

Evaluation of antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (*Pistacia atlantica*) in vitro and in vivo

Adel Ghaderi¹, Mohammad Bagher Khadem-Erfan², Mohammad Barati¹, Shahla Ghaderi²

1.Infectious Diseases Research Center, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran, , Tel:021-43822990, Email: mbaratim@gmail.com

2.Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medical Sciences, Kordestan University, Sanandaj, Iran.

ABSTRACT

background and Aim: Leishmaniasis is a zoonotic disease which presents with a wide range of clinical features, including cutaneous and visceral forms in Iran. *Leishmania (L) major* is one of the agents responsible for cutaneous leishmaniasis transmitted by the bite of sand fly. In this study we assessed the antileishmania effect of *pistacia Atlantica* (alpha-pinene) in culture and also its therapeutic effects on Balb/c mice infected with *L. Major*.

Material and Method: Certain amount of promastigots was challenged with increasing concentrations of *pistacia atlantica* extract. MTT test was used to assess promastigote survival after 24, 48 and 72 hours. For in vivo assessment, in the stationary phase, 0.1 ml solution containing 2×10^6 promastigotes were injected subcutaneously into the base of the tails of the mice. Four weeks after injection, cutaneous lesions appeared and different doses of the extract were applied daily in the form of an ointment for 3 weeks. Diameters of the lesions were measured at the end of each week and therapeutic effect of the extract on the lesions was assessed.

Results: The results of MTT test revealed remarkable effect of the treatment on the growth of promastigots. IC50 values for glucantime and *alpha pinene* were found to be 10 µg/ml and 1.46 µg/ml respectively. 30 % ointment of the extract decreased the lesion diameter significantly while 15% ointment and treatment for control group were ineffective.

Conclusion: The results of the present study showed antileishmanial effect of *alpha-pinene* on *Leishmania major* promastigots, *in vitro*. Moreover, topical ointment of the extract can reduce size of the lesions caused by the parasite, *in vivo*.

Keywords: *Pistacia atlantica*, *Leishmania major*, Area of lesion, *alpha-pinene*, MTT

Received: June 31, 2018

Accepted: July 6, 2018

How to cite the article:

Adel Ghaderi, Mohammad Bagher Khadem-Erfan, Mohammad Barati, Shahla Ghaderi.

Antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (*Pistacia atlantica*) in vitro and in vivo. SJKU.2018;23(4):32-44. URL: <http://sjku.muk.ac.ir/article-1-3586-fa.html>

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره گیاهی آلفاپاین (*Pistacia atlantica*) در شرایط

آزمایشگاهی و موش حساس آزمایشگاهی BALB/c

عادل قادری^۱، محمدباقر خادم عرفان^۲، محمد براتی^۱، شهلا قادری^۲

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۰۲۱-۴۳۸۲۲۹۹۰، Email: mbaratim@gmail.com

۲. گروه فارغ و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز از جمله بیماری‌های مشترک انسان و حیوان است که با طیف وسیعی از علائم بالینی به‌ویژه ضایعات جلدی (سالک) و احشایی (کالا آزار) در ایران همراه است. لیشمانیا مائور یکی از علل لیشمانیوز جلدی است که به‌وسیله نیش پشه‌ی حاکی منتقل می‌شود. در مطالعه حاضر تأثیر آلفاپاین، عصاره گیاهی بنه (*Pistacia atlantica*) در میزان کشندگی لیشمانیا مائور در محیط کشت و همچنین اثر درمانی این عصاره بر روی لیشمانیازیس ناشی از لیشمانیا مائور در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c بررسی گردید.

روش بررسی: غلظت‌های افزایش‌یابنده عصاره گیاهی آلفاپاین با میزان مشخص پروماستیگوت‌ها مواجه داده شدند. برای محاسبه میزان زنده ماندن، تعداد پروماستیگوت‌ها بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی شرایط درون تنی از چهار گروه موش استفاده گردید، جهت آلوده کردن موش‌ها به میزان ۱/ میلی‌لیتر محلول حاوی 2×10^6 پروماستیگوت لیشمانیا مائور در فاز ایستا به قاعده دم موش‌ها و به صورت زیر جلدی تزریق شد. حدود ۴ هفته پس از تزریق، ضایعات جلدی مشهود گردید، سپس با استعمال دارو به صورت پماد در دوزهای مختلف به‌صورت روزانه و به مدت سه هفته در ناحیه زخم و اندازه‌گیری مساحت زخم‌ها در پایان هر هفته در گروه‌های مختلف، اثر درمانی دارو در بهبودی زخم بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT حاکی از اثرگذاری تیمار مورد نظر بر رشد پروماستیگوت‌ها بود. میزان IC_{50} مربوط به عصاره آلفا پاین $1/46 \mu g/ml$ و گلوکانتیم $10 \mu g/ml$ محاسبه گردید. در شرایط درون تنی نیز پماد موضعی ۳۰ درصد این عصاره در کاهش اندازه زخم تأثیر داشت، به‌طوری‌که غلظت ۱۵ درصد و داروی کنترل تأثیری را در کاهش اندازه زخم نداشتند. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد، استفاده از عصاره آلفا پاین در شرایط برون تنی اثر ضد لیشمانیایی مناسبی بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور نشان داد و در شرایط درون تنی نیز بر روی موش حساس آزمایشگاهی باعث محدود شدن زخم گردید.

