دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، صفحه ۵۳-۴۴ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.121732.2311
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.44.93.1.1576.111

بررسی اثر اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط In vivo و In vitro

دلشاد حسامی[۱]، فاطمه غفاری‌فر[۲*]، عبدالحسین دلیمی اصل[۳]، وحید نصیری[۴]، عزت‌الله قاسمی[۵] و اوغل نیاز جرجانی[۶]

۱- کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

۳- استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- دانشجوی دکترا، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۶- استادیار، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

چکیده

لیشمانیوز جلدی از بیماری‌های اندمیک و شایع در بعضی از نقاط کشورمان می‌باشد. استفاده از ترکیب‌های آنتی‌موان پنج ظرفیتی به‌عنوان داروهای خط اول درمان لیشمانیازیس جلدی همراه با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعدد است. داروهایی با منشأ گیاهی می‌توانند جایگزین مناسبی باشند. به همین منظور در این پژوهش تأثیر اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) که از گیاهان بومی کشور است بر رشد لیشمانیای ماژور در شرایط in vivo و in vitro بررسی شد. ابتدا اسانس بنه با رقت‌های ۱/۵۰ µg/ml تا ۱/۳۲۰۰ بر پروماستیگوت‌های لیشمانیای ماژور، ماکروفاژهای غیر آلوده و ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت انگل در شرایط in vitro با آزمون‌های MTT و فلوسایتومتری بررسی شد. میزان دوز مؤثر IC_{50} بر روی پروماستیگوت‌های سوش استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER)، مشخص گردید. اسانس بنه به‌صورت پمادی برای درمان استفاده شد. سپس موش‌های نژاد BALB/c به ۳ گروه ۵تایی تحت درمان با اسانس بنه به‌صورت پمادی و گروه درمان با گلوکانتیم به‌صورت تزریقی و گروه کنترل بدون درمان چهار هفته درمان، یک‌بار در روز در یک زمان مشخص انجام شد و برای بررسی میزان تأثیر دارو هر هفته قطر زخم، وزن موش‌ها و میزان مرگ و میر موش‌ها بررسی شد. به‌طوری که اسانس به‌صورت پمادی از افزایش قطر زخم‌ها جلوگیری کرد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بنه توانست در ۱۰٪ پروماستیگوت‌ها ایجاد آپوپتوز کند. نتایج بدست‌آمده نشان داد اسانس بنه در از بین بردن لیشمانیای ماژور در ماکروفافاژ و محیط کشت فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد. همچنین میزان بقاء موش‌هایی که تحت درمان قرار گرفتند با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، اسانس بنه (*Pistacia atlantica* Desf.)، شرایط آزمایشگاهی، موش BALB/C.

مقدمه

لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*)، به‌عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، عامل بیماری سالک روستایی (سالک نوع حاد و مرطوب) می‌باشد. مصونیت نسبت به این بیماری با بهبود ضایعات کامل می‌گردد و درمان آن نیز تا حدودی با داروهای شیمیایی، اقدامات فیزیکی و اعمال جراحی امکان‌پذیر است. مطالعات انجام شده مؤید آن است که لیشمانیا ماژور در اغلب نقاط جهان و ایران شایع بوده و شاید تنها راه‌گشای این مشکل، تهیه داروی مؤثری می‌باشد که دارای کمترین اثرهای جانبی و بهترین اثر تقویت‌کنندگی را روی سیستم دفاعی بدن داشته باشد (Alvar *et al*., 2012). لیشمانیا ماژور عامل بیماری سالک جلدی حاد و جزء بیماری‌های منتقل‌شده از حیوان به انسان است (Sacks, 1989؛ Handman *et al*., 1983؛ King & Turco, 1988؛ Kink & Chang, 1987).

