مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v17i1.2569

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره آبی بذر درمنه کوهی بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی

رامین پازکی[۱]، شیدا نبویان[۲]، فاطمه غفاری‌فر[۳]، فرحناز بینشیان[۴*]

۱- استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی سمنان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
۲- دانشجوی پزشکی، گروه انگل و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی سمنان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
۳- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴- استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی سمنان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

چکیده

مقدمه: *لیشمانیازیس جلدی یک بیماری عفونی آندمیک در ایران می‌باشد. عدم موفقیت در درمان کامل بیماری با استفاده از درمان‌های رایج، استفاده از گیاهان دارویی مؤثر را ضروری می‌سازد. گونه‌های مختلف گیاه آرتمیزیا فعالیت ضدلیشمانیایی دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر کشندگی عصاره آبی بذر درمنه کوهی بر لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه از بذر گیاه آرتمیزیا اوچری عصاره آبی تهیه گردید. عصاره آبی آرتمیزیا اوچری در غلظت‌های ۵۰،۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (µg/ml) تهیه گردید. اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، ماکروفاژهای غیرآلوده و ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور با آزمون‌های MTT و فلوسایتومتری بررسی شدند. تأثیر عصاره بر ایجاد آپوپتوز در پروماستیگوت‌ها با روش فلوسایتومتری بررسی شد.*

نتایج: *تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت و مشخص گردید که افزایش زمان و غلظت عصاره آبی آرتمیزیا اوچری باعث کاهش معنادار (P≤۰/۰۵) تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور شد به‌طوری‌که در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره رشد انگل به‌طور کامل متوقف شد. درصد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت برای گروه درمان شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۱۱/۸۴ درصد و برای گروه کنترل ۲۸ درصد بود. IC50 عصاره برای پروماستیگوت‌ها ۳۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد به‌طوری‌که در این غلظت ۵۰ درصد ممانعت از رشد وجود داشت.*

نتیجه‌گیری: *عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری در از بین بردن پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در ماکروفاژها اثر مطلوب داشت و عصاره توانست در ۹/۲۸ درصد پروماستیگوت‌ها ایجاد آپوپتوز کند.*

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی، آرتمیزیا اوچری، لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت.

***نویسنده مسئول:** سمنان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، گروه انگل و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی سمنان، **تلفن:** ۰۲۳-۳۳۶۵۴۱۷۰، **نمابر:** ۰۲۳-۳۳۶۵۴۱۷۰، **Email:** fzbineshian@yahoo.com

ارجاع: پازکی رامین، نبویان شیدا، غفاری‌فر فاطمه، بینشیان فرحناز. بررسی اثر عصاره آبی بذر درمنه کوهی بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛۱۷(۱):۱۷-۹.

مقدمه

لیشمانیا ماژور، به‌عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، عامل بیماری سالک روستایی (سالک نوع حاد و مرطوب) می‌باشد. بیماری در انسان محدود به پوست و گاهی غشاهای مخاطی است. مخزن اصلی انگل جوندگان بیابانی می‌باشند و لذا عامل بیماری از این حیوانات و با واسطه پشه‌خاکی به انسان منتقل می‌شود و از این رو جزء بیماری‌های منتقله از حیوان به انسان است. لیشمانیا ماژور تک‌یاخته‌ای است که به دو فرم پروماستیگوت و آماستیگوت دیده می‌شود (۱ و ۲).

سالک روستایی یک بیماری با اتیولوژی و سیربالینی مشخص، دوره کمون متغیر، اشکال کلینیکی متعدد، واکنش‌های بافتی متفاوت و عوارض گوناگون است. درمان آن نیز تا حدودی با داروهای شیمیایی، اقدامات فیزیکی و اعمال جراحی امکان‌پذیر می‌باشد. داروهای رایج در درمان این بیماری آنتیموان پنج ظرفیتی و آمفوتریسین B می‌باشد و هر یک به علت دارا بودن عوارض جانبی دارای محدودیت‌هایی در مصرف می‌باشند لذا داروهایی با منشأ گیاهی می‌تواند به مرور جایگزین مناسبی باشد (۱ و ۲).

آرتمیزینین و مشتقات آن، دسته جدید و مهمی از داروهای ضدمالاریا می‌باشند که استفاده از آنها به تدریج در سراسر جهان متداول شد.

گیاه آرتمیزیا فعالیت‌های دارویی گسترده‌ای دارد و از زمان‌های بسیار قدیم در طب سنتی به‌عنوان دارویی برای درمان احتقان، اسپاسم، آلودگی‌های ویروسی، عفونت‌های باکتریال، بیماری‌های مالاریا، هپاتیت، سرطان و التهاب مورد استفاده قرار گرفته است (۳).

جنس آرتمیزیا دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدتریپانوزوم و ضدلیشمانیا می‌باشد (۸-۴).