کلمات کلیدی: *Pistacia atlantica*، لیشمانیا مائور، مساحت زخم، آلفاپاین، MTT

وصول مقاله: ۹۶/۳/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۷/۹ پذیرش: ۹۷/۷/۱۴

مقدمه

لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای است که توسط گونه‌های انگل لیشمانیا و گزش پشه خاکی ماده ایجاد می‌گردد. سالیانه حدود ۱۲ میلیون نفر در ۹۸ کشور در سراسر جهان به این بیماری مبتلا می‌گردند و حدود ۳۵۰ میلیون نفر هم در معرض خطر با گونه‌های مختلف تک‌یاخته لیشمانیا هستند. گونه‌های لیشمانیا در انسان می‌توانند ایجاد بیماری‌های لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز جلدی-مخاطی و لیشمانیوز احشایی نمایند (۱).

لیشمانیازیس پوستی یکی از مهم‌ترین علل ضایعات پوستی اولسراتیو مزمن است. از نظر بالینی بیماری به اشکال مختلف دیده می‌شود. لیشمانیازیس پوستی حاد، لیشمانیازیس پوستی مزمن، لیشمانیازیس پوستی عودکننده و لیشمانیازیس پوستی منتشر (۲). لیشمانیوز جلدی-مرطوب (لیشمانیوز نوع روستایی) یکی از اشکال مهم و شایع بیماری لیشمانیوز است که توسط گونه لیشمانیا ماژور ایجاد می‌گردد، این بیماری جزء بیماری‌های زئونوز (مشترک بین انسان و حیوان) بوده و سالیانه افراد زیادی را در ایران و جهان درگیر می‌کند (۳). داروهای شیمیایی مختلفی از جمله میلتفوسین، پنتامیدین، آمفوتریسین B، عوامل ضد قارچی (از قبیل، کتوکونازول، فلوکونازول، ایتراکونازول)، پاروموایسین، آلپورینول و مپاکرین در درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. خط اولیه درمان این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی‌موآن است (۴).

اغلب فرآورده‌های دارویی و ترکیبات ضد لیشمانیایی دارای سمیت و عوارض جانبی بوده به طوری که مواردی از مقاومت دارویی در درمان با گلوکانتیم در برخی بیماران دیده شده است. همچنین درمان با این داروها طولانی‌مدت بوده به طوری که ممکن است تا چندین ماه فرد مبتلا نیاز به استفاده از دارو داشته باشد. از طرفی معمولاً درمان مؤثر لیشمانیوز جلدی با گلوکانتیم نیاز به تزریق دارو در محل

ضایعه دارد و از آنجا که ضایعات عمدتاً در دست یا صورت فرد مبتلا دیده می‌شود، تزریق دارو با درد همراه است. گلوکانتیم علاوه بر اثری که بر روی انگل دارد می‌تواند باعث تخریب سلول‌های طبیعی بدن فرد مبتلا شود که این امر یکی از مهم‌ترین اثرات جانبی استفاده از گلوکانتیم است. زخم مشکل جدی برای بیمار ایجاد نمی‌کند و در اکثر موارد بهبودی خودبه‌خودی حاصل می‌شود، ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بدشکل بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه، ارائه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد (۶-۴).

با توجه به اثرات سمی و عوارض جانبی این داروها و ترکیبات شیمیایی، بنابراین استفاده از گیاهان و فرآورده‌های گیاهی بومی مناطق اندمیک بیماری که منبع غنی ترکیبات ضد لیشمانیایی را فراهم می‌کنند به عنوان استراتژی جدید درمانی در محدود کردن و درمان این بیماری، جزء اهداف مهم سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سایر نهادهای بهداشتی و درمانی در دنیا و ایران است. استفاده از گیاهان دارویی به علت ماهیت طبیعی خود دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی می‌باشند (۷ و ۵).

بنه (*Pistacia atlantica*) یک نوع درخت از خانواده آنکاردیاسه (*Anacardiaceae*) است که عمدتاً در مناطق غربی (کوه‌های زاگرس) مشاهده می‌شود. میوه‌های بنه توسط افراد محلی پس از آسیاب کردن و مخلوط کردن با مواد طعم‌دهنده دیگر به عنوان مواد غذایی استفاده می‌شود و همچنین از صمغ یا شیره غلیظ (*Oleoresin*) بنه برای ساخت آدامس در ایران استفاده می‌شود (۸). آلفا پائین مهم‌ترین ماده تشکیل‌دهنده‌ی عصاره‌ی گیاه بنه است که در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است (۹ و ۸).

(MRHO.IR.75.ER) در شرایط برون تنی و همچنین درون تنی (موش آزمایشگاهی) انجام شد.