درمان سالک موضوعی بحث‌انگیز است، به‌طوری که گاهی درمان آن را ضروری می‌دانند و گاهی از درمان آن اصولاً چشم‌پوشی می‌کنند و آن را به حال خود می‌گذارند تا مسیر طبیعی خود را طی کند و بهبودی خود به خود حاصل شود. بنابراین درمان به عوامل متعددی مانند تعداد زخم‌های سالک، مدت زمان پیدایش زخم‌ها، محل زخم‌ها و شرایط سنی، جنسی، اجتماعی و غیره بستگی دارد. در مناطقی که بیماری به‌صورت اندمیک وجود دارد، چنانچه زخم در صورت (یا مناطق باز بدن) نباشد که به زیبایی شخص صدمه بزند، در صورتی که بتوان آن را از عفونت‌های ثانویه محفوظ نگه داشت، بهتر است از درمان خودداری نمود تا پس از بهبودی، بیمار نسبت به عفونت دوباره مصون شود. اما در مناطق غیر اندمیک بیماران را می‌توان درمان نمود (Meshnick, 2002).

بیماری لیشمانیوز جلدی، سال‌هاست که مورد مطالعه پژوهشگران قرار گرفته است. این بیماری ازجمله بیماری‌های بومی کشور ما ایران است و در مناطقی از این سرزمین، به‌صورت هیپراندمیک وجود دارد. در این بیماری پس از گزش حشره و گذشتن دوره کمون، ضایعات قرمز رنگ ظاهر می‌شود و پس از مدتی زخم شده در نهایت خود به خود بهبود می‌یابد و از خود جوشگاهی باقی می‌گذارد، اما همیشه سیر بیماری به‌صورتی که گفته شد طی نمی‌شود و گاهی زخم به‌صورت مزمن سال‌ها باقی می‌ماند و مشکلات متعددی را برای بیمار ایجاد می‌نماید. این بیماری دارای یک طیف وسیع 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.

داروی گیاهی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت اسانس بنه با نام علمی *Pistacia atlantica* می‌باشد (Bozorgi *et al*., 2013؛ Pourreza *et al*., 2008). این واریته در ایران در استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، کرمان (شاه کوه، کوه جبال بارز)، سیستان و بلوچستان (۱۳ کیلومتری جنوب غرب نصرت‌آباد، کوه تفتان) و همچنین نواحی مختلف استان هرمزگان می‌روید (Zakizadeh *et al*., 2011). ارتفاع این گیاه به ۷ تا ۹ متر می‌رسد. اگرچه آمار دقیقی از تعداد درختان بنه در بانه موجود نیست اما تعداد آنها بین ۱۰ تا ۲۰ هزار اصله تخمین زده شده‌است. روغن پسته وحشی به‌طور متوسط ۵۹٪ چربی دارد و غنی از اسیدهای چرب غیراشباع بوده که اسیدهای چرب غیراشباع آن شامل: اسید اولئیک (۶۹٪)، اسید لینولئیک (۱۷٪)، اسید پالمیتیک (۹/۶٪)، اسید استئاریک (۱/۳٪) و اسید پالمیتولئیک (۳/۱٪) می‌باشد (Handman *et al*., 1983).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آلکالوئیدهای مشتق از گیاهان دارویی شامل ترپن و فنول خاصیت ضدانگلی دارند. در مطالعه Kayser و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده شده که گیاه بنه شامل مونوترپن و تری‌ترپن است. در مطالعات انجام شده توسط Yousefi و همکاران (۲۰۰۹) و Tabatabaii و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از عصاره دو گیاه فرفیون (*Euphorbia mysinites*) و ابوخلسا (*Alkanna tinctoria*) که هر دو حاوی ترپن می‌باشند بر روی انگل لیشمانیا خواص ضدلیشمانیایی خوبی از خود نشان داده‌اند. به همین

دلیل بود که در این تحقیق نیز از اسانس گیاه *Pistacia atlantica* برای درمان لیشمانیازیس ناشی از لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی و موش BALB/c استفاده شد.