ترکیبات شیمیایی مختلفی در بعضی از گونه‌های آرتمیزیا وجود دارد که از آن جمله می‌توان منوترپن‌ها، سسکوئی‌ترپن‌ها، لاکتون‌های سسکواترپن، فلاوونوئیدها، کومارین‌ها، استرول‌ها و پلی‌استات‌ها را نام برد (۹ و ۱۰). لاکتون‌های سسکواترپن طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند ضدتوموری، ضدالتهابی، ضددرد، ضدزخم، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدانگل و بازدارنده حشرات می‌باشند (۱۱). دانشمندان براین باورند که عمل قدرتمند آرتمیزینین علیه انگل‌ها به‌دلیل حضور پل اندوپراکسید است (۱۲).

برای مقایسه تأثیر داروها از IC50 (50% inhibitory concentration) یا غلظت مهار میانه استفاده می‌شود که هرچه این عدد پایین‌تر باشد نشانه تأثیر بیشتر دارو می‌باشد.

مطالعات زیادی در قسمت‌های مختلف ایران بر روی اسانس درمنه کوهی (Aucheri Artemisia) صورت گرفته است فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، آنتی‌کانسر، سایتوتوکسیک، آنتی‌موتاژنیک و آپوپتوز بر روی بعضی از سلول‌های سرطانی گزارش شده است (۱۳-۱۵). گونه‌های مختلف گیاه آرتمیزیا (Artemisia spp) فعالیت لیشمانیا کشی دارند ولی هیچ مطالعه‌ای در باره تأثیر بذر گونه درمنه کوهی بر لیشمانیا در ایران صورت نگرفته است با توجه به مطالب ذکر شده هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر کشندگی عصاره آبی بذر درمنه کوهی بر لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با شناسه IR.SEMUMS.REC.1397.041 مورد تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی سمنان قرار گرفت.

– تهیه عصاره آبی

گیاه آرتمیزیا اوچری از گیاهان بومی استان سمنان است در فصل پاییز از منطقه رستنی آن و در حوالی شهر سمنان بذر گیاه جمع‌آوری گردید و زیر نظر کارشناس هرباریوم مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی سمنان تأیید گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه، در شرایط مطلوب و ایده‌آل (سایه، درجه حرارت اتاق و رطوبت مناسب) خشک گردید. ابتدا مقدار ۵۰ گرم از بذر گیاه را کاملاً خرد کرده و آسیاب شد سپس در یک بشر ۱۰۰۰ سی‌سی منتقل کرده و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و روی آن را با پارافیلم پوشانیده و بعد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت بر روی هیتر شوف بالن با دمای ملایم گذاشته تا به جوش آید. سپس تمامی محلول به‌وسیله گاز استریل و کاغذ صافی صاف گردید. مایع صاف شده در بن ماری ۷۰-۶۰ درجه سانتیگراد تا حدی قرار گرفت تا حالت عسلی پیدا کرد. روش دیگر این است که مایع صاف شده را به مقدار ۲۵میلی‌لیتر یا کمتر در لوله‌های فالکونه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فریزر ۷۰- قرار داده شدند سپس لوله‌ها را از فریزر خارج کرده و به دستگاه لیوفیلیزه انتقال گردید. لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار گرفته تا در نهایت عصاره خشک حاصل شد. عصاره خشک حاصل تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

– انتخاب گونه لیشمانیا:

از انگل لیشمانیا سویه استاندارد MRHO/IR/75/ ER موجود در گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد.

– نحوه کشت انگل لیشمانیا ماژور

انگل از دمای ۷۰- درجه سانتیگراد خارج و در بن ماری ۲۵ درجه ذوب گردید. برای حصول اطمینان از زنده بودن انگل، در شرایط استریل یک قطره از محیط کشت در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰X مشاهده گردید. سپس برای کشت از محیط RPMI1640 (با ۲۰٪ سرم جنین گوساله غنی شد) استفاده گردید که به ظرف حاوی

انگل اضافه و در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. این محیط حاوی معرف "فنل رد" بوده که با رشد و تکثیر انگل و کاهش PH به‌دلیل آزاد شدن متابولیت‌های انگل معرف از رنگ قرمزبه رنگ زرد تغییر می‌یابد. برای مشاهده انگل‌ها، بهتر است از میکروسکوپ اینورت استفاده شود تا خطر آلودگی کاهش یابد. از این انگل‌ها در فاز ایستا، می‌توان برای تزریق به موش استفاده نمود.

– 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 $۱/۶ \times ۱۰^{۶}$ پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف تهیه شده در PBS (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ µg /ml) از عصاره گیاهی در طی مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت و در درجه حرارت ۲۶ درجه سانتیگراد کشت داده شد.