سویه استاندارد از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و بعد از کشت و پاساژهای متوالی به دانشکده علوم پزشکی دانشگاه کردستان منتقل شد. به منظور کشت انگل لیثمانیا، محیط RPMI1640 به- صورت آماده خریداری شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ۱۰۰unit/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین و به عنوان ماده مکمل سرم جنین گوساله (FBS) ۱۰٪ به محیط اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور ۲۴ درجه سانتی گراد منتقل و هر روز با میکروسکوپ اینورت (invert) بررسی شد. در صورتی که رنگ محیط زرد شده و پروماستیگوت‌ها وارد فاز ایستا شدند، محیط کشت جدید به آن‌ها اضافه گردید. این کار تا زمانی انجام شد که تعداد انگل به میزان مورد نیاز برسد. برای شمارش تعداد انگل از لام نئوبار استفاده شد که مقطع آن در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است

تصویر ۱: نحوه بهره برداری شیر از درخت بنه



با توجه به اینکه گیاه بنه از جمله گیاهان بومی منطقه کردستان است و سابقه زیادی در طب سنتی این منطقه دارد و اثرات ضد میکروبی آن در متون علمی مختلف مورد تأیید قرار گرفته است، لذا به همین منظور در این مطالعه اثر ضد لیثمانیایی آلفاپاین، عصاره‌ی گیاهی بنه (*Pistacia atlantica*) در شرایط برون تنی و همچنین در موش حساس آزمایشگاهی BALB/c مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه و استخراج عصاره‌های گیاهی

با پایان بارش‌های بهاره و رسیدن دما به حداکثر میزان خود در منطقه رشته کوه‌های زاگرس (بین اواسط خرداد تا اوایل تیرماه) کار بهره‌برداری شیره سقز از درختان بنه آغاز می‌شود چون در این زمان درخت در حال رشد است و شیره سقز از آن تراوش می‌کند (تصویر ۱). شیره را به شرکت سقز سازی انتقال داده سپس همراه با آب در دیگ‌های جوش به نقطه‌ی جوش رسانیده و بعد از به جوش آمدن، بخارات حاصله توسط دستگاه تقطیر در مخزنی مدرج ذخیره می‌شوند. در این مخزن دو فاز جدا از هم تشکیل می‌گردد که شامل آب و آلفا پاین است. آب به علت سنگین بودن در زیر قرار می‌گیرد سپس توسط شیر تخلیه خارج می‌گردد، در نهایت آنچه در مخزن باقی می‌ماند عصاره‌ی گیاه بنه یا همان آلفا پاین خواهد بود. به این عصاره به این علت آلفا پاین گفته می‌شود چون بعد از GC-MS گرفته شده از عصاره، بیش از ۹۷٪ آن را آلفاپاین تشکیل می‌دهد. آلفاپاین عصاره‌ای روغنی و هیدروفوبیک است.

تهیه و کشت انگل

این مطالعه به روش تجربی (Experimental) بر روی انگل لیثمانیا مائزور سویه استاندارد با کد شناسایی

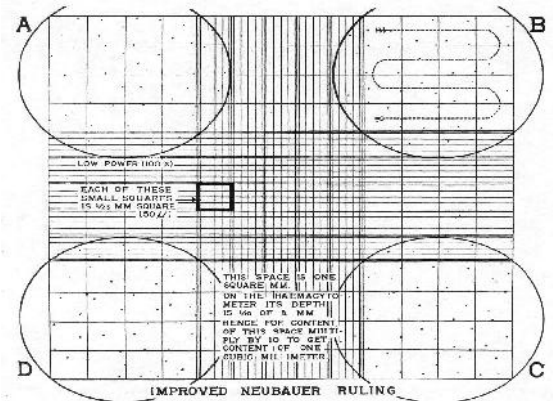
شدن می‌باشند و جذب نوری محلول رنگی حاصل، می‌تواند با استفاده از روش الایزا به طور کمی مورد بررسی قرار گیرد. کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی به صورت تریپلیکیت انجام شد و نتایج با دستگاه الایزا ریدر شرکت Biotek مدل Synergy HTX قرائت شد (۱۰ و ۶)

به میزان 2×10^6 لاندای MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و چاهک‌ها در محیط تاریک به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت به میزان ۱۰۰ لاندای DMSO به منظور حل کردن مواد درون چاهک ریخته شده و پیتینگ انجام شد. در پایان، جذب نوری حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد. سپس میزان IC50 (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰٪ ارگانسیم می‌شود) نیز محاسبه شد.

جامعه مورد مطالعه

با توجه به مطالعات مشابه، در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و گروه آزمون به‌طور جداگانه، تعداد ۱۰ موش در هر گروه تعیین گردید. موش‌ها را با تعداد مشخصی از انگل لیشمانیا ماژور سویه ایرانی، آلوده کرده سپس با دوزاژ مشخص از عصاره‌ی آلفا پاپین (گروه آزمون)، داروی استاندارد (گروه کنترل مثبت) و هیچ‌کدام (گروه کنترل منفی) تحت درمان قرار گرفتند، سپس بهبودی زخم ایجاد شده در اثر انگل، بررسی شد.

