

Antiparasitic Effects of *Heracleum persicum* and *Foeniculum vulgare* (Fruit) Essential Oils on Experimental Toxoplasmosis (In Vitro and In Vivo)

Mahbobeh Montazeri¹,
 Samira Khani²,
 Ahmad Daryani³,
 Shahabeddin Sarvi⁴,
 Somayeh Shahani⁵,
 Fatemeh Mirzaee⁶,
 Somaye Yosefi⁷,
 Shirzad Gholami³

¹ PhD in Medical Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² MSc in Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ PhD Student in Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ BSc in Laboratory Sciences, Fatima Zahra Hospital, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 4, 2020 ; Accepted February 27, 2021)

Abstract

Background and purpose: There are few treatment options available for treatment of toxoplasmosis and effective drugs have serious toxic effects. In this study, the *in vivo* and *in vitro* anti-toxoplasma activities of *Heracleum persicum* and *Foeniculum vulgare* fruits essential oils were investigated.

Materials and methods: *In vitro*, Vero cells were incubated with different concentrations of essential oils or pyrimethamine (positive control) and the cellular viability was determined. Next, Vero cells were infected with *T. gondii* (RH strain) and treated with agents. Then, the CC₅₀, IC₅₀, and selectivity index (SI) were calculated. Moreover, *in vivo*, the effect of oils on survival times of Balb/c mice infected with *T. gondii* were determined.

Results: *In vitro* results showed that the oils exhibited less cell toxicity than pyrimethamine. The selective index was 2.94, 6.96, and 3.06 for *Heracleum persicum*, *Foeniculum vulgare*, and pyrimethamine, respectively. Also, the infected mice treated with *F. vulgare*-pyrimethamine showed a better survival rate than others ($P < 0.05$).

Conclusion: The *H. persicum* and *F. vulgare* essential oils showed anti-toxoplasmic activity *in vitro* and *in vivo*, but, combination therapy with *F. vulgare* and pyrimethamine showed a better survival time in mice infected with *T. gondii*. Therefore, *F. vulgare* may be a useful candidate in treatment of Toxoplasmosis. However, further studies are needed to investigate the fractions of this plant against *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, *Heracleum persicum*, *Foeniculum vulgare*, *In vitro*, *In vivo*

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (196): 1-10 (Persian).

* Corresponding Author: Shirzad Gholami - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: sgholami200@gmail.com)

اثرات ضد انگلی اسانس میوه گیاهان گلپر و رازیانه بر توکسوپلاسموز تجربی [در مدل های درون تنی و برون تنی]

محبوبه منتظری^۱
سمیرا خانی^۲
احمد دریانی^۳
شهاب الدین سروی^۴
سمیه شاهانی^۵
فاطمه میرزایی^۶
سمیه یوسفی^۷
شیرزاد غلامی^۳

چکیده

سابقه و هدف: برای درمان توکسوپلاسموز گزینه های درمانی کمی در دسترس است و داروهای موثر اثرات سمی جدی دارند. در این مطالعه اثرات ضد انگلی اسانس میوه رازیانه و گلپر بر تاکی زوئیت انگل توکسوپلاسم گوندی در شرایط برون تنی و درون تنی بررسی شد.

مواد و روش ها: در شرایط برون تنی، سلول های Vero با غلظت های مختلفی از اسانس گیاهان یا پریمتامین (کنترل مثبت) انکوبه شده و میزان زنده بودن سلول ها ارزیابی شد. در مرحله بعد سلول های Vero آلوده به تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلاسم گوندی درمان شدند. سپس IC_{50} ، CC_{50} ، شاخص انتخابی (selectivity index) محاسبه شد. همچنین در شرایط درون تنی اثرات اسانس ها بر زمان بقای موش های آلوده شده با تاکی زوئیت توکسوپلاسم گوندی بررسی شدند.

یافته ها: نتایج مدل برون تنی نشان داد که اسانس رازیانه و گلپر توکسیستیتی سلولی کم تری از پریمتامین داشته و به ترتیب دارای شاخص انتخابی (۲/۹۴ و ۶/۹۶) در مقایسه با پریمتامین (۳/۰۶) بودند. همچنین موش های آلوده درمان شده در ترکیب درمانی با رازیانه- پریمتامین زمان بقای بیش تری را از سایر درمان ها نشان دادند ($P < 0.05$).