مواد و روش‌ها

انگل لیشمانیا ماژور

سویه انگلی که برای این تحقیق انتخاب گردید (MHRO/IR/75/ER) سویه‌ای از لیشمانیا ماژور است که توسط آقای دکتر ندیم از رومبومیس در منطقه اصفهان جدا شد و هم اکنون در ایران برای تهیه لیشمانین و واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد و توسط مؤسسه‌های مربوطه، به‌صورت زنده در برودت بسیار پایین و یا به‌صورت پاساژهای سریال، در محیط کشت و موش BALB/c نگهداری می‌شود.

حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این تحقیق از موش‌های آزمایشگاهی خالص از نوع BALB/c استفاده گردید. موش‌ها همگی ماده بوده و در سنین ۶ تا ۸ هفتگی مورد استفاده قرار گرفتند. این موش‌ها از مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، واقع در مؤسسه تحقیقات رویان تأمین شده و در مرکز نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

شرایط in vitro

نحوه کشت انگل لیشمانیا ماژور: انگل از دمای ۷۰- درجه سانتیگراد خارج و در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید. به این ترتیب محیط یخ زده انگل، به‌صورت مایع درآمد. برای حصول اطمینان از زنده بودن انگل، در کنار شعله، با استفاده از سوآپ استریل و در زیر هود، یک قطره از محیط جدا و در زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ مشاهده گردید. سپس برای کشت از محیط GIBCO® RPMI Media 1640 که با ۲۰٪ سرم جنین گوساله (Fetal Bovine Serum (FBS) GIBCO) غنی شده است استفاده شد که به ظرف حاوی انگل اضافه شده و در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این محیط در شرایط عادی به‌دلیل اینکه حاوی "فنل رد" می‌باشد، قرمز رنگ است و با رشد و تکثیر انگل و تنزل pH به‌دلیل آزاد شدن متابولیت‌های انگل به رنگ زرد در می‌آید. در چنین حالتی برای جلوگیری از اُفت انگل باید آن را به محیط تازه پاساژ داد. برای مشاهده انگل‌ها، بهتر است از میکروسکوپ معکوس استفاده نمود تا خطر آلودگی کاهش یابد. در هر بار پاساژ به روش گفته شده فوق، از محیط نمونه‌برداری شد و رشد انگل‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از این انگل‌ها در مرحله ایستا، می‌توان برای تزریق به موش به‌مدت طولانی استفاده نمود.

آماده‌سازی پماد: ۰/۱ گرم از اسانس بنه همراه با ۱ گرم وازلین روی زخم به‌صورت درمان موضعی استفاده شد.

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 ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف اسانس بنه در طی مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در سه پلیت جداگانه و به‌صورت تری‌پلیت در درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد پی‌ریزی شده است. درضمن چون اسانس بنه بوی بسیار تندی دارد پروماستیگوت‌هایی که با اسانس بنه مجاور شد در میکروتیوپ کشت داده شد واسانس بنه با DMSO و PBS رقیق شد. اسانس به‌صورت مساوی با DMSO مخلوط شد و اسانس بنه با رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰ و ۱/۳۲۰۰ تهیه شد و در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۲۰٪FCS+RPMI1640 حاوی انگل به تعداد ۲×۱۰^{۶} به چاهک‌ها اضافه گردید (ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای رقیق‌سازی اسانس بنه را انجام داده‌ایم). لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شده است و پلیت اول را به مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به‌مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به‌مدت۷۲ ساعت

در انکوباتور ۲۲–۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده است. همچنین در هر پلیت ۳ چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط فاقد هیچگونه دارویی بود که این چاهک به‌عنوان کنترل آزمون است. همچنین در هر پلیت در ۳ چاهک آمفوتریسین و در ۳ چاهک دیگر گلوکانتیم با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان دارو اضافه شد تا اثر اسانس بنه با این دو دارو مقایسه و ارزیابی شود.

اندازه‌گیری میزان بقاء انگل با انجام آزمایش MTT

آزمایش MTT (3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide) نسبت به سایر روش‌های بررسی پرولیفراسیون سلولی ساده‌تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجراست. به‌علاوه اینکه کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر قرائت می‌شود، ازاین‌رو تعداد زیادی نمونه را می‌توان همزمان آزمایش کرد.