در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش BALB/c، ۴ تا ۶ هفته‌ای، ماده با وزن متوسط ۲۵ گرم از مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، واقع در مؤسسه تحقیقات انستیتو-پاستور خریداری شده و جهت رفع استرس پس از گذشت یک هفته در خانه حیوانات مرکز بیماری‌های پوست و جدام دانشگاه علوم پزشکی تهران تلقیح انگل انجام شد. جهت آلوده کردن موش‌ها به میزان ۱/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی 2×10^6 پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در فاز ایستا



تصویر ۲: مقطع لام نوبار جهت شمارش پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

پروماستیگوت‌ها در فاز لگاریتمی به میزان ۱۰۰ لاندای (حاوی $10^6 \times 0.5$ پروماستیگوت لیشمانیا ماژور) در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای) کشت داده شدند، سپس به همان میزان غلظت-های افزایش یافته از آلفا پاپین به صورت تری‌پلیت برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای 22°C درجه سانتی‌گراد با پروماستیگوت‌ها مواجهه داده شدند. در هر پلیت به عنوان کنترل منفی به ازای هر تکرار یک چاهک دارای پروماستیگوت و ^۱PBS قرار داده شد، سپس انگل‌ها شمارش و برای محاسبه میزان زنده‌مانی توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش MTT

این آزمون که نوعی آزمون رنگ سنجی محسوب می‌شود و بر پایه‌ی شکسته شدن نمک تترازولیوم MTT (۳-۴ و ۵-دی متیل تترازولیل (۲-۲) و ۵-دی فیل تترازولیوم بروماید) زرد به کریستال‌های فورمازون بنفش توسط سلول‌هایی است که از نظر متابولیسمی فعال هستند. این احیاء سلولی با دخالت کوفاکتور نوکلئوتید پیریدین NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازونی که تشکیل می‌شوند قابل حل

^۱ Phosphate-buffered saline

شروع درمان، طول دوره درمان و اندازه‌گیری مساحت زخم
 زخم‌ها پس از گذشت حدود شش هفته مشهود و درمان از این زمان شروع شد. اندازه زخم‌ها از ابتدای مشهود شدن ثبت گردیدند. مدت زمان درمان سه هفته به طول می‌انجامد. گروه‌ها روزانه با مقداری از پماد که سطح زخم را پوشش دهد تحت درمان قرار گرفتند (۱۱).

در مورد گروه کنترل مثبت نیز با تزریق روزانه‌ی گلوکانتیم (بر اساس دوز استاندارد دارو) در اطراف زخم، به صورت زیر جلدی (SC) درمان صورت گرفت.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها جهت مقایسه میانگین اندازه زخم در مدت سه هفته در گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه^۲ استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دوجه‌دو بین گروه‌های مختلف از آزمون T-test استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد و سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج برون تنی (*In vitro*) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، درصد انگل‌های زنده با استفاده از روش MTT نشان داد که در حضور غلظت‌های ۵- ۲/۵- ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ درصد عصاره‌ی آلفا پائین تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد که این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است ($P < 0/05$). مقایسه اثر ضد لیشمانیایی غلظت‌های مختلف آلفا پائین نشان داد که با افزایش غلظت، موجب مهار رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور گردیده است (نمودار ۱).

(Stationary) به‌وسیله سرنگ انسولین به قاعده دم موش-ها و به صورت زیر جلدی تلقیح شد. پس از گذشت حدود ۴ هفته از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل تزریق پدید آمد که پس از حدود ۲ هفته به زخم مبدل شد. سپس به خانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه کردستان منتقل شدند.

تهیه پماد عصاره آلفا پائین پمادهای ۱۵ و ۳۰ درصد مربوط به این عصاره بر پایه وازلین-اوسرین تهیه گردید. جهت آماده‌سازی پماد ۱۵ درصد، به میزان ۱۵ میلی لیتر عصاره حاصله با ۸۵ میلی لیتر از ترکیب وازلین و اوسرین (به ترتیب به نسبت ۵۰ و ۳۵ میلی‌لیتر) مخلوط گردید. پماد ۳۰ درصد نیز با ترکیب ۳۰ میلی‌لیتر عصاره و ۷۰ میلی‌لیتر از ترکیب وازلین و اوسرین (به ترتیب به نسبت ۵۰ و ۲۰ میلی‌لیتر) مخلوط گردید.

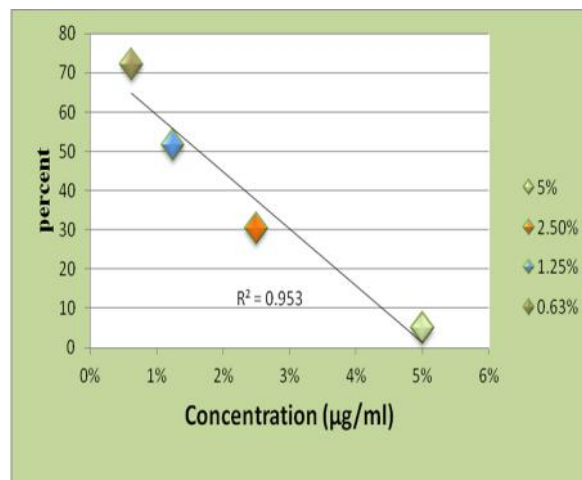
اندازه‌گیری زخم جهت بررسی زخم هر هفته با استفاده از دوربین دیجیتال از زخم عکس گرفته شد و مساحت زخم با استفاده از نرم افزار اتوکلد از روی تصاویر حاصل از زخم برآورد گردید (۱۱). تصویر شماره ۳ زخم ایجادشده در موش آلوده به لیشمانیا ماژور و نحوه اندازه‌گیری زخم نشان داده شده است.



