extract on promastigotes after 72 h was 304.17 µg/ml. The effects of *Fumaria* extract showed effective limitation on lesion size. The survival rate for treated mice with *Fumaria* extract showed significant differences with control groups.

Conclusion: The results showed that aqueous extract of *Fumaria* has antileishmanial effects in vitro and in vivo condition. Also aqueous extract of *Fumaria* showed low toxicity against macrophages than pentavalent antimonials.

Keyword: *Fumaria*, *Leishmania major*, Antileishmanial, In vitro, In vivo.

پماد بر بهبود زخم‌های ناشی از لیشمانیا ماژور در موش‌های بلب سی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: IC50 محاسبه شده برای عصاره شاتره روی پروماستیگوت‌ها پس از ۷۲ ساعت ۳۰۴,۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بررسی تاثیر دارو بر قطر زخم‌ها نشان داد عصاره آبی در فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد و می‌تواند رشد زخم را مهار کند. میزان بقا موش‌هایی که تحت درمان با عصاره آبی بودند با گروه کنترل و تحت درمان با وازلین اختلاف معناداری داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره شاهتره دارای آثار ضدلیشمانیایی در شرایط برون تنی و درون تنی بوده و دارای سمیت کمتری بر ماکروفاژها نسبت به ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان دارد.

واژه‌های کلیدی: شاهتره، لیشمانیا ماژور، اثر ضدلیشمانیایی، برون تنی، درون تنی.

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۸

ghafarif@modares.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های آندمیک و انگلی در برخی از نقاط ایران است. بیش از ۷۵-۷۰ درصد موارد جهانی لیشمانیازیس جلدی از ایران گزارش شده است. ایران در منطقه خاورمیانه از نظر ابتلا به لیشمانیازیس جلدی در رتبه نخست و از نظر ابتلا به لیشمانیازیس احشایی در رتبه چهارم قرار دارد [۱]. لیشمانیوز از لحاظ بالینی به سه دسته لیشمانیوز جلدی، احشایی، مخاطی-جلدی تقسیم می‌شود [۲]. لیشمانیوز جلدی به دو شکل روستایی و شهری مشاهده شده است. لیشمانیوز جلدی روستایی بیماری مشترک انسان و حیوان بوده. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی لیشمانیا ماژور و عامل لیشمانیوز جلدی شهری لیشمانیا تروپیکا است [۳]. رایج ترین داروهای موجود استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان (پنتوستام و گلوکانتیم) است. سایر داروهای مورد استفاده عبارتند

بررسی اثر عصاره آبی گیاه شاهتره (Fumaria parviflora) روی لیشمانیای ماژور در شرایط برون تنی و درون تنی

آذرسمین

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس a.simin@modares.ac.ir

فاطمه غفاری فر*

استاد گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ghafarif@modares.ac.ir

حمید دلاوری حسن کیاده

استادیار، گروه نانو مواد، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس hamid.delavari@modares.ac.ir

فرحناز بینشیان

استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان Bineshian@semums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در پژوهش حاضر تاثیر عصاره آبی گیاه شاهتره که از گیاهان بومی ایران است بر پروماستیگوت و اماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی و درون تنی انجام شده است.

مواد و روش کار: پس از تهیه عصاره آبی، اثر غلظت‌های مختلف در شرایط برون تنی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، ماکروفاژهای غیر آلوده و ماکروفاژهای آلوده به اماستیگوت انگل با آزمون‌های شمارش، MTT و فلوسایتومتری سنجیده، IC50 روی پروماستیگوت مشخص شد. عصاره آبی شاهتره به صورت پمادی برای درمان استفاده شد. همچنین تاثیر عصاره آبی به صورت

achillea millefolium، اویشن، چای کوهی، برگ ازگیل، فلوس، هلیله زرد، گل میمون و به دلیل وجود فلاونوئیدها و آلکالوئیدها، رزین و تانن و مواد موثر برای ازبین بردن انگل لیشمانیا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۵-۲۰]. از عصاره متانولی کل گیاه شاهتره ترکیبی به نام $N\text{-}octacosan-7\beta\text{-}\alpha$ جدا شد و خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی علیه *E.Coli*، *C.albicans*، *A.niger* و ضد پروماستیگوتی آن به اثبات رسید [۲۱].

