

ORIGINAL ARTICLE

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

Ali Niapour¹,
Shahab Bohlooli²,
Marzieh Sharifi Pasandi³,
Behnam Mohammadi-ghalehbin⁴

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 cytoidal 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 ($p < 0.05$). IC₅₀ 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)

بررسی اثر ضد لیشمانيایی عصاره سیاه تخمه روی پروماستیگوت های لیشمانيا ماذور در شرایط آزمایشگاهی

علی نیاپور^۱

شهاب بعلولی^۲

مرضیه شریفی پاسندی^۳

بهنام محمدی قلعه بین^۴

چکیده

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

مواد و روش ها: تعداد $2/5 \times 10^6$ پروماستیگوت لیشمانيا ماذور در فاز ایستا به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه اضافه شد. عصاره سیاه تخمه در رقت های افرایشی (۲/۴ - ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک ها افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. از داروی گلو کانتیم 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 پروماستیگوت های لیشمانيا ماذور استفاده گردید.

یافته ها: عصاره سیاه تخمه به صورت وابسته به دوز باعث کاهش درصد زنده مانی پروماستیگوت های لیشمانيا ماذور شد که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی دار داشت ($p < 0.05$). در روش MTT، IC₅₀ عصاره بر روی پروماستیگوت های انگل لیشمانيا ماذور 0.365 ± 0.005 میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

استنتاج: عصاره آبی سیاه تخمه نسبت به گلو کانتیم تاثیر بسیار قوی تری روی اشکال پروماستیگوت لیشمانيا ماذور دارد.

واژه های کلیدی: لیشمانيا ماذور، سیاه تخمه، MTT

مقدمه

نشان داده است، ۱۲ میلیون نفر در جهان با این بیماری در گیر هستند و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا می باشند و سالیانه دو میلیون ابتلای جدید گزارش می شود. ایران جزو کشورهایی است که لیشمانيوز جلدی در آن شایع

لیشمانيوز بیماری تک یاخته ای است که توسط گونه های مختلف جنس لیشمانيا ایجاد می شود و تظاهرات بالینی آن به فرم های جلدی، جلدی مخاطی، احشایی و جلدی منتشر دیده می شود. بررسی های اپیدمیولوژیک

مؤلف مسئول: بهنام محمدی قلعه بین-اردبیل: دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی

۱. دانشیار، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم شریحی و پاتولوژی، دانشکده 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

۵. تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۴

لیشمانیا دونسووانی در برابر گلوکانتیم و ان متیل گلوکامین، تقریباً کنار گذاشته شده اند(۱۲). گیاه سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) گیاهی مدتیرانه‌ای از خانواده Caryophyllaceae با گل‌های بنفش یا ارغوانی کم رنگ و با دانه‌های سمي می‌باشد که به وفور در طبیعت یافت می‌شود. این گیاه دارای اثرات سمي شناخته شده‌ای به روی انسان و حیوانات است(۱۳،۱۴). همچنین، در ایران در مراعع 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 زگل استفاده می‌شده است(۱۶-۱۸). عصاره دانه سیاه تخمه حاوی Githagnin و Saponin، Githaginin و Agrostemmic acid می‌باشد(۱۹،۲۰). خاصیت سیتو توکسیک این گیاه مربوط به Triterpenoid saponin، protein Agrostin و Ribosome-inactivating protein می‌باشد(۲۱،۲۲). آگروستین یک پروتئین غیرفعال کننده ریبوzوم تیپ یک می‌باشد (RTP I) و ترکیب با ساپونین فعالیت سیتو توکسیک آن را تقویت می‌کند(۲۳). این گیاه همچنین دارای فلاونوئیدهایی با خاصیت سیتو توکسیک 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 3 Caspase 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 سیتو توکسیک 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