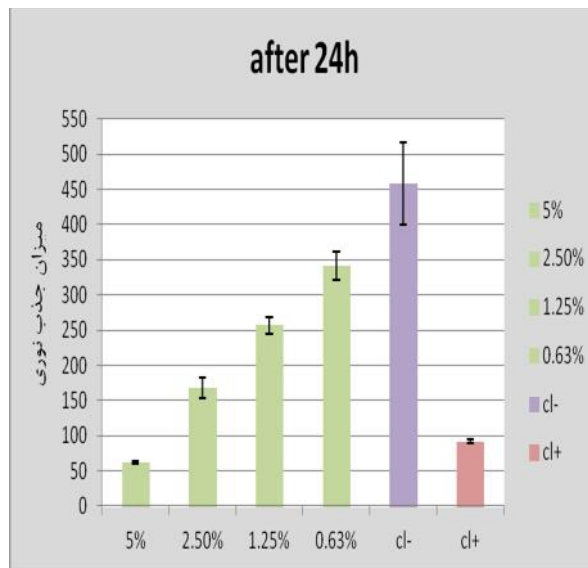
تصویر ۳: زخم ایجاد شده در موش آلوده به لیشمانیا ماژور و نحوه اندازه‌گیری زخم

میانگین جذب نوری در گروه‌های دارو و کنترل را به ترتیب بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد.

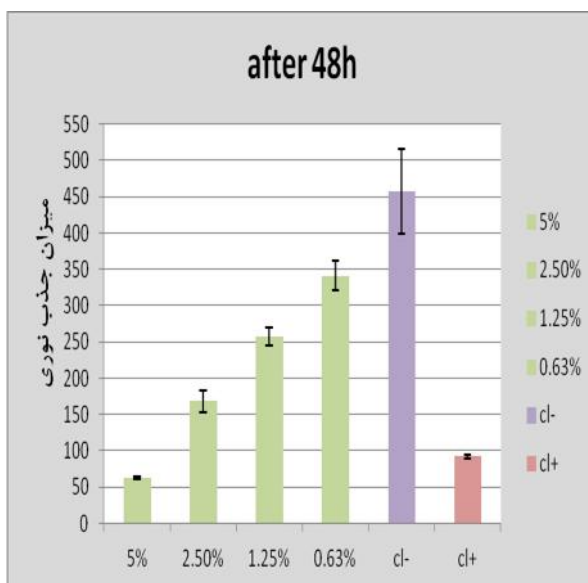
در نمودار شماره ۲، مقایسه میانگین جذب نوری آلفا پائین و گروه کنترل مثبت (گلوکانتیم) و منفی بعد از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره میزان جذب نوری کاهش می‌یابد. همچنین نمودار شماره ۳ و ۴،



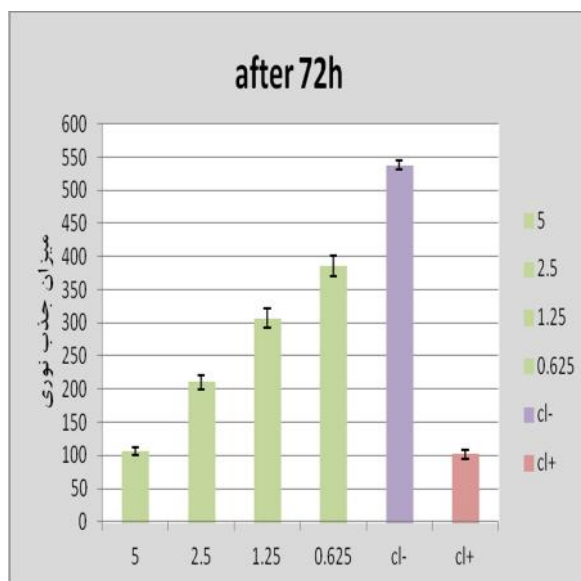
نمودار ۱. درصد زنده مانی پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور با غلظت‌های مختلف عصاره آلفا پائین در شرایط برون تنی بعد از ۴۸ ساعت



نمودار (۲). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف آلفا پائین، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و گروه کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۲۴ ساعت



نمودار (۳). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف آلفا پاینن، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۴۸ ساعت



نمودار (۴). مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف آلفا پاینن، گلوکانتیم (کنترل مثبت) و کنترل منفی در شرایط برون تنی بعد از ۷۲ ساعت

با توجه به نمودارهای بالا این نتیجه به دست می آید که با پروماستیگوت های لیشمانیا در حضور عصاره آلفا پاینن به گذشت زمان تغییر معنی داری در میزان مهار رشد وجود نمی آید.