عصاره الکی ۵ گونه شاهتره علیه انگل‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم (مالاریا) و تریپانوزوم بروسی رودسنس بررسی شد که از میان این ۵ گونه *Fumaria densiflora* دارای آثار ضد مالاریایی ۹۳/۸۰٪ و ضد تریپانوزومی ۵۵/۴۰٪ بود [۲۲].

هدف از این پژوهش تهیه عصاره آبی شاتره و بررسی آثار ضد لیشمانیایی آن در شرایط درون تنی و برون تنی و همچنین بررسی اثرا سایتوتوکسیستی بر سلول‌های ماکروفاژ است.

مواد و روش‌ها

سویه انگلی که برای این پژوهش انتخاب شد (MRHO/IR/75/ER) سویه از لیشمانیا ماژور است که توسط ندیم از رومبومیس در منطقه اصفهان جدا شده است.

حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این پژوهش از موش‌های آزمایشگاهی خالص از نوع BALB/c استفاده شده است. موش‌ها همگی ماده و در سن ۸ تا ۶ هفتگی بوده. حیوانات ذکر شده از موسسه سرم سازی رازی تهیه شده و در حیوان خانه متعلق به گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط استاندارد نگهداری شده‌اند.

شرایط *In vitro*

طرز تهیه عصاره آبی گیاه شاهتره

گیاه شاهتره از عطاری معتبر خریداری و زیر نظر کارشناس هر بازیوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تایید شد. کد هر

از آفوتریسین مترونیدازول، دیامیدین، پتتامیدین، آلپورینول، کتوکونازول، استروکونازول، داپسون، پاراموایسین [۴، ۵]. گلوکانتیم رایج‌ترین دارویی است که در ایران استفاده می‌شود. استفاده این دارو به صورت موضعی دردناک و عوارض شایع از جمله بی اشتها، تب و لرز، درد مفاصل و غیره... معمولاً در بیماران با مشکلات کبدی و کلیوی استفاده از این دارو توصیه نمی‌شود. همچنین به علت قیمت بالا این دارو و مشاهده مقاومت انگل به این دارو تلاش برای درمان‌های جایگزین زیاد شده است [۴، ۷، ۶].

داروی گیاهی که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت گیاه شاهتره است. شاهتره یک گیاه دارویی مهم است که در بسیاری از بیماری‌ها به عنوان داروی سنتی استفاده می‌شود از جمله این کاربردها در بیماری‌های پوستی، افزایش باروری مردان، ضد التهاب، ضد اسپاسم و درد و ملین، ضد استفراغ، تب و درمان سوختگی [۹-۸].

Fumarioideae از زیر خانواده *papaveraceae* (خانواده خشخاش) است که دارای ۲۰ جنس و بیش از ۵۷۵ گونه است [۱۰]. این گیاه به نام‌های گوناگون در جهان نامگذاری شده در لاتین به نام *fumus terrae* یعنی دود زمین. در هند به نام‌های گوناگون *pitpapa* و *shatra* است [۱۰-۸].

در ایران ۷ گونه گیاهی علفی یکساله از جنس (*fumaria L.*) موجود است. گونه دارویی شاهتره در ایران *F.parviflora* است [۱۱]. گیاه دارای طعم تلخ، سبز رنگ و بدون بو است [۱۱]. این گیاه در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب به وسعت پهناوری از شمال ایران مانند، گیلان، مازندران، آذربایجان، فارس، شیراز، جزیره خارک، کرمان، خراسان، نیشابور، تهران، ورامین، چهارمحال بختیاری و ... می‌روید [۱۲]. مهمترین ترکیبات دارویی این گیاه آلکالوئیدهای آن است شامل فومارین، پروتوپین، کریپتوکاوین، اسکولرین و تتراهیدرو کوپتیسین و دارای املاح معدنی و ماده موثر گیاه شامل پتاسیم، فوماریک اسید، سینامیک اسید، فومارامیدین پارفومین، بیکوکولین و ترکیبات فلاونوئیدی است. مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی آن روتین است همچنین این گیاه حاوی مواد رزینی و موسیلاژ نیز هست [۱۴-۱۳]. استفاده از گیاهانی مثل ترشک *Rumex*، بومادران

پروماستیگوت به صورت جداگانه اضافه شد حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پلیتها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۱۸-25 درجه قرار داده شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک مقدار ۲۰ μl از محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد. پلیتها دوباره به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس پلیتها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع شده و دور ریخته می شود به طوری که سلولها در ته پلیت ته نشین شدند. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ μl از DMSO اضافه شد. جذب حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. نتایج آزمایش به صورت OD محاسبه شد.