استنتاج: اسانس گیاهان رازیانه و گلپر فعالیت ضد توکسوپلاسمایی در مدل های درون تنی و برون تنی نشان دادند، اگرچه رازیانه در ترکیب با پریمتامین زمان بقای بهتری در موش های آلوده به توکسوپلاسم دارا بود. بنابراین رازیانه ممکن است به عنوان کاندیدی برای درمان عفونت توکسوپلاسموزیس مفید باشد. اگرچه در آینده مطالعات بیش تری برای بررسی فراکشن های این گیاه در برابر انگل توکسوپلاسم گوندی لازم است.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسم گوندی، توکسوپلاسموز، گلپر، رازیانه، درون تنی، برون تنی

مقدمه

توکسوپلاسم گوندی تک یاخته ای داخل سلولی است که باعث بیماری توکسوپلاسموز در انسان و حیوانات می شود. در افراد سالم و دارای سیستم ایمنی نرمال، عفونت با این تک یاخته، معمولاً فاقد علائم کلینیکی

E-mail: sgholami200@gmail.com

مؤلف مسئول: شیرزاد غلامی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دکترای انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. دانشجوی دکترای فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان فاطمه الزهراء (س)، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۹/۷/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱۲/۹

می‌باشد و در برخی موارد ممکن است به دلیل تمایل انگل به چشم و مغز میزبان و تشکیل کیست در این اندام‌ها، خطر آفرین باشد. اما در افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند و همچنین زنان باردار این انگل باعث عوارض شدید می‌شود. در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، عفونت مزمن با توکسوپلازما گوندیی می‌تواند مجدداً فعال شده و باعث آنسفالیت، کوریورتینیت و یا مرگ شود (۱). در حقیقت، توکسوپلازما گوندیی یکی از فرصت طلب‌ترین پاتوژن‌های انگلی در افراد مبتلا به ایدز می‌باشد. همچنین توکسوپلازما مادرزادی که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین، مرگ جنین در رحم یا نقص‌های شدید مادرزادی مثل هیدروسفالی، عقب ماندگی ذهنی یا کوریورتینیت شود (۲).

برای درمان توکسوپلازما سموز گزینه‌های درمانی کمی در دسترس است و داروهای موثر اثرات سمی جدی دارند که منجر به توقف درمان می‌شود. اخیراً بیش‌ترین رژیم درمانی موثر علیه توکسوپلازما سموز ترکیب سینرژسمی سولفادایزین و پریمتامین می‌باشد. این داروها از مهارکننده‌های فولات بوده و از ساخت و متابولیسم اسید فولیک ممانعت می‌کنند. بنابراین اسید فولیک باید به عنوان مکمل برای کاهش خطر ساپرس شدن مغز استخوان تجویز شود. همچنین این رژیم درمانی معمولاً با اثرات جانبی زیادی مثل مسمومیت خونی، افزایش حساسیت، تحمل ناپذیری، ساپرس مغز استخوان و اثرات تراوتورنیک در سه ماهه اول بارداری همراه می‌باشد (۳، ۱). در شرایط خاصی ممکن است کلیندامایسین به عنوان مهارکننده سنتتاز پروتئین تجویز شود، اما به علت اثرات محدود باید به میزان نسبتاً زیادی تجویز شود که با واکنش‌های جانبی شامل راش، تهوع، استفراغ و اسهال همراه می‌باشد. موثر بودن آتوواکون نیز از آن‌چه در ترکیب با پریمتامین دیده می‌شود کم‌تر می‌باشد و به دلیل داشتن عوارض جانبی مانند سردرد، بثورات جلدی و بالا رفتن سطح آنزیم‌های کبدی محدودیت استفاده