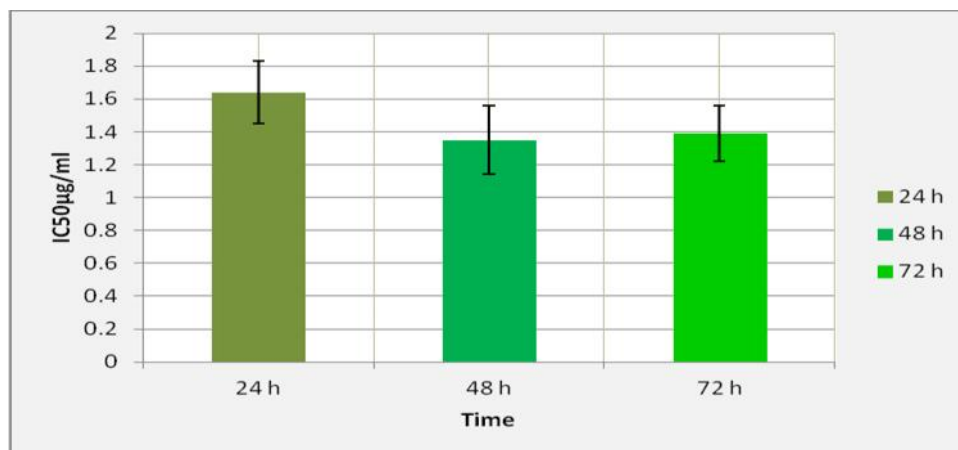
میزان IC50 عصاره آلفا پاین و گلوکانتیم (کنترل مثبت) در زمان‌های مختلف، مورد بررسی قرار گرفت و با توجه اینکه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، در نهایت IC50 میانگین محاسبه شد (جدول ۱).

جدول (۱) مقایسه میزان IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای آلفا پاین و گلوکانتیم

	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲
آلفا پاین	۱/۶۴	۱/۳۵	۱/۳۹
گلوکانتیم	۱۲	۹	۹

میانگین IC50 برای آلفا پاین = $1/46 \mu\text{g/ml}$

میانگین IC50 برای گلوکانتیم = $10 \mu\text{g/ml}$



نمودار (۵). مقایسه میزان IC50 عصاره آلفا پاین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

نتایج درون تنی (*In vivo*)

میانگین مساحت زخم در گروه‌های تیمار و کنترل در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. در تمامی گروه‌های گلوکانتیم، تیمار و کنترل منفی میانگین مساحت زخم هفته-های اول، دوم و سوم پس از شروع درمان اندازه‌گیری شد. حداقل اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های تیمار شده با غلظت-های مختلف آلفا پاین و گلوکانتیم با استفاده از تست MTT نشان می‌دهد که هر دو گروه تیمار نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معنی‌داری دارند. در گروه‌های تیمار آلفا پاین نیز با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رشد پروماستیگوت‌ها افزایش یافت.

جدول (۲). مقادیر میانگین و انحراف معیار مساحت زخم ناشی از لیثمانیا ماژور در گروه‌های تیمار و کنترل بر حسب میلی‌متر مربع

زمان (هفته)	گلوکانتیم	آلفا پاین ۱۵ درصد	آلفا پاین ۳۰ درصد	کنترل منفی
۰	۲/۲۱±۱/۲۶	۲/۸۳±۲/۴۴	۱/۳۴±۱/۳۷	۲/۱۳±۰/۴۷
۱	۲/۶۰±۱/۵۷	۳/۱۴±۲/۳۳	۰/۷۳±۰/۴۱	۲/۸۰±۰/۵۲
۲	۳/۴۴±۲/۱۵	۲/۸۲±۱/۷۱	۰/۵۷±۰/۳۹	۳/۵۰±۰/۷۵
۳	۳/۵۲±۰/۶۸	۲/۵۵±۱/۳۱	۰/۲۷±۰/۲۳	۴/۲۷±۱/۰۷

معنی دار با هم می‌باشند)، اما گروه آلفا پاین ۳۰ درصد با گروه‌های آلفا پاین ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌دار در پایان هفته سوم است.

جدول (۳)، نشان می‌دهد که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های آلفا پاین ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی مشاهده نشد (حروف مختلف دارای اختلاف

جدول (۳): اختلاف آماری بین گروه‌های مختلف در پایان هفته سوم در اندازه مساحت زخم بر حسب میلی‌متر مربع ناشی از لیثمانیا ماژور.

گلوکانتیم	آلفا پاین ۳۰ درصد	آلفا پاین ۱۵ درصد	کنترل منفی
۲/۹۴±۱/۴۱	۰/۷۳±۰/۶۰	۲/۸۳±۱/۴۱	۳/۱۷±۰/۷۰
A	B	A	A

دارویی این ترکیبات گزارش گردیده است که موجب شده کارایی درمانی آن‌ها زیر سؤال رود (۲)، بنابراین استفاده از ترکیبات و فرآورده‌های گیاهی که در دسترس و کم هزینه بوده و همچنین دارای اثرات جانبی کمتری می‌باشند به عنوان استراتژی درمانی نوین، به‌ویژه در مناطق بومی ضرورت دارد (۱۴).