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

دقیقا به روش کشت پروماستیگوتها کشت سلولهای ماکروفاژ نیز انجام می شود فقط به جای انگل از لاین سلولی j774 ماکروفاژ به همان تعداد استفاده می کنیم.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوتها

ماکروفاژها روی لاملهای استریل کشت داده می شود سپس پروماستیگوتهایی که در فاز ایستایی اند به تعداد ۷ تا ۱۰ برابر ماکروفاژ به هر چاهک اضافه می شود. از عصاره‌ی آبی با غلظت های ۵۰۰ و ۲۵۰ و ۱۲۵ و ۶۲٫۵ و ۳۱٫۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و بعد از اضافه شدن به هر لامل، این آزمایش به صورت تریپلیکیت انجام گرفت. لاملها برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس لاملها توسط متانول فیکس و با گیمسا رنگ آمیزی شد. لاملها در پایان به منظور شمارش تعداد ماکروفاژ آلوده به انگل و تعداد آماستیگوتهای موجود در هر ماکروفاژ در تعداد ۱۰۰ ماکروفاژ بررسی می شود. (شاهد منفی (ماکروفاژ و انگل بدون دارو) و شاهد مثبت (ماکروفاژ و انگل درمان شده با گلوکانتیم) است.

بررسی آپوپتوز به وسیله فلوئوسایتومتری

پروماستیگوتهای مواجه شده با غلظت های مختلف عصاره‌ی آبی و هم چنین سلولهای کنترل برای آزمایش فلوئوسایتومتری مورد

باریوم متعلق به شاهتره ۸۰۷۱ است. ابتدا مقدار ۲۵ گرم از گیاه شاهتره خشک و آسیاب شده را به یک بشر ۱۰۰۰ سی سی منتقل کرده ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر روی آن ریخته شد به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه آن را روی حرارت بسیار ملایم گذاشته قبل از جوشیدن از روی شعله برداشته شد و مدت ۳ روز در حالت استراحت و در دمای اتاق قرار دادیم پس از گذشت این مدت با کاغذ صافی، صاف شد. مایع صاف شده را با دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را جدا کرده در پلیت ریخته و در دمای اتاق می گذاریم تا آب آن تبخیر شده و بعد از خشک شدن در فریزر نگهداری می کنیم.

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 2×10^6 پروماستیگوت) در حضور غلظت های مختلف و مشخص شده ۶۲٫۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره‌ی آبی در هنگام مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در سه پلیت جداگانه و به صورت تری پلیکیت در درجه حرارت ۲۲-۲۵ درجه سانتی گراد پی ریزی شده است. در هر پلیت ۳ چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط و بدون هیچگونه دارویی است که این چاهک به عنوان کنترل آزمون است. و همچنین در هر پلیت در ۳ چاهک امفوتریسین و در ۳ چاهک دیگر گلوکانتیم به عنوان دارو اضافه می شود تا اثر عصاره‌ی آبی با این دو دارو مقایسه و ارزیابی شوند.

اندازه گیری تکثیر پروماستیگوتها به وسیله آزمایش

MTT (3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide)

در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از انگل حاوی 10^6 در میلی لیتر از پروماستیگوت اضافه شد.

سپس دارو یا عصاره را با غلظت های مختلف $4000 \mu\text{g/ml}$ ، ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۵۰۰ و ۲۵۰ و ۱۲۵ و ۶۲٫۵ به چاهک های حاوی

همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون من ویتنی استفاده شد. از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک نمونه‌ای برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

In vitro نتایج

نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها
پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی در مرحله اول و با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد، و IC_{50} در عصاره آبی در ۲۴ ساعت به ترتیب ۶/۲۱۵۷ در ۴۸ ساعت به ترتیب ۶۹/۹۷۲ و در ۷۲ ساعت عبارت است از ۱۷/۳۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. با انجام آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) بین غلظت‌های مختلف عصاره و گروه کنترل اختلاف معنا داری دیده شد (جدول ۱).

