

بررسی اثر درمانی داروی گیاهی فنکون (Fenchone) بر روی لیشمانیا ماژور در مدل برون‌تنی

سارا آسایش^۱، سیدرضا حسینی^{۱*}، ایرج شریفی^۲، باقر امیرحیدری^۳

^۱ گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

کلمات کلیدی

فنکون

گلوکانتیم

فعالیت ضدلیشمانیایی

پروماستیگوت

آماستیگوت

چکیده

مقدمه و هدف: لیشمانیازیس یکی از بیماری‌های انگلی است که به‌طور گسترده در جهان گسترش یافته است. لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا باعث بروز لیشمانیوز جلدی می‌شوند. از نظر بالینی، ضایعات ناشی از لیشمانیا ماژور بیش‌تر طول می‌کشند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدلیشمانیایی و اثرات یک عصاره گیاهی بر مراحل مختلف لیشمانیا ماژور طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: غلظت‌های مختلف عصاره فنکون در برابر لیشمانیا ماژور با استفاده از روش تست سمیت‌سنجی یا روش انجام آزمایش تعیین میزان سمیت داروها بر روی ماکروفاژ مورد استفاده قرار گرفتند و غلظت بازدارنده (IC₅₀) با شمارش انگل‌ها محاسبه شد. برای آماستیگوت‌های درون ماکروفاژ، فعالیت ضدلیشمانیایی به‌وسیله شمارش میانگین تعداد آماستیگوت‌ها و مقدار IC₅₀ مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب نوری توسط الیزا برای تعیین مقادیر IC₅₀ برای پروماستیگوت‌ها اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که عصاره فنکون باعث کاهش میزان تکثیر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها می‌شود ($P < 0.001$). میانگین مقادیر IC₅₀ آماستیگوت‌ها برای فنکون برابر با ۸۲ در مقابل ۱۷۵/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی گلوکانتیم بود. هم‌چنین میانگین مقادیر IC₅₀ پروماستیگوت‌ها برای فنکون برابر با ۱۸۰ در مقابل ۶۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی گلوکانتیم بود. میزان شاخص انتخابی برای فنکون ۹/۶ بود در حالی که این مقدار برای داروی گلوکانتیم برابر با ۸/۲۴ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ارگانسیم نسبت به داروی کنترل مقاومت نسبی پیدا کرده و عصاره فنکون مانع توسعه پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها شده و هم‌چنین سمیت کم‌تری نسبت به داروی استاندارد گلوکانتیم دارد.

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در علم پزشکی و به‌ویژه در کنترل بیماری‌های عفونی حاصل شده است، هنوز هم برخی از بیماری‌های عفونی به‌عنوان یکی از معضلات بهداشتی در نظر گرفته می‌شوند (۱). سازمان جهانی بهداشت به‌دلیل اهمیت بهداشتی، این بیماری را در ردیف ۶ بیماری حائز اهمیت در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری معرفی نموده است (۲ و ۳). عامل بیماری لیشمانیوز یک انگل تک یاخته‌ای داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا است. این انگل بر حسب محیط زندگی خود به دو شکل بدون تاژک (آماستیگوت) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود. شکل بدون تاژک این انگل در بدن مهره‌داران و در سلول‌های تک هسته‌ای بیگانه‌خوار رشد و تکثیر می‌یابد، اما نوع دارای تاژک آزاد، در بدن پشه‌خاکی و محیط‌های کشت مصنوعی یافت می‌شود (۴). بیش از ۲۰ گونه لیشمانیا برای انسان بیماری‌زا بوده و حدود ۳۰ گونه پشه‌خاکی ناقل آن می‌باشند. لیشمانیوز در شمار بیماری‌های مشترک انسان و حیوان قرار دارد و به ۳ فرم لیشمانیوز پوستی، احشایی و پوستی-مخاطی بروز می‌کند. شایع‌ترین فرم پوستی به ۲ صورت خشک یا شهری و مرطوب یا روستایی مشاهده می‌شود که عامل آن‌ها به‌ترتیب لیشمانیا تروپیکا^۱ و لیشمانیا مائور^۲ می‌باشند (۵). گستردگی این بیماری در تمام قاره‌های جهان به‌جز استرالیا مشهود است. طبق اطلاعات سازمان جهانی بهداشت، ۱۲ میلیون نفر در جهان به انواع مختلف لیشمانیوز مبتلا بوده و جمعیتی در حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلاء به این بیماری قرار دارند (۶). سالیانه ۲-۱/۵ میلیون نفر به این انگل مبتلا شده که حدود ۵۰۰ هزار مورد از آن مربوط به لیشمانیوز احشایی و بقیه موارد لیشمانیوز پوستی و پوستی-مخاطی است (۷). در میان این کشورها ایران و عربستان سعودی بیش‌ترین میزان شیوع بیماری مذکور را دارا می‌باشند (۸). در ایران لیشمانیوز پوستی از بیماری‌های مهم انگلی بوده و می‌توان گفت بعد از مالاریا مهم‌ترین بیماری منتقله توسط بندپایان است. در مناطق اندمیک به‌طور معمول کودکان بیش‌تر به این بیماری گرفتار می‌شوند، ولی در مناطق غیراندمیک در سنین مختلف مشاهده می‌شود (۹). بهترین روش مقابله با لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا تروپیکا، تشخیص سریع و درمان به‌موقع است. از آن جایی که لیشمانیوز جلدی یکی از اولویت‌های بهداشتی و پژوهشی سازمان جهانی بهداشت به‌خصوص در ارتباط با کشورهای در حال توسعه است، لذا در ایران نیز مورد توجه قرار گرفته است و در برنامه‌های پژوهشی متعددی و در جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد. کانون‌های لیشمانیای جلدی شهری در ایران، استان‌های تهران، خراسان،