در مطالعه حاضر، نتایج اثر ضد لیثمانیایی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آلفا پاین و داروی کنترل (گلوکانتیم) در شرایط برون تنی و درون تنی بررسی شد. برای تعیین اثرات عصاره بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور و مقایسه

بحث

لیثمانیوز جلدی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم و اندمیک در برخی از کشورهای مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران به حساب می‌آید. این بیماری در مهر و موم‌های اخیر در برخی استان‌های ایران روند افزایشی به خود گرفته است (۱۲ و ۱۳). درمان معمول لیثمانیوزها استفاده از ترکیبات آنتی‌موان پنج ظرفیتی است که این داروها گران، کمیاب و دارای عوارض جانبی شدید می‌باشند، علاوه بر این درمان با آن‌ها زمان بر بوده و همچنین در مهر و موم‌های اخیر موارد متعددی از مقاومت

آن با دارو از روش رنگ سنجی MTT، استفاده شد که نتایج نشان داد، با افزایش غلظت، موجب افزایش مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور می گردد و کاهش جذب نوری بیانگر این اثر مهاری است. در ایران در مطالعات متعددی از این روش رنگ سنجی جهت بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره های گیاهی، به دلیل فوایدی از جمله سادگی، سهولت، تکرار پذیری، ارزانی، ایمن و قابل اطمینان بودن، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶).

همچنین در مقایسه میانگین جذب نوری بین داروی کنترل و عصاره مورد بررسی، اختلاف آماری معنی داری مشاهده شد؛ اما با گذشت زمان، از نظر آماری اختلاف معنی داری در میزان مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا در حضور عصاره آلفا پائین وجود نداشت.

میزان IC50 مربوط به عصاره آلفا پائین $1/46 \mu\text{g/ml}$ و گلوکانتیم $10 \mu\text{g/ml}$ محاسبه گردید که نشان می دهد عصاره آلفا پائین در مقایسه با داروی کنترل گلوکانتیم دارای تأثیر مناسبی در مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی است.

در سال های اخیر خواص بیولوژیکی متعددی برای آلفا پائین (پیستاسیا آتلانتیکا) گزارش گردیده است. در مطالعات مختلفی خاصیت ضد میکروبی (۱۶) و همچنین اثر ضد قارچی (۱۷) آن مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه دیگری تأثیر ضد انگلی عصاره میوه و برگ آن بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک بررسی گردیده است (۱۸).

اخیراً فعالیت ضد لیشمانیایی آلفا پائین در شرایط برون تنی بر روی لیشمانیا آمازوننسیس (*L. amazonensis*) بررسی شده است. این مطالعه نشان می دهد که آلفا پائین ترکیب فعال بیولوژیکی بر علیه هر دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا آمازوننسیس در شرایط آزمایشگاهی است (۱۹).

در زمینه ارزیابی خواص دارویی و سمیت فرآورده ها و ترکیبات جدید دو دیدگاه وجود دارد عده های اعتقاد به کاهش استفاده از حیوانات در شرایط آزمایشگاهی را دارند که این امر، باعث گسترش روش های برون تنی گردیده است (۱۲). در یک روش، از پروماستیگوت ها جهت بررسی تأثیر مواد ضد لیشمانیایی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می گردد.

در این زمینه براتی و همکاران اثر ضد لیشمانیایی عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد را در مقایسه با داروی کنترل مورد بررسی قرار دادند به طوری که عصاره ها و داروی کنترل تأثیر مناسبی بر مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور نشان دادند (۶). همچنین در مطالعه ای دیگری عصاره های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه، رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی را مهار کردند (۱۴).

اما به توجه به اینکه فرم آماستیگوت انگل در بدن میزبان حضور داشته و مسئول ایجاد علائم بالینی لیشمانیوز است بنابراین به نظر می رسد که استفاده از مدل های آزمایشگاهی با فرم آماستیگوت دارای اهمیت بسزایی باشد. بدین منظور محیط های کشت اگزینیک آماستیگوت (*Axenic amastigote*) تولید شده اند تا در مطالعات غربالگری ترکیبات جدید ضد لیشمانیایی بر روی این فرم انگل مورد استفاده قرار گیرند (۲۰ و ۱۵ و ۱۲). همچنین محیط های اگزینیک جهت شناخت مکانیزم های تمایز، بقا و بیماری زایی انگل به منظور توسعه و شناسایی اهداف مولکولی و شیمی درمانی دارای اهمیت می باشند (۲۱).

دیدگاه دوم بر این عقیده است که مدل های حاوی فرم داخل سلولی انگل یکی از بهترین روش ها برای ارتباط دادن فعالیت برون تنی یک دارو با اثربخشی آن در شرایط درون تنی است (۱۲)، بنابراین استفاده از حیوان آزمایشگاهی را جهت انجام مطالعات ضد لیشمانیایی توصیه می کنند.

لیشمانیا مازور است (۱۱) که این نتایج با یافته های مطالعه حاضر همخوانی دارد.

امروزه توسعه و گسترش داروهای مؤثر، ایمن و قابل استعمال موضعی برای درمان لیشمانیوز یک امر ضروری به نظر می رسد. با توجه به اینکه داروی گلوکانتیم که به صورت تزریقی استفاده می شود دارای عوارض دارویی بوده در حالی که عصاره آلفا پائین عوارض جانبی کمتری داشته و علاوه بر این به صورت پماد جلدی مورد استفاده قرار می گیرد و اثرات درمانی بهتری نیز نشان داد، بنابراین می تواند جایگزین مناسبی برای درمان لیشمانیوز جلدی باشد.