دارد (۴). از سویی بعضی از داروها که به‌طور تجربی استفاده می‌شوند، متأسفانه اثرات کمی در کلینیک دارند. همچنین سویه‌های توکسوپلازما گوندیی مقاومت زیادی را علیه تعداد زیادی از مهارکننده‌ها که به میزان فراوانی استفاده می‌شوند در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند (۵-۸). بنابراین هیچ دارویی در دسترس نیست که قادر باشد انگل را حذف کند. بعضی داروها نیز فقط قادرند افزایش انگل را طی مرحله فعال تکثیر محدود نمایند. علاوه بر موارد ذکر شده، درمان‌های موجود برای توکسوپلازما سموز تنها بر روی فرم تاکی زوئیت موثر می‌باشند و تاثیری بر فرم برادی زوئیت ندارند. لذا یافتن داروهای آلترناتیو موثر و بدون عوارض جانبی ضد توکسوپلازما ضروری به نظر می‌رسد (۷، ۳). امروزه رویکرد فزاینده‌ای در مطالعات علمی به داروهای گیاهی و طب سنتی مشاهده می‌شود تا داروهای گیاهی مناسبی برای درمان بیماری‌های رایج با مطالعات علمی بیابند تا در عین کاهش استفاده از داروهای سنتتیک که اغلب نیز مضرات آن بر فوایدشان برتری دارد، گامی نیز در جهت خودکفائی بردارند (۹). گلپر گیاه چند ساله با نام علمی *Heracleum persicum* و متعلق به خانواده جعفری می‌باشد که در ترکیه و ایران پراکندگی دارد. این گونه اصولاً در نواحی مرطوب کنار جویبارها و باغ‌ها در استان‌های مازندران، گرگان، آذربایجان، لرستان، اصفهان، خراسان، زنجان، تهران و سمنان می‌روید. پودر میوه آن به منظور معطر کردن انواع غذاها و ترشیجات به کار می‌رود و به علت اسانسی که دارد جهت رفع نفخ و ناراحتی‌های گوارشی استفاده می‌شود (۱۰). همچنین مطالعات گذشته اثرات ضد مالاریایی، ضد کرمی، ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی گلپر را گزارش نموده‌اند (۱۱-۱۵). رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* گیاهی چند ساله متعلق به خانواده جعفری می‌باشد. این گیاه چند ساله و معطر است و به علت دارویی بودن در اغلب نقاط ایران کاشته می‌شود و در مازندران نیز به صورت خودرو دیده می‌شود. تمام قسمت‌های گیاه از

جمله اسانس میوه‌های آن توسط بخار آب مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گیاه دارای خواص ضد نفخی، ضد اسپاسم، ضد عفونی‌کنندگی، ضد ویروسی و ضد قارچی می‌باشد (۱۰). همچنین اثرات ضد انگلی متعددی از جمله اثرات مهاری علیه ناقل انگل مالاریا/نوفل/استفوسی، انگل آیمیریا تئلا و اثرات ضد کرمی رازیانه گزارش شده است. از سوی این گیاه خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی متعددی دارد (۱۹-۱۶). لذا با توجه پراکندگی متعدد این گیاهان در ایران به خصوص در استان مازندران، هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد انگلی اسانس میوه رازیانه و گلپر بر تاکی زوئیت انگل توکسوپلازما گوندی در شرایط برون تنی و درون تنی است.

مواد و روش‌ها

الف- آماده سازی اسانس میوه گلپر و رازیانه

برای تهیه گیاهان رازیانه و گلپر، میوه خشک این دو گیاه از عطاری خریداری شده و توسط متخصص سیستماتیک گیاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران شناسایی شد. در ابتدا میوه خشک دو گیاه پودر شد و بعد از مخلوط شدن با آب، در بالن دستگاه کلونجر قرار گرفت. کلونجر دستگاهی است که به روش تقطیر برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بالن محتوی آب و پودر گیاه در مجاورت منبع حرارتی قرار گرفته و بعد از تبخیر شدن، اسانس توسط کندانسور خنک شده و در نهایت در لوله مدرج انتهایی جمع شده و توسط شیر تخلیه خارج شد.

ب- تکثیر تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلازما گوندی در صفاق موش سوری

تاکی زوئیت سوش RH توکسوپلازما گوندی از دانشگاه لیموز فرانسه در سال ۲۰۱۷ (Biological Resource Center for Toxoplasma, Limoges University, France) تهیه شد و در مرکز توکسوپلاسموز علوم پزشکی

مازندران- ساری تکثیر شد. به این ترتیب که ابتدا تعدادی از تاکی زوئیت‌های تازه و فعال انگل (2×10^4) را به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق نموده و بعد از ۵-۴ روز (بسته به تعداد انگل تزریق شده) که علائم بیماری از قبیل چرت زدن، کز کردن، تغییر حالت مو در موش ظاهر شد، در شرایط استریل و زیر هود حیوان آلوده را با اتر کشته یا قطع نخاع کرده و سپس روی تخته تشریح تثبیت نموده و سطح شکمی با الکل ۷۰ درجه ضد عفونی می‌شود. سپس به کمک پنس و قیچی استریل پوست ناحیه شکم باز شده و با سوزن روی تخته تشریح ثابت شد. حدود ۵ سی‌سی از PBS (phosphate-buffered saline) استریل و ترجیحاً سرد را با سرنگ در محوطه صفاقی تزریق نموده و پس از زدن چند ضربه آرام به محوطه صفاقی موش، مایع صفاقی را خارج کردیم، سپس به منظور حذف ماکروفاژهای صفاقی، مایع صفاقی ۲۰-۱۰ بار از سرنگ عبور داده شد تا سلول‌های حاوی انگل پاره شده و تاکی زوئیت‌های انگل از آن خارج شوند. سپس مایع صفاقی به دست آمده با PBS استریل شستشو داده شد. به این ترتیب که ۵ میلی‌لیتر PBS به لوله حاوی انگل اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۳ تا ۵ هزار سانتریفوژ نموده و مایع رویی تخلیه شد. شستشو ۳ بار تکرار شد. در نهایت تعداد انگل با لام نئوبار شمارش شد (۲۰).