MTT قادر به عبور از غشای سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، حلقه تترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کنند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. هدف از این آزمایش تعیین دوز آنتی‌ژن و بدست آوردن حداکثر پرولیفراسیون در آزمایش‌های in vitro است.

آزمایش MTT بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

در سه پلیت به‌صورت جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول RPMI 1640 و FCS ۲۰٪ حاوی $۲×۱۰^{۶}$ پروماستیگوت به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه شد.

در یک چاهک از ۲۰۰ میکرولیتر RPMI 1640 + FCS20% به‌عنوان کنترل استفاده شد. از اسانس بنه با رقّت‌های مختلف از ۱/۵۰ تا ۱/۳۲۰۰ تهیه و در هر چاهک به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۵°C–۱۸ قرار داده شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک مقدار ۲۰µl از محلول MTT اضافه گردید. پلیت‌ها دوباره به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۱۸°C انکوبه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد، به‌طوری که سلول‌ها در ته پلیت ته‌نشین شدند. به هر چاهک مقدار ۱۰۰µl از DMSO اضافه گردید. جذب حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. نتایج آزمایش به‌صورت OD محاسبه گردید.

آزمایش MTT بر روی ماکروفاژها (برای بررسی سمّیت دارو بر سلول)

دقیقاً به روش کشت پروماستیگوت‌ها انجام شد، فقط بجای انگل از لاین سلولی 774J ماکروفاژ به همان تعداد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵٪ گاز CO_2 استفاده شد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از ماکروفاژها (حاوی $۵×۱۰^{۴}$) بر روی لامل‌های استریل که درون پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت قرار داده شده بود ریخته شد. لامل‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ گاز CO_2 به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا ماکروفاژها به کف پلیت بچسبند. پس از این مدت به‌منظور حذف ماکروفاژهایی که نچسبیده‌اند در زیر هود و کنار شعله محلول رویی برداشته و با RPMI یک‌بار شستشو داده شد. سپس پروماستیگوت‌هایی که در مرحله ایستایی بودند به تعداد ۷ تا ۱۰ برابر ماکروفاژ به هر چاهک به میزان ۲۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ گاز CO_2 به‌مدت ۵ ساعت انکوبه شدند تا انگل وارد ماکروفاژ شود. پس از این مدت به‌منظور حذف انگل‌هایی که وارد ماکروفاژ نشده‌اند در زیر هود و کنار شعله محلول رویی برداشته شده و با RPMI یک‌بار شستشو داده شد. آنگاه اسانس بنه با رقّت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰

و ۱/۳۲۰۰ میکرولیتر تهیه و به هر لامل اضافه شد. این کار برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد. لامل‌ها برای ۲۴ ساعت انکوبه و بعد توسط پنس از چاهک‌ها خارج شدند. سپس سطح آنها توسط متانول فیکس و با گیمسا به نسبت (۱ به ۵) رنگ‌آمیزی شد. لامل‌ها در پایان به‌منظور شمارش تعداد ماکروفاژ آلوده به انگل و تعداد آماستیگوت‌های موجود در هر ماکروفاژ در تعداد ۱۰۰ ماکروفاژ بررسی شد و شاهد منفی (ماکروفاژ و انگل بدون دارو) و شاهد مثبت (ماکروفاژ و انگل درمان شده با گلوکانتیم) تعیین گردید.

بررسی مرگ سلولی به‌وسیله فلوسایتومتری

سلول‌های مواجه شده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی و اسانس بنه و همچنین سلول‌های کنترل توسط محلول PBS خنک در ۱۴۰۰g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ و شسته شد. برای اطمینان بیشتر از خارج شدن محیط RPMI۱۶۴۰ این عمل یک‌بار دیگر انجام شد. مطابق پروتکل به سلول‌های ته‌نشین شده ۵µl محلول Annexin-V و ۵µl از 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 تجزیه‌وتحلیل شد.