نتیجه گیری

بر پایه ی نتایج این مطالعه می توانیم نتیجه بگیریم که استفاده از عصاره آلفا پائین درخت بنه (*pistica atlantica*) در شرایط برون تنی (*In vitro*) سبب مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا مازور می شود، به نحوی که با افزایش غلظت، میزان مهار آلفا پائین افزایش یافت. همچنین در شرایط درون تنی (*In vivo*) پماد ۳۰ درصد آلفا پائین نیز زخم را محدود کرده و سبب بهبودی سریع تر می گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی آجا و همکاری دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام گردید. بدین وسیله نویسندگان از دکتر عباس احمدی و دکتر پیمان توکلی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

Reference

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-18.
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* 2017; 6: 750.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم / آذر و دی ۱۳۹۷

در مطالعه حاضر مدل درون تنی نیز با استفاده از موش حساس آزمایشگاهی BALB/c جهت بررسی اثرات درمانی عصاره آلفا پائین مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از آلوده کردن موش ها و ایجاد زخم لیشمانیایی از پماد های حاوی ۱۵ درصد و ۳۰ درصد آلفا پائین در گروه های مداخله استفاده شد و در گروه کنترل نیز از تزریق داروی گلوکانتیم جهت درمان استفاده گردید. نتایج نشان داد که اختلاف آماری معنی داری بین گروه های آلفا پائین ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی مشاهده نشد و عملاً تأثیر درمانی آن چنانی نداشتند اما گروه آلفا پائین ۳۰ درصد با گروه های آلفا پائین ۱۵ درصد، گلوکانتیم و کنترل منفی اختلاف معنی دار در پایان هفته سوم نشان داد؛ بنابراین پماد حاوی عصاره ۳۰ درصد در مقایسه با پماد ۱۵ درصد این عصاره و نیز داروی گلوکانتیم زخم ناشی از لیشمانیا را محدود کرده و سبب بهبودی سریع تر زخم گردید.

در راستای یافته های این پژوهش، در یک مطالعه اثر ضد لیشمانیایی صمغ به دست آمده از پیستاسیا آتلانتیکا بررسی شد که در آن مطالعه ثابت گردید صمغ مربوطه، لیشمانیوز جلدی در موش های آلوده به لیشمانیا مازور را کنترل کرده و قادر به کاهش اندازه زخم در آن ها است (۲۲).

در مطالعه دیگری اثر ضد لیشمانیایی عصاره الکلی پیستاسیا کینجاک (*P. khinjuk*) بر روی لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا مازور انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره تأثیر چشمگیری بر روی فرم های پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا تروپیکا داشته و در شرایط درون تنی نیز در موش های (BALB/c) آلوده که با غلظت ۳۰٪ عصاره تیمار شده بودند، اثر مهاری مناسبی داشته در حالی که در غلظت ۲۰٪ دارای تأثیر متوسطی در مهار رشد انگل

3. Pakzad R, Dabbagh-Moghaddam A, Mohebali M, Safiri S, Barati M. Spatio-temporal analysis of cutaneous leishmaniasis using geographic information system among Iranian Army Units and its comparison with the general population of Iran during 2005-2014. *J Parasit Dis* 2017; 41: 1114-22.
4. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2015;16: 99-109.
5. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12: 514-35.
6. Barati M, Sharifi I, Sharififar F. In vitro evaluation of anti-leishmanial activities of *Zataria Multiflora* Boiss, *Peganum Harmala* and *Myrtus Communis* by colorimetric assay. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2010; 17: 32-41.
7. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 2005; 66: 2056-71.
8. Hatamnia AA, Abbaspour N, Darvishzadeh R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of *Bene* (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chem* 2014; 15; 145: 306-11.
9. Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharmacol* 2008; 2: 22-8.
10. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127-52.
11. Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M, Ezzatkah 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.
12. De Muylder G, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1253.
13. Pouresmaelian S, Sharifi I, Aflatoonian M, Fotouhi Ardakan R, Mirzaee M, Barati M. A new focus of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Dehbakry region of Bam district, southeastern Iran 2008. *JKMU* 2010; 7: 15-24.
14. 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. *Anti Infect Agents* 2014; 12: 159-64.
15. Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 972-6.
16. Ali Roozegar M, Azizi Jalilian F, Reza Havasian M, Panahi J, Pakzad I. Antimicrobial effect of *Pistacia atlantica* leaf extract. *Bioinformation* 2016; 12: 19-21.
17. Shialy Z, Zarrin M, Nejad BS, Naanaie SY. In vitro antifungal properties of *Pistacia atlantica* and olive extracts on different fungal species. *Curr Med Mycol* 2015; 1: 40-5.
18. Zibaei M, Rostampour R, Nayebzadeh H. Effect of *Pistacia atlantica* Fruit and Leaf Extracts on Hydatid Cyst Protoscolices. *Recent Pat Anti Infect Drug* 2016; 11: 53-8.
19. Rodrigues KA, Amorim LV, Dias CN, Moraes DF, Carneiro SM, Carvalho FA. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol* 2015; 160: 32-40.

20. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, Nosratabadi J, et al. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitol Res* 2012; 110: 1113-7.
21. Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol* 2001;17: 150-3.
22. Taran M, Mohebalı M, Esmaeli J. In vivo efficacy of gum obtained *Pistacia atlantica* in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Public Health* 2010; 39: 36-41.