ج- ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی اسانس میوه گلپر و رازیانه در مدل برون تنی

آماده سازی غلظت‌های اسانس میوه گلپر و رازیانه بازه غلظت‌های مورد بررسی اسانس میوه گلپر، رازیانه و داروی پریمتامین از ۵ تا ۴۰۰ (۴۰۰ و ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. به منظور تهیه این غلظت‌ها، ابتدا محلول استوک از غلیظ‌ترین غلظت ($400 \mu\text{g/ml}$) با استفاده از دی متیل سولفو کساید (غلظت نهایی کم‌تر از ۱ درصد) تهیه شد. سپس محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و در

نهایت محلول با PBS به حجم رسانده شد. تمامی این مراحل در شرایط استریل و زیر هود انجام شد. سپس رقت‌ها با استفاده از این محلول استوک به راحتی تهیه شدند.

بررسی سمیت غلظت‌های مختلف اسانس میوه گلپر و رازیانه به روش MTT بر سلول‌های Vero (Cytotoxicity assay) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاو) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین، ۱۰۴ × ۲ عدد سلول از رده سلولی Vero اضافه شد، برای هر غلظت از اسانس‌ها سه چاهک در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی سلول به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت جهت رشد سلول‌ها انتقال داده شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون و اطمینان از عدم آلودگی، به چاهک‌ها، غلظت‌های مختلف اسانس گلپر، رازیانه و داروی پریمتامین (کنترل مثبت) اضافه شد. جهت کنترل منفی به ۳ چاهک محیط کشت کامل و به ۳ چاهک جهت کنترل اثرات دی‌متیل سولفو کساید بر سلول‌ها، دی‌متیل سولفو کساید (غلظت نهایی کم‌تر از ۱ درصد) اضافه شد. پس از افزودن اسانس و داروها، پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا زمان کافی برای اثر آن‌ها با سلول باشد.

سپس پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT تهیه شده در محیط تاریک به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه و جهت جلوگیری از نور با فویل پوشانده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک با دقت کامل به طوری که کریستال‌های متصل به کف جدا نشود، خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا کریستال‌های فورمازان ایجاد شده حل شود. پس از ۲۰ دقیقه، جذب سلول‌های رنگ گرفته در چاهک‌ها با دستگاه الیزا در طول موج

۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). OD‌های به دست آمده جهت محاسبه CC₅₀ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 استفاده شد.

ارزیابی مهار رشد سلولی اسانس میوه گلپر و رازیانه بر سلول‌های آلوده به تاکی زوویت توکسوپلازما گوندیی ۲۴ ساعت پس از قرار دادن ۱۰^۴ × ۲ عدد از سلول‌های Vero به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط CO₂ ۵ درصد، سوسپانسیون حاوی ۱۰^۵ × ۲ تاکی زوویت به هر چاهک اضافه شد (نسبت تاکی زوویت به سلول ۱۰ به ۱ بود). پس از افزودن تاکی زوویت‌ها، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط CO₂ ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از این مدت، پلیت‌ها زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شده، مایع رویی پلیت‌ها توسط سمپلر تخلیه و محیط کشت کامل جایگزین شد (این مرحله شستشو جهت حذف تاکی زوویت‌های خارج سلولی انجام شد). پس از شستشو مانند روش شرح داده شده در متد قبلی درمان انجام شد. OD‌های به دست آمده جهت محاسبه IC₅₀ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 استفاده شد (۲۱).

د- ارزیابی اثرات ضد توکسوپلازمایی اسانس میوه گلپر و رازیانه در مدل درون تنی

با توجه به نتایج *in vitro* از ۵۰ mg/kg برای گلپر، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg برای رازیانه و ترکیب درمانی ۵۰ mg/kg رازیانه-۵۰ mg/kg پریمتامین برای درمان در این مرحله در نظر گرفته شد. پریمتامین (۵۰ mg/kg) به عنوان کنترل مثبت و PBS به عنوان کنترل منفی (گروه درمان نشده) استفاده شد.