شرایط in vivo

روش آلوده‌سازی و درمان موش‌های BALB/c با انگل لیشمانیا ماژور

سویه انگلی که برای این تحقیق انتخاب گردید (MRHO/IR/75/ER) سویه‌ای از لیشمانیا ماژور است که توسط آقای دکتر ندیم از رومبومیس در منطقه اصفهان جدا شد. ۰/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی انگل که حاوی ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت را که در مرحله ایستا بود به‌صورت زیرجلدی، به کمک سرنگ انسولین، در ناحیه قاعده دم موش‌ها تزریق شد. پس از گذشت ۳۵ روز از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل پدید آمد که پس از حدود ۲ هفته به زخم تبدیل شد. برای اطمینان از وجود انگل لیشمانیا در زخم، از روش نمونه‌برداری استفاده و با لام مستقیم در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. پس از ایجاد زخم درمان موش‌ها شروع شد.

برای درمان موش‌ها از اسانس بنه به‌صورت پماد موضعی استفاده گردید. روش کار بدین شرح بود.

موش‌ها به ۳ دسته ۵تایی به تقسیم شدند:

۱- گروه شاهد آلوده بدون درمان

۲- گروه تحت درمان با پماد بنه

۳- گروه تحت درمان با تزریق گلوکانتیم

در طول درمان و چند هفته پس از درمان قطر زخم موش‌ها به‌صورت هفتگی با کولیس اندازه‌گیری شد. پس از چند هفته ۲ موش از هر گروه را کشته و برای بررسی بار انگلی از طحال موش‌ها رقّت تهیه و به‌صورت هفتگی تعداد پروماستیگوت‌های رشدکرده شمارش شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

برای مقایسه میانگین متغیرهای مورد مطالعه در گروه‌های مختلف از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way Analysis of Variance) استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به‌صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون تعقیبی (Post Hoc Test) توکی (Tukey) استفاده گردید. از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک‌نمونه‌ای (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ استفاده گردید و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج in vitro

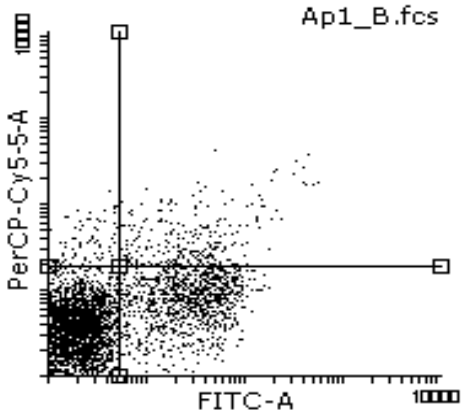
بررسی نتایج تأثیر اسانس بنه بر روی آماستیگوت‌های *L. majer* در شرایط In vitro

نتایج آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف یک نمونه‌ای نشان‌دهنده آن است که فرض نرمال بودن برای ماکروفاژهای

آلوده (P=69%) و آماستیگوت (P=59%) در غلظت‌های مختلف برقرار است. نتایج استفاده از اسانس بنه در میانگین تعداد ماکروفاژهای آلوده بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). قابل ذکر است که در اثر اسانس بنه در کلیه غلظت‌ها تمام آماستیگوت‌ها از بین رفته بودند.

نتایج بررسی فلوسایتومتری

نتایج بررسی فلوسایتومتری بنه در غلظت ۱/۳۲۰۰ بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور نشان داد که ۱۰/۱۰٪ انگل ها دچار آپوپتوز اولیه ۲/۵۸٪ دچار آپوپتوز ثانویه و ۱/۰۹٪ دچار نکروز شده‌اند (شکل ۱).