فارس و کرمان (به‌خصوص کانون اصلی در بم) دیده می‌شود. در استان کرمان لیشمانیا تروپیکا غالب است و بهترین روش کنترل آن تشخیص فوری و درمان است. لیشمانیوزیس هنوز یک مشکل بهداشتی مناطق اندمیک نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران است. کنترل عفونت‌های لیشمانیوز شکل آنتروپونتیک که راه انتقال انسان به ناقل و دوباره انسان می‌باشد اساساً بر درمان شیمیایی متکی است. درمان استاندارد لیشمانیوز با استفاده از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان که داروی خط‌اول درمان این بیماری در طی ۷۵ سال گذشته می‌باشد، صورت گرفته است. با این وجود اکثر این داروها دارای اثرات سمی و جانبی زیادی بوده و در عین حال گران و دارای دوره درمان طولانی هستند (۱۰ و ۱۱). با توجه به این که مصرف داروهای صنعتی با عوارض جانبی زیادی همراه است، توجه به اهمیت گیاهان دارویی و تولید داروهایی از آن‌ها برای درمان بیماری‌ها پیوسته تاکید می‌شود. این گیاهان با داشتن ساختمان گسترده شامل سلول‌ها، پروتئین، قند، آنزیم و چربی دارای خاصیت درمانی بر روی انسان به‌دلیل مواد فعال درون خود می‌باشند. از این‌رو نیاز به استفاده از ترکیبات و داروهای ضدلیشمانیایی موثر، با سمیت کم، کم هزینه و هم‌چنین با قابلیت تجویز به صورت خوراکی بیش از پیش احساس می‌شود (۱۲). در همین راستا با توجه به تنوع گسترده آب و هوایی و گیاهی ایران، استفاده از گیاهان فلور طبیعی هر منطقه به‌عنوان منبع غنی عوامل دارویی ضدلیشمانیایی ضروری می‌باشد (۱۳). هم‌چنین درمان با یک دارو (مونوتراپی) معمولاً بر علیه لیشمانیا تروپیکا موثر نیست، لذا ضرورت استفاده از گلوکانتیم همراه با داروهای دیگر ضرورت می‌یابد. امروزه از تجویز یک دارو با دوز بالا به‌عنوان درمان، بهتر است که کم‌تر استفاده شود و سعی شود از چند دارو با دوزهای پایین‌تر استفاده شود تا از اثرات جانبی احتمالی داروها کاسته شود. استفاده تنها از گلوکانتیم می‌تواند بسیار موثر باشد، حتی علی‌رغم مقاومت‌های دارویی گزارش شده ولی استفاده از گلوکانتیم چون با تزریق دردناک توام است و نیز زمان طولانی باید استفاده شود، سیر درمان را طولانی و ناخوشایند می‌کند. بدین ترتیب با استفاده توام از دو دارو با مکانیزم اثرات متفاوت احتمال اثربخشی بر روی کنترل انگل در دوزهای کم‌تر دارو را فراهم می‌آورد. استفاده از داروهای گیاهی می‌تواند زمینه مناسب علمی جهت دستیابی به درمانی مناسب را به‌صورت برون‌تنی فراهم نماید تا در مراحل بعدی با انتخاب دوز مناسب در انسان بتوان نسبت به کنترل بیماری اقدام نمود (۱۴ و ۱۵). این مطالعه با هدف ارزیابی فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره فنکون بر روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکا در شرایط برون‌تنی و در جهت تولید دارویی گیاهی با اثرات سمی کم در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد.

