14(1) 337-342, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Therapeutic effect of herbal medicine Fenchone on *Leishmania major* in vitro

Sara Asayesh [1], Seyed Reza Hosseini [*1], Iraj Shafiei [2], Bagher Amir Heidari [3]

[1]Department of Veterinary Patobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2]Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[3]Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Key Words
Fenchone
Glucantime
Leishmanicidal activity
Leishmania major
Promastigote
Amastigote

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is parasitic diseases with widely spread in world. *Leishmania major* and *L. tropica* cause cutaneous leishmaniasis (CL). Clinically, lesions caused by *L. major* last longer. This study was designed to evaluate the leishmanicidal activity of fenchone as a plant extract on *L. major* stages.

Materials & Methods: Various concentrations of fenchone against *L. major* stages by MTT assay and macrophage model were used and the inhibitory concentration 50 (IC50) was calculated by counting of the parasites. For intramacrophage amastigotes, the leishmanicidal activity was evaluated by the mean number of amastigotes and IC50 values.

Results: The findings showed that extract of fenchone inhibited the proliferation rate of Promastigotes and amastigotes ($P<0.001$). The mean IC50 values of amastigotes for fenchone were 82 vs. 175.1 (µg/ml) glucantime. Also, the mean IC50 values of promastigotes for fenchone were 180 vs. 613 (µg/ml) glucantime. The SI index for Fenchone was 9.6, while that for glucantime was 8.24.

Conclusion: This study revealed that extract of fenchone prevented the development of the promastigotes and amastigotes. Also, toxicity of fenchone is less than standard drug (glucantime).

* Corresponding Author's email: dr.s.reza@gmail.com
Received: 24 July 2021; Reviewed: 28 June 2021; Revised: 3 October 2021; Accepted: 4 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.307345.2649

مقاله پژوهشی

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 (IC۵۰) با شمارش انگل‌ها محاسبه شد. برای آماستیگوت‌های درون ماکروفاژ، فعالیت ضدلیشمانیایی به‌وسیله شمارش میانگین تعداد آماستیگوت‌ها و مقدار IC۵۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب نوری توسط الایزا برای تعیین مقادیر IC۵۰ برای پروماستیگوت‌ها اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که عصاره فنکون باعث کاهش میزان تکثیر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها می‌شود (P<۰/۰۰۱). میانگین مقادیر IC۵۰ آماستیگوت‌ها برای فنکون برابر با ۸۲ درمقابل ۱۷۵/۱ میکروگرم برمیلی‌لیتر داروی گلوکانتیم بود. هم‌چنین میانگین مقادیر IC۵۰ پروماستیگوت‌ها برای فنکون برابر با ۱۸۰ در مقابل ۶۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی گلوکانتیم بود. میزان شاخص انتخابی برای فنکون ۹/۶ بود در حالی‌که این مقدار برای داروی گلوکانتیم برابر با ۸/۲۴ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ارگانیسم 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.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.s.reza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲ مرداد ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۷ تیر ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۱ مهر ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آبان ۱۴۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.307345.2649

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 درنظرگرفته 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 برحسب 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 پشه خاکی 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 ماژور*[۲] می‌باشند (۵). گستردگی این بیماری در تمام قاره‌های جهان به‌جز استرالیا مشهوداست. 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- ۱/۵میلیون 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 بعداز 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 جایی‌که 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 بیماری‌در 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 این‌که مصرف‌داروهای 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 گلوکانتیم‌می‌تواند 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. بدین‌ترتیب 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.

[۱] *L. tropica*

[۲] *L. major*

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی انگل *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد: انگل *لیشمانیاماژور* سویه استاندارد(MRHO/IR/75/ER) که‌از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بود، از فریزر خارج گردید و در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در طی ۳-۲ روز بعد، هر روز محیط حاوی انگل را به‌مدت ۴۵-۲۰ دقیقه شیکر کرده و با میکروسکوپ معکوس[1]به بررسی رشد انگل پرداخته شد. هر روز با لام نئوبار تعداد انگل شمارش گردید به این ترتیب که ۱۰۰ لاندا از محیط حاوی انگل برداشته و با ۱۰۰ لاندا از 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[2]محتوی ۱۵-۱۰٪ بافر فسفات سالین و ۱/۵-۱٪ پنی‌سیلین استرپتومایسین در فلاسک‌های ۵۰ سی‌سی ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه که همراه با ۵٪ دی اکسیدکربن 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[3]به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول‌رویی 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 درنظر 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 دایلوشن این غلظت، سایر غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ ، ۲۵ و ۱۲/۵ ساخته شد.