از میکرو پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد به هر چاهک آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پروماستیگوت و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۲۰FCS+RPMI1640 درصد اضافه شد سپس غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی به چاهک‌ها اضافه شد تمام آزمایشات به‌صورت سه بار تکرار انجام شد و یک پلیت به مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت. به‌عنوان کنترل آزمون در هر پلیت سه عدد از چاهک‌ها فقط دارای پروماستیگوت بدون هیچ دارویی بودند. همچنین در هر پلیت ۳ چاهک آمفوتریسین و در ۳ چاهک دیگر گلوکانتیم با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان دارو اضافه شد تا اثر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری با این دارو مقایسه و ارزیابی شود (۱۶).

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها

ابتدا موش‌ها را با پروماستیگوت‌های فاز ایستاآلوده کرده و پس از ۲۴ ساعت وقتی اطمینان حاصل شد که اکثر ماکروفاژهای صفاق موش آلوده به انگل لیشمانیا هستند می‌توان از این ماکروفاژهای آلوده جهت انجام آزمون استفاده کرد. ماکروفاژها را از صفاق موش جدا کرده و در فلاسک کشت قرار داده شد و بعد از زمان ۲۴ ساعت ماکروفاژهای چسبیده به کف پلیت را با استفاده از یخ جدا نموده و پس از شمارش در پلیت‌های کشت سلولی کشت داده شد (۱۶).

آماستیگوت موجود در ۱۰۰ ماکروفاژ توسط عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ به همراه روغن ایمرسیون شمارش شد و سپس عدد حاصله بر عدد ۱۰۰ تقسیم گردید تا درصد آلودگی اولیه ماکروفاژها بدست آمد عدد حاصل بیانگر متوسط تعداد آماستیگوت در ماکروفاژ است سپس ۱۰۰ میکرولیتر از درون فلاسک‌ها که حاوی ماکروفاژهای دارای آماستیگوت بود وارد چاهک‌های پلیت‌های استریل مخصوص کشت سلول گردید، غلظت‌های از عصاره گیاهی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ µg /ml) به درون چاهک‌ها اضافه شد یک چاهک فقط دارای ماکروفاژهای آلوده بود که به‌عنوان حفره کنترل یا شاهد در نظر گرفته شد سپس پلیت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباتور قرار گرفت و بعد از گذشت این مدت پلیت در بین تکه‌های یخ به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار گرفت و این عمل باعث شد تا ماکروفاژهای چسبیده به کف پلیت آزاد شده و در مایع RPMI غوطه‌ور شوند و سپس از چاهک‌های پلیت لام تهیه شد لام‌ها با متانول فیکس و با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و درصد آلودگی ماکروفاژها برای هر چاهک محاسبه گردید. لازم به ذکر است که تمامی این آزمون‌ها به‌صورت سه تایی تکرار شد (۱۶).

ارزیابی حیات سلولی:

الف: تست تریپان بلو

بررسی میزان اثربخشی عصاره‌ی آبی بذر گیاه آرتمیزیا بر رنگ‌پذیری پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور کشت داده شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین گردید.

بررسی میزان نفوذ رنگ تریپان بلو به داخل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور و شمارش سلول‌های مرده و زنده با استفاده از لام نئوبار ومیکروسکوپ نوری انجام گردید. در این روش سلول‌های زنده به‌دلیل دارا بودن غشا سالم و مقاوم و مقاوت در برابر ورود رنگ، بی‌رنگ باقی می‌مانند، اما سلول‌های مرده یا در حال مرگ که مقاومت خود را از دست داده‌اند به رنگ آبی در می‌آیند (هسته و سیتوپلاسم آنها رنگ می‌گیرد) که نشان‌دهنده‌ی اثر بخشی دارو بر پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور است. سلول‌های کشت داده شده پس از رشد کافی در معرض ماده تریپان بلو با غلظت ۰/۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیدند و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و لام نئوبار تعداد سلول‌های مرده و زنده شمارش و گزارش شد (۱۶).

ب: آزمون MTT

با استفاده از آزمون MTT (دی متیل تیازولیل دی فنیل تترازولیوم بروماید) میزان اثر بخشی عصاره‌ی آبی بذر گیاه آرتمیزیا در مهار رشد لیشمانیا ماژور بررسی شد. آزمون MTT یک روش رنگ‌سنجی استاندارد جهت ارزیابی فعالیت متابولیک سلول و بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. پودر MTT (دی متیل تیازولیل دی فنیل تترازولیوم بروماید) یک نمک محلول در آب است که در PBS حل می‌شود و یک ترکیب زرد رنگ ایجاد می‌کند که در میتوکندری سلول‌های سالم تغییر رنگ‌یافته و به رسوب ارغوانی رنگ تبدیل می‌شود. MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی احیا و ایجاد بلور ارغوانی نامحلول فورمازان می‌کند که در DMSO (دی

متیل سولفوکسید) حل می‌شود و در طول موج ۵۷۰ نانومتر دارای جذب است. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار چاهک‌های نمونه با نمک MTT تیمار شده و به مدت ۳ ساعت در تاریکی و در انکوباتور قرار می‌دهیم و احیای وابسته به دهیدروژناز میتوکندریایی MTT به فورمازان به‌وسیله‌ی الایزا ریدر (ELIZA Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید که با تعداد سلول‌های زنده رابطه‌ی مستقیم دارد. در این آزمون با بررسی نتایج می‌توان به دوز دارویی مناسب که اثر بخشی مناسب‌تری دارد دست یافت (۱۷).