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) می‌باشد که در دهه‌های گذشته مورد استفاده قرار گرفته و دارای عوارض جانبی متعدد مثل مسمومیت دارویی می‌باشد. از سوی دیگر مقاومت انگل نسبت به این دارو در نقاط مختلف جهان در حال افزایش می‌باشد(۴). داروهای خط دوم از جمله آمفوتیریسین B و میلتوفوسین دارای عوارض سوء دارویی بالا و محدودیت استفاده در تمام بیماران بوده و فرم لیپوزومال آمفوتیریسین B هزینه بالایی را به بیماران تحمیل می‌نماید(۵،۶). در پاره‌ای از موارد سایر داروها، از قبیل پنتامیدین، آمفوتیریسین B و پارامویسین علی‌رغم سمیت بالایشان برای میزان به عنوان گزینه‌های دوم و در موارد بروز مقاومت به کار می‌روند که اخیراً مقاومت در مورد پنتامیدین نیز گزارش شده است. همچنین مشکلات مربوط به درمان بیماران دچار سرکوب اینمی (مانند HIV) یعنی بیمارانی که داروهای موجود اثر کم تری روی آن‌ها داشته و معمولاً دوز های دارویی بیشتر و دوره‌ی درمان طولانی تری 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 پروتوكلهای درمانی مختلف براساس مناطق جغرافیایی خاص تعیین می‌شوند(۹). علاوه بر پاسخ‌های کلینیکی متفاوت بیماران لیشمانیازیس احشایی و جلدی نسبت به ترکیبات آنتی موan ۵ ظرفیتی، عوارض جانبی از قبیل تجمع دارو در بافت‌هایی مثل کبد و طحال، درد عضلاتی، پانکراتیت، آریتمی قلبی و هپاتیت منجر به کاهش مصرف دارو یا ترک درمان و حتی مقاومت اکسابی به این ترکیبات شده است(۱۰،۱۱). آنتی موان‌های 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

پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مژور 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 میلی‌لیتر در محیط BHI تهیه شد. سپس با روش رقیق‌سازی سریالی (Serial dilution) رقت‌های ۱۶، ۱۲، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. از غلظت ۲۴ میلی‌گرم جهت تهیه رقت‌های ۱۲، ۶ و ۳ و از غلظت ۱۶ میلی‌گرم برای تهیه رقت‌های 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.

سنجهش اثر کشنده‌گی رقت‌های گوناگون عصاره آبی سیاه تخمه به روش MTT

ماده MTT پودری زرد رنگ است که جذب سلول‌های زنده شده و توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی تبدیل به ماده‌ی نامحلول فورمازان می‌شود. با اضافه شدن حلال مناسب نظر 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 سلول‌هاست که توسط روش کالریمتریک قابل اندازه‌گیری است. برای اجرای آزمایش، پروماستیگوت‌های در فاز ایستا به تعداد 10^6 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط 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 سانتریفیوژ 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

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

مواد و روش‌ها

پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مژور از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و در محیط کشت (Brain Heart Infusion Broth) BHI 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 میلی‌لیتر (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) در آخرین 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 فریزدراير 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 کشنده‌گی رقت‌های گوناگون عصاره آبی سیاه تخمه بر انگل لیشمانیا مژور اثر کشنده‌گی عصاره گیاهی سیاه تخمه بر روی

بررسی سمیت سلولی عصاره آبی سیاه تخمه بر رده سلولی ماکروفائزی J774 جهت بررسی سمیت سلولی از رده سلولی ماکروفائزی J774 استفاده شد. این رده‌ی سلولی از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران به صورت ویال منجمد شده خریداری شد و پس از ذوب، در فلاسک حاوی محیط کشت DMEM با مقدار گلوکوز بالا حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (FBS)، آنتی‌بیوتیک یک درصد (Pen/strep) و گلوتومکس در انکوباتور (شرکت Memmert آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری و کشت شدند. به طور خلاصه، تعداد $10^2 \times 5$ 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 (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ 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 \pm خطای معیار میانگین بیان و ارزش احتمالی کمتر از $0/05$ ، 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.