نتایج MTT

بیشترین اثر بازدارندگی انگل مربوط به غلظت ۴۰۰۰ μ/ml از عصاره آبی گیاه شاهتره است (جدول ۳). کمترین اثر بازدارندگی روی ماکروفاژها مربوط به غلظت ۵/۶۲ μ/ml از عصاره آبی گیاه شاهتره است (جدول ۲).

نتایج فلوسایتومتری

نتایج بررسی عصاره آبی شاهتره در غلظت ۱۰۰۰ μ/ml روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور ۱۶٪ مرگ انگل، ۱۱٪ آپاپتوز اولیه، ۱۹٪ آپاپتوز ثانویه، ۲۵٪ نکروز را نسبت به نمودار ۱ که نمودار کنترل بدون درمان است و حدود ۹۹/۵ درصد انگل‌ها زنده هستند نشان می‌دهد نمودار (۲ و ۱) نمودار فلوسایتومتری نمونه انگل بدون مواجهه با عصاره .

استفاده قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت سانتیفریوژ شد. مطابق پروتکل به همراه بافر فلوسایتومتری به سلول‌های ته نشین شده ۵ λ محلول Annexin-V و ۵ λ محلول PI اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. شدت رنگ Annexin-V و Propidium جذب شده به سلول‌ها توسط دستگاه BDFACSCantoII Flow cytometer بررسی شد. نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo تجزیه و تحلیل شد و به صورت نمودار رشد نمایش داده شد.

In vivo شرایط

روش آلوده‌سازی موش‌های بальب سی با انگل لیشمانیا ماژور و درمان موش‌ها
۰/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی انگل، که حاوی ۱۰^۶ پروماستیگوت را که در فاز ایستا بود به صورت زیر جلدی، به کمک سرنگ انسولین، در ناحیه قاعده دم موش‌ها تزریق شد، پس از گذشت ۴ تا ۵ هفته از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل پدید آمد که پس از حدود ۲ هفته به زخم باز تبدیل شد. برای اطمینان از حضور انگل لیشمانیا در زخم، از روش نمونه برداری و مشاهده با لام مستقیم در زیر میکروسکوپ استفاده شد.

آماده سازی پماد

جهت تهیه پماد موضعی میزان ۵ سی سی از محلول استوک اولیه را با ۵ سی سی از پماد وازلین چشمی ترکیب کردیم. موش‌ها به ۴ دسته ۵ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱. گروه شاهد آلوده بدون درمان.
۲. گروه آلوده تحت درمان با عصاره‌ی آبی گیاه شاهتره (۴۰۰۰ میکروگرم) + وازلین
۳. گروه گلوکانتیم (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) به مدت ۲۸ روز.
۴. گروه درمانی فقط پماد وازلین

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین متغیرهای مطالعه شده در گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد.

جدول (۱) میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا تحت تاثیر عصاره آبی گیاه شاهتره در مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

غلظت بر اساس میکروگرم در میلی لیتر عصاره	میانگین و انحراف معیار پروماستیگوت‌ها $\times 10^4$		
	(۲۴ ساعت)	(۴۸ ساعت)	(۷۲ ساعت)
۴۰۰۰	20.72 ± 0.12	16.41 ± 0.50	13.07 ± 0.41
۲۰۰۰	28.32 ± 0.54	24.55 ± 0.46	21.42 ± 0.41
۱۰۰۰	35.47 ± 0.38	32.27 ± 1.44	30.97 ± 0.71
۵۰۰	42.46 ± 1.04	41.57 ± 0.41	39.72 ± 1.18
۲۵۰	49.15 ± 0.84	48.80 ± 0.79	48.70 ± 1.35
۱۲۵	51.42 ± 1.22	53.80 ± 0.92	51.87 ± 1.37
۶۲/۵	61.77 ± 1.23	56.37 ± 1.93	53.20 ± 1.51
بدون تاثیر عصاره	3 ± 65	$92 \pm 77/51$	120 ± 30
امفوتریسین ب	10 ± 5	7 ± 5	$3 \pm 1/7$
گلوکانتیم	9 ± 2	8 ± 2	3 ± 2

** در تمام گروهها اختلاف معنی داری بین کنترل و نمونه تحت تاثیر * اختلاف معنی دار آماری با گروه کنترل دیده می شود ($p < 0.05$).