– MTT بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

در سه پلیت به‌صورت جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول RPMI ۱۶۴۰ و Fcs (Fetal calf serum) ۲۰٪ حاوی $۱/۶\times۱۰^{۶}$ پروماستیگوت به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل از ۱۰۰ میکرولیتر ۲۰ درصد RPMI 1640 + Fcs استفاده شد.

غلظت‌های از عصاره گیاهی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ml/**µg**) به چاهک‌های حاوی پروماستیگوت به‌صورت جداگانه اضافه شد پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۶°C قرار داده شدند. سپس به هر چاهک مقدار ۲۰ µl از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۲۶°C انکوبه شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی دور ریخته شد به سلول‌ها موجود در ته پلیت مقدار ۱۰۰ µl از DMSO اضافه شد. جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (۱۴) و نتیجه به‌صورت OD محاسبه شد (۱۶).

آزمایش MTT برروی ماکروفاژها

برای کشت سلولی از ماکروفاژ لاین سلولی J774 (تهیه شده از انستیتو پاستور) استفاده شد که مانند پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره مواجه شد. درجه حرارت انکوباتور برای ماکروفاژها ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد.

ج: بررسی مرگ سلولی به‌وسیله فلوسایتومتری

فلوسایتومتری بر این اصل استوار است که اشعه نور لیزر تابیده شده به یک جمعیت سلول دچار شکست می‌شود بررسی تفرق نور حاصل در جهات مختلف می‌تواند اطلاعاتی در مورد اندازه شکل و ساختار سلول ارایه دهد شدت شکست نور در جهت مستقیم Forward Light Scatter (FLS) با اندازه سلول مرتبط است حال آن که میزان شکست نور در زاویه راست نسبت‌به نور لیزر تابانده شده با تراکم سلولی در ارتباط بوده و بیانگر حضور اندامک‌های درون سلولی است که می‌تواند موجب تفرق نور تابانده شده شوند. با بررسی تفرق اشعه لیزر تابانده شده به یک مجموعه سلولی می‌توان تا حدود زیادی به وضعیتی که سلول در آن به سر می‌برد پی‌برد برای افتراق سلول‌های نکروتیک و آپوپتوتیک پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مواجه شده با دوزهای مختلف عصاره گیاهی از روش رنگ‌آمیزی Annexin-V استفاده شد (۱۶ و ۱۷).

برای انجام آزمون می‌توان از رنگ‌آمیزی Propidium Iodide (PI) و آنکسین جداگانه استفاده کرد که در این مطالعه برای دقت بیشتر از کیت شرکت (Roche, Germany) استفاده شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تأثیر عصاره بر انگل با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت تا اختلاف معنی‌دار آماری مشخص گردد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری بر پروماستیگوت‌ها تعداد اولیه پروماستیگوت‌ها ۱۶۰×۱۰^{۴} بود که تحت تأثیر رقت‌های مختلف عصاره قرار گرفت. گروه کنترل منفی بدون دارو و گروه کنترل مثبت تحت تأثیر داروهای گلوکانتیم و آمفوتریسین قرار گرفتند.

IC50 عصاره ۳۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. برای محاسبه IC50 از برنامه ED50V10 که یک برنامه در نرم‌افزار اکسل است، استفاده گردید. در غلظت ۳۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره تعداد انگل برابر با نیمی از تعداد انگل در گروه کنترل بدون دارو بود و این بدین معنی است که در این غلظت ۵۰ درصد ممانعت از رشد وجود داشته است.

در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره رشد انگل به‌طور کامل متوقف شده است (جدول ۱، نمودار ۱ و ۲).

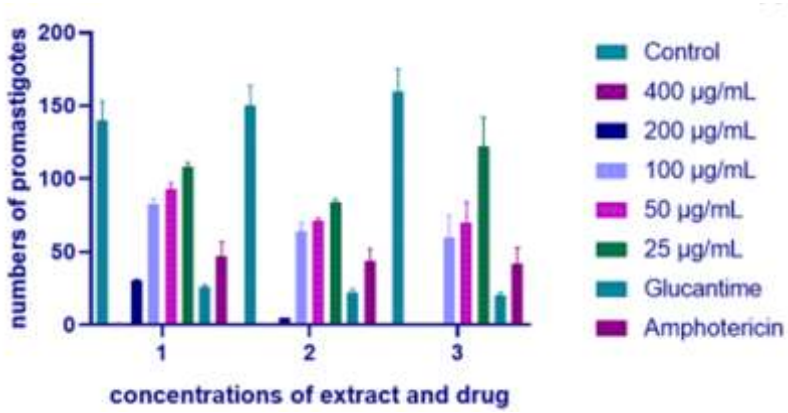
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD صورت گرفت تا درصد معنی‌داری مشخص گردید. برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. گروه کنترل با همه گروه‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سطح ($P\leq۰/۰۵$) معنی‌دار بوده است.