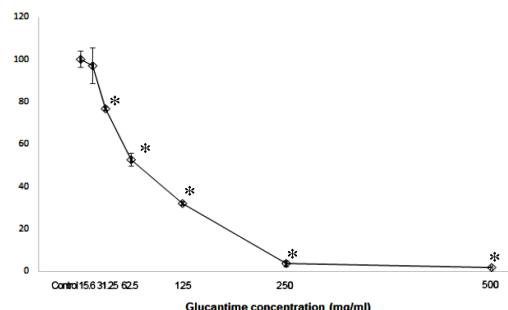
یافته‌ها

اثر عصاره دانه Agrostemma githago در ۱۰ غلظت مختلف بر میزان بقای پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا اثر ضد لیشمانیایی عصاره دانه‌ی گیاه لیشمانیا مازور به روش سنجش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره در غلظت‌های مختلف به طور معکوس با درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا

MTT با غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات به هر چاهک اضافه شد. پس به مدت چهار ساعت در انکوباتور و در تاریکی نگهداری شد. پس از اتمام انکوباسیون، حجم ۱۰۰ میکرولیتر از حلال متوقف کننده DMSO اضافه شد و پس از پنج دقیقه میزان جذب نوری که بیانگر فعالیت متابولیک پروماستیگوت‌ها است، توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (ELISAReader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. به عنوان کنترل از داروی گلوكاتین در غلظت‌های ۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. (در خصوص کنترل منفی نیز باید توضیحات نوشته شود. یعنی انگل‌های لیشمانیا به تنها و بدون مداخله دارویی) آزمایشات به صورت تریپلیکات و سه بار تکرار گردید (۲۶).

بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها

ماده تریپان بلو به طور گسترده‌ای برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده استفاده می‌شود. تریپان بلو نمی‌تواند بین سلول‌های کاملاً سالم و سلول‌های زنده اما فاقد عملکردهای سلولی تمایز قائل شود. بنابراین، تنها وارد سلول‌هایی می‌شود که تمامیت غشای خود را از دست داده باشد 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 $2/5 \times 10^6$ 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 سوپرانسیوں سلولی از هر گروه با حجم برابر محلول تریپان بلو چهار درصد مخلوط شده به روی لام گذاشته شد و زیر میکروسکوپ شمارش شد.

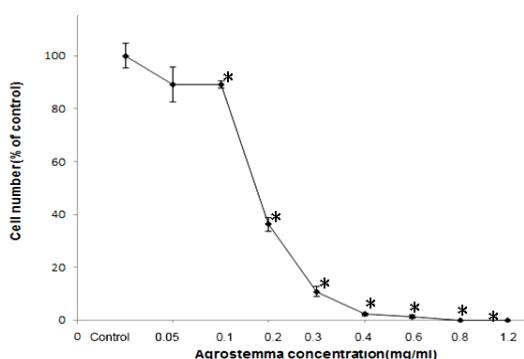


نمودار شماره ۲: تاثیر کشنده‌گی غلظت‌های مختلف داروی گلوکانتیم بر پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

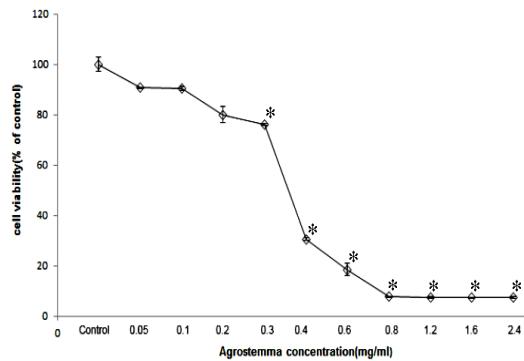
*: کمتر از 5×10^{-5} از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

ماژور ارتباط دارد که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$). تغییرات جذب نوری به صورت میانگین درصد کشنده‌گی \pm 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 لیشمایا مازور 0.365 mg/ml در میلی لیتر به دست آمد.

اثر عصاره دانه گیاه *Agrostemma githago* بر میزان زندگانی پروماستیگوت‌های انگل لیشمایا مازور برای بررسی میزان زندگانی انگل در غلظت‌های مختلف عصاره، تعداد کل سلول‌های زندگ در هر گروه به کمک رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد. تعداد سلول‌های محاسبه شده به صورت \pm mean در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره دانه گیاه *Agrostemma githago* سبب کاهش میزان زندگانی سلول‌ها به صورت وابسته به دوز در پروماستیگوت‌های انگل لیشمایا مازور پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون شد و با افزایش غلظت عصاره این میزان به طور معنی‌اری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0.001$).