در این تحقیق برای ارزیابی هر اسانس از ۶ سر موش Balb/c (مجموعاً ۳۶ سر) به وزن ۲۲ گرم استفاده شد. ابتدا با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد، سطح شکمی موش ضدعفونی شده و سپس به تمامی گروه‌ها (جدول

جدول شماره ۲: نتایج CC_{50} ، IC_{50} (µg/ml) و SI اسانس رازیانه،

گلپر و داروی پریمتامین در تست MTT

اسانس/دارو	IC_{50}^a (µg/ml)	CC_{50}^b (µg/ml)	SI ^c
<i>Heracleum persicum</i> (گلپر)	۲۶/۰۴	۷۶/۵۷	۲/۹۴
<i>Foeniculum vulgare</i> (رازیانه)	۱۴/۵۴	۱۰۱/۲	۶/۹۶
PYR (پریمتامین)	۲/۶۳	۷/۹۹	۳/۰۳

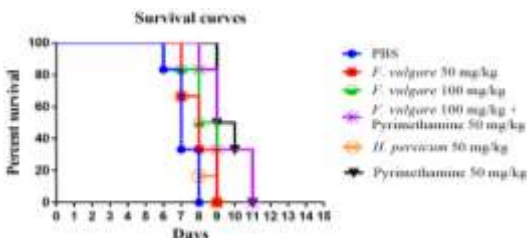
a : The half maximal inhibitory concentration

b : The half maximal cytotoxic concentration

c : Selectivity index = CC_{50}/IC_{50}

۲- نتایج مدل درون تنی

با توجه به نمودار شماره ۱، برای تعیین اثرات ضد انگلی اسانس گلپر و رازیانه در شرایط برون تنی در موش های بآلب سی که با تزریق داخل صفاق 1×10^3 تاکی زوئیت توکسوپلازما گوندی آلوده شده بودند، زمان بقای موش ها پس از ۵ روز درمان بررسی شد. موش های کنترل منفی که انگل و PBS دریافت کردند، از روز ششم پس از آلوده شدن، شروع به مردن کردند و در پایان روز هشتم تمامی موش های این گروه مردند. موش های گروه کنترل مثبت که پریمتامین دریافت کردند از روز نهم شروع به مردن کردند و تا پایان روز یازدهم همه موش ها مردند.



نمودار شماره ۱: اثرات اسانس گلپر، رازیانه و داروی پریمتامین بر میزان زمان بقاء در موش های Balb/c آلوده به انگل توکسوپلازما گوندی

موش هایی که اسانس گلپر (۵۰ mg/kg) و رازیانه (۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) دریافت کردند در روزهای هفتم، هشتم و نهم آزمایش مردند. البته ۵۰ درصد موش هایی که رازیانه (۱۰۰ mg/kg) دریافت کرده بودند، در روز نهم مردند. همچنین یک موش در گروه درمان شده با ترکیب رازیانه (۱۰۰ mg/kg) - پریمتامین (۵۰ mg/kg) در روز هشتم مرد و سایر موش های این گروه در روزهای نهم و یازدهم مردند.

شماره ۱)، 1×10^3 تاکی زوئیت به صورت داخل صفاقی تلقیح شد. تمامی گروه ها ۶ ساعت پس از دریافت تاکی زوئیت به مدت ۵ روز با اسانس ها درمان شدند. سپس هر ۲۴ ساعت میزان مرگ و میر موش ها بررسی شد (۲۱،۲۰).

جدول شماره ۱: گروه بندی موش ها

۱	موش های دریافت کننده PBS (کنترل منفی)
۲	موش های دریافت کننده گلپر (۵۰ mg/kg)
۳	موش های دریافت کننده رازیانه (۵۰ mg/kg)
۴	موش های دریافت کننده رازیانه (۱۰۰ mg/kg)
۵	موش های دریافت کننده رازیانه (۱۰۰ mg/kg) + پریمتامین (۵۰ mg/kg)
۶	موش های دریافت کننده پریمتامین (۵۰ mg/kg) (کنترل مثبت)

ه- آنالیز آماری

نتایج این مطالعه با نرم افزار Graphpad Prism 6 مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین نمودار Kaplan-Meier برای زمان بقا رسم شد و برای مقایسه میزان بقای موش ها در گروه های مورد مطالعه نیز از نرم افزار Graphpad Prism 6 و آزمون Log-rank (Mantel-Cox) استفاده شد. نتایج $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

یافته های این مطالعه در دو مدل برون تنی و درون تنی دسته بندی شده است.

۱- نتایج مدل برون تنی

نتایج این مطالعه نشان داد که براساس CC_{50} ، اسانس رازیانه دارای سیتوتوکسیسیته کمی نسبت به گلپر و پریمتامین بوده است. از سویی گلپر نیز با $CC_{50} = 76.57 \mu\text{g/ml}$ ، سیتوتوکسیسیته کمی نسبت به پریمتامین داشته است. میزان IC_{50} اگرچه در درمان با پریمتامین کم تر بوده است، اسانس رازیانه نیز IC_{50} کم تری از گلپر نشان داده است.