جدول ۱- تعداد پروماستیگوت پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری

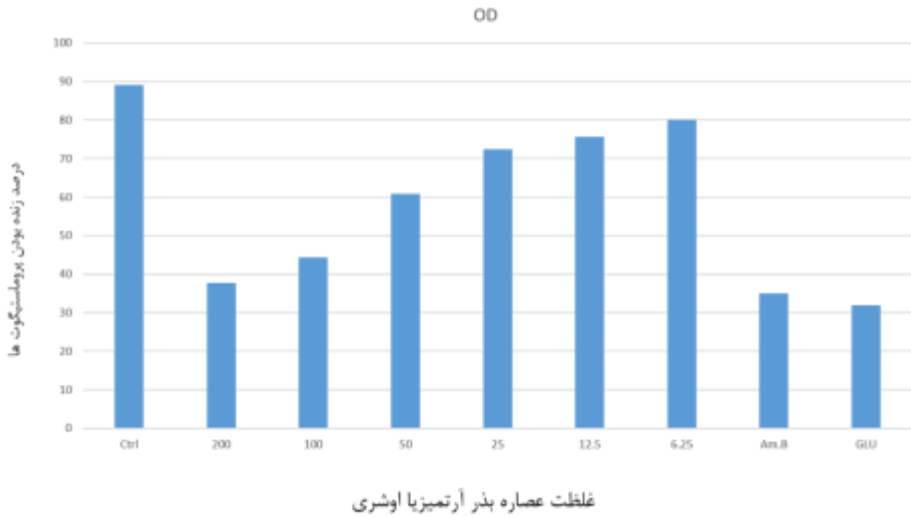
غلظت میکروگرم بر میلی‌لیتر	تعداد پروماستیگوت (Mean±SD) پس از ۷۲ ساعت
انگل بدون دارو (کنترل منفی)	$۱۶۰\times۱۰^{۴}\pm۱۴/۱۴\times۱۰^{۴}$
۴۰۰ عصاره	.٠٠٠٠±.٠٠٠٠

۲۰۰ عصاره	.۰۰۰۰±.۰۰۰۰
۱۰۰ عصاره	۶۰×۱۰^{۴}±۱۹/۷۹×۱۰^{۴}
۵۰ عصاره	۶۹×۱۰^{۴}±۱۵/۵۵×۱۰^{۴}
۲۵ عصاره	۱۲۲×۱۰^{۴}±۲۲/۶۲×۱۰^{۴}
گلوکانتیم	۲۰×۱۰^{۴}±۲/۸۲×۱۰^{۴}
آمفوتریسین	۴۱×۱۰^{۴}±۱۲/۷۲×۱۰^{۴}

داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل می‌باشند.



نمودار ۱- نمودار ستونی تعداد پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های دارویی مختلف در مقایسه با گروه کنترل در سه زمان (۱) ۲۴، (۲)۴۸ و (۳)۷۲ ساعت
داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل می‌باشند. خطوط عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است.



نمودار ۲- درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها پس از ۷۲ ساعت
نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری بر آماستیگوت‌ها پس از ۷۲ ساعت.

در گروه کنترل بدون درمان پس از ۷۲ ساعت ۲۸ درصد از ماکروفاژهای الوده بودند که به‌طور میانگین در هر ماکروفاژ ۲/۱۷ آماستیگوت وجود داشت (SD=۰/۰۷).

در صد ماکروفاژهای آلوده تحت درمان با عصاره در رقت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۵/۱۹ درصد که به‌طور میانگین در هر ماکروفاژ ۱/۳ آماستیگوت وجود داشت (SD=۰/۰۳). سایر اطلاعات در جدول ۲ آمده است (جدول ۲).