^۱L. major^۲L. tropica

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی انگل لیثمانیا مازور سویه استاندارد:
انگل لیثمانیا مازور سویه استاندارد (MRHO/IR/75/ER) که از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بود، از فریزر خارج گردید و در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طی ۲-۳ روز بعد، هر روز محیط حاوی انگل را به مدت ۴۵-۲۰ دقیقه شیکر کرده و با میکروسکوپ معکوس به بررسی رشد انگل پرداخته شد. هر روز با لام نئوبار تعداد انگل شمارش گردید به این ترتیب که ۱۰۰ لانداز محیط حاوی انگل برداشته و با ۱۰۰ لانداز رنگ تریپان بلو مخلوط کرده، یک قطره برداشته و با لام نئوبار به شمارش آن در یکی از خانه‌های شانزده تایی پرداخته شد و با استفاده از فرمول زیر تعداد تقریبی انگل در هر میلی‌لیتر محاسبه شد:

= تعداد انگل در هر میلی‌لیتر
عکس ضریب رقت در تعداد انگل شمارش شده در خانه‌های شانزده تایی $\times 10^4$

تهیه و آماده‌سازی سلول‌های ماکروفاژ: سلول‌های ماکروفاژ را در محیط کشت دی ام دی ام محتوی ۱۵-۱۰٪ بافر فسفات سالیین و ۱/۵-۱٪ پنی‌سیلین استرپتومایسین در فلاسک‌های ۵۰ سی‌سی ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه که همراه با ۵٪ دی‌اکسیدکربن است، قرار داده شد. هر روز یا یک روز در میان محیط کشت رویی را با محیط کشت جدید عوض کرده و بعد از چند روز سطحی که همیشه بر روی صفحه انکوباتور قرار دارد، مملو از ماکروفاژهای چسبیده به سطح خواهد بود. وقتی تمام سطح فلاسک از ماکروفاژهای چسبیده انباشته شد، در زیر هود با تیغه اسکرچر و یا نوک سمپلر ماکروفاژهایی که به جدار داخلی فلاسک چسبیده‌اند را جدا کرده به‌طوری‌که جدار فلاسک شفاف گردیده که حاکی از کنده شدن ماکروفاژها می‌باشد. کمی محیط کامل داخل فلاسک ریخته و شستشو داده شد تا تمام ماکروفاژهای کنده شده داخل مایع قرار گیرند، سپس محلول داخل فلاسک به لوله فالکون منتقل گردید و با ۴۵۰۰-۱۱۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و لوله به آرامی تکان داده شد تا سلول‌ها از ته لوله کنده شوند. حجم لوله با محیط کامل به ۱ سی‌سی رسید و خوب مخلوط گردید و به شمارش ماکروفاژها پرداخته شد. می‌توان درصد سلول‌های زنده و نیز میزان سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از طریق فرمولی که در تهیه و آماده‌سازی انگل‌ها توضیح داده شد، محاسبه گردید. درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۸٪ محاسبه گردید که قابل قبول جهت شروع آزمایش است. تعداد لازم جهت شروع آزمایش ۵۰۰۰۰۰ تا ۱ میلیون در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

رقت‌سازی داروها

گلوکانتیم (Sanofi-Aventis): از آمپول ۱/۵ گرم ماده موثره در ۵ سی‌سی استفاده شد و برای تهیه غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ابتدا مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از این آمپول با آب مقطر به حجم ۶ سی‌سی رسانده شد و به این ترتیب به این غلظت دست پیدا کردیم. جهت به‌دست آوردن غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از آن با سریال دایلوژن این غلظت، سایر غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ ساخته شد.