جدول (۲) میانگین و انحراف معیار و درصد بازدارندگی تاثیر عصاره آبی گیاه شاهتره بر روی پرو ماستیگوت‌ها و ماکروفاژها در آزمون MTT

غلظت بر اساس (میکروگرم بر میلی لیتر)	میانگین \pm انحراف معیار		میانگین \pm انحراف معیار	
	میزان جذب در پروماستیگوت‌ها	% باز دارندگی	میزان جذب در ماکروفاژها	% باز دارندگی
۴۰۰۰	0.37 ± 0.03	*۴۷	0.66 ± 0.14	*۱۲
۲۰۰۰	0.45 ± 0.02	*۳۶	0.67 ± 0	*۱۱/۸
۱۰۰۰	0.58 ± 0.04	*۱۸	0.69 ± 0.02	*۹/۲۱
۵۰۰	0.60 ± 0.01	*۱۵	0.71 ± 0	*۶/۵
۲۵۰	0.63 ± 0	*۱۲	0.73 ± 0.01	۳/۹
۱۲۵	0.65 ± 0.01	*۸	0.74 ± 0	۲/۶
۶۲/۵	0.67 ± 0.05	*۵	0.75 ± 0	۱/۳
کنترل	0.71 ± 0.01	۰	0.76 ± 0.15	۰
گلوکانتیم	0.17 ± 0.01	*۷۷	0.38 ± 0	۵۰
امفوتریسین	0.18 ± 0	*۷۶	0.36 ± 0	۵۲

** اختلاف معنی داری بین کنترل و نمونه تحت تاثیر عصاره دیده می شود ($p < 0.05$).

جدول (۳) میانگین وانحراف معیار تغییرات قطر زخم ناشی از آلودگی به لیشمانیای مازور در موش‌های کنترل بدون درمان و تحت درمان

گروه	تحت درمان با عصاره آبی شاهتره ۴ (میلی گرم)	گروه کنترلی (بدون درمان)	گروه	گروه تزریقی گلوکانتیم
اول	۳/۴۲±۰/۱۴	۳/۵۷±۰/۸۸	۳/۵۹±۰/۷۴	۳/۱۳±۰/۲۹
دوم	۳/۴۵±۰/۱۹	۵/۳۹±۰/۷۵	۵/۱۷±۰/۲۴	۳/۱۳±۰/۲۹
سوم	۳/۶۰±۰/۲	۷/۶۱±۰/۸۱	۸/۲۷±۰/۷۲	۳/۱۴±۰/۲۹
چهارم	۴/۲±۰/۲۳	۹/۹۱±۰/۴۰	۱۰±۰/۴۸	۳/۱۴±۰/۲۹

**بین میانگین قطر زخم موشهای آلوده و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است ($p < 0.05$).

جدول (۴) تغییرات وزن موش‌ها در ۴ هفته

گروه	تحت درمان با عصاره آبی شاهتره ۴ (میلی گرم)	گروه کنترلی (بدون درمان)	گروه	گروه تحت درمان با گلوکانتیم
اول	۳۲/۶۶	۳۲/۶۶	۳۲/۶۵	۳۲/۶۶
دوم	۳۲/۶۶	۳۱/۸	۳۲	۳۲/۶۶
سوم	۳۲/۶۵	۳۱	۳۱/۷	۳۲/۶۹
چهارم	۳۲/۶۳	۳۰/۴	۳۰/۵	۳۲/۷

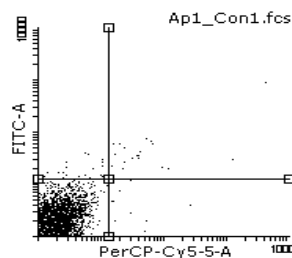
**بین وزن موش‌های تحت درمان و وزن موشهای آل وده و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است ($p < 0.05$).

نتایج In vivo

نتایج حاصل از گروه‌های مورد مطالعه

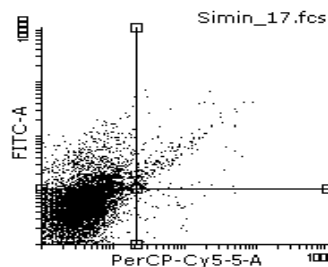
در تمام گروه‌ها، بررسی تا پایان روز ۶۰ (۳۰ روز درمان موضعی و ۳۰ روز تعقیب نتیجه درمان و در پایان روز ۶۰ برای سنجش میزان بار انگلی کشته شدند و طحال جدا شد) انجام گرفت. بدین ترتیب که درمان به مدت ۳۰ روز متوالی در زمان معین و هر روز انجام شد. و بعد به منظور سنجش بار انگلی موشهای زنده مانده کشته شدند.