فنکون (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 دایلوشن 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 دی اکسیدکربن به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس پروماستیگوت‌های شمارش شده که در فاز ثابت رشد بودند، به‌میزان ۱۰ برابر تعداد ماکروفاژها یعنی ۱۰۰ هزار انگل در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به لام‌های پلیت دوم به بعد اضافه شدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه برگردانده شدند و بعد از طی زمان موردنظر 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، درنظر گرفته شدند.لازم به‌ذکر است که هر رقت دارویی بر روی سه لام ریخته شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ساعت در انکوباتور ۳۷درجه‌سانتی‌گرادو با ۵درصددی اکسیدکربن انکوبه گردیدند. پس از گذشت زمان ۷۲ ساعته، محتویات لام‌ها را خالی کرده و بعد از این‌که 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.

سنجش‌مهار پروماستیگوت: ابتدا درهریک ازچاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* که حاوی ۵۰ هزار انگل در فاز ثابت رشد است

[1] Invert

[2] DMEM =(Dulbecco’s Modified Eagle Medium)

[3] RPM

اضافه شد. پس از آن رقت‌های مختلف دو دارو، گلوکانتیم که به‌عنوان داروی خط اول درمان است و فنکون به‌ترتیب به خانه‌های دارای انگل افزوده شد. تمامی رقت‌ها به‌صورت سه تایی ریخته شدند. در سه خانه اول پلیت هیچ انگلی وارد نشد تا به‌عنوان بلانک تست (کنترل منفی) محسوب گردند و در سه خانه دوم نیز انگل ریخته ولی هیچ دارویی اضافه نشد تا به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شوند. سپس پلیت به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگی MTT آماده‌شده (میزان ۵ میلی‌گرم رنگ در ۱ سی‌سی محلول بافر فسفات سالین) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت مجدداً به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از گذشت زمان ۴ ساعت پلیت ازانکوباتور خارج شدو به هر یک ازچاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپرانول اضافه گردید تا فورمازان تولید شده به شکل محلول درآید. در نهایت پلیت‌ها برای خوانش در دستگاه الایزا ریدر (Biotek ELx800 U.S.A) قرار داده شد و با طول موج ۴۹۰ نانومتر جذب نوری[1] چاهک‌ها قرائت گردید.

آزمایش بررسی سمیت دارو: سیتوتوکسیسیته (یاخته آزاری) یا اثر سمی دارو بر سلول‌های میزبان به‌میزان سمیت دارو بر روی ماکروفاژهای موشی گفته می‌شود که باعث جلوگیری از رشد ۵۰٪ از ماکروفاژها می‌شود که هر چه‌قدر 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 ۹۰میکرولیتر ماکروفاژ موشی ریخته و به هر یک از آن‌ها به‌صورت سه‌تایی[2] و به‌ترتیب غلظت‌های دو دارو (گلوکانتیم و فنکون) به‌میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. در سه خانه اول پلیت به‌جای دارو، محیط کشت اضافه گردید و به‌عنوان کنترل استفاده شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵٪ دی‌اکسیدکربن، به‌مدت 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 بودو در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد، به آن‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ ثانیه آن‌ها خوب شیک شد تا به طور کامل مخلوط شوند. سپس پلیت‌ها به‌مدت 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 الایزا ریدر ذکر شده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر میزان جذب نوری آن‌ها قرائت گردید.

نتایج

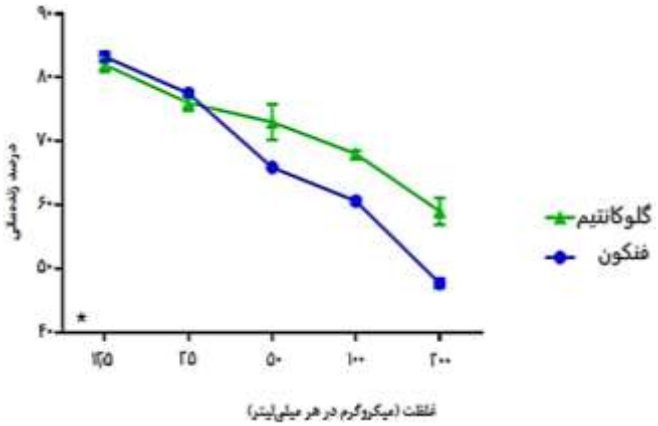
تاثیر ضدلیشمانیایی بر پروماستیگوت خارج سلولی *لیشمانیا ماژور*: در این مطالعه از غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فنکون و گلوکانتیم استفاده شد که با توجه به نتایج حاصل، مشخص شد که از گذشته تا به امروز از میزان تاثیر گلوکانتیم بر انگل *لیشمانیا* کاسته شده و ارگانیسم نسبت به گلوکانتیم کم کم مقاوم شده است. این موضوع در قیاس نتایج تاثیر گلوکانتیم و فنکون بر روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های *لیشمانیا* قابل مشاهده است، به‌طوری‌که 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 درحالی‌که فنکون با افزایش غلظت، خصوصاً از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور 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<۰/۰۰۱). میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از انگل‌های *لیشمانیا ماژور* می‌شود برای فنکون در برابر انگل‌های خارج سلولی، ۲±۱۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. درحالی‌که مقدار IC۵۰ برای داروی گلوکانتیم به‌عنوان داروی کنترل ۱۰/۹±۶۱۳ میکرو گرم در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۱ و شکل ۱).