فنگون (Sigma-Aldrich): برای تهیه رقت‌های داروی مورد استفاده در این بررسی، ابتدا مقدار ۲۰۰۰ میکروگرم از این دارو را در ۱ سی‌سی آب مقطر حل کرده که غلظت میکروگرم در هر میلی‌لیتر ۲۰۰۰ می‌باشد و بعد ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت ۲۰۰۰ به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد و سپس با درست کردن سریال دایلوژن از این غلظت، غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ و ۲۵ و ۱۲/۵ تهیه گردید.

سنجش مهار آماستیگوت: ابتدا ۱۰ هزار ماکروفاژهای موشی J774A-1 را پس از شمارش داخل پلیت ریخته و بعد پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس پروماستیگوت‌های شمارش شده که در فاز ثابت رشد بودند، به میزان ۱۰ برابر تعداد ماکروفاژها یعنی ۱۰۰ هزار انگل در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به لام‌های پلیت دوم به بعد اضافه شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه برگردانده شدند و بعد از طی زمان مورد نظر پروماستیگوت‌های متاسیکلیک وارد سلول‌های ماکروفاژ شده بودند. در این مرحله و پس از طی زمان ۲۴ ساعته انکوبه، در زیر هود و در کنار شعله و در شرایط استریل، به ترتیب رقت‌های دارویی تهیه شده به لام‌ها اضافه شدند. در این مرحله پلیت اول به‌عنوان شاهد منفی، یعنی محیط حاوی ماکروفاژ و بدون انگل و دارو و پلیت دوم به‌عنوان شاهد مثبت، یعنی محیط حاوی ماکروفاژ و انگل و بدون دارو، در نظر گرفته شدند. لازم به‌ذکر است که هر رقت دارویی بر روی سه لام ریخته شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه گردیدند. پس از گذشت زمان ۷۲ ساعته، محتویات لام‌ها را خالی کرده و بعد از این که کاملاً خشک شدند، با متانول فیکس کرده و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت لام‌ها به‌منظور شمارش تعداد ماکروفاژهای آلوده به انگل و تعداد آماستیگوت‌های موجود در هر ماکروفاژ به تعداد ۱۰۰ ماکروفاژ بررسی شدند.

سنجش مهار پروماستیگوت: ابتدا در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پروماستیگوت‌های انگل لیثمانیا مازور که حاوی ۵۰ هزار انگل در فاز ثابت رشد است

نتایج

تأثیر ضدلشمانیایی بر پروماستیگوت خارج سلولی

لشمانیا ماژور: در این مطالعه از غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فنکون و گلوکانتیم استفاده شد که با توجه به نتایج حاصل، مشخص شد که از گذشته تا به امروز از میزان تأثیر گلوکانتیم بر انگل *لشمانیا* کاسته شده و ارگانسیم نسبت به گلوکانتیم کم کم مقاوم شده است. این موضوع در قیاس نتایج تأثیر گلوکانتیم و فنکون بر روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های *لشمانیا* قابل مشاهده است، به طوری که گلوکانتیم با افزایش غلظت و گذشت زمان تغییر محسوسی در میزان انگل ایجاد نکرده است و با افزایش غلظت میزان ثابتی از انگل را کاهش می‌دهد در حالی که فنکون با افزایش غلظت، خصوصاً از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور محسوسی باعث کاهش میزان انگل و افزایش میزان مهار رشد انگل شده است که از لحاظ آماری این اختلاف با گروه کنترل (گلوکانتیم) معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.001$). میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از انگل‌های *لشمانیا ماژور* می‌شود برای فنکون در برابر انگل‌های خارج سلولی، 18.0 ± 2 میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. در حالی که مقدار IC_{50} برای داروی گلوکانتیم به عنوان داروی کنترل $613 \pm 10/9$ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۱ و شکل ۱).