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	86.23
Right Bottom	10.10
Left Top	1.09
Right Top	2.58

شکل ۱- نتایج فلوسایتومتری با اسانس بنه با رقّت ۱/۳۲۰۰ نشان‌دهنده ۸۶/۲۳٪ انگل زنده، ۱۰/۱۰٪ آپوپتوز اولیه، ۱/۰۹٪ نکروز و ۲/۵۸٪ آپوپتوز ثانویه

جدول ۱- تأثیر اسانس بنه بر روی پروماستیگوت‌ها در آزمون MTT

غلظت اسانس بنه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	انحراف معیار ± میانگین	درصد بازدارندگی
۱/۵۰	۰/۱۱ ±۰	۸۴
۱/۱۰۰	۰/۱۲ ± ۰/۰۱	۸۳
۱/۲۰۰	۰/۱۳ ± ۰	۸۱
۱/۴۰۰	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۷۸
۱/۸۰۰	۰/۱۶ ±۰	۷۷
۱/۱۶۰۰	۰/۱۷ ±۰	۷۶
۱/۳۲۰۰	۰/۱۸ ±۰	۷۵
کنترل	۰/۷۱ ±۰	۰
گلوکانتیم	۰/۲۲ ±۰	۶۹
آمفوتریسین	۰/۱۷ ± ۰	۷۶

اختلاف تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد (P<0.05).

نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بنه روی پروماستیگوت‌های لیشمانیای ماژور به‌نحوی بود که تمام پروماستیگوت‌ها تحت تأثیر اسانس بنه در کلیه غلظت‌ها از بین رفتند.

نتایج آزمون MTT

درصد کشندگی غلظت‌های مختلف اسانس بنه با غلظت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰ و ۱/۳۲۰۰ بر روی پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای (غیر آلوده) ۷۲ ساعت پس از کشت در جدول‌های ۱ و ۲ شرح داده شده است ($P<۰/۰۵$).

نتایج in vivo

نتایج حاصل از گروه‌های مورد مطالعه

در گروه شاهد بیشتر موش‌های شاهد بیمار تا پایان روز ۶۰ (در پایان روز ۶۰ برای سنجش میزان بار انگلی کشته شدند و طحال جدا گردید) مردند. بدین‌ترتیب که درمان به مدت ۲۸ روز متوالی در زمان معین و هر روز انجام شد و بعد برای سنجش بار انگلی از هر گروه دو موش انتخاب شد و موش‌های انتخاب شده برای سنجش بار انگلی کشته شدند. اما موش‌های باقی‌مانده از گروه شاهد بیمار پس از یک هفته مردند. گروه پمادی بنه در مقایسه با گروه شاهد بیمار و گروه‌های تحت درمان از نظر میانگین قطر زخم و میانگین وزن اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). در گروه شاهد، میانگین قطر زخم پیوسته در حال افزایش و میانگین وزن هم در طی ۶۰ پایش کاهش چشمگیری داشت (جدول ۳).

جدول ۲- تأثیر اسانس بنه بر روی ماکروفاژ با استفاده از آزمون MTT

غلظت اسانس بنه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	انحراف معیار ± میانگین میزان جذب	درصد بازدارندگی
۱/۵۰	۰/۰۸ ± ۰	۸۸
۱/۱۰۰	۰/۰۹ ± ۰	۸۷
۱/۲۰۰	۰/۱۰ ±۰	۸۶
۱/۴۰۰	۰/۱۰ ± ۰	۸۶
۱/۸۰۰	۰/۱۱ ±۰	۸۵
۱/۱۶۰۰	۰/۱۱ ± ۰	۸۴
۱/۳۲۰۰	۰/۱۲ ±۰	۸۴
کنترل	۰/۷۵ ±۰/۱۵	۰
گلوکانتیم	۰/۳۹ ± ۰	۴۸
آمفوتریسین	۰/۳۵ ± ۰	۵۳

اختلاف تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار تغییرات قطر زخم ناشی از آلودگی به لیشمانیای ماژور در موش‌های کنترل بدون درمان و تحت درمان