بیشتر موش‌های شاهد بیمار بعد از ۶۰ روز مرده بودند و تنها ۱ موش از ۵ سر موش زنده ماند. که آن نیز برای کنترل کبد و طحال آلوده و سنجش بار انگلی کشته شد. گروه شاهد بیمار با گروه‌های تحت درمان از نظر میانگین قطر زخم و میانگین وزن اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) در گروه شاهد میانگین قطر زخم پیوسته در حال افزایش (جدول ۳) (شکل ۳ و ۴) و میانگین وزن هم در هنگام این دوره کاهش چشم‌گیری داشت (جدول ۴).



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	99.45
Right Bottom	0.11
Left Top	0.25
Right Top	0.19

نمودار (۱) نمودار فلوسایتومتری نمونه انگل بدون مواجهه با عصاره



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	84.07
Right Bottom	0.47
Left Top	13.46
Right Top	2.00

نمودار (۲) نمودار فلوسایتومتری انگل مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ μg/ml عصاره آبی گیاه شاهتره

شاهتره دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد کرمی هستند، و همچنین ضد ویروس بوده است. با توجه به اینکه فوماریا دارای خواص ضد مالاریا و ضد تریپانوزوما (۲۲) است نظر بر این شد که از عصاره گیاه شاهتره را در این پژوهش استفاده کنیم.

اندازه زخم: بررسی موش‌های شاهد گروه آلوده بدون درمان نشان می‌دهد که میانگین زخم‌های این گروه که در ابتدای بررسی ۳/۵ میلی‌متر بوده، در مدت هفته‌های متوالی روندی رو به توسعه داشته، به طوری که در روز ۳۰ درمان به مقدار ۹ میلی‌متر رسیده است. اما در گروه‌های تحت درمان با عصاره آبی قطر زخم کمی افزایش یافت. اما نسبت به گروه کنترل بدون درمان اختلاف معناداری داشت. آزمون آماری در هفته اول و دوم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. ولی طبق جدول در هفته‌های بعد معنی‌دار است.

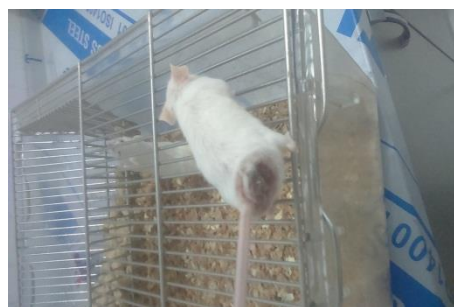
زمان بقا: طبق آزمایش‌های برون تنی و تاثیر عصاره‌ی آبی روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت، برای درمان زخم موش‌های Balb/c از آنها استفاده شد اما چون عصاره‌ها به صورت مایع بوده و مصرف آنها سخت بود با استفاده از پماد وازلین، پماد درمانی از عصاره‌ها تهیه شد و روزانه در ناحیه زخم استفاده شد. پیشنهاد می‌شود برای مطالعه افزایش تاثیرگذاری عصاره‌ها را از روند تزریقی آنها در ناحیه زخم هم استفاده شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه و کمتر بودن عوارض جانبی عصاره آبی گیاه شاهتره در مقایسه با ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان، می‌توان پیشنهاد داد که پژوهش بیشتری در این زمینه صورت گیرد و از عصاره الکلی این گیاه نیز برای درمان لیشمانیازیس جلدی استفاده کرد. برای اثر بخشی بیشتر آن پیشنهاد میشود به صورت تزریقی یا خوراکی از این عصاره نیز استفاده شود.

فهرست منابع و مآخذ

1. Alvar, J., D.Ve'lez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7(5): p.e35671.
2. Mohseni, N., et al. (2012). "Natural anti-leishmaniasis compounds in traditional Iranian medicine." *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine* 3(1): 41-50.