همچنین میزان شاخص انتخابی (Selectivity index) که از تقسیم CC_{50} به IC_{50} محاسبه شد، در اسانس رازیانه بهتر از اسانس گلپر و حتی پریمتامین بوده است (جدول شماره ۲).

گروه‌های درمانی با رازیانہ (100 mg/kg)، پریمتامین (50 mg/kg) و ترکیب درمانی رازیانہ (100 mg/kg) - پریمتامین (50 mg/kg) نسبت به گروه کنترل منفی (PBS) افزایش معنی داری در میزان بقا داشتند ($P < 0.05$). همچنین گروه درمان شده با ترکیب درمانی رازیانہ (100 mg/kg) - پریمتامین (50 mg/kg) نسبت به گروه کنترل مثبت (پریمتامین) تفاوت معنی داری در میزان بقا نداشتند ($P > 0.05$). اگرچه سایر گروه‌های درمانی تفاوت آماری معنی داری با گروه کنترل مثبت نشان دادند ($P < 0.05$).

بحث

اگرچه پیشرفت‌های وسیعی در درمان بیماری‌های انسان حاصل شده است، اما توسعه درمان‌های جدید برای هر دو مرحله حاد و مزمن بیماری توکسوپلازما گوندی نیاز به عزمی راسخ دارد. توکسوپلاسموز تهدیدی برای سلامت جمعیت متنوعی از بیماران شامل بیمارانی با نقص سیستم ایمنی، زنان باردار و افرادی که دچار بیماری‌های چشمی هستند، می‌باشد. در حال حاضر درمان انتخابی توکسوپلاسموز دارای عوارض جانبی زیادی بوده و مقاومت‌های دارویی نیز در مواردی گزارش شده است که این عوامل منجر به قطع درمان می‌شوند (۷،۱). لذا یافتن داروهای آلترناتیو موثر و بدون عوارض جانبی ضد انگل توکسوپلازما گوندی ضروری به نظر می‌رسد (۳). امروزه استفاده از داروهای گیاهی با توجه به این که عوارض جانبی کم‌تری نسبت به ترکیبات شیمیایی دارند و با قیمت کم‌تر در دسترس هستند، افزایش یافته است. در سال‌های اخیر محققین اثرات عصاره متانولی گیاهان مختلف مانند برگ گیاه *اوکالپتوس*، *آلوئه‌ورا* و *Feijoa sellowiana* بر تاکی زوئیت‌های انگل توکسوپلازما گوندی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی نموده‌اند (۲۱، ۲۲).

طبق مطالعات اخیر گیاه رازیانہ دارای اثرات ضد انگلی متعددی از جمله اثرات مهاری علیه ناقل انگل

مالاریا *آنوفل استفسی*، انگل *آیمریا تنلا* و اثرات ضد کرمی داشته است. همچنین این گیاه خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی متعددی دارد (۱۹-۱۶). گلپر نیز دارای اثرات ضد مالاریایی، ضد کرمی، ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی بوده (۱۵-۱۱) و کومارین‌ها و فلاونوئیدها از ترکیبات اصلی موجود در گلپر می‌باشند (۲۳). با توجه به خواص گلپر و رازیانہ در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات ضد انگلی اسانس میوه این گیاهان علیه توکسوپلازما گوندی در مدل‌های برون‌تنی و درون‌تنی بررسی شده است. بر اساس نتایج این مطالعه در شرایط برون‌تنی، اسانس میوه گلپر و به‌خصوص رازیانہ در دوزهای بالاتری نسبت به پریمتامین بر سلول‌های Vero اثرات سیتوتوکسیک داشتند. همچنین اسانس رازیانہ در مقایسه با گلپر اثرات بهتری در مهار سلول‌های آلوده به انگل نشان داده است. شاخص انتخابی (SI) رازیانہ نیز به عنوان یک شاخص مهم درمانی حتی از شاخص انتخابی درمان استاندارد (پریمتامین) و گلپر بیش‌تر بوده است. ترکیبات شاخص دانه رازیانہ شامل آنتون، لیمون و فنچون است (۱۹) که احتمالاً با وجود این ترکیبات اثرات ضد انگلی بر تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی نشان داده است.