تأثیر ضدلشمانیایی بر آماستیگوت‌های داخل سلولی

لشمانیا ماژور: اثر داروها با میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژ آلوده ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف داروها قادر به مهار قابل توجهی از تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده در مقایسه با شاهد درمان نشده بودند ($P < 0.05$). فنکون نسبت به داروی استاندارد گلوکانتیم به طور قابل توجهی موثرتر ($P \leq 0.001$) بود (جدول ۱). مقدار IC_{50} برای فنکون در برابر انگل‌های داخل سلولی، $82 \pm 1/6$ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. در حالی که مقدار IC_{50} برای داروی گلوکانتیم به عنوان داروی کنترل $175/14 \pm 11/2$ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۲).

سیتوتوکسیستی فنکون در مقایسه با داروی استاندارد

گلوکانتیم: به منظور بررسی سمیت و اثر سیتوتوکسیستی فنکون و گلوکانتیم در این مطالعه، از روش رنگ‌سنجی استفاده شد و نتایج به این صورت بودند که غلظتی از دارو که از رشد ۵۰٪ سلول‌ها جلوگیری می‌کند، برای فنکون برابر است با $789/9 \pm 9/9$ و برای گلوکانتیم 1425 ± 25 بود. با توجه به این نتایج و همچنین میزان IC_{50} یعنی میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از انگل‌های *لشمانیا ماژور* می‌شود، شاخص انتخابی برای فنکون و گلوکانتیم به ترتیب برابر است با $9/6$ و $8/24$ که نشان از سمیت کم‌تر و تأثیر بیش‌تر فنکون بر روی انگل‌های *لشمانیا ماژور* دارد (شکل ۲).

افزاده شد. پس از آن رقت‌های مختلف دو دارو، گلوکانتیم که به عنوان داروی خط اول درمان است و فنکون به ترتیب به خانه‌های دارای انگل افزوده شد. تمامی رقت‌ها به صورت سه تایی ریخته شدند. در سه خانه اول پلیت هیچ انگلی وارد نشد تا به عنوان بلانک تست (کنترل منفی) محسوب گردند و در سه خانه دوم نیز انگل ریخته ولی هیچ دارویی اضافه نشد تا به عنوان شاهد مثبت استفاده شوند. سپس پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگی MTT آماده شده (میزان ۵ میلی‌گرم رنگ در ۱ سی‌سی محلول بافر فسفات سالین) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از گذشت زمان ۴ ساعت پلیت از انکوباتور خارج شد و به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپرانول اضافه گردید تا فورمازان تولید شده به شکل محلول درآید. در نهایت پلیت‌ها برای خوانش در دستگاه الیزا ریدر (Biotek ELx800 U.S.A) قرار داده شد و با طول موج ۴۹۰ نانومتر جذب نوری، چاهک‌ها قرائت گردید.

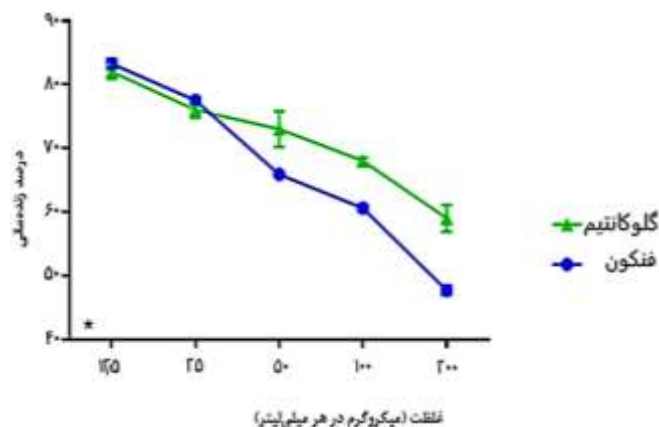
آزمایش بررسی سمیت دارو: سیتوتوکسیسته (یاخته آزاری)