تاثیر ضدلیشمانیایی بر آماستیگوت‌های داخل سلولی *لیشمانیا 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<۰/۰۵). فنکون نسبت به داروی استاندار گلوکانتیم به‌طور قابل توجهی موثرتر (P≤۰/۰۰۱) بود (جدول ۱). مقدار IC۵۰ برای فنکون در برابر انگل‌های داخل سلولی، ۱/۶±۸۲ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. درحالی‌که مقدار IC۵۰ برای داروی گلوکانتیم به‌عنوان داروی کنترل ۱۱/۲±۱۷۵/۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۲).

سیتوتوکسیستی فنکون در مقایسه با داروی استاندارد گلوکانتیم: به‌منظور 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 ۹/۹±۷۸۹/۹ و برای گلوکانتیم ۲۵±۱۴۲۵ بود. با توجه به این نتایج و هم‌چنین میزان IC۵۰ یعنی میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از انگل‌های *لیشمانیا ماژور* می‌شود، شاخص انتخابی برای فنکون و گلوکانتیم به‌ترتیب برابر است با ۹/۶ و ۸/۲۴ که نشان از سمیت کم‌تر و تاثیر بیش‌تر فنکون بر روی انگل‌های *لیشمانیا ماژور* دارد (شکل ۲).

[1] Optical Density

[2] Triplicate

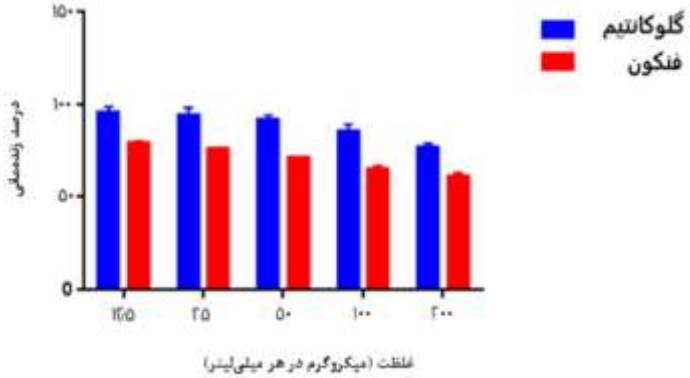


شکل ۱: درصد بازدارندگی فنکون بر روی رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در مقایسه با گلوکانتیم به‌عنوان داروی کنترل به‌روش رنگ‌سنجی (MTT)

*: P<۰/۰۰۱ تفاوت قابل توجهی در مقایسه با گروه بدون درمان

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف فنکون و گلوکانتیم بر میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در هر ماکروفاژ × ۱۰۰ به‌صورت سه‌تایی بامقدار احتمال یک درصد

غلظت	گلوکانتیم	فنکون
میکروگرم/ میلی‌لیتر	میانگین± انحراف معیار	میانگین± انحراف معیار
۰ (کنترل مثبت)	۳۲ ± ۱/۲	۲۱/۶ ± ۰/۷
۱۲/۵	۱۵/۰۴ ± ۰/۹	۱۹/۹± ۰/۳۵
۲۵	۱۹/۲ ± ۱/۶	۱۸/۴۳ ± ۰/۸
۵۰	۲۱/۷۶ ± ۱/۶	۱۴/۲۶± ۱/۲
۱۰۰	۲۴/۳۲ ± ۲/۶	۷/۷ ± ۰/۵
۲۰۰	۲۷/۲ ± ۱/۲	۴/۶ ±۰/۲