بر اساس مطالعه علیزاده و همکاران شاخص انتخابی عصاره متانولی گیاه *آلوئه‌ورا* (۳/۳) نیز در مقایسه با شاخص انتخابی پریمتامین بیش‌تر بود و این عصاره خواص آنتی‌اکسیدانی نیز داشته است. عفونت توکسوپلازما گوندی سبب تولید استرس اکسیداتیو در بدن می‌شود. گیاهانی با خواص آنتی‌اکسیدانی با مقابله با این عوامل تولید شده سبب کاهش عوارض ایجاد شده می‌شوند (۲۱). بررسی اسانس گلپر، رازیانہ و داروی پریمتامین بر روی زمان بقای موش‌های Balb/c آلوده با 1×10^2 تاکی زوئیت RH توکسوپلازما گوندی با تزریق داخل صفاقی در مرحله حاد بیماری نشان داد که موش‌ها در گروه‌های درمان شده زمان بقای بهتری را نسبت به گروه کنترل منفی از خود نشان دادند و به‌خصوص

مطالعه Mady و همکاران نشان داد که اسانس گیاه *Nigella sativa* در ترکیب با پریمتامین بهترین تاثیر مطلوب را در درمان توکسوپلاسموزیس داشت. همچنین *Nigella* به تنهایی خواص آنتی اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی از خود نشان داد. در این مطالعه *Nigella sativa* باعث افزایش زمان بقا در توکسوپلاسموز تجربی شد، اگرچه ترکیب این اسانس با داروی پریمتامین دارای بهترین نتایج زمان بقا بوده است (۲۴).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس میوه گیاهان گلپر و رازیانه دارای اثرات ضد توکسوپلاسمایی قابل قبولی می باشند. از این رو پتانسیل این را دارند تا جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی متداول گردند. مخصوصاً در مورد گیاه رازیانه با نتیجه بهتری که از مصرف این اسانس در میزان زمان بقا به دست آمد، امید این وجود دارد که با استفاده از این اسانس از اثرات سوء داروهای شیمیایی در امان باشیم. البته برای به دست آوردن بهترین غلظت اسانس ها که دارای بیشترین خاصیت ضد انگلی و کمترین میزان سایتوتوکسیسیته باشند، مطالعات تکمیلی بیش تری در آینده نیاز است.

سپاسگزاری

این مطالعه با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1398.147 در دانشگاه علوم پزشکی مازندران مورد تصویب قرار گرفته است.

گروه ترکیب درمانی رازیانه- پریمتامین، نتایج بهتری داشتند. همه گروه های درمانی تفاوت معنی داری با پریمتامین نشان دادند، اگرچه گروه درمان شده با رازیانه- پریمتامین بهترین زمان بقا را در مقایسه با سایر گروه های درمانی از خود نشان داد و در مقایسه با کنترل مثبت (پریمتامین) نیز تفاوت آماری معنی داری نداشت. بنابراین این ترکیب با توکسیته کمی نسبت به درمان با پریمتامین توانایی کنترل عفونت حاد توکسوپلاسموز را دارد و می تواند جایگزین درمان با پریمتامین شود. بر اساس مطالعه علیزاده و همکاران بررسی غلظت های مختلف عصاره های آلونه ورا و اکالیپتوس بر روی زمان بقای موش های Balb/c که با تزریق داخل صفاقی تاکی زوئیت ها به توکسوپلاسموزیس مبتلا شده بودند نشان داد که عصاره ها باعث افزایش زمان بقای موش ها شده بودند. اگرچه در این بررسی داروی پریمتامین نسبت به این دو گیاه تاثیر بهتری داشته است، با این وجود غلظت 100 mg/kg اکالیپتوس دارای اثر بیش تری بر روی زمان بقا در مقایسه با سایر غلظت های عصاره ها داشت (۲۱).

در مطالعه ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۱۷ که بر روی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره متانولی میوه و برگ گیاه *Allium paradoxum*, *Feijoa sellowiana* و *Quercus castaneifolia* انجام شد، برگ *F. sellowiana* دارای بهترین اثر در زمان بقا نسبت به دیگر عصاره ها بوده است (۲۲) (ENREF 81).