یا اثر سمی دارو بر سلول‌های میزبان به میزان سمیت دارو بر روی ماکروفاژهای موشی گفته می‌شود که باعث جلوگیری از رشد ۵۰٪ از ماکروفاژها می‌شود که هر چه قدر میزان این سمیت کم‌تر باشد، به عنوان داروی بهتری محسوب می‌شود. برای سنجش میزان سمیت دارو پس از کشت و تکثیر ماکروفاژهای موشی، ابتدا در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ۹۰ میکرولیتر ماکروفاژ موشی ریخته و به هر یک از آن‌ها به صورت سه تایی^۳ و به ترتیب غلظت‌های دو دارو (گلوکانتیم و فنکون) به میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. در سه خانه اول پلیت به جای دارو، محیط کشت اضافه گردید و به عنوان کنترل استفاده شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵٪ دی‌اکسیدکربن، به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت مدت ۷۲ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد و در زیر هود و در کنار شعله (شرایط استریل) به آن‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT که قبلاً ساخته شده بود و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ ثانیه آن‌ها خوب شیک شد تا به طور کامل مخلوط شوند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت به درون انکوباتور بازگردانده و نگهداری شد و پس از طی این زمان ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپرانول به آن‌ها افزوده تا فورمازان تولید شده به شکل محلول درآمد و بلافاصله با دستگاه الیزا ریدر ذکر شده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر میزان جذب نوری آن‌ها قرائت گردید.

^۳Triplicate

^۳Optical Density

است، اگرچه لیشمانیوز احشایی مرگ و میر بالاتری دارد، اما لیشمانیوز پوستی شیوع و گستردگی بیش تری دارد (۷). حدود ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز پوستی از ۸ کشور جهان شامل افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه و الجزایر گزارش می‌شوند (۱۶). دو فرم شایع لیشمانیوز پوستی در ایران *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* می‌باشند که در صورت عدم درمان برای یک سال و یا بیش تر طول خواهد کشید. کشف داروی جدید جهت درمان بیماران مبتلا به لیشمانیوز به این جهت می‌باشد که داروهای خط اول درمان این بیماری در مقابل آن دیگر پاسخگو نمی‌باشند و ارگانسیم نسبت به این داروها نسبتاً مقاوم شده‌اند. برای تعیین میزان زنده بودن^۱ آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌های *لیشمانیا تاکنون* چندین روش ابداع و معرفی شده است که شامل شمارش مستقیم سلول‌های زنده، اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و واکنش احیای نمک تترازولیوم است (۱۷). روش‌های رنگ سنجی^۲ که جهت بررسی رشد و زنده بودن ارگانسیم بر روی پلیت انجام می‌شوند، فواید زیادی دارند از جمله این که این روش‌ها علاوه بر سهولت انجام و ارزان بودن، سریع، حساس و قابل اعتماد هستند و هم‌چنین فاقد هرگونه ماده رادیو ایزوتوپ هستند، از این رو ایمن و مطمئن می‌باشند. از طرفی این روش‌ها قابلیت تکرارپذیری دارند که امکان خطا را به حداقل می‌رسانند (۱۱). روش رنگ‌سنجی MTT یک روش کمی اسپکتوفتومتری است که طی آن نمک تترازولیوم به فومارزان غیر محلول احیا می‌شود (۱۲). این روش به صورت وسیعی جهت بررسی رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* به کار می‌رود (۱). براساس نتایج به دست آمده در طی این مطالعه، نشان داده شد که با افزایش غلظت دارو و مدت زمان، اثر مهاری بر روی آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌ها افزایش می‌یابد و تعداد آماستیگوت‌ها و جذب نوری پروماستیگوت‌ها کاهش محسوسی می‌یابند. در این مطالعه ارزیابی و مقایسه میانگین تعداد آماستیگوت‌ها و هم‌چنین میانگین جذب نوری پروماستیگوت‌هایی که در تماس با فنکون بودند، با داروی کنترل اختلاف معنی‌داری دارند و این نشان‌دهنده آن است که عصاره مورد مطالعه باعث کاهش پیشرفت *لیشمانیا ماژور* در بیمار می‌شود. هم‌چنین ارزیابی و مقایسه تعداد آماستیگوت‌ها و جذب نوری پروماستیگوت‌ها در غلظت‌های کم‌تر و بیش‌تر فنکون حاکی از آن است که این دارو از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا دارای تاثیر قابل توجهی نسبت به غلظت‌های کم‌تر است و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها می‌باشد. براساس نتایج حاصل، عصاره فنکون از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا دارای تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی ارگانسیم است و نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری دارد.