شکل ۲: اثر سیتوتوکسی فنکون و گلوکانتیم بر روی ماکروفاژهای 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 است، اگرچه لیشمانیوز احشایی مرگ و میر بالاتری دارد، اما لیشمانیوز پوستی شیوع و گستردگی بیش‌تری 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 درصورت‌عدم‌درمان برای یک‌سال و یا بیش‌تر 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 ارگانیسم نسبت به این داروها نسبتاً مقاوم شده‌اند. برای تعیین میزان زنده بودن[1] 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[2] که جهت بررسی رشد و زنده بودن ارگانیسم بر روی پلیت انجام می‌شوند، فواید زیادی دارند ازجمله این‌که این روش‌ها علاوه بر سهولت انجام و ارزان بودن، سریع، حساس و قابل اعتماد هستند و هم‌چنین فاقد هرگونه ماده رادیو ایزوتوپ هستند، از این‌رو 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 فورمازان غیرمحلول احیا می‌شود(۱۲). این روش به‌صورت‌وسیعی جهت بررسی رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* به‌کار می‌رود (۱). براساس نتایج به‌دست آمده در طی این مطالعه، نشان داده شد که با افزایش غلظت دارو و مدت‌زمان، 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 واختلاف معنی‌داری بین آن‌ها می‌باشد. براساس نتایج حاصل، عصاره فنکون از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا دارای تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی ارگانیسم است و نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری دارد.

[1] Viability

[2] Colorimetry

جدول ۲: مقایسه مقادیر[۱و۲] IC۵۰ داروها بر روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور*، مقادیر[۳] CC۵۰ داروها بر روی ماکروفاژ و شاخص انتخابی[۴]

دارو	آماستیگوت	پروماستیگوت	ماکروفاژ	
	غلظتی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* با مقدار احتمال ۵ درصد می‌شود[۱] (±انحراف معیار)	غلظتی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰٪ از پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* با مقدار احتمال یک درصد می‌شود (±انحراف معیار)	غلظتی از دارو که از رشد ۵۰٪ سلول‌ها جلوگیری می‌کند.	شاخص انتخابی[۴]
گلوکانتیم	۱۷۵/۱۴±۲/۱۱	۶۱۳ ±۱۰/۹	۱۴۴۲ ± 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.
[۳]غلظتی از دارو که از رشد ۵۰٪ سلول‌ها جلوگیری می‌کند. [۴] Selectivity Index یا شاخص انتخابی CC_{50}/IC_{50}[a]

با توجه به IC۵۰ بالای داروی کنترل، که ملاک‌قیاس‌با عصاره فنکون مطالعه است،بنابراین انتخاب‌غلظت‌های 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 گلوکانتیم ۸/۲۴ درحالی‌که برای فنکون این شاخص برابر ۹/۶ است. نتایج این مطالعه نشان داد که داروی کنترل (گلوکانتیم) دیگر به اندازه گذشته دارای تاثیر بر روی ارگانیسم نیست و ارگانیسم 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 عصاره‌بر روی‌آماستیگوت و پروماستیگوت‌دارد،ضرورت‌انجام‌آزمایشات بیش‌تری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا به‌صورت برون‌تنی و در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود.

منابع

1. **Hosseini, S. and Dadadkhah Tehrani, S., 2020.** Trypanosomatide in Iran and the world. Publications of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. 7-32. (In Persian)
2. **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.
3. **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.
4. **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.
5. **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 Med Parasitol. 97(8): 811-816.
6. **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
7. **Desjeux, P., 2004.** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 27(5): 305-318.
8. **Hadighi, R.; Mohebali, 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.
9. **Leandro, C. and Campino, L., 2003.** Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. Int J Antimicrob Agents. 22(3): 352-357.
10. **González, P.; Marín, 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.
11. **Minodier, P. and Parola, P., 2007.** Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis. 5(3): 150-158.
12. **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
13. **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.
14. **Lanza, H.; Afonso-Cardoso, S.R.; Silva, A.G.; Napolitano, D.R.; Espíndola, 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.
15. **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 (*Rhombomis opimus*) on Distribution of Sandfly *Phlebotomus papatasi* in Golestan Province. Journal of animal Environmental. 9(4): 73-80. (In Persian)
16. **WHO (World Health Organization). 2010.** Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases.
17. **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.
18. **Kazemi, M. and Saleh, H., 2021.** In vitro evaluation of medicinal plants including *Artemisia aucheri* Boiss, *Salvia leriifolia* Benth, *Achilea santolina*, and *Nepeta glumerulosa* in livestock diet. Journal of animal Environmental. 13(1): 81-92. (In Persian)