نمودار شماره ۳: تاثیر کشنده‌گی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Agrostemma githago* بر پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور به روش رنگ آمیزی تریپان بلو پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. *: کمتر از 5×10^{-5} از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.



نمودار شماره ۱: تاثیر کشنده‌گی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Agrostemma githago* بر پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

*: کمتر از 5×10^{-5} از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

اثر گلوکانتیم در ۶ غلظت مختلف بر میزان بقای پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور اثر ضد لیشمایی داروی گلوکانتیم به عنوان داروی استاندارد بر روی حیات سلولی پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور به روش سنجش MTT بررسی شد. تغییرات جذب نوری به صورت میانگین درصد کشنده‌گی \pm انحراف معیار در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که رقت‌های مختلف داروی گلوکانتیم (در محدوده ۵۰۰-۱۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) باعث کاهش درصد زندگانی پروماستیگوت‌های لیشمایا مازور (گردید $IC_{50} = 71.01$) (p < 0.05).

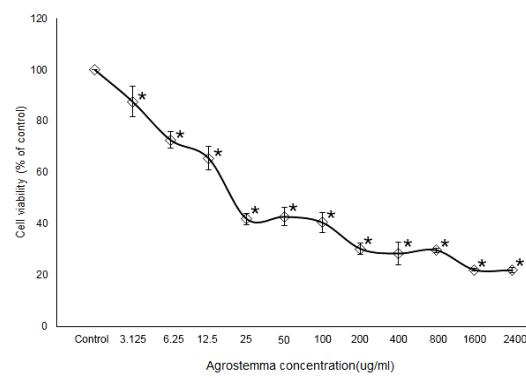
این مهم میسر نشده و مطالعات در این زمینه کماکان ادامه دارد. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی به منظور تاثیر عصاره‌های گیاهی روی انگل‌های لیشمانیا در ایران و جهان صورت گرفته است و نتایج مختلفی از این مطالعات به دست آمده است.

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 هگرانی و اتانولی استخراج شده از دانه *P. nigrum* بر رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا دنوانی به ترتیب با IC_{50} ۳۱/۶، ۳۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر قابل ملاحظه داشتند^(۲۹). Sifaoui و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور بزریل مطالعه‌ای با عنوان اثر عصاره برگ گیاه زیتون روی پتانسیل غشای میتوکندریایی انگل لیشمانیا انجام داده‌اند که در آن دو عصاره (oleanolic acids و maslinic acids) از برگ زیتون جدا شده و علیه پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا آمازوننسیس مورد استفاده قرار گرفت. طبق بررسی‌ها IC_{50} ماسلینیک اسید ۹/۳۲ \pm ۱/۶۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای لیشمانیا اینفانتوم و ۱۲/۴۶۰ \pm ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای لیشمانیا آمازوننسیس گزارش شد که نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه‌ی 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 آمفوتیریسین 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، IC_{50}

اشر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Agrostemma githago* 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، IC_{50} عصاره سیاه تخمه روی سلول‌های ماکروفازی به میزان ۱۲/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.



نمودار شماره ۴: تاثیر کشنده‌گی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Agrostemma githago* بر سلول‌های رده ماکروفازی 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 به طور معکوس با درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور ارتباط دارد و میزان IC_{50} عصاره بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مازور ۰/۳۶۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. در حالی که این میزان برای گلوکاتنیم ۷۱/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای سلول‌های ماکروفاز ۱۲/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر 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

دارو، آزمایش آن به روش برون تنی می باشد. تا کنون مطالعه ای روی تاثیر عصاره سیاه تخمه بر انگل لیشمانیا صورت نگرفته است تا نتایج آن با مطالعه ای حاضر مقایسه گردد. در این مطالعه عصاره دانه سیاه تخمه در شرایط آزمایشگاهی روی پروماستیگوت های لیشمانیا مژور اثر داده شد و مشخص شد که در مقایسه با گلوکانتیم به عنوان کنترل از اثر کشنده گی بالایی برخوردار است. از طرفی مشخص گردید که سلول های ماکروفاز نسبت به پروماستیگوت های لیشمانیا به غلظت های پایین تر 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 سیمی آن روی سلول های میزان بکاهد که نیازمند بررسی های دقیق با آزمایشات درون تنی (in vivo) می باشد. همچنین با توجه به تاثیر کمتر سمتیت ترکیبات داروئی در استفاده ای موضعی، آزمایشات بیش تر برای تاثیر موضعی عصاره به شکل پماد روی زخم های لیشمانیایی در حیوان آزمایشگاهی پیشنهاد می شود.