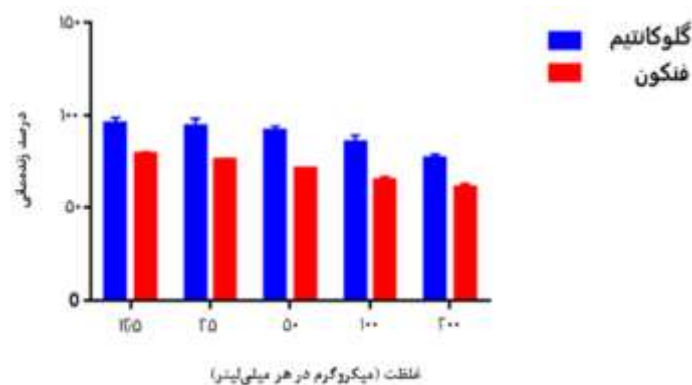


شکل ۱: درصد بازدارندگی فنکون بر روی رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در مقایسه با گلوکانتیم به عنوان داروی کنترل به روش رنگ‌سنجی (MTT)

*: $P < 0.001$ تفاوت قابل توجهی در مقایسه با گروه بدون درمان

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف فنکون و گلوکانتیم بر میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در هر ماکروفاز $\times 100$ به صورت سه تایی با مقدار احتمال یک درصد

غلظت	گلوکانتیم	فنکون
میکروگرم / میلی‌لیتر	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار
۰ (کنترل مثبت)	۳۲ \pm ۱/۲	۲۱/۶ \pm ۰/۷
۱۲/۵	۱۵/۰۴ \pm ۰/۹	۱۹/۹ \pm ۰/۳۵
۲۵	۱۹/۲ \pm ۱/۶	۱۸/۴۳ \pm ۰/۱۸
۵۰	۲۱/۷۶ \pm ۱/۶	۱۴/۲۶ \pm ۱/۲
۱۰۰	۲۴/۳۲ \pm ۲/۶	۷/۷ \pm ۰/۵
۲۰۰	۲۷/۲ \pm ۱/۲	۴/۶ \pm ۰/۱۲



شکل ۲: اثر سیتوتوکسی فنکون و گلوکانتیم بر روی ماکروفازهای موشی

بحث

لیشمانیوز پوستی یکی از ۹ بیماری مهم انگلی است که در سراسر دنیا به‌ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری گسترش دارد. در حال حاضر بیماری لیشمانیوز یکی از معضلات مهم و جدی بهداشتی

^۱Colorimetry

^۱ Viability

جدول ۲: مقایسه مقادیر^۱ IC₅₀ داروها بر روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، مقادیر^۲ CC₅₀ داروها بر روی ماکروفاژ و شاخص انتخابی^۴

دارو	آماستیگوت	پروماستیگوت	ماکروفاژ	شاخص انتخابی ^۴
گلکانتیم	۱۷۵/۱۴±۲/۱۱	۶۱۳±۱۰/۹	۱۴۴±۹۷	۸/۲۴
فنکون	۸۲±۱/۲	۱۸۰±۲	۷۸۹/۹±۹/۹	۹/۶۳

^۱ غلظتی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. ^۲ غلظتی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود.

^۴ غلظتی از دارو که از رشد ۵۰٪ سلول‌ها جلوگیری می‌کند. ^۳ Selectivity Index یا شاخص انتخابی CC₅₀/IC₅₀