هفته / گروه	گروه تزریقی گلوکانتیم	گروه کنترلی (بدون درمان)	تحت درمان با اسانس بنه به صورت پمادی
اول	۴/۲۸±۰/۵۵	۳/۶۷±۰/۸۸	۴/۱۳±۰/۲۵
دوم	۴/۲۹±۰/۵۵	۵/۴۹±۰/۹۱	۴/۱۳±۰/۲۵
سوم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۷/۵۱±۰/۶۷	۴/۱۴*±۰/۲۵
چهارم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۸/۷۱±۰/۴۱	۴/۱۴*±۰/۲۵
پنجم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۹/۹۳±۰/۸۳	۴/۱۴*±۰/۲۵
ششم	۴/۲۹*±۰/۵۵	۱۲/۲۲±۰/۵۶	۴/۱۴*±۰/۲۵

*، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد ($P<0.05$).

بحث

مهمترین درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیوز بکار می‌رود، ترکیب‌های ۵ ظرفیتی آنتی‌موان هستند که شامل سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) و مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) می‌باشد. این ترکیب‌ها بیش از یک قرن است که برای درمان لیشمانیوز بکار 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 سویی به علت وجود عوارض متعدد دارو، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریعتر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را هم داشته باشد و پس از بهبودی جوشگاهی بر جای نگذارد، ادامه دارد. درمان‌های مختلفی مانند سرما درمانی، گرما درمانی، استفاده از داروهایی مثل داپسون، ریفامپیسین، کتوکونازول، پاروموماییسین موضعی، آمتین، مپاکرین، آمفوتریسینB و آلوپورینول و غیره برای این بیماری پیشنهاد شده است، اما هیچکدام از این موارد روش درمان قطعی نمی‌باشند.

مطالعات قبلی بر روی گیاهان دارویی دارای فرآورده‌های آلکالوئیدی شامل ترپن نشان داده که دارای خاصیت ضد لیشمانیایی می‌باشند. گیاهانی مانند فرفیون (*Euphorbia mysinites*) و ابوخلسا (*Alkanna tinctoria*) که دارای آلکالوییید تری‌ترپن می‌باشند هر دو دارای خواص ضد لیشمانیایی بوده (Tabatabaii *et al*., 2005؛ Yousefi *et al*., 2009) و این مطالعه نیز که شامل اسانس بنه و حاوی مونوترپن و تری‌ترپن است نشان داد که دارای خواص ضد لیشمانیایی بوده و می‌تواند در درمان لیشمانیا مؤثر باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش قطر زخم برای موش‌های درمان شده با بنه مشابه کاهش قطر زخم برای موش‌های درمان شده با گلوکانتیم می‌باشد و قطر زخم از هفته سوم با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد که این امر بیانگر قدرت بالای اسانس بنه برای درمان زخم موش‌های BALB/c ناشی از لیشمانیا ماژور است.

نتایج بررسی آپوپتوز و نکروز با روش فلوسایتومتری نشان داد که آپوپتوز ایجاد شده در پروماستیگوت‌ها بیش از ۱۰٪ می‌باشد که این درصد برای نکروز ۱٪ بود، بنابراین استفاده از اسانس بنه علاوه‌بر ازبین بردن انگل لیشمانیا کمترین التهاب را ایجاد می‌کند.

با توجه به اثرهای سایتوتوکسیک بیشتر داروهای

بکار رفته علیه لیشمانیازیس که اکثراً تزریقی هستند، جایگزین کردن این داروها با داروهایی که منشأ گیاهی داشته و بومی کشورمان باشند از اهداف این تحقیق بود. درمان با استفاده از اسانس بنه در لیشمانیوز جلدی به‌صورت پماد می‌باشد، بنابراین از روش‌های تهاجمی تزریقی استفاده نمی‌شود و کارایی آن نیز مشابه داروی گلوکانتیم است. بنابراین با انجام تحقیقات بیشتر اسانس بنه می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروی گلوکانتیم باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از اعضای محترم گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر را دارند (بودجه این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است).