تأثیر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری بر روی ماکروفاژها

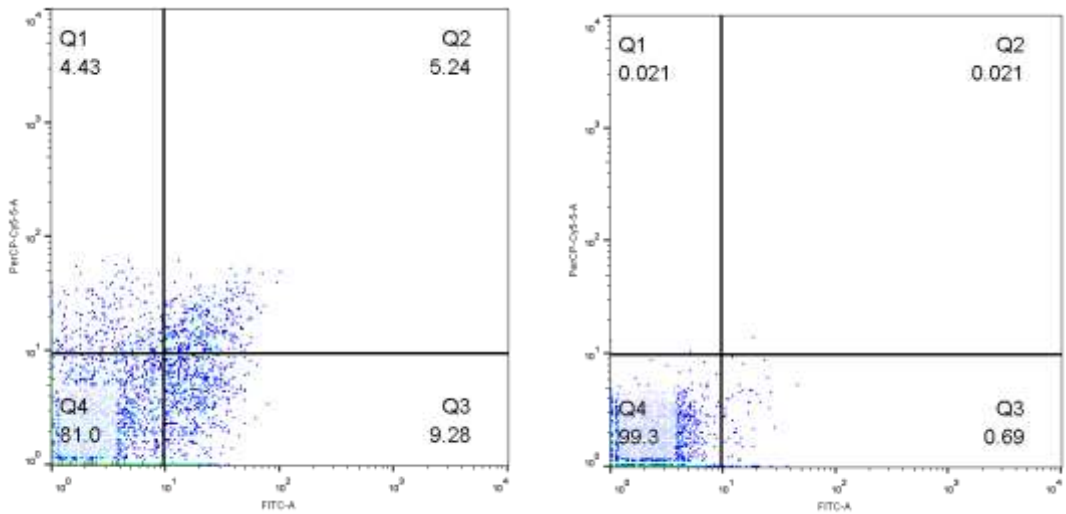
درصد زنده بودن ماکروفاژها پس از تأثیر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT محاسبه شد (نمودار ۳).

نتایج فلوسایتومتری

در نمونه تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری در مدت زمان ۷۲ ساعت پروماستیگوت زنده ۸۱ درصد، آپوپتوز ۹/۲۸ درصد، آپوپتوز ثانویه ۵/۲۴ درصد، نکروز ۴/۴۳ درصد مشاهده شد در گروه کنترل درصد پروماستیگوت‌های زنده پس از ۷۲ ساعت ۹۹/۳ درصد و آپوپتوز ۰/۶۹ درصد بود (شکل ۱).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار تعداد آماستیگوت‌ها در یک ماکروفاژ و درصد ماکروفاژهای آلوده در گروه‌های درمان شده با عصاره آرتمیزیا اوچری، گروه کنترل و گروه‌های درمان شده با گلوکانتیم و آمفوتریسین

گروه‌های مورد مطالعه	غلظت دارو µg/mL	تعداد آماستیگوت‌ها در هر ماکروفاژ انحراف معیار ± میانگین	درصد ماکروفاژهای آلوده
عصاره بذر آرتمیزیا اوچری	۵۰	۱/۸۴ ±۰/۰۶	۱۱/۸۴
	۱۰۰	۱/۳± ۰/۰۳	۵/۱۹
کنترل بدون درمان	۰	۲/۱۷± ۰/۰۷	۲۸
گلوکانتیم	۵۰	۱/۱ ±۰/۰۹	۸
آمفوتریسین	۱	۱/۳± ۰/۰۵	۹



شکل ۱- تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری پروماستیگوت‌های تیمار شده باغلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (چپ :گروه کنترل، راست: گروه تحت درمان)

بحث

لیشمانیوز جلدی از جمله بیماری‌های بومی ایران بوده و در مناطقی از آن به‌صورت هیپر اندمیک وجود دارد. این بیماری دارای یک طیف وسیع علایم بالینی است که از یک زخم ساده خود به خود بهبود یابنده تا لیشمانیوز جلدی حاد، لیشمانیوز جلدی منتشره، لیشمانیوز احشایی و لیشمانیوز جلدی- مخاطی را شامل می‌شود. خط اول درمان انواع لیشمانیوز در جهان و ایران ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان هستند و خط دوم درمان آمفوتریسین B می‌باشد (۱۸ و ۱۹) با توجه به اینکه ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان و آمفوتریسین B هر دو سمی هستند و داروهای تزریقی می‌باشند و دوره درمان خیلی طولانی می‌باشد همچنین وجود عوارض جانبی داروها، گران قیمت بودن داروها و گزارش مقاومت انگل به این داروها یک مشکل جدی محسوب شده و استفاده از داروهای جدید کاملاً ضروری می‌باشد. بنابراین استفاده از ترکیبات گیاهی با سمیت کمتر و استفاده موضعی بر داروهای شیمیایی ارجحیت دارند. گیاه آرتمیزیا به علت خاصیت ضدمالاریایی ترکیبات مؤثر در سطح جهانی مورد توجه و مطالعات مختلف قرار گرفته است (۲۰).

در بررسی اثر عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری بر پروماستیگوت‌ها درغلظت ۳۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تعداد انگل برابر با نیمی از تعداد انگل در گروه کنترل (فاقد دارو) می‌باشد و این بدین معنی است که در این غلظت ۵۰ درصد ممانعت از رشد وجود داشته است. در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره رشد انگل به‌طور کامل متوقف شده است

بررسی فلوسایتومتری نشان داد درصد سلول‌های زنده تحت درمان با عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری پس از ۷۲ ساعت ۸۱ درصد بودند و آپوپتوز ۹/۲۸ درصد و آپوپتوز ثانویه ۵/۲۴ درصد نکروز ۴/۴۳ درصد مشاهده شد در حالی که در گروه کنترل درصد سلول‌های زنده پس از ۷۲ ساعت ۹۹/۳ درصد و آپوپتوز ۰/۶۹ درصد بود.