- Med Parasitol. 97(8): 811-816.
- Desjeux, P., 2018. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 95(3): 239-243. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490989>
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 27(5): 305-318.
- Hadighi, R.; Mohebbali, M.; Boucher, P.; Hajjaran, H.; Khamesipour, A. and Ouellette, M., 2009. Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug-Resistant *Leishmania tropica* Parasites. Handman DE, editor. PLoS Med. 3(5): e162.
- Leandro, C. and Campino, L., 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. Int J Antimicrob Agents. 22(3): 352-357.
- González, P.; Marin, C.; Rodríguez-González, I.; Hitos, A.B.; Rosales, M.J. and Reina, M., 2005. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. Int J Antimicrob Agents. 25(2): 136-141.
- Minodier, P. and Parola, P., 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis. 5(3): 150-158.
- Mishra, B.B.; Kale, R.R.; Singh, R.K. and Tiwari, V.K., 2009. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia. 80(2): 81-90
- Lamidi, M.; DiGiorgio, C.; Delmas, F.; Favel, A.; Mve-Mba, C.E. and Rondi, M.L., 2005. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. J Ethnopharmacol. 102(2): 185-190.
- Lanza, H.; Afonso-Cardoso, S.R.; Silva, A.G.; Napolitano, D.R.; Espindola, F.S. and Pena, J., 2004. Comparative effect of ion calcium and magnesium in the activation and infection of the murine macrophage by *Leishmania major*. Biol Res. 37(3): 385-393.
- Ahmadpour, M.; Varasteh Moradi, H.; Rezaei, H.R.; Oshaghi, M.A. and Hosseinzadeh Colagar, A., 2018. Modeling of the Geographical Distribution Effects of Great Gerbil (*Rhombomys opimus*) on Distribution of Sandfly *Phlebotomus papatasi* in Golestan Province. Journal of animal Environmental. 9(4): 73-80. (In Persian)
- WHO (World Health Organization). 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis.
- Mikus, J. and Steverding, D., 2000. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. Parasitol Int. 48(3): 265-259.
- Kazemi, M. and Saleh, H., 2021. In vitro evaluation of medicinal plants including *Artemisia aucheri* Boiss, *Salvia lerifolia* Benth, *Achillea santolina*, and *Nepeta glomerulosa* in livestock diet. Journal of animal Environmental. 13(1): 81-92. (In Persian)

با توجه به IC₅₀ بالای داروی کنترل، که ملاک قیاس با عصاره فنکون مطالعه است، بنابراین انتخاب غلظت‌های مختلف داروی کنترل و مقایسه آن با هر کدام از غلظت‌های عصاره، این تاثیر را به‌طور قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد. هم‌چنین در این مطالعه میزان سمیت دارو مورد نظر بررسی شد که این آزمایش نیز به روش رنگ‌سنجی MTT انجام شد و با توجه به نتایج می‌توان گفت که این دارو دارای سمیت بسیار تا بسیار کم‌تری نسبت به داروی کنترل است که یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب یک دارو جهت درمان بیماری می‌باشد، به نحوی که شاخص انتخابی برای گلکانتیم ۸/۲۴ درحالی‌که برای فنکون این شاخص برابر ۹/۶ است. نتایج این مطالعه نشان داد که داروی کنترل (گلکانتیم) دیگر به اندازه گذشته دارای تاثیر بر روی ارگانسیم نیست و ارگانسیم نسبت به این دارو مقاومت پیدا کرده است و پیدا کردن و کشف دارویی جدید که دارای اثرات سمی کم‌تر و اثر مهاری بیش‌تری باشد، بیش از پیش اهمیت پیدا کرده است (۱۸). با توجه به این نتایج که نشان از تاثیر مطلوب عصاره بر روی آماستیگوت و پروماستیگوت دارد، ضرورت انجام آزمایشات بیش‌تری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا به‌صورت برون‌تنی و در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود.

منابع

- Hosseini, S. and Dadakhah Tehrani, S., 2020. Trypanosomatide in Iran and the world. Publications of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. 7-32. (In Persian)
- Edrisiyan, G.H., 1996. Visceral Leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in the diagnosis and epidemiological studies. J Kerman Univ Med Sci. 3(2): 97-108.
- Kubba, R.; Al-Gindan, Y.; El-Hassan, A.M. and Omer, A.H.S., 1987. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis (oriental sore). J Am Acad Dermatol. 16(6): 1183-1189.
- Zink, A.R.; Spigelman, M.; Schraut, B.; Greenblatt, C.L.; Nerlich, A.G. and Donoghue, H.D., 2006. Leishmaniasis in ancient Egypt and upper Nubia. Emerg Infect Dis. 12(10): 1616.
- Moemenbellah-Fard, M.D.; Kalantari, M.; Rassi, Y. and Javadian, E., 2003. The PCR-based detection of *Leishmania major* infections in *Meriones libycus* (Rodentia: Muridae) from southern Iran. Ann Trop