عصاره آبی سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) نسبت به گلوکانتیم تاثیر بسیار قوی تری روی اشکال پروماستیگوت لیشمانیا مژور در شرایط برون تنی دارد. مطالعات تکمیلی در جهت تاثیر این عصاره روی اشکال آماتیگوت و تاثیر آن در شرایط in vivo به شکل موضعی و سیستمیک در حیوان آزمایشگاهی لازم می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه پزشکی به شماره ۵۶۵ و کد اخلاق ۱۳۹۴.۸۹ IR.ARUMS.REC 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.

پروماستیگوت برابر با $58/6 \pm 3/2$ میکرو گرم بر میلی لیتر به دست آمد (۳۲).

اما می و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر عصاره یازده گیاه از گونه های آرتمیسیا را روی پروماستیگوت های لیشمانیا مژور با روش MTT بررسی کردند و نتایج A.santolina، A.ciniformis و A.kulbadica نشان داد که تاثیر سه گونه A.santolina داشتند (۳۳). محمودوند و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه ای اثر عصاره Berberis vulgaris و Nigella sativa را روی لیشمانیا تروپیکا بررسی کردند که میزان ۴/۸۳ IC50، IC50 B.vulgaris و میزان ۷/۸۳ میکرو گرم بر میلی لیتر برای N.sativa گزارش شد که تاثیر عصاره ای این گیاهان را نشان می داد (۳۴).

فتاحی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر عصاره Nigella sativa را روی پروماستیگوت های لیشمانیا مژور بررسی کرده و نشان دادند که غلظت های ۰/۴، ۰/۸ و ۰/۲۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره باعث کاهش رشد پروماستیگوت ها می شود (۳۵).

در مطالعه دیگری اثر عصاره Peganum harmala بر پروماستیگوت های لیشمانیا مژور بررسی شد و میزان ۱/۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر بهست آمد است (۳۶). در مطالعه گسترده ای که گارسیا و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره ۴۷ گیاه بومی کشور کوبا روی لیشمانیا آمازونتیسیس انجام دادند، عصاره ۵۰ IC کمتر از ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر داشتند که از بین آنها عصاره Bambusa vulgaris Hura crepitans L. و Simarouba glauca DC. ترتیب غلظت موثره آنها برابر با ۴۱/۵، ۲۷/۷ و ۴۵/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بود (۳۷). نتایج مطالعات فوق نشان می دهد که غلظت موثر عصاره های بررسی شده در مطالعات مختلف روی انگل لیشمانیا متفاوت از هم می باشد. فاکتور های متنوع و پیچیده ای در انتخاب داروی مناسب برای استفاده در موجودات زنده دخیل هستند. اولین قدم در روند امتحان یک ترکیب کاندید

References

- 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.
- Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam GR, Sarkari B, Mohebali M, Zarei 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).
- 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).
- 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).
- Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004; 10(6): 307-315.
- Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad med J* 2007; 83(976): 649-657.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 111-126.
- 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.
- Koz O, Bedir E, Masullo M, AlankusCaliskan O, Piacente S. Triterpene glycosides from *Agrostemma gracilis*. *Phytochemistry* 2010; 71(5-6): 663-668.
- 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.
- 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.

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. Available 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): 159-164.
21. Heisler I, Sutherland M, Bachran C, Hebestreit P, Schnitger A, Melzig MF, et al. Combined application of saponin anchimeric toxins drastically enhances targeted 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. Bohloli 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 differentiation 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, Sheikhkanlou 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.

32. Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M, Ezzatkahah 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.