منابع مورد استفاده

- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. and den Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One, 7(5): e35671.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R. and Rahimi, R., 2013. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk* and *P. lentiscus*): A Review of their traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World: 33p.
- Handman, E., Hocking, R.E., Mitchell, G.F. and Spithill, T.W., 1983. Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. Molecular and Biochemical Parasitology, 7(2): 111-126.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. and Croft, S.L., 2003. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitology Research, 90(2): 55-62.
- King, D.L. and Turco, S.J. 1988. A ricin agglutinin-resistant clone of Leishmania donovani deficient in lipophosphoglycan. Molecular and Biochemical Parasitology, 28(3): 285-293.
- Kink, J.A. and Chang, K.P., 1987. Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana* amazonensis: expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(5): 1253-1257.
- Meshnick, S.R., 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. International Journal for Parasitology, 32(13): 1655-1660.
- Pourreza, M., Shawb, J.D. and Zangeneh, H., 2008. Sustainability of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in Zagros forests, Iran. Forest Ecology and Management, 255: 3667-3671.
- Sacks, D.L., 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania promastigotes*. Experimental Parasitology, 69(1): 100-103.
- Tabatabaii, F., Ghaffarifar, F. and Dalimi A., 2005. Effects of new herbal formulation of *Euphorbia mysinites*, *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* combination against experimental leishmaniasis in BALB/c mice. Medical Daneshvar Journal, 57: 37-46.
- Yousefi, R., Ghaffarifar, F. and Dalimi, A., 2009. The effect of *Alkanna tincturia* and *Peganum harmala* extraction on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iranian Journal of Parasitology, 4(1): 40-47.
- Zakizadeh, M., Nabavi, S. and Ebrahimzadeh, M., 2011. In vitro antioxidant activity of flower, seed and leaves of *Alcea hyrcana* Grossh. European review for Medical and Pharmacological Sciences, 15(4): 406-412.

A study on the effects of *Pistacia atlantica* Desf. essential oil on *Leishmania major* in vitro and in vivo

D. Hesami[1], P. Ghaffarifar[2*], A. Dalimi Asl[1], V. Nasiri[3], E. Ghasemi[4] and O.N. Jorjani[5]

1- Parasitology Deptartment, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Parasitology Deptartment, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran E-mail: ghafarif@modares.ac.ir
3- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Ph.D. student, Parasitology Department, Faculty of Medical Sciences, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran
5- Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Received: May 2018 Revised: October 2018 Accepted: October 2018

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is one of the endemic and common diseases in many parts of our country. The use of pentavalent antimony compounds as first-line drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis have several limitations and side effects. Hence the herbal drug can be good alternatives. In the present study, the effect of essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. on the growth of *Leishmania major* was investigated in *in vivo* and *in vitro* conditions. Initially, the essential oil of *Pistacia atlantica* with dilution of 1:50 to 1:3200 was evaluated on the promastigotes of *Leishmania major*, non-infected macrophages, and infected macrophages with amastigotes, in *in vitro* with MTT and flow cytometry tests. Also, the IC_{50} of the essential oil on the promastigotes of the *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) was calculated. The ointment of *Pistacia atlantica* essential oil was used for treatment in *in vivo* condition. BALB /c mice were divided into three groups and in each group five mice including treated group with ointment of essential, treated group with glucantime and non-treated control group. The treatment was performed daily and once a day for four weeks. To assess the effect of the drugs, the wound diameter and weight and the mortality rate of the mice were measured every week. The ointment of *Pistacia atlantica* essential oil could inhibit the wounds diameter caused by *Leishmania major.* The flow cytometry results showed that *Pistacia atlantica* essential oil could create 10% apoptosis in the treated promastigotes. Overall, *Pistacia atlantica* essential oil was effective in eliminating the amastigotes of *Leishmania major* in the macrophages and culture media, and also the survival rate differences of treated mice and control group were significant.

Keywords: *Leishmania major*, *Pistacia atlantica* Desf. essential oil, in vitro, BALB/c mouse.