براتی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، انقوزه و قوزه پنبه بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره متانولی اندام‌های هوایی(ساقه، برگ، گل) آرتمیزیا اوچری در غلظت‌های ۰/۳۱۲۵، ۵/۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بی‌تأثیر بوده است و تنها در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات ضدلیشمانیایی می‌باشد.

همچنین میزان IC50 عصاره‌ی درمنه کوهی ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. این عصاره بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور اثرات ضدلیشمانیایی مطلوبی نشان داد (۲۱).

شریف و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی عصاره متانولی اندام‌های هوایی آرتمیزیا اوچری در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ بررسی نمودند و نتایج نشان داد غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محصول متانولی ارتمیزیا اوچری می‌تواند مراحل پیشرفته انگل را بعد از ۷۲ ساعت از بین ببرد (۲۲).

رستمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد لیشمانیایی عصاره متانولی آرتمیزیا اوچری در غلظت‌های ۰/۰۹، ۰/۳۶، ۱/۴۴، ۶، ۲۸ mg/kg بر روی موش به‌مدت ۳۰ روز بررسی کردند در نتیجه این عصاره با کاهش بار انگل در نمونه‌های به‌دست آمده از زخم، کبد، طحال و غدد لنفاوی تأثیر ضدلیشمانیایی خود را نشان داد (۲۳).

کریمی‌پور و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات ضدلیشمانیایی عصاره‌های اندام‌های هوایی آرتمیزیا اوچری در فصول بهار و پاییز را بررسی کردند و نتایج نشان داد عصاره آرتمیزیا اوچری در فصل بهار در مقایسه با عصاره آرتمیزیا اوچری در فصل پاییز دارای اثر قوی‌تر بر روی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بود (۲۴).

مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات ذکر شده که تماماً بر روی اندام‌های هوایی گیاه می‌باشد بیانگر آن است که همه قسمت‌های گیاه هم اندام‌های هوایی و هم بذر آرتمیزیا اوچری دارای اثرات ضد لیشمانیایی می‌باشند.

عصاره آبی بذر گیاه آرتمیزیا اوچری بر آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا ماژور تأثیر گذاشته و باعث ممانعت از رشد آنها می‌شود. همچنین آزمایشات نشان داد که فعالیت ضدلیشمانیایی آن در دوزهای بالاتر اثرگذاری بیشتری داشته است. بدین ترتیب عصاره آبی بذر آرتمیزیا اوچری می‌تواند به‌عنوان یک منبع ضدلیشمانیایی قابل دسترسی باشد که اثرات فارماکولوژیک سودمندی در درمان این بیماری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله ازکارکنان آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که صمیمانه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One 2012;7:e35671.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004;27:305-18. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.
3. Nigam M, Atanassova M, Mishra AP, Pezzani R, Devkota HP, Plygun S, et al. Bioactive compounds and health benefits of Artemisia species. Natural Product Communications 2019;14:1934578X19850354. doi: 10.1177/1934578X19850354
4. Emami SA, Rabe SZT, Ahi A, Mahmoudi M. Inhibitory activity of eleven Artemisia species from Iran against Leishmania major parasites. Iran J Basic Med Sci 2012;15:807. doi: 10.22038/ijbms.2012.4854
5. Heydari FE, Ghaffarifar F, Soflaei S, Dalimi A. Comparison between in vitro effects of aqueous extract of Artemisia seiberi and artemisinin on Leishmania major. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2013;8:70.
6. Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry 2008;69:1732-8. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.014
7. Naß J, Efferth T. The activity of Artemisia spp. and their constituents against Trypanosomiasis. Phymed 2018;47:184-91. doi: 10.1016/j.phymed.2018.06.002
8. Soosaraei M, Fakhar M, Teshnizi SH, Hezarjaribi HZ, Banimostafavi ES. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. Ann Med Surg 2017;21:63-80. doi: 10.1016/j.amsu.2017.07.057
9. MMaM M. Introduction of the genus. In: CW Wright (eds.), Artemisia. Abbreviation 1976:1-50. doi:
10. Tan RX, Zheng W, Tang H. Biologically active substances from the genus Artemisia. Planta Medica 1998;64:295-302. doi: 10.1055/s-2006-957438
11. Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene lactones from Artemisia genus: biological activities and methods of analysis. J Anal Methods Chem 2015;2015. doi: 10.1155/2015/247685
12. Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. Int J Parasitol 2002;32:1655-60. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00194-7
13. Asl RMZ, Niakousari M, Gahruie HH, Saharkhiz MJ, Khaneghah AM. Study of two-stage ohmic hydro-extraction of essential oil from Artemisia aucheri Boiss.: Antioxidant and antimicrobial characteristics. Food Res Int 2018;107:462-9. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.059
14. Hosseinzadeh L, Shokoohinia Y, Arab M, Allahyari E, Mojarrab M. Cytotoxic and apoptogenic sesquiterpenoids from the petroleum ether extract of Artemisia Aucheri aerial parts. Iran. J Pharm Sci 2019;18:391.
15. Taherkhani M. Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and in vitro cytotoxic effects of Artemisia aucheri herbs. Pharm Chem J 2017;50:736-45. doi: 10.1007/s11094-017-1523-5