شکل (۳) زخم مربوط به گروه کنترل (بدون درمان)



شکل (۴) بعد از ۴ هفته درمان با عصاره آبی

بحث

مهمترین درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیوز به کار می‌رود، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان هستند که شامل سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) و مگلو مین آنتی‌موانات (گلوکانتیم) می‌شوند. این ترکیبات، بیش از یک قرن است که برای درمان لیشمانیوز به کار 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 طرفی به علت وجود عوارض متعدد دارو (۶-۷)، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریعتر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبودی، جوشگاهی بر جای نگذارد ادامه دارد. درمان‌های مختلفی برای این بیماری پیشنهاد شده است مانند: سرما درمانی، گرما درمانی، استفاده از داروهای مثل داپسون، ریفامپیسین، کتوکونازول، پارومومایسین موضعی، آمیتین، مپاکرین، آمفوتریسین ب، آلپورینول و غیره... اما هیچکدام از موارد ذکر شده روش درمان قاطعی نبوده، و با توجه به آثار جانبی و عوارض ترکیبات آنتی‌موان، و با عنایت به اینکه عصاره‌ی آبی گیاه

14. Suau, R., et al. (2002). "Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS." *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 13(6): 363-367.
15. Hejazi, S. H., et al. (2009). "Comparison effectiveness of extracts of Thyme, Yarrow, Henna and Garlic on cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* in animal model (Balb/c)." *Journal of Medicinal Plants* 8(30): 129-160.
16. Nursabaghi, F., et al. (2016). "Evaluation the effect of *Rumex* alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Balb/c mice." *Razi Journal of Medical Sciences* 23(148): 28-35.
17. Asadi, M., et al. (2012). "Effect of hydroalcoholic extracts of *Stachys lavandulifolia* Vahl and *Mespilus germanica* leaves on *Leishmania major*." *Hormozgan Medical Journal* 15(4): 279-284.
18. Shariatifar, N., et al. (2006). "The study of flos plant on progmastigote in culture." *The Horizon of Medical Sciences* 11(4): 5-9.
19. Noor Mohammadi H, Maroufi Y, Dabirzadeh M, Miri A, Karimi A. *Journal of Medicinal Plants*, Year 15, Volume 2, Serial Number 58, Spring 2016.[persian]
20. Naseri Farr, Dalimi A, Ahmadinejad, Investigation of the effect of different concentrations of aqueous extract of monkey plant on the growth of leishmaniasis major in macrophages of rat rat in laboratory conditions. *Research Journal of Shahid Beheshti University of Medical Sciences*. Volume 36, Special Issue 1, Winter 2012, pp. 12-18.[persian]
21. Jameel, M., et al. (2014). "Phytochemical investigation of the aerial parts of *Fumaria parviflora* Lam." *Journal of Pharmaceutical and Biosciences B* 2: 1-8.
22. Orhan, I. E., et al. (2015). "Antiprotozoal assessment and phenolic acid profiling of five *Fumaria* (fumitory) species." *Asian Pacific journal of tropical medicine* 8(4): 283-286.
3. Ramezani, Y., et al. (2011). "Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol from April to September 2009." *KAUMS Journal (FEYZ)* 15(3): 254-258.
4. Hadighi, R., et al. (2006). "Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites." *PLoS medicine* 3(5).
5. Arevalo, I., et al. (2001). "Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator." *Clinical infectious diseases* 33(11): 1847-1851.
6. Saebi, E. (2011). "Clinical Parasitology: Protozoal Diseases in Iran." Tehran: Aeeizh.
7. Al-Majali, O., et al. (1997). "A 2-year study of liquid nitrogen therapy in cutaneous leishmaniasis." *International journal of dermatology* 36(6): 460-462.
8. Kumar, S., et al. (2017). "*Fumaria parviflora* Lam.(Fumitory): A traditional herbal medicine with modern evidence." *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3(6): 200-207.
9. Chauhan, N. S. (1999). *Medicinal and aromatic plants of Himachal Pradesh*, Indus publishing
10. Orhan, I. E., et al. (2012). "Antioxidant and hepatoprotective activity appraisal of four selected *Fumaria* species and their total phenol and flavonoid quantities." *Experimental and toxicologic pathology* 64(3): 205-209.
11. Mozaffarian Vali-Allah, *Iranian Crop Names: Latin, English, Persian*. Contemporary culture. 1375, page 238.[Persian]
12. 3. Ali's disease, medicinal plants. Seventh Edition. Tehran Institute of Publishing and University. 1997, Volume One, Pages 72 – 166.[Persian]
13. Soušek, J., et al. (1999). "Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species." *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 10(1): 6-11.