References

1. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. Clin Microbiol Rev 2018; 31(4): e00057-e00017.
2. Dubey JP. The history of Toxoplasma gondii the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 2008; 55(6): 467-475.
3. Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, Mehrzadi S, Ahmadpour E, Daryani A. A systematic review of in vitro and in vivo activities of anti-Toxoplasma drugs and compounds (2006–2016). Front Microbiol 2017; 8: 25.
4. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. The Lancet 2004; 363(9425): 1965-1976.
5. Montazeri M, Daryani A, Ebrahimzadeh M, Ahmadpour E, Sharif M, Sarvi SJJom. Effect of propranolol alone and in combination with

- pyrimethamine on acute murine toxoplasmosis. Jundishapur Journal of Microbiology 2015; 8(9): e22572 (Persian).
6. Montazeri M, Ebrahimzadeh MA, Ahmadpour E, Sharif M, Sarvi S, Daryani A. Evaluation of Propranolol Effect on Experimental Acute and Chronic Toxoplasmosis using Q-PCR. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016; 60(12).
 7. Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Tanzifi A, Aghayan SA, et al. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. Front Microbiol 2018; 9: 2587 (Persian).
 8. Montazeri M, Rezaei K, Ebrahimzadeh MA, Sharif M, Sarvi S, Ahmadpour E, et al. Survey on synergism effect of ketotifen in combination with pyrimethamine in treatment of acute murine toxoplasmosis. Tropical Medicine and Health 2017; 45(1): 39 (Persian).
 9. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod 2016; 79(3): 629-661.
 10. Mozaffarian V. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang Moaser Publishers, Tehran (2012). 2013 (Persian).
 11. Sharififar F, Moshafi MH, Dehghan-Nudehe G, Ameri A, Alishahi F, Pourhemati A. Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 2009; 22(3): 317-322.
 12. Liu G-L, Hu Y, Chen X-H, Wang G-X, Ling F. Synthesis and anthelmintic activity of coumarin-imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish. Bioorg Med Chem Lett 2016; 26(20): 5039-5043.
 13. Panahi Y, Dadjou Y, Pishgoo B, Akbari A, Sahebkar A. Antioxidant Activity of *Heracleum persicum* Fruit Extract: Evidence from a Randomized Controlled Trial. J Diet Suppl 2016; 13(5): 530-537.
 14. Shariatfar N, Mostaghim T, Afshar A, Mohammadpourfard I, Sayadi M, Rezaei M. Antibacterial Properties of Essential Oil of *Heracleum persicum* (Golpar) and Foodborne Pathogens. Int J Enteric Pathog 2017; 5(2): 41-44.
 15. Nejad BS, Rajabi M, Mamoudabadi AZ, Zarrin M. In vitro anti-candida activity of the hydroalcoholic extracts of *heracleum persicum* fruit against pathogenic candida species. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(1): e8703 (Persian).
 16. Sedaghat M, Dehkordi AS, Abai M, Khanavi M, Mohtarami F, Abadi YS, et al. Larvicidal activity of essential oils of Apiaceae plants against malaria vector, *Anopheles stephensi*. Iran J Arthropod Borne Dis 2011; 5(2): 51-59 (Persian).
 17. Drăgan L, Györke A, Ferreira JF, Pop IA, Dunca I, Drăgan M, et al. Effects of *Artemisia annua* and *Foeniculum vulgare* on chickens highly infected with *Eimeria tenella* (Phylum Apicomplexa). Acta Veterinaria Scandinavica 2014; 56(1): 22.
 18. Mahmoudvand H, Mahmoudvand H, Jahanbakhsh S, Nadri S. Inhibitory activity of Fennel methanolic extract against hydatid cyst protoscoleces. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences 2016; 9(4): 76-90 (Persian).
 19. Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. Flavour and Fragrance Journal 2009; 24(4): 170-176.
 20. Montazeri M, Emami S, Asgarian-Omran H, Azizi S, Sharif M, Sarvi S, Rezaei F, Sadeghi

- M, Gohardehi S, Daryani A. In vitro and in vivo evaluation of kojic acid against *Toxoplasma gondii* in experimental models of acute toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2019; 200: 7-12.
21. Mirzaalizadeh B, Sharif M, Daryani A, Ebrahimzadeh MA, Zargari M, Sarvi S, et al. Effects of Aloe vera and Eucalyptus methanolic extracts on experimental toxoplasmosis in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology* 2018; 192: 6-11 (Persian).
22. Ebrahimzadeh MA, Taheri MM, Ahmadpour E, Montazeri M, Sarvi S, Akbari M, et al. Anti-Toxoplasma Effects of Methanol Extracts of Feijoa sellowiana, Quercus castaneifolia, and Allium paradoxum. *J Pharmacopuncture* 2017; 20(3): 220-226.
23. Sharififar F, Pournourmohammadi S, Arabnejad M, Rastegarianzadeh R, Ranjbaran O, Purhemmaty A. Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Heracleum persicum* Desf. In mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2009; 8(4): 287-292 (Persian).
24. Mady RF, El-Hadidy W, Elachy S. Effect of *Nigella sativa* oil on experimental toxoplasmosis. *Parasitol Res* 2016; 115(1): 379-390.