16. Ghaffarifar F, Heydari FE, Dalimi A, Hassan ZM, Delavari M, Mikaeiloo H. Evaluation of apoptotic and antileishmanial activities of Artemisinin on promastigotes and BALB/C mice infected with Leishmania major. Iran J Parasitol 2015;10:258. doi:

17. Lü L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. Toxicol In Vitro 2012;26:636-44. doi: 10.1016/j.tiv.2012.02.006

18. Mohebali M, Rezayat M, Gilani K, Sarkar S, Akhoundi B, Esmaeili J, et al. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major (MRHO/IR/75/ER): an in vitro and in vivo study. DARU J Pharm Sci 2009;17:285-9.

19. Rocha L, Almeida J, Macedo R, Barbosa-Filho J. A review of natural products with antileishmanial activity. Abbreviation 2005;12:514-35. doi: 10.1016/j.phymed.2003.10.006

20. Loo CSN, Lam NSK, Yu D, Su X-z, Lu F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. Pharmacol Res 2017;117:192-217. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.012

21. 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. Antiinfect Agents 2014;12:159-64. doi: 10.2174/22113525113119990005

22. Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalab A, Rostami M. Effect of methanolic extracts of Artemisia aucheri and Camellia sinensis on Leishmania major (in vitro). Turk J Med Sci 2007;36:365-9.

23. Rostami M, Nahrevanian H, Farahmand M, Ziaee H, Sharif M, Maghsudloorad FS. Evaluation of anti-leishmanial efficacy by extract of Artemisia auchery Boiss. on Leishmania major in Balb/c. J. Herb Drug 2012;2:269-74.

24. KarimiPourSaryazdi A, Ghaffarifar F, Dalimi A, Dayer MS. In-vitro and in-vivo comparative effects of the spring and autumn-harvested Artemisia aucheri Bioss extracts on Leishmania major. J Ethnopharmacol 2020;257:112910. doi: 10.1016/j.jep.2020.112910

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2022; Vol 17, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v17i1.2569

Original Article

Effect of Aqueous Extract of Artemisia Aucheri Seed on Promastigote and Amastigote of leishmania Major in Vitro

Ramin Pazoki (Ph.D.)[1], Sheida Nabavian (M.D. Student)[1], Fatemeh Ghaffarifar (Ph.D.)[2], Farahnaz Bineshian (Ph.D.)[*1]

1- Dept. of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.
2- Dept. of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 24 April 2021**, Accepted:** 13 March 2022

Abstract:

Introduction: *Cutaneous leishmaniasis is an endemic infectious disease in Iran. Failure to treat the disease requires the use of effective medicinal plants. Different species of Artemisia have anti leishmania activity. The aim of this study was to study effect of aqueous extract of Artemisia aucheri seed on Promastigote and Amastigote of leishmania major in vitro.*
Methods: *In this study, the aqueous extract of Artemisia aucheri was prepared. The concentration of Artemisia aucheri was 25, 50, 100, 200 and 400 µg/ml to investigate on promastigote and amastigote of Leishmania major. The effects of concentrations on leishmania promastigotes, non-infected macrophages and amastigote-infected macrophages were investigated by MTT and flow cytometry tests. The effect of the extract on apoptosis in promastigotes was investigated by flow cytometry.*
Results: *Data were analyzed using one-way ANOVA. Increasing the time and concentration of Artemisia aucheri significantly decreased the number of promastigotes of Leishmania major (P≤0.05). The growth of the parasite was completely stopped at a concentration of 400 and 200 µg / ml. Percentage of macrophages infected with amastigotes was 11.84% for the treated group at a concentration IC50 of extract was 37.5 µg /ml for promastigotes. At this concentration there was a 50% inhibition of growth.*
Conclusion: *Aqueous extract of Artemisia aucheri seed had good activity in destroying Leishmania major promastigotes in culture and Leishmania major amastigotes in macrophages and the extract was able to induce apoptosis in 9.28% of promastigotes.*

Keywords: Aqueous extract; Artemisia aucheri; Leishmania major; Promastigote.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** F. Bineshian, **Email**: fzbineshian@yahoo.com*

Citation: Pazoki Ramin, Nabavian Sheida, Ghaffarifar Fatemeh, Bineshian Farahnaz. Effect of Aqueous Extract of Artemisia Aucheri seed on Promastigote and Amastigote of leishmania Major in Vitro. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;17